

Tvorba biofilmu potravinářsky významnými bakteriemi

Martina Hrubanová

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina HRUBANOVÁ**
Osobní číslo: **T08319**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Tvorba biofilmu potravinářsky významnými bakteriemi**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika biofilmu, jeho struktura, tvorba a vznik Quorum sensing.
2. Odolnost biofilmu vůči antibiotikům a ostatních antimikrobních látek.
3. Biofilm v lékařství – metody stanovení významné v potravinářství.
4. Metody inaktivace a odstranění biofilmu.
5. Definice patogenních mikroorganismů, význam v potravinářství a významné patogeny.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]Votava, M. a kolektiv. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2006.

[2]Šilhánková, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Victoria publishing, a.s., 1995.

[3]Pace, J. L., Rupp, M. E., Finch, R. G. Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy. USA: CRS Press Taylor & Francis Group, 2006.

[4]Zottola, E. A., Kyle, C. S. Microbial biofilms in the food processing industry - Should They be a concern? USA: International Journal of Food Microbiology, 1993-1994.

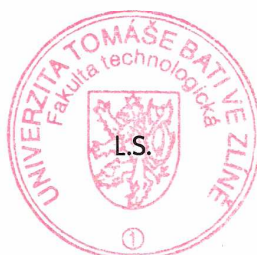
Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **11. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. května 2011**

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HRUBANOVÁ MARTINAObor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 12.5.2011

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Práce je zaměřena na bakteriální biofilmy, zejména na biofilmy typické pro potravinářský průmysl. V práci je popsána jejich struktura, tvorba, možnosti odstranění a rovněž i různé diagnostické metody pro průkaz biofilmu. Část práce se zabývá definováním patogenních mikroorganismů a vybranými patogeny, které přežívají v biofilmu, zejména produkcí biofilmu v potravinářských provozech a možnostmi jejich likvidace.

Klíčová slova: Biofilm, struktura biofilmu, quorum sensing, antimikrobiální látky, průkaz biofilmu, potravinářský průmysl, patogenní mikroorganismy.

ABSTRACT

The work is focused on bacterial biofilms, especially on biofilms typical for food industry. Thesis describe their structure, formation, and removal capabilities as well as various diagnostic methods for the detection of biofilm. Part of this work deals with the definition of pathogenic microorganisms and selected pathogens that survive in the biofilms, especially production of biofilm in the food processing and removal options.

Keywords: Biofilm, biofilm structure, quorum sensing, antimicrobial agents, biofilm detection, food industry, pathogens.

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost, inspiraci a cenné rady. Rovněž děkuji svým rodičům za morální i finanční podporu při studiu. Děkuji také příteli a přátelům za velkou trpělivost a oporu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
1 BIOFILM	11
1.1 HISTORIE BIOFILMU	11
1.2 DEFINICE BIOFILMU	11
1.3 STRUKTURA BIOFILMU	12
1.4 TVORBA BIOFILMU	14
1.4.1 Adheze buněk na povrch	14
1.4.2 Akumulace a maturace	15
1.4.3 Disperze buněk	15
1.5 QUORUM SENSING	15
2 BIOFILM A ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	17
2.1 PŘÍČINY VYŠŠÍ REZISTENCE BAKTERIÍ V BIOFILMU	17
2.2 STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÍ V BIOFILMU K JEDNOTLIVÝM ANTIBIOTIKŮM	18
3 DIAGNOSTICKÉ METODY PRO PRŮKAZ BIOFILMU	19
3.1 CHRISTENSENOVA ZKUMAVKOVÁ METODA	19
3.2 CHRISTENSENOVA METODA V MIKROTTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH	20
3.3 MIKROSKOPICKÉ METODY	20
3.4 KULTIVACE NA AGARU S KONGO ČERVENÍ	20
4 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU	22
4.1 MÍSTA VÝSKYTU BIOFILMU V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	23
4.2 TVORBA BIOFILMU NA POVRŠÍCH Z NEREZOVÉ OCELI.....	23
4.3 ÚČINNOST SANITAČNÍCH PROSTŘEDKŮ A ODSTRAŇOVÁNÍ BAKTERIÁLNÍHO BIOFILMU.....	25
4.4 NOVÉ METODY PRO KONTROLU BIOFILMU V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU.....	25
4.4.1 Kontrola biofilmu pomocí enzymů	25
4.4.2 Kontrola biofilmu pomocí bakteriofágů.....	26
4.4.3 Kontrola biofilmu pomocí bioregulace	26
4.4.4 Čištění a dezinfekce biofilmu.....	26
5 PATOGENNÍ MIKROORGANISMY TVOŘÍCÍ BIOFILM	28
5.1 DEFINICE PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ	28
5.1.1 Patogenita a patogeneze bakteriálních infekcí	28
5.2 MNOŽENÍ BAKTERIÍ V PODMÍNKÁCH <i>IN VIVO</i>	30
5.3 CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY VYBRANÝCH PATOGENNÍCH ZÁSTUPCŮ SCHOPNÝCH TVOŘIT BIOFILM	30
5.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
5.3.1.1 Kultivace a biochemie	31
5.3.1.2 Patogenita.....	31
5.3.1.3 Onemocnění a léčba.....	32
5.3.1.4 Produkce biofilmu u <i>Pseudomonas fluorescens</i>	32
5.3.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	33

5.3.2.1	Virulence <i>Staphylococcus epidermidis</i>	33
5.3.2.2	Regulace tvorby biofilmu u zástupců rodu <i>Staphylococcus</i>	34
5.4	PŘILNAVOST <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NA PEVNÉ POVRCHY	34
5.4.1	Vlastnosti <i>Listeria monocytogenes</i>	34
5.4.2	Možnosti průkazu tvorby biofilmu u <i>Listeria monocytogenes</i>	35
ZÁVĚR		37
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		38
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		45
SEZNAM OBRÁZKŮ		46

ÚVOD

Mikroorganismy se nejčastěji vyskytují ve formě planktonické nebo v biofilmu. Biofilm je pro mikroorganismy výhodnější pro přežití, a to po stránce metabolické a jako ochrana před nepříznivými vlivy. Biofilm umožňuje bakteriím přežít v extrémních prostředích, jako je velké rozmezí pH a teploty, silné záření a tlak.

Existence biofilmu je známá již od 17. století. Biofilm se vyskytuje v různých prostředích a na různých materiálech. Jako příklady ze života, kdy jsme se mohli s biofilmem setkat, lze uvést mokré kameny v potoce, akvárium, kde ze stěn stíráme biofilm tvořený řasami nebo i při čištění zubů odstraňujeme biofilm zvaný zubní plak. Biofilmy představují vyšší a složitější způsob života mikroorganismů. Mikroorganismy vytváří biofilm především v případě, že mají nedostatek živin. Biofilm mikroorganismům dodává živiny, najdou pevnou oporu v prostředí, kde se začnou rozmnožovat a růst.

Mikroorganismy mezi sebou mohou komunikovat pomocí systému quorum sensing, který také umožňuje bakteriím přizpůsobení se prostředí. Bakterie mají schopnost adheze, neboli přilnutí k povrchu, pomocí bičků, pil, proteinů, EPS nebo lipopolysacharidů, což vede ke vzniku biofilmu. Schopnost adheze mikroorganismů souvisí s jejich virulencí.

Ke kontaminaci biofilmem dochází především v potravinářském průmyslu, kde napadá povrchy určené pro výrobu potravin nebo pomůcky, které podléhají kontaminaci. Z tohoto důvodu je vhodné v potravinářství používat materiály z nerezové oceli, která je především snadno čistitelná. Mezi nejčastěji se vyskytující patogeny, které tvoří biofilm v potravinářském průmyslu, patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* a koagulasa negativní *Staphylococcus*. Kromě kontaminace v potravinářském průmyslu způsobuje řadu chronických, infekčních onemocnění a napadá umělé povrchy vyskytující se v lékařství. Biofilm je odolný vůči antimikrobiálním látkám, proto odstranění biofilmu vyžaduje důkladné a intenzivní čištění a správnou volbu dezinfekčních prostředků.

Biofilm hraje i prospěšnou roli, kdy sliznice lidského těla je pokryta biofilmem normální mikroflóry, především sliznice tlustého střeva a nosohltanu a tím poskytuje ochranu před uchycením patogenů. Jako pozitivum lze také uvést, že se používá pro čištění odpadních vod.

1 BIOFILM

1.1 Historie biofilmu

V roce 1676 se nizozemský přírodovědec a průkopník mikroskopie Antony von Leeuwenhoek jako první zabýval myšlenkou bakterií přisedlých k povrchu. Mikroskopem pozoroval buňky zubního plaku. Polovina 19. a 20. století byla považována za „zlatý věk bakteriologie“, kdy se studovaly jen planktonické formy organismů. Pokud se objevily zmínky o růstu biofilmu, byly tyto pokusy odmítnuty. Sto let od dob Roberta Kocha a Louise Pasteura došlo ve vědě k velkým pokrokům. Předtím nikoho nenapadlo, že by bakterie mohly v přírodě růst jinak, než jako volně se vznášející v tekutém prostředí nebo jako kolonie rostoucí na agaru. Dříve byla mikrobiologie uvedena v omyl, protože nebylo známo, že pro některé mikroorganismy je přirozené růst jako biofilm. Teprve v roce 1935 Zobel jako první použil přímou mikroskopii k pozorování biofilmu u mořských bakterií. V letech 1950 – 1960 byly zveřejněny první zprávy o problémech s biofilmem. V roce 1978 přírodovědec John William Costerton upozornil na všudypřítomnost biofilmu. Přírodovědci Costerton, Stewart a Greenberg v roce 1999 prokázali účast biofilmu v perzistentních infekcích. V dnešní době se biofilmem zabývá nejvíce lékařská mikrobiologie. [1]

1.2 Definice biofilmu

Bakterie rostou na živných půdách v podobě kolonií. Než však Robert Koch přišel na způsob, jak kultivovat bakterie na pevných půdách, pěstovaly se po několik let v tekutinách, nejčastěji v bujónu. Bakterie mohou žít buď volně ve vodném prostředí jako plankton, nebo ve společenství, které vytváří tenkou vrstvu na pevných tělesech – biofilm. Existence v biofilmu je pro bakterie výhodnější a je základním způsobem jejich přirozené existence. [2] Kmen tvořící biofilm je považován za virulentnější než tentýž kmen žijící planktonicky. [3]

Planktonní buňky mají výhodu v rychlém množení a šíření na nová území. Bakterie rostoucí v konsorciích známých jako biofilm jsou přítomny ve všech přírodních a patogenních ekosystémech. [4] Biofilmy jsou první formy života na Zemi, které se datují více než 3,5 miliard let. Nalézají se i v extrémních podmínkách, jako je například pH mezi 0,5-14, teplota -5 až +120 °C, při silném ozáření nebo tlaku až 1000 barů. [5]

