



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2018

5. dubna 2018

**Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava
areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice**

Editor: Olga Mařátková

Praha 2018

Pořádající instituce:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Sponzoři, spolupracující společnosti a hosté:

EPS biotechnology s.r.o.

Heineken Česká republika

Lonza Biotec s.r.o.

Pivovar Litovel a.s.

Pivovar Protivín a.s.

Pivovary Staropramen s.r.o.

Pivovar Zubr a.s.

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Přípravný a organizační výbor:

doc. Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

doc. Ing. Olga Maňátková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani odbornou úpravou. Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018

ISBN 978-80-7592-022-5

Obsah

Boková S.: Ověření účinnosti látek s antibiofilmovou aktivitou vůči vybraným patogenům	8
Čadková A.: Adsorpce endokrinních disruptorů na řasovou biomasu	14
Dejmková K.: Možnosti inhibice kolonizace titanových materiálů	21
Drbohlavová J.: Vliv extraktů <i>Vitis vinifera</i> na biofilm rodu <i>Candida</i>	26
Kašparová P.: Vliv vybraných biologicky aktivních látek na růst <i>Staphylococcus epidermidis</i>	33
Lokočová K.: Biofilmy oportunně patogenních mikroorganismů a možnosti jejich potlačení	38
Lucáková S.: Heterotrofní kultivace jednobuněčných řas s využitím alternativních zdrojů substrátu	43
Michailidu J.: Udržitelná produkce nanočástic stříbra za použití extraktu <i>Vitis vinifera</i>	44
Musilová V.: Vliv nanočástic kovů na patogenní bakterie rostoucí v suspenzi a biofilmu	48
Neřoldová Š.: Vliv nutričních faktorů a kultivačních podmínek na růst bakterií <i>Salinispora tropica</i>	49
Potočár T.: Využití materiálů schopných modifikovat vlnovou délku světla v kultivaci fototrofních organismů	50
Sembolová E.: Antibiofilmové vlastnosti biologicky aktivních látek v kombinaci s netermálním plazmatem	56
Štursová J.: Možnosti cíleného potlačení tvorby biofilmů a jejich stability pomocí derivátů kobalt bis-1,2-dikarbolidu	63
Vlček J.: Použití sorbentů pro zvýšení stability pивní pěny	69
Vlčková V.: Porovnání sorpčních materiálů k odstranění mikropolutantů z odpadních vod	70

Program konference

1. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C: studenti DSP		
9:00 - 9:05	Zahájení konference	
9:05 - 9:35	Lonza Biotec s.r.o.: firemní prezentace	
9:35 - 9:45	<u>Čadková A.</u> , Jelínek L., Brányik T. Adsorpce endokrinních disruptorů na řasovou biomasu	
9:45 - 9:55	<u>Chalupa J.</u> , Vlčková V., Halecký M. Problematika využití bioreaktorů pro čištění horkých odpadních plynů	
9:55 - 10:05	<u>Ježková Z.</u> , Brányik T. Kultivační techniky bakterie <i>S. tropica</i> zaměřené na izolaci extraktu karotenoidů	
10:05 - 10:15	<u>Kaufman F.</u> , Rumlová M. Příprava a studium proteinu BCA3	
10:15 - 10:25	<u>Lokočová K.</u> , Masák J. Biofilmy oportunně patogenních mikroorganismů a možnosti jejich potlačení	
10:20 - 10:30	<u>Michailidu J.</u> , Čejková A. Biosyntéza nanočástic kovů a jejich aktivita	
10:30 - 10:40	<u>Potočár T.</u> , Brányik T.: Využití materiálů schopných modifikovat vlnovou délku světla v kultivaci fototrofních organismů	
10:40 - 10:50	<u>Vlčková V.</u> , Chalupa J., Halecký M. Porovnání sorpčních materiálů k odstranění mikropolutantů z odpadních vod	
10:50 - 11:20	přestávka	

2. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C: studenti MSP		
11:20 - 11:30	<u>Dvořáková M.</u> , Branská B. Valorizace zemědělských odpadů pomocí fermentačních procesů	
11:30 - 11:40	<u>Müllerová J.</u> , Jelínek L. Využití chmelového extraktoru pro zlepšení kvality studeně chmelených piv	
11:40 - 11:50	<u>Plot L.</u> , Jelínek L. Využití odhořčených chmelových materiálů pro zlepšení stability pивní pěny	
11:50 - 12:00	<u>Prchal J.</u> , Nešpor J., Karabín M. Obohacování chmelového materiálu biologicky aktivními prenylovanými flavonoidy	
12:00 - 12:10	<u>Stručková E.</u> , Gharwallová L., Nešpor J., Karabín M. Stanovení biogenních aminů v alkoholických nápojích	
12:10 - 12:20	<u>Šenkárčinová B.</u> , Brányik T. Optimalizace provozních podmínek kvašení piva využívající probiotické kvasinky	
12:20 - 12:30	<u>Vlček J.</u> , Brányik T. Vliv sorbentů na stabilitu pивní pěny	
12:30 - 13:30	přestávka	

3. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL A: studenti MSP	
11:20 - 11:30	<u>Boková S.</u> , Vaňková E., Paldrychová M., Lokočová K., Masák J. Ověření antibiofilmové aktivity chitosanu vůči vybraným patogenům
11:30 - 11:40	<u>Červenková V.</u> , Raschmannová H., Paulová L.: Biotechnologická produkce probiotik a organických kyselin jako doplňku krmiv hospodářských zvířat
11:40 - 11:50	<u>Dejmková K.</u> , Lokočová K., Mařátková O. Možnosti inhibice kolonizace titanových materiálů
11:50 - 12:00	<u>Drbohlavová J.</u> , Paldrychová M., Gharwalová L., Kolouchová I. Vliv extraktů <i>Vitis vinifera</i> na biofilm rodu <i>Candida</i>
12:00 - 12:10	<u>Grusová K.</u> , Chalupa J., Halecký M. Biofiltrace odpadních plynů za termofilního režimu provozu
12:10 - 12:20	<u>Hnatajko L.</u> , Drahokoupil M., Patáková P.: Bakteriální produkce kyseliny mléčné a různé způsoby její izolace z kultivačního média
12:20 - 12:30	<u>Kašparová P.</u> , Lokočová K., Mařátková O.: Vliv vybraných biologicky aktivních látek na růst <i>Staphylococcus epidermidis</i>

12:30 - 13:30	přestávka
----------------------	------------------

4. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C: studenti MSP	
13:30 - 13:40	<u>Kurková Š.</u> , Dostálková A., Rumlová M. Strukturně-funkční studie stabilního alfa helixu myšího leukemického viru
13:40 - 13:50	<u>Lucáková S.</u> , Kaštánek P.: Heterotrofní kultivace jednobuněčných řas s využitím alternativních zdrojů substrátu
13:50 - 14:00	<u>Matoušová M.</u> , Patrovský M., Patáková P. Produkce sekundárních metabolitů houbou <i>Monascus purpureus</i>
14:00 - 14:10	<u>Musilová V.</u> , Koukalová M., Čejková A. Vliv nanočástic kovů na patogenní bakterie rostoucí v suspenzi a biofilmu
14:10 - 14:20	<u>Neřoldová Š.</u> , Ježková Z., Brányik T. Vliv nutričních faktorů a kultivačních podmínek na růst bakterií <i>Salinispora tropica</i>
14:20 - 14:30	<u>Pánek T.</u> , Chalupa J., Halecký M. Analýza a modelování dat z náplňového bioreaktoru pro čištění odpadních plynů

5. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL A: studenti MSP	
13:30 - 13:40	<u>Sembořlová E.</u> , Paldrychová M., Vaňková E.: Antibiofilmové vlastnosti biologicky aktivních látek v kombinaci s netermálním plazmatem
13:40 - 13:50	<u>Straková Z.</u> , Chmátal M., Patáková P.: Příprava a aplikace biokatalyzátoru pro bioremediaci odpadních vod z koksárenského průmyslu
13:50 - 14:00	<u>Štursová J.</u> , Lokočová K., Masák J.: Možnosti cíleného potlačení tvorby biofilmů a jejich stability pomocí derivátů kobalt bis-1,2-dikarbolidu
14:00 - 14:10	<u>Urbanová K.</u> , Brányiková I., Brányik T.: Srovnání účinnosti separace řas <i>Chlorella vulgaris</i> pomocí alkalické flokulace a elektroflokulace
14:10 - 14:20	<u>Vetýšková V.</u> , Kaufman F., Rumlová M.: Příprava, charakterizace a porovnání biochemických vlastností isoform I a II lidského ameloblastinu
14:20 - 14:30	<u>Vrublevskaya M.</u> , Gharwalová L., Kolouchová I. Inhibiční účinky antibiotik a boswellových kyselin na rod <i>Candida</i>

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Ověření účinnosti látek s antibiofilmovou aktivitou vůči vybraným patogenům

Boková S., Paldrychová M., Lokočová K., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Biofilmy mikroorganismů, v porovnání se suspenzními buňkami, se vyznačují zvýšenou odolností vůči přítomnosti některých přírodních i syntetických látek, zejména antibiotik. Právě snížená citlivost vůči antibiotikům je častou příčinou vzniku tzv. nozokomiálních infekcí. Příkladem je zhoršení stavu pacientů s cystickou fibrózou způsobené infekcí oportunního patogenu *Pseudomonas aeruginosa*. Potencionálním agens v boji proti tvorbě biofilmu je chitosan, který se se svými vlastnostmi řadí mezi biologicky aktivní látky vhodné pro aplikaci ve zdravotnictví.

Definice biofilmu

Prvním sledovaným biofilmem, a zároveň dodnes nejvíce studovaným, byl zubní plak. Přichycené mikroorganismy na zubní sklovině, včetně povlaku na sliznici jazyka, sledoval již v roce 1683 A. van Leewenhoek, vynálezce prvního mikroskopu (Høiby, 2014). Průkopníkem ve studiu a determinaci biofilmu se stal kanadský mikrobiolog J. W. Costerton (Costerton a Lewandowski, 1995). Pod jeho vedením byly mikroskopovány a fotograficky snímány vzorky z vodních výměníků tepla, alpských proudů, a především lidských tkání. J. W. Costerton dokázal přítomnost extracelulárního matrix („pouzdra“) u bakterie *P. aeruginosa*, v následujících letech i u jiných bakterií způsobujících nozokomiální a jiné bakteriální infekce (Lam a kol., 2012). Zabýval se detailním popisem struktury biofilmu, rovněž mechanismem adheze buněk a vlivem produkovaných metabolitů na okolní prostředí. Termín „biofilm“ se stal definitivním pro charakter této formy bakterií (později i kvasinek a mikromycet). V publikaci Costerton a Lewandowski (1995) je biofilm definován jako „uzavřená bakteriální populace adherentní k sobě navzájem a/nebo k povrchu či k rozhraní.“ Od 90. let 20. století se počet studií, které se zabývají inhibicí adheze buněk či eradikací již vzniklého biofilmu, stále zvyšuje. Příkladem je rostoucí trend počtu publikací za rok s klíčovým slovem „biofilm“ v databázi Web of Science. V roce 2010 bylo s tímto klíčovým slovem zveřejněno 2814 publikací a v roce 2017 6201 publikací.

Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa a ostatní druhy rodu *Pseudomonas* se vyskytují převážně v půdě a vodě, kde žijí saprofytický. Patří však rovněž do širokého spektra mikroorganismů, které jsou oportunně fytopatogenní, zoopatogenní a u člověka mohou být příčinou některých infekcí (zejména nozokomiálních) (Bodey a kol., 1983). Schopnost tvorby biofilmu *P. aeruginosa* je častým problémem v několika odvětvích průmyslu a zdravotnictví. Ve zdravotnictví je *P. aeruginosa* nejčastější příčinou zhoršení stavu a úmrtí pacientů s cystickou fibrózou (Brewington a Clancy, 2016). Také pacienti, kteří jsou dlouhodobě hospitalizováni, mohou být touto bakterií kolonizováni. Jejich snížená imunita a odolnost *P. aeruginosa* vůči antibiotikům může způsobit endokarditidy, meningitidy a pneumonie (Bodey a kol., 1983; Wagner a kol., 2016). Expres konkrétních bakteriálních genů kódujících tvorbu biofilmu a další virulenční faktory je zprostředkována pomocí malých signálních molekul (Lee a Zhang, 2015). *P. aeruginosa* využívá jako hlavní signální molekuly N-acyl-homoserinové laktony (Choudhary a Schmidt-Dannert, 2010).

Tab. I: Vliv vybraných virulenčních faktorů *P. aeruginosa* na tvorbu biofilmu a jejich účinek na hostitelské buňky (Adam a kol., 1997; Denning a kol., 1998; Jensen a kol., 2006; Laaman a kol., 2012; Park a kol., 2000; Wolz a kol., 1994)

Virulenční faktor	Regulovaný gen	Vliv na tvorbu biofilmu	Účinek na hostitele
Alkalická proteasa	<i>aprA</i>	Vyšší odolnost vůči imunitnímu systému hostitele	Degradace cytokinů
Elastasa	<i>lasB</i>	Zisk Fe iontů	Degradace elastinu a kolagenu buněk
Exotoxin A	<i>lasR</i>	Usnadnění kolonizace nového povrchu	Buněčná smrt
Lektiny	<i>lecA</i>	Usnadnění kolonizace nového povrchu	Paralýza řasinkového epitelu dýchacích cest
Proteasa	<i>lasA</i>	Usnadnění kolonizace nového povrchu	Porušení epitelu
Pyocyanin	<i>phz</i>	Usnadnění kolonizace nového povrchu	Příčina oxidačního stresu v buňkách, cytotoxicita
Rhamnolipidy	<i>rhlAB</i>	Podpora tvorby biofilmu	Nekróza makrofágů

Vliv biologicky aktivních látek na biofilm *P. aeruginosa*

Přibývajícím případům rezistence bakterií *P. aeruginosa* vůči standardně používaným antibiotikům indukují studium přírodních biologicky aktivních látek (BAL), které by mohly snížit tvorbu biofilmu oportunních patogenů nebo jejich virulenci (Madathil a Rajendran, 2013). K výhodám přírodních BAL oproti syntetickým preparátům patří široké spektrum jejich výskytu a lepší snášenlivost lidského organismu. Právě chitosan, polysacharid získaný N-deacetylací přírodního chitinu, je svými vlastnostmi vhodným potenciálním antimikrobiálním a antibiofilmovým agens (Kumar a kol., 2004).

Chitosan

Jedním z nejhojnějších polysacharidů v přírodě je homopolymer N-acetylglukosaminu (2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa), chitin, podle odhadů se ho nachází v přírodě až 1×10^{13} kg. Chitin je významnou součástí skeletu bezobratlých živočichů, tvoří např. schránky krabů a krevet, ve stopovém množství ho můžeme nalézt rovněž v kokonech hmyzu nebo v buněčné stěně hub (Kumar a kol., 2004). Podstatně širší využití má však chitosan, derivát chitinu, který začal být používán v zemědělství, při čištění odpadních vod, ale také k redukci tělesné hmotnosti. Komerčně je získáván bazickou N-deacetylací chitinu a obsahuje tak kromě N-acetylglukosaminu také glukosamin(2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosu), v závislosti na míře deacetylce. Ta se pohybuje v rozmezí 50 - 95 %, proto se může i molekulová hmotnost chitosanu výrazně lišit (10 - 2000kDa), (Illum, 1998; Pillai a kol., 2009). Míra deacetylce se může lišit také na základě použitého zdroje chitinu. Chitin se v přírodě nachází ve 3 isoformách, nejčastěji však ve formě obsahující $\beta(1-4)$ vazbu mezi samotnými jednotkami polymeru (Rudall a Kenchington, 1973). Míra deacetylce rovněž určuje rozpustnost chitosanu (Kumar a kol., 2004; Qin a kol., 2006).

▪ Antimikrobiální a antibiofilmová aktivita chitosanu

Účinek chitosanu je závislý na míře deacetylce a na molekulové hmotnosti (Tokura a kol., 1997). S větším počtem kladně nabitých aminoskupin stoupá jeho vliv na cytoplasmatickou membránu, kde může dojít až ke ztrátě její permeability. Značný vliv má pH okolního prostředí (při nízkém pH je množství NH_3^+ vyšší, tím se zvyšuje počet elektrostatických interakcí chitosanu s jinými molekulami) a také složení obalových struktur mikroorganismu. Vnější vrstva lipopolysacharidů gramnegativních bakterií vykazuje vyšší odolnost vůči působení chitosanu než obaly grampozitivních bakterií (Helander a kol., 2001; Park a kol., 2011; Verlee a kol., 2017). Schopnost chitosanu vázat různé ionty kovů je jedním z důvodů jeho

antimikrobiální aktivity. Chelatace iontů Ca^{2+} a Mg^{2+} narušuje stabilitu vnější membrány a může tak dojít ke ztrátě některých živin. Chitosan je rovněž schopen vázat ionty, které působí jako kofaktory některých enzymů čímž dochází k inaktivaci enzymů důležitých pro metabolismus buňky (Bhatia a Ravi, 2003; Tsai a Su, 1999). Po narušení cytoplasmatické membrány může chitosan penetrovat až do cytosolu, nízkomolekulární chitosan až do jádra, kde se může vázat na další negativně nabitě molekuly a ovlivnit životaschopnost buňky (Fei Liu a kol., 2001).

Závěr

Vzhledem k biodegradabilitě, netoxicitě vůči živočichům a levné výrobě je chitosan využíván v mnoha oblastech průmyslu. Své uplatnění si našel v kosmetice, při výrobě fotografií, papíru, baterií a při čištění odpadních vod (Arof a kol., 1995; Habibie a kol., 2016; Majeti a Kumar, 2000). Největší potenciál má však jeho použití ve zdravotnictví. Svými vlastnostmi je ideálním materiálem pro výrobu kontaktních čoček, lze ho využít jako antikoagulační agens a také k vychytávání lipidů ze stravy u obézních pacientů (Gades a Stern, 2005; Hirano, 1999; Vongchan a kol., 2002). Jeho antimikrobiální aktivita a nízká toxicita v porovnání s jinými přírodními polysacharidy z něj činí vhodné agens v boji proti tvorbě biofilmu (Kong a kol., 2010). Letální dávka LD50 chitosanu u myši byla stanovena na hodnotu 16 g/(den×kg) (Raafat a Sahl, 2009).

Literatura

- Adam E. C., Mitchell B.S., Schumacher D.U., Grant G., Schumacher U. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155, str. 2102-2104.
- Arof A.K., Subban R.H.Y., Radhakrishna S. (1995) Solid State Batteries from Chitosan Based Biopolymers. In *Polymers and Other Advanced Materials* (Prasad, P. N. a kol.) Springer
- Bhatia S.C., Ravi N. (2003) A Mössbauer study of the interaction of chitosan and D-glucosamine with iron and its relevance to other metalloenzymes. *Biomacromolecules*, 4, str. 723-727.
- Bodey G.P., Bolivar R., Fainstein V., Jadeja L. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*, 5, str. 279-313.
- Brewington J., Clancy J.P. (2016) Diagnostic Testing in Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine*, 37, str. 31-46.
- Costerton J.W., Lewandowski Z. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, str. 711-745.
- Denning G.M., Wollenweber L.A., Railsback M.A., Cox C.D., Stoll L.L., Britigan B.E. (1998) *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, 66, str. 5777-5784.
- Fei Liu X., Lin Guan Y., Zhi Yang D., Li Z., De Yao K. (2001) Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, str. 1324-1335.

- Gades M.D., Stern J.S. (2005) Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. *Journal of the American Dietetic Association*, 105, str. 72-77.
- Habibie S., Hamzah M., Anggaravidya M., Kalemang E. (2016) The effect of chitosan on physical and mechanical properties of paper. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science*, 7, str. 1-10.
- Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. (2001) Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, str. 235-244.
- Hirano S. (1999) Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, 48, str. 732-734.
- Høiby N. (2014) A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*, 70, str. 205-211.
- Choudhary S., Schmidt-Dannert C. (2010) Applications of quorum sensing in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, str. 1267-1279.
- Illum L. (1998) Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*, 15, str. 1326-1332.
- Jensen V., Löns D., Zaoui C., Bredenbruch F., Meissner A., Dietrich G., Münch R., Häussler S. (2006) RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways. *Journal of Bacteriology*, 188, str. 8601-8606.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, str. 51-63.
- Kumar M.N.V.R., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J. (2004) Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 104, str. 6017-6082.
- Laaman A.J., Bardoel B.W., Ruyken M., Fernie J., Milder F.J., van Strijp J.A., Rodjakkers S.H. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *Journal of Immunology*, 183, str. 386-393.
- Lam J.S., Graham L.L., McLean R.J.C. (2012) Obituary - The scientific world has lost a leading Canadian microbiologist. *Canadian Journal of Microbiology*, 58, str. 3-4.
- Lee J., Zhang L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6, str. 26-41.
- Madathil D., Rajendran N. (2013) Prevention and Inhibition of Environmental Biofilms: Future Perspectives. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4, str. 1398-1409.
- Majeti N.V., Kumar M.N.V.R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, str. 1-27.
- Park P.W., Pier G.B., Preston M.J., Goldberger O., Fitzgerald M.L., Bernfield M. (2000) Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, str. 3057-3064.
- Park S.C., Nah J.W., Park Y. (2011) pH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. *Macromolecular Research*, 19, str. 853-860.
- Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, str. 641-678.
- Qin C., Li H., Xiao Q., Zhu J., Du Y. (2006) Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63
- Raafat D., Sahl H.-G. (2009) Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, 2, str. 186-201.

