Quorum sensing u rodu *Lactobacillus*

Bc. Jana Langášková

Diplomová práce
2023

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Jana Langášková**
Osobní číslo:	**T19779**
Studijní program:	**N0721A210004 Technologie potravin**
Forma studia:	**Kombinovaná**
Téma práce:	**Quorum sensing u rodu Lactobacillus**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část
Charakteristika laktobacilů.
Biofilm.
II. Praktická část
Kultivační metody pro stanovení biofilm pozitivních bakterií.
Vliv laktobacilů na tvorbu biofilmů.
Vyhodnocení a zpracování výsledků
Diskuze a formulace závěrů

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

Seznam doporučené literatury:

[1] A.N. Ramos, M.E. Sesto Cabral, M.E. Arena, C.F. Arrighi, A.A. Arroyo Aguilar, J.C. Valdez, Compounds from Lactobacillus plantarum culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. Pharmaceutical Biology, 53 (3) (2015), pp. 350-358
[2] F.A. Sadiq, S. Flint, L. Yuan, Y. Li, T. Liu, G. He. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. International Journal of Food Microbiology, 262 (2017), pp. 89-98

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

Oponent diplomové práce: **Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

……..
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakterie jsou sociální organismy, vytvářející na různých površích organizovaná společenství nazývající se biofilmy, které usnadňují přežití společenství větší odolností proti vnějším vlivům a zajištěním zdrojů živin. Quorum sensing je klíčovým mechanismem, kterým bakterie v biofilmu mezi sebou komunikují a který reguluje fenotypové vlastnosti jako je virulence, bioluminiscence, horizontální přenos DNA, syntéza antibiotik a bakteriocinů, a také tvorbu biofilmu.

V teoretické části je popsána charakteristika a vlastnosti rodu *Lactobacillus*, vlastnosti a tvorbu biofilm a je uveden také stručný přehled základních mechanismů quorum sensing včetně metod jejich detekce.

V části experimentální bylo cílem zjistit, které ze 45 vybraných druhů rodu *Lactobacillus* produkují biofilm a také vyhodnotit jejich růst pomocí růstových křivek. Tvorba biofilmu byla detekována pomocí Christensenovy metody.

Z výsledků vyplývá, že ze souboru 45 testovaných vzorků rodu *Lactobacillus* je 13 z nich schopno tvořit biofilm, což je předpokladem pro možnou aktivaci systému komunikace quorum sensing mezi těmito bakteriemi i v laboratorních podmínkách.

Klíčová slova: bakterie, biofilm, Christensenova metoda, *Lactobacillus*, quorum sensing, růstové křivky

ABSTRACT

Bacteria are social organisms forming organized communities on various surfaces called biofilms, which allow the survival of the bacterial community by better resistance towards external factors and better nutrient acquisition. The quorum sensing is the key mechanism by which bacteria communicate and which regulates the phenotypic properties as virulence, bioluminescence, horizontal DNA transfer, synthesis of antibiotics and bacteriocins and also a biofilm formation.

The theoretical part describes the characteristics and properties of the genus *Lactobacillus*, formation and properties of a biofilm and also briefly overviews basic mechanisms of quorum sensing including detection methods.

The aim of the experimental part was to determine which of 45 selected strains of *Lactobacillus* produce the biofilm and to evaluate their growth according to growth curves. The biofilm formation was detected using the method of Christensen.

The results showed that from the set of 45 tested strains of *Lactobacillus*, 13 strains are able to weakly form the biofilm which is a presumption for a possible activation of quorum sensing communication among bacteria in laboratory conditions.

Keywords: bacteria, biofilm, growth curves, Christensen method, *Lactobacillus*, quorum sensing

Ráda bych poděkovala Ing. Pavlu Plevovi PhD., vedoucímu mé diplomové práce za jeho rady a čas, který mi věnoval při konzultacích a vypracovávání této diplomové práce a Ing. Lucii Bartošové a kolektivu v laboratořích mikrobiologie za přátelský přístup a pomoc s některými částmi experimentů.

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 BAKTERIE RODU *LACTOBACILLUS* **12**
1.1 TAXONOMIE RODU *LACTOBACILLUS* 12
1.2 OBECNÉ VLASTNOSTI RODU *LACTOBACILLUS* 13
1.3 METABOLISMUS RODU *LACTOBACILLUS* 14
1.4 PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI RODU *LACTOBACILLUS* 14
1.5 AKTIVITA LAKTOBACILŮ V POTRAVINÁCH 15
1.6 *LACTOBACILLUS* A TVORBA BAKTERIOCINŮ 16
1.7 KMENY RODU *LACTOBACILLUS* S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU 17
1.7.1 Lactobacillus plantarum 17
1.7.2 Lactobacillus acidophilus 18
1.7.3 Lactobacillus brevis 18
1.7.4 Lactobacillus fermentum 18
1.7.5 Lactobacillus vurvatus 19
1.7.6 Lactobacillus casei 19
1.7.7 Lactobacillus paracasei 19
1.7.8 Lactobacillus gasseri 19
2 BIOFILM **21**
2.1 VÝVOJ A SLOŽENÍ BIOFILMU 22
2.2 VÝZNAM BIOFILMU V POTRAVINÁŘSTVÍ 23
2.3 VÝZNAM BIOFILMU V MEDICÍNĚ 24
2.4 QUORUM SENSING 24
2.4.1 Quorum sensing u grampozitivních bakterií 25
2.4.2 Quorum sensing u gramnegativních bakterií 26
2.4.3 Quorum sensing universální – mezidruhový signální systém 28
2.4.4 Quorum sensing u rodu *Lactobacillus* 28
2.4.5 Quorum quenching 30
2.5 METODY DETEKCE BIOFILMU 32
2.6 METODY DETEKCE QUORUM SENSING 34
II PRAKTICKÁ ČÁST **36**
3 METODIKA **37**
3.1 MATERIÁL KE KULTIVACI 37
3.1.1 Seznam kmenů 37
3.1.2 Živná půda pro laktobacily 39
3.1.3 Laboratorní pomůcky a chemikálie 39
3.1.4 Přístrojová technika pro kultivaci a stanovení biofilmu 40
3.1.5 Oživení lyofilizovaných kultur 40

3.2 KULTIVAČNÍ METODY PRO STANOVENÍ BIOFILM POZITIVNÍCH KMENŮ 40
3.2.1 Christensenova metoda stanovení tvorby biofilmu 40
3.2.2 Postup kultivace v mikrotitračních destičkách Christensenova metoda 40
3.2.3 Stanovení hraniční hodnoty pro biofimpozitivitu bakterií 41
4 VÝSLEDKY A DISKUSE 42
4.1.1 Srovnání výsledků tvorby biofilmu u testovaných laktobacilů 58
ZÁVĚR 60
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 61
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 70
SEZNAM OBRÁZKŮ 71

ÚVOD

Biofilmy jsou společenství mikroorganismů, které žijí přichycené k biotickému nebo abiotickému povrchu. Tvorba biofilmu je vícestupňový proces, při kterém mikrobiální buňky přilnou k povrchu a jsou upevněny extracelulární matricí, obsahující polysacharidy, proteiny a DNA. Buňky usazené v této matrici mezi sebou komunikují a vykazují koordinované skupinové chování zprostředkované procesem zvaným quorum sensing. Bakterie žijící v biofilmu se fyziologicky i geneticky odlišují od planktonických bakterií a jednou z jejich typických vlastností je zvýšená odolnost k běžně používaným antimikrobiálním látkám (Coenye a Nelis, 2010).

Tvorba biofilmu probiotickými bakteriemi, jako jsou *Lactobacillus* spp. je považována za prospěšnou vlastnost, protože by mohla podpořit kolonizaci a delší setrvání ve slizničních tkáních hostitele a zabránit tak kolonizaci patogenními bakteriemi. Schopnost rodu *Lactobacillus* tvořit biofilmy na abiotických površích (sklo nebo polystyren) byla v posledních letech studována a výsledky ukazují, že tuto vlastnost mají pouze některé kmeny. Bylo také prokázáno, že extracelulární polymerní látky produkované některými biofilmotvornými kmeny jsou schopny inhibovat tvorbu biofilmů některých patogenních bakterií (Salas-Jara *et al*., 2016).

V této práci jsme chtěli zjistit, jaká je schopnost některých sbírkových bakterií rodu *Lactobacillus* aktivovat systém quorum sensing a produkovat biofilm v laboratorních podmínkách a jak na produkci biofilmu působí nastavené kultivační podmínky. Zjistit a podle nejnovějších dostupných literárních zdrojů diskutovat souvislosti mezi biofilmem a systémem quorum sensing.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE RODU *LACTOBACILLUS*

1.1 Taxonomie rodu *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* zahrnuje přes 170 druhů a 17 poddruhů, které nelze jednoduše fenotypově odlišit a často je nutná molekulární identifikace. Ačkoliv jsou součástí běžné gastrointestinální a vaginální mikroflóry, mohou být také příležitostnými oportunními patogeny. Kmeny rodu *Lactobacillus* jsou obecně odolné vůči kyselinám, a proto jsou schopny přežít průchod gastrointestinálním traktem. V lidském organismu existuje řada ekologických nik a různých laktobacilů. *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* bývá obyčejně izolován ze střeva. Ze sliznice žaludku jsou izolovány *Lactobacillus antri, Lactobacillus gastricus, Lactobacillus kalixensis, Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus ultunensis* častými vaginálními izoláty jsou *Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus jensenii, Lactobacillus vaginalis* a *Lactobacillus iners* (Goldstein *et al.*, 2015).

Podle taxonomické klasifikace náleží rod *Lactobacillus* do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacili* a řádu *Lactobacillales*. Šest čeledí *Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae* zahrnuje rody *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus*, *Tetragenococcus, Vagococcus, Oenococcus, Pediococcus, a Weissella*. Tyto rody se rozlišují na základě tvaru, produkce CO_2, růstu při 10 °C až 45 °C, růstu při koncentraci 6,5 až 18 % NaCl, růstu při koncentraci pH 4,4 až 9,6 a typu produkované kyseliny mléčné. V řádu Lactobacillales jsou zařazeny i rody, které se projevují jako patogeny jsou to *Streptococcus, Enterococcus a Carnobacterium* (Horáčková, 2018).

K březnu roku 2020 rod *Lactobacillus* zahrnoval 261 druhů, které jsou velmi rozmanité na fenotypové, ekologické a genotypové úrovni. Ve studii autorů (Zheng et al., 2020) byla nově vyhodnocena taxonomie čeledí *Lactobacillaceae* a *Leucostonocaceae* na základě celých genomových sekvencí. Na základě těchto výsledků byla navržena reklasifikace rodu *Lactobacillus* do 25 kmenů, které mají novelizované označení. Jako příklad lze uvést synonyma pro *Lactobacillus plantarum-Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus casei-Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus fermentum-Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus hilgardii-Lentilactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus rhamnosus-Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei-Latilactobacillus sakei*, *Lactobacillus*

paracasei-Lacticaseibacillus paracasei. Tato reklasifikace odráží fylogenetickou pozici mikroorganismů a seskupuje je do početných klastrů se shodnými ekologickými a metabolickými vlastnostmi. Rodový název *Lactobacillus* je však nadále používán pro označení všech mikroorganismů, které byly do roku 2020 zařazeny do čeledi *Lactobacillacae*.

1.2 Obecné vlastnosti rodu *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je velkou a rozmanitou skupinu kmenů a mnoho z nich má prospěšné účinky na zdraví člověka a zvířat. Některé se specializují na určitý ekosystém například *Lactobacillus johnsonii* se vyskytuje v gastrointestinálním traktu, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v mléčných výrobcích. Jako mnohem přizpůsobivější druh můžeme označit například *Lactobacillus plantarum*, kterého můžeme najít nejen na rostlinném materiálu v živočišném gastrointestinálním traktu, ale i ve fermentovaných potravinách (Sturme *et al.*, 2007).

Lactobacillus spp. jsou grampozitivní tyčinky a jejich morfologie se může lišit, zahrnuje krátké baculaté tyčinky, štíhlé a dlouhé seskupené v hroznech anebo v palisádách. Jejich koloniální vzhled se může lišit od malých až po středně velké šedé kolonie, které na krevním agaru vykazují alfa hemolýzu na krevním agaru. Rostou na různých mediích včetně MRS agaru (Man, Rogosa a Sharpe), kde se jeví jako bílé, obvykle mukoidní kolonie (Goldstein *et al.*, 2015).

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou také souhrnně nazývány jako LAB (Lactic acid bacteria). LAB jsou nesporotvorné grampozitivní tyčinky nebo koky. Tyto bakterie sdílí řadu dalších shodných charakteristik. Jsou to většinou anaerobní a aerotolerantní mikroorganismy, které z důvodu absence cytochromů a porfyrinů neprodukují katalázu a oxidázu. Buněčnou energii získávají fermentací cukrů a jejím hlavním produktem je kyselina mléčná a další produkty. LAB rozdělujeme podle typu dráhy fermentace cukrů a podle typu metabolitů na homofermentativní a heterofermentativní (Adams *et al*., 2008).

Homofermentativní bakterie fermentují sacharidy na kyselinu mléčnou a neprodukují oxid uhličitý. Heterofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* metabolizují sacharidy na kyselinu mléčnou, ale i na jiné produkty, jako je kyselina octová a oxid uhličitý. Většina zástupců *Lactobacillus* vyžaduje pro fermentaci látek jako je cukr aktivitu vody nad hodnotou 0,95

pod tento limit výrazně omezuje svůj růst. Pro jejich růst je také nutná hodnota pH vyšší než 3,2 (Feiner, 2006).

1.3 Metabolismus rodu *Lactobacillus*

Technologická funkce LAB je spojena s metabolismem sacharidů. Fermentace hexos se uskutečňuje pomocí dvou metabolických drah, je to Embden-Mayerhof-Parnasova glykolytická dráha pro homofermentativní rozklad, při němž vzniká pouze kyselina mléčná. Druhou glykolytickou drahou je pentoso-fosfoketolázová dráha typická pro heterofermentativní rozklad, který kromě kyseliny mléčné poskytuje také významné množství oxidu uhličitého, ethanolu a acetátu. Kromě metabolismu sacharidů je však při výrobě potravin důležitý i metabolismus bílkovin. Proteolytický systém LAB byl popsán u rodu *Lactococcus* ve vztahu k rozkladu kaseinu v mléce. Tento systém je důležitý nejen pro růst těchto bakterií ale i pro organoleptické vlastnosti potravin vyráběných pomocí LAB. (Horáčková, 2018)

1.4 Probiotické vlastnosti rodu *Lactobacillus*

Laktobacily jsou součástí mikrobioty přítomné v lidském gastrointestinálním a urogenitálním traktu. V poslední době se věnuje stále větší pozornost jejich probiotickým, zdraví podporujícím schopnostem. Základem schopností laktobacilů podporujících zdraví hostitele, je inhibice patogenů a obnovení mikrobiální homeostázy interakcemi mezi mikroby, posílení bariérové funkce epitelu a modulace imunitních reakcí. Schopnost laktobacilů inhibovat patogeny je dobře známá, protože se již po staletí používají při konzervaci potravin k prevenci mikrobiální degradace (Lebeer, Vanderleyden a De Keersmaecker, 2008).

Většina probiotických kmenů patří k *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. Definice probiotik byla několikrát upravována a její současné znění je, že probiotika jsou živé mikroorganismy, které při požití v přiměřeném množství působí na zdraví hostitele. Probiotika musí být bezpečná, geneticky stabilní, a především schopná přežít průchod gastrointestinálním traktem (Le a Yang, 2018).

Zdravotními benefity LAB, které jsou také nazývány probiotiky, je zlepšení nutriční hodnoty jídla, inhibice enterálních patogenů, zmírnění příznaků průjmu nebo zácpy, snížení cholesterolu v krvi, stimulace imunitního systému a protirakovinné působení. Ukázalo se, že jogurt má silný inhibiční efekt na růst coliformních bakterií v trávicím traktu a zkracuje

trvání průjmu u dětí. Obvyklé startovací kultury v jogurtu jako je *Lactobacillus delbrueckii* a *Streptococuss termophilus* nejsou tolerantní proti žluči, proto nedokážou střevo kolonizovat. Protektivní účinek je omezen pouze po dobu průchodu trávicím traktem, než se vyloučí stolicí, oproti tomu schopnost kolonizovat střevní sliznici mají druhy jako je *Lactobacillus acidophilus* a potom také bifidobakterie *Bifidobacterium longum.* Bylo prokázáno, že tyto bakterie dokážou například zkrátit průjmy virového původu a rovněž průjmy bakteriálního původu (Adams, 2008).

V řadě studií byly prokázány benefity mléčných výrobků, obsahující protektivní kmeny LAB. Tyto kmeny v používané v praxi musí vykazovat antimikrobiální aktivitu cílenou na nežádoucí mikroorganismy a musí být bez zdravotních rizik (produkce biogenních aminů a rezistence k antibiotikům). Mezi tradičně používané protektivní kmeny patří kmeny *Lactococcus lactis* subsp. lactis produkující bakteriocin nisin, kmeny pediokoků produkující pediociny a laktobacily s antibakteriální a antifungální aktivitou, jako je *Lactobaccillus rhamnosus, L. plantarum, L. casei (*Horáčková, 2018).

Novou skupinou probiotik jsou psychobiotika, která ovlivňují centrální nervový systém prostřednictvím metabolických a nervových drah mezi střevem a mozkem. Bylo zjištěno, že psychobiotika inhibují a snižují hladinu kortizolu, což vede ke zmírnění příznaků úzkosti a deprese. Také jsou účinná při zlepšování neurodegerativních a neurovývojových poruch, jako jsou například poruchy autistického spektra, Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Cheng *et al.*, 2019). Konkrétně u *Lactobacillus rhamnosus* byl prokázán pozitivní vliv na zvýšení hladin neurotransmiterů, které jsou dlouhodobě sníženy při dlouhodobém stresu, což se projevilo při experimentech na klidnějším a uvolněnějším chování stresovaných pokusných zvířat, u kterých byl tento kmen laktobacila suplementován (Kochalska *et al.*, 2020).

1.5 Aktivita laktobacilů v potravinách

Laktobacily jsou častými inhibitory jiných mikroorganismů, což je základem jejich schopnosti zlepšovat a udržovat kvalitu a bezpečnost potravin. Mezi faktory přispívající k mikrobiální inhibici náleží především produkce organických kyselin, bakteriocinů, peroxidu vodíku, diacetylu a alkoholu. Tyto produkty jejich metabolismu snižují pH a redoxní potencionál v okolí těchto bakterií a dochází také k vyčerpání živin v důsledku kompetice (Adams, 2008).

Lactobacillus spp. jsou obvykle příčinou kyselosti v masných výrobcích. Některé kmeny heterofermentativních laktobacilů produkují peroxid vodíku. Peroxid vodíku pocházející z *Lactobacillus. viridedescens a Lactobacillus curvatus* způsobuje oxidaci pigmentu myoglobinu, což má za následek šedozelenou nebo dokonce žlutou barvu masa. K zezelenání masných produktů však může dojít i u vakuově balených výrobků, pokud dojde k propustnosti kyslíku, z důvodu vadného obalu. Některé druhy *Lactobacillus* spp. se přidávají jako startovací kultury do salámu, kde působí jako konkurenční mikroflóra soutěžící o živiny s patogeny jako je *L. monocytogenes* a přispívá tak k prodloužení trvanlivosti a bezpečnosti výrobku (Feiner, 2006).

1.6 *Lactobacillus* a tvorba bakteriocinů

Uvádí se, že mnoho laktobacilů vylučuje antimikrobiální peptidy zvané bakteriociny. Většina bakteriocinů bakterií rodu *Lactobacillus* jsou malé, tepelně stabilní proteiny s vysokým izoelektrickým bodem (bakteriociny třídy II), které působí všeobecně tak, že vyvolávají zvýšenou propustnost membrán a následný únik molekul z cílových bakterií. Produkce bakteriocinů je řízena v závislosti na hustotě populace bakterií pomocí vylučovaného peptidového feromonu quorum sensing. Předpokládá se, že detekce růstu vlastního druhu, které je pravděpodobně porovnáváno s růstem příbuzných druhů, umožňuje produkujícímu organismu zapnout produkci bakteriocinů v době, kdy je pravděpodobné, že konkurence o živiny bude silnější (Lebeer, Vanderleyden a De Keersmaecker, 2008).

Tyto baktericidní proteiny jsou podobné antibiotikům. Rozsah inhibiční aktivity bakteriocinů LAB může být buď úzký, inhibuje jen ty kmeny, které jsou blízce příbuzné produkčnímu organismu anebo mají širší účinnost proti různorodým skupinám grampozitivních bakterií. Zvyšující se poptávka po bezpečných potravinách zvýšila zájem o nahrazení konvenčních antibiotik bakteriociny. Fáze růstu, kdy LAB zahajují produkci bakteriocinů, je řízena systémem buněčné komunikace quorum sensing (Noda *et al.*, 2018).

