



Ústav konzervace potravin
VŠCHT PRAHA

Metody detekce bakteriálních biofilmů v potravinářství

Eva Šviráková

Lucie Bambasová, Jaroslav Krupinský

TEORIE

Taxonomie vybraných bakterií schopných tvořit biofilmy: koky

Doména: Bacteria
Oddělení: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeď: Enterococcaceae

Rod: *Enterococcus*

Druh: *Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecium

Doména: Bacteria
Oddělení: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeď: Streptococcaceae

Rod: *Streptococcus*

Druh: *Streptococcus* sp.

Optimální kultivační podmínky

Teplota: *Ent. (faecalis a faecium)* (35-37 °C), *Streptococcus* sp. (37 °C)

pH: *Ent. (faecalis a faecium)* (7,0-7,5), *Streptococcus* sp. (7,0-7,2)

Kultivace: aerobní

TEORIE

Taxonomie vybraných bakterií schopných tvořit biofilmy: tyčinky

Doména: Bacteria

Oddělení: Proteobacteria

Třída: Gammaproteobacteria

Řád: Enterobacteriales

Čeleď: Enterobacteriaceae

Rod: *Escherichia*, *Klebsiella*

Druh: *Escherichia coli**

*Klebsiella pneumoniae**

Doména: Bacteria

Oddělení: Proteobacteria

Třída: Gammaproteobacteria

Řád: Pseudomonadales

Čeleď: Pseudonadaceae

Rod: *Pseudomonas*

Druh: *Pseudomonas aeruginosa***

Optimální kultivační podmínky

Teplota: *E. coli* (35-37 °C), *K. pneumoniae* (30-35 °C), *P. aeruginosa* (30-37 °C)

pH: *E. coli* (5,5-8,0), *K. pneumoniae* (7,2), *P. aeruginosa* (6,6-7,0)

Kultivace: fakultativně anaerobní*, aerobní**

TEORIE

Charakteristika bakteriálních biofilmů

BAKTERIÁLNÍ BIOFILMY

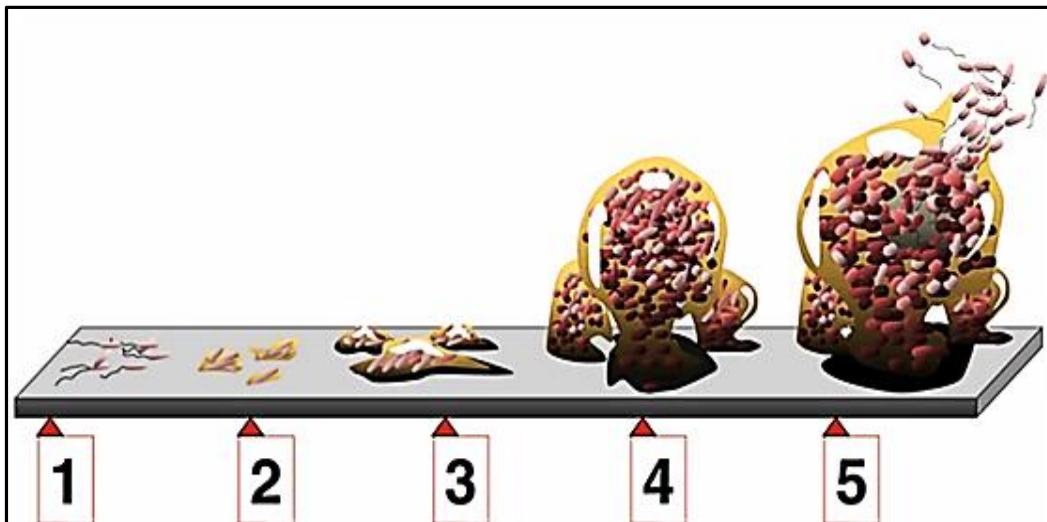
- Představují funkční heterogenní (nebo homokulturní) konsorcia
bakterií
- Jsou odolnější vůči nepříznivým podmínkám
oproti planktonním buňkám
- Jejich výskyt v potravinářství je (většinou) nežádoucí,
vyskytují se např. v mlékárenském, masném, konzervářenském průmyslu
- Vytvářejí mikrobiální „kapsy“ / „díry“
zvláště na obtížně sanitovatelných místech
- Kontaminují (sekundárně) potravinářské suroviny a výrobky
a snižují tak jejich zdravotní bezpečnost a jakost (za vzniku různých senzorických defektů)
(ETNA Consulting Group, 2020)

