

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Nováková

Studium tvorby biofilmu u bakteriálních izolátů z mléka a mlékárenských výrobků
Study of biofilm formation of bacterial isolates from milk and dairy products

Bakalářská práce

Školitel: prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc., DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce, prof. Ing. Kateřině Demnerové, CSc., DrSc. za trpělivost a cenné odborné rady. Dále bych ráda poděkovala za konzultace Ing. Sabině Purkrtové, Ph.D. a v neposlední řadě i svým přátelům a rodině za podporu.

Abstrakt: Bakteriální biofilm je uspořádané společenství mikrobiálních buněk uzavřené v extracelulární matrix, přičemž charakteristickým rysem biofilmu je schopnost přichycovat se na abiotické nebo biotické povrchy. Tvorba biofilmu je dynamický regulovaný proces, při kterém jednotlivé bakterie vytváří mnohobuněčný útvar. Počáteční fáze kontaktu bakterie s povrchem se nazývá adheze. Po té následuje produkce extracelulární matrix, která určuje životní podmínky buněk biofilmu. Biofilmy se vyznačují velmi vysokou schopností rezistence proti antimikrobiálním látkám. Rezistence zahrnuje fyzické a chemické bariéry, které efektivně brání difúzi a následné penetraci do biofilmu. Problematika biofilmů zasahuje potravinářský průmysl, kde mohou biofilmy být zdrojem kontaminací. Důkladné porozumění vzájemného působení mikroorganismů a materiálů, které se používají při konstrukci povrchů ve výrobních zařízeních potravinářství, je zcela zásadní pro vývoj kontrolních systémů tvorby biofilmu

Klíčová slova: biofilm, mléko a mléčné produkty, mlékárenský průmysl, dezinfekční činidla, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*

Abstract: Bacterial biofilm is a complex community of microbial cells, which are embed into the extracellular polysaccharide matrix. Typical ability of the biofilm is the ability to adhere to either abiotic, or biotic surfaces. The formation of biofilm is a dynamic process, which finally formes a 3D multicellular complex. The initial phase is called the adhesion. After that process is done, the extracellular polymeric matrix is produced to create living conditions of bacteria in biofilm. Biofilm has high level of antimicrobial resistance. This resistance consists of physical and chemical barriers, which effectively block diffusion and penetration of antimicrobial substances inside the biofilm. Biofilms cause problems in food industry, where it could be origin of food contaminations. Therefore it is necessary to understand the relationship between microorganisms and materials used in food industry.

Key words: biofilm, milk and dairy products, milk and dairy industry, disinfectant, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*

Obsah

1. Úvod	1
2. Bakteriální biofilmy	2
2.1. Stručná historie studia biofilmu	2
2.2. Definice biofilmu	3
3. Vznik a tvorba biofilmu	4
3.1. Adheze a tvorba jednovrstevného biofilmu	5
3.2. Tvorba extracelulární matrix	7
3.3. Vícevrstevnatý biofilm a maturace	8
3.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti biofilmu	9
4. Regulace tvorby biofilmu	10
4.1. Mezibuněčná komunikace v biofilmu.....	10
4.2. Rezistence proti dezinfekčním prostředkům, antibiotikům a stresu	10
5. Metody detekce biofilmu	14
6. Mikroflóra mléka	15
6.1. <i>Escherichia coli</i>	16
6.2. rod <i>Staphylococcus</i>	16
7. Biofilm v potravinářském průmyslu	17
7.1. Výskyt a problematika v potravinářském průmyslu	17
7.2. Kontrola tvorby biofilmu v potravinářském průmyslu	17
7.3. Metody odstranění biofilmu v potravinářských provozech, především mlékárenských prostorách	18
8. Závěr	20
Literatura	21

1. Úvod

Biofilmy jsou komplexní společenstva mikroorganismů, která jsou obklopena extracelulární matrix a vytváří tak jedinečný mikroekosystém. Vyskytují se na mnoha odlišných místech. Jsou schopny osídlit jak lidské tělo, kde mohou způsobovat rozsáhlé infekce, také různé průmyslové prostory. Například v případě potravinářského průmyslu je pojem biofilm často spojován s kontaminací produktů. Pro lepší pochopení struktury biofilmu je nezbytné studium jeho vývoje a specifických vlastností, z nichž je největší pozornost věnovaná rezistenci proti antimikrobiálním látkám.

Cílem této práce je shrnutí charakteristiky biofilmu a jeho problematiky v potravinářském průmyslu, především v mlékárenských prostorech. Na začátku se lze seznámit s historickými milníky, následuje definice biofilmu, jeho vývoj a vlastnosti. Postupně se zaměřím na důsledky tvorby biofilmu v potravinářství a způsoby řešení jeho výskytu v praxi. Metody detekce biofilmu uvádí samostatná kapitola. Zvláštní pozornost je věnována mléčné mikroflóře a problematice biofilmu v mlékárenských prostorech. Jsou představeny speciální průmyslové dezinfekční metody a jejich reálné využití. Mezi nejvíce studované mikroorganismy v souvislosti s biofilmy patří bakterie rodu *Staphylococcus* a druh *Escherichia coli*, proto jim je v této práci věnována bližší pozornost.

2. Bakteriální biofilmy

2.1. Stručná historie studia biofilmu

Dlouhou dobu se myslelo, že mikroorganismy se vyskytují především ve formě volně rostoucích, na sobě nezávislých buněk - označovaných jako buňky planktonické. Tato představa vznikla na základě charakteristiky růstu bakteriální kultury v médiu bohatém na živiny. První, kdo tuto teorii vyvrátil, byl Anthony van Leewenhoek na přelomu 17. a 18. století, který pozoroval schopnost mikroorganismů přichytit se a růst na nechráněném povrchu. Své pozorování provedl za pomoci jednoduchého vlastnoručně sestrojeného mikroskopu a jako vzorek použil svůj zubní plak. Zubní plak je dnes jednou z nejvíce prostudovaných forem biofilmu (Dufour *et al.*, 2011).

Ve 20. století bylo odhaleno, že mikroorganismy ulpívající na různém povrchu ve formě biofilmu se vyznačují jiným fenotypem než planktonické buňky s ohledem na transkripci jednotlivých genů a rychlost růstu. Ukázalo se, že díky pochopení specifických mechanismů přichycení k povrchu a následného vývoje mikroekosystému lze proniknout do studia biofilmu (Dolan, 2002).

Více než dvě stě let po van Leewehoekovi pozoroval americký bakteriolog Arthur Henrici růst řas na stěně akvária a rozhodl se provést experiment. Do akvária umístil několik podložních sklíček a předpokládal, že bude moci pozorovat růst řas a mít tak stále k dispozici preparáty k pozorování mikroorganismů *in situ*. Proto byl velmi překvapen, když na podložním sklíčku kromě řas mohl pozorovat i slabý souvislý bakteriální plak, jehož bakterie se vyznačovaly různými tvary a v některých případech také neobvyklou morfologií. Henrici v roce 1933 prohlásil: „Je vcelku zřejmé, že značná část vodních bakterií nejsou volně se vznášející mikroorganismy, ale že se jedná o mikroorganismy upřednostňující růst na povrchu skrytém pod vodou.“ O několik let později přišli s novým objevem vědci Heukelekin a Heller, jejich specializací byla mikrobiologie odpadních vod. Na základě svého pozorování došli k závěru, že tato schopnost umožňuje bakteriím po přichycení další vývin i na substrátech, které jinak růst neumožňují. Při kultivaci docházelo jak k dalšímu vývoji bakteriálních kolonií přichycených k povrchu, tak k nárůstu objemu mezibuněčné hmoty (Dufour *et al.*, 2011).

Dalším významným mikrobiologem, který přispěl ke studiu biofilmů, byl Claude Zobell, významný průkopník ekologie mikroorganismů. Mikrobiolog Zobell zjistil, že pokud se mořská voda nachází ve skleněných sterilních nádobách, tak se více bakterií vyskytuje na

skleněném povrchu než v samotné vodě, čímž zdůraznil přisedlý způsob růstu u bakterií (Dufour *et al.*, 2011).

Existence biofilmů byla potvrzena i díky fosilním nálezům z období před 3,3 – 3,4 miliardy let v Jižní Africe a z Austrálie, kde byly objeveny fosilie vláknitého biofilmu. V obou případech se jednalo o nálezy v oblastech s vysokou hydrotermální aktivitou. Obdobné biofilmy můžeme v těchto oblastech najít i v současné době, zejména pak v blízkosti horkých pramenů a mořských prúdů (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Z toho lze usoudit, že jsou biofilmy velmi odolné i vůči extrémním podmínkám.

2.2. Definice biofilmu

Laicky si lze pod pojmem biofilm představit např. kluzkou hmotu, která pokrývá kameny v potoce nebo řece. Jedná se o příklad vodního biofilmu, který je tvořen bakteriemi, houbami, sinicemi a řasami (Harrison *et al.*, 2005).

Biofilmy jsou komplexní společenstva mikroorganismů, která vznikají na rozmanitých živých i neživých površích v různých životních prostředích. Mohou kontaminovat průmyslová potrubí, klimatizace, rozvod vody, stomatologické soupravy, katetry, kanily, ventilátory a lékařské implantáty. Mohou být také zdrojem infekcí, kdy následně dochází k uvolňování buněk znovu do prostředí, kde následně způsobují různá onemocnění člověka, živočichů i rostlin (Hall-Stoodley a Stoodley, 2002; Stooley *et al.*, 2002). Stejným způsobem pak může docházet ke kontaminaci v potravinářských provozech z biofilmu, který se vytváří v obtížně čistitelných místech.