Rudall K.M., Kenchington W. (1973) The chitin system. *Biological Reviews*, 40, str. 597-636.

Tokura S., Ueno K., Miyazaki S., Nishi N. (1997) Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular Symposia*, 120, str. 1-9.

Tsai G.-J., Su W.-H. (1999) Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62, str. 239-243.

Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. (2017) Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, str. 268-283.

Vongchan P., Sajomsang W., Subyen D., Kongtawelert P. (2002) Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. *Carbohydrate Research*, 337, str. 1239-1242.

Wagner S., Sommer R., Hinsberger S., Lu C., Hartmann R.W., Empting M., Titz A. (2016) Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, str. 5929-5969.

Wolz C., Honloch K., Ocaktan A., Poole K., Evans R.W., Rochel N., Albrecht-Gary A.M., Abdallah M.A., Doring G. (1994) Iron release from transferrin by pyoverdine and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 62, str. 4021-4207.

Adsorpce endokrinních disruptorů na řasovou biomasu

A. Čadková, L. Jelínek, T. Brányik

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Endokrinní disruptory (EDC, z anglického endocrine disrupting compounds) jsou látky znečišťující životní prostředí exogenního původu, které mohou způsobit interakci s endokrinním systémem živých organismů. Mají specifické vlastnosti, které výrazně znesnadňují nebo přímo znemožňují jejich odstranění v běžných čističkách odpadních vod. Proto je nutný vývoj a nasazení nových specifických metod. Běžně využívaný sorbent na odstraňování EDC je aktivní uhlí, jehož využití a likvidace je ovšem investičně i provozně náročné. Řasová biomasa je lehce biodegradovatelný materiál s vysokým sorpčním potenciálem, který byl už dokázán v mnoha studiích. V tomto projektu byla testována sorpční kapacita biomasy *Chlorella vulgaris*. Bylo vybráno sedm steroidních hormonů, spadající mezi EDC, s různou strukturou, u kterých proběhla řada sorpčních testů. Naměřená účinnost sorpce byla velice rozdílná. Nejlépe se sorbovaly hormony s rozvětvenou strukturou obsahující konjugované dvojné vazby. Bylo zjištěno, že k ustálení sorpce dochází mezi 12 – 24 hodinami a optimální množství sorbentu při koncentraci hormonů v roztoku 10 µg/l je 1 g/l. Vysoká míra sorpce byla zaznamenána pro megestrol acetát (95%), ethinylestradiol (72 %), progesteron (52 %) a estron (35%). Pro testosteron, desogestrel a kortison byla účinnost sorpce nižší než 10 %.

Úvod

Odpadní vody jsou kontaminovány širokou škálou škodlivých látek, včetně reziduí léčiv, chemikálií pocházející z kosmetiky, domácích přípravků či pesticidů. Jedna skupina z těchto problematických látek se souhrnně nazývá endokrinní disruptory (dále jen EDC, z anglického endocrine disrupting compounds). EDC jsou látky exogenního původu, které negativně ovlivňují zdraví organismů a jejich potomstva narušováním jejich endokrinních funkcí. V životním prostředí se často vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (v řádu ng/l až µg/l). Jedná se o velice rozmanitou skupinu látek, do které patří některé těžké kovy, ftaláty, parabeny, DDT, bisfenol A, polychlorované bifenylly (PCB), pesticidy, léčiva nebo hormony (Bendlová, 2013). Jedním z nejznámějších příkladů účinku EDC je celosvětově pozorovaná feminizace samců ryb pod vypustěmi z čističek odpadních vod (dále jen ČOV), což může vést až k vymizení celé populace ryb, jako v případě pstruhů v jezeře Ontario v Kanadě (Jobling a Tyler,

2003). Tato práce se zabývá zkoumáním využití adsorpce na řasovou biomasu k odstraňování edokrinních disruptorů z odpadních vod, konkrétněji k odstraňování steroidních hormonů.

Steroidní hormony jsou přirozeným způsobem vylučovány lidmi, například hormony 17 β -estradiol a estron jsou vylučovány ženami (2-20 $\mu\text{g/osoba/den}$), stejně tak jako muži (5 $\mu\text{g/osoba/den}$) (Ying a kol., 2002). Významnými zdroji steroidů jsou i hospodářská zvířata, a to jak velkochovy, tak i bodové zdroje jako odpouštění fekálií ze statků či dokonce vylučování zemědělských zvířat přímo do vodních toků (Johnson a kol., 2005).

Naměřená koncentrace steroidních hormonů v odpadních a povrchových vodách se pohybuje nejčastěji v řádu ng/l. Například koncentrace estronu byla v holandských vodách naměřena v rozmezí 0,1 – 3,4 ng/l. V italské řece Tibera koncentrace estronu dosahovala 1,5 ng/l, v německých řekách 0,3 – 5,5 ng/l (Baronti a kol., 2000). U výpustě z ČOV v české Uhřetěbce byla naměřena koncentrace estrogenů v kalu až 345 ng/l (Pačes, 2015).

Jejich odstranění z odpadních vod v běžných ČOV znesnadňuje například komplikovaná struktura těchto látek. Často tak prochází beze změny do životního prostředí. Nejčastěji zmiňované možnosti účinného odstranění EDC v odpadních čistíčkách vod zahrnují složité oxidační procesy či adsorpci. Běžně využívaný sorbent je aktivní uhlí, jehož využití je ovšem investičně i provozně náročné s nutností regenerace nebo dokonce likvidace aktivního uhlí jako odpadu. Odstranění těchto látek pomocí adsorpce na mikroskopické řasy se proto do budoucna jeví jako velmi lukrativní způsob levného a ekologicky nezávadného čištění odpadních vod.

Adsorpce je proces, jehož principem je hromadění částic (molekul) plynu, kapaliny či pevné látky na povrchu (fázovém rozhraní) účinkem mezipovrchových přitažlivých sil. Při sorpci na řasovou biomasu jsou komponenty ve vodném prostředí vázány na buněčnou stěnu. Ta obsahuje velký počet funkčních skupin a tím pádem vazebních míst, na která lze navázat mnoho chemických sloučenin. Existuje zde mnoho oblastí bohatých na uronové kyseliny, glukosaminy a proteiny, které mohou reagovat s desítkou strukturně odlišných sloučenin, prostřednictvím vodíkových vazeb, π - π interakcí nebo hydrofobních interakcí. Velký počet studií se zabýval a zabývá především biosorpcí malých molekul na povrch řas. Mnoho autorů (Tüzün a kol., 2005; Gupta a Rastogi, 2008; Pavasant a kol., 2006; Romera a kol., 2007) poukazuje na schopnost vyvazovat pomocí řas významné množství těžkých kovů (Pb, Hg a Cd) z kontaminované vody. Biosorpce nabízí kromě využití v oblasti čištění životního prostředí i možnost výroby potravinových doplňků obohacených o elementární prvky jako jsou např. Se, Fe, Mn, Cr, Cu, Zn, nebo polyfenoly (Jelínek a kol., 2015). Takto obohacená biomasa se dále dá používat i pro krmné účely hospodářských zvířat a ryb.

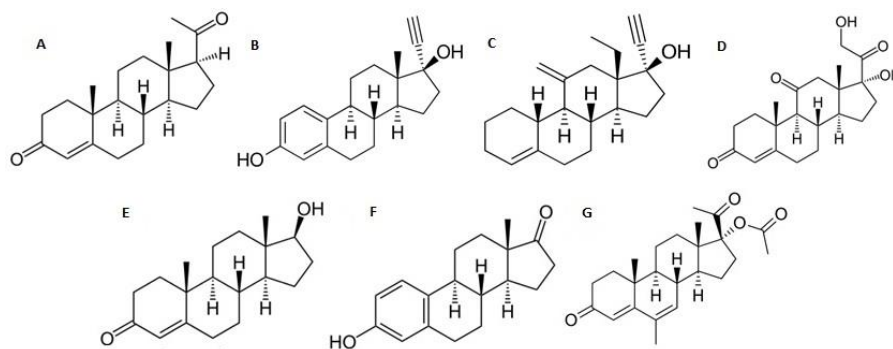
Materiály a metody

1.1. Biosorbent

Jako modelový mikroorganismus byla použita jednobuněčná řasa *Chlorella vulgaris*, kultivována ve fotobioreaktorech Mikrobiologického ústavu akademie věd Třeboň (MBÚ AV Třeboň). Po kultivaci byla řasa promyta a lyofilizována. Takto upravená byla použita jako základní modelový biosorbent.

1.2. Endokrinní disruptory

Byly testovány čtyři přírodní steroidní hormony: progesteron, testosteron, kortizon, estron a tři syntetické: desogestrel, ethinylestradiol a megestrol (SigmaAldrich, p.a. $\geq 99\%$). Struktury jednotlivých hormonů jsou zobrazeny na obr. č. 1.



Obr. 1 Struktury testovaných látek: A – progesteron, B – ethinylestradiol, C – desogestrel, D – kortizon, E – testosteron, F – estron a G – megestrol acetát

1.3. Biosorpční testy

Všechny biosorpční experimenty probíhaly jako vsádkové experimenty o objemu 750 ml s danou koncentrací testovaných hormonů a s biomasou *Chlorella vulgaris*. Roztoky byly míchány při 28 °C na třepačce o frekvenci 150 rpm. Následně byla biomasa odstředěna, supernatant přefiltrován na vakuovém filtračním zařízení přes membránové filtry a zkoncentrován pomocí extrakce na tuhé fázi (SPE). Každé měření bylo provedeno třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Určení přesné koncentrace probíhalo pomocí HPLC-DAD s následujícími parametry: kolona Agilent Eclipse XDB (5 μ m; 4.6x150mm), gradientová eluce, mobilní fáze: roztok A (0,01 % kyselina orthofosforečná ve vodě) a B (0,01 % kyselina orthofosforečná v acetonitrilu), průtok 0,8 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 20 μ l.

Předběžné testování hormonů probíhalo po dobu 24 hodin s koncentrací hormonů 10 µg/l a biomasy 1 g/l.

Experimenty na stanovení závislosti účinnosti biosorpce na době kontaktu sorbentu se sorbátem probíhaly s koncentrací hormonů 10 µg/l a biomasy 1 g/l. Účinnost byla testována po 6, 12, 24 a 48 hodin.

Pro testování vhodného množství biosorbentu byla testována koncentrace biomasy 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 a 4 g/l. Testy probíhaly po dobu 24 hodin s koncentrací hormonů 10 µg/l.

Pro všechny testované steroidní hormony byly provedeny biosorpční testy bez biosorbentu (10 µg/l steroidních hormonů, 24 hodin). Výsledky byly vypočteny na základě procentuálního porovnání poklesu koncentrace steroidních hormonů v roztoku.

Výsledky a diskuze

Byla testována adsorpční kapacita *Chlorella vulgaris* na sedmi vybraných hormonech. Výsledky předběžného testování lze vidět v tab. I. Účinnost absorpce byla u jednotlivých steroidních hormonů velice rozdílná. Rozdílné schopnosti sorpce na povrch lyofilizované biomasy *Ch. vulgaris* lze vysvětlit rozdílnou strukturou vybraných steroidních hormonů. Megestrol acetát, u kterého byla naměřena nejvyšší účinnost sorpce na řasovou biomasu (až 95 %) je syntetický derivát progesteronu u kterého byla také naměřena vysoká účinnost (až 52 %). Jeho struktura je doplněna o methylovou skupinu v poloze C6, dvojnou vazbu mezi polohami C6 a C7 a ester acetátu v poloze C17- α . Lze tedy říci, že rozvětvenější struktura tak napomáhá k vyšší účinnosti sorpce. Dalším významný vliv na sorpci má obsah benzenového jádra ve struktuře látky. Srovnáme-li látky s podobnou strukturou jako ethinylestradiol (účinnost 71 %) a desogestrel (účinnost 6,7 %), je patrné že ethinylestradiol má pravděpodobně vyšší účinnost sorpce právě díky benzenovému jádru ve své struktuře. Struktura estronu také není rozvětvená, přesto účinnost dosáhla 35 %. Vliv počtu aromatických kruhů v molekule označili jako hlavní rozhodující faktor i Jelínek a spol. ve své práci z roku 2015, kde naměřili rozdílné schopnosti vázat se na řasovou biomasu, a to v závislosti na počet aromatických kruhů v molekule. Nejvyšší schopnost zaznamenali u quercetinu a xanthohumulonů. Nejnižší pak například u kyseliny galové a kumarové (Jelínek a spol., 2015).

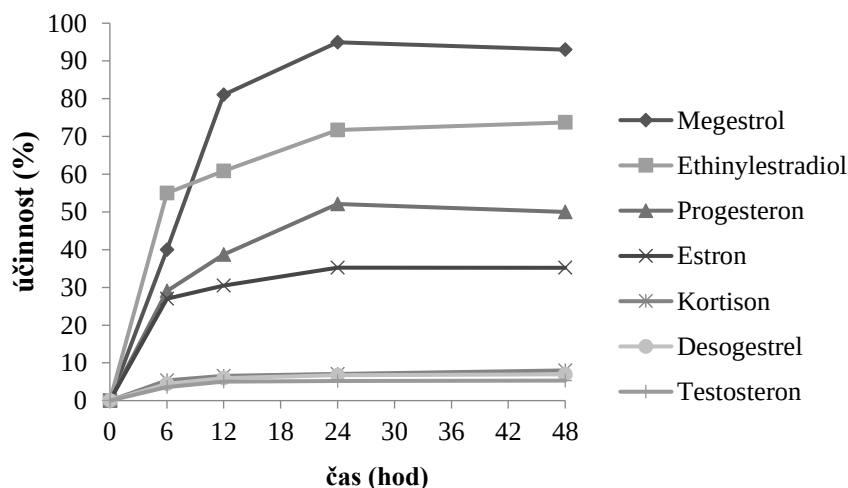
Nízkou schopnost sorpce u kortisonu i přes jeho rozvětvenou strukturu na C17, která předpovídá dobrou sorpční schopnost, nelze zatím ničím vysvětlit. Je pro to tedy potřeba provést další řadu testů.

Tab. I Účinnost biosorpce steroidních hormonů (poč. koncentrace 10 µg/l) na řasovou biomasu (konc. 1 g/l)

Hormon	Účinnost (%)
Testosteron	5,2 ± 2,1
Desogestrel	6,7 ± 1,6
Kortison	7,1 ± 3,2
Estron	35,2 ± 4,1
Progesteron	52,1 ± 5,2
Ethinylestradiol	71,7 ± 4,3
Megestrol acetát	94,9 ± 4,7

3.1 Závislost účinnosti na době expozice

Biosorpce je jev na který má vysoký vliv kontaktní čas mezi sorbentem a sorbátem. V našem případě kontakt mezi steroidními hormony a řasovou biomasou (obr. 2). K ustálení účinnosti biosorpce dochází někdy mezi 12 až 24 hodinami. Po této době k zvyšování účinnosti biosorpce již nedochází u žádného z testovaných hormonů. U hormonů s celkově nižší schopností sorpce na řasovou biomasu (testosteron, desogestrel, kortison) dochází k relativnímu ustálení již po 6 hodinách. V delším časovém úseku nedocházelo k sorpci dalších molekul hormonů, neboť vhodná volná vazebná místa na povrchu řasy byla již zaplněna. Nejvyšší adsorpce bylo pozorováno pro megestrol acetát, kdy se po 24 hodinách ustálila na hranici 93 %.

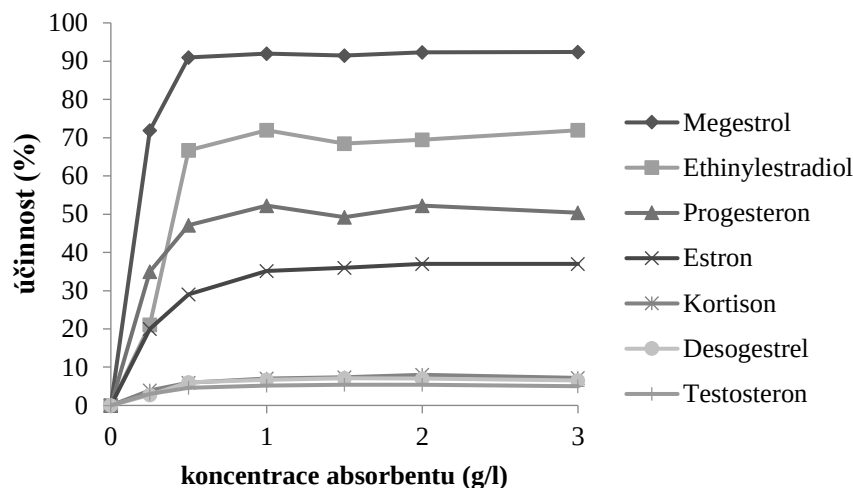


Obr. 2 Graf závislosti účinnosti biosorpce na době kontaktu steroidních hormonů (poč. koncentrace 10 µg/l) s řasovou biomasou (koncentrace 1 g/l)

3.2. Závislost účinnosti na koncentraci adsorbátu

Jak je vidět na obr. 3, vliv na účinnost biosorpce steroidních hormonů (poč. koncentrace 10 µg/l) má i použitá dávka biosorbentu. Koncentrace 0,5 g/l biomasy stačilo ke snížení

koncentrace megestrolu o 93 %, s vyšší dávkou se účinnost dále již výrazně nezvyšuje. Tak tomu je i u testovaného ethinylestradiolu a progesteronu. Pro ostatní hormony platí, že hodnoty účinnosti biosorpce stále v rozmezí koncentrací řasy 0,5 g/l a 1 g/l rostou. Při počáteční koncentraci 10 µg/l steroidních hormonů je tedy optimální dávka řasové biomasy 1 g/l. Účinnost sorpce se dále zvyšuje, ovšem neúměrně k zvýšené dávce biosorbentu.



Obr. 3 Graf závislosti koncentrace sorbentu (řasové biomasy) na účinnosti biosorpce steroidních hormonů (poč. koncentrace 10 µg/l)

Závěr

Nejvyšší účinnosti biosorpce (nad 50 %) bylo dosaženo pro megestrol, ethinylestradiol a progesteron. Vliv chemické struktury látek na účinnost biosorpce nebyla prokázána, přičemž přítomnost benzenového jádra a rozvětvené struktury ve většině případů zvyšují schopnost vázat se na řasovou biomasu.

Proces sorpce steroidních hormonů je relativně pomalý. K ustálenému stavu dochází až mezi 12–24 hodinami. Pro další testování byla tedy stanovena doba hraniční doba 24 hodin. Při počáteční koncentraci 10 µg/l steroidních hormonů se jako optimální dávka řasové biomasy stanovila koncentrace 1 g/l.

I přes rozdílné schopnosti sorpce se biomasa *Chlorelly vulgaris* v námi provedených pokusech ukázala jako vhodný biosorbent pro snížení koncentrace některých z mikropolutantů ve vodném prostředí. Biomasa se tak ukazuje jako levný biodegradovatelný sorpční materiál, vhodný jako alternativa k dnes často používanému aktivnímu uhlí v čističkách odpadních vod. Po ztrátě klíčových vlastností, sorpčních a mechanických (částečný rozklad materiálu mikroorganismy), nabízí šetrnou likvidaci pomocí dekontaminačně-degradačního procesu (kompostování, metanogeneze).

Literatura

Baronti Ch., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. (2000) Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environmental Science and Technology*, 34, 5059–5066.

Bendlová B. (2013) Endokrinní disruptory – neviditelná hrozba – editorial. *Vnitřní lékařství*, 59(5), 334-336.

Gupta V. K., Rastogi A. (2008). Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studies, *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 407-414.

Jelínek L., Procházková G., Quintelas C., Beldíková E., Brányik T. (2015). *Chlorella vulgaris* biomass enriched by biosorption of polyphenols. *Algal Research*, 10, 1-7, 2015.

Johnson I., Harvey P. (2002) Study of the Scientific Evaluation of 12 Substances in the Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions, European Commission report

No.:UC6052.[Online] dostupné z: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/wrc_report.pdf

Pačes, T. Estrogeny – ženské hormony ve vltavské a pitné vodě v Praze. [on line] Dostupné z: <http://www.kontrolyvody.cz/clanky/%C5%BDensk%C3%A9%20hormony%20v%20povrchov%C3%BDch%20vod%C3%A1ch,%20%C4%8Disti%C4%8Dk%C3%A1ch%20a%20pitn%C3%A9%20vod%C4%9B%20v%20Praze.pdf>

Pavasant P., Apiratikul R., Sungkhum V., Suthiparinyanont P., Wattanachira S., Marhaba T.F. (2006). Biosorption of Cu 2+, Cd 2+, Pb 2+, and Zn 2+ using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresource Technology*, 97(18), 2321-2329.

Romera E., González F., Ballester A., Blázquez M.L., Muñoz J.A. (2007). Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresource Technology*, 98(17), 3344-3353.

Tüzün I., Bayramoğlu G., Yalçın E., Başaran G., Celik G., Arica, M.Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg (II), Cd (II) and Pb (II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Environmental Management*, 77(2), 85-92.

Ying G. G., Kookana R. S., Ru Y. J. (2002) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 6, 28.

Možnosti inhibice kolonizace titanových materiálů

Dejmková K., Lokočová K., Mařátková O.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mikrobiální biofilmy jsou vysoce odolné struktury obklopené extracelulárními polymerními látkami, které ochraňují buňky před různými antimikrobiálními činidly nebo imunitním systémem hostitele. Problematika stále narůstající rezistence mikroorganismů není výjimkou ani u kvasinek rodu *Candida*. Kvasinky rodu *Candida* nepatří mezi nejčastější mikroorganismy infekcí kloubních protéz, avšak patří mezi velice odolné a nebezpečné oportunní patogeny. Z tohoto důvodu v současné době roste zájem o hledání vhodných alternativ, které by byly účinné v boji proti tvorbě biofilmu. Vhodnou alternativou běžně používaných antibiotik v prevenci vzniku a léčby infekcí kloubních náhrad by se mohly stát bioaktivní látky (BAL) izolované z přírodních zdrojů.