TEORIE

Tvorba bakteriálních biofilmů I

K tvorbě bakteriálních biofilmů dochází v 5 obecných fázích:

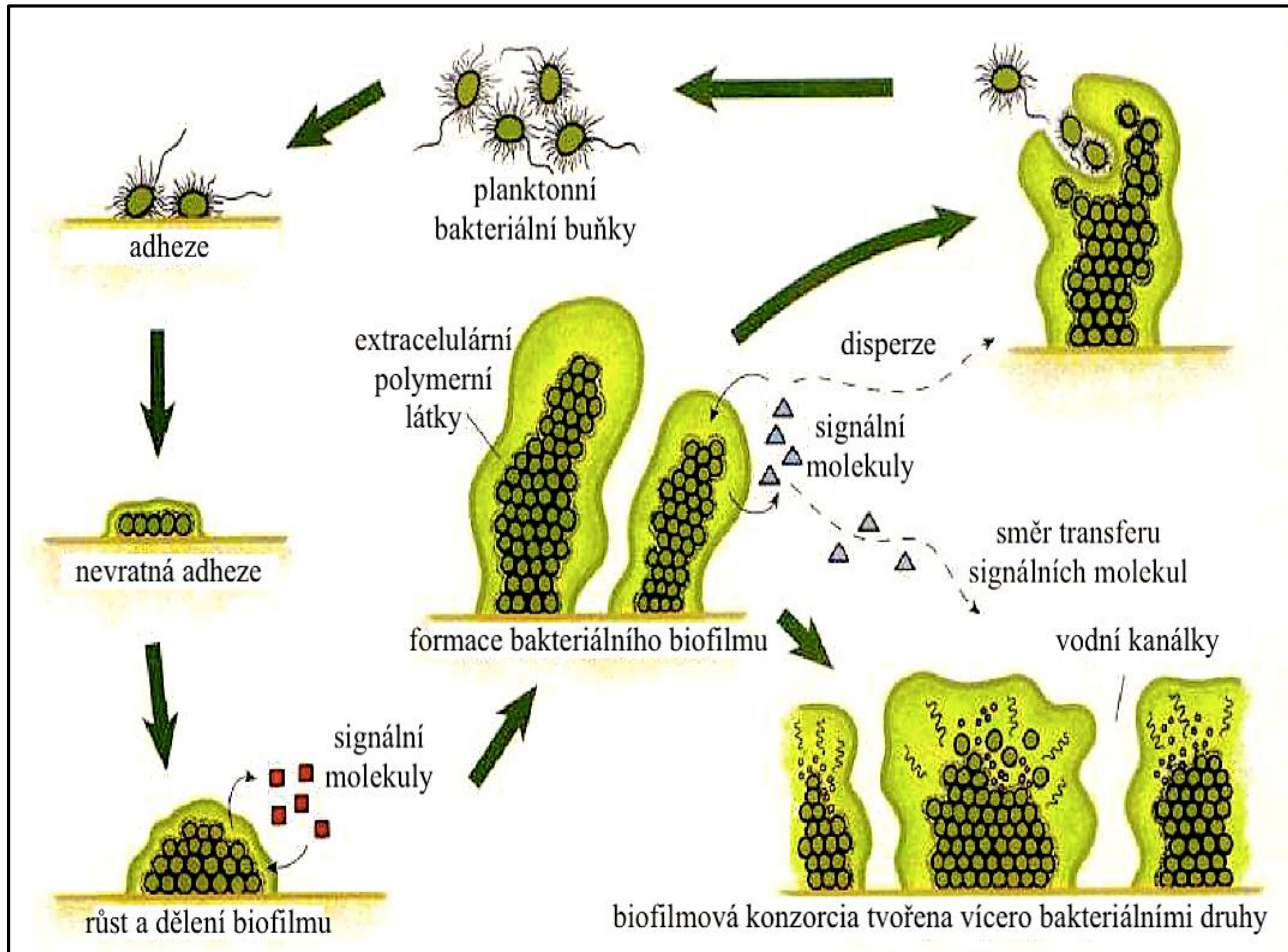
- 1) Lag fáze biofilmu
- 2) Exponenciální fáze biofilmu
- 3) Fáze zpomaleného růstu biofilmu
- 4) Fáze stacionárního nárůstu biofilmu
- 5) Fáze zralého biofilmu



