

1. ÚVOD

O existenci bakterií v přírodě se ví již dlouhou dobu. První hypotézy o existenci mikroorganismů se objevily již ve středověku. Již roku 1020 ve svém Kánonu lékařství perský lékař a filosof Avicenna (Ibn Sína) uvedl hypotézu, že tělní tekutiny jsou kontaminovány nečistými cizími tělísky před tím, než dojde k infekci daného člověka, nicméně tato tělíška nepovažoval za hlavní příčinu nemoci.

Ve 14. století však arabští lékaři Ibn Khatima a Ibn al-Khatib pod dojmem morové epidemie (*Yersinia pestis*) v Maury okupované španělské Granadě napsali, že tato infekční choroba byla způsobena nakažlivými entitami, které vstupovaly do lidských těl. Hypotézy a teorie arabských lékařů se v Evropě staly populárními s nástupem renesance, zejména díky spisům Girolama Fracastora.

K dalšímu vývoji v mikrobiologii došlo v 17. století, kdy Anthony van Leeuwenhoek roku 1676 zkonstruoval a použil jednoduchý mikroskop. Nazval jej „animalcules“ a svá pozorování zaslal v sérii dopisů Královské společnosti v Londýně. Název „bakterie“ byl následně zaveden Christianem Gottfriedem Ehrenbergem roku 1828 a je odvozen od řeckého slova βακτήριον (bakterion) znamenajícího v přibližném překladu „drobné osazenstvo“.

V 19. a 20. století šel vývoj již rychle kupředu. Roku 1859 Louis Pasteur poprvé demonstroval, že proces fermentace (kvašení) je způsoben růstem mikroorganismů. Ve stejné době Robert Koch zjistil, že cholera, antrax a tuberkulóza jsou přenášeny malými choroboplodnými zárodky, za což mu byla následně v roce 1905 udělena Nobelova cena. Roku 1910 bylo Paulem Ehrlichem vyvinuto první antibiotikum – částečně změnil barvivo barvící spirochetu *Treponema pallidum* na chemikálii, která tohoto patogena selektivně zabíjela. A konečně roku 1977 Carl Woese zpracoval první fylogenetický strom bakterií na základě podjednotky ribozomální RNA a rozdělil prokaryota na dvě evolučně dominantní linie – Archaea a Bacteria [1].

2. Co je biofilm

2.1 Vznik biofilmu

Biofilmem nazýváme společenstva bakterií i vyšších organismů, která tvoří tenké povlaky na různých površích. Podmínkou jejich vzniku je přítomnost vody, živin a kyslíku. Uvnitř biofilmu probíhá látková výměna a „soutěž“ o živiny. Typické biofilmy mívají svrchní vrstvu prokysličenou a spodní vrstvu bez kyslíku. Tato skutečnost je významná v dynamice jejich vzniku. Tak např. prvotní osídlení aerobními organismy může umožnit sekundární osídlení organismy anaerobními. Příkladem biofilmu je zubní plak; za mikrobiální korozi může být považován i zubní kaz.

Biofilmy jsou slizovité vrstvy mikroorganismů a mimobuněčných látek, které se mohou vyskytovat i v potrubních systémech a zásobnících. Tyto vrstvy jsou pak živnou půdou pro mnoho patogenních mikroorganismů (jako je např. *E. coli* nebo *Legionella*) a navíc těmto mikroorganismům poskytují dokonalou ochranu před účinkem chemikálií. Mikroorganismy vyskytující se v biofilmech jsou proto mimořádně odolné vůči desinfekčním činidlům [2].

2.2 Vlastnosti biofilmu

Většina povrchů pevné fáze na Zemi je pokryta mikroorganismy, které tvoří různé ekosystémy. Jako příklad lze uvést kluzký povrch kamenů v tekoucí i stojaté vodě, sliz ucpávající odtok z umyvadla, atp. Přes toto obrovské množství mikrobiálních kolonií víme o jejich životě a soudržnosti velmi málo, protože všechny popsané tisíce druhů mikroorganismů jsou v laboratoři kultivovány v suspenzi, kde se volně pohybují. Víme však, že při zachycení na nějakém povrchu, který je pro ně příhodný, dojde k dramatickým změnám v jejich způsobu života, včetně molekulárních metabolických pochodů. Takováto společenství mají velmi rozmanitou infrastrukturu, která je do značné míry obdobná organizaci vyšších organismů, včetně dělby práce. Vytvářejí se tak rozmanité povrchové tvary obdobné těm, které se tvoří na povrchu korálových útesů [3].

Obecně vzato, bakterie opatřené bičíky, pokud se pohybují volně v suspenzi, mohou bičíky ztratit, a naopak při navázání na povrch začnou vylučovat tři druhy matricového polysacharidu, sloužícího k udržení pevnosti biofilmu. V posledních letech byl

zaznamenán velký pokrok při definici signálních molekul informujících bakterie o jejich poloze a potřebách. Mezi nejdůležitější (a to v celé řadě studovaných bakterií) je tzv. c-di-GMP čili bis(3'-5')-cyklický dimerní guanosinmonofosfát. Z hlediska lidského zdraví je zřejmé, že většina biofilmů je velice užitečná i proto, že nás chrání proti invazi různých patogenů. Na druhé straně jsou však některé biofilmy nesmírně nebezpečné, zejména pak ty, které se tvoří na předmětech vložených do lidské tkáně, jako jsou např. katetry, protézy apod. Tyto biofilmy se mohou stát rezervoáry pro systémovou infekci, protože jsou z dosud neznámých důvodů nepropustné pro mnoho antimikrobních činidel. Bude tedy nutné, aby se potřebnou strategií v rozvoji terapie dosáhlo kontroly nežádoucích biofilmů, aniž by byly poškozeny biofilmy užitečné [3].

2.2.1 Metabolické a fyziologické vlastnosti

Kapalina, která biofilm omývá zvenčí, přináší využitelné organické i anorganické látky a odnáší produkty metabolismu. Do hloubky jsou – stejně jako kyslík – zanášeny již zmíněným systémem kanálků. Lze v nich pozorovat proudění, a dokonce byla změřena hydrodynamika protékající tekutiny. Rychlost proudění v kanálcích, které jsou hlouběji, je nižší než v kanálcích při povrchu. V polovině hloubky je průtok oproti povrchu asi pětikrát pomalejší. Z kanálků proudí kapalina póry do nitra větších mikrokolonií a dále už je transportována pouze difuzí. Pro polysacharidy však difuze není příliš účinná. Obsah kyslíku se směrem do hloubky snižuje. V oblasti základny biofilmu jsou již jen bakterie anaerobní. Proto je také biofilm aerobní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* tenčí než biofilm složený z více druhů.

Je otázkou, jak bakterie poznají přítomnost vhodného povrchu, na němž se mohou přichytit. Těsně před přilnutím se řada genů spouští nebo dramaticky zvyšuje svou aktivitu. Uplatňují se bičíky, jimiž jsou některé bakterie opatřeny. Ve fázi dotyku s povrchem se jejich tvorba zvyšuje; v biofilmu se pak snižuje nebo úplně ustává. Pomáhají i další struktury, například fimbrie. Od bičíků se dost liší, vypadají spíš jako třásně nebo chloupky, na buňce tvoří husté kartáčky. Při dotyku s vhodným povrchem jich vznikne víc. Některé bakterie dokonce vytvářejí nový typ fimbrií, které byly popsány teprve nedávno a dostaly poetické jméno „curl“ (kudrlinky). Je zcela zřejmé, že bakterie mají schopnost zjistit dotek s podložkou, po němž následuje řada nových syntéz, včetně syntézy polysacharidové matrice [4].

Zajímavé je, že bakterie *Escherichia coli* při kultivaci ve zkumavce volně plavou a neusazují se na stěnách. Když se však kultivují v nádobách, kam se pomalu kontinuálně přivádí živný roztok, vytvářejí na stěnách biofilm. Buňky v povlaku jsou však odlišné. Jsou to formy, které už mají schopnost se přichytávat. Mutací je zaměněna jediná aminokyselina v regulační bílkovině genu, který spouští produkci bílkoviny, z níž jsou „kudrlinky“ složeny. Při pozorování pomocí elektronového mikroskopu lze spatřit, že jsou jimi buňky hustě obaleny [4].

Když se bakterie přichytí na povrch, mění své vlastnosti; zpočátku jen na úrovni regulace genů. Aktivují se geny, které produkují polysacharidy a polymery, jež jsou rozhodující pro vznik biofilmu. Spouštěcími podněty pro změnu regulace činnosti genů jsou zevní podmínky v tvořícím se biofilmu – zvýšený osmotický tlak, snížený obsah kyslíku a rostoucí hustota populace. Přechod z planktonického způsobu existence je pravděpodobně řízen transkripčním σ -faktorem, podobně jako sporulace a disociace kolonií. Kolonie bakterií v určité disociační fázi, v níž se nacházejí, mají změněný vzhled a buňky rovněž změněné antigenní složení. Buňky, u nichž σ -faktor přestane být aktivní, mění svůj fenotyp, tj. produkují enzymy, které štěpí matrici, v níž jsou buňky uvězněny, a které se uvolňují, odplouvají a jsou opět planktonické [4].

2.3 Výskyt biofilmu

Mikrobiální společenstva, která označujeme jako biofilm, nacházíme především ve vodném prostředí, ale i na povrchu půdy.

Je všeobecně známo, že se bakterie pěstují na živných půdách ve skleněných nebo plastických miskách. Rostou v malých „kopečcích“, které jsou označovány jako kolonie. Než však Robert Koch objevil způsob, jak pěstovat bakterie na pevných půdách, pěstovaly se tyto po několik let pouze v tekutinách, nejčastěji v bujonu. V něm se volně vznášely, plavaly a množily se, nebyl ale znám způsob, jak je od sebe oddělit. To umožnily až Kochovy agarové půdy, díky nimž se dala získat čistá kultura, a mohl začít zlatý věk bakteriologie. Ten byl naplněn studiem morfologie, fyziologie a genetiky bakterií zaměřený především na to, že výsledky studia prozradí o bakteriích vše.

Avšak dlouhou dobu nebylo známo, jak žijí bakterie v přirozeném prostředí. Objevila se tedy celá řada otázek. Žije každá buňka sama pro sebe, nebo je ovlivňována ostatními a sama ovlivňuje druhé? Uplatňuje se už i u bakterií nějaký systém funkční diferenciací?

