

Monitoring tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z potravin a potravinářských provozů

Bc. Martina Hrubanová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Hrubanová**
Osobní číslo: **T11563**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Monitoring tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z potravin a potravinářských provozů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika biofilmu, jeho struktura a tvorba biofilmu.
2. Bakterie významné v potravinářství, možnosti tvorby biofilmu bakteriemi.
3. Mikrobiální biofilm v potravinářském průmyslu a jeho význam.
4. Metody stanovení biofilmu.

II. Praktická část

1. Průkaz tvorby biofilmu bakteriemi izolovanými z potravin pomocí Christensenovy metody.
2. Vyhodnocení výsledků.
3. Diskuze výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]RULÍK, M., HOLÁ, V., RŮŽIČKA, F., VOTAVA, M. a kol. Mikrobiální biofilm, 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci 2011. ISBN 978-80-244-2747-8.

[2]SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm. Vesmír. 2001, roč. 80, č. 4, s. 203-206.

[3]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.

[4]ČAPLA, J., ZAJÁC, P., VIETORIS, V., BAJZÍK, P. Potravinářstvo: new methodologies for biofilms control in food industry. 2010, roč. 4, č. 3, s. 10-12.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HRUBANOVÁ MARTINA

Obor: THEVP

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, považuji 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 28.4.2013

Martina Hrubanová

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

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

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

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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na monitoring biofilmu v potravinářském průmyslu. Především byly zkoumány potravinářsky významné bakterie, které biofilm produkují. Teoretická část se zabývá definicí biofilmu, jeho strukturou, tvorbou a regulací biofilmu. Praktická část se zabývá sledováním tvorby biofilmu u potravinářsky významných bakterií. Tvorba biofilmu byla zkoumána pomocí Christensenovy zkumavkové metody a modifikované Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách. Vyšší výskyt biofilmu byl u testovaných bakterií prokázán v polystyrenových mikrotitračních destičkách. Podle Christensenovy zkumavkové metody tvořilo biofilm ze 140 testovaných mikroorganismů 1,4 %. Největšími producenty biofilmu byli *Pseudomonas fluorescens* a *Enterococcus* sp. E 24. Na polystyrenovém povrchu tvořilo biofilm z 328 testovaných mikroorganismů 23,5 %. Největšími producenty biofilmu byli *Escherichia coli* 44, *E. coli* 50, *E. coli* 56, *E. coli* 46, *Serratia marcescens* 114, *Citrobacter gillenii* 66, *Pseudomonas aeruginosa* 115, *Lactobacillus paracasei* 51, *Enterococcus faecium* 51.

Klíčová slova: Biofilm, biofilm v potravinářském průmyslu, potravinářsky významné bakterie, metody stanovení biofilmu.

ABSTRACT

This thesis is focused on the monitoring of biofilm in the food industry. Above were examined food-significant bacteria that produce biofilm. The theoretical part deals with the definition of biofilm formation, structure, and regulation of biofilm formation. The practical part deals with monitoring of biofilm formation in food-related bacteria. Biofilm formation was investigated by Christensen spin tube method and modified Christensen method in microplates. A higher incidence of biofilm formation was tested for bacteria prokázám in polystyrene microplates. According to Christensen spin tube method consisted of 140 biofilm microorganisms tested 1.4%. The largest producers were *Pseudomonas fluorescens* biofilms and *Enterococcus* E24. In polystyrene formed biofilm of 328 microorganisms tested 23.5%. The largest producers of biofilm were *Escherichia coli* 44, *E. coli* 50, *E. coli* 56, *E. coli* 46, *Serratia marcescens* 114, *Citrobacter gillenii* 66, *Pseudomonas aeruginosa* 115, *Lactobacillus paracasei* 51, *Enterococcus faecium* 51.

Keywords: Biofilm, biofilm in the food industry, food industry important bacteria, methods of determining biofilm.

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za odbornou pomoc, trpělivost, vstřícnost, inspiraci a cenné rady, které mi při tvorbě této práce velmi pomohly. Rovněž bych ráda poděkovala Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D za poskytnuté kmeny bakterií a laborantkám Lence Machálkové a Olze Vlčkové za pomoc a cenné rady při práci v laboratoři. Děkuji svým rodičům za morální a finanční podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOFILM.....	12
1.1 CHARAKTERISTIKA BIOFILMU	12
1.2 STRUKTURA BIOFILMU.....	12
1.3 TVORBA BIOFILMU	14
1.3.1 Adheze buněk na pevný povrch	14
1.3.2 Tvorba mikrokolonií.....	14
1.3.3 Maturace biofilmu	15
1.3.4 Disperze	15
1.4 REGULACE TVORBY BIOFILMU	15
1.5 OBECNÝ VÝZNAM BIOFILMU	17
1.5.1 Negativní význam.....	17
1.5.2 Pozitivní účinek.....	17
2 BAKTERIE VÝZNAMNÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	18
2.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	18
2.1.1 Využití bakterií.....	19
2.2 BAKTERIE A BIOFILM	19
2.2.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	20
2.2.1.1 Tvorba biofilmu u <i>Staphylococcus</i>	20
2.2.1.2 Quorum sensing u stafylokoků.....	22
2.2.2 Rod <i>Streptococcus</i>	23
2.2.2.1 Quorum sensing u streptokoků.....	23
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.4 <i>Legionella pneumophila</i>	24
2.2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.2.5.1 Tvorba biofilmu u <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.2.5.2 Quorum sensing bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.2.6 <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.2.7 <i>Proteus</i>	28
2.2.8 <i>Salmonella sp.</i>	28
2.2.9 <i>Bacillus cereus</i>	30
3 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU.....	31
3.1 VÝZNAM BIOFILMU V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	31
3.2 MÍSTA VÝSKYTU BIOFILMU V POTRAVINÁŘSTVÍ	32
3.2.1 Inaktivace mikroorganismů v biofilmu.....	33
3.3 POZITIVNÍ ÚČINEK BIOFILMU.....	34
3.3.1 Probiotický kmen <i>Escherichia coli</i>	34
3.3.2 Probiotický rod <i>Lactobacillus</i>	35
3.4 BIOFILM A PITNÁ VODA	35
4 METODY STANOVENÍ BIOFILMU.....	37
4.1 FENOTYPOVÉ METODY PRO STANOVENÍ BIOFILMU	37
4.1.1 Mikroskopické metody	37

4.1.2	Christensenova zkumavková metoda	37
4.1.3	Christensenova metoda v mikrotitrační destičce	38
4.1.4	Kultivace na agaru s kongo červení	39
4.2	GENOTYPOVÉ METODY	39
4.2.1	Geny zodpovědné za tvorbu biofilmu	39
4.2.2	Průkaz tvorby biofilmu pomocí molekulárně-biologických metod	40
II	PRAKTICKÁ ČÁST	42
5	CÍL PRÁCE	43
6	MATERIÁL A METODIKA	44
6.1	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	44
6.2	POUŽITÉ POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	44
6.3	KULTIVACE BAKTERIÍ	45
6.3.1	Příprava bujónu	45
6.3.2	Kultivace bakterií	45
6.4	STANOVENÍ TVORBY BIOFILMU CHRISTENSENOVOU ZKUMAVKOVOU METODOU	45
6.5	STANOVENÍ TVORBY BIOFILMU V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE	46
6.6	VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA TVORBU BIOFILMU	47
7	VÝSLEDKY STANOVENÍ	48
7.1	PRODUKCE BIOFILMU VE SKLENĚNÝCH ZKUMAVKÁCH	48
7.1.1	Produkce biofilmu u bakterií ze školní sbírky	48
7.1.2	Produkce biofilmu u bakterií izolovaných z bažantů	49
7.1.3	Produkce biofilmu u kmenů bakterií izolovaných z králíků	50
7.1.4	Produkce biofilmu u kmenů <i>Escherichia coli</i>	50
7.2	PRODUKCE BIOFILMU V MIKROTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH	51
7.2.1	Kmeny bakterií izolovaných z bažanta	51
7.2.2	Kmeny bakterií izolovaných z králíka	55
7.2.3	Kmeny testovaných bakterií <i>Escherichia coli</i>	57
7.2.4	Izoláty testovaných bakterií ze sýra a sbírkové kmeny	59
7.2.5	Tvorba biofilmu u mléčných bakterií	61
7.3	VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA TVORBU BIOFILMU	63
8	DISKUZE	70
9	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	86
	SEZNAM OBRÁZKŮ	88
	SEZNAM TABULEK	90

ÚVOD

C. E. Zobel v roce 1935 jako první popsal biofilm u mořských bakterií. V letech 1950-1960 byly první zprávy o problémech, které biofilm může způsobit. Bakterie rostoucí v podobě biofilmu mají velmi odlišné vlastnosti od mikrobů, kteří rostou ve formě planktonické (volně se vznášející). Biofilm je mikrobiální společenství, které adhezuje k inertním i živým povrchům, a které představuje výhodnější prostředí pro život mikrobů. Produkce biofilmu bakteriemi představuje závažný problém ve zdravotnictví a v potravinářském průmyslu. Zvláště nebezpečný je biofilm v potravinářském průmyslu, kde se může vytvářet na povrchu jednotlivých výrobních zařízení. Vyskytuje se především v místech špatně dostupných pro sanitaci, poté dojde k uvolnění bakterií do prostředí a kontaminaci potravin. Kontaminace potravin vede ke snížení jejich kvality, rychlejšímu kažení, a pokud jsou přítomny patogenní mikroorganismy, pak může dojít k onemocnění z potravin. Pro prostředí zpracování potravin poskytuje mnoho podmínek, které podporují tvorbu biofilmu, například vlhkost a živiny. Navíc jsou biofilmy obtížně odstranitelné.

Biofilmy se také projevují zvýšenou rezistencí k antimikrobiálním látkám, která je spojena s trojrozměrnou strukturou biofilmu a produkcí EPS (extracelulární polysacharidová substance), která slouží k jeho ochraně. Dále biofilm umožňuje bakteriím setrávat v prostředí, jsou odolné vůči vysychání, UV záření a sanitačním látkám. Problém procesu přichycování bakterií na povrchy a následná tvorba biofilmu v potravinářském průmyslu není doposud vyřešen. Právě z tohoto důvodu a rovněž díky zvýšené rezistenci a obtížnému odstranění biofilmu v potravinářských provozech je této problematice v poslední době věnována značná pozornost.

Pro tvorbu biofilmu jsou v potravinářském průmyslu nejvíce zkoumány *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOFILM

1.1 Charakteristika biofilmu

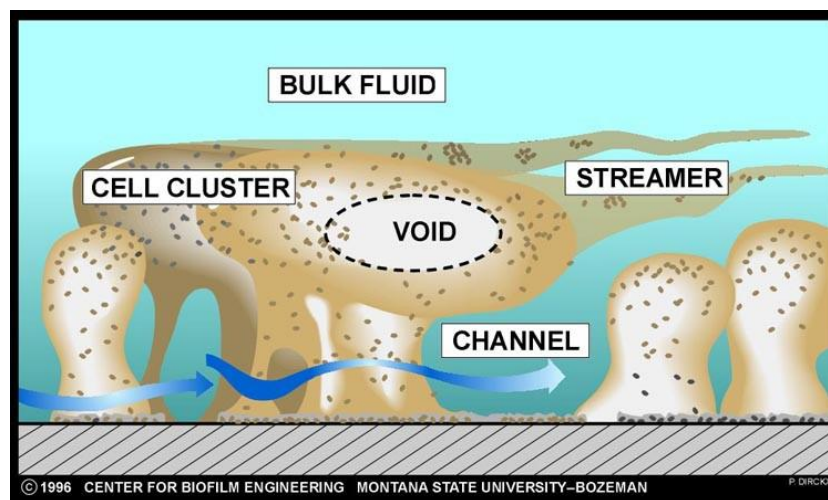
Biofilm je jeden ze způsobů života bakterií a je charakterizován jako společenství buněk mikroorganismů, které jsou pevně přichyceny k povrchu nebo se mohou vyskytovat na rozhraní dvou fází. [1] Biofilm může být jednodruhový, častěji se spíše vyskytuje vícedruhový, kdy ho mohou vytvářet převážně bakterie, dále kvasinky, řasy a případně i další mikroorganismy. [2] Mikroorganismy mají schopnost přichycení na povrchy různého materiálu, které mohou být umělé či nativní. Lze tedy říci, že biofilm je všudypřítomný. Může se vyskytovat na kamenech, na dně řek, živých tkáních, zdravotních pomůckách, katétrech nebo například ve vodním potrubí a přírodních vodních systémech. [3]

Buňky v biofilmu jsou usazené v extracelulární polymerní substanci (tzv. sliz), kterou samy produkují. Sliz má různé chemické složení a je složen z extracelulární polysacharidové substance (EPS). [4] EPS zajišťuje ochranu bakterií před škodlivými vlivy, které na ně působí z vnějšího prostředí, bakterie odolávají účinku biocidů, UV záření, antimikrobiálních látkám, detergentům či bakteriofágům. [5] EPS tvoří zhruba 85 %, je tvořena sítí mikrokanálků, které slouží k zajištění proudění vody a plynů, vylučování metabolitů a přísunu živin. [6,7] Různé MO netvoří vždy stejné množství EPS. Množství závisí na stáří biofilmu, kdy EPS vzrůstá postupně s tím, jak biofilm stárne. [3] Při nedostatečném přísunu živin dochází k hladovění bakterií, při kterém dojde k odpojení buněk z biofilmu a ke snížení velikosti buňky. Mikroorganismy se poté dostávají do prostředí, kde opět získají normální velikost buňky a mají dostatek živin. [8] Schopnost tvorby biofilmu u bakterií je spojována s rezistencí k účinku antibiotik, čímž se zabývá klinická mikrobiologie, která posuzuje faktory virulence. Bakterie tvořící biofilm jsou považovány za více virulentní než planktonické bakterie. [9]

1.2 Struktura biofilmu

Biofilm není homogenní strukturou, skládá se ze shluků buněk a dutin. Jedná se o vzájemně propojené, spletené kanálky, které mají rozmanitý tvar. [10] K poznání struktury biofilmu se využívají fyzikální a fyzikálně chemické metody. Tloušťka biofilmu závisí na přítomnosti živin a na tom, zda je biofilm tvořen jedním nebo více druhy mikroorganismů. Koncentraci kyslíku v buňkách a dutinkách, která je důležitá pro existenci aerobních bakte-

rií nebo anaerobních bakterií, lze zjistit pomocí mikroelektrod. Na povrchu biofilmu je koncentrace kyslíku nízká, hlouběji koncentrace stoupá a dále do hloubky opět klesá, v základní vrstvě biofilmu je potom koncentrace kyslíku nulová. V jednotlivých vrstvách má biofilm různý elektrický náboj, který napomáhá transportu živin. [11] Struktura je dána vlastnostmi prostředí (např. pH, hydrodynamické síly), ve kterém se mikroorganismy (MO) nachází, dále přítomností živin, kyslíku a přítomnými druhy bakterií. Na základě prostředí, ve kterém bakterie vytvářejí biofilm, existují různé formy a struktury biofilmu. [12] Základní strukturou jsou mikrokolonie, ve kterých se buňky shlukují v samostatná společenstva. Mikrokolonie může být tvořena jedním nebo více druhy MO. Jedná se o houbovitý tvar, kde se většina buněk vyskytuje v kloboučku „houby“. [13] Bakteriální mikrokolonie jsou vsazené do EPS matrix a od ostatních mikrokolonií jsou odděleny pomocí vodních kanálků a pórů. Tekutiny, které protékají těmito kanály, umožňují difúzi živin, metabolických zplodin a kyslíku dovnitř a ven z buňky. [14] Extracelulární matrix je složena z 97 % vody, z polysacharidů, bílkovin, lipidů, nukleových kyselin (DNA, RNA), pohlcených živin, metabolitů a ze zbytků odumřelých buněk. [15] Struktura EPS se mění v čase a uspořádáním v prostoru, tím dochází také ke změně chemických a fyzikálních vlastností (např. čím blíže jsou mikrokolonie k jádru, tím je matrix hustší). [16]



Obr. 1: Houbovitá struktura biofilmu [113]

1.3 Tvorba biofilmu

Pro tvorbu biofilmu je důležité, aby se na povrch přichytilo alespoň malé množství bakterií. Pohybující se buňky, které hladovějí, se přichytí na pevný povrch, který jim poskytne dostatečný přísun živin. Po přilnutí bakterií k povrchu, dochází ke změně jejich chování a mění se také jejich fenotyp. Přichycené bakterie produkují do prostředí velké množství polysacharidů, které jsou svým složením podobné škrobu a mají podobné lepivé vlastnosti. Poté dojde ke vzniku matrice, která udržuje buňky seskupené, vytváří vhodné prostředí pro množení buněk za vzniku mikrokolonií, kanálků, které se podílejí na tvorbě struktury. [10]

Tvorbu biofilmu lze rozdělit do čtyř základních kroků: [4]

1. Adheze buněk na pevný povrch
2. Tvorba mikrokolonií
3. Maturace biofilmu
4. Fáze disperze

1.3.1 Adheze buněk na pevný povrch

Adheze buněk k povrchu probíhá za vhodných podmínek vnějšího prostředí, které napomáhají přechodu buněk z planktonické formy v biofilm. Podmínky závisí na daném druhu mikroorganismu. Mezi nejvýznamnější podmínky patří dostupnost živin, hodnota pH, osmotický tlak a teplota. [4,17] V první fázi buňky hledají vhodné místo pro počáteční adhezi a poté přilnou k povrchu pomocí povrchové struktury buněk, jako jsou, pili, bičíky, proteiny nebo EPS. Na přilnutí buněk k povrchu se také podílí fyzikální vlastnosti, například hydrofobicita povrchu buňky i povrchu, na který buňka adhezuje. Mikroorganismy adhezuji lépe na hladké hydrofobní povrchy (plasty) než na povrchy hydrofilní (sklo). [1] Přilnutí bakterií k povrchu je zprostředkováno různými mechanismy, mezi které patří difúze, transport díky proudění vody nebo pohyb buněk pomocí bičíků. [18] Na počátku je adheze k povrchu slabá, buňky jsou obaleny malým množstvím EPS a mají schopnost se stále pohybovat po povrchu, tzv. klouzání, kdy se jedná o „trhavý“ nebo „skákavý“ pohyb. Tento pohyb je vyvolán bičíky nebo pili a závisí na daném druhu mikroorganismu. [17,19]

1.3.2 Tvorba mikrokolonií

Po přilnutí buněk k povrchu dochází ke změně jejich vlastností, kdy se aktivují geny, které jsou odpovědné za produkci polysacharidů a polymerů, které jsou rozhodující pro vznik biofilmu. [11] V této fázi dochází k binárnímu dělení, kdy z mateřské buňky vznikají buň-

ky dceřiné. Vzniklé dceřiné buňky poté agregují s dalšími buňkami a vytváří shluky, tzv. mikrokolonie. [17] Jelikož biofilm vytváří většinou více druhů mikroorganismů, jedná se spíše o koagregaci (adhezi mezi geneticky odlišnými mikroorganismy). Při shlukování buněk a jejich přilnutí k povrchu se významně uplatňují povrchové proteiny, tzv. adheziny. Pomocí adhezínů mohou buňky rozpoznávat složky povrchů, na který adherují. V okolí mikrokolonií se hromadí EPS, díky které dochází k vytvoření vyzrálé vrstvy biofilmu. [19]

1.3.3 Maturace biofilmu

Maturace, tzv. dozrávání, biofilmu je způsobena zvýšenou produkcí EPS a tvorbou mikrokolonií, které se formují a tvoří kanálky, mezi kterými jsou obsaženy póry. [19]

1.3.4 Disperze

Jakmile buňky dosáhnou určité buněčné hustoty, začnou se ze zralého biofilmu oddělovat jednotlivě nebo shluky buněk i s jednotlivými částmi biofilmu. Tento děj se nazývá disperze biofilmu, během kterého se buňky uvolňují do prostředí ve formě planktonických buněk a mohou agregovat na další povrchy a vytvářet biofilm. Disperzi vzniká v biofilmu dynamická rovnováha, která je regulována přístupem živin, samotnými bakteriemi, například quorum sensing a podmínkami vnějšího prostředí. [17,19,20]

Disperzi můžeme rozdělit do 3 typů [21]

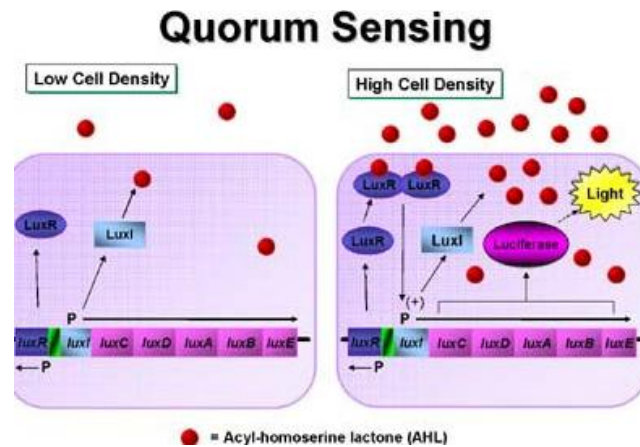
1. „swarming/seeding“ – při této disperzi dochází k uvolnění jednotlivých buněk,
2. „clumping“ – dochází k uvolnění shluků buněk v EPS,
3. „surface“ – dochází k uvolnění buněk a zároveň k pohybu biofilmu po povrchu.