Infekce kloubních implantátů

Vzhledem ke stále narůstajícímu počtu pacientů s nejrůznějšími onemocněními pohybového aparátu, jako je například osteoartritida nebo zlomeniny, se ortopedické implantáty kloubů v medicíně využívají stále častěji. Ve spojení se zaváděním cizího tělesa do lidského těla zde ale vzniká jisté riziko infekce (Connaughton a kol., 2014, on-line).

V současnosti jsou na předních příčkách seznamu materiálů používaných pro nejrůznější implantáty (ortopedické, dentální, kardiovaskulární a další) především titanové slitiny. Slitiny titanu mají specifické mechanické vlastnosti a jsou nejvíce biokompatibilní ze všech kovových materiálů. Drtivá většina kloubních implantátů je vyrobena z titanové slitiny s hliníkem a vanadem – Ti6Al4V.

Infekce kloubních implantátů jsou v ortopedii velice známým a závažným problémem, přestože v k jejich vzniku v současné době dochází jen zřídka (Arciola a kol., 2012).

Jedním z faktorů, který přispívá k závažnosti těchto infekcí je častá rezistence mikroorganismů vůči širokému spektru antimikrobiálních látek (Connaughton a kol., 2014, on-line).

Mikroorganismy snadno adherují k povrchu implantátu pomocí svých povrchových struktur, jako jsou například pili, fimbrie, bičíky a glykokalyx, a následně tvoří biofilm, který může narůstat až do tloušťky 100 mm (Connaughton a kol., 2014, on-line). V biofilmu žijí mikroorganismy seskupeny a obklopeny vysoce hydratovanou extracelulární matrix (Trampuz

a Zimmerli, 2005). Uvnitř biofilmu mohou mikroorganismy přejít do stacionárního stavu vlivem vyčerpání živin a akumulací odpadních produktů. Takto žijící buňky mohou být až 1000× odolnější vůči antimikrobiálním látkám a antibiotikům, oproti jejich planktonně žijícím protějškům.

Infekční mikroorganismy

Nejčastějšími bakteriálními druhy, které způsobují infekce kloubních protéz, jsou *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, koaguláza negativní *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides* spp. a *Enterococcus* (Mariani a Tuan, 1998). Z 3–6 % jsou původci infekcí kloubních protéz i anaerobní bakterie *Propionibacterium acnes* a další, které mohou vyvolávat velké komplikace a významně zvyšovat morbiditu pacientů (Shah a kol., 2015).

V současné době jsou kandidy jedním z nejčastějších původců nozokominálních infekcí (Douglas, 2003). *C. albicans* je běžnou součástí mikrobiomu kůže, ústní dutiny, gastrointestinálního traktu a vagíny (Gulati a Nobile, 2016), avšak u imunosuprimovaných pacientů může tato kvasinka způsobovat závažné infekce (Douglas, 2003). Téměř polovina všech kandidóz je způsobena právě *C. albicans*.

Candida spp. je méně častým původcem infekcí kloubních protéz (1–3 %), avšak infekce způsobené tímto druhem kvasinek jsou považovány za velice obtížně léčitelné, proto je také nutný velice dlouhý interval mezi vyjmutím implantátu a jeho znovuzavedením (6–10 týdnů) pro odstranění infekce. Biofilm kvasinek rodu *Candida* je mnohem odolnější než suspenzní buňky, podobně jako je tomu u bakterií. V případě infekce kloubní protézy způsobené kvasinkami rodu *Candida*, se musí velmi často infikovaný implantát zcela vyměnit za nový, vzhledem k obtížné léčitelnosti infekcí způsobených těmito kvasinkami a jejich vysokou antifungální odolností, i přesto recidivy těchto infekcí nejsou ničím výjimečným (Maiolo a kol., 2016), což může být způsobeno i tím, že se buňky mohou z biofilmu uvolňovat, a tak se infekce šíří po celém těle (Ramage a kol., 2012, on-line).

Přírodní látky

Baicalein

Baicalein (5,6,7-trihydroxyflavon) je flavonoid izolovaný převážně z kořenů rostliny *Scutellaria baicalensis* (Serpa a kol., 2012). *S. baicalensis* je rostlina z východní Asie, která se v tradiční čínské medicíně využívá jako prostředek k léčbě hyperlipidémie, hypertenze, aterosklerózy, nachlazení, rakoviny a zánětlivých onemocnění jater (Bie a kol., 2017). Samotný

baicalein vyniká hlavně antioxidačními, neuroprotektivními, antibakteriálními, antivirovými a antimykotickými účinky (Cao a kol., 2018). Je také důležité podotknout, že baicalein vykazuje nízkou toxicitu vůči lidským buňkám, a proto se zdá být účinnou látkou v boji proti infekcím způsobených biofilmy (Chen a kol., 2016, on-line).

Z literárních zdrojů vyplývá, že by baicalein mohl na buňky účinkovat několika různými mechanismy (Cao a kol., 2008). Shirley a kol. (2015) a Cao a kol. (2008) ve svých experimentálních studiích testovali účinky baicaleinu na tvorbu biofilmu vzhledem k hydrofobitě buněčného povrchu kvasinky *C. albicans*. Zjistili, že baicalein snižuje hydrofobitu povrchu buněk, a tím pravděpodobně zhoršuje schopnost adheze buněk této kvasinky.

Dále byly popsány účinky baicaleinu na indukci apoptózy prostřednictvím zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku v buňkách kvasinky *C. albicans*. Zvýšená hladina těchto kyslíkových radikálů je jedním z hlavních znaků apoptózy (Dai a kol., 2009;). Baicalein by také mohl mít vliv na inhibici efluxních pump, což je jeden z hlavních faktorů rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám (Huang a kol., 2008).

Chitosan

Chitosan je přírodní polymer složený z glukosaminu a N-acetylglukosaminu vázaných β -1,4 vazbou. Vzniká alkalickou N-deacetylací chitinu, což je hlavní složka buněčné stěny hub, schránek hmyzu a mořských korýšů. Bylo prokázáno, že chitosan snižuje růst kvasinek rodu *Candida* (Rabea a kol., 2003; Park a kol., 2008). Nicméně mechanismus účinku chitosanu ještě nebyl zcela objasněn. Bylo publikováno několik studií (Rabea a kol., 2003) zabývajících se mechanismem účinku chitosanu. Je pravděpodobné, že působí na cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu kvasinek, chelatuje ionty kovů a inhibuje syntézu mRNA (Rabea a kol., 2003; Park a kol., 2008). Antimikrobiální aktivita chitosanu závisí na několika parametrech jako je například jeho molekulová hmotnost a stupeň deacetylce (Kong a kol., 2010). Také jeho účinnost závisí na typu mikroorganismu a podmínkách prostředí jako pH a iontová síla roztoku (Kong a kol., 2010; Rabea a kol., 2003). Antimikrobiální účinnost čistého chitosanu je obecně nejvyšší při pH 6,0, v důsledku protonace aminoskupin, díky kterým je více rozpustný ve vodě a vykazuje silnější interakce se záporně nabitou buněčnou membránou mikroorganismů (Kong a kol., 2010). Tato interakce pravděpodobně vede k poškození buněčné membrány a k úniku intracelulárních komponent (Rabea a kol., 2003).

Ve studii Park a kol., (2008) studovali chitosan s nízkou molekulovou hmotností a zjistili, že vykazuje silnou antifungální aktivitu vůči různým druhům patogenních plísní a kvasinek včetně *C. albicans*, prostřednictvím interakce s membránou buněk. A nepůsobí

cytotoxicky vůči savčím buňkám (Park a kol., 2008).

Peña a kol. (2013, on-line) studovali účinky nízkomolekulárního chitosanu na buňky *C. albicans*. Potvrdili interakci chitosanu s membránou buněk, která způsobuje únik draselných iontů a dalších malých molekul, což zvyšuje membránový potenciál. Následně dochází k uptake vápenatých iontů a současnému úniku záporně nabitých iontů. Zjistili, že dochází i k inhibici buněčné respirace a tím i životaschopnosti buněk (Peña a kol., 2013, on-line).

Závěr

Baicalein vyniká hlavně antioxidačními, neuroprotektivními, antibakteriálními, antivirovými a antimykotickými účinky (Cao a kol., 2018). Je také důležité podotknout, že baicalein vykazuje nízkou toxicitu vůči lidským buňkám, a proto se zdá být účinnou látkou v boji proti infekcím způsobených biofilmy (Chen a kol., 2016, on-line).

Chitosan je netoxický, biokompatibilní a biologicky odbouratelný. Vykazuje celou řadu biologických a léčivých účinků, například má pozitivní vliv na snížení cholesterolu, hojení ran a vykazuje také antimikrobiální účinky. Bylo prokázáno, že chitosan snižuje růst kvasinek rodu *Candida* (Rabea a kol., 2003; Park a kol., 2008).

Literatura

Arciola C. R., Campoccia D., Speziale P., Montanaro L., Costerton J. W. (2012) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33, str. 5967–5982.

Bie B., Sun J., Guo Y., Jiang W., Yang J., Huang Ch. (2017) Baicalein: a review of its anti-cancer effects and mechanisms in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, str. 1285–1291.

Cao Y., Dai B., Wang Y., Huang S., Xu Y., Cao Y., Gao P., Zhu Z., Jiang Y. (2008) *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, str. 73 – 77.

Chen Y., Liu T., Wang K., Hou C., Cai S., Huang Y., Du Z., Huang H., Kong J., Chen Y. (2016) Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro*. *PLoS ONE*, v tisku, DOI 10.1371/journal.pone.0153468.

Connaughton A., Childs A., Dylewski S., Sanesan V. J. (2014) Biofilm disrupting technology for orthopedic implants: what's on the horizon? *Frontiers in Medicine*, v tisku, DOI 10.3389/fmed.2014.00022.

Dai B., Cao Y., Huang S., Xu Y., Gao P., Wang Y., Jiang Y. (2009) Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, str. 803 – 809.

Douglas J. L. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11, str. 30–36.

Gulati M., Nobile C. J. (2016) *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18, str. 310–321.

Huang S., Cao Y., Dai B., Sun X., Zhu Z. Y., Cao Y., Wang Y., Gao P., Jiang Y. (2008) *In vitro* synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, str. 2234–2236.

Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, str. 51–63.

Maiolo E. M., Oliva A., Tabin U. F., Perrotet N., Borens O., Trampuz A. (2016) Antifungal activity against planktonic and biofilm *Candida albicans* in an experimental model of foreign-body infection. *Journal of Infection*, 72, str. 386–392.

Park Y., Kim M. H., Park S. C., Cheong H., Jang M. K., Nah J. W., Hahm K. S. (2008) Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, str. 1729–1734.

Peña A., Sánchez N. S., Calahorra M. (2013) Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*, v tisku DOI 10.1155/2013/527549.

Rabea E. I., Badawy M. E. - T., Stevens Ch. V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, str. 1457–1465.

Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. (2012) Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, v tisku, DOI 10.1155/2012/528521.

Serpa R., França E. J., Furlaneto-Maia L., Andrade C. G., Diniz A., Furlaneto M. C. (2012) *In vitro* antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 61, str. 1704–1708.

Shah N. B., Tande A. J., Patel R., Berbari E. F. (2015) Anaerobic prosthetic joint infection. *Anaerobe*, 36, str. 1–8.

Shirley K. P., Windsor L. J., Eckert G. J., Gregory R. L. (2015) *In vitro* effects of *Plantago major* extract, aucubin, and baicalein on *Candida albicans* biofilm formation, metabolic activity, and cell surface hydrophobicity. *Journal of Prosthodontics*, 26, str. 508–515.

Trampuz A., Zimmerli W. (2005) Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Medical Weekly*, 135, str. 243–251

Vliv extraktů *Vitis vinifera* na biofilm rodu *Candida*

Drbohlavová J., Kolouchová I., Paldrychová M., Gharwalová L.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mikroorganismy mají tendenci přisedat k nejrozličnějším povrchům a vytvářet na nich biofilmy, právě tento jev je původcem mnoha infekcí a rezistencí vůči antibiotikům. Současný výzkum je zaměřen na studium přírodních látek obsažených v rostlinách, například ve vinné révě, které by mohly přispět k řešení tohoto problému. Během posledních několika let je pozornost soustředěna na využití vedlejších vinařských produktů z důvodu obsahu polyfenolových sloučenin, zejména resveratrolu, polydatinu nebo quercetinu, u kterých byla prokázána antimikrobiální a antibiofilmová aktivita.

1. Úvod

Bakteriální biofilmy jsou již poměrně detailně prostudovány, oproti tomu studium eukaryotních biofilmů je neustále ve vývoji (Kuhn, 2002). Negativní vlivy biofilmů jsou současným problémem v medicíně. Mikroorganismy jsou zodpovědné za široké spektrum mikrobiálních infekcí v lidském těle (Fanning a Mitchel, 2012). Kvasinky rodu *Candida* jsou stále častěji identifikovány jako lidské oportunní patogeny kolonizující různé typy implantátů (Silva a kol., 2011). Tvorba biofilmů a s ní související rostoucí rezistence mikroorganismů k běžně používaným antibiotikům ukazuje na potřebu hledání nových antibiofilmových látek, které by mohly přispět k odstranění již vytvořeného biofilmu (Kagan a kol., 2014). Současné studie jsou zaměřeny na testování přírodních látek, sekundárních metabolitů rostlin, například polyfenolů. Tyto metabolity se přirozeně vyskytují v ovoci, zelenině, obilovinách, ale také v rostlinných produktech, jako je, víno, pivo, čaj a kakao (Guendez a kol., 2005). V současné době se pozornost přesunula k rostlinným polyfenolům izolovaným z extraktu rostlin *Vitis vinifera* a *Polygonum cuspidatum*. Tyto rostliny obsahují velké množství polyfenolových látek, např. resveratrolu, quercetinu či polydatinu (Naczka a Shahidi, 2004).

2. Biofilm rodu *Candida*

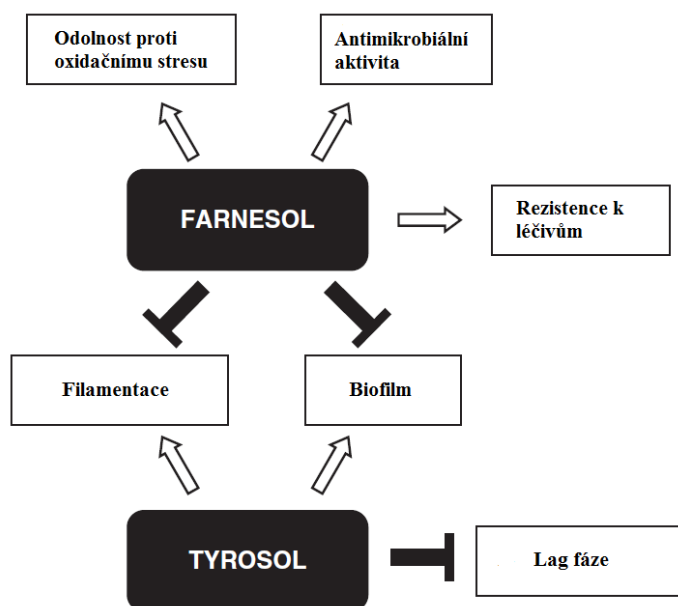
Mezi nejvýznamnější eukaryotní mikroorganismy tvořící biofilm patří kvasinky. Zástupci rodu *Candida* patří mezi oportunně patogenní mikroorganismy, jelikož jsou součástí běžné mikroflóry na kůži či na površích sliznic trávicího traktu, dutiny ústní nebo

urogenitálního systému (Kang a kol., 2010). Obecně jsou biofilmy rodu *Candida* trojrozměrné struktury, která se liší v závislosti na druhu materiálu, ke kterému se kvasinky přichytí a jejíž uspořádání je ovlivněno druhem kvasinky a parametry životního prostředí (Estivill a kol., 2011; Kumamoto, 2002). Jako lidské patogeny byly identifikovány různé druhy rodu *Candida*. Počet invazivních infekcí rodem *Candida* v posledních letech vzrostl. Rod *Candida* patří mezi čtyři nejčastější infekce krevního oběhu (Silva-Dias a kol., 2014).

2.2 Biofilm *Candida albicans*

Kvasinka *C. albicans* způsobuje jednu z nejčastějších plísňových infekcí u lidí, kandidózu, která je spojována s tvorbou biofilmu (Evensen a Braun, 2009). Biofilm se z větší části skládá z vláknitých buněk hyf, pseudohyf nebo blastospor (Silva a kol., 2011; Fanning a Mitchell, 2012). *C. albicans* vykazuje tři rozdílné stupně vývoje biofilmu na protetickém materiálu, které souvisejí s vývojem extracelulární vrstvy. Rozdělují se dle délky trvání: raná fáze 0 – 11 h, střední fáze 12 – 30 h a fáze zrání 38 – 72 h. První fáze charakterizuje vývoj od prvotní adheze buněk k povrchu. Ve střední fázi dochází k produkci exopolymerních sacharidů (EPS), které překrývají mikrokolonie. Dále následuje hojné množení a vývoj hyf, důležitých pro zrání biofilmu. V průběhu maturace (zrání) dochází k zvyšování produkce extracelulárního materiálu, dokud není vytvořena silná vrstva matrix, která chrání buňky před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí (Chandra a kol., 2001; Blankenship a Mitchel, 2006).

U kvasinky *C. albicans* byla prokázána regulace morfogeneze prostřednictvím quorum sensing systému jako u první eukaryotické buňky. Quorum sensing systém v reakci na výkyvy v hustotě buněčné populace vyvolává expresi genů souvisejících s virulencí. *C. albicans* produkuje dvě hlavní signální molekuly; farnesol (3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodekatrien-1-ol) a tyrosol (2-(4-hydroxyfenyl) ethanol). Přičemž pozitivní regulace systému je zajišťována tyrosolem a negativní farnesolem (Obr. 1) (Alem a kol., 2006; Ramage a kol., 2002). Tyrosol je schopný úplně zrušit lag fázi a stimuluje tvorbu hyf v rané fázi vývoje biofilmu (Alem a kol., 2006). Signální molekula farnesol řídí expresi genů důležitých pro rozvoj hyf (inhibuje tvorbu biofilmu utlumením procesu klíčení buněk a vznik vláknité formy), rezistenci vůči lékům a celistvost buněčné stěny (Blankenship a Mitchell, 2006). Studie ukázaly, že přidáním farnesolu v rané fázi růstu buněk dochází k inhibici tvorby biofilmu (Alem a kol., 2006).



Obr. 1: Schématické znázornění vlivů farnesolu a tyrosolu na fyziologii *C. albicans*. Bílé šipky ukazují pozitivní regulaci a černé linie negativní regulaci (De Sordi a Mühlischlegel, 2009)

3. Fenolové látky s antimikrobiální a anti-biofilmovou aktivitou obsažené ve vinné révě a Křídlatce japonské

Synergické působení antibiotik a bioaktivních rostlinných extraktů může být využito k inhibici růstu mikrobiálních patogenů po aplikaci podstatně nižší dávky antibiotik (Gibbons, 2004). Jednou z možných alternativ je použití sekundárních metabolitů rostlin. *Vitis vinifera* (vinná réva) obsahuje velké množství polyfenolových látek. Biosyntéza polyfenolových látek nastává během normálního růstu rostliny nebo jako reakce na stresové podmínky, jako je infekce, poranění rostliny a UV záření (Naczka a Shahidi, 2004). Antioxidační vlastnosti výtažků z hroznových semen spočívají v přítomnosti flavanolových a proantokyanidinových sloučenin (Bozan a kol., 2008). Další fenolové sloučeniny přítomné v pokrutinách červeného a bílého vína jsou hydroxyskořicové kyseliny, flavonoly a stilbeny (resveratrol, polydatin). Slupky bobulí jsou bohatými zdroji antokyanidinů, hydroxyskořicové kyseliny a flavanolů. Modré a bílé odrůdy se liší v množství obsažených antokyanů, přičemž modré odrůdy jich obsahují vyšší množství (Kammerer a kol., 2004). V červeném víně byla prokázána přítomnost quercetinu (3,5,7,-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-4chromen-4-on), který patří mezi flavonoidní sloučeniny (Wang a kol., 2006). Quercetin má mnoho biologických a farmakologických účinků, včetně antioxidačních, protizánětlivých a antibakteriálních (Yang a kol., 2016). Byla prokázána jeho antibiofilmová aktivita proti patogenům přenášených potravinami jako jsou *Pseudomonas aeruginosa* či *Klebsiella pneumoniae* (Gopu a kol., 2015).

Křídlatka japonská (*Polygonum cuspidatum*) je druh tradiční čínské rostliny. Běžně se používá pro léčbu opáření či popálení. Tato čínská rostlina obsahuje stilbeny, anthrachinony a další fenolové látky. Z extraktu z kořenů křídlatky japonské byl izolován resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben) a polydatin (3,4',5-trihydroxystilben-3- β -D-glukosid) (Beňová a kol., 2010).

