

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Faktory virulence u *Arcobacter* spp. a možná eliminace tvorby biofilmů

Barbora Vacková

Diplomová práce

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Vacková**
Osobní číslo: **C15638**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Faktory virulence u *Arcobacter* spp. a možná eliminace tvorby biofilmů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši vztahující se k zadanému tématu, v úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o rodu *Arcobacter*.
2. Zpracujte literární rešerši na téma mikrobiálních biofilmů a možnosti ovlivnění jeho tvorby v přítomnosti přírodních antimikrobiálně působících extraktů.

Experimentální část:

3. Proveďte screening přítomnosti virulečních faktorů u vybraných izolátů arkobakterů, a to molekulárně-biologickým postupem.
4. Vybrané kmeny vyšetřete z hlediska tvorby biofilmu Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách. Dále otestujte, jak bude tvorba biofilmu ovlivněna přítomností antimikrobiálně působících extraktů přírodních látek.
5. Vyhodnoťte prevalenci faktorů virulence a porovnejte dosažené výsledky s dříve publikovanými.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Ing. Lucie Šilhová**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. května 2017

Bc. Barbora Vacková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému vedoucímu, panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost, cenné rady a připomínky, které mi pomohly tuto diplomovou práci zpracovat. Dále děkuji své konzultantce paní Ing. Lucii Šilhové, Ph.D. Rovněž děkuji svým rodičům, příteli a sourozencům za velkou trpělivost a za morální a finanční podporu při studiu.

SOUHRN

Teoretická část předkládané diplomové práce je souhrnem informací o rodu *Arcobacter*, jeho charakteristikou, výskytem a detekcí. Dále jsou obsaženy kapitoly, které se zabývají virulenčními faktory bakterií (včetně arkobakterů) a detekcí virulentně asociovaných genů. Uvedeny jsou kapitoly věnované tvorbě bakteriálního biofilmu, detekci biofilmu a především pak možným způsobům jeho eliminace.

V části experimentální je popsána metoda detekce virulentně asociovaných genů a metoda detekce tvorby biofilmu v přítomnosti přírodních látek. Tyto metody byly aplikovány na vybrané referenční a sbírkové kmeny rodu *Arcobacter*.

Geny kódující virulenční faktory arkobakterů byly detekovány pomocí optimalizované metody multiplexní polymerázové řetězové reakce. Tvorba biofilmu těchto bakterií v přítomnosti přírodních extraktů byla detekována pomocí Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách.

Na základě získaných výsledků lze říci, že výskyt jednotlivých virulenčních faktorů v genomu testovaných kmenů je variabilní. Dále lze říci, že u všech testovaných kmenů došlo v přítomnosti přírodních extraktů k eliminaci vytvořeného biofilmu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Arcobacter, faktory virulence, *m*PCR, biofilm, eliminace biofilmu, přírodní extrakty

SUMMARY

The theoretic part of this thesis is a summary of information about the genus *Arcobacter*, its characteristics, occurrence and detection. There are the chapters about virulence factors of bacteria (including the genus *Arcobacter*) and about detection of virulence-associated genes. Then there are chapters about bacterial biofilm formation, about methods for its detection and primary about methods for its elimination.

The experimental part describes the method of detection virulence-associated genes and the method for detection of biofilm in the presence of natural substances. These methods were applied to selected reference and collection strains of the genus *Arcobacter*.

Genes that encode virulence factors of *Arcobacter* spp. were detected using an optimized multiplex polymerase chain reaction. The biofilm of these bacteria in the presence of natural extracts was determined using the Christensen's method in the polyethylene microtiter plates.

According to acquired results the occurrence of individual virulence factors in the genome of the tested strains is variable. In addition, biofilm was eliminated in the presence of natural extracts in all tested strains.

KEYWORDS

Arcobacter, virulence factors, *m*PCR, biofilm, biofilm elimination, natural extracts

OBSAH

OBSAH.....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	15
0 ÚVOD.....	18
1 TEORETICKÁ ČÁST	19
1.1 Rod <i>Arcobacter</i>	19
1.1.1 Taxonomické zařazení	19
1.1.2 Výskyt arkobakterů.....	19
1.1.3 Morfologie arkobakterů	20
1.1.4 Biochemické vlastnosti a citlivost k vnějším vlivům	22
1.1.5 Epidemiologie a patogeneze	22
1.1.6 Terapie infekcí způsobených <i>Arcobacter</i> spp.	23
1.1.7 Laboratorní diagnostika <i>Arcobacter</i> spp.....	24
1.1.7.1 Kultivace, růst a identifikace.....	24
1.1.7.2 Molekulárně-biologické metody	25
1.1.7.3 MALDI /TOF MS.....	28
1.1.7.4 Sekvenování genomu	29
1.2 Faktory virulence.....	30
1.2.1 <i>Quorum sensing</i> spojené s virulencí.....	30
1.2.2 Významné virulenční faktory bakterií	31
1.2.2.1 Adheze mikroorganismů	31
1.2.2.2 Invazivita a kolonizace	32
1.2.2.3 Motilita a chemotaxe	33
1.2.3 Detekce a identifikace virulenčních faktorů	33
1.2.4 Faktory virulence u arkobakterů.....	34
1.2.5 Detekce a identifikace virulenčních faktorů arkobakterů	36
1.3 Biofilm	37
1.3.1 Historie biofilmu	38
1.3.2 Tvorba biofilmu a jeho složení.....	38

1.3.2.1	Ochranná role extracelulárních polymerních látek.....	39
1.3.2.2	Buněčná různorodost uvnitř biofilmu	40
1.3.3	Tvorba biofilmu u arkobakterů	41
1.3.4	Metody detekce biofilmu u arkobakterů.....	43
1.3.4.1	Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách	43
1.4	Ovlivnění tvorby biofilmu	45
1.4.1	Eliminace biofilmu	45
1.4.1.1	Antibiotika.....	46
1.4.1.2	Čištění	47
1.4.2	Ovlivnění tvorby biofilmu arkobakterů	48
1.4.2.1	Ovlivnění růstu a tvorby biofilmu arkobakterů přírodními látkami	49
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	54
2.1	Materiál a metody.....	54
2.1.1	Chemikálie	54
2.1.2	Reagencie a primery pro PCR.....	54
2.1.3	Pracovní roztoky.....	55
2.1.4	Pevná a tekutá kultivační média	57
2.1.5	Pomůcky a potřeby	57
2.1.6	Přístroje.....	58
2.2	Použité bakteriální kmeny.....	59
2.3	Příprava přírodních extraktů s antimikrobiálním účinkem	60
2.3.1	Příprava extraktů z vybraných druhů koření.....	60
2.4	Detekce virulenčních faktorů bakterií rodu <i>Arcobacter</i> pomocí <i>m</i> PCR.....	61
2.4.1	Příprava lyzátů testovaných bakterií.....	61
2.4.2	Příprava reakčních <i>m</i> PCR směsí	61
2.4.3	Separace a vizualizace PCR produktů	62
2.4.4	Optimalizované kroky PCR reakce	63
2.4.4.1	Optimalizace poměru objemu <i>m</i> PCR směsi vs. buněčného lyzátu.....	63
2.4.4.2	Optimalizace teplotního programu termocykleru.....	63
2.4.4.3	Optimalizace složení agarózového gelu.....	64
2.5	Testování tvorby biofilmu arkobakterů v přítomnosti extraktů z přírodních látek.....	64
2.5.1	Příprava bakteriální suspenze.....	64