Biofilmem se rozumí výsledek adherence mikroorganismů na povrchy různého materiálu, které mohou být umělé či nativní. Na nich vznikají mnohvrstevné shluky mikroorganismů

a mikrokolonie, které jsou obklopené vrstvou polymerního extracelulárního materiálu. [6] Bakterie produkují velké množství extracelulární substance, slizu, který má různé chemické složení a je složen z extracelulární polysacharidové substance (EPS). [7] EPS obsahují substituované a nesubstituované polysacharidy, proteiny, fosfolipidy a nukleové kyseliny. Poskytují ochranu bakteriím žijících v biofilmu produkcí živin. Rovněž zabraňují přístupu biocidů, toxinů a těžkých kovů a chrání buňky proti vysychání. [8]

EPS umožňuje bakteriím zachytit živiny. Bakteriální extracelulární polysacharidy jsou tvořeny homopolysacharidy nebo heteropolysacharidy, a to zejména jednotkami glukosy, fruktosy, manosy, galaktosy, pyruvátu. EPS fungují také jako stabilizátory struktury biofilmu. Některé mikroorganismy mohou vázat ionty do jejich EPS, které pak ovlivňují biofilm. [9]

Cílem biofilmu je chránit mikroorganismy v nepřátelském prostředí. Přilnavost je závislá na čase a může být rozdělena do dvou fází, vratné a nevratné. Pokud mikroorganismy hladoví, dojde k odpojení od biofilmu. Hladovění vede ke snížení velikosti buňky, mikroorganismy mohou opět získat velikost normální buňky v prostředí, kde jsou živiny opět k dispozici. Velikost buňky kromě živin ovlivňuje i pH, teplota, hydrofobicita buňky, struktura buňky včetně EPS, iontová koncentrace a fáze růstu. [9] S tvorbou biofilmu je spojován vznik nemocí, mezi které patří např. periodontitida (tj. rozšířené onemocnění dásní a čelisti, které může vést až ke ztrátě zubů), osteomyelitida (tj. infekční hnisavé onemocnění kostí a kostní dřeně vyvolané bakteriemi či mykobakteriemi) či chronické pulmonální infekce, zejména cystická fibróza (postihuje převážně dýchací a trávicí soustavu). [10]

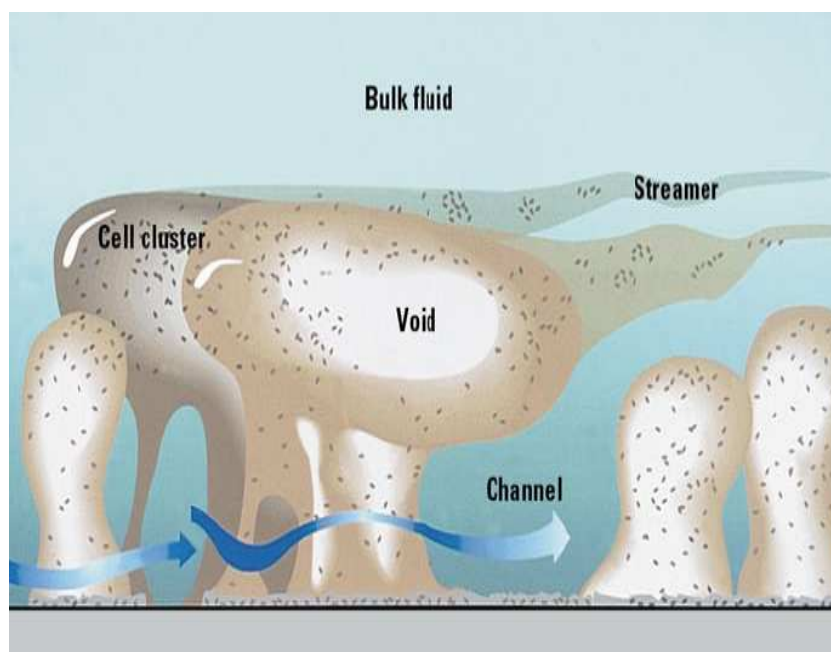
V klinické mikrobiologii se problematikou tvorby biofilmu zabýváme, posuzujeme-li faktory virulence daného kmene mikroorganismu a jeho klinický význam nebo při hodnocení citlivosti daného kmene mikroorganismu k antimikrobiálním látkám. [3]

1.3 Struktura biofilmu

Struktura biofilmu není jednotná v čase nebo prostoru, není zatím ani zcela známa. Byly navrženy tři modely jeho struktury. Prvním je „heterogenní model“, ve kterém mikroorganismy tvoří hustý, rovinný, homogenní biofilm, který je vystaven proudící kapalině. Druhý model s názvem „heterogenní mozaikový model“ nebo také „pseudohomogenní model“ popisuje vrstvy skládající se z buněk, které drží pohromadě EPS. Jedná se o sloupce oddě-

lené kanály s tekutinou (obr. 1). [11] Proudění kapaliny těmito kanály zajišťuje přísun živin, kyslíku a výměnu metabolických produktů. [12] V kanálcích proudí tekutina pomaleji než v samotném prostředí a díky tomu mohou bakterie získat maximum živin i z prostředí na živiny velmi chudých. [13] Třetí model s názvem „houba“ nebo také „tulipánový model“ byl popsán s použitím laserové skenovací mikroskopie. Tulipánový model je obklopen vodními kanály, přes které proudí živiny a kyslík. [11] Na struktuře biofilmu se podílejí i další faktory, např. vlastnosti povrchu, přísun živin, rychlost růstu nebo hydrodynamické síly. V pomalém laminárním toku vytváří biofilmy nepravidelné, vyvýšené agregáty, zatímco v toku turbulentním spíše vláknité struktury. [12]

Bakteriální biofilmová struktura tvoří asi 98 % vody a extracelulární hmoty. Struktura biofilmu obsahuje polysacharidovou matrix a také organické a anorganické látky, které byly získány z vnějšího prostředí a které v biofilmu tvoří ochrannou funkci. Polysacharidová struktura chrání buňky proti vysychání, UV záření, před predátory, imunitním systémem hostitele a před průnikem dezinfekčních prostředků a antibiotik. V oligotrofních prostředích tvoří biofilm mozaikovitě a nízké struktury. Prostředí bohaté na živiny tvoří v biofilmu porézní strukturu s dutinami a kanálky, kde dochází ke shluku mikrobiálních buněk. [14]



Obr. 1: Houbovitá struktura biofilmu.[69]

1.4 Tvorba biofilmu

Biofilm se může vyskytovat v různých prostředích a na různých materiálech. Jeho výskyt byl zjištěn například v mlékárenském a pivovarském průmyslu na površích zařízení a nástrojů, jako jsou např. ohyby potrubí, pryžová těsnění, pásové dopravníky, potrubí odpadní vody, podlaha apod. Tvorba biofilmu byla zaznamenána i v zařízeních využívaných v mlynářství. V mlýnech, kde se zrna myje, jsou využívány nádrže, které jsou trvale mokré a jsou kolonizovány hustým biofilmem, ve kterém se mohou usadit patogenní bakterie. Jejich výskyt může být následně zjištěn v mouce, která se pak může stát zdravotně závadnou. V cukrovarech se vytváří biofilmy v prostorách, kde sídlí *Leuconostoc* spp. [15]

Tvorba biofilmu se dá rozdělit do tří kroků: adheze buněk na povrch materiálů, akumulace a maturace biofilmu a fáze disperze.

1.4.1 Adheze buněk na povrch

Přechod z planktonické formy k životu v biofilmu je podmíněn řadou faktorů, jako je koncentrace živin, pH, teplota, osmolarita prostředí. První kontakt bakterií s povrchem je zprostředkován různými mechanismy. [6]

1. Difúzí, která je výsledkem Brownova pohybu.
2. Pasivním transportem díky proudění kapaliny.
3. Aktivním pohybem buněk pomocí bičíků. [6]

V počáteční fázi adheze se uplatňují různé povrchové struktury bakterií, jako pili, bičíky, lipopolysacharidy (LPS), proteiny a EPS. Adhezi ovlivňují i některé fyzikálně-chemické interakce zahrnující van der Waalsovy a elektrostatické síly. [6] Bakterie adherují za vzniku specifických vazeb, které mají chemickou povahu. [16] Důležitou roli hraje také povrchový náboj buněk (zeta potenciál) a hydrofobicita povrchu buňky i povrchu, ke kterému buňka adheruje. Povrchová hydrofobicita různých bakterií souvisí s přítomností proteinů a lipidů na povrchu buněk. Se snižující se hydrofobicitou pevného povrchu nebo povrchu bakterií se schopnost adheze snižuje a naopak se snižujícím se zeta potenciálem roste. Většina bakterií má při neutrálním pH záporný zeta potenciál, který je dán disociací kyselých skupin přítomných na povrchu buňky. Většina mikroorganismů lépe adheruje na hydrofobní povrchy (plasty) než na hydrofilní (sklo). [17]

1.4.2 Akumulace a maturace

Fáze akumulace a maturace následuje po přilnutí mikroorganismů k povrchu. [16] Díky zvýšené produkci EPS a vzniku mikrokolonií dochází k maturaci (tzv. dozrávání) biofilmu. Aktivují se geny, které produkují polysacharidy a polymery rozhodující pro vznik biofilmu. Snižuje se, nebo úplně ustává, tvorba bičíků, dochází k množení bakterií a vytváří se tzv. mikrokolonie. V přírodě se vyskytují spíše smíšené biofilmy, a tak se při vzniku mikrokolonií uplatňuje proces zvaný kongregace, což je adheze mezi geneticky odlišnými bakteriemi. [6] V okolí mikrokolonií dochází k hromadění EPS a díky tomu dochází k vytvoření vyzrálé vrstvy biofilmu. [18] Jakmile dojde k dosažení určitého množství buněčné hustoty, začínají se ze zralého biofilmu oddělovat jednotlivé buňky nebo celé jejich shluky i s částmi biofilmu a tím dochází k disperzi. [19]

1.4.3 Disperze buněk

Buňky jsou uvolňovány zpět do prostředí a kolonizují další povrchy, které jsou vhodné pro růst biofilmu. Vzniká dynamická rovnováha, která je regulována podmínkami vnějšího prostředí, dostupností živin a může být regulována i samotnými mikroorganismy (př. quorum sensing). [20] Mezi další faktory, které regulují rovnováhu biofilmu, řadíme produkci látek, které degradují struktury biofilmu a tím napomáhají uvolnění bakteriálních buněk z jeho struktury. [6] Pokud mluvíme o disperzi, tak se jedná o aktivní nebo pasivní proces. Aktivní disperze je fyziologicky regulována a umožňuje buňkám kolonizaci v novém prostředí. K takovému stavu může dojít, pokud buňky nemají dostatek živin a hledají nové zdroje. Při pasivní disperzi jsou buňky uvolňovány chemickým vlivem proudu tekutiny. [21]

