

Vliv laktobacilů na biofilm pozitivní bakterie

Veronika Pirochtová

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Pirochtová**
Osobní číslo: **T20358**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vliv laktobacilů na biofilm pozitivní bakterie**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se při tvorbě biofilmů.

Biofilm.

II. Praktická část

Kultivační metody pro stanovení biofilm pozitivních bakterií.

Vliv laktobacilů na tvorbu biofilmů.

Vyhodnocení a zpracování výsledků.

Diskuze a formulace závěrů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] A.N. Ramos, M.E. Sesto Cabral, M.E. Arena, C.F. Arrighi, A.A. Arroyo Aguilar, J.C. Valdez, Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharmaceutical Biology*, 53 (3) (2015), pp. 350-358
- [2] F.A. Sadiq, S. Flint, L. Yuan, Y. Li, T. Liu, G. He. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 262 (2017), pp. 89-98
- [3] HE, Yuanhui, Risu NA, Xiaoxi NIU, Bingbing XIAO a Huixia YANG. *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* Affect Various Stages of Gardnerella Species Biofilm Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, 11. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.568178
- [4] ISHIKAWA, Karin H., Manuela R. BUENO, Dione KAWAMOTO, Maria R. L. SIMIONATO a Marcia P. A. MAYER. Lactobacilli postbiotics reduce biofilm formation and alter transcription of virulence genes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular Oral Microbiology*. 2021, 36(1), 92-102. ISSN 2041-1006. Dostupné z: doi:10.1111/omi.12330

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavel Pleva, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Biofilm vzniká přichycením mikroorganismů k povrchu a následnou tvorbou komplexního společenstva. Některé laktobacily produkují bakteriociny, které mohou biofilm inhibovat. Teoretická část pojednává o testovaných bakteriích včetně laktobacilů, tvorbě biofilmu a bakteriocinech. Cílem praktické části bylo zjistit vliv laktobacilů na biofilm pozitivní bakterie. Podle výsledků pilotní studie bylo vybráno pět laktobacilů, u nichž byl testován vliv na růst biofilmu u biofilm pozitivních bakterií. Tvorba biofilmu *Bacillus subtilis* CCM 2216 byla inhibována všemi laktobacily vyjma *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832. V případě *Staphylococcus aureus* CCM 885 došlo k omezení růstu biofilmu vlivem *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 196, *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 198 a *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422. U *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 byl růst biofilmu inhibován všemi laktobacily. V pilotní studii byl zkoumán vliv bakteriocinů a jejich antimikrobiální aktivita na vybrané laktobacily a bakterie. Studii bylo zjištěno, že největší účinnost bakteriocinů mezi laktobacily měl kmen *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717. Oproti tomu kmen *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 375 a kmen *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 381 neprokázaly inhibici u žádného testovaného laktobacilu. Na sledovaných biofilm pozitivních bakteriích, *Bacillus subtilis* CCM 2216 a *Staphylococcus aureus* CCM 885, byly antibakteriální a antibiofilm účinky prokázány všemi laktobacily vyjma *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717. *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 byla inhibována pouze kmenem *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832.

Klíčová slova: biofilm, bakteriociny, laktobacily, bakterie, inhibice

ABSTRACT

Biofilm is formed by the attachment of microorganisms to the surface and the subsequent formation of a complex community. Some lactobacilli produce bacteriocins that can inhibit the biofilm. The theoretical section discusses the tested bacteria including lactobacilli, biofilm formation and bacteriocins. The aim of the practical part was to investigate the effect of lactobacilli on biofilm positive bacteria. According to the results of the pilot study, five lactobacilli were selected and tested for their effect on biofilm growth in biofilm positive bacteria. Biofilm formation by *Bacillus subtilis* CCM 2216 was inhibited by all lactobacilli except *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832. For *Staphylococcus aureus* CCM 885, biofilm growth was inhibited by *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 196, *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 and *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422. For *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640, biofilm growth was inhibited by all lactobacilli. The effect of bacteriocins and their antimicrobial activity on selected lactobacilli and bacteria was investigated in a pilot study. The study found that *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717 had the highest bacteriocin efficiency among lactobacilli. In contrast, *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 375 and *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 381 did not show inhibition in any of the tested lactobacilli. On the tested biofilm positive bacteria, *Bacillus subtilis* CCM 2216 and *Staphylococcus aureus* CCM 885, antibacterial and antibiofilm effects were proven by all lactobacilli except *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717. *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 was inhibited only by *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832.

Keywords: biofilm, bacteriocins, lactobacillus, bacteria, inhibition

Poděkování patří mému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlovi Plevovi Ph.D. za vedení, konzultace a pomoc během praktické i teoretické části. Dále bych chtěla poděkovat paním laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za rady a trpělivost během praktické části práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE PŘI TVORBĚ BIOFILMŮ.....	11
1.1 <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	11
1.2 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	12
1.3 <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i>	12
1.4 LAKTOBACILY	13
2 BIOFILM	14
2.1 HISTORIE BIOFILMU	14
2.2 KOLONIZACE POVRCHU A VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOFILMU	15
2.3 TVORBA BIOFILMU	16
3 BAKTERIOCINY	19
3.1 BAKTERIOCINY/LANTIBIOTIKA TŘÍDY I.	20
3.2 BAKTERIOCINY TŘÍDY II.....	20
3.3 BAKTERIOCINY TŘÍDY III.	21
3.4 BAKTERIOCINY TŘÍDY IV.	21
3.5 VÝZNAM BAKTERIOCINŮ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU.....	21
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	22
4 MATERIÁL	23
4.1 POUŽITÉ MIKROORGANISMY	23
4.2 CHEMIKÁLIE.....	23
4.3 POMŮCKY.....	24
5 METODIKA PRÁCE.....	25
5.1 DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI BAKTERIOCINŮ.....	25
5.2 VLIV BAKTERIOCINŮ NA BIOFILM	26
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	27
6.1 RŮSTOVÁ KŘIVKA LAKTOBACILŮ	27
6.2 PŘÍTOMNOST BAKTERIOCINŮ.....	28
6.3 VLIV BAKTERIOCINŮ NA BIOFILM	32
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	43
SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	44

ÚVOD

Bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Teoretická část je věnována testovaným bakteriím, biofilmu a bakteriocinům. Praktická část je rozdělena na pilotní studii, která se soustředí na vliv laktobacilů na růst sledovaných patogenních bakterií i jiných kmenů laktobacilů. Hlavním cílem praktické části bakalářské práce je sledování vlivu laktobacilů na produkci biofilmu u patogenních bakterií. Vliv na biofilmy byl sledován na třech bakteriích tvořící biofilm, jedná se o *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Staphylococcus aureus* CCM 885, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 a vybrané laktobacily.

Biofilm je tvořen velkým množstvím gramnegativních i grampozitivních bakterií. Jedná se o komplexní bakteriální společenstvo, u kterého dochází ke vzájemné komunikaci mezi bakteriemi a navýšení rezistivity vůči nepříznivým vlivům okolí. Biofilmy mohou mít pozitivní i negativní charakter. V přírodě mají přínosnou roli v ekosystémech a v potravinářském průmyslu byly mikrobiální biofilmy shledány užitečnými při fermentaci potravin. [16] Pokud jde o technologické mikroorganismy, jejich využití se našlo i v mnoha dalších průmyslových odvětvích [13]. Negativní dopad tvorby biofilmu se projevuje u patogenních mikroorganismů, které jsou rezistentní vůči antibiotikům a znesnadňují léčbu [17]. Součástí práce je produkce bakteriocinů laktobacily, jejichž působení bylo testováno na laktobacilech i na bakteriích zmíněných výše.

Bakteriociny jsou bílkovinné toxiny s antimikrobiální aktivitou o daných koncentracích, jejichž producenty jsou bakterie a některá archea. Inhibují růst podobných nebo blízce příbuzných bakteriálních kmenů, čímž se liší od antibiotik, které působí na bakterie širšího spektra. Jejich uplatnění nalezneme v potravinářském průmyslu, kde mohou nahradit chemické konzervační látky, zabránit bakteriální kontaminaci a kažení potravin. Dále se používají i v zemědělství a léčivech, které cílí na specifické bakteriální patogeny. [24]

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE PŘI TVORBĚ BIOFILMŮ

V následující podkapitolách jsou zmíněny bakterie námi studované v souvislosti s biofilmem. Je zde popsána charakteristika *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* a laktobacilů.

1.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je grampozitivní nepatogenní bakterie tvořící spory za nepříznivých podmínek. Pokud nastanou nepříznivé podmínky jako nedostatek živin nebo špatný vliv prostředí, mohou bakterie diferenciovat a přizpůsobovat se vnějšímu prostředí. Diferenciace bakteriálních buněk je důležitým procesem při tvorbě bakteriálního biofilmu. Během přizpůsobování se diferenciací vytvoří nové, fenotypově odlišné buněčné typy bakterií. Pokud nastane diferenciace, u mnohobuněčných společenstev dojde ke koexistenci buněk odlišných typů, vzájemné spolupráci a většímu přizpůsobení se okolí. Dále můžeme pozorovat přeměnu minoritní populace buněk na kompetentní buňky. Děj probíhá ve stacionární fázi růstu a jedná se o navýšení genetické rozmanitosti připojením volné DNA z prostředí. *Bacillus subtilis* má také schopnost rezistence vůči stresům prostředí, pokud se diferencuje na dormantní spory. K jejich diferenciaci jsou zapotřebí sporulační kinázy, které přijímají signály o stavu živin, pokud má bakterie nedostatečné množství živin začne tvořit spory. Jestliže dojde k vytvoření složitého mnohobuněčného společenstva mikrobiálních buněk obalených maticí, pojednáváme o biofilmu. Bakterie jsou schopné samotvorby matrice. [1]

Bacillus subtilis má zastoupení v několika průmyslových aplikacích, při výrobě hydrolytických látek, enzymů, využívá se i jako probiotikum [3] a při fermentaci potravin. Fermentovanou potravinou je například sýru zvaném Natto, jde o fermentativní zpracování sójových bobů pomocí *Bacillus subtilis* [2].

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie z rodu stafylokoků, která se tvarově řadí mezi koky. Jedná se o významný lidský patogen, jehož vlastnosti podporují jeho rozvoj v různých klinických situacích jako je bakteriémie, infekce kůže a měkkých tkání, nekrotizující pneumonie, cystická fibróza a infekce spojené s přístroji. Může být přítomen v mase a způsobovat mastitidu skotu, což je zánět mléčných žláz. Jeho důsledkem jsou ztráty v mlékárenském průmyslu [4].