Biofilmy jsou studovány u mnoha druhů mikroorganismů, napříč fylogenetickým spektrem. Stále více se rozšiřuje přesvědčení, že mikroorganismy mají schopnost osidlovat a přetvářet ekologické niky právě prostřednictvím biofilmů (Hall-Stoodley a Stoodley, 2002; Stooley *et al.*, 2002). Studium biofilmů vyžaduje stále nové metodické postupy. Mnohé z nedávných pokroků jsou výsledkem spolupráce mezi mikrobiálními ekology, environmentálními inženýry a matematiky. Tato spolupráce vedla ke vzniku současné definice - bakteriální biofilm je uspořádané společenství mikrobiálních buněk uzavřené v extracelulární matrix, přičemž charakteristickým rysem biofilmu je schopnost přichycovat se na abiotické nebo biotické povrchy (Costerton *et al.*, 1999).

Biofilm jako vysoce komplexní struktura představuje určitý stupeň diferenciací, což vyžaduje důmyslný systém mezibuněčné komunikace a určitou míru buněčné specializace (Stooley *et al.*, 2002). Podle jedné z hypotéz biofilm patří k nejpůvodnějším strategiím adaptace prokaryot. Avšak důsledky tendence bakterií přichycovat se k povrchu jsou zřejmější až

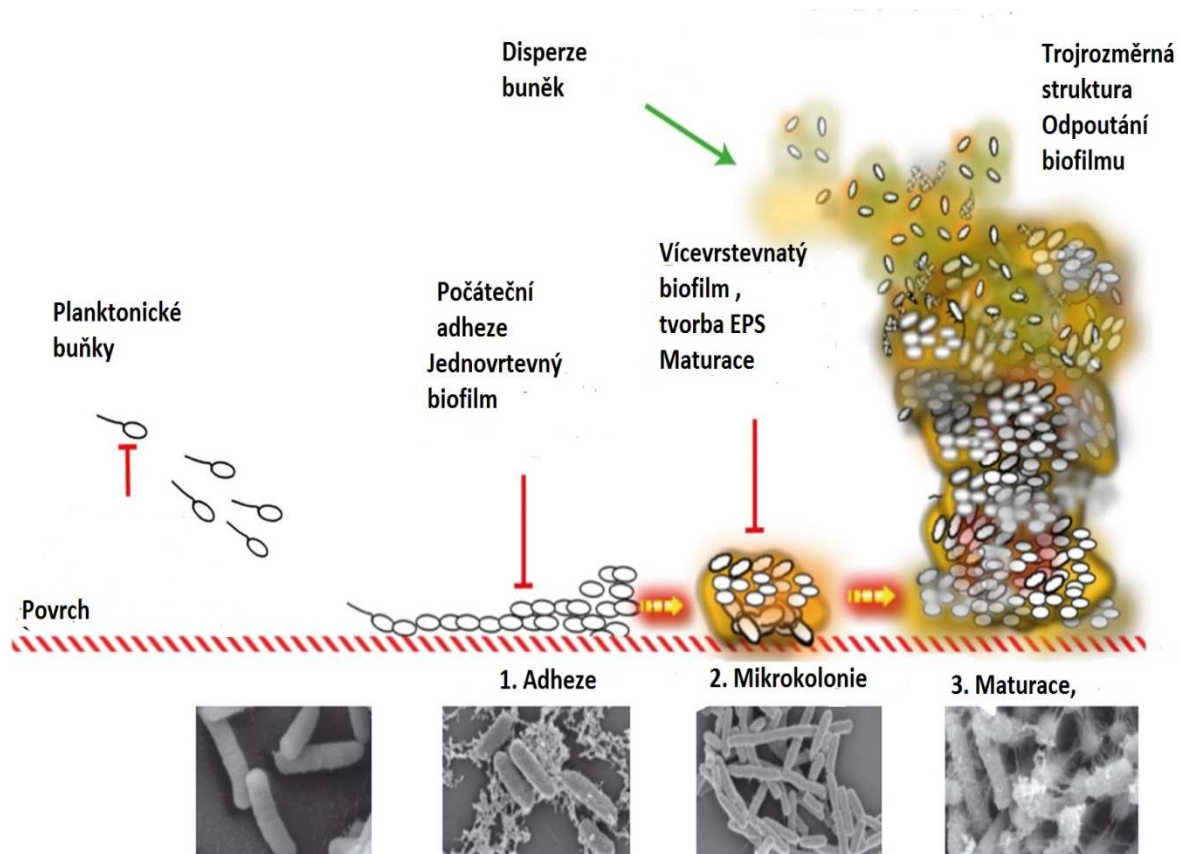
v současné době, a to především díky neustálému technickému pokroku (Hall-Stooley *et al.*, 2004).

3. Vznik a tvorba biofilmu

Klíčovou otázkou je, jaké výhody přináší koexistence bakterií v biofilmu a jakou roli hraje povrch, se kterým interagují. K tomuto tématu bylo vysloveno několik hypotéz. Na základě jedné z nich povrch poskytuje místo k osídlení, do jisté míry stabilní prostředí pro růst, a navíc může mít i katalytickou funkci, což platí v případě bakterií, které jsou s ním v těsném kontaktu. Podle jiného názoru biofilm chrání bakterie před spoustou nežádoucích podmínek prostředí jako je UV záření, přítomnost toxických kovů, velmi nízké pH, dehydratace, salinita, nebezpečí fagocytózy a v neposlední řadě i proti některým antibiotikům a antibakteriálním prostředkům (Hall-Stooley *et al.*, 2004).

Většina bakterií má schopnost přichycovat se k povrchu, pohybovat se ve směru gradientu živin v jejich nejbližším okolí a také schopnost rychle využít dostupné zdroje, což může urychlit následný růst populace. Přichycení k povrchu je důležité pro počáteční kolonizaci prostředí. Schopnost rychle využít dostupné živiny hraje klíčovou úlohu v uspořádaném růstu bakteriální biomasy (Tolker-Nielsen a Molin 2000). Tvorba biofilmu je dynamický regulovaný proces, při kterém jednotlivé bakterie vytváří mnohobuněčný útvar. Na základě mnoha rozsáhlých studií byl vytvořen model tvorby biofilmu. Tento model je možné využívat pro různé bakteriální druhy, navíc je možné s ním pracovat ve dvou různých případech, jak v případě pohyblivých, tak i nepohyblivých bakterií (Lemon *et al.*, 2008). Tvorbu biofilmu je možné rozdělit na pět fází, viz obr. 1:

- 1) Počáteční přichycení bakterie k povrchu – adheze
- 2) Tvorba jednovrstevného biofilmu
- 3) Migrace bakterií s cílem vytvoření vícevrstevného biofilmu
- 4) Produkce extracelulární matrix (EPS)
- 5) Maturace biofilmu, vyznačující se trojrozměrnou strukturou



Obr. 1 Tvorba biofilmu

3.1. Adheze a tvorba jednovrstevného biofilmu

Počáteční fáze kontaktu bakterie s povrchem se nazývá adsorpce neboli adheze. V závislosti na pohyblivosti bakterie může být aktivní či pasivní. Při pasivní adhezi se bakterie pohybuje k cílovému místu díky gravitaci, difúzi nebo dynamickému proudění. K aktivní adhezi dochází prostřednictvím flagella, pili a adhesinu (Kumar a Anand 1998). Tento proces trvá 5 až 10 s (Mitelman 1998).

Nejříve dochází k adheze reverzibilní a ta se následně stává ireverzibilní. Reverzibilní adheze je slabá interakce mezi bakterií a povrchem, i přes vliv Van der Waalsových sil, elektrostatické adheze a hydrofobních sil je stále možné pozorovat Brownův pohyb, dokonce je ještě možné bakterie snadno odstranit z povrchu. Avšak při ireverzibilní adhezi už k Brownově pohybu nedochází, bakterie i povrch musí být hydrofobní. V tomto případě již není možné snadné odstranění z povrchu (Marshall *et al.*, 1971; Loosdrecht *et al.*, 1989). Bakterie i substrát, ke kterému adherují, mají obvykle záporný náboj, tak dochází ke vzniku repulzní síly, která roste se zkracující se vzdáleností. Vazbu mezi substrátem a bakterií tvoří

vodíkové můstky, interakce dipólů, iontová vazba a je zde i vliv hydrofobních sil (Hory a Matsumoto 2010). Ireverzibilní adheze trvá od 20min do 4h a to v závislosti na teplotě (Chmielewski a Frank, 2003).

Během celého procesu nelze opominout významnou roli chemických a fyzikálních vlastností bakterií i povrchu. V případě povrchu záleží na jeho volné energii, změně hydrofobních vlastností, elektrostatickém náboji a podmínkách proudění (McLamborough *et al.*, 2006). Ukazalo se, že adheze se zvyšuje s rostoucím záporným nábojem a vyšší hydrofobicitou povrchu (Dickson a Koohmaraie, 1989). K jejímu zesílení dochází také díky laminárnímu i turbuletnímu proudění, protože jsou tak bakterie transportovány blíže k povrchu (Rijnaarts *et al.*, 1993). Samotnou kategorií hodnocení povrchů je typ materiálu a jeho struktura. Bylo zjištěno, že různé nerovnosti, trhliny, zlomy, zákruty, ventily, těsnění a rohy vytvářejí ideální prostor pro tvorbu biofilmu, protože jsou tak špatně přístupné při čištění (Marchand *et al.*, 2012; Chmielewski a Frank 2003).