2.5.2 Příprava koncentrační řady testovaných extraktů	64
2.5.3 Christensenova metoda pro detekci biofilmu arkobakterů	64
3. VÝSLEDKY A DISKUSE	67
3.1 Virulenční faktory <i>Arcobacter</i> spp.	67
3.1.1 Optimalizace <i>m</i> PCR pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů.....	67
3.1.2 Detekce virulenčních faktorů bakterií rodu <i>Arcobacter</i> optimalizovanou metodou	70
3.2 Testování tvorby biofilmu arkobakterů v přítomnosti extraktů z přírodních látek.....	76
3.2.1 Výsledky testování schopnosti tvorby biofilmu u <i>Arcobacter</i> spp. a jejího ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku	76
3.2.2 Závěrečné zhodnocení výsledků detekce a kvantifikace biofilmu arkobakterů v přítomnosti přírodním extraktů	89
4 ZÁVĚR	92
5 PŘÍLOHY	94
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	110

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Snímek z elektronového mikroskopu zachycující buňky <i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621 (A) a <i>Arcobacter cryaerophilus</i> LMG 7537 (B) (Ho <i>et al.</i> , 2006).....	20
Obr. 2 Schéma průběhu PCR (www.ncbi.nlm.nih.gov).....	26
Obr. 3 Schematické znázornění vývoje mikrobiálního biofilmu (upraveno Dufour <i>et al.</i> , 2010).....	37
Obr. 4 Procesy vzniku heterogenity v jednodruhovém biofilmu (upraveno dle Dufour <i>et al.</i> , 2010).....	39
Obr. 5 Tvorba biofilmu tří referenčních kmenů <i>Arcobacter butzleri</i> LMG 6620, <i>Arcobacter butzleri</i> LMG 9869, <i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828 a pěti izolátů v závislosti na druhu atmosféry a počáteční optické denzitě (OD) buněčné suspenze. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr + SD (upraveno Ferreira <i>et al.</i> , 2013).....	41
Obr. 6 Buňky bakterie <i>Arcobacter butzleri</i> , rastrovací elektronová mikroskopie, mikroaerofilní prostředí (upraveno Pereira-Medrano <i>et al.</i> , 2013).....	42
Obr. 7 Polyetylenová mikrotitrační destička (96 jamek) s buněčnou suspenzí příslušného mikroorganismu (fotoautor).....	43
Obr. 8 Hřebíček vonný (<i>Eugenia aromaticum</i>) (webozdravi.cz).....	49
Obr. 9 Chemická struktura eugenolu (Burt, 2004).....	49
Obr. 10 Badyán (<i>Illicium verum</i>) (www.daryodprirody.cz).....	50
Obr. 11 Muškátový oříšek (<i>Myristica fragrans</i>) (www.rehabilitace.info).....	51
Obr. 12 Schéma rozložení jednotlivých pozic testovaných koncentrací extraktu do mikrotitrační destičky	64
Obr. 13 Gradientová <i>m</i> PCR pro rod <i>Arcobacter</i> (<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828; <i>m</i> PCR směs 1 vlevo; <i>m</i> PCR směs 2 vpravo).....	67
Obr. 14 Gradientová <i>m</i> PCR pro rod <i>Arcobacter</i> (<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828) a vliv složení reakční směsi (<i>m</i> PCR směs 3).....	67
Obr. 15 Gradientová <i>m</i> PCR pro rod <i>Arcobacter</i> (<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828; <i>m</i> PCR směs 2), 2% agarozový gel barvený ethidium bromidem.....	68

Obr. 16 Gradientová <i>mPCR</i> pro rod <i>Arcobacter</i> (<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828; <i>mPCR</i> směs 2), 2% agarózový gel barvený GelRedem	69
Obr. 17 Elektroforetický záznam <i>mPCR</i> pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, (<i>mPCR</i> směs 1).....	69
Obr. 18 Elektroforetický záznam <i>mPCR</i> pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, (<i>mPCR</i> směs 2).....	70
Obr. 19 Elektroforetický záznam <i>mPCR</i> pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, (<i>mPCR</i> směs 3).....	70
Obr. 20 Tvorba biofilmu kmene <i>A. thereius</i> LMG 24488 v přítomnosti přírodních extraktů.....	76
Obr. 21 Tvorba biofilmu kmene <i>A. lanthieri</i> LMG 28517 v přítomnosti přírodních extraktů.....	77
Obr. 22 Tvorba biofilmu kmene <i>A. defluvii</i> LMG 25694 v přítomnosti přírodních extraktů.....	78
Obr. 23 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621 v přítomnosti přírodních extraktů	79
Obr. 24 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2013/8 v přítomnosti přírodních extraktů	80
Obr. 25 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828 v přítomnosti přírodních extraktů	81
Obr. 26 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484 v přítomnosti přírodních extraktů	83
Obr. 27 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050 v přítomnosti přírodních extraktů	84
Obr. 28 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13 v přítomnosti přírodních extraktů	85

Obr. 29 Tvorba biofilmu kmene <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 v přítomnosti přírodních extraktů	86
Obr. 30 Tvorba biofilmu kmene <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 v přítomnosti přírodních extraktů	87

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Citlivost antibiotik k různým druhům bakterií v planktonní formě nebo v biofilmu (upraveno Donlan and Costerton, 2002).....	46
Tab. 2 Přehled bakteriálních kmenů použitých ve studii.....	58
Tab. 3 Přehled použitých matric k přípravě extraktů	59
Tab. 4 Přehled použitých navážek matric a objemů extrakčního činidla pro extrakci.....	59
Tab. 5 Složení PCR směsí (1, 2, 3) pro jeden vzorek (celkový objem 25 µl).....	60
Tab. 6 Výčet extraktů/koncentrací a jejich „cut of score“.....	65
Tab. 7 Detekce virulenčních faktorů <i>Arcobacter</i> spp. molekulárně-biologickou <i>mPCR</i> reakcí – přehled výsledků.....	71