Bakteriociny jsou v potravinářství používány jako konzervační látky a v lékařství se uplatňují jako baktericidní a antivirová léčiva. Bakteriociny produkované LAB řadíme do následujících tříd.

1. Lantibiotika – obsahují aminokyseliny jako lantionin, 3-6 metylalntionin a malé molekuly: 2-3 kDa. Do této třídy můžeme zahrnout nisin, subtilin, galidermin, epidermin a další.

2. Nemodifikované malé bakteriociny, tepelně odolné (do 10 kDa) produkované kmeny rodů *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc* a *Pediococcus*
    - 2 a skupina: pediocinové bakteriociny se silným antilisteriovým účinkem
    - 2 b skupina: dvoupeptidové bakteriociny
3. Velké tepelně labilní bakteriociny
4. Nedefinované směsi bílkovin, tuků a sacharidů (Pospíšilová, 2007)

Aplikace LAB a bakteriocinů neustále přibývají a jsou vyhlídky na jejich další využití v budoucnu, například v anti-quorum sensing strategiích a v místním specifickém podávání léčiv. S ohledem na riziko možného horizontálního přenosu genů resistence na antibiotika prostřednictvím LAB se musí výběr vhodných izolátů řídit přísnými pokyny (Mokoena, 2017).

1.7 Kmeny rodu *Lactobacillus* s antimikrobiální aktivitou

1.7.1 Lactobacillus plantarum

Lactobacillus plantarum je jedním z nejznámějších druhů *Lactobacillus*, je rozšířen v různých ekologických oblastech, jako je zelenina, fermentovaná jídla a zdravá lidská střevní sliznice. Doposud bylo popsáno více než 180 různých kmenů. *Lactobacillus plantarum* se často používá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu jako startovací kultura nebo probiotikum. *Lactobacillus plantarum* má také prokázanou schopnost přežít průchod trávicím traktem a je schopen kolonizovat střevní trakt člověka a jiných savců. Ve střevě moduluje imunitní odpověď lymfoidních a epiteliálních buněk, moduluje střevní mikrobiotu a potlačuje patogeny. Má prokázanou schopnost přežít průchod trávicím traktem a je schopen kolonizovat střevní trakt člověka a jiných savců. Některé kmeny mají protektivní a protizánětlivý účinek prostřednictvím T-buněk, tím že modulují rovnováhu mezi Th1 a Th2 produkcí a stimulací cytokinů, jako je nekrotizující faktor alfa, interleukin 1β, IL-6, IL 10, 12 a interferon gama. Interakce imunitního systému a *Lactobacillus plantarum* není zatím objasněna, zkoumána byla pouze kyselina lipoteichoová a plantaricin EF. Uplatňuje se v prevenci a léčbě dráždivého tračníku, Crohnově chorobě a ulcerativní colitidě, v prevenci rakoviny a ischemické chorobě srdeční (Le a Yang, 2018).

Supernatant získaný z *Lactobacillus plantarum* je úspěšně používaný při léčbě chronických ran (dekubity, popáleniny, bércové vředy) při místní aplikaci. Nedostatečné hojení ran je způsobeno tvorbou biofilmu a neefektivní eradikací oportunních mikroorganismů, jako je

Pseudomonas auerginosa. Supernatant z *Lactobacillus plantarum* interferuje s patogenní schopností *Pseudomonas auerginosa* tím, že inhibuje adhezi, quorum sensing a faktory virulence jako je elastáza, pyocyanin a rhamnolipidy. V supernatantu byla prokázána přítomnost Al – 2 sloučeniny v jejíž přítomnosti *Pseudomonas auerginosa* modifikuje svoji fenotypovou expresi na planktonní způsob růstu a snižuje produkci faktorů virulence. Kromě této látky obsahuje další komponenty narušující biofilm jako je DNáza, kationty solí sodíku, vápníku a magnezia, chelatační činidla a surfaktanty, organické kyseliny, peroxid vodíku, alkoholy, které působí antimikrobiálně (Ramos *et al.*, 2015).

Podobný experiment je zpracován ve studii (Carvalho *et al.* 2021) kde se hodnotil vliv *Lactobacillus plantarum* na adhezi *Escherichia coli* na lékařský silikon, bylo zjištěno, že je schopen vytvářet stabilní biofilmy na silikonových površích. Tato schopnost je ovlivněna složením a četností výměny kultivačního media, hydrodynamickými podmínkami a dobou inkubace. *Lactobacillus plantarum* vykazoval vysokou aktivitu při inhibici adheze *Escherichia coli* na silikon, tyto jeho vlastnosti, jsou spojovány s mechanismem kompetitivního vyloučení patogenu a dále produkcí antimikrobních sloučenin, jako jsou bakteriociny, peroxid vodíku, exopolysacharidy a biosurfaktanty.

1.7.2 Lactobacillus acidophilus

Dřívější studie potvrdily, že *Lactobacillus acidophilus* CLR 1259 lidského původu inhibuje růst uropatogenní *Escherichia coli*, proto byl tento kmen zařazen mezi probiotika pro vaginální aplikaci. Vaginální kmeny rodu *Lactobacillus* prokazatelně inhibují růst patogenů působením vlastních bakteriocinů a také prostřednictvím produkce kyseliny mléčné, která snižuje pH v prostředí v okolí bakterie (Mokoena, 2017).

1.7.3 Lactobacillus brevis

Tento druh rodu *Lactobacillus*, izolovaný z japonského citrusového ovoce, které se jmenuje citrus iyokan, produkuje bakteriocin zvaný jako brevicin 174 A, který inhibuje růst patogenních bakterií, jako jsou *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* a *Streptococcus mutans* (Noda *et al.* 2018).

1.7.4 Lactobacillus fermentum

Lactobacillus fermentum který byl izolován z mateřského mléka produkuje bakteriociny účinné v širokém spektru proti uropatogenům, včetně *Staphylococcus aureus*, MRSA,

Proteus spp., *Enterococcus spp*. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumonie* (Mokoena, 2017).

Inhibiční účinky *Lactobacillus fermentum* vůči patogenům byly publikovány ve studii autorů (Rybalchenko *et al.*, 2015). Bylo potvrzeno, že tento probiotický kmen změnil morfologické vlastnosti a potlačil tvorbu stafylokoků, enterotoxigenních enterobakterií a Candida albicans. Pozorován byl také výrazný přechod do klidových stavů, degradace buněčných stěn a cytoplazmy a rozrušení zralých bakteriálních biofilmů.

1.7.5 Lactobacillus vurvatus

Při použití bezbuněčného supernatantu z bylo ve studii prokázáno, že *Lactobacillus vurvatus* HH významně snižuje tvorbu biofilmu u uropatogení *Candida albicans* o 61,1 % a u *Candida glabrata* až o 79,4 %. Tyto výsledky naznačily, že supernatant snižuje tvorbu biofilmu *Candida spp*. a může být použit v prevenci i léčbě kandidózy (Mokoena, 2017).

1.7.6 Lactobacillus casei

Kolektiv autorů (Azami *et al.* 2022) prokázal vliv postbiotik-extraktu z *Lactobacillus casei* subsp. *casei* na biofilm patogenní bakterie *Pseudomonas auerginosa,* jako inhibitoru quorum sensing. Inhibiční efekt byl potvrzen snížením exprese genů virulence u této bakterie, což bylo potvrzeno pomocí kvantitativní real-time PCR, rovněž došlo k prokazatelnému úbytku biofilmu tohoto patogenu, aniž by byl pozorován cytotoxický efekt. Na základě těchto výsledků byly kolektivem autorů této studie doporučeny postbiotika *Lactobacillus casei* jako bezpečný přírodní prostředek ke snížení virulence patogenních biofilmů.

1.7.7 Lactobacillus paracasei

Tato probiotická bakterie byla testována jako přírodní antimikrobiální látka proti enteropatogenní bakterii *Vibrio parahemolyticus* způsobující gastroenteritidy. Bylo zjištěno, že při společné kultivaci výrazně snižuje životaschopnost patogenu, jak v planktonní fázi, tak v biofilmu, přičemž v planktonní fázi byl účinek výraznější. Supernatant z *Lactobacillus paracasei* vykazoval rovněž na koncentraci závislý způsob inhibice a likvidace biofilmu *Vibrio parahemolyticus* (Shangguan *et al.,* 2021).

1.7.8 Lactobacillus gasseri

Lactobacillus gasseri a *Lactobacillus crispatus* jsou převládajícími probiotickými bakteriemi na vaginální sliznici žen. Inhibiční účinky supernatantů na kvasinku *Candida*

albicans, která způsobuje infekce vaginální sliznice, byly zkoumány ve studii (Matsuda et al., 2018). Supernatanty těchto probiotických bakterií inhibovaly počáteční kolonizaci *Candida albicans*, zrání biofilmu i jeho adhezi ke sliznici snížením regulace genů souvisejících s tvorbou biofilmu.

2 BIOFILM

Mnoho přírodních i umělých systémů je ovlivněno biofilmy, mikroorganismy připevněnými k povrchům. Z lidského hlediska je lze rozdělit podle účinku na žádoucí biofilmy, nežádoucí až po biofilmy s katastrofálním účinkem. Žádoucí aktivita mikrobiálního biofilmu probíhá při bioremediaci, ve filtrech, které používají čistírny odpadních vod, tyto biofilmy odstraňují organické látky z vody. Příkladem nežádoucího biofilmu je biofilm nahromaděný v chladících a tepelných výměnících, kde zvyšují odpor přenosu tepla nebo biofilm ovlivňující orální hygienu. Katastrofální účinky aktivity biofilmu vyvíjejících se na implantabilních protetických pomůckách, katetrech a kanylách, kde mohou způsobit závažné infekce a onemocnění až smrt pacienta (Lewandowski, 2019).

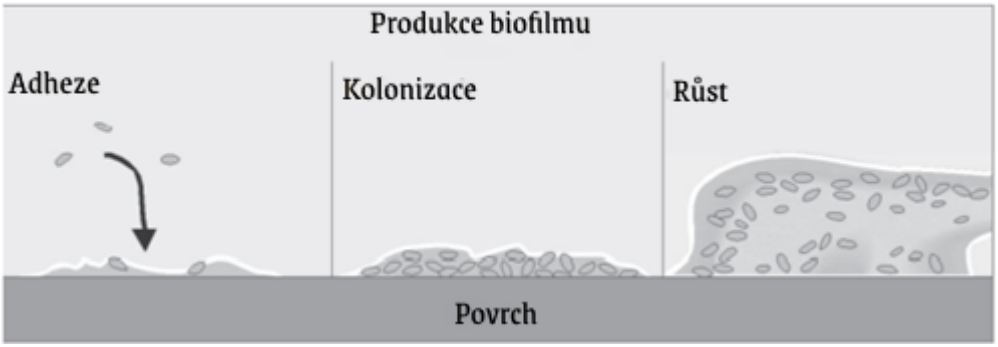
Biofilm je definován jako přisedlá mikrobiální komunita mikroorganismů, často více druhová, nevratně připojená k povrchu biotickému anebo nebiotickému. Zasazená do vlastní matrice sestávající z lepivých exopolysacharidů, proteinů a nukleových kyselin. Mezi mikrokoloniemi jsou přítomny kanály naplněné vodou, které umožňují transport živin a kyslíku pro bakterie umístěné ve spodní část biofilmu (Cooper *et al.*, 2016).

Přechod bakterií z volně žijícího stavu do mnohobuněčné populace je komplikovaný a dynamický proces, který prochází mnoha změnami, jako je buněčné přeprogramování, změny v expresi specifických genů a tvorba faktorů virulence. Koncentrace signálních molekul quorum sensing v biofilmech může být 1000krát vyšší než v prostředí, kde žijí planktonní bakterie. Studie také ukázaly, že tloušťka, biomasa, aktivita a morfologie biofilmu závisí na dostupnosti živin v prostředí (Deng *at al*., 2020).

Bakterie v biofilmu se chovají jinak než planktonní bakterie, zejména pokud jde o jejich reakci na léčbu antibiotiky. Bakterie asociované s biofilmem jsou vysoce rezistentní vůči antibiotikům. Složitá struktura biofilmu s extracelulární polymerní matrix zabraňuje tomu, aby se k bakteriím dostala antibiotika. Bakterie v biofilmu mohou být také ve fázi pomalého růstu v důsledku vyčerpání živin v okolí a hromadění odpadních metabolitů a tento stav je také činí odolnějšími vůči antibiotikům, která jsou účinnější při aktivních bakteriálních procesech (Chen *at al*. 2013).

2.1 Vývoj a složení biofilmu

Tvorba biofilmu začíná adsorpcí jednotlivých mikrobiálních buněk z roztoku, které jsou transportovány proudem kapaliny nad povrch, některé buňky se přichytí na povrch a začnou produkovat exopolysacharidy (EPS) a tím produkovat biofilm. Účinnost adherence-přichycení závisí na mnoha faktorech včetně vlastností povrchu, fyziologického stavu mikroorganismu a na hydrodynamice v blízkosti povrchu. Vývoj biofilmu můžeme rozdělit na tři základní fáze, jak je zobrazeno v obrázku 1. První fáze přichycení – adheze, druhá fáze – kolonizace a třetí fáze –růst. (Lewandowski, 2019)



Obr. 1 Fáze vývoje biofilmu (upraveno dle Lewandowski, 2019)

Biofilm má trojrozměrnou strukturu, základní jednotkou jsou mikrokolonie bakterií, které jsou obklopeny mezibuněčnou matrix, která obsahuje polysacharidová pouzdra, exopolysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy atd. Tvorba biofilmu nastává adhezí bakterií na vhodný povrch a následnou tvorbou polysacharidových vláken. Tato složitá struktura obsahuje volné kanálky pro vodu přinášející živiny a odvádějící odpadní metabolity. Nános dalších organických a anorganických látek z okolní kapalné fáze umožňuje nárust biofilmu. Při stárnutí biofilmu dochází k oddělení buněk z jeho povrchu a jejich rozptýlení. Mikrobiální buňky v podobě biofilmu se zásadně odlišují od samostatných buněk planktonických svojí odolností vůči zevním vlivům, vysychání, napadení bakteriofágy, účinku antibiotik a dezinfekčních látek a protilátek. A rovněž zde lze pozorovat oproti planktonickým formám buněk úspěšnější horizontální přenos genů, např. genů resistence (Bursová, 2014).

Ve fázi reversibilní adheze se planktonní mikroorganismy přiblíží k povrchu a přilnou k němu prostřednictvím Van der Waalsových sil, anebo elektrostatické interakce, ve fázi

zvané nevratná adheze se mikroorganismy přichytí pomocí struktur buněčné adheze (např. pili) anebo produkují specifické adheziny, což vede k vytvoření monovrstvy biofilmu. Ve fázi zvané časný vývoj biofilmu bakterie zahájí vylučování extracelulárních složek. (Cooper *et al.*, 2016)

2.2 Význam biofilmu v potravinářství

Biofilmy se v posledních 30 letech staly hlavním problémem environmentální mikrobiologie v potravinářském průmyslu. Toto téma je významné kvůli potenciální kontaminaci potravin biofilmy; jsou zodpovědné za více než 20 % případů otravy potravinami a jsou až 1000krát tolerantnější k antibiotikům než jejich planktonní protějšky. Pro potravinářský průmysl představují biofilmy velkou výzvu, protože umožňují bakteriím vázat se na řadu povrchů, včetně pryže, polypropylenu, plastů, skla, nerezové oceli, a dokonce i potravinářských výrobků, během několika minut, což je následováno vývojem zralých biofilmů během několika hodin až dnů (Carrascosa *at al*., 2021).

Při zpracování potravin dochází k častým interakcím mezi mikroorganismy, které mohou nakonec vést k tvorbě hustých, komplexních a vysoce strukturovaných, více druhových biofilmů. Kooperativní, kompetitivní nebo neutrální interakce mezi potravinovými patogeny (např. *Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus a Escherichia coli*) a dalšími mikroorganismy v biofilmech mohou zvyšovat patogenitu. Zvýšená odolnost většiny více druhových biofilmů vůči dezinfekčním prostředkům však zůstává v potravinářském průmyslu velkou výzvou (Li *et al*. 2021).

Na většině povrchů v potravinářském průmyslu, jako jsou různá zařízení, potrubí anebo membránové systémy se vyskytuje mikrobiální biofilm, který je tím pádem špatně přístupný a analyzovatelný. Proto je snaha vyvinout sensory *in situ*, které by umožnily monitorovat znečištění povrchu, což by potom umožňovalo včasnou detekci a lokalizaci znečištění. S tímto cílem byl vyvinut sensor, který detekuje autofluorescenci aminokyselin jako indikátoru mikrobiální biomasy (Alvarez-Ordóñez *et al*. 2019).

Budoucí strategie pro kontrolu nežádoucího biofilmu by proto mohly zahrnovat záměrnou a řízenou kolonizaci prostředí, v němž se potraviny zpracovávají, vybranými a prospěšnými mikroorganismy, které by konečným potravinářským produktům propůjčily pozitivní vlastnosti a zároveň konkurenceschopně vyloučily škodlivé mikroorganismy, čímž by se zlepšila kvalita a bezpečnost zpracovávaných potravin a dosáhlo by se tak i omezení

nežádoucího vlivu na životní prostředí v důsledku použití biocidních čistících prostředků (Alvarez-Ordóñez *et al*. 2019).

2.3 Význam biofilmu v medicíně

Biofilmy v ústní dutině a na dýchacích cestách jsou spojovány s infekcemi dýchacích cest a zubními kazy a parodontitidou. Kromě toho je v literatuře poukazováno na vyšší odolnost biofilmů vůči usmrcení bakterií bakteriocidními antibiotiky. Oproti tomu biofilmu podobná společenstva v trávicím traktu obsahující prospěšné laktobacily mohou mít ochrannou probiotickou funkci (Aoudia *et al.*, 2016).

Tvorba biofilmu bakteriálními patogeny na implantovaných zdravotnických prostředcích způsobuje velkou morbiditu a mortalitu pacientů a vede k miliardovým nákladům na zdravotní péči. Z tohoto důvodu jsou naléhavě zapotřebí nová terapeutická řešení jiná než konvenční antibiotická terapie. Jednou z možností je použití určitých molekul a enzymů které narušují biofilm a inhibují tvorbu biofilmu. Další směr, kterým se ubírá současný výzkum se zaměřuje na úpravu materiálů používaných ve zdravotnických prostředcích tak, aby byly odolné vůči tvorbě biofilmu (Chen *et al.* 2013).

Tvorba biofilmu na zdravotnických pomůckách a implantátech, jako jsou srdeční chlopně, kardiostimulátory, cévní štěpy, katetry, kloubní protézy, nitroděložní tělíska, stehy a kontaktní čočky, představují závažné riziko infekce pro pacienta. Mezi bakterie nejčastěji spojované s infekcemi souvisejícími se zdravotní péčí patří *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa a Acinetobacter* (Subhadra *et al.* 2018).

2.4 Quorum sensing

Bakterie jsou sociální organismy, které žijí a vytvářejí velmi složitá a vysoce organizovaná společenstva. Tyto mnohobuněčné struktury se vyvíjejí na různých površích a usnadňují přežití a optimální využití zdrojů v nehostinných prostředích. Tato struktura a s ní spojený životní styl se označují jako "biofilm". Odhaduje se, že více než 99 % veškeré bakteriální aktivity v přírodních ekosystémech je spojeno s bakteriemi organizovanými v biofilmech. Pochopení biologie biofilmů je tedy zásadní při studiu ekosystémů, včetně těch půdních.

Quorum sensing (QS) je klíčový mechanismus, který reguluje několik aspektů vývoje biofilmu, včetně adheze, motility, zrání a disperze (Nievas *at al.*, 2012).

Můžeme ho přirovnat k jazyku umožňujícímu bakteriím regulovat mnohé fenotypové vlastnosti jako je virulence, bioluminiscence, horizontální přenos DNA, syntéza antibiotik a bakteriocinů, tvorba biofilmu, schopnost odolávat drsnému žaludečnímu prostředí a schopnost tvořit sekundární metabolity a upravovat tím například potraviny (Kareb a Aïder, 2020).

Je to proces, při němž bakterie ve skupinách koordinovaně regulují genovou expresi a to tak, že vylučují signální molekuly zvané autoinduktory a s rostoucí denzitou bakterií se zvyšuje koncentrace autoinduktoru až do bodu, kdy může modulovat transkripční regulaci v buňkách, což vede ke změně genové exprese (Conway *et al.*, 2015).

U jednotlivých planktonických buněk a při nízké buněčné hustotě se mikroorganismus chová jako jednobuněčný, pokud je dosaženo určitého stupně populační hustoty, může se začít chovat díky mechanismu quorum sensing jako mnohobuněčný organismus. Nedávné studie dokázaly, že si takto mohou mikroorganismy komunikovat nejen v rámci stejných druhů, ale jsou schopné reagovat i na signály nepříbuzných druhů, přičemž je také zřejmé, že proces QS není omezen jenom na bakterie (Paldrychová *et al*., 2017).