Adheze bakterií plynule přechází k tvorbě jednovrstevného biofilmu. Bakterie se začínají dělit a spouští mezibuněčnou signalizaci, která vyústí v produkci extracelulární matrix, ta biofilm upevňuje k povrchu a vytváří ochrannou vrstvu. Postupně se snižuje pohyblivost buněk a vznikají mikrokolonie (Brooks 2009; Costerson *et al.*, 1999).

Při studiu počáteční fáze tvorby biofilmu u *E. coli* bylo zjištěno, že vývoj biofilmu je rychlejší při snížené dostupnosti živin. Experiment byl prováděn na nerez oceli, avšak výsledky mohly být ovlivněny přenosem z kutlivačného media (Dewanti a Wong 1994). Významnou roli při adhezi mají pili typu 1 a P, jež z většiny tvoří protein pilin. Tyto pili jsou důležitým virulentním faktorem patogenů, mimo jiné stojí za zmínku jejich podíl na šhubavém pohybu bakterií (Hori a Matsumoto 2010).

S. epidemis při své počáteční adhezi využívá tvorby extracelulární matrix, kde jsou převládajícími složkami fibrinogen a fibronektin. Následně se adhezi k povrchu podílí hlavně mezibuněčný polysacharidický adhezín (PIA), který má také nezastoupitelnou funkci při tvorbě vícevrstevného biofilmu (Hori a Matsumoto 2010).

3.2. Tvorba extracelulární matrix

Extracelulární matrix neboli extracelulární polymerní substance (EPS) určuje životní podmínky buněk biofilmu, protože ovlivňuje pórovitost, hustotu, obsah vody, schopnost absorpce náboj, hydrofobní vlastnosti a mechanickou odolnost. EPS se skládá z polysacharidů, proteinů, glykoproteinů, glykolipidů, extracelulární DNA (e-DNA) a dalších složek, viz Tab. 1. Celý komplex EPS je vysoce hydratovaný, čímž se vytváří matrix, která drží buňky biofilmu pohromadě a zároveň zadržuje vodu. Díky EPS vzniká ideální prostředí pro horizontální genový transport, protože se buňky nacházejí velmi blízko sebe (Fleming *et al.*, 2007). Vlastnosti EPS záleží na druhu mikroorganismu, stáří biofilmu a podmínkách okolního prostředí, konkrétně se jedná o teplotu, pH, rychlost vysychání, dostupnost živin a koncentraci kyslíku a dusíku (Vu *et al.*, 2009). Polysacharidy EPS se mohou lišit ve své funkci, v případě patogenů mohou být složkou EPS i některé bakteriální virulentní faktory (van Kraneburg *et al.*, 1999). Klíčový je pro syntézu EPS uhlík. Jeho nadbytek spolu s dostupností dusíku, draslíku a fosfátů výrazně podporuje produkci EPS. Dalo by se očekávat, že syntéza EPS klésá spolu s růstem bakterií, avšak je tomu naopak. V případě *E. coli* vystavené stresujícím podmínkám, došlo ke zvýšení tvorby EPS (Sutherland 2001).

Při bližším pohledu na chemickou strukturu EPS jsou určujícím vlastnostmi především molekulární hmotnost a tuhost polymerů, dále přítomnost postranních řetězců a substituentů. Jako příklad organických skupin lze uvést acetyl, pyruvyl a sukcinyl, z anorganických skupin jsou často zastoupeny sulfátová nebo fosfátová skupina. Polysacharidy, převažující složka EPS, vznikají polymerací oligosacharidových jednotek. Biosyntéza polysacharidu vyžaduje glykosyltransferázu, která spojuje monomery sacharidů, odtržených z nukleotidů, s lipidickým nosičem (van Kraneburg *et al.*, 1999).

Jedním z hlavních biopolymerů EPS je cellulóza, její syntéza byla zaznamenána u *E. coli*. Bylo zjištěno, že soubežně se syntézou cellulózy dochází k expresi slabých fimbrií, které se podílejí na agregaci buněk při tvorbě biofilmu. Cellulóza spolu s fimbriemi vytváří vysoce hydrofobní strukturu, kde jsou buňky pevně drženy (Zogaj *et al.*, 2001). Dalším příkladem významného biopolymeru EPS je mezibunečný polysacharidový adhesin (PIA - polysaccharide intercellular adhesin). PIA je produkován např. *E. coli*, *S. aureus* a *S. epidermis*. Do stejné skupiny bipolymerů jako PIA patří i poly-N-acetyl-glukosamin (PNAG). PIA a PNAG jsou nezbytné pro tvorbu biofilmu u *E. coli* a rodu *Staphylococcus*. Při studiu syntézy jednotlivých biopolymerů se zjistilo, že existuje více variant syntézy a to v závislosti na podmínkách prostředí, což se projevuje rozdílnou expresí extracelulární proteinů. Jako příklad lze uvést expresi konjugativních pílí u *E. coli*. Tyto pílí značně urychlí počáteční

adhezi a následně i vývoj biofilmu, to vše je zprostředkováno nespecifickým mezibuněčným kontaktem planktonických buněk a kontaktem mezi buňkou a povrchem. Jiným příkladem je enteroagregativní *E. coli* (EAEC), která vytváří biofilmy na skle a plastech. EAEC, při vysoké osmolalitě a vyšší koncentraci glukózy v růstovém médiu, potřebuje pro svou adhezi pouze adhezivní fimbrie, z čehož vyplývá, že je její adheze možná bez jinak nezbytných pili typu 1 a schopnosti pohybovat se. Existují také příklady situací, kdy stejné složky EPS mají různou funkci v odlišných podmínkách (Branda *et al.*, 2005).

Tab.1 Funkce složek EPS (podle Fleming *et al.* 2007)

Složka EPS	Funkce	Význam v biofilmu
Neutrální polysacharidy a amyloidy	stavební	Stavební látky
Nabité nebo hydrofobní polysacharidy	absorpční	Výměna iontů, absorpce
Extracelulární enzymy	Enzymová aktivita	Degradace polymerů
Amfifilní membránové vezikuly	Povrchová aktivita	Export,
Lektiny a nukleové kyseliny	informační	Specifická, rozpoznání genetické informace, struktura
Další pomery	výživová	Zdroje C, N, P

3.3 Vícevrstevnatý biofilm a maturace

Maturace biofilmu nastává za vhodných podmínek, které umožňují dostatečný růst a seskupení buněk, výsledkem tohoto procesu je organizovaná struktura. Buď se může jednat pouze o jednu vrstvu buněk, jež jsou součástí pórovité EPS, nebo vzniká mnohvrstevnatá struktura, jejíž mikrokolonie pohromadě drží EPS a různě rozložené vodní kanálky (Chmielewski a Frank, 2003). V případě mnohvrstevnaté struktury lze pozorovat trojrozměrný útvar připomínající houbu nebo květ tulipánu s podstavci, věžemi a vodními kanály (Aparna *et al.*, 2008; Chmielewski a Frank, 2003).

Za začátek maturace lze považovat moment, kdy biofilm dosahuje tloušťky asi 10 μm . Postupně se stále zvyšující produkcí EPS a buněčným dělením může dosáhnout až tloušťky

100 nm. Několik dní po ukončení maturace dochází k vycestování některých buněk z biofilmu. Pro tyto bakterie je charakteristický fenotyp planktonní buňky (Aparna *et al.*, 2008). Tím se celý proces zacyklí a tvorba biofilmu může vypuknout na dalším vhodném povrchu

3.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti biofilmu

Fyzikálně-chemické vlastnosti biofilmu spolu s vlastnostmi povrchu tvoří souhrn faktorů ovlivňujících adhezi, viz kap. 2.1. Struktura biofilmu je značně ovlivněna pH, teplotou, přítomností solí, prouděním (Marchald *et al.* 2012). Studie difúze plynů a kapalin v biofilmu odhalila fakt, že bakterie biofilmu mají nižší příjem kyslíku a živin, než buňky v suspenzi. Tato skutečnost však napomáhá bakteriím přežít a růst v rozmanitých podmínkách včetně toxického prostředí, kde se tak projevuje jejich zvýšená rezistence oproti planktonické formě (McLandsborough *et al.*, 2006).

Bakteriální povrch je velmi komplexní a obsahuje mnoho molekul, jež se vyznačují proměnlivostí svého elektrického náboje a změnou hydrofobních vlastností nejen mezi druhy, ale i v rámci jednoho druhu. Z čehož vyplývá, že jeden kmen může mít afinitu k řadě typů povrchů, které se kromě výšše zmíněných rozdílů liší především povrchovou energií. Vzniká tak otázka do jaké míry je možné vytvářet modelové situace, které by následně bylo možné aplikovat ve specifických fyzicko-chemikálních podmínkách daného povrchu a biofilmu (McLandsborough *et al.*, 2006).