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2-DE	dvojměrná elektroforéza
<i>A.</i>	<i>Arcobacter</i>
<i>Ab.</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
ATB	antibiotika
ATCC	Americká sbírka mikroorganismů
BHI	mozkosrdcová infuze
<i>C.</i>	<i>Cronobacter</i>
CASA	Campylobacter selektivní agar
CAT	cefoperazon – amphotericin B – teikoplanin
CCM	Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně
CCUG	Švédská sbírka mikroorganismů Univerzity Göteborg
CFU	kolonie tvořící jednotky
<i>ciaB</i>	<i>Campylobacter</i> invazivní antigen B
CIN agar	cefsulodin – irgasan – novobiocin
<i>cj1349</i>	gen kódující protein vázající fibronectin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzymoimunoanalytická zkouška
EMA	ethidium monoazid
EPS	extracelulární polymerní substance
<i>hecA</i>	filamentární hemaglutinin
<i>hecB</i>	protein aktivující hemolysin
IFIS	Mezinárodní komise pro mikrobiologické specifikace pro potraviny

<i>InlA</i>	internalin A
<i>irgA</i>	vnější membránový protein
JM agar	Johnson – Murano agar
LMG	Belgická sbírka mikroorganismů Univerzity Gent
MALDI/TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice a průletového analyzátoru
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MLST	metoda multilokusového sekvenačního typingu
<i>mPCR</i>	multiplexní polymerázová řetězová reakce
<i>mviN</i>	integrální membránový protein
NGS	novodobé sekvenační technologie
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>pldA</i>	fosfolipáza
PMA	propidium monoazid
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>QS</i>	<i>quorum sensing</i>
<i>rRNA</i>	ribosomální ribonukleová kyselina
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
TBE	tris–borát–EDTA
TE	tris–EDTA
<i>tlyA</i>	hemolyzin
TSA	trypton sojový agar
UPa	Univerzita Pardubice
UV	ultrafialová oblast spektra
spp.	označení podruhu (z lat. <i>subspecies</i>)

ICMFS	Mezinárodní komise pro mikrobiologické specifikace pro potraviny
<i>cadF</i>	gen kódující protein vázající fibronectin
Da	dalton
FHA	filamentární hemaglutinin
<i>iroE</i>	gen kódující periplazmatický enzym
ÚČP	účinnost čistícího procesu
CMJ	chicken meat juice medium
bp	páry bází
USA	Spojené státy americké
A ₅₉₅	absorbance při vlnové délce 595 nm

0 ÚVOD

Mikroorganismy se vyskytují ve dvou formách, a to jak ve formě planktonní, tak také ve formě biofilmu. Existence v biofilmu je pro mikroorganismy z mnoha důvodů výhodnější (ochrana před nepříznivými podmínkami) a ve většině případů je základním způsobem jejich přirozeného výskytu. Eliminace biofilmů bývá, z důvodu jejich vysoké odolnosti, v mnohých případech velmi složitá a problematická.

Mezi mikroorganismy tvořící biofilm patří také bakterie rodu *Arcobacter*. Jedná se o patogeny spojované především s potravinami živočišného původu, které představují riziko pro lidi i zvířata. Kromě tvorby biofilmu se arkobaktery vyznačují některými významnými virulenními faktory, které jsou kódovány geny, jejichž homology byly nalezeny rovněž v genomu bakterií rodu *Campylobacter*. Toto dokládá příbuznost obou rodů.

K detekci virulentně asociovaných genů se využívá celá řada metod, které mají své výhody i nevýhody. Mezi v současné době nejvyužívanější techniky patří metody molekulárně-biologické, založené na polymerázové řetězové reakci. Patří sem zejména multiplexní polymerázová řetězová reakce (*mPCR*), která využívá hned několik párů *mPCR* primerů současně, čímž je možná detekce více virulentně asociovaných genů v jedné reakci.

Pro hodnocení tvorby biofilmu se využívají například metody kultivační a mikroskopické, avšak především metody molekulárně biologické či spektrofotometrické.

Tato diplomová práce je zaměřena na detekci virulentně asociovaných genů arkobakterů optimalizovanou metodou *mPCR*. Dále se diplomová práce zabývá hodnocením tvorby biofilmů v přítomnosti přírodních extraktů u vybraných kmenů *Arcobacter* spp., a to pomocí modifikované Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách s využitím spektrofotometrické detekce.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rod *Arcobacter*

Rod *Arcobacter* (A.) byl definován před více než 20 lety odvozením od bakterií rodu *Campylobacter* a v posledních letech se stává čím dál více diskutovanou skupinou bakterií. Rod zahrnuje jak patogenní, tak i běžně se vyskytující druhy (Salas-Massó *et al.*, 2016). Někteří zástupci tohoto rodu jsou považováni za enteropatogeny nebo za potenciální původce střevních onemocnění (Collado and Figueras, 2011).

1.1.1 Taxonomické zařazení

Arkobaktery se stejně jako jim velmi příbuzné kampylobaktery řadí do čeledi *Campylobacteraceae* (Motarjemi *et al.*, 2014). Tato čeleď se taxonomicky řadí do domény *Bacteria*, kmene *Proteobacteria*, třídy *Epsilonproteobacteria* a řádu *Campylobacterales* (Sedláček, 2007; Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016).

První izolace těchto bakterií byla provedena na sklonku roku 1970 z potráceného hovězího plodu (Fallas-Padilla *et al.*, 2014). Bakterie byly chybně identifikovány jako aerotolerantní *Campylobacter* spp. Teprve až na základě studie Vandamme *et al.* (1991) bylo navrženo přesunutí dvou aerotolerantních druhů rodu *Campylobacter* (*Campylobacter cryaerophila*, *Campylobacter nitrofigilis*) do bakteriálního rodu *Arcobacter* (nyní *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter nitrofigilis*). Tento historický okamžik byl významným milníkem pro vznik tohoto rodu. O rok později došlo stejným způsobem k přearazení dalších druhů a rod *Arcobacter* se tímto rozšířil (Collado and Figueras, 2011).

Arkobaktery se vyznačují schopností růstu za aerobních i anaerobních podmínek v širokém rozsahu teplot (15 až 42 °C), čímž se od kampylobakterů odlišují (Collado and Figueras, 2011; Ho *et al.*, 2006; Laishram *et al.*, 2016).

1.1.2 Výskyt arkobakterů

Arkobaktery jsou bakterie s širokou distribucí výskytu. Důvodem je jejich schopnost přizpůsobovat se různým podmínkám a prostředí (Motarjemi *et al.*, 2014). Navzdory tomu, je jejich výskyt poměrně podceňován, zejména z důvodu omezení současných metod detekce a identifikace (Collado and Figueras, 2011).