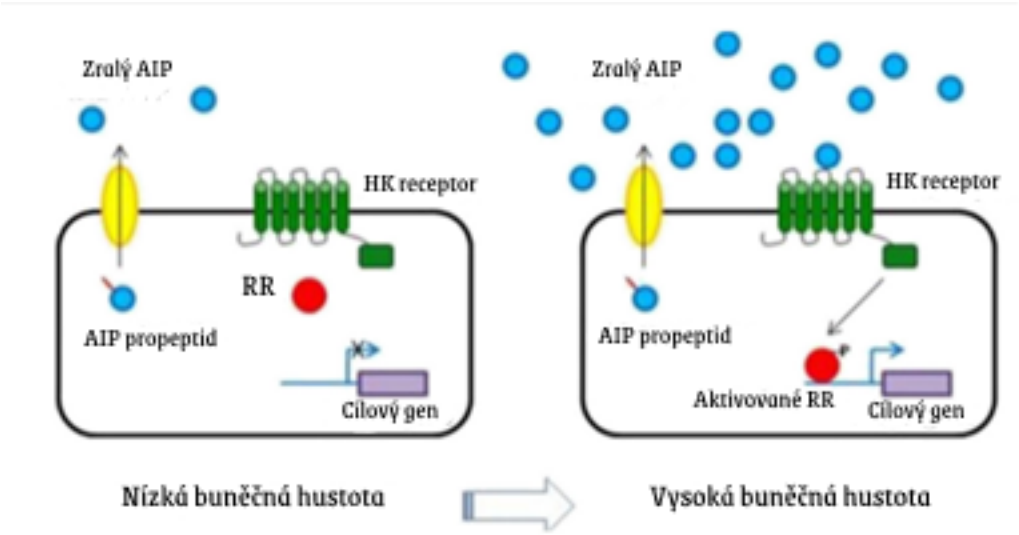
Je možné, že principy, na kterých je založeno quorum sensing u bakterií jsou zásadní i pro kolektivní chování u vyšších organismů. Například sociální hmyz, jako je včela medonosná a mravenec obecný používají mechanismus podobný QS k určování míst k hnízdění (Papenfort a Bassler 2016).

Regulace pomocí QS byl v literatuře poprvé popsán v souvislosti s luminiscenční mořskou bakterií *Vibrio fischeri*. Tento mikroorganismus exprimuje geny řídící emisi světla enzymem luciferáza, ale pouze tehdy, pokud žije v symbióze se svými přirozenými hostiteli (hlavonožci). V takovém případě je jeho buněčná hustota dostatečně vysoká. Pokud se *Vibrio fisheri* vyskytuje volně v planktonní formě v oceánu, luciferázu neprodukuje (Paldrychová *et al.*, 2017).

2.4.1 Quorum sensing u grampozitivních bakterií

U grampozitivních bakterií jsou v systému QS signálními molekulami peptidy zvané auto induktorové peptidy (AIP). Jsou známé dvě dráhy, které se od sebe odlišují v mechanismu percepce signálu. První dráha transportuje AIP dvousložkovým systémem (TCS) který

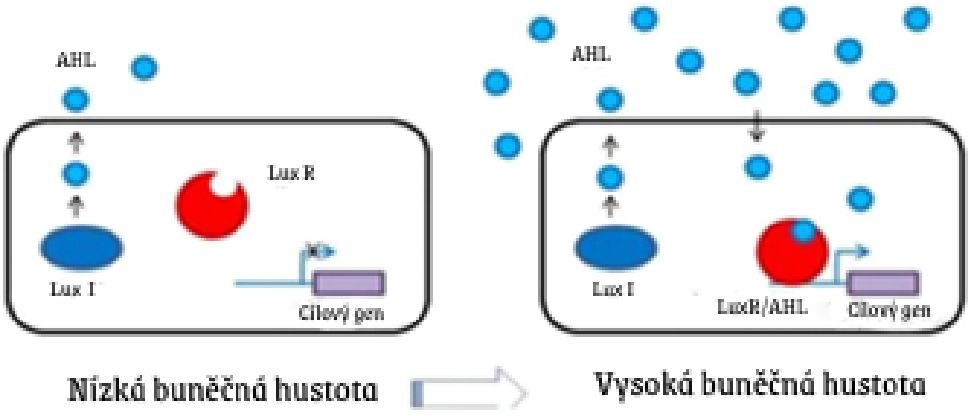
využívá transmembránovou histidinkinázu (HK) a cytoplazmatický transkripční regulátor (RR). AIP je vylučován do extracelulárního prostoru, při určité hladině množství je detekován a vede k fosforylaci HK, fosforylová skupina je přenášena na cytoplazmatický transkripční regulátor. Fosforylace RR moduluje schopnost regulátoru aktivovat, anebo potlačit specifické geny. Schéma této dráhy je zobrazeno na obrázku 2. Tento způsob využívají k přirozené transformaci bakterie *S. pneumonie*, *B. subtilis* a *S. aureus*. Druhá dráha spočívá v opětovném importu AIP do bakterie pomocí oligopeptidu AMI, patřícím do rodiny ABC transportérů, následně reaguje AIP přímo s cytoplazmatickým regulátorem transkripce a moduluje expresi specifických genů. Tato cesta byla popsána při produkci bakteriocinu *Lactobacillus sakei* (Kareb a Aïder, 2020).



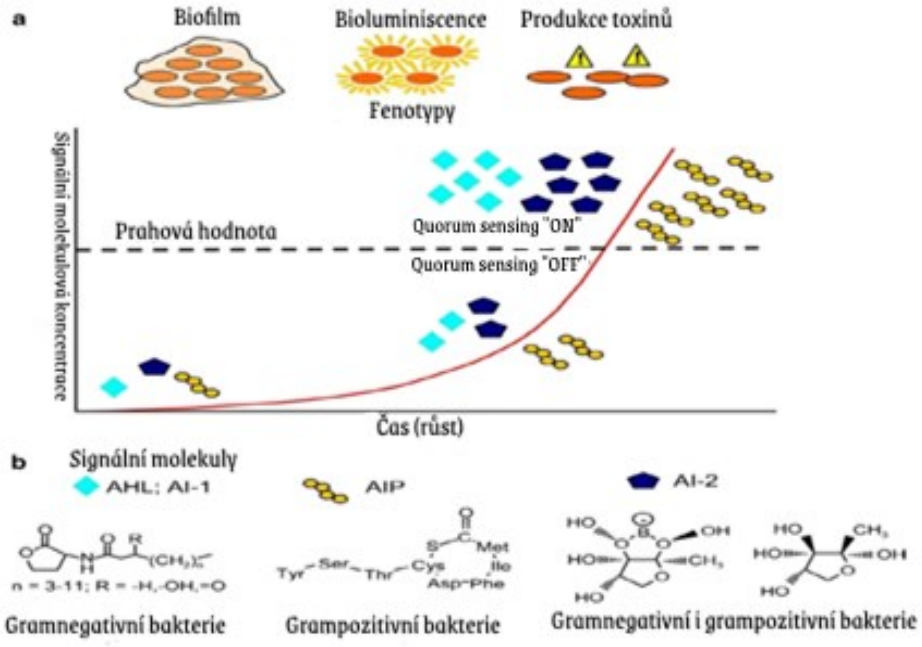
Obr. 2 Quorum sensing u grampozitivních bakterií (upraveno dle Kareb a Aïder, 2020)

2.4.2 Quorum sensing u gramnegativních bakterií

Nejběžnějšími signalizačními molekulami u gramnegativních bakterií jsou N-acyl homoserin laktony (AHLs) nebo jiné molekuly, které jsou syntetizovány z S-adenosylmethionin (SAM). Tyto autoinduktory jsou schopny volně procházet bakteriální membránou a jsou vázané na specifické receptory, které se vyskytují buď ve vnitřní membráně anebo v cytoplazmě. Schéma této dráhy je zobrazeno na obrázku 3. Quorum sensing obvykle mění desítky až stovky genů, které jsou klíčové pro různé biologické procesy (Papenfort a Bassler 2016).



Obr. 3 Quorum sensing u gramnegativních bakterií (upraveno dle Kareb a Aïder, 2020)



Obr. 4

a) Graf závislosti hustoty bakterií a zapínání quorum sensing systému

b) Hlavní signální molekuly u grampozitivních a gramnegativních bakterií

(upraveno dle Kareb a Aïder, 2020)

2.4.3 Quorum sensing universální – mezidruhový signální systém

Prostřednictvím QS jsou například patogeny schopny synchronizovat produkci specifických proteinů potřebných pro infekční procesy. Tento proces může nastat prostřednictvím acyl-homoserin laktonových derivátů, jako je to u gram negativních bakterií anebo cestou signálních peptidů u grampozitivních bakterií. V nedávné době byla objevena další cesta QS, která je rozšířená jak u gramnegativních tak u grampozitivních bakterií, která je založena na LuxS/AI-2, který generuje signální sloučeninu 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (Mansel, 2005).

Systém LuxS/AI-2 je pravděpodobně universální signální molekula vyskytující se současně u gramnegativních i grampozitivních bakterií je regulační mechanismus umožňující bakteriím činit kolektivní rozhodnutí expresí specifického souboru genů vylučováním a detekcí signální molekuly AI-2, furanosylborát-diesteru, který byl identifikován u *Vibrio Harvey* stejně jako u *Escherichia coli*. Tato signální cesta se podílí na mnoha fyziologických procesech jako je tvorba biofilmu, virulence a antibiotická resistence. Inhibice bakteriálního QS představuje novou antibakteriální strategii, která zabraňuje rozvoji bakteriální resistence a snižuje virulenci bakteriálních populací (Wang *et al.* 2019).

2.4.4 Quorum sensing u rodu *Lactobacillus*

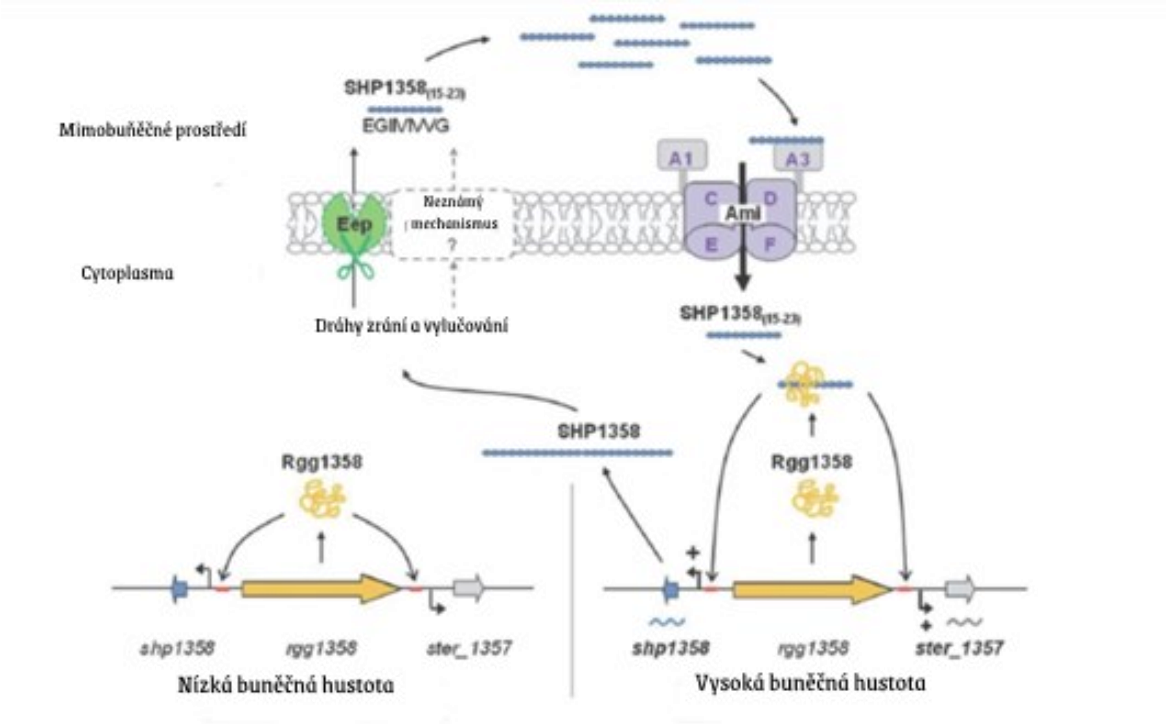
Aby byla bakteriím rodu *Lactobacillus* umožněna kolonizace a perzistence ve svých přirozených nikách, a především také adaptace na jiné prostředí a podmínky, potřebují tyto bakterie smyslové systémy k detekci specifických signálů prostředí. Tato funkce je u všech grampozitivních bakterií zprostředkována dvousložkovými regulačními systémy TCS, které se skládají z membránově umístěné proteinkinázy (HPK), která monitoruje prostředí a z regulátoru odpovědi (RR), který reguluje expresi specifických genů. HPK a RR funguje na principu fosforylového přenosu signálu. HPK a RR monitoruje a následně reaguje na změny podmínek jako je osmolalita, dostupnost živin (C, N, P) nebo teplota. Tento systém reaguje také na hustotu specifických signálních molekul – autoindukčních peptidů zapojených do quorum sensing mezi bakteriemi a modifikují tak vlastnosti jako je virulence, kompetice a tvorba bakteriocinů. Bakterie rodu *Lactobacillus* mohou obsahovat více quorum sensing dvousložkových systémů, což upozorňuje na význam mezidruhové komunikace (Sturme *et al.*, 2007).

Navzdory ekonomickému přínosu v potravinářství není důkladně prostudováno a zdokumentováno quorum sensing u bakterií mléčného kvašení. Uplatňují se zde však jako

signální molekuly SHP (Short hydrofobic peptide) a transkripční regulátor patřící do rodiny RGG. Tento mechanismus byl prokázán u *S. thermophilus*. Schéma tohoto mechanismu je zobrazeno na obrázku 5. Tento regulační systém se podílí také na biosyntéze bakteriocinů. Při dosažení hladiny zralého peptidu SHP 1388 je prekursor peptidu štěpen endopeptidázou a exportován extracelulárně později je reimportován zpět do buňky oligopeptidem transportérem AMI CDEF. Jakmile je v buňce, reaguje s transkripčním regulátorem RGG 1358 a moduluje expresi specifických genů (Kareb a Aïder, 2020).

Již dříve byla zmíněna souvislost mezi sekrecí signálních molekul quorum sensing systému a tvorbou biofilmu jako například ve studii autorů (Gu *et al.*, 2021) kde byl prokázán podpůrný účinek exogenního AI-2 (universálního signálu QS) na tvorbu biofilmu u různých druhů *Lactobacillus plantarum.* V testu u bakterií, kterým bylo suplementováno AI-2 přímo do živné půdy, byla ovlivněna tvorba biofilmu zvýšením tvorby EPS, rovněž se také ale zvýšil růst buněk planktonních. Suplementace AI-2 rovněž významně zlepšila toleranci buněk ke žlučovým solím. Tento efekt podle autorů mohl být způsoben usnadněním produkce EPS a potlačením hydrolýzy polysacharidů. (Deng et al., 2022) ve své práci prokázali, že AI-2/LuxS quorum sensing systém široce používané probiotické bakterie *Lactobacillus rhamnosus* GG podporuje produkci biofilmu a zlepšuje zároveň resistenci zvířecího modelu Dania reria proti enterotoxigenní *Escherichia coli,* což potvrdili v testech s divokým kmenem *Lactobacillus rhamnosus* GG a jeho mutantem bez Lux/S. V nepřítomnosti Lux/S u mutanta bakterie se snížila tvorba biofilmu, vylučování extracelulárních polysacharidů a taktéž adheze byla narušena, což dokládá široké souvislosti mezi signalizací quorum sensing a tvorbou biofilmu.

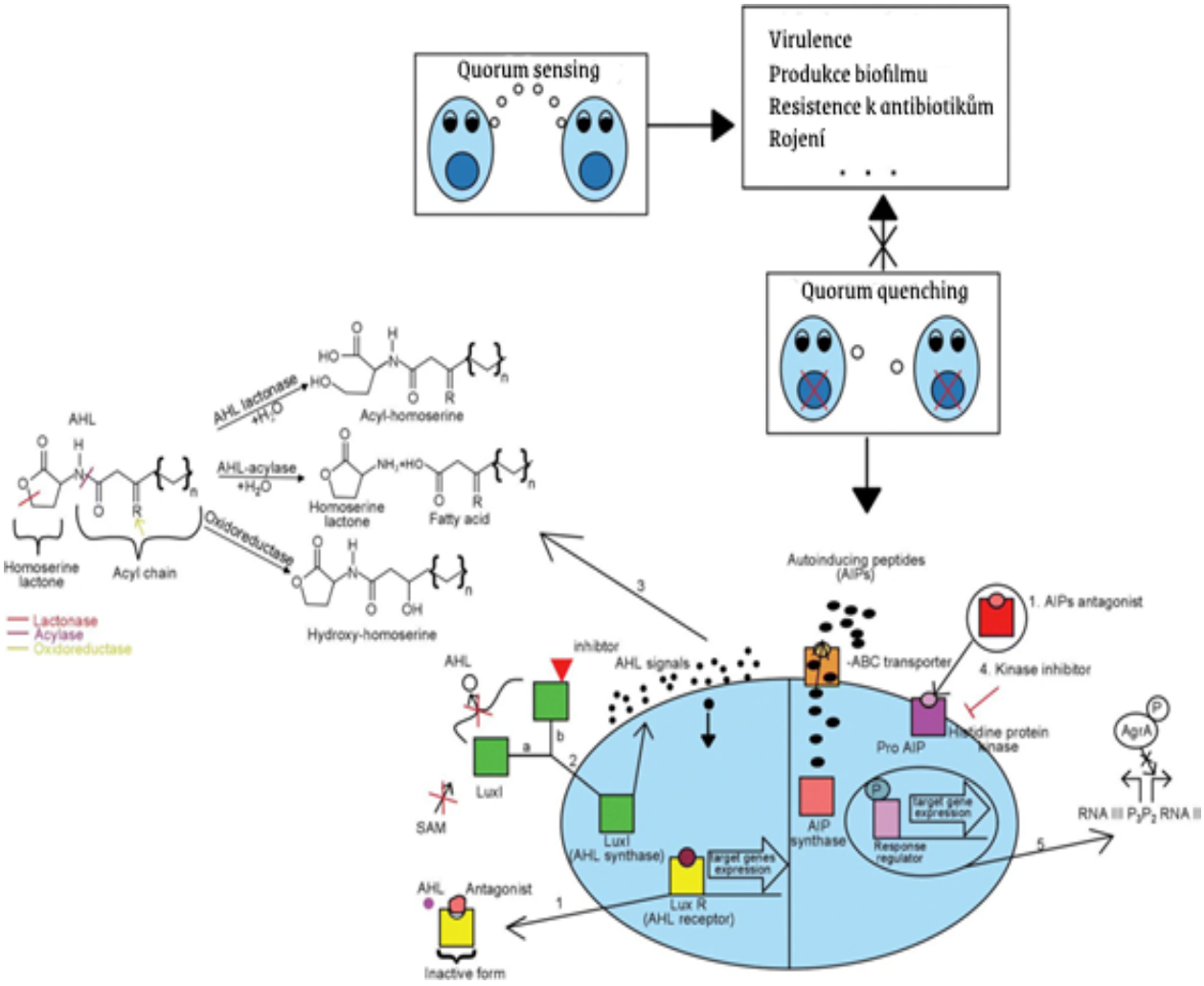
Podobnou práci s bakterií *Lactobacillus acidophilus* publikovali (BUCK, B.L., M.A. AZCARATE-PERIL a T.R. KLAENHAMMER, 2009), kteří zkoumali, zda signalizační molekula autoinduktoru AI-2, která je součástí quorum-sensing, ovlivňuje adherenci ke střevním epiteliálním buňkám. Srovnávali opět fenotypové vlastnosti divokého typu bakterie a mutantního kmene s absencí LuxS enzymu. Mutantní kmen s absencí LuxS vykazoval sníženou úroveň konečné biomasy a testech na schopnost adheze k epiteliálním střevním buňkám byl zjištěn výrazný pokles adheze.



Obr. 5 Schéma Quorum sensing SHP-Rgg u *Streptococcus termophilus* (upraveno dle Kareb a Aïder, 2020)

2.4.5 Quorum quenching

K nejznámějším mechanismům quorum quenching (QQ) patří enzymatická degradace molekul AHL, kterou katalyzují čtyři různé enzymy, jsou to laktonázy, acylázy, reduktázy a oxidázy, které štěpí amidovou vazbu AHL anebo modifikují její aktivitu. Další možností je využití indukčních antagonistů, tyto molekuly soutěží s induktory o stejné vazebné místo na receptoru a blokují tak přenos signálu do buňky. Mechanismus QQ je zobrazen na obrázku 6. Možné je také využití inhibitorů signálních molekul např. inhibitorů kináz jako je closantel nebo RWJ – 49815, který vede k inhibici QS signálů u grampozitivních bakterií. Posledním způsobem je blokování signální transdukční kaskády (Paluch *et al.,* 2020).