1.4 Regulace tvorby biofilmu

Při tvorbě biofilmu hraje důležitou roli proces zvaný *quorum sensing* (QS). Jedná se o proces vnitrobiofilmové komunikace, která je v současné době intenzivně studována. Dříve byla jakákoliv komunikace přehlížena z toho důvodu, že bakteriální buňka byla brána jako soběstačné individuum, které není schopné jakékoliv vzájemné komunikace či tvorby skupin. *Quorum sensing* byl poprvé prozkoumán v 70. letech u bakterie *Vibrio fischeri*, mořské bakterie, u které kontroluje luminiscenci. [22]

Quorum sensing je založen na produkci signálních molekul a jejich transportu mezi buňkami. Signální molekuly jsou rozpoznány pomocí receptorů okolních buněk, které může ovlivňovat jejich chování. [23,24] U gramnegativních bakterií slouží jako signální molekuly různé chemické látky, nejčastěji N-acyl-homoserinlaktón (acyl-HSL), který je složen z mastné kyseliny a aminokyseliny (AMK) serinu. U grampozitivních bakterií se většinou jedná o krátké oligopeptidy, které lze přirovnat k feromonům nebo hormonům. U stafylokoků jsou za signální molekuly považovány cyklické peptidy s thionolaktónovým kruhem. U grampozitivních a gramnegativních bakterií se může vyskytovat signální látka, tzv. autoinducer-2 (AI-2). Signální látky se podílejí na dělení buněk a tím na hustotě populace v biofilmu a dále se mohou podílet na tvorbě polysacharidové matrice. Mezi nejstudovanější signální molekulu patří acyl-HSL, která nemá žádnou jinou funkci a je produkována specifickými enzymy. [22]

Regulace pomocí QS je třífázový proces, u kterého v 1. fázi bakterie produkuje specifickou signální molekulu. Signální molekuly vznikají většinou intracelulárně a do vnějšího prostředí se dostávají přímo nebo pomocí aktivního transportu. Některé signální molekuly se mohou už přímo vyskytovat ve vnějším prostředí. V tomto případě jsou aktivovány příslušným enzymem, který je produkován bakteriemi. Ve 2. fázi se shromažďují signální molekuly ve vnějším prostředí okolo bakteriální buňky. Kumulace je především způsobena rostoucí populační hustotou bakterií, které tyto signální látky produkují. Ke třetí fázi dochází až při překročení koncentrace signálních látek, kdy molekula se poté naváže na membránový receptor, který je na povrchu bakteriální buňky a poté je aktivován intracelulární regulátorový protein, který spouští expresi genů. Tímto způsobem mezibuněčná komunikace ovlivňuje virulenci u mnoha patogenních mikroorganismů. Komunikace mezi jednotlivými bakteriemi pomocí signálních molekul se podílí na regulaci procesu tvorby biofilmu. [22]

Obr. 2: Mechanismus *quorum sensing* [111]

1.5 Obecný význam biofilmu

1.5.1 Negativní význam

Bakterie tvořící biofilm jsou odolné vůči antibiotikům, což může způsobovat řadu problémů s lidským imunitním systémem. Dále mohou mikroorganismy v biofilmu způsobovat nejrůznější průmyslové kontaminace, dále tzv. biofouling, při kterém bakterie vytvářejí povlaky na površích ponořených do různých tekutin, včetně vody. [25] Biofilm se také účastní tvorby koroze (biokoroze), ucpává náplně chladících věží, potrubí a průchody vody, dále snižuje účinnost přenosu tepla a rovněž zvýšené riziko k výskytu některých onemocnění (např. legionářské nemoci). [26]

1.5.2 Pozitivní účinek

Biofilmy se podílejí na samočištění potoků a řek a snižují znečištění půdy. [25] V průmyslu se někdy biofilmy využívají v úpravkách pitné vody, kde v přírodních podzemních a povrchových vodách, které se ve vodárenství upravují na vodu pitnou, je zvýšený obsah amonných iontů. Jejich přítomnost snižuje účinnost chlorace (hygienické zabezpečení) za vzniku chloraminů. Z tohoto důvodu se snižuje obsah amonných iontů v upravené vodě, k čemuž se využívají fyzikálně chemické (iontová výměna, chemická oxidace) a biologické postupy. Pro biologickou metodu čištění se využívají autotrofní nitrifikační bakterie (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrocystin* a *Nitrobacter*), které oxidují amonné ionty. Nitrifikační oxidace je podmíněna vhodnou biokulturou (biofilm) a její výskyt je limitován. Biofilmová nitrifikační metoda je méně nákladná a bezpečnější. [27]

Další pozitivní účinek můžeme zachytit v potravinářském průmyslu – viz kapitola 3.

2 BAKTERIE VÝZNAMNÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ

2.1 Obecná charakteristika

Bakterie představují nejúspěšnější formu života na Zemi. Doposud bylo popsáno asi 5 000 druhů bakterií (odhaduje se i 1000x více). [28] Bakterie patří mezi prokaryotní organismus, u kterého je buňka schopná samostatné existence. Jedná se o nejstarší organismus na planetě, její výskyt je datován před 3,5 miliardou let. [29] Velikost buňky je v řádu tisícín milimetru. Jsou různého tvaru, buď se vyskytují jako kulovité koky, nebo jsou podlouhlé ve tvaru tyčinek, vláken a různě zprohýbané jako rohlíčky, spirály a jiné. Od buněk živočichů se bakterie především liší tím, že jejich genetická informace vázaná na DNA v jádře není ohraničena jadernou membránou a neobsahuje jadérko. Z tohoto důvodu jsou bakteriální buňky označovány jako prokaryotní, kde funkci jádra má pouze jediný chromozom, který nese geny a je označen jako genom. DNA se v buňce může také vyskytovat ve formě plasmidu. V cytoplasmě jsou obsaženy ribozomy, které slouží pro syntézu bílkovin. [10] Bakterie je ohraničena cytoplasmatickou membránou, tuhou a pevnou buněčnou stěnou (BS). Podle struktury buněčné stěny rozdělujeme bakterie na grampozitivní (G⁺) a gramnegativní (G⁻). G⁺ bakterie mají silnější BS a G⁻ bakterie tenčí BS. Na povrchu je bakterie vybavena důležitými strukturami, které jsou určeny pro styk s okolním světem, například pro mechanickou ochranu, pro adsorpci na povrch, pro přenos genetické informace na jiné bakterie. [30]

Přirozeným prostředím pro bakterie je voda, půda, sliznice živočichů a povrch těla. Mohou se také vyskytovat ve vzduchu buď jako samostatné, jsou-li unášeny, nebo se častěji vyskytují na částicích prachu. Bakterie jsou schopné přežít i extrémní fyzikální a chemické podmínky, díky jejich schopnosti sporulace. [10]

Nejzávažnějším objektem zájmu jsou bakterie, které mohou člověku způsobit závažnou zdravotní újmu. Jedná se o bakterie patogenní. [10] Patogenita bakterie závisí na vlastnostech hostitele a na funkčním stavu jedince. Kvantitativním vyjádřením patogenity je virulence. [31]

Základním oborem zabývající se morfologií, cytologií, klasifikací a genetikou MO je obecná mikrobiologie. Aplikované obory mikrobiologie se poté zabývají činností MO v určité oblasti (např. mikrobiologie potravinářská, zemědělská, průmyslová aj.). [31]

2.1.1 Využití bakterií

Bakterie mají rozsáhlé využití v průmyslu. Účastní se:

- při výrobě kyseliny mléčné, butanolu a acetonu
- uplatňují se při zrání sýrů a kysání mléka (např. výroba jogurtu, kefiru)
- při výrobě některých antibiotik, aminokyselin a vitaminů
- při výrobě alkoholických nápojů
- rozkladu látek (čištění odpadních vod)
- využívají se v genovém inženýrství aj. [32]

2.2 Bakterie a biofilm

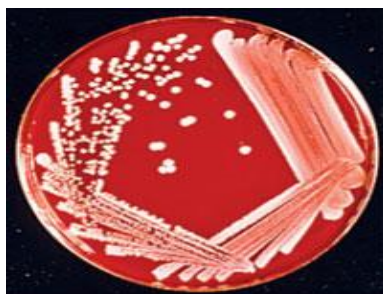
Bakterie se kultivují na živných půdách ve skleněných nebo plastových miskách za vzniku kolonií. Kromě laboratorních podmínek mohou bakterie žít volně ve vodním prostředí jako plankton nebo ve společenství, kde na pevném povrchu vytváří tenkou vrstvu – biofilm. Existence v biofilmu je pro bakterie výhodnější a dnes už patří mezi základní způsob jejich přirozené existence. [11] Bakterie tvořící biofilm jsou považovány za virulentnější než ty, které žijí ve formě planktonu, čímž se stávají odolnější vůči antibiotikům, imunitní reakci hostitele a desinfekčním prostředkům. Člověk bakterie využívá, například v potravinářském nebo chemickém průmyslu a v biotechnologiích. [33]

Mezi nejvýznamnější bakterie tvořící biofilm řadíme:

- *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Escherichia coli*
- *Legionella pneumophila*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Listeria monocytogenes*
- *Proteus* sp.
- *Salmonella* sp.
- *Bacillus cereus* [33]

2.2.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou charakterizovány jako chemoorganotrofní, grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a fakultativně anaerobní bakterie. Na živných půdách vytváří neprůhledné kolonie, které jsou bílé, krémové nebo žlutooranžové barvy. [34] Mezi nejznámějšího zástupce tvořícího biofilm patří *Staphylococcus aureus*, který je řazen mezi nejvýznamnější patogeny. Vyvolává řadu infekcí u lidí a zvířat. [35] *Staphylococcus aureus* produkuje látky, které mu umožňují napadat hostitelskou buňku a způsobovat různé onemocnění. Některé kmeny mohou produkovat toxiny, 19 typů toxinů (typy A – U), z nichž nejúčinnější je typ A, dále enterotoxiny, které mohou vyvolat závažné otravy z potravin a leukocidin. [36] *Staphylococcus aureus* se vyskytuje všude kolem nás, ve vzduchu, prachu, ve vodě, často bývá na kůži, kožních rankách a odřeninách. Biofilm může vytvářet například na potravinářských zařízeních, pracovních plochách aj. [37] Stafylokoky mohou díky tvorbě biofilmu přežívat na kontaktních površích, například v mlékárenském a masném průmyslu, kde odolávají působení desinfekčních látek a mohou způsobovat sekundární kontaminaci, například ve mléce nebo v mléčných produktech. [38]



Obr. 3: *Staphylococcus aureus* na krevním agaru [113]

Staphylococcus epidermidis je považován za součást běžné mikroflóry jako komenzál kůže a sliznice. Pro svůj růst potřebuje dostatečný zdroj dusíku a vitaminy skupiny B. Na živných půdách vytváří hladké a ploché kolonie bez tvorby pigmentu, proto je kolonie většinou zabarvena šedě či šedobíle. *S. epidermidis* vytváří biofilm především na implantátech a snadno se váže na polystyren. [39]

2.2.1.1 Tvorba biofilmu u *Staphylococcus*

Tvorba biofilmu u stafylokoků je několikastupňový proces, na kterém se podílí řada genů, enzymů, proteinů a faktory vnějšího prostředí. Stejně jako u ostatních MO má tvorba biofilmu fáze adheze, akumulace, maturace a disperze. [40]

První fází tvorby biofilmu u *S. epidermidis* je tedy schopnost adheze na povrch. Závisí na vlastnostech příslušného kmene, na fyzikálně chemických vlastnostech povrchu a na vnitřním prostředí hostitele. Významnou roli pro přilnutí stafylokoků k povrchu hraje přítomnost EPS na jejich povrchu. EPS substance je důležitá pro vytvoření vyzrálého stafylokokového biofilmu, chrání stafylokokové buňky před ozonizací a účinkem komplementového systému, kdy jednotlivé složky tohoto systému nemohou proniknout až k membráně bakteriální buňky, což omezuje baktericidní efekt. [41] Adheze se může uskutečnit přisedáním buněk *S. epidermidis* na povrch nebo nepřímo interakcí bakterie s proteiny hostitele. Za adhezi bakterie na povrch jsou zodpovědné Van der Waalsovy síly, polarita a hydrofobicita povrchu. [42] Hostitelské proteiny jsou navázány na adhezní povrch prostřednictvím specifické interakce receptor – ligand mezi adheziny vyskytující se na povrchu buňky a bílkoviny hostitele, které pokrývají kolonizovaný povrch, například fibrin, laminin aj. [41] Mezi nejdůležitější povrchové proteiny bakterií patří především autolysin AtlE. Jedná se o protein kódovaný genem *atlE* a tvoří hlavní součást povrchových proteinů, který ovlivňuje adhezi především k hydrofobním povrchům (polystyren). Kromě autolysinu AtlE se na adhezi mohou podílet další různé bílkoviny, například bílkoviny ze skupiny Sdr (serine – aspartate repeat containing), protein Fbe (fibrinogen – binding) aj. [41,42] Předpokládá se, že převládá spíše adheze na proteiny hostitele než přisedáním bakteriálních buněk na povrch. Proteiny nejprve pokryjí povrch a poté dochází k interakci proteinu s povrchovou strukturou stafylokoků. [43]

Ve druhé fázi, akumulace a maturace, dochází ke shlukování stafylokokových buněk, k produkci velkého množství EPS a také k množení bakterií. Vytváří se mikrokolonie a později dochází k tvorbě mnohvrstevného zralého biofilmu. EPS umožňuje agregaci jednotlivých bakteriálních buněk do mikrokolonií, současně tyto buňky obklopuje a určuje vlastnosti biofilmu. [44]

Poslední fází je disperze, kdy dojde k uvolnění buď jednotlivých buněk, nebo shluků buněk z biofilmu. Na fázi disperze se podílí řada faktorů, jako je velká tloušťka biofilmu, velké množství EPS nebo tzv. tečení biofilmu, při kterém se biofilm pohybuje po povrchu na základě mechanického podnětu. Struktura biofilmu může být také narušena změnou mikroprostředí ve vrstvách biofilmu, nahromaděním odpadních látek či nedostatkem živin a kyslíku. [45,46]

2.2.1.2 *Quorum sensing u stafylokoků*

QS je u stafylokoků kódován souborem genů na chromozomu v oblasti zvané *agr* (accessory gene regulator) lokus. Jedná se o genový regulátor, který u *S. aureus* a *S. epidermidis* kontroluje expresi genů kódujících převážně toxiny a faktory virulence (včetně tvorby biofilmu). [47,48] QS systém *agr* je u stafylokoků tvořen dvěma operony RNA II a RNA III, u kterých je transkripce *agr* lokusu řízena dvěma promotory P2 a P3. [49] Promotor P2 kontroluje transkripci operonu RNA II, který zahrnuje čtyři geny, a to *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*. Promotor P3 kontroluje transkripci operonu RNA III, který představuje efektorový aparát *agr* QS systému, jedná se především o geny kódující exotoxiny a exoproteiny. Tvorba exotoxinů a exoproteinů vede ke zvýšení tvorby biofilmu. Geny *agrB* a *agrD* vytváří produkty, které se podílejí na tvorbě signální molekuly tzv. autoindukčního peptidu (feromon). Jedná se o cyklický peptid, který má ve své molekule thionolaktonovou strukturu. Gen *agrB* transportuje vzniklý feromon *agrD* extracelulárně. Je známo více autoindukčních peptidů, které se liší složením, délkou a jsou druhově specifické. U *S. aureus* byly popsány čtyři skupiny autoindukčních peptidů. Autoindukční peptid jednoho druhu stafylokoka může působit inhibičně na jiné stafylokoky, nejsou tedy vzájemně kompatibilní. [22] V závislosti na druhu stafylokoka dochází ke změně aminokyselinové sekvence (tzn. v primární struktuře) autoindukčního peptidu, ale thionolaktonová cyklická struktura zůstává zachována. [50]

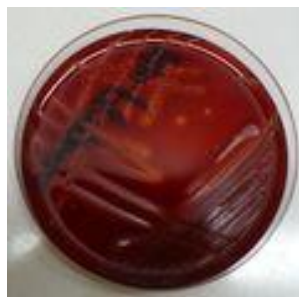
Promotor P2 má velmi nízkou aktivitu, což vede ke stálému hromadění feromonu v okolním prostředí buňky. Jakmile dojde k překročení této koncentrace nad prahovou hodnotu, aktivuje se *agrC* protein, kterým je transmembránová histidinkináza. *AgrC* protein aktivuje protein *agrA* v cytoplasmě (cytoplasmatický regulátor), který poté zvyšuje činnost promotorů P2 a P3. Aktivací promotoru P2 dojde ke zvýšení transkripce *agr* operonu a tím ke zvýšení tvorby autoindukčního peptidu a k amplifikaci signálu. Aktivace promotoru P3 vede k transkripci úseku DNA. Systém *agr* QS ovlivňuje expresi faktorů virulence a tím i onemocnění způsobené stafylokoky. I přesto, že *agr quorum sensing* systém vytváří centrální úlohu při regulaci stafylokokové patogeneze, byly popsány i další regulační systémy faktorů virulence, které vytváří komplex regulačních systémů umožňující bakteriím reagovat na signály z vnějšího prostředí a ovlivňovat aktivitu *agr quorum sensing* systému. [22]

Dalším QS systémem u stafylokoků je *luxS*, který se vyskytuje jak u grampozitivních, tak u gramnegativních bakterií. [48] *Quorum sensing luxS* umožňuje mezidruhovou komunikaci. [47] Byly zkoumány účinky *luxS* u stafylokoků, převážně u *S. epidermidis*, u kterého byl

tento gen nalezen, a bylo zjištěno, že mutantní bakterie v genu *luxS* produkovaly silnější biofilm. Také byla prokázána vyšší virulence u kmenů *S. epidermidis* mutantních v genu *luxS*, která souvisí s vyšší tvorbou biofilmu. [48]

2.2.2 Rod *Streptococcus*

Mezi nejvýznamnějšího streptokoka tvořící biofilm řadíme *Streptococcus pyogenes*. Objevuje se spíše v klinickém prostředí, kde vytváří biofilmy na kloubních náhradách, katetrech aj. Z morfologického hlediska se jedná o grampozitivní bakterii vytvářející řetízky, která může být původcem streptokokových infekcí. [51]



Obr. 4: *Streptococcus pyogenes* na krevním agaru [113]

2.2.2.1 Quorum sensing u streptokoků

Tvorba biofilmu u streptokoků je hlavním faktorem zvýšené virulence. S tvorbou biofilmu souvisí Com (competence) QS regulační systém, který je kódován geny uspořádaných na chromozomu ve dvou operonech, a to *comCDE* a *comAB* lokus a samostatně je umístěn gen *comX*. Gen *comC* kóduje signální peptid (CSP – tzv. competence simulating peptide), který je upravován a transportován pomocí proteinů, které jsou kódovány *comAB* lokusem. Signální peptid se hromadí v okolí buňky a překročení koncentrace vede k aktivaci transmembránové histidinkinázy *comD*, která fosforyluje s regulátorem *comE* v cytoplasmě. Fosforylovaný *comE* zvyšuje aktivaci *comCDE* a *comAB* operonů a také genu *comX*. Takto je zvýšena syntéza CSP signálního peptidu, který je nezbytný pro tvorbu zralého biofilmu. Zablokování funkce jednotlivých složek vede k tvorbě abnormálního biofilmu. Hromadění CSP a zvýšená tvorba biofilmu vede ke zvýšenému vychytávání cizorodé DNA buňkami, ke genetické kompetenci buněk a také je zvýšená odolnost k nízkému pH. Adaptace streptokoků k nižšímu pH ($\text{pH} < 4$) je nezbytnou podmínkou k přetrvání biofilmu a k jeho další tvorbě a vývoje. [22]

2.2.3 *Escherichia coli*

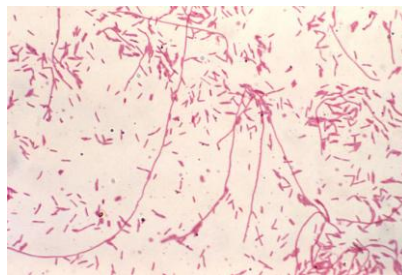
Escherichia coli je fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která se vyskytuje v tlustém střevě teplokrevných živočichů. Její přítomnost je důležitá pro správný chod trávicích procesů ve střevě. *Escherichia coli* vytváří biofilm na dně řek, jezer a v nádržích s pitnou vodou. Ve vodě slouží jako indikátor fekálního znečištění, pokud je ve vodě prokázána její přítomnost, jedná se o vodu nepitnou. Některé kmeny *E. coli* mohou být za určitých podmínek patogenní a způsobují závažná onemocnění. *E. coli* se rovněž využívá v biotechnologii (příprava enzymů, inzulínu), jako modelový organismus v genetice a pro přenos rekombinační DNA do jiného organismu aj. [37]



Obr. 5: *Escherichia coli* na krevním agaru [113]

2.2.4 *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila je gramnegativní, pohyblivá, aerobní, tyčinkovitá bakterie. *L. pneumophila* je jako jediná bakterie charakterizována tím, že ve své buněčné stěně obsahuje rozvětvené 2,3-dihydroxy-mastné kyseliny. Legionely rostou na živné půdě s vysokým obsahem aktivního uhlí. Legionely se vyskytují ve vodách, přírodních vodních rezervoárech a v průmyslových vodách. *Legionella pneumophila* vytváří biofilm například v klimatizačním zařízení, vodních tocích, v rozvodech pro teplou vodu, v jezerech, nádržích aj. Mohou být původci velmi vážného onemocnění tzv. legionelózy a vytváří 2 typy onemocnění, tzv. Legionářskou nemoc nebo Pontiackou horečku. [52,53]



Obr. 6: *Legionella pneumophila* [114]

2.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa řadíme mezi gramnegativní, aerobní, nefermentující bakterii. Nejčastější výskyt *P. aeruginosa* je v odpadních vodách, v půdě a na rostlinách, kde může kolonizovat. Kolonizuje také na močovém ústrojí a dýchací sliznici, kde může způsobovat infekci. Jedná se tedy o patogenní mikroorganismus, který způsobuje infekce především u člověka, např. s oslabenou imunitou, s těžkým základním onemocněním (*diabetes mellitus*, cystickou fibrózou plic aj), s popáleninami. Velké množství pseudomonád má schopnost vytvářet biofilm, díky kterému mohou přežívat například v nádobách na výrobu léčiv, nádoby s amoniiovými sloučeninami nebo na lahvích s balenou minerální vodou. Pseudomonády jsou velmi dobře odolné vůči účinku antibiotik (penicilin, beta-laktamová antibiotika), které jsou schopné dostat z buňky velmi rychle ven do vnějšího prostředí. Tvorba biofilmu tuto odolnost zvyšuje. [54,55]



Obr. 7: *Pseudomonas aeruginosa* na krevním agaru [113]

2.2.5.1 *Tvorba biofilmu u Pseudomonas aeruginosa*

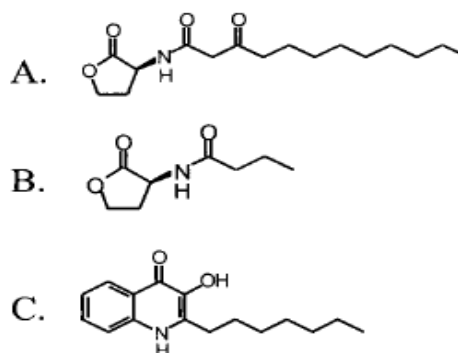
Vznik biofilmu sestává z pěti kroků, během nichž dojde k expresi více jak 800 proteinů. [56]

1. fáze: Reversibilní přilnutí, během kterého se buňky přechodně fixují k substrátu, genová exprese ústí do tvorby proteinového profilu, který je odlišný od planktonních buněk.
2. fáze: Ireversibilní přilnutí, během kterého u buněk dochází k reorientaci, shlukování, ztrátě pohyblivosti a aktivaci *quorum sensing*.
3. fáze: Maturace I, kdy vytvořené buněčné shluky jsou silnější a je aktivován systém *rhl QS*.

4. fáze: Maturace II, kdy buněčné shluky s proteinovým profilem dosahují maximální tloušťky.
5. fáze: Disperze, během které dochází ke změně struktury shluků buněk a formují se póry a kanálky. V této fázi je přítomnost pohyblivých i nepohyblivých buněk. [56]

2.2.5.2 *Quorum sensing bakterie Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa využívá dvou propojených QS systémů, a to *las* a *rhl*. Tyto systémy slouží ke kontrole vzniku biofilmu, expresi faktorů virulence, například exoenzymů (např. alkalická proteasa), sekundárních metabolitů, toxinů a lektinů. [57,58] Patogenní *Pseudomonas aeruginosa* produkuje dva typy autoinduktorů acylhomoserinlaktónů (acyl-HSL). Jedná se o *lasI*, která katalyzuje syntézu N-(3-oxododekanoyl)-L-homoserinlaktónu (3-oxo-C₁₂-HSL) a *rhlI*, který řídí syntézu N-butanoyl-L-homoserinlaktónu (C₄-HSL). Tyto vzniklé signální molekuly se poté navážou na transkripční faktor (*lasR/rhlR*) a aktivují ho. Později byla zjištěna další signální molekula, 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon, která vyvolává expresi *lasB* kódujícího virulentní faktor *lasB* elastasu. [59]



Obr. 8: Chemická struktura signálních molekul [59]

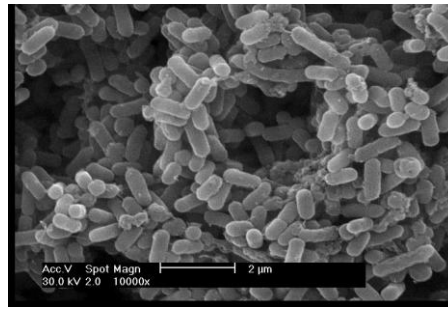
(A) *N*-(3-oxododekanoyl)-*L*-homoserinlaktón. (B) *N*-butanoyl-*L*-homoserinlaktón.
(C) 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon.

