

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Mikrobiální adheziny jako základ tvorby biofilmů

Štěpánka Krýslová

Bakalářská práce

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Štěpánka Krýslová**  
Osobní číslo: **C18248**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Mikrobiální adheziny jako základ tvorby biofilmů**  
Téma práce anglicky: **Microbial Adhesins As A Basis For Biofilm Formation**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. Definujte mikrobiální biofilm, jeho strukturu, složení a fáze tvorby biofilmu.
2. Zaměřte se na faktory ovlivňující biofilmovou aktivitu nebo intenzitu produkované biofilmové vrstvy.
3. Podrobněji se zabývejte mikrobiálními adheziny a adhezními vlastnostmi, jejich genetickou podstatou a také technikami pro měření adhezních schopností.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Karolína Švarcová**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Mikrobiální adheziny jako základ tvorby biofilmů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2022

Štěpánka Krýslová v. r.

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a věnovaný čas při vypracování této bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá tvorbou biofilmu, konkrétně adhezí mikrobiálních buněk na povrchy. Biofilm je tvořen větším množstvím mikrobiálních buněk, které přisedají k různým povrchům ale i k sobě navzájem. Vytvořená biofilmová vrstva obklopující buňky, poskytuje bakteriálním buňkám větší ochranu. Práce zahrnuje základní charakteristiku biofilmu, faktory ovlivňující tvorbu biofilmu. Jsou zde uvedeny fyzikálně-chemické a biologické interakce, které zprostředkovávají adhezi mikrobiálních buněk na povrch a techniky k měření adhézní schopnosti. Práce se dále věnuje mikrobiální adhezi na běžně používané povrchy v potravinářském průmyslu a následně možnostmi eliminace bakteriálních biofilmů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Biofilm, adheze, detekce biofilmu, adheziny, faktory prostředí, eliminace biofilmu

## **TITLE**

Microbial adhesins as a basis for biofilm formation

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with biofilm formation, specifically the adhesion of microbial cells to surfaces. A biofilm is formed by many microbial cells that attach to different surfaces but also to each other. The formed biofilm layer surrounding the cells provides greater protection to the bacterial cells. The work includes basic characteristics of biofilm, factors affecting biofilm formation. The physicochemical and biological interactions that mediate the adhesion of microbial cells to the surface and techniques to measure the adhesion capacity are presented. The thesis also discusses microbial adhesion to commonly used surfaces in the food industry, followed by options for eliminating bacterial biofilms.

## **KEYWORDS**

Biofilm, adhesion, biofilm detection, adhesins, environmental factors, biofilm elimination

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ, ROVNIC A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK .....	10
ÚVOD.....	11
1    MIKROBIÁLNÍ BIOFILM .....	12
1.1    Základní charakteristika biofilmu .....	12
1.2    Vývoj mikrobiálního biofilmu .....	12
1.2.1    Adheze buněk na povrch (attachment).....	14
1.2.2    Akumulace buněk a maturace biofilmu.....	14
1.2.3    Oddělování buněk z biofilmu (detachment).....	15
1.3    Komunikace uvnitř biofilmu – <i>Quorum sensing</i> .....	15
1.4    Struktura biofilmu .....	16
2    FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOFILMU.....	19
2.1    Vliv proudění kapaliny na tvorbu biofilmu.....	19
2.2    Vliv pH na tvorbu biofilmu.....	19
2.3    Vliv teploty a dostupnosti živin na tvorbu biofilmu .....	20
2.4    Vliv povrchových vlastností materiálu na tvorbu biofilmu .....	21
2.5    Vliv kyslíku na tvorbu biofilmu.....	21
3    MIKROBIÁLNÍ ADHEZE.....	23
3.1    Termodynamický přístup .....	23
3.2    DLVO teorie.....	24
3.3    Rozšířená DLVO teorie.....	26
3.4    Techniky k měření adhezni schopnosti .....	27
3.5    Biologický popis mikrobiální adheze.....	29
3.6    Bakteriální adheze na materiály .....	32
3.6.1    Tvorba biofilmu na nerezové oceli.....	32
3.6.2    Tvorba biofilmu na materiálech z plastu .....	34
3.6.3    Tvorba biofilmu na skle.....	34
3.6.4    Tvorba biofilmu na dřevě .....	35
3.6.5    Tvorba biofilmu na teflonu.....	36
3.7    Možnosti eliminace bakteriálního biofilmu .....	36
3.7.1    Chemické metody dezinfekce.....	37
3.7.2    Fyzikální metody dezinfekce.....	39

3.7.2.1	Ultrazvuk.....	39
3.7.2.2	Ultrafialové záření.....	40
3.7.2.3	Kyslíková plazma.....	41
3.7.2.4	Ozařování elektronovým paprskem.....	42
ZÁVĚR .....		43
POUŽITÁ LITERATURA .....		45



# SEZNAM OBRÁZKŮ, ROVNIC A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Christensenovou metodou obarvená destička zobrazující schopnost mikroorganismů tvořit biofilm (upraveno dle Darwish and Asfour, 2013).....	13
<b>Obrázek 2</b> Vývojová stádia tvorby biofilmu (Sauer, 2003) .....	14
<b>Obrázek 3</b> Přehled strukturních složek EPS účastnících se tvorby biofilmu (upraveno dle Molobela et al., 2012) .....	17
<b>Obrázek 4</b> Smáčivost povrchu ( upraveno dle Linford, 2014). .....	21
<b>Obrázek 5</b> Dvoukrokový proces adheze bakterií ( upraveno dle Hori and Matsumoto, 2010) .....	25
<b>Obrázek 6</b> Upravené povrchy nerezové oceli s přilnutými mikroby, rastrovací elektronová mikroskopie, a) elektrolyticky leštěný povrch (měřítko 30 $\mu\text{m}$ ), b) kartáčovaný povrch (100 $\mu\text{m}$ ) (Bohinc et al., 2016) .....	33
<b>Obrázek 7</b> Biofilm <i>P. aeruginosa</i> na povrchu teflonu, rastrovací elektronová mikroskopie (měřítko 10 $\mu\text{m}$ ) (upraveno dle De-la-Pinta et al., 2019) .....	36
<b>Obrázek 8</b> Buňky bakterie <i>E. coli</i> , transmisní elektronová mikroskopie, (měřítko 0,2 $\mu\text{m}$ ) (Li et al., 2016) .....	39
<b>Obrázek 9</b> Buňky bakterie <i>E. coli</i> , rastrovací elektronová mikroskopie, (měřítko 3,0 $\mu\text{m}$ ) (Patange et al., 2021) .....	41
<b>Rovnice 1</b> Vztah pro popis adheze v termodynamickém přístupu (upraveno dle Procházková et al., 2011) .....	23
<b>Rovnice 2</b> Vztah DLVO teorie (Procházková et al., 2011).....	24
<b>Rovnice 3</b> Vztah rozšířené DLVO teorie doplněn o acidobazické interakce ( $\Delta G^{\text{AB}}$ ) (Procházková et al., 2011) .....	26
<b>Rovnice 4</b> Youngova rovnice (upraveno dle Akbari and Antonini, 2021). .....	28
<b>Tabulka 1</b> Metody používané k hodnocení hydrofobnosti povrchu mikrobiálních buněk (upraveno dle Doyle, 2000) .....	27

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AHL</b>	Acyl-homoserin lakton
<b>BHI</b>	Mozkosrdcová infúze (Brain Heart Infusion)
<b>CSH</b>	Hydrofobicita buněčného povrchu (Cell Surface Hydrophobicity)
<b>DLVO</b>	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
<b>EPS</b>	Extracelulární polymerní látky (Extracellular Polymeric Substance)
<b>LPS</b>	Lipopolysacharidy
<b>LW</b>	Lifshitz-van der Waalsovy síly
<b>PBP</b>	Protein vázající penicilin (Penicilin Binding Proteins)
<b>PE</b>	Polyethylen
<b>PET</b>	Polyethylentereftalát
<b>PP</b>	Polypropylen
<b>PVC</b>	Polyvinylchlorid
<b>KAS</b>	Kvartérní amoniové sloučeniny (Quaternary Ammonium Compounds)
<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
<b>STEC</b>	Shiga toxigenní <i>Escherichia coli</i>
<b>TSB</b>	Tryptonosojový bujón (Tryptic Soy Broth)

# ÚVOD

Biofilm je seskupení mikrobiálních buněk obklopené extracelulární polymerní substancí vlastní produkce. Představují složitější a odolnější způsob života mikroorganismů. Takovýto způsob života je pro bakteriální buňky z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí, také základním způsobem přirozeného výskytu. V prostředí biofilmu jsou mikroorganismy chráněny před nepříznivými podmínkami prostředí nebo imunitními mechanismy, oproti bakteriím rostoucím v planktonní formě.

Kromě přírodního prostředí se vyskytují i v potravinářském průmyslu, kde zněčišťují povrchy, na nichž se tvoří a způsobují značné potíže. Tvorba biofilmu probíhá v několika krocích, z nichž nejdůležitější je adheze planktonních buněk na povrch. Počáteční adheze bakterií je zprostředkována van der Waalsovými interakcemi mezi povrchem buňky a substrátem. Mikrobiální adhezi ovlivňují také povrchové struktury jako fimbrie, bičíky a schopnost produkce extracelulárních polymerních látek. Tato fáze představuje zásadní krok tvorby biofilmu, pokud se bakteriální buňky uchytí, začnou se vyvíjet. Díky své zvýšené rezistenci k antimikrobiálnímu ošetření je obtížné poté biofilmy odstranit.

Tato práce se proto zaměřuje na fyzikálně-chemické a biologické interakce zprostředkovávající mikrobiální adhezi na povrchy.

# 1 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM

## 1.1 Základní charakteristika biofilmu

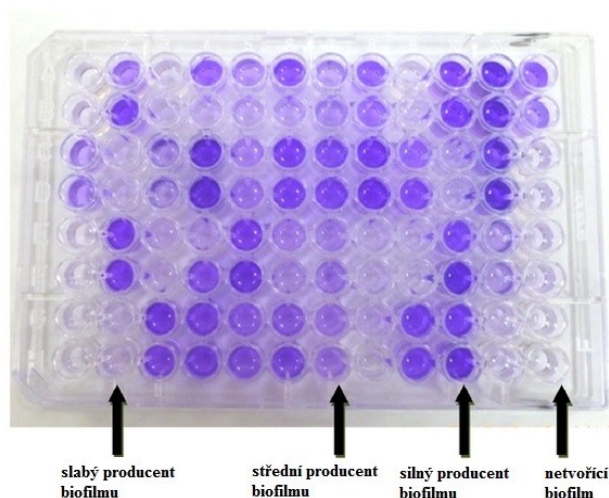
Bakteriální buňky mají tendenci se v přírodním prostředí přichycovat na nejrůznější povrchy a vytvářet tak společenství většího množství mikrobiálních buněk zvaný biofilm (Branda et al., 2005). Růst ve formě biofilmu je pro mikroorganismy výhodný, oproti bakteriím rostoucím v planktonní formě. Život v tomto seskupení poskytuje mikrobiálním buňkám vyšší odolnost vůči působení toxických látek, mechanickému poškození, bakteriofágům i predátorům (Holá and Rulík 2012).

S biofilmy přicházíme do kontaktu každý den. K jejich tvorbě dochází na všem, co je ve styku s živným médiem. Kromě přírodního prostředí se vyskytují v mnoha typech humánního prostředí, kde způsobují četné problémy. V dnešní době je nejvíce studovaný výskyt biofilmů v medicíně, především na cizích tělesech v lidském těle, jako jsou umělé implantáty, katetry nebo kanyly. Biofilmy se vyskytují i na zubech, kde jsou součástí zubního plaku a přispívají k tvorbě zubního kazu. I přes jejich negativní dopad na naše zdraví a životní prostředí, jsou biofilmy užitečné zejména v odvětvích průmyslu (biotechnologie, čištění odpadních vod nebo bioremediace), kde je naopak jejich přítomnost nezbytná (Overman, 2000; Rulík and Holá, 2012). Existence biofilmů v přírodním prostředí je důležitá hlavně pro bakteriální ekologii a evoluci (Hall-Stoodley et al., 2004).

## 1.2 Vývoj mikrobiálního biofilmu

Proces vývoje mikrobiálního biofilmu je regulovaný pochod, při kterém se jednobuněčné organismy seskupují a vytvářejí mnohobuněčné útvary. Pro vznik mikrobiálního biofilmu je nejpodstatnější adheze prvotních buněk k vhodnému povrchu. Adheze bakteriálních buněk k povrchu je ovlivněna řadou faktorů (např. hydrodynamikou, hydrofobicitou, pH a teplotou), které se u jednotlivých druhů mohou lišit (Garrett et al., 2008). Lemon et al. (2008) popsali obecný model vývoje biofilmu. V něm rozlišili vývoj u bakterií, které jsou schopny pohybu a u mikroorganismů, které nejsou schopny pohybu (např. rod *Staphylococcus*). Pokud nastanou příznivé podmínky pro vznik biofilmu u rodu *Staphylococcus*, bakterie zvýší expresi povrchových struktur (adhezinů) na svém povrchu. V případě rodu *Staphylococcus* jsou to převážně povrchové proteiny Bap. Naopak bakterie, které jsou schopny pohybu, ztrácí svou pohyblivost a začnou produkovat extracelulární matrix, díky které drží pohromadě.

Tvorbou bakteriálního biofilmu koaguláza-negativních bakterií u rodu *Staphylococcus* se poprvé zabývali Christenson et al. (1985). K analýze tvorby biofilmu využili mikrotitrační destičky z polystyrenu (viz **Obrázek 1**). Naředěné bakteriální buňky TSB bujónem v mikrotitračním destičkách inkubovali 18 hodin při teplotě 37°C. Po uplynutí doby kultivace odstranili planktonní buňky fyziologickým roztokem. Následně obarvili biofilm připevněný k povrchu jamek krystalovou violetí. Podle intenzity zabarvení biofilmu jsou pak bakterie rozlišeny, zda jsou schopny tvořit biofilm či nikoli. Výsledky studie ukázaly, že u patogenních kmenů izolovaných z intravaskulárních katétrů byla pozorována vyšší adheze bakterií na povrch destičky než u saprofytických kmenů.

