

Mikrobiální biofilmy v potravinářském průmyslu

Schlegelová J., Karpíšková S.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno

Souhrn

Biofilmy jsou společenství mikroorganismů s architekturou, na které se podílejí mikroorganismy a jimi produkované biotické látky spolu se zachycenými organickými a anorganickými látkami z vnějšího prostředí. Vážným problémem jsou v humánním lékařství. Mikrobiální biofilmová společenství jsou problémem i v potravinářském průmyslu, kde patogenní mikroorganismy uvolněné z biofilmové struktury mohou způsobovat kontaminace potravin a surovin pro jejich výrobu. Společenství jako celek, ale i jednotlivé buňky, vykazují zvýšenou rezistenci k sanitacím a dezinfekčním prostředkům, která způsobuje, že tyto komunity je nesnadné odstraňovat nebo mikroorganismy v nich inaktivovat. Zejména modelové studie, molekulárně-genetické a mikroskopické metody, mohou přispět k dalším poznáním, která povedou k prevenci a k inaktivaci mikrobiálních společenství na kontaktních površích technologických zařízení potravinářských podniků. Dá se očekávat, že tyto studie přinesou poznatky potřebné jak z pohledu lidského zdraví, tak pro zpracovatelské a výrobní potravinářské závody.

Klíčová slova: bezpečnost potravin – biocidní látky – eradikace biofilmu.

Summary

Schlegelová J., Karpíšková S.: Microbial Biofilms in the Food Industry

Biofilms are microbial communities whose architecture includes microorganisms, biotic substances produced by these microorganisms and attached organic and inorganic substances from the environment. They pose a serious problem in human medicine. Microbial biofilm communities are also cause for concern in the food industry since pathogenic microorganisms released from the biofilm may contaminate food and raw materials for food production. Not only the microbial community as a whole but also particular cells exhibit increased resistance to sanitation measures and disinfectants which makes it difficult to remove the biofilm or to inactivate particular built up microorganisms. Mainly model studies and molecular genetic and microscopy methods can contribute to better understanding of this issue, and thus to prevention and inactivation of microbial communities on food contact surfaces of equipment in the food production plants. Such studies would be of benefit to both health care and food processing and production.

Key words: food safety – biocides – eradication of biofilm.

Povrchová mikrobiální společenství – biofilmy

Za bakteriální biofilmy jsou považována společenství mikroorganismů rostoucí na rozhraní fází, například na pevném povrchu zařízení ve fluidním prostředí [13, 33]. Tato strukturovaná mikrobiální společenství mohou být jak jedno, tak častěji vícedruhová [55, 57]. V jednom společenství mohou koexistovat vedle sebe bakterie s odlišnými nároky například na kyslík a s odlišnou respirační aktivitou [11].

Je prokázáno, že mezi buňkami mikrospolečenství dochází k transferu DNA [21, 28, 44]. Toto poznání upozorňuje na další nebezpečí vyplývající z existence biofilmů, a tím je možnost přenosu rezistence k antimikrobiálním látkám mezi mik-

roorganismy. Subletálním působením biocidních látek na buňky v biofilmu může docházet k adopci mechanismů způsobujících rezistenci k biocidním i antimikrobiálním látkám [25]. Některé mikroorganismy rostoucí v biofilmech mohou nést jednoznačný detekovatelný genetický potenciál pro vznik biofilmu [14, 17]. Například ze stěrů z technologického zařízení potravinářských závodů a z potravin byly izolovány kmeny *Staphylococcus epidermidis*, které ve svém genomu nesly ica operon. Tyto kmeny se od ostatních lišily fenotypově, a to tvorbou biofilmu na polystyrenovém a skleněném povrchu [30].