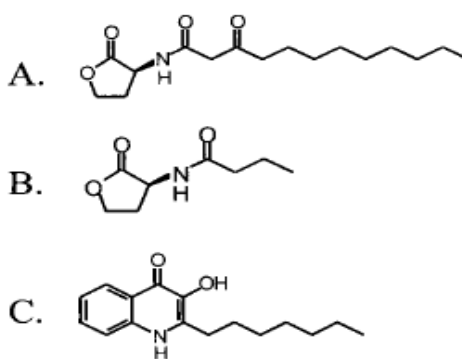
Disperze může probíhat třemi základními způsoby. Zaprvé dochází k uvolňování jednotlivých buněk („swarming/seeding“). Zadruhé dochází k uvolňování agregátů buněk v EPS. Tyto agregáty jsou více podobné biofilmu než planktonickým buňkám („clumping“) a zatřetí dochází k uvolnění biofilmu a jeho pohybu po povrchu. [22]

1.5 Quorum sensing

Bakterie lépe využívají prostředí, je-li jich na jednom místě více. Lépe zachytí molekuly živin, šetří energii, snáze odolávají nepříznivým podmínkám. [23] Biofilmy jsou definovány jako konsorcia mikroorganismů, které jsou připojeny k biotickému a abiotickému povrchu. Jedná se o proces, ve kterém se drží mikrobiální buňka k povrchu, zatímco následná

produkce EPS má za následek pevnější uchycení. Koordinované chování skupiny zprostředkovává proces zvaný quorum sensing (QS). Umožňuje také bakteriím komunikovat a napomáhá bakteriím přizpůsobovat se životním podmínkám prostředí. [24] Hlavním účelem komunikace je poznání momentu, kdy mikroorganismy dosáhnou kritické velikosti, dochází ke sdružení bakterií a dokáží se chránit. Komunikují spolu bakterie stejného, příbuzného nebo nepříbuzného druhu. Bakterie dokážou také reagovat na signální látky hostitele. Komunikace probíhá pomocí signálu, který se vygeneruje. Příjemce ho zachytí a může na něj reagovat. Odpovědí může být například tvorba společenství bakterií, tedy tvorba biofilmu. K tvorbě je nutná aktivita příslušných genů. [23]

Quorum sensing je umožněn produkcí signálních molekul tzv. autoinduktorů. Jednotlivé buňky mezi sebou komunikují pomocí sekrece a vylučování drobných difúzních molekul. QS souvisí s hustotou populace. Čím hustší je populace, tím je i vyšší koncentrace autoinduktorů. [25] Rozpoznání kritické hustoty populace má význam pro patogenitu mikroorganismů. [23] Komunikační systém gramnegativních bakterií je založen na produkci signálních molekul AHL (tzv. acylhomoserinlaktónů). Grampozitivní bakterie využívají ke komunikaci signální peptidy, dvousložkový regulační systém a vnitrobuněčné regulátory. [26] Produkce specifických signálních molekul je výhodná, protože nereagují na rušivé signály, které vysílají ostatní druhy bakterií. [23] Koordinace napomáhá k přežití pro celou komunitu. Tento komunikační systém reguluje různé funkce, jako jsou virulence, sporulace, produkce antibiotik, výměna DNA, motilita a rozvoj mnohobuněčných struktur. [4]



Obr. 2 Chemická struktura signálních molekul [70]

(A) *N*-(3-oxododekanoyl)-*L*-homoserinlaktón. (B) *N*-butanoyl-*L*-homoserinlaktón.
(C) 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon.

2 BIOFILM A ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Biofilm chrání buňky proti antimikrobiálním látkám, včetně antibiotik, biocidů a mechanismů obrany hostitele. [27] Koncentrace dezinfekčních látek a vybraných antibiotik, které jsou schopné zasáhnout bakterie v biofilmu, jsou o několik řádů vyšší než koncentrace, která je účinná na planktonické formy mikroorganismů. Bakterie v biofilmu mohou způsobit infekce, které špatně reagují na antibiotickou léčbu a mohou tak přecházet do chronického stádia. [28]

2.1 Příčiny vyšší rezistence bakterií v biofilmu

Vyšší rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám je vysvětlována několika mechanismy:

1. EPS vytváří pro bakterie bariéru, která omezuje difúzi antibiotik do biofilmu. Účinek bariéry není absolutní, ale zpomalení difúze umožňuje bakteriím dostatek času na adaptaci. Buňky, které jsou nejprve vystaveny antimikrobiálním látkám s nižší koncentrací, mají čas pro aktivaci obranných mechanismů. [29] Bariéra funguje obousměrně, tedy látky, které jsou schopny snížit účinek antibiotik, se hromadí v okolí buňky, jejich koncentrace dosahuje vyšších hodnot a dochází tak k snadnější neutralizaci antibiotik, které pronikly do biofilmu. [30]
2. V důsledku tvorby biofilmu může docházet ke změnám fyzikálně-chemických vlastností v okolí buněk v hlubších vrstvách biofilmu, zejména ke snižování pH. Nízké pH omezuje účinek antibiotik. [30] Rovněž dochází k omezení difúze molekul v hlubších vrstvách, a to vede ke snížení zásobení buněk živinami a kyslíkem. Pomocí EPS a snížením množství živin a kyslíku dochází ke zpomalení pronikání látek do biofilmu. Omezená difúze vede také k hromadění odpadních metabolitů, což ovlivňuje mikroprostředí v okolí buněk v jednotlivých vrstvách biofilmu. Dochází ke zpomalení růstu buňky nebo k jejich úplnému zastavení, jelikož buňka má nepříznivé prostředí pro svůj růst a nedostatek živin. Pomalu rostoucí buňky mají výhodu, pokud na ně působí antibiotika, která účinkují na rostoucí bakterie (např. β -laktamová antibiotika). Taková antibiotika pak mají snížený účinek. [31] Za další důvod je považována existence tzv. „biofilmového fenotypu“ bakterie. Jak již bylo řečeno, biofilm aktivuje řadu genů, mezi které mohou patřit i geny snižující účinek antibiotik. [29] Genetické přenosy v biofilmu jsou řadové vyšší než u planktonických buněk v suspenzi. [4]

2.2 Stanovení citlivosti bakterií v biofilmu k jednotlivým antibiotikům

Pro určování účinnosti antibiotik se používá minimální inhibiční koncentrace (MIC) a popřípadě také minimální baktericidní koncentrace (MBC). Tyto koncentrace se nejčastěji stanoví pomocí mikrodiluční metody nebo tzv. E-testu. Tyto metody ovšem stanovují pouze citlivost planktonních bakterií. Citlivost bakterií v biofilmu k antibiotikům je odlišná. [30] Není přesně známá souvislost mezi MIC nebo MBC a koncentrací antibiotik, které by zasáhly buňky v biofilmu. Tuto citlivost je nutné zjistit vyšetřením pomocí vyjádření minimální koncentrace eradikující biofilm (MBEC), tj. koncentrace antibiotik, která je schopná usmrtit všechny buňky v biofilmu. Minimální inhibiční koncentrace se pro biofilmovou formu nestanovuje, a to z toho důvodu, že je velmi náročná na provedení a pro praxi má hodnota velmi malý význam. [32]

Principem stanovení citlivosti biofilmu k antibiotikům je kultivace biofilmu na stěně kultivační nádoby nebo na nosiči. Poté je biofilm vystaven účinku určité koncentrace antibiotik a je sledována přítomnost životaschopných bakterií pomocí sonifikace nosiče, který je porostlý biofilmem. [32] Následně je provedeno vyočkování a spočítání kolonií (CFU). Přítomnost životaschopných buněk lze také zjistit pomocí kolorimetrických médií [33] nebo mikroskopicky po obarvení předem připraveného preparátu specifickými barvivy. [34]

3 DIAGNOSTICKÉ METODY PRO PRŮKAZ BIOFILMU

Pro průkaz tvorby biofilmu se používají fenotypové a genotypové metody. U fenotypových metod se kultivuje daný mikroorganismus na vnitřním povrchu zkumavky nebo v jamce mikrotitrační destičky, kde vzniká biofilm, který je následně obarven. Pomocí mikroskopu se sledují obarvené vrstvy biofilmu. Genetické metody jsou založeny na identifikaci genů zodpovědných za tvorbu biofilmu a na studiu konkrétních genů, které jsou identifikovány za konkrétních podmínek. [35]

Mezi diagnostické metody patří Christensenova zkumavková metoda, Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, mikroskopické metody a kultivace na agaru s kongo červení. [35]

3.1 Christensenova zkumavková metoda

Christensenova zkumavková metoda patří mezi klasickou metodu, která je založená na zjištění schopnosti mikroorganismů vytvářet biofilm. [36] Provádí se ve skleněných nebo plastových zkumavkách. Při stanovení se musí brát v úvahu, že různé druhy mikroorganismů adherují k různým druhům povrchů odlišně. [37] Princip stanovení je založen na kultivaci daného mikroorganismu ve zkumavce s příslušným bujonem. Vzniká biofilmová vrstva, která je poté obarvena. [36] Někdy se do média přidává glukosa, která zvyšuje schopnost tvorby biofilmu. [38] Médium se inokuluje mikrobiální suspenzí. Délka kultivace bývá v rozmezí 24 až 48 hodin při optimální růstové teplotě bakterií nebo kvasinek. Doba kultivace závisí na druhu mikroorganismu a na jeho růstových podmínkách. [39]

Po inkubaci jsou zkumavky vyprázdněny, a aby došlo k vyplavení nezachycených buněk, jsou promyty fyziologickým roztokem. Poté jsou zkumavky fixovány sušením nebo pomocí fixačních roztoků. [40] Jestliže na vnitřním povrchu zkumavky vznikly vrstvy biofilmu, prokazují se barvením, a to po dobu 20 minut. Jako barviva se používají především safranin, krystalová violet (nejčastěji) a karbolfuchsin. [41]

Kmeny s dobře obarvenou vrstvou v celé části zkumavky jsou považovány za biofilmpozitivní. Pokud nedošlo k žádnému obarvení, pak se jedná o biofilmnegativní kmeny. Pro vyhodnocení výsledků se využívá ordinální stupnice, která má rozsah 0 – 3, kde stupeň 0 značí, že se netvoří biofilm, stupeň 1 slabý výskyt biofilmu, stupeň 2 středně silný výskyt biofilmu a stupeň 3 značí silný výskyt biofilmu. Výhodou Christensenovy zkumavkové metody je jednoduchost jejího provedení. [37]