Díky své fenotypové přizpůsobivosti představují bakterie nejúspěšnější formu existence života na Zemi. Mohou žít buď volně ve vodném prostředí jako plankton a/nebo ve společenství, které vytváří tenkou vrstvu na pevných tělesech, tj. biofilm [5].

Tloušťka biofilmu závisí na dostupnosti živin a na tom, zda je složen z jednoho či více bakteriálních druhů. Mnohem častější je přítomnost více druhů najednou; naopak v prostředí chemicky ovlivněném občas expanduje jen jeden druh, který měl schopnost se nejrychleji přizpůsobit. Naměřené hodnoty tloušťky biofilmu se pohybují od jednotek až do stovky mikrometrů. Biofilm není homogenní, skládá se z agregátů a četných dutin. Jsou to spleť, vzájemně propojené kanálky rozmanitého tvaru. Důležitá je i koncentrace rozpuštěných plynů v těchto kanálkách, zejména pak kyslíku důležitého pro společnou existenci bakterií aerobních (vyžadujících kyslík) a anaerobních (žijících bez kyslíku). Koncentrace kyslíku na povrchu biofilmu je nízká, o trochu hlouběji stoupá a dále do hloubky podle očekávání klesá, takže na původním povrchu je vesměs nulová. V různých vrstvách má biofilm navíc různý elektrický náboj, což pomáhá transportu živin [1].

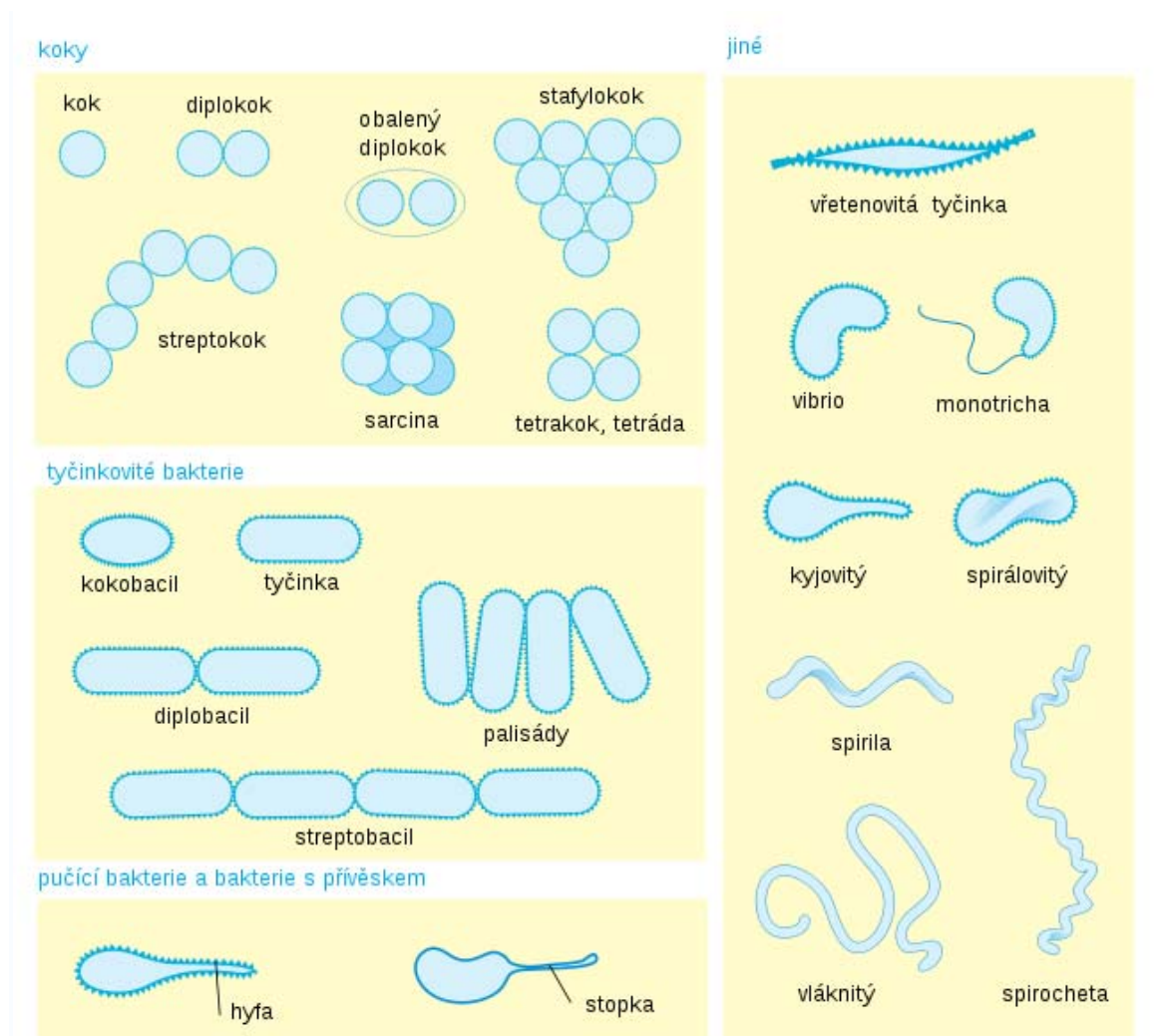
3. Složení biofilmů

3.1 Biofilmy tvořené bakteriemi

Bakterie (*Bacteria*), nebo také eubakterie (*Eubacteria*), je doména jednobuněčných prokaryotických organismů. Mívají kokovitý či tyčinkovitý tvar (viz obr.1) a zpravidla dosahují velikosti v řádu několika mikrometrů. Studium bakterií se zabývá obor tzv. bakteriologie.

Typickou součástí bakteriálních buněk je peptidoglykanová buněčná stěna, jaderná oblast (nukleoid), DNA bez intronů, plazmidy a prokaryotický typ ribozomů. U bakterií se nevyskytuje pohlavní rozmnožování. Místo toho se nejčastěji dělí binárně. Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě. Dříve se druhy bakterií klasifikovaly podle vnějšího vzhledu, avšak dnes jsou moderní zejména genetické metody klasifikace. Díky nim se dnes rozlišuje asi 25 základních taxonů bakterií.

Bakterie mají velký význam v oběhu živin a v mnoha případech vstupují do oboustranně prospěšných svazků s jinými organismy. Velká skupina bakterií patří mezi komenzálické druhy, které žijí např. v lidské trávicí soustavě. Na druhou stranu je známo i mnoho patogenních bakterií, tedy druhů, které způsobují infekce. Člověk mnohé z bakterií využívá, například v potravinářském a chemickém průmyslu a v biotechnologiích [6].



Obr. 1 Tvary bakterií [6]

3.1.1 *Staphylococcus*

Nejvýznamnějším stafylokokem tvořící biofilmy je *Staphylococcus aureus*. Bakterie *Staphylococcus aureus* způsobuje u lidí otravu z potravin – alimentární intoxikaci – tím, že se v potravě nahromadí za určitých podmínek toxické zplodiny jejich metabolismu - enterotoxiny.

Bakterie *Staphylococcus aureus* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní koky seskupené do hroznovitých tvarů. Jsou nejvýznamnějším patogenem rodu *Staphylococcus*, vyvolávají mnoho infekcí lidí i zvířat. *Staphylococcus aureus* produkuje 19 typů toxinů (typy A až U), přičemž nejúčinnější je typ A.

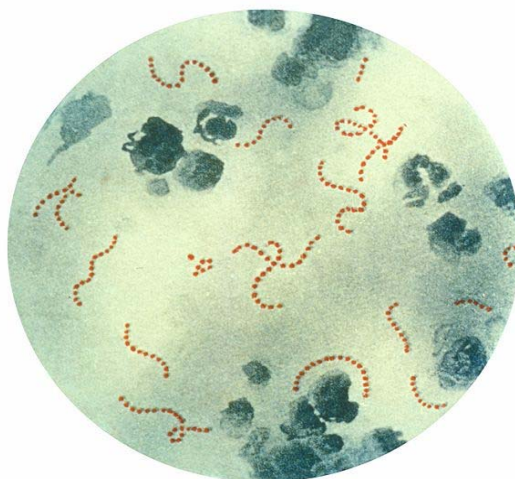
Vyskytuje se všude okolo nás, ve vzduchu, prachu i vodě. Je součástí mikroflóry nosní a ústní dutiny zvířat i lidí. Často bývá na kůži, kožních rankách a odřeninách. Infekce se

může přenášet rukama nebo kapénkami z úst i nosu. Odolává chladu, zahřátí nad teplotu 60 °C nepřežívá. Biofilmy se vytváří na potravinářských zařízeních, pracovních plochách atd.

Jeho toxiny však odolávají vyšším teplotám a ani var při 100 °C po dobu 20 minut je nezničí a mohou setrvat v tepelně zpracované potravíně beze změny. Bakterie *Staphylococcus aureus* byly zjištěny v různých typech potravin. Otrava, tzv. stafylokoková enterotoxikóza, nastává po požití silně kontaminované potravy, kde se bakterie pomnožila, přičemž vyprodukovala velké množství toxinů. Právě toxiny přítomné v potravě jsou příčinou této nemoci [7,8].

3.1.2 *Streptococcus*

Nejvýznamějším streptokokem tvořícím biofilmy je *Streptococcus pyogenes* (obr. 2), tvořící biofilmy na kloubních náhradách, katetrech atd. *Streptococcus pyogenes* je grampozitivní řetízkovitá bakterie, která může být původcem některých streptokokových infekcí. Způsobuje celou řadu nemocí, jako jsou např. různě silné infekce hrtanu, dále spálu, infekce kůže a podkoží, až po způsobení streptokokového toxického šoku, který je však dobře léčitelný antibiotiky na bázi penicilinu. Další možná léčba u alergiků na penicilin je možná tetracyklinem či erytromycinem. V případě těžkých forem, které mohou způsobit až nekrózu tkáně, je nutný chirurgický zásah [9,10].



Obr. 2 *Streptococcus pyogenes*, preparát tkáně, zvětšený pomocí mikroskopu 10 x 100 [9]

3.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli je fakultativně anaerobní gramnegativní bičíkatá tyčinkovitá bakterie žijící v tlustém střevě teplokrevných živočichů. Je jedním s nejdůležitějších zástupců střevní mikrobioty a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů ve střevě. Tvoří biofilmy v nádržích s pitnou vodou, jezerech a řekách.