Resveratrol je nejznámějším zástupcem stilbenů (Filip a kol., 2003). Resveratrol disponuje protirakovinnými, antioxidačními a antimikrobiálními účinky (Shukla a Singh, 2011). Červené víno obsahuje koncentraci resveratrolu v rozmezí 1,5 až 8 mg/l. Antimikrobiální aktivita byla prokázána u bakterií *Streptococcus mutants* a *Streptococcus sanguis*, což jsou bakterie ústní mikroflóry zodpovědné za tvorbu plaku, zubního kazu a paradontózy (Yim a kol., 2010). U resveratrolu byla také prokázána antifungální aktivita a podle Lee (2015) by resveratrol mohl působit jako induktor apoptosy lidských oportunně patogenních kvasinek *C. albicans* (Lee, 2015).

Polydatin patří mezi nejčastěji se vyskytující stilbeny v přírodě, nenalezneme ho v hroznech nebo ořeších (Liu a kol., 2012). Byl zjištěn jeho inhibiční účinek na růst *Venturia inaequalis*, původce strupovitosti jablečných listů (Schulze a kol., 2005). Polydatin a *trans*-viniferin, látky izolované ze stonků a listů révy Amur (*Vitis amurensis*) byly studovány jako antimikrobiální látky u bakterie *S. mutants* a *S. sanguis*. Byla prokázána redukce tvorby zubního plaku a prevence vzniku zubního kazu (Yim a kol., 2010).

Extrakty z *Vitis vinifera* obsahující komplexní směs látek vykazují lepší antibiofilmové účinky než čisté látky. Jelikož izolace čistých látek představuje složitější a nákladnější provoz, je použití komplexních směsí i ekonomicky výhodnější.

4. Závěr

Extrakty *Vitis vinifera* by v budoucnu mohly přispět k řešení problému s rezistencí mikroorganismů vůči běžně používaným antibiotikům. Jednou z možností je využití letorostů *Vitis vinifera*, které se získávají minimálně dvakrát do roka a patří mezi odpadní produkty vinohradnictví. To by přispělo i k řešení finanční stránky, kdy využití čistých látek není nejlevnější.

5. Literatura

Alem, M. A.; Oteef, M. D.; Flowers, T. H.; Douglas, L. J. (2006). "Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development." *Eukaryotic Cell*, 5 (10), str. 1770-1779.

- Beňová, B.; Adam, M.; Pavlíková, P.; Fischer, J. (2010). "Supercritical fluid extraction of piceid, resveratrol and emodin from Japanese knotweed." *The Journal of Supercritical Fluids*, **51** (3), str. 325-330.
- Blankenship J. R. a Mitchell A. P. (2006). "How to build a biofilm: a fungal perspective." *Current Opinion in Microbiology*, **9**, str. 588-594.
- Bozan, B.; Tosun, G.; Ozcan, D. (2008). "Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity." *Food Chemistry*, **109** (2), str. 426-430.
- De Sordi, L. a Mühlischlegel, F. A. (2009). "Quorum sensing and fungal–bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence." *FEMS yeast research*, **9** (7), str. 990-999.
- Dong, Z. (2003). "Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **523-524**, str. 145-150.
- Estivill, D.; Arias, A.; Torres-Lana, A.; Carrilo-Munoz, A. J.; Arevalo, M. P. (2011). "Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials." *Journal of Microbiological Methods*, **86** (2), str. 238-242.
- Evensen, N. A. a P. C. Braun (2009). "The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation." *Canadian Journal of Microbiology*, **55** (9), str. 1033-1039.
- Fanning S. a Mitchell A. P. (2012): "Fungal biofilms." *PLoS Pathog*, **8**, str. e1002585.
- Filip, V.; Plocková M.; Šmidrkal J.; Špičková Z.; Melzoch K.; Schmidt Š. (2003): "Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness." *Food chemistry*, **83** (4), str. 585-593.
- Gopu, V.; Meena, C. K. a Shetty, P. H. (2015). "Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: in-vitro and in-silico evidence." *PloS one*, **10** (8), str. 1-17.
- Guendez, R.; Kallithraka, S.; Makris, D. P.; Kefalas, P. (2005): "Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera*) seed extracts: Correlation with antiradical activity." *Food Chemistry* **89**, str. 1-9.
- Chandra, J.; Kuhn, D. M.; Mukherjee, P. K.; Hoyer, L. L.; McCormick, T.; Ghannoum, M. A. (2001). "Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance." *Journal of Bacteriology*, **183** (18), str. 5385-5394.
- Kagan, S.; Jabbour, A.; Sionov, E.; Alquntar, A. A.; Steinberg, D.; Srebnik, M.; Nir-Paz, R.; Weiss, A.; Polacheck, I. (2014). "Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69** (2), str. 416-427.

- Kammerer, D.; Claus, A.; Carle, R.; Schieber, A. (2004). "Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS." *Journal of agricultural and food chemistry*, **52** (14), str. 4360-4367.
- Kang, K.; Fong, W. P.; Tsang, P. W. (2010). "Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis." *Mycopathologia*, **170** (6), str. 391-396.
- Kuhn, D. M. (2002). "Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces." *Infection and Immunity*, **70** (2), str. 878-888.
- Kumamoto, C. A. (2002). "Candida biofilms." *Current opinion in microbiology*, **5** (6), str. 608-611.
- Lee, J. and D. G. Lee (2015). "Novel antifungal mechanism of resveratrol: apoptosis inducer in *Candida albicans*." *Current microbiology*, **70** (3), str. 383-389.
- Liu, L. T.; Guo, G.; Wu, M. a Zhang, W. G. (2012). "The progress of the research on cardiovascular effects and acting mechanism of polydatin." *Chinese journal of integrative medicine*, **18** (9), str. 714-719.
- Naczek, M. a Shahidi, F. (2004). "Extraction and analysis of phenolics in food." *Journal of Chromatography A*, **1054** (1-2), str. 95-111.
- Ramage, G.; Saville, S. P.; Wickes, B. L.; Lopez-Ribot, J. L. (2002). "Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule." *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (11), str. 5459-5463.
- Shukla, Y.; Singh, R. (2011): "Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention." *Ann New York academy of sciences*, **1215**, str. 1-8.
- Schulze, K.; Schreiber, L.; Szankowski, I. (2005). "Inhibiting effects of resveratrol and its glucoside piceid against *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab." *Journal of agricultural and food chemistry*, **53** (2), str. 356-362.
- Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D. W.; Azeredo, J. (2011). "Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species." *Trends in Microbiology*, **19** (5), str. 241-247.
- Silva-Dias, A.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Miranda, I. M.; Branco, J.; Cobrado, L.; Monteiro-Soares, M.; Queiroz, J. A.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. G. (2014). "Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species." *Medical Microbiology and Immunology*, **203** (1), str. 25-33.
- Wang, W.; Sun, C.; Mao, L.; Ma, P.; Liu, F.; Yang, J. a Gao, Y. (2016). "The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review." *Trends in Food Science & Technology*, **56**, str. 21-38.

Yang, S.; Cao, C.; Chen, S.; Hu, L.; Bao, W.; Shi, H.; Zhao, X. a Sun, Ch. (2016). "Serum metabolomics analysis of quercetin against acrylamide-induced toxicity in rats." *Journal of agricultural and food chemistry*, **64** (48), str. 9237-9245.

Yim, N.; Ha Do, T.; Trung, T. N.; Kim, J. P.; Lee, S.; Na, M.; Jung, H.; Kim, H. S.; Kim, Y. H.; Bae, K. (2010). "The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens." *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, **20** (3), str. 1165-1168.

Vliv vybraných biologicky aktivních látek na růst *Staphylococcus epidermidis*

P. Kašparová, K. Lokočová, O. Maťátková
Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Staphylococcus epidermidis patří mezi grampozitivní bakterie a přesto že se přirozeně vyskytují v lidské mikroflóře, jedná se o oportunní patogen. Díky jeho schopnosti tvořit biofilm a kolonizovat tak nejrůznější medicínské materiály (katetry, implantáty a další) umožňuje tomuto mikroorganismu vyvolávat rozsáhlé špatně léčitelné infekce.

V této práci byl sledován vliv dvou přírodních látek chitosanu a pterostilbenu a dvou komerčních antibiotik erythromycinu a tetracyklinu na *S. epidermidis* DBM 3179. Byl sledován jejich vliv na suspenzní růst buněk a tvorbu biofilmu *S. epidermidis*.

Byly sledovány inhibiční účinky chitosanu a pterostilbenu pro suspenzní buňky *S. epidermidis* (inhibiční koncentrace mezi 30–40 mg/l) a jejich účinek na tvorbu biofilmu, který byl mnohem větší než v případě antibiotik. Erythromycin byl značně účinný proti suspenzním buňkám *S. epidermidis* ($MIC_{80} = 0,50\text{--}0,75$ mg/l), byl však zcela neúčinný proti buňkám biofilmu *S. epidermidis*.

1. Úvod

Staphylococcus epidermidis je mikroorganismus ze skupiny grampozitivních bakterií. Přirozeně se vyskytuje na pokožce a sliznicích člověka a představuje tak součást lidské mikroflóry (Gillapsy a Iandolo, 2009). Při zavlečení do organismu je ovšem schopen vyvolat rozsáhlé lokální či systémové infekce. K rozvoji infekcí tohoto mikroorganismu značně přispívá jeho schopnost vytvářet biofilm a kolonizovat tak nejrůznější medicínské materiály jako jsou venózní či urinární katetry či náhrady kloubů a jiné implantáty (von Eiff a kol., 2002). V nemocnicích se v posledních letech začaly objevovat vysoce rezistentní kmeny tohoto mikroorganismu, které jsou bohužel v mnoha případech rezistentní i vůči antibiotikům poslední instance, kterými je například vankomycin nebo methicillin (Sodhi, 2016). Právě z důvodu značného rozvoje antibiotické rezistence nejen u *S. epidermidis* je velký zájem o hledání nových látek, které by byli schopné nahradit antibiotika.

Jednou z těchto látek je chitosan, přírodní polysacharid, který se připravuje částečnou bazickou N-deacetylací chitinu ze schránek korýšů (Kumar, 2000). Jedná se o polysacharid složený z částečně acetylovaných N-glukosaminů spojených β -(1-4) vazbou (Helander a kol.,

2001). Využívá se také pro cílení některých léčiv a především sám vykazuje široké spektrum antimikrobiálního účinku (Rabea a kol., 2003).

Druhou sledovanou látkou byl pterostilben, zástupce stilbenoidů který je připravován chemickou syntézou (Yang a kol., 2017). Je tvořen dvěma substituovanými aromatickými jádry spojenými vynilovým můstkem (Davis a kol., 2001). Pterostilben byl poprvé izolován ze santalového dřeva ze stromu *Pterocarpus santalinus* a dále byl nalezen také ve zástupcích rodu *Vaccinium* a ve *Vitis vinifera* (Rimando a kol., 2002). Má významné antimikrobiální účinky a je schopen synergismu s řadou antibiotik proti nejrozličnějším patogenům (Basri a kol., 2016; Ishak a kol., 2016; Lee a kol., 2017).

2. Materiály a metody

Použité mikroorganismy

Kmen *S. epidermidis* DBM 3179 byl získán ze sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie (VŠCHT Praha). Mikroorganismy byly uchovávány v 50% glycerolu při -70 °C.

Antimikrobiální látky

Chitosan (50-190 kDa) byl zakoupen v Sigma Aldrich (USA). Roztok byl připraven rozpuštěním chitosanu v růstovém médiu okyseleném kyselinou octovou tak, aby výsledný roztok obsahoval maximálně 2 % kyseliny octové. Pterostilben byl získán od Prof. Ing. Jan Šmidrkal, CSc z Ústavu mléka, tuku a cereálií (VŠCHT Praha). Roztok pterostilbenu byl připraven jeho rozpuštěním ve 100% DMSO (Carl Roth, Německo), roztok pterostilbenu byl v jamce s buňkami obsažen v množství 1 % pracovního objemu. Erythromycin i tetracyklin byly zakoupeny v Sigma Aldrich (USA) a jejich zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním erythromycinu resp. tetracyklinu v růstovém médiu.

Kultivace suspenzních buněk

Buňky byly inokulovány do 100 ml růstového média. Byl použit Tryptone Soya Broth (TSB) od firmy Oxoid (Velká Británie). Buňky byly kultivovány po 24 h při 37 °C a 150 min⁻¹. Suspenze buněk byla následně odstředěna (10 min, 4 °C, 23 478×g) a resuspendována v novém růstovém médiu. Optická densita připraveného inokula (viz 2.3) byla upravena na OD_{600nm} = (0,100 ± 0,010) a připravená suspenze byla pipetována do jamek mikrotitrační destičky v objemu 30 µl. Objem jamek byl doplněn roztokem biologicky aktivní látky a sterilním médiem na 320 µl. Kultivace suspenzních buněk *S. epidermidis* probíhala v mikrokultivačním zařízení Bioscreen C (LabSystems, Finsko) po 24 h a 37 °C. Každých 30 minut byly buňky intenzivně třepány a následně byla měřena absorbance. Ze získaných dat byly

sestrojeny růstové křivky, z nichž byly stanoveny tzv. minimální inhibiční koncentrace daných látek pro *S. epidermidis* (MIC₈₀), tedy nejnižší koncentrace, které již způsobily 80% pokles mikrobiálního růstu vůči kontrole (100 rel. %).

Kultivace a analýza buněk v biofilmu

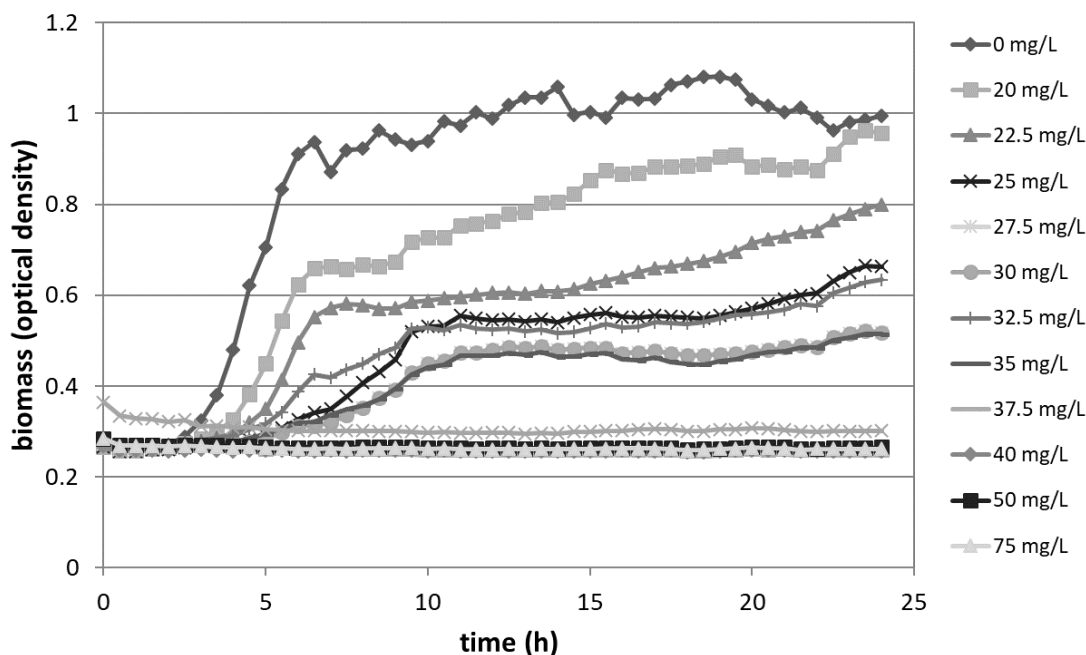
Optická densita suspenze resuspendovaných buněk (viz 2.3) byla upravena na OD_{600nm} = (0,800 ± 0,020). Upravené inokulum bylo pipetováno do jamek mikrotitračních destiček v objemu 210 µl. Objem jamek byl doplněn roztokem biologicky aktivní látky a sterilním médiem na 280 µl. Buňky byly kultivovány 24 h při 37 °C a 150 min⁻¹.

Po kultivaci byla odstraněna suspenze buněk a vzniklý biofilm byl šetrně promyt 200 µl sterilního fosfátového pufru (PBS, pH = 7,4). Metabolická aktivita buněk biofilmu byla stanovena pomocí 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) dle Riss a kol., (2013). Ve zkratce, do jamek s biofilmem bylo přidáno 50 µl roztoku MTT v PBS (1 g/l) a 60 µl D-glukosy (57,4 g/l). Buňky byly inkubovány za nepřístupu světla při 37 °C a 150 min⁻¹ po 1-3 h. Pro rozpuštění vytvořeného formazanu byl do jamek s biofilmem přidán vymývací roztok (40 % (v/v) DMF, 60 % (v/v) 2% kyseliny octové v PBS a 160 mg/l SDS) v objemu 100 µl. Biofilm byl dále inkubován při stejné teplotě a při 230 min⁻¹. Rozpuštěný formazan byl měřen spektrofotometricky při 570 nm. Ze získaných dat byly stanoveny minimální koncentrace inhibující biofilm (MBIC₈₀), tj. nejnižší koncentrace daných látek, které již způsobily 80% pokles metabolické aktivity buněk biofilmu vůči kontrolou.

3. Výsledky a diskuze

Vliv antimikrobiálních látek na suspenzní růst a tvorbu biofilmu *S. epidermidis*

Vůči suspenzním buňkám *S. epidermidis* DBM 3179 byl nejúčinnější látkou erythromycin, jehož inhibiční účinky se projeví již při 0,7 mg/l. Chitosan i pterostilben (viz Obr. 1) projeví inhibiční účinky vůči suspenzním buňkám v rozmezí koncentrací 30-40 mg/l. Tetracyklin nebyl výrazně účinný proti *S. epidermidis* DBM 3179 (MIC₈₀ = 65 mg/l). Byl sledován i vliv biologicky aktivních látek na tvorbu biofilmu *S. epidermidis*. Dle očekávání byly chitosan i pterostilben mnohem více účinné na buňky v biofilmu než sledovaná antibiotika. Jejich inhibiční účinky na tvorbu biofilmu se pohybovaly v rozmezí 45-200 mg/l. Erythromycin byl navzdory svému značnému účinku proti suspenzním buňkám zcela neúčinný proti buňkám v biofilmu.



Obr. 3: Vliv pterostilbenu (koncentrace 0-75 mg/L) na suspenzní růst *S. epidermidis* DBM 3179 (37 °C, TSB medium)

4. Závěr

Chitosanu i pterostilben inhibovaly suspenzní růst *S. epidermidis* DBM 3179 okolo 30 mg/l a buňky biofilmu byly vůči jejich působení jen 2-5× odolnější. Erythromycin byl výrazně účinný vůči suspenzním buňkám *S. epidermidis* ($MIC_{80} = 0,50-0,75$ mg/l) ale byl zcela neúčinný na buňky biofilmu ($MBIC_{80} > 500$ mg/l).

5. Literatura

- Basri, D. F.; Hamid, N. A.; Ishak, S. F.; Ghazali, A. R. (2016): Pterostilbene Reduced Post-antibiotic Effect Time of Linezolid against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian J. Pharm. Sci.* 78 (6), str. 748-754.
- Davis, W. B.; Ratner, M. A.; Wasielewski, M. R. (2001): Conformational gating of long distance electron transfer through wire-like bridges in donor-bridge-acceptor molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (32), str. 7877-7886.
- Gillapsy, A. F.; Iandolo, J. J. (2009) *Staphylococcus* (Encyclopedia of Microbiology 3rd Edition, M. Schaechter), Elsevier Inc., San Diego, CA, USA, str. 293-303
- Helander, I. M.; Nurmiaho-Lassila, E. L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. (2001): Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71 (2-3), str. 235-244.

- Ishak, S. F.; Ghazali, A. R.; Zin, N. M.; Basri, D. F. (2016): Pterostilbene Enhanced Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity of Oxacillin. *Am. J. Infect. Dis.* 12 (1), str. 1-10.
- Kumar, M. (2000): A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46 (1), str. 1-27.
- Lee, W. X.; Basri, D. F.; Ghazali, A. R. (2017): Bactericidal Effect of Pterostilbene Alone and in Combination with Gentamicin against Human Pathogenic Bacteria. *Molecules* 22 (3), str. 1-12.
- Mat'atkova, O.; Kolouchova, I.; Kvasnickova, E.; Jezdik, R.; Masak, J.; Cejkova, A. (2017): Synergistic action of amphotericin B and rhamnolipid in combination on *Candida parapsilosis* and *Trichosporon cutaneum*. *Chem. Pap.* 71 (8), str. 1471-1480.
- Rabea, E. I.; Badawy, M. E. T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. (2003): Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4 (6), str. 1457-1465.
- Rimando, A. M.; Cuendet, M.; Desmarchelier, C.; Mehta, R. G.; Pezzuto, J. M.; Duke, S. O. (2002): Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J. Agr. Food Chem.* 50 (12), str. 3453-3457.
- Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. (2013): Cell Viability Assays. 2013.
- Sodhi, N. (2016): New mechanism of resistance in a last-resort antibiotic. *Australian Veterinary Journal* 94 (1-2), str. N8-N9.
- von Eiff, C.; Peters, G.; Heilmann, C. (2002): Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *staphylococci*. *Lancet Infect. Dis.* 2 (11), str. 677-685.
- Yang, S. C.; Tseng, C. H.; Wang, P. W.; Lu, P. L.; Weng, Y. H.; Yen, F. L.; Fang, J. Y. (2017): Pterostilbene, a Methoxylated Resveratrol Derivative, Efficiently Eradicates Planktonic, Biofilm, and Intracellular MRSA by Topical Application. *Front. Microbiol.* 8, str. 1-14.