3.2 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách

Metoda v mikrotitračních destičkách je využívána poměrně často a je založena na kultivaci testovaného mikroorganismu v jamkách mikrotitrační destičky. Nárůst biofilmu bývá na stěnách těchto jamek. Kultivace probíhá za stejných podmínek a ve stejných médiích jako u předchozí zkumavkové metody. Množství inokula volíme tak, aby jejich výsledná hustota bakteriální suspenze činila 10^6 - 10^7 buněk/ml. Po inkubaci dochází opět k fixaci, a to sušením nebo pomocí fixačních roztoků. Poté je provedeno barvení, u něhož jsou použita stejná barviva, jako u předchozí metody. Nárůst biofilmu je vyhodnocen spektrofotometricky, a to tak, že se zjišťuje síla biofilmové vrstvy, která vzniká na dně jamky. [42]

3.3 Mikroskopické metody

Pro studium biofilmu se mohou využít elektronová mikroskopie, laserová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil, fluorescenční mikroskopie a světelná mikroskopie. [43] Nejprve je připraven preparát, a to barvením, fixací, zmrazením, dehydratací, řezáním (řez slouží k možnosti znázornit i vnitřní strukturu biofilmu) apod. Přitom je nutné vzít v úvahu, že příprava preparátu ovlivňuje strukturu biofilmu. [28] Pro dobrý a ostrý obraz je nejlepší použít laserovou mikroskopii. U laserové mikroskopie nemusí být provedena fixace a řezání vzorku. [44] Pro studium prostorového uspořádání složek v biofilmu je využívána fluorescenční metoda. [45] Při běžné světelné mikroskopii se výskyt biofilmu prokáže barvením. Světelná mikroskopie je využívána pro kontrolu klinického materiálu. [40]

3.4 Kultivace na agaru s kongo červení

Kultivace na agaru s kongo červení se používá především na stanovení tvorby biofilmu u stafylokoků. Agar je složen z kongo červeně, 5% sacharosu a z mozkosrdcové infuze. Na takto připravený agar jsou naočkovány testované mikroorganismy a vzhled kolonií se hodnotí po 24-48 hodinách kultivace. Bakterie vytvářející biofilm mají černé suché kolonie s matným povrchem nebo mají vzhled kolonií černohnědý se zónou precipitace. Pokud je vzhled kolonií lesklý, hladký povrch s červeným až červenohnědým zabarvením, pak se jedná o biofilmnegativní kmeny. Hodnocení je však subjektivní, což je u tohoto stanovení nevýhodou. [46] Biofilmpozitivní kmeny gramnegativních bakterií tvoří hladké krémově zbarvené kolonie, u biofilmnegativních mikroorganismů se zabarvení netvoří. [47]



Obr. 3 : Kultivace bakterií tvořících biofilm na agaru s kongo červení [71]

4 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU

Mikrobiální biofilm způsobuje problémy také v potravinářském průmyslu, kde může docházet k uvolňování patogenních mikroorganismů, které následně mohou kontaminovat potraviny a suroviny určené k jejich výrobě. V potravinářském průmyslu bývá nejčastěji detekován výskyt biofilmu u *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*, v dnešní době také u *Bacillus subtilis*. Tyto patogeny byly nalezeny především na pevných kontaktních površích ze skla a z nerez. Dále se mohou vyskytovat na povrchu z gumy, dřeva, teflonu a plastických hmot. [48]

Bakterie nebo jejich shluky mohou být z biofilmu uvolňovány. Uvolňují se především jednotlivé bakterie, které mohou kontaminovat přímo potravinu rostlinného nebo živočišného původu, nebo mohou být unášeny médiem a tím vytvářet zdroj kontaminace na dalších površích. Za protékající médium bývají považovány např. voda, mléko, rostlinné šťávy nebo může dojít k uchycení přímo na potravinách, surovinách nebo polotovarech. Velké shluky buněk se uvolňují jen výjimečně. Možné riziko je závislé na druhu mikroorganismu a na velikosti infekční dávky. Například bylo zjištěno, že bakterie uvolňující se z biofilmu kontaminovaly mléko po pasteraci přes nerezový povrch tepelného výměníku v koncentraci až 10^6 CFU/ml. V posledních letech došlo k pokrokům v mikrobiologii a snížil se výskyt kontaminace biofilmem jak v klinické mikrobiologii, tak v potravinářském průmyslu. [49]

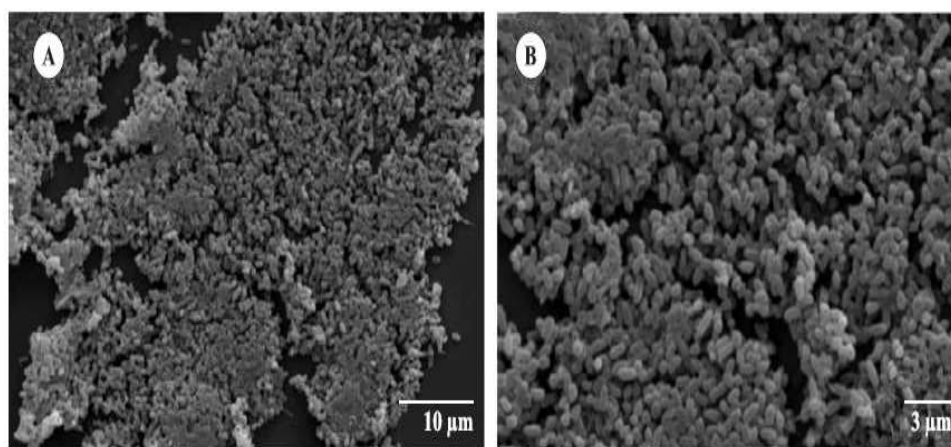


Figure 2. Electro micrographs of *Staphylococcus aureus* cells adhered onto glass (A) and stainless steel (B) surfaces, visualized by scanning electron microscopy.

Obr. 4 Biofilm *Staphylococcus aureus* na skle (A) a na nerezavějící oceli (B) [72]

4.1 Místa výskytu biofilmu v potravinářství

Kvalita zpracovaných produktů je ovlivněna z hygienického hlediska, a to stavem povrchu, nástrojů a zařízení. Při nedostatečném nebo špatném čištění či sanitaci, dochází ke kontaminaci a tvorbě biofilmu vytvořeného mikroorganismy, který jim poskytuje ochranu proti působení sanitačních nebo čisticích prostředků. Mezi kontaminované povrchy v potravinářských podnicích patří převážně dopravní pásy, na kterých jsou potraviny v přímém kontaktu s kontaminovaným povrchem. Bylo zjištěno, že i po vyčištění byl v mlékárně dopravní pás kontaminován bakteriemi *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. a dalšími v množství až 10^5 – 10^6 CFU/100 cm². Za další zdroj kontaminace je považován bioaerosol, do kterého jsou mikroorganismy uchyceny pomocí kapalinových částic aerosolu. [50]

Další výskyt mikroorganismů, které byly uvolněny z biofilmu, byl prokázán v odpadech nebo na podlahách, které mají zdrsňený povrch nebo na povrchu, který byl poškozen. V dnešní době je v potravinářském průmyslu řada povrchů tvořena z nerezové oceli, která je snadno čistitelná a chemicky odolná. Bylo ovšem prokázáno, že častým mechanickým čištěním dochází také k narušení tohoto povrchu, kdy dochází ke vzniku trhlinek a vrypů, kde se snadno uchycují mikroorganismy. V potravinářském průmyslu se může biofilm vyvíjet až několik týdnů. V masném a mlékárenském průmyslu byl prokázán velmi vysoký výskyt stafylokoků a pseudomonád. Vývoj biofilmu je také ovlivněn povrchovými vlastnostmi mikroorganismů. [49]

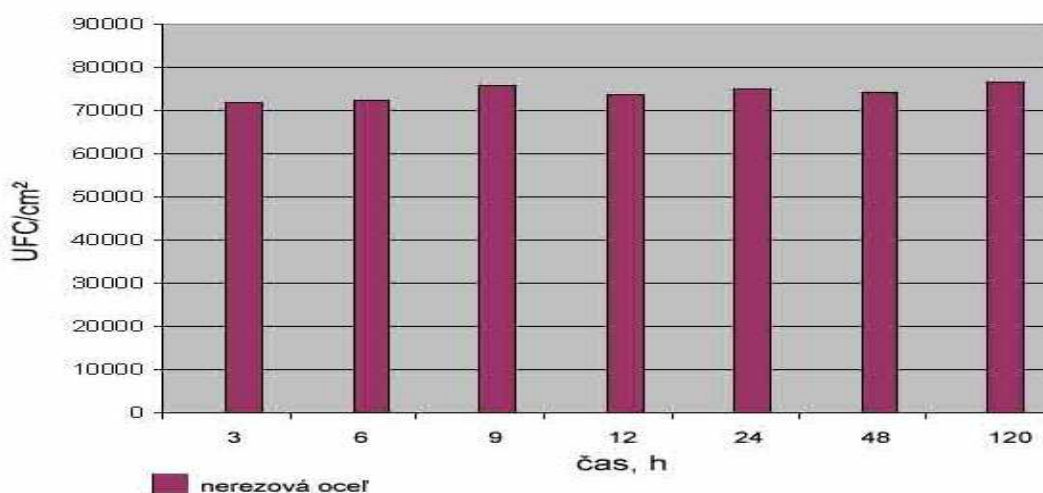
4.2 Tvorba biofilmu na površích z nerezové oceli

Nerezová ocel se nejčastěji používá jako materiál pro různé typy zařízení v potravinářském průmyslu. Jako testovaný materiál pro zjišťování, zda jsou mikroorganismy schopny vytvářet biofilm i na tomto povrchu, byl použit kovový povrch z nerezové oceli, který má charakteristické vlastnosti podobné těm, které se v potravinářském průmyslu používají, aniž by ovlivnili životaschopnost buněk. V posledních letech je biofilm mnohdy tvořen bakteriálním druhem *Bacillus subtilis*, který je taxonomicky řazen mezi sporotvorné gram-pozitivní bakterie. Tento mikroorganismus byl použit při testování tvorby biofilmu na nerezovém povrchu. [50]

Bylo provedeno několik experimentů pro průkaz vzniku biofilmu na testovaném materiálu:

1. Kovové destičky byly nejdříve ponořeny po dobu 30 minut do acetonu a následně byly ponořeny do 1 % NaOH po dobu 1 hodiny. Po 1 hodině byly kovové destičky vyjmuty a řádně opláchnuty destilovanou vodou a byla provedena sterilace při 121 °C po dobu 35 minut.
2. Do sterilního mléka bylo záměrně naočkováno určité množství *Bacillus subtilis*, které bylo asepticky naočkováno na testovaný povrch. Destičky z nerezové oceli byly uchovávány při konstantní teplotě po dobu 3, 6, 12, 24, 48 a 120 h. Po uplynutí této doby byl zkoumán vznik biofilmu.
3. Pomocí vatového tampónu byl proveden stěr z testovaného materiálu, který byl převeden do zkumavky s fyziologickým roztokem. Stěr byl vytřepán do roztoku, kde došlo k uvolnění buněk. Takto připravené ředění bylo naočkováno na agarové plotny a poté byla provedena kultivace při 30 °C po dobu 48-72 h. [50]