Podle výzkumného týmu vedeného S. Cappelom, v roce 2006, je jedním ze zásadních abiotických faktorů teplota. Při pokusu s *Pseudomonas aeruginosa* se zjistilo, že její schopnost adheze a nepřímo i hydrofobicita buňky závisí právě na teplotě. Ukázalo se, že nejvíce se vliv teploty projevil během prvních 24 hodin, vzhledem k tomu se nejspíš jednalo o stresovou reakci.

4. Regulace tvorby biofilmu

4.1. Mezibuněčná komunikace v biofilmu

Bakteriální společenstva biofilmů tvoří jedinečný ekosystém, kde je nezbytná mezibuněčná komunikace, ať už se zaměříme na biofilmy obsahující jeden či více bakteriálních druhů. Vzhledem k hustotě populace biofilmu je zřejmé, že zde dochází ke vzniku a následně ke kumulaci sekundárních metabolitů, vedlejších metabolických produktů, sekrečních a exkrečních látek. Speciální skupinou metabolitů jsou autoinduktory, které zprostředkovávají tzv. *quorum sensing* (QS) (Parsek a Greenberg 2004; Redfield 2002).

QS je způsob mezibuněčné komunikace. První zmínka o QS byla zaznamenána v souvislosti s výzkumem bioluminiscence mořské bakterie *Vibrio fischeri* (Miller 2001). Autoinduktory mohou být peptidy (charakteristické pro grampozitivní bakterie), nebo acyl-homoserin (charakteristický pro gramnegativní bakterie), dále laktony (AHL) a borové deriváty ribózy.

Princip QS spočívá ve schopnosti bakterií v nejbližším okolí vzájemně registrovat svou přítomnost. Pokud koncentrace autoinduktorů přesáhne určitou hranici, spouští se genová exprese, která obvykle vyvolá produkci dalších extracelulárních metabolitů. Těmito metabolity mohou být např. proteázy, antibiotika, toxiny a pigmenty. Koncentrace autoinduktorů závisí na míře jejich produkce, který je úměrná hustotě populace. V případě biofilm tvořících bakterií se QS značně podílí jak na vývoji, tak i na rozrušování biofilmu (Parsek a Greenberg 2004; Redfield 2002).

Biofilmy v přirozeném prostředí obsahují většinou více bakteriálních kmenů, což se projevuje i v průběhu QS, protože autoinduktor jednoho kmene může zvyšovat např. jen svůj růst na úkor kmene cizího. Naopak v jiných případech dochází ke koordinaci všech bakterií. Je zřejmé, že mezi jednotlivými kmeny vznikají komplikované vztahy. Vzhledem k vlastnostem biofilmu lze usuzovat, že převládá mutualismus, komensalismus a synergismus (Nadell *et al.* 2008)

4.2. Rezistence proti dezinfekčním prostředkům, antibiotikům a stresu

Studie porovnávající patogeny v planktonické formě a formě biofilmu jasně ukazují, že biofilm výrazně zvyšuje rezistenci proti nízkému pH, přítomnosti solí a antimikrobiálních látek (ATM). Zároveň usnadňuje přežití při nedostatečném či hraničním přísunu živin (McLandsborough *et al.* 2006). Jako příklad lze uvést odolnost proti ATM, kde biofilm dosáhl deseti až sto násobku odolnosti planktonické formy (Mah a O'Toole 2001).

Rezistence zahrnuje fyzické a chemické bariéry, které efektivně brání difúzi a následné penetraci do biofilmu. Sníží-li se přísun živin, zpomalí se růst a aktivuje se stresová reakce. EPS vytváří fyzickou i chemickou bariéru zároveň, ta je v některých případech dostačující, avšak ne vždy zajišťuje zcela neproniknutelnou ochranu před difúzí. Z toho důvodu se na rezistenci musí podílet další mechanismy (Mah a O'Toole 2001). Význam EPS dokazuje i fakt, že syntéza EPS si při stresové odpovědi zvyšuje (Sutherland 2001).

Základní reakcí na stres je zpomalení růstu některých buněk biofilmu, což dokazují mnohé fyziologické změny, jejichž cílem je ochrana buněk např. před důsledky tepelného šoku, snížením teploty, změn pH a dalších výkyvů prostředí. Celý proces je řízen centrálním regulátorem. Přestože není ještě jasná funkce QS v mechanismech rezistence, bylo zjištěno, že mutanty s defektním QS, nevykazují očekávanou rezistenci proti antibiotikům a detergentům (Mah a O'Toole, 2001).

Pod pojmem antimikrobiální látky (AML) si lze představit např. antibiotika (ATB), ale i další látky. Na základě chemické povahy se AML dělí na: β -laktany, tetracykliny, chloramfenikoly, aminoglykosidy, makrolidy, ozalidy, linkosamidy, polypeptidy, glykopeptidy, chinoliny, fluorochinoliny, antituberkulotika, chemoterapeutika a antimykotika. Dále se rozlišují bakterostatické a bakterocidní látky. Bakterostatické látky blokují bakteriální růst, tedy dělení, účinkují až po několika dnech. Bakterocidní látky způsobují téměř okamžitou smrt bakterie. Bakterocidní a bakterostatické látky lze následně rozdělit podle mechanismu účinku na: inhibitory syntézy bakteriální stěny, inhibitory funkce cytoplazmatické membrány, inhibitory syntézy nukleových kyselin, inhibitory funkce ribozomů a inhibitory metabolismu esenciálních metabolitů (Julák *et al.*, 2006).

Většina ATB je produktem mikroorganismů. Za nejznámější ATB lze považovat penicillin, což je produkt *Penicilium chrysogenum*. Penicilin v široké míře působí proti grampozitivním bakteriím. Principem funkce ATB je cílená reakce v určitém místě buňky. Naopak další AML látky se vyznačují tím, že mohou působit na různé části buňky. AML jsou organické či anorganické chemikálie, obecně je lze charakterizovat jako toxické pro mikroorganismy, patří mezi ně dezinfekce, antiseptika a konzervační látky. Běžně se používají pro každodenní čištění domácností, průmyslových prostorů, laboratoří, nemocnic, bazénů a dalších míst (Czechowski a Stoodley, 2002).

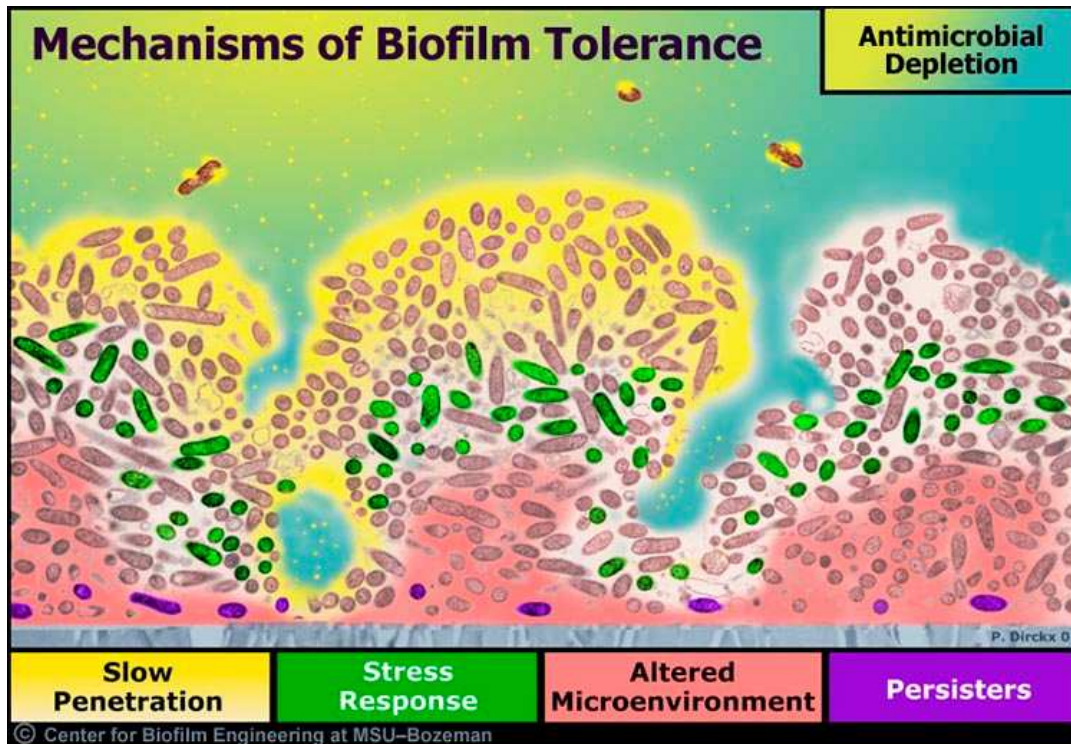
Příčinu neefektivity ATB a ATM prostředků nelze hledat jen v mechanismech rezistence, ale je třeba se také zamyslet nad tím, s jakou rozvahou jsou aplikovány. Pak bude možné zjistit, proč se postupně stávají neúčinnými. Problémem zůstává také testování antibiotik a ATM látek. Při testování se ve většině případů pracuje s čistou plaktonickou kulturou, ale

ve skutečnosti se na výšše zmíněných místech vyskytují převážně biofilmy tvořené více druhy mikroorganismů (Czechowski a Stoodley, 2002). Na základě výsledků experimentu smíšených biofilmů lze usoudit, že rezistence biofilmu více druhů je vyšší než v případě biofilmu tvořeného jedním druhem mikroorganismu. Konkrétně bylo provedeno srovnání biofilmů *S. epidermis*, *L. monocytogens* a smíšeného biofilmu obou druhů. Ve smíšeném biofilmu byly oba bakteriální druhy zastoupeny v různých poměrech. V případě, že byl jeden druhů zastopen výrazně dominantně, např. v poměru 80:20, výsledná síla biofilmu odpovídala přibližně součtu sil jednotlivých druhů v daném poměru. Avšak při změně poměru, přibližně 50:50, byl výsledek nečekaný. Síla biofilmu neodpovídala součtu sil podle poměru zastoupení druhů, ale byla výrazně vyšší (Zameer *et al.*, 2010).