Bakteriální buňky jsou uvnitř biofilmu propojeny a uzavřeny v exkretovaných povrchově aktivních substancích (polysacharidy, extracelulární

enzymy aj.), které tvoří tzv. biofilmový glykokalyx [23]. Vedle organických látek jsou zde zachytávány i anorganické látky z prostředí. Pomocí skenovací konfokální laserové mikroskopie umožňující prostorové zobrazení bylo zjištěno, že kontakt nižších vrstev buněk společenství s vnějším prostředím je uskutečňován prostřednictvím kanálků v biomase [32]. Mikrobiální biofilm žije v mikronice (s adaptací mikroorganismů na odlišný způsob života), jako společenství s primitivní homeostázou, primitivním cirkulačním systémem, metabolickou kooperací a každá z uchycených buněk ve společenství reaguje zcela odlišně od volných, planktonních buněk téže species. Jedná se tak o komplexní diferencované společenství, jehož proces vzniku lze pokládat, vzhledem ke koordinovaným aktivitám relativně malých genomů prokaryotů, v biologii za unikátní [54]. Již z tohoto je zřejmé, že za biofilm nelze považovat stav, kdy jsou mikrobiální buňky pouze adherované na povrchu, i když u některých kolonizací je možno adherované mikroorganismy považovat za první reverzibilní stadium vývoje biofilmu.

Adherence volných planktonních mikrobiálních buněk v přirozených systémech probíhá tehdy, kdy pro to existují zcela určité podmínky jak mikrobiální (hydrofobicita povrchu, přítomnost bičků a řasinek, přítomnost proteinů na povrchu buněk aj.), tak detailní podmínky, které charakterizují obvykle povrchy a prostředí po chemické, fyzikálně-chemické a nutriční stránce (hydrofilie/hydrofobicita, osmotický tlak, pH, teplota, přítomnost glycidů, aj.) [19]. Biologické makromolekuly adsorbované na pevném povrchu často obsahují polymery s proteiny a jsou předpokladem pro uchycení buněk [62]. Na kontaktních površích v potravinářském průmyslu jsou to především proteiny z mléka [31] nebo masové šťávy [62], které ulpěly na povrchu a tvoří tzv. kondiční film pro nasedávání a uchycení mikrobiálních buněk. Toto však neplatí za každé situace a podmínky se mohou u jednotlivých mikroorganismů lišit [29]. Například zdravotně významná bakterie *Listeria monocytogenes* adherovala na nerezové povrchy kondicionované složkami mléka ve významně menším počtu než na povrchy nekondicionované [60].

Význam biofilmu

V lékařství

Potencionálně nebezpečná společenství mikroorganismů pro člověka byla nalézána především v humánním lékařství, a to na površích umělohmotných, ale i na kovových implantátech a lékařských zařízeních [16, 18, 26, 58]. V případě biofilmů v humánním lékařství mohou uvolněné mikroorganismy způsobovat reinfekce [18]. Dokonce se v této souvislosti hovoří o běžné příčině perzistujících infekcí [12].



V potravinářském průmyslu

Avšak i v potravinářském průmyslu, kde jsou podmínky pro vznik biofilmu s ohledem na sanitaci a dezinfekční procesy složitější, byly patogenní mikroorganismy (*L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* aj.) nalézány jak na pevných kontaktních površích ze skla a z nerez, tak na površích z gumy, teflonu, ze dřeva a z umělých hmot [6, 35]. Prokazatelné mikrobiální biofilmy byly pomocí skenovací a světelné mikroskopie identifikovány na rostlinných potravinách, které byly zakoupeny v supermarketech [43].

Bakterie nebo jejich shluky uvolněné z biofilmu a unášené v protékajícím médiu, jako jsou voda, mléko, rostlinné šťávy, nebo uchycené na vlhkých polotovarech a potravinách, mohou být zdrojem pro mikrobiální kontaminaci dalších površích [61] nebo závažněji přímo potravin, a to rostlinného i živočišného původu [20, 43]. Uvolňovány jsou převážně jednotlivé buňky a malé shluky, ale byly zachyceny i velké agregáty buněk o velikosti 500 μm [55]. Velké agregáty již představují riziko s ohledem na velikost infekční dávky. Například bakterie rostoucí v biofilmu na nerezovém povrchu tepelného výměníku pasterační jednotky v mlékárně kontaminovaly mléko po pasterační v koncentraci 10^6 CFU/ml [22].