Tyto experimenty prokázaly, že *Bacillus subtilis* je schopný tvořit biofilm na materiálech z nerezové oceli. Bakterie přilnuly na povrch materiálu a vytvářely biofilm. Následně byly popsány jednotlivé fáze vývoje biofilmu. V budoucnosti může schopnost přichycení bakterie sloužit například ke zlepšení vývoje sanitačních prostředků, k redukci potenciální kontaminace zpracovaných produktů nebo pro lepší vývoj povrchu. [50]



Obr. 5: Tvorba biofilmu na nerezové oceli při teplotě 20 °C po různě dlouhou dobu. [73]

Na obr. 5 jsou znázorněny získané údaje z experimentu, pro zjištění tvorby biofilmu na nerezové oceli, který provedl Čapla a kol. Prvním krokem byl vznik vrstvy biofilmu. Díky

dostatečnému příjmu živin došlo v biofilmu k intenzivnímu růstu bakterií. V intervalu 3-6 hodin nastala adheze mikroorganismů na povrch z nerezové oceli. Biofilmem bylo osídleno asi 80% plochy testovaného materiálu. K maximálnímu přilnutí a rozvoji bakterií došlo po zhruba 9 hodinách od zaočkování bakterií. Bakterie rostly v biofilmu díky produkci polysacharidové substance během 9-24 hodin. Po 12 hodinách došlo ke krátkodobému odlučování buněk. Po 24 hodinách došlo k dalšímu rozvoji mikroorganismů, produkci EPS a rozvoji matrice biofilmu. [50]

4.3 Účinnost sanitačních prostředků a odstraňování bakteriálního biofilmu

Přítomnost patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů v prostředí potravinářské výroby může způsobovat závažné kontaminace potravinářských produktů. Nejeefektivnější způsob na zničení patogenní mikroflóry je správná dezinfekce, čištění zařízení a výrobního prostředí. Jak již bylo řečeno, bakterie, které vytváří biofilm, mohou přežívat dezinfekci. [51] Odstranění biofilmu vyžaduje intenzivní čištění. Dezinfekční prostředek je třeba vybírat podle pracovního prostředí a podle předpokládaného výskytu mikroorganismů. Důležitá je rovněž vhodně volená teplota, spolupůsobení ultrazvuku nebo mechanické čištění. Mezi nejúčinnější sanitační prostředky pro odstranění biofilmu lze zařadit aldehydy, aktivní kyslík, chlornan sodný. [52] V potravinářském průmyslu se v biofilmu nejběžněji vyskytují pseudomonády, stafylokoky a enterobakterie. [53]

4.4 Nové metody pro kontrolu biofilmu v potravinářském průmyslu

Tvorba biofilmu a jeho mikrobiální adheze je velmi rizikovým faktorem pro potravinářský průmysl. Velmi často bývá zaznamenán jejich výskyt na povrchu při styku s potravinou, a proto vědci hledají nové metody pro odstranění biofilmu. [50]

4.4.1 Kontrola biofilmu pomocí enzymů

Při kontrole biofilmu slouží enzym jako „biočistič“, který vhodně překonává tvorbu biofilmu v potravinářském průmyslu. Na enzymových základech jsou založeny sanitační prostředky, které slouží ke zlepšení účinnosti dezinfekčních prostředků. Enzymy mají funkci degradace biofilmu. Enzymy jsou rovněž schopny rozkládat EPS v biofilmu. Důležité je, aby se našly takové enzymy, které účinkují proti různým typům biofilmu. Užitečné mohou být například proteasy a enzymy hydrolyzující polysacharidy. [50]

4.4.2 Kontrola biofilmu pomocí bakteriofágů

Vzájemné interakce bakteriofágů s biofilmem jsou závislé na citlivosti bakterií přežívajících v biofilmu k bakteriofágům. Bakteriofág je schopen produkovat enzymy, které degradují polysacharidy. Díky tomu pak může dojít k rozpadu buněk vlivem degradace. Pro odstranění biofilmu jsou důležitá tato kritéria:

- Bakterie musí být citlivé vůči příslušným bakteriofágům.
- Bakteriofág musí být schopen rozkládat EPS biofilmu.

Tato metoda byla navržena jako velmi účinná, pokud splňuje alespoň jedno z kritérií. Zatím však existuje jen málo dostupných informací o bakteriofázích, kteří napadají bakterie na biofilmech. [50]

4.4.3 Kontrola biofilmu pomocí bioregulace

Bioregulace je považována za prostředek mezidruhové interakce. Vzájemné interakce a vícenásobná produkce metabolitů může zasahovat do vývoje biofilmu. Výzkum ukázal, že různé mikroorganismy mohou soutěžit s jinými o zdroj energie nebo živin a jsou schopné syntetizovat a vylučovat povrchově aktivní látky, které zde rovněž hrají významnou roli. Mohou způsobovat větší hydrofóbnost povrchu buňky. Biofilm je odstraněn produkcí biotenzidu, díky kterému dochází k přesunu EPS jedné bakterie do druhé, buňky jsou v těsné blízkosti a dostávají antimikrobiální vlastnosti. Odstranění biofilmu pak způsobuje produkce biotenzidu, kdy EPS jedné bakterie se přesouvá do druhé a buňky jsou v těsné blízkosti a dostávají antimikrobiální vlastnosti na další druhy bakterií. Biotenzidy se také používají na zlepšení povrchové hygieny v potravinářských závodech. Bylo zjištěno, že tenzidy z *Bacillus subtilis* rozrušují biofilm ještě při růstu buněk a tím zabraňují vzniku biofilmu mikroorganismy, jako jsou *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* nebo *Proteus mirabilis*. Bakterie mléčného kvašení a kvasinky mohou rovněž produkovat látky s antimikrobiálními účinky např. proti *Listeria monocytogenes*. [50]

4.4.4 Čištění a dezinfekce biofilmu

Podle směrnice 98/8/ES Evropského parlamentu [54] o uvádění biocidních výrobků na trh jsou biocidní výrobky definovány jako aktivní látky a přípravky s cílem ničení, zneškodnění a zabránění škodlivého účinku organismů. Biocidní výrobky mohou působit na škodlivý organismus i jinými inhibičními účinky, a to chemickými nebo biologickými. Podle

Gilberta a McBaina jsou biocidy definovány jako aktivní látky, které při určité koncentraci v určitém čase za definovaných podmínek ničí mikroorganismy nebo zpomalují jejich růst a rozmnožování. [50]

Dezinfekce a sanitace provozů patří v potravinářském průmyslu mezi základní kroky k zabezpečení výroby potravin a zároveň ovlivňují kvalitu a bezpečnost výrobku. K minimalizaci kontaminace v potravinářském průmyslu se využívá čištění. Čištěním by se měly odstranit i jiné nečistoty, ve kterých by byl možný výskyt daného mikroorganismu. Čištění se provádí mechanicky studenou nebo teplou vodou. Poté se zpravidla použije chemický prostředek, který obsahuje povrchově aktivní látky. Důležitý je oplach vodou, následná dezinfekce a opětovný oplach vodou, aby nezůstaly zbytky toxických látek na povrchu materiálu a neměly tak vliv na sensorickou kvalitu výrobku. V dnešní době se používá kombinace různých chemických látek. Pro odstranění biofilmu je velmi účinné mechanické působení např. vodní turbulence, drhnutí. Při čištění dochází k rozkladu matrice EPS a tím získává dezinfekční prostředek přístup k životaschopným buňkám. Při čištění se bakterie mohou uchytit na jiném místě a vzhledem k přítomnosti vody a dostatečnému množství živin opět vytvářet biofilm. Proto musí být využita i dezinfekce. V potravinářském průmyslu je důležité, aby byly čisté všechny plochy, které jsou ve styku s potravinou. Tím se zabrání mikrobiální kontaminaci a zvýší se bezpečnost potravin. [50]

Velmi důležitá je rovněž volba dezinfekčního prostředku, který je vhodný na odstranění biofilmu. Bylo zjištěno, že dezinfekční roztoky obsahují mikroorganismy, které zvyšují ochranu biofilmu schopností tvořit rezistentní kmeny. Dezinfekční prostředky nepronikají do matrice biofilmu a nejsou tedy zničeny všechny živé buňky. Mokrý povrch poskytuje dobré prostředí pro růst mikroorganismů, a proto je dezinfekce nutná. Cílem dezinfekce je snížit množství mikroorganismů a zabránění jejich růstu. Účinnost dezinfekčních prostředků může být kontrolována např. pomocí pH, organických látek, teploty, tvrdosti vody a chemických inhibitorů. Vhodný dezinfekční prostředek volíme podle použitého materiálu. Dezinfekční prostředky jsou nejefektivnější, pokud jsou odstraněny ostatní organické látky, jako jsou například tuky, sacharidy či materiály na bázi bílkovin. [50]

5 PATOGENNÍ MIKROORGANISMY TVOŘÍCÍ BIOFILM

S biofilmem úzce souvisí patogenní mikroorganismy a schopnost jejich virulence, jelikož právě převážně patogeny vytváří biofilm, ve kterém přežívají. [55]

Mezi hlavní zástupce patogenních mikroorganismů schopných tvořit biofilm můžeme zařadit:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Listeria monocytogenes*,
- *Staphylococcus* – koagulasa negativní druhy,
- *Escherichia coli*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Acinetobacter baumannii* [55]

5.1 Definice patogenních mikroorganismů

Nejzávažnější negativní působení mikroorganismů v přírodě vyplývá z činnosti tzv. patogenních mikroorganismů, které způsobují nemoci člověka, zvířat nebo rostlin. Velmi rychlé rozmnožování mikroorganismů a nedostatečná hygiena mohou vést ke vzniku epidemií nebo i pandemii. Jako příklad můžeme uvést morové nebo cholerové epidemie středověku nebo raného novověku. Dnes se díky zvýšené hygieně, důsledné mikrobiologické kontrole a pokročilé lékařské péči větší epidemie bakteriálních onemocnění vyskytují méně často, převážně v rozvojových zemích. Ve vyspělých zemích se však stále ještě objevují epidemie virových onemocnění, z nichž některé (např. infekční hepatitida) jsou přenosné potravinami a vodou. [56]

5.1.1 Patogenita a patogeneze bakteriálních infekcí

Patogenita je obecná schopnost bakterie způsobit infekční onemocnění. Patogenitu určuje virulence, jež je mírou patogenity pro daný živočišný druh. Patogenní bakterie nemusí být aktuálně virulentní. Virulence, či její míra, se stanovují obtížně, protože ji lze měřit jen v podmínkách *in vivo* na zvířatech nebo na buněčných kulturách. Virulence je komplexní vlastnost, spočívá v invazivně, tj. ve schopnosti proniknout do tkáně a tam se pomnožit, ve schopnosti kolonizace, což je osídlení sliznice hostitele, a v adhezenci na buňku. [57]