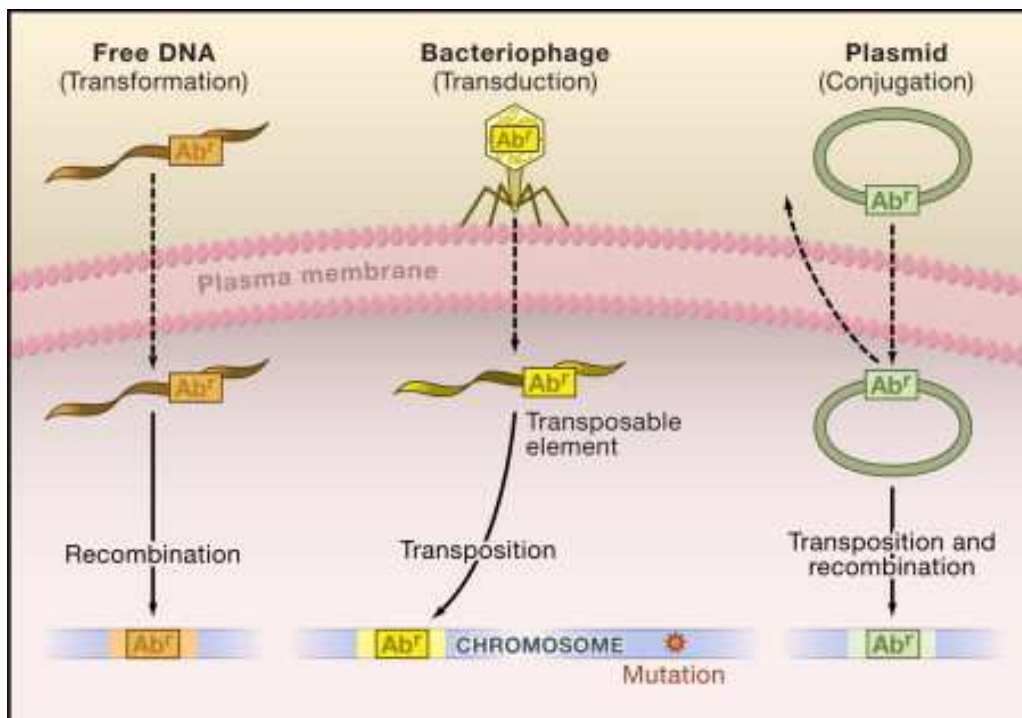
Bakterie ovládají několik mechanismů rezistence, viz obr. 2. Jedním z nich je změna genetické informace, což jim umožňuje získat určitou ATB rezistenci. Ke změně genetické informace dochází díky spontánní mutaci, nebo získáním nového genu. V obou případech v přítomnosti určitého ATB může následně dojít k selekci. Jako příklad spontánní mutace lze uvést mutaci genu RNA polymerázy a DNA gyrázy, výsledkem této mutace je bakteriální rezistence proti ATB rifamycinu a chinolinu. K získání nového genu dochází prostřednictvím horizontálního genové transferu (HGT). Rozlišují se tři typy GHT: konjugace, transdukce a transformace, viz obr. 3. (Lambert 2005). Jako příklad HGT, konkrétně se jedná o konjugaci, lze uvést získání genu pro enzym β -laktamázu. β -laktamáza hydrolyticky štěpí β -laktamová ATB ještě před tím, než se vůbec dostanou na cílové místo (Tenover, 2005).

Dalším mechanismem rezistence jsou tzv. efluxní pumpy, které mohou ATM dostat ven z buňky. Příkladem efluxní pumpy je systém QAC (quaternary ammonium compounds) u *S. aureus*. Tento systém zajišťuje rezistenci proti chlorhexidinu. Efluxní pumpy využívají biofilmy i planktonické buňky (Mah a O'Toole, 2001).

Existuje i možnost změny syntézy bakteriální stěny, tento rezistenční mechanismus je řízen několika geny. Bakterie syntetizují alternativní bakteriální stěnu, která neobsahuje vazebná místa pro ATM (Tenover 2005).



Obr. 2 Mechanismy rezistence biofilmu (Steward a Dickx, 2001)



Obr. 3 Horizontální genový transfer (Aleskhun a Levy, 2010)

5. Metody detekce biofilmu

K detekci biofilmu se v praxi využívá mnoha metod. Tyto metody lze rozdělit na genotypové a fenotypové. Mezi fenotypové metody patří metody mikroskopické a kultivační. Jednou z nejpoužívanějších mikroskopických metod je skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a konfokální laserová mikroskopie (CLSM), dále se používá transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a mikroskopie atomových sil (AFM, atomic force microscopy) (Chmielewski a Frank, 2003; Chavant *et al.*, 2007).

CLSM umožňuje pozorování biofilmu bez nutnosti fixace, díky čemuž lze sledovat téměř zcela nepoškozený plně hydratovaný biofilm. Jedinou nezbytností zůstává použití mnoha typů specifických fluorescenčních sond a nespecifických fluorescenčních sloučenin. Díky tomu je možné pozorovat strukturu biofilmu a její změny (Costerson a Lewandowski, 1995).

Kultivační metody zahrnují zkumavkovou metodu (TM - tube method), někdy také označovanou jako Christensenovu zkumavkovou metodu (CTT), dále kultivace na tkáňových destičkách (TCP – tissue culture plate), kultivace na agaru s kongo červení (CRA- Congo red agar) (Chavmt *et al.*, 2007). Kongo červeně je barvivo, jedná se o roztok ethanolu nasycený chloridem sodným, toto barvivo se vyznačuje schopností vázat polysacharidy, což je princip CRA (Puchtler *et al.*, 1961).

Obdobou CTT je kultivace na mikrotitračních destičkách s použitím krystalové violeti. Bakterie jsou působením krystalové violeti vystaveny asi 45 min, potom se destička promývá sterilizovanou vodou. V případě biofilm-tvořících buněk dochází k navázání krystalové violeti na EPS a na dně jamky destičky lze pozorovat fialovou vrstvu. Pokud se však nejedná o biofilm-tvořící buňky, nedochází k navázání krystalové violeti, proto ani nelze pozorovat fialovou vrstvu. Po obarvení se do destiček přidává 95 % ethanol, který vyváže barvivo. Nakonec se provádí přenos obsahu destičky do nové destičky, následuje měření na spektrofotometru. Naměřená hodnota optické denzity při 620 nm se porovnává s OD před barvením. Množství uvolněné violeti přímo úměrně odpovídá množství vytvořeného biofilmu (Purktrová *et al.*, 2010).

Z genotypových metod se nejčastěji používá polymerázová řetězová reakce (PCR). Prostřednictvím PCR se zjišťuje přítomnost genů souvisejících s tvorbou biofilmu, především se jedná o geny kódující složky EPS. Výhodou PCR je fakt, že lze získat objektivní informace nezávislé na kultivačních podmínkách (Arciloa *et al.*, 2002).

Dalšími často používanými metodami detekce biofilmu jsou FISH (fluorescent *in situ* hybridization) a hybridizace 16-23S rRNA (Chmielewski a Frank, 2003). Pro získání ucelené

představy o struktuře biofilmu se zdá vhodná kombinace genotypových a fenotypových metod.

6. Mikloflóra mléka

Surové mléko je bohatým zdrojem živin nejen pro člověka, ale také pro mikroorganismy, což ho činí ideálním kultivačním médiem. Tento přirozený rezevoár mikroorganismů se však v potravinářství může rychle stát zdrojem kontaminace a následně příčinou zdravotních rizik (Wouters *et al.*, 2001; Marchand *et al.*, 2012). Kontaminace patogeny, které se mohou vyskytovat v mléce a mléčných produktech, nejčastěji způsobuje zvracení, horečku, průjemy a v některých případech i smrt (Argarwal *et al.*, 2012). V konkrétních případech se může jednat o nemocnění jako je listerióza, salmonelóza, otravy stafylokokovými enterotoxiny a další (Balaban a Rasooly 2000; Chmielewki a Frank 2003; Weiler *et al.*, 2012).

Kromě rizika onemocnění mohou nežádoucí mikrobiální kontaminace znehodnotit jednotlivé složky mléka, změnit jeho chuť a v neposlední řadě sníží jeho trvanlivost, k čemuž dochází činností bakteriálních enzymů (Marchand *et al.*, 2012). Nejčastěji tyto problémy způsobují proteázy a lipázy (Chen *et al.*, 2003). Jako příklad lze uvést hydrolýzu acylglycerolů lipázami, jejímž výsledkem je uvolnění mastných kyselin, které způsobí zhořknutí a žluknutí mléka. Na chuti mléka se svou aktivitou podílí i proteázy. Degradací kaseinu dochází k zhořknutí mléka a vzniku sraženin (Marchand *et al.*, 2012).