Staphylococcus aureus tvoří biofilm (viz kapitola 2) proti obrannému a eradikačnímu opatření hostitele. Život v biofilmu představuje velkou výhodu pro perzistenci během chronických onemocnění [5, 6]. Pro zajištění dostatečné efektivity léčby se využívají opatření proti tvorbě biofilmu a snížení rezistivity buněk [7].

V potravinářském průmyslu je jeho přítomnost nežádoucí, produkuje enterotoxin, kterým kontaminuje jídlo, důsledkem jsou otravy potravinami. Enterotoxiny jsou bílkoviny s vysokou tolerancí k denaturaci a mohou si zachovat svoji aktivitu, i když je vegetativní forma bakterie inaktivována během zpracování potravin [8].

1.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia je aerobní nefermentující gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru všudypřítomná v přírodním prostředí včetně sladkovodních zdrojů, v půdním i rostlinném mikrobiomu [11]. Její přítomnost byla identifikována i na povrchu biomateriálů používaných v protetických pomůckách, vodovodních linkách zubních přístrojů a nebulizátorech. *Stenotrophomonas maltophilia* je patogenní mikroorganismus způsobující řadu onemocnění. Typicky jde o chronické respirační infekce, akutní a chronické pneumonie, meningitidy, endokarditidy, infekce ran a krevního řečiště, zejména u imunokompromitovaných osob [10].

Jedná se o biofilm pozitivní bakterii (viz kapitola 2), čímž se stává vysoce antimikrobiálně rezistentní. Při tvorbě biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* upřednostňuje jako zdroj uhlíku aminokyseliny namísto glukózy. Uhlík je prostřednictvím glukoneogeneze přesouván z aminokyseliny na nedefinovanou metabolickou dráhu a podporuje tak její růst. Tvorba biofilmu závisí i na mnoha genech, například gen *spgM* kóduje bifunkční enzym s fosfoglukomutázovou i fosfomannomutázovou aktivitou,

který se podílí na biosyntéze lipopolysacharidů (LPS) a hraje při tvorbě biofilmu důležitou roli [9].

V případě potravinářského průmyslu je *Stenotrophomonas maltophilia* patogen způsobující ekonomické ztráty při produkci mléka a zhoršuje kvalitu mléčných výrobků. Objevuje se ve zmrzlínách, v nepasterizované smetaně, v sýrech a másle. *Stenotrophomonas maltophilia* je poměrně odolná bakterie, dokáže vyvinout adaptivní strategii, což jí umožňuje přežít některé konzervační podmínky [12].

1.4 Laktobacily

Rod *Lactobacillus* zahrnuje grampozitivní fermentativní fakultativně anaerobní a nesporulující mikroorganismy. Laktobacily jsou řazeny do třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeledi *Lactobacillaceae*, která obsahuje 24 rodů, [39] mezi něž se řadí například *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* a *Pediococcus*. Nejbližšími příbuznými na úrovni čeledi jsou *Leuconostocaceae* [37]. Laktobacily jsou důležité technologické mikroorganismy, řadí se mezi bakterie mléčného kvašení a jsou nedílnou součástí při výrobě některých mléčných, masných, cereálních, ovocných i zeleninových produktů. Vykazují pozitivní vliv na zdraví člověka, a proto jsou využívány jako probiotikum [13]. Jsou hlavní složkou při fermentaci potravin a nápojů. Fermentace zajistí prodloužení trvanlivosti výrobku, zlepšuje stravitelnost, chuť a potlačuje růst nežádoucích mikroorganismů. Také jsou tímto způsobem dodávány probiotika do lidských střev, výsledkem je dobrá výživová hodnota potravin a nápojů [14].

2 BIOFILM

Bakterie jsou mikroskopické buňky žijící samostatně v planktonní formě, avšak mnoho z nich dokáže vytvářet biofilm, což je komunitní stav, kdy buňky sdílejí zdroje a jsou chráněny před škodlivými podmínkami [15]. Tvorbu biofilmu lze u mikroorganismů považovat za fázi života. Nastává přichycením mikroorganismů k povrchu a následuje vznik komplexních bakteriálních společenstev. Mezi bakteriemi dochází ke vzájemné komunikaci a navýšení rezistivity vůči nepříznivým vlivům okolí [16].

Biofilm může mít pozitivní i negativní dopad, osídluje přírodní i umělé povrchy. V přírodě se bakterie vyskytují převážně v biofilmu, což může mít příznivý vliv na podporu růstu rostlin, rozklad organických sloučenin, i na vodní ekosystémy. Kromě toho byly mikrobiální biofilmy shledány užitečnými při výrobě mnoha biologických materiálů, čištění odpadních vod, mikrobiálních palivových článků a fermentaci potravin. V případě, že se jedná o bakterie pro fermentaci žádoucí, může dojít k urychlení procesu fermentace a lepším senzorkým hodnotám výsledného produktu [16]. Tvorby biofilmu jsou schopné i probiotické laktobacily. Jedním z důvodů je ochrana před stresem z vnějšího prostředí, dále podporují tvorbu kolonií v biotických i abiotických podmínkách a populační změny. Aby došlo k tvorbě biofilmu v trávícím systému, bakterie se musí přichytit na epiteliální buňky a zůstat uchycený dostatečně dlouho, aby mohlo dojít ke stabilizaci bakterií na epiteliálních buňkách. Dané buňky brání kompetitivnímu uchycení patogenních bakterií a tvorbě biofilmu, také mohou stimulovat imunitní systém hostitele [19].

Pokud budeme hovořit o nechtěném výskytu biofilmu, který může mít negativní dopad na zdraví člověka, lze ho najít v podobě patogenních bakterií na lékařských implantátech, živých tkáních, vodních kanálech, potrubí, nemocničních podlahách, potravinářských zařízeních a dalších biotických i abiotických površích [16, 17].

2.1 Historie biofilmu

Objev bakteriálního biofilmu řadíme do 17. století. Holandský vědec Antoni van Leeuwenhoek, jenž je považován za otce mikrobiologie, v roce 1663 poukázal na přítomnost bakterií *animalcules*, které popsal jako malé živočichy vyskytující se na povrchu zubů. Aby mohl zkoumat zubní plak, vyvinul řadu čoček, pomocí kterých mikroorganismy pozoroval. To vedlo k sestavení prvního mikroskopu a tím byly položeny základy moderních vědeckých poznatků mikrobiologie. Antoni van Leeuwenhoek provedl řadu studií zubního plaku a byl první, kdo pozoroval jevy rezistence mikroorganismů v biofilmu [18].

Mikroorganismy pozorovali i současníci Antonia van Leeuwenhoeka. Významné poznatky uvedl Robert Hooke, který pro mikroorganismy poprvé použil termín „buňka“ a vytvořil etiologický základ. Roku 1878 vyvinul několik metod k získání patogenních mikroorganismů v čisté kultuře a došel k poznání, že určité mikroorganismy mohou být původci onemocnění u zvířat i lidí [18].

V 70. let 20. století William Bill objevil, že mikroorganismy preferují růst v biofilmu neboli povrchově vázané a tvořící společenstva, tím vyvrátil domněnku o jejich převážném růstu v suspenzi [18].

Biofilmem se dále zabýval John William Costerton. Během bádání pozoroval populaci bakterií spojených slizem na dně vod v horském potoce. Došel k závěru, že sliz obsahuje velké množství bakterií zapletených do rozsáhlé vláknité matrice podporující vznik mikrokolonií. Ty jsou ukotveny k povrchu a tvoří funkční společenstva, v nichž většina přisedlých bakterií žije. John William Costerton zavedl termín biofilm a následně založil Centrum pro inženýrství biofilmu, kde byly provedeny rozsáhlé výzkumy s cílem pochopit vývoj biofilmu, vlastnosti biofilmu a jeho důsledky na lidské zdraví a nemoci [18, 19].

2.2 Kolonizace povrchu a vnější faktory ovlivňující tvorbu biofilmu

Samotný vznik biofilmu je složitý proces, který je závislý na mnoha faktorech. Bakterie žijící volně v planktonní formě přechází do sedimentární formy tvořící biofilm. Tato změna stylu života závisí na tom, jak jednotlivé druhy mikroorganismů reagují na určité podmínky prostředí. Mezi podstatné faktory patří dostupnost živin, produkce určitých chemických spouštěčů a také buněčné parametry, kterými jsou například koncentrace bakterií, rychlost proliferace nebo difuzní chování [15, 20].

Na celý proces tvorby biofilmu mají také velký vliv vnější podmínky. Důležitá je interakce mezi bakteriální buňkou, okolním prostředím, povrchovou vazbou a celkovou dobou kontaktu. Typ povrchu hraje roli při adhezi a určuje obtížnost přilnutí bakterií k povrchu. Lze hovořit o drsnosti, čistotě a smáčivosti, která je určována hydrofobností. Mezi důležité povrchové vlastnosti bakteriálních buněk lze řadit fyzikální, chemické vlastnosti buněk a elektrický náboj povrchu buněk. Uchycení bakterií závisí na povrchu buňky, zda má pili, bičíky či povrchové polysacharidy [15].

Dalším faktorem je prostředí, kde je podstatné pH povrchu, živiny, teplota, iontové síly, hydrodynamické podmínky prostředí, fyzikální a chemické vlastnosti. Posledním zmíněným bodem je doba kontaktu mezi bakteriemi a povrchem. [15]

2.3 Tvorba biofilmu

Biofilm je tvořen stupňovitě, nejprve dojde k adhezi planktonu k povrchu. Rozlišuje se reverzibilní a ireverzibilní přichycení. Zpočátku se mikroorganismy nachází volně a reverzibilně přichycené k povrchu, jakmile dojde ke změně orientace, mikroorganismy se na povrch přilnou naplocho, nastane ireverzibilní přichycení. Zvýší se odolnost vůči mnoha fyzikálním faktorům, které znemožňují tvorbu biofilmu [17].

Důležitou signální molekulou je intracelulární Bis-(3'-5')-cyklický dimerický guanosinmonofosfát (c-di-GMP), ten je zodpovědný za obtížnější pohyblivost bičíků, a tím dojde k větší produkci biofilmového matrix. Mikrobiální povrch obsahuje systém zvaný Pil-Chp, který ovlivňuje množství produkce c-di-GMP. Bakterie s nízkou koncentrací c-di-GMP k povrchu po jejich setkání nepřilnou, bakterie s vysokou koncentrací c-di-GMP, které se setkaly s povrchem na něj přilnou [15, 20]. Další důležitou látkou je extracelulární polymerní matrix (EPM) produkována bakteriemi. Dopomáhá přichycení mikrobů k povrchu, stabilizuje trojrozměrnou strukturu biofilmu, seskupuje buňky, chrání před různými stresy jako je reakce imunitního systému hostitele, antimikrobiální látky, oxidační poškození a kovové kationty. Také zapouzdřuje signální molekuly potřebné pro quorum sensing, metabolické produkty a enzymy [21].