Biofilmy oportunně patogenních mikroorganismů a možnosti jejich potlačení

Lokočová K., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mikrobiální biofilmy jsou vysoce odolné struktury obklopené extracelulárními polymerními látkami (EPS), především polysacharidy, bílkovinami, lipidy a nukleovými kyselinami. Extracelulární matrix napomáhá k přichycení buněk k různým povrchům v prvních fázích tvorby biofilmu a rovněž zajišťuje mechanickou stabilitu biofilmů. Mikroorganismy ve formě biofilmu často vykazují rezistenci vůči běžně používaným antibiotikům. Jedním z nejčastějších původců nozokomiálních infekcí jsou v současné době kvasinky rodu *Candida*. Náš výzkum byl zaměřen na otestování vlivu přírodní látky chitosan na tvorbu biofilmu kvasinek *Candida parapsilosis* DBM 2165, *Candida krusei* DBM 2163 a *Candida albicans* DBM 2164. Metabolická aktivita buněk biofilmu byla stanovena pomocí metody MTT a celkové množství biomasy biofilmu bylo kvantifikováno barvením krystalovou violetí. Nejvýznamnější vliv chitosanu byl pozorován při aplikaci koncentrace 5 mg/l, kdy došlo k poklesu metabolické aktivity buněk biofilmu *C. parapsilosis* (o 88 % oproti kontrole).

Úvod

Podmíněně patogenní kvasinky rodu *Candida* mohou způsobovat jak povrchová, tak závažná systémová onemocnění. Téměř polovina všech kandidóz je způsobena právě *Candida albicans*. V současné době se začínají objevovat i případy infekcí způsobených ostatními druhy jako je *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* nebo *Candida tropicalis* (Kawai a kol., 2015). Množství rezistentních mikroorganismů vůči běžně používaným antibiotikům výrazně narůstá, a proto roste zájem o studium přírodních biologicky aktivních látek, které by mohly inhibovat tvorbu mikrobiálních biofilmů (Kapadia a kol., 2015).

Vhodným potenciálním antimikrobiálním a antibiofilmovým agens je právě díky svým vlastnostem chitosan. Jedná se o polysacharid získaný N-deacetylací přírodního chitinu (Kumar a kol., 2004). Chitin je hlavní součástí schránek korýšů (např. krabů, krevet a humrů) či hmyzu (Sinha a kol., 2004).

V rámci této práce byl sledován vliv chitosanu na tvorbu biofilmu kvasinek rodu *Candida*, které jsou považovány za jedny z nejzákeřnějších patogenů (Maiolo a kol., 2016).

Materiál a metody

Kultivace mikroorganismů

Kryokultury kvasinek byly zaočkovány do 250 ml Erlenmeyerových baněk se 100 ml sterilního YPD média. Kultivace *Candida parapsilosis* DBM 2165, *Candida krusei* DBM 2163 a *Candida albicans* DBM 2164 probíhala na orbitální třepačce při 150 min^{-1} a teplotě 30°C , po dobu 24 h.

Příprava roztoků

Chitosan byl rozpuštěn v YPD médiu a 99% kyselině octové, která tvořila 2 % z celkového objemu.

Sledování vlivu chitosanu na tvorbu biofilmu

Po ukončení kultivace mikroorganismů bylo inokulum odstředěno (10 min, 10°C , 9000 g) a jeho optická densita byla upravena pomocí čerstvého sterilního YPD média na hodnotu $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,800 \pm 0,020$. Pracovní objem každé jamky byl 280 μl . Do každé jamky bylo pipetováno 210 μl suspenze s takto upravenou optickou densitou a zbytek pracovního objemu byl doplněn roztokem biologicky aktivní látky (chitosanu) a médiem. Kultivace biofilmu probíhala v 96jamkových mikrotitračních destičkách z polystyrenu (150 min^{-1} , 30°C , 24 h). Poté byly jamky dvakrát promyty sterilním fyziologickým roztokem a následně bylo provedeno stanovení vlastností biofilmu.

Stanovení metabolické aktivity buněk biofilmu pomocí MTT

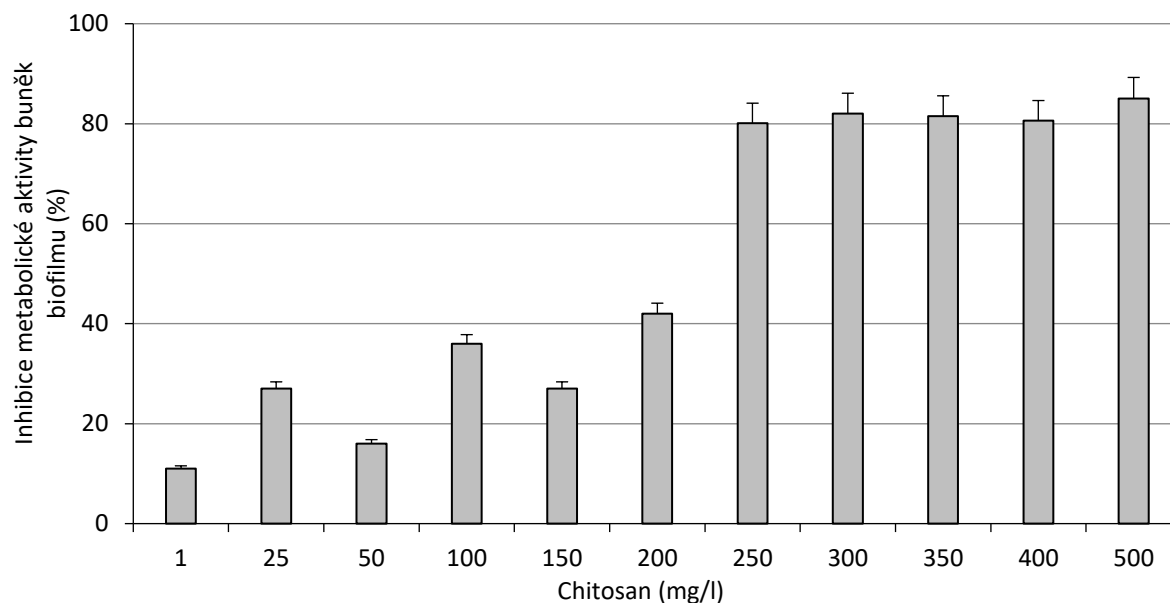
Po promytí jamek bylo k biofilmu přidáno 60 μl glukózy a 50 μl MTT. Destička byla umístěna na orbitální třepačku, kde byla míchána při 150 min^{-1} a teplotě 37°C po dobu 1,5 h. Pro rozpuštění krystalů formazanu bylo do všech jamek přidáno 100 μl vymývacího roztoku. Destička byla následně inkubována po dobu 30 min při vysokých otáčkách (230 min^{-1}). Poté bylo 100 μl roztoku převedeno do nové mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance při 570 nm. Všechny experimenty byly provedeny v 8 paralelách.

Kvantifikace celkového obsahu biomasy biofilmu

Roztok krystalové violeti (0,1 %) o objemu 200 μl byl přidán do každé jamky a inkubace probíhala po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Po odsátí roztoku barviva byly jamky dvakrát promyty fyziologickým roztokem. Poté bylo do každé jamky pipetováno 200 μl 96% ethanolu a po uplynutí 10 min bylo z každé jamky přeneseno 100 μl do čisté mikrotitrační destičky pro spektrofotometr. Absorbance byla měřena při 580 nm. Všechna měření probíhala v 8 paralelách.

Výsledky a diskuze

Byl sledován vliv chitosanu na tvorbu biofilmu kvasinek rodu *Candida*. Obr. 1 – 3 zachycují inhibici metabolické aktivity buněk biofilmu *C. albicans* DBM 2164 (Obr. 1), *C. parapsilosis* DBM 2165 (Obr. 2) a *C. krusei* DBM 2163 (Obr. 3).

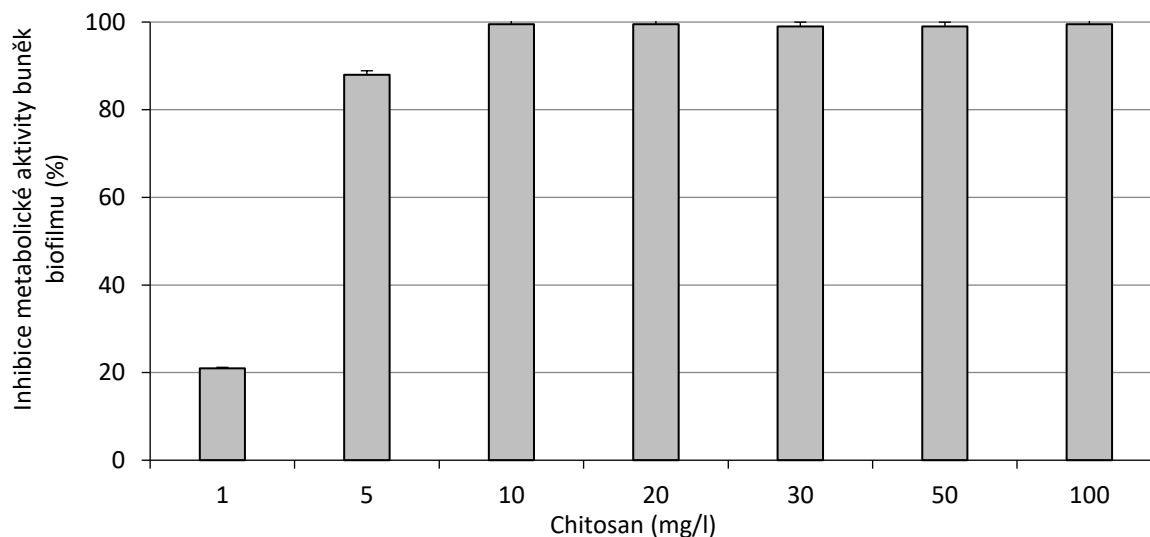


Obr. 1 Vliv chitosanu na tvorbu biofilmu *C. albicans* DBM 2164; inhibice metabolické aktivity buněk biofilmu vyjádřena v relativních procentech vztahených ke kontrole (100 %, bez přítomnosti chitosanu)

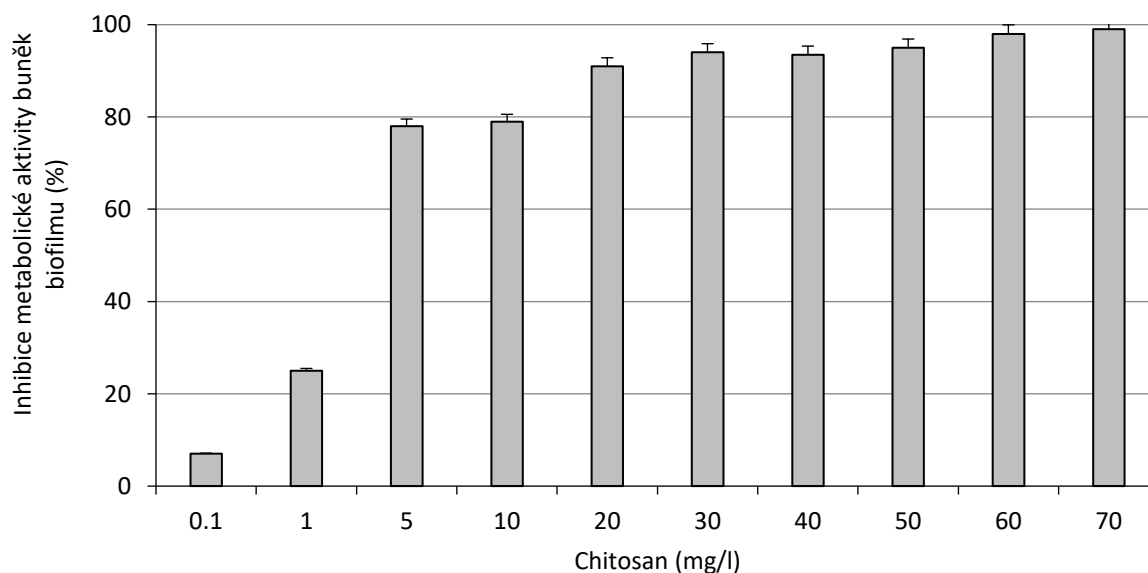
Bylo zjištěno, že všechny testované kvasinky rodu *Candida* jsou citlivé vůči chitosanu. Nejvýraznější pokles metabolické aktivity buněk biofilmu byl zaznamenán v případě *C. parapsilosis*. Metabolická aktivita buněk biofilmu *C. parapsilosis* byla snížena o 88 % (oproti kontrole 100 %) při aplikaci chitosanu o koncentraci 5 mg/l. Naproti tomu celkový obsah biomasy biofilmu vykazoval indukční charakter (data nejsou zobrazena). Chitosan projevil podobné inhibiční účinky na metabolickou aktivitu buněk biofilmu *C. krusei* při koncentraci 20 mg/l, a to redukcí o 91 %. Kvasinka *C. albicans* byla ze všech testovaných mikroorganismů nejméně citlivá vůči chitosanu. Byl zaznamenán pokles metabolické činnosti buněk biofilmu *C. albicans* o 80 % ve srovnání s kontrolou při koncentraci chitosanu 250 mg/l. Účinek chitosanu na celkový obsah biomasy biofilmu *C. albicans* měl v intervalu koncentrací 1 – 500

mg/l variabilní charakter (data nejsou uvedena).

Potvrdili jsme antifungální účinky chitosanu u všech testovaných kvasinek rodu *Candida*.



Obr. 2 Vliv chitosanu na tvorbu biofilmu *C. parapsilosis* DBM 2165; inhibice metabolické aktivity buněk biofilmu vyjádřena v relativních procentech vztažených ke kontrole (100 %, bez přítomnosti chitosanu)



Obr. 3 Vliv chitosanu na tvorbu biofilmu *C. krusei* DBM 2163; inhibice metabolické aktivity buněk biofilmu vyjádřena v relativních procentech vztažených ke kontrole (100 %, bez přítomnosti chitosanu)

Závěr

V naší studii byla sledována antibiofilmová aktivita chitosanu. Chitosan inhiboval metabolickou aktivitu buněk biofilmu u všech testovaných kvasinek. Použitím této látky došlo

k nejsilnější redukci metabolické aktivity v případě *C. parapsilosis* při koncentraci 5 mg/l (o 88 %). U kvasinek rodu *Candida* lze považovat chitosan za slibnou látku při jeho potenciálním využití pro inhibici tvorby biofilmu.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2018).

Literatura

Kapadia B. H., Berg R. A., Daley J. A., Fritz J., Bhawe A., Mont M. A. (2016) Periprosthetic joint infection. *Lancet*, 387, str. 386–394.

Kawai A., Yamagishi Y., Mikamo H. (2015) *In vitro* efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-*albicans* *Candida* species biofilms. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21, str. 647-653.

Kumar M.N.V.R., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J. (2004) Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 104, str. 6017-6082.

Maiolo E. M., Oliva A., Tabin U. F., Perrotet N., Borens O., Trampuz A. (2016) Antifungal activity against planktonic and biofilm *Candida albicans* in an experimental model of foreign-body infection. *Journal of Infection*, 72, str. 386-392.

Sinha V., Singla A., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceuticals*, 274 (1), str.1-33.

Heterotrofní kultivace jednobuněčných řas s využitím alternativních zdrojů substrátu

S. Lucáková, P. Kaštánek, O. Kronusová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Nenasycené mastné kyseliny ze skupiny omega-3 mají příznivý vliv na kardiovaskulární a centrální nervový systém seniorů, imunitu, vývoj mozku a zraku novorozenců. V současné době nacházejí tyto látky uplatnění v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Široké možnosti využití vedly společně s omezeným množstvím jejich tradičně využívaných zdrojů (mořských ryb) a stále častější preferencí vegetariánství k prohloubení zájmu o nalezení alternativních cest produkce těchto látek. Jednobuněčná protista řádu *Thraustochytrids* jsou jednou z perspektivních možností produkce doplňků stravy obsahujících omega-3 mastné kyseliny s vysokým podílem dokosaheptaenové kyseliny.

Tato práce je zaměřena na heterotrofní kultivaci zástupců rodu *Schizochytrium* a *Japonochytrium* s cílem výběru vhodného produkčního kmene omega-3 mastných kyselin (především kyseliny dokosaheptaenové) a na optimalizaci kultivačních podmínek do takové míry, aby byl možný budoucí scale-up procesu do poloprodučního měřítka. Na základě kultivace v komplexním médiu byl zvolen kmen *Schizochytrium limacinum* CO3-H, u kterého bylo dosaženo nejvyšší produktivity biomasy i dokosaheptaenové kyseliny (finální koncentrace biomasy 14,1 g.l⁻¹, dokosaheptaenové kyseliny 1,6 g.l⁻¹). Při vsádkové a fed-batch kultivaci byl testován vliv pH média, teploty, složení kultivačního média, aerace, obvodové rychlosti míchadla a přítokování substrátu na tvorbu biomasy, lipidů a dokosaheptaenové kyseliny. Na základě výsledků jednotlivých experimentů byly jako optimální podmínky kultivace zvoleny: pH média 5,5, teplota kultivace 25 °C, průtok aeračního plynu 5 l.min⁻¹, obvodová rychlost míchadla 0,8 m.s⁻¹. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při fed-batch kultivaci v bioreaktoru rozdělené do dvou fází lišících se v kultivačních podmínkách (ve druhé fázi byla snížena frekvence otáček míchadla a teplota), při které došlo k vytvoření maximální koncentrace biomasy (34,8 g.l⁻¹), lipidů (15,1 g.l⁻¹) i dokosaheptaenové kyseliny (5,6 g.l⁻¹).

Udržitelná produkce nanočástic stříbra za použití extraktu *Vitis vinifera*

J. Michailidu, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Nanočástice se v současnosti dostávají do středu zájmu lékařského odvětví hlavně díky své antimikrobiální aktivitě vůči mnohým (oportunním) patogenům. Jejich antibakteriální efektivita byla již experimentálně prokázána v případě účinku na *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a mnoho dalších lidských patogenů. Problematickým aspektem použití nanočástic se ale prozatím jeví jejich samotná syntéza – převládající přístupy, mezi něž patří mechanická či chemická syntéza, jsou ekologicky i ekonomicky nevýhodné. V této studii byla studována možnost výroby nanočástic stříbra pomocí extraktu *Vitis vinifera* a roztoku dusičnanu stříbrného. V experimentech byla použita dvě rozpouštědla (ethanol a destilovaná voda) a byly studovány také vlivy různé intenzity filtrace. Pro vyhodnocení úspěšnosti proběhlé biosyntézy byla zvolena spektrofotometrická analýza UV/VIS spekter. Naše výsledky prokázaly, že vodný i ethanolový extrakt *Vitis vinifera* je efektivním prostředníkem pro formaci nanočástic stříbra.

1. Úvod

Stříbrné nanočástice představují v době narůstající antibiotické rezistence mnoha lidských patogenů novou naději. Největší potenciál pro jejich využití leží v medicíně, jelikož vykazují dobré antimikrobiální vlastnosti, jež jsou dnes již relativně dobře prozkoumané. Jejich aktivita byla již prokázána u závažných lidských patogenů, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gnanajobitha a kol., 2013; Roe a kol., 2008; Yoon a kol., 2008).

Nejčastěji využívané přístupy syntézy nanočástic stříbra (mechanické, chemické, fyzikální) nejsou naneštěstí ekonomicky výhodné a některé z nich mohou být také nebezpečné z hlediska environmentálních dopadů. Je tedy žádoucí zkoumat možné udržitelné způsoby jak tato efektivní antimikrobiální činidla produkovat (Ghaffari-Moghaddam a kol., 2014; Makarov a kol., 2014; Patete a kol., 2011). V tomto kontextu byla sledována i efektivita extraktu *Vitis vinifera* v této studii.

2. Materiál a metody

2.1 Materiál

Letorosty *Vitis vinifera*, dusičnan stříbrný (Sigma aldrich), ethanol (40%), destilovaná voda

2.2 Výroba extraktu

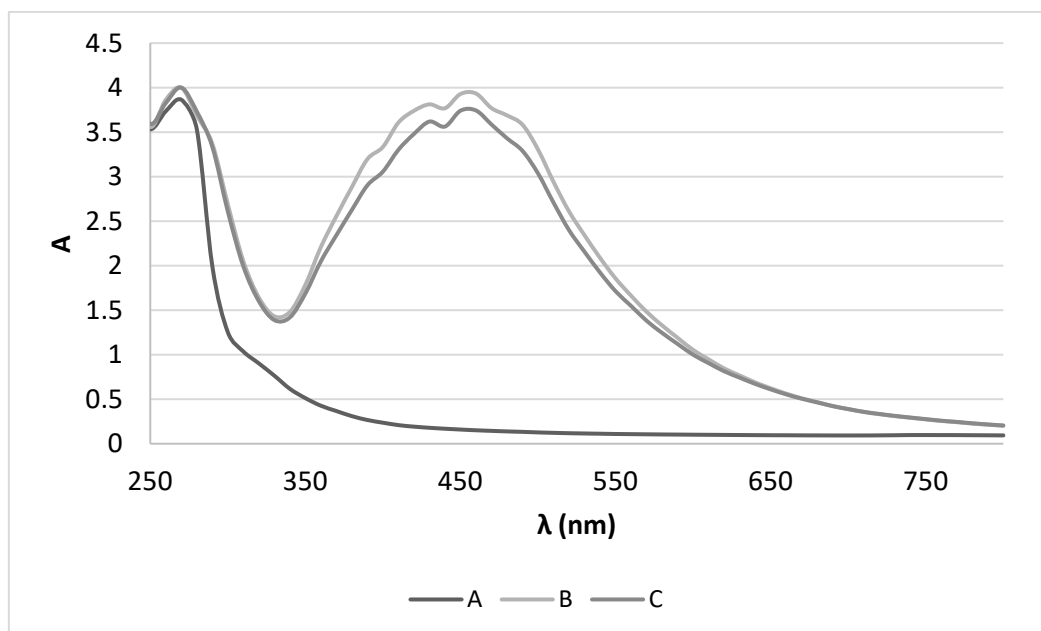
Letorosty *Vitis vinifera* byly homogenizovány za použití kuchyňského mixéru. 150 mg homogenizovaných letorostů bylo smícháno s 600 ml 40% ethanolu, či s 600 ml destilované vody, a tato směs byla macerována po dobu 24 hodin. Následně byl extrakt filtrován přes běžný laboratorní filtr (8 μm) a v některých případech ještě jednou skrze 0,2 μm filtr. Extrakt byl pro další užití uskladněn v chladničce.