Obr. 6 Mechanismus blokování quorum sensing u grampozitivních a gramnegativních bakterií (upraveno dle Paluch *et al.*, 2020)

Komunikace mezi buňkami může být narušena antagonizujícími skupinami bakterií nazývajícím se quorum quenching. Tento fenomén je přítomný mezi grampozitivními i gramnegativními bakteriemi a má za následek zeslabení quorum sensing indukovaného signálu a tím i nežádoucí exprese genů. Quorum quenching může blokovat, izolovat a degradovat signální molekuly QS. Nejvíce prostudovaný je systém degradace AHL u gramnegativních bakterií, a to laktonázou v *Bacillus subtilis*, která hydrolyzuje laktonový kruh AHL a znemožňuje tak přenos signálu. Další strategií je použití LAB, které také jsou schopny blokovat QS, jako je to například v případě *Lactobacillus reuteri* RC-14, který je schopen inhibovat virulenci S. aureus. Podobný jev byl dále pozorován u *E. coli* O157:H7 ve společné kultuře s *Lactobacillus acidophilus.* Proto je v současné době věnován quorum

quenching zvýšený zájem jako potencionálnímu novému prostředku pro boj s patogeny (Kareb a Aïder, 2020).

Některé bakteriální druhy jako je *Pseudomonas*, *Auerginosa*, *Klebsiella pneumonie*, *Agrobacterium tumefacis* a především *Bacillus spp*. produkují enzymy které jsou schopné degradovat AHL molekuly a interferovat tak s quorum sensing. Tato schopnost byla nalezena však také u léčivých rostlin a hub. Léčivé rostliny produkují řadu sekundárních metabolitů jako jsou flavonoidy, fenoly, saponiny, kumariny, taniny, alkaloidy a terpeny působící proti quorum sensing. Je to například mexický jam bean (*Pachyrhisus erosus*), štírovník růžkatý (*Lotus corniculatus*), ječmen setý (*Hordeum Vulgare*), červená řasa (*Delisea pulchra*). Účinnost prokazují dále i silice z esenciálních olejů levandule, skořice obsahující látku kumarin, který interferuje s quorum sensing *Pseudomonas auerginosa*. Cinnamaldehyd ze skořice je účinný proti biofilmu jak u gramnegativních, tak grampozitivních bakterií. Flavonoidy quercetin, apigenin, naringenin interferují s quorum sensing *E. coli* 0157:H7. Hesperidin a naringenin je účinný proti *Yersinia enterocolitica*. Peprmintový olej a mentol působí inhibičně proti *Chromobacterium violaceinum* a piperin a embelin z pepře proti *Streptococcus mutans* (Paluch *et al.* 2020).

2.5 Metody detekce biofilmu

Metody, kterými můžeme potvrdit tvorbu biofilmu dělíme na metody fenotypové a metody genotypové. Fenotypové metody spočívají v kultivaci mikroba a jeho následném barvení biofilmu, který je přichycen exopolysacharidovou matricí ke stěnám zkumavky anebo mikrotitrační destičky, v přímém mikroskopickém pozorování obarvené vrstvy biofilmu například na povrchu katetru dále na hodnocení vzhledu mikrobiálních kolonií na agarech s kongo červení, nebo na posouzení povrchových vlastností mikroba. Průkazem genů odpovědných za tvorbu biofilmu a studiem exprese specifických genů za konkrétních podmínek se zabývají metody genotypové.

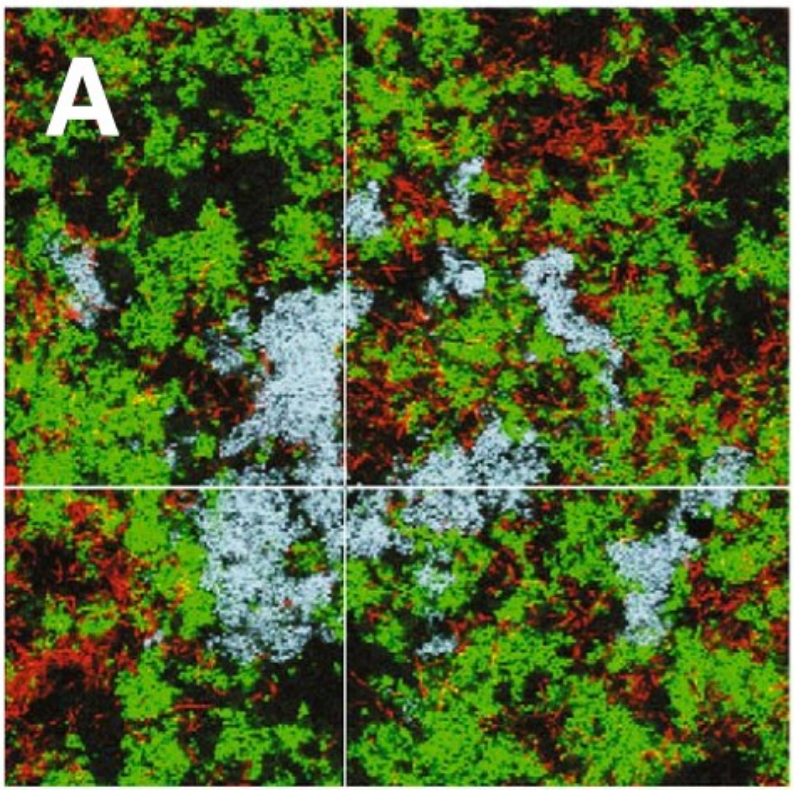
Chemické metody, které využívají barviva nebo fluorochromy, které se mohou vázat na specifické složky biofilmu jako je EPS, řadíme k takzvaným nepřímým metodám detekce. Tyto testy barví živé a mrtvé buňky v biofilmu a také jeho matrici a jsou tak vhodné pro kvantifikaci celkové biomasy biofilmu (Azeredo *et al.*, 2017).

Metody k detekci a sledování biofilmu zahrnují fluorescenční mikroskopii, MTT test a Christensenovu metodu. MTT test a Christensenova metoda jsou metody založené na barvení biofilmu a následném spektrofotometrickém měření. Při Christensenově metodě se biofilm barví krystalovou violetí a po promytí vodou se barva vyluhuje etanolem a následné zbarvení výluhu odpovídá síle tvorby biofilmu. Oproti tomu při MTT testu se sledují pouze živé buňky biofilmu, metabolicky aktivní buňky biofilmu redukují žluté tetrazoliové barvivo (MTT) na fialový formazan, který se rozpustí v dimethylsulfoxidu a barva extraktu je potom přímo úměrná počtu životaschopných bakterií. U obou těchto metod je zkoumána tvorba biofilmu stanovením mezních hodnot, tyto hodnoty jsou stanoveny z referenční hodnoty, což je hodnota bez inokulace mikroorganismem a tří směrodatných odchylek. Výsledná hodnota potom spadá do jedné ze tří kategorií: bez biofilmu, slabá tvorba biofilmu a silná tvorba biofilmu.

Fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorovat životaschopnost biofilmu. Odlišení živých buněk od mrtvých lze provést barvením propidium monoazidem, který proniká do narušené cytoplazmatické membrány mrtvých buněk. Rozliší se tak poměr živých a mrtvých buněk, které po obarvení zobrazí nukleové kyseliny fluoreskující zelenou barvou SYTO® 9 (Pleva *et al.*., 2022).

Biofilm lze také kvantifikovat pomocí kvantitativní polymerázové reakce (q PCR). Tento přístup však může nadhodnocovat počet životaschopných buněk, kvůli přítomnosti volné extracelulární DNA a DNA pocházející z buněk mrtvých. Modifikací této metody pro účely přesnější kvantifikace biofilmu je PMA – qPCR, při které jsou vzorky před extrakcí DNA ošetřeny propidiem monoazidem tato molekula vstupuje pouze do buněk s narušenou membránou a vřadí se mezi báze a takto upravená DNA mrtvých buněk a volné DNA při reakci není amplifikována (Azeredo *et al.*, 2017).

Fluorescenční *in situ* hybridizace byla vyvinuta pro identifikaci bakterií v 90. letech, otevřela četné nové výzkumné cesty ke zkoumání prostorové organizace smíšených mikrobiálních společenstev, jako jsou biofilmy. Principem této metody je označení několika specifických chromozomových oblastí fluorescenčně značenou sondou komplementární ke zkoumanému úseku DNA. Výsledky ukazují, že pomocí FISH lze vyšetřovat biofilmy složené z více druhů bakterií s rozdílnými vlastnostmi barvení podle Grama. V kombinaci s optickými řezovými vlastnostmi konfokální laserové skenovací mikroskopie (CSLM) je tato technika příslibem pro analýzu prostorových změn ve složení biofilmu v reakci na výzvy prostředí. Snímek CSLM je zobrazen na obrázku 7 (Thurnheer *at al.*, 2004).



Obrázek č. 7 Snímek CSLM pomocí FISH, fluorescenčně značené sondy u 3 různých bakterií ve smíšeném orálním biofilmu (Thurnheer *at al.*, 2004)

2.6 Metody detekce quorum sensing

Kvantitativní a kvalitativní měření autoinduktorů, lze provádět různými technikami, můžeme ho klasifikovat jako přímé a nepřímé. U nepřímých technik se používá jako indikátor biosenzor. Signální molekula, obsahující specifické funkční skupiny reaguje s chemickými látkami biosensoru tak, že vyvolávají barevnou reakci anebo luminiscenci, kterou je možné kvantifikovat. Mezi přímé metody můžeme zahrnout především kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií. (Paluch *et al.,* 2020)

K hlavním přístupům studia quorum sensing mechanismů náleží nepochybně genomika a transkriptomika. Sekvenování genomu otevřelo cestu k dalším metodám jako je například srovnávací a funkční proteomika. Proteomika umožňuje stanovit celkový obraz o proteinech exprimovaných z genomu a poskytuje tak nové poznatky o chování bakterií, které je řízeno quorum sensing signály. V proteomice se používají především molekulárně separační

metody jako je například gelová elektroforéza proteinů, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Di Cagno *at al.,* 2011).

Často jsou používány metody detekce quorum sensing u rodu *Lactobacillus* kultivačně, a to pomocí biosensorů.

Aktivita některých autoinduktorů lze zjistit pomocí reportérových kmenů bakterií vyvolávajících buď luminiscenci anebo barevnou reakci. Jednou s takových indikátorových bakterií pro quorum sensing je *Vibrio Harvei*. Biologický test při kultivaci *Vibrio Harveyi* s přídavkem supernatant z kultury z kmenů *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* v mikrotitračních destičkách a následném měření bioluminiscence byla provedena ve studii Surette a Bassler už v roce 1996.

Mořská bakterie *Vibrio harveyi* využívá k regulaci bioluminiscence dva mechanismy quorum sensing AI-2 a AI-I. Mutantní kmen *Vibrio harveyi* je schopen reagovat pouze na signální molekuly AI-2, které stimulují expresi luciferázového operonu (lux geny) pro indukci bioluminiscence. Tato metoda se běžně používá jako biologický test k prokázání přítomnosti molekul AI-2 u jiných bakteriálních druhů. AI-2 syntáza LuxS se vyskytuje u více než 40 druhů gramnegativních a grampozitivních bakterií (DeKeersmaecker a Vanderleyden, 2003).

V tomto testu se využívá bioluminiscenční bakteriální reportérový kmen *Vibrio harveyi* BB170, který produkuje světlo v reakci na přítomnost autoindutorů AI-2. První krokem je odběr vzorků supernatantu kultury testovaného kmene. Ve druhém kroku se supernatant přidá ke kultuře reportérového kmeni *Vibrio harveyi* a odečte se výsledná produkce světla pomocí luminometru. AI-2 aktivita se vypočítá jako indukce luminiscence *Vibrio harveyi* (Taga, 2005).

Podle autorů (De Keersmaecker a Vanderleyden, 2003) byly detekovány signální molekuly AI-2 u mnoha bakterií rodu *Lactobacillus* a to například u *Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103, Lactobacillus rhamnosus GG E-96666, Lactobacillus rhamnosus Lc705, Lactobacillus rhamnosus LMG 18030, Lactobacillus rhamnosus LMG 6400, Lactobacillus rhamnosus NRRL-445, Lactobacillus rhamnosus 1/6, Lactobacillus casei immunitas, Lactobacillus casei shirota, Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 Int-1, Lactobacillus johnsonii VPI 11088, Lactobacillus casei ATCC 393.*

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 METODIKA

3.1 Materiál ke kultivaci

Ke kultivaci jsme použili 45 kmenů rodu *Lactobacillus* pocházejících ze sbírky mlékárenských bakterií CCDM Laktoflora, které byly uchované ve formě lyofilizátu.

3.1.1 Seznam kmenů

1. *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 767
2. *Lactobacillus casei* CCDM 145
3. *Lactobacillus casei* CCDM 422
4. *Lactobacillus casei* CCDM 650
5. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198
6. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 199
7. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 802
8. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCDM 66
9. *Lactobacillus fermentum* CCDM 154
10. *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828
11. Lactobacillus *paracasei* CCDM 888
12. *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* CCDM 832
13. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 741
14. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 792
15. *Lactobacillus plantarum* CCDM 147
16. *Lactobacillus plantarum* CCDM 178
17. *Lactobacillus plantarum* CCDM 181
18. *Lactobacillus plantarum* CCDM 182
19. *Lactobacillus plantarum* CCDM 183

20. *Lactobacillus plantarum* CCDM 184
21. *Lactobacillus plantarum* CCDM 185
22. *Lactobacillus plantarum* CCDM 186
23. *Lactobacillus plantarum* CCDM 187
24. *Lactobacillus plantarum* CCDM 188
25. *Lactobacillus plantarum* CCDM 189
26. *Lactobacillus plantarum* CCDM 191
27. *Lactobacillus plantarum* CCDM 194
28. *Lactobacillus plantarum* CCDM 196
29. *Lactobacillus plantarum* CCDM 336
30. *Lactobacillus plantarum* CCDM 375
31. *Lactobacillus plantarum* CCDM 381
32. *Lactobacillus plantarum* CCDM 383
33. *Lactobacillus plantarum* CCDM 384
34. *Lactobacillus plantarum* CCDM 385
35. *Lactobacillus plantarum* CCDM 388
36. *Lactobacillus plantarum* CCDM 391
37. *Lactobacillus plantarum* CCDM 535
38. *Lactobacillus plantarum* CCDM 583
39. *Lactobacillus plantarum* CCDM 195
40. *Lactobacillus plantarum* CCDM 387
41. *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 821
42. *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 963 A
43. *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus* CCDM 776
44. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* CCDM 339
45. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* CCDM 717

3.1.2 Živná půda pro laktobacily

De Man, Rogosa a Sharpe (MRS);(Merck KGaA, Darstadt, Germany) speciální živná půda pro laktobacily obsahující polysorbát, acetát, hořčík a mangan o kterých je známo, že působí příznivě na jejich růst, stejně jako bohatý nutriční základ, zahrnující glukózu, pepton z kaseinu, masový extrakt a kvasniční extrakt.

Přesné složení z dokumentace o instantním bujonu MRS z technické dokumentace v (g/l): pepton z kaseinu 10,0 (g/l); masový extrakt 8,0 (g/l); kvasinkový extrakt 4,0 (g/l); D (+) - glukóza 20,0 (g/l); hydrogenfosforečnan draselný 2,0 (g/l); Tween 80 1.0 (g/l); hydrogencitrát dvojamonný 2.0 (g/l); octan sodný 5.0 (g/l); síran hořečnatý 0.2 (g/l); síran manganatý 0.04 (g/l). (Merck KGaA, Darstadt, Germany, 2022)

Příprava dle doporučení výrobce: 52.2 g MRS granulátu / litr destilované vody, doporučeno autoklávovat 15 minut při teplotě 121^0 C.

Výsledné pH: 5.7 ± 0.2 při 25 °C.

Do instantního bujonu jsme navíc přidali 5 % cystein (Merck KGaA, Darstadt, Germany, 2022) a 3 % glukózu (Merck KGaA, Darstadt, Germany, 2022)

navíc.

3.1.3 Laboratorní pomůcky a chemikálie

- Mikrotitrační destičky - 96 jamek, polystyrenové
- Automatické pipety
- Etanol denaturovaný 96 %
- Roztok krystalové violeti

Příprava: 10 g krystalové violeti se rozpustí v 96 % etanolu a doplní do 500 ml 1% roztoku šťavelanu amonného. Takto připravený roztok se následně zfiltruje.

- Destilovaná voda
- Parafín
- Fyziologický roztok

3.1.4 Přístrojová technika pro kultivaci a stanovení biofilmu

- Tecan Infinite M 200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland)
- Biohazard box EUROFLOW (Schoeller Instruments, ČR)
- Biologický termostat Memmert INE 600 (Memmert, Schwabach, Německo)
- Analytické váhy Adventurer Pro 500 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Denzitometr (Erba Lachema s.r.o., ČR)

3.1.5 Oživení lyofilizovaných kultur

Do zkumavek s 10 ml MRS média s přídavkem 5 % cysteinu byl asepticky vložen lyofilizát sterilní kličkou, suspenze byla upravena tak, aby odpovídala 1. stupni Mc Farlandovy stupnice (cca $3x10^8$ CFU/ml), zkumavky byly následně inkubovány v termostatu Memmert INE 600 (Memmert, Schwabach, Německo) po dobu 24 hodin při 37^0 C za anaerobních podmínek, tj. v exikátoru s hořící svíčkou.

3.2 Kultivační metody pro stanovení biofilm pozitivních kmenů

3.2.1 Christensenova metoda stanovení tvorby biofilmu

Tato metoda využívá schopnost bakteriálního kmene tvořícího biofilm přilnout ke stěně kultivační zkumavky nebo mikrotitrační destičky. Vrstva biofilmu je následně obarvena krystalovou violetí nebo safraninem. U zkumavkové metody se intenzita zbarvení stěn hodnotí subjektivně pouhým okem, avšak modifikovaný test na mikrotitračních destičkách je jako kvantitativní test lepší než zkumavkový test z hlediska objektivity a přesnosti, množství biofilmu je zde hodnoceno pomocí spektrofotometru měřením absorbance. Na přilnutí bakteriálních buněk mají vliv chemické a fyzikální vlastnosti povrchu zkumavky či destičky, většina mikroorganismů se přichytí lépe na hydrofobní povrchy – plasty než na hydrofilní povrch – sklo. Tento způsob barvení jako první publikoval Gordon D. Christensen (1985) ve studii, kde zkoumal biofilm vytvořený koaguláza pozitivními stafylokoky z intravaskulárních katetrů a intracerebrálních shuntů (Djordjevic *at al.,* 2002, Pleva *at al.*, 2022).

3.2.2 Postup kultivace v mikrotitračních destičkách Christensenova metoda

Do sterilních mikrotitračních destiček se nadávkovalo automatickou pipetou 200 µl MRS média, 5 µl inokula oživené kultury a 30 µl parafínu a byly inkubovány v termostatu po dobu

48 hodin při 37^0 C. V každé destičce byly poslední dva sloupce použity jako negativní kontrola, kde byl použit pouze čistý bujón bez inokula kultury. Po inkubaci se destičky opatrně promyly vodou, následně destilovanou vodou, tak aby se odstranila planktonická fáze bakterií, poté se do jamek nadávkovalo 200 µl 96 % etanolu na 20 minut pro zafixování biofilmu, po vylití etanolu a vysušení jamek se do jamek přidalo 200 µl roztoku krystalové violeti k obarvení vrstvy biofilmu po dobu 20 minut. Dalším krokem bylo promytí vodou a destilovanou vodou a opětovné nadávkování 200 µl 96 % etanolu k vyluhování barviva z vrstvy biofilmu. Intenzita zbarvení výluhu ethanolu je přímo úměrná množství vyprodukovaného biofilmu. Posledním krokem byla závěrečná kvantifikace biofilmu měřením absorbance krystalové violeti při 600 nm. v spektrofotometrickém přístroji Tecan Infinite M 200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland); (Pleva *at al.*, 2022).

Kultury pro stanovení růstových křivek byly inkubovány v Tecan Infinite M 200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland) po dobu 72 hodin a každých 30 minut byla měřena a automaticky zaznamenávána optická denzita vzorku.

Bylo provedeno deset opakování každého z uvedených kmenů ve dvou měřeních na stanovení biofilm pozitivních kmenů a jejich růstových křivek.