2.2.6 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes patří mezi jedny z nejzávažnějších alimentárních patogenů, které mohou způsobit závažná onemocnění (listeriózu). Je řazena mezi fakultativně anaerobní, nesporotvorné, grampozitivní tyčinky. *L. monocytogenes* se běžně vyskytuje v půdě, povrchových vodách, odpadech, na rostlinách, dále se může vyskytovat ve střevním traktu

zdravých lidí, hospodářských zvířat, ryb a hlodavců. V potravinářském průmyslu nejčastěji kontaminuje syrové maso, vařené masné výrobky, syrovou zeleninu, uzené ryby, syrové mléko, mléčné výrobky (zejména sýry zrající pod mazem, s plísní na povrchu nebo v těstě) a lahůdkářské výrobky. [60] Díky tvorbě biofilmu dokáže *L. monocytogenes* překonat i extrémní podmínky prostředí. Může růst při teplotě v rozmezí 1-45 °C, vyskytuje se při pH v rozmezí 4,3 až 9,6, dokáže přežívat v prostředí s koncentrací až 10 % NaCl, odolává sanitacím a desinfekčním prostředkům. Psychofilní povaha této bakterie je zejména nebezpečná u potravin uložených při chladírenských teplotách, během skladování se může vyskyt i malého množství této bakterie několikrát znásobit. Výskyt listeriózy je nejčastěji spojován se sekundární kontaminací v průběhu nebo po zpracování potravin. *L. monocytogenes* se může vyskytovat v kanalizacích, na dopravnících, prýžkových těsněních, apod. Dodnes není ještě přesně prozkoumán vývoj, zrání a oddělení biofilmu u *L. monocytogenes*. Marsh et al. a Chavant et al. sledovali vývoj biofilmu u této bakterie pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Chae a Schraft popsali pomocí skenovací laserové mikroskopie dvouvrstvou strukturu biofilmu, která sestává z vrchní a spodní vrstvy, které obsahují 105 buněk/cm². Některé kmeny *L. monocytogenes* mohou přežívat několik měsíců nebo dokonce i několik let. Na tvorbu biofilmu u *L. monocytogenes* má vliv životní prostředí, ve kterém se vyskytují (teplota, pH), stres a také povrch, na který adherují. Bylo prokázáno, že *L. monocytogenes* adheruje na širokou škálu povrchů, jako jsou například povrchy z nerezové oceli, pryže, polymery, plasty a sklo. Nerezová ocel je jeden z nejpoužívanějších materiálů v potravinářství a současně nejvíce vyhovuje listeriím pro jejich přilnutí. Meylheuc et al. popsali inhibiční působení kaučuku na tvorbu a růst biofilmu *L. monocytogenes*. Výsledky ze současných studií ukazují, že *L. monocytogenes* preferuje tvorbu biofilmu za relativně vysokého množství živin. [61]

V mlékárenských závodech byla izolována *L. monocytogenes* z plnicích nebo balících linek, odpadů vody v podlahách, ze stěn, chladících trubek, dopravních pásů nebo například z ručních nástrojů a rukavic. [62]

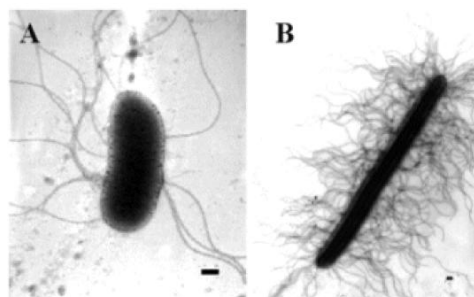


Obr. 9: Struktura biofilmu u *Listeria monocytogenes* [61]

2.2.7 *Proteus*

Bakterie rodu *Proteus* jsou řazeny do čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakterie byla popsána v roce 1885 německým patologem G. Hauserem. Jedná se o gramnegativní, nesporulující a fakultativně anaerobní bakterie. [63] *Proteus* se nejčastěji vyskytuje v půdě, ve vodě a odpadním kalu. Mezi nejznámější patří *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*, které se mohou vyskytovat v trávicím traktu člověka. [64] V současné době se řeší problém jejich rezistence k antibiotikům (ATB), která je způsobena změnou propustnosti membrány a čerpáním antibiotik z buňky. [65]

Tvorba biofilmu u rodu *Proteus* je ovlivněna hodnotnou pH, kdy při vysokém pH lépe adherují bakteriální buňky. Pokud je prostředí chudé na živiny, pak je vytvořený biofilm velmi tenký. *Proteus* je významný tím, že má schopnost tvořit populaci plazivých buněk, které se dále uvolňují do prostředí a dochází k další kolonizaci. [66]



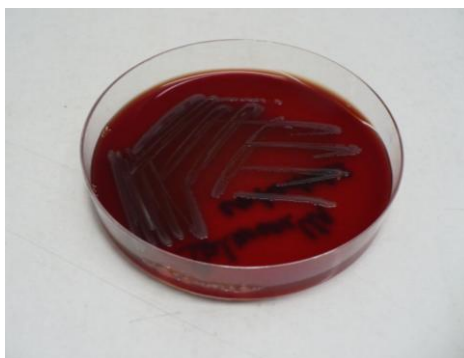
Obr. 10: Buňky bakterie *Proteus mirabilis* [64]

2.2.8 *Salmonella sp.*

Salmonely patří mezi nejvýznamnější patogeny, které způsobují tyfus a alimentární onemocnění, tzv. salmonelózy (průjmové onemocnění). Rod *Salmonella* se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní, nesporulující gramnegativní tyčinky. V současné době spolu s kampylobakteriemi jsou považovány za nejčastější původce bak-

teriálních střevních nákaz. V potravinářském průmyslu mají významnou vlastnost, a to přilnout k povrchu za tvorby biofilmu. Díky tomu jsou salmonely velmi dobře odolné vůči antimikrobiálním a desinfekčním látkám, bez tvorby biofilmu jsou na tyto látky citlivé. Salmonely se běžně vyskytují v zažívacím traktu ptáků, hmyzu, zvířat i člověka. Jsou vyřizovány fekáliemi a snadno dochází ke kontaminaci potravin a životního prostředí. V potravinách se nejčastěji vyskytují u vajec. U člověka bývá příčinou salmonelózy kromě vajec také syrové maso, nejčastěji vepřové a drůbeží. Mohou být také kontaminovány cukrářské a lahůdkářské výrobky, u kterých bývá kontaminace způsobena nedostatečnou hygienou (podíl ruční práce) nebo také syrové mléko. [67]

Podle systému RASFF (systém kontroly potravin a krmiv) bylo v roce 2009 prokázáno, že salmonely nejčastěji kontaminují drůbeží maso. Z drůbeže bývá nejčastěji izolována *Salmonella enterica*, u které nebyla schopnost tvorby biofilmu detailně prozkoumána. Dále bylo zjištěno, že salmonelám, pro tvorbu biofilmu, nejvíce vyhovují povrchy z polystyrenu. Metodou dle Stepanovice et al. bylo zjištěno, že schopnost tvorby biofilmu na polystyrenovém povrchu má nejvíce *Salmonella enterica*, což vede k obavám, jelikož plasty jsou používány na farmách, jatkách, v potravinářském průmyslu, v kuchyních a například v nádržích. Dále bylo zjištěno, že tvorba biofilmu na povrchu ze skla nebo nerezové oceli byla mnohonásobně nižší. Pui et al, uvádí, že tvorba biofilmu závisí na daném sérotypu bakterie, například bylo zjištěno, že *Salmonella* Typhimurium má nejmenší schopnost produkce biofilmu, naopak největší produkce biofilmu byla zaznamenána u *Salmonella* Typhi. [68]



Obr. 11: *Salmonella enteritidis* na krevním agaru [113]

2.2.9 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus spadá do čeledi *Bacillaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní, sporotvornou, grampozitivní tyčinku. *Bacillus* produkuje celou řadu toxinů a enzymů (např. emetický toxin, enterotoxiny, hemolysin, enzymy s proteolytickou, lipolytickou a amylolytickou aktivitou), které se uplatňují při kažení potravin. *B. cereus* je tedy původcem kažení potravin, zejména mléčných výrobků (sladké srážení mléka, hořknutí smetany). Má schopnost produkce termorezistentních spór, díky kterým se podílí na kažení pasterovaných výrobků. Kažení potravin je umožněno celou řadou enzymů, mezi nejvýznamnější patří proteázy, které degradují želatinu a kaseiny, dále amylázy, které hydrolyzují škrob, a lipázy, které degradují triacylglyceroly. Konzumace potravin, které jsou kontaminovány bacilem, mohou vést k alimentárnímu onemocnění. Jelikož přežívají vysoké teploty používané při výrobě potravin a pokrmů, je vhodným preventivním opatřením skladování potravin za podmínek, při kterých nedojde k vyklíčení spór. Spóry bacila se běžně vyskytují v půdě, prachu a vodě. *Bacillus* patří mezi bakterie, které nejčastěji kontaminují mléko, maso a potraviny rostlinného původu. [69]

Tvorba biofilmu u *Bacillus cereus* je považována spíše za strategii přežití, než za faktor virulence. Hornstra et al. prokázali, že vyprodukované spóry se lépe přichytí k povrchu a vytvoří biofilm jako vegetativní buňka. S tím také souvisí fakt, že na tvorbu biofilmu má vliv přítomnost živin v prostředí. Nižší koncentrace živin v prostředí podporuje vyšší tvorbu biofilmu právě díky produkci spór, aby bacilus dokázal přežít. [70]



Obr. 12: *Bacillus cereus* na krevním agaru [115]

3 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU

V potravinářském průmyslu jsou kladeny vysoké nároky na sanitační a desinfekční postupy, ovšem i přesto může dojít ke kontaminaci bakteriemi, například z důvodu nedokonale vyčištěného nebo vysterilizovaného zařízení, kontaminace pocházející ze vzduchu nebo personálu. Jednou z možných příčin může být kontaminace biofilmem na kontaktních površích, a to z toho důvodu, že bakterie tvořící biofilm jsou odolnější vůči desinfekčním látkám. [71] V potravinářském průmyslu se nejvíce používají povrchy hydrofobní (polystyren) nebo hydrofilní (nerezová ocel). Tvorba biofilmu v potravinářském průmyslu představuje určité zdravotní riziko, například byla v potravinářském průmyslu po desinfekci zjištěna přítomnost patogenních mikroorganismů *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*. V potravinářském průmyslu se mohou vyskytovat i jiné patogenní bakterie, například *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* aj. Výskyt biofilmu v potravinářském průmyslu může také vést k omezení tepelné výměny či korozi zařízení, což vede k energetické, produktové a ekonomické ztrátě, dále mohou být rozkládány plasty nebo může dojít k ucpávání filtrů. [72]

Prostředí v potravinářském průmyslu poskytuje mnoho podmínek, které by mohly podporovat tvorbu biofilmu, například vlhkost, přítomnost živin a inokula mikroorganismů ze surovin. Výskyt biofilmu v potravinářství může být potenciálním zdrojem kontaminace potravin, které může vést ke kažení nebo přenosu patogenních bakterií, které mohou být přenášeny potravinami. Dojde také k oddělení biofilmu od abiotického povrchu a mikroorganismy se mohou snadno rozšířit. [73]

3.1 Význam biofilmu v potravinářství

Patogenní mikroorganismy se mohou v potravinářském průmyslu přichycovat na pevné kontaktní povrchy ze skla, z nerezové oceli, ze dřeva, z teflonu, z polymerů a také se může vytvářet na gumových površích. Pro zjištění výskytu biofilmu na površích v potravinářství se využívá světelné a skenovací mikroskopie. [74] Mimo přilnutí k povrchu je velmi nebezpečné uvolnění velkých shluků buněk odpovídajících infekční dávce do protékajícího média, například vody, mléka aj. [72] Bakterie nebo jejich shluky mohou být unášeny v protékajícím médiu (voda, mléko, rostlinné šťávy) nebo se mohou uchytit na vlhkých polotovarech a potravinách, a tím dochází k mikrobiální kontaminaci dalších povrchů nebo ke kontaminaci přímo na potravině. Většinou se uvolňují malé shluky buněk, byly ovšem

objeveny i velké agregáty buněk o velikosti 500 μm , které představují velké riziko s ohledem na velikost infekční dávky. Po předchozích studiích bylo několikrát prokázáno, že se v potravinářském průmyslu vyskytují bakterie žijící v biofilmu. Například byl objeven v mlékárně po sanitaci povrchu postpasterizační jednotky, kde byl zjištěn výskyt rodů *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a také gramnegativní *Shigella*, *Escherichia* a *Enterobacter*. Případy poškození zdraví konzumentů se ovšem objevují jen výjimečně, kde například v Japonsku v roce 2000 propukla krize kvůli výskytu termorezistentního toxinu bakterií *Staphylococcus aureus*, která rostla v kohoutku potrubí potravinářského podniku pro zpracování mléka. [74]

3.2 Místa výskytu biofilmu v potravinářství

Z hlediska výskytu biofilmu jsou problematické povrchy z měkkého materiálu, které se snadněji poruší, například při řezání nožem. Na takových površích se snadno uchytlí patogenní MO nebo dochází k tvorbě tzv. kondičních filmů, na kterých se následně uchytlí patogeny. Při testování domácností byl biofilm objeven převážně na dřevěných površích, v mycích houbičkách a vlhčených utěrkách. V potravinářských podnicích se biofilm také velmi často vyskytuje na dopravních pásech, kde jsou výrobky v přímém kontaktu s mikrobiálně kontaminovaným povrchem. Například byl zjištěn výskyt bakterií *S. aureus* a *Pseudomonas* spp. na dopravním pásu po sanitaci v mlékárně, kde byl povrch kontaminován 10^5 - 10^6 CFU/100 cm^2 . Zdrojem mikrobiální kontaminace může být i bioaerosol, kdy bakterie jsou zachyceny do kapalinových částic. Odpady nebo podlahy, které mají zdrsňný povrch nebo jsou poškozeny, mohou obsahovat bakterie, které se působením proudem vody a vzduchu uvolnily z biofilmu. Takové povrchy jsou mikrobiálně kontaminovány až 10^8 CFU/100 cm^2 . Například v masném nebo mlékárenském průmyslu byly z těchto míst izolovány zdravotně závadné pseudomonády, stafylokoky a *Listeria monocytogenes*. Z těchto důvodů se v potravinářství nejvíce využívají povrchy z nerezové oceli, která je snadno čistitelná a chemicky odolná. Ovšem po delší době se může také opotřebovat a narušit mechanickým čištěním za vzniku trhlinek nebo vrypů, kde se zachytí dané mikroorganismy nebo zbytky surovin. Přichycení bakterií na nerezový povrch je podmíněno daným mikroorganismem a také vlastnostmi povrchu. EPS produkovaná jedním mikroorganismem může poskytovat vhodné prostředí pro adsorpci a vývoj jiného mikroorganismu. [74]

3.2.1 Inaktivace mikroorganismů v biofilmu

Biofilm jde z potravinářských kontaktních povrchů obtížně inaktivovat. Bylo prokázáno, že bakterie žijící v biofilmu vykazují zvýšenou rezistenci k čistícím a desinfekčním látkám. Zvýšená rezistence je dána vlastnostmi mikroorganismů (např. růstová fáze), dále produkcí degradujících enzymů a strukturou biofilmu. Desinfekční a sanitační schopnost látek je ovlivněna adsorpcí buněčné populace v biofilmu. U bakterií tvořících biofilm bylo také zjištěno, že ovlivňují biocidní efektivitu látek, například u bakterie *Escherichia coli* O157:H7 byla zjištěna zvýšená rezistence k chlóru. Dále bylo zjištěno, že se na površích uchytávají také organické a abiotické látky z prostředí, což zvyšuje rezistenci k biocidním látkám. V potravinářských podnicích se k desinfekci běžně používají chlorové desinfekční přípravky a takto je snižována jejich aktivita. Organické látky mají ochrannou funkci biofilmu před působením desinfekčních látek. [74]

Čistící a desinfekční látky musí být takové povahy, aby zohledňovaly specifické vlastnosti prostředí, ve kterém se vytváří biofilm a nesmí být zdravotně škodlivé. V potravinářství je důležitá efektivita čistících prostředků, a to z toho důvodu, že odstraňují nánosy, které chrání biofilm před jejich účinkem. [74]

Používání desinfekčních prostředků v potravinářství podléhá podmínkám uvedených ve veterinárním zákoně č. 166/1999 Sb. a dalším právním předpisům, ve kterých jsou uvedeny podmínky pro uvádění výrobků na trh a nejvyšší přípustné limity reziduí těchto biologicky aktivních látek. Státní veterinární správa s Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv vydává seznam, ve kterém jsou uvedeny desinfekční, desinfekční čistící a čistící přípravky povolené v mlékárenských provozech a provozech zpracovávající maso. [74]

Mezi čistící přípravky patří například alkalické látky saponifikující tuky a oleje, látky solubilizující proteiny nebo chelatující látky, které vážou a odstraňují minerální látky. Desinfekční přípravky jsou nejčastěji na bázi chlóru, jodu, amonných solí a některých kyselin. Jsou studovány fyzikálně chemické a fyzikální faktory, a to pH sanitačních prostředků, síla proudu při čištění a termodynamické podmínky. Dále jsou zkoumány různé kombinace čistících a desinfekčních prostředků, které by mohly inaktivovat vyskytující se mikroflóru nebo způsobit uvolnění mikroorganismů od povrchu. V kombinaci kyselých a alkalických přípravků bylo prokázáno ovlivnění životnosti MO, což snížilo rozšíření kontaminace. [74]

3.3 Pozitivní účinek biofilmu

Mikroorganismy mohou způsobovat kažení potravin a vytvářet různé toxické látky. Kromě těchto nežádoucích MO se ovšem vyskytují bakterie, které pozitivně ovlivňují chuťové i technologické vlastnosti potravin (fermentované potraviny, například chléb, jogurty a sýry, dále fermentované nápoje). Fermentace se podílí na zvýšené údržnosti potraviny a vede k tvorbě charakteristické chuti a vůně. Nejznámějšími mikroorganismy podílející se na fermentaci jsou kvasinky, které se například podílí na výrobě chleba, pečiva. Z bakterií mají pozitivní účinek bakterie mléčného kvašení (BMK), díky kterým se vyrábí fermentované mléčné produkty, např. sýry. Bakterie mléčného kvašení vytváří typické sensoricky aktivní látky, prodlužují tržnost potravin a inhibují škodlivou mikroflóru. BMK se dále mohou uplatňovat v probiotických kulturách, které se používají na výrobu potravinových doplňků nebo zvyšují činnost přirozené mikroflóry přítomné v trávicím traktu. [75]

3.3.1 Probiotický kmen *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* Nissle 1917 nevykazuje patogenní vlastnosti a je považována za probiotickou. Nepatogenní vlastnosti prokázal Alfred Nissle v roce 1917 a zároveň zjistil, že tento kmen potlačuje růst enterobakterií díky produkci mikrocinů, které je potlačují. Na chromozomu bakterie jsou zachyceny tzv. genomické ostrovy (GEI), na kterých se vyskytují genové shluky, které kódují produkci těchto mikrocinů. [76] V současné době patří tento kmen k nejlépe popsáným probiotickým bakteriím, které splňují všechny požadavky na bezpečnost a mohou být podávány i ve vyšších dávkách, aniž by vykazovaly patogenitu. [77] Bezpečnost *E. coli* Nissle 1917 byla zkoumána pomocí molekulárně-genetické a biochemické typizace (pomocí PCR), při které byly analyzovány kryptické plastidy a definován sérotyp (O6:K5:H1). [78] Je popsáno několik modelů účinku tohoto kmene, mezi které patří úprava imunitního systému hostitele, přímý účinek na jiné mikroorganismy, které může ovlivnit nebo změnit nebo může změnit produkty hostitele a některých složek potraviny. [79] V dnešní době se tento kmen využívá především jako probiotikum pro léčbu zánětlivých střevních onemocnění, při trávicích potížích, pro léčbu Crohnovy nemoci, dále zabraňuje kolonizaci patogenních bakterií ve střevě u novorozenců, napomáhá rozvoji střevního imunitního systému. [80] Mechanismus probiotické aktivity u *E. coli* Nissle 1917 je ovlivněn především jejím metabolismem, DNA nebo peptidoglykany. [79] *E. coli* Nissle 1917 vykazuje imunomodulující vlastnosti díky obsahu speciálních lipopolysacharidům na její vnější membráně. [76]

Probiotický kmen *E. coli* Nissle 1917 vytváří biofilm na polystyrenovém a skleněném povrchu v proudící tekutině. Probiotické kmeny v kultivačním médiu vytváří pouze jednodruhový biofilm, a to lépe a rychleji jak patogenní *E. coli*. [81]

3.3.2 Probiotický rod *Lactobacillus*

Laktobacily řadíme mezi grampozitivní, fakultativně anaerobní tyčinky, které mohou vykazovat vlastnosti probiotik. [82] Mezi nejlépe zkoumaný probiotický kmen patří *L. rhamnosus*, u kterého byla prokázána tvorba biofilmu na polystyrenových matricích, kde jako kultivační prostředí sloužilo trypton sojové médium nebo médium s kyselinou listovou. Tento kmen tvořil také biofilm v MRS médiu bez přídavku glukózy. V MRS bujónu vytvářely biofilm také *L. reuteri*, *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *L. brevis* a *L. fructivorans*. Tyto laktobacily vytvářely biofilm na skleněných sklíčkách v mikrotitrační destičce. [83] Bylo prokázáno, že tvorba biofilmu u *L. rhamnosus* závisí na médiu a na podmínkách vnějšího prostředí. Tvorba biofilmu u probiotických bakterií je různá dle jednotlivých kmenů. [84]

Při vzniku biofilmu hraje také důležitou roli QS, kde byla zjištěna přítomnost genů *luxS* a signální molekuly AI-2 u probiotických kmenů *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium longum*. Gen *luxS* ovlivňuje metabolismus probiotických laktobacilů. [85]

3.4 Biofilm a pitná voda

V potravinářském průmyslu se běžně používá pitná voda, například jako surovina pro technologickou výrobu, pro čištění zařízení, strojů a výrobních prostorů. Z tohoto důvodu musí splňovat hygienické a legislativní požadavky na zdravotní nezávadnost. Pitná voda musí být zdravotně nezávadná, aby nedošlo ke kontaminaci mikroorganismy. Nádrže na pitnou vodu jsou nejvíce kontrolovanými oblastmi. Mezi mikroorganismy tvořící biofilm ve vodě řadíme převážně plísně, enterokoky a pseudomonády. [86] V pitné vodě se nesleduje pouze obsah patogenních MO, ale sleduje se především výskyt indikátorových mikroorganismů.