Její přítomnost ve vodě indikuje fekální znečištění, které se může objevit buďto hned, nebo také až po 14 dnech, a tudíž vede k vyloučení vody pro použití jakožto pitné vody. Některé vzácnější kmeny *E. coli* jsou, nebo za určitých okolností mohou být patogenní a mohou způsobit různé zánětlivé stavy, jako např. zánět močového měchýře a řadu dalších závažných onemocnění.

E. coli (viz obr. 3) je používána jako důležitý modelový organismus v genetice a mikrobiologii, který je významný zvláště pro obecné modelové studium bakterií. Dále je pak významná jako nástroj používaný pro svou relativní jednoduchost v biotechnologiích, např. pro vnášení požadovaných úseků DNA (pro přípravu enzymů, inzulín,...), přenos rekombinantní DNA pomocí konjugace do jiných organismů (*Agrobacterium* v rostlinných biotechnologiích), apod. [8,11].



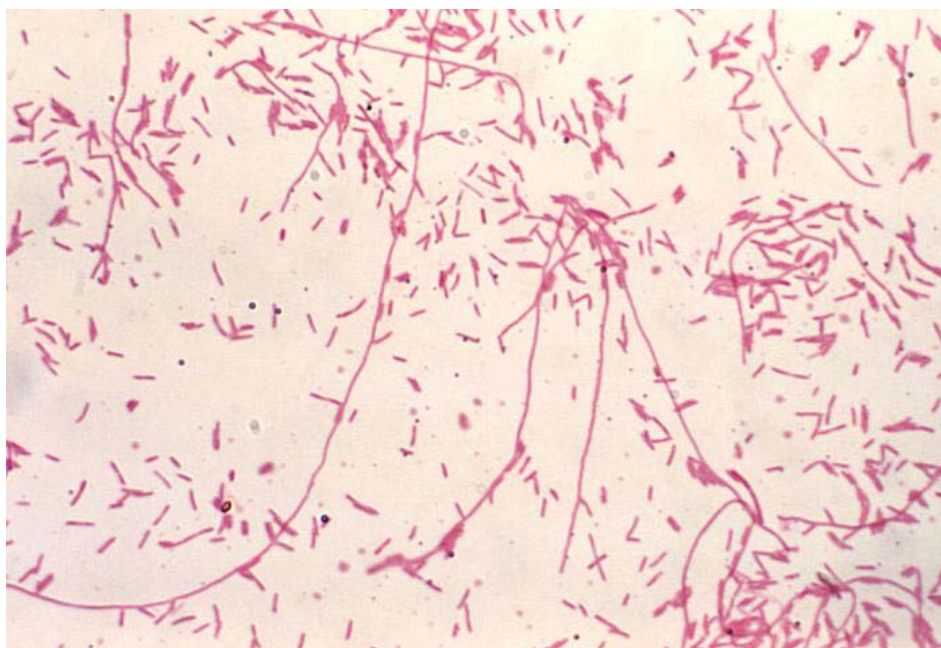
Obr. 3 *Escherichia coli* při zvětšení 10 x 100 po Gramově barvení [11]

3.1.4 *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila je gramnegativní, pohyblivá, nespíralující bakterie, která je tvořena štíhlými tyčkami, příp. vykazuje vláknitý charakter. Stěna obsahuje rozvětvené 2,3-dihydroxy - mastné kyseliny, které jsou charakteristické pro tento rod; nejsou přítomny u jiných bakterií.

Legionely rostou na půdě s obsahem aktivního uhlí pro detoxikaci peroxidů přítomných v půdě i vznikajících oxidací z cysteinu. Nejužívanější agarová půda je BCYE a je složena z kvasničného extraktu, zdroje cysteinu, z pyrofosfátu železitého a aktivního uhlí o pH 6,8 - 7,0. Jsou aerobní, vyskytují se přirozeně ve vodách, v přírodních vodních rezervoárech a ve vodách průmyslových. Závislost na cysteinu je hlavní znak určující příslušnost k čeledi. Teplotní rozmezí růstu je mezi 25 - 43°C, nerostou při teplotě 50°C a vyšší.

Legionely (obr. 4) mohou být původci smrtelných onemocnění u člověka, hlavně pak u pacientů se sníženou imunitou - tzv. legionelóza. Všechny legionely jsou potenciálně patogenní. Onemocnění vzniká většinou inhalační cestou. Zdroj nákazy je obsažen v životním prostředí v celé jeho šíři, tj. např. ve vodě jezer a nádrží, vodních tocích, v rozvodech teplé vody, ve sprchových hlavicích i v klimatizačním zařízení, kde tak vytváří biofilmy. Způsobují dva typy onemocnění, tj. tzv. Legionářskou nemoc nebo Pontiackou horečku [12,14].

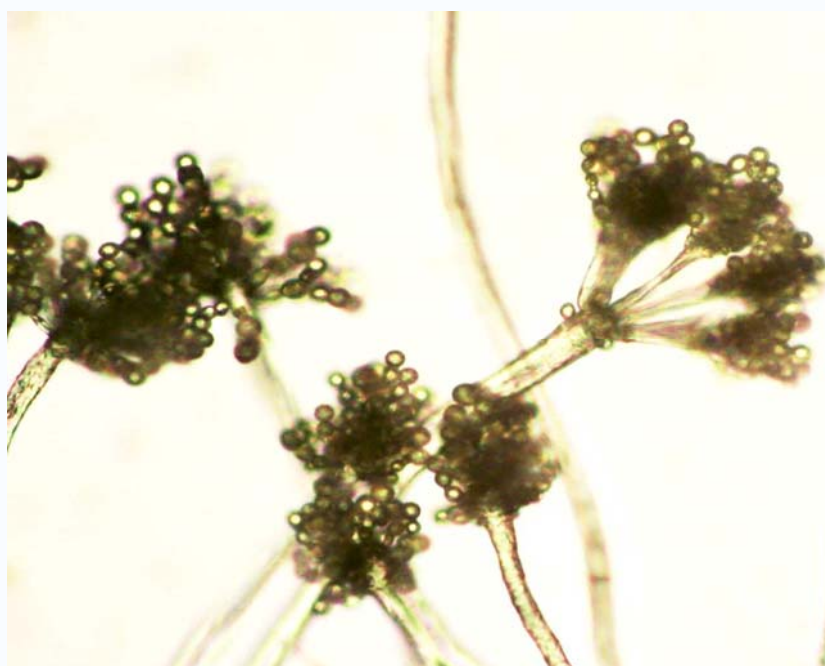


Obr. 4 *Legionella pneumophila* při zvětšení 10 x 100 po Gramově barvení [13]

3.2 Biofilmy tvořené plísněmi

Termín plíseň představuje nesystematické označení pro skupinu hub, které pokrývají povrch substrátu jemným bílým nebo barevným myceliem. Mezi plísně zahrnujeme fykomycety (pravé plísně) s rody *Absidia*, *Mucor* (plíseň hlavičková) a *Rhizopus*, vřeckaté houby (mj. s rody *Bysochlamys* a *Neurospora*) a *Fungi imperfecti* (houby nedokonalé) s rody *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* (viz obr.5), *Scopulariopsis*, *Sporotrichum*, *Stachybotrys* a *Trichothecium* a řadou dalších. Plísně jsou většinou saprofytické, mohou být užitečné (produkují-li antibiotika, organické kyseliny, příp. enzymy v průmyslovém měřítku) nebo škodlivé (působící mykózy lidí i zvířat, tvořící mykotoxiny, rozkládající potraviny a krmivo, kazící dřevo, kůži, papír, textilie aj.). Biofilmy tvoří hlavně plísně vyskytující se ve vodném prostředí, některé z nich např. fusaria způsobuje až ucpávání potrubí.

Různé druhy hub, které nazýváme plísněmi, jsou využívány ve farmaceutickém, chemickém i potravinářském průmyslu. Nejznámější je jistě využití druhu *Penicillium chrysogenum*, který produkuje známé antibiotikum penicilin. Jiné plísně jsou využívány v potravinářství, např. *Penicillium roqueforti* či *Penicillium camemberti*, jakožto kulturní plísně pro výrobu sýrů [15].



Obr. 5 Rod *Penicillium* zvětšený 10 x 40 pomocí mikroskopu [16]

3.3 Biofilmy tvořené kvasinkami

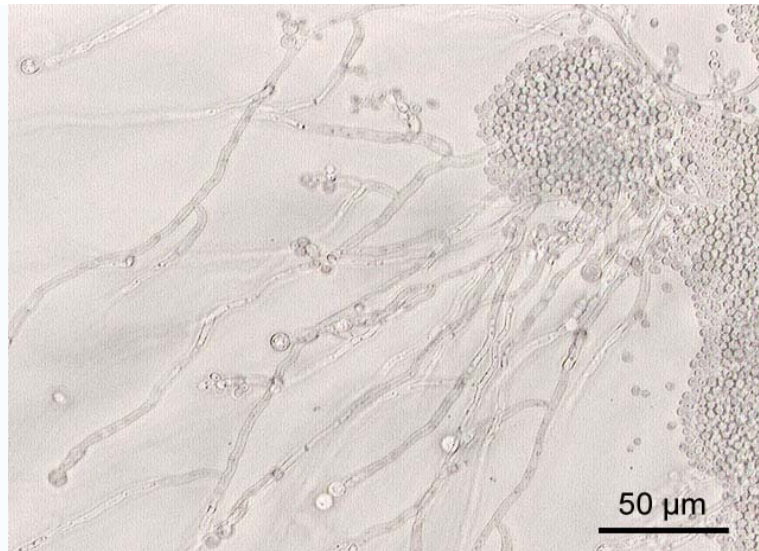
Kvasinky jsou jednobuněčné houbové mikroorganismy. Většina kvasinek patří do třídy vřeckovýtrusných hub, některé však i do třídy hub stopkovýtrusných, a proto společně netvoří taxonomickou skupinu. Netvoří plodnice, množí se zejména nepohlavně a je pro ně charakteristický způsob dělení buněk, tzv. pučení.