3.2.3 Stanovení hraniční hodnoty pro biofimpozitivitu bakterií

Při stanovení hodnoty ODH se postupovalo následujícím způsobem:

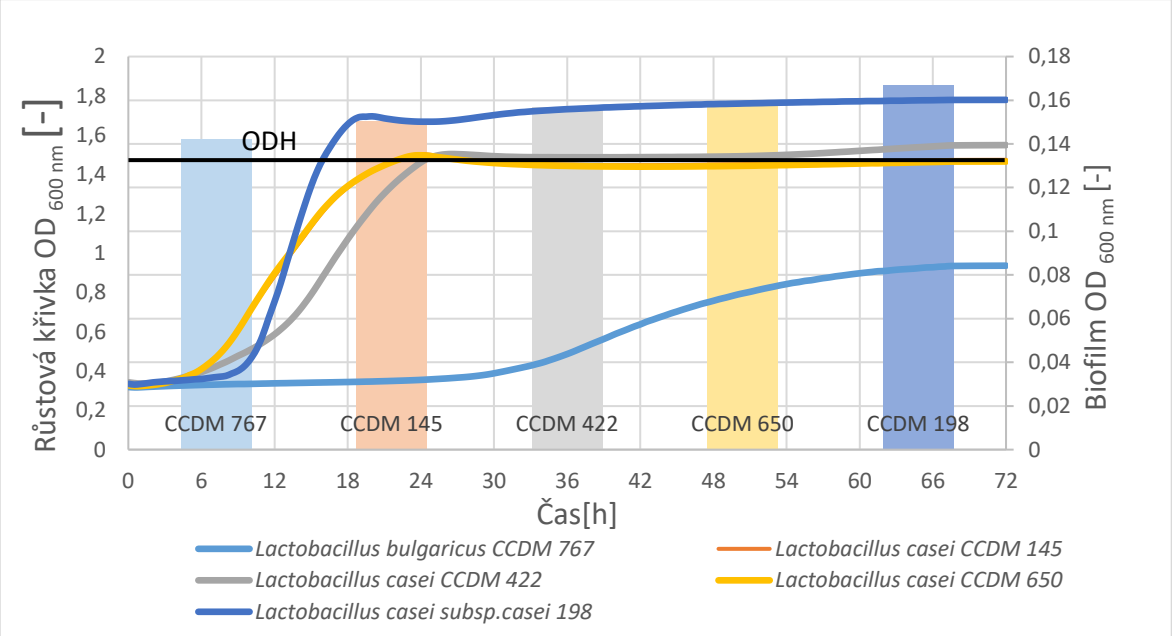
Z jamek negativních kontrol jsme zjistili průměrnou OD negativních kontrol a vypočítali jejich směrodatnou odchylku.

Hraniční hodnota pro biofilmpozitivitu (ODH) se rovná pak trojnásobku směrodatné odchylky nad průměrnou hodnotou optické denzity negativních kontrol (ODnc).

Následně se výsledky roztřídily podle hodnoty do tří kategorií na základě porovnání OD vzorku s hraniční hodnotou ODnc takto: kmen netvořící biofilm ($OD \leq ODnc$), kmen se slabou tvorbou biofilmu ($ODnc < OD \leq 2ODnc$), kmen se silnou tvorbou biofilmu ($OD > 2ODnc$) ; (Pleva *et al.,* 2022).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky měření optické denzity vzorků jednotlivých druhů kmene bakterií *Lactobacillus* jsou zpracovány do grafů znázorňujících hodnotu optické denzity biofilmu a průběh růstové křivky, vyznačena je hodnota ODH, která je rozhodující pro posouzení, zda je kmen biofilm pozitivní nebo negativní.



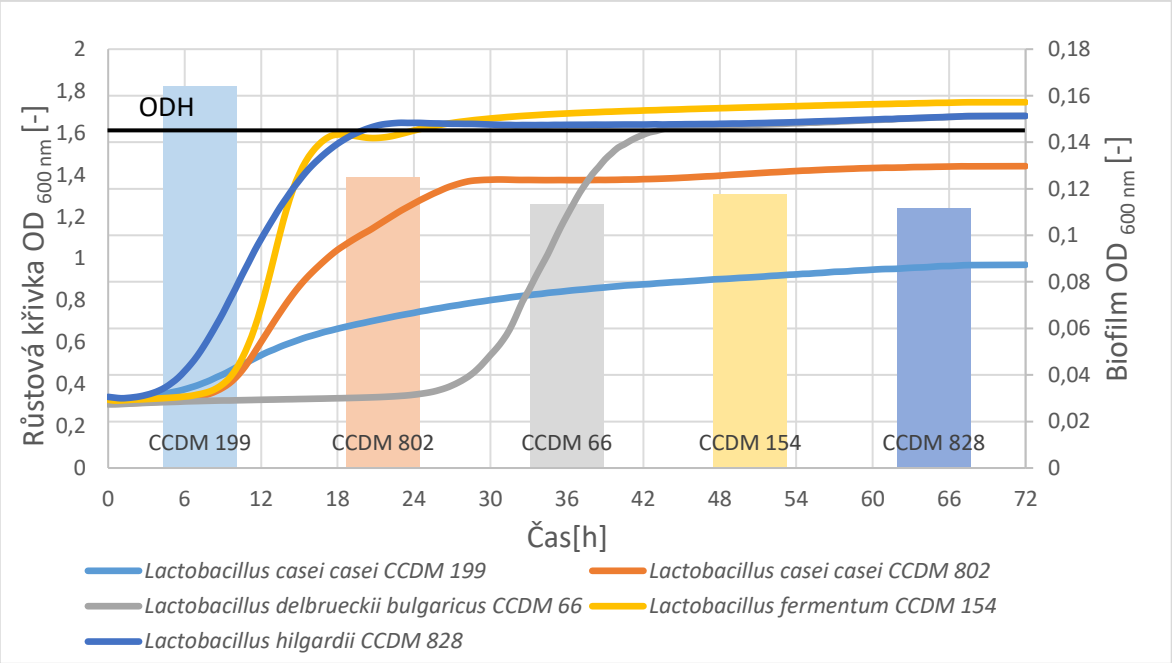
Obrázek 8: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů bakterií *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 767, *Lactobacillus casei* CCDM 145, *Lactobacillus casei* 422, *Lactobacillus casei* 650, *Lactobacillus casei subsp. casei* CCDM 198. (**ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Na obrázku 8 je zřejmá růstová křivka *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 767. Z této pětice bakterií má nejdelší lag fázi růstu, a to v délce 30 hodin, až po této době křivka začíná formovat do logaritmické fáze, která dosahuje vrcholu kolem 66 hodiny, dosahuje však jen hodnoty 0,9 optické denzity (OD), křivka je oproti ostatním bakteriím poměrně plochá. Ze sloupcového grafu je patrné, že biofilm tato bakterie vytvořila i přesto, že průběh růstu se odlišuje od ostatních bakterií v tomto souboru. U *Lactobacillus casei* CCDM 422 lag fáze trvá 6 hodin následně dochází k vzestupu do logaritmické fáze, která dosahuje vrcholu kolem 25 hodiny kultivace a dosahuje hodnoty 1,5 OD, poté je její průběh již stacionární. *Lactobacillus casei subsp. casei* CCDM 198 setrvává v lag fázi růstu 8 hodin načež následuje poměrně strmý vzestup do logaritmické fáze růstu. Logaritmická fáze dosahuje vrcholu na hodnotě 1,7 OD. *Lactobacillus casei* CCDM 145 má velmi podobný průběh jako

Lactobacillus casei CCDM 650, křivka prakticky není na grafu proto zřetelná, pravděpodobně způsobeno chybou při pipetování do mikrotitrační destičky. Lag fáze u *Lactobacillus casei* 650 je v trvání 5 hodin, kdy se růst prudce zvyšuje a dosahuje maxima logaritmické fáze na hodnotě 1,5 OD. Limit pro biofilm pozitivitu překročily všechny kmeny uvedených laktobacilů. Dle studie Wen *et al.* (2017), ve které byla zkoumána schopnost pěti druhů laktobacilů běžně se vyskytujících v zubním plaku včetně *Lactobacillus casei* vykazovaly všechny testované kmeny pouze omezenou schopnost tvořit biofilm při samostatné kultivaci *in vitro*, stejně tak jako v našem experimentu. Pokud však byly kultivovány společně se *Streptococcus mutans*, jejich schopnost tvořit biofilm se významně zlepšila u všech laktobacilů kromě vzorku *Lactobacilus fermentum*.

Interakcemi mezi biofilmy *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus casei (*běžně se vyskytujícím v zubním plaku) za podpory polyfenolu rostlinného původu oxyresveratrolu se zabývala také studie (Wu *et al.,* 2022). Tato studie zjistila, že oxyresveratrol může *Lactobacillus casei* zajistit kompetetivní dominanci v biofilmu při kultivaci těchto dvou druhů současně. EPS (Extracellular polymeric substance) biofilmu vlivem polyfenolu měnilo složení a rozpadalo se prostřednictvím modulace genů souvisejících s glykometabolismem *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus casei* naopak polyfenol podporoval v produkci kyseliny octové, která poskytuje *Lactobacillus casei* konkurenční výhodu proti *Streptococcus mutans*.

Podobné výsledky potvrzující násobně zvýšené produkce biofilmu u laktobacilů ve smíšených kulturách s jinými kmeny uvádí (Filoche, Anderson a Sissons, 2004). Zkoumána byla schopnost *Lactobacillus rhamnosus* tvořit biofilm v monokultuře a kokultuře s *Actinomyces naeslundii a gerencseriae.* Množství *Lactobacillus rhamnosus* v kokultuře s každým z druhů Actinomyces bylo v obou pokusech 7-20×větší než v jeho monokulturním biofilmu. V monokultuře byl *Lactobacillus plantarum* 5krát větší než biofilm monokultury *Lactobacillus rhamnosus*. Růst biofilmu *Lactobacillus plantarum* v kokultuře se zvýšil 4-7× než v jeho monokulturním biofilmu, zvýšila se i koncentrace proteinů v buňkách biofilmu. Oba laktobacily způsobily mírnou inhibici jednotlivých druhů *Actinomyces*.



Obrázek 9: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů bakterií *Lactobacillus casei casei* CCDM 199, *Lactobacillus casei casei* CCDM 802, *Lactobacillus fermentum* CCDM 154, *Lactobacillus delbrueckkii bulgaricus* CCDM 66 a *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828. (**ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

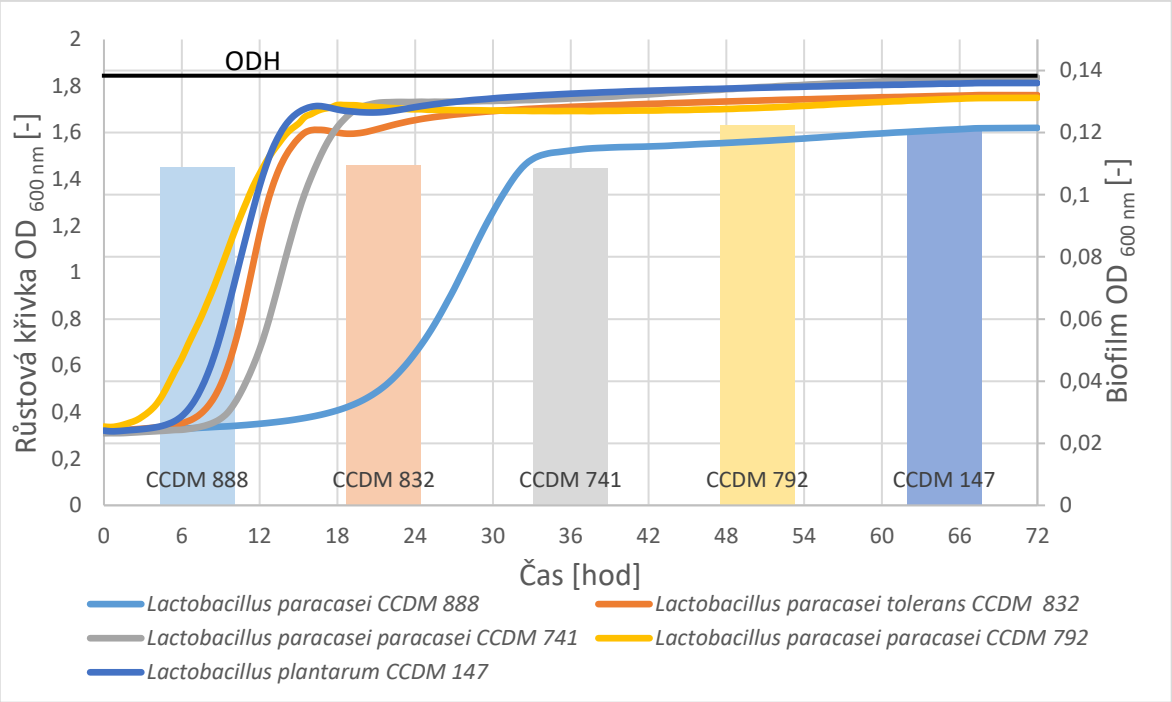
Lactobacillus delbrueckkii bulgaricus CCDM 66 vykazoval na obrázku 9 poměrně dlouhou přípravnou fázi lag v trvání kolem 30 hodin, následuje prudké zvýšení růstu logaritmické fáze dosahující maxima na hodnotě 1,6 optické denzity v 42 hodině, v této hodnotě je již růst stacionární až do konce měření v 72 hodině. *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828 jde po 4 hodinách prudce do logaritmické fáze dosahuje hodnoty kolem 1,7 optické denzity v 20 hodině. U *Lactobacillus casei casei* CCDM 802 dochází k pozvolnější logaritmické fázi kolem 9 hodiny a maxima dosahuje na hodnotě 1,4 optické denzity v 26 hodině. *Lactobacillus fermentum* CCDM 154 setrvává v lag fázi po 9 hodin následuje prudký nárůst denzity na hodnotu 1,6 kolem 17 hodiny a nadále je již růst stacionární. U růstové křivky *Lactobacillus casei casei* CCDM 199 není zcela dobře vyjádřená logaritmická fáze růstu, od 5 hodiny kultivace nastává pozvolný nárůst optické denzity v maximu kolem 0, 9 až mezi 66 a 72 hodinou kultivace. Navzdory ne zcela standartnímu průběhu růstové křivky této bakterie v porovnání s ostatními bakteriemi vyprodukovala nejvíce biofilmu. U ostatních bakterií se tvorba biofilmu nepotvrdila.

Podle studie Kanwala *et al.* (2019) ve které byly testovány na tvorbu biofilmu za simulovaných podmínek trávení probiotické kmeny *Lactobacillus plantarum, delbru*eckii a

fermentum izolované z mléčných potravin, prokázalo se, že testované druhy *Lactobacillus fermentum* jsou silnými producenty biofilmu v porovnání s ostatními testovanými druhy, což se v našem experimentu nepotvrdilo. Právě podmínky napodobující prostředí gastrointestinálního traktu, což je přirozená enviromentální nika těchto bakterií, mohly navodit podmínky klíčové pro výsledek této studie, kde bakterie rodu *Lactobacillus* vytvořily velké množství biofilmu. Bakterií *Lactobacillus fermentum* se zabývali autoři studie Zhang et al. (2022) tato studie zkoumala vliv genu pro *LuxS* na tvorbu biofilmu těchto bakterií a jejich odolnost proti stresu. Kmen s deficitem genu pro *LuxS* proti divokému typu kmenu vykazoval snížení tvorby biofilmu a snížení odolnosti proti stresu, kyselinám, žlučovým solím, vysokým teplotám a hypertonickému prostředí.

Vliv fenolického extraktu medu na produkci biofilmu u bakterií *Lactobacillus fermentum* a *Pediococcus pentosaceus* popisuje (Chiappe, Iurlina a Saiz, 2020). Tyto bakterie se používají v potravinářství ke kontrole výskytu patogenních biofilmů, jejichž růst inhibují. Bylo prokázáno, že použití fenolického extraktu medu jako stresového faktoru snižuje tvorbu biofilmu těchto bakterií. Lepší profil tolerance vůči zvyšujícím se koncentracím fenolického extraktu medu vykazoval *Pediococcus pentosaceus*. U bakterie *Lactobacillus fermentum* bylo pozorováno, že tento extrakt vyvolává poškození na jeho buněčných membránách. Autoři studie proto doporučují, aby ke kontrole patogenních biofilmů v potravinách doplněnými o fenolické sloučeniny, byl využíván přednostně *Pediococcus pentosaceus.*

Výsledky společné kultivace kmenů rodu *Lactobacillus* a *Streptococcus termophillus* uvádí Yao *et al.* (2022) a objasňuje tak vliv vztahů mezi těmito bakteriemi na výtěžnost tvorby biofilmu. Výsledky ukázaly, že při společném pěstování všechny čtyři kmeny laktobacilů podporovaly růst *S. thermophilus* a že *S. thermophilus* podporoval růst *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus a Lactobacillus helveticus*, ale inhiboval růst *Lactobacillus kefiranofaciens*. Žádný zjevný vliv neměl na růst *Lactobacillus paracasei* ve srovnání s kultivací samotného kmene. Výrazně více biofilmu vytvořily během společné kultivace smíšené druhy než jediný kmen, a to bez ohledu na to, zda mezi kmeny existoval symbiotický vztah. Tato skutečnost naznačuje, že tvorba biofilmu společně kultivovanými kmeny nemusí nutně souviset se symbiózou mezi kmeny. Taktéž bylo v této studii prokázáno, že biofilm LAB pomáhá udržovat skladovací stabilitu fermentovaného mléka svojí zvýšenou odolností vůči kyselinám.



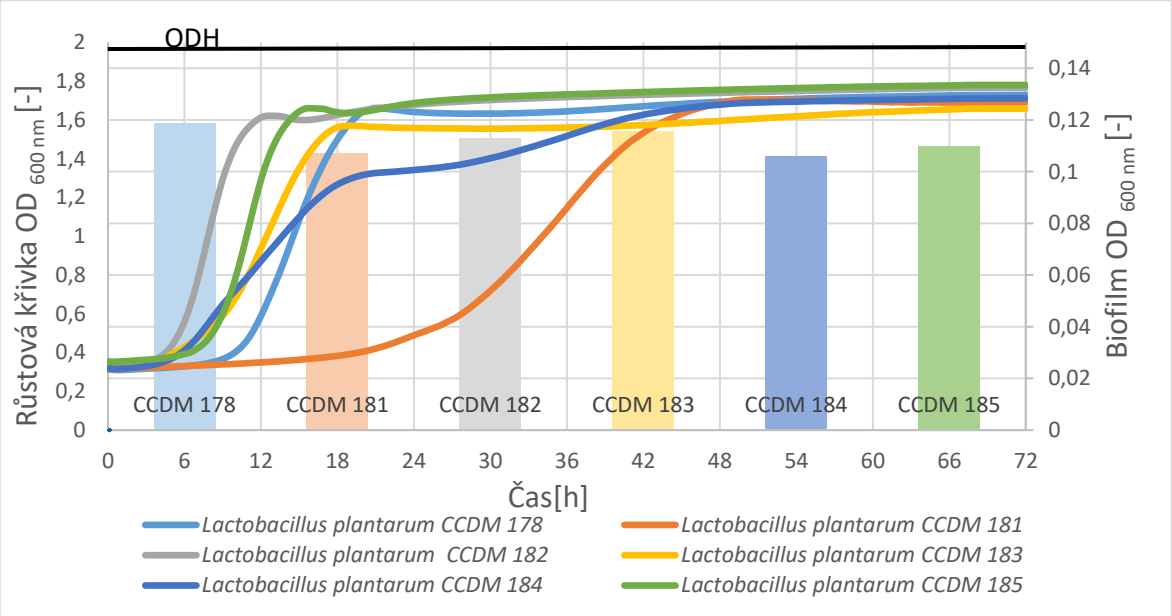
Obrázek 10: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů *Lactobacilus paracasei* CCDM 888, *Lactobacilus paracasei paracasei* CCDM 741, *Lactobacillus paracasei tolerans* CCDM 832, *Lactobacilus paracasei paracasei* CCDM 792 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 147. (**ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Obrázek 10 zobrazuje růstovou křivku *Lactobacilus paracasei* CCDM 888, která setrvává v lag fázi do 20 hodiny kultivace následuje pozvolnější vzestup křivky logaritmická fáze růstu dosahuje maxima kolem 1,6 OD v 38 hodiny kultivace a nadále je růst již stacionární. U *Lactobacilus paracasei paracasei* CCDM 741 je lag fáze v trvání 9 hodin následuje prudký exponenciální vzestup růstu dosahující maxima na hodnotě 1,7 OD v 20 hodině růstu. *Lactobacillus plantarum* CCDM 147 setrvává v lag fázi 6 hodin, kde křivka prudce stoupá až na hodnotu 1,7 OD v 15 hodině kultivace. *Lactobacillus paracasei tolerans* CCDM 832 dochází k logaritmické fázi v 9 hodině dosahuje maxima na hodnotě 1,6 OD v 15 hodině kultivace. *Lactobacilus paracasei paracasei* CCDM 792 vykazuje nejkratší lag fázi z uvedené skupiny. K exponenciálnímu růstu dochází už kolem 3 hodině kultivace, logaritmická fáze dosahuje maxima v 18 hodině na hodnotě 1,7 OD. Tato pětice výše uvedených kmenů *Lactobacillus* v našem testu schopnost tvořit biofilm neprokázala a můžeme je označit jako biofilm negativní, protože ani jeden nedosáhl limitní hodnoty ODH.