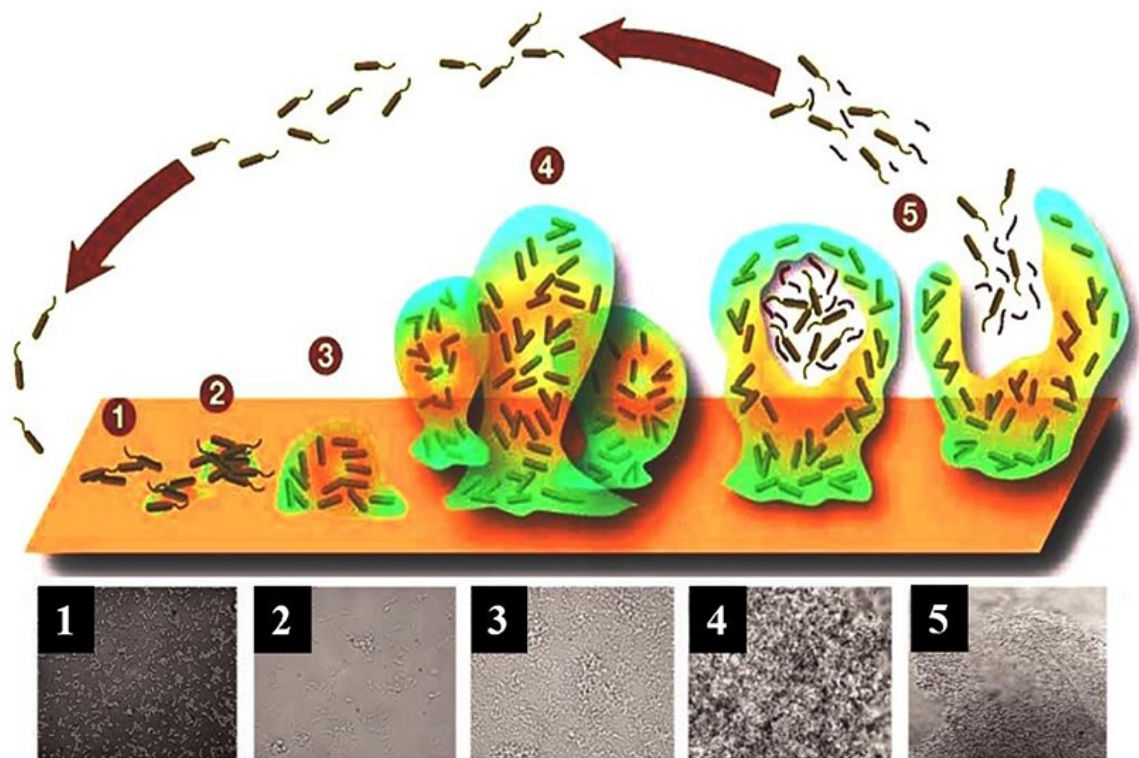
EPS spojené s biofilmem se skládají z různých typů kationtových a aniontových molekul, jako jsou glykoproteiny, glykolipidy a proteiny, které se mohou vázat s antimikrobiálními látkami, a poskytovat tak útočiště mikrobiálním druhům. Povlak vytvořený EPS chrání bakteriální buňky před antibiotiky, čímž zvyšuje toleranci bakterií vůči léčivům. Většina matrice biofilmu se skládá z extracelulárních polysacharidů, které se síťují s eDNA, čímž stabilizují strukturu biofilmu. K rozvoji rezistence vůči léčivům dochází především díky přítomnosti e-DNA, protože se může snadno vstřebat do bakterie, tím podporuje komunikaci DNA [21].

Mikroorganismy se po adhezi na povrch množí a shromažďují v dané extracelulární polymerní matrix (EPM), vznikají mikrokolonie, ty mají během svého zrání specifické složení, tvar a architekturu. U zralého biofilmu lze pozorovat strukturu ve tvaru „houby“ nebo „věže“, to záleží na aero-toleranci a rychlosti metabolismu [17].

Celkové zrání biofilmu je zprostředkováno mechanismem Quorum sensing, který závisí na produkci autoinduktoru, což je chemická signální molekula. Rozlišují se dvě hlavní příčiny, proč koncentrace autoinduktorů zůstává pod prahovou hodnotou potřebnou pro tvorbu biofilmu. V prvním případě jsou živiny spotřebovávány tak vysokou rychlostí, že autoinduktory jsou produkovány bakteriemi v omezeném množství a na vytvoření autoinduktorů není dostatek času. Ve druhém případě bakterie difundují, a proto se rozptylují ve zvýšené míře, příčinou mohou být vnější podmínky, to omezuje akumulaci autoinduktorů na jednom místě. Byl vytipován i třetí faktor, jedná se o poměr mezi dobou nutnou ke spotřebě živin a dobou potřebnou k produkci autoinduktorů, zmíněný poměr ovlivní, jak rychle se biofilm vytvoří a jak velký bude. V případě většího poměru mezi těmito časovými měřítky dochází k rychlejšímu růstu biofilmu v opačném případě, kdy je poměr menší, tvorba biofilmu se zpomaluje. Na základě již zmíněných tří parametrů, čímž byla spotřeba živin, rozptyl bakterií a poměr časového měřítka spotřeby k produkci, lze určit rozvoj biofilmu jednotlivých druhů. [15]

Po dostatečném nárůstu zralý biofilm vytvoří třívrstvou strukturu rozdělenou na vnitřní regulační vrstvu, střední mikrobiální bazální vrstvu a vnější vrstvu osídlenou planktonní formou mikroorganismů, které jsou připraveny biofilm opustit prasknutím. U zralého biofilmu lze rozlišovat prasknutí aktivní, které je závislé na motilitě a degradaci EPS, či prasknutí pasivní, to souvisí s fyzikálními vlivy. Dojde k rozptýlení biofilmu a cyklus se opakuje znovu [17].

Mezi faktory zodpovědné za disperzi zralého biofilmu řadíme především přerostlou populaci, nedostatek živin, působení enzymů, změny podmínek prostředí jako je teplota, nedostatek kyslíku a akumulace metabolitů. Zralý biofilm je heterogenní směs planktonních (zelených bičíkatých), přisedlých (zelených), trvalých (hnědých) a mrtvých (černých) buněk, vodních kanálek a různých typů signálních a stabilizačních molekul, jako jsou acyl-homoserinové laktony (AHL), lipidy, polysacharidy, proteiny, extracelulární DNA (eDNA) [17].



Obrázek 1: Přehled tvorby biofilmu v několika zásadních fázích [22].

3 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou multifunkční, ribozomálně syntetizované proteiny nebo krátké polypeptidy, jedná se o bílkovinné toxiny s výraznou antimikrobiální a antibiofilm aktivitou o daných koncentracích, jejichž producenty jsou bakterie a některá archea [24, 26].

Účelem tvorby bakteriocinů je inhibice růstu nebo změn metabolických projevů (biofilm) podobných nebo blízké příbuzných bakteriálních kmenů, čímž se liší od antibiotik, které působí na bakterie širšího spektra. Pokud se pozastavíme u porovnání těchto dvou látek, je potřeba zmínit jejich odlišnou výrobu, bakteriociny jsou ribozomálně syntetizovány, zatím co antibiotika se vyrábí pomocí více enzymových komplexů. Bakteriociny jsou účinnější než antibiotika při nižších koncentracích, pokud se jedná o jejich cílové bakterie. Za přirozenější lze považovat bakteriociny, a to kvůli předpokladu jejich přítomnosti v potravinách běžně konzumovaných už od starověku. Jsou inaktivovány enzymy, které jsou v gastrointestinálním traktu, jedná se o trypsin a pepsin, díky tomu se nemění mikrobiota trávícího traktu [24].

Všechny živé organismy mohou produkovat antimikrobiální peptidy (AMP), to jsou proteiny specifické imunity tvořené hostitelskými buňkami, tudíž producent je vůči jejich AMP odolný. Bakterie produkují dva typy AMP, prvním typem jsou ty, které jsou syntetizovány ribozomy (nazývané bakteriociny), druhý typ tvoří AMP, které nejsou syntetizovány ribozomy, nemají strukturální geny kódující dané AMP. Strukturální geny kódující produkci bakteriocinů, soubor imunitních proteinů a další pomocné proteiny jsou organizovány do operonů, které jsou umístěny v kruhovém chromozomu, plazmidech nebo jiných mobilních genetických elementech. Bakteriociny inhibují růst cílových organismů působením na buněčnou stěnu, také ovlivňují genovou expresi a produkci proteinů v buňkách [25, 26].

Mezi přínosné vlastnosti bakteriocinů se řadí přirozená tolerance k vysokým teplotám a aktivita v širokém rozsahu pH. Jejich antimikrobiální peptidy jsou bezbarvé, bez zápachu a bez chuti, to usnadňuje jejich potenciální použitelnost. Díky bílkovinné povaze snadno dochází k degradaci proteolytickými enzymy, to má za následek krátkou životnost bakteriocinů v lidském těle. Bakteriociny mohou inhibovat quorum sensing [40]. Jejich využití lze nalézt ve více oborech, a to v potravinářském průmyslu, v živočišné výrobě, zemědělství, v léčivech, které cílí na specifické bakteriální patogeny [24].

Stále se objevují nové typy sloučenin bakteriocinů a noví producenti, proto se jejich klasifikace neustále mění. Jedna z možností rozdělení bakteriocinů do tříd je na základě jejich strukturních a fyzikálně-chemických vlastností, lze ale říct, že třída I-III zahrnuje bakteriociny produkované převážně grampozitivními bakteriemi, zatímco bakteriociny a mikrocinů třídy IV jsou produkovány gramnegativními bakteriemi [24, 25].