V současné době rod zahrnuje 25 druhů izolovaných z různých prostředí a hostitelů. Mezi zástupce patří *A. acticola*, *A. nitrofigilis*, *A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. faecis*, *A. marinus*, *A. trophiarum*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. thereius*, *A. halophilus*, *A. mytili*, *A. defluvii*, *A. bivalviorum*, *A. venerupis*, *A. cloacae*,

A. suis, *A. anaerophilus*, *A. ebronensis*, *A. aquimarinus*, *A. lanthieri*, *A. porcinus* a *A. pacificus* (González *et al.*, 2013; Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Izolace arkobakterů byla provedena z nejrůznějších druhů vod, potravin a živočišných zdrojů, především z kuřecího, vepřového, hovězího a jehněčího masa (González *et al.*, 2013; Pentimalli *et al.*, 2009; Philips, 2001). Běžně se arkobaktery vyskytují ve střevním traktu a stolici nejen nemocných, ale i zdravých zvířat (González *et al.*, 2013; Laishram *et al.*, 2016). Ke kontaminaci masa dochází nejčastěji při jatečném procesu. Mezi nejvíce ohrožené druhy z hlediska nákazy těmito bakteriemi patří zejména drůbež. Právě na výrobcích z drůbeže je prevalence *Arcobacter* spp. nejvyšší a pohybuje se mezi 24 až 96 % (Šilha *et al.*, 2014).

Arkobaktery byly také izolovány ze syrového mléka. V kravském mléce se jednalo zejména o druh *A. butzleri*, v mléce bůvolím byl nejvíce zastoupen druh *A. cryaerophilus* (Yesilmen *et al.*, 2014). Riziko ovšem představují i čerstvé sýry a zelenina, kde byly bakterie rodu *Arcobacter* také prokázány (González *et al.*, 2013; Laishram *et al.*, 2016; Yesilmen *et al.*, 2014).

Často dochází k nákaze ryb, korýšů a škeblí, a to zejména druhem *Arcobacter butzleri*. Nedostatečné tepelné zpracování a konzumace syrových plodů moře představuje významné riziko nejen střevních, ale i dalších onemocnění (Collado and Figueras, 2011; Girbau *et al.*, 2015; Laishram *et al.*, 2016).

Druhy *A. nitrofigilis*, *A. mytili*, *A. ellisii*, *A. molluscorum*, *A. bivalviorum*, *A. venerupis*, *A. marinus*, *A. defluvii* a *A. cloacae* jsou spojovány s kontaminací vodního prostředí (González *et al.*, 2013; Šilha *et al.*, 2014). *Arcobacter nitrofigilis* byl z tohoto výčtu druhů objeven a izolován nejdříve a jedná se o tzv. běžně se vyskytující druh bakterie se schopností vázat dusík. Jeho izolace byla provedena ze sedimentů mořské vody či ropou znečištěné podzemní vody (Philips, 2001).

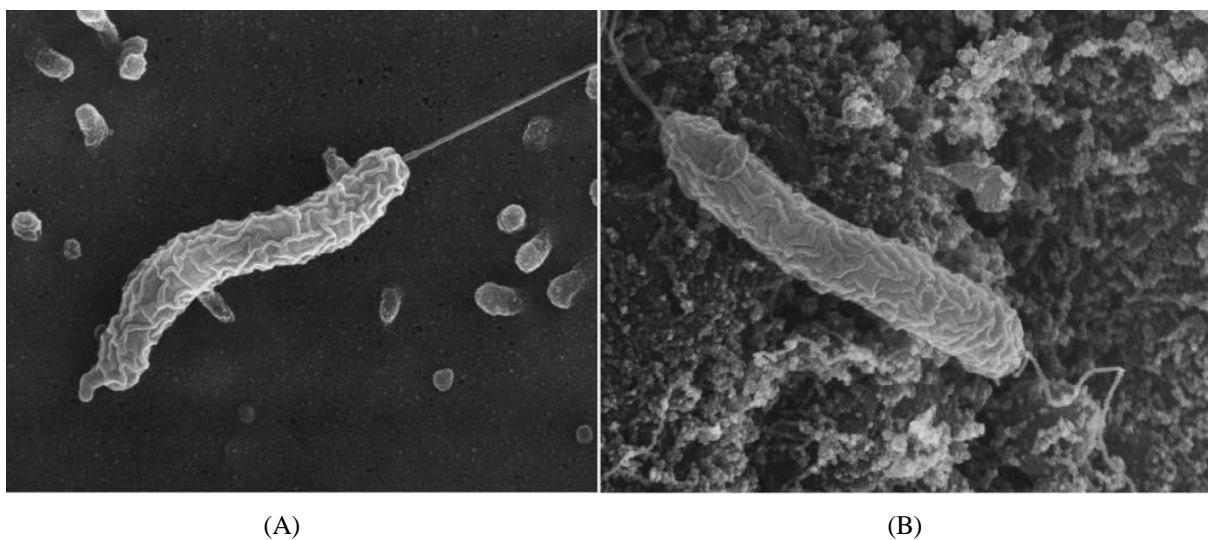
Arcobacter cibarius byl poprvé izolován z kůže mrtvých těl brojlerů v Belgii. Následně byl objeven obligátně halofilní druh *Arcobacter halophilus* izolovaný ze slané laguny na Havaii (Collado and Figueras 2011; Motarjemi *et al.*, 2014).

Z výše uvedených důvodů jsou potraviny živočišného původu považovány za největší zdroj přenosu těchto bakterií (Pentimalli *et al.*, 2009; Collado and Figueras, 2011).

1.1.3 Morfologie arkobakterů

Arkobaktery jsou Gram-negativní nesporulující bakterie. Jejich tvar je nejčastěji spirálovitý či ve tvaru písmene „S“ (**Obr. 1**). Buňky obvykle dosahují délky 0,5 – 3 μm a

šířky 0,2 – 0,9 μm (Ho *et al.*, 2006). Byly pozorovány i buňky o extrémní délce 20 μm (Motarjemi and Adams, 2006). Díky polárně umístěnému bičíku vykazují tyto bakterie charakteristický vývrtkovitý pohyb (Ho *et al.*, 2006; Motarjemi and Adams, 2006).



Obr. 1 Snímek z elektronového mikroskopu zachycující buňky *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 (A) a *Arcobacter cryaerophilus* LMG 7537 (B) (Ho *et al.*, 2006)

Při 30 °C v aerobním prostředí rostou arkobaktery v podobě bělavých či šedivých hladkých zaoblených kolonií, lišících se velikostí v závislosti na daném druhu (Philips, 2001; Motarjemi *et al.*, 2014). Tyto kolonie jsou obvykle drobné o velikosti cca 2 – 4 mm (Philips, 2001). Optimální teplotní rozmezí je pro tyto bakterie 15 – 37 °C, přičemž mnohé z nich jsou schopny se množit i při teplotě 41,5 °C (Motarjemi *et al.*, 2014; Philips, 2001). Jejich růst byl ovšem zaznamenán i při nižších teplotách, jako je například teplota podzemních vod (5 °C). Proto jejich přežívání při chladničkové teplotě představuje velké riziko kontaminace potravin (Šilha *et al.*, 2014).