Parametry pro pitnou vodu jsou dány vyhláškou č. 293/2006 Sb. a č. 187/2005 Sb., kterými se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. [87]

Tab. 1: Mikrobiologické a biologické ukazatele pitné vody a jejich hygienické rozsahy

č.	ukazatel	jednotka	limit	typ limitu	vysvětlivky
1	<i>Clostridium perfringens</i>	KTJ/100 ml	0	MH	1
2	enterokoky	KTJ/100 ml	0	NMH	
		KTJ/250 ml	0	NMH	2
3	<i>Escherichia coli</i>	KTJ/100 ml	0	NMH	
		KTJ/250 ml	0	NMH	2
4	koliformní bakterie	KTJ/100 ml	0	MH	
5	mikroskopický obraz – abioseston	%	10	MH	3,4
6	mikroskopický obraz – počet organismů	jedinci/ml	50	MH	3,4
7	mikroskopický obraz – živé organismy	jedinci/ml	0	MH	3,5
8	počet kolonií při 22 °C	KTJ/ml	200	MH	6
		KTJ/ml	500	NMH	2
9	Počty kolonií při 36 °C	KTJ/ml	100	MH	7
		KTJ/ml	20	NMH	2
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ/250 ml	0	NMH	2

KTJ – kolonie tvořící jednotku

NMH – nejvyšší mezní hodnota = „hodnota, jejíž překročení vylučuje užití vody jako pitné.“

MH – mezní hodnota = „hodnota, jejímž překročením ztrácí voda vyhovující jakost.“ Její překročení nepředstavuje akutní zdravotní riziko. [87]

4 METODY STANOVENÍ BIOFILMU

Pro průkaz tvorby biofilmu byla vyvinuta celá řada metod, které lze rozdělit na metody fenotypové a genotypové. Genotypové metody slouží k určení genu, který je zodpovědný za adhezi bakteriálních buněk k povrchu nebo za syntézu extracelulární matrix. Skutečná tvorba biofilmu se ovšem dá prokázat pouze fenotypovými metodami. [88]

4.1 Fenotypové metody pro stanovení biofilmu

Výskyt biofilmu lze prokázat pomocí mikroskopických technik nebo pomocí kultivačních metod, které prokazují tvorbu biofilmu na kultivačním médiu (Christensenova zkumavková metoda). Na agaru s kongo červení lze stanovit základní stavební složky biofilmu, například u stafylokoků lze stanovit přítomnost EPS. [89]

4.1.1 Mikroskopické metody

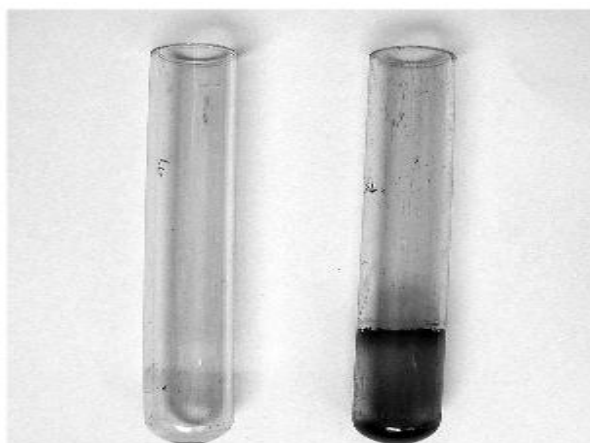
Mezi nejpoužívanější mikroskopické metody patří optická mikroskopie, která se používá pro určení adheze bakterií k průhlednému podkladu. Strukturu biofilmu a bakteriální buňky lze zvýraznit různými vhodnými barvivými, které se na ně navážou. [89] Optickou mikroskopií lze použít na tenké biofilmy, řádově do několika mikrometrů. Mezi další metodu pro stanovení biofilmu řadíme fluorescenční mikroskopií, kterou lze vizualizovat vytvořený biofilm, jeho jednotlivých složek, slouží k posouzení metabolické aktivity buněk uvnitř biofilmu a k určení životaschopnosti bakteriálních buněk, například odlišení mrtvých buněk od vitálních pomocí barviv (akridová oranž, etidiumbromid). [90]

Laserovou mikroskopií lze stanovit biofilm o tloušťce větší než 3 – 4 μm . Výhodou laserové mikroskopie je, že poskytuje dobrý a ostrý obraz a umožňuje nám zobrazit průřez biofilmem. Elektronová mikroskopie se používá v klinické mikrobiologii pro průkaz biofilmu na povrchích implantátů. [91]

4.1.2 Christensenova zkumavková metoda

Princip této metody spočívá na schopnosti bakterií vytvářet biofilmovou vrstvu při kultivaci za vhodných podmínek na stěně kultivační nádoby. Bakterie tvořící biofilm je považována za biofilm pozitivní, biofilm negativní kmeny vrstvu netvoří. Nejčastěji používaným materiálem pro kultivaci je sklo a tvrzený polystyren, může se použít i jiný materiál, například polypropylen nebo polyvinylchlorid. Typ materiálu hraje velkou roli při adhezi k povrchu a následné tvorbě biofilmu. [92] Tvorba biofilmu je ovlivněna přidávkem sacha-

rosy, etanolu, vyšším přídatkem NaCl a stresem MO. Kultivace biofilmopozitivního kmene probíhá většinou ve zkumavce s bujónem TSB (tryptonsojový bujón) nebo BHI (mozko-srdcová infuze). Do média se většinou přidává sacharosa z toho důvodu, že podporuje tvorbu biofilmu. Délka inkubace bývá většinou 24 až 48 hodin při 37 °C (u kvasinek se volí teplota nižší, a to 30°C). [93] Po kultivaci je provedeno následné obarvení biofilmové vrstvy (krystalová violet, safranin nebo alciánová modř). Bakterie jsou hodnoceny jako biofilmopozitivní, pokud na zkumavce vytváří dobře patrnou obarvenou vrstvu. Bakterie biofilmnegativní nevykazují žádnou obarvenou vrstvu na stěně zkumavky. Hodnocení výsledků je bohužel subjektivní, což může vést k chybám hodnocení. Tvorba biofilmu může být také negativně ovlivněna nedodržením kultivačních podmínek. Díky jednoduchosti patří Christensenova zkumavková metoda k dobře využitelným v běžné laboratoři klinické mikroskopie. [94]

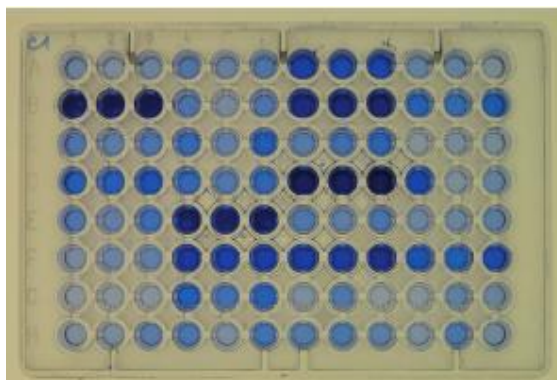


Obr. 13: Průkaz tvorby biofilmu u *Staphylococcus epidermidis* – Christensenova zkumavková metoda. Vlevo biofilmnegativní kmen, vpravo biofilmopozitivní kmen [74]

4.1.3 Christensenova metoda v mikrotitrační destičce

Tato metoda je považována za modifikaci Christensenovy zkumavkové metody. Principem je kultivace testované bakterie v jamkách mikrotitrační destičky v půdě TSB nebo BHI za stejných kultivačních podmínek, čili inkubace po dobu 24 až 48 hodin při 37 °C, v případě kvasinek 30 °C. [89] Po kultivaci je destička vypláchnuta a poté obarvena vhodným barvivem, nejčastěji se používá krystalová violet. [95] Barvivo v jamkách je rozpuštěno etanolem. Nárůst biofilmu je poté hodnocen spektrofotometricky, při vlnové délce 595 – 620 nm a výsledkem je hodnota optické denzity (OD). OD odráží akumulaci barviva na dně jamky

a na jeho stěnách. Hodnota OD jednotlivých jamek je poté porovnána s tzv. cut off value, která je zjištěna z OD jamek z negativní kontroly. Pokud je hodnota OD vyšší jak cut off value, testované bakterie jsou považovány za biofilm pozitivní. Hodnota OD nižší jak cut off value představuje biofilm negativní kmeny. Výhoda oproti Christensenově zkumavkové metodě je přesnost stanovení. [93]



Obr. 14: Christensenova metoda v mikrotitační destičce [89]

4.1.4 Kultivace na agaru s kongo červení

Kongo červeně patří mezi barviva, která se vážou na polysacharidy. Freeman popsal rozlišení stafylokoků na biofilm pozitivní a biofilm negativní podle růstu na tomto agaru. Výsledkem kultivace je typické zbarvení a nárůst kolonií, které jsou černé s matným povrchem, případně mohou být černohnědé s precipitační zónou a s produkcí slizu. Biofilm negativní bakterie vytváří na agaru lesklé kolonie s červeným až červenohnědým zbarvením bez produkce slizu. Nevýhodou této metody je, stejně jako u Christensenovy zkumavkové metody, subjektivita hodnocení, další nevýhodou je, že vzhled kolonií se liší i u stejného kmene na různých druzích agaru s kongo červení. Z těchto důvodů by se tato metoda měla využívat v kombinaci s jinými metodami pro stanovení biofilmu. [88]

4.2 Genotypové metody

4.2.1 Geny zodpovědné za tvorbu biofilmu

Na tvorbě biofilmu se podílí mnoho genů. U některých MO můžeme tyto geny prokázat pomocí metody PCR, některé mikroorganismy ovšem takto stanovit nelze. [96] Průkaz genů tvořících biofilm se používá například u stafylokoků, u kterých se vyskytuje tzv. *ica* operon obsahující geny *icaA*, *icaB*, *icaD*, *icaC* a represivní gen *icaR*. U ostatních mikroorganismů se genetické metody používají spíše k výzkumným účelům. [97]

4.2.2 Průkaz tvorby biofilmu pomocí molekulárně-biologických metod

Real-time PCR je považována za modifikaci PCR (polymerázová řetězová reakce). Jedná se o kvantitativní PCR (qPCR). Tato metoda je vysoce citlivá, jednoduchá a využívá se pro analýzu genové exprese, genotypizaci nebo pro stanovení počtu kopií DNA. [98] K detekci produktu se používají 3 chemické postupy, které jsou založené na použití barviv vázajících se na dsDNA, dále na použití fluorescenčně značených sond nebo fluorescenčně značených primerů. [99] V dnešní době se využívají fluorescenčně značené sondy TaqManTM, které obsahují fluorofor (na 5'konci) a zhášec (na 3'konci). Fluorofor vyzařuje záření s krátkou vlnovou délkou, zhášec vyzařuje záření s delší vlnovou délkou, a to díky tomu, že mu byla od fluoroforu předána energie a tím zároveň bylo jeho záření utlumené. [100] Na komplementární sekvenci přisedá jak sonda, tak i primery. Polymerásou je nově vytvořený řetězec prodlužován, dokud nedorazí k místu, kde je navázána sonda, poté dojde k jejímu uvolnění, ustane záření zhášec a začne se opětovně vyzařovat záření o krátké vlnové délce (fluorofor). Čím vyšší množství PCR produktu, tím vyšší intenzita fluorescence. [99] Pro navázání barviva na dsDNA se používá barvivo SYBR Green, u kterého navázáním dojde ke zvýšení fluorescence a čím vyšší množství produktu PCR, tím se několikanásobně zvýší fluorescenční signál. [101] Signál může být měřen dvěma způsoby, a to kontinuálně nebo na konci elongace. Nevýhodou této metody je, že nedokážeme rozlišit nespecifické produkty PCR nebo dimery primerů. [102] Na začátku reakce se vyskytuje podprahová hodnota, což vede k tomu, že se fluorescence nedá určit, proto se postupně zvyšuje množství produktu PCR a tím dosáhneme detekovatelné hladiny (prahový cyklus), jejichž hodnoty se podle jednotlivých vzorků liší. Hodnoty prahového cyklu se stanovují v exponenciální fázi z toho důvodu, že na reakci působí inhibitory, které vedou ke vzniku neexponenciální fáze. Mezi hlavní přednost qPCR patří stanovení výchozího počtu templátu ve vzorku. [103]

Bakterie *Escherichia coli* produkující shiga toxin (STEC) se řadí mezi alimentární patogeny, které způsobují různá onemocnění. Za primární zdroj STEC jsou považovány přeživší kavi, zejména skot. Z toho důvodu byl nejčastější přenos STEC z kontaminovaného, nedostatečně tepelně upraveného hovězího masa. Nedávné studie ukazují, že některé STEC O157:H7 kmeny mají schopnost se adsorbovat na povrch, kolonizovat na něm a vytvářet biofilm. Přítomnost STEC v potravinářských výrobcích má také schopnost adsorpce přímo na potraviny. Vzhledem k tomu, že STEC může nést genové sekvence, které se mohou podílet na tvorbě biofilmu, byla u těchto kmenů provedena studie. Bylo zkoumáno 51

kmenů STEC izolovaných z potravin a vody. Kmeny byly skladovány při -70 °C v bujónu TSB (trypton sojový bujón), do kterého bylo poté přidáno 15 % glycerolu pro podporu růstu. STEC kmeny byly zjišťovány pomocí PCR na přítomnost genů zodpovědných za virulenci. Uhlich et al. studovali pouze některé kmeny O157 a zjistili, že tyto geny mají schopnost produkce biofilmu, ale nemají schopnost produkce celulosy. Cookson potvrdil teorii, že na tvorbě biofilmu se podílí geny *csgA* a *CRL*. Dále byly testovány 4 kmeny izolované z vody na gen *ehaA* a výsledky ukázaly, že 2 ze 4 kmenů vytvářely silný biofilm. Dále bylo zjištěno, že gen *fimH* se neúčastní tvorby biofilmu. U *E. coli* 473/01 bylo zjištěno, že produkce biofilmu souvisí s tvorbou celulosy. Pro tuto hypotézu by ovšem měly být provedeny další studie. [104]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byl monitoring tvorby biofilmu u izolovaných potravinářsky významných bakterií, které byly izolovány z potravin nebo potravinářských provozů.

Cílem teoretické části bylo:

- definovat biofilm a jeho vznik
- popis formy komunikace mezi bakteriemi
- charakteristika nejvýznamnějších bakterií tvořící biofilm a význam biofilmu v potravinářství
- popis metod, díky kterým lze stanovit výskyt biofilmu

Cílem praktické části bylo:

- zjistit tvorbu biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody
- zjistit tvorbu biofilmu modifikací Christensenovy metody v mikrotitrační destičce
- posoudit rozdíl výsledků mezi těmito metodami
- sledovat vliv vnějších faktorů na schopnost tvorby biofilmu (kultivační teplota, přídavek sacharidů – sacharosy a glukosy, přídavek NaCl),
- na základě výsledků sestavit závěry

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použité mikroorganismy

- kmeny bakterií izolované z bažantů,
- kmeny bakterií (r. *Enterococcus* a r. *Staphylococcus*) izolované z masa králíků,
- kmeny bakterie *Escherichia coli*
- kmeny bakterií izolované ze sýrů
- bakterie ze sbírky Fakulty technologické (včetně bakterií mléčného kvašení)

6.2 Použité pomůcky a chemikálie

Při stanovení produkce biofilmu Christensenovou zkumavkovou metodou byly použity tyto pomůcky:

- automatické pipety o objemu 20 μ l a 100 μ l, zkumavky, kádinky, špičky na pipety a další jednorázové pomůcky z plastů, stojánky na zkumavky, autokláv, očkovací box, termostat, třepačka.

Při stanovení produkce biofilmu v mikrotitračních destičkách byly použity tyto pomůcky:

- automatické pipety o objemu 20 μ l, 100 μ l a 200 μ l, zkumavky, kádinky, špičky na pipety, stojánky na zkumavky, autokláv, očkovací box, termostat, mikrotitrační destičky, spektrofotometr Tecan.

Příprava krystalové violeti:

Bylo připraveno celkové množství krystalové violeti v objemu 500 ml. Byla navážena krystalová violet' v množství 2,5 g. Navážka byla rozpuštěna ve 100 ml etanolu. Takto připravená směs byla rozpouštěna v termostatu při teplotě 37 °C/1 den. Poté byly rozpuštěny 4 g šřavelanu amonného ve 400 ml destilované vody. Obě směsi byly smíchány a poté byla provedena filtrace.

6.3 Kultivace bakterií

6.3.1 Příprava bujónu

Bujón MPB byl připraven z předem vypočítané navážky jednotlivých komponent (5,0 g/l masového peptonu, 1,5 g/l hovězího extraktu, 1,5 g/l kvasničného extraktu a 5,0 g/l chloridu sodného) smícháním s destilovanou vodou. Dále byl připraven bujón MPB s 5% (w/v) sacharosou. Poté bylo do každé zkumavky odpipetováno 3 ml MPB a 3 ml MPB s 5 % sacharosou, zkumavky byly překryty víčky a dány ke sterilaci do autoklávu.

Pro testované bakterie r. *Enterococcus* a *Staphylococcus*, které byly izolovány z králíka, byl stejným způsobem připraven bujón BHI (200,0 g/l telecí mozkové infuse, 250,0 g/l hovězí srdcové infuse, 10,0 g/l proteosového peptonu, 2,0 g/l dextrosy, 5,0 g/l chloridu sodného a 2,50 g/l hydrogenfosforečnanu (di)sodného) a BHI s 5 % sacharosou.

Při sledování tvorby biofilmu v závislosti na vnějších podmínkách byly navíc připraveny bujóny BHI s přídatkem:

- 3 %, 5 % a 7 % (w/v) sacharosy,
- 5 % (w/v) glukosy,
- 5 % (w/v) glukosy a 1 % (w/v) NaCl,
- 3 %, 5 % a 7 % (w/v) sacharosy a 1 % (w/v) NaCl.

6.3.2 Kultivace bakterií

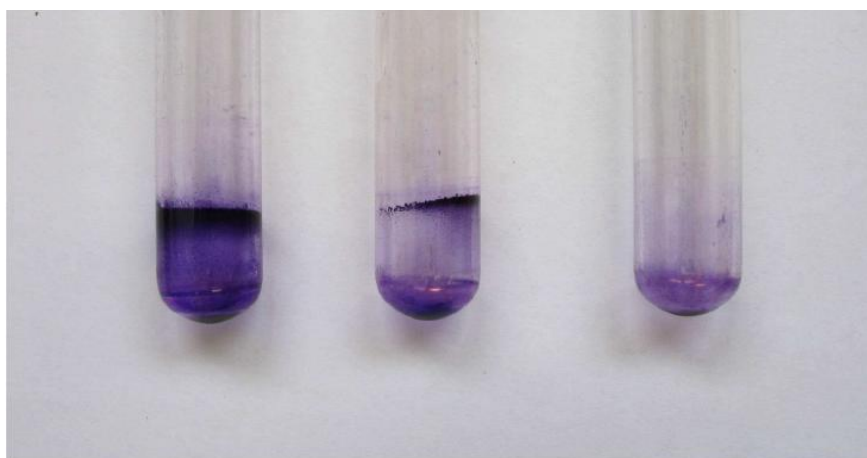
Do připraveného bujónu MPB (BHI) ve zkumavkách bylo automatickou pipetou napipetováno 100 µl testovaných kultur. Naočkované zkumavky byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C / 1 den, aby došlo k jejich pomnožení. Z takto připraveného inokula bylo dvojmo naočkováno 20 µl suspenze testovaných kultur do bujónu MPB (BHI) a MPB (BHI) s 5 % (w/v) sacharosy. Takto připravené zkumavky byly kultivovány v normální atmosféře za intenzivního třepání po dobu 48 hodin.

6.4 Stanovení tvorby biofilmu Christensenovou zkumavkovou metodou

Po 48 hodinové kultivaci bakterií byl obsah zkumavek vylit a zkumavky byly třikrát jemně promyty destilovanou vodou. Biofilm byl na stěnách zkumavky fixován chemicky etano-

lem po dobu 20 minut. Po skončení fixace byl vzniklý biofilm obarven roztokem krystalové violeti, která byla ponechána k působení po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Poté bylo barvivo ze zkumavek vylito, zkumavky byly třikrát promyty vodou a bylo hodnoceno zabarvení vrstvy vytvořené na stěně zkumavky.

Jako silně pozitivní byly označeny kmeny, které tvořily homogenní, intenzivně zbarvenou vrstvu biofilmu. Jako slabě pozitivní byly označeny kmeny, které tvořily slabší vrstvu biofilmu a jako negativní byly označeny kmeny, u kterých vrstva biofilmu nebyla patrná. Tvorba prstence na zkumavkách byla také označena jako negativní výsledek (viz obr. 15).



Legenda: ++, silně biofilmpozitivní kmen; +, slabě biofilmpozitivní kmen; 0, biofilmnegativní

Obr. 15: Christensenova zkumavková metoda – nalevo pozitivní tvorba biofilmu, uprostřed střední tvorba biofilmu a napravo negativní tvorba biofilmu. [116]

6.5 Stanovení tvorby biofilmu v mikrotitrační destičce

Produkce biofilmu v polystyrenových mikrotitračních destičkách byla u testovaných bakterií stanovena modifikací metody dle Djordjevice et al. [105]

Do mikrotitračních destiček bylo očkováno 20 μ l suspenze testovaných bakterií vyrostlých přes noc (viz kapitola 6.3.2) a k nim bylo přidáno 200 μ l živného média BHI. Takto připravené mikrotitrační destičky byly kultivovány do druhého dne při 30 °C.

Po inkubaci byl veškerý obsah z destiček odpipetován, destička byla promyta 250 μ l destilované vody a byla ponechána při pokojové teplotě po dobu 45 minut k oschnutí. Poté bylo do každé jamky napipetováno 150 μ l krystalové violeti, která byla ponechána k působení po dobu dalších 45 minut (při pokojové teplotě). Následně po odstranění krystalové violeti

byla mikrotitrační destička 6x promyta 250 μ l destilované vody a byla ponechána k oschnutí při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Krystalová violet byla následně uvolněna přidávkem 200 μ l 95 % etanolu, který byl ponechán k působení při pokojové teplotě po dobu 15 minut.

Po uvolnění krystalové violeti do etanolu byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 595 nm. Absorbance byla korigována na absorbanci pozadí (blank), které bylo vytvořeno tak, že do mikrotitrační destičky nebyly naočkovány testované bakterie, ale byl přidán čistý bujón, po kterém následovalo promývání, přidávek krystalové violeti a etanolu (stejným postupem uvedeným v odstavci výše).

- Výpočet výsledné absorbance

Testované bakterie byly naočkovány vždy do 3 jamek mikrotitrační destičky (3 opakování), z každé bakterie byly tedy získány 3 absorbance, ze kterých (stejně jako z hodnot pozadí (blanku)) byly následně vypočteny průměrné hodnoty. Od zprůměrovaných hodnot byla následně odečtena průměrná hodnota pozadí, a tak byly získány výsledné hodnoty absorbance A_{595} . Hodnota A_{595} je přímo úměrná množství vytvořeného biofilmu.

6.6 Vliv vnějších podmínek na tvorbu biofilmu

Vliv vnějších podmínek, zejména kultivační teploty a přidávku sacharidů a soli, byl opět sledován v polystyrenových mikrotitračních destičkách.

Postup byl shodný s postupem uvedeným v předchozí kapitole s tím rozdílem, že vybrané bakterie, které byly zjištěny jako pozitivní na tvorbu biofilmu, byly kultivovány v BHI bujónech s přidávkem 2 různých sacharidů (sacharosy nebo laktosy) v koncentracích 3-7 % (w/v) a případně s přidávkem NaCl (1 % w/v).

Takto připravené destičky byly kultivovány při 30 °C a při 25 °C, aby byl zjištěn vliv teploty na tvorbu biofilmu.

7 VÝSLEDKY STANOVENÍ

7.1 Produkce biofilmu ve skleněných zkumavkách

Byla zkoumána produkce biofilmu u potravinářsky významných bakterií pomocí Christensenovy zkumavkové metody. Ke zjištění produkce biofilmu byly použity bakterie izolované z bažantů a králíků, dále byly zkoumány bakterie *Escherichia coli* a bakterie ze školní sbírky.