2.3 Biosyntéza a detekce

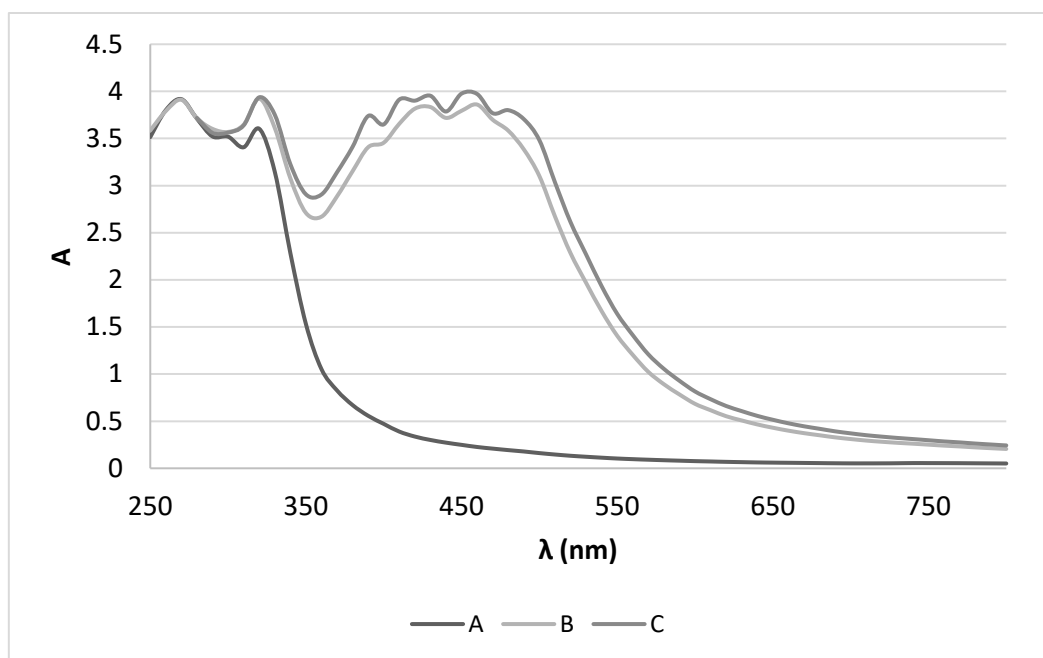
Extrakt *Vitis vinifera* byl smíchán s roztokem dusičnanu stříbrného (1 mM) v poměru 10:90. Experimenty byly provedeny v 96 jamkových mikrotitračních destičkách, pokaždé v 8 ekvivalentních paralelách a reakční směs byla ponechána po dobu 48 h při pokojové teplotě. Následně byla provedena UV-VIS spektrofotometrie na přístroji TECAN Reader. Poté byly vyhodnoceny výsledky spektrální analýzy (250-700 nm) a bylo vyhotoveno jejich grafické ztvárnění.

3. Výsledky a diskuze

V této studii byla pozorována možnost využití vodného či ethanolového extraktu z odpadního materiálu (letorostů) *Vitis vinifera* pro produkci stříbrných nanočástic. Data získaná z UV-VIS spektrofotometru z jednotlivých paralelních experimentů byla zprůměrována a převedena do grafu (Obr. 1 a 2).



Obr. 1 Biosyntéza nanočástic stříbra za použití vodného extraktu z letorostů *Vitis vinifera*; UV-VIS spektra (250-700 nm); A: kontrola – 10 % extrakt, B: 10 % extraktu (filtrovaného pouze jednou skrze běžný filtrační papír) + 90 % 1 mM roztoku dusičnanu stříbrného, C: 10 % extraktu (filtrovaného přes oba filtry – 8 μm a 0,2 μm)



Obr. 2 Biosyntéza nanočástic stříbra za použití ethanolového extraktu z letorostů *Vitis vinifera*; UV-VIS spektra (250-700 nm); A: kontrola – 10 % extrakt, B: 10 % extraktu (filtrovaného pouze jednou skrze běžný filtrační papír) + 90 % 1 mM roztoku dusičnanu stříbrného, C: 10 % extraktu (filtrovaného přes oba filtry – 8 μm a 0,2 μm)

Co se týče vodného extraktu *Vitis vinifera* (Obr. 1), byl v porovnání s kontrolou rozpoznán významný pík kolem 450 nm, jenž je dle literatury charakteristický právě pro výskyt stříbrných nanočástic v roztoku (Ghaffari-Moghaddam a kol., 2014; Gabriela a kol., 2017). Podobné výsledky byly pozorovány také při použití ethanolového extraktu *Vitis vinifera* (Obr. 2). Při pozorování vlivu dvojí filtrace při výrobě extraktu bylo zjištěno, že tato nemá zásadnější vliv na následnou biosyntézu při použití žádného ze studovaných extraktů (Obr. 1 a 2).

4. Závěr

Z našich výsledků vyplývá, že extrakt z letorostů *Vitis vinifera* je opravdu možno použít pro biosyntézu nanočástic stříbra. Bylo také zjištěno, že dodatečná filtrace přes 0,2 μm filtr, jež bude potenciálně potřebná pro budoucí testy antimikrobiální aktivity, biosyntézu nijak výrazně neovlivnila.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2018).

5. Literatura

Gabriela, Á.-M., Gabriela, M. O.-V., Luis, A.-M., Reinaldo, P.-R., Michael, H.-M., Rodolfo, G.-P., Roberto, V.-B. J. (2017) Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Mint Leaf Extract (*Mentha piperita*) and Their Antibacterial Activity. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 11, str. 914-923.

Ghaffari-Moghaddam, M., Hadi-Dabanlou, R., Khajeh, M., Rakhshanipour, M., Shameli, K. (2014) Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, str. 548–557.

Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Annadurai, G., Kannan C. (2013) Fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera* and evaluation of their antimicrobial efficacy. *Journal of nanostructure in chemistry*, 3, 67.

Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., Kalinina, N. O. (2014) “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6.

Patete, J. M., Peng, X., Koenigsmann, Ch., Xu, Y., Karn, B., Wong, S. S. (2011) Viable methodologies for the synthesis of high-quality nanostructures. *Green Chemistry* 13, 482.

Yoon, K.-Y., Byeon, J. H., Park, J.-H., Ji, J. H., Bae, G. N., Hwang, J. (2008) Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against *Bacillus subtilis* Bioaerosols. *Environmental Engineering Science*. 25, str. 289-294.

Vliv nanočástic kovů na patogenní bakterie rostoucí v suspenzi a biofilmu

V. Musilová, A. Čejková, M. Koukalová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

V posledních letech se velmi diskutovaným problémem stává rezistence některých mikroorganismů vůči používaným antibiotikům. Tuto problematiku navíc ještě podporuje skutečnost, že některé bakteriální kmeny jsou schopny růst ve formě biofilmu. Vzhledem k jeho vysoké rezistenci vůči antibiotikům se hledá řešení, jak tvorbu bakteriálního biofilmu inhibovat. Jednou ze slibných alternativ k běžným antibiotikům se jeví použití nanočástic, které mají jedinečné antibakteriální vlastnosti a zájem o ně vyplývá zejména z jejich fyzikálních, chemických a biologických vlastností, které jsou dány jejich malou velikostí a tvarem.

Experimentální část byla zaměřena na sledování vlivu nanočástic zlata a platiny na patogenní bakterie rostoucí v suspenzi a v biofilmu. Jako modelové mikroorganismy byly použity bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*. Po expozici buněk nanočásticím byly sledovány změny celkového množství biomasy biofilmu a metabolické aktivity buněk a dále změna hladiny signálních molekul, které jsou zodpovědné za mezibuněčnou komunikaci (*quorum sensing*).

Vliv nutričních faktorů a kultivačních podmínek na růst bakterií *Salinispora tropica*

Š. Neřoldová, Z. Ježková, T. Brányik

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Salinispora tropica je vláknitá mořská bakterie ze skupiny Aktinomycet, jejíž sekundární metabolit Salinosporamid A má velký potenciál při léčbě rakoviny. Dokáže totiž specificky inhibovat funkci proteazomu 26S, podjednotky 20S, aniž by inhiboval funkci ostatních proteázových aktivit buňky. Cílem této práce bylo celkové zefektivnění procesu kultivace bakterie *S. tropica*. Snahou bylo zvýšení nárůstu biomasy, dosažení vyšších hodnot produktivity a snížení finančních nákladů na kultivaci. Byl sledován vliv zdroje a koncentrace dusíku v médiu, vliv světla, teploty, geometrie baňek a přestupu kyslíku na růst biomasy při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách na třepačce. Dále byl testován převod kultivace do většího měřítka laboratorních reaktorů, kde byl sledován vliv vzdušnění a rychlosti míchání na růst biomasy. Byla prováděna jak vsádková, tak přítokovaná kultivace.

Ze zdrojů dusíku bylo nejvyššího nárůstu biomasy ($9,55 \text{ g.l}^{-1}$) dosaženo v médiu s peptonem ze sóji. V baňkách s narážkami byla oproti kultivaci v baňkách bez narážek naměřena o 138 % vyšší hodnota objemového součinitele přestupu kyslíku a kultivace v těchto baňkách byla o 35 % účinnější z hlediska nárůstu biomasy. Při teplotě 28°C bylo dosaženo vyšší koncentrace biomasy o 160 % než při kultivaci při teplotě 23°C . Dále bylo lepších výsledků (o 23 %) dosaženo při kultivaci na světle ($25 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) než ve tmě. Při kultivaci v reaktorech došlo k menšímu růstu biomasy a to jak při vsádkové kultivaci (o 45 %), tak při přítokované kultivaci (o 56 %) oproti kultivaci v Erlenmeyerových baňkách s narážkami.

Využití materiálů schopných modifikovat vlnovou délku světla v kultivaci fototrofních organismů

T. Potočár, T. Brányik

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Jednobuněčné řasy jsou fotosyntetické organismy produkující široké spektrum žádaných sloučenin, jako jsou lipidy či fytohormony. Jedním ze zástupců této skupiny je *Ch. vulgaris*, jejíž roční produkce dosahuje 2000 tun. Pro efektivní fotosyntézu je třeba záření nacházející se v části viditelné oblasti. Zbytek solárního spektra je pro fotosyntézu nevyužit, či ji inhibuje a poškozuje. Díky fotovoltaiickým systémům jsou známe materiály použitelné pro konverzi nevyužitých vlnových délek do oblasti PAR. Ve fotovoltaiice jsou snahy vytvořit takový materiál, který by dopadající UV světlo konvertoval do viditelné až blízké infračervené oblasti a ze vzdálené infračervené oblasti do blízké až viditelné. Procesy se nazývají up- a down- konverze podle změny energie fotonu. Pro většinu materiálů je společný znak obsah kationtů prvků vzácných zemin. Těmito částicemi je potom možné obohatit borosilikátové sklo i jiné skelné materiály, potahové vrstvy či vytvářet kultivační nádoby z dalších transparentních obohacených materiálů.

1. Jednobuněčné řasy a fotosyntéza

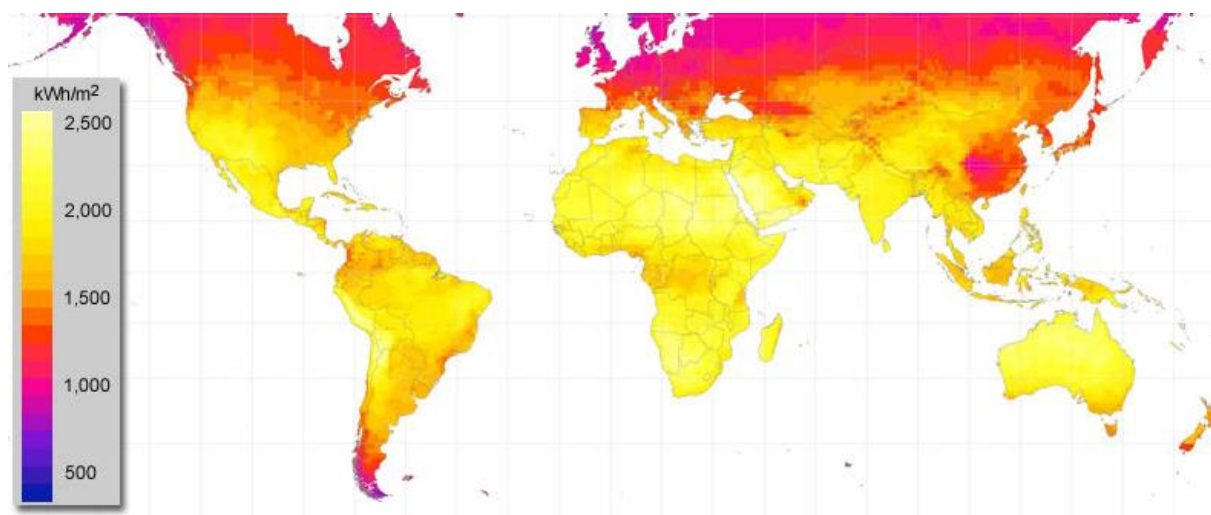
Jednobuněčné řasy (mikrořasy) představují skupinu mikroorganismů s velkou biodiverzitou čítající okolo 40000 popsaných zástupců. Jedná se o fotosyntetické mikroorganismy fixující oxid uhličitý s potenciálem produkce sloučenin s vysokou přidanou hodnotou. Mezi tyto produkty patří například karotenoidy, polynenasycené mastné kyseliny, fytohormony či polysacharidy (Amrei a kol., 2015; Safi a kol., 2014).

Chlorella vulgaris byla objevena roku 1890 a už počátkem 19. století byla testována jako zajímavý zdroj proteinů při alternativní výživě. Jedná se o mikrořasu spadající dle NCBI do říše Protista, oddělení *Chlorophyta*, řád *Chlorellales*, čeleď *Chlorellaceae*, rod *Chlorella*. Tato řasa má široký biotechnologický potenciál. K roku 2009 dosáhla celosvětová produkce suché biomasy *Chlorella vulgaris* 2000 tun, ze kterých bylo 30 % použito jako krmná biomasa. (Liu a Hu, 2013; Safi a kol., 2014)

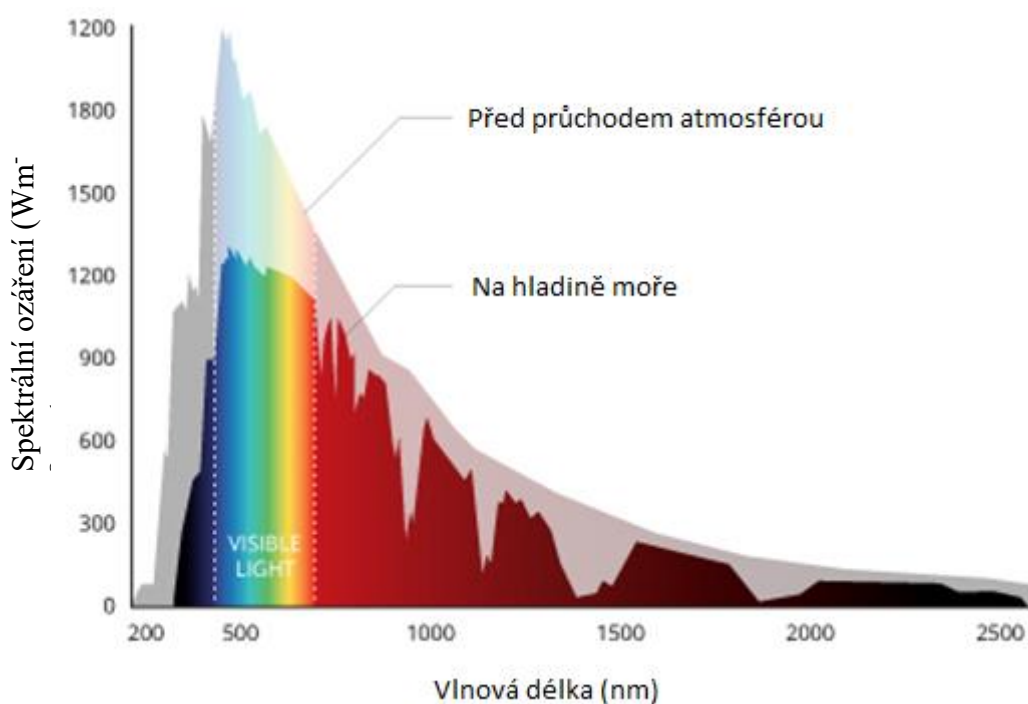
Biotechnologický potenciál rodu je široký. Biomasa řasy *Chlorella* je velmi bohatá na proteiny, jichž obsahuje i více než 60 % suché váhy. Dále je složena z 10–15 % sacharidů a 12–15 % lipidů suché váhy. Obsahuje také velké množství aminokyselin, včetně těch pro člověka esenciálních; vitaminů jako je provitamin A, vitaminy B1, B2, B6, B12, C, E, kyselinu folovou, niacin a kyselinu pantothenovou; minerálů jako je sodík, draslík, vápník, hořčík, železo, mangan, zinek, měď a další; pigmentů chlorofylu *a*, *b*, široké spektrum karotenoidů, konkrétně beta-karoten, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, neoxanthin a antheraxanthin. Obvykle je biomasa řasy *Chlorella* prodávána jako potravinový doplněk ve formě sušeného prášku, tablet nebo kapslí. Jedním z produktů je také *Chlorella* růstový faktor (CGF, z anglického *Chlorella* Growth Factor), což je extrakt z buněk *Chlorella* (Liu a Hu, 2013).

Chlorella je studována také v souvislosti s vývojem a produkcí biopaliv. Ačkoli za běžných podmínek je obsah lipidů v biomase relativně nízký, při výběru vhodného produkčního kmene a při zachování vhodných kultivačních podmínek dosahuje až 60 %. Výsledná bionafta, kterou lze z řasové biomasy získat, má vlastnosti srovnatelné s běžným dieselem (Xu a kol., 2006). V neposlední řadě je také zkoumáno použití biomasy v čistírnách odpadních vod (Safi a kol., 2014).

Při fototrofní kultivaci je světlo, respektive fotony, hlavním zdrojem energie pohánějící fotosyntetickou asimilaci v organismu. Současně je intenzita světla a jeho spektrální profil limitujícím faktorem této strategie kultivace (Amrei a kol., 2015). V nulové nadmořské výšce je spektrum elektromagnetického záření rozloženo mezi 290 nm až 4000 nm, ale fotosynteticky aktivní záření (PAR) je z tohoto spektra pouze výseč mezi 400 až 700 nm (část viditelného spektra, VIS 390 až 760 nm). Regiony ultrafialového a infračerveného záření zůstávají při fotosyntéze nevyužity. Intenzitu slunečního záření v oblasti PAR ovlivňují 3 základní faktory: zeměpisná poloha, roční období a denní doba. Maximální hodnoty intenzity záření PAR jsou detekovatelné v poledne v rovníkových oblastech během letních měsíců. Celoroční sumy záření jsou znázorněny na obrázku 1 (www.fondriest.com, 2014, online).



Obr. 1. Mapa intenzity sluneční energie za jeden rok (<http://www.greenrhinoenergy.com>, 2018, online)



Obr. 2. Spektrum solárního záření před a po průchodu atmosférou (www.fondriest.com, 2014, online)

2. Materiály modifikující vlnovou délku světla

Po průchodu atmosférou se část elektromagnetického spektra pohltí (obr. 2) a majoritní zastoupení 90-95 % v ultrafialové oblasti zaujímá UV-A (vlnové délky mezi 315 a 400 nm), zbytek připadá na UV-B (vlnové délky mezi 280 a 315 nm). Prokázalo se, že na tyto dva typy

záření reaguje široké spektrum organismů, jedná se buď o fotoinhibici nebo přímé poškození fotosyntetického aparátu. Díky spektrálnímu posunu ultrafialového záření do viditelného spektra by bylo možné omezit tyto nežádoucí jevy a současně by bylo možné prodloužit kultivační období s vysokou intenzitou záření potřebného pro fotosyntézu, a tím zvýšit produktivitu kultivace řas mimo letní měsíce i v oblastech vzdálenějších od rovníku. Současně by se prodloužila i produkční fáze dne. Pro maximalizaci utilizaci světla je potřeba najít takový materiál, který by dosáhl nejvyšší shody mezi absorpčním spektrem daného pigmentu a profilem dodávaného světla. V případě chlorofylu se maxima nachází mezi oblastí modrého a červeného světla (Amrei a kol., 2014).

Proces, při kterém je možné docílit změny vlnové délky světla z UV oblasti na viditelnou, se nazývá down-konverze. Obecně je down-konverze proces, při kterém je foton s vysokou energií konvertován na dva nebo více fotonů o energii nižší. Podstata této reakce se dá vysvětlit pomocí iontu, který bude považován za opticky aktivní centrum se třemi energetickými hladinami. Když je foton absorbován, dostane se ion do maximální energetické hladiny. Následný návrat do hladiny s minimální energií je sledem dvou stimulovaných emisí, při kterých jsou uvolněny dva fotony o nižší energii. Tento děj se může odehrávat i v systémech užívající dva různé ionty, kde se excitovaný ion dostává do minimální energetické hladiny energetickým transferem na druhý ion (de la Mora a kol., 2017).