Rané práce zabývající se mikrobiálními biofilmy v potravinářském průmyslu prokazovaly biofilmy jak na potravinách, tak na kontaktních

povrchů technologických zařízení a tím odůvodňovaly studium biofilmů v tomto mikrobiálně exponovaném prostředí [36, 61, 62]. Během několika málo let znalosti v tomto směru pokročily natolik, že nelze o přítomnosti biofilmů na technologických površích a jejich potenciálu kontaminovat potraviny nebezpečnými mikroorganismy pochybovat [5, 23, 49]. Z povrchu post-pasterizační jednotky v mlékárně byly získány po sanitaci izoláty jak rodů *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*, tak Gram-negativní izoláty *Shigella* spp., *Escherichia* spp. a *Enterobacter aerogenes*. Navíc, izoláty byly čteně rezistentní ke karbenicilinu, kloxacilinu, cefaloridinu, novobiocinu a vankomycinu [47]. Prokazatelné případy poškození zdraví konzumentů jsou však zaznamenávány výjimečně, například příčinou krize v Japonsku v roce 2000 byla produkce termorezistentního toxinu bakterií *S. aureus* rostoucí v kohoutu potrubí závodu pro zpracování mléka [3].

Místa výskytu biofilmů v potravinářství

Je snadné si představit, že problematické z pohledu tvorby biofilmů a sanitace budou zejména povrchy z měkkých materiálů, které budou více narušeny například noži při řezání, a to i v domácnostech. Takováto místa mohou být zdrojem patogenních mikroorganismů a nebo tvořit niky pro tzv. kondiční filmy a následné uchycení patogenních a potenciálně patogenních mikroorganismů [20]. Při testování pomůcek používaných v domácnostech bylo zjištěno, že exopolymerní substance charakterizující biofilm byly identifikovány na všech testovaných dřevěných plochách pro krájení potravin, v kuchyňských mycích houbičkách i vlhčených utěrkách [43].

Mezi čteně kontaminované povrchy v potravinářských podnicích, i po sanitaci podle zavedených validovaných postupů, patří dopravní pásy, na kterých mohou být výrobky v přímém kontaktu s kontaminovaným povrchem. I po vyčištění byl dopravní pás v mlékárně na kontaktním povrchu kontaminován 10^5 – 10^6 CFU/100 cm² bakteriemi *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. a dalšími [42]. Zdrojem kontaminace může být i bioaerosol, při kterém jsou mikroorganismy uchyceny do kapalinových částic aerosolu. V prostředí závodů vzniká prouděním vody a vzduchu a uvolňováním bakterií z biofilmů v odpadech nebo na podlahách závodů, které mívají zdrsňený povrch nebo mohou být poškozeny. Takovéto povrchy jsou kontaminovány bakteriemi až 10^8 CFU/100 cm². Z prostředí masných a mléčných potravinářských podniků byly z těchto míst nejčastěji izolovány zdravotně závažné pseudomonády a stafyloko-

ky [37], izolována byla rovněž *L. monocytogenes* [56].

Většina povrchů v potravinářském průmyslu je z nerezavějící oceli, která je snadno čistitelná a chemicky odolná. Mikroskopicky však bylo prokázáno, že hladké nerezové povrchy jsou časem mechanickým čištěním rovněž narušeny. Vznikají na něm trhlinky a vrypy, kde zůstávají uchyceny mikroorganismy a zbytky surovin [59]. „Klasický“ biofilm, se kterým se můžeme setkat například ve vodovodních řádech, se může vyvíjet až několik týdnů [33]. Rovněž však bylo zjištěno, že ireverzibilní stadium vývoje biofilmu na nerezovém povrchu může za určitých podmínek nastat velmi rychle (do 1 minuty) [23].