Na druhou stranu enzymy v mléce mají i svou kladnou funkci, ať se již jedná o produkty bakterií, které se v mléce vyskytují přirozeně či jsou záměrně přidávány jako mlékárenské kultury. Právě tyto enzymy se se svojí aktivitou podílí na vzniku správné chuti či konzistence jako je tomu např. u sýrů a jogurtů (Kooh *et al.*, 2013). Bez přítomnosti mléčných acidofilních bakterií by nebyla možná fermentace, na které závisí výroba mnoha mléčných produktů, mj. různých druhů sýrů a zakysaných nápojů (Wouters *et al.*, 2001).

V mléčné mikloflóře byl zaznamenán výskyt gramnegativních i grampozitivních bakterií. V případě gramnegativních bakterií převažovaly následující rody: *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Aenomonas*, *Plesiomonas*, *Moraxella*, *Alcaligenes* a *Pseudomonas*. V případě grampozitivních se vyskytovaly následující rody: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* a mléčné acidofilní bakterie jako je *Streptococcus*, *Leconostoc*, *Pedicoccus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus* (Dalmaso *et al.*, 2008; Marchand *et al.*, 2012). Tato práce se nejvíce zaměřuje na druh *Escherichia coli* a rod *Staphylococcus*.

6.1. *Escherichia coli*

E. coli patří do čeledi Enterobacteriaceae, což je skupina fakulativně anaerobních nesporeujících gramnegativních tyčinek. Řadí se mezi modelové organismy mikrobiologie, což ji činí jedním z nejvíce prozkoumaných mikroorganismů. *E. coli* se využívá při biotechnologických procesech a genetických manipulacích a při určování fekální kontaminace pitné vody, kde je nejběžnějším indikátorem. (Bednář *et al.*, 1996; Julák 2006; Sedláček 2001)

E.coli se řadí k běžným komenzálům mikroflóry gastrointestinálního traktu, její největší výskyt byl zaznamenán na sliznici tlustého střeva člověka i jiných savců. V tlustém střevě produkuje vitamin K a potlačuje případné osídlení střevními patogeny. Patogeny podléhají účinku kolicinů, což jsou bakteriociny *E.coli*. Avšak lze se setkat i s patogenními kmeny, které mohou vyvolat gastrointestinální infekce, močové infekce, pneumonie, infekce ran, sepse a neonatální meningitidy. Patogenita či nepatogenita *E.coli* je zapříčiněna genetickou heterogenitou mezi jejími jednotlivými kmeny. (Bednář *et al.*, 1996; Julák 2006; Sedláček 2001)

6.2. rod *Staphylococcus*

Staphylococcus patří mezi nesporeující, nepohyblivé, většinou fakulativně anaerobní, kultivačně nenáročné, většinou neopouzdřené grampozitivní koky. Do tohoto rodu patří 40 druhů a poddruhů. Tvorba biofilmu je nejčastěji studována u *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermis*. Tyto dva druhy také patří mezi významné patogeny (Bednář *et al.* 1996, Julák 2006).

S. aureus se běžně vyskytuje v okolí člověka a zvířat. U člověka dochází krátce po narození k osídlení *S. aureus* na kůži, sliznici dýchacího a gastrointestinálního traktu. Stafylokokové mastitidy, což jsou onemocnění dojného skotu i ovcí, způsobují enterotoxinogenní kmeny a mohou u člověka prostřednictvím mléka a mléčných produktů zapříčinit enterotoxikózu. Enterotoxiny obsažené v mléku vyvolávají nevolnost, následně střevní potíže a dehydrataci (Bednář *et al.*, 1996; Šrubařová a Dvořák, 2010).

S. epidermis má u člověka obdobný výskyt jako *S. aureus*, v případě skotu, ovcí a koz se s vysokou frekvencí nachází ve strukových mlékovodech a následně v jejich mléce, i zde je velké riziko mastitidy (Bednář *et al.*, 1996; Šrubařová a Dvořák, 2010).

7. Biofilm v potravinářském průmyslu

7.1. Výskyt a problematiky v potravinářském průmyslu

Jak bylo výše zmíněno, vznik biofilmů způsobuje problémy nejen v souvislosti s onemocněními. Kvůli nebezpečí kontaminace vody patogeny biofilmy představují také závažné riziko pro zásoby pitné vody. V petrochemickém průmyslu snižují účinnost zařízení, jako jsou potrubí vedoucí ropu nebo vrtné plošiny. Biofilmy se mohou také objevit na trupech lodí, rybářských pastích a sítích, což představuje hlavní ekonomický problém. Přestože biofilmy mohou v průmyslu způsobovat extrémní finanční náklady, v praxi existuje i jejich kladné využití. Jako příklad jejich prospěšnosti lze uvést využití při výrobě průmyslových chemikálií, např. ethanolu nebo octa, dále stojí za zmínku odstraňování toxických sloučenin při čištění odpadních vod a mořské vody znečištěné ropou (Dufour *et al.*, 2011).

Problematika biofilmů zasahuje i potravinářský průmysl. Navzdory snaze o co nejopatrnější postupy při vlastní výrobě je velmi obtížné, ne-li zcela nemožné vyrábět potraviny, které by neobsahovaly žádné mikroorganismy, přestože výrobní proces zahrnuje i sterilizaci. Tento problém může často souviset s tvorbou biofilmů přímo ve výrobních zařízeních (Brooks a Flint, 2008).

7.2. Kontrola tvorby biofilmu v potravinářském průmyslu

Důkladné porozumění vzájemného působení mikroorganismů a materiálů, které se používají při konstrukci povrchů ve výrobních zařízeních potravinářství, je zcela základní pro vývoj kontrolních systémů tvorby biofilmu. Aby bylo možné navrhnout co nejúčinnější čistící systém, je nezbytné řešit ohnisko problému. Další vylepšení v odstraňování a kontrole biofilmů spočívá především v objasnění strategií, používaných bakteriemi pro počáteční kontakt s povrchem a také jejich vzájemné přichycování (Brooks a Flint, 2008). Většina získaných poznatků o biofilmech je výsledkem studia přirozeného prostředí, kde jsou limitované zdroje živin, a nebo jeho simulací, v obou těchto případech se tedy jedná o odlišné podmínky, než se vyskytují v potravinářských provozech. Právě v potravinářských provozech lze najít bohatší zdroje živin. Význam biofilmů ve výrobě potravin není zatím dobře probádán, protože chybí přímá pozorování biofilmů v tomto prostředí, a také je nedostatek výzkumů pracujících s modelovými systémy, které by mohly dobře napodobovat prostředí potravinářských provozů. Mikroorganismy pocházející ze zkažených i nezkažených potravin se mohou přichytit a produkovat EPS v místech kontaktu vyráběných potravin a vyhovujících

povrchů. Patogenní bakterie mohou spoluexistovat v biofilmech jiných mikroorganismů, např. *Listeria monocytogenes* přežívá v biofilmech tvořených bakteriálními rody *Pseudomonas*. Biofilmy je obtížné odstranit z povrchů výrobních zařízení potravin a z jejich přirozených prostředí. Příčinou je produkce složek EPS a problémy související s procesem čištění výrobních zařízení i výrobního prostředí, proto se při kontrole biofilmu spoléhá na efektivní čištění a postupy dezinfekce. Zároveň je nutný další technický vývoj výrobních linek a určitá změna vlastních výrobních prostor, aby se zamezilo výskytu možných kontaminací (Chmielewski a Frank, 2003).

Zbytky potravin vznikající během vlastní výroby neodmyslitelně patří k potravinářským provozům, mlékárenství nevyjímaje. Nahromadění zbytků poskytuje prostředí vybízející ke kolonizaci bakteriemi, zvláště ve formě biofilmů. Ve studii Sary Cleto a její výzkumné skupiny z roku 2012, zabývající se charakteristikou kontaminace v mlékárenských provozech po důkladném hygienickém čištění, byly použity izoláty získané z prasklin zařízení, která se nacházejí právě v mlékárenských provozech. Na základě sekvenace 16S rDNA bylo rozpoznáno pět převládajících rodů bakterií: *Pseudomonas* sp. (37%); *Staphylococcus* (20%); *Serratia* sp. (16%), *Stenotrophomonas* sp. (15%) a *Alcaligenes* (5%). U všech izolátů bylo provedeno testování jejich schopnosti produkovat látky, které mohou způsobit změny v organoleptických vlastnostech mléka, jako jsou chuť, vůně a struktura, které mají přímý vliv na obchodní hodnotu konečného produktu. Konkrétně byla odhalena syntéza těchto nejdůležitějších tří skupin enzymů: proteázy, lipázy a lecithinázy (Cleto *et al.*, 2012).