Jak již bylo zmíněno výše, arkobaktery jsou schopny růstu v aerobním prostředí, ovšem optimální jsou pro ně mikroaerobní podmínky. Tedy prostředí se sníženým obsahem kyslíku (3 – 10 %) a zvýšeným obsahem oxidu uhličitého (5 – 10 %) v atmosféře (Motarjemi *et al.*, 2014; Philips, 2001; Shah *et al.*, 2011).

1.1.4 Biochemické vlastnosti a citlivost k vnějším vlivům

Arkobaktery jsou relativně biochemicky inertní mikroorganismy (Pentimalli *et al.*, 2009). Výsledky klasických biochemických testů používaných pro identifikaci klinických bakterií jsou u arkobakterů ve většině případů negativní nebo proměnlivé (Collado and Figueras, 2011).

Nemetabolizují sacharidy, ale potřebnou energii mohou získávat oxidací aminokyselin a z meziproductů citrátového cyklu. Testy na přítomnost katalázy a oxidázy jsou zpravidla pozitivní, a některé kmeny jsou α -hemolytické (Motarjemi *et al.*, 2014). U druhů *Arcobacter mytili* a *Arcobacter molluscorum* byla zjištěna neschopnost hydrolyzy indoxyl acetátu. U druhu *Candidatus Arcobacter sulfidicus*, který byl v minulosti navržen jako potenciální nový druh, byla prokázána schopnost oxidace sulfidů (Collado and Figueras, 2011). Na základě studie, kterou se v roce 2007 zabývali Miller *et al.* bylo zjištěno, že kmen *Arcobacter butzleri* RM 4018 obsahuje šest genů, které se podílejí na odbourávání močoviny (Miller *et al.*, 2007).

1.1.5 Epidemiologie a patogeneze

Arkobaktery byly v roce 2002 Mezinárodní komisí pro mikrobiologické specifikace pro potraviny (ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods) klasifikovány jako rozvíjející se patogeny pocházející z potravin (Aski *et al.*, 2016).

I přesto, že se v posledních letech navýšil počet případů průjmů způsobených *Arcobacter* spp., je jen velmi málo známo o jejich patogenезi (Ho *et al.*, 2006). Výsledky jedné studie ukazují, že mnoho důležitých druhů rodu *Arcobacter* (86 %) má patřičné virulentní geny, které mohou nést potenciální patogenní vlastnosti pro člověka (Pentimalli *et al.*, 2009; Ricke *et al.*, 2016).

Právě druhy *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a především *A. butzleri* jsou za tyto potenciální lidské patogeny považovány, což dokládá jejich izolace v případě gastroenteritid, endokarditid, peritonitid či septikémie (González *et al.*, 2013; Laishram *et al.*, 2016; Pentimalli *et al.*, 2009).

A. butzleri byl již v roce 1995 izolován v případě novorozenecké bakteriémie. Jednalo se o první případ neonatální infekce způsobé arkobaktery (On *et al.*, 1995). Navíc byl tento kmen nedávno uznán jako původce cestovních nevolností a průjmů (Fallas-Padilla *et al.*, 2014). *A. butzleri* patří zároveň mezi nejdůležitější a převládající druh tohoto rodu a v roce 2012 byl ICMFS prohlášen za velmi nebezpečný pro lidské zdraví (Giacometti *et al.*, 2013).

Další zástupce, *A. theaeus*, je častým původcem potratů u zvířat, nicméně jeho přítomnost byla prokázána také u zvířat trpících mastitidami a lidí trpících poruchami zažívacího traktu (González *et al.*, 2013).

1.1.6 Terapie infekcí způsobených *Arcobacter* spp.

V roce 1995, kdy byl izolován *Arcobacter butzleri* u případu novorozenecké bakteriémie, byla v rámci terapie zjištěna vysoká odolnost této bakterie proti široké škále antibiotik. Antibiotická rezistence byla poté prokázána i u dalších 39 referenčních kmenů tohoto rodu (On *et al.*, 1995).

Předmětem studie Aski *et al.* (2016) byla odolnost vybraných *Arcobacter* spp. vůči antimikrobiálním látkám. Antimikrobiální citlivost byla u těchto izolátů stanovena celkem pro 18 antibiotik, a to pomocí diskové difuzní metody. Vysokou citlivost vykazovaly především vůči antibiotikům tetracyklinu, oxytetracyklinu, erythromycinu, ciprofloxacinu, kanamycinu, amikacinu, gentamicinu a enrofloxacinu. Dále bylo prokázáno, že tetracykliny a aminoglykosidy mají významný vliv na životaschopnost těchto bakterií a mohou být použity pro léčbu lidských infekcí vyvolaných právě druhu *Arcobacter*. Naopak všechny testované izoláty byly rezistentní k antibiotikům rifampicinu, vankomycinu, ceftriaxonu, trimetoprimu a cefalotinu (Aski *et al.*, 2016).

Jiná studie, kterou se zabýval Yesilmen *et al.* (2014) popisuje antimikrobiální chování druhů *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii* a *Arcobacter butzleri*. U izolátů druhu *A. cryaerophilus* byla prokázána rezistence vůči antibiotikům cefoperazonu, cloxacillinu a penicilinu, naopak citlivost byla zjištěna vůči ceftiofuru, spiramycinu, streptomycinu a gentamicinu spolu s amoxicilinem. Izoláty druhů *A. skirrowii* a *A. butzleri* byly rezistentní na antibiotika cefoperazon, tetracyklin, ampicilin, erythromycin, kloxacilin a penicilin, ovšem citlivost zmíněné druhy vykazovaly vůči streptomycinu a gentamicinu s amoxicilinem (Yesilmen *et al.*, 2014).

U druhu *A. butzleri* byla dále zaznamenána vysoká citlivost vůči chloramfenikolu (Aski *et al.*, 2016). Pro léčbu akutních průjmů spojených s bolestmi břicha u dětí byl zvolen erythromycin (50 mg/kg/den, rozdělených do čtyř dávek po dobu 10 dnů) a dietní režim. Po ukončení léčby již bakterie ve stolici dítěte nebyly identifikovány a léčba byla úspěšná (Fernández *et al.*, 2004).

Rezistentní kmeny představují veliký problém i z toho důvodu, že antibiotické rezistentní determinanty mohou být přeneseny na jiné patogenní bakterie, potenciálně ohrožující léčbu závažných bakteriálních infekcí (Aski *et al.*, 2016).

Ačkoli infekce vyvolané těmito bakteriemi obvykle spontánně vymizí a léčbu nevyžadují, jsou v závažných a dlouhotrvajících případech nejčastěji předepisovány léky jako je erythromycin nebo fluorochinolony, například ciprofloxacin. Jako alternativa jsou občas využívány i tetracyklin, doxycyklin a gentamicin (Aski *et al.*, 2016).