Pro docílení výše zmíněného procesu se užívají ionty lanthanoidů, které jsou vhodné díky orbitalům 4f. Energie těchto orbitalů je dostatečná a mohou dosahovat různých energetických hladin. Současně jim tento orbital slouží jako efektivní štít, který zachovává vlastnosti volných iontů i po přidání do vybraných materiálů. Mezi nejpoužívanější lanthanoidy se řadí ytterbium, terbium, cer, gadolinium a další, které jsou fixovány v polymerech (polymethylmethakrylát), borosilikátovém sklu nebo v tenkých vrstvách tvořených metodou sol-gel (Lv a kol., 2014; de la Mora a kol., 2017).

3. Aktuální stav v řešení problematiky

Německá výzkumná skupina započala s řešením problematiky týkající se konverze fotosynteticky nevyužitého světla. Jako konverzní materiál použili $\text{Ca}_{0.59}\text{Sr}_{0.40}\text{Eu}_{0.01}\text{S}$. Z emisních a excitačních hodnot tohoto materiálu vyplývá, že nejvyšších intenzit záření je dosaženo v oblasti mezi 650 až 700 nm a překrývá se s absorpcemi maximy chlorofylu a i b. Konverzní vrstva je umístěna na zadní stranu deskového vertikálního reaktoru před zrcadlo. Jako zdroj záření s profilem podobným slunečnímu záření byla použita metalhalidová výbojka. V tomto uspořádání je konvertováno částečně pohlcené záření až po průchodu buněčnou

suspenzí. Jako modelový organismus byl zvolen *Haematococcus pluvialis*. Z publikovaných růstových křivek je vyšší nárůst počtu buněk o 36 % v reaktoru s konverzní vrstvou oproti kontrolnímu (Wondraczek a kol., 2013).

Íránsko-nizozemská skupina se zabývala kultivací cyanobakterie *Synechococcus*. Zdrojem záření v tomto případě byla výbojka, která má emisní maximum v blízké UV oblasti (370 nm). Konverzní materiál byl komerční výrobek Uvitex OB nanesený v matrici na osvětlovanou stranu reaktoru. V tomto uspořádání docházelo k totální konverzi UV na viditelné spektrum s maximem při 440 nm, opět odpovídající absorpčnímu spektru pigmentu. V tomto experimentu byla rozhodující koncentrace konvertoru v matrici. Při koncentracích nižších než 33 mg Uvitex OB v 1 gramu suché matrice byl výsledný počet buněk nižší než v kontrolním reaktoru bez konvertoru. Při koncentraci 33 mg.g⁻¹ bylo dosaženo zhruba 10% nárůstu počtu buněk. Další varianty nebyly testovány (Amrei a kol., 2014).

4. Závěr

Použití materiálů schopných konvertovat ultrafialové záření na záření viditelné oblasti je možným postupem, jak zvýšit produkci fototrofních organismů, zlevnit kultivaci a zvýšit produkci látek s přidanou hodnotou, jako jsou lipidy nebo vitamíny. Tyto materiály jsou přejímány z rozsáhlých fotovoltaických výzkumů, díky čemuž se počty možných materiálů zvyšují a usnadňuje se hledání shody spekter mezi fotosyntetickým pigmentem a daným materiálem.

5. Literatura

Amrei D. H., Nasernejad B., Ranjbar R., Rastegar S. (2014) Spectral shifting of UV-A wavelenghts to blue light for enhancing growth rate of cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 26, str. 1493-1500.

Safi C., Zebib B., Pontalier P. Y., Vaca-Garcia C. Merah O. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 35, str. 265-278.

Liu J., Hu Q. (2013) *Chlorella*: Industrial production of cell mass and chemicals (Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2nd edition, edited by Amos Richmond, Ph.D., Prof. Emeritus, Qiang Hu, Ph.D.) Wiley-Blackwell, USA, str. 329 – 338.

Xu H.; a kol. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, str. 499–507.

Amrei D. H., Ranjbar R., Rastegar S., Nasernejad B., Nejadebrahin A. (2015) Using Fluorescent material for enhancing microalgae growth rate in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27, str. 67-74.

Fundamental of environmental measurements [online]. Datum vytvoření 21. 3. 2014 [25. 1. 2018] Dostupné z: <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/weather/photosynthetically-active-radiation/#PAR17>

Green Rhino Energy Ltd. [online]. Rok vytvoření 2016 [25. 5. 2018] Dostupné z: <http://www.greenrhinoenergy.com/solar/radiation/empiricalevidence.php>

de la Mora M. B., Amelines Sarria O., Monroy B. M., Hernández-Pérez C. D., Lugo J. E. (2017) Materials for downconversion in solar cells: Perspectives and challenges. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 165, str. 59-71.

Lv T. S., Xu X. H., Zhou D. C., Yu H. L., Qui J. B. (2014) Efficient multi-wavelength-driven spectral conversion from ultraviolet to visible in transparent borosilicate glasses. *Ceramics International*, 40, str. 12367-12373.

Wondraczek L., Batentschuk M., Schmidt M. A., Borchardt R., Scheiner S., Seemann B., Schweizer P., Brabec C. J. (2013) Solar spectral conversion for improving the photosynthetic activity in algae reactors. *Nature Communications*, 2047, str. 1-6.

Antibiofilmové vlastnosti biologicky aktivních látek v kombinaci s netermálním plazmatem

E. Sembolová, E. Vaňková, M. Paldrychová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

V posledních letech přibývají rezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, které jsou odolné vůči běžně používaným antibiotikům (například aminoglykosidům, karbapenemům a fluorochinolonům). Biofilmové populace *P. aeruginosa* jsou více rezistentní než populace suspenzních buněk a jsou strůjci řady zdravotních komplikací. Způsobují například pooperační infekce, komplikace průběhu cystické fibrózy a infekce močových cest. Velké riziko nastává při pooperačních infekcích. Bakteriální buňky, které vnikly do těla pacienta, mohou vytvářet biofilmy na intravenózních katetrech, umělých srdečních chlopních, kloubních náhradách či zubních implantátech. Cílem naší studie bylo nalézt vhodné alternativy pro nahrazení v současné době používaných, ne zcela účinných metod, nebo jejich použití v různých kombinacích, díky kterým by byl společný účinek posílen. Slibnou alternativou s prokázaným antibakteriálním účinkem může být netermální plazma (NTP), chitosan a extrakt z modrých hroznů *V. vinifera*.

Patogenita bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa patří mezi gramnegativní, aerobní bakterie, tyčinkovitého tvaru se schopností vytvářet biofilm, který osidluje různé typy povrchů. Biofilm *P. aeruginosa* je tvořen z matrice biofilmu (vyprodukované buňkami) a ze samotných buněk. Matrice biofilmu se skládá z exopolysacharidů, extracelulární DNA (eDNA), extracelulárních proteinů a extracelulárních lipidů (Rasamiravaka a kol., 2015).

Velké množství extracelulárních proteinů je produkováno za účelem manifestace nákazy (Rasamiravaka a kol., 2015). Také extracelulární lipidy, především rhamnolipidy jsou důležitými virulentními faktory, zodpovědnými za centrální destrukci leukocytů a erytrocytů (Laabei a kol., 2014). *P. aeruginosa* produkuje také toxiny fenazinové struktury. Ty jsou známy jako modrozelené pigmenty pyocyanin, pyoverdin a pyochelin, které mohou za nazelenalé zbarvení hlenu či infikované rány (Mulcahy a kol., 2014).

Tvorba biofilmu a dalších virulentních faktorů *P. aeruginosa* je založena na mezibuněčné komunikaci bakterií, tzv. quorum sensing (QS). Mezibuněčná komunikace je podmíněna hustotou populace buněk. Bakteriální buňky biofilmového fenotypu produkují na rozdíl od suspenzních bakteriálních buněk vyšší množství signálních molekul neboli autoinduktorů. Je-li v daném prostředí vytvořena dostatečná koncentrace autoinduktorů, dojde k jejich navázání na specifické bakteriální receptory, aktivaci signálních drah a následné transkripci genů kódujících faktory virulence. *P. aeruginosa* má 4 doposud známé systémy QS: LasI/LasR systém, RhlI/RhlR systém, *Pseudomonas* chinolon signální systém (PQS) a integrovaný QS systém (Jimenez a kol., 2012; Kariminik a kol., 2017; Lee a kol., 2013; Miller, Bassler, 2001).

Léčba onemocnění spojená s tvorbou biofilmu

Díky doposud získaným informacím o *P. aeruginosa* mohou být nalezeny nové agens a jejich kombinace, které by dokázaly ovlivnit QS systémy těchto bakterií a působily antibiofilmově.

Netermální plazma

Vhodnou alternativou pro dlouhodobě používané, ne zcela účinné metody (např. antibiotika, vůči kterým si mikroorganismy vytvořily značnou rezistenci) může být netermální plazma (NTP). To je již využíváno pro svůj velký potenciál v medicíně. Využití NTP je založeno především na jeho antibakteriálním účinku (léčba kožních infekcí) (Leštinská a kol., 2011). NTP nachází také další využití při zrychlení koagulace krve během operativních zákroků, při desinfekci kožních infekcí a katetrů, při indukci apoptózy nádorových buněk a léčbě rakoviny (Fridman a kol., 2007; Fridman a kol., 2008; Kang a kol., 2014; Julák, Scholtz, 2013; Robert a kol., 2013).

▪ Definice plazmatu

Plazma je známo jako čtvrtý skupenský stav, jde o ionizovaný plyn, který vykazuje znaky kolektivnosti (vzájemné působení částic pomocí makroskopických elektromagnetických polí) a kvazineutritality. Kvazineutralita je pojem používaný pro označení celkově neutrálního náboje. Na základě těchto podmínek působí plazma navenek jako elektricky neutrální (Eliezer, Eliezer, 2001; Martišovitš, 2006).

Existují dva druhy plazmatu: termální plazma a netermální plazma (NTP). Rozdílem mezi termálním a netermálním plazmatem jsou teploty částic (Eliezer, Eliezer, 2001). Pojem

„netermální“ spočívá v tom, že elektrické pole urychluje především elektrony, a proto pouze jejich teplota dosahuje vysokých hodnot. Neutrální částice a ionty nesou pouze zanedbatelnou energii a zůstávají chladnými (Martišovitš, 2006; Eliezer, Eliezer, 2001).

- Vznik netermálního plazmatu a jeho antimikrobiální účinky

Netermální plazma (NTP) může být generováno při sníženém nebo při atmosférickém tlaku. Jako nosný plyn pro generaci NTP jsou nejčastěji využívány vzduch, dusík, kyslík, helium, vodík, argon nebo jejich směsi (Moreau a kol., 2008). NTP vzniká rozkladem molekul nosného plynu v elektrickém poli a také z interakcí nově vytvořených druhů částic nosného plynu. Částice mezi sebou interagují na základě fyzikálně-chemických reakcí, např. rekombinací (opak ionizace), excitací, ionizací nebo disociací. Vznikají tak neutrální či excitované molekuly nebo atomy, negativně a pozitivně nabitě ionty, volné radikály, elektrony a fotony (Ragni a kol., 2010). NTP tak může působit antimikrobiálně na gramnegativní a grampozitivní bakterie a kvasinky (Moreau a kol., 2008).

Možný mechanismus účinku NTP na mikroorganismy pozorovali ve své práci Ohshima a kol. (1995). Následkem použití pulsního elektrického pole na *Saccharomyces cerevisiae*, pozorovali tvorbu otvorů v cytoplazmatických membránách buněk této kvasinky. Tvorba pórů v cytoplazmatické membráně může být způsobena radikály, které dopadají na mikroorganismy. Buňky nestíhají opravovat narušení cytoplazmatických membrána, tím ztrácí svou životaschopnost (Moreau a kol., 2008). Kromě radikálů a iontů se při plazmatickém výboji vytváří i nízké procento UV záření (140 - 300 nm). Neschopnost rychlé reparace buňky může být způsobena také degradací DNA, která byla vystavena UV záření (Bahre a kol., 2011; Fridman a kol., 2007).

Ve studii Alkawareek a kol. (2012) byly testovány antibiofilmové účinky NTP na gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a *P. aeruginosa*, grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*. Grampozitivní bakterie byly vůči působení NTP citlivější než gramnegativní bakterie. NTP také působí inhibičně na QS systémy, které řídí tvorbu biofilmu a dalších virulentních faktorů.

NTP by mohlo být vhodnou alternativou k antibiotikům při lokálním ošetření bakteriálního biofilmu jako tomu je například u kloubních náhrad (z Ti6Al4V slitiny) kolonizovaných biofilmem *P. aeruginosa*. Pacient by tak nemusel být vystaven vysokým dávkám antibiotik a jejich případným vedlejším účinkům, které mohou způsobovat oslabení imunitního systému pacienta (Ubeda, Pamer, 2012).

Přírodní biologicky aktivní látky

Vhodnou alternativou antibiotik mohou být také přírodní látky, které jsou zastoupeny v široké škále rostlin či živočichů. Kromě podpůrné stavební funkce slouží tyto látky jako antimikrobiální ochrana rostlin či živočichů. Mnoho těchto přírodních látek je pro své antimikrobiální a antioxidační účinky v dnešní době využíváno jako potravinové doplňky, který slouží jako prevence před zátěží organismu toxickými látkami i před nákazou mikroorganismy.

▪ Chitosan

Chitosan je přírodní lineární biopolymer, který je složen ze sacharidových jednotek (1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukan(N-acetylD - glukosamin) a (1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glukan(D-glukosamin). Je získáván alkalickou N-deacetylací chitinu. Chitin se běžně vyskytuje ve schránkách mořských korýšů, anebo může být produktem fermentace například *Rhizopus oryzae* (Croisier, Jérôme, 2013; Vinche a kol., 2012; Nilsen-Nygaard a kol., 2015).

Chitosan se vyznačuje svou antimikrobiální a antifungální aktivitou. Může být vhodný pro použití v mnoha oblastech jako je potravinářský průmysl (obalové materiály), výroba kosmetiky (zpomalení procesu stárnutí pokožky), farmacie (tkáňové inženýrství - obvazy na rány, antimikrobiální látky, pomocné látky pro vakcíny a nanočástice)(Hmed a kol., 2017; Elieh-Ali-Komi, Hamblin, 2016; Dutta a kol., 2009; Senda a kol., 1996). Existuje několik různých modelů působení chitosanu. Jeden z nich pojednává o elektrostatických interakcích kladně nabitých funkčních skupin molekuly chitosanu se záporně nabitou cytoplazmatickou membránou (fosfátovými skupinami molekul fosfolipidu) bakterie. Tyto interakce byly také pozorovány mezi chitosanem a záporně nabitými molekulami v buňce, např. s proteiny či nukleovými kyselinami (v DNA). Veškeré tyto interakce mohou vést k bakteriostatickému účinku chitosanu (Tsai, Su, 1999; Hadwiger a kol., 1986; Senda a kol., 1996; Shahidi a kol., 1999).

Dalším možným mechanismem účinku je schopnost chelatace iontů, tím může chitosan ovlivňovat například transmembránový transport. Chitosan může způsobovat záchyt iontů Ca^{2+} (nebo K^+ , Na^+), které jsou potřebné pro udržení homeostázy buňky. Také může z blízkého okolí buňky vyvazovat různé ionty kovů, které jsou důležité pro správnou funkci metaloproteinů, což vede ke snížení metabolické aktivity buněk a tím také k bakteriostatickému efektu (Bégin, Van Calsteren, 1999).

Extrakt *Vitis vinifera*

Extrakt *V. vinifera*, neboli révy vinné, je komplexní směs látek *trans*-resveratrolu, *cis*-resveratrolu, *trans*-polydatinu, quercetinu, kaempferolu, kyseliny abscisové, katechinů, prokyanidinů, antokyanidů, kyseliny gallové a dalších. Většina těchto látek je řazena mezi polyfenolické látky a jejich základní struktura je C₆-C₂-C₆ (neplatí pro kyseliny). Pro pochopení působení extraktu *V. vinifera* vzniklo velké množství studií, zabývajících se jeho biologickou aktivitou. V dnešní době jsou již popsány antioxidační účinky, kardioprotektivní účinky, protirakovinné, protizánětlivé a antimikrobiální účinky extraktu (Daglia, 2012; Xia a kol., 2010).

Nejvyšší citlivost buněk vůči působení tohoto extraktu byla pozorována u grampozitivních bakterií, menší citlivost u gramnegativních. Také u kvasinek byla zaznamenána značná citlivost vůči tomuto extraktu. Mechanismus účinku extraktu však není zcela známý, ale v mnoha případech se hovoří o změně permeability cytoplazmatické membrány v přítomnosti látek obsažených v extraktu, inhibici extracelulárních enzymů mikroorganismů nebo zpomalení či zastavení růstu mikroorganismů na základě deprese iontů železa a zinku v okolním prostředí, které byly chelatovány prokyanidiny (Daglia, 2012; Xia a kol., 2010).

Jednotlivé složky extraktu *V. vinifera* jsou v posledních letech testovány jako vhodné antibiofilmové agens cílící na QS systémy grampozitivních i gramnegativních bakterií (Daglia, 2012; Xia a kol., 2010).

Závěr

V posledních letech přibývá více rezistentních kmenů *P. aeruginosa*. Jsou proto hledány takové agens, které by mohly nahradit stávající méně účinná terapeutika. Se zvyšující se rezistencí bakterií také roste trend aplikace kombinací jednotlivých agens. Z ekonomického hlediska se NTP, chitosan a extrakt *V. vinifera* řadí mezi méně nákladné léčivé prostředky. Dle provedených studií může být NTP velice dobré antibiofilmové agens, na které si bakterie doposud nebyly schopny vytvořit rezistenci. V kombinaci s chitosanem či extraktem *V. vinifera* může být dosaženo výrazného aditivního účinku.

Literatura

- Alkawareek M. Y., Algwari Q. T., Gorman S. P., Graham W. G., O'connell D., Gilmore B. F. (2012) Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65, str. 381-384.
- Bahre H., Lange H., Schulz-von der Gathen V., Foest R. (2011) Vacuum ultraviolet (VUV) emission of an atmospheric pressure plasma jet (μ -APPJ) operated in helium-oxygen mixtures in ambient air. *Acta Tech.*, 56, str. 199.
- Bégin A., Van Calsteren M.-R. (1999) Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, str. 63-67.
- Croisier F., Jérôme C. (2013) Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49, str. 780-792.
- Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, str. 174-181.
- Dutta P., Tripathi S., Mehrotra G., Dutta J. (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, str. 1173-1182.
- Eaton P., Fernandes J. C., Pereira E., Pintado M. E., Malcata F. X. (2008) Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108, str. 1128-1134.
- Elieh-Ali-Komi D., Hamblin M. R. (2016) Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International Journal of Advanced Research*, 4, str. 411.
- Eliezer S., Eliezer Y. (2001) The fourth state of matter: an introduction to plasma science, CRC Press, 224 stran.
- Fridman G., Peddinghaus M., Balasubramanian M., Ayan H., Fridman A., Gutsol A., Brooks A. (2006) Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 26, str. 425-442.
- Fridman G., Shereshevsky A., Jost M. M., Brooks A. D., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V., Friedman G. (2007) Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 27, str. 163-176.
- Hadwiger L. A., Kendra D. F., Fristensky B. W., & Wagoner W. (1986) Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi (Chitin in nature and technology, Muzzarelli R., Jeuniaux Ch., Gooday G. W., Eds.), Springer, Boston, MA, str. 209-214.
- Helander I., Nurmiäho-Lassila E.-L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. (2001) Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, str. 235-244.
- Hmed A. A., Sofy A. R., Sharaf A. E.-M. M., El-Dougdoug K. A. (2017) Effectiveness of Chitosan as Naturally-Derived Antimicrobial to Fulfill the Needs of Today's Consumers Looking for Food without Hazards of Chemical Preservatives. *Journal of Microbiology Research*, 7, str. 55-67.
- Julák J., Scholtz V. (2013) Decontamination of human skin by low-temperature plasma produced by cometary discharge. *Clinical Plasma Medicine*, 1, str. 31-34.
- Kang S., Cho J., Chang J., Shin Y., Kim K., Park J., Yang S., Lee J., Moon E., Lee K. (2014) Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Death & Disease*, 5, str. 1056.
- Kariminik A., Baseri-Salehi M., Kheirkhah B. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. *Immunology Letters*, 190, str. 1-6.
- Laabei M., Jamieson W. D., Lewis S. E., Diggle S. P., Jenkins A. T. A. (2014) A new assay for rhamnolipid detection—important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, str. 7199-7209.