Toxigenní bakterie produkují bílkovinné toxiny. Produkují také bílkoviny, jež samy toxicky nepůsobí, ale jejich kooperace hostitelskou buňku poškodí. Mezi klasickými toxiny a těmito toxiny není výrazný rozdíl. Všechny výše zmíněné faktory determinující patogenitu a její míru – virulenci. Jako faktory virulence se souhrnně označují všechny faktory včetně adheziv, toxinů, bílkovin, které zasahují do metabolismu buňky či aktivují různé geny. Faktorů virulence je celá řada. Mezi méně známé faktory virulence lze zařadit například schopnost mobilizovat a vázat železo z prostředí a využít je v metabolismu tvorby toxinů. Vztah bakterií a člověka závisí na tom, zda mezi hostitelem a bakterií je vytvořena rovnováha, nebo zda jeden či druhý převáží. [57]

Primární patogeny způsobují infekční onemocnění, jakmile se dostanou do styku s osobou jinak zdravou. Podmíněné patogeny nebo oportunní patogeny vyvolávají infekční onemocnění osob oslabených jinou nemocí, dlouhodobým pobytem v nemocnici, podvýživou či vysokým věkem. [57]

Patogenní bakterie se do potravinářských provozů dostávají z okolního prostředí, z půdy, vody nebo od hmyzu, zvířat či lidí. Mohou se přenášet vzduchem, kontaminovanými předměty nebo kontaktem. Do těla se dostávají dýchacím traktem, trávicím traktem, spojivkami, kůží – bodnutím hmyzem, kousnutím zvířete, při porušení celistvosti kůže poraněními i zcela neviditelnými. [57]

Adheze, kolonizace

Patogenní mikroorganismus se musí v organismu hostitele uchytit. Bakterie přilnou k buňkám sliznice. Adheziny na povrchu bakterie reagují s receptory na povrchu buněk sliznice a bakterie se na ně navážou. Na sliznici soutěží patogenní bakterie s přítomnou kolonizující normální flórou o receptory. Jako adheziny fungují různé fimbrie, zejména fimbrie typu 1 a 4. Lze zmínit také p-fimbrie, jež se vážou na buňky močového epitelu a jsou specifické pro kmeny gramnegativních bakterií, zejména *Escherichia coli*, které vyvolávají močové infekce. Podle specifity fimbriového adhezinu vyvolávají určité kmeny *E. coli* střevní nebo močovou infekci. Bílkovina schopná vazby na receptor eukaryontní buňky je lokalizována na špičce fimbrie. U streptokoků funguje jako adhezín kyselina teichoová a lipoteichoová v buněčné stěně grampozitivních bakterií. Nespecificky adheruje také pouzdro nebo glykokalyx. [57]

Adheziny se však nevážou na jakoukoliv buňku, jsou specifické pro určitou tkáň nebo živočišný druh. Specifita pro tkáň je patrná u kmenů *Escherichia coli*, některé adherují jen

k prasečím buňkám, jiné k buňkám telecím a nikoliv lidským, jiné výhradně k buňkám lidským. Určitý typ *Salmonella enterica* adhezuje k buňkám hovězím, nikoliv k lidským, a proto infikuje jen hovězí dobytek. *Streptococcus pyogenes* skupiny A, původce angíny, adhezuje pouze k buňkám lidským. Lze to považovat za výhodu, protože člověk se pyogenním streptokokem nemůže nakazit od zvířat. [57]

U grampozitivních buněk se většinou nevyskytují fimbrie, a tak bílkovinný adhezín pokrývá celý povrch bakteriální buňky, např. u stafylokoků, pneumokoků a streptokoků. Kolonizovány jsou tkáně spojené s vnějším prostředím, sliznice dýchacího, trávicího a močového traktu, pochvy, spojivky. [57]

5.2 Množení bakterií v podmínkách *in vivo*

Rychlost množení patogenních mikroorganismů v organismu hostitele se výrazně liší v průběhu onemocnění. Při akutním onemocněním je kratší doba ke zdvojení mikroorganismů, přičemž při chronickém onemocnění zpravidla nastává delší doba zdvojení mikroorganismů. Rychlost množení mikroorganismů v podmínkách *in vivo* je zpravidla nižší než v podmínkách *in vitro*. Vnitřní prostředí hostitele může být ovlivněno metabolickou aktivitou (spotřeba glukosy a pokles glykemie, obsah železa v prostředí). Patogenní mikroorganismy jsou závislé na získávání železa z hostitele a tím dochází ke zvyšování virulence. [58]

Železo se u hostitele vyskytuje:

- intracelulárně – dostupné až po rozrušení hostitelské buňky,
- extracelulární – vázané na bílkoviny, například transferin [58]

Bakterie vytváří transportní sloučeniny pro železo, tzv. siderofory. V prostředí se zvýšenou koncentrací železa dochází k většímu výskytu patogeních mikroorganismů a hrozí nebezpečí infekce. [58]

5.3 Charakteristické znaky vybraných patogenních zástupců schopných tvořit biofilm

5.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je bakterie, která je považována za nejčastěji izolovanou a klinicky nejvýznamnějším představitelem celého rodu. Řadí se do čeledi *Pseudomonadaceae*.

Její výskyt je popisován především v různých vodách, zejména odpadních, ve střevě obratlovců, na rostlinách a v půdě. Ve velkém množství může zamořovat nemocniční prostředí, kde kontaminují katétry, infuzní roztoky a dýchací přístroje. Mnohdy přežívá v biofilmu. [59]

5.3.1.1 Kultivace a biochemie

Zástupce pseudomonád lze identifikovat podle růstu na základních půdách. Kolonie bývají zčásti autolyzovány a díky tomu připomínají plaky. [60]

Vytváří zápach, který je způsobený trimetylamínem a celou řadu pigmentů (většinou zelených), z nichž nejčastější je modrozelený pyocyanin, který je tvořen *Pseudomonas aeruginosa* a žlutozelený fluorescein. [59] Činností bakterií rodu *Pseudomonas* mohou rovněž vznikat oxidační deriváty, jako jsou např. aflaoxifenasin, které mají antibiotický účinek proti grampozitivním a některým gramnegativním bakteriím. Tyto deriváty byly nesprávně zařazeny mezi enzymy a byly označeny jako pyocyanasa. [60]

Z biochemického hlediska štěpí *P. aeruginosa* řadu cukrů a vykazuje oxidasovou aktivitu. Biochemické hledisko je velmi významné zejména u kmenů neprodukcujících pigmenty, kdy *Pseudomonas aeruginosa* tvoří 5-20% ze všech kmenů rodu *Pseudomonas*. [59]

5.3.1.2 Patogenita

Mezi virulentní faktory pseudomonád můžeme zařadit faktory vázané na bakteriální buňku (extracelulární polysacharid, slizová vrstva, stěnový lipopolisacharid) a extracelulární produkty, mezi které patří enzymy, toxiny a pigmenty. [60] Faktory virulence jsou produkovány v závislosti na hustotě populace. [23]

Extracelulární polysacharid alginát, se tvoří v enormním množství u mukoidních kmenů, obaluje mikrokolonie bakterií a chrání je před obrannými mechanismy hostitele, a to zejména u cystické fibrózy. Při pasážování *in vitro* alginát mizí. [60]

Lipopolysacharidový komplex neboli endotoxin, se řadí mezi další faktory virulence pseudomonád. Je spojen s typově specifickým antigenem a protilátky proti němu působí jako opsoniny zabezpečující opsonizaci, čímž urychlují a usnadňují fagocytosu. [60]

Z extracelulárních enzymů se při patogenezi uplatňují především proteolytické enzymy, které štěpí kasein, fibrin, elastin a kolagen. Poškozují stěny drobných cév, čímž vyvolávají

hemoragie až nekrózy. Inaktivují složky komplementu a tím brání vyvolání ozonizace a inhibují fagocytosu. [60]

Pseudomonas aeruginosa tvoří 2 typy hemolysinů. Jeden s aktivitou C fosfolipasy a druhý je termostabilní glykolipid. Pyocyanin je uplatňován jako inhibitor mitochondriálních enzymů, snižuje pohyb řasinek a tím dochází ke zhoršování očišťování sliznice dýchacích cest. [60]

5.3.1.3 Onemocnění a léčba

U zdravého člověka v důsledku přítomnosti *P. aeruginosa* onemocnění zpravidla nevznikne. K propuknutí onemocnění jsou nutné další faktory, jako jsou poruchy fagocytosu, popáleniny, maligní procesy (především leukémie), podávání cytostatik, kortikoidů, dlouhodobé užívání antibiotik, těžké operace, zavedení katetrů nebo onemocnění diabetes mellitus. [58]

Pseudomonas aeruginosa vyvolává tedy infekci jen při snížení lokální nebo celkové odolnosti organismu. Kmeny, které vyvolávají nemocniční infekce, jsou obvykle vysoce virulentní a rezistentní na antibiotika. K léčbě onemocnění způsobené *Pseudomonas aeruginosa*, slouží běžné antibiotika, které musí být podány injekční formou. [60]

5.3.1.4 Produkce biofilmu u *Pseudomonas fluorescens*

Ve studii Čaply a kol. [61] byly zkoumány možnosti tvorby biofilmu *Pseudomonas fluorescens*. Zkoumání bylo provedeno na různých typech povrchů, na destičkách z nerezové oceli, z polyetylenu (PE), a na mikroskopickém podložním skle. Pro přípravu suspenze byla použita kultura *Pseudomonas fluorescens*, která byla kultivována 24 hodin při teplotě 22-25 °C. Takto připravená suspenze bakterií byla následně zředěna sterilním bujónem, na počet mikroorganismů cca 10^8 KTJ/ml. Testované povrchy byly zality zředěnou suspenzí buněk tak, aby byl celý povrch ponořen. Inkubace byla provedena při teplotě 25 °C po dobu 3, 24 a 72 hodin. Po uběhnutí uvedené doby byly vzorky opláchnuty fyziologickým roztokem, přičemž oplach sloužil k odstranění nepřichycených buněk. Poté byly povrchy kultivovány po dobu 72 h, opláchnuty sterilovanou vodou a opět zality připravenou zředěnou suspenzí buněk a následně kultivovány dalších 72 h. Po 3 a 24 h při teplotě 25 °C byly testované povrchy promyty fosfátovým pufrům a byla provedena stěrová metoda a kultivace na živném médiu. [61]

Počet adherovaných buněk *Pseudomonas fluorescens* po 3 hodinách přesáhl počet 10^3 KTJ/cm². U materiálu z nerezové oceli, skla a u PE bylo dosaženo hodnoty až $1,3 \cdot 10^4$ KTJ/cm². Jako nejlepší materiál pro přilnutí buněk se jevil PE, kde po 72 h byl počet buněk cca 10^6 KTJ/cm². Výjimku tvořil povrch z nerezové oceli, kde byl zjištěn nejvyšší nárůst po 6 h. U většiny materiálů byl po 72 hodinách zjištěn vznik bakteriálního biofilmu. Při tomto pokusu byla zároveň prokázána produkce exopolysacharidové matrice buněk *Staphylococcus aureus*. [61]