Znalost citlivosti druhů *Arcobacter* na daná antibiotika je důležitá nejen z hlediska zahájení účinné léčby, ale i z hlediska vývoje kultivačních médií vhodných pro izolaci těchto bakterií (Yesilmen *et al.*, 2014).

1.1.7 Laboratorní diagnostika *Arcobacter* spp.

Nedostatek standardizovaných metod pro izolaci arkobakterů a relativně málo znalostí o jejich výskytu a distribuci, přispívá k jistým omezením v jejich detekci a identifikaci (Pentimalli *et al.*, 2009). Přes všechny tyto nedostatky byla navržena řada izolačních médií a postupů s cílem odhalit tři nejčastěji se vyskytující druhy tohoto rodu (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*) v různých typech vzorků (Motarjemi *et al.*, 2014).

Mezi nejčastější diagnostické metody patří metody kultivační, které využívají schopnost růstu arkobakterů při nižších teplotách (≤ 30 °C) a za aerobních podmínek. Dodržením těchto kultivačních podmínek se zároveň předchází nežádoucí izolace příbuzných kamylobakterů (Motarjemi *et al.*, 2014).

1.1.7.1 Kultivace, růst a identifikace

V současné době jsou pro izolaci arkobakterů komerčně dostupné obohacené živné půdy, které obsahují pepton, extrakt z kvasnic, či chlorid sodný. Mediem, které se setkalo s jistým úspěchem pro kultivaci arkobakterů je cefoperazon – amphotericin B – teikoplanin (CAT) agar. Původně byl vyvinut pro jiné bakteriální patogeny, ovšem po určitých modifikacích se stal vhodným médiem i pro bakterie rodu *Arcobacter* (Motarjemi *et al.*, 2014).

U pomaleji rostoucích druhů arkobakterů, jako jsou *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* je pro detekci vhodné prodloužení inkubace až na sedm dní. Významnou roli v kultivaci těchto kmenů může hrát vlhkost v inkubační atmosféře (Motarjemi *et al.*, 2014).

Bylo zjištěno, že agarové médium (JM agar) obsahující bazální nutriční směs spolu s 0,05 % kyseliny thioglykolové, 0,05 % pyruvátu sodného a 5 % ovčí krve (pH $6,9 \pm 0,2$), je nejlepším médiem pro kultivování druhů *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. nitrofigilis*. Zmíněné druhy vykazují na tomto médiu vynikající růstové charakteristiky a temně červené zbarvení v okolí kolonií (McClure and Blackburn, 2009).

Další médium, které bylo využito pro izolaci arkobakterů je CIN agar (cefsulodin – irgasan – novobiocin). CIN agar je selektivní především pro bakterie *Yersinia* spp., nicméně byl úspěšně použit také k zachycování životaschopnosti bakterií rodu *Arcobacter* ze vzorků vepřového masa a v případě lidských enteritid (Philips, 2001).

Arkobaktery lze s ohledem na jejich velikost a pohyblivost izolovat pomocí membránového filtru o pórozitosti 0,45 – 0,65 μm , který je uložen na plotně se selektivním/neselektivním agarovým médiem. Jako selektivní medium lze využít krevní BHI agar obohacený o CAT suplement (Aski *et al.*, 2016). Otáčením filtru v určitých intervalech je docíleno rovnoměrného rozložení bakteriální suspenze na agaru. Tato metoda je vhodná zejména pro výrazně pohyblivé kmeny rodu *Arcobacter*, které jsou schopny proniknout póry filtru, zatímco ostatní druhy bakterií zůstávají zachyceny na jeho povrchu. Bylo prokázáno, že je tato metoda mnohem citlivější než většina selektivních činidel přidávaných do agarových půd (Motarjemi *et al.*, 2014).

Na základě jedné studie v roce 2015 bylo zjištěno, že pro izolaci arkobakterů, a to především ze vzorků potravin a životního prostředí, může být po jisté modifikaci použit také *Campylobacter* selektivní agar (CASA). Ve studii byly pro popis růstu arkobakterů na tomto selektivním mediu použity kmeny *A. butzleri* CCUG 30484, *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. skirrowii* LMG 6621. U zmíněných kmenů byl na CASA mediu po 48 hodinách kultivace při 30 °C v aerobním prostředí pozorován nárůst drobných, cihlově červených kolonií o průměru asi 1,0 – 1,5 mm. Dále bylo zjištěno, že tento agar velmi významně inhibuje růst další doprovodné mikroflory vzorku (Šilha *et al.*, 2015).

Bylo prokázáno, že tato nově vyvinutá metoda se zdá být pro izolaci arkobakterů velmi úspěšná a účinná (Šilha *et al.*, 2015).

1.1.7.2 Molekulárně-biologické metody

Arkobaktery stejně jako kampylobaktery, mají velmi náročné požadavky na růst, které brání jejich identifikaci běžnými fenotypickými metodami. Navíc vzhledem k fylogenetické blízkosti těchto dvou rodů může dojít k jejich vzájemnému zaměnění. To může přispívat ke značnému podhodnocení jejich skutečného výskytu (González *et al.*, 2013). Takováto omezení vedla k rostoucímu zájmu o výzkum směřující k rychlým a především citlivým analytickým metodám, které umožňují specifickou detekci těchto rozvíjejících se patogenů (González *et al.*, 2013).

S využitím polymerázové řetězové reakce (PCR), která je považována za současný nástroj volby pro detekci, identifikaci a sledování *Arcobacter* spp. nejen v potravinách, jsou