Mikrobiální adherence na plochy z nerezových materiálů, jako jedno ze stadií vývoje biofilmu, nenastává vždy a je podmíněna jak vlastnostmi nerezové oceli [50], tak zejména vlastnostmi mikroorganismů. Vysoká korelace ($R=0,979$) byla zaznamenána mezi hydrofobicitou povrchu bakterie *Bacillus cereus* v různých růstových fázích a mírou adheze k nerezové oceli [41]. Z nerezového povrchu v mlékárně byla izolována bakterie *L. monocytogenes*, přičemž bylo prokázáno, že kmeny perzistující na nerezovém povrchu měly zvýšenou adhezenční schopnost a lišily se od dalších náhodných izolátů i optimální adhezenční teplotou při růstu v monokultuře [39]. Dále, exopolymerní substance produkované jedním mikroorganismem mohou poskytovat prostředí pro uchycení a růst jiného mikroorganismu, jak bylo zjištěno pro *L. monocytogenes* uchycenou v exopolymeru produkovaném *Pseudomonas fragi* [62].

Povrchové vlastnosti mikroorganismů ovlivňují i další stadium vývoje biofilmu. Například u kmenů *Escherichia coli* O157:H7 bez řasinek a s řasinkami, které jsou produkovány za stresových podmínek, nebyl zaznamenán rozdíl v adhezenci k nerez, ale kmeny s řasinkami byly schopny tvořit signifikantně lépe biofilm [46].

Rezistence a inaktivace mikroorganismů v biofilmech

Na rozdíl od volně žijících planktonních buněk, mikroorganismy v biofilmech na potravinářských kontaktních površích lze velmi obtížně inaktivovat. Bylo prokázáno, že bakteriální biofilmy vykazují zvýšenou rezistenci jak k čistícím a dezinfekčním látkám [8], tak biocidním látkám používaným v terapii infekčních onemocnění [2, 4]. Rezistence je přisuzována jednak specifickým vlastnostem buněčné populace v mikrospolečenství, jakou je například růstová fáze mikroorganismů [34] nebo produkce degradujících enzymů [53], tak struktúře biofilmu [9].

Vedle již zmíněných odlišných vlastností

buněk žijících v biofilmu, mezi které patří snížená citlivost k biocidním látkám, je dezinfekční a sanitační schopnost látek silně ovlivněna densitou buněčné populace v biofilmu. Jak bylo zjištěno, od koncentrace 10^8 CFU bakterií/cm² se však účinnost prakticky neměnila [52]. Rovněž jednotlivé druhy a kooperace mikroorganismů rostoucích v konkrétním biofilmu ovlivňují biocidní efektivitu látek. Například kmeny bakterie *E. coli* O157:H7 produkující exopolysacharid a nesoucí na povrchu řasinky měly oproti negativním kmenům zvýšenou rezistenci k chlóru [46]. Dále, uvolňování buněk *Pseudomonas aeruginosa* rostoucí v biofilmu s dominantní bakterií *Klebsiella pneumoniae* bylo mnohem pomalejší než u bakterie *P. aeruginosa* rostoucí v monokultuře [52].

Bylo zaznamenáno, že do specifické buněčné architektury biofilmu na kontaktních površích v potravinářských podnicích jsou uchyťovány organické a abiotické látky z prostředí [9, 52]. Biofilm rostoucí v neustálé přítomnosti abiotických částic byl mnohem rezistentnější k biocidním látkám než byl biofilm rostoucí bez nich. Uchycený kaolin a vápenaté ionty snižovaly signifikantně efektivnost dezinfekce a odstraňování biofilmu monochloraminem [52]. Důvodem snížené efektivnosti může být i inaktivace biocidní látky. Takto je například snižována aktivita chlorových dezinfekčních preparátů, které jsou v potravinářském průmyslu k dezinfekci často používány [10]. Organické látky mohou ulpívat i na povrchu biofilmu a tvořit tak ochranu bakterií v biofilmu před působením dezinfekčních látek [62].