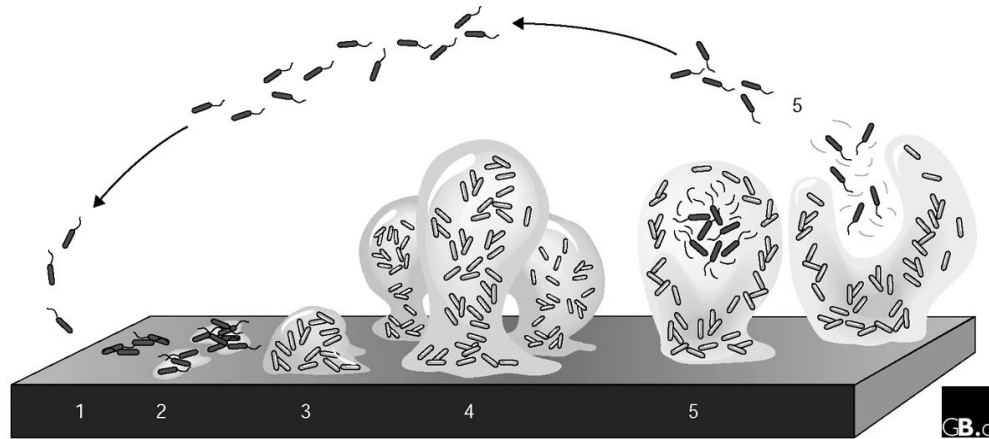


**Obrázek 1** Christensenovou metodou obarvená destička zobrazující schopnost mikroorganismů tvořit biofilm (upraveno dle Darwish and Asfour, 2013)

K pozorování bakteriálního biofilmu lze mimo jiné využít i tzv. Biofilm Ring Test. Jedná se o modernější a rychlejší metodu, která narozdíl od výše zmíněné metody nevyžaduje barvení či promývání destičky. K tomuto testu jsou opět zapotřebí mikrotitrační destičky, do jejichž jamek jsou umístěny magnetické mikrokuličky. Jednotlivé jamky jsou pokryty kontrastní kapalinou, která umožňuje čtení mikrotitrační destičky pomocí readeru navrženého pro Biofilm Ring Test. Tvorba biofilmů je detekována pomocí mikrokuliček, které jsou přitahovány magnety, umístěné pod středem každé jamky. Pokud se mikrobiální biofilm nevytvořil, magnetické mikrokuličky vytvářejí na středě jamky hnědý kruh. V případě vytvořeného biofilmu jsou mikrokuličky uchyceny v jeho struktuře a při přiblížení magnetu se nepohybují, zůstávají nedetekovatelné (Chavant et al., 2007; Olivares et al., 2016).

Tvorba mikrobiálního biofilmu probíhá v několika fázích (viz **Obrázek 2**). V první fázi dochází k adhezi planktonních buněk k povrchu. Zpočátku se jedná o reversibilní nepřilís silné

připojení, buňky se mohou ještě oddělit. Pokud se ale bakteriální buňky ireversibilně uchytí k povrchu, začnou se dělit a vytvářet mikrokolonie. Ve vyvráleném biofilmu mohou buňky buď přetrvat nebo se šířit do okolí a kolonizovat tak nový povrch (Dhar and Han, 2020).



**Obrázek 2** Vývojová stádia tvorby biofilmu (Sauer, 2003)

1 – reverzibilní adheze bakteriálních buněk, 2 – ireverzibilní adheze, 3 – akumulace mikrobiálních buněk, 4 – zrání biofilmu, 5 – disperze

### 1.2.1 Adheze buněk na povrch (attachment)

Adheze planktonických buněk k povrchu představuje zásadní krok v tvorbě biofilmu a je podmíněna řadou faktorů např. substrátem, hydrodynamikou nebo vlastnostmi buněčného povrchu. Jednotlivé faktory a jejich vliv na tvorbu biofilmu jsou popsány níže (Donlan, 2001).

Bakteriální adhezi lze rozdělit do dvou fází. V počáteční fázi adheze se uplatňují povrchové struktury (adheziny) bakterií, jako pili, fimbrie, bičiky, proteiny nebo lipopolysacharidy (LPS). Kromě adhezínů ovlivňují přilnavost bakterií i některé fyzikálně-chemické interakce zahrnující van der Waalsovy a elektrostatické síly. Zpočátku má mikrobiální adheze reverzibilní charakter, buňky tak mohou opustit povrch a vrátit se do planktonické formy. Pokud ale bakteriální buňky překonají van der Waalsovy a elektrostatické síly, dochází k ireverzibilní adhezi k povrchu. Následně bakterie začínají produkovat extracelulární polymerní látky (EPS) a společně s ligandy, umístěnými např. na fimbriích, upevňují vazbu k povrchu. V tu chvíli se bakteriální adheze stává nevratnou (Dunne, 2002).

### 1.2.2 Akumulace buněk a maturace biofilmu

Fáze akumulace a maturace mikrobiálních buněk následuje po ireverzibilním navázání mikroorganismů na povrch. Bakterie začínají vytvářet složitou síť zvanou mikrokolonie. Jednotlivé mikrokolonie jsou od ostatních mikrokolonií odděleny pomocí vodních kanálků

(Toyofuku et al., 2015). Mikrobiální buňky produkují extracelulární sloučeniny, ze kterých se poté vytváří mezibuněčná hmota (matrix). Extracelulární polymerní látky se skládají především z polysacharidů a tvoří strukturu biofilmu. Maturace (zrání) bakteriálního biofilmu je podmíněna dostupností živin do buněk a odstraňováním odpadních látek. Mezi další faktory ovlivňující zrání biofilmu patří např. pH, zdroj uhlíku nebo osmolarita (Dunne, 2002; Donlan, 2001).

### 1.2.3 Oddělování buněk z biofilmu (detachment)

V průběhu zrání bakteriálního biofilmu dochází k oddělování jednotlivých buněk nebo celých mikrokolonií, což umožňuje buňkám kolonizovat nové povrchy a zahájit tak zcela nový proces tvorby biofilmu. K rozptýlení (disperzi) buněk dochází díky dvěma základním procesům. Pomocí mechanického oddělování v důsledku proudu tekutiny nebo díky spontánnímu oddělování. Poněvadž bakterie přítomné ve spodních vrstvách nemají dostatečný přístup k živinám či kyslíku (Barraud et al., 2015). Vysoký počet buněk a genová exprese je v biofilmu regulováno pomocí *quorum sensing* (Garrett et al., 2008).

## 1.3 Komunikace uvnitř biofilmu – *Quorum sensing*

*Quorum sensing* (QS) představuje zásadní regulační mechanismus mikroorganismů, který umožňuje jednotlivým buňkám komunikovat, adaptovat se na životní podmínky okolí nebo regulovat svoje chování. To je umožněno produkcí a následným rozpoznáváním signálních molekul (autoinduktorů) (Zhao et al., 2020). QS závisí na hustotě bakteriální populace, neboť se vzrůstající bakteriální populací dochází ke zvýšení syntézy autoinduktorů. Když signální molekuly dosáhnou prahových hodnot, bakterie tento signál detekují a reagují na něj změnou jejich genové exprese (Miller and Bassler, 2001).

Signální molekuly používané k přenesu informací u Gram-negativních a Gram-pozitivních bakterií jsou rozdílné. Komunikační systém LuxR/I byl poprvé popsán u *Vibrio fischeri* (Nealson et al., 1970). Systém je regulován proteinem LuxR a LuxI, který je zodpovědný za produkci autoinduktoru acyl-homoserin laktonu (AHL). Syntéza acyl-homoserin laktonu probíhá pouze za přítomnosti S-adenosylmethioninu. Proteiny typu LuxR po návázání na signální molekulu AHL, následně regulují transkripci svých cílových genů, které jsou zapojeny do specifických procesů. Kromě tvorby bakteriálního biofilmu mezi ně patří i produkce sekundárních metabolitů a sekrece faktorů virulence. Proteiny typu LuxR rozpoznávají pouze jednu signální molekulu AHL. Existují však i jiné typy tohoto proteinu (např. Sdia), které rozpoznávají více než jeden autoinduktor AHL (Reading and Sperandio,

2005). Tento protein se vyskytuje u kmenů rodu *Salmonella* a bylo zjištěno, že se váže na autoinduktory AHL, které jsou produkovány jinými bakteriálními druhy (Michael et al., 2001)

Komunikační systém u Gram-pozitivních bakterií využívá malé peptidy, které jsou produkty oligopeptidů (Reading and Sperandio, 2005). Agr systém je jedním z nejlépe prozkoumaných komunikačních systémů u Gram-pozitivních bakterií. Agr systém reguluje u stafylokoků sekreci faktorů virulence nebo rezistenci *S. aureus* k meticilu (MRSA). Při prahových koncentracích jsou autoindikující peptidy navázány na sensorové kinázy (AgrC). Sensorové kinázy následně přenášejí fosfát na regulátor odezvy (AgrA), který aktivuje transkripci (Tan et al., 2018). Existují i samoindukující molekuly, které využívají Gram-pozitivní tak i Gram-negativní bakterie. Mezi takové autoinduktory patří např. diestery furanboritanu (Zhao et al., 2020).

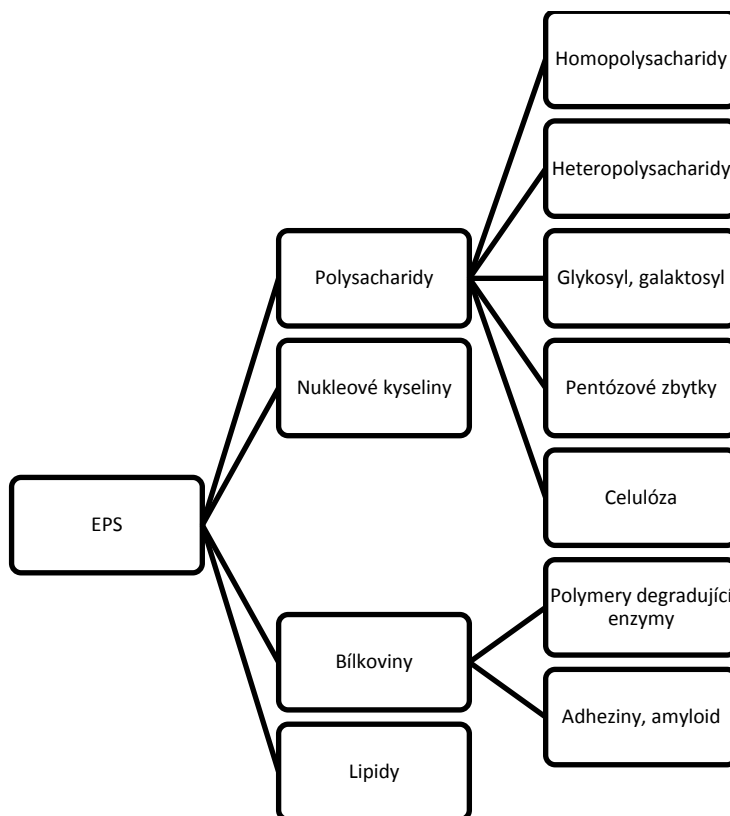
## 1.4 Struktura biofilmu

Biofilmy jsou složitá společenství, proto k jejich detailnímu sledování nepostačuje optická ani elektronová mikroskopie. K tomuto účelu je vhodné použít konfokální skenovací laserový mikroskop. Elektronová mikroskopie sice poskytuje struktury mikrobiálního biofilmu ve vysokém rozlišení, nicméně nutná příprava vzorku zahrnuje procesy, které vedou k dehydrataci preparátu. Tyto kroky mohou vést k nepřesné interpretaci výsledků. Z toho důvodu se využívá konfokální skenovací laserový mikroskop, který dokáže vizualizovat plně hydratované vzorky a poskytnout tak trojrozměrnou strukturu biofilmů (Davey and O'toole, 2000).

Výsledná struktura biofilmu je ovlivněna bakteriálními buňkami a prostředím ve kterém vznikne. Základní stavební jednotkou biofilmu jsou mikrobiální buňky, které vytvářejí mikrokolonie, a mezibuněčná hmota (matrix). Jak již bylo zmíněno mezi mikrokoloniami se nacházejí intersticiální dutiny (vodní kanálky). V těchto kanálcích dochází k proudění tekutiny, která umožňuje v biofilmech difúzi živin, kyslíku i antimikrobiálních látek. Bakteriální buňky jsou v bakteriálním biofilmu obklopeny mezibuněčnou hmotou, což je směs primárně složená z extracelulárních polymerních látek (EPS). Extracelulární polymerní látky představují 50 až 90 % celkového organického uhlíku a lze je tedy považovat za primární matricový materiál biofilmů. Biofilmy se od sebe odlišují právě ve složení a rozložení jednotlivých EPS (viz **Obrázek 3**). V případě Gram-negativních bakterií mohou být extracelulární polymerní látky neutrální nebo polyaniontové. Přítomnost uronových kyselin, jako je kyselina glukuronová nebo kyselina galakturonová, poskytují těmto látkám



charakteristické aniontové vlastnosti. Aniontové vlastnosti jsou důležité pro asociaci dvojmocných kationtů jako je vápník a hořčík, které udržují strukturální celistvost bakteriálních biofilmů. Gram-positivní bakterie, mají na rozdíl od Gram-negativních bakterií, kationtové chemické složení polymerních látek (Donlan, 2002; Vasudevan, 2014).



**Obrázek 3** Přehled strukturních složek EPS účastnících se tvorby biofilmu (upraveno dle Molobela et al., 2012)

Z obrázku je zřejmé, že se extracelulární polymerní látky neskládají pouze z polysacharidů, ale navíc jsou tvořeny z různých bílkovin, lipidů a nukleonových kyselin. Například některé bakteriální EPS obsahují ve svých strukturách vázané hexózové zbytky a díky tomu mají tendenci být pevnější a v určitých případech nerozpustné. Matrice biofilmu obsahuje i nebuněčné materiály, jako jsou minerální látky, popř. částice bahna nebo jílu u biofilmů v enviromentálním prostředí (Donlan, 2002).

Struktura biofilmu je kromě mikrobiálních látek a mezibuněčné hmoty navíc tvořena různými proteiny, DNA, RNA nebo ionty. Důležitou složkou je voda, která zajišťuje snadný tok živin a odstranění odpadních látek (Donlan, 2002; Vasudevan, 2014).

Extracelulární polymerní látky v bakteriálním biofilmu zastupují řadu funkcí. K těm nejpodstatnějším se řadí strukturní integrita biofilmu, akumulace živin z vnějšího prostředí

a odolnost k různým antimikrobiálním látkám, jako jsou dezinfekční prostředky a antibiotika (Flemming and Wingender, 2010).

## 2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOFILMU

Složitost struktury biofilmu záleží zejména na podmínkách okolního prostředí, v němž se biofilm tvoří. Jako příklady lze uvést dostupnost živin, teplotu, pH, proudění kapaliny nebo koncentraci kyslíku (Abdallah et al., 2014). V této kapitole jsou uvedeny jednotlivé faktory a jejich vliv na tvorbu biofilmu.

### 2.1 Vliv proudění kapaliny na tvorbu biofilmu

Tok kapaliny je jedním z významných faktorů, který ovlivňuje nejen strukturu biofilmu ale i hustotu a pevnost přítomných bakteriálních buněk (Purevdorj et al., 2002). V závislosti na toku kapaliny byly pozorovány rozdíly v rychlosti tvorby mikrobiálního biofilmu. V případě sledování paralelního a šikmého proudu kapaliny na stejném místě povrchu není v rychlosti tvorby biofilmu významný rozdíl. Zatímco v experimentech s příčným tokem se biofilm vytvořil snáze na povrchu při začínajícím toku kapaliny než na vzdálenějším povrchu po proudu (Krivorot et al., 2011). Kromě směru proudu kapaliny ovlivňuje tvorbu a strukturu biofilmu i rychlost toku. Biofilmy vyvinuté v prostředí, kde kapalina proudí pomaleji, vytvářejí pórovitější struktury. V prostředí, ve kterém kapalina proudí rychleji, jsou biofilmy hustší a hladší (Choi et al., 2013). Proudění kapaliny je také důležité v kanálcích biofilmů. V kanálcích proudí kapalina pomaleji než v samotném prostředí, a díky tomu mohou buňky získat více živin. V opačném případě by docházelo ke snížení hustoty bakteriálních buněk v důsledku nedostatečného přístupu živin (Purevdorj et al., 2002).

### 2.2 Vliv pH na tvorbu biofilmu

Také změny pH mají výrazný vliv na tvorbu mikrobiálního biofilmu. Proto se pH při výrobě dezinfekčních prostředků a detergentů udržuje v kyselé oblasti, v níž mají na mikroorganismy až biocidní účinek. Pro regulaci pH cytoplazmy může být problematická přítomnost protonové pumpy. Ta se nachází v membráně bakteriální buňky, odkud přenáší vodíkové ionty (protony) z cytoplazmy a vytváří elektrochemický gradient. Může tak docházet k pasivnímu transportu protonů v důsledku hybné síly, pohánějící tento gradient. Tento pasivní proces poté bakteriálním buňkám ztěžuje regulovat pH cytoplazmy. Bakterie na tyto změny pH vnějšího i vnitřního (cytoplazmy) prostředí reagují zvýšením aktivity a syntézou proteinů, spojených s různými buněčnými procesy (Garrett et al., 2008).

Byla provedena studie, která zkoumala vliv pH na bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae* způsobující nozokomiální infekce. Kmeny byly kultivovány

za stejných podmínek (při teplotě 30 °C až 37 °C a v médiu o pH 5,5 až 8,5). Výsledky studie prokázaly, že pozvolné zvyšování pH zvyšuje šanci mikrobiálních buněk na přežití a tvorbu biofilmu, než když dojde k prudké změně pH (například náhlým přidáním HCl) (Hošťacká et al., 2010). To naznačuje, že v bakteriálních buňkách probíhá mechanismus, který umožňuje bakteriální populaci přizpůsobit se malým změnám pH. Existují však buněčné procesy, jako je syntéza extracelulárních polymerních látek, které se změnám pH nepřizpůsobují tak snadno. Optimální pH pro syntézu těchto látek závisí na bakteriálních druzích. U většiny bakterií se však pohybuje kolem pH 7 (Garrett et al., 2008).

### 2.3 Vliv teploty a dostupnosti živin na tvorbu biofilmu

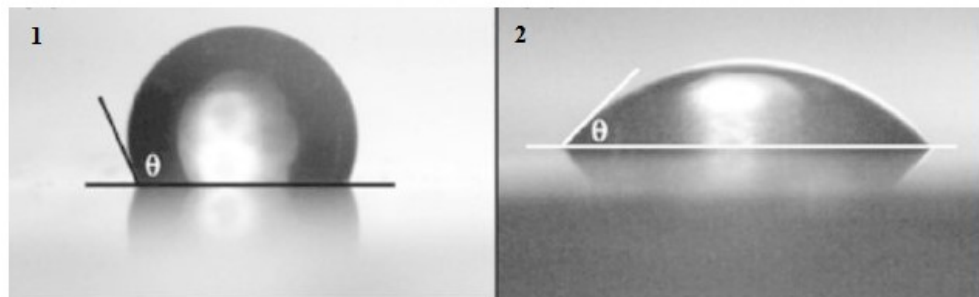
Studie dokazují, že i teplota ovlivňuje vývoj bakteriálního biofilmu. Ukázalo se, že optimální teplota je závislá na daném druhu bakterie (Abdallah et al., 2014). Například u *P. aeruginosa* se biomasa biofilmu zvyšovala se vzrůstající teplotou (Hošťacká et al., 2010). Kromě zvýšeného počtu bakteriálních buněk v biofilmu dochází k tvorbě povrchových struktur (adhezínů). Mikrobiální buňky inkubované při teplotě 35 °C vykazovaly jeden bičík, zatímco při teplotě 21 °C měly dva až tři, a při nižších teplotách dokonce více bičíků (Herald and Zottola, 1988).

Choi et al. (2013) ve svých studiích zjistili, že biomasa biofilmů *S. aureus* byla výraznější při 37 °C než biomasa biofilmů pěstovaných při 25 °C na polystyrenu. Zatímco Pagedar et al. (2010) pozorovali vyšší počet bakteriálních buněk *S. aureus* při 25 °C, na rozdíl od počtu buněk získaných při 37 °C na nerezové oceli. Optimální teplota pro tvorbu biofilmu u *S. aureus* nebyla dosud prokázána. Tyto rozdílné výsledky mohou naznačovat vliv dalších faktorů prostředí jako je typ povrchu nebo dostupnost živin.

Při zvýšení příjmu živin, dochází k rychlejší tvorbě biofilmu. Aby mohly být živiny dále zpracovávány, je podstatná přítomnost potřebných enzymů, které regulují fyziologické a biochemické procesy bakterií. Rychlost enzymatické reakce je však závislá na teplotě, a proto je zvýšená tvorba bakteriálního biofilmu spojována s optimální teplotou kultivace biofilmu (Garrett et al., 2008). Například bylo zjištěno, že *P. aeruginosa* a *S. aureus* zvyšovali biomasu biofilmu při zvýšeném obsahu glukózy, železa nebo NaCl v růstovém médiu (Abdallah et al., 2014).

## 2.4 Vliv povrchových vlastností materiálu na tvorbu biofilmu

Povrch materiálu vykazuje několik vlastností, které ovlivňují tvorbu biofilmu. Avšak do jaké míry bude tvorba biofilmu ovlivněna, závisí zejména na konkrétním kmenu nebo druhu mikroorganismu (Abdallah et al., 2014). Jednou z charakteristických vlastností každého materiálu je tzv. volná povrchová energie. Materiály s nízkou povrchovou energií nepřitahují vodu, proto je jejich naměřený kontaktní úhel mezi kapkou vody a povrchem větší než  $90^\circ$ . Takové materiály jsou označovány jako hydrofobní. Naopak látky s vyšší povrchovou energií se snadněji smáčejí, vykazují tak kontaktní úhel menší než  $90^\circ$  a jsou označovány jako hydrofilní (viz **Obrázek 4**). Ve větší míře se mikroorganismy přichytí k hydrofobním povrchům, jako je např. teflon, polystyren a další plasty, než k hydrofilním materiálům jako je sklo a nerezová ocel (Donlan, 2002; Chieng et al., 2019).



**Obrázek 4** Smáčivost povrchu ( upraveno dle Linford, 2014).

1 – hydrofobní povrch (kontaktní úhel  $90^\circ < \theta < 150^\circ$ ), 2 – hydrofilní povrch ( $\theta < 90^\circ$ )

Characklis et al. (1990) poznamenali, že se rozsah mikrobiální kolonizace zvětšuje se zvyšující se drsností povrchu. To je dáno díky smykovým silám, které se na drsnějších površích zmenšují (Donlan 2002). Nicméně k tvorbě biofilmu také dochází na površích, které jsou pokryty vrstvou organických látek, jako jsou bílkoviny z mléka, krve nebo masa (Donlan 2002). Lze říci, že přichycení mikroorganismů na povrch je velmi složitý proces, jehož výsledek ovlivňuje mnoha různých faktorů. Obecně dochází k tvorbě mikrobiálního biofilmu nejnázne na drsném a hydrofobním povrchu (Donlan, 2002).

## 2.5 Vliv kyslíku na tvorbu biofilmu

I dostupnost kyslíku má značný vliv na tvorbu bakteriálního biofilmu. Bakteriální buňky při nedostatku kyslíku snižují metabolickou aktivitu při rozvoji biofilmu, nebo dochází k jejich oddělování. Avšak existují i mikroorganismy, které kyslík k tvorbě biofilmu nevyžadují. K němu se řadí například bakterie *P. aeruginosa* (Alotaibi and Bukhari, 2021). Provedené studie dokazují, že prostředí se sníženým kyslíkem výrazně snižuje účinnost antibiotik na mikroorganismy. Bylo také pozorováno, že inkubace v anaerobním prostředí vedla

k podstatnému snížení citlivosti kmene *S. aureus* k beta-laktamovým antibiotikům. Je známo, že beta-laktamová antibiotika inhibují syntézu bakteriální buněčné stěny vazbou na proteiny vázající penicilin (PBP) na buněčné membráně. Nedostatečný přísun kyslíku může změnit expresi PBP nebo snížit afinitu léků k enzymům PBP, což vede ke snížení citlivosti bakterií (Gupta et al., 2016).

## 3 MIKROBIÁLNÍ ADHEZE

Proces adheze představuje počáteční stádium kolonizace povrchů mikroorganismy, která se rozděluje na primární a sekundární adhezi. Primární adheze je charakterizována nespecifickými a vratnými interakcemi, v kombinaci s nekovalentními interakcemi jako jsou Lifshitz-van der Waalsovy, elektrostatické a hydrofobní interakce. Při sekundární adhezi dochází k nevratnému připojení buněk k povrchu, a to pomocí vývoje specifických vazebných interakcí mezi interagujícími povrchy (např. účastí specifických adhezínů) (Hori a Matsumoto, 2010, Procházková et al., 2011). V následujícím textu jsou zohledněny jak fyzikálně-chemické interakce, které uskutečňují síly působící mezi mikroorganismem a povrchem, tak biologické interakce mezi adheziny a dalšími povrchovými strukturami buněk.

### 3.1 Termodynamický přístup

První z fyzikálně-chemických teorií je tzv. termodynamický přístup, který se využívá k popisu přilnavosti bakterií k povrchům. Předpokládá přímý kontakt dvou povrchů za stavu termodynamické rovnováhy (Katsikogianni and Missirlis, 2004, Procházková et al., 2011). K adhezi dochází v případě, že je energeticky výhodný vznik jednoho mezifázového rozhraní (povrch nosiče-povrch buňky) na úkor zániku dvou mezifázových rozhraní (povrch nosiče-vodné prostředí a povrch buňky-vodné prostředí). Každé z těchto rozhraní je charakterizováno mezifázovou energií (mezifázovým napětím). Energetickou bilanci pro adhezní děj lze vyjádřit pomocí změny Gibbsovy energie (viz **Rovnice 1**) (Hermansson, 1999).

$$\Delta_{\text{adh}}G = \gamma_{\text{NB}} - \gamma_{\text{NV}} - \gamma_{\text{BV}}$$

**Rovnice 1** Vztah pro popis adheze v termodynamickém přístupu (upraveno dle Procházková et al., 2011)

$\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$  – adhezní Gibbsova energie v systému buňka-vodné prostředí-nosič vztažená na jednotku plochy fázového rozhraní [ $\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ],  $\gamma$  – příslušná povrchová (mezifázová) napětí ( $B$  – buňka,  $N$  – nosič,  $V$  – vodné prostředí)

Jelikož hodnoty mezifázových rozhraní uvedené v rovnici nejsou experimentálně dostupné, využívá tento model k výpočtu číselné hodnoty termodynamických vlastností látek (volnou povrchovou energii buňky, volnou povrchovou energii substrátu, a povrchové napětí kapaliny) (Absolom et al., 1983). Jednou z možných metod určení volné povrchové energie je metoda měření kontaktního úhlu. Tato metoda je popsána v kapitole techniky k měření adhezní schopnosti. Výsledná hodnota Gibbsovy energie pak umožňuje předpovědět, zda bude mikrobiální adheze upřednostňována. Pokud je tedy hodnota Gibbsovy energie na jednotku plochy negativní ( $\Delta G^{\text{adh}} < 0$ ), adheze je z termodynamického hlediska energeticky výhodná

(Hori and Matsumoto, 2010; Katsikogianni and Missirlis, 2004). Termodynamický přístup nezahrnuje elektrostatické interakce ani separační vzdálenost mezi buňkou a nosičem. Pro zohlednění těchto interakcí do procesu adheze buněk je potřeba využít DLVO teorii (Procházková et al., 2011).

### 3.2 DLVO teorie

Teorie dle Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) popisuje nesespecifické interakční energie, které řídí počáteční fázi bakteriální adheze. Jedná se o přitažlivé Lifshitz-van der Waalsovy interakce a elektrostatické interakce, které mohou být buď přitažlivé, nebo odpudivé v závislosti na povrchu (Bayouhd et al., 2009). Původně byla DLVO teorie vyvinuta pro popis chování koloidních částic v roztoku (Verwey, 1947). V současné době je široce používána jako teoretický model pro výpočet skutečných změn adhezní energie, podílejících se na mikrobiální adhezi a agregaci (Bayouhd et al., 2009)

Výsledná interakční energie mikroorganismu s pevným povrchem, je tedy dána součtem elektrostatické a Lifshitz-van der Waalsovy interakční energie, přičemž všechny tyto energie jsou funkcí vzdálenosti mezi nabitými povrchy (Procházková et al., 2011) (viz **Rovnice 2**).

$$\Delta_{adh}G_{DLVO}(d) = \Delta G^{EL}(d) + \Delta G^{LW}(d)$$

**Rovnice 2** Vztah DLVO teorie (Procházková et al., 2011)

$\Delta_{adh}G^{tot}$  – adhezní Gibbsova energie podle teorie DLVO,  $\Delta G^{EL}$  – Lifshitz-van der Waalsovy síly,  $\Delta G^{LW}$  – elektrostatické síly v závislosti na vzdálenosti ( $d$ )

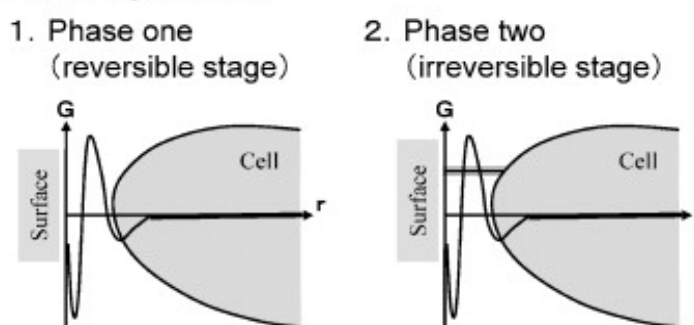
Nabitý povrch částice (buňky/nosiče) přitahuje z okolí rozpuštěné ionty opačné polarity. Tyto protiionty se okolo povrchu hromadí a vytvářejí elektrickou dvojrstvu. Vzhledem k tomu, že většina povrchů (včetně toho mikrobiálního) má ve vodném roztoku negativní náboj, dochází k elektrostatickému odpuzování. Pokud se tedy přibližuje záporně nabitá buňka k záporně nabitému povrchu, je odpudivá elektrostatická energie způsobena překrýváním elektrických dvojrstev bakteriálních buněk a substrátu (Hori and Matsumoto, 2010; Procházková et al., 2011). Van der Waalsovy interakce jsou přímo úměrné Hamakerově konstantě. Hamakerova konstanta je soubor konstant, který popisuje vlastnost materiálu, sílu interakce mezi povrchem a médiem, jakož i mezi dvěma interagujícími povrchy ve vodném prostředí. Závisí na dielektrických vlastnostech prostředí a pevných materiálů (Hermansson, 1999). Přesné hodnoty Hamakerovy konstanty pro interakci mikrobiálních buněk ve vodném prostředí nejsou známy, ale existují postupy pro její odhad (Procházková et al., 2011).

Dle Sternova modelu se elektrická dvojrstva skládá ze dvou vrstev. Jednak ze Sternovy vrstvy, kterou tvoří protiionty vázané adsorpčními a elektrostatickými silami na ionty povrchu,



a z difúzní vrstvy. Součástí difúzní vrstvy jsou pohyblivé protiionty a ionty pocházející z ostatních elektrolytů disperzního prostředí (Pouchlý, 2008). Jak je zřejmé, k tomuto jevu jsou zapotřebí rozpuštěné ionty v roztoku. Koncentraci rozpuštěných iontů v roztoku nám udává iontová síla. Řada studií prokázala, že zvýšením koncentrace elektrolytu v rozmezí 0 až asi 0,1 – 0,2 M se tloušťka elektrické dvojvrstvy zmenšuje (Hermansson, 1999). Například zvýšením iontové síly elektrolytu z 1 mmol·dm<sup>-3</sup> na 500 mmol·dm<sup>-3</sup> se vzdálenost mezi nabitými povrchy zmenší přibližně z 10 nm na 0,2 nm. Tím se usnadní vzájemný přístup interagujících povrchů (Procházková et al., 2011).

Naopak při nízké iontové síle se odpudivá elektrostatická energie zvyšuje. Pokud se tedy bakteriální buňka přiblíží k povrchu při nízké iontové síle. Dochází k zabránění přímému kontaktu povrchů v důsledku potenciálové bariéry. V tento moment jsou buňky reverzibilně ukotveny v určité vzdálenosti od povrchu pevného substrátu v tzv. sekundárním minimu. Tato vzdálenost je obvykle v několika nanometrech v závislosti na iontové síle. Bakteriální buňky mohou tuto energetickou bariéru překonat pomocí adhezínů, jako jsou pili, bičíky nebo tvorbou exopolymerních látek. Díky tomu dosáhnou vzdálenosti energeticky výhodnější, která odpovídá primárnímu minimu (viz **Obrázek 5**) (Hori and Matsumoto, 2010).



**Obrázek 5** Dvoukrokový proces adheze bakterií ( upraveno dle Hori and Matsumoto, 2010)

Čím je tedy iontová síla nižší, tím obtížnější je pro bakteriální buňky překonat energetickou bariéru a přilnout tak k povrchu substrátu. Naopak při vysoké iontové síle buňky mohou snadno a rychle dosáhnout nevratné adheze, protože energetická bariéra mizí (Hori and Matsumoto, 2010).

Pomocí DLVO teorie lze do značné míry předpovídat adhezi, ačkoliv ne vždy je předpověď ve shodě s reálným stavem. Zejména pro situace s vysokou iontovou silou DLVO teorie nepostačuje. Proto byl do klasické DLVO teorie zaveden další parametr, Lewisovy acidobazické (hydrofilní/hydrofobní) interakce (van Oss, 1989).

### 3.3 Rozšířená DLVO teorie

Rozšířená DLVO teorie zahrnuje acidobazické interakce, které jsou založeny na interakcích donorů a akceptorů elektronů. Tím přidávají do DLVO teorie vliv hydrofobních/hydrofilních interakcí a osmotických interakcí (pro buňky je lze zanedbat), které jsou na krátké vzdálenosti 10 – 100× silnější, než LW interakce povrchů v přímém kontaktu (Procházková et al., 2011; van Oss, 1989). Podle rozšířené DLVO teorie je tedy velice výrazný vliv acidobazických interakcí na mikrobiální adhezi. Jelikož se jedná o interakce krátkého dosahu (pod 5 nm), musí dojít k blízkému kontaktu povrchů, aby se dostatečně projevíly (Hori and Matsumoto, 2010; Procházková et al., 2011). Do vztahu (viz **Rovnice 3**) rozšířené DLVO teorie se dosazuje polární složka mezifázové interakční energie ( $\Delta G^{AB}$ ), která je získána termodynamickým přístupem. Proto lze rozšířenou DLVO teorii považovat za kombinaci klasické DLVO teorie a termodynamického přístupu (Procházková et al., 2011).

$$\Delta_{adh}G_{DLVO}(\mathbf{d}) = \Delta G^{EL}(\mathbf{d}) + \Delta G^{LW}(\mathbf{d}) + \Delta G^{AB}(\mathbf{d})$$

**Rovnice 3** Vztah rozšířené DLVO teorie doplněn o acidobazické interakce ( $\Delta G^{AB}$ ) (Procházková et al., 2011)

U klasické i rozšířené DLVO teorie se předpokládá, že interagující povrchy jsou dokonale hladké a homogenní, což běžně není reálné. Proto je vhodné pro předpověď interakčních energií znát řídicí proces, který má v daném systému největší vliv na úspěšnost adheze (Procházková et al., 2011).

### 3.4 Techniky k měření adhezní schopnosti

Jak již bylo uvedeno, jednou z charakteristických vlastností látek je tzv. volná povrchová energie. O volné povrchové energii, resp. hydrofobnosti (hydrofobicitě) lze mluvit i u bakteriálních buněk (Mafu et al., 1991).

Hydrofobicita buněčného povrchu hraje důležitou roli při přichycování k povrchu, proto byly vyvinuty různé metody zaměřené právě na její měření (viz **Tabulka 1**). Úkolem těchto metod je předpovědět, zda proběhne adheze buněk. Dalším úkolem je, pokud možno adhezi předejít, popř. omezit (Mafu et al., 1991).

**Tabulka 1** Metody používané k hodnocení hydrofobnosti povrchu mikrobiálních buněk (upraveno dle Doyle, 2000)

Název metody
Otisky kolonie
Měření kontaktního úhlu (CAM)
Dielektrická permitivita
Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)
Otisk testu
Mikrobiální adheze na uhlovodíky (MATH)
Mikrosférická adheze
Test valivých kapiček
Test agregace soli (SAT)
Dvoufázové dělení (TPP)
Vazba na alifatické kyseliny

Nejčastěji používanou metodou k hodnocení hydrofobních vlastností je metoda, mikrobiální adheze na uhlovodíky. Metoda měří úbytek zákalu (absorbance) v buněčné suspenzi, která je převrstvená kapalným uhlovodíkem (např. n-hexadekanem, n-oktanem) (Doyle, 2000). Postup je velmi rychlý a jednoduchý. Připraví se zkumavka s buněčnou suspenzí, ke které se přidá malý objem kapalného uhlovodíku a nechá se nějaký čas inkubovat. Následně se směs promíchá několik sekund na vortexu a ponechá se ustálit tak, aby došlo k oddělení jednotlivých fází. Po ustálení a oddělení fází se změří úbytek zákalu vodní suspenze. Získaný úbytek zákalu představuje adhezi hydrofobních buněk na hydrofobní

uhlovodík během míchání. Mícháním směsi totiž dochází k vytvoření kapiček uhlovodíku, ke kterým jsou buňky schopny přilnout (Rosenberg 2006).

Důležitou podmínkou správného měření je použití pufru s vysokou iontovou silou, která minimalizuje elektrostatické efekty, čímž zdůrazní význam hydrofobických sil (Doyle, 2000). Mezi nevýhody této metody patří nízká rozlišovací schopnost u hydrofilních kmenů. Tomuto problému lze však předcházet postupným přidáváním síranu amonného, který zvyšuje adhezi k n-hexadekanu, n-oktanu a p-xylenu (Rosenberg, 1984). Naopak značnou výhodou je nenáročnost na speciální vybavení. K testu postačí základní laboratorní vybavení, jako jsou zkumavky, vortex a spektrofotometr. Dále lze metodu použít k pozorování smíšených populací stejného druhu. Použití hexadekanu je zvláště užitečné, protože je netoxický pro mikroorganismy, má nízký tlak par a bod tuhnutí je při teplotě nižší (Doyle, 2000; Rosenberg, 2006).

Další efektivní metodou pro stanovení míry povrchové hydrofobicity je měření kontaktního úhlu. Metoda vychází z Youngovy rovnice (viz **Rovnice 4**), která popisuje, jak povrchové energie určují velikost úhlu smáčení. Pokud je známo povrchové napětí použité kapaliny, lze z kontaktního úhlu odvodit povrchovou energii zkoumaného povrchu (Akbari and Antonini, 2021).

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos \theta$$

**Rovnice 4** Youngova rovnice (upraveno dle Akbari and Antonini, 2021).

*$\gamma_{sg}$  – povrchová energie tuhé látky,  $\gamma_{sl}$  – mezifázová energie rozhraní tuhá látka-kapalina,  $\gamma_{lg}$  – povrchová energie kapaliny*

Princip metody spočívá v nanesení kapky známé kapaliny (např. vody, pufru) na vrstvu buněk (měřený povrch) a následně se změří kontaktní úhel  $\theta$  mezi povrchem a kapkou. V případě hydrofilních buněk se kapka kapaliny rychle rozptýlí a zmizí ve vrstvě buněk. Vzniklý kontaktní úhel takto rozprostřené kapky bude malý. Zatímco kontaktní úhel kapky u hydrofobních buněk bude velký, protože buňky méně vážou kapalinu (Doyle, 2000).

Pro získání přesných hodnot by měl být měřený povrch maximálně hladký, plochý a chemicky homogenní, aby nedocházelo k deformaci geometrie kapky (Akbari and Antonini, 2021, Doyle, 2000).

K rychlému zjištění míry hydrofobicity lze využít vysolovací (agregační) test. Kvůli nízké citlivosti se spíše využívá k orientačnímu účelu. Test se provádí přidáním síranu amonného k buněčné suspenzi, který způsobí agregaci. Hydrofobní buňky agregují za krátkou

dobu, kdežto hydrofilní buňky k tvorbě agregátů vyžadují vyšší koncentraci soli a mnohem více času (Doyle, 2000).

Míru CSH lze zjistit i pomocí separačního mechanismu uplatňující se u hydrofobní interakční chromatografie. Princip metody spočívá v zadržování nepolárních částí pohyblivé fáze (buněčné suspenze) stacionární fází. Stacionární fázi představuje hydrobní gel v koloně, který obsahuje alkylové či arylové zbytky. Hydrofobní buňky jsou zadržovány kolonou, ze které se následně vymyjí pufovaným roztokem (např. síranu amonného nebo chloridu sodného) s nízkou iontovou silou (Smyth et al., 1978).

Zde byly uvedeny jen některé metody ke zjištění míry hydrofobicity buněčného povrchu, ale je potřeba vzít v potaz, že každá z metod využívá zcela odlišný postup. Například metoda CAM vyžaduje vzorky dostatečně vysušené a zbavené od nečistot. Přičemž tyto zásahy mohou ovlivnit povrchové vlastnosti organismu a vést ke klamným výsledkům. Proto je potřeba zvážit přípravu vzorku, aby jakkoliv neovlivnila bakteriální povrch. Z tohoto důvodu analýza povrchu mikrobiálních buněk vyžaduje nové metody, které nejsou závislé na rozsáhlé manipulaci s buňkami před měřením a které umožňují stanovit hydrofobicitu bakteriálních buněk získaných přímo z prostředí (Pembrey et al., 1999).

### **3.5 Biologický popis mikrobiální adheze**

Mikrobiální adheze na pevné povrchy není ovlivňována pouze fyzikálně-chemickými silami, ale z velké míry záleží i na povrchových strukturách bakterií (adhezínů). Jsou to specializované povrchové proteiny, které zprostředkovávají přichycení k povrchu na větší vzdálenost (Niemann et al., 2004). Jelikož to jsou jevy obecného charakteru, je obtížné zahrnout je do matematických modelů, popisujících nebo předpovídajících adhezi (Procházková et al., 2011).

Mikrobiální adheziny jsou často sestaveny ve složitější polymerní struktury (např. pili nebo fimbrie), které vyčnívají z povrchu bakterií. Mohou být i jednodušší povahy a jsou připojeny k povrchu nebo k jiné povrchové struktuře buď jako monomery nebo krátké oligomery (Klemm and Schembri, 2000). Nejčastěji se však jedná o proteiny, které dokážou vysoce specificky rozpoznávat a vázat sacharidy. Mezi nejčastěji rozpoznávané sacharidy se řadí galaktóza, N-acetyl-galaktosamin, kyselina sialová, fukóza, N-acetyl-glukosamin a glukóza. Dalšími možnostmi mohou být interakce protein-protein nebo sacharid-sacharid (Nobbs et al., 2009).

Výše zmíněné pili a fimbrie patří k nejznámějším proteinovým adhezínům Gram-negativních bakterií. Pilus Gram-negativních bakterií je tvořen z několika proteinových

podjednotek, které jsou k sobě vázány nekovalentními interakcemi. Tento typ se podílí jak na nespecifické adhezi k abiotickým povrchům za účelem kolonizace a tvorby biofilmu, tak na adhezi k buňkám hostitele. (Beaussart et al., 2014; Hori and Matsumoto, 2010). Například protein FimH umožňuje specifickou vazbu *Escherichia coli* na povrchové struktury obsahující manózu (Krogfelt et al., 1990). Adhezin PapG zprostředkovává vazbu uropatogenních kmenů *Escherichia coli* na glykolipidy přítomné v močových cestách. Existují tři různé třídy variant PapG, které se liší svým receptorem. Adhezin PapGI přednostně váže globotriaosylceramid, který se hojně vyskytuje na lidských uroepiteliálních buňkách. PapGII se váže na globosid (glykolipidový izoreceptor lidských ledvin) a je primárně spojován s lidskou pyelonefritidou, zatímco varianta PapGIII se přednostně váže na globopentosylceramid (Forssmanův antigen) a je spojena s lidskou cystitidou (Proft and Baker, 2008).

Mnoho bakteriálních druhů produkuje kromě proteinových adhezínů i extracelulární polysacharidy, které se podílejí na adhezi. Jako příklady lze uvést extracelulární polysacharidový adhezin poly-N-acetylglukosamin (PNAG) nebo polysacharidový intracelulární adhezin (PIA). Tyto adheziny zprostředkovávají vazbu stafylokoků k abiotickým povrchům (Di Martino, 2018).

V poslední době přitahují značnou pozornost také autotransportérové adheziny (ATAD). Jedná se o proteiny Gram-negativních bakterií. Jsou ukotveny na vnější membráně mikrobů nebo jsou uvolňovány do prostředí (Klemm et al., 2006). Rozlišují se dva typy, jedním jsou monomerní konvenční autotransportéry a druhým trimerní autotransportérové adheziny. Obě variace autotransportérových adhezínů mají společné strukturní uspořádání, které zahrnuje N-terminální signální peptid. Tento peptid zajišťuje přenos přes vnitřní membránu. Dále sekretovanou doménu a translokační doménu, která vytvoří  $\beta$ -barrelovou strukturu pórů ve vnější membráně. Prostřednictvím póru je následně sekretovaná doména vylučována z periplazmy na povrch buňky (Girard and Mourez, 2006).

Mezi nejvíce studované autotransportéry patří proteiny produkované kmenem *Escherichia coli*. První povrchově lokalizovaný glykoprotein byl TibA. Adhesin TibA slouží k adhezi enterotoxigenní *E. coli* k epiteliálním buňkám tenkého a tlustého střeva. Dále se ukázalo, že polyklonální anti-TibA antisérum inhibovalo invazi enterotoxigenního kmene *E. coli* H10407. To naznačuje, že protein TibA nejenže zprostředkovává buněčnou adhezi, ale také působí jako invazin (Lindenthal and Elsinghorst, 2001). Některé kmeny *E. coli* produkují i glykoprotein AIDA a protein Ag43. Glykoprotein AIDA byl původně spojován s adhezí kmene *E. coli* O126:H27 ke střevnímu epitelu. Další studie však prokázaly, že adhezin AIDA zprostředkovává bakteriální adhezi na širokou řadu lidských buněk. Jako příklady lze uvést

HeLa buňky (lidské karcinomové buňky z děložního čípku) a HT29 buňky (lidské adenokarcinomové buňky odvozené z tlustého střeva). Protein Ag43 byl zpočátku charakterizován svou schopností agregovat některé kmeny *E. coli* v kapalných suspenzích. Na rozdíl od ahezinů AIDA a TibA je Ag43 neglykosovaný a nezprostředkovává specifickou adhezi na lidské buňky (Klemm et al., 2006). Má však významnou roli při tvorbě biofilmu *E. coli* v médiu s minimálním obsahem glukózy. Danese et al. (2002) totiž prokázali, že protein Ag43 zprostředkovává mezi jednotlivými buňkami a povrchem interakce, které jsou nezbytné pro vývoj zralého biofilmu v prostředí s minimem glukózy. Ačkoli se proteiny AIDA, TibA a Ag43 liší ve svých funkcích, mají však jednu společnou. Všechny mohou zprostředkovat bakteriální agregaci a tvorbu biofilmu, a proto bylo navrženo jejich seskupení s názvem samosdružující autotransportéry (SAAT) (Klemm et al., 2006).

## 3.6 Bakteriální adheze na materiály

K bakteriální adhezi a tvorbě biofilmu patogenních bakterií dochází často na površích, využívaných v potravinářském průmyslu. Patogenní bakterie (např. *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, rod *Shigella* nebo rod *Vibrio*) jsou původci alimentárních onemocnění z potravin. Bakterie adherují a vytvářejí biofilm na materiálech, které bývají povahy hydrofilní (např. nerezová ocel) nebo hydrofobní (např. teflon, polystyren a další plasty). Jedním z důvodů kontaminace povrchů může být výskyt biofilmu, který odolává vlivu dezinfekčních a sanitárních prostředků. Proto se při výběru materiálu klade důraz na jeho hygienickou nezávadnost, mechanické a antikorozi vlastnosti (Awad et al., 2018; Zore et al., 2020).

Bakteriální adheze a tvorba biofilmu na daném povrchu je ovlivněna jak vlastnostmi mikrobiální buňky (hydrofobicita a náboj buněčného povrchu, extracelulární polymerní látky, signální molekuly, adheziny), tak i vlastnostmi povrchu (hydrofobicita, elektrický náboj a drsnost povrchu) (Awad et al., 2018; Zore et al., 2020).

### 3.6.1 Tvorba biofilmu na nerezové oceli

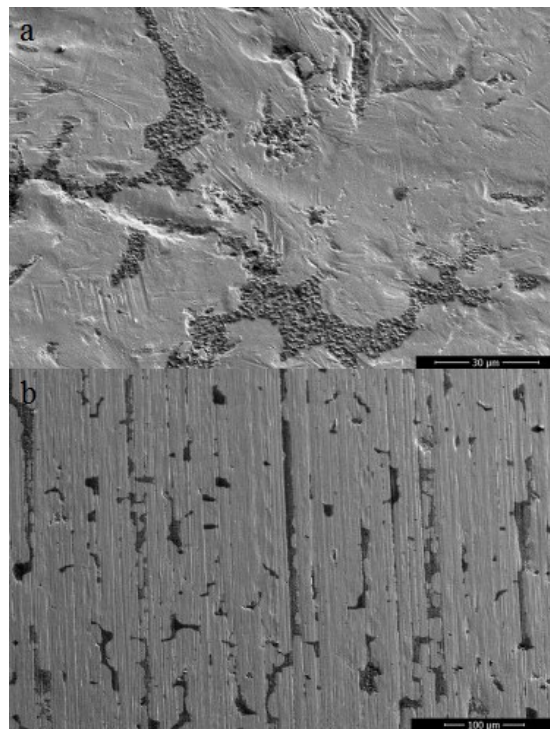
Nerezová ocel se hojně používá jako materiál v potravinářských zařízeních díky své vysoké hygienické nezávadnosti. Lze ji vyrábět v různých jakostech a povrchových úpravách, které však ovlivňují přilnavost bakterií. Jednotlivé druhy se mezi sebou liší obsahem železa a jiných příměsí. Austenitická nerezová ocel obsahuje např. chrom, nikl a molybden, z důvodu vyšší odolnosti vůči korozi. Feritická nerezová ocel se uplatňuje v různých odvětvích, protože ji lze snadno tvarovat nebo svářet. Odlišnou jakost nerezové oceli lze získat pomocí úprav povrchu např. mořením, lesklým žíháním nebo mechanickým leštěním. Pomocí těchto úprav docílíme méně drsného povrchu (Jullien et al., 2003).

Perrin et al. (2009) provedli studii, ve které byl zkoumán vliv niklu na tvorbu biofilmu *E. coli* produkující extracelulární vlákna. Výsledky tohoto výzkumu ukázaly, že subinhibiční koncentrace (koncentrace nižší než minimální inhibiční koncentrace) niklu zprostředkovala tvorbu biofilmu tím, že zvýšila produkci extracelulárních vláken na povrchu buněk. Adherenční schopnost *E. coli* O157:H7 potvrdili ve své studii i Ryu et al. (2004).

Jiné studie potvrdily, že významný vliv na tvorbu biofilmu má povrchová úprava nerezové oceli. Na méně drsném povrchu (jako je leštěný povrch) mikroorganismy přednostně ulpívají v jamkách a rostou víceméně v jedné vrstvě. Zatímco na drsném povrchu (jako je broušený, kartáčovaný povrch) se mikroorganismy koncentrují v pórech, škrábancích a rostou ve více vrstvách (viz **Obrázek 6**). Bohinc et al. (2016) zkoumali vliv upravených



povrchů nerezové oceli (kartáčováním, leštěním a broušením) na bakteriální adhezi. K výzkumu použili odlišné druhy bakterií, např. *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky této studie ukázaly, že bakterie dobře přilnuly k upraveným povrchům z nerezové oceli, ale na nejvíce drsném povrchu (broušeném) přilnula pouze *L. monocytogenes*. Povrch nerezové oceli by tedy neměl obsahovat známky poškození (rýhy, trhliny), abychom předcházeli případné adhezenci mikroorganismů, neboť bakterie jsou v těchto mikrostrukturních vadách hůře přístupné dezinfekčnímu prostředku (Jullien et al., 2003).



**Obrázek 6** Upravené povrchy nerezové oceli s přilnutými mikroby, rastrovací elektronová mikroskopie, a) elektrolyticky leštěný povrch (měřítko 30 µm), b) kartáčovaný povrch (100 µm) (Bohinc et al., 2016)

Ma et al. (2019) ve své studii zjistili, že významnou roli při přichycení bakterií na nerezovou ocel hrají příznivé podmínky prostředí jako je teplota, vlhkost, tlak nebo dostupnost živin. Kmen *E. coli* produkující *shiga toxin* (STEC) vykazoval silnou produkci biofilmu na povrchu nerezové oceli při 22 °C, zatímco v prostředí s nízkou teplotou (13 °C) byla tvorba biofilmu významně inhibována. Jiné studie potvrdili, že při nízkých teplotách nedocházelo k tvorbě povrchových struktur (např. fimbrií, bičíků) u bakterií, což značně snižuje jejich ulpívání na površích používaných v potravinářském průmyslu (Walker et al., 1999).

Hlavním zdrojem živin pro bakterie v potravinářském průmyslu jsou organické látky například bílkoviny z masa, které zůstávají na povrchu nerezové oceli po kontaktu

s potravinami. Většina dosud provedených studií hodnotila tvorbu biofilmů pomocí běžných laboratorních růstových médií. Tvorba biofilmu je však velmi závislá na podmínkách prostředí. Při zkoumání tvorby biofilmu je tedy důležité zvolit taková média, aby se výsledky co nejvíce přiblížily skutečným podmínkám v potravinářském prostředí. Z tohoto důvodu Paz-Mendéz et al. (2017) provedli studii, ve které zkoumali tvorbu biofilmu z drůbežáren izolovaných kmenů salmonel. Bakterie na povrchu nerezové oceli byly inkubovány v médiu obsahující masovou šťávu. Výsledky této studie dokázaly, že na povrchu nerezové oceli byla tvorba biofilmu vyšší než při použití běžných růstových medií (např. tryptického sójového bujónu). Také Li et al. (2017) pozorovali, že kmen *Campylobacter* a *Salmonella* lépe přilnuly na povrchy v přítomnosti tohoto média, což naznačuje, že přítomnost organických látek v médiu může podporovat tvorbu mikrobiálních biofilmů.

### **3.6.2 Tvorba biofilmu na materiálech z plastu**

Materiály z plastu se využívají v různých odvětví průmyslu, ale své největší zastoupení mají v obalovém průmyslu. Jelikož plasty přicházejí do kontaktu s potravinami, bylo provedeno mnoho studií, které zkoumaly vliv vlastností plastových polymerů na tvorbu biofilmu. Některé studie uvádějí, že adheze bakterií na plastové povrchy je velmi rychlá a začíná již v řádu několika sekund po kontaktu s plasty. Cai et al. (2019) ve svých studiích zkoumali krátkodobé uchycení bakterií (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*) na plastových površích. Ke svému výzkumu si vybrali nejčastěji vyráběné plasty jako je polyethylen (PE), polypropylen (PP), polyethylentereftalát (PET) a polyvinylchlorid (PVC). Výsledky ukázaly, že množství bakterií, které ulpívají na plastech, pozitivně koreluje s tvrdostí povrchu než s drsností povrchu. Zkoumané bakterie více ulpěli na PE a PVC, protože jejich povrchová tvrdost byla výrazně nižší než u PET a PP. To nasvědčuje tomu, že povrchová tvrdost plastů může být klíčovým faktorem, který dominuje interakcím mezi různými plasty a bakteriemi.

### **3.6.3 Tvorba biofilmu na skle**

Pokud jde o uchycení mikroorganismů k povrchu skla, řada studií prokázala, že bakterie jsou schopny přilnout k povrchu jak po krátkodobém kontaktu, tak i po delší době a vytvořit biofilm. K těmto výsledkům došli ve svých studiích Mafu et al. (1990), když zkoumali schopnost *L. monocytogenes* přilnout ke sklu při pokojové teplotě (20 °C) a při chladničkové teplotě skladování (4 °C). Výsledky studie ukázaly, že *L. monocytogenes* byla schopna přilnout ke sklu za krátkou dobu při obou teplotách. Nicméně přítomnost extracelulárních materiálů obklopující připojené buňky k povrchu pozorovali po delší době expozice (1 hodina).

Extracelulární materiály, kterými mohou být neutrálně nebo negativně nabitě polysacharidy, se mohou totiž adsorbovat na povrch a zvýšit přichycení bakterií k povrchu tím že, mezi organismem a povrchem sníží odpudivé elektrostatické síly (Leech et al., 1979).

Bylo také zjištěno, že vlastnosti povrchu skla, resp. hydrofobicita se mění s roztokem použitým při čištění a dezinfekci (Mozes et al., 1987). Proto bylo provedeno mnoho studií, které zkoumaly vliv pH na hydrofobicitu nebo hydrofilitu skla. Hamadi et al. (2009) ve svých studiích uvedli, že skleněný povrch byl hydrofilní při pH 5 a hydrofobní při pH 2 a pH 11. Při vysoce kyselém (pH 2) i alkalickém pH buňky *S. aureus* více adherovaly k povrchu skla. Podle těchto výsledků, lze usuzovat, že ošetření povrchu středně kyselým roztokem v procesu čištění a dezinfekce může inhibovat adhezi *S. aureus* na skleněné povrchy.

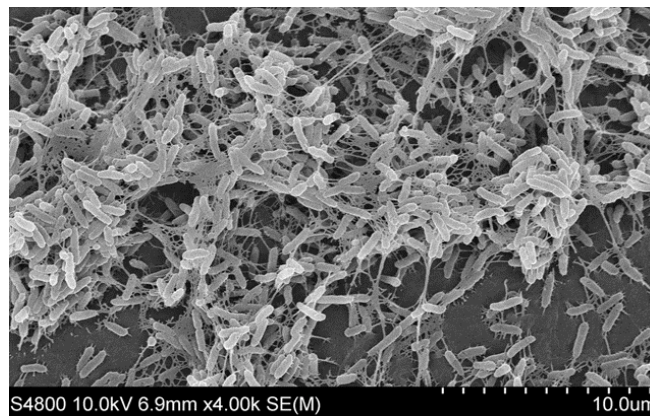
### 3.6.4 Tvorba biofilmu na dřevě

Dřevo je organický a přírodní materiál, který se hojně využívá při přípravě, balení a přepravě potravinářských výrobků. Použití dřeva v přímém kontaktu s potravinami je obvykle považováno za méně hygienické, než jiné materiály jako je plast, nerezová ocel nebo sklo. Gough and Dodd (1998) ve své studii uvádějí, že dřevěná prkénka jsou častěji kolonizována mikroorganismy než prkénka plastová. Dřevo je totiž materiál s vysokou drsností a porézností. I přesto nemůže být v některých procesech nahrazen jinými materiály. Tyto materiály by totiž změnily vlastnosti některých výrobků např. tradiční chuť nebo texturu sýra. Výroba sýra tedy vyžaduje tvorbu bakteriálního biofilmu na dřevěných prknech, protože hraje důležitou roli při jeho vyzrání (Tomičić et al., 2020).

Několik studií potvrdilo, že některé dřevěné materiály mají antimikrobiální vlastnosti, ve srovnání s jinými materiály. Antimikrobiální účinek dřeva inhibuje mikrobiální růst na základě složení extraktivních látek jako jsou fenoly a flavonoidy (Munir et al., 2021). Podle informací získaných z předešlých studií bylo zjištěno, že nejvíce biologicky aktivních extraktivních látek obsahuje dřevo smrku ztepilého. Například *S. aureus* a *P. membranifaciens* měly menší přilnavost ke smrku ve srovnání s topolem a bukem, což naznačuje, že dřevo smrku ztepilého má oproti ostatním dřevinám lepší hygienické vlastnosti. Kromě toho studie Tomičić et al. (2020) také odhalili, že Gram-negativní bakterie (*E. coli* a *P. aeruginosa*) lépe přilnuly k dřevěným povrchům než Gram-pozitivní bakterie (*S. aureus*). Kromě rozdílů ve složení a struktuře buněčné stěny mikroorganismů bylo prokázáno že existuje několik faktorů, které mohou ovlivnit adhezi bakterií. Například zvýšená relativní vlhkost při skladování zvyšuje počet přilnutých mikroorganismů (Onilude et al., 2010).

### 3.6.5 Tvorba biofilmu na teflonu

Další studie se zabývala tvorbou biofilmu bakterií na teflonu. Ukázalo se, že bakterie rodu *Listeria* mají schopnost tvořit biofilm na povrchu teflonu. Blackman and Frank (1996) ve své studii pozorovali, že akumulace biofilmu *Listeria* na teflonu byla výrazně vyšší v přítomnosti komplexního (TSB) média než v chemicky definovaném médiu. Komplexní růstová média totiž obsahují organické polymery, jako je hydrolyzovaný protein, které se adsorbují na povrch a ovlivňují tvorbu biofilmu. V chemicky definovaných médiích tyto polymery přítomny nejsou. Jiné studie analyzovaly vliv drsnosti a hydrofobicity teflonu na vývoj bakteriálního biofilmu. Jak již bylo uvedeno teflon se řadí mezi hydrofobní materiál, a jeho povrch vykazuje vyšší drsnost než např. borosilikátové sklo. Většina bakterií adhezuje a tvoří biofilm nejvíce na hydrofobních a drsnějších materiálech, toto tvrzení potvrdili ve své studii De-la-Pinta et al. (2019). Bakterie *S. epidermidis* a *P. aeruginosa* vytvořily na teflonu hustou biofilmovou vrstvu mikrobiálních buněk s bohatou extracelulární maticí oproti jiným materiálům (viz **Obrázek 7**).



**Obrázek 7** Biofilm *P. aeruginosa* na povrchu teflonu, rastrovací elektronová mikroskopie (měřítko 10  $\mu$ m) (upraveno dle De-la-Pinta et al., 2019)

### 3.7 Možnosti eliminace bakteriálního biofilmu

I když jsou v potravinářském průmyslu kladeny přísné nároky na sanitaci a dezinfekci povrchů, přesto dochází k jejich bakteriální kontaminaci. Mnoho studií prokázalo, že bakterie rostoucí ve formě biofilmu jsou mnohem více rezistentní k antimikrobiálnímu ošetření ve srovnání s buňkami planktonními (Kumar and Anand, 1998). V současnosti neexistuje jednotná metoda ke snížení rizika kontaminace a potlačení tvorby biofilmů na površích používaných v potravinářském průmyslu. Protože biofilmy jsou čím dál více rezistentní vůči fyzikálním (teplota, vlhkost) a chemickým faktorům (dezinfekční prostředek) (McDonnell and Russell, 1999).

### 3.7.1 Chemické metody dezinfekce

Chemická dezinfekce se provádí pomocí aktivních chemických látek. Tyto látky usmrtí nebo inhibují růst mikroorganismů. Jedná se o dezinfekční prostředky, které svým statickým účinkem pouze inhibují růst organismu (např. bakteriostatické, fungistatické a sporistatické). Zatímco látky s tzv. cidním účinkem (např. baktericidní, virucidní a sporicidní) usmrcují cílový organismus (McDonnell and Russell, 1999).

Nejpoužívanějšími dezinfekčními prostředky v potravinářském průmyslu jsou kvartérní amoniové sloučeniny (KAS), amfoterní sloučeniny, chlornany, peroxidy, aldehydy a fenoly. Kvarterní amoniové sloučeniny (např. benzalkonium chlorid a dodecyldimethylamonium chlorid) jsou povrchově aktivní látky, které mají bipolární chemickou strukturu (Carrascosa et al., 2021). KAS narušují plazmatickou membránu kvasinek a také cytoplazmatickou membránu bakterií, což vede k jejímu rozkladu, vyplavení intracelulárního materiálu, degradaci proteinů a nukleonových kyselin, a nakonec k lýze buněčné stěny autolytickými enzymy (McDonnell and Russell, 1999). Jejich účinnost je však stále zpochybňována. Moretro et al. (2003), ve své studii potvrdili, že kmeny *Staphylococcus* a *L. monocytogenes* jsou rezistentní vůči KAS.

Jiné studie však potvrdily, že k eliminaci bakterií *Staphylococcus* docházelo při použití dezinfekčního prostředku obsahující chlornan sodný. Sloučeniny na bázi chlóru jsou totiž silná oxidační činidla, která inhibují bakteriální DNA a syntézu proteinů. Toto tvrzení potvrdili ve své studii Mckenna and Davies (1988), když ověřili, že kyselina chlorná inhibovala růst *E. coli*. Bylo také zjištěno, že sloučeniny na bázi chlóru jsou schopny ve vyšších koncentracích inaktivovat spóry. Sporicidní účinek mají také dezinfekční prostředky obsahující glutaraldehyd. Glutaraldehyd se využívá spíše pro dezinfekci při nízkých teplotách a je účinnější při alkalickém než při kyselém pH. Dezinfekční prostředky obsahující glutaraldehyd se nejčastěji používají k eliminaci biofilmů *E. coli* a *S. aureus* (McDonnell and Russell, 1999).

Mezi další účinné dezinfekční prostředky proti bakteriím v biofilmu patří peroxidy, které mohou depolymerizovat EPS, čímž umožňují oddělování biofilmů od povrchů (Kumar and Anand, 1998). Například kyselina peroctová eliminuje biofilmy kmenů *Listeria* a *Pseudomonas* vytvořené na nerezové oceli lépe než dezinfekční prostředek obsahující chlór. Pomocí peroxidů docházelo také k odstranění biofilmu *S. Typhimurium* (Moretro et al., 2012; Meyer 2003). Několik vědců také prokázalo, že smíchání různých dezinfekčních prostředků (např. peroxidu vodíku, chlornanu sodného a kyseliny peroctové), které jsou poté rozprášené na povrch, inhibují tvorbu biofilmu. Pro účely dostatečného odstranění bakterií pomocí dezinfekčních prostředků, je potřeba povrchy předtím řádně vyčistit. Pokud se neprovádí mechanické čištění (kartáčování, škrábání nebo vysokotlakové čištění), nedochází k odstranění

nečistot z povrchu. Tyto zanechané nečistoty na povrchu mohou totiž inaktivovat dezinfekční prostředek nebo naopak ochránit mikroorganismy před jeho účinkem. Několik autorů také uvedlo, že mechanické čištění je nejúčinnější způsob k odstranění mikroorganismů a biofilmů. I přes jejich účinnost je potřeba brát v úvahu možné šíření kontaminace. Zejména vysokotlaké sprejové systémy produkují aerosoly životaschopných mikroorganismů, které by mohly být rozptýleny do prostředí a mohou tak zahájit tvorbu biofilmu na jiném povrchu (Gibson et al., 1999; Moretro et al., 2012).

Kromě nedostatečného čištění je antibakteriální účinek chemických dezinfekčních prostředků ovlivněn řadou faktorů, souvisejících s podmínkami prostředí a citlivostí cílových organismů. Mezi hlavní faktory ovlivňující účinek dezinfekčního prostředku patří koncentrace, teplota, doba vystavení povrchu dezinfekčním prostředkům a přítomnost organického materiálu. Nedostatek očekávané účinnosti dezinfekčních prostředků, lze často vysvětlit tím, že nejsou dezinfekční prostředky použity podle doporučení. Výrobci obvykle poskytují doporučení pro použití s ohledem na to, jak výše uvedené faktory ovlivňují účinnost konkrétního dezinfekčního prostředku (Gibson et al., 1999; Moretro et al., 2012).

Během posledního desetiletí byly vyvinuty a uvedeny na trh také antimikrobiální materiály. Jedná se o materiály, kde je dezinfekční prostředek začleněn do struktury materiálu nebo je jím potažen jako film na materiálu. Tyto materiály jsou odolné proti bakteriální kolonizaci, dokud se antibakteriální látky uvolňují z povrchu. Své využití si našly hlavně v potravinářské a lékařské oblasti (Moretro et al., 2012).

Výsledky několik studií prokázaly, že k inhibici biofilmů docházelo na materiálech potažených stříbrem nebo triclosanem. Cutter (1999) ve své studii pozoroval inhibici růstu *S. Typhimurium* triclosanem, který byl obsažen v plastovém obalu na potraviny. Nicméně, když bylo do tohoto obalu vakuovaně zabaleno maso, nebyl pozorován žádný inhibiční účinek na růstu těchto bakterií. V jiné studii byl testován antibakteriální účinek potravinářských prkének obsahující stříbro nebo triclosan na kmen *Salmonella*. U prkének obsahujících triclosan byl pozorován inhibiční účinek, oproti deskám obsahujících stříbro (Moretro et al., 2011). Lze říct, že materiály s přidanými antimikrobiálními látkami mohou mít za určitých podmínek antimikrobiální vliv na kmen *Salmonella*, ale jejich účinek je obvykle mnohem nižší než tradiční čištění nebo dezinfekce (Moretro et al., 2012).

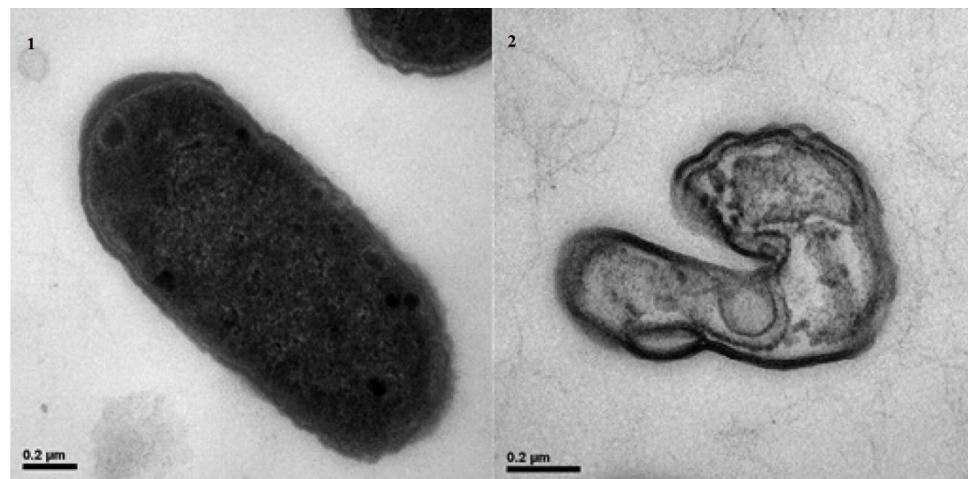
Úspěšnost prováděného dezinfekčního postupu závisí do značné míry i na správném střídání používaných dezinfekčních preparátů, a to z důvodu omezení možnosti vzniku rezistence mikroorganismů k těmto látkám.

### 3.7.2 Fyzikální metody dezinfekce

Fyzikální dezinfekce patří k účinným ekologickým metodám dekontaminace. Na rozdíl od chemických metod, které využívají k dezinfekci chemické látky, jsou založeny na účinku teploty a záření (např. ultrafialové záření) (McDonnel and Burke, 2011). Níže jsou popsány pouze některé fyzikální metody, které jsou využívány ke snížení alimentárních patogenů v potravinářském průmyslu.

#### 3.7.2.1 Ultrazvuk

Ultrazvukem se rozumí jakýkoli zvuk o frekvenci vyšší než 20 kHz, který je pro lidské ucho neslyšitelný. Ultrazvukové ošetření je považováno za slibnou technologii, která účinně odděluje mikrobiální biofilmy od kontaktních povrchů a zároveň má baktericidní účinek (viz **Obrázek 8**).



**Obrázek 8** Buňky bakterie *E. coli*, transmisní elektronová mikroskopie, (měřítko 0,2 µm) (Li et al., 2016)

1 – bakterie *E. coli* před ošetřením ultrazvukem, 2 – bakterie *E. coli* po ošetření ultrazvukem po dobu 20 minut

K usmrcení bakterií pomocí ultrazvuku, velmi závisí na parametrech během ošetření (např. doba expozice a frekvence) a na mikrobiálních kmenech (Yu et al., 2020). Obecně platí, že vnímavost mikroorganismů k ultrazvuku závisí na morfologických a fyziologických faktorech buňky. Gram-negativní tyčinky jsou zpravidla citlivější než koky a vegetativní buňky jsou citlivější než spóry (Otto et al., 2011). Torlak and Sert (2013) ve své studii hodnotili účinnost ultrazvuku o nízké frekvenci (35 kHz) na odstranění biofilmu *L. monocytogenes* na polystyrenovém povrchu. Výsledky této studie ukázaly, že ke snížení životaschopných buněk v biofilmu docházelo s prodlouženou dobou expozice. Avšak více než 90 % bakteriálních buněk *L. monocytogenes* bylo usmrceno. Mimo jiné může být ultrazvukové čištění podpořeno dezinfekčními prostředky, které se přidávají do kapaliny. Dezinfekční prostředek rychleji

pronikne do mikrobiálního biofilmu, čímž se zvýší jeho účinnost. Například účinnost kvartérních amoniových a chlorových dezinfekčních prostředků vůči *L. monocytogenes* se zlepšila při použití ultrazvuku. Nicméně bylo zjištěno, že účinnost oxidačních dezinfekčních prostředků nebyla ultrazvukovým ošetřením nijak ovlivněna (Berrang et al., 2008; Yu et al., 2020).

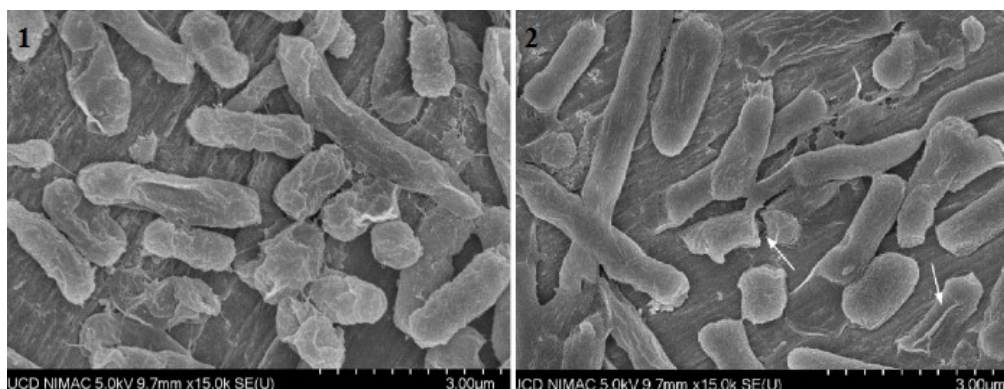
### 3.7.2.2 Ultrafialové záření

Odstranění mikroorganismů UV zářením, je již dlouhodobě uznávanou účinnou fyzikální metodou (Vasilyak, 2021). Antimikrobiální účinek ultrafialového světla lze využít v potravinářské technologii k dezinfekci vody, povrchů nebo tekutin. Cílem UV dezinfekce je snížení celkové mikrobiální zátěže za účelem prodloužení trvanlivosti produktu, nebo inaktivace specifických patogenů (Franz et al., 2009). Při ozařování potravin ultrafialovým zářením se vlnová délka pohybuje v rozmezí od 100 do 400 nm. Ultrafialové záření se podle vlnových délek rozděluje na UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) a UVC (200-280 nm). Vlnová délka UVC zahrnuje absorpční maximum DNA. Při expozici UVC záření tedy vznikají DNA fotoprodukty. Příkladem je pyrimidinový dimer, který může přerušit transkripci i translaci DNA. Z tohoto důvodu se používá jako účinný germicidní prostředek na většinu mikroorganismů (Do Prado et al., 2019). Účinnost UVC záření na redukci spór, oocyst a tvorbu biofilmu byla studována řadou studií. Hanes et al. (2002) prokázali, že kontaminovaný jablečný mošt *Cryptosporidium parvum* vystavený UVC záření po dobu 2 sekund, způsobil inaktivaci oocyst. Jiná studie zkoumala vliv UVC záření na spóry a tvorbu biofilmu *Alicyclobacillus* na nerezovém a pryžovém povrchu, s použitím pomerančové šťávy jako kultivačního média. Po 30minutovém vystavení UVC záření docházelo k výraznému snížení počtu spór a tvorby biofilmu u *A. acidocaldarius* (Do Prado et al., 2019).



### 3.7.2.3 Kyslíková plazma

Plazma je ionizovaný plyn složený z neutrálních částic, elektronů, kladně nebo záporně nabitých atomů nebo molekul, o kterém platí, že jeho prostorový náboj je přibližně roven nule (Critzler et al., 2007). Plazma vzniká, pokud vysoký potenciálový rozdíl mezi dvěma elektrodami vyvolá excitaci nebo ionizaci plynu. Vlastnosti plazmatu závisí na složení a průtoku plynu, které určují typ a množství vznikajících reaktivních látek. Dále vlastnosti plazmatu závisí na aplikovaném tlaku, elektromagnetickém poli a geometrických faktorech elektrod (např. tvar a vzdálenost mezi póly). Vzniklé reaktivní látky jako je atomární kyslík, ozón nebo volné radikály (např. hydroxyly, superoxidu nebo oxidu dusíku) vykazují antimikrobiální aktivitu (Critzler et al., 2007). Plazma generovaná za atmosférického tlaku nebo s jednou atmosférou se používá k dezinfekci kapalin, vzduchu a povrchů jako je ocel, plast, pryž (Otto et al., 2011). Při přímém kontaktu s plazmou totiž dochází k porušení cytoplazmatické membrány buněk elektrostatickými silami, což má za následek lýzu buněk a uvolnění proteinů, DNA nebo nukleonových kyselin (viz **Obrázek 9**).



**Obrázek 9** Buňky bakterie *E. coli*, rastrovací elektronová mikroskopie, (měřítko 3,0 μm) (Patange et al., 2021)

1 – bakterie *E. coli* před ošetřením plazmou za atmosférického tlaku, 2 – bakterie *E. coli* po ošetření plazmou za atmosférického tlaku po dobu 10 minut, bílé šipky označují viditelně deformované struktury a póry

Kelly-Wintenberg et al. (1999) s použitím plazmy s jednou atmosférou zaznamenali poškození cytoplazmatické membrány *E. coli* K-12. Poškození se projevilo zvýšenou hustotou kultivační suspenze po expozici plazmatu, což bylo následkem uvolnění buněčného obsahu. V jiné studii Kelly-Wintenberg et al. (1998) naočkovali bakterie na různé materiály a vystavili je působení plazmy za atmosférického tlaku se zvyšující se dobou expozice. Výsledky studie ukázaly, že u *E. coli* a *S. aureus* bylo po 30 sekundách pozorováno výrazné snížení buněk na polypropylenu a papíře. Jedním z možných mechanismů usmrcení bakteriálních buněk je působení vzniklých reaktivních látek, které způsobily oxidaci membránových lipidů.

#### **3.7.2.4 Ozařování elektronovým paprskem**

Ozařování elektronovými paprsky se využívá při ozařování potravin a potravinářských výrobků, za účelem eliminace patogenů. Elektronový paprsek inaktivuje mikroorganismy přímo poškozením DNA, které vede k reprodukční buněčné smrti, a nepřímo vznikajícími volnými radikály, které rozkládají buněčnou membránu buněk. Proces elektronového paprsku využívá jako zdroj záření elektrony s vysokou energií. Elektrony, které jsou produkovány elektrickým proudem, jsou urychlovány na rychlost světla lineárním urychlovačem. Následně jsou přeneseny do speciální pistole odkud jsou použity na cílený mikroorganismus. V závislosti na dávce paprsku dochází k sterilizaci (eliminace všech mikroorganismů) nebo pasterizaci (eliminace patogenních mikroorganismů) (Tahergorabi et al., 2012).

## ZÁVĚR

Tato práce shrnuje základní informace o mikrobiálních biofilmech, o faktorech ovlivňujících tvorbu biofilmu, o bakteriální adhezi a o technikách k měření adhezní schopnosti. Zároveň práce popisuje přehled buněčných povrchových struktur účastnících se mikrobiální adheze.

Mikrobiální adheze je složitý proces, který zahrnuje několik fyzikálně-chemických a biologických vlivů. Přesný dopad těchto vlivů na adhezi se u jednotlivých mikrobiálních druhů může lišit, a proto je těžké případnou adhezi mikrobiálních buněk predikovat. Jednotlivé mikroorganismy se mezi sebou liší způsobem, jakým přilnou k danému povrchu. U kmene *E. coli* je adheze zprostředkována pomocí proteinových adhezínů (např. FimH nebo PapG), jiné bakterie (rodu *Staphylococcus*) produkují extracelulární polysacharidové adheziny (např. polysacharidový intracelulární adhezin). V poslední době jsou v popředí zájmu autotransportové adheziny. Jedná se o proteiny Gram-negativních bakterií, které jsou ukotveny na vnější membráně mikroorganismů nebo jsou uvolňovány do prostředí (např. u kmene *E. coli* protein TibA, AIDA, nebo Ag43).

Aplikace fyzikálně-chemických modelů pro studium adheze mikroorganismů na určitý povrch, umožňují předpovědět podmínky (ne)úspěšné adheze, a tím významně přispět ke studiu vzniku a vývoje biofilmu. Je však nutné si uvědomit, že teoretický přístup, DLVO teorie nebo rozšířená DLVO teorie neumožňují dokonale vystihnout reálný studovaný systém za všech okolností. Rozšířená DLVO teorie, umožňuje celkem přesné popsání bakteriální adheze na hladké homogenní povrchy, ale už ne tak přesný popis adheze na tkáň. Podobně jsou na tom metody používané k hodnocení hydrofobnosti povrchu mikrobiálních buněk. Metody měření kontaktního úhlu, mikrobiální adheze na uhlovodíky nebo vysolovací (agregační) test využívají zcela odlišné postupy, kterou mohou ovlivnit povrchové vlastnosti organismu a vést k zavádějícím výsledkům. Z tohoto důvodu analýza povrchu mikrobiálních buněk vyžaduje nové metody, které nejsou závislé na rozsáhlé manipulaci s buňkami před měřením a také umožňují stanovit hydrofobicitu bakteriálních buněk získaných přímo z prostředí. Dosud provedené studie umožňují predikovat bakteriální adhezi na různé substráty. Proto se závěrem práce zabývám bakteriální adhezí k materiálům v potravinářském průmyslu a možnostmi eliminace přilnutých bakteriálních buněk.

Aktuální poznatky nás informují o tom, že bakterie nejnáze ulpívají na drsném a hydrofobním povrchu (např. teflon a plast) ve srovnání s hydrofilními povrchy (např. sklo nebo nerezová ocel). Z tohoto důvodu je výhodné využívat co nejhladší povrchy, snižující přilnavost

bakterií. Jelikož jsou bakterie v prostředí biofilmu více odolné vůči ultrafialovému záření, ultrazvuku a dezinfekčním prostředkům, je potřeba každé potenciální bakteriální kolonizaci povrchu předcházet. V současnosti jsou také vyvíjeny materiály s antimikrobiálními vlastnostmi. Dosud jsou ovšem některé antimikrobiální materiály ve fázi laboratorního testování, a proto není jejich praktická aplikace zatím všeobecně možná.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. **Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. and Chibib, N.** (2014) Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196 (7), 453-472.
2. **Absolom D. R., Lamberti, F. V., Policova, Z., Zingg, W., Van Oss, C. J. and Neumann, A. W.** (1983) Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (1), 90-97.
3. **Akbari, R. and Antonini, C.** (2021) Contact angle measurements: From existing methods to an open-source tool. *Advances in Colloid and Interface Science*, 294, 102470.
4. **Alotaibi, G. F. and Bukhari, M. A.** (2021) Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *American Journal of Biomedical Science and Research*, 12 (6), 617-626.
5. **Awad, T. S., Asker, D. and Hatton, B. D.** (2018) Food-safe modification of stainless steel food-processing surfaces to reduce bacterial biofilms. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10 (27), 22902-22912.
6. **Barraud, N., Kjelleberg, S. and Rice, S. A.** (2015) Dispersal from microbial biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3 (6), 1-15.
7. **Beaussart, A., Baker, A. E., Kuchma, S. L., El-Kirat-Chatel, S., O'Toole, G. A. and Dufrene, Y. F.** (2014) Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *American Chemical Society*, 8 (10), 10723-10733.
8. **Berrang, M. E., Frank, J. F. and Meinersmann, R. J.** (2008) Effect of chemical sanitizers with and without ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a biofilm within polyvinyl chloride drain pipes. *Journal of Food Protection*, 71 (1), 66-69.
9. **Blackman, I. C. and Frank, J. F.** (1996) Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59 (8), 827-831.
10. **Bohinc, K., Dražić, G., Abram, A., Jevšnik, M., Jeršek, B., Nipič, D., Kurinčič, M. and Raspor, P.** (2016) Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 68, 39-46.
11. **Boinovich, L.** (2010) DLVO forces in thin liquid films beyond the conventional DLVO theory. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15 (5), 297-302.

12. **Branda, S., Vik Å., Friedman, L. and Kolter, R.** (2015) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13 (1), 20-26.
13. **Cai, L., Wu, D., Xia, J., Shi, H. and Kim, H.** (2019) Influence of physicochemical surface properties on the adhesion of bacteria onto four types of plastics. *Science of The Total Environment*, 671, 1101-1107.
14. **Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A. and Raposo, A.** (2021) Microbial biofilms in the food industry – a comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (4), 1-31.
15. **Critzer, F. J., Kelly-Wintenberg, K., South, S. L. and Golden, D. A.** (2007) Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. *Journal of Food Protection*, 70 (10), 2290-2296.
16. **Cutter, C. N.** (1999) The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. *Journal of Food Protection*, 62 (5), 474-479.
17. **Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. and Kolter, R.** (2002) The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 37 (2), 424-432.
18. **Darwish, S. F. and Asfour H. A. E.** (2013) Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 378492.
19. **Davey, M. E. and O'toole, G. A.** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 847-867.
20. **De-la-Pinta, I., Cobos, M., Ibarretxe, J., Montoya, E., Eraso, E., Guraya, T. and Quindós, G.** (2019) Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30 (7), 1-11.
21. **Dhar, Y. and Han, Y.** (2020) Current developments in biofilm treatments: wound and implant infections. *Engineered Regeneration*, 1, 64-75.
22. **Di Martino, P.** (2018) Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiology*, 4 (3), 563-566.
23. **Donlan, R. M.** (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infection Diseases*, 33 (8), 1387-1392.

24. **Donlan, R. M.** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881-890.
25. **Do Prado, D. B., Szczerepa, M. M. A., Capeloto, O. A., Astrath, N. G. C., dos Santos, N. C. A., Previdelli, I. T. S., Nakamura, C. V., Mikcha, J. M. G. and Filho, B. A. A.** (2019) Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108238.
26. **Doyle, R. M.** (2000) Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and Infection*, 2 (4), 391-400.
27. **Dunne, W. M.** (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Journal of Clinical Microbiology*, 15 (2), 155-166.
28. **Flemming, H.-C. and Wingender, J.** (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (9), 623-633.
29. **Franz, Ch. M. A. P., Specht, I., Cho, G.-S., Graef, V. and Stahl, M. R.** (2009) UV-C-inactivation of microorganisms in naturally cloudy apple juice using novel inactivation equipment based on Dean vortex technology. *Food Control*, 20 (12), 1103-1107.
30. **Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T.** (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42 (8), 872-874.
31. **Garrett, T., Bhakoo, M. and Zhang, Z.** (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18 (9), 1049-1056.
32. **Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E. and Holah, J. T.** (1999) Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87 (1), 41-48.
33. **Girard, V. and Mourez, M.** (2006) Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features. *Research in Microbiology*, 157 (5), 407-416.
34. **Gough, N. L. and Dodd, C. E. R.** (1998) The survival and disinfection of *Salmonella Typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control*, 9 (6), 363-368.

35. **Gupta, S., Laskar, N. and Kadouri, D. E.** (2016) Evaluating the effect of oxygen concentrations on antibiotic sensitivity, growth, and biofilm formation of human Pathogens. *Microbiology Insights*, 9, 37-46.
36. **Hall-Stoodley, L., Costerton, W. and Stoodley, P.** (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), 95-108.
37. **Hamadi, F., Latrache, H., Zekraoui, M. Ellouali, M. and Bengourram, J.** (2009) Effect of pH on surface energy of glass and teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. *Materials Science and Engineering*, 29 (4), 1302-1305.
38. **Hanes, D. E., Worobo, R. W., Orlandi, P. A., Burr, D. H., Miliotis, M. D., Robl, M. G., Bier, J. W., Arrowood, M. J., Churey, J. J. and Jackson, G. J.** (2002) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in fresh apple cider by UV irradiation. *Food Microbiology*, 68 (8), 4168-4172.
39. **Herald, P. J. and Zottola, E. A.** (2006) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, 53 (5), 1549-1562.
40. **Hermansson, M.** (1999) The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14 (1-4), 105-119.
41. **Hori, K. and Matsumoto, S.** (2010) Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (3), 424-434.
42. **Hošťacká, A., Čížnár, I. and Štefkovičová, M.** (2010) Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica*, 55 (1), 75-78.
43. **Characklis, W. G., McFeters, G. A. and Marshall, K. C.** (1990) *Physiological ecology in biofilm systems*. New York: John Wiley and Sons, 341-394.
44. **Chau, T. T., Bruckard, W. J., Koh, P. T. L. and Nguyen, A. V.** (2009) A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice. *Advances in Colloid and Interface Science*, 150 (2), 106-115.
45. **Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., Bernardi, T.** (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 605-612.



46. **Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Daud, N. A. and Talib, Z. A.** (2019) Functionalization of graphene oxide via gamma-ray irradiation for hydrophobic materials synthesis. *Technology and Applications of Carbon Nanomaterials*, 177-203.
47. **Choi, N. Y., Kim, B. R., Bae, Y. M. and Lee, S. Y.** (2013) Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 207-220.
48. **Christensen, G., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D. and Beachey, E.** (1985) Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *American Society for Microbiology*, 22(6), 996-1006.
49. **Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Leuret, V. and Faille, C.** (2003) Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56 (1), 77-87.
50. **Kelly-Wintenberg, K., Hodge, A. and Montie, T. C.** (1999) Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms. *Journal of Vacuum Science and Technology*, 17 (4), 1539-1544.
51. **Kelly-Wintenberg, K., Montie, T. C., Brickman, C., Roth, J. R., Carr, A. K., Sorge, K., Wadsworth, L. C. and Tsai, P. P. Y.** (1998) Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 69-74.
52. **Klemm, P. and Schembri, M. A.** (2000) Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290 (1), 27-35.
53. **Klemm, P., Vejborg, R. M. and Sherlock, O.** (2006) Self-associating autotransporters, SAATs: Functional and structural similarities. *International Journal of Medical Microbiology*, 296 (4), 187-195.
54. **Krivorot, M., Kushmaro, A., Oren, Y. and Gilron, J.** (2011) Factors affecting biofilm formation and biofouling in membrane distillation of seawater. *Journal of Membrane Science*, 376 (1), 15-24.
55. **Krogfelt, K. A., Bergmans, H. and Klemm, P.** (1990) Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infection and Immunity*, 58 (6) 1995-1998.

56. **Kumar, C. G. and Anand, S. K.** (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1), 9-27.
57. **Leech, R., Marsh, P. and Rutter, P.** (1979) The deposition of oral bacteria at the solid/liquid and solid/liquid/air interfaces. *Archives of Oral Biology*, 24 (5), 379-387.
58. **Lemon, K. P., Earl, A. M., Vlamakis, H. C., Aguilar, C. and Kolter, R.** (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 1-16.
59. **Li, J., Ahn, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X. and Ding, T.** (2016) Evaluation of ultrasound-induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (6), 1828-1837.
60. **Li, J., Feng, J., Ma, L., Núñez, C. de la F., Götz, G. and Lu, X.** (2017) Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 253, 20-28.
61. **Lindenthal, Ch. and Elsinghorst, E. A.** (2001) Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infection and Immunity*, 69 (1), 52-57.
62. **Linford, M. R.** (2014) A discussion of aspects of a paper by caporali, bardi, and lavacchi on LEIS and XPS. *Vacuum Technology and Coating*. 2-8.
63. **Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P.** (1990) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53 (9), 742-746.
64. **Mafu, A.A., Roy, D., Savoie, L. and Goulet, J.** (1991) Bioluminescence assay for estimating the hydrophobic properties of bacteria as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (6), 1640-1643.
65. **Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D. and McAllister, T. A.** (2019) Biofilm formation by *Shiga toxin*-producing *Escherichia coli* on stainless steel coupons as affected by temperature and incubation time. *Microorganisms*, 7 (4), 95.
66. **McDonnell, G. and Russell, A. D.** (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179.

67. **McKenna, S. M. and Davies, K. J. A.** (1988) The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochemical Journal*, 254 (3), 685-692.
68. **Meyer, B.** (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51 (4), 249-253.
69. **Michael, B., Smith, J. N., Swift, S., Heffron, F. and Ahmer, B. M. M.** (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *Journal of Bacteriology*, 183 (19), 5733-5742.
70. **Miller, M. B. and Bassler, B. L.** (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55 (1), 165-199.
71. **Molobela, I. P. and Ilunga, F. M.** (2012) Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. *Annals of Microbiology*, 62, 461-467.
72. **Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K. and Langsrud, S.** (2003) Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9), 5648-5655.
73. **Møretrø, T., Høiby-Pettersen, G. S., Habimana, O., Heir, E. and Langsrud, S.** (2011) Assessment of the antibacterial activity of a triclosan-containing cutting board. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2), 157-162.
74. **Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L. L., Vestby, L. K. and Langsrud, S.** (2012) Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*, 45 (2), 532-544.
75. **Mozes, N., Marchal, F., Hermesse, M. P., Van Haecht, J. L., Reuliaux, L., Leonard, A. J. and Rouxhet, P. G.** (1987) Immobilization of microorganisms by adhesion: Interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 439-450.
76. **Munir, M. T., Maneewan, N., Pichon, J., Gharbia, M., Oumarou-Mahamane, I., Baude, J., Thorin, Ch., Lepelletier, D., Pape, P. L., Eveillard, M., Irle, M., Pailhoriès, H., Aviat, F., Belloncle, Ch., Federighi, M. and Dubreil, L.** (2021) Confocal spectral microscopy, a non-destructive approach to follow contamination and biofilm formation of mCherry *Staphylococcus aureus* on solid surfaces. *Scientific Reports*, 11, 15574.

77. **Nealson, K. H., Platt, T. and Hastings, J. W.** (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104 (1), 313-22.
78. **Niemann, H. H., Schubert, W.-D. and Heinz, D. W.** (2004) Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes and Infection*, 6 (1), 101-112.
79. **Nobbs, A. H., Lamont, R. J. and Jenkinson, H. F.** (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73 (3), 407-450.
80. **Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T. and Jehl F.** (2016) The BioFilm ring test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 657-661.
81. **Olson, E. R.** (1993) Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular Microbiology*, 8 (1), 5-14.
82. **Onilude, A. A., Igbinalolor, R. O. and Wakil, S. M.** (2010) Effect of time and relative humidity on the microbial load and physical quality of cashew nuts (*Anacardium occidentale* L) under storage. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (19), 1939-1944.
83. **Otto C., Zahn, S., Rost, F., Zahn, P., Jaros, D. and Rohm, H.** (2011) Physical methods for cleaning and disinfection of surfaces. *Food Engineering Reviews*, 3, 171-188.
84. **Overman, P.** (2000) Biofilm: A New View of Plaque. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 1 (3), 18-29.
85. **Patange, A. D., Simpson, J. C., Curtin, J. F., Burgess, C. M., Cullen, P. J. and Tiwari, B. K.** (2021) Inactivation efficacy of atmospheric air plasma and airborne acoustic ultrasound against bacterial biofilms. *Scientific Reports*, 11 (1), 2346.
86. **Paz-Méndez, A. M., Lamas, A., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A. and Franco, C. M.** (2017) Effect of food residues in biofilm formation on stainless steel and polystyrene surfaces by *Salmonella enterica* strains isolated from poultry houses. *Foods*, 6 (12), 106.
87. **Pagedar, A., Singh, J. and Batish, V. K.** (2010) Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *Journal of Basic Microbiology*, 50 (1), 98-106.

88. **Pembrey, R. S., Marshall, K. C. and Schneider, R. P.** (1999) Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7), 2877-2894.
89. **Perrin, C., Briandet, R., Jubelin, G., Lejeune, P., Mandrand-Berthelot, M.-A. Rodrigue, A. and Dorel, C.** (2009) Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6), 1723-1733.
90. **Pouchlý, J.** (2008) Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 195.
91. **Proft, T. and Baker, E. N.** (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 613-635.
92. **Procházková, G., Jirků, V., Bartovská, L. and Brányik, T.** (2011) Použití Fyzikálně-chemických nástrojů pro predikci mikrobiální adheze. *Chemické Listy*, 105, 856-863.
93. **Purevdorj, B., Costerton, J. W. and Stoodley, P.** (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9), 4457-4464.
94. **Reading, N. C. and Sperandio, V.** (2005) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 254 (1), 1-11.
95. **Rosenberg, M.** (2006) Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *Microbiology Letters*, 262 (2), 129-134.
96. **Rosenberg, M.** (1984) Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *Microbiology Letters*, 22, 289-295.
97. **Rulík, M., Holá, V.** (2012) Mikrobiální biofilmy 1. Všudypřítomný, a přitom málo známý fenomén. *Živa*, 104-106.
98. **Ryu, J.-H., Kim, H. and Beuchat, L. R.** (2004) Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Journal of Food Protection*, 67 (10), 2123-2131.

99. **Sauer, K.** (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4 (6), 219.
100. **Smyth, C. J., Jonsson, P., Olsson, E., Soderlind, O., Rosengren, J., Hjertén, S. and Wadström, T.** (1978) Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Infection and immunity*, 22 (2), 462-472.
101. **Soto, G. E. and Hultgren, S. J.** (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, 181 (4), 1059-1071.
102. **Stern, H. O.** (1924) Zur theorie der elektrolytischen doppelschicht. 30 (21-22), 508-516.
103. **Tahergorabi, R., Matak, K. E. and Jaczynski, J.** (2012) Application of electron beam to inactivate *Salmonella* in food: Recent developments. *Food Research International*, 45 (2), 685-694.
104. **Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M. and Li, S.** (2018) Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) system. *Frontiers in Microbiology*, 9, 55.
105. **Todt, J. C. and McGroarty, E. J.** (1992) Involvement of histidine-21 in the pH-induced switch in porin channel size. *Biochemistry*, 31 (43), 10479-10482.
106. **Tomičić, R., Tomičić, Z., Thaler, N., Humar, M. and Raspor, P.** (2020) Factors influencing adhesion of bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and yeast *Pichia membranifaciens* to wooden surfaces. *Wood Science and Technology*, 54 (6), 1663-1676.
107. **Torlak, E. and Sert, D.** (2013) Combined effect of benzalkonium chloride and ultrasound against *Listeria monocytogenes* biofilm on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 57 (1), 220-226.
108. **Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M. and Nomura, N.** (2015) Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 226, 65-77.
109. **Van Oss, C. J.** (1989) Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biophysics*, 14, 1-16.

110. **Vasilyak, L. M.** (2021) Physical Methods of Disinfection (A Review). *Plasma Physics Reports*, 47 (3), 318-327.
111. **Vasudevan R.** (2014) Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 1 (3), 84-98.
112. **Verwey, E. J. W.** (1947) Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *The Journal of Physical Chemistry*, 51 (3), 631-636.
113. **Walker, S. M., Sojka, M., Dibb-Fuller, M. and Woodward, M. J.** (1999) Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype *Enteritidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 48 (3), 253-261.
114. **Yu, H., Liu, Y., Li, L., Guo, Y., Xie, Y., Cheng, Y. and Yao, W.** Ultrasound-involved emerging strategies for controlling foodborne microbial biofilms. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 91-101.
115. **Zhao, X., Yu, Z. and Ding, T.** (2020) *Quorum-sensing* regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*, 8 (3), 425.
116. **Zore, A., Bezek, K., Jevšnik, M., Abram, A., Runko, V., Slišković, I., Raspor, P., Kovačević, D. and Bohinc, K.** (2020) Bacterial adhesion rate on food grade ceramics and teflon as kitchen worktop surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108764.