3.1 Bakteriociny/lantibiotika třídy I.

Zde jsou řazeny malé peptidy s molekulovou hmotností ≤ 10 kDa, které jsou tepelně stabilní. Lze je dělit do podtříd podle typu posttranslačních modifikací, které se v peptidu nacházejí. Dnes nejprozkoumanější a nejrozsáhlejší podtřída obsahuje lantibiotika, které jsou dle rozdílného náboje děleny na dva typy. Jedním z nich je typ A, kam je řazen nisin (potravinový konzervant E234) a lakticin. Jedná se o šroubovitě, pružné molekuly s kladným nábojem, tvoří póry v buněčné membráně cílového organismu, to vede k depolarizaci cytoplazmy daného druhu. Druhým typem jsou lantibiotika typu B, které mají negativní nebo nulový náboj, jsou globulárního tvaru a zasahují do buněčných enzymatických reakcí. Dále jsou řazeny mezi bakteriociny třídy I. sactibiotica, glykociny (glykosylované bakteriociny), peptidy obsahující nukleotidy a siderofory, lasopeptidy, lineární peptidy, linaridiny, thiopeptidy, botromyciny, cyanobaktiny a N-C-cyklické peptidy. [24, 27]

3.2 Bakteriociny třídy II.

Jedná se o nemodifikované peptidy s molekulovou hmotností ≤ 10 kDa, přičemž struktury některých peptidů jsou stabilizovány jednou nebo více disulfidickými vazbami. Bakteriociny třídy II. se nadále dělí do čtyř podtříd IIa, IIb, IIc, IId a to podle strukturních podobností a mechanismů účinku. Do třídy IIa se řadí peptidy podobné pediocinu obsahující konzervovanou N-koncovou sekvenci Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Třída IIb obsahuje nemodifikované dvousložkové bakteriociny s maximální aktivitou, pokud jde o koordinovanou interakci dvou peptidů (α a β). U třídy IIc byla udělána změna, původně zahrnovala N-C-cyklické peptidy, nyní obsahuje bakteriociny syntetizované bez N-koncové sekvence. Třída IId sdružuje všechny ostatní jednopeptidové nemodifikované bakteriociny včetně nemodifikovaných mikrocinů z gramnegativních bakterií. Bakteriociny řazené do třídy IId byly ve většině případů izolovány z bakteriálních rodů: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* a *Carnobacterium*. Producenti se vyskytují také mezi kmeny *Corynebacterium*,

Brevibacillus, Leuconostoc, Weissella, Staphylococcus, Bacillus, Listeria, Clostridium, Brochothrix, Myxococcus. [24, 27]

3.3 Bakteriociny třídy III.

Zde se řadí velké tepelně labilní proteiny s molekulovou hmotností ≥ 10 kDa, dále se dělí na dvě podtřídy: bakteriolyziny, jde o enzymy schopné rozkládat peptidoglykan bakteriální buněčné stěny, a nelytické bakteriociny, které nezpůsobují současnou lýzu buněk a uplatňují jiné mechanismy účinku, včetně inhibice transportu sacharidů, biosyntézy DNA nebo proteinů [27].

3.4 Bakteriociny třídy IV.

Jde o velké proteiny s molekulovou hmotností ≥ 30 kDa produkované převážně gramnegativními bakteriemi, jako jsou koliciny produkované většinou kmenů *Escherichia coli*, kolicinu podobné bakteriociny produkované jinými gramnegativními bakteriemi a tailociny produkované některými gramnegativními a grampozitivními bakteriemi, které se strukturně podobají „ocasů“ bakteriofágů [27].

3.5 Význam bakteriocinů v potravinářském průmyslu

Produkty bakteriocinů, tedy antimikrobiální peptidy, mohou být alternativa k použití chemických konzervačních látek v potravinářských produktech. Purifikované antimikrobiální peptidy přidané do matrice potravin interagují s jednotlivými složkami, tím se docílí snížení antimikrobiální aktivity. To zabraňuje bakteriální kontaminaci a kažení potravin. [28] Některé bakteriociny (např. nisin) jsou legislativně schváleny a využívají se jako konzervační látky, podle nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1332/2008 [23].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL

4.1 Použité mikroorganismy

Při testování vlivu bakteriocinů na biofilm byly použité biofilm pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 a *Staphylococcus aureus* CCM 885. Produkce bakteriocinu byla sledována u těchto kmenů:

- *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 181,
- *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 196,
- *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 198,
- *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 199,
- *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 375,
- *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 381
- *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422,
- *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717,
- *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832.

4.2 Chemikálie

V experimentu byly použité kultivační média a chemikálie:

- MRS agar, bujón (de Man, Rogosa and Sharpe, Indie),
- BHI (Brain Heart Infusion, Indie),
- Glukóza (MERK, Darmstadt, Německo),
- Chloroform ((Lach-Ner, s.r.o., Česká republika),
- Pufř $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M (Fosfa a.s., Břeclav, Česká republika),
- NaOH (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika).

4.3 Pomůcky

Během experimentu byly použity:

- Petriho misky; sterilní zkumavky; endorfy; sterilní špičky; jednorázové očkovací kličky; sterilní mikrotitrační destičky (P-Lab, Česká republika); filtr velikosti 0,2 μm (Ahlstrom ReliaPrepTM); stříkačka.

Dále byly použity přístroje:

- Analytické váhy (KERN, Česká republika);
- Osobního bioreaktoru RTS – 1C (Biosan, Lotyšsko);
- Automatické pipety (Biohit, Švýcarsko);
- Multifokální pipeta (Biohit, Švýcarsko);
- Centrifuga Mr 23i (Jouan, Francie);
- pH metr InoLab pH 720 (WTW, Německo);
- Denzitometr McFarland typ DEN-1 (Erba Lachema, Česká republika);
- Vortex IKA MS3 basic (IKA, Německo);
- Autokláv Systec 2540 EL (Systec, Linden, Německo);
- Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Trading AG, Švýcarsko);
- Termostat (iBioTech, Česká republika);
- Biohazard box EUROFLOW (Schoeller, Česká republika);
- Exsikátor s $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (ČSN SIMEX, Česká republika).

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Důkaz přítomnosti bakteriocinů

Před sledováním vlivu antimikrobních a biofilm potlačujících látek, produkovaných laktobacily, bylo zkoumáno, jak moc se změní pH bakterií vlivem metabolismu laktobacilů. Na test byl využit CCDM 832, který byl očkovan do 6 zkumavek s MRS bujónem a kultivován 24 hodin v anaerobním prostředí při 30 °C. Narostlý *Lactobacillus* se odstředil a po následné filtraci se pracovalo pouze s jeho metabolity v tekutině.

Byly připraveny dva typy BHI soft agaru, první typ byl BHI soft agar rozpuštěný v destilované vodě, v druhém případě se destilovaná voda nahradila puftrem $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M. Bakterie *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640, *Staphylococcus aureus* CCM 885 byly zaočkovány do obou typů BHI soft agaru, přepipetovány do zkumavek s MRS bujónem a CCDM 832. Kultivace proběhla 24 hodin v aerobním prostředí při 37 °C u *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 a *Staphylococcus aureus* CCM 885. *Bacillus subtilis* CCM 2216 byl kultivován v 30 °C. Po nárůstu bakterií bylo měřeno pH. Na základě výsledků byl pro testování bakteriocinů působících na bakterie použit BHI soft agar s puftrem $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M.

Přítomnost bakteriocinů byla zkoumána u sbírkových kmenů CCDM 181, CCDM 196, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 422, CCDM 717, CCDM 832. Zmíněné laktobacily byly očkovány vpichem do MRS agaru obohaceného 0,01 % cysteinu tak, že v jedné misce bylo 9 vpichů. Misky s živnou půdou a laktobacily byly kultivovány za anaerobních podmínek v exikátoru při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Po nárůstu laktobacilů došlo k usmrcení mikroorganismů chloroformem, kterého byly odpipetovány 2 ml do víček Petriho misek, páry chloroformu působily 30 minut, dalších 20 minut se nechaly misky otevřené, aby byl chloroform vyvětrán. MRS soft agar byl rozpipetován po 4 ml do zkumavek a jednotlivé zkumavky byly očkovány 400 μl CCDM 181, CCDM 196, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 422, CCDM 717, CCDM 832. BHI soft agar s puftrem $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M byl také pipetovány po 4 ml a zaočkovány 400 μl *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640, *Staphylococcus aureus* CCM 885. Soft agary s danými mikroorganismy byly přelity na MRS půdy s 9 již zmíněnými laktobacily očkovány vpichem. Misky s laktobacily byly kultivovány za anaerobních podmínek při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin, misky s bakteriemi byly kultivovány aerobně 24 hodin při teplotě 37 °C v případě

Staphylococcus aureus a *Stenotrophomonas maltophilia* a při 30 °C byl kultivován *Bacillus subtilis*. Cílem bylo získat inhibiční zóny.

5.2 Vliv bakteriocinů na biofilm

V hlavní části experimentu se pracovalo s kmeny CCDM 196, CCDM 198, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 832, ty byly očkovány po 50 µl do 40 ml MRS bujónu a dány do osobního bioreaktoru RTS – 1C (Biosan, Lotyšsko), kde byla nastavená teplota kultivace na 30 °C, RPM 0, interval 30 minut, objem 40 ml, ten zaznamenal růst laktobacilů a ultrazvukem rozbil buňky. Následně bylo za použití NaOH upraveno pH na 7 a laktobacily byly dány do odstředivky po dobu 10 minut na 6000 otáček/minuta. Přes filtr 0,2 µm (Ahlstrom ReliaPrep™) a pomocí stříčky byly laktobacily přefiltrovány a získány pouze jejich metabolity, s kterými se pracovalo dále. Před použitím mikrotitrační destičky byla nezbytná kultivace bakterií *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640, *Staphylococcus aureus* CCM 885. U všech bakterií byl upraven zákal na 0,5 McFarlandovy stupnice pomocí denzitometru, jedná se o správný poměr mezi fyziologickým roztokem a danou bakterií.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 µl metabolitů jednotlivých laktobacilů, 100 µl BHI bujónu obohaceného 5 % glukózou a 5 µl příslušné bakterie. Byla udělána negativní kontrola s 200 µl metabolitů laktobacilů i kladná kontrola s 200 µl BHI bujónem obohaceného 5 % glukózou a 5 µl testované bakterie. Mikrotitrační destička byla kultivována v Tecan přístroji za optimálních růstových podmínek studovaných bakterií: *Bacillus subtilis* 30 °C, *Staphylococcus aureus* a *Stenotrophomonas maltophilia* 37 °C, dále 48 cyklů (24 h), absorbance 600 nm, přístroj zaznamenával růstové křivky jako OD.