Kvasinky jsou hojně využívány v potravinářství a v biotechnologiích. Prvořadý význam mají dnes v kvasném průmyslu při výrobě lihu, piva, vína, pekařského droždí a také některých mléčných nápojů. V krmivářském průmyslu nabývají význam krmné směsi z kvasnic. Doposud jsou poměrně málo využívány pro potravinářské účely jako zdroj bílkovin a jiných biologicky cenných látek. Mají bohatý obsah dobře stravitelných bílkovin, cukrů a zejména komplexu vitamínu B, což platí zvláště pro pivovarské kvasinky. Ty se využívají i při léčbě nervových onemocnění, při zánětlivých kožních chorobách, při poruchách zažívacího traktu a jaterních chorobách.

Vedle převažujícího pozitivního významu existuje i negativní vliv kvasinek patogenních, či nevhodný výskyt kvasinek coby škodlivého kontaminantu ve výrobním procesu, jako je např. *Candida albicans*. S biofilmy se můžeme setkat v medicíně, kdy biofilm bývá příčinou chronických infekcí, neboť dokážou přežít i poté co jsou plaktonické formy (volně se pohybující) zlikvidovány např. vulvo vaginální kandidosa. Kvasinkový biofilm byl zkoumán teprve nedávno a předpokládá se, že se významně uplatňuje při infekci epitelálního povrchu. U vaginální infekce kvasinky vytvářejí smíšený biofilm s bakteriemi [17].

3.3.1 *Candida albicans*

Candida albicans (obr. 6) je druh kvasinky, jenž někdy u lidí způsobuje ústní a genitální houbové infekce. Je rovněž velmi častou příčinou nemocí a úmrtí u osob se sníženou imunitou (vlivem AIDS, chemoterapie, transplantace orgánů). Při infekci se do těla dostává obvyklá jednobuněčná kvasinková forma. Ta se však vlivem prostředí může změnit v invazivní mnohobuněčnou vláknitou formu [18,19].



Obr. 6 *Candida albicans* a její vláknité hyfy, zvětšení 10 x 40 [18]

3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (pivní kvasinka – viz obr. 7) je druh kvasinky z oddělení vřeckovýtrusných hub, která se již od antiky používá při kvasných procesech v pekařství a pivovarnictví. Předpokládá se, že byla izolována z tenkého biofilmu na slupkách hroznového vína. Pivní kvasinka je tedy logicky jedním z nejstudovanějších eukaryotních organismů z hlediska molekulární a buněčné biologie. Buňky *S. cerevisiae* jsou oválné až kulovité, o velikosti 5-10 mikrometrů. Pivní kvasinka se rozmnožuje speciálním typem dělení, které je typické pro kvasinky, tj. tzv. pučením. Pivní kvasinka byla prvním eukaryotním organismem, který byl osekvenován (byla přečtena jeho genetická informace zapsaná pomocí DNA) [20,21].



Obr. 7 *Saccharomyces cerevisiae* při pučení v mikroskopickém zvětšení 10 x 40 [20]

3.4 Biofilmy tvořené sinicemi

Sinice (*Cyanobacteria*) se vyznačují schopností fotosyntézy, při níž vzniká kyslík (tzv. oxygenní typ). Buňky sinic jsou jednobuněčné či vláknité, nejčastěji modrozeleně zbarvené a v mnohých ohledech typicky prokaryotické - obsahují kruhovou molekulu DNA, bakteriální typ ribozomů a chybí u nich složitější membránové struktury. Fotosyntetická barviva se nacházejí ve speciálních útvarech, fykobilizomech nebo tylakoidech.

K hlavním barvivům účastnícím se fotosyntézy patří chlorofyl *a* (někdy též *b*, *c*, nebo *d*) a dále allofykocyanin, fykocyanin, fykoerythrin, atd. Sinice se rozmnožují nepohlavně, a to buněčným dělením či fragmentací vláken. Vyskytují se hojně ve vodném prostředí (kde hojně mohou tvořit biofirmy, zejména v zařízeních na úpravu vod, v bazénech a rekreačních nádržích), ale i v půdě, a mnohdy také v extrémních podmínkách, jako jsou např. pouště či polární oblasti [22].



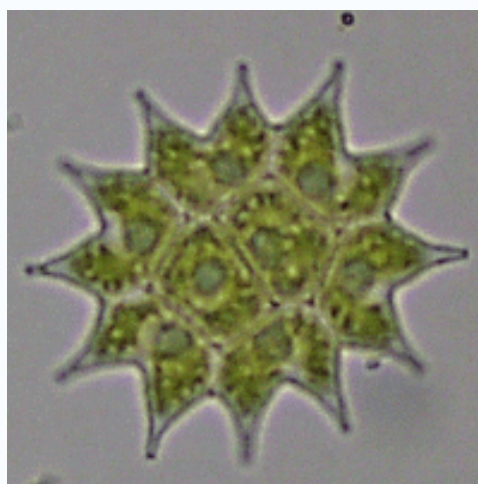
Obr. 8 *Anabaena flosaquae*, zvětšení 10 x 100 [22]

3.5 Biofilmy tvořené řasami

Zelené řasy jsou velkou skupinou nižších rostlin. Mají různé typy stélek - od mikroskopických jednobuněčných až po makroskopické. Mnohé z řas jsou relativně primitivní jednobuněčné organizmy s pouhým jediným endosymbiotizovaným plastidem. Avšak některé skupiny zelených řas vykazují zvyšující se úroveň vnitřní organizace. Jejich fotosyntetickými barvivy jsou chlorofyly *a* a *b*, α - a β -karoteny a xanthofyly.

Chloroplasty mají dvě obalné membrány a thylakoidy jsou uspořádány po dvou až šesti. Hlavní zásobní látkou je většinou škrob. Buněčná stěna je zpravidla na bázi celulózy (v některých případech však může chybět) nebo je nahrazena glykoproteinovou vrstvou. Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně.

Někteří zástupci jsou využíváni jako zdroj potravinářských barviv nebo přímo k výživě lidí i hospodářských zvířat. Řasy se využívají v potravinářství jakožto zahušťovadla, v mikrobiologii k přípravě agarů na ztužování živných půd a v elektroforetických metodách. Makroskopické zelené řasy se také často používají jako ozdobné rostliny v akváriích (obr. 9). Biofilmy řas se vyskytují na stejných místech jako biofilmy sinic. [23].



Obr. 9 *Pediatrum boryanum*, zvětšení 10 x 100 [23]

4. Význam biofilmů

4.1 Negativní vliv biofilmů

V současnosti je pozornost zaměřena zejména na odstranění problémů s biofilmy, které se v této souvislosti vyskytují – v lékařství jde především o endokarditidu (zánětlivé onemocnění srdečních chlopní a vnitřní výstelky srdce) a cystickou fibrózu. K jejím projevům patří opakované infekce dýchacích cest či vysoký obsah solí v potu. Velké procento dospělých mužů s cystickou fibrózou je neplodných.

Mikrobiální organismy, zejména pak bakterie, mají tendenci shlukovat se do složitých útvarů pokrývajících tenkou vrstvou jejich tělíček rozsáhlé povrchy (biofilm). Ve formě biofilmu obsahujícího milióny bakterií jsou bakterie více odolné před účinky antibiotik a způsobují celou řadu problémů lidskému imunitnímu systému. Zároveň mají za následek

nejrůznější průmyslové kontaminace, dále tzv. biofouling (vznik povlaků bakterií na površích ponořených do nejrůznějších tekutin, včetně vody) a biokorozi, která je problémem u historických památek, např. i ve zdivu Karlova mostu v Praze [1].

Problémy způsobené biofilmy [24]:

- Ucpávání náplní chladicích věží, potrubí a průchodů vody
- Zrychlená koroze
- Snížená účinnost přenosu tepla
- Zvýšené riziko tzv. legionářské nemoci

4.2 Pozitivní vliv biofilmů

Bakterie v biofilmech jsou ale také využívány ku prospěchu člověka. Podílejí se značnou měrou na samočisticí schopnosti potoků a řek, umějí snižovat znečištění půd a dokonce i produkovat elektřinu bez souběžné produkce dnes nepopulárního CO₂ [1].

V průmyslu jde o odstranění problémů spojených s biofilmy v čističkách odpadních vod, ale zároveň se biofilmy paradoxně využívají i v úpravách pitné vody.

4.2.1 Úprava podzemních vod na pitnou vodu

V přírodních podzemních a povrchových vodách využívaných ve vodárenství pro úpravu na vodu pitnou je relativně častý výskyt zvýšených obsahů amonných iontů. V současných podzemních vodách je nejčastějším zdrojem zvýšených koncentrací NH₄⁺ rozkládající se biomasa. Obvykle se koncentrace NH₄⁺ pohybují pod úrovní 0,5 mg l⁻¹, nejsou však výjimkou podzemní vody, v nichž obsahy amonných iontů překračují hodnoty 6 – 9 mg l⁻¹.

Přítomnost amonných iontů v upravované vodě významně snižuje účinnost hygienického zabezpečení chlorací v důsledku vzniku chloraminů. Za přítomnosti rozpuštěného kyslíku vznikají v síti bakteriální oxidací nežádoucí dusitany působící hygienickou nezpůsobilost upravené vody k pitným účelům. Z výše uvedených důvodů je nezbytné snížit obsah amonných iontů v upravené vodě, přičemž obecně lze využít celé řady technologií. K odstranění amonných iontů ze surové podzemní a povrchové vody lze použít fyzikálně-

chemické a biologické postupy. U prvé skupiny metod přichází v úvahu především iontová výměna a chemická oxidace [25].

Biologické metody čištění: Amonné ionty jsou oxidovány autotrofními nitrifikačními bakteriemi za přítomnosti ve vodě rozpuštěného kyslíku přes dusitany na dusičnany. Zjednodušeně lze chemickou bilanci vyjádřit rovnicí:



Reakce probíhá ve dvou stupních za přispění striktně aerobních autotrofních bakterií rodů *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrocystis* a *Nitrobacter*. Průběh dvoustupňové nitrifikační oxidace je podmíněn vhodným nosičem nitrifikační biokultury (biofilmu) a je přímo limitován koncentrací ve vodě rozpuštěného kyslíku, přičemž na nitrifikaci 1 mg NH_4^+ je třeba asi 3,55 mg rozpuštěného O_2 . Vzhledem k tomu, že koncentrace ve vodě rozpuštěného kyslíku je při teplotě podzemní vody (a v rovnováze se vzduchem) omezena na rozmezí $\approx 9 - 11 \text{ mg l}^{-1}$ a kritická koncentrace O_2 nezbytná pro průběh biofilmové nitrifikace je $2,0 - 2,5 \text{ mg l}^{-1}$, pak technologiemi pracujícími s jednoduchým systémem sycení surové vody vzduchem lze odstranit nejvýše $\approx 2,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_4^+$. Při nedodržení kritických požadavků probíhá nitrifikace obvykle pouze do 1. stupně za zvýšené tvorby nežádoucích dusitanů. V porovnání s fyzikálně-chemickými postupy (iontové výměně, chemické oxidace) je provozování biofilmové nitrifikace bezpečné a méně nákladné. Problémem je však stechiometrické omezení dané rozpustností vzdušného kyslíku v případě, že je nezbytné odstraňovat koncentrace amonných iontů vyšší než $2,5 \text{ mg l}^{-1}$. Vzhledem k tomu, že zvýšením parciálního tlaku kyslíku, např. dávkováním plynného O_2 , by vedlo k intoxikaci biofilmu, je nezbytné kyslíkovou bilanci řešit při normálním atmosférickém tlaku technickým uspořádáním nitrifikačního systému [25].