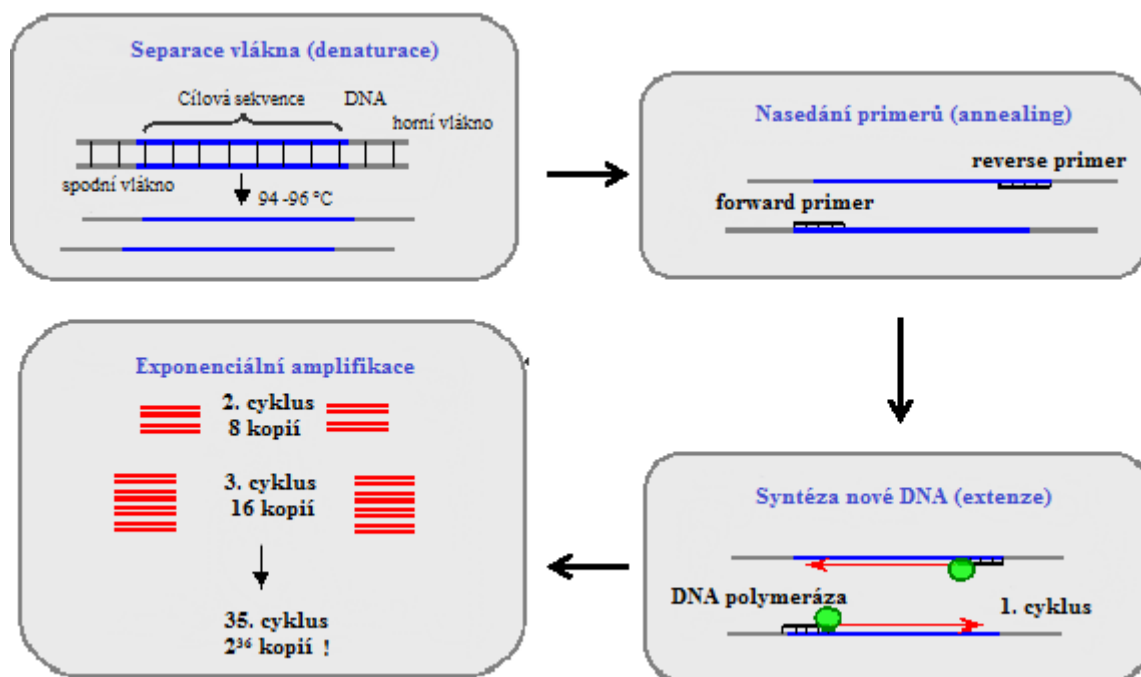
možnosti jejich zachycení zase o krok dále (González *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2006). Důkazem může být například studie Aski *et al.* (2016), ve které byla prokázána lepší detekce arko-bakterů pomocí PCR (14,3 %), v porovnání s kultivačními metodami (8,7 %).

Molekulárně-biologické metody zahrnují simplexní i multiplexní PCR testy s využitím primerů specifických pro daný druh arko-bakterů (Pentimalli *et al.*, 2009). Nejen k detekci bakterií samotných, ale také k detekci bakterií tvořících bakteriální biofilmy se využívá molekulárně-biologických metod založených na polymerázové řetězové reakci. Například k detekci životaschopných buněk v biofilmu bakterií rodu *Arcobacter* byla v roce 2013 zavedena a optimalizována metoda založená na *m*PCR, která využívá interkalačních barviv ethidium monoazidu (EMA) a propidium monoazidu (PMA) (Hrušková *et al.*, 2013).

Polymerázová řetězová reakce je velmi specifická a citlivá metoda používaná k amplifikaci daného fragmentu DNA (deoxyribonukleová kyselina) *in vitro* (Bártová, 2011; Daintith and Elizabeth, 2010; Pentimalli *et al.*, 2009; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Amplifikace DNA *in vitro* se velmi podobá replikaci DNA *in vivo*. Klíčovou roli zde hraje enzym DNA – polymeráza, který katalyzuje syntézu kopií úseku DNA podle templátu (jednořetězová DNA). Templátová DNA obsahuje cílovou sekvenci a vzniká denaturací dvouvláknové DNA za vysoké teploty. Dále je zapotřebí alespoň dvou primerů, chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů. Primery se připojují ke komplementárním úsekům řetězců DNA takovým způsobem, aby jejich 3' – OH – konce směřovaly proti sobě. Tento požadavek zároveň umožňuje vymezení určitého úseku matrice, který bude amplifikován (Bártová, 2011; www.ncbi.nlm.nih.gov).

PCR generuje kopie cílové sekvence exponenciálně, přičemž se na konci reakce akumuluje daná sekvence v miliardách amplikonů, jak je patrné z **Obr. 2** (Bártová, 2011; www.ncbi.nlm.nih.gov).



Obr. 2 Schéma průběhu PCR (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Samotná PCR probíhá v tzv. termocykleru, tedy přístroji, který umožňuje individuální nastavení teplotních podmínek. Teplotní program se skládá celkem z 5 fází, vzájemně se lišících dobou trvání a teplotou, při které probíhají. Jedná se o počáteční denaturaci, denaturaci, annealing, extenzi a závěrečnou polymerační syntézu. Prostřední tři fáze (denaturace, annealing, extenze) se cyklicky opakují, a to obvykle 25 – 35× (Bártová, 2011).

Multiplex PCR je variantou konvenční metody PCR. Základní princip těchto metod je stejný, ovšem u *mPCR* jsou dvě nebo více cílových sekvencí amplifikovány buď jedním, nebo více páry primerů v jedné reakci současně (Markoulatos *et al.*, 2002).

Vývoj účinné multiplexní PCR obvykle vyžaduje strategické plánování a často i více pokusů, vedoucích k optimalizaci reakčních podmínek. Pro úspěšný průběh reakce jsou důležité její podmínky, relativní koncentrace primerů, koncentrace PCR pufru, rovnováha mezi koncentracemi chloridu hořečnatého a deoxynukleotidů, vhodně zvolený teplotní program termocykleru, správné množství templátové DNA a DNA polymerázy. K získání vysoce specifických produktů amplifikace je zásadní také optimální kombinace annealing teploty a koncentrace PCR pufru (Markoulatos *et al.*, 2002).

Multiplexní PCR je ekonomičtější, rychlejší a má podobnou specificitu a citlivost jako simplexní PCR. Tato varianta vykazuje také větší flexibilitu při navrhování primerů a reakčních podmínek pro reakci (Watson and Preedy, 2016).

Od roku 1988, kdy byla metoda PCR vyvinuta, byla úspěšně aplikována v mnoha oblastech testování DNA. Jsou jimi například analýza genomu, mutací či polymorfismů. PCR se běžně používá jako alternativa „klonování genu“ jako prostředek amplifikace genetického materiálu pro sekvenování DNA. Technika se také ukázala přínosnou pro forenzní účely. Umožňuje amplifikaci stopového množství genetického materiálu pro tzv. DNA profilování a fingerprinting nebo pro detekci mikrosatelitní DNA (Daintith and Martin, 2010; Markoulatos *et al.*, 2002). Využití tato metoda nachází také v odvětví antropologie, a to například k identifikaci prastarých DNA z kostí (Markoulatos *et al.*, 2002).

V neposlední řadě je PCR využívána v oblasti detekce infekčních nemocí, kde je cenným nástrojem pro identifikaci virů, bakterií a parazitů (Markoulatos *et al.*, 2002). Nově vyvinuté *m*PCR testy mohou být využity jako rychlé techniky a užitečné markery pro detekci, prevalenci a profilování virulenčních faktorů *Arcobacter* spp. Kromě toho mohou být tyto testy využity s vysokou přesností pro identifikaci patogenů v epidemiologickém šetření infekcí u lidí (Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016). PCR se tak stala rychlým a pohodlným screeningovým testem jak v klinických, tak také ve výzkumných laboratořích (Markoulatos *et al.*, 2002).