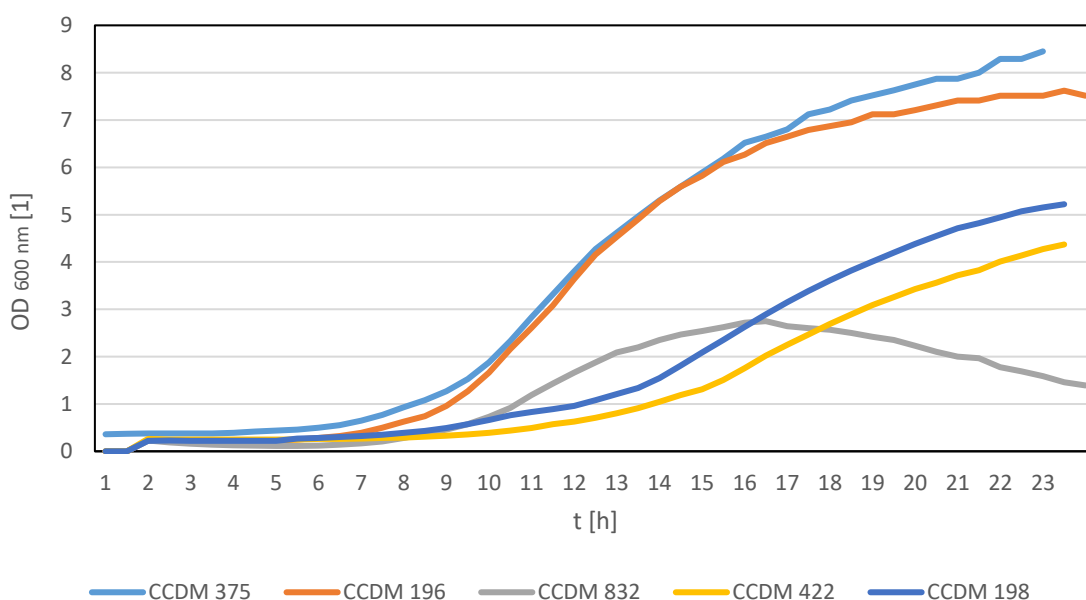
Po dokončeném měření se nechaly mikrotitrační destičky kultivovat v příslušných teplotách po dobu 48 hodin, celková doba růstu biofilmu byla 72 hodin. Pro detekci tvorby biofilmu byla využita Christensenova metoda. Obsah destičky byl vylit a jamky byly promyty fyziologickým roztokem. Do každé jamky bylo následně pipetováno 200 µl denaturovaného ethanolu, po 20 minutách byl odstraněn. Pipetovalo se 150 µl krystalové violeti, vyčkalo se 20 minut a poté následovalo odpipetování. Jamky byly 3x promyté fyziologickým roztokem a počkalo se na vyschnutí jamek. V posledním kroku bylo pipetováno 200 µl denaturovaného ethanolu a na Tecanu byla změřena absorbance při 600 nm. [38]

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Růstová křivka laktobacilů

V první části experimentu byly změřeny růstové křivky vybraných laktobacilů (CCDM 375, CCDM 196, CCDM 832, CCDM 422, CCDM 198) pomocí osobního bioreaktoru RTS – 1C (Biosan, Lotyšsko), (obrázek 2). U sledovaných kmenů byly hodnoceny lag a log fáze růstu, kdy CCDM 375 měl lag fázi 7 hodin, fázi zrychleného růstu 9 hodin, log fáze byla ukončena po 16 hodinách. CCDM 196 ukončil lag fázi po 7 hodinách, fázi rychlého růstu v 9 hodinách a log fázi po 17 hodinách. CCDM 832 lag fázi trvala 8 hodin, fáze rychlého růstu byla do 9 hodin a log fázi do 15 hodin. U CCDM 422 byla lag fáze do 11 hodin, fáze rychlého růstu do 13 hodin a log fáze do 22 hodin. Poslední testovaný CCDM 198 měl lag fázi 10 hodin, fáze rychlého růstu do 13 hodin a log fázi po celý čas měření (24 h). Z grafu je patrné že nejkratší dobu lag fáze mají kmeny CCDM 375 a CCDM 196.

Studie De Angelis a spol. [32] se zabývala reakcí *Lactiplantibacillus plantarum* na tepelný šok. Během výzkumu byl zaznamenán růst *Lactiplantibacillus plantarum* i při 30 °C, přičemž uvedli střed log fáze po 5 hodinách a stacionární fázi po 12 hodinách. V porovnání s námi testovanými *Lactiplantibacillus plantarum* (CCDM 375, CCDM 196) byl růst podstatně rychlejší při stejné kultivační teplotě.



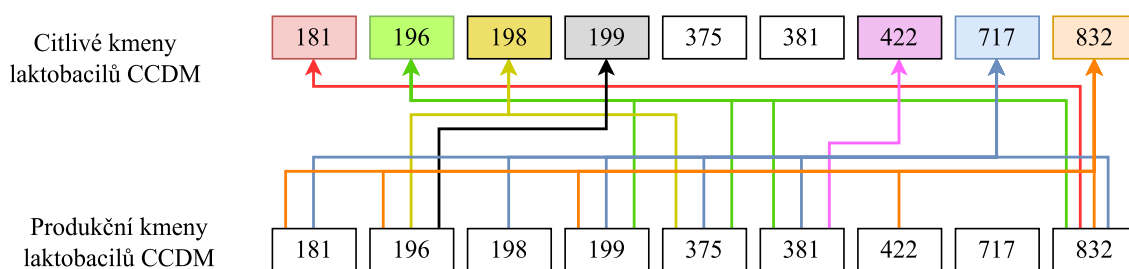
Obrázek 2: Růstové křivky CCDM 375, CCDM 196, CCDM 832, CCDM 422, CCDM 198.

6.2 Přítomnost bakteriocinů

Přítomnost bakteriocinů byla sledována jako pilotní studie. Cílem bylo zjistit, zda daný kmen produkuje antimikrobní či antibiofilm látku, pomocí inhibičních zón. Testovala se inhibice vzájemně mezi laktobacily (obrázek 3). Z námi testovaných laktobacilů měl vliv na růst sledovaných kmenů:

- citlivý kmen *Lactilactobacillus sakei sakei* CCDM 717
Byl inhibován šesti produkčními laktobacily, jedná se o kmeny CCDM 181, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 832.
- citlivý kmen *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832
Vytvořily se inhibiční zóny u kmenů CCDM 181, CCDM 196, CCDM 199, CCDM 422, CCDM 832.
- citlivý kmen *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 196
Bakteriociny byly produkovány kmeny CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 832.
- citlivý kmen *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 198
Působily inhibičně kmeny CCDM 196, CCDM 375.
- citlivý kmen *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 181
Vliv měl kmen CCDM 832.
- citlivý kmen *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 199
Byla vytvořena inhibiční zóna u kmene CCDM 196.
- citlivý kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422
Působil pouze kmen CCDM 381.
- citlivý kmen *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 375
Žádný z testovaných laktobacilů u tohoto kmene nevytvořil inhibiční zónu.
- citlivý kmen *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 381
Žádný z testovaných laktobacilů u tohoto kmene nevytvořil inhibiční zónu.

Ve studii Todorov a spol. [29] pozorovali baktericidní aktivitu u *Lactiplantibacillus plantarum*. Jejich výstupem byla inhibice růstu bakterií mléčného kvašení, konkrétně inhiboval *Lacticaseibacillus casei*, *Latilactobacillus sakei*. Námi testovaný *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422 byl inhibován pouze jedním ze čtyř testovaných *Lactiplantibacillus plantarum* (CCDM 181, CCDM 196, CCDM 375, CCDM 381), a to *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 381. *Latilactobacillus sakei* CCDM 717 byl inhibován všemi testovanými *Lactiplantibacillus plantarum* (CCDM 181, CCDM 196, CCDM 375, CCDM 381).



Obrázek 3: Tvorba inhibičních zón mezi testovanými druhy laktobacilů (CCDM 181, CCDM 196, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 422, CCDM 717, CCDM 832).

V tabulce 1 jsou zaznamenány výsledky pH příslušných bakterií s CCDM 832. Byl zkoumal rozdíl pH bakterií v BHI soft agaru připraveného s destilovanou vodou a s BHI soft agarem připraveného s pufrém $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M namísto destilované vody. Cílem měření bylo zjistit, zda BHI soft agar s pufrém $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M udrží pH blížíci se 7. V případě nízkého pH mohou být bakterie inhibovány kyselinou mléčnou nikoliv bakteriociny. *Bacillus subtilis* CCM 2216 vykazoval nejmenší rozdíl pH z testovaných bakterií, pH v BHI soft agaru s H_2O bylo 4,20, v BHI soft agaru s pufrém $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M vyšlo pH 5,67. *Staphylococcus aureus* v BHI soft agaru s H_2O měl pH 3,92, v BHI soft agaru s pufrém $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M bylo stanoveno pH 5,73. *Stenotrophomonas maltophilia* měla pH 3,89 v BHI soft agaru s H_2O a pH 5,67 v BHI soft agaru s pufrém $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M. Na základě výsledků z tabulky 1, byly bakteriociny dále zkoumány za použití BHI soft agaru s pufrém $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M, (obrázek 4).

Tabulka 1: Porovnání pH kultury bakterií kultivovaných v BHI soft agaru s H₂O a v BHI soft agaru s pufrům NaH₂PO₄·H₂O 0,2M.

	pH v BHI soft agaru s H ₂ O	pH v BHI soft agaru s pufrům NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,2M
<i>Bacillus subtilis</i>	4,20	6,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,92	6,27
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,89	6,19

Vliv bakteriocinů testovaných laktobacilů na citlivé kmeny *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 a *Staphylococcus aureus* CCM 885 očkovaných v BHI soft agaru s pufrům NaH₂PO₄·H₂O 0,2M (obrázek 4). Pufr byl použit namísto vody, aby nedošlo k záměně vlivu na tvorbu inhibičních zón. Cílem pufru bylo potlačit vliv kyseliny mléčné produkované laktobacily, která může inhibovat testované bakterie namísto bakteriocinů. Přítomnost bakteriocinů se projeví tvorbou inhibiční zóny.

- *Bacillus subtilis* CCM 2216 byl inhibován osmi laktobacily, jedná se o CCDM 181, CCDM 196, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 422, CCDM 832, inhibiční zóna nevznikla pouze s CCDM 717.