Obr. 1: Koloběh růstu bakteriálního biofilmu:
1-5): fáze vzniku a růstu biofilmu
(Monroe, 2007); upraveno

TEORIE

Tvorba bakteriálních biofilmů II

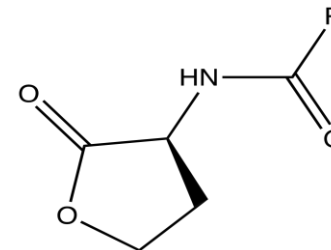


Obr. 2: Obecný proces tvorby bakteriálního biofilmu
(Harrison a kol., 2005), upraveno

QUORUM SENSING

Je komunikační proces k organizaci skupinového chování bakterií v biofilmech

Ke komunikaci mezi buňkami dochází pomocí signálních molekul homoserin-laktonů



Obr. 3: N-acylhomoserin lakton (AHL)
(Eickhoff a Bassler, 2018; Vadakkan a kol., 2018)

QUORUM QUENCHING

Je inhibiční mechanismus quorum sensingu

CÍLE PRÁCE

U testovaných bakterií
Enterococcus spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp.,
Pseudomonas sp. a *Streptococcus* sp.:

USKUTEČNIT MAKROSKOPICKÁ A MIKROSKOPICKÁ POZOROVÁNÍ



DETEKOVAT VYTVOŘENÉ BIOFILMY



DISKUTOVAT ZÍSKANÉ VÝSLEDKY

stran zvýšení zdravotní mikrobiologické bezpečnosti a jakosti
potravinářských surovin a výrobků
ve vazbě na nežádoucí tvorbu biofilmů



EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použité kmeny bakterií

Sbírkové kmeny:

Enterococcus faecalis CCM 7247

Enterococcus faecium CCM 2308

Escherichia coli CCM 7395

Klebsiella pneumoniae CCM 8853

Pseudomonas aeruginosa CCM 7930

Streptococcus sp. CCM 4685

Deponování kmenů:

Česká sbírka mikroorganismů

(CCM - Czech Collection of Microorganisms,
Brno, CZE)

Izolované kmeny:

Escherichia coli LEV 682/17

Escherichia coli LEV 687/17

Escherichia coli LEV 1456/17

Klebsiella pneumoniae LEV 700/17

Klebsiella pneumoniae LEV 1009/17

Klebsiella pneumoniae LEV 1022/17

Izolace kmenů:

potravinářská průmyslová výroba v ČR
(solovna)

Uložení kmenů:

Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
v.v.i., Brno; VŠCHT Praha

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použité metody a test

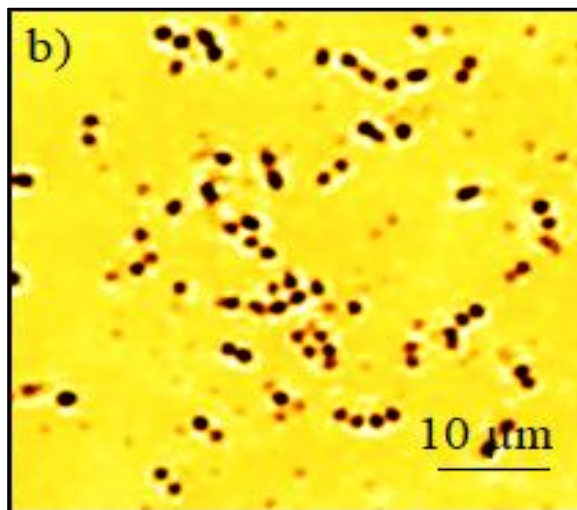
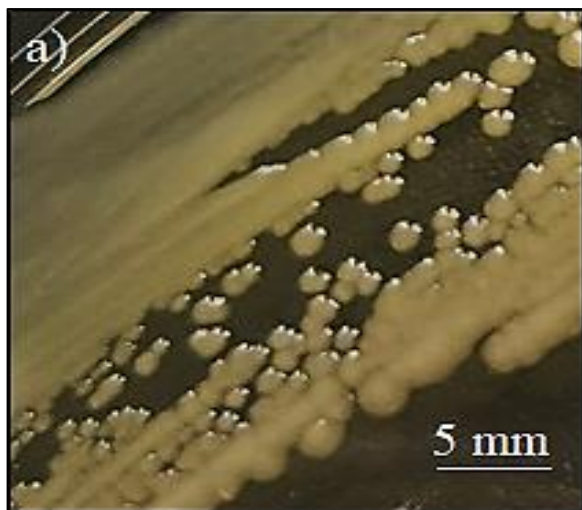
STANOVENÍ MAKROSKOPICKÝCH A MIKROSKOPICKÝCH ZNAKŮ BAKTERIÍ

ZJIŠTĚNÍ TVORBY BIOFILMŮ U BAKTERIÍ

- Modifikovaná Christensenova zkumavková metoda (Olivares a kol., 2016)
(barvivo: krystalová violeť 0,1 hm. %)
- Plotnová metoda s agarem s kongo červení (Kaiser a kol., 2013)
(barvivo: kongo červeň 0,8 hm. %)
- Sprejový test TBF[®] 300S (Christeyns, BEL)
(barvivo: neuvedeno)
- Spektrofotometrická metoda (Stepanović a kol., 2007)
(A_{570})

