

## Monitoring tvorby biofilmu u potravinářsky významných bakterií

Termínem *biofilm* se rozumí výsledek adherence mikrobů na různé povrchy, ať již umělé či nativní. Na nich vznikají mnohvrstevné shluky mikrobů, mikrokolonie, obklopené vrstvou polymerního extracelulárního materiálu. Tato extracelulární polysacharidová (proteinová) substance tvoří přibližně 85 % biofilmu a je protkaná rozsáhlou sítí mikrokanálek, které zajišťují proudění vody a plynů, distribuci živin a vylučování metabolitů. Kromě polysacharidové matrix obsahuje zpravidla i další organické a anorganické složky získané z vnějšího prostředí a v biofilmu plní ochrannou funkci. Bakteriální buňky jsou díky tomu chráněny před vnějšími vlivy, jako je např. vysychání či účinky UV záření, dále před imunitním systémem hostitele a před průnikem antibiotik a dezinfekčních prostředků.

Biofilm představuje důležitou složku životního prostředí, která člověku přináší užitek nejen ve formě normální mikroflóry, ale také je součástí celé řady biotechnologií, včetně průmyslové výroby a technologií pro čištění odpadních vod. Na druhou stranu však přináší biofilm celou řadu problémů. V průmyslu jde především o podíl na kolonizaci lodních trupů, o podporu koroze průmyslových konstrukcí, v průmyslových výměnících tepla tvoří tepelnou izolační vrstvu aj. Z hlediska hygienického představují mikrobiální biofilmy závažný problém ve vodárenských a rozvodových zařízeních pro pitnou vodu, kde mohou být biofilmy zdrojem oportunně patogenních bakterií. V potravinářském průmyslu jsou kladeny přísné nároky na sanitační a dezinfekční postupy, ale i přesto není výskyt bakteriálních kontaminací v potravinářském odvětví úplnou výjimkou. Jednou z možných příčin kontaminace může být výskyt biofilmu na kontaktních površích, který odolává působení dezinfekčních látek. Nejčastěji bývá detekován výskyt biofilmu u *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*.

K průkazu tvorby biofilmu se používá jednak metod fenotypových, jednak genotypových. *Fenotypové metody* jsou založeny na kultivaci mikroba a poté na obarvení vzniklého biofilmu na vnitřním povrchu zkumavky či důlku mikrotitrační destičky (Christensenova metoda), na mikroskopickém pozorování obarvené vrstvy biofilmu např. na povrchu katétru, na posouzení vzhledu kolonií na půdách s kongočervení, nebo na posouzení povrchových vlastností mikroba. *Genetické metody* se zakládají na průkazu genů pro tvorbu biofilmu.

**Christensenova zkumavková metoda** je založena na kultivaci testovaného mikroba ve zkumavce s tryptonosojovým bujonem (TSB) nebo mozkosrdcovou infuzí (BHI) a následném obarvení vzniklé biofilmové vrstvy např. krystalovou violetí. Často se využívá i suplementace média glukózou, protože glukóza zvyšuje schopnost tvorby biofilmu. Délka inkubace se pohybuje zpravidla v rozmezí 24 až 48 hodin, v závislosti na druhu mikroba a růstových podmínkách. Teplota inkubace je u bakterií obvykle 37 °C, u kvasinek se používá teplota nižší, 30 °C. Nevýhodami této metody jsou nemožnost přesně kvantifikovat nárůst biofilmu a značná subjektivita hodnocení výsledku. Výhodou je naopak jednoduchost jejího provedení a nenáročnost k laboratornímu vybavení.

Další často používanou metodou je **Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách**. Jde o modifikaci předchozí metody a je založena na kultivaci testovaného mikroba v jamkách mikrotitrační destičky a hodnocení jeho nárůstu na stěnách těchto jamek. Kultivace probíhá ve stejných médiích a za stejných kultivačních podmínek jako v případě Christensenovy zkumavkové metody. Po inkubaci, fixaci a následném obarvení je síla biofilmového nárůstu hodnocena spektrofotometricky při vhodných vlnových délkách, tj. 595 – 620 nm. Výsledkem je hodnota optické denzity (OD) každého testovaného důlku. OD jednotlivých důlků se potom porovnává s tzv. *cut off value*, která se vypočítá na základě OD důlků negativní kontroly. Výhoda oproti předchozí metodě je přesnost stanovení.

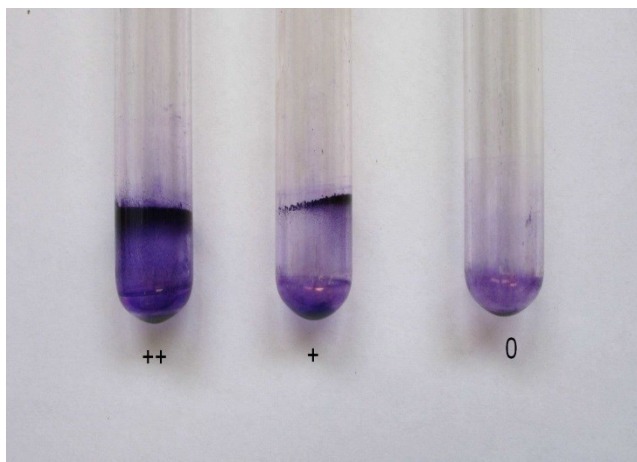
## Úkol 1 - Průkaz tvorby biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody

**Testované mikroorganismy:** *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* (nebo *P. aeruginosa*), *Klebsiella* sp., *Bacillus subtilis* (nebo *B. cereus*), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

### Postup:

- Čisté kultury vyšetřovaných kmenů přeneste sterilní kličkou do zkumavek se sterilním fyziologickým roztokem a upravte suspenzi tak, aby odpovídala 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice (cca  $3 \times 10^8$  CFU/ml).
- Do plastových a skleněných zkumavek pipetujte po 2 ml mozkosrdcové infuze (BHI) nebo BHI se sacharózou (5% w/v; BHI-S). Všechny zkumavky zaočkejte 100  $\mu$ l suspenze testovaných kultur.
- Po 24hodinové kultivaci při 37 °C za intenzivního třepání v normální atmosféře vylijte obsah zkumavek a zkumavky třikrát jemně promyjte vodou.
- Biofilm na dně zkumavky fixujte etanolem 20 min.
- Po skončení fixace naplňte zkumavky 3 ml Gramova roztoku č. 1 (roztok krystalové violeti) a nechte působit 20 min při pokojové teplotě.
- Poté barvivo ze zkumavek vylijte a zkumavky opět třikrát promyjte vodou.

### Hodnocení:



Obr. 1 – Christensonova zkumavková metoda

Zhodnoťte zbarvení vrstvy vytvořené na vnitřní stěně zkumavky. Jako silně pozitivní (++) označte kmeny, které vytvořily homogenní, intenzivně zbarvenou vrstvu. Jako slabě pozitivní (+) označte kmeny, které vytvořily slabší vrstvu biofilmu. Pokud zbarvená vrstva na stěně zkumavky není patrná, kmen je negativní (0). Přítomnost zbarveného materiálu jen na dně zkumavky nebo pouhý barevný prstenec vytvořený v oblasti původní hladiny média označte také jako negativní výsledek.

## Úkol 2 - Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce

**Testované mikroorganismy:** *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* (nebo *P. aeruginosa*), *Bacillus subtilis* (nebo *B. cereus*), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

## Postup:

- Čisté kultury vyšetřovaných kmenů přeneste sterilní kličkou do zkumavek se sterilním fyziologickým roztokem a upravte suspenzi tak, aby odpovídala 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice (cca  $3 \times 10^8$  CFU/ml).
- Do jamek destičky (viz Tab. 2): 20  $\mu$ l suspenze bakterií + 180  $\mu$ l média BHI nebo BHI-S (s přidavkem 5 % sacharózy).
- Inkubace inokulovaných mikrotitračních destiček v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Po skončení inkubace opatrně odpipetujte obsah jamek a jamky třikrát promyjte vodou.
- Fixace etanolem 20 min.
- Po skončení fixace naplňte jednotlivé jamky 160  $\mu$ l Gramova roztoku č. 1 (roztok krystalové violeti) a nechte působit po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Poté barvivo z jamek odstraňte a zkumavky třikrát promyjte vodou.
- Po usušení naplňte jednotlivé jamky 160  $\mu$ l 95% etanolu, který vyluhuje barvivo z obarvené vytvořené vrstvy biofilmu. Intenzita zbarvení výluhu v jednotlivých jamkách (optická denzita, OD) měřte spektrofotometricky při 595 nm.

Tab. 1 – Schéma rozmístění jednotlivých mikroorganismů v mikrotitrační destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
B	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
C	<i>Escherichia coli</i> (BHI)						<i>Escherichia coli</i> (BHI-S)					
D	<i>P. fluorescens</i> nebo <i>P. aeruginosa</i> (BHI)						<i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> (BHI-S)					
E	<i>Klebsiella</i> (BHI)						<i>Klebsiella</i> (BHI-S)					
F	<i>Bacillus subtilis</i> nebo <i>B. cereus</i> (BHI)						<i>Bacillus subtilis</i> nebo <i>B. cereus</i> (BHI-S)					
G	<i>Staphylococcus aureus</i> (BHI)						<i>Staphylococcus aureus</i> (BHI-S)					
H	<i>Enterococcus faecalis</i> (BHI)						<i>Enterococcus faecalis</i> (BHI-S)					

NK – negativní kontrola (kultivační médium bez mikroorganismů)

## Hodnocení:

Produkcí biofilmu testovanými bakteriemi posuďte dle výsledné hodnoty absorbance, která je přímo úměrná množství vytvořeného biofilmu. Výsledná hodnota absorbance se vypočítá následovně:

$$A_{595} = A_M - A_{NK}$$

kde:  $A_{NK}$ .....průměrná hodnota absorbance negativních kontrol

$A_M$ .....průměrná hodnota absorbance testovaného mikroorganismu

Výsledky rozdělte do tří kategorií na základě porovnání výsledné hodnoty  $A_{595}$ :

- kmen netvořící biofilm ( $A_{595} = 0 - 1$ ),
- kmen se slabou tvorbou biofilmu ( $A_{595} = 1 - 1,5$ ),
- kmen se silnou tvorbou biofilmu ( $A_{595} = 1,5$  a více).