U Christensenovy zkumavkové metody byla subjektivně hodnocena vsrta adsorbovaného a obarveného biofilmu, a to buď jako negativní (-), střední (+) nebo velmi vysoká (++). Pro stanovení byl použit univerzální bujón MPB pro růst testovaných bakterií izolovaných z bažantů, bakterie *Escherichia coli* a pro sbírkové kmeny. Dále byl použit bujón MPB s přídavkem 5 % sacharosy, a to z toho důvodu, že 5 % koncentrace sacharosy v bujónu by měla podporovat produkci biofilmu danými bakteriemi. U bakterií rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus* byl použit bujón BHI a to z toho důvodu, že toto živné médium více vyhovuje jejich životním podmínkám. Stejně jako tomu bylo u předchozích testovaných bakterií, byl také připraven u těchto rodů bujón BHI s přídavkem 5 % sacharosy pro podpoření produkce biofilmu.

7.1.1 Produkce biofilmu u bakterií ze školní sbírky

Pomocí Christensenovy zkumavkové metody bylo na tvorbu biofilmu testováno 14 bakterií, které jsou součástí sbírky mikroorganismů Fakulty technologické (Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí), a to 10 gramnegativních bakterií a 4 grampozitivní. Z výsledků je patrné, že schopnost produkovat biofilm na skleněném povrchu měla pouze *Pseudomonas fluorescens*, a to tehdy, pokud byla kultivována v bujónu s přídavkem sacharosy.

Tab. 2: Tvorba biofilmu u testovaných bakterií ze školní sbírky

Testovaná bakterie	MPB	MPB + 5 % sacharosa
	zkumavka	zkumavka
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-

++ vysoká tvorba biofilmu

+ střední tvorba biofilmu

— negativní tvorba biofilmu

7.1.2 Produkce biofilmu u bakterií izolovaných z bažantů

Pomocí Christensenovy zkumavkové metody bylo na tvorbu biofilmu testováno 76 bakterií, které byly izolovány ze vzorku bažantů, a to:

- a) 34 G⁺ koků, z toho 4 zástupci *Staphylococcus succinus*, 5 zástupců *Staphylococcus vitulinus*, 2 zástupci *Staphylococcus epidermidis*, 1 zástupce *Staphylococcus hominis*, 5 zástupců *Enterococcus faecium*, 8 zástupců *Enterococcus durans*, 4 zástupci *Enterococcus hirae*, 4 zástupci *Enterococcus faecalis* a 1 zástupce *Lactobacillus curvatus*.

b) 42 G⁻ tyčinek (čeleď *Enterobacteriaceae* a rod *Pseudomonas*):

- čeleď *Enterobacteriaceae* a z ní 4 zástupci *Yersinia enterocolitica*, 9 zástupců *Escherichia coli*, 8 zástupců *Citrobacter gillenii*, 3 zástupci *Pantoea agglomerans*, 5 zástupců *Hafni alvei*, 7 zástupců *Serratia liquefaciens*, 1 zástupce *Serratia marcescens*, 1 zástupce *Ewingella americana*, 2 zástupci *Moellerella wisconsensis* a 1 zástupce *Proteus mirabilis*.
- rod *Pseudomonas* a z toho 1 zástupce *Pseudomonas aeruginosa*.

U všech testovaných bakterií nebyla prokázána tvorba biofilmu na skleněném povrchu, výsledky byly negativní. Testované bakterie pomocí Christensenovy zkumavkové metody můžeme tedy vyhodnotit jako biofilmnegativní.

7.1.3 Produkce biofilmu u kmenů bakterií izolovaných z králíků

Pomocí Christensenovy zkumavkové metody bylo na tvorbu biofilmu testováno 38 bakterií, které byly izolovány ze vzorku králíka. Jednalo se o G⁺ bakterie rodu *Enterococcus* a rodu *Staphylococcus*:

- r. *Enterococcus* a z něj 19 zástupců *Enterococcus faecium* a 6 zástupců *Enterococcus* spp.
- r. *Staphylococcus* a z něj 5 zástupců *Staphylococcus warneri*, 3 zástupci *Staphylococcus hominis*, 3 zástupci *Staphylococcus haemolyticus*, 1 zástupce *Staphylococcus pasteurii* a 1 zástupce *Staphylococcus epidermidis*.

Tvorba biofilmu byla prokázána u testované bakterie *Enterococcus* sp. E 24. Bakterie produkovala biofilm na skleněném povrchu a to při kultivaci v bujónu BHI a v bujónu s přídavkem sacharosy. Tato bakterie byla označena jako biofilmpozitivní.

7.1.4 Produkce biofilmu u kmenů *Escherichia coli*

Pomocí Christensenovy zkumavkové metody bylo na tvorbu biofilmu testováno 12 bakterií G⁻ *Escherichia coli*. U testovaných bakterií nebyla prokázána produkce biofilmu na skleněném povrchu. Všechny výsledky byly negativní, bakterie byly tedy vyhodnoceny jako biofilmnegativní.

7.2 Produkce biofilmu v mikrotitračních destičkách

Tvorba biofilmu byla dále zkoumána pomocí mikrotitračních destiček, kde byl jako živné médium použit bujón BHI, který svým složením vyhovoval všem daným testovaným bakteriím. Jako tomu bylo u Christensenovy zkumavkové metody, i tady byl připraven bujón BHI s přídavkem 5 % sacharosu, pro podporu produkce biofilmu bakteriemi. Tvorba biofilmu pomocí mikrotitrační destičky byla zkoumána u bakterií izolovaných z bažantů, u kmenů *Escherichia coli*, u mléčných bakterií, u testovaných bakterií izolovaných ze sýrů, sbírkových kmenů a bakterií rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus*, které byly izolovány z masa (svaloviny) králíků. Tvorba biofilmu byla zjišťována na základě výsledné hodnoty absorbance, která je přímo úměrná množství vytvořeného biofilmu. Souhrn výsledků je uveden v tabulkách 3-7.

Produkce biofilmu testovanými bakteriemi na povrchu polystyrenu byla posuzována dle výsledné hodnoty absorbance A_{595} , kde hranice tvorby biofilmu byla sestavena následovně:

0 – 1 = negativní tvorba biofilmu

1 – 1,5 = střední tvorba biofilmu

1,5 a více = vysoká tvorba biofilmu

7.2.1 Kmeny bakterií izolovaných z bažanta

Pomocí polystyrenových mikrotitračních destiček bylo na tvorbu biofilmu zkoumáno 130 bakterií, které byly izolovány z těl bažantů, a to:

- 1 G^+ tyčinka *Lysinibacillus sphaericus*
- 61 G^+ koků, z toho 4 zástupci *Staphylococcus epidermidis*, 5 zástupců *Staphylococcus succinus*, 3 zástupci *Staphylococcus warneri*, 1 zástupce *Staphylococcus hominis*, 5 zástupců *Staphylococcus vitulinus*, 8 zástupců *Enterococcus faecium*, 10 zástupců *Enterococcus durans*, 5 zástupců *Enterococcus hirae*, 6 zástupců *Enterococcus faecalis*, 2 zástupci *Streptococcus salivarius*, 1 zástupce *Leuconostoc mesenteroides*, 2 zástupci *Lactobacillus curvatus*, 2 zástupci *Lactobacillus* spp., 1 zástupce *Lactobacillus homohiochii*, 3 zástupci *Lactobacillus sakei*, 1 zástupce *Lactobacillus plantarum*, 2 zástupci *Lactobacillus brevis*.
- 68 G^- tyčinek, z toho 23 zástupců *Escherichia coli*, 4 zástupci *Acinetobacter lwoffii*, 2 zástupci *Acinetobacter genomospecies*, 4 zástupci *Yersinia enterocolitica*, 8 zástupců *Citrobacter gillenii*, 4 zástupci *Pantoea agglomerans*, 6 zástupců *Hafni al-*

vei, 11 zástupců *Serratia liquefaciens*, 1 zástupce *Serratia marcescens*, 1 zástupce *Proteus mirabilis*, 1 zástupce *Ewingella americana*, 2 zástupci *Moellerella wisconsinensis*, 1 zástupce *Pseudomonas aeruginosa*.

Z výsledků je patrné, že největší tvorba biofilmu byla zaznamenána u těchto bakterií:

- a) *Escherichia coli* 44, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou nejvyšší, a to 2,628. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy byla hodnota nižší, a to 1,851.
- b) *Escherichia coli* 56, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 2,075. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy tato bakterie biofilm nevytvářela.
- c) *Escherichia coli* 46, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI 2,044. V živném médiu BHI s 5 % sacharosou byla výsledná hodnota nižší, a to 1,701.
- d) *Escherichia coli* 50, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 2,012. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy byla hodnota nižší, a to 1,614.
- e) *Escherichia coli* 52, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 1,969. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy tato bakterie biofilm netvořila.
- f) *Citrobacter gillenii* 66, u kterého byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 2,178. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy byl zaznamenán střední výskyt biofilmu.
- g) *Citrobacter gillenii* 59, u kterého byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 1,902. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy tato bakterie biofilm netvořila.
- h) *Serratia marcescens* 114, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI 2,234 a v BHI s 5 % sacharosou byla výsledná hodnota A_{595} vyšší, a to 2,264.
- i) *Pseudomonas aeruginosa* 115, u které byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 2,264. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy byla zaznamenána hodnota nižší, a to 1,738.
- j) *Enterococcus faecium* 51, u kterého byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 2,159. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy byla hodnota nižší, a to 1,678.

- k) *Enterococcus faecalis* 131, u kterého byla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou 1,929. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy tato bakterie biofilm netvořila.

Tab. 3: Výsledné hodnoty absorbance u testovaných bakterií izolovaných z bažantů (pokračování str. 54-55)

Testované kmeny	A_{595} [nm] BHI	A_{595} [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A_{595} [nm] BHI	A_{595} [nm] BHI+sach
<i>E. coli</i> 1	0,004	0,007	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 2	0,059	0,350
<i>E. coli</i> 6	0,010	0,242	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 3	0,115	0,130
<i>E. coli</i> 7	0,003	0,216	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 40	0,009	0,159
<i>E. coli</i> 8	0,045	0,285	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 136	0,008	1,475
<i>E. coli</i> 9	0,001	0,130	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 137	0,143	0,010
<i>E. coli</i> 11	0,005	0,560	<i>Staphylococcus succinus</i> 4	0,155	1,041
<i>E. coli</i> 20	0,004	0,178	<i>Staphylococcus succinus</i> 47	0,932	0,556
<i>E. coli</i> 27	0,086	0,174	<i>Staphylococcus succinus</i> 77	0,803	0,549
<i>E. coli</i> 28	0,006	0,123	<i>Staphylococcus succinus</i> 80	0,494	0,495
<i>E. coli</i> 35	0,141	0,151	<i>Staphylococcus succinus</i> 89	0,923	0,544
<i>E. coli</i> 36	1,060	0,763	<i>Staphylococcus warneri</i> 24	0,001	0,083
<i>E. coli</i> 37	0,091	0,506	<i>Staphylococcus warneri</i> 25	0,010	0,192
<i>E. coli</i> 38	0,539	0,235	<i>Staphylococcus warneri</i> 29	0,004	0,151
<i>E. coli</i> 39	0,242	0,263	<i>Staphylococcus hominis</i> 138	0,078	1,763
<i>E. coli</i> 44	1,852	2,682	<i>Staphylococcus vitulinus</i> 60	1,476	0,482
<i>E. coli</i> 46	2,044	1,701	<i>Staphylococcus vitulinus</i> 69	0,725	0,368
<i>E. coli</i> 50	1,614	2,012	<i>Staphylococcus vitulinus</i> 81	0,509	0,375
<i>E. coli</i> 52	1,043	1,969	<i>Staphylococcus vitulinus</i> 82	0,906	0,474
<i>E. coli</i> 53	1,478	1,791	<i>Staphylococcus vitulinus</i> 88	0,887	0,574
<i>E. coli</i> 55	1,104	1,691	<i>Acinetobacter lwoffii</i> 12	0,007	0,054
<i>E. coli</i> 56	0,756	2,075	<i>Acinetobacter lwoffii</i> 15	0,020	0,614

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>E. coli</i> 72	1,365	1,636	<i>Acinetobacter lwoffii</i> 10	0,024	0,424
<i>E. coli</i> 73	0,778	1,730	<i>Acinetobacter lwoffii</i> 30	0,054	0,177
<i>Lactobac. curvatus</i> 48	0,517	0,821	<i>Acinetobacter genomospecies</i> 21	0,033	0,466
<i>Lactobac. curvatus</i> 54	0,937	0,802	<i>Acinetobacter genomospecies</i> 31	0,065	0,300
<i>Lactobacillus</i> sp. 91	0,642	0,073	<i>Yersinia enterocolitica</i> 43	0,411	0,356
<i>Lactobacillus</i> sp. 96	0,523	0,052	<i>Yersinia enterocolitica</i> 85	0,696	0,752
<i>Lactobac. homohiochii</i>	0,373	0,645	<i>Yersinia enterocolitica</i> 99	0,566	1,072
<i>Lactobac. sakei</i> 166	0,509	0,682	<i>Yersinia enterocolitica</i> 100	0,648	1,013
<i>Lactobac. sakei</i> 168	0,753	0,606	<i>Enterococcus faecium</i> 51	1,676	2,159
<i>Lactobac. sakei</i> 103	0,666	0,943	<i>Enterococcus faecium</i> 129	0,444	0,520
<i>Lactobac. plantarum</i> 123	0,323	0,451	<i>Enterococcus faecium</i> 133	0,025	1,817
<i>Lactobac. brevis</i> 125	0,518	0,632	<i>Enterococcus faecium</i> 143	0,010	1,258
<i>Lactobac. brevis</i> 126	0,382	0,562	<i>Enterococcus faecium</i> 144	0,883	0,887
<i>Citrobacter gillenii</i> 58	0,648	0,892	<i>Enterococcus faecium</i> 145	0,107	1,140
<i>Citrobacter gillenii</i> 59	0,539	1,902	<i>Enterococcus faecium</i> 163	0,858	0,466
<i>Citrobacter gillenii</i> 64	0,285	0,754	<i>Enterococcus faecium</i> 128	0,470	0,763
<i>Citrobacter gillenii</i> 65	0,415	0,967	<i>Enterococcus durans</i> 63	0,929	0,484
<i>Citrobacter gillenii</i> 66	1,189	2,178	<i>Enterococcus durans</i> 68	0,699	0,323
<i>Citrobacter gillenii</i> 70	0,886	1,799	<i>Enterococcus durans</i> 151	0,265	1,251
<i>Citrobacter gillenii</i> 71	0,926	1,350	<i>Enterococcus durans</i> 152	0,009	0,661
<i>Citrobacter gillenii</i> 67	1,007	1,443	<i>Enterococcus durans</i> 153	0,010	0,642
<i>Pantoea agglomerans</i> 78	0,456	1,554	<i>Enterococcus durans</i> 154	0,787	0,965
<i>Pantoea agglomerans</i> 79	0,452	1,350	<i>Enterococcus durans</i> 155	0,492	0,728
<i>Pantoea agglomerans</i> 83	0,506	0,275	<i>Enterococcus durans</i> 160	0,787	0,720
<i>Pantoea agglomerans</i> 87	0,793	1,081	<i>Enterococcus durans</i> 164	0,523	0,304
<i>Hafni alvei</i> 84	0,827	1,024	<i>Enterococcus durans</i> 169	0,763	0,350
<i>Hafni alvei</i> 93	0,637	1,070	<i>Enterococcus hirae</i> 76	0,665	0,212

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>Hafni alvei</i> 95	0,769	0,999	<i>Enterococcus hirae</i> 122	0,267	0,552
<i>Hafni alvei</i> 97	0,389	0,390	<i>Enterococcus hirae</i> 124	0,278	0,439
<i>Hafni alvei</i> 101	0,461	0,536	<i>Enterococcus hirae</i> 146	0,002	0,302
<i>Hafni alvei</i> 102	0,466	0,652	<i>Enterococcus hirae</i> 147	0,428	0,843
<i>Serratia liquefaciens</i> 86	0,976	1,290	<i>Enterococcus faecalis</i> 130	0,401	0,496
<i>Serratia liquefaciens</i> 90	1,042	1,042	<i>Enterococcus faecalis</i> 131	0,218	1,929
<i>Serratia liquefaciens</i> 105	0,978	0,912	<i>Enterococcus faecalis</i> 132	0,616	1,500
<i>Serratia liquefaciens</i> 106	1,130	0,571	<i>Enterococcus faecalis</i> 140	0,010	0,937
<i>Serratia liquefaciens</i> 108	1,551	1,814	<i>Enterococcus faecalis</i> 141	0,450	0,431
<i>Serratia liquefaciens</i> 109	1,173	0,878	<i>Enterococcus faecalis</i> 142	0,672	0,413
<i>Serratia liquefaciens</i> 110	1,199	0,353	<i>Streptococcus salivarius</i> 149	0,494	0,452
<i>Serratia liquefaciens</i> 118	0,463	0,665	<i>Streptococcus salivarius</i> 150	0,342	0,574
<i>Serratia liquefaciens</i> 119	0,460	0,614	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 170	0,347	0,682
<i>Serratia liquefaciens</i> 120	0,344	0,552	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 115	1,738	2,264
<i>Serratia liquefaciens</i> 121	0,410	0,632	<i>Ewingella americana</i> 94	0,853	0,653
<i>Serratia marcescens</i> 114	2,238	2,674	<i>Moellerella wisconsensis</i> 111	1,089	0,330
<i>Proteus mirabilis</i> 167	0,916	0,315	<i>Moellerella wisconsensis</i> 117	0,922	0,266

7.2.2 Kmeny bakterií izolovaných z králíka

Pomocí polystyrenových mikrotitračních destiček bylo na tvorbu biofilmu zkoumáno 52 G⁺ bakterií, které byly izolovány ze vzorku svaloviny králíků, a to:

- rod *Enterococcus* a z něj 20 zástupců *Enterococcus faecium* a 11 zástupců *Enterococcus* spp.
- rod *Staphylococcus* a z něj 9 zástupců *Staphylococcus warneri*, 3 zástupci *Staphylococcus hominis*, 4 zástupci *Staphylococcus haemolyticus*, 2 zástupci *Staphylococcus pasteurii* a 3 zástupci *Staphylococcus epidermidis*.

Z výsledků je patrné, že nejvyšší tvorba biofilmu byla na polystyrenovém povrchu zaznamenána pouze u *Staphylococcus hominis* 20/1, kde výsledná hodnota absorbance A_{595} činila 1,617. V prostředí s přidavkem sacharosu byla hodnota nižší, produkce biofilmu byla střední.

Tab. 4: Výsledné hodnoty absorbance u bakterií r. *Enterococcus* a r. *Staphylococcus* (pokračování str. 57)

Testované kmeny	A_{595} [nm] BHI	A_{595} [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A_{595} [nm] BHI	A_{595} [nm] BHI+sach
<i>Enterococcus faecium</i> E8	0,015	1,070	<i>Enterococcus</i> sp. E18	0,005	0,007
<i>Enterococcus faecium</i> E9	0,010	0,678	<i>Enterococcus</i> sp. E16	0,001	0,095
<i>Enterococcus faecium</i> E10	0,192	0,010	<i>Enterococcus</i> sp. E20	0,001	0,002
<i>Enterococcus faecium</i> E11	0,003	0,013	<i>Enterococcus</i> sp. E30	0,006	0,010
<i>Enterococcus faecium</i> E12	0,454	0,010	<i>Enterococcus</i> sp. E21	0,332	0,349
<i>Enterococcus faecium</i> E13	0,009	0,008	<i>Staphylococcus warneri</i> 18/1	0,004	0,005
<i>Enterococcus faecium</i> E14	0,757	0,603	<i>Staphylococcus warneri</i> 23/1	0,010	0,450
<i>Enterococcus faecium</i> E33	0,236	0,032	<i>Staphylococcus warneri</i> 24/2	0,580	0,076
<i>Enterococcus faecium</i> E29	0,528	0,330	<i>Staphylococcus warneri</i> 24/1	0,858	0,341
<i>Enterococcus faecium</i> E27	0,003	0,509	<i>Staphylococcus warneri</i> 16/1	0,001	0,007
<i>Enterococcus faecium</i> E23	0,454	0,865	<i>Staphylococcus warneri</i> 16/2	0,003	0,074
<i>Enterococcus faecium</i> E31	0,009	0,010	<i>Staphylococcus warneri</i> 23/3	0,010	0,441
<i>Enterococcus faecium</i> E34	0,002	0,007	<i>Staphylococcus warneri</i> 23/2	0,010	0,007
<i>Enterococcus faecium</i> E1	0,005	0,004	<i>Staphylococcus warneri</i> 24/3	0,528	0,847
<i>Enterococcus faecium</i> E2	0,002	0,006	<i>Staphylococcus hominis</i> 19/2	0,445	0,338
<i>Enterococcus faecium</i> E3	0,002	0,003	<i>Staphylococcus hominis</i> 20/2	0,583	0,298
<i>Enterococcus faecium</i> E4	0,010	0,007	<i>Staphylococcus hominis</i> 20/1	1,617	1,008
<i>Enterococcus faecium</i> E6	0,007	0,006	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 22/3	0,607	0,299
<i>Enterococcus faecium</i> E7	0,001	0,005	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 22/2	0,653	0,010
<i>Enterococcus faecium</i> E17	0,192	0,519	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 22/1	0,308	0,003
<i>Enterococcus</i> sp. E15	0,318	0,340	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 22/4	0,999	0,827

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>Enterococcus</i> sp. E32	1,041	0,189	<i>Staphylococcus pasteurii</i> 19/1	0,504	0,416
<i>Enterococcus</i> sp. E28	0,010	0,986	<i>Staphylococcus pasteurii</i> 23/5	0,003	0,009
<i>Enterococcus</i> sp. E24	0,844	1,199	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 21/1	0,227	0,004
<i>Enterococcus</i> sp. E22	0,832	0,406	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 23/4	1,048	0,695
<i>Enterococcus</i> sp. E19	0,008	0,003	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 21/2	0,142	0,520

7.2.3 Kmeny testovaných bakterií *Escherichia coli*

Pomocí polystyrenových mikrotitračních destiček bylo na tvorbu biofilmu zkoumáno 60 G⁻ bakterií *Escherichia coli*.

Z výsledků je patrné, že u testovaných bakterií rodu *Escherichia* byla nejvyšší tvorba biofilmu zaznamenána u *Escherichia coli* ER1, u které byla výsledná hodnota A₅₉₅ 1,966, a to tehdy, pokud byla kultivována v bujónu s přídavkem sacharosy. V živném médiu BHI bez přídavku sacharosy tato bakterie biofilm nevytvářela.