Amplifikované produkty jsou separovány nejčastěji pomocí gelové elektroforézy. Pro detekci DNA se do gelu přidává adekvátní množství barviva, zpravidla ethidium bromidu. Jako marker molekulových hmotností se využívá DNA ladder o určitém počtu párů bází. Na závěr se provádí vizualizace pomocí UV transluminátoru (Aski *et al.*, 2016).

1.1.7.3 MALDI /TOF MS

Spolehlivým způsobem detekce a identifikace bakterií rodu *Arcobacter* je také metoda MALDI/TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) (Šilha *et al.*, 2015).

Jedná se vysoce přesnou a ve srovnání s jinými tradičními metodami velice rychlou metodu způsobu identifikace mikroorganismů (Alispahic *et al.*, 2010; Huong *et al.*, 2014). Celková doba analýzy včetně přípravy vzorku trvá totiž pouhých pár minut, což je v rutinní praxi velmi významné a důležité (Barbuddhe *et al.*, 2008).

Principem identifikace bakterií metodou MALDI/TOF MS je generování komplexních spekter, skládajících se z řady píků, tzv. „*fingerprintingů*“ molekul biomarkerů na základě

měření přesného poměru hmotnosti a náboje peptidů a proteinů (Alispahic *et al.*, 2010; Barbuddhe *et al.*, 2008). Data získaná z hmotnostních spekter a následující porovnání těchto dat s knihovnou hmotnostních spekter mikroorganismů slouží k identifikaci mikroorganismů na rodové, druhové a dokonce i kmenové úrovni (Barbuddhe *et al.*, 2008; Huong *et al.*, 2014).

Přesné stanovení jednotlivých bakterií touto metodou se využívá při monitoringu životního prostředí, zpracování potravin, ochraně veřejného zdraví, při krevním screeningu a především v klinické diagnostice (Alispahic *et al.*, 2010; Barbuddhe *et al.*, 2008; Huong *et al.*, 2014).

1.1.7.4 Sekvenování genomu

Důležitou metodou detekce a identifikace bakterií, včetně arkobakterů, je sekvenování (Abdelbaqi *et al.*, 2007).

Sekvenování je metoda, o jejíž průlom se v roce 1977 zasloužili Fred Sanger a Alan R. Coulson (Schuster, 2008). Jejím cílem je stanovení sekvence DNA, tedy pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Stala se tak nástrojem pro dešifrování kompletních genů a dokonce celých genomů (Hutchison *et al.*, 2007; Schuster, 2008).

Sangerova metoda je známá jako enzymatická metoda sekvenování, která při syntéze nového řetězce využívá specifických vlastností DNA polymerázy. Tato technologie byla tzv. „*první generací*“ komerčně dostupného sekvenování, kdy sekvenátory detekovaly DNA báze v řadě jednu po druhé a k separaci vzniklých fragmentů docházelo v polyakrylamidovém gelu (Hutchison *et al.*, 2007; Koubková *et al.*, 2014). Tato metoda se stala velmi rozšířenou v laboratořích po celém světě navzdory její pracnosti i časové náročnosti (Koubková *et al.*, 2014).

Novodobé sekvenační technologie, tzv. NGS (Next generation sequencing) využívají automatických sekvenátorů, které umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně (Bertelli and Greub, 2013). K separaci jednotlivých úseků DNA zde obvykle dochází pomocí kapilární elektroforézy (Koubková *et al.*, 2014).

Dále byla popsána metoda multilokusového sekvenačního typingu (multilocus sequence typing, MLST), která se od roku 1998 s výhodou využívá pro molekulární charakterizaci bakterií. Data získaná touto metodou jsou informativní, všeobecně srovnatelná, snadno ověřitelná a přístupná pomocí internetu (Miller *et al.*, 2009; Pérez-Losada *et al.*, 2017). Principem této metody je DNA sekvenace více lokusů tzv. „*housekeeping*“ genů. Tyto stanovované geny, kterých je obvykle sedm, kodují informaci o základních metabolických funkcích bakterie (Almeida *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009).

Nejen pomocí sekvenování DNA, ale také pomocí sekvenace 16S ribosomální RNA či 23S (r)RNA je umožněna identifikace a taxonomické zařazení bakterií (Abdelbaqi, 2007; Almeida *et al.*, 2009; Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016). Na základě studie z roku 2009 byla úspěšně aplikována nová metoda MLST také u bakterií rodu *Arcobacter*, a to včetně tří nejčastěji izolovaných druhů, tedy *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* (Miller *et al.*, 2009).

1.2 Faktory virulence

Virulencí rozumíme stupeň či závažnost poškození, které je hostiteli způsobeno určitým druhem mikroorganismu. Jedná se tedy o vlastnost kvantitativní. Naproti tomu patogenita, která udává schopnost patogenu vyvolat onemocnění určitého hostitele, je vlastností kvalitativní (IFIS, 2009; Tian *et al.*, 2016).

Geny virulence bakteriálních patogenů mohou být kódovány na plasmidech, bakteriofázích či chromosomech a obvykle jsou seskupeny v genomu. Virulence je také často multifaktoriální a koordinovaně regulovaná (Maurelli *et al.*, 1998).

Virulenční faktory ovlivňují vlastnosti daného mikroorganismu. Pro růst bakterie *in vitro* na kultivačním médiu jsou postradatelné, ale jistým způsobem se podílejí a přispívají ke vniku onemocnění hostitele (IFIS, 2009; Tian *et al.*, 2016). Bylo prokázáno, že pro rozlišení patogenních a nepatogenních bakterií mohou být využity právě jejich specifické virulenční faktory (Keen, 2012).

Jedním z kritérií důležitým pro propuknutí bakteriální infekce je souhra mezi virulenčními faktory daného patogenu a obrannými mechanismy hostitele (Griffiths, 2005).

1.2.1 *Quorum sensing* spojené s virulencí

Významný vliv při modulaci bakteriální virulence má také *quorum sensin* (*QS*) systém (Griffiths, 2005).

Quorum sensing je jedním z nejdůležitějších regulačních mechanismů bakterií (Hogan *et al.*, 2004). Bakterie jsou díky tomuto systému schopné odolávat a přizpůsobovat se neustálým změnám prostředí (Sharma *et al.*, 2014). V mnoha případech *QS* reguluje tvorbu biofilmu, pohyb, expresi faktorů virulence, sekreci toxinů, antibakteriálních látek a enzymů (Duarte *et al.*, 2015; Miller and Bassler, 2001; Waters and Bassler, 2005). Dále systém zajišťuje schopnost komunikace mezi jednotlivými bakteriemi, a to prostřednictvím malých molekul, nazývaných tzv. „*autoinduktory*“. V případě, kdy autoinduktory dosáhnou kritických

hodnot, bakterie na tento signál reagují změnou genové exprese. Funkce ovládané *quorum sensing* jsou velmi rozmanité