5.3.2 *Staphylococcus epidermidis*

Rod *Staphylococcus* se řadí mezi grampozitivní nepohyblivé fakultativně anaerobní koky, které se vyskytují jednotlivě, po dvou, v tetrádách nebo ve shlucích ve tvaru hroznu. Jsou katalasa negativní a oxidasa pozitivní. Buňky na živné půdě vytváří kolonie bílé, krémové, žlutooranžové nebo žluté barvy. [59] Nejčastější výskyt stafylokoků je na kůži, mukózních membránách savců a ptáku a na kožních žlázách. Stafylokoky jsou také považovány za součást přirozené mikroflóry lidského těla a při oslabení imunity se mohou projevit jako patogenní. Stafylokoky dělíme podle plazmakoagulasového testu na koagulasa pozitivní a koagulasa negativní. Z koagulasa pozitivních je nejdůležitějším zástupcem *Staphylococcus aureus* a z koagulasa negativních *Staphylococcus epidermidis*. [62]

5.3.2.1 Virulence *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis tvoří nevelké množství extracelulárních enzymů a toxinů, které degradují tkáň. Nejvýznamnějším toxinem je δ -toxin, N-formylovaný α -helikální peptid. Tento toxin vytváří póry v buněčných membránách, které vytváří lyzi erytrocytů a jiných buněk hostitele. [63] *Staphylococcus epidermidis* využívá produkci antibakteriálních peptidů, které obsahují aminokyseliny lantionin nebo metylantionin. Jedná se o tzv. lantibiotika. Jsou to látky, které produkují jiné druhy grampozitivních bakterií, které mají baktericidní účinky. U *Staphylococcus epidermidis* je velmi důležitá přítomnost železa, které se váže na glykoproteiny. Železo podporuje růst buněk a uplatňuje se při patogenezi. Může se získávat pomocí dvou mechanismů:

1. Pomocí tvorby sideroforů (tj. stafyloferin A a B). Jedná se o cheláty železa, které produkují buňky stafylokoků.
2. Pomocí přímého kontaktu bakterií s transferiny přes receptory, které se nachází na povrchu buněk. [64]

5.3.2.2 Regulace tvorby biofilmu u zástupců rodu *Staphylococcus*

Tvorba biofilmu je regulována pomocí genů, jejichž exprese je ovlivněna podmínkami prostředí, a proto se různé kmeny odlišují v produkci extracelulárního slizu a odlišná je také tvorba biofilmu. Na regulaci se významně podílí QS, a to především systém *agr* (accessory gene regulator), který snižuje expresi povrchových proteinů a zvyšuje expresi virulentních faktorů. [65] Při rozvoji biofilmu jsou produkovány určité složky, které systém *agr* omezuje, a proto při jeho porušení nebo inhibici dochází ke zvýšení adheze bakterií a vytváří se biofilm. [66]

Mezi další systém QS řadíme systém pro mezidruhovou komunikaci, jedná se o tzv. *lux* systém, který řídí syntézu molekul autoinduktoru 2 (AI-2). Patří mezi významný regulátor tvorby biofilmu. Systém *lux*, kromě *Staphylococcus epidermidis*, můžeme najít i u dalších grampozitivních a gramnegativních stafylokoků. [65]

Grampozitivní bakterie mohou komunikovat také pomocí oligopeptidů. Oligopeptidy jsou zde využity jako signály, které jsou složeny z krátkých řetězců aminokyselin (AMK). Dochází k tvorbě autoinduktoru, který je přenesen z buňky do prostředí. Jakmile se oligopeptid nahromadí a dosáhne dostatečné koncentrace, je zachycen a přenesen dále. Poté se napojí na AMK histidinfosfát, která je dále přenesena na regulační bílkovinu genu, který aktivuje a dochází ke vzniku biofilmu. Přenos signálu je dvousložkový, ovšem oligopeptid dvousložkový signální přenašeč dokáže rozeznat. [23]

5.4 Přílnavost *Listeria monocytogenes* na pevné povrchy

5.4.1 Vlastnosti *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes patří mezi grampozitivní tyčinky, aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie. Typickou vlastností je pohyblivost u kultur, které rostou při nízkých teplotách. Problematika přítomnosti *Listeria monocytogenes* v potravinářských provozech se stala aktuální především koncem 70. let, kdy se ve světě v poměrně krátké době objevila řada epidemií. Pro průkaz *Listeria monocytogenes* platí Česká státní norma ISO 10560 z roku 1996, která je založená na tvorbě typických kolonií narostlých tuhých na selektivních médiích vykazující morfoloické a metabolické vlastnosti. [67]

Listeria monocytogenes je řazena mezi hlavní patogeny, které se mohou vyskytovat v potravinářském průmyslu. Způsobuje listeriózu, což je onemocnění s vysokou úmrtností u rizikových skupin obyvatelstva. Mezi rizikové skupiny jsou řazeny osoby se sníženou

imunitou, děti, staří lidé a těhotné ženy. Výskyt listerií byl zjištěn v potravinách, jako jsou sýry, ryby, maso, vejce, zelenina a lahůdky, které obsahují zejména maso a vejce. *Listeria monocytogenes* může také kontaminovat potravinářská zařízení, na kterých může z důvodu její poměrně značné odolnosti vůči působení sanitačních prostředků perzistovat. Perzistence je dána zvýšenou adhezí a tvorbou biofilmu na plochách, které jsou v přímém styku s potravinou. [68]

5.4.2 Možnosti průkazu tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*

Schopnost tvořit biofilm je považována za nejpravděpodobnější vlastnost v souvislosti s *Listeria monocytogenes* v potravinářských výrobcích. Pro stanovení možnosti tvorby biofilmu byly použity čtyři kmeny *Listeria monocytogenes*, které byly z potravinářských provozů opakovaně izolovány v letech 1996 – 2007 a čtyři kmeny *Listeria monocytogenes*, které byly izolovány v průběhu let 1999-2008 sporadicky. Rovněž byl použit kontrolní kmen *Listeria monocytogenes* EGD. Kmeny byly kultivovány v trypton-sojovém bujónu při teplotě 37 °C po dobu 18-20 hodin. Suspenze buněk byla nanášena do polystyrenové mikrotitrační destičky. Vzniklý biofilm byl kvantifikován spektrofotometricky barvením krystalovou violetí. Míra tvorby biofilmu mezi jednotlivými skupinami kmenů byla určena procentuálně. [68]

Na tvorbu biofilmu má vliv teplota a různé růstové fáze buněk, proto ze základní suspenze byly následně připraveny dvě další suspenze buněk v různé fázi růstu (exponenciální až stacionární fáze růstu). Tvorba biofilmu byla testována při 20 °C, 37 °C a 40 °C po dobu 20-24 hodin. Všechny kmeny tvořily biofilm bez ohledu na jejich růstové fáze a při všech testovaných teplotách. Nebyl prokázán značný rozdíl mezi jednotlivými kmeny, ani vzhledem k růstové fázi. [68]

Na tvorbu biofilmu mají vliv také živiny, což bylo testováno v médiu, které bylo vyměněno za čerstvé. Tvorba biofilmu probíhala při teplotách 20, 37 a 40 °C po dobu 20-24 hodin, respektive při teplotě 4 °C po dobu 5 dní. Přirozené podmínky prostředí v potravinářském průmyslu poskytují nepravidelný a omezený přísun živin pro mikroorganismy, proto dochází ke zvýšené adhezii a k tvorbě biofilmu na povrchu. [68]

Dále byl prokázán vliv zvýšené koncentrace NaCl na adhezii buněk. Suspenze kmenů byla připravená kultivací v bujónu s 10 % NaCl. Adheze za polystyren probíhala při 20 °C po dobu 4 h. Zvýšená adheze buněk listerií na polystyren vlivem zvýšené koncentrace NaCl bývá popisována jako důsledek vzniku flagel. V prostředí s vyšší koncentrací solí (10 %

NaCl) byla prokázána zvýšená adheze testovaných kmenů, byla prokázána zvýšená schopnost tvorby biofilmu za různých teplotních podmínek. [68]



Obr. 6: Tvorba biofilmu u *Listeria monocytogenes* za 7 dní [74]

ZÁVĚR

Biofilmy jsou nežádoucí sloužkou našeho života. Kontaminují především povrchy v potravinářském průmyslu a v klinickém prostředí. V potravinářském průmyslu se mohou uvolňovat patogenní mikroorganismy, které následně mohou kontaminovat potraviny a suroviny k jejich výrobě.

Bakterie v biofilmu jsou zpravidla více rezistentní vůči antimikrobiálním látkám než bakterie planktonní. Tato rezistence je způsobena několika mechanismy.

Bylo prokázáno, že v potravinářském průmyslu nejčastěji vytvářejí biofilm bakterie *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Tyto mikroorganismy kontaminují především povrchy ze skla a z nerezové oceli. Nerezová ocel je jedním z nejpoužívanějších povrchových materiálů v potravinářském průmyslu.

V mnoha studiích bylo rovněž prokázáno, že na tvorbu biofilmu má vliv několik faktorů, jako je např. teplota, růstová fáze buněk, dostupnost živin nebo zvýšená koncentrace NaCl. Mnohé z těchto faktorů se uplatňují při technologickém zpracování potravin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie I: mikrobiální biofilm*. Brno: Neptun, 2001. 247 s. ISBN 80-902896-2-2.
- [2] SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*. 2001, roč. 80, č. 4, s. 203-206.
- [3] ARCIOLA, C. R., BALDASSARRI, L., MONTANARO, L. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J. Biomed. Mater.* 2002, roč. 59, č. 3, s. 557-562.
- [4] PACE, J. L., RUPP, M. E., FINCH, R. G. *Biofilms: infection and antimicrobial therapy*. 1.vyd. Boca raton: Taylor & Francis group, 2006. 512 s. ISBN 0-82-47-2643-x.
- [5] SCHULTE, S., WINGENDER, H. C. Fields of application: efficacy of biocides against biofilms. *Chemistry and materials science*. 2005, roč. 10, č. 5, s. 93-120.
- [6] DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol.* 2000, roč. 64, č. 4, s. 847-867.
- [7] DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect.* 2001, roč. 33, č. 8, s. 1387-1392.
- [8] CHMIELEWSKI, R. A. N., FRANK, J. *Comprehensive reviews in food science and food safety: biofilm formation and control in food processing facilities institute of food technologies*. 2 vyd. North America: Willey-blackwell, 2010. 488 s. ISBN 978-1-4051-8740-4.
- [9] POULSEN, L. V. Microbial biofilm in food processing: department of biotechnology, centre for advanced food studies. *Technical University of Denmark*. 1999, roč. 32, č. 6, s. 321-326.
- [10] LICKING, E. Getting a grip on bacterial slime. *Business Week*. 1999, roč. 13, č. 9, s. 98-100.
- [11] DEMIRCI, A., PONGTBARABGKUL, T., POMETTO III., A. L. Applications of biofilms reactors for production of value: added products by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 87, č. 2, s. 445-446.

- [12] BUSSCHER, H. J., VAN DER MEI, H. C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*. 1997, roč. 11, č. 1, s. 24-32.
- [13] DANESE, P. N., PRATT, L. A., KOLTER, R. Biofilm formation as a developmental process. *Methods Enzymol.* 2001, roč. 336, s. 19-26.
- [14] DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, roč. 15, č. 2, s. 167-193.
- [15] CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993, roč. 75, č. 6, s. 499-511.
- [16] MACK, D., BECKER, P., CHATTERJEE, I., DOBINSKY, S., KNOBLOCH, J. K., PETERS, G., ROHDE, H., HERRMANN, M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004, roč. 294, č. 2-3, s. 203-212.
- [17] ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry: Should they be a concern? Department of food science and nutrition. *University of Minnesota*. 1994, roč. 23, č. 2, s. 125-148.
- [18] DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 2001, roč. 33, č. 8, s. 1387-1392.
- [19] STOODLEY, P., BAUER, K., DAVIES, D. G., COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002, roč. 56, s. 187-209.
- [20] DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W., GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998, č. 280, s. 295-298.
- [21] HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, roč. 2, s. 95-108.
- [22] HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, roč. 2, s. 95-108.

- [23] SCHINDLER, J. *Ze života bakterií*. Praha: Academica, 2008. 143 s. ISBN 978-80-200-1666-9.
- [24] COENYE, T., NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, roč. 83, s. 89-105.
- [25] DUAN, K., SURETTE, M. G. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 las and rhl quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*. 2007, roč. 189, s. 4827-4836.
- [26] READING, N. C., SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, roč. 254, s. 1-11.
- [27] TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2003, roč. 25, č. 6, s. 207-815.
- [28] STEWART, P. S., COSTERTON, J. W. resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001, roč. 358, s. 135-138.
- [29] DAROUICHE, R. O., DHIR, A., MILLER, A. J., LANDON, G. C., RAAD, I. I., MUSHE, D. M. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J. Infect. Dis.* 1997, roč, 170, č. 3, s. 720-723.
- [30] LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, roč. 45, č. 4, s. 999-1007.
- [31] SPOERING, A. L., LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 2001, roč. 183, č. 23, s. 6746-6751.
- [32] CERI, H., OLSON, M. E., STREMICK, C., READ, R. R., MORCK, D., BURET, A. The Calgary biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 1999, roč. 37, č. 6, s. 1771-1776.
- [33] HOLÁ, V., RŮŽIČKA, F., TEJKALOVÁ, R., VOTAVA, M. Stanovení citlivosti k antibiotikům u biofilmopozitivních forem mikroorganismů. *Klin. Mikrobiol. Infekč. Lék.* 2004c, roč. 10, č. 5, s. 218-222
- [34] NEU, T. R. Biofilms: investigative methods and application. *Lancaster: Technomics Publ.* 2000, s. 211-219.

- [35] FREBOURG, N. B., LEFEBVRE, S., BAERT, S., LEMELAND, J. F. PCR: based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, roč. 38, č. 2, s. 877-880.
- [36] HAWSET, S. P., NORRIS, H., JESSUP, C. J., GHANNOUM, M. A. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, roč. 36, č. 5, s. 1450-1452.
- [37] KIERS, P. J., BOS, R., VAN DER MEI, H. C., BUSSCHER, H. J. The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology*. 2001, roč. 147, č. 3, s. 757-762.
- [38] DOBINSKY, S., KIEL, K., ROHDE, H., BARTSCHT, K., KNOBLOCH, J. K., HORSTKOTTE, M. A., MACK, D. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J. Bacteriol.* 2003, roč. 185, č. 9, s. 2879-2886.
- [39] STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-LAHOVIC, M. A modified microtiter: plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 2000, roč. 40, č. 2, s. 175-179.
- [40] BALDASSARRI, L., SIMPSON, W. A., DONELLI, G., CHRISTENSEN, G. D. Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993, roč. 12, č. 11, s. 866-868.
- [41] CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., BISNO, A. L., BEACHEY, E. H. Adherence of slime: producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*. 1982, roč. 37, č. 1, s. 318-326.
- [42] CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., BADDOUR, L. M., BARRETT, F. F., MELTON, D. M., BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical device. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985, roč. 22, č. 6, s. 996-1006.

- [43] SURMAN, S. B., WALKER, J. T., GODDARD, D. T., MORTON, L. H. G., KEEVIL, C. W., WEAVER, W., SKINNER, A., HANSON, K., CALDWELL, D., KURTZ, J. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 1996, roč. 25, č. 1, s. 57-70.
- [44] ZAURA-ARITE, E., VAN MARLE, J., CATE, J. M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J.Dent.Res.* 2001, roč. 80, č. 5, s. 1436-1440.
- [45] YU, F. P., McFETERS, G. A. Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. *J. Microbiol. Methods*. 1994, roč. 20, s. 1-10.
- [46] RŮŽIČKA, F., HOLÁ, V., VOTAVA, M., TEJKALOVÁ, R., HORVATH, R., HEROLDOVÁ, M., WOZNICOVÁ, V. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol.* 2004, roč. 49, č. 5, s. 596-600.
- [47] JAIN, S., CHEN, J. Antibiotic resistance profiles and cell surface components of *Salmonellae*. *J. Food Prot.* 2006, roč. 69, č. 5, s. 1017-1023.
- [48] ČAPLA, J. ZAJÁC, P., VIETORIS, V. BAJZÍK, P. Potravinárstvo: new methodologies for biofilms control in food industry. 2010, roč. 4, č. 3, s. 10-12.
- [49] KRŽIŽOVÁ, P., VOTAVA, M. Epidemiologie. *Česká lékařská společnost J. E. Purkyně*. 2007, roč. 56, č. 1, s. 10-14.
- [50] ČAPLA, J. ZAJÁC, P., VIETORIS, V. BAJZÍK, P. Potravinárstvo. *Vedecký potravinársky časopis*. 2009, č. 1. ISSN 1337-0960.
- [51] CHAVANT, P., GAILLARD, M., HEBRAUD, B. M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *In FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 23, s. 241-248.
- [52] PAP, K., KISKÓ, G. Efficacy of disinfectants against static biofilms on stainless steel surface. *In Acta Alimentaria*. 2008, roč. 37, s. 1-7.
- [53] KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. *In Journal of Food and Nutrition Research*. 2008, roč. 47, s. 100-104

- [54] Směrnice Evropského parlamentu: uvádění biocidních výrobků [online]. Dostupný z WWW: <http://eur-lex.europa.eu/>.
- [55] ČERNOHORSKÁ, L. Tvorba biofilmu u mikrobu izolovaných z klinického materiálu [online]. Dostupný z WWW: <http://www.cuni.cz/>.
- [56] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia, 2004. 364 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [57] SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Grada, 1994. 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4.
- [58] Přednášky: patogenita a virulence bakterií [online]. Dostupné z WWW: <http://biomikro.vscht.cz/documents/hygklinmik/klinika2web.pdf>.
- [59] VOTAVA, M., a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- [60] *Pseudomonas aeruginosa* [online]. Dostupná z WWW: http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/pseudomonas_aeruginosa.php.
- [61] ČAPLA, J., ZAJÁC, P., GOLIAN, J., BAJZÍK, P., ZELENÁKOVÁ, L., VIETORIS, V., KOZELOVÁ, D. Microbial Biofilms Produced by *Pseudomonas fluorescens* on Solid Surfaces. *Potravinářstvo*. 2011, roč. 5, s. 13-15.
- [62] KLOOS, W. E., BANNERMAN, T. L. Staphylococcus and Micrococcus. In *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. 1999, roč. 56, č. 1, s. 264-280.
- [63] VUONG, C., OTTO, M. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes. In fect.* 2002, roč. 4, s. 481-489.
- [64] VON EIFF, C., PETERS, G., HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet. Infect.* 2002, roč. 2, s. 677-685.
- [65] MACK, D., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., ROHDE, H., HORSTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, J. K. Microbial interactions in Staphylococcus epidermidis biofilms. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, roč. 387, s. 399-408.
- [66] YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M. Quorum sensing in Staphylococcus infections. *J. Clin. Invest.* 2003, roč. 112, s. 1620-1625.

- [67] VŠCHT: imunochemická laboratoř [online]. Dostupný z WWW:
http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/listeria_cz.html.
- [68] KOREŇOVÁ, J., ORAVCOVÁ, K. Persistence of *Listeria monocytogenes* Versus Adherence on Solid Surface. *Potravinářstvo*. 2011, roč. 5, s. 41-43.
- [69] Houbovitá struktura biofilmu. Dostupný z WWW:
http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/cermak/klinicka_mikrobiologie-biofilm.pdf
- [70] PESCI, E. C., MILBANK, J. B. J., PEARSON, J. P., McKNIGHT, S., KENDE, A. S., GREENBERG, E. P., IGLEWSKI, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1999, roč. 96, s. 11229-11234.
- [71] Kultivace bakterií tvořící biofilm na agaru s kongo červení. Dostupný z WWW:
atlas.medmicro.info.
- [72] Biofilm *Staphylococcus aureus* na skle a nerezavějící oceli. Dostupný z WWW:
www.scielo.br.
- [73] Tvorba biofilmu na nerezové oceli při teplotě 20 °C po různě dlouhou dobu. *Potravinářstvo: vědecký potravinářský časopis*. 2009, č. 1. ISSN 1337 – 0960.
- [74] Tvorba biofilmu u *Listeria monocytogenes* za 7 dní. Dostupný z WWW:
www1.clermont.inra.fr.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EPS Extracelulární polysacharidová substance.

LPS Lipopolysacharidy.

QS Quorum sensing.

AHL Acylhomoserinlaktón.

MIC Minimální inhibiční koncentrace.

MBC Minimální baktericidní koncentrace.

PE Polystyren.

Agr Genový regulátor.

AI-2 Autoinduktor 2.

AMK Aminokyseliny.

TSB Trypton-sojový bujón.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Houbovitá struktura biofilmu [69].....	16
Obrázek 2. Chemická struktura signálních molekul [70].....	19
Obrázek 3. Kultivace bakterií tvořící biofilm na agaru s kongo červení [71].....	24
Obrázek 4. Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> na skle a nerezavějící oceli [72].....	25
Obrázek 5. Tvorba biofilmu na nerezové oceli při teplotě 20°C [73].....	27
Obrázek 6. Tvorba biofilmu u <i>Listeria monocytogenes</i> za 7 dní [74].....	39