Znamená to, že čisticí a dezinfekční látky používané v potravinářství musí být konstruovány tak, aby zohledňovaly specifické vlastnosti prostředí, ve kterém se biofilm může tvořit, avšak nezpůsobovaly ohrožení lidského zdraví. V potravinářství je důležitá zejména efektivita čisticích prostředků, protože odstraňují nánosy, chrání biofilm před působením dezinfekčních látek [24]. V průběhu čisticí fáze může být odstraněno až 99,8% bakterií přítomných na nerezovém povrchu [20].

V České republice podléhá používání dezinfekčních prostředků v potravinářství podmínkám uvedeným ve veterinárním zákonu č. 166/1999 Sb. a dalším právním předpisům, které zmiňují jak podmínky uvádění přípravků na trh, tak nejvyšší přípustné limity reziduí těchto biologicky aktivních látek. Státní veterinární správa ČR ve spolupráci s Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv vydává seznam, kde jsou mimo jiné uvedeny dezinfekční, dezinfekční čisticí a čisticí přípravky povolené v mlékárenských a maso zpracovatelských provozech [15].

Mezi čisticími látkami jsou například alkalické látky saponifikující tuky a oleje nebo látky solubilizující proteiny, chelátující látky, která vážou a odstraňují minerály. Jako dezinfekční látky jsou nejčtenější přípravky na bázi chloru, jodu, kvarterních amonných solí a některých kyselin.

Vedle působení těchto chemických látek [8, 48] jsou studovány indikované fyzikálně-chemické a fyzikální faktory (pH sanitačních prostředků, síla proudu sanitačního prostředku, termodynamické podmínky) a kombinace čisticích a dezinfekčních postupů, které mohou inaktivovat mikroorganismy nebo způsobit uvolnění společenství od osídlených povrchů [7, 38, 48, 50]. Kombinace účinků chelátujícího prostředku EDTA s ultrazvukem měla jednoznačný synergický efekt na uvolnění modelového biofilmu tvořeného *E. coli*. Toto však nebylo prokázáno pro biofilm tvořený *S. aureus* [40]. Pro čištění povrchu od biofilmu tvořeného *P. aeruginosa* a *S. aureus* se jeví efektivní použití silného proudu vody (17.2 barů). V kombinaci použité alkalické a kyselé přípravky dále signifikantně ovlivňovaly životnost mikroorganismů, což minimalizovalo potenciál pro šíření kontaminant [24].

Závěr

Studium biofilmů, primárně v humánním lékařství, je již velmi mnoho objasněno. Schopnosti mikroorganismů tvořit biofilmy je využíváno i průmyslově, například k čištění odpadních vod v rotačních biokontaktorech [45]. Pro mikrobiology v oblasti bezpečnosti potravin je studium faktorů, které přispívají k tvorbě a omezování biofilmů jako nebezpečných společenství mikroorganismů v potravinářském průmyslu záležitostí otevřenou. Dá se očekávat, že toto studium přinese poznatky potřebné jak z pohledu lidského zdraví, tak pro zpracovatelské a potravinářské podniky. Zejména modelové studie, molekulárně-genetické a mikroskopické metody mohou přispět k dalším poznáním, která povedou k prevenci a k inaktivaci mikrobiálních společenství na kontaktních površích technologických zařízení potravinářských podniků.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky č. QF4048 a Výzkumného záměru MZe č. 0002716201.