V zásadě lze biofilmovou nitrifikaci podzemních nebo povrchových vod s vysokým obsahem NH_4^+ technicky řešit:

- *recirkulací upravené vody*
- *vícestupňovým provzdušněním*
- *kontinuálním provzdušňováním*

V případě technického řešení biofilmové nitrifikace recirkulací, je část upravené vody směřována před provzdušňovačem s vodou surovou a tak dochází k jejímu naředění na mez zvládnutelnou jednostupňovým systémem. V tomto uspořádání je nezbytné zařadit

vyrovnávací akumulaci, z níž je čerpána upravená voda jak do sítě, tak k recirkulaci, což je v současnosti energeticky nákladné. Vícestupňový systém zahrnuje sériově řazené provzdušňovače a bioreaktory, obvykle opět s meziakumulací pro přečerpávání. Ovládání akumulací je složité, přečerpávání opět energeticky relativně nákladné. Technologicky pravděpodobně nejefektivnější uspořádání biofilmové nitrifikace je kontinuálně provzdušňovaný biofilmový reaktor (soproudem, protiproudem). Upravovaná voda prochází bionitrifikačním reaktorem, který je kontinuálně sycený stechiometrickým přebytkem vzdušného kyslíku, přičemž nitrifikační spotřebovaný kyslík se průběžně doplňuje z dosud nerozpuštěného přebytku. Biofilmový reaktor lze řešit jako klasické filtrační lože nebo jako fluidní systém. Značnou úsporu pořizovacích nákladů představuje menší nárok na separační plochu bioreaktoru (více než o polovinu nižší ve srovnání s předchozími variantami řešení) [25].

4.2.2 Technologie výroby potravin

Je všeobecně rozšířen názor, že mikroorganismy se podílejí na zkáze potravin a tvorbě toxických látek v potravinách. Již méně je však známo, že mimo tyto škodlivé bakterie (patogeny) existují rovněž mikroorganismy, které příznivě ovlivňují chuťové vlastnosti potravin.

Mikroorganismy jsou často považovány výhradně za škodlivé organismy a vůbec nejsou brány v úvahu i jejich vlastnosti, které se v mnoha případech uplatňují při výrobě různých potravin i při ovlivňování tělesných funkcí. Tak např. při trávicích pochodech se uplatňují mikroorganismy přítomné ve velkém množství v zažívacím traktu.

Účinkem mikroorganismů získávají fermentované potraviny požadované chuťové i technologické vlastnosti. Do této skupiny patří chléb, jogurty a sýry běžné v Evropě a Severní Americe, zatímco potraviny v Africe, připravované z fermentovaných škrobnatých plodin, tvoří důležitou součást místních pokrmů. Výrobky připravované na bázi fermentovaných sojových bobů nebo ryb jsou v Asii konzumovány denně. Fermentované nápoje zahrnují nejen alkoholické nápoje, ale i čaj, kávu a kakao, kde listy nebo boby jsou po sklizni podrobeny fermentaci, přičemž dochází k tvorbě charakteristických chutí a vůní. Některé potraviny lze rovněž fermentací upravit tak, že jsou výživnější, chutnější a stravitelnější. Fermentace se rovněž může podílet na zvýšení údržnosti potravin a omezuje tak nutnost jejich mrazení nebo použití jiných

konzervačních metod náročných na spotřebu energie. Nejznámějšími mikroorganismy, které jsou spojovány s výrobou potravin a nápojů, jsou kvasinky. Uplatňují se při výrobě chleba a pečiva, kde mají hlavní úlohu při zajištění požadované houbovitě struktury a tvorbě alkoholu, který vzniká z cukrů. Objev funkce kvasinek v těchto procesech byl zcela jistě náhodný, v současné době jsou připravovány speciální kultury kvasinek, které jsou využívány při výrobě potravin. Druhým nejdůležitějším oborem fermentačního průmyslu (po výrobě alkoholických nápojů) je výroba fermentovaných mléčných produktů. Například sýry jsou vyráběny po celém světě. Základem je fermentační přeměna mléčného cukru (laktosu) na kyselinu mléčnou účinkem bakterií mléčného kysání. Tento proces přispívá k vývoji žádoucích sensorických vlastností a má důležitou funkci při zabránění zkázy potravin a při inhibici růstu patogenních mikroorganismů. I v tomto případě byla úloha mikroorganismů ve výrobě mléčných produktů objevena před mnoha lety náhodně a postupně byly vyvinuty průmyslové výrobní postupy. Nyní je hlavním úkolem fermentačního průmyslu v mlékárenství dodávat stabilní kmeny bakterií, které se uplatňují v průmyslové velkovýrobě mléčných fermentovaných výrobků.

Existuje mnoho dalších způsobů využití bakterií mléčného kysání. Uplatňují se jako užitečné bakterie v probiotických kulturách v potravinových doplňcích a zvyšují účinnost normální mikroflóry přítomné v trávicím systému. Na řadě míst se mohou tvořit mikrobiální biofilmy řady společenstev (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, a další). S biofilmem se můžeme setkat na povrchu řady materiálů, dokonce na nerezové oceli, teflonu, různých polymerech a i na skle [26, 27].

5. Biofilmy ve vodním hospodářství

5.1 Řeky a jezera

Biofilmy jsou celosvětovým problémem. Největší hrozbou, konkrétně v rekreačních nádržích, jsou biofilmy tvořené nejčastěji různými typy sinic. Tyto slizovité povlaky se tvoří nejčastěji na povrchu hladiny, nebo na okraji břehů ve formě nazelenalé pěny. Tento, tzv. přírodní indikátor, je důkazem znečištění vody, ale také její vysoké hodnoty CHSK5 (chemická spotřeba kyslíku za pět dní). Tento jev je pozorován nejčastěji v teplých letních dnech při velké vytíženosti těchto nádrží. Velkým rizikem jsou následně kožní choroby či jiné alergické reakce. Nelze také opominout nedostatečné okysličování vody, což vede k částečnému zničení vodního ekosystému. K likvidaci těchto

mikroorganismů se používá různých prostředků, ať už na bázi fyzikální či chemické. Problémem při použití těchto metod je neúmyslná úprava genetické informace v plazmidech některých jedinců, kteří předali tuto informaci další generaci buněk a ty se poté staly na tuto látku, příp. metodu, rezistentní. Jako nejvýhodnější se v současné době jeví metoda na bázi elektrického proudu, který poškodí buněčnou stěnu sinice a dojde k jejímu zániku (úhynu).

5.2 Nádrže s pitnou vodou

Tato místa jsou nejvíce kontrolovanými oblastmi, jelikož se jedná o zdroje pitné vody. Pitná voda je dle definice taková voda, která je zdravotně nezávadná a ani při trvalém používání nevyvolá onemocnění nebo poruchy zdraví, a to přítomností mikroorganismů nebo látek ovlivňujících akutním, chronickým či pozdním působením zdraví fyzických osob a jejich potomstva, jejíž smyslově postižitelné vlastnosti a jakost nebrání jejímu požívání a užívání pro hygienické potřeby fyzických osob. Biofilmy nejčastěji tvoří plísně, pseudomonády, enterokoky [28,29].

5.2.1 Parametry některých mikroorganismů [28]:

Je důležité na tomto místě zdůraznit, že u pitné vody se nesleduje obsah patogenních mikroorganismů (např. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*...), ale počty těchto druhů či skupin:

- ***Escherichia coli* (EC)**
 - platí NMH
 - je indikátorem čerstvého fekálního znečištění
- **Koliformní bakterie (KB)**
 - platí MH
 - je indikátorem celkového fekálního znečištění
- **Enterokoky (EK)**
 - platí NMH
 - je indikátorem fekálního znečištění
- ***Pseudomonas aeruginosa* (PA)**
 - platí NMH
 - způsobuje hnisavé procesy
 - důrazně se sleduje u balených vod určených pro kojence
- **Počty kolonií při 36 °C (K36)**
 - platí MH; u balené vody NMH
 - zdrojem jsou nejčastěji výkaly, dále půda, rostliny, prach, atd.
- **Počty kolonií při 22 °C (K22)**
 - platí MH; u balené vody NMH
 - zdrojem jsou nejčastěji výkaly, dále půda, rostliny, prach, atd.

➤ ***Clostridium perfringens* (CP)**

- platí MH
- patogen, působící na kvalitu pitné vody při přípravě z povrchové

MH – mezní hodnota. Její překročení nepředstavuje akutní zdravotní riziko. Je nutné však provést úpravu vody.

NHM – nejvyšší mezní hodnota, která nesmí být překročena. Pokud dojde k jejímu překročení, nejedná se o pitnou vodu.

5.2.2 Parametry pro bakterie rodu *Legionella*

Podle vyhlášky ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na pitnou a teplou vodu pro zdravotnická pracoviště, kde jsou hospitalizováni pacienti se sníženou imunitou, se požaduje v 50 ml každého vzorku teplé vody 0 buněk legionel. Pro nemocnice a ostatní ubytovací zařízení platí mezní hodnota ve 100 ml každého vzorku teplé vody 100 buněk legionel. Tato hodnota je v ČR doporučena pro ostatní odběratele pitné vody, a proto je nutné o tuto hodnotu pomocí technických opatření dodržovat. Nebezpečí hrozí v rozvodech teplé vody, v hadicích, ve filtrech zvlhčovačů vzduchu. Legionela je jednou z hlavních příčin nozokomiálních nákaz (nákazy v nemocnicích) [31].