VÝSLEDKY I

Makroskopické a mikroskopické znaky bakterií



Obr. 3: Makrofotografie a mikrofotografie *Ent. faecalis* CCM 7247

Enterococcus faecalis CCM 7247

Kolonie

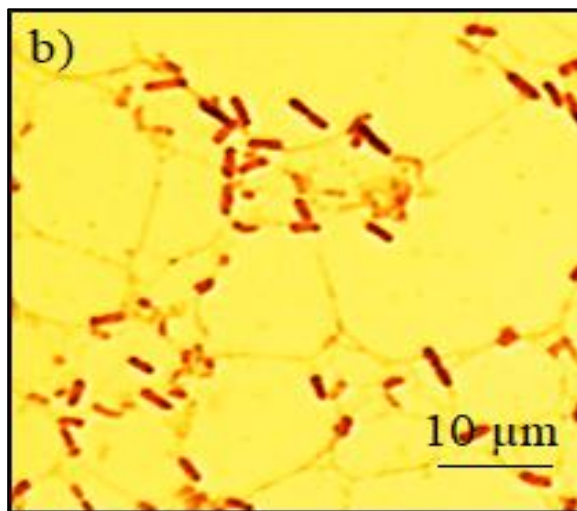
Barva: smet. bílá

Průměr: 1,5-2,0 mm

Buňky

Typ: G⁺ koky

Průměr: 1,0-2,0 μm



Obr. 4: Makrofotografie a mikrofotografie *K. pneumoniae* CCM 8853

Klebsiella pneumoniae CCM 8853

Kolonie

Barva: bílá

Průměr: 1,5-2,0 mm

Buňky

Typ: G⁻ tyčinky

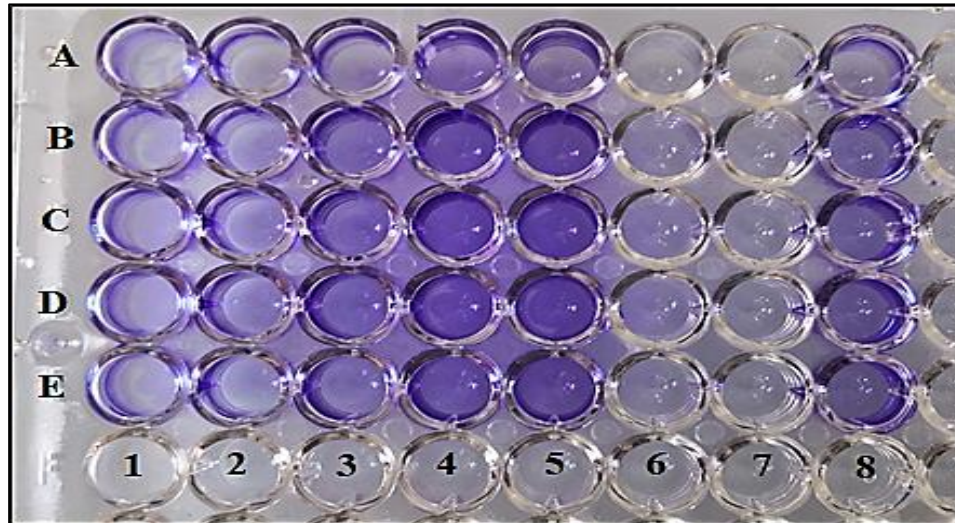
Délka: 3,0-5,0 μm

Šířka: 0,5-1,0 μm

VÝSLEDKY II

Detekce biofilmů u bakterií (kvalitativní)

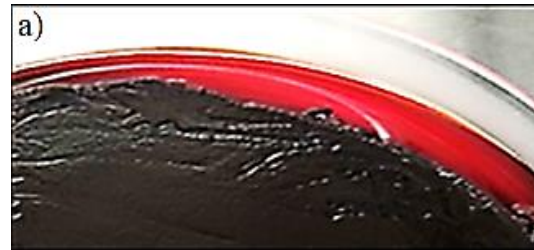
Christensenova zkumavková metoda (modifikace)



Obr. 5:

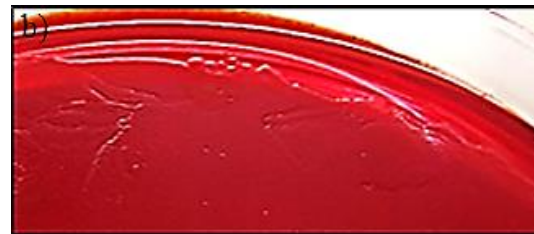
- 1) *E. coli* CCM 7395
 - 2) *Ent. faecalis* CCM 7247
 - 3) *Ent. faecium* CCM 2308
 - 4) *K. pneumoniae* CCM 8853
 - 5) *P. aeruginosa* CCM 7930
 - 6) *Streptococcus* sp. CCM 4685
 - 7) negativní kontrola (sterilní bujón TSB)
 - 8) pozitivní kontrola (kmen *Asaia lannensis*)
- (Šístková a kol., 2019)

Plotnová metoda s agarem s kongo červení



Obr. 6a:

- a) pozitivní tvorba biofilmu (+)
u *K. pneumoniae* CCM 8853
(černé kolonie na červeném agaru)



- Obr. 6b: Negativní tvorba biofilmu (-)
u *Streptococcus* sp. CCM 4685
(bezbarvé, průhledné, kolonie
na červeném agaru)

Sprejový test TBF[®] 300S (Christeyns, BEL)



Obr. 7a:

- pozitivní tvorba biofilmu (+)
u *K. pneumoniae* CCM 8853
(růžové kolonie na podložním skle)