Probiotické kmeny *Lactobacillus paracasei* a vliv suplementů posilující jejich růst zkoumala v rozsáhlém screeningu autorka Brignone *at al*. (2017), která prokázala, že přídavek

askorbátu sodného, pyruvátu sodného, síranu manganatého a cysteinu má výrazný posilující účinek na rychlost růstu, vyšší hustotu buněk a celkovou koncentraci biomasy. Cystein také výrazně zkrátil lag fázi a tím i dobu fermentace. V našem experimentu se tvorba biofilmu u *Lactobacillus paracasei* nepotvrdila, což mohlo být způsobeno ne zcela vhodnými kultivačními podmínkami pro tvorbu biofilmu u těchto kmenů.

Antimikrobiální vlastnosti a schopnost produkce biosurfaktantů inhibujících tvorbu a adhezi biofilmu orálních streptokoků u *Lactobacillus paracasei* byly potvrzeny ve studii (Ciandrini *et al.,* 2016). Interakcemi mezi biofilmy *Lactobacilus paracasei* a *Streptococcus oralis* se zabývala studie Archambault et al. (2021) která potvrdila u *Lactobacillus paracasei* produkci inhibitoru růstu *Streptococcus oralis* a povrchově aktivních látek, které se na této interferenci mohou taktéž podílet.

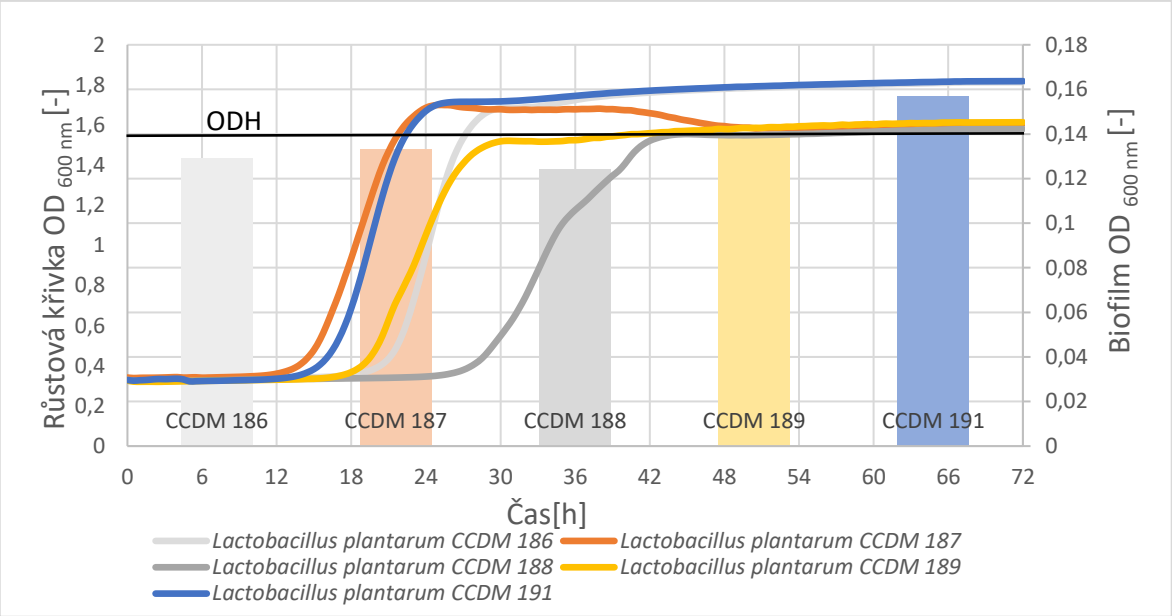


Obrázek 11: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů *Lactobacilus plantarum* CCDM 178, *Lactobacilus plantarum* CCDM 181, *Lactobacilus plantarum* CCDM 182, *Lactobacilus plantarum* CCDM 183, *Lactobacilus plantarum* CCDM 184 a *Lactobacilus plantarum* CCDM 185. (**ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Růstová křivka na obrázku 11 u *Lactobacilus plantarum* CCDM 178 vykazuje lag fázi v trvání 9 hodin, kdy dochází k fázi logaritmické, která se zastavuje na maximu OD kolem

1,7 v 21 hodině kultivace následně je již hodnota optické denzity setrvalá. *Lactobacilus plantarum* CCDM 181 setrvává ve fázi lag nejdelší dobu ze všech bakterií v této skupině až kolem 24 hodiny dochází k výraznějšímu růstu a nástupu log fáze, která je však pozvolná a dosahuje maxima v 50 hodině na hodnotě 1,7 OD. U bakterie *Lactobacilus plantarum* CCDM 182 se jeví lag fáze jako poměrně krátká ve 4 hodině dochází k exponenciálnímu růstu, maxima dosahuje ve 12 hodině na hodnotě 1,6 OD. V křivce *Lactobacilus plantarum* CCDM 183 můžeme pozorovat nástup logaritmické fáze v 9 hodině kultivace, nástup vzrůstu je pozvolnější a na maximu se zastaví na hodnotě 1,5 OD v 18 hodině kultivace. U *Lactobacilus plantarum* CCDM 184 je zřejmé, že logaritmická fáze má pozvolnější charakter, lag fáze je krátká, nárůst pozorujeme kolem 5 hodiny kultivace, maxima OD je dosaženo hodnotou 1,7 kolem 48 hodiny kultivace. Bakterie *Lactobacilus plantarum* CCDM 185 setrvává v lag fázi přibližně 7 hodin, kde dochází k prudkému růstu, logaritmická fáze dosahuje maxima OD na hodnotě 1,7 v 16 hodnotě kultivace. Limitu pozitivity biofilmu však žádný z těchto kmenů nedosáhl.

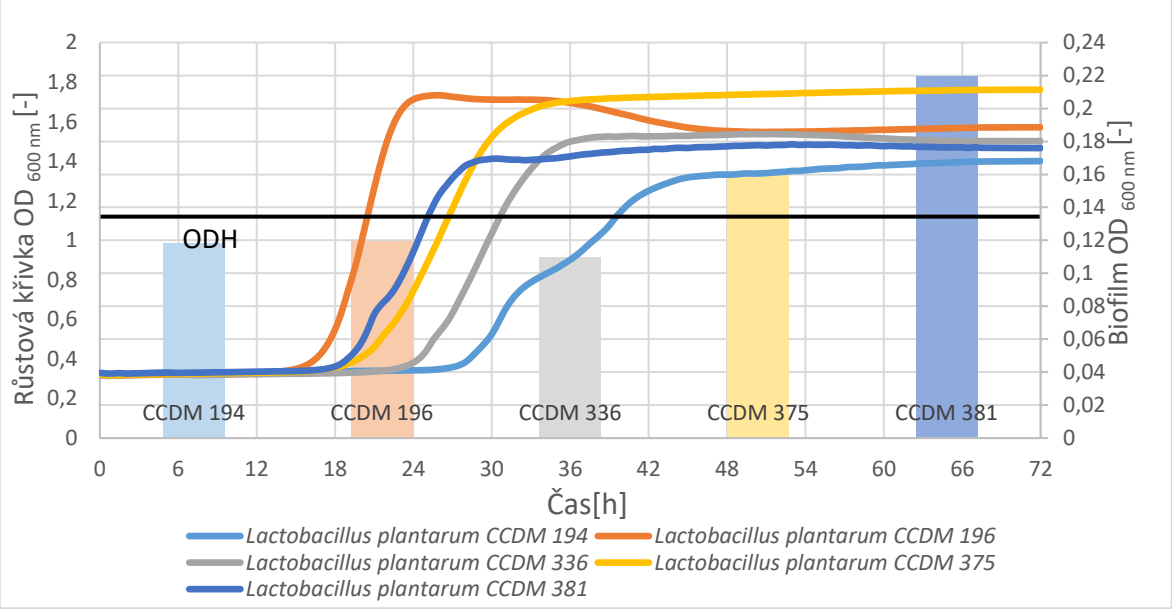
Schopnost zvýšit tvorbu biofilmu u *Lactobacillus rhamosus*, izolovaného z jogurtového nápoje, popisuje (Bruslik, Salakhutdinova a Yarullina, 2017). V této studii bylo prokázáno, že přídavek železa do kultivačního media významně zvýšil koncentraci biofilmu při následném měření, přispívá tak k zvýšení probiotické schopnosti tohoto kmenu, který je následné schopen konkurovat střevním patogenům za podmínek vysoké přítomnosti železa například při střevním krvácení a traumatech, kdy je většina probiotik již neúčinná. Kmeny *Lactobacillus plantarum* byly testovány za účelem schopnosti tvořit biofilm za podmínek kyselého a etanolového stresu *in vitro* ve studii (Pannella *et al.*, 2020). Tvorba biofilmu u 68 izolátů byla hodnocena s výhledem výběru vhodných kandidátů pro zajištění konverze kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou za účelem chuti v podmínkách stresu při výrobě vína. Po 24 hodinách inkubace v běžných, kyselých, etanolových a stresových podmínkách vykazovalo 59 kmenů slabou tvorbu biofilmu a 9 kmenů silnou tvorbu biofilmu. Výsledky ukázaly, že tvorba biofilmu je striktně kmenově závislá a na tvorbu biofilmu neměly vliv stresové podmínky ani původ izolátů.



Obrázek 12: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 186, *Lactobacilus plantarum* CCDM 187, *Lactobacilus plantarum* CCDM 188, *Lactobacilus plantarum* CCDM 189, *Lactobacilus plantarum* CCDM 191. (**ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Na obrázku 12 růstová křivka *Lactobacilus plantarum* CCDM 186 vykazuje lag fázi v trvání 20 hodin, kdy dochází ke zvýšení růstu a fázi exponenciální s maximem OD 1,7 kolem 30 hodiny kultivace. *U Lactobacilus plantarum* CCDM 189 můžeme pozorovat lag fázi v trvání 18 hodin, kdy dochází k nárůstu a log fázi s maximem OD 1,5 kolem 30 hodiny kultivace a překročil zároveň hranici ODH a můžeme jej tak hodnotit jako biofilm pozitivní. *Lactobacilus plantarum* CCDM 187 setrvává v lag fázi nejkratší dobu této pětice bakterií, a to v trvání 14 hodin, logaritmická fáze dosahuje maxima na hodnotě 1,7 OD v 24 hodině kultivace, kdy je růst již vyrovnaný. *Lactobacilus plantarum* CCDM 188 vykazuje poměrně dlouhou lag fázi, k výraznějšímu vzestupu dochází v 28 hodině, logaritmická fáze je pozvolnější dosahuje maximální hodnoty 1,6 OD v 40 hodině kultivace. *Lactobacilus plantarum* CCDM 191, který vytvořil nejvíce biofilmu z výše uvedených bakterií měl nástup do logaritmické fáze růstu v 15 hodině, dosáhl maximální hodnoty 1,8 OD v 38 hodině. Ve studii autorů Aoudia *et al.* (2016) kteří zkoumali probiotické druhy *Lactobacillus plantarum a Lactobacillus fermentum* izolované z lidských slin a výkalů, byla potvrzena jejich schopnost tvořit biofilm na abiotických látkách a dalším testováním dospěli k závěru, že způsob života těchto bakterií v biofilmu je kmenově specifická vlastnost a souvisí

s probiotickými vlastnostmi laktobacilů. To znamená, že testované bakterie produkovaly extracelulární faktory, které jsou schopny modulace imunitního systému a inhibice růstu patogenů. Růst biofilmu probiotických bakterií mohou podpořit také prebiotika, tradičně v podobě inulinu nebo fruktooligosacharidů. Vliv prebiotika v podobě oligopeptidu z vlašského ořechu na růstovou křivku a tvorbu biofilmu u kmene *Lactobacillus plantarum* zkoumali ve studii (Ding a Li, 2021). Bylo zjištěno, že oligopeptidy z vlašských ořechů podporují růst a množení bakterií a také snižují počet odumřelých buněk. Produkce bakteriálního biofilmu a EPS se výrazně zvýšila pravděpodobně v souvislosti s aktivací quorum sensing těchto bakterií.



Obrázek 13: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 194, *Lactobacilus plantarum* CCDM 196, *Lactobacilus plantarum* CCDM 336, *Lactobacilus plantarum* CCDM 375, *Lactobacilus plantarum* CCDM 381. **(ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Na obrázku 13 je zobrazená růstová křivka u *Lactobacilus plantarum* CCDM 194, která má nejdelší lag fázi z pětice bakterií, a to v trvání 27 hodin, poté nastupuje pozvolna do logaritmické fáze růstu a dosahuje maxima OD na hodnotě 1,40 přibližně až 60 hodině kultivace, kdy je růst nadále již stacionární. U *Lactobacilus plantarum* CCDM 336 můžeme pozorovat 24 hodin trvající lag fázi a poměrně prudký nárůst růstové křivky, která dosahuje maximální hodnoty 1,5 OD v 36 hodině. *Lactobacilus plantarum* CCDM 196 vykazuje 16

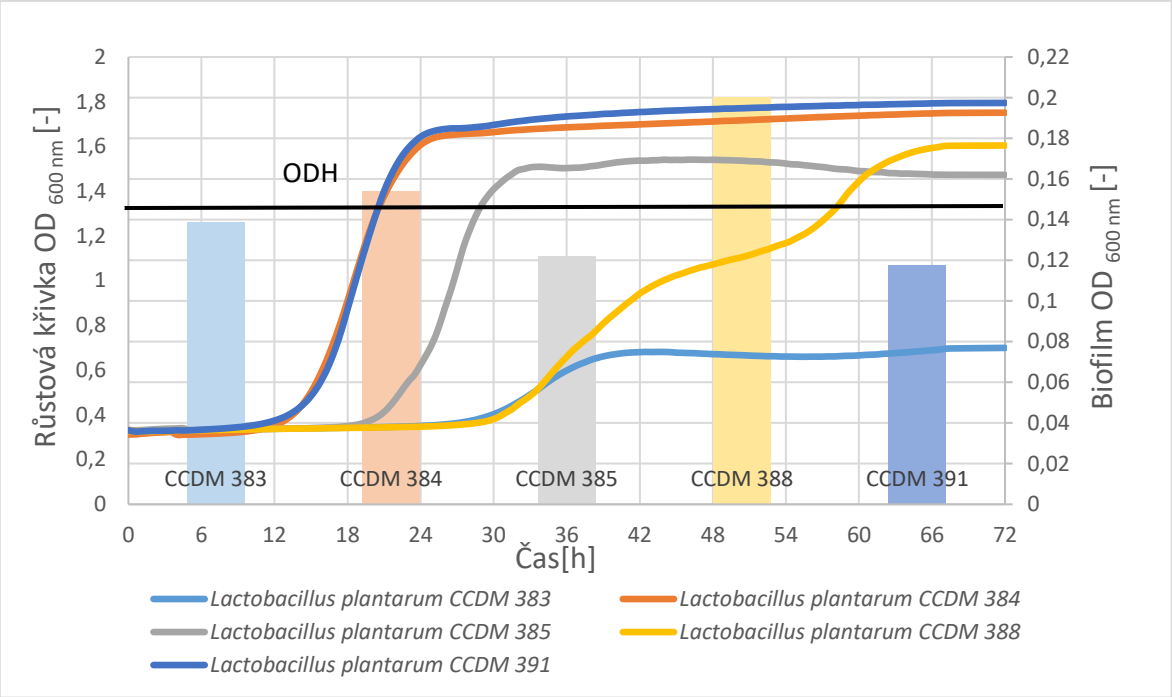
hodin dlouhou lag fázi a strmý nárůst do fáze logaritmické s maximem na hodnotě 1,72 OD v 25 hodině. *Lactobacilus plantarum* CCDM 375 nastupuje do logaritmické fáze v 19 hodině kultivace a dosahuje vrcholu v 36 hodině na hodnotě OD 1,69. Růst *Lactobacilus plantarum* CCDM 381 zůstává v klidové fázi po 18 hodin, kdy můžeme pozorovat nástup do fáze logaritmické, která vrcholí v přibližně v 36 hodině kultivace na hodnotě 1,7 OD.

Tvorba biofilmu byla potvrzena u dvou kmenů *Lactobacillus plantarum* CCDM 375 a 381.

Ve screeningu schopnosti vaginálních laktobacilů tvořit biofilm za různých kultivačních podmínek, bylo testováno patnáct vaginálních kmenů rodu *Lactobacillus* včetně kmenů *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus*, které byly kultivovány v různě modifikovaných kultivačních mediích a k detekci byla použita metoda barvení biofilmu krystalovou violetí podobně jako v našem experimentu. Z výsledků vyplývá, že z uvedených vaginálních izolátů pouze kmeny *Lactobacillus rhamnosus* (CRL 1332), *Lactobacillus reuteri* (CRL 1324) a *Lactobacillus delbrueckii* (CRL 1510) byly schopny růst a tvořit biofilm v kultivačním mediu s vynecháním Tween 80. Skenovací mikroskopie ukázala, že výše uvedené kmeny vyprodukovaly vysoce strukturovaný biofilm. Autoři této studie zmiňují, že tvorba biofilmu byla silně ovlivněna kmenem bakterie, složením kultivačního media, koncentrací inokula a mikrobiálním růstem (Terraf *et al.*, 2012).

Rolí živin ve vývoji biofilmu se zabývá studie Yunda a Quilès (2019), v této práci byly sledovány změny biochemického složení biofilmů probiotické bakterie *Lactobacillus rhamnosus* ve třech výživných mediích 10krát zředěný MRS, mTSB a AOAC in situ za průtokových podmínek. Polysacharidy byly v nejvyšší míře produkovány a biofilm byl nejhustší v mTSB mediu. Pozorovány byly i změny v morfologii bakterií, kde MRS neměnil tyčinkovitý tvar buněk, zatímco kultivační media mTSB a AOAC bakterie tvarově deformovaly.

Účinkem taninu extrahovaného z lískových ořechů na růst a tvorbu biofilmu u *Lactobacillus plantarum* se zabývali ve studii Rasooly *et al*. (2022) Hamamelitannin je látka známá jako inhibitor mnohých patogenních bakterií. Bylo zjištěno, že přes svůj negativní vliv na růst patogenů jako je například *Staphylococcus epidermidis*, tanin s lískových ořechů podporuje růst probiotických bakterií, konkrétně *Lactobacillus plantarum* v nutričně chudém prostředí, zatímco v prostředí bohatém jeho růst pouze udržuje. Tyto výsledky proto naznačují, že tanin je možné použít ke zvýšení růstu a podpoře přežívání probiotik.



Obrázek 14: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 383, *Lactobacilus plantarum* CCDM 388, *Lactobacilus plantarum* CCDM 384, *Lactobacilus plantarum* CCDM 391, *Lactobacilus plantarum* CCDM 385. **(ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Obrázek 14 znázorňuje růst pěti kmenů *Lactobacilus plantarum.* U *Lactobacilus plantarum* CCDM 383 můžeme pozorovat velmi dlouhou lag fázi růstu, logaritmická fáze nastává až 34 hodině kultivace a dosahuje velmi nízkých hodnot maxima optické denzity a to jen na hodnotě 0,7 v 42 hodině kultivace, nadále je růst již stacionární. Podobně dlouhý nástup log fáze má i *Lactobacilus plantarum* CCDM 388 přibližně v 31 hodině, logaritmická fáze však je u této bakterie velmi dlouhá a pozvolná, vrcholí v 67 hodině na hodnotě 1,6 OD. Tato bakterie však vytvořila nejvíce biofilmu z této série bakterií. *Lactobacilus plantarum* CCDM 384 a *Lactobacilus plantarum* CCDM 391 má podobný průběh růstové křivky ze které je zřejmé, že logaritmická fáze nastává v 13 hodině kultivace, je poměrně strmá a krátká, vrcholí na hodnotě 1,67 OD v 25 hodině kultivace. U bakterie *Lactobacilus plantarum* CCDM 384 byla prokázána biofilm pozitivita, zatímco *Lactobacilus plantarum* CCDM 391 biofilm nevytvořila. *Lactobacilus plantarum* CCDM 385 nastupuje do logaritmické fáze v 20 hodině a maxima růstové křivky na hodnotě 1,6OD dosahuje v 35 hodině.