6. Metody používané pro stanovení mikrobiálních biofilmů

Tradiční mikrobiologické techniky a mikroskopické metody nejsou dostatečně účinné pro studium mikrobiálních společenstev, jako např. biofilmů. Důvodem tohoto omezení je obtížnost vytvoření podmínek, které jednotlivé druhy potřebují k růstu v jejich přirozeném prostředí. V mikrobiálních biofilmech se často setkáváme s různými zástupci (houby, bakterie), které často vyžadují odlišné metody stanovení. V poslední době se staly populárními především molekulárně-biologické techniky, které vyžadují izolaci bakteriálních kmenů a jsou nyní stále více využívány k detekci a charakteristice bakterií v přírodních a člověkem vytvořených prostředích. Metody používané ke studiu mikrobiálních biofilmů jsou pak podobné těm, které se používají při hodnocení mikrobiálních populací. Metody dělíme na přímé a nepřímé a tyto lze dále dělit na metody, které zaznamenávají všechny a/nebo pouze živé mikroorganismy. Základem je

zachování podmínky pro daný mikroorganismus (charakteristická živná půda, teplota, pH, anaerobní či aerobní prostředí) [32].

6.1 Metody pro stanovení hub (mikromycety) [32]

- *Přímé mikroskopické pozorování charakteristických spor, tj. hypnomycet*
- *Metoda návnad*
- *Metoda kultivací*
- *Biomasa hyf*
- *Analýza chitinu*
- *Analýza ergosterolu + produkce hub*
- *Monoklonální protilátky*

6.2 Metody pro stanovení bakterií [32]

- *Elektronový mikroskop (SEM)*
- *Přímé epifluorescenční počty (AO, DAPI)*
- *Živé počty (kultivace, autoradiografie, INT, MTT, TTC, TB, FDA)*
- *PCR + Hybridizace in situ*
- *Inkorporace ³H-thymidinu, ³H-adeninu, ³H-leucinu, ¹⁴C-leucinu*

6.3 Metody pro stanovení mikrobiálních společenstev [32]

- *Extrakce EPS*
- *Stanovení sacharidů*
- *Stanovení TOC a proteinů*
- *Koncentrace ATP*
- *Spotřeba kyslíku*
- *Utilizace ¹⁴C*
- *ETS aktivita*
- *Enzymatická aktivita*
- *Inkorporace ³²P-H₃PO₄ a 1-¹⁴C-octanu sodného do lipidů*
- *Kyselina muramová*
- *Lipopolysacharidy*
- *Fosfolipidy*

- *Mastné kyseliny*
- *Mikroelektrody (mikroozonace pH, Eh, O₂, plynů aj.)*

7. Odstraňování biofilmů ve vodovodních systémech

Biofilmy jsou pro patogenní substance ideální živnou půdou a mohou být příčinou závažných hygienických problémů zejména ve vodovodních systémech. Rovněž zvířata přijímající vodu infikovanou biofilmem jsou permanentně vystavena zdravotnímu riziku. Nejvýznamnější jsou biofilmy vytvořené legionelami [33].

V dalším textu je uveden výčet postupů, které jsou v současné době k dispozici a které by mohly (byť i krátkodobě) zajistit výše uvedený požadavek přijatelné redukce legionel a kontroly jejich růstu v síti. Jedná se především o dezinfekci zvýšenou teplotou, ionizací těžkými kovy Ag/Cu, aplikaci Cl₂, ClO₂, chloraminu, O₃, UV zářením [34].

7.1 Termodynamická dezinfekce

Podstatou je periodické zvyšování teploty po určitou dobu v celé síti teplé vody včetně výtokových míst s určitou dobou proplachu těchto míst při zvýšené teplotě. Podstatná je výše teploty a doba proplachu.

Často se kombinuje použití termodezinfekce s chlorací, Ag/Cu ionizací či jiným suplementárním (doplňujícím) prostředkem. Žádný však neumožní totální eliminaci mikroorganismů, a to především legionel ze systému [34].

7.2 Ag/Cu ionizace

Ag/Cu ionizace představuje další používaný systém pro kontrolu a redukci legionel. Využívá působení těžkých kovů na mikroorganismy. Zatímco Ag působí spíše na syntézu enzymů a proteinů v buňce, Cu ovlivňuje propustnost buněčné membrány.

Výhodou ionizace proti termodesinfekci (či chloraci) je vyšší účinnost a delší protektivní účinek, což je dáno schopností penetrace Ag a Cu do biofilmů. Koncentrace 400 µg l⁻¹ Cu + 40 µg l⁻¹ Ag výrazně snižuje denzitu legionel, po 1 měsíci dochází k poklesu pozitivitu na výtocích k hodnotě 0 % z 60 až 80 %, zatímco koncentrace ≤ 300 + 30 µg l⁻¹ Cu/Ag tento efekt redukce nevykazují a ani nedochází k žádným změnám positivity. Při aplikaci

nižších koncentrací může docházet i k adaptaci mikroflóry biofilmů na Ag a Cu. Na začátku zásahu se obvykle volí koncentrace 400 až 800 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cu + 40 až 80 $\mu\text{g l}^{-1}$ Ag k razantní eliminaci legionel; jako udržovací koncentrace pak 5 až 20 + 50 až 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ Ag/Cu [34].

7.3 Chlorace

Chlorace a zejména její varianta hyperchlorace je další z možností redukce legionel v distribuční síti. Pro dosažení účinku musí být prováděna kontinuální chlorace v rozmezí 4 až 6 mg l^{-1} aktivního chloru, nebo šoková dezinfekce s 20 až 50 mg l^{-1} v celém rozvodu po dobu 1 až 2 h. Koncentrace aktivního chloru při kontinuálním dávkování nesmí poklesnout pod 4 mg l^{-1} . Často se v praxi používá koncentrace jen 1 až 2 mg l^{-1} z důvodů menší koroze potrubí a jiných vedlejších produktů chlorace.

K inaktivaci legionel ve volné vodě v potrubí postačí 0,4 mg l^{-1} ; to však neplatí pro biofilmy, sedimenty nebo cysty améb a jiných prvoků, které bývají hostiteli legionel. Jejich rezistence k teplotě a chloru je velmi vysoká. Zásah v rozvodné síti pitné vody, kontaminované legionelami a tím i jinými mikroorganismy (mykobakterie, viry, *Pseudomonas aeruginosa*, protozoa aj.) je vždy i zásahem proti mikroorganismům v biofilmech, inkrustech, event. i sedimentech, tedy proti systémům vyskytujících se v rozvodu ať teplé či studené vody jako celku [34].

7.3.1 Použití monochloraminu

V poslední době se uvažuje i o případném využití monochloraminu ke kontrole legionel v rozvodné síti. V teplých krajinách (Jižní Austrálie) se používá jeho koncentrace 1,5 mg l^{-1} k prevenci výskytu améb v síti.

Hlavní výhodou chloraminu jsou jeho delší reziduální účinky oproti chloru, vyšší stabilita, a to i za zvýšené teploty, schopnost průniku do biofilmů i v málo průtočných a vzdálených částech rozvodné sítě. Při aplikaci monochloraminu byl zjištěn nižší výskyt legionelózy, než v případě chloru, dle literárních údajů až 10x nižší než u chlorovaných rozvodných systémů [34].

7.3.2 Použití chlórdioxidu

Podobně jako v předešlém případě jistou novinkou je snaha využít ClO_2 k redukcí legionel v distribuční síti pitné vody, a to jak studené, tak i teplé. ClO_2 vykazuje též prodloužený reziduální účinek, což neplatí v případě Cl_2 , O_3 , ani termodezinfekce či UV záření.

Chlórdioxid se vyznačuje schopností atakovat biofilmy a pronikat do málo cirkulujících částí rozvodů, kde se právě nachází potencionální inokulum pozdější rekolonizace (možný zdroj opětovného osídlení). Nereaguje s dusíkatými sloučeninami, netvoří THM, účinek nezávisí na pH, odstraňuje inkrusty v rozvodech, je vysoce účinný proti různým typům mikroorganismů v koncentraci $0,2 \text{ mg l}^{-1}$.

Koncentrace $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ působí inhibičně (potlačí schopnost růstu) i na cysty améb a tak odstraňuje jejich ochranný efekt v rozvodné síti. Zbytková koncentrace ClO_2 by měla být max. $0,3 \text{ mg l}^{-1}$, lépe $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ s ohledem na prahovou hodnotu jeho senzoričského působení a zejména na toxické působení chloritanů jako vedlejšího produktu dezinfekce – celková koncentrace chlórdioxidu, chloritanů a chlorečnanů by se měla pohybovat do hodnoty $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ [35].

7.4 Použití UV záření

Použití UV záření, které působí jiným mechanismem, než chemická či termická dezinfekce, představuje další možnost zásahu proti mikroorganismům. I když toto záření nemá reziduální účinky a neproniká do biofilmů, má výhodu v tom, že netvoří vedlejší produkty dezinfekce, není ovlivněno teplotou ani turbiditou za běžných podmínek v síti, nemění charakter vody, neškodí materiálům rozvodů a snadno se instaluje.

S ohledem na možnou reparaci vitality mikroorganismů nutno použít typ polychromatických UV lamp s dávkou 30 mJ cm^{-2} . Polychromatické záření znemožní obnovu poškozených buněk inaktivací enzymů a proteinů zodpovědných za obnovu původní populace reversibilně poškozených mikrobů.

Zařízení musí být umístěno těsně před odběrová místa ze sítě (baterie, kohouty, sprchy), průběžně provozované, příp. ve spojení s filtry ochrání před osídlením mikroorganismy. Je vhodné jako primární i doplňkový prostředek. Vhodné je kombinovat tuto metodu

např. s tepelnou dezinfekcí, zařízení potřebného výkonu umisťovat na vhodná místa rozvodu pro snížení dávky legionel v následujících úsecích či kombinovat je s filtry před místy odběru ze sítě [34].

7.5 Použití ozonu (ozonifikace)

Ozon je nejúčinnější dezinfekční prostředek, vysoce reaktivní, inaktivující široké spektrum mikroorganismů. Nevykazuje však reziduální účinky, rychle se rozkládá, váže se příslušnými reakcemi s organickou i anorganickou hmotou, mikroby, a proto nepostihuje vzdálená místa sítě, takže je třeba jej kombinovat např. s chlorací nebo termodezinfekcí.