Literatura

1. **Al-Makhlafi, H., Lakamraju, M., Pohipleux, N., Singla, B., McGuire, J.** Measuring surface hydrophobicity as compared to measuring a hydrophobic effect on adhesion events. *J Food Prot*, 1995, 58, 1034–1037.
2. **Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S.** Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 1818–1824.
3. **Anonym:** Companies in Crisis – What not to do when it all goes wrong. Snow Brand Milk Products Co. <http://www.mallenbaker.net/csr/CSRfiles/>
4. **Anwar, H., Strap, J.L., Costerton, J.W.** Eradicating of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Can J Microbiol*, 1992, 38, 618–625.
5. **Arnold, J.W., Silvers, S.** Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poult Sci*, 2000, 79, 1215–1221.
6. **Austin, J.W., Bergeron, G.** Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J Dairy Res*, 1995, 62, 509–549.
7. **Bellon-Fontaine, M.N., Mozes, N., van der Mei, H.C., Sjollem, J. et al.** A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*, 1990, 17, 93–106.
8. **Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., Roques, C.** Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, 1469–1474.
9. **Carpentier, B., Cerf, O.** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol*, 1993, 75, 499–511.
10. **Ceri, H., Morck, D.W., Olson, M.E.** Biocide susceptibility testing of biofilms. In: *Block, S.S. (ed.): Disinfection, sterilization and preservation*, 5th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1429–1437.
11. **Cole, A.C., Semmens, M.J., LaPara, T.M.** Stratification of activity and bacterial community structure in biofilms grown on membranes transferring oxygen. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 1982–1989.
12. **Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *J Clin Pharmacol*, 1999, 9, 887–898.
13. **Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J.** How bacteria stick. *Sci Am*, 1978, 238, 86–95.
14. **Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B. et al.** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, 2001, 183, 2888–2896.
15. **Čupera, Z., Dočkalová, K., Drábková, L., Dušek, D. et al.** Seznam schválených veterinárních přípravků a prostředků veterinární zdravotnické techniky. ÚSKVBL Brno, Nucleus Hradec Králové, 2002, 398 s. ISBN 80-86225-20-8
16. **Dankert, J., Hogt, A.H., Feijen, J.** Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization, and identification. *Crit Rev Biocompat*, 1986, 2, 219–301.
17. **de Silva, G.D.I., Kantzanou, M., Justica, A., Massey, R.C. et al.** The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 2002, 40, 382–388.
18. **Donlan, R.M.** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8, 881–890.
19. **Donlan, R.M.** Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*, 2001, 33, 1387–1392.
20. **Dunsmore, D.G., Twomey, A., Whitlestone, W.G., Morgan, H.W.** Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review. *J Food Prot*, 1981, 44, 220–240.
21. **Ehlers, L.J., Bouwer, E.J.** RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci Technol*, 1999, 7, 163–171.
22. **Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D.** Biofouling, 1997, 11, 81–97.
23. **Frank, J.F.** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv Food Nutr Res*, 2001, 43, 319–370.
24. **Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., Holah, J.T.** Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol*, 1999, 87, 41–48.
25. **Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J.** Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol, Supplement*, 2002, 92, 98–110.
26. **Habash, M., Reid, G.** Microbial biofilms: Their development and significance for medical device-related infection. *J Clin Pharmacol*, 1999, 39, 887–898.
27. **Hall-Stoodley, L., Lappin-Scott, H.M.** Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Method Enzymol*, 2001, 337, 306–319.
28. **Hausner, M., Wuertz, S.** High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65, 3710–3713.
29. **Hood, S.K., Zottola, E.A.** Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol*, 1997, 37, 145–153.
30. **Karpíšková, S., Dendis, M., Vlková, H., Schlegelová, J.** Incidence biofilm-pozitivních kmenů *Staphylococcus epidermidis* v potravním řetězci. In *Sborník abstraktů XIII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny. Správy klinické mikrobiologie*, SB, 2005, 5, 38. ISSN 1335–8219.
31. **Kumar, C.G., Anand, S.K.** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 1998, 42, 9–27.
32. **Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E.** Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol*, 1991, 173, 6558–6567.
33. **LeChevallier, M.W., Babcock, T.M., Lee, R.G.** Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53, 2714–2724.
34. **Luppens, S.B.I., Rombouts, F.M., Abee, T.** The effect of the growth phase of *Staphylococcus aureus* on resistance to desinfectants in suspension test. *J Food Prot*, 2002, 65, 124–129.
35. **Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Magny, P.** Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot*, 1990, 53, 742–746.
36. **Marshall, K.C.** Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Am Soc Microbiol News*, 1992, 58, 202–207.
37. **Mettler, E., Carpentier, B.** *J Food Prot*, 1998, 61, 57–65.
38. **Morck, D.W., Olson, M.E., Ceri, H.** Microbial biofilms: prevention, control, and removal. In: *Block, S.S. (ed.): Disinfection, sterilization and preservation*, 5th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 34, 675–683.
39. **Norwood, D.E., Gilmour, A.** *Letters Appl Microbiol*, 2001, 33, 320–324.