Tab. 5: Výsledné hodnoty absorbance u kmenů bakterií *Escherichia coli* (pokr. str. 58)

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI + sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI + sach
<i>Escherichia coli</i> G	0,428	0,404	<i>Escherichia coli</i> N	0,438	0,638
<i>Escherichia coli</i>	0,570	0,470	<i>Escherichia coli</i> V1	1,184	1,035
<i>Escherichia coli</i> V21	1,205	1,242	<i>Escherichia coli</i> M	0,528	0,507
<i>Escherichia coli</i> V3	0,544	0,589	<i>Escherichia coli</i> V18	0,706	0,749
<i>Escherichia coli</i> F	0,410	0,260	<i>Escherichia coli</i> V2	0,645	0,892
<i>Escherichia coli</i>	0,550	0,735	<i>Escherichia coli</i>	0,546	0,933
<i>Escherichia coli</i>	0,312	0,878	<i>Escherichia coli</i> E	0,616	0,862
<i>Escherichia coli</i> D'	0,298	0,608	<i>Escherichia coli</i> E'	0,486	0,899

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>Escherichia coli</i> F'	0,313	0,504	<i>Escherichia coli</i> R39	0,363	0,594
<i>Escherichia coli</i> R40	0,579	0,529	<i>Escherichia coli</i> R41	0,285	0,694
<i>Escherichia coli</i> R45	0,346	0,426	<i>Escherichia coli</i> R47	0,239	0,601
<i>Escherichia coli</i> R50	0,802	0,766	<i>Escherichia coli</i> R35	0,854	0,616
<i>Escherichia coli</i> R37	0,885	0,760	<i>Escherichia coli</i> R38	0,347	0,368
<i>Escherichia coli</i> R51	0,286	1,078	<i>Escherichia coli</i> T62	0,313	0,595
<i>Escherichia coli</i> R15	0,297	0,562	<i>Escherichia coli</i> R16	0,201	0,756
<i>Escherichia coli</i> R17	0,153	0,588	<i>Escherichia coli</i> T37	0,530	0,258
<i>Escherichia coli</i> T43	0,489	0,369	<i>Escherichia coli</i> I/2	0,817	0,357
<i>Escherichia coli</i> II/1	0,769	0,869	<i>Escherichia coli</i> T4	0,635	0,140
<i>Escherichia coli</i> T10	0,245	0,248	<i>Escherichia coli</i> T29	0,509	0,190
<i>Escherichia coli</i> T31	0,132	0,154	<i>Escherichia coli</i> T33	1,136	0,483
<i>Escherichia coli</i> T34	0,982	0,727	<i>Escherichia coli</i> II/3	0,301	0,278
<i>Escherichia coli</i> EJ1	0,849	1,566	<i>Escherichia coli</i> EM1	0,526	0,292
<i>Escherichia coli</i> ED'1	0,193	0,052	<i>Escherichia coli</i> EE'1	0,275	0,079
<i>Escherichia coli</i> EB'2	0,243	0,142	<i>Escherichia coli</i> EC'1	0,706	1,151
<i>Escherichia coli</i> EA'1	0,654	0,289	<i>Escherichia coli</i> EB'1	0,281	0,050
<i>Escherichia coli</i> EY2	0,485	1,065	<i>Escherichia coli</i> EZ1	0,420	0,092
<i>Escherichia coli</i> H	0,186	1,032	<i>Escherichia coli</i> B'	0,275	0,509
<i>E.coli</i> EU1	1,032	1,078	<i>E. coli</i> EV1	0,337	1,225
<i>Escherichia coli</i> ES1	0,468	0,101	<i>Escherichia coli</i> ET1	0,348	1,106
<i>Escherichia coli</i> EP1	0,290	1,521	<i>Escherichia coli</i> ER1	0,445	1,966

7.2.4 Izoláty testovaných bakterií ze sýra a sbírkové kmeny

Pomocí polystyrenových mikrotitračních destiček bylo na tvorbu biofilmu zkoumáno 25 G⁺ koků a 29 G⁺ tyčinek, které byly izolovány ze vzorku sýrů a bakterií, které jsou součástí sbírky mikroorganismů Fakulty technologické (Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí), a to:

a) G⁺ tyčinky, z toho:

- 8 zástupců *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, 6 zástupců *Lactobacillus curvatus*, 1 zástupce *Lactobacillus brevis*, 3 zástupci *Lactobacillus casei*, 8 zástupců *Lactobacillus paracasei*, 1 zástupce *Lactobacillus plantarum*.
- 1 zástupce *Clostridium sporogenes* a 1 zástupce *Bacillus pumilus*.

b) G⁺ koky, z toho:

- 4 zástupci *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 1 zástupce *Lactococcus lactis*, 7 zástupců *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- 2 zástupci *Enterococcus* sp., 1 zástupce *Enterococcus faecalis*, 1 zástupce *Enterococcus durans*, 2 zástupci *Enterococcus faecium*, 3 zástupci *Leuconostoc mesenteroides*, 3 zástupci *Leuconostoc pseudomesenteroides* a 1 zástupce *Pediococcus*.

Z výsledků je patrné, že zvýšená tvorba biofilmu byla také zaznamenána u bakterie, která byla izolována ze vzorku sýru, a to *Lactobacillus casei* kmen BIV-13, u které byla výsledná hodnota A₅₉₅ v živném médiu BHI 1,932. V živném médiu BHI s přidavkem sacharosu tato bakterie biofilm nevytvářela. Nejvyšší tvorba biofilmu byla zaznamenána u bakterie *Lactobacillus paracasei* 51, kde výsledná hodnota A₅₉₅ činila 2,685, a to tehdy, pokud byla kultivována v bujónu s přidavkem sacharosu.

Tab. 6: Výsledné hodnoty absorbance u testovaných bakterií (pokračování str. 60- 61)

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 2	0,010	0,290	<i>Lactobac. curvatus</i> 17	0,308	1,562
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 3	0,263	0,252	<i>Lactobac. curvatus</i> 15	0,114	1,080
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 37	0,459	0,279	<i>Lactobac. curvatus</i> 41	0,227	1,236

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 7	0,014	0,792	<i>Lactobac. curvatus</i> 42	0,280	0,788
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 8	0,424	0,530	<i>Lactobac. curvatus</i> AI-3	0,108	0,123
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 12	0,134	0,454	<i>Lactobac. curvatus</i> AI-2	0,029	0,003
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 39	1,476	1,411	<i>Lactobac. brevis</i> 24	0,082	0,008
<i>Lactobac. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 40	0,843	0,795	<i>Lactobac. paracasei</i> 44	0,161	1,469
<i>Lactobacillus casei</i> BIV-11	0,033	0,006	<i>Lactobac. paracasei</i> 46	0,010	1,303
<i>Lactobacillus casei</i> BIV-13	1,932	0,688	<i>Lactobac. paracasei</i> 50	0,165	1,617
<i>Lactobacillus casei</i> 35	0,317	0,548	<i>Lactobac. paracasei</i> 51	0,647	1,324
<i>Lactococ. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 890	0,002	0,018	<i>Lactobac. paracasei</i> 52	0,580	1,516
<i>Lactococ. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	0,046	0,133	<i>Lactobac. paracasei</i> 58	1,061	1,148
<i>Lactococ. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	0,129	0,027	<i>Lactobac. paracasei</i> 63	0,017	0,471
<i>Lactococ. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 421	0,208	0,053	<i>Lactobac. paracasei</i> 49	0,204	2,685
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 45	0,001	0,107	<i>Clostridium sporogenes</i> 60	1,088	1,257
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CCDM 59	0,053	0,094	<i>Bacillus pumilus</i> 61	1,062	1,020
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 398	0,006	0,068	<i>Pediococcus</i> sp. 396	0,007	0,034

Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach	Testované kmeny	A ₅₉₅ [nm] BHI	A ₅₉₅ [nm] BHI+sach
<i>Lactococ. lactis</i> subsp. <i>lact</i> BIV-9	0,069	0,036	<i>Lactobac. plantarum</i> AI-7	0,079	0,126
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> 47	0,003	0,110	<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> CCDM 823	0,039	0,052
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> 62	0,551	0,277	<i>Enterococcus</i> sp. 19	0,166	0,339
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> 63	0,360	0,197	<i>Enterococcus</i> sp. 20	0,059	0,544
<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 414	0,020	0,020	<i>Enterococcus faecalis</i> 53	0,450	1,811
<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 48	0,029	0,045	<i>Enterococcus durans</i> CCDM 53-B029	0,040	0,400
<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 141	0,034	0,389	<i>Enterococcus faecium</i> CCDM 816	0,002	0,007
<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> 354	0,055	0,069	<i>Enterococcus faecium</i> CCDM 816	0,001	0,170
<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 1004	0,010	0,059	<i>Lactoc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylac.</i> 418	0,035	0,132

7.2.5 Tvorba biofilmu u mléčných bakterií

Pomocí polystyrenových mikrotitračních destiček bylo na tvorbu biofilmu zkoumáno 30 mléčných bakterií, z toho 1 zástupce *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 3 zástupci *Lactobacillus curvatus*, 1 zástupce *Lactobacillus helveticus*, 4 zástupci *Lactobacillus plantarum*, 6 zástupců *Lactobacillus rhamnosus*, 1 zástupce *Lactobacillus casei*, 2 zástupci *Lactobacillus paracasei*, 7 zástupců *Lactobacillus acidophilus*, 1 zástupce *Bifidobacterium longum*, 1 zástupce *Bifidobacterium bifidum*, 3 zástupci *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, 1 zástupce *Bifidobacterium adolescentis* a 1 zástupce *Bifidobacterium* sp.

Z výsledků je patrné, že testované mléčné bakterie neprodukovaly biofilm na povrchu z polystyrenu. Jedná se tedy o biofilmnegativní bakterie.

Tab. 7: Výsledné hodnoty absorbance u mléčných bakterií – pokračování str. 63

Testované kmeny	A _{595 nm} BHI	A _{595nm} BHI + sach	Testované kmeny	A _{595 nm} BHI	A _{595 nm} BHI + sach
<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 94	0,057	0,109	<i>Lactobac. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 364	0,220	0,069
<i>Bifidobac. adolescentis</i> CCDM 223	0,282	0,010	<i>Lactobac. curvatus</i> CCDM 393	0,085	0,047
<i>Bifidobac. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 240	0,075	0,004	<i>Lactobac. curvatus</i> CCDM 394	0,043	0,050
<i>Bifidobac. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 241	0,379	0,069	<i>Lactobac. curvatus</i> CCDM 834	0,345	0,019
<i>Bifidobac. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 374	0,050	0,113	<i>Lactobac. helveticus</i> CCDM 807	0,488	0,087
<i>Bifidobac. bifidum</i> CCDM 559	0,007	0,106	<i>Lactobac. plantarum</i> CCDM 183	0,247	0,084
<i>Bifidobac. longum</i> CCDM 569	0,242	0,152	<i>Lactobac. plantarum</i> CCDM 818	0,208	0,278
<i>Lactobac. acidophilus</i> CCDM 79	0,321	0,189	<i>Lactobac. plantarum</i> CCDM 375	0,113	0,069
<i>Lactobac. acidophilus</i> CCDM 109	0,161	0,489	<i>Lactobac. plantarum</i> CCDM 381	0,222	0,347
<i>Lactobac. acidophilus</i> CCDM 197	0,122	0,071	<i>Lactobac. rhamnosus</i> CCDM 148	0,121	0,118

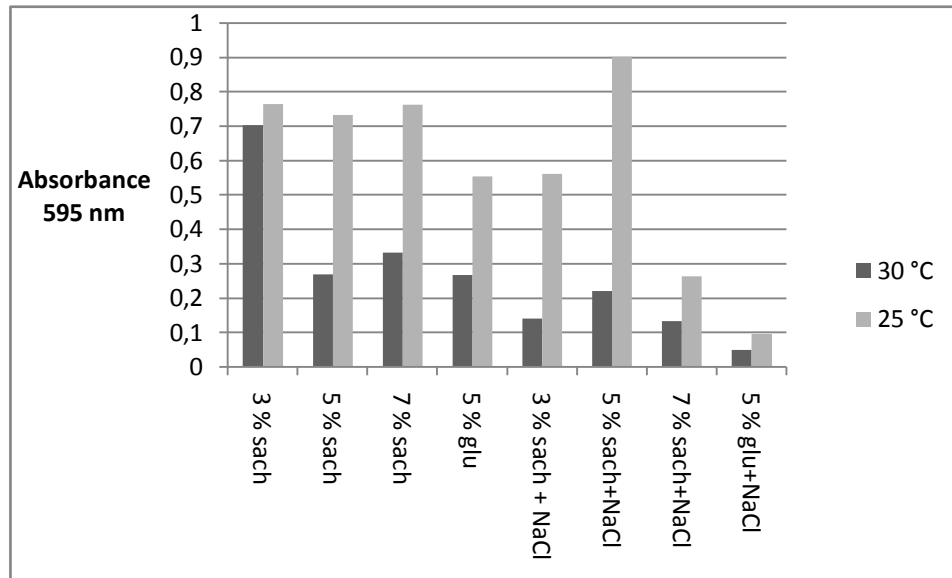
Testované kmeny	A _{595 nm} BHI	A _{595nm} BHI + sach	Testované kmeny	A _{595 nm} BHI	A _{595 nm} BHI + sach
<i>Lactobac. acidophilus</i> CCDM 217	0,193	0,197	<i>Lactobac. rhamnosus</i> CCDM 157	0,128	0,004
<i>Lactobac. acidophilus</i> CCDM 382	0,104	0,040	<i>Lactobac. rhamnosus</i> CCDM 821	0,003	0,119
<i>Lactobac. acidus.</i> 406	0,023	0,076	<i>Lactobac. rhamnosus</i> CCDM 579	0,006	0,035
<i>Lactobac. acidophilus</i> CCDM 476	0,107	0,277	<i>Lactobac. rhamnosus</i> CCDM 963A	0,001	0,080
<i>Lactobac. paracasei</i> CCDM 741	0,007	0,010	<i>Lactobac. rhamnosus</i> CCDM 963B	0,006	0,004
<i>Lactobac. paracasei</i> CCDM 832	0,002	0,009	<i>Lactobac. casei</i> CCDM 422	0,007	0,073

7.3 Vliv vnějších podmínek na tvorbu biofilmu

Tvorba biofilmu byla zkoumána v bujónu BHI, do kterého byla přidána sacharosa v koncentracích 3 %, 5 % a 7 % dále byl do těchto bujónů přidán NaCl (1 %): Dalším faktorem, který byl sledován, byl přídavek 5 % glukosy a 5 % glukosy s přídavkem 1 % NaCl, aby bylo zjištěno, jestli tyto různé koncentrace mají pozitivní nebo negativní vliv na produkci biofilmu bakteriemi. Pro toto stanovení byly vybrány pouze bakterie s nejvyšší výslednou hodnotou A₅₉₅, tedy s nejvyšším výskytem biofilmu. Pro stanovení byly použity dvě odlišné teploty, a to 30 °C a 25 °C, aby bylo zjištěno, která teplota bakteriím více vyhovuje pro jejich produkci biofilmu.

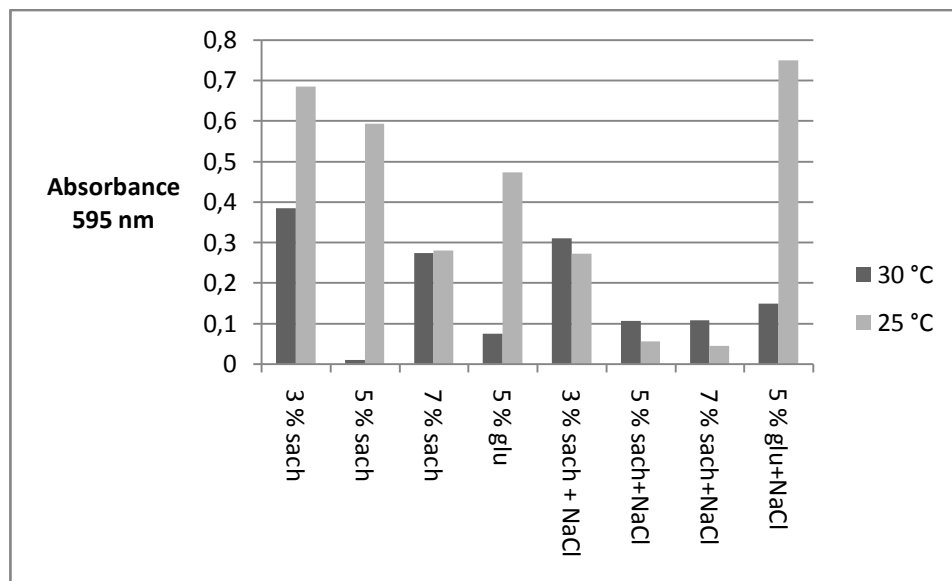
Z obrázků 16-27 je patrné, že nejvyšší tvorba biofilmu byla zaznamenána u bakterie *Staphylococcus epidermidis*, kde výsledná hodnota A₅₉₅ činila 2,545. Bakterie produkovala biofilm v bujónu s přídavkem 3 % sacharosy při 30 °C. Při teplotě 25 °C byla hodnota absorbance nepatrně menší, výsledná hodnota A₅₉₅ v bujónu s přídavkem 3 % sacharosy činila 1,857.

Dále je z obrázků 16-27 patrné, že ostatní testované bakterie neprodukovaly biofilm na povrchu z polystyrenu. Tvorba biofilmu tedy nebyla jednoznačně potvrzena.



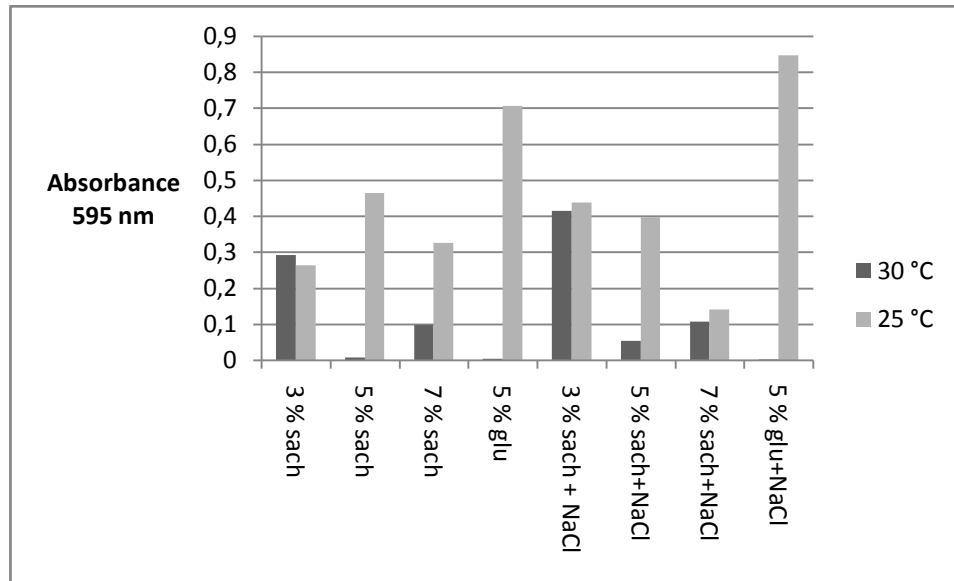
Obr. 16: Závislost absorpance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u

Enterococcus faecium 51



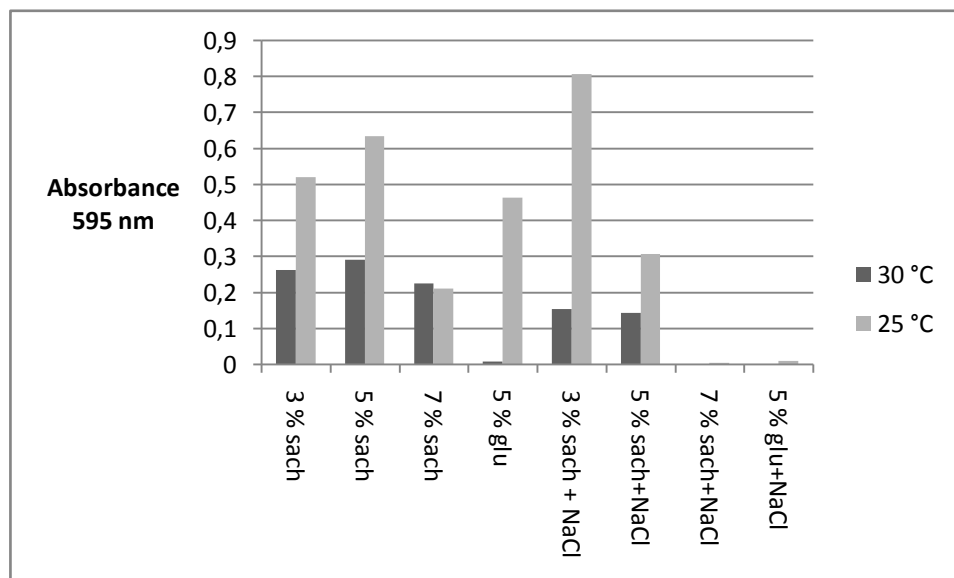
Obr. 17: Závislost absorpance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u

Enterococcus faecalis 53



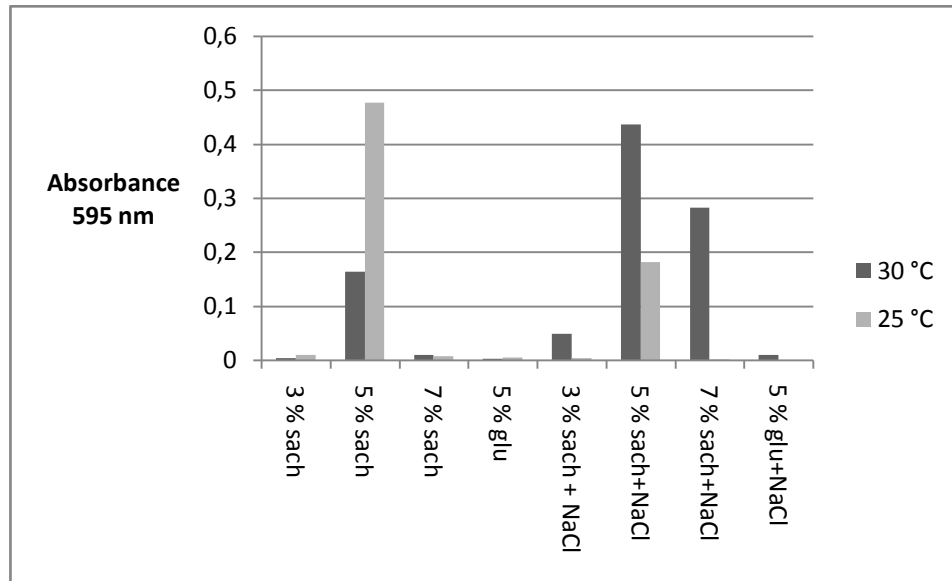
Obr. 18: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u