V koncentraci 0,3 až 0,4 mg l⁻¹ zastavuje růst buněk bakterií i virů; koncentrace 0,4 mg l⁻¹ vede k destrukci cyst. Účinná je koncentrace 1 až 2 mg l⁻¹ i proti biofilmům.

V praxi se dává přednost spíše Ag/Cu ionizaci, termodezinfekci či hyperchloraci, nebo kombinovanému působení dezinfekčních prostředků a postupů [34].

7.6 Použití tlakových membránových procesů

Membránová technologie představuje kombinaci konvenčního aktivačního procesu a velmi účinné separace pevné (aktivovaný kal) a tekuté fáze (vyčištěná odpadní voda). Mechanicky předčištěná odpadní voda je provzdušňována, biologicky čištěna a posléze pomocí membrán zbavena všech pevných látek, které mají větší velikost než je velikost pórů membrán. Do permeátu tak mohou proniknout ze separovaného média pouze ty částice, které mají rozměr menší než je průměr pórů.

Tento systém slouží k aktivačnímu aerobnímu mikrofiltračnímu čištění odpadních vod z objektů, které není možné (a/nebo výhodné pro svoji polohu) připojit na kanalizační systém. K těmto objektům patří např. rodinné domy, bytová zařízení obytných lokalit, rekreační zařízení, hotely, autokempinky atd., kdy je uvažováno s hodnotou BSK₅ 60 g/den a množstvím odpadních vod 150 l/den [36].

➤ *Výhody membránové technologie* [36]

Za předpokladu dobře navrženého biologického stupně čištění je možné uvést tyto výhody membránové technologie:

- nahrazení prostorově náročných dosazovacích nádrží
- zvýšením koncentrace aktivní biomasy na 12 - 16 g l⁻¹ může být výkonnost stávajících konvenčních čistíren zvýšena bez nároku na zvětšení objemu nádrží
- při instalaci nedochází k zvětšování objemů nádrží, není nutné ani rozšiřování systémů o přídatnou aktivaci, dosazovací nádrže nebo filtrační zařízení
- kvalita odtoku (permeátu) je na takové úrovni, že umožňuje jeho zpětné využívání (např. závlahy, mytí, umělá jezera). Vzhledem k velikosti pórů membrán dochází k zadržení všech bakterií a částečně i virů, které nelze odstranit sedimentací v dosazovacích nádržích
- na rozdíl od dosazovacích nádrží není účinnost separace příliš ovlivňována vlastnostmi aktivovaného kalu, což eliminuje problémy související převážně s výskytem vláknitých mikroorganismů
- díky vyšší koncentraci biomasy klesá zatížení kalu a tedy i produkce přebytečného kalu. Pokud by zatížení kleslo pod určitou hranici, produkce kalu by se úplně zastavila. Navíc dochází k jeho částečné aerobní stabilizaci
- vyšší stáří kalu a vyšší koncentrace kalu umožňují odstraňování i biologicky těžko rozložitelných látek
- účinnost čištění není podmíněna dobrou flokulací; naopak lze využít disperzního růstu s vysokými jednotkovými rychlostmi dějů
- provoz membránových reaktorů je poměrně jednoduchou záležitostí na rozdíl od provozu gravitačních dosazovacích nádrží
- membránové bioreaktory jsou modulární, což znamená, že velikost a počet řad mohou být upraveny tak, aby byla pokryta potřeba dané obce (obr. 10)



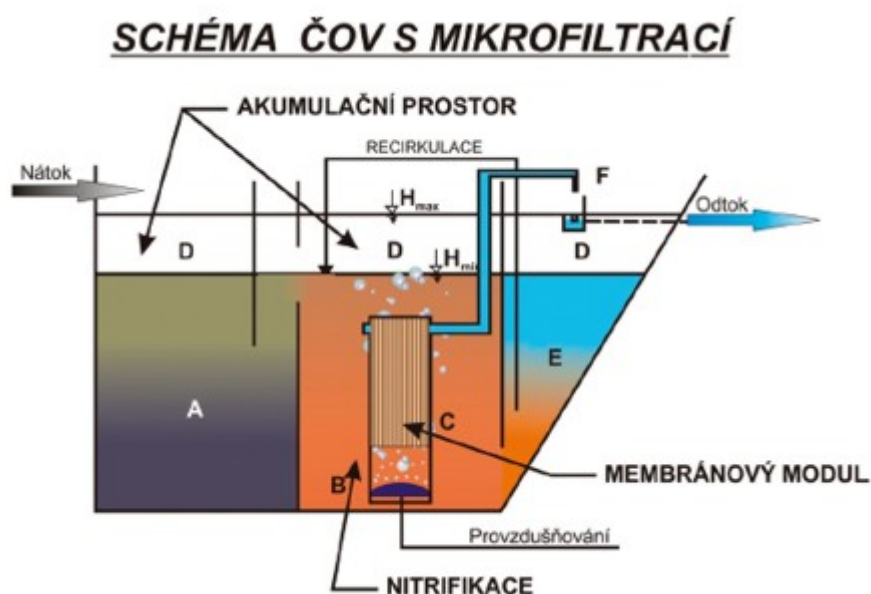
Obr. 10 Snímek membránového modulu FM 663 [36]

➤ **Popis procesu:**

Odpadní voda natéká do usazovací části ČOV, která slouží zároveň i jako zásobník přebytečného kalu. Zde jsou zachyceny sedimentující a plovoucí nečistoty, které jsou dále podrobeny anaerobnímu rozkladu (hydrolyze). Z usazovacího prostoru natéká přepadem již mechanicky předčištěná voda do aktivačního prostoru, kde je umístěn mikrofiltrační modul. Aktivační prostor slouží k biologickému čištění odpadní vody a mikrofiltraci přes membrány. Tento prostor je ve spodní části osazen distributorem vzduchu, který slouží k provzdušnění nádrže a také k čištění membrán, do kterých je vháněn vzduch pomocí dmyhadla. Výhodou řešení u ČOV VARIOcomp Ultra je akumulací prostor v celém prostoru aktivace čistírny, který je určen k akumulaci odpadní vody a k zabezpečení zrovnoměrnění odtoku z čistírny. Aktivovaná směs z aktivace je pod tlakem separována přes mikrofiltrační membrány do odtoku. V případě vyřazení funkčnosti modulu, natéká směs do vertikální dosazovací nádrže, kde dochází k sedimentaci vytvořených kalových vloček a následně k odtoku vyčištěné vody odtokovým žlabem. Zahuštěný kal se ze spodní části dosazovací nádrže vrací automaticky zpět do aktivace. Část aktivovaného kalu z aktivace je jako přebytečný kal odtahována do kalové nádrže (obr. 11). Technologie čištění odpadních vod řeší nerovnoměrný hydraulický i látkový nátok na ČOV a je proto zárukou stability procesu čištění [36].

Čištění membrán – regenerace:

K zajištění kontinuálního a stabilního odtoku je nutné membrány pravidelně čistit - regenerovat. Po určité době, tj. přibližně jednou ročně, dochází při provozu k poklesu rozdílu tlaku nad a pod membránou, což se projevují postupným snižováním rychlosti odtoku vyčištěné odpadní vody ze systému. Pokles výkonu membránového zařízení je způsoben postupným zanášením membrány, a to jednak vytvářením filtračního koláče na jejím povrchu při biologickém čištění odpadních vod, jednak zanášením pórů membrány drobnými částicemi. Pokles této hodnoty indikuje potřebu regenerace separační membránové jednotky [28].



Obr. 11 Schéma čištění odpadních vod pomocí mikrofiltrace [36]

A - usazovací a kalový prostor, B - membránový modul, C - aktivace, D - akumulací prostor, E - dosazovací prostor, F – odtok

8. Biotechnologie a membránové bioreaktory

Biotechnologie představují soubor výrobních, procesních a servisních postupů, které jsou založeny na využití látkové přeměny živých systémů všech typů (tedy nejen živých systémů buněk mikroorganismů, ale i buněk rostlin a živočichů, a to od buněčné úrovně až po jejich biologicky aktivní látky).

Podnětem k prudkému rozvoji biotechnologií jsou současné možnosti cíleného, produkčně zaměřeného ovlivňování a programování dědičných vlastností buněk

mikroorganismů a výhledově i možnosti cíleného, produkčně zaměřeného ovlivňování dědičných vlastností buněk rostlin a živočichů prostřednictvím nových technik manipulace dědičným materiálem, založené na principech buněčného a genového inženýrství. Možnosti těchto technik jsou znásobovány ve spojení s technikami enzymového inženýrství, jež spočívají na pracovním využití živých systémů a jejich biologický aktivní komponent, zakotvených na vhodných nosičích, i ve spojení s technikami produkčně zaměřené velkokapacitní kultivace nejen buněk mikroorganismů, ale i buněk živočišných a rostlinných. K rozvoji biotechnologií přispívá i uplatnění poznatků procesního a systémového inženýrství a soudobé techniky, které jsou zaměřeny na automatizaci a optimalizaci biologických výrobních procesů. Průmyslově se biotechnologie využívají v mikrobiálních fermentačních technologiích, které jsou spolu s novými biotechnologickými technikami i základním výrobním nástrojem moderní aplikované mikrobiologie.

Biotechnologie jsou zaměřeny na výrobní buněčné hmoty (mikroorganismů, rostlin a živočichů) a na zpracování biomasy, zejména rostlinného původu (fytomasy), jako na nevyčerpatelný samoobnovitelný zdroj základních i speciálních složek krmivářských a potravinářských, látek významných pro lékařství, chemii, rostlinnou a živočišnou výrobu, ochranu životního prostředí i energetiku.

K biotechnologiím patří i soubor technologických postupů izolace, čištění a ekonomického výhodného zhodnocování mnoha látek živé i neživé přírody i látek umělých na společensky významné produkty uplatňující se v zemědělství, a to jak ve sféře týkající se výživy, tak i ve sféře energetické. Biotechnologie mají prvořadý význam pro farmaceutický a kosmetický průmysl a začínají se uplatňovat i jako zdroj základních surovin také na úseku těžké chemie.