40. **Oulahal, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., Blum, L.J.** Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to „*Escherichia coli* milk“ and „*Staphylococcus aureus* milk“ biofilms. *Biofilms*, 2004, 1, 65–73.
41. **Peng, J.S., Tsai, W.C., Chou, C.C.** *Int J Food Microbiol*, 2001, 65, 105–111.
42. **Peters, A.** Control of biofilm in the food industry: a microbiological survey of high-risk processing facilities. *In Lens, P. et al. Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology: Characteristics, analysis and control.* Cornwall, UK, IWA Publishing, 2003, 554–567.
43. **Rayner, J., Veeh, R., Flood, J.** Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *Int J Food Microbiol*, 2004, 95, 29–39.
44. **Roberts, A.P., Pratten, J., Wilson, M., Mullany, P.** Transfer of a conjugative transposon Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Let*, 1999, 177, 636.
45. **Rodgers, M., Zhan, X.M.** Moving-medium biofilm reactors. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2003, 2, 213–224.
46. **Ryu, J.-H., Beuchat, L.R.** Biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 on stainless steel: Effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71, 247–254.
47. **Sharma, M., Anand, S.K.** Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol*, 2002, 19, 627–636.
48. **Scher, K., Romling, U., Yaron, S.** Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71, 1163–1168.
49. **Somers, E.B., Johnson, M.E., Wong, A.C.** Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic bacteria in the dairy environment. *J Dairy Sci*, 2001, 84, 1926–1936.
50. **Somers, E.B., Wong, A.C.** Efficacy two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *J Food Prot*, 2004, 67, 2218–2229.
51. **Speers, J.G.S., Gilmour, A.** The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *J Appl Bacteriol*, 1985, 59, 325–332.
52. **Srinivasan, R., Stewart, P.S., Griebe, T., Chen, C.I., Xu, X.** Biofilm Parameters Influencing Biocide Efficacy. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 46, 553–560.
53. **Stewart, P.S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J.G., Lewandowski, Z. et al.** Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 836–838.
54. **Stoodley, P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002, 56, 187–209.
55. **Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D. et al.** Growth and detachment of cell clusters from mature mixed species biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67, 5608–5613.
56. **Suihko, M.L., Sato, S., Niclasen, O., Gudbjornsdottir, B. et al.** Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. *Int J Food Microbiol*, 2002, 72, 137–146.
57. **Tomlin, K.L., Coll, O.P., Ceri, H.** Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Can J Microbiol*, 2001, 47, 949–954.
58. **Votava, M.** Mikrobiální biofilm a jeho význam v lékařství. *Prakt Lékař*, 2002, 82, 522–525.
59. **Wirtanen, G., Husmark, U., Mattila-Sandholm, T.** Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J Food Prot*, 1996, 59, 727–733.
60. **Wong, A.C.L.** Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci*, 1998, 81, 2765–2770.
61. **Zoltai, P.T., Zottola, E.A., McKay, L.L.** Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *J Food Prot*, 1981, 44, 204–208.
62. **Zottola, E.A., Sasahara, K.C.** Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *Int J Food Microbiol*, 1994, 23, 125–148.

Do redakce došlo 28. 7. 2006

RNDr. Jarmila Schlegelová,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno
e-mail: schlegelova@vri.cz