Lactobacillus paracasei 50

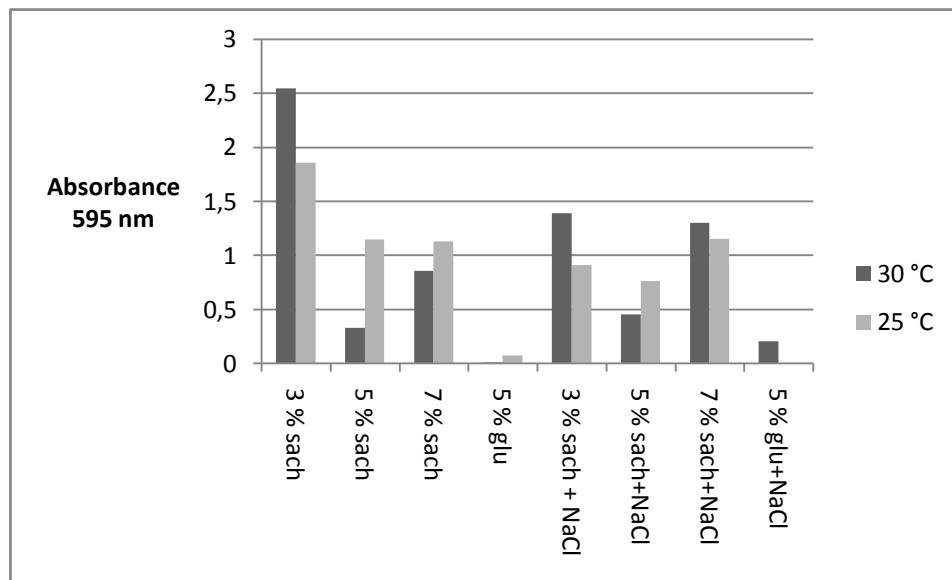


Obr. 19: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u

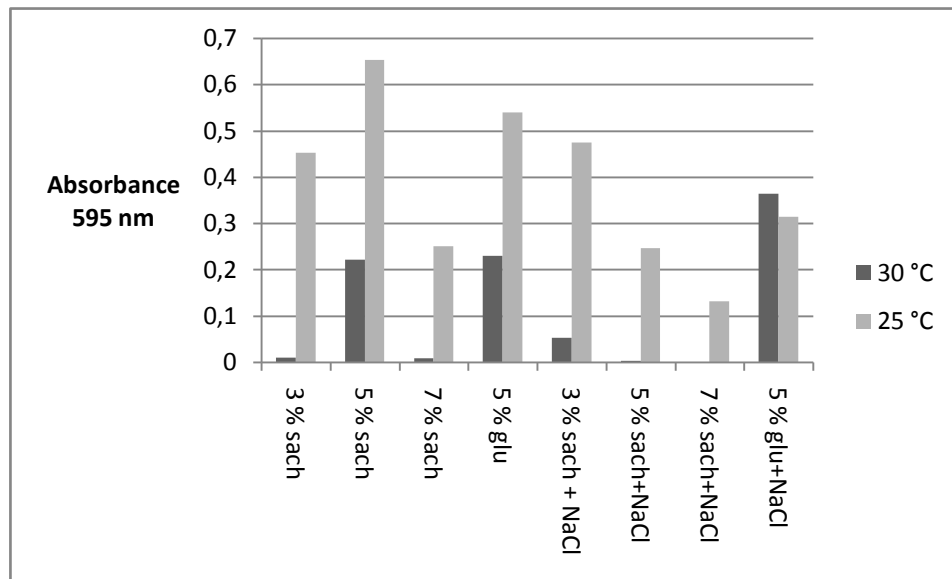
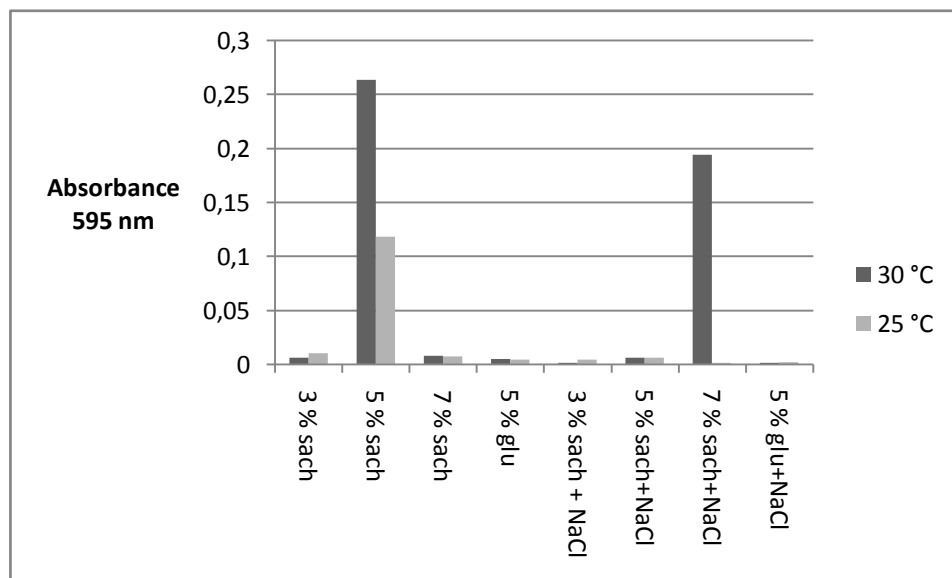
Lactobacillus curvatus 17

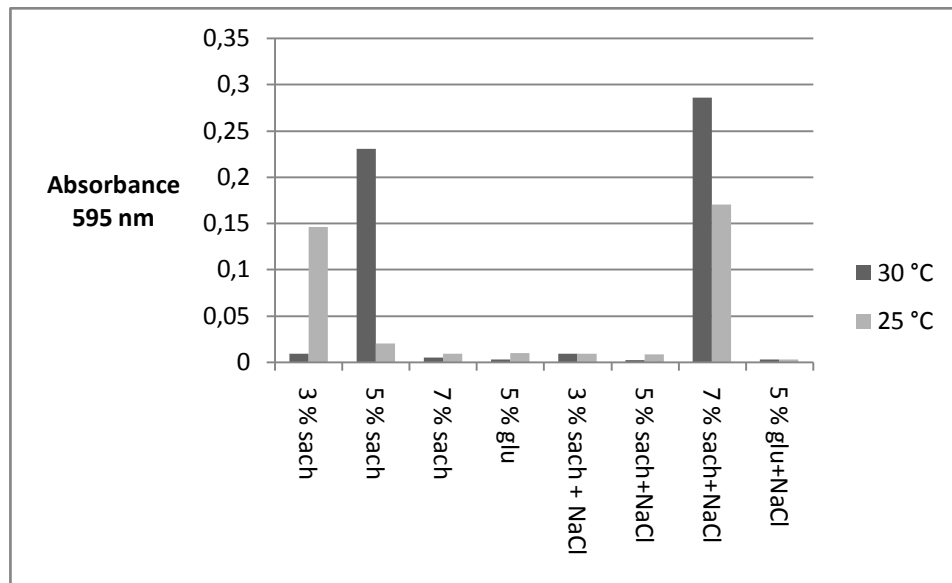


Obr. 20: Závislost absorpance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u *Staphylococcus hominid* 138



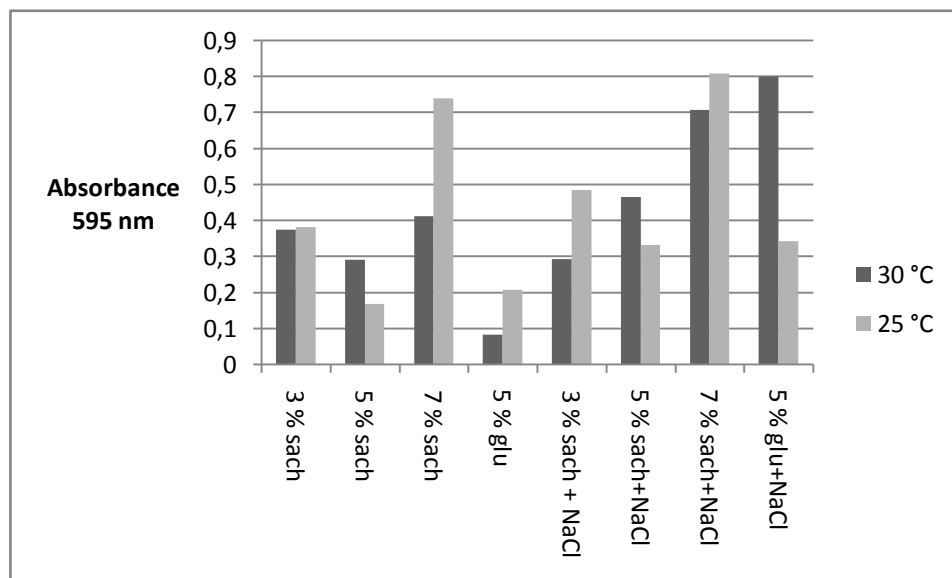
Obr. 21: Závislost absorpance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u *Staphylococcus epidermidis* 136

Obr. 22: Závislost absorpance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u*Pantoea agglomerans* 78Obr. 23: Závislost absorpance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u*Escherichia coli* 46



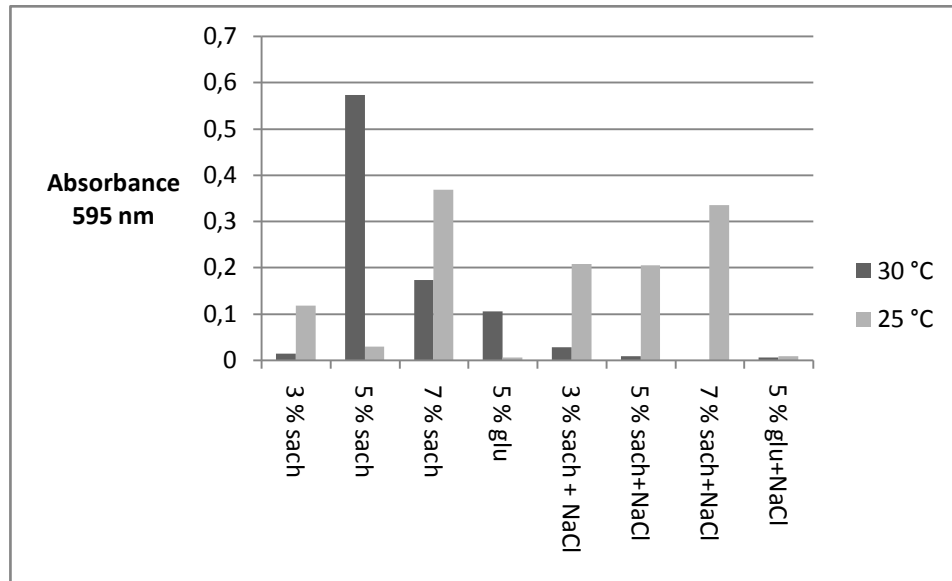
Obr. 24: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u

Citrobacter gilenii 66

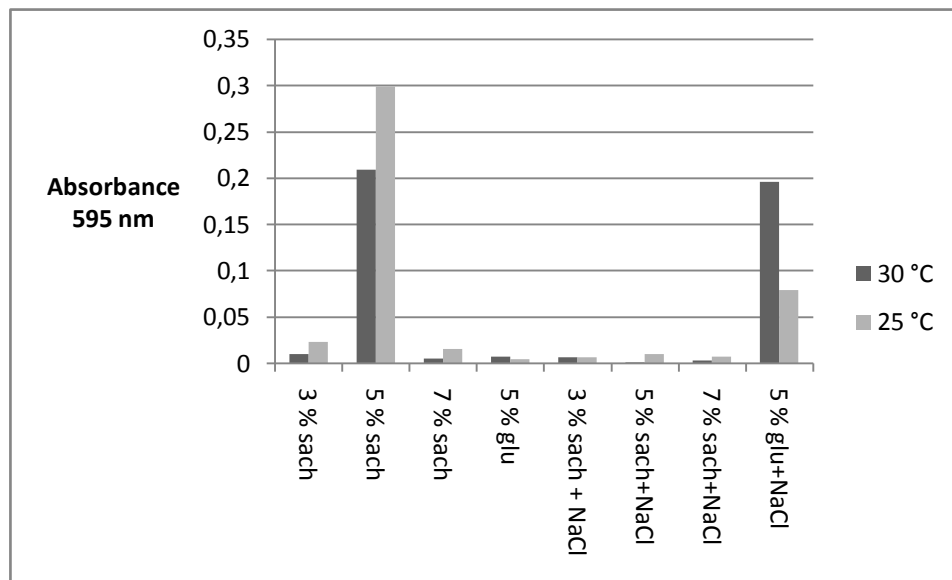


Obr. 25: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u

Serratia marcescens 114



Obr. 26: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u *Serratia liquefaciens* 108



Obr. 27: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u *Pseudomonas aeruginosa* 115

8 DISKUZE

V této diplomové práci byla experimentálně sledována tvorba biofilmu u potravinářsky významných bakterií, které byly izolovány z bažantů, masa králíků a ze sýrů. Dále byla tvorba biofilmu zkoumána u školních sbírkových kmenů, včetně bakterií mléčného kvašení a kmenů *Escherichia coli*.

Pro monitoring tvorby biofilmu byly použity dvě metody, a to Christensenova zkumavková metoda a stanovení tvorby biofilmu modifikací této metody pomocí mikrotitrační destičky.

Gupta et al. [106] testovali 50 klinických izolátů, a to z bakterie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, koaguláza negativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Těchto 50 izolátů bylo testováno na tvorbu biofilmu pomocí zkumavkové metody. Tvorba biofilmu je znázorněna na obr. 28.

<i>Organisms</i>	<i>Total no.</i>	<i>Heavy growth</i>	<i>Moderate growth</i>	<i>No/weak growth</i>
<i>Escherichia coli</i>	28	6	7	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	0	0	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1	2	0
NFGNB*	3	0	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	0	0
CoNS ⁺	8	0	1	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	0	1
Total	50	10	11	29

*NFGNB-Non fermenting gram negative bacilli. ⁺CoNS-Coagulase negative *Staphylococci*

Obr. 28: Tvorba biofilmu u testovaných 50 izolátů [106]

Na obrázku je zobrazeno testovaných 50 izolátů. U každé bakterie je zobrazen počet izolátů (total no.) a kolik z nich tvořilo silný (heavy), střední (moderate) nebo negativní/slabý (no/weak) biofilm. Při vlastním stanovení byla tvorba biofilmu u bakterií *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* negativní. Na obr. 28 lze vidět, že převážná část izolátů *Escherichia coli* a bakterie *Enterococcus faecalis* byla také negativní na tvorbu biofilmu, u *Pseudomonas aeruginosa* byla zachycena střední (+) tvorba biofilmu. Ostatní testované bakterie nebyly při vlastním stanovení zjišťovány zkumavkovou metodou. [106]

Planchon et al. [107] testovali na tvorbu biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody 12 kmenů *Staphylococcus xylosus*, které byly izolovány z fermentovaných salámů. Při stanovení byl rozdíl v použitém živném médiu, kdy kmeny byly kultivovány v bujónu TSB a produkce biofilmu byla testována jak na skleněném povrchu, tak i na polystyrenovém povrchu. Výsledky ukázaly, že 10 kmenů *Staphylococcus xylosus* tvořilo podstatně vyšší biofilm na skleněném povrchu, než na polystyrenových zkumavkách a pouze 1 kmen vytvářel biofilm na obou materiálech. [107] Při vlastním stanovení byla zkoumána tvorba biofilmu na skleněném povrchu u *Staphylococcus aureus*, který byl získán ze školní sbírky a u kmenů rodu *Staphylococcus* izolovaných ze svaloviny králíků. U všech vzorků byla tvorba biofilmu negativní. Na polystyrenovém povrchu byly testovány kmeny rodu *Staphylococcus*, které byly izolovány ze svaloviny králíka, produkci biofilmu vykazoval *Staphylococcus hominis*. Produkce biofilmu byla podpořena přidavkem sacharosy. Stejně tak tomu bylo u *Staphylococcus epidermidis*, který byl izolován z bažanta a produkoval biofilm na polystyrenovém povrchu během kultivace v bujónu s přidavkem sacharosy. *Staphylococcus epidermidis* obsahuje povrchové proteiny (autolysin), které především ovlivňují přilnutí k povrchu z polystyrenu, a napomáhají tvorbě biofilmu. Vyšší tvorba biofilmu u této bakterie je také spojována s mutantními kmeny, u kterých je znám gen *luxS*, který také podporuje produkci biofilmu. [48]

Christensenova zkumavková metoda je dle mého názoru poněkud nepřesná. Pro přesnost a ujištění, zda jsou testované bakterie biofilmnegativní či biofilmpozitivní, by se k této metodě měly využít i další doplňkové metody. Vyhodnocení této metody je velmi subjektivní, a proto dle mého názoru se nejedná o vhodnou metodu pro stanovení tvorby biofilmu.

U některých testovaných bakterií, při stanovení biofilmu pomocí polystyrenové mikrotitrační destičky, vyšla výsledná hodnota A_{595} v živném médiu BHI s 5 % sacharosou nižší, než v médiu BHI bez přidavku sacharosy, což mohlo být způsobeno tím, že na některé bakterie působí sacharosa v této koncentraci inhibičně nebo také tím, že její přítomnost nemá vliv na produkci exopolysacharidové matrice.

Tvorba biofilmu, při zkoumání vlivu vnějších podmínek, byla u většiny bakterií negativní. Vysoká tvorba biofilmu byla prokázána jen u *Staphylococcus epidermidis*, který byl kultivován při 30 °C v bujónu s přidavkem 3 % sacharosy. Při působení teploty 25 °C v bujónu s 3% sacharosou byla produkce biofilmu nižší. Lze tedy usoudit, že tvorbu biofilmu podporuje vyšší teplota. Bohužel ve většině případů nebylo potvrzeno, že v živném médiu BHI s 5 % sacharosy by dané bakterie produkovaly zvýšené množství biofilmu. Mohlo to být

způsobeno tím, že se bakterie neuchytily nebo v průběhu časového rozpětí odumřely. Přídavek 1 % NaCl do bujónu BHI snižoval nebo inhiboval tvorbu biofilmu u testovaných bakterií.

Podle Shin-Hee Kima a Cheng-I Weia [108] byla zkoumána tvorba biofilmu u bakterie *Salmonella* Typhimurium DT104, která byla izolována z mletého hovězího masa. Stanovení bylo provedeno v bujónu Luria Bertoni (LB) a LB s přídavkem 1 % NaCl, aby bylo zjištěno, jaký vliv má NaCl na tvorbu biofilmu. U testované bakterie *Salmonella* Typhimurium DT104 byla prokázána tvorba biofilmu v LB bujónu bez přídavku NaCl. [108] Potvrdilo se tedy, že účinek NaCl inhibuje tvorbu biofilmu. Při vlastním stanovení byl testován odlišný kmen *Salmonella* Typhimurium, který nebyl testován na účinek NaCl při tvorbě biofilmu, z toho důvodu, že tento kmen nevytvářel biofilm. Při stanovení vlivu vnějších faktorů u kmenů, které vykazovaly produkci biofilmu, přídavek 1 % NaCl inhiboval tvorbu biofilmu u většiny testovaných bakterií. Výjimku tvořil *Staphylococcus epidermidis*, u kterého je z obrázku 21 patrné, že bakterie v bujónu s přídavkem 3 a 7 % sacharosu a 1 % NaCl vykazovala střední tvorbu biofilmu. Briantet et al. [108] poukazují na skutečnost, že u *Staphylococcus* spp. přídavek NaCl naopak zlepšuje přilnavost na povrch z nerezové oceli a tím je podpořena produkce biofilmu. [108] Tato skutečnost může být rovněž dána tím, že stafylokoky jsou halotolerantní a přítomnost soli v prostředí výrazněji neovlivňuje jejich růst. [34]

Testované bakterie tvořící biofilm byly označeny jako biofilm pozitivní a je u nich možné riziko kontaminace v potravinářském průmyslu. U bakterie rodu *Escherichia*, která byla izolována z těla bažanta, kmenů *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* získaných ze školní sbírky, byla prokázána vyšší tvorba biofilmu. Tyto bakterie se řadí mezi potenciálně patogenní MO a mohou negativně ovlivňovat zdraví člověka. U další potenciálně patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* získané ze školní sbírky, nebyl jednoznačně prokázán výskyt biofilmu. Vyšší výskyt biofilmu byl u *Staphylococcus hominis* izolovaného z bažanta, který vytvářel biofilm v živném médiu BHI s přídavkem 5 % sacharosu. Jedná se ovšem o kmen, který je považován za nepatogenní.

Podle Sudaginana a Yemenicioglu [109] byla zkoumána tvorba biofilmu u patogenních kmenů *Staphylococcus aureus*, které byly izolovány ze sýra (12 kmenů) a syrového mléka (13 kmenů). Dále byl u těchto bakterií zkoumán účinek nisinu a lysozymu na tvorbu nebo inhibici biofilmu. Účinky těchto látek na kmeny *S. aureus* byly stanoveny v bujónu TSB, u kterého bylo upraveno pH na 6,5. Při tomto stanovení bylo zjištěno, že lysozym přidaný do

TSB v množství 1-5 mg/ml nevykazoval inhibiční účinky na tvorbu biofilmu bakterií *S. aureus*. Dále bylo zjištěno, že lysozym podporuje virulenci u testovaných bakterií. Lysozym tedy tvorbu biofilmu neovlivnil nebo jeho tvorbu mírně podpořil. Bylo prokázáno, že nisin v množství 25 mg/ml inhiboval růst všech kmenů *S. aureus* izolovaných ze syrového mléka. Bakterie vykazovaly citlivost už v koncentraci 0,5 mg nisinu/ml. Kmeny *S. aureus*, které byly izolovány ze sýra, byly vysoce citlivé na účinek nisinu, a to při koncentraci 12,5 mg/l. Peschel et al. [109] uvádí, že inhibiční účinky nisinu na bakterii *S. aureus* byly způsobeny kladně nabitými D-alanin estery, které jsou obsaženy v její buněčné stěně. Martinez et al. [109] zjistili, že účinek nisinu u těchto kmenů snižuje hydrofóbnost.

Podle Wondshorsta [110] byla na tvorbu biofilmu zkoumána bakterie *Salmonella enterica*, která byla izolována z drůbežárny. Stanovení bylo provedeno v bujónu LB. Bylo zjištěno, že *Salmonella enterica* izolovaná z vaječné skořápky tvořila biofilm, kdy výsledná hodnota A_{595} činila 1,659. U laboratorních kmenů nebyl prokázán výskyt biofilmu, výsledná hodnota A_{595} činila 0,441. [110] Při vlastním stanovení tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce bakterie *Salmonella enterica* nebyla v této diplomové práci zkoumána. Patogenní *Salmonella* Enteritidis byla testována Christensenovou zkumavkovou metodou, u které nebyl prokázán výskyt biofilmu na skleněném povrchu. Studie ukazují, že bakteriím rodu *Salmonella* vyhovuje, pro zvýšenou tvorbu biofilmu, spíše polystyrenový povrch.

Podle Djordjevice et al. [111] byl zkoumán růst a tvorba biofilmu u patogenní *Listeria monocytogenes*, která byla izolována z mořských plodů. Pro stanovení byl použit bujón MWB s přídavkem glukosy a se zdroji uhlíku. Byla prokázána vysoká tvorba biofilmu a dále bylo zjištěno, že přídavek uhlíku výrazněji neovlivňuje tvorbu biofilmu. Dále byla mikroskopicky zkoumána produkce biofilmu na povrchu z PVC a nerezové oceli. Bylo zjištěno, že vyšší produkce biofilmu bakterií *L. monocytogenes* byla na povrchu z PVC. [111] Jelikož patří *Listeria monocytogenes* mezi nebezpečné patogeny, nebylo možné provést vlastní stanovení, ale různými studiemi je prokázáno, že tato bakterie vytváří silný biofilm. Studie ukazují, že na tvorbu biofilmu u listérie má vliv především životné prostředí, teplota, pH a povrch.

9 ZÁVĚR

V této práci byly pro stanovení tvorby biofilmu u potravinářsky významných bakterií použity Christensenova zkumavková metoda a její modifikace v mikrotitrační destičce. Christensenova zkumavková metoda je velmi subjektivní a výsledky by měly být zkontrolovány i další metodou. Velmi vysoká tvorba biofilmu byla u bakterie *Pseudomonas fluorescens*, u které byla produkce biofilmu podpořena přidavkem 5 % sacharosu do bujónu BHI. Střední tvorba biofilmu byla u *Enterococcus* sp. E24. Tyto bakterie byly označeny jako biofilmpozitivní. Ostatní testované kmeny byly podle Christensenovy zkumavkové metody hodnoceny jako biofilmnegativní.

Použití mikrotitračních destiček pro stanovení produkce biofilmu je přesnější. Tvorba biofilmu byla hodnocena na základně výsledné hodnoty absorbance. Nejvyšší tvorba biofilmu byla zaznamenána u kmenů bakterie *Escherichia coli*, dále u *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, u kmenů bakterie *Citrobacter gillenii*, *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* a u mléčné bakterie *Lactobacillus casei*. Tyto testované bakterie byly zhodnoceny jako biofilmpozitivní.