7.3. Metody odstranění biofilmu v potravinářských provozech, především mlékárenských prostorech

V potravinářství je jednou z hlavních výzev snaha zcela se vyhnout kontaminaci nejen výsledných produktů, ale i syrových potravin (surového materiálu) mikroorganismy, především patogenními. Pro dekontaminaci povrchů byly vyvinuty různé metody. Nejběžnější z nich je manuální aplikace ve formě pěny nebo gelu, který obsahuje aktivní sloučeniny, to vše probíhá za nízkého tlaku (Cleto *et al.*, 2012). Velmi rozšířeným způsobem čištění je metoda CIP (Clean-in-Place). Při CIP se k čištění využívá NaOH a HNO₃. Dochází ke kompletnímu čištění celého výrobního prostoru, včetně potrubí, není třeba rozmontování, ani otvírání vybavení. Značnou nevýhodou této metody zůstává její destruktivní účinek na přírodní i syntetické povrchy, výsledkem je vznik trhlin, které napomáhají adhezi, viz kap. 3.1., (Brooks *et al.*, 2009). V laboratorních podmínkách se experimentuje s dezinfekčními účinky Sava S, což je roztok 5% NaClO a 2% NaOH, dále s roztokem propanolu s ethanolem,

roztokem benzoalkania s chloridem, peroxiacetylovou kyselinou, ozonem a dalšími. Klíčové jsou poměry jednotlivých látek a jejich koncentrace, nicméně záleží i na době působení na biofilm (Purkrťová *et al.*, 2010).

Fogging (rozprašování) pomocí automatického systému se v potravinářství řadí prozatím mezi alternativní metody. Rozprašování dezinfekce je v podstatě rozptýl jemně uspořádaných kapek dezinfekce v místnosti. Hlavním smyslem této metody je jistota, že je dezinfekce v přiměřené dávce rozptýlena ve všech částech místnosti, včetně jejího vybavení. Přestože se jedná o poměrně nákladný systém dezinfekce, mohl by přinést vysokou efektivitu a také výrazné zlepšení hygieny, pokud se však použije náležitým způsobem (Cleto *et al.*, 2012). Bore a Langsrud se ve své studii z roku 2005 také zabývali účinností různých metod dezinfekce, ke své práci využili izoláty z pěti různých mlékáren. Ve třech z pěti mlékáren bylo prováděno čištění a dezinfekce běžným způsobem a právě u těchto běžných zavedených způsobech byla zaznamenáno zřetelné pochybení v technice. V jedné z mlékáren došlo k selhání přístroje produkujícího „mlhu“, ta se tak nedostala do všech částí místnosti. V jiné mlékárně byl problém s velikostí přístroje produkujícího „mlhu“, kvůli čemuž neměl kapacitu k dezinfekci celé místnosti, a tak většina prostoru nebyla vyčištěna. Dalším problémem bylo selhání počítačového programu, který měl zajistit kontrolu celého dezinfekčního procesu. Nakonec byly pro další práci vybrány jen zbývající dvě mlékárny, kde nedošlo k žádnému pochybení. Celkem bylo odebráno šest izolátů. V obou mlékárnách byla dezinfekce prováděna jednou týdně, použity byly prostředky Oxonia Aktiv a TP99 (akrylaminoacetát), střídány byly každé tři měsíce.

V mlékárenských prostorech se v současné době využívá automatický systém zpracování, z materiálů jsou nejvíce zastoupena nerez ocel, guma a plasty. Hlavní důvodem, proč jsou tyto povrchy vhodné pro adhezi, je přítomnost mléka a mléčných proteinů, které tvoří počáteční živnou půdu pro bakterie. Výsledky studie Teixeira jejího týmu z roku 2004 ukazují, že nejvíce náchylným materiálem byla guma to bez větších rozdílů mezi použitými rody bakterií, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* a další (Barnes *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2004).

Při bližším pohledu na metody dezinfekce v potravinářském průmyslu je zřejmé, že neexistuje jeden dostatečně účinný postup. Příčinou mnohdy není neúčinnost dezinfekčních prostředků, ale doba působení, vliv okolní teploty a druhové složení biofilmu. Pokud není zdrojem kontaminace výchozí surovina, může být problémem i kontaminace mezi jednotlivými výrobními kroky (Asa *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 2009).

8. Závěr

Biofilmy a problematika jejich tvorby stále zůstávají ve středu pozornosti mnoha výzkumů. Důvodem je především jejich komplikovaná struktura. Tvorba biofilmů je již poměrně hluboce prostudovanou oblatí, jsou detailně známy mechanismy počáteční adheze, tvorba jednovrstevného biofilmu i maturace spolu s vznikem trojrozměrného útvaru. Avšak ještě stále existují nezodpovězené otázky, a to především ohledně tvorby extracelulární matrix (EPS) a mechanismu quorum sensing. Tvorba EPS do značné míry ovlivňuje rezistenci biofilmu. Právě rezistence a její mechanismy jsou ve středu zájmu, protože je to možná cesta k eliminaci biofilmu, ať už v oblasti medicíny, či v potravinářském průmyslu. Potravinářský průmysl, včetně oblasti produkce mléka a mléčných výrobků, usiluje o minimalizaci kontaminace výsledných produktů. Toho lze docílit několika cestami. Zamezit počáteční kontaminaci ještě před zpracováním mléka není reálné, avšak zpřísněním kontroly mezikroků při jeho zpracování lze redukovat rizika další kontaminace. Dalšími cestami je zdokonalení dezinfekčních procedur, včetně zefektivnění v současné době používaných prostředků.

Literatura

- Agarwal, Amit, Vandana Awasthi, Ajit Dua, Sanjeev Ganguly, Vivek Garg, and Satwinder S. Marwaha. 2012. "Microbiological Profile of Milk: Impact of Household Practices." *Indian Journal of Public Health* 56 (1): 88–94. doi:10.4103/0019-557X.96984.
- Awasthi, Vandana, Sanjivan Bahman, Lalit K. Thakur, Santosh Kumar Singh, Ajit Dua, and Sanjeev Ganguly. 2012. "Contaminants in Milk and Impact of Heating: An Assessment Study." *Indian Journal of Public Health* 56 (1): 95–99. doi:10.4103/0019-557X.96985.
- Barthel, W., and F. Markwardt. 1975. "Aggregation of Blood Platelets by Adrenaline and Its Uptake." *Biochemical Pharmacology* 24 (20): 1903–4.
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A. and Vávra, J. 1996. „Lékařská mikrobiologie. *Mirva*.
- Bishop, J. O., J. S. Beckmann, M. S. Campo, N. D. Hastie, M. Izquierdo, and S. Perlman. 1975. "DNA-RNA Hybridization." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 272 (915): 147–57.
- Bore, E., and S. Langsrud. 2005. "Characterization of Micro-Organisms Isolated from Dairy Industry after Cleaning and Fogging Disinfection with Alkyl Amine and Peracetic Acid." *Journal of Applied Microbiology* 98 (1): 96–105. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02436.x.
- Bose, K. S., and R. H. Sarma. 1975a. "Delineation of the Intimate Details of the Backbone Conformation of Pyridine Nucleotide Coenzymes in Aqueous Solution." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66 (4): 1173–79.
- . 1975b. "Delineation of the Intimate Details of the Backbone Conformation of Pyridine Nucleotide Coenzymes in Aqueous Solution." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66 (4): 1173–79.
- Brooks, John D., and Steve H. Flint. 2008. "Biofilms in the Food Industry: Problems and Potential Solutions." *International Journal of Food Science & Technology* 43 (12): 2163–76. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x.
- Cappello, S. and Guglielmie, S., P., P. 2006. „Effects of growth temperature on the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 to polystyrene.“ *Annals of Microbiology* 56 (4): 383-385.
- Chen, L., R.M. Daniel, and T. Coolbear. 2003. "Detection and Impact of Protease and Lipase Activities in Milk and Milk Powders." *International Dairy Journal* 13 (4): 255–75. doi:10.1016/S0958-6946(02)00171-1.
- Chmielewski, R.A.N., and J.F. Frank. 2003. "Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2 (1): 22–32. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x.
- Cleto, Sara, Sónia Matos, Leon Kluskens, and Maria João Vieira. 2012. "Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant." *PLoS ONE* 7 (6): e40189. doi:10.1371/journal.pone.0040189.
- D' Aubigné, R. M. 1975. "[Giant cell tumors. Conclusions]." *Revue De Chirurgie Orthopédique Et Réparatrice De L'appareil Moteur* 61 (5): 447–50.
- Di Prisco, G. 1975a. "Effect of pH and Ionic Strength on the Catalytic and Allosteric Properties of Native and Chemically Modified Ox Liver Mitochondrial Glutamate Dehydrogenase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (2): 604–12.
- . 1975b. "Effect of pH and Ionic Strength on the Catalytic and Allosteric Properties of Native and Chemically Modified Ox Liver Mitochondrial Glutamate Dehydrogenase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (2): 604–12.
- Dickson, J S, and M Koohmaraie. 1989. "Cell Surface Charge Characteristics and Their Relationship to Bacterial Attachment to Meat Surfaces." *Applied and Environmental Microbiology* 55 (4): 832–36.

- Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167–93. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- Donlan, Rodney M. 2002. "Biofilms: Microbial Life on Surfaces." *Emerging Infectious Diseases* 8 (9): 881–90. doi:10.3201/eid0809.020063.
- Flemming, H.-C., T. R. Neu, and D. J. Wozniak. 2007. "The EPS Matrix: The 'House of Biofilm Cells.'" *Journal of Bacteriology* 189 (22): 7945–47. doi:10.1128/JB.00858-07.
- Flickinger, R. A. 1976. "Effect of Rate of Replication upon Transcription in Chick Embryo Limb Bud Mesenchyme Cells in Organ Culture." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 6 (3): 169–75.
- Ganneskog, G. 1976. "[Occupational health care of tomorrow--demands and expectations]." *Läkartidningen* 73 (35): 2791–93.
- Gehler, J., M. Cantz, J. F. O'Brien, M. Tolksdorf, and J. Spranger. 1975. "Mannosidosis: Clinical and Biochemical Findings." *Birth Defects Original Article Series* 11 (6): 269–72.
- Geslin, P., P. Legrand, F. Squinazi, R. Brioude, J. Lerailliez, and J. A. Lejeune. 1976a. "[Letter: Diagnostic value of the detection of specific polysaccharides by counterelectrophoresis in meningitis in children. 50 cases]." *La Nouvelle Presse Médicale* 5 (22): 1431–32.
- . 1976b. "[Letter: Diagnostic value of the detection of specific polysaccharides by counterelectrophoresis in meningitis in children. 50 cases]." *La Nouvelle Presse Médicale* 5 (22): 1431–32.
- Hall-Stoodley, Luanne, J. William Costerton, and Paul Stoodley. 2004. "Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases." *Nature Reviews Microbiology* 2 (2): 95–108. doi:10.1038/nrmicro821.
- Hall-Stoodley, Luanne, and Paul Stoodley. 2002. "Developmental Regulation of Microbial Biofilms." *Current Opinion in Biotechnology* 13 (3): 228–33. doi:10.1016/S0958-1669(02)00318-X.
- Harrison, Joe, Raymond Turner, Lyrium Marques, and Howard Ceri. 2005. "Biofilms." *American Scientist* 93 (6): 508. doi:10.1511/2005.6.508.
- Hori, Katsutoshi, and Shinya Matsumoto. 2010. "Bacterial Adhesion: From Mechanism to Control." *Biochemical Engineering Journal* 48 (3): 424–34. doi:10.1016/j.bej.2009.11.014.
- Isaacks, R. E., D. R. Harkness, G. A. Froeman, and S. A. Sussman. 1976. "Studies on Avian Erythrocyte Metabolism--I. Procedure for Separation and Quantitation of the Major Phosphorylated Metabolic Intermediates by Anion Exchange Chromatography." *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 53 (1): 95–99.
- Jaglic, Z., Červinková, D., Vlková, H., Michu, E., Kunová, G. and Babák, V. 2012. „Bacterial Biofilms Resist Oxidising Agents Due to the Presence of Organic Matter.“ *Czech Journal of Food Science*. 30 (2): 178 – 187.
- Jallon, J. M., Y. Risler, and M. Iwatsubo. 1975. "Beef Liver L-Glutamate Dehydrogenase Mechanism: Presteady State Study of the Catalytic Reduction of 2-oxoglutarate by NADPH." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 67 (4): 1527–36.
- Julák, Jaroslav, and Univerzita Karlova. 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum.
- Kumar, C. Ganesh, and S. K Anand. 1998. "Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: A Review." *International Journal of Food Microbiology* 42 (1–2): 9–27. doi:10.1016/S0168-1605(98)00060-9.
- Lee, G. D., and R. L. van Etten. 1975a. "Evidence of an Essential Histidine Residue in Rabbit Liver Aryl Sulfatase A." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (2): 424–34.
- . 1975b. "Evidence of an Essential Histidine Residue in Rabbit Liver Aryl Sulfatase A." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (2): 424–34.
- . 1975c. "Evidence of an Essential Histidine Residue in Rabbit Liver Aryl Sulfatase A." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (2): 424–34.

- Loosdrecht, Mark C. M. van, Johannes Lyklema, Willem Norde, and Alexander J. B. Zehnder. 1989. "Bacterial Adhesion: A Physicochemical Approach." *Microbial Ecology* 17 (1): 1–15.
- Makar, A. B., K. E. McMartin, M. Palese, and T. R. Tephly. 1975. "Formate Assay in Body Fluids: Application in Methanol Poisoning." *Biochemical Medicine* 13 (2): 117–26.
- Marion, Dalmaso, Prestoz Sylvie, Rigobello Veronique, and Demarigny Yann. 2008. "Evolution of the Raw Cow Milk Microflora, Especially Lactococci, Enterococci, Leuconostocs and Lactobacilli over a Successive 12 Day Milking Regime." *International Journal of Dairy Science* 3 (3): 117–30. doi:10.3923/ijds.2008.117.130.
- Marshall, K. C., R. Stout, and R Mitchell. 1971. "Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces." *Journal of General Microbiology* 68 (3): 337–48. doi:10.1099/00221287-68-3-337.
- Marwaha, SatwinderS, Vandana Awasthi, Sanjeev Ganguly, Amit Agarwal, Ajit Dua, and Vivek Garg. 2012. "Microbiological Profile of Milk: Impact of Household Practices." *Indian Journal of Public Health* 56 (1): 88. doi:10.4103/0019-557X.96984.
- McLandsborough, L., A. Rodriguez, D. Pérez-Conesa, and J. Weiss. 2006. "Biofilms: At the Interface between Biophysics and Microbiology." *Food Biophysics* 1 (2): 94–114. doi:10.1007/s11483-005-9004-x.
- McPhie, P. 1975. "The Origin of the Alkaline Inactivation of Pepsinogen." *Biochemistry* 14 (24): 5253–56.
- Mittelman, M. W. 1998. "Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations." *Journal of Dairy Science* 81 (10): 2760–64. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75833-3.
- Otto, Karen. 2008. "Biophysical Approaches to Study the Dynamic Process of Bacterial Adhesion." *Research in Microbiology* 159 (6): 415–22. doi:10.1016/j.resmic.2008.04.007.
- Penman, C. S., and J. H. Duffus. 1976. "Histone-like Protein Fractions of *Kluyveromyces Fragilis* and Their Relation to the Cell Cycle." *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie* 19 (5): 361–67.
- Purkrtová, S., Turoňová, H., Piločová, T., Demnerová, K. and Pazlarová, J. 2010. „Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Disinfectans. *Czech Journal of Food Science*. 28 (4): 326-332.
- Rijnaarts, Huub H. M., Willem Norde, Edward J. Bouwer, Johannes Lyklema, and Alexander J. B. Zehnder. 1993. "Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 59 (10): 3255–65.
- Robert, M. 1975. "[Oxygen affinity of haemoglobin (author's transl)]." *Bulletin De Physiopathologie Respiratoire* 11 (1): 79–170.
- Schmoltdt, A., H. F. Bente, and G. Haberland. 1975a. "Digitoxin Metabolism by Rat Liver Microsomes." *Biochemical Pharmacology* 24 (17): 1639–41.
- . 1975b. "Digitoxin Metabolism by Rat Liver Microsomes." *Biochemical Pharmacology* 24 (17): 1639–41.
- . 1975c. "Digitoxin Metabolism by Rat Liver Microsomes." *Biochemical Pharmacology* 24 (17): 1639–41.
- Silverberg, A. B., S. D. Shah, M. W. Haymond, and P. E. Cryer. 1978. "Norepinephrine: Hormone and Neurotransmitter in Man." *The American Journal of Physiology* 234 (3): E252–256.
- Stein, J. M. 1975. "The Effect of Adrenaline and of Alpha- and Beta-Adrenergic Blocking Agents on ATP Concentration and on Incorporation of $^{32}\text{P}_i$ into ATP in Rat Fat Cells." *Biochemical Pharmacology* 24 (18): 1659–62.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton. 2002. "Biofilms as Complex Differentiated Communities." *Annual Review of Microbiology* 56: 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.

- Teh, Koon Hoong, Denise Lindsay, Jon Palmer, Paul Andrewes, Phil Bremer, and Steve Flint. 2013. "Lipolysis within Single Culture and Co-Culture Biofilms of Dairy Origin." *International Journal of Food Microbiology* 163 (2-3): 129–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.009.
- Teixeiraa, Pilar, and Maria Jo. 2015. "Short Communication Physicochemical Surface Characterization of a Bacterial Population Isolated from a Milking Machine." *ResearchGate*, August. http://www.researchgate.net/publication/238679984_Short_communication_Physicochemical_surface_characterization_of_a_bacterial_population_isolated_from_a_milking_machine.
- Thomas, R. J., and P. J. Waller. 1975a. "Significance of Serum Pepsinogen and Abomasal pH Levels in a Field Infection of *O Circumcincta* in Lambs." *The Veterinary Record* 97 (24): 468–71.
- . 1975b. "Significance of Serum Pepsinogen and Abomasal pH Levels in a Field Infection of *O Circumcincta* in Lambs." *The Veterinary Record* 97 (24): 468–71.
- . 1975c. "Significance of Serum Pepsinogen and Abomasal pH Levels in a Field Infection of *O Circumcincta* in Lambs." *The Veterinary Record* 97 (24): 468–71.
- Tolker-Nielsen, T., and S. Molin. 2000. "Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities." *Microbial Ecology* 40 (2): 75–84.
- Wiesmann, U. N., S. DiDonato, and N. N. Herschkowitz. 1975. "Effect of Chloroquine on Cultured Fibroblasts: Release of Lysosomal Hydrolases and Inhibition of Their Uptake." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66 (4): 1338–43.
- Wouters, Jan T.M, Eman H.E Ayad, Jeroen Hugenholtz, and Gerrit Smit. 2002. "Microbes from Raw Milk for Fermented Dairy Products." *International Dairy Journal* 12 (2-3): 91–109. doi:10.1016/S0958-6946(01)00151-0.