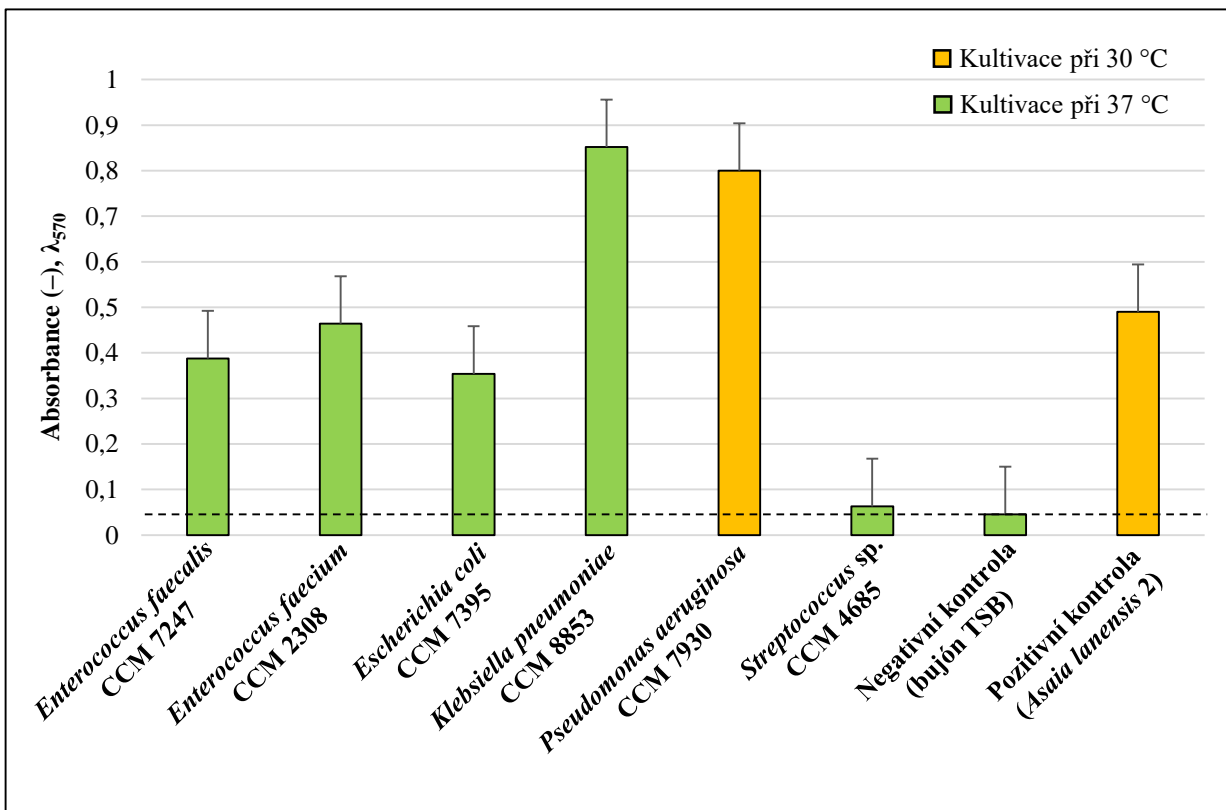


- Obr. 7b: Negativní tvorba biofilmu (-)
u *Streptococcus* sp. CCM 4685
(žádné adherované buňky
na podložním skle)