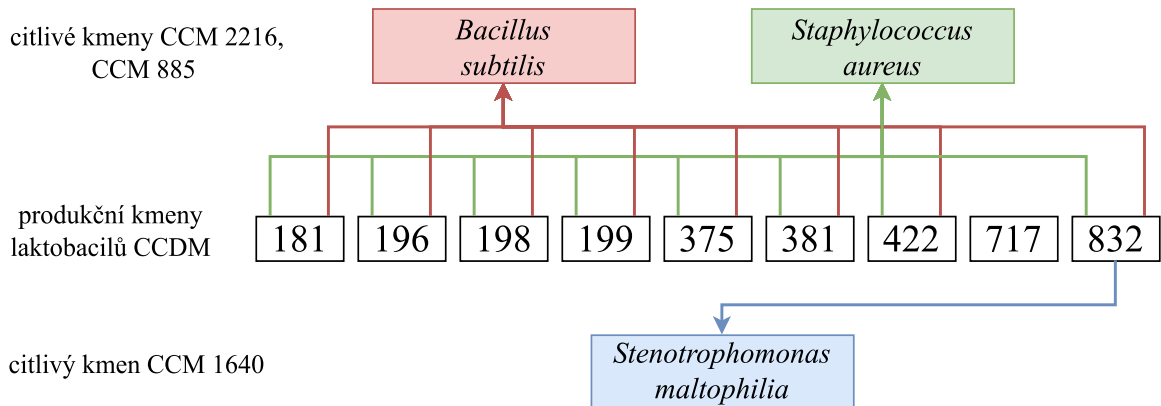
Ve studii Cizeikiene a spol. [30] zjistili, že *Latilactobacillus sakei* inhibuje *Bacillus subtilis*, což se u námi testovaného *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717 prokázat nepodařilo.

- *Staphylococcus aureus* CCM 885 vytvořil inhibiční zóny se stejnými osmi laktobacily jako *Bacillus subtilis*, jedná se o CCDM 181, CCDM 196, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 422, CCDM 832, inhibiční zóna nevznikla pouze s CCDM 717.

Shodné výsledky měla i studie Todorov a spol. [29], kde se zabývali bakteriocidní aktivitou u *Lactiplantibacillus plantarum*, ten prokazoval bakteriocidní účinek na *Staphylococcus aureus* CCM 885 i studie Jiang a spol. [31] prokázala inhibici *Staphylococcus aureus* CCDM 885 pomocí *Lactiplantibacillus plantarum* má antimikrobiální schopnost pro střevní patogeny.

- U *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 byla pozorována inhibiční zóna pouze u CCDM 832.

Studii o vlivu bakteriocinů produkovaných laktobacily na *Stenotrophomonas maltophilia* je poměrně malé množství. Studie Sarhan a spol. [36] zkoumala vliv bakteriocinů *Lactobacillus acidophilus* na *Stenotrophomonas maltophilia*, závěrem byla prokázána inhibice tohoto kmene.

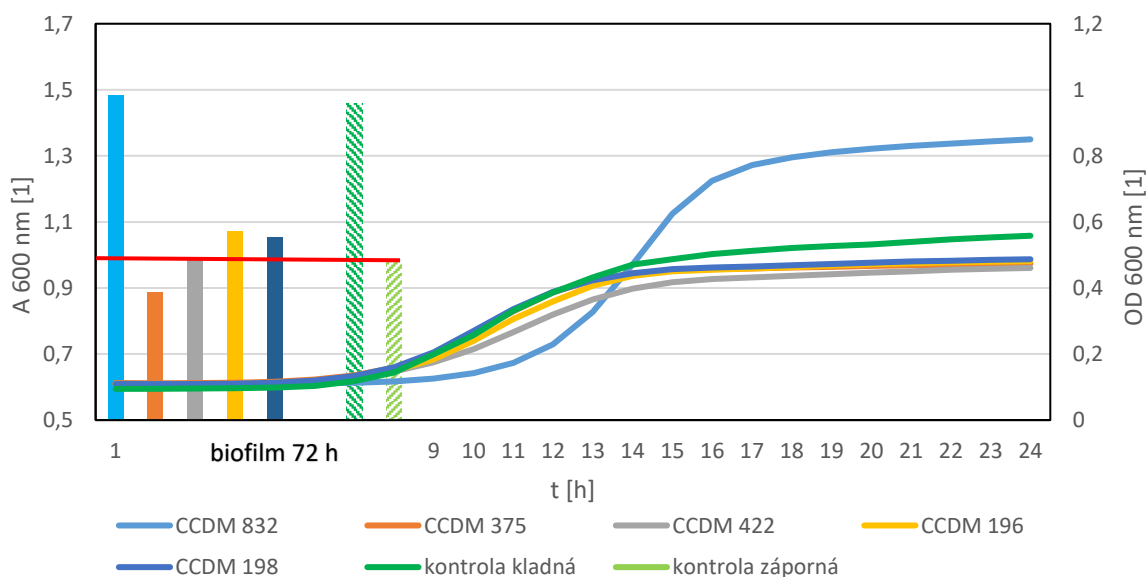


Obrázek 4: *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 a *Staphylococcus aureus* CCM 885 zaočkovaný v soft agaru s pufrům $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M a jejich inhibice zkoumanými laktobacily, u kterých byly pozorovány inhibiční zóny.

6.3 Vliv bakteriocinů na biofilm

Růstová křivka bakterie *Bacillus subtilis* je znázorněná společně s metabolity (viz kapitola 5.2) i bez metabolitů po kultivaci 24 hodin na obrázku 5. Lag fáze kmene *Bacillus subtilis* kultivovaného pouze v kultivačním médiu (viz kapitola 5.2) bez přídavku LB produktů byla 6,5 hodin. *Bacillus subtilis* společně s produkty laktobacilů CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198 trvala 6,5 hodin, u *Bacillus subtilis* s CCDM 832 skončila lag fáze po 8hodinách kultivace. Fáze zrychleného růstu byla u všech laktobacilů s *Bacillus subtilis* stejná, vyjma CCDM 832, a to 6,5-8 hodin. U CCDM 832 nastala fáze rychlého růstu 9-11 hodin. Následná log fáze trvala do 14 hodin u všech laktobacilů s *Bacillus subtilis* kromě CCDM 832, ten skončil log fází až po 17 hodinách kultivace.

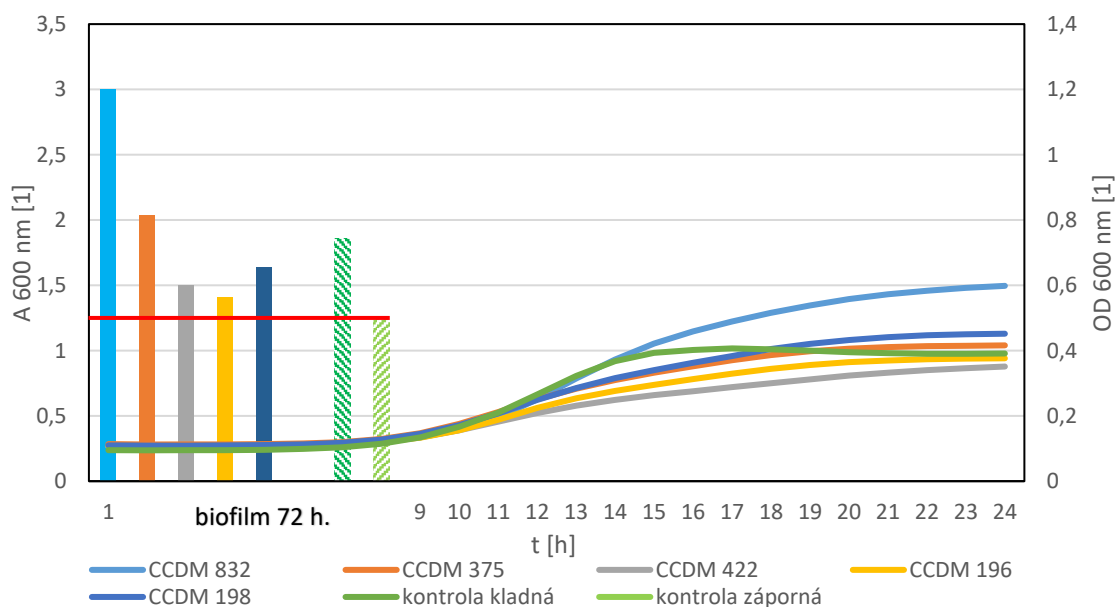
Vliv laktobacilů na vznik biofilmu (obrázek 5) byl pozorována na mikrotitrační destičce pomocí Christensenovy metody. Laktobacily, které mají nižší hodnoty, než záporná kontrola inhibovaly růst biofilmu, jedná se o kmeny CCDM 375 a CCDM 422. V případě CCDM 832 nebyl růst biofilmu ovlivněný, slabou tvorbu biofilmu prokázaly kmeny CCDM 196 a CCDM 198. Ve studii Leathers a spol. [33] byl zkoumán vliv *Bacillus subtilis* ALT3A a *Bacillus subtilis* RPT-82412 na biofilm pozitivní *Lactiplantibacillus plantarum*. Oba kmeny *Bacillus subtilis* inhibují tvorbu biofilmu *Lactiplantibacillus plantarum*. Námi testovaný *Lactiplantibacillus plantarum* (CCDM 196 a CCDM 378) působily inhibičně na biofilm tvořený *Bacillus subtilis* CCM 2216.



Obrázek 5: Vliv metabolitů sledovaných laktobacilů (CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) na biofilm (72 h) *Bacillus subtilis* CCM 2216 (sloupec).

Byly sledovány růstové křivky a tvorba biofilmu u *Staphylococcus aureus* CCM 885. Za definovaných kultivačních podmínek ve specifickém prostředí s metabolity laktobacilů (viz kapitola 4.1), (obrázek 6). Lag fáze byla u samotné bakterie i u bakterie společně s CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198 stejná, a to 6 hodin. Následující fáze zrychleného růstu byla také pro všechny shodná, skončila po 9 hodinách. V případě log fáze byly časy kultivace různé. *Staphylococcus aureus* ukončil log fázi po 15 hodinách, u CCDM 832 probíhala log fáze celý čas měření (24 h), CCDM 375 ukončil log fázi po 20 hodinách, CCDM 422 pokračoval v log fázi i po 24 hodinách, CCDM 196 byl v log fázi do 20 hodin kultivace a CCDM 198 dokončil log fázi do 19 hodin.