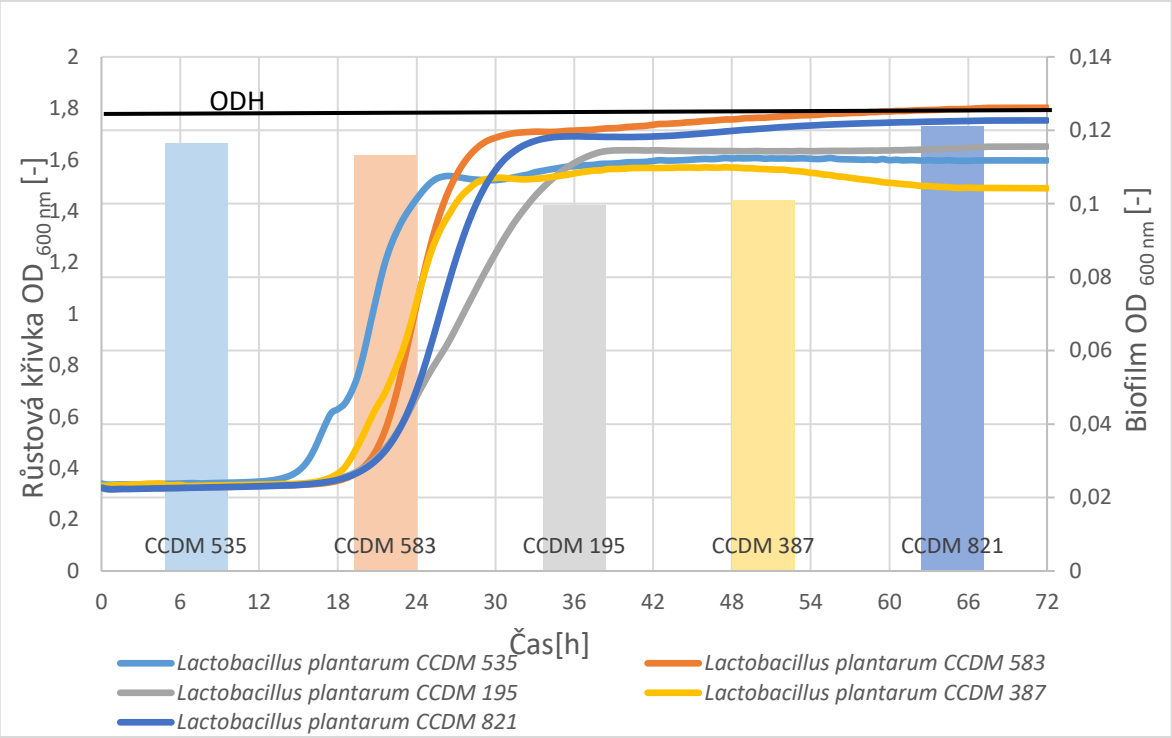
Ze sloupcových grafů je zřejmé, že hranici pro biofilm pozitivitu překročili dva kmeny z této pětice a to CCDM 384 a 388.

Schopnost tvorby biofilmu byla testována u 79 různých druhů laktobacilů izolovaných z tradičních fermentovaných mléčných produktů ve studii (Sun *et al.,* 2020). Všechny kmeny byly kultivovány v MRS bujónu po 24 hodin při 37^0 C v mikrotitračních destičkách a hodnoceny podobně jako v našem testu. Z testovaných 79 kmenů bylo za těchto podmínek schopno tvořit biofilm 74 kmenů. Jako biofilm negativní byli označeny některé kmeny *Lactobacillus casei* a *paracasei* a jeden kmen *Lactobacillus plantarum*. Skupina se slabou tvorbou biofilmu tvořila 12 kmenů a střední tvorbou biofilmu 35 kmenů. 27 kmenů byly izoláty se silnou tvorbou biofilmu. Výrazně nejsilnější producent tvorby biofilmu ze všech testovaných laktobacilů byl z kmene *Lactobacillus plantarum*.

Schopnost tvorby biofilmů bakterií mléčného kvašení *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus fructivorans* byla popsána také ve studii autorů (Kubota *et al*., 2008) Jsou to kmeny bakterií způsobující znehodnocení potravin. Potvrdilo se, že adherují a hromadí se na laboratornímu sklu a bakterie *Lactobacillus fructivorans* tvořily tenké biofilmy podobné celofánu a většina buněk biofilmu byla delší než planktonní buňky. Byla testována i odolnost těchto biofilmů proti kyselině octové a ethanolu. Bylo zjištěno, bakterie zformované do biofilmu byly odolnější než planktonní bakterie. Povrch planktonních bakterií byl poškozen silně, zatímco povrch bakterií biofilmu jenom mírně.

Ve studii Endo *et al*. (2006), která zkoumala vliv mastných kyselin na růst pěti kmenů bakterií rodu *Lactobacillus gasseri, Lactobacilus plantarum a Lactobacillus reuteri.* Jako kultivační medium pro růst biofilmu bylo použit MRS obsahující různé mastné kyseliny místo Tweenu 80. Výsledky této studie ukázaly, že kyselina oktadecenová a transmastné kyseliny silně podporovaly růst těchto druhů laktobacilů v důsledku zabudování do jejich vlastních membránových lipidů.

Inhibici produkce biofilmu a systému QS bakterií může způsobit D-galaktóza, jak bylo publikováno ve studii (Ryu *et al*., 2016). Negativní účinek D-galaktózy na tvorbu biofilmu zubních patogenů byl hodnocen v této studii pomocí barvení krystalovou violetí a konfokální laserové skenovací mikroskopií v nepřítomnosti nebo přítomnosti AI-2. D-galaktóza významně inhibovala aktivitu AI-2 u *Vibrio harveyi* a *Fusobacterium nucleatum,* aniž by ovlivnila růst bakterií.



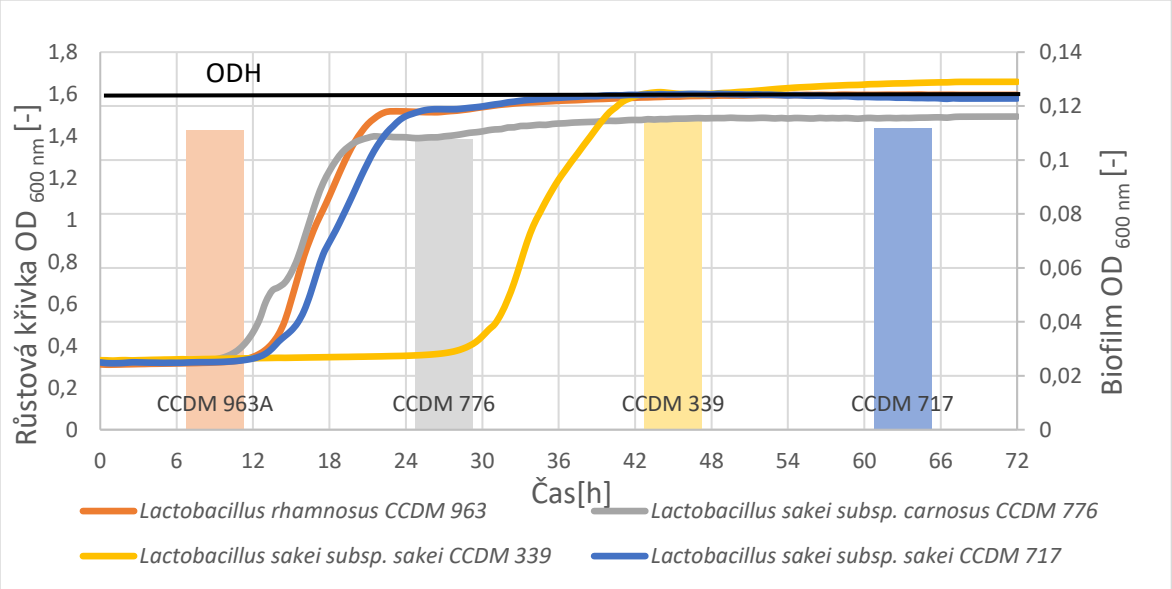
Obrázek 15: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 535, *Lactobacilus plantarum* CCDM 387, *Lactobacilus plantarum* CCDM 583, *Lactobacilus plantarum* CCDM 821, *Lactobacilus plantarum* CCDM 195. (**ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Na obrázku 15 je zřejmý průběh růstové křivky u *Lactobacilus plantarum* CCDM 535, která je dobře vyjádřená s nástupem log fáze v 15 hodině kultivace, maximální hodnoty 1,5 OD bylo dosaženo v 26. hodině. *Lactobacilus plantarum* CCDM 387 má podobný průběh. Log fáze nastává 19 hodině a vrcholí také na hodnotě 1,5 OD v 29 hodině kultivace. U *Lactobacilus plantarum* CCDM 821 exponenciální růst začíná v 21 hodině, maxima dosahuje v 34 hodině hodnotou 1,68 OD, z uvedených bakterií se nejvíce blíží hranici ODH biofilmu, jak je zřejmé ze sloupcového grafu. *Lactobacilus plantarum* CCDM 195 nastupuje do logaritmické fáze v 20 hodině a tato fáze dosahuje maxima na hodnotě 1,55 OD v 37 hodině.

Ani jeden z kmenů této pětice *Lactobacillus plantarum* hraniční hodnoty pro potvrzení tvorby biofilmu nedosáhl.

Z dalších odborných studií týkajících se tvorby biofilmu u laktobacilů vyplývá, že při kultivaci *in vitro* velmi záleží na složení media a dalších kultivačních podmínkách. *Lactobacillus plantarum* je v potravinářství spojován s mikrobiální degradací potravin, ve studii Fernandéz Ramiréz *et al*. (2015) byla analyzována schopnost tvořit biofilm u 6 vzorků

tohoto kmene izolovaných z kazících se potravin. Biofilm byl kvantifikován pomocí barvení krystalovou violetí podobně jako v našem experimentu a výsledky byly ovlivněné specifickými vlastnostmi kmene, teplotou, dobou zrání. Všechny kmeny společně však vykazovaly nejvyšší míru tvorby biofilmu v mediu Brain Heart Infusion doplněného o mangan a glukózu. Ve studii autorů Slížová *et al.* (2015), byl sledován potenciál tvorby biofilmu u střevních kmenů *Lactobacillus reuteri* za různých kultivačních podmínek. Při kultivaci v nutričně bohatém mediu MRS (Man-Rogosa-Sharpe) běžně užívaném v praxi pro kultivaci laktobacilů, nebyla produkce biofilmu prokázána. Vysoce pozitivní tvorba však byla potvrzena naopak při kultivaci v médiu s nižší dostupností uhlíku a solí. Získané výsledky také potvrdili významnou roli Tweenu 80 na produkci biofilmu. Vynechání Tweenu 80 v mediu MRS podpořilo tvorbu biofilmu. Hojný výskyt biofilmu byl také zjištěn v přítomnosti laktózy, galaktózy a glukózy. Postupné zvyšování koncentrace cukrů však vyvolalo pokles tvorby biofilmu.



Obrázek 16: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus rhamnosus* CCDM 963 A, *Lactobacillus sakei subsp. sakei* CCDM 339, *Lactobacillus sakei subsp. carnosus* CCDM 776, *Lactobacillus sakei subsp. sakei* CCDM 717. **(ODH** = limitní hodnota denzity tvorby biofilmu)

Na obrázku 16 jsou zobrazeny dobře vyjádřené růstové křivky u této poslední čtveřice testovaných bakterií. Lactobacillus rhamnosus CCDM 963 A nastupuje do logaritmické fáze růstu v 13 hodině, dosahuje maxima růstové křivky na hodnotě 1,5 OD v 22 hodině

kultivace. *Lactobacillus sakei subsp. sakei* CCDM 339 má na rozdíl od ostatních bakterií této čtveřice velmi dlouhou lag fázi v trvání 29 hodin, logaritmická fáze dosahuje hodnoty 1,6 v 42 hodině kultivace. *Lactobacillus sakei subsp. carnosus* CCDM 776 nastupuje do logaritmické fáze po 10 hodinách kultivace a tato fáze vrcholí na hodnotě 1,4 OD v 21 hodině. Růst *Lactobacillus sakei subsp. sakei* CCDM 717 se exponenciálně zvyšuje v 14 hodině a v 25 hodině kultivace se dostává na nejvyšší hodnotu 1,5 OD.

Poslední čtveřici testovaných laktobacilů musíme však hodnotit jako biofilm negativní, hraniční hodnotu nepřekročil ani jeden z kmenů.

Tvorbu biofilmu a proteom u *Lactobacillus sakei* zkoumali také autoři studie Pérez-Ibarreche *et al*. (2019), tento kmen byl vybrán k analýze na základě jeho schopnosti tvořit bakteriociny a schopnost adherovat k abiotickému povrchu při nízkých teplotách. Biofilm byl pěstován na povrchu z nerezové oceli, tento materiál byl vybrán z důvodů možné aplikace této bakterie v potravinářství ke kontrole kolonizace potravin a potravinářského zařízení patogeny. Pomocí RT – PCR analýzy a analýzy proteomu u této bakterie byly identifikovány geny a proteiny související s tvorbou biofilmu. Ve srovnávací studii autorů Lebeer et al. (2007) ve které byla testována skupina blízce příbuzných bakteriálních kmenů *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus casei, z*e všech testovaných kmenů vykazoval nejlepší výsledky ve schopnosti tvořit biofilm *Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103),* který byl schopen tvořit souvislou vrstvu biofilmu *in vitro* na rozdíl od ostatních příbuzných testovaných laktobacilů. Testy biofilmu na mikrotitračních destičkách ukázaly, že *in vitro* je tvorba biofilmu u tohoto kmenu silně ovlivněna faktory kultivačního média a podmínkami souvisejícími s tvorbou biofilmu v gastrointestinálním prostředím, včetně nízkého pH, vysoké osmolarity a přítomnosti žluči, mucinů a bakterií. Při testování vlivu kultivačního media a dalších enviromentálních aspektů na tvorbu biofilmu, bylo prokázáno, že uvedený kmen neprodukuje biofilm ve standardním mediu MRS pro laktobacily. Dále byl u byl u tohoto konkrétního kmenu potvrzen potlačující účinek glukózy na růst biofilmu, který byl potvrzen taktéž přídavkem glukózy do media Tryptocasein Soy Broth (TSB). Taktéž bylo pozorováno násobné zvýšení tvorby biofilmu po přidání 0,05 až 0,2 % žlučových kyselin do syntetického média AOAC. Inhibičně na růst biofilmu také působil přídavek Tweenu 80, stejně jako ve studii kolektivu autorů (Slížová *et al*., 2015).

Inhibiční účinek detergentu Tween 80 na formování biofilmu laktobacilů a výsledné množství produkované bakteriální hmoty v laboratorních podmínkách je zmíněn ve studiích (Lebeer *et al*., 2007, Slížová *et al*., 2015, Terraf *et al.*, 2012). Je proto možné, že může mít

negativní vliv na adhezi těchto bakterií k polystyrenovému povrchu mikrotitračních destiček. Kmeny rodu *Lactobacillus* produkují také značné množství svých vlastních biosurfaktantů (Shokouhfard *et al.*, 2022). V této studii byl potvrzen vliv biosurfaktantů produkovaných *Lactobacillus acidophilus* na adhezi nemocničního patogenu Proteus mirabilis k močovým katetrům a dalším zařízením užívaným ve zdravotnictví. Biosurfaktanty snižují adhezi kmenů k povrchu mikrotitračních destiček prostřednictvím snížení povrchového napětí. Autoři se tak domnívají, že biosurfaktanty výše uvedeného laktobacila brání v přichycení-adhezi jiných bakterií k abiotickému materiálu. Podobný výsledek dokládá studie autorů Walencka *et al.* (2008), kde byla zaznamenána schopnost biosurfaktantů kmenů *Lactobacillus acidophilus* inhibovat jiné biofilmy v tomto případě patogeny *Staphylococces aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Bylo dokázáno, že přídavek povrchově aktivních látek produkovaných těmito laktobacily, k předem vytvořeným zralým biofilmům urychlil jejich rozptyl a změnil parametry biofilmu, pravděpodobně v důsledku vlivu na hydrofobicitu povrchu buněk testovaných stafylokoků.

4.1.1 Srovnání výsledků tvorby biofilmu u testovaných laktobacilů

Tabulka 1: Srovnání výsledků schopnosti tvorby biofilmu testovaných laktobacilů

	Bakterie	OD	Kontrola	Smodch	1ODH	2ODH
1.	*LB bulgaricus* CCDM 767	0,1423	0,1136	0,0089	0,1402	0,2804
2.	*LB casei* CCDM 145	0,1505	0,1136	0,0089	0,1402	0,2804
3.	*LB casei* CCDM 422	0,1570	0,1136	0,0089	0,1402	0,2804
4.	*LB casei* CCDM 650	0,1582	0,1136	0,0089	0,1402	0,2804
5.	*LB casei subsp.casei* CCDM 198	0,1671	0,1136	0,0089	0,1402	0,2804
6.	*LB casei casei* CCDM 199	0,1639	0,1136	0,0089	0,1402	0,2804
7.	*LB casei casei* CCDM 802	0,1249	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
8.	*LB delbrueckii bulgaricus* CCDM 66	0,1133	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
9.	*LB fermentum* CCDM 154	0,1176	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
10.	*LB hilgardii* CCDM 828	0,1114	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
11.	*LB paracasei* CCDM 888	0,1090	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
12.	*LB paracasei tolerans* CCDM 832	0,1095	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
13.	*LB paracasei paracasei* CCDM 741	0,1085	0,1115	0,0108	0,1439	0,2878
14.	*LB paracasei paracasei* CCDM 792	0,1225	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
15.	*LB plantarum* CCDM 147	0,1213	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
16.	*LB plantarum* CCDM 178	0,1188	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
17.	*LB plantarum* CCDM 181	0,1071	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
18.	*LB plantarum* CCDM 182	0,1130	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
19.	*LB plantarum* CCDM 183	0,1154	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
20.	*LB plantarum* CCDM 184	0,1058	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
21.	*LB plantarum* CCDM 185	0,1097	0,1010	0,0150	0,1459	0,2917
22.	*LB plantarum CCDM 186*	0,1292	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
23.	*LB plantarum CCDM 187*	0,1331	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
24.	*LB plantarum CCDM 188*	0,1240	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
25.	*LB plantarum CCDM 189*	0,1406	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
26.	*LB plantarum CCDM 191*	0,1570	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
27.	*LB plantarum CCDM 194*	0,1184	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
28.	*LB plantarum CCDM 196*	0,1191	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
29.	*LB plantarum CCDM 336*	0,1098	0,1123	0,0092	0,1400	0,2799
30.	*LB plantarum CCDM 375*	0,1597	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
31.	*LB plantarum CCDM 381*	0,2195	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
32.	*LB plantarum CCDM 383*	0,1388	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
33.	*LB plantarum CCDM 384*	0,1541	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
34.	*LB plantarum CCDM 385*	0,1223	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
35.	*LB plantarum CCDM 388*	0,2004	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
36.	*LB plantarum CCDM 391*	0,1178	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
37.	*LB plantarum CCDM 535*	0,1163	0,1154	0,0069	0,1359	0,2719
38.	*LB plantarum CCDM 583*	0,1130	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
39.	*LB plantarum CCDM 195*	0,0996	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
40.	*LB plantarum CCDM 387*	0,1009	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
41.	*LB plantarum CCDM 821*	0,1210	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
42.	*LB rhamnosus CCDM 93A*	0,1112	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
43.	*LB sakei subsp. carnosus CCDM 776*	0,1076	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
44.	*LB sakei subsp. sakei CCDM 339*	0,1144	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458
45.	*LB sakei subsp. sakei CCDM 717*	0,1118	0,1030	0,0066	0,1229	0,2458

Z uvedené tabulky je patrné, že ze 45 kmenů testovaných bakterií rodu *Lactobacillus* je 13 kmenů biofilmpozitivních, se slabou tvorbou biofilmu. Jsou to bakterie *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 767, *Lactobacillus casei* CCDM 145, 422, 650, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 199 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 189, 191, 375, 381, 383, 384, 388. U ostatních testovaných bakterií nebyla tvorba biofilmu v našem experimentu prokázána.

Z výše uvedeného celkového počtu kmenů je pouze necelých 29 % biofilm pozitivních, a to s hodnocením slabé tvorby biofilmu. Tento výsledek může být buď kmenově specifický (Aoudia *et al.* 2016, Pannela *et al.* 2020) ale mohl být ovlivněn kultivačními podmínkami (Yunda a Quilès, 2019, Kanwal *et al.* 2019), především výběrem kultivačního media v našem experimentu anebo inhibičním účinkem Tweenu 80 na adhezi biofilmu ke stěnám mikrotitračních destiček (Lebeer *et al*., 2007, Slížová *et al*., 2015, Terraf *et al.*, 2012). Zvýšit produkci biofilmu a aktivovat tak quorum sensing u kmenů rodu *Lactobacillus* by mohly v dalších podobných testech různé suplementy, jako jsou netradiční prebiotika, polyfenoly, mastné kyseliny a taniny (Ding a Li, 2021, Endo *et al*. 2006, Rasooly *et al*. 2022, Wu *et al.,* 2022).

ZÁVĚR

Quorum sensing je systém přenosu informace společenstvím bakterií pomocí signálních molekul, který hraje důležitou roli při regulaci tvorby biofilmu.

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou schopny za příznivých podmínek aktivace systému quorum sensing a tvorby biofilmů s nízkou i vysokou hustotou. Tato schopnost je kmenově specifická vlastnost, lze ji však ovlivnit kultivačními podmínkami: složením kultivačního media, teplotou a dobou inkubace. Pozitivně působí také simulace prostředí gastrointestinálního traktu, společná kultivace s jinými bakteriemi nebo přídavek prebiotik a dalších suplementů. Mnohé studie zabývající se analýzou různých kultivačních podmínek zmiňují negativní vliv detergentu Tween 80 na tvorbu biofilmu v kultivačním mediu.