- Lee J., Wu J., Deng Y., Wang J., Wang C., Wang J., Chang C., Dong Y., Williams P., Zhang L.-H. (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9, str. 339.
- Leštinská L., Martišovič V., Machala Z. (2011) Corona discharge as a temperature probe of atmospheric air microwave plasma jet. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112, str. 2779-2786.
- Martišovič V. (2006) Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium., Univerzita Komenského, Bratislava, 189 stran.
- Miller M. B., Bassler B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55, str. 165-199.
- Moreau M., Orange N., Feuilloley M. (2008) Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26, str. 610-617.
- Mulcahy L. R., Isabella V. M., Lewis K. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*, 68, str. 1-12.
- Nilsen-Nygaard J., Strand S. P., Vårum K. M., Draget K. I., Nordgård C. T. (2015) Chitosan: Gels and interfacial properties. *Polymers*, 7, str. 552-579.
- Ohshima T., Sato M., Saito M. (1995) Selective release of intracellular protein using pulsed electric field. *Journal of Electrostatics*, 35, str. 103-112.
- Ragni L., Berardinelli A., Vannini L., Montanari C., Sirri F., Guerzoni M. E., Guarnieri A. (2010) Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *Journal of Food Engineering*, 100, str. 125-132.
- Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P., El Jaziri M. (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*.
- Robert E., Vandamme M., Brullé L., Lerondel S., Le Pape A., Sarron V., Riès D., Darny T., Dozias S., Collet G. (2013) Perspectives of endoscopic plasma applications. *Clinical Plasma Medicine*, 1, str. 8-16.
- Shahidi F., Arachchi J. K. V., Jeon Y.-J. (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, str. 37-51.
- Senda K., Arakawa Y., Nakashima K., Ito H., Ichiyama S., Shimokata K., Kato N., Ohta M. (1996) Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, str. 349-353.
- Tsai G.-J., Su W.-H. (1999) Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62, str. 239-243.
- Ubeda C., Pamer E. G. (2012) Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology*, 33, str. 459-466.
- Xia E. Q., Deng G. F., Guo Y. J., Li H. B. (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11, str. 622-646.

Možnosti cíleného potlačení tvorby biofilmů a jejich stability pomocí derivátů kobalt bis-1,2-dikarbolidu

Štursová J., Lokočová K., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mnoho mikroorganismů se v přírodě vyskytuje ve formě organizovaných biofilmových struktur. Biofilm tvoří i bakterie patogenní, což představuje vážný hygienický problém ve zdravotnictví i potravinářských provozech. Vzhledem k vlastnostem biofilmu bývá léčba obtížná s hrozcím vznikem rezistence. Proto jsou patogenní mikroorganismy tvořící biofilm často příčinou úmrtí a přibývají důkazy, že nemoci zprostředkované tvorbou biofilmu přispívají k rozvoji chronických onemocnění a opakujícím se infekcím. Vzhledem ke skutečnosti, že známé způsoby nejsou vždy spolehlivé a účinné a rezistence vůči antibiotikům představuje pro člověka velkou hrozbu, vzniká potřeba vyvíjet nové metody. Vysoký potenciál se naskytá také v tzv. trojrozměrných karboranových strukturách, mezi které patří i kobalt bis-1,2-dikarbolid s unikátními fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi.

Vývojový cyklus bakteriálního biofilmu

Tvorba biofilmu je vícestupňový proces, jehož výsledkem je strukturovaný ekosystém, který je tvořený mikroorganismy se změněnou fyziologií. Vzniká zachycením mikroorganismů na povrch a následným zapouzdřením v matrix, který se skládá z polysacharidů, proteinů a extracelulární DNA (eDNA) (Wolska a kol., 2016).

Při tvorbě bakteriálního biofilmu se v prvním kroku planktonní buňky reverzibilně přichytí na povrch, který je v ideálním případě hrubý a hydrofobní (Simões a kol., 2010). Může se jednat o významný zdroj živin, obzvláště v případě, kdy jich okolní prostředí neposkytuje dostatek. Nicméně to není nezbytnou podmínkou a buňky se mohou přichytit i na povrch, který živiny neposkytuje (Watnick a Kolter, 2000). Jakmile buňky přilnou, změní se jejich fenotyp a začnou sekretovat extracelulární polymerní látky (extracellular polymeric substance, EPS). Vazba se stává nereverzibilní (Richards a Melander, 2009). Matrix tvořený EPS má gelovitou strukturu a chrání buňky před vnějším prostředím. Bakterie, které jsou součástí biofilmu, tak oproti bakteriím v planktonní formě odolávají většímu stresu vyvolávanému vnějšími podmínkami (Simões a kol., 2010) jako jsou antibiotika a další biocidní látky. Následně je vytvořena mikrokolonie (Wolska a kol., 2016). V tomto stavu mohou buňky mezi sebou komunikovat pomocí „cell-to-cell“ signálních molekul, transportovat substrát dovnitř biofilmu

a v rámci něj a transportovat produkty metabolismu ven. Dále probíhá buněčný růst, replikace a další produkce EPS (Simões a kol., 2010). Biofilm dozrává a získává trojrozměrný tvar. Morfologie a topografie začíná být zřetelná, biofilm nabývá pilířovitého tvaru a začínají se objevovat zřetelné dutiny a kanálky (Worthington a kol., 2014). Ty umožňují transport vody, kyslíku a planktonních buněk a napomáhají buňkám zbavovat se odpadu a maximálně adsorbovat živiny (Wolska a kol., 2016). V posledním stádiu jednotlivé buňky nebo větší části biofilmu opouští biofilm a kolonizují další část povrchu (Worthington a kol., 2014). V případě nepříznivých podmínek je syntéza složek EPS snížena, matrix je enzymaticky štěpen a biofilm se rozpadá (Gjermansen a kol., 2005). Buňky opouštějící biofilm se fenotypově podobají spíše původním planktonním buňkám než buňkám, které jsou součástí biofilmu (Worthington a kol., 2014).

Zásah do tvorby biofilmu

Za předpokladu, že nedojde k ulpění buněk na povrchu, není možné, aby se vytvořil biofilm. Není proto pochyb, že velký význam má prevence (Meyer, 2003). Zabránit tvorbě ovšem není vždy možné, a proto je potřeba odstranit již narostlý biofilm. K tomu je potřeba rozrušit EPS a získat přístup k mikrobiálním buňkám (Richards a Melander, 2009). Vzhledem k tomu, že tvorbu biofilmu ovlivňuje řada faktorů jako je typ povrchu, dostupnost živin a kyslíku, různorodost mikroorganismů a rozdílnost okolního prostředí, neexistuje univerzální metoda aplikovatelná na všechny biofilmy (Meyer, 2003).

Biofilm tvořící se na zařízeních v potravinovém provozu a dalších plochách, které přicházejí s jídlem do kontaktu je neustálým zdrojem kontaminace. Je proto velmi důležité zařízení dokonale čistit. V opačném případě snáze dojde k opětovnému přichycení planktonních buněk a vytvoření nového biofilmu. Navíc je v přítomnosti nečistot zeslaben účinek desinfekčních přípravků. Běžně se k čištění používají prostředky na bázi kyselin a zásad, k jejichž účinnosti je nezbytné dodržovat vhodné parametry, jako jsou teplota nebo koncentrace. Odstranění biofilmu je během čištění možné podpořit mechanickou silou, například použitím kartáče. Důležité je také zamezit šíření mikroorganismů ve formě aerosolu, proto jsou při čištění upřednostňovány pěny a gely před spreji. Využívána je řada desinfekčních prostředků, mezi které patří oxidační činidla (například látky na bázi chloru, peroxid vodíku nebo ozon), povrchově aktivní sloučeniny (například kvartérní amoniové soli) nebo přípravky obsahující jod. Možná je také kombinace desinfekčních prostředků s detergenty nebo enzymy. Nicméně látky účinné proti planktonním buňkám nemusí vůči biofilmu působit tak dobře, případně vůbec (Van Houdt a Michiels, 2010).

Jako alternativa chemických prostředků byla studována řada fyzikálních metod, jako je využití ionizujícího záření, atmosférické plazmy nebo ultrazvuku, případně elektrického pole v kombinaci s aktivní látkou. Takzvaný bioelektrický efekt usnadní proniknutí aktivní látky do buňky a může snížit koncentraci nezbytnou pro eradikaci biofilmu (Van Houdt a Michiels, 2010).

Významnou roli hraje i design vybavení a materiál povrchu. Vhodné je použití nerezové oceli s různými povrchovými úpravami. Naopak pravděpodobnost tvorby se zvýší za přítomnosti trhlin, štěrbin nebo ohybů. Náchylná jsou také těsnění, ventily a spoje (Simões a kol., 2010).

Tvorba biofilmu také úzce souvisí s celou řadou infekcí. Ty se objevují na katetrech a dalších cizích tělesech, ale i na tkáních. Příkladem mohou být plíce pacienta trpícího cystickou fibrózou (Ciofu a kol., 2017). Zatímco lékařské implantáty napadené patogeny tvořícími biofilm mohou být zánětlivým ložiskem a jedinou efektivní léčbou je jejich vyjmutí (Wojtyczka a kol., 2014) a nahrazení novými (Richards a Melander, 2009), pro biofilmy tkání a sputa je jedinou dostupnou léčbou aplikace antibiotik. Vzhledem k vlastnostem biofilmu bývá léčba obtížná s hrozícím vznikem rezistence (Ciofu a kol., 2017). Proto jsou patogenní mikroorganismy tvořící biofilm často příčinou úmrtí (Worthington a kol., 2014) a přibývají důkazy, že nemoci zprostředkované tvorbou biofilmu přispívají k rozvoji chronických onemocnění a opakujícím se infekcím (Rasamiravaka a kol., 2015). Množství mikroorganismů ve zdravotnických zařízeních a tedy i riziko nozokomiálních infekcí je možné snížit o více než 40% správným používáním dezinfekčních prostředků (Wojtyczka a kol., 2014).

Vzhledem ke skutečnosti, že známé způsoby nejsou vždy spolehlivé a účinné a rezistence vůči antibiotikům představuje pro člověka velkou hrozbu, vzniká potřeba vyvíjet nové metody. (Worthington a kol., 2014). V současné době se dostávají do popředí tzv. zelené strategie, které využívají fágů, enzymů a bioregulátorů. Tyto metody vyžadují znalosti procesů, které při tvorbě a regulaci biofilmu probíhají (Simões a kol., 2010).

Metalokarborany

Kobalt bis-1,2-dikarbolid

Polyhedrální heteroborany, mezi které se řadí dideka-kloso-dodekaborany neboli karborany, mají sumární vzorec $C_2B_{10}H_{12}$, globulární geometrii a obecně hydrofobní povrch. Karborany existují jako orto, meta a para izomery v závislosti na poloze uhlíku v klastru (Valliant a kol., 2002).

Anorganická molekula na bázi boru kobalt bis-1,2-dikarbolid (známý také jako COSAN) se skládá ze dvou vysoce hydrofobních dikarbolidových jednotek (C₂B₉H₁₁)₂– v komplexu s iontem Co³⁺ (Gona a kol., 2014), polární částí celé struktury (Bauduin a kol., 2011). (C₂B₉H₁₁)₂– ligandy jsou vůči sobě otočené o 37 °, což vede k symetrii obou karboranových klecí a zároveň obou uhlíků. (Dash a kol., 2017).

Kobalt bis-1,2-dikarbolid je možné použít například v elektrochemii k transferu kationtů z vodného do organického rozpouštědla a přes lipidové membrány nebo jako součást iontově selektivních elektrod (Sivaev a Bregadze, 1999). Díky své stabilitě má potenciál v syntéze tepelně vodivých, stabilních polymerů. Řada derivátů kobalt bis-1,2-dikarbolidu patří mezi potenciální inhibitory proteázy virů HIV, která je nezbytná v produkčním cyklu viru, neboť je odpovědná za štěpení polyproteinových prekurzorů důležitých pro vznik nových virových částic. Chemická inaktivace a inhibice proteázy tak představuje možnost léčby AIDS (Dash a kol., 2017). Jeho terapeutický potenciál je i v možnosti akumulovat se v lidských buňkách, což může být výhodné pro borovou záchytovou neutronovou terapii, která se využívá k léčbě rakoviny (Tarrés a kol., 2014).

Li a kol. (2013) syntetizovali a testovali ferrocenem substituované karborany na biofilm bakterií s mnohočetnou lékovou rezistencí (multidrug resistance, MDR), konkrétně na grampozitivní *S. aureus* a gramnegativní *P. aeruginosa*. Byla stanovena MIC těchto látek při 36 mg/l pro oba mikroorganismy. Dále byla stanovena MBIC₅₀ na hodnotu 4, resp. 6 mg/l pro *S. aureus*, resp. *P. aeruginosa* (v tomto pořadí) a MBIC₉₀ na hodnotu 14, resp. 16 mg/l.

Popova a kol. (2013) testovali kobalt bis-1,2-dikarbolid a jeho deriváty na šestnácti kmenech patogenních grampozitivních i gramnegativních bakterií. Mezi testovanými byly kmeny izolované z lidských i zvířecích tkání, ale i kmeny kontrolní. Konkrétně se jednalo o bakterie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Dále byly testovány tři kmeny *Candida albicans* a jeden kmen *Candida tropicalis*. Prokázalo se, že některé deriváty mají stejnou nebo i větší účinnost v porovnání se širokospektrým antibiotikem thiamfenikol. Kobalt bis-1,2-dikarbolid měl nižší účinnost v porovnání s jeho deriváty. U nejlépe působících derivátů byla stanovena MIC₅₀ pro každý mikroorganismus.

Chang a kol. (2010) testovali antibakteriální aktivitu komplexů kobaltu na řadu zástupců bakteriálních buněk. Příkladem může být N,S-chelatovaný komplex kobaltu, který byl aktivní proti bakterii *Staphylococcus albus* nebo komplex kobaltu obsahující oximovou funkční skupinu, účinný proti bakteriím *Enterobacter aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, a *Bacillus subtilis niger*. Kobalt bis-1,2-dikarbolid byl zmíněn pro svou antivirovou aktivitu jako inhibitor HIV-proteázy.

Závěr

Z důvodu výše zmíněné rezistence na antibiotika a obtížnosti léčby pacientů postižených infekčními onemocněními se do popředí dostává testování nových látek (Simões a kol., 2010).

Vysoký potenciál se naskytá mimo jiné v tzv. trojrozměrných karboranových strukturách (Li a kol, 2013), mezi které patří také kobalt bis-1,2-dikarbolid, anorganická látka s unikátními vlastnostmi, a rovněž jeho aminoderiváty. Li a kol. (2013) syntetizovali a testovali ferrocenem substituované karborany na biofilm bakterií s mnohočetnou lékovou rezistencí (multidrug resistance, MDR), konkrétně na grampozitivní *S. aureus* a gramnegativní *P. aeruginosa*. Ferrocenem substituované karborany inhibovaly tvorbu biofilmu u obou dvou testovaných bakterií.

Literatura

Bauduin P., Prevost S., Farràs P., Teixidor F., Diat O., Zemb T. (2011) ATheta-Shaped Amphiphilic Cobaltabisdicarbollide Anion: Transition From Monolayer Vesicles to Micelles, *Angewandte Chemie International Edition*, 50, str. 5298-5300.

Ciofu O., Rojo-Molinero E., Macià M. D., Oliver A (2017) Antibiotic treatment of biofilm infections, *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 125, str. 304-319.

Dash B. P., Satapathy R., Swain B. S., Mahanta Ch., S., Jena B. B., Hosmane N. S. (2017) Cobalt bis(dicarbollide) anion and its derivatives, *Journal of Organometallic Chemistry*, 849-850, str. 170-194.

Gjermansen M., Ragas P., Sternberg C., Molin S., Tolker-Nielsen T. (2005) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms, *Environmental Microbiology*, 7, str. 894-906.

Gona K. B., Zaulet A., Go –Vallejo V., Teixidor F., Llop J., Viñas C. (2014) COSAN as a molecular imaging platform: synthesis and “in vivo” imaging, *Chemical Communications*, 50, str. 1415-1417.

Chang E. L., Simmers Ch., Knight D. A. (2010) Cobalt Complexes as Antiviral and Antibacterial Agents. *Pharmaceuticals*, 3, str. 1711-1728.

Li S., Wang Z., Wei Y., Wu C., Gao S., Jiang H., Zhao X., Yan H. a Wang X. (2013) Antimicrobial activity of a ferrocene-substituted carborane derivative targeting multidrug-resistant infection. *Biomaterials*, 34, str. 902-911.

Meyer B. (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 249-253.

Popova, T., Zaulet, A., Teixidor, F., Alexandrova, R., Viñas, C. (2013) Investigations on antimicrobial activity of cobaltabisdicarbollides. *Journal of Organometallic Chemistry*, 747, str. 229-234.

Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P., El Jaziri M. (2015) The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms, *BioMed Research International* 2015.

Richards J. J., Melander C. (2009) Controlling bacterial biofilms, *ChemBioChem*, 10, str. 2287-2294.

Simões L. C., Simões M., Vieira M. J. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT - Food Science and Technology*, 43, str. 573-583.

Sivaev I. B., Bregadze V. I. (1999) Chemistry of Cobalt Bis(dicarbollides). A Review, Collection of Czechoslovak Chemical Communications. *Journal of Chemical Education*, 64, str. 783-805.

Tarrés M., Canetta E., Paul E., Forbes J., Azzouni K., Viñas C., Teixidor F. Harwood J. A. (2014) Biological interaction of living cells with COSAN-based synthetic vesicles, *Scientific Reports*, 5, str. 1-8.

Valliant J. F., Guenther K. J., King A. S., Morel P., Schaffer P., Sogbein O. O. a Stephenson K. A. (2002) The medicinal chemistry of carboranes. *Coordination Chemistry Reviews*, 232, str. 173-230.

Van Houdt R., Michiels C. W. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface, *Journal of Applied Microbiology*, 109, str. 1117-1131.

Watnick P., Kolter R. (2000) Biofilm, city of microbes, *Journal of Bacteriology*, 182, str. 2675-2679.

Wojtyczka R. D., Orlewska K., Kępa M., Idzik D., Dziedzic A., Mularz T., Krawczyk M., Mikłasińska M., Wąsik J. T. (2014) Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, str. 4619-4633.

Wolska K. I., Grudniak A. M., Rudnicka Z., Markowska K. (2016) Genetic control of bacterial biofilms, *Journal of Applied Genetics*, 57, str. 225-238.

Worthington R. J., Richards J. J., Melander C. (2014) Non-microbicidal control of bacterial biofilms with small molecules, *Anti-Infective Agents*, 12, str. 120-138.

Použití sorbentů pro zvýšení stability pивní pěny

J. Vlček, T. Brányik

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Struktura a stabilita pивní pěny jsou jedny z posuzovaných kritérií při senzorickém hodnocení piva a mají zásadní vliv na celkový požitek z konzumace tohoto nápoje. Problémy se stabilitou pěny nastaly především po zavedení technologie high-gravity brewing (HGB). Řešení spočívající v přidávání stabilizačních látek (PGA, Tetrahop) se setkalo s určitým odporem veřejnosti, proto byl v této práci hledán způsob, kterým by se podařilo zvětšit stabilitu pивní pěny bez užití přídatných látek.

Pozitivně na tvorbu a stabilitu pěny působí zejména bílkoviny, polypeptidy, některé hořké chmelové látky a kovové ionty. Mezi hlavní negativní činitele řadíme lipidy. Právě skutečnost negativního působení lipidů na stabilitu pěny vedla k myšlence jejich odstranění z piva. Byly navrženy látky (sorbenty), které by na sebe měly vázat látky lipidické povahy. Tyto sorbenty se přidají do piva, nechají se působit a pak se odstraní např. odstředěním nebo filtrací. Ukázalo se, že použité látky zvýšily stabilitu pěny až několikanásobně, a že se tedy jedná o vhodnou metodu pro zvýšení stability pивní pěny bez přidání cizích látek do piva.

Byly sledovány závislosti mezi účinností sorbentů a jejich materiálovými vlastnostmi (specifický povrch, porozita). Dále byl popsán i vliv povrchových vlastností (hydrofobita) na účinnost sorbentů. Některé z látek jsou regenerovatelné a mají tedy velký potenciál využití v průmyslovém měřítku. Účinky nejslibněji působících sorbentů byly testovány v několika aplikacích ve čtvrtprovozním měřítku v prostředí průmyslového pivovaru. Ukázalo se, že všechny vybrané sorbenty významně zvyšovaly stabilitu pěny. Podle výsledků měření bylo zjištěno, že použité koncentrace sorbentů neměly vliv na barvu, v některých případech však mírně zvýšily analytickou hořkost. Senzorická analýza ukázala, že některé sorbenty měnily charakter doznívání hořkosti, jiné prošly testem bez rozeznání rozdílů.

Porovnání sorpčních materiálů k odstranění mikropolutantů z odpadních vod

V. Vlčková, J. Chalupa, M. Halecký

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Projekt se zabývá otestováním levných a dobře dostupných biodegradovatelných a/nebo sorpčních materiálů, které budou následně využity k odstraňování mikropolutantů z odpadních vod. Materiály budou použity jako směsný nosič náplňových reaktorů. Součástí projektu bude i obohacovací kultivace směsné mikrobiální kultury jako inokulum do náplňového reaktoru.

Testované náplňové materiály do reaktorů jsou experimentální biodegradovatelná pěna na bázi polyolů PUR A z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, dvojice běžně dostupných aktivních uhlí (Aquasorb 5005, Sh-Gu) a dvojice levných odpadních uhlíkatých materiálů, a to zbytků ze zplyňování dřeva (Tarpo spol.s.r.o., Bor Biotechnology a.s.). U materiálů budou testovány nejen jejich sorpční schopnosti, ale i jejich další možné využití, např. jako nosiče biofilmu, využití materiálů jako kosubstrátu nebo minerálních živin. Materiály jsou zvolené i z pohledu jejich zpracování po použití (vhodným dekontaminačně-degradačním procesem je např. kompostování nebo metanogeneze). Biodegradovatelný nosič je plně rozložitelný a odpadní uhlíkaté materiály jsou po dekontaminaci inertní.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2018**

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Editor: Olga Mařátková

Rok vydání: 2018

Počet stran: 71

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF na CD-ROM.