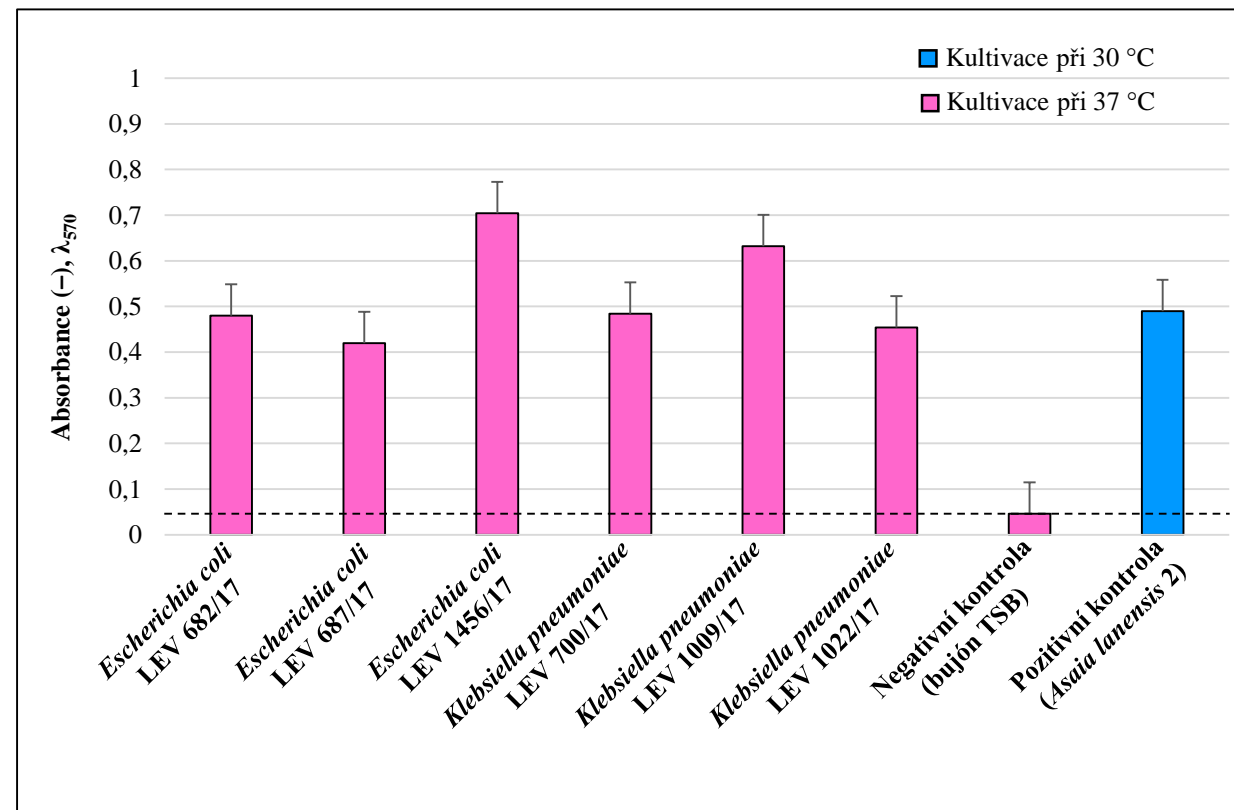
VÝSLEDKY III

Detekce biofilmů u bakterií (kvantitativní)

Spektrofotometrická metoda



Obr. 8a: Tvorba biofilmů u bakteriálních sbírkových kmenů (CCM), spektrofotometrická metoda (A_{570})



Obr. 8b: Tvorba biofilmů u bakteriálních izolovaných kmenů (LEV), spektrofotometrická metoda (A_{570})

VÝSLEDKY IV

Tvorba biofilmů u bakterií – sumarizace (všechny metody)

Bakteriální kmen	Christensenova zkumavková metoda (modifikace)	Plotnová metoda (agar+kongo červeně)	Sprejový test TBF®300S (Christeysns, BEL)	Spektrofotometrická metoda (A ₅₇₀)
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7247	+	+	+	+ (0,388)
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 2308	+	+	+	+ (0,464)
<i>Escherichia coli</i> CCM 7395	+	+	+	+ (0,354)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 8853	+	+	+	+ (0,852)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 7930	+	+	+	+ (0,800)
<i>Streptococcus</i> sp. CCM 4685	-	-	-	- (0,063)
<i>Escherichia coli</i> LEV 682/17	+	+	+	+ (0,480)
<i>Escherichia coli</i> LEV 687/17	+	+	+	+ (0,420)
<i>Escherichia coli</i> LEV 1456/17	+	+	+	+ (0,704)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LEV 700/17	+	+	+	+ (0,484)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LEV 1009/17	+	+	+	+ (0,632)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LEV 1022/17	+	+	+	+ (0,454)

+... pozitivní tvorba biofilmu, -... negativní tvorba biofilmu

ZÁVĚR

**Výsledky této práce
mohou být využitelné
v potravinářském průmyslu,
zejména mlékárenském, masném
a konzervářském,
při spolehlivém průkazu
a účinné eliminaci biofilmů
technologicky nežádoucích bakterií**