Na tvorbu biofilmu má vliv celá řada faktorů, jedním z nich je povrch, na který bakterie adsorbují. Při stanovení tvorby biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody a pomocí polystyrenové mikrotitrační destičky bylo zjištěno, že bakterie lépe adherují na povrchu z polystyrenu, než na povrch ze skla. Lze tedy usoudit, že bakteriím lépe vyhovuje hydrofóbní materiál, než hydrofilní.

Při zkoumání účinku vnějšího prostředí, bylo zjištěno, že tvorbu biofilmu podporuje zvýšená teplota a naopak inhibuje prostředí s přidavkem NaCl. Výjimku ovšem tvoří kmeny rodu *Staphylococcus*, u kterých přidavek NaCl mírně podporoval produkci biofilmu.

Jelikož testované MO tvořící biofilm se vyskytují v potravinářském průmyslu a některé z nich jsou považovány za patogeny, měl by být kladen velký důraz na provozní a osobní hygienu a potravinářské provozy by měly splňovat kritéria dané HACCP.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DONLAN, M. R. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, roč. 2, č. 7, s. 277-281. ISSN 1080-6059.
- [2] ZAHRADNÍČEK, O. Lékařská mikrobiologie pro ZDLR [online] [3.2.2013]. Dostupný z
WWW: https://is.muni.cz/el/1411/.../T24_Zaklady_klinické_mikrobiologieI.ppt.
- [3] DONLAN, M. R. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, roč. 9, č. 8, s. 881-890. ISSN 1080-6059.
- [4] DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol.* 2000, roč. 4, č. 64, s. 847-867. ISSN 1092-2172.
- [5] COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999, č. 284, s. 1318-1322. ISSN 1095-9203.
- [6] ROBINSON, R. W., AKIN, D. E., NORDSTEDT, R. A., THOMAS, M. V., HENRY, C. Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *APPL Environ. Microbiol.* 1984, roč. 1, č. 48, s. 127-136. ISSN 1098-5336.
- [7] LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R., HOYLE, B. D., COSTERTON, J. W., CALDWELL, D. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 1991, roč. 20, č. 173, s. 6558-6567. ISSN 1098-5530.
- [8] POULSEN, L. V. Microbial biofilm in food processing: department of biotechnology, centre for advanced food studies. *Technic. Univer. of Denmark.* 1999, roč. 32, č. 6, s. 321-326. ISSN 1422-0067.
- [9] 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. Res.* 2002, roč. 3, č. 59, s. 557-562. ISSN 1552-4965.
- [10] SCHINDLER, J. *Ze života bakterií.* Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1666-9.

- [11] SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*. 2001, roč. 4, č. 80, s. 203-221. ISSN 1214-4029.
- [12] DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, roč. 2, č. 15, s. 167-193. ISSN 1098-6618.
- [13] COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1990, č. 11, s. 217-221. ISSN 0924-8579.
- [14] TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbiol. Ecol.* 2000, č. 40, s. 75-84. ISSN 1432-184X.
- [15] SUTHERLAND, W. I. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends. Microbiol.* 2001, roč. 5, č. 9, s. 222-227. ISSN 0966-842X.
- [16] SUTHERLAND, W. I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol.* 2001, č. 147, s. 3-9. ISSN 1465-2080.
- [17] O'TOOLE, G. O., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 2000, č. 54, s. 49-79. ISSN 0066-4227.
- [18] MAIER, R. M., PEPPER, I. L., GERBA, Ch. P. Environmental microbiology. *Elsevier (USA): Academic. Press.* 2000. ISSN 0269-9370.
- [19] STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G., COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. Microbiol.* 2002, č. 56, s. 187-209. ISSN 0066-4227.
- [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, roč. 280, č. 5361, s. 295-298. ISSN 1095-9203.
- [21] HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, č. 2, s. 95-108. ISSN 1740-1526.
- [22] RULÍK, M., HOLÁ, V., RŮŽIČKA, F., VOTAVA, M., a kol. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2011. ISBN 978-80-2442747-8.

- [23] SINGH, P. K., SCHAEFER, A. L., PARSEK, M. R., MONINGER, T. O., WELSH, M. J., GREENBERG, E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 2000, roč. 407, č. 6805, s. 762-764. ISSN 0028-0836.
- [24] VUONG, C., SAENZ, H. L., GOTZ, F., OTTO, M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2000, roč. 6, č. 182, s. 1688-1693. ISSN 1537-6613.
- [25] 3pol magazín: význam biofilmu [online] [6.11.2012]. Dostupný z WWW: www.tretipol.cz/index.asp?clanek&view&633.
- [26] Aquion: význam biofilmu [online] [6.11.2012]. Dostupný z WWW: www.aquion.cz/main.php?id2=105&submenu=1.
- [27] DUBÁNEK, V., CHVÁLA J. Technologie kontinuálně provzdušňované biofilmové nitrifikace při úpravě podzemní vody na vodu pitnou [online] [14.2.2013]. Dostupný z WWW: www.smv.cz/res/data/014/001650.pdf.
- [28] Bakterie: obecná charakteristika [online] [17.4.2013]. Dostupný z WWW: www.orko.cz/Biologie%202010/Baktérie.ppt.
- [29] Bakterie: stavba, význam v přírodě a pro člověka [online] [17.4.2013]. Dostupný z WWW: www.natur.cuni.cz/sbv/soubory/.../mikrobiologie_jarka.ppt.
- [30] SCHINDLER, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Academia, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
- [31] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [32] Biomach: bakterie [online] [17.4.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.biomach.cz/mikrobiologie/bakterie>.
- [33] ČERNOHORSKÁ, L. Tvorba biofilmu u mikrobů izolovaných z klinického materiálu [online] [3.2.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.cuni.cz/>.
- [34] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.

- [35] Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky: *Staphylococcus* [online] [22.3.2013].
Dostupný z WWW: www.svssr.sk/sk/spotrebitel/latky/Stafylococcus.asp.
- [36] DINGES, M. M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, roč. 1, č. 13, s. 16-34. ISSN 1098-6618.
- [37] TAULO, S., WETLESEN, A., ABRAHAMSEN, R. K., NARVHUS, J. A., MKAKOSYA, R. Quantification and variability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cross-contamination during servis and consumption of cooked thick porridge in Lungwena rural households. *Food Control.* 2009, č. 20, s. 1158-1166. ISSN 0956-7135.
- [38] SHARMA, M., ANAND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 2002, č. 19, s. 627-636. ISSN 0956-7135.
- [39] KLOOS, W. E., SCHLEIFER, K. H. *Staphylococcus. Genus IV.* 1986, č. 2, s. 1013-1035. ISSN 1573-8388.
- [40] VUONG, C., OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002, roč. 4, č. 4, s. 481-489. ISSN 1286-4579.
- [41] VON EIFF, C., PETERS, G., HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet. Infect.* 2002, roč. 2, s. 677-685. ISSN 1474-4457.
- [42] ZIEBUHR, W., HENNING, S., ECKART, M., KRÄNZLER, H., BATZILLA, C., KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006, č. 28, s. 14-20. ISSN 0924-8579.
- [43] GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 2002, č. 43, s. 1367-1378. ISSN 1365-2958.
- [44] HUSSAIN, M., HERRMANN, M., VON EIFF, C., PERDREAU-REMITON, F., PETERS, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* 1997, roč. 2, č. 65, s. 519-524. ISSN 1098-5522.

- [45] RUPP, M. E., FUX, C. A., STOODLEY, P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, roč. 4, č. 71, s. 2175-2178. ISSN 1098-5336.
- [46] YARWOOD, J. M., BARTELS, D. J., VOLPER, E. M., GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* 2004, roč. 6, č. 186, s. 1838-1850. ISSN 1098-5530.
- [47] BASSLER, B. L., GREENBERG, E. P., STEVENS, A. M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 1997, č. 179, s. 4043-4045. ISSN 1098-5530.
- [48] XU, L., LI, H., VUONG, C., VADYVALOO, V., WANG, J., YAO, Y., OTTO, M., GAO, Q. Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 2006, roč. 1, č. 74, s. 488-496. ISSN 1098-5522.
- [49] JI, G., BEAVIS, R. C., NOVICK, R. P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, roč. 26, č. 92, s. 12055-12059. ISSN 0027-8424.
- [50] KONG, K. F., VUONG, C., OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006, č. 296, s. 113-139. ISSN 1438-4221.
- [51] BESSEN, D. E. Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Elsevier.* 2009, roč. 9, č. 4, s. 581-593. ISSN 1438-4221.
- [52] GOMEZ-VALERO, L., RUSNIOK, C., BUCHRIESER, C. *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. *Infect. Genet. Evolut.* 2009, roč. 5, č. 9, s. 727-739. ISSN 1567-1348.
- [53] Repetitorium: *Legionella pneumophila* [online] [22.3.2013]. Dostupný z WWW: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/lepn.htm>.
- [54] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-2380-297-6.
- [55] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

- [56] PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, roč. 16, č. 97, s. 8789-8793. ISSN 0027-8424.
- [57] DUAN, K., SURETTE, M. G. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* AO1 las and rhl quorum-sensing systém. *J. Bacteriol.* 2007, č. 189, s. 4827-4836. ISSN 0021-9193.
- [58] READING, N. C., SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microb. Lett.* 2006, č. 254, s. 1-11. ISSN 1574-6968.
- [59] PESCI, E. C., MILBANK, J. B. J., PEARSON, J. P., McKNIGHT, A. S., KENDE, A. S., GREENBERG, E. P., IGLEWSKI, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. of the Nat. Acad. Sci USA*. 1999, č. 96, s. 11229-11234. ISSN 0027-8424.
- [60] *Listeria monocytogenes*: základní charakteristika [online] [22.3.2013]. Dostupný z WWW: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/lm/index.html>.
- [61] HANNA, S. E., WANG, H. H. Biofilm development by *Listeria monocytogenes*. *John Wiley & Sons Retrieved*. 2007, s. 48-71.
- [62] Mlékařské listy: Podmínky tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes* [online] [22.3.2013]. Dostupný z WWW: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2009/112_s._12-15.pdf.
- [63] GARRITY, G. M., BRENNER, G. E., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer, 2005. ISBN 978-0-387-98771-2.
- [64] MANOS, J., BELAS, R. The Genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella* [online] [3.4.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.prokaryotes.com>.
- [65] SABBUBA, N. A., MAHENTHIRALINGAM, E., STICKLER, D. E. Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* 2003, č. 41, s. 4961-4965. ISSN 1435-4373.
- [66] JONES, S. M., YERLY, J., HU, Y., CERI, H., MARTINUZZI, R. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, č. 268, s. 16-21. ISSN 1574-6968.
- [67] *Salmonella* spp.: základní charakteristika [online] [3.4.2013]. Dostupný z WWW: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/sal/sal.html>.

- [68] DIÉZ-GARCÍA, M., CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 2012, roč. 31, č. 2, s. 173-180. ISSN 1095-9998.
- [69] *Bacillus cereus*: základní charakteristika [online] [3.4.2013]. Dostupný z WWW: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/sal/sal.html>.
- [70] PAGEDAR, A., SINGH, J. Influence of psychological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. *Int. Dairy J.* 2012, roč. 23, č. 1, s. 30-35. ISSN 0958-6946.
- [71] AUSTIN, J. W., BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J. Dairy Res.* 1995, č. 62, s. 509-519. ISSN 1469-7629.
- [72] KUMAR, C. G., ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, č. 42, s. 9-27. ISSN 0168-1605.
- [73] VONDRÁŠKOVÁ, Š. Bakteriální biofilmy v potravinářském průmyslu [online] [15.2.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=116673&ids=176>.
- [74] SPOLEČNOST PRO EPIDEMIOLOGII A MIKROBIOLOGII ČLS JEP. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Praha: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 1994. ISBN 1210-7913.
- [75] European Food Information Council: Svět mikroorganismů [online] [17.4.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.eufic.org/article/cs/page/FTARCHIVE/artid/svet-mikroorganismu/>.
- [76] SONNENBORN, U., SCHULZE, J. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917-features of a versatile probiotic. *Microbiol. Ecol.* 2009, roč. 2, č. 21, s. 122-158. ISSN 0095-3628.
- [77] LUKÁŠ, M. *Escherichia coli* (*Escherichia coli* kmen Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1) jako probiotikum v klinické praxi [online] [22.3.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Escherichia-coli-Escherichia-coli-kmen-Nissle-1917-serotyp-O6-K5-H1-jako-probiotikum-v-klinicke-praxi/6-E-dF.magarticle.aspx>.
- [78] ALTENHOEFER, A., OSWALD, S., SONNENBORN, U., ENDERS, C., SCHULZE, J., HACKER, J., OELSCHLAEGGER, TA. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells

- by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004, č. 40, s. 223-229. ISSN 0928-8244.
- [79] OELSCHLAEGER, TA. Mechanisms of probiotic actions. *A review. Int. J. Med. Microbiol.* 2010, č. 300, s. 57-62. ISSN 1438-4221.
- [80] BUENAU, R., JEAKEL, L., SHUBOTZ, E., SCHWARZ, S., STROFF, T., KRUEGER, M. *Escherichia coli* Strain Nissle 1917: Significant Reduction of Neonatal Calf Diarrhea. *J. Dairy Sci.* 2005, č. 88, s. 317-323. ISSN 1525-3198.
- [81] HANCOCK, V., FERIÉRES, L., KLEMM, P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, č. 267, s. 30-37. ISSN 1574-6968.
- [82] CARR, F. J., CHILL, D., MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002, č. 28, s. 281-370. ISSN 1549-7828.
- [83] KUBOTA, H., SENDA, S., NOMURA, N., TOKUDA, H., UCHIYAMA, H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J. Biosci. Bioeng.* 2008, č. 106, s. 381-386. ISSN 1389-1723.
- [84] JONES, S. E., VERSALOVIC, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 2009, č. 9, s. 35-43. ISSN 1471-2180.
- [85] LEBEER, S., VERHOEVEN, T. L. A., De KEERSMAECKER, S. C. J., FADDA, A. A., MARCHAL, K., VANDERLEYDEN, J. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2007a, č. 189, s. 860-871. ISSN 1098-5530.
- [86] LEHTOLA, J. M., MIETTINEN, T. I., KEINÄNEN, M. M., KEKKI, K. T., LAINE, O., HIRVONEN, A., VARTIAINEN, T., MARTIKAINEN, J. P. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res.* 2004, roč. 17, č. 38, s. 3769-3779. ISSN 0043-1354.
- [87] Požadavky na pitnou vodu: vyhláška č. 252/2004 Sb. [online] [22.3.2013]. Dostupný z WWW: <http://www.pvk.cz/res/data/000074.pdf?seek=7>.
- [88] RŮŽIČKA, F., HOLÁ, V., VOTAVA, M. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 2006, roč. 1, č. 55, s. 23-29. ISSN 1210-7913.

- [89] CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., BADDOUR, L. M., BARRETT, F. F., MELTON, D., BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical device. *J. Clin. Microbiol.* 1985, roč. 22, č. 6, s. 996-1006. ISSN 1098-660X.
- [90] MÜLLER, E., ASMUS, B., HARTMANN, A., SEILER, K. P. The in situ detection of microbial biofilm on karst rock coupon in groundwater habitat. *Lancaster: Tech. Publ. Co.* 2000, s. 155-163.
- [91] AN, Y. H., FRIEDMAN, R. J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. Microbiol. Methods.* 1997, roč. 2, č. 30, s. 141-152. ISSN 0167-7012.
- [92] CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., BISNO, A. L., BEACHEY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 1982, roč. 37, č. 1, s. 318-326. ISSN 1098-5522.
- [93] STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.* 2000, roč. 40, č. 2, s. 175-179. ISSN 0167-7012.
- [94] KENNEDY, C. A., O'GARA, J. P. Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 2004, č. 53, s. 1171-1173. ISSN 1473-5644.
- [95] GRACIA, E., FERNANDEZ, A., CONCHELLO, P., LACLERIGA, A., PANIAGUA, L., SERAL, F., AMORENA, B. Adherence of *Staphylococcus aureus* slime-producing strain variants to biomaterials used in orthopaedic surgery. *Int. Orthop.* 1997, roč. 21, č. 1, s. 46-51. ISSN 1432-5195.
- [96] CHEUNG, A. L., SCHMIDT, K., BATEMAN, B., MANNA, A. C. SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2001, roč. 4, č. 69, s. 2448-2455. ISSN 1098-5522.
- [97] CRAMTON, S. E., GERKE, C., SCHNELL, N. F., NICHOLS, W. W., GOTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 1999, roč. 10, č. 67, s. 5427-5433. ISSN 1098-5522.

- [98] BAI, R. K., PERNG, C. L., HSU, C. H., WONG, L. J. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 2004, 1011, s. 304-309. ISSN 0077-8923.
- [99] ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N., PATEL, R. H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2005, roč. 2, č. 5, s. 209-219. ISSN 1473-7159.
- [100] CARDULLO, R. A., AGRAWAL, S., FLORES, C., ZAMECNICK, P. C., WOLF, D. E. Detection of nucleic acid hybridization by non-radiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, č. 85, s. 8790-8794. ISSN 0027-8424.
- [101] MORRISON, T. B., WEIS, J. J., WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotech.* 1998, č. 24, s. 954-962. ISSN 1860-7314.
- [102] BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, č. 25, s. 169-193. ISSN 1479-6813.
- [103] PFAFFL, M. V. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Oxf. Univer. Press.* 2001, č. 29, s. 2002-2007.
- [104] BISCOLA, F. T., ABE, C. M., GUTH, B. E. C. Determination of Adhesin Gene Sequences in, and Biofilm Formation by, O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, roč. 7, č. 77, s. 2201-2208. ISSN 1098-5336.
- [105] DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M., McLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, roč. 6, č. 68, s. 2950. ISSN 1098-5336.
- [106] GUPTA, S., AGARWAL, S., SAHOO, D. R., MURALIDHARAN, S. *In vitro* production of biofilm in a flow cell system in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* and determination of efficiency of ciprofloxacin against them. *Ind. J. Pathol. Microb.* 2011, roč. 3, č. 54, s. 569-571. ISSN 0974-5130.
- [107] PLANCHON, S., GAILLARD-MARTINIE, B., DORDET-FRISONI, E., BELLON-FONTAINE, M. N., LEROY, S., LABADIE, J., HÉBRAUD, M., TALON, R. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Inter. J. Food Microbiol.* 2006, roč. 106, č. 1-2, s. 88-96. ISSN 0168-1605.

- [108] KIM, S. H., WEI, C. L. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 on food contact surfaces. *J. Food Prot.* 2009, roč. 9, č. 72, s. 1841-1847. ISSN 1944-9097.
- [109] SUDAGIDAN, M. M., YEMENICIOGLU, A. A. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. *J. Food Prot.* 2012, roč. 9, č. 75, s. 1627-1633. ISSN 1944-9097.
- [110] SCHONEWILLE, E., NESSE, L. L., HAUCK, R., WINDHORST, D., HAFEZ, H. M., VESTBY, L. K. Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.* 2012, roč. 2, č. 65, s. 360-365. ISSN 1574-695X.
- [111] ČERMÁK, P. Klinická mikrobiologie – biofilm [online] [6.11.2012]. Dostupný z WWW: http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/cermak/klinicka_mikrobiologie-biofilm.pdf.
- [112] Quorum sensing: mechanismus quorum sensing [online] [6.11.2012]. Dostupný z WWW: <http://qscreceptor.blogspot.cz/p/quorum-sensing.html>.
- [113] Portál: atlas mikrobiologických kultivací [online] [13.2.2013]. Dostupný z WWW: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Port%C3%A1l:Atlas_mikrobiologick%C3%B4ch_kultivac%C3%AD.
- [114] Repetitorium: *Legionella pneumophila* [online] [13.2.2013]. Dostupný z WWW: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/graphics/lepn.jpg>.
- [115] Department of Veterinary Disease Biology: *Bacillus cereus* [online] [13.2.2013]. Dostupný z WWW: http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/bacteria/Bacillus_cereus/.
- [116] DOLEŽÁLKOVÁ, I. BUŇKOVÁ, L. Možnosti tvorby biofilmu bakteriemi. *Mikrobiologie potravin a kosmetiky – lab. cvičení.* 2011, s. 4.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
Agr	Genový regulátor
AI-2	Autoinduktor -2
AMK	Aminokyselina
ATB	Antibiotika
BHI	Mozkosrdcová infuze
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CFU	Kolonie tvořící jednotku
CRL	Regulátorový gen
CSLM	Skenovací laserová mikroskopie
CSP	Signální peptid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EPS	Extracelulární polysacharidová substance
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
LB	Lurio Bertani bujón
MH	Mezní hodnota
MO	Mikroorganismus
MPB	Masopeptonový bujón
NMH	Nejvyšší mezní hodnota
OD	Optická denzita
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PVC	Polyvinylchlorid
QS	Quorum sensing
RNA	Ribonukleová kyselina
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie

STEC *E. coli* produkující shiga toxin

TSB Trypton sojový bujón

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Struktura biofilmu (houbovitá) [111]	13
Obrázek 2. Mechanismus <i>quorum sensing</i> [112].....	17
Obrázek 3. <i>Staphylococcus aureus</i> na krevním agaru [113]	20
Obrázek 4. <i>Streptococcus pyogenes</i> na krevním agaru [113].....	23
Obrázek 5. <i>Escherichia coli</i> na krevním agaru [113].....	24
Obrázek 6. <i>Legionella pneumophila</i> [114]	24
Obrázek 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na krevním agaru [113]	25
Obrázek 8. Chemická struktura signálních molekul [59].....	26
Obrázek 9. Struktura biofilmu u <i>Listeria monocytogenes</i> [61]	28
Obrázek 10. Buňky bakterie <i>Proteus mirabilis</i> [64]	28
Obrázek 11. <i>Salmonella enteritidis</i> na krevním agaru [113].....	29
Obrázek 12. <i>Bacillus cereus</i> na krevním agaru [115]	30
Obrázek 13. Průkaz tvorby biofilmu u <i>Staphylococcus epidermidis</i> [74].....	38
Obrázek 14. Christensenova metoda v mikrotitační destičce [89].....	39
Obrázek 15. Christensenova zkumavková metoda [116]	46
Obrázek 16: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Enterococcus faecium</i>	64
Obrázek 17: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Enterococcus faecalis</i>	64
Obrázek 18: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Lactobacillus paracasei</i>	65
Obrázek 19: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Lactobacillus curvatus</i>	65
Obrázek 20: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Staphylococcus hominis</i>	66

Obrázek 21: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Staphylococcus epidermidis</i>	66
Obrázek 22: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Pantoea agglomerans</i>	67
Obrázek 23: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Escherichia coli</i>	67
Obrázek 24: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Citrobacter gilonii</i>	68
Obrázek 25: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Serratia marcescens</i>	68
Obrázek 26: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Serratia liquefaciens</i>	69
Obrázek 27: Závislost absorbance A_{595} na vlivu vnějších podmínek u <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Obrázek 28. Tvorba biofilmu u testovaných 50 izolátů [106].....	70

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Mikrobiologické a biologické ukazatele pitné vody a jejich hygienické rozsahy.....	36
Tab. 2. Tvorba biofilmu u testovaných bakterií ze školní sbírky	49
Tab. 3. Výsledné hodnoty absorbance u testovaných bakterií izolovaných z bažanta.....	53
Tab. 4. Výsledné hodnoty absorbance u bakterií r. <i>Enterococcus</i> a r. <i>Staphylococcus</i>	56
Tab. 5. Výsledné hodnoty absorbance u kmenů bakterií <i>Escherichia coli</i>	57
Tab. 6. Výsledné hodnoty absorbance u testovaných bakterií.....	59
Tab. 7. Výsledné hodnoty absorbance u mléčných bakterií	62