Tvorba biofilmu patogenními a nepatogenními mikroorganismy je zodpovědná za udržení těchto mikroorganismů ve stabilních ekosystémech *in vivo* například v gastrointestinálním traktu. U probiotických kmenů je považována za prospěšnou vlastnost, která podporuje kolonizaci a dlouhodobé setrvání u hostitele a jeho ochranu před patogeny.

V našem experimentu byla prokázána schopnost rodu *Lactobacillus* tvořit biofilm *in vitro* na abiotickém povrchu polystyrenových mikrotitračních destiček. Z 45 testovaných kmenů rodu *Lactobacillus* bylo schopno vytvořit biofilm 13 kmenů. Tvorba biofilmu byla potvrzena u kmenů *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Tento výsledek mohl být ovlivněn kultivačními podmínkami a specifickou schopností tvorby biofilmu u jednotlivých kmenů. Planktonní růst testovaných vzorků byl souběžně potvrzen měřením růstových křivek jednotlivých mikroorganismů.

Objasnění podmínek enviromentálního prostředí, které aktivuje QS systém laktobacilů a podporuje tvorbu biofilmu u laktobacilů má význam jak v potravinářství, kde by mohlo přispět při navrhování nových strategií k prevenci tvorby biofilmu patogenů, tak i v medicíně, kde se uplatňují jako probiotika nebo postbiotika. Postbiotika některých kmenů rodu *Lactobacillus* se uplatňují právě díky mezidruhové reaktivitě QS systémů za účelem snížení virulence a omezení růstu biofilmu konkurenčních patogenních bakterií, které jsou rezistentní k běžně užívaným antibiotikům.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMS, M. R. a M. O. MOSS. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge: Royal Soc. of Chemistry, 2008. ISBN 978-0-85404-284-5

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, Avelino et al., 2019. Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. **10**(1), 173-195 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1941-1413. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-food-032818-121805

AOUDIA, Nabil et al., 2016. Biofilms of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology* [online]. **53**, 51-59 [cit. 2023-04-13]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2015.04.009

ARCHAMBAULT, Linda et al., 2021. Understanding Lactobacillus paracasei and Streptococcus oralis Biofilm Interactions through Agent-Based Modeling. *MSphere* [online]. **6**(6), e00875-21 [cit. 2023-04-13]. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.00875-21

AZAMI, S., E. AREFIAN a N. KASHEF. Postbiotics of Lactobacillus casei target virulence and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa by modulating quorum sensing. Archives of Microbiology 204 [online]. [cit. 2023-03-04]. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00203-022-02770-8

AZEREDO, Joana et al., 2016. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **43**(3), 313-351 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2016.1208146

Biology Dictionary: Biofilm. *Biology Dictionary* [online]. 6.8. 2016 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: https://biologydictionary.net/biofilm/

BRIGNONE, Desideria et al., 2017. Boosting the growth of the probiotic strain Lactobacillus paracasei ssp. paracasei F19. *Archives of Microbiology* [online]. **199**(6), 853-862 [cit. 2023-03-09]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-017-1352-7

BRUSLIK, Natalia L., Aigul I. SALAKHUTDINOVA a Dina R. YARULLINA, 2017. Involvement of Iron in Biofilm Formation by Lactobacillus rhamnosus. *BioNanoScience* [online]. **7**(1), 70-72 [cit. 2023-03-23]. ISSN 2191-1630. Dostupné z: doi:10.1007/s12668-016-0290-1

BUCK, B.L., M.A. AZCARATE-PERIL a T.R. KLAENHAMMER, 2009. Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of Lactobacillus acidophilus. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **107**(1), 269-279 [cit. 2023-04-04]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04204.x

BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.

CARRASCOSA, Conrado et al., 2021. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **18**(4) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph18042014

CARVALHO, Fábio M. et al., 2021. Effect of Lactobacillus plantarum Biofilms on the Adhesion of Escherichia coli to Urinary Tract Devices. *Antibiotics* [online]. **10**(8) [cit. 2023-03-09]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics10080966

CIANDRINI, Eleonora et al., 2016. Characterization of biosurfactants produced by Lactobacillus spp. and their activity against oral streptococci biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **100**(15), 6767-6777 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7531-7

COENYE, Tom a Hans J. NELIS, 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **83**(2), 89-105 [cit. 2023-04-04]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi :10.1016/j.mimet.2010.08.018

CONWAY a COHEN, ed. *Metabolism and Bacterial Pathogenesis* [online]. American Society of Microbiology, 2015 [cit. 2022-05-08]. ISBN 9781555818869. Dostupné z: doi:10.1128/9781555818883

COOPER, Stuart a Jianjun GUAN, 2016. *Advances in Polyurethane Biomaterials: 12.4.3 Microbial ability to form a biofilm* [online]. Elsevier [cit. 2023-04-17]. ISBN 978-0-08-100622-1. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010WM0T8/advances-in-polyurethane/microbial-ability-form

DEKEERSMAECKER, Sigrid C. J. a Jos VANDERLEYDEN, 2003. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using Vibrio harveyi as a reporter.

Microbiology [online]. **149**(8), 1953-1956 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.C0117-0

DENG, Zhaoxi et al., 2020. Quorum Sensing, Biofilm, and Intestinal Mucosal Barrier: Involvement the Role of Probiotic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **10** [cit. 2023-03-28]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.538077

DENG, Zhaoxi et al., 2022. AI-2/LuxS Quorum Sensing System Promotes Biofilm Formation of Lactobacillus rhamnosus GG and Enhances the Resistance to Enterotoxigenic Escherichia coli in Germ-Free Zebrafish. *Microbiology Spectrum* [online]. **10**(4), e00610-22 [cit. 2023-04-01]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/spectrum.00610-22

DI CAGNO, Raffaella et al., 2011. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *Journal of Proteomics* [online]. **74**(1), 19-34 [cit. 2023-03-28]. ISSN 18743919. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jprot.2010.09.003

DING, Ting a Yong LI, 2021. *Beneficial effect and mechanism of walnut oligopeptide on Lactobacillus plantarum Z7* [online]. **9**(2), 672-681 [cit. 2023-04-13]. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.2029

DJORDJEVIC, D., M. WIEDMANN a L. A. MCLANDSBOROUGH, 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of Listeria monocytogenes Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **68**(6), 2950-2958 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002

ENDO, Yasushi et al., 2006. Trans fatty acids promote the growth of some Lactobacillus strains. *The Journal of General and Applied Microbiology* [online]. **52**(1), 29-35 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0022-1260. Dostupné z: doi:10.2323/jgam.52.29

FEINER, Gerhard, 2006. *Meat Products Handbook: The microbiology of specific bacteria, 39.8.1 Genus Lactobacillus* [online]. Woodhead Publishing [cit. 2023-04-17]. ISBN 978-1-84-569172-1. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMPHPST0H/meat-products-handbook/meat-products-handbook

FERNÁNDEZ RAMÍREZ, Mónica D. et al., 2015. Characterisation of biofilms formed by Lactobacillus plantarum WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **207**, 23-29 [cit. 2023-03-28]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.030

FILOCHE, S. K., S. A. ANDERSON a C. H. SISSONS, 2004. Biofilm growth of Lactobacillus species is promoted by Actinomyces species and Streptococcus mutans. *Oral Microbiology and Immunology* [online]. **19**(5), 322-326 [cit. 2023-05-07]. ISSN 0902-0055. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-302x.2004.00164.x

GOLDSTEIN, Ellie J. C., Kerin L. TYRRELL a Diane M. CITRON, 2015. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **60**(suppl_2), S98-S107 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ072

GU, Yue et al., 2021. Dissecting signal molecule AI-2 mediated biofilm formation and environmental tolerance in Lactobacillus plantarum. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **131**(2), 153-160 [cit. 2023-04-09]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.09.015

HORÁČKOVÁ, Šárka. Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných výrobcích ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Mlékařské listy 170* [online]. 2018 Str. 22-24 [cit. 2021-11-01] Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_170-s.22-24.pdf

CHEN, Meng, Qingsong YU a Hongmin SUN, 2013. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **14**(9), 18488-18501 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms140918488

CHENG, Li-Hao et al., 2019. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. **27**(3), 632-648 [cit. 2023-04-30]. ISSN 10219498. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jfda.2019.01.002

CHIAPPE, Cristina S., Miriam O. IURLINA a Amelia I. SAIZ, 2020. Effect of honey phenolic extract on biofilm formation by Pediococcus pentosaceus and Lactobacillus fermentum. *LWT* [online]. **131** [cit. 2023-04-15]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi: 10.1016/j.lwt.2020.109782

KANWAL, Aziz a Tariq MUHAMMAD, 2019. Biofilm development in L. fermentum under shear flow & sequential GIT digestion. *FEMS mikrobiology Letters* [online]. [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: doi: DOI:10.1093/femsle/fnz064

KAREB, Ourdia a Mohammed AÏDER, 2020. Quorum Sensing Circuits in the Communicating Mechanisms of Bacteria and Its Implication in the Biosynthesis of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria: a Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [online]. **12**(1), 5-17 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1867-1306. Dostupné z: doi:10.1007/s12602-019-09555-4

KOCHALSKA, Katarzyna et al., 2020. Dietary supplementation with Lactobacillus rhamnosus JB-1 restores brain neurochemical balance and mitigates the progression of mood disorder in a rat model of chronic unpredictable mild stress. *Nutrition Research* [online]. **82**, 44-57 [cit. 2023-04-30]. ISSN 02715317. Dostupné z: doi: 10.1016/j.nutres.2020.06.019

KUBOTA, Hiromi et al., 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **106**(4), 381-386 [cit. 2023-04-15]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.106.381

LE, Bao a Seung Hwan YANG, 2018. Efficacy of Lactobacillus plantarum in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicology Reports* [online]. **5**, 314-317 [cit. 2023-03-28]. ISSN 22147500. Dostupné z: doi: 10.1016/j.toxrep.2018.02.007

LEBEER, Sarah et al., 2007. Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain Lactobacillus rhamnosus GG. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **73**(21), 6768-6775 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01393-07

LEBEER, Sarah, Jos VANDERLEYDEN a Sigrid C. J. DE KEERSMAECKER, 2008. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **72**(4), 728-764 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00017-08

LEWANDOWSKI, Zbigniew a Haluk BEYENAL. *Fundamentals of Biofilm Research* [online]. [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: doi:10.1201/b16291

LI, Qun et al., 2021. Formation of Multispecies Biofilms and Their Resistance to Disinfectants in Food Processing Environments: A Review. *Journal of Food Protection* [online]. **84**(12), 2071-2083 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/JFP-21-071

MANSEL, Griffiths, 2005. *Understanding pathogen behaviour-virulence, stress response and resistence: 11.3.10 Quorum sensing* [online]. Food Science [cit. 2023-04-17].

ISBN 978-1-84569-022-9. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpUPBVSRR1/understanding-pathogen/understanding-pathogen

MATSUDA, Yuko et al., 2018. Culture Supernatants of Lactobacillus gasseri and L. crispatus Inhibit Candida albicans Biofilm Formation and Adhesion to HeLa Cells. *Mycopathologia* [online]. **183**(4), 691-700 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0301-486X. Dostupné z: doi:10.1007/s11046-018-0259-4

Merck KGaA,Darmstadt, Germany: Technical information MRS [online]. [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/MRS-broth,MDA_CHEM-110661?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.bing.com%2F#documentation

MOKOENA, Mduduzi Paul, 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens. *Molecules* [online]. **22**(8) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22081255

NIEVAS, Fiorela et al., 2012. Detection, Characterization, and Biological Effect of Quorum-Sensing Signaling Molecules in Peanut-Nodulating Bradyrhizobia. *Sensors* [online]. **12**(3), 2851-2873 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s120302851

NODA, Masafumi et al., 2018. Expression of Genes Involved in Bacteriocin Production and Self-Resistance in Lactobacillus brevis 174A Is Mediated by Two Regulatory Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **84**(7), e02707-17 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02707-17

PALDRYCHOVÁ, Martina a Jana KVASNIČKOVÁ, 2017. QUORUM SENSING VE VZTAHU K VIRULENCI MIKROORGANISMŮ. Chem. Listy [online]. (111), 637-643 [cit. 2023-02-07]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1501/1501

PALUCH, E. et al., 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **104**(5), 1871-1881 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10349-w

PANNELLA, Gianfranco et al., 2020. Effect of Biofilm Formation by Lactobacillus plantarum on the Malolactic Fermentation in Model Wine. *Foods* [online]. **9**(6) [cit. 2023-04-13]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9060797

PAPENFORT, Kai a Bonnie L. BASSLER, 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **14**(9), 576-588 [cit. 2022-03-23]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2016.89

PÉREZ-IBARRECHE, Mariana et al., 2019. Corrigendum to "Proteomic and genetics insights on the response of the bacteriocinogenic Lactobacillus sakei CRL1862 during biofilm formation on stainless steel surface at 10 °C" [Int. J. Food Microbiol. 258 (2017), 18–27]. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **301** [cit. 2023-04-13]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.029

PLEVA, Pavel et al., 2022. Biofilm Formation Reduction by Eugenol and Thymol on Biodegradable Food Packaging Material. *Foods* [online]. **11**(1) [cit. 2023-03-28]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11010002

POSPÍŠILOVÁ, Marta. Význam a použití bakteriocinů. *Internetový portál bezpečnosti potravin* [online]. 9.12.2007 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu.aspx

RAMOS, Alberto N. et al., 2014. Compounds from Lactobacillus plantarum culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharmaceutical Biology* [online]. **53**(3), 350-358 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1388-0209. Dostupné z: doi:10.3109/13880209.2014.920037

RASOOLY, Reuven et al., 2022. The Effect of Tannin-Rich Witch Hazel on Growth of Probiotic Lactobacillus plantarum. *Antibiotics* [online]. **11**(3) [cit. 2023-04-12]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11030395

RYBALCHENKO, Oxana V. et al., 2015. Inhibitory effects of Lactobacillus fermentum on microbial growth and biofilm formation. *Archives of Microbiology* [online]. **197**(8), 1027-1032 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-015-1140-1

RYU, Eun-Ju et al., 2016. D-Galactose as an autoinducer 2 inhibitor to control the biofilm formation of periodontopathogens. *Journal of Microbiology* [online]. **54**(9), 632-637 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1225-8873. Dostupné z: doi:10.1007/s12275-016-6345-8

SALAS-JARA, María et al., 2016. Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* [online]. **4**(3) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms4030035

SHANGGUAN, W. et al., 2021. Anti-biofilm potential of kefir-derived Lactobacillus paracasei L10 against Vibrio parahaemolyticus. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **73**(6), 750-758 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1111/lam.13568

SHOKOUHFARD, Maliheh et al., 2022. Lactobacillus spp. derived biosurfactants effect on expression of genes involved in Proteus mirabilis biofilm formation. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. **100** [cit. 2023-04-12]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi: 10.1016/j.meegid.2022.105264

SLÍŽOVÁ, Magdaléna et al., 2015. Analysis of biofilm formation by intestinal lactobacilli. *Canadian journal of Microbiology* [online]. [cit. 2023-02-16]. Dostupné z: https://cdnsciencepub.com/doi/10.1139/cjm-2015-0007

STURME, Mark H. J. et al., 2007. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on Lactobacillus plantarum WCFS1. *Microbiology* [online]. **153**(12), 3939-3947 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.2007/012831-0

SUBHADRA, Bindu et al., 2018. Control of Biofilm Formation in Healthcare: Recent Advances Exploiting Quorum-Sensing Interference Strategies and Multidrug Efflux Pump Inhibitors. *Materials* [online]. **11**(9) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma11091676

SURETTE, Michael G. a Bonnie L. BASSLER, 1998. Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **95**(12), 7046-7050 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.12.7046

TAGA, Michiko E., 2006. Methods for Analysis of Bacterial Autoinducer-2 Production. *Current Protocols in Microbiology* [online]. **00**(1) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1934-8525. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mc01c01s00

TERRAF, M.C. Leccese et al., 2012. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **113**(6), 1517-1529 [cit. 2023-04-01]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x

THURNHEER, T., R. GMÜR a B. GUGGENHEIM, 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **56**(1), 37-47 [cit. 2023-03-28]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi :10.1016/j.mimet.2003.09.003

WALENCKA, E. et al., 2008. The influence of Lactobacillus acidophilus-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiologica* [online]. **53**(1), 61-66 [cit. 2023-04-12]. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-008-0009-y

WANG, Yang et al., 2019. Regulatory Mechanisms of the LuxS/AI-2 System and Bacterial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **63**(10), e01186-19 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01186-19

WEN, Zezhang T. et al., 2017. Streptococcus mutans Displays Altered Stress Responses While Enhancing Biofilm Formation by Lactobacillus casei in Mixed-Species Consortium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **7** [cit. 2023-04-25]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00524

WU, Jiayi et al., 2022. Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation by the Joint Action of Oxyresveratrol and Lactobacillus casei. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **88**(9), e02436-21 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.02436-21

YAO, Caiqing et al., 2022. The symbiosis among, and the storage stabilities of, starter lactic acid bacterial strains in biofilms. *LWT* [online]. **155** [cit. 2023-04-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi: 10.1016/j.lwt.2021.112896

YUNDA, Elena a Fabienne QUILÈS, 2019. In situ spectroscopic analysis of Lactobacillus rhamnosus GG flow on an abiotic surface reveals a role for nutrients in biofilm development. *Biofouling* [online]. **35**(5), 494-507 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0892-7014. Dostupné z: doi:10.1080/08927014.2019.1617279

ZHANG, Yue et al., 2022. Deletion of luxS gene mediated by λRed gene recombination technology reduces biofilm formation and stress resistance of Lactobacillus fermentum. *Food Bioscience* [online]. **49** [cit. 2023-04-13]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fbio.2022.101892

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

QS Quorum sensing

QQ Quorum quenching

LAB Lactic acid bacteria (Bakterie mléčného kvašení)

AIP Autoinduktor peptid

TCS Two component systém (Dvojsložkový systém)

HK Histidin kináza

RR Transkripční regulátor

MTT Tetrazoliové barvivo (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)

OD Optická denzita

ODH Hraniční hodnota optické denzity

ODnc Optická denzita negativní kontroly

MRS De Man Rogosa, Rogosa a Sharp agar

mTSB Tryptic Soy broth

EPS Extracellular polymeric systém (Extracelulární polymerní látky)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tvorba biofilmu upraveno dle Lewandowski

Obrázek 2: Quorum sensing u grampozitivních bakterií upraveno dle (Kareb 2020)

Obrázek 3: Quorum sensing u gramnegativních bakterií upraveno dle (Kareb et al., 2020)

Obrázek 4: a) Graf závislosti hustoty bakterií a zapínání quorum sensing systému.

b) Hlavní signální molekuly u grampozitivních a gramnegativních bakterií upraveno dle (Kareb et al., 2020)

Obrázek 5: Schéma Quorum sensing SHP-Rgg u *Streptococcus termophilus* upraveno dle (Kareb et al., 2020)

Obrázek 6: Mechanismus blokování quorum sensing u grampozitivních a gramnegativních bakterií upraveno dle (Paluch et al., 2020)

Obrázek 7: Snímek CSLM pomocí FISH, fluorescenčně značené sondy u 3 různých bakterií ve smíšeném orálním biofilmu upraveno dle (Thurnheer at al., 2004)

Obrázek 8: Růstová křivka a tvorba biofilmu vybraných kmenů bakterií *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 767, *Lactobacillus casei* CCDM 145, 422 a 650, *Lactobacillus casei subsp. casei* CCDM 198.

Obrázek 9: Růstová křivka a tvorba biofilmu vybraných kmenů bakterií *Lactobacillus casei casei* CCDM 199, CCDM 802, *Lactobacillus fermentum* CCDM 154, *Lactobacillus delbrueckkii bulgaricus* CCDM 792 a *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828

Obrázek 10**:** Růstová křivka a tvorba biofilmu vybraných kmenů *Lactobacillus paracasei a plantarum* CCDM 888, CCDM 832, CCDM 741, CCDM 792, CCDM 147

Obrázek 11**:** Růstová křivka a tvorba biofilmu vybraných kmenů *Lactobacillus plantarum* CCDM 178, CCDM 181, CCDM 182, CCDM 183, CCDM 184 a CCDM 185

Obrázek 12: Růstová křivka a tvorba biofilmu vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacillus plantarum* CCDM 186, CCDM 187, CCDM 188, CCDM 189, CCDM 191

Obrázek 13 Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 194, CCDM 196, CCDM 336, CCDM 375, CCDM 381

Obrázek 14: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 383, CCDM 388, CCDM 384, CCDM 391, CCDM 385

Obrázek 15: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus plantarum* CCDM 535, CCDM 387, CCDM 583, CCDM 821, CCDM 195

Obrázek 16: Růstová křivka a tvorba biofilmu (sloupcový graf) vybraných kmenů laktobacilů *Lactobacilus rhamnosus* CCDM 963 A, *Lactobacillus sakei subsp. sakei* CCDM 339, *Lactobacillus sakei subsp. carnosus* CCDM 776, *Lactobacillus sakei subsp. sakei* CCDM 717

Tabulka 1: Srovnání výsledků schopnosti tvorby biofilmu jednotlivých testovaných laktobacilů