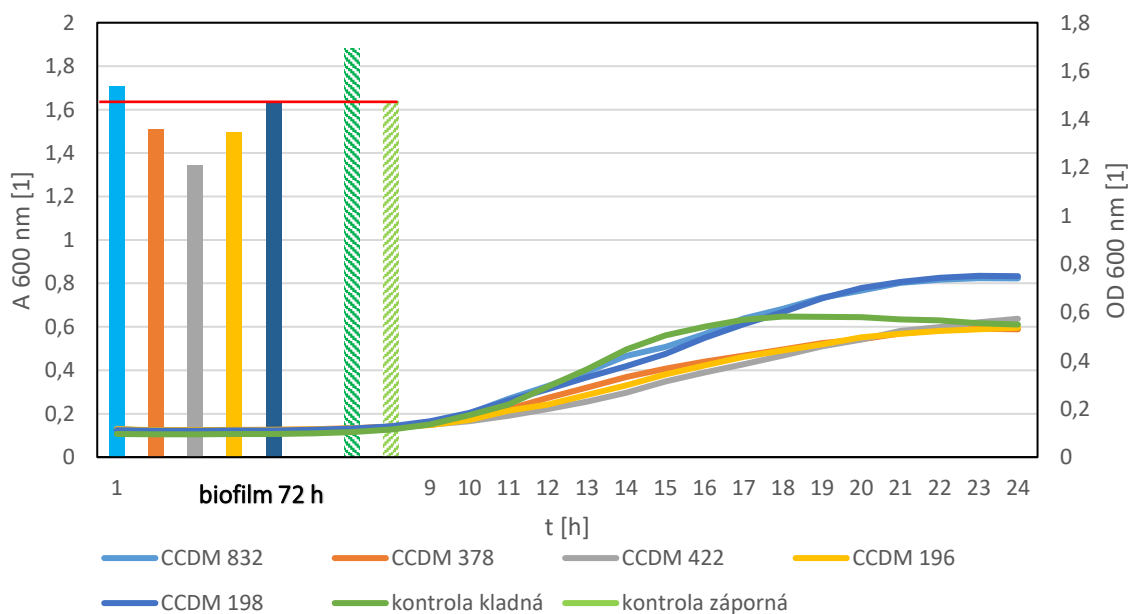
Na obrázku 6 je také zaznamenána tvorba biofilmu samotného *Staphylococcus aureus* CCM 885 i společně s metabolity laktobacilů (viz kapitola 5.2). Ze stanovení podle Christensenovi metody (viz kapitola 5.2) bylo zjištěno, že kmeny CCDM 422, CCDM 196 a CCDM 198 tvořily biofilm slabě, naopak kmeny CCDM 832 a CCDM 375 tvorbu biofilmu podpořily a je patrné, že nemají negativní vliv na tvorbu biofilmu. Ve studii Saidi a spol. [34] byl prokázán vliv *Lacticaseibacillus casei* ATCC 39392 na tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, měl inhibiční účinky v závislosti na koncentraci. Námi testovaný *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 198 růst biofilmu pouze omezil.



Obrázek 6: Vliv metabolitů sledovaných laktobacilů (CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) na biofilm (72 h) *Staphylococcus aureus* CCM 885 (sloupce).

Znázornění růstových křivek (obrázek 7) samotné *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 i společně s metabolity (viz kapitola 5.2) testovaných laktobacilů (viz kapitola 4.1). Lag fáze trvala u samotné *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 i společně s laktobacily 6 hodin kultivace. Fáze zrychleného růstu se také nelišila u jednotlivých laktobacilů ani u bakterie samotné, začala po 9 hodinách a skončila v 10 hodinách. Log fáze samotné *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 trvala do 17 hodin. V případě působení CCDM 832, CCDM 375, CCDM 196, CCDM 198 byla log fáze ukončená za 22 hodin. U CCDM 422 log fáze po celou dobu měření (24 h) neskončila.

Vliv metabolitů (viz kapitola 5.2) testovaných laktobacilů (viz kapitola 4.1) na tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 (obrázek 7). Kmen CCDM 832 jako jediný tvořil biofilm slabě, ostatní testované laktobacily (CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) působily na tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 inhibičně. Podle studie Kivanç a spol. [35] je biofilm tvořen *Stenotrophomonas maltophilia* dobře inhibován *Lactiplantibacillus plantarum* 1771. V této práci byl testován *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 196 a *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 378, v obou případech došlo k inhibici biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640.



Obrázek 7: Vliv metabolitů sledovaných laktobacilů (CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) na biofilm (72 h) *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 (sloupce).

ZÁVĚR

Bakteriociny mohou být v potravinářském průmyslu alternativou chemických konzervačních látek, zabraňují bakteriální kontaminaci a kažení potravin. Již se lze setkat v potravinách s bakteriociny, mezi něž patří konzervant nisin (E234). Z legislativního hlediska jsou bakteriociny v potravinách schváleny v nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1332/2008. V bakalářské práci byly testovány inhibiční účinky laktobacilů na patogenní bakterie, i mezi laktobacily vzájemně. Výsledky mohou sloužit jako základ pro další výzkum působení jednotlivých bakteriocinů na jiné druhy patogenních i nepatogenních bakterií a následné uplatnění v potravinářském průmyslu v podobě konzervačních látek.

- Z použitých laktobacilů měl nejvyšší baktericidní aktivitu kmen *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717, který inhiboval 6 z 9 sledovaných laktobacilů, avšak sám nebyl inhibován žádným testovaným laktobacilem.
- Antimikrobiální účinky nebyly prokázány u kmenů *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 375 a *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 381.
- *Bacillus subtilis* CCM 2216 i *Staphylococcus aureus* CCM 885 byl inhibován na miskách všemi laktobacily vyjma kmene *Latilactobacillus sakei sakei* CCDM 717.
- Na *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 působil bakteriocidně pouze kmen *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832.

Hlavním cílem práce bylo sledování vlivu produktů laktobacilů na patogenní i nepatogenní mikroorganismy vyskytující se v potravinách, které tvoří biofilm.

- Tvorba biofilmu v případě *Bacillus subtilis* CCM 2216 byla inhibována všemi laktobacily vyjma *Lacticaseibacillus paracasei tolerans* CCDM 832, ten růst biofilmu neovlivnil.
- U kmene *Staphylococcus aureus* CCM 885 došlo k omezení růstu biofilmu produkčními kmeny *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 196, *Lacticaseibacillus casei casei* CCDM 198 a *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422.
- Růst biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1640 byl inhibován všemi produkčními (sledovanými) kmeny laktobacilů.

Laktobacily se využívají jako probiotika, vytvářejí biofilm v trávicím traktu, čímž kompetitivně brání uchycení patogenních bakterií a následné tvorbě biofilmu patogenních bakterií. Laktobacily jsou důležité technologické mikroorganismy, využívají se při fermentaci mléčných, masných, cereálních, ovocných i zeleninových produktů. Biofilm tvořený technologickými mikroorganismy má kladný vliv na výslednou potravinu, zatímco patogenní bakterie tvořící biofilm mohou potraviny kontaminovat a zhoršují jejich senzorické vlastnosti.

Přínos této práce může zasahovat do více oborů, nejen potravinářských, ale i biotechnologických aj. Vliv laktobacilů na patogenní bakterie tvořící biofilm má zásadní význam v boji proti infekcím střevního traktu či nozokomiálních patogenů. Využití laktobacilů při fermentaci ovlivňuje organoleptické vlastnosti, mohou navyšovat i výživové hodnoty a působit na zdraví. V této práci byla použita široká škála různých rodů laktobacilů. Další výzkum by mohl zkoumat specifické druhy laktobacilů a jejich účinky na biofilmy. Dále lze doporučit studium laktobacilů v kombinaci s jinými látkami, jako jsou antioxidanty nebo další probiotika, symbiotika či prebiotika, která mohou zvýšit účinky na biofilmy patogenních bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] QIN, Yuxuan, Leticia Lima ANGELINI a Yunrong CHAI. Bacillus subtilis Cell Differentiation, Biofilm Formation and Environmental Prevalence. *Microorganisms* [online]. 2022, 10(6) [cit. 2022-09-20]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10061108.
- [2] KUBO, Yuji, Tomotsugu NOGUCHI a Keitarou KIMURA. Storage temperature and quality changes of natto. *Food Science and Technology Research* [online]. 2021, 27(3), 497-504 [cit. 2023-04-22]. ISSN 1344-6606. Dostupné z: doi:10.3136/fstr.27.497.
- [3] ARNAOUTELI, Sofia, Natalie C. BAMFORD, Nicola R. STANLEY-WALL a Ákos T. KOVÁCS. Bacillus subtilis biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, 19(9), 600-614 [cit. 2023-02-21]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-021-00540-9.
- [4] LIU, Ying, Jiang ZHANG a Yinduo JI. Environmental factors modulate biofilm formation by Staphylococcus aureus. *Science Progress* [online]. 2020, 103(1) [cit. 2023-02-11]. ISSN 0036-8504. Dostupné z: doi:10.1177/0036850419898659.
- [5] PENG, Qi, Xiaohua TANG, Wanyang DONG, Ning SUN a Wenchang YUAN. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics* [online]. 2023, 12(1) [cit. 2023-03-21]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics12010012.
- [6] JEAN-PIERRE, Vincent, Agathe BOUDET, Pauline SORLIN, Quentin MENETREY, Raphaël CHIRON, Jean-Philippe LAVIGNE a Hélène MARCHANDIN. Biofilm Formation by Staphylococcus aureus in the Specific Context of Cystic Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, 24(1) [cit. 2023-03-22]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24010597.
- [7] HAN, Jiahe a Alessandro POMA. Molecular Targets for Antibody-Based Anti-Biofilm Therapy in Infective Endocarditis. *Polymers* [online]. 2022, 14(15) [cit. 2023-02-06]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14153198.
- [8] GRISPOLDI, Luca, Musafiri KARAMA, Andrea ARMANI, Chrystalleni HADJICHARALAMBOUS a Beniamino T. CENCI-GOGA. Staphylococcus aureus enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment

- from farm to table. Italian Journal of Animal Science [online]. 2021, 20(1), 677-690 [cit.2023-04-22]. ISSN 1828-051X. Dostupné z:doi:10.1080/1828051X.2020.1871428.
- [9] ISOM, Cierra M., Blake FORT, Gregory G. ANDERSON a Conrad W. MULLINEAUX. Evaluating Metabolic Pathways and Biofilm Formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Bacteriology [online]. 2022, 204(1), e00398-21 [cit. 2023-02-13]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00398-21.
- [10] BOSTANGHADIRI, Narjess, Abdollah ARDEBILI, Zohreh GHALAVAND, Samane TEYMOURI, Mahsa MIRZARAZI, Mehdi GOUDARZI, Ehsan GHASEMI a Ali HASHEMI. Antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-associated genes among *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. BMC Research Notes [online]. 2021, 14(1) [cit. 2023-02-13]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-021-05567-y.
- [11] AKBAR, Sirwan, Simon P. ROUT a Paul N. HUMPHREYS. Draft Genome Sequence of the Biofilm-Forming *Stenotrophomonas maltophilia* Strain 53. Genome Announcements [online]. 2015, 3(2), e00312-15 [cit. 2023-02-13]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00312-15.
- [12] ZEINHOM, Mohamed M.A., Gamal M. HASSAN, Heba A.M. SALEM a Harold CORKE. Prevalence and Survival of *Stenotrophomonas* Species in Milk and Dairy Products in Egypt. Foodborne Pathogens and Disease [online]. 2021, 18(5), 337-345 [cit. 2023-04-22]. ISSN 1535-3141. Dostupné z: doi:10.1089/fpd.2020.2893.
- [13] Bialasová, K. Laktobacily a jejich schopnost snižovat hladinu cholesterolu [online]. 2018 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: [https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/2018/laktobacily-a-jejich-schopnost-snizovat-hladinu-cholesterolu?cookie\[only_desktop\]=1](https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/2018/laktobacily-a-jejich-schopnost-snizovat-hladinu-cholesterolu?cookie[only_desktop]=1).
- [14] ADESULU-DAHUNSI, Adekemi Titilayo, Samuel Olatunde DAHUNSI a Titilayo Adenike AJAYEOBA. Co-occurrence of *Lactobacillus* Species During Fermentation of African Indigenous Foods: Impact on Food Safety and Shelf-Life Extension. Frontiers in Microbiology [online]. 2022, 13 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.684730.
- [15] P, Shravan a Paulo E ARRATIA. To biofilm or not to biofilm. ELife [online]. 2022, 11 [cit. 2023-02-20]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.80891.

- [16] POMPILIO, Arianna, Daniela SCRIBANO, Meysam SARSHAR, Giovanni DI BONAVENTURA, Anna Teresa PALAMARA a Cecilia AMBROSI. Gram-Negative Bacteria Holding Together in a Biofilm: The *Acinetobacter baumannii* Way. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(7) [cit. 2023-02-09]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9071353.
- [17] RATHER, Muzamil Ahmad, Kuldeep GUPTA a Manabendra MANDAL. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2021, 52(4), 1701-1718 [cit. 2022-11-02]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1007/s42770-021-00624-x.
- [18] SENEVIRATNE, Chaminda, Neha SRIVASTAVA, Intekhab ISLAM a KELVIN FOONG AND FINBARR ALLEN. Microbial Biofilms. In: SENEVIRATNE, Chaminda, ed. *Microbial Biofilms* [online]. Routledge, 2017, 2017-05-11, s. 1-32 [cit. 2023-02-11]. ISBN 978-1-4987-2219-3. Dostupné z: doi:10.1201/9781315120119-2.
- [19] Citace: A Review on Production of Exopolysaccharide and Biofilm in Probiotics Like Lactobacilli and Methods of Analysis. *Biointerface Research in Applied Chemistry* [online]. 2020, 10(5), 6058-6075 [cit. 2022-09-15]. ISSN 2069-5837. Dostupné z: doi:10.33263/BRIAC105.60586075.
- [20] WALKER, James, Jana JASS a Susanne SURMAN. *Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control*. New York: John Wiley, 2000. ISBN 0-471-98866-9.
- [21] LAHIRI, Dibyajit, Moupriya NAG, Ritwik BANERJEE, et al. Amylases: Biofilm Inducer or Biofilm Inhibitor?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2021, 11 [cit. 2023-02-20]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.660048.
- [22] Kathryn E. FAIRFULL-SMITH. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019, 7 [cit. 2023-04-22]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00824.
- [23] EVROPSKÝ PARLAMENT, RADA EVROPSKÉ UNIE, 2023 [online]. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Poslední změna: 22.03.2023 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32008R1333>.

- [24]NEGASH, Abebe Worku, Berhanu Andualem TSEHAI a Joseph FALKINHAM. Current Applications of Bacteriocin. International Journal of Microbiology [online]. 2020, 2020, 1-7 [cit. 2023-03-23]. ISSN 1687-9198. Dostupné z: doi:10.1155/2020/4374891.
- [25]RILEY, Margaret A. a John E. WERTZ. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annual Review of Microbiology [online]. 2002, 56(1), 117-137 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- [26]ZIMINA, Maria, Olga BABICH, Alexander PROSEKOV, Stanislav SUKHIKH, Svetlana IVANOVA, Margarita SHEVCHENKO a Svetlana NOSKOVA. Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. Antibiotics [online]. 2020, 9(9) [cit. 2023-02-27]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9090553mm.
- [27]ANTOSHINA, Daria V., Sergey V. BALANDIN a Tatiana V. OVCHINNIKOVA. Structural Features, Mechanisms of Action, and Prospects for Practical Application of Class II Bacteriocins. Biochemistry (Moscow) [online]. 2022, 87(11), 1387-1403 [cit. 2023-03-31]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297922110165.
- [28]EGHBAL, Noushin, Christophe VITON a Adem GHARSALLAOUI. Nano and microencapsulation of bacteriocins for food applications: A review. Food Bioscience [online]. 2022, 50 [cit. 2023-04-23]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.102173.
- [29]TODOROV, S.D. a L.M.T. DICKS. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology [online]. 2005, 36(2-3), 318-326 [cit. 2023-04-24]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2004.09.009.
- [30]CIZEIKIENE, Dalia, Grazina JUODEIKIENE, Algimantas PASKEVICIUS a Elena BARTKIENE. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control [online]. 2013, 31(2), 539-545 [cit. 2023-04-24]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.004.
- [31]JIANG, Liming, Yiyong LUO, Xuebin CAO, Wen LIU, Gang SONG a Zhizhen ZHANG. LuxS quorum sensing system mediating Lactobacillus plantarum probiotic

- characteristics. Archives of Microbiology [online]. 2021, 203(7), 4141-4148 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-021-02404-5.
- [32] DE ANGELIS, Maria, Raffaella DI CAGNO, Claude HUET, Carmine CRECCHIO, Patrick F. FOX a Marco GOBBETTI. Heat Shock Response in *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2004, 70(3), 1336-1346 [cit. 2023-05-08]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.3.1336-1346.2004.
- [33] LEATHERS, Timothy D., Kenneth M. BISCHOFF, Joseph O. RICH, Neil P.J. PRICE, Pennapa MANITCHOTPISIT, Melinda S. NUNNALLY a Amber M. ANDERSON. Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. Bioresource Technology [online]. 2014, 169, 45-51 [cit. 2023-05-09]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2014.06.065.
- [34] SAIDI, Navid, et al. Anti-biofilm potential of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* cell-free supernatant extracts against *Staphylococcus aureus*. Advanced Biomedical Research [online]. 2023, 12. [cit. 2023-05-09]. doi:10.4103/abr.abr_156_21
- [35] KIVANÇ, Sertaç Argun, Berna AKOVA BUDAK a Merih KIVANÇ. Göz Yüzeyinden Elde Edilen Bakterilerin Oluşturduğu Biyofilme Karşı Probiyotik Bakterilerin Hücresiz Filtratlarının Antibiyofilm Etkilerinin Araştırılması. SDÜ SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ [online]. 432-440 [cit. 2023-05-09]. ISSN 2146-1937. Dostupné z: doi:10.22312/sdusbed.1151489.
- [36] SARHAN, Sarhan Rashid a Orooba Mohammed S. IBRAHIM. In-Vitro Study the Antibacterial Activity of Bacteriocin against *Stenotrophomonas maltophilia* and Evaluation its Synergism with some Antibiotics. Advances in Animal and Veterinary Sciences [online]. 2018, 6(12) [cit. 2023-05-09]. ISSN 23078316. Dostupné z: doi:10.17582/journal.aavs/2018/6.12.556.568.
- [37] ZHENG, Jinshui, Stijn WITTOUCK, Elisa SALVETTI, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2020, 70(4), 2782-2858 [cit. 2023-05-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004107.
- [38] PANDA, Pragyanswagatika, Uma CHAUDHARY a SuryaK DUBE. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. Indian

Journal of Pathology and Microbiology [online]. 2016, 59(2) [cit. 2023-05-16]. ISSN 0377-4929. Dostupné z: doi:10.4103/0377-4929.182013.

[39] MEIER-KOLTHOFF, Jan P, Joaquim Sardà CARBASSE, Rosa L PEINADO-OLARTE a Markus GÖKER. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. Nucleic Acids Research [online]. 2022, 50(D1), D801-D807 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=lactobacillus>.

[40] SHANKER, Erin; FEDERLE, Michael J. Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. Genes [online]. 2017, 8.1: 15. [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4425/8/1/15>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EPS	Extracelulární polymerní látky
LPS	Lipopolysacharidy
c-di-GMP	Bis-(3'-5')-cyklický dimerický guanosinmonofosfát
AHL	Acyl-homoserinové laktony
AMP	Antimikrobiální peptidy

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Přehled tvorby biofilmu v několika zásadních fázích [22].	18
Obrázek 2: Růstové křivky CCDM 375, CCDM 196, CCDM 832, CCDM 422, CCDM 198.	27
Obrázek 3: Tvorba inhibičních zón mezi testovanými druhy laktobacilů (CCDM 181, CCDM 196, CCDM 198, CCDM 199, CCDM 375, CCDM 381, CCDM 422, CCDM 717, CCDM 832).	29
Obrázek 4: <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CCM 1640 a <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 885 zaočkovaný v soft agaru s pufrům NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,2M a jejich inhibice zkoumanými laktobacily, u kterých byly pozorovány inhibiční zóny.	31
Obrázek 5: Vliv metabolitů sledovaných laktobacilů (CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) na biofilm (72 h) <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 (sloupce).....	32
Obrázek 6: Vliv metabolitů sledovaných laktobacilů (CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) na biofilm (72 h) <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 885 (sloupce)..	33
Obrázek 7: Vliv metabolitů sledovaných laktobacilů (CCDM 832, CCDM 375, CCDM 422, CCDM 196, CCDM 198) na biofilm (72 h) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CCM 1640 (sloupce).....	34
Tabulka 1: Porovnání pH kultury bakterií kultivovaných v BHI soft agaru s H ₂ O a v BHI soft agaru s pufrům NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,2M.	30