Na úseku lehké chemie se biotechnologie uplatňují při speciálních chemicko-biologických syntézách a začínají se používat i při výrobě bioplastů neznečišťujících životní prostředí a v petrochemii. Biotechnologie slouží také v oblasti potravinářské výroby i při biologickém zpracování a zhodnocování rud při biometalurgické těžbě, zejména mědi a uranu. Biotechnologie jsou podnětem i pro rychlý rozvoj specializované strojní výroby na úseku bioinstrumentalistiky, tj. v konstrukci a výrobě buněčných kultivátorů, enzymových reaktorů a speciálních přístrojů pro analýzu a syntézu přírodních látek. Rozvoj biotechnologií podmínil vznik nového výzkumného a výrobního úseku informatiky, tzv.

bioinformatiky, zaměřené na automatickou registraci funkčních projevů živých systémů ve zdraví i nemoci.

Biotechnologie jsou obecně energeticky málo náročné, protože probíhají nejčastěji při teplotě těla použitých produkčních živých systémů a jejich výrobní aplikace umožňují bezodpadové výrobní cykly, které nenarušují životní prostředí a mohou být přímo spojovány se zhodnocováním energie za současné likvidace odpadů. Aplikace biotechnologií umožňuje rozšiřovat přirozený způsob dalšího zvyšování rostlinné výroby (při snižování spotřeby syntetických hnojiv a chemizace), a tím i dalšího zvyšování v živočišné výrobě [37].

Membránové bioreaktory jsou zařízení, ve kterých probíhá enzymaticky katalyzovaná chemická reakce, kdy enzymy, mikrobiální, živočišné, resp. rostlinné buňky jsou působením membrán v reaktoru zadržovány, přičemž současně může probíhat jak biokonverze, tak separace produktů. Podle konstrukce můžeme membránové bioreaktory rozdělit do dvou tříd [38]:

1. *Bioreaktory se zabudovanými membránami.* Umožňují dobře regulovat a kontrolovat biokonverzi, nevýhodou je malá účinná plocha membrány jako separátoru.
2. *Membránové moduly připojené k bioreaktoru.* Používají se zejména pro mikrobiální a buněčné technologie, kdy separují buňky po jejich výstupu z reaktoru a vracejí je zpět.

Bioreaktory (biofermentory) se dají rozdělit podle řady hledisek [39]

➤ ***dle fází***

- jednofázové (obsahují kapalný substrát s rozpuštěným enzymem)
- dvoufázové (kapalina x částice; kapalina x mikroorganismy)
- třífázové (plyn x kapalina x mikroorganismy)
- čtyřfázové (tuhý substrát x plyn x kapalina x mikroorganismy)

➤ ***dle doplňování živin***

- vsádkové - jednorázové naplnění
- semikontinuální
- kontinuální - průběžné doplňování v průběhu fermentace

➤ ***dle aerace***

- aerobní
- anaerobní

➤ ***dle aktivní složky***

- enzymové (mohou být volné nebo imobilizované)
- mikrobiální (volné, imobilizované)

➤ ***typu sterilizace***

- autokláv (skleněná nádoba)
- *in situ* (párou) sterilizovatelný reaktor (nerezová nádoba)

9. Závěr

Biofilm jsou určité kolonie mikroorganismů, které nasedají na určitý povrch a jejich kolonie jsou pokryty slizem. Ten je tvořen ve většině případů samotnými mikroorganismy. Jeho složení je charakteristické pro každý mikroorganismus, ale skoro vždy je hlavní složkou určitý polysacharid. Biofilmy se vyskytují všude tam, kde jsou vytvořeny příznivé podmínky k jejich tvorbě (vlhko, teplo), tj. např. jezera, řeky, chladicí věže, průmyslové výroby, apod.

Biofilmy jsou svým složením velice rozmanité. Lze se setkat jak s bakteriemi, houbami, kvasinkami, tak i s jinými druhy, které jsou buď pro člověka příznivé nebo zdraví či životu nebezpečné. Jejich odstranění je velice složité, jelikož každý druh mikroorganismu je náchylný na jiné změny podmínek. Ovšem neexistuje postup, který by eliminoval veškeré mikroorganismy s povrchu. Pokud chceme znát, která z metod, ať již chemických, mechanických, biologických, nebo fyzikálních, je účinnější, musíme provést zkoušku na stejném druhu a za stejných podmínek. Výsledek je následně nutné vyhodnotit s ohledem na úspěšnost eliminace (většinou udávána v procentech). K stanovení biofilmů je nutné znát jejich složení, abychom věděli, o jaký mikroorganismus se jedná a jakou metodu lze použít. Celý průběh stanovení je tedy nejlépe začít mikroskopicky pomocí Gramova barvení a teprve pak použít příslušná činidla.

Pozornost je nutné věnovat i negativním a pozitivním vlivům biofilmů. Jelikož se naše populace neustále rozrůstá, je zapotřebí stále většího přísunu potravin a čisté pitné vody. Toto je celosvětovým problémem, protože právě v nádržích s pitnou vodou, příp. v potrubních sítích, které vedou do budov, je jejich výskyt velice hojný. Velkým problémem ve vodovodním systému je legionela, která způsobuje Legionářskou nemoc a Pontickou horečku. Nelze však také opomenout biofilmy, které se vyskytují v potravinářství či jiném průmyslovém odvětví. Svým působením (kontaminace, metabolické pochody či vylučování pro ně specifických toxinů) znehodnocují výrobu nebo stabilitu povrchu. Na tomto místě je však vhodné připomenout si i pozitivní vlastnosti biofilmů, kterých je celá řada. Jako první stojí za zmínku jejich pozitivní účinek v potravinářské výrobě, kde pomáhají při fermentaci, dále pak ve farmaceutickém odvětví jsou producenty různých léčiv, barviv a vitamínů. A také nelze zapomenout na biologické zpracování odpadů, nebo využití biofilmů při odstraňování organických látek při ropných haváriích a přebytečných dusíkatých látek (např. NH_3^+ , NO_3^-) z odpadních či užitkových

vod. Jejich využití je ekonomicky velice výhodné, a proto jsou dnes biofilmy pro uvedené účely často používány.

Závěrem je nutné konstatovat, že biofilmy budou stále o krok před naším vědeckým poznáním. Lidé se je však budou snažit více zkoumat, a proto je možné, že se dočkáme léků na dnes nevléčitelné nemoci, nových vitamínů, výroby umělých tkání či biodegradovatelných materiálů.

10. Seznam použité literatury

1. www.tretipol.cz/index.asp?clanek&view&633 - 31k (5.4.2009)
2. www.prominent.cz/DesktopDefault.aspx/tabid-6285/999_read-44061/-56k (5.4.2009)
3. akademon.cz/SearchDatabase.asp?searchtext=biofilmy - 11k (5.4.2009)
4. www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=2415 - 9k (7.4.2009)
5. www.vesmir.cz/clanek/mikrobiaalni-biofilm - 24k(25) (6.4.2009)
6. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakterie> (7.4.2009)
7. www.svssr.sk/sk/spotrebitel/latky/Stafylococcus.asp - 40k (7.4.2009)
8. Taulo S., Wetlesen A., Abrahamsen R. K., Narvhus J. A., Mkakosya R.: Quantification and variability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cross- contamination during servis and consumption of cooked thick porridge in Lungwena rural households. *Food Control*, 2009 (v tisku)
9. http://cs.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_pyogenes (13.4.2009)
10. Bessen D. E.: *Population biology of the human restricted pathogen, Streptococcus Pyogenes*. Elsevier 2009
11. http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Escherichia_coli_Gram.jpg (13.4.2009)
12. old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/lepn.htm - 6k (13.4.2009)
13. en.wikipedia.org/wiki/Legionella_pneumophila - 65k (13.4.2009)
14. Gomez-Valero L., Rusniok C., Buchrieser C.: *Legionella pneumophila: Population genetics, phylogeny and genomics: Infection, Genetics and Evolution*, 2009 (v tisku)
15. cs.wikipedia.org/wiki/Plíseň - 25k (15.4.2009)
16. www.plisne.com/obr1.jpg (15.4.2009)
17. cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky - 79k (15.4.2009)
18. cs.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans - 30k (15.4.2009)
19. Ramage G., Saville S. P., Thomas D. P., López-Ribot J. L.: *Candida* biofilms: An update. *Eukaryotic Cell*, **4**(4) (2005) 633-638
20. cs.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae - 29k (15.4.2009)
21. Ko J. K., Bak J. S., Jung M. W., Lee H. J., In-Geol Choi, Kim T. H., Kim K. H.: Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. *Bioresource Technology*, 2009 (v tisku)

22. cs.wikipedia.org/wiki/Sinice - 135k (15.4.2009)
23. http://cs.wikipedia.org/wiki/Zelen%C3%A9_%C5%99asy (15.4.2009)
24. www.aquion.cz/main.php?id2=105&submenu=1 - 33k (18.4.2009)
25. www.smv.cz/res/data/014/001650.pdf (18.4.2009)
26. www.eufic.org/article/cs/page/FTARCHIVE/artid/svet-mikroorganismu/ - 43k (25.4.2009)
27. Purkrťová S., Pilchová T., Ďurišová J., Demnerová K., Pazlarová J.: Podmínky tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*. *Mlékařské listy*, 112 (2009) 12-15
28. cs.wikipedia.org/wiki/Pitná_voda - 38k (25.4.2009)
29. Lehtola J. M., Miettinen T. I., Keinänen M. M., Kekki K. T., Laine O., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen J. P.: Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*, 38(17) (2004) 3769-3779
30. www.aquasana.cz/Aquasana_soubory/19.04.2007/2/Watercolery.doc (25.4.2009)
31. www.chos.cz/legionella.htm - 16k (25.4.2009)
32. Rulík M., Lamačová J., Barták P., Rolčík J.: Význam a využití metody analýzy fosfolipidových mastných kyselin pro charakteristiku a kvantifikaci mikrobiálních společenstev. *Mikrobiologie vody* (D. Baudišová ed.), Praha 2002
33. www.newstin.com/show-document.a?edition=cz&document_id=102755515- 37k (25.4.2009)
34. www.euroclean.cz/moznosti-odstraneni-legionel-z-distribucni-site-pitne-vody-44k (25.4.2009)
35. Schwartz T., Hoffmann S., Obst U.: Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution systém. *Journal of Applied Mikrobiology*, 95(3) (2003) 591-601
36. www.asio.cz/czech/mbrp01.htm (25.4.2009)
37. referaty-seminarky.cz/biotechnologie-klonovani/ - 66k (25.4.2009)
38. Kaštánek F.: *Bioinženýrství*. Academia, Praha 2001, str. 252-256
39. cs.wikipedia.org/wiki/Bioreaktor - 27k (26.4.2009)