LITERATURA

- Betelgeux**, Christeysn Food Hygiene, TBF®300S biofilm detection test. [Online] **2020**, <https://www.betelgeux.es/en/betelgeuxtv/tbf-300-detection-rapid-of-biofilms/> (accessed July 31, 2020).
- Brands, S. J.** (ed.), 1989-present. *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. [Online] **2019**. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/> (accessed July 31, 2020).
- Eickhoff, M. J.; Bassler B. L.** SnapShot: bacterial quorum sensing. *Cell* **2018**, 174: 1328-1328.
- ETNA Consulting Group.** Spoilage of non-carbonated beverages [Online] **2020**, <https://www.etnaconsulting.com/blog/spoilage-of-non-carbonated-beverages> (accessed May 11, 2020).
- Coughlan, L. M.; Cotter, P. D.; Hill, C.; Alvarez-Ordóñez, A.** New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology* **2016**, 7, 121.
- Fisher, K.; Phillips, C.** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (Reading, U. K.)* **2009**, 155 (6), 1749-1757.
- Flemming, H.-C.; Wingender, J.** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **2010**, 8 (9), 623-633.
- Grimont, P. A.; Grimont, F.** *Klebsiella*, pp. 1-26. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2nd ed., **2015**. In: Wiley Online Library [Online] **14.9.2015**. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01150> (accessed July 31, 2020).
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, 2 (2), 95-108.
- Harrison, J. J.; Turner, R. J.; Marques, L. L., Ceri H.** Biofilms: a new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. *American Scientist* **2005**, 93: 508-515.
- Kaiser, T. D. L.; Pereira, E. M.; Dos Santos, K. R. N.; Maciel, E. L. N.; Schuenck, R. P.; Nunes, A. P. F.** Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2013**, 75 (3), 235-239.
- Merino, L.; Procura, F.; Trejo, F. M.; Bueno, D. J.; Golowczyc, M. A.** Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: detection, control and eradication strategies. *Food Research International* **2019**, 119, 530-540.
- Monroe, D.** Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLOS Biology* **2007**, 5 (11), 2458-2461.
- Olivares, E.; Badel-Berchoux, S.; Provot, C.; Jaulhac, B.; Prévost, G.; Bernardi, T.; Jehl, F.** The biofilm ring test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of Clinical Microbiology* **2016**, 54 (3), 657-661.
- Palleroni, N. J.** *Pseudomonas*, pp. 1-105. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2nd ed., **2015**. In: Wiley Online Library [Online] **14.9.2015**. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01210> (accessed July 31, 2020).
- Scheutz, F.; Strockbine, N. A.** *Escherichia*, pp. 1-49. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2nd ed., **2015**. In: Wiley Online Library [Online] **14.9.2015**. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01147> (accessed July 31, 2020).
- Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Bonaventura, G. D.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F.** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* **2007**, 115 (8), 891-899.
- Šístková, I.; Horsáková, I.; Čeřovský, M.; Čížková, H.** Efficacy of chemical agents and power ultrasound on biofilms formed by *Asaia* spp. – spoilage bacteria in beverage industries. *Czech Journal of Food Sciences* **2019**, 37 (4), 221-225.
- Vadakkan, K.; Choudhury, A. A.; Gunasekaran, R.; Hemapriya, J.; Vijayanand, S.** Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **2018**, 16: 239-252.
- Whiley, R. A.; Hardie, J. M.** *Streptococcus*, pp. 1-86. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2nd ed., **2015**. In: Wiley Online Library [Online] **14.9.2015**. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00612> (accessed July 31, 2020).

DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST

**Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství,
Národní agenturou pro zemědělský výzkum,
projektem QK1710156 (2017-2021, MZE/QK),
v programu QK - Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství
na období 2017-2025 "ZEMĚ",
s dobou řešení projektu: 02/2017-12/2021**

KONTAKT:

Ing. Eva Šviráková, Ph.D.

Ústav konzervace potravin

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Technická 3/5, 166 28 Praha 6 – Dejvice

E-mail: eva.svirakova@vscht.cz

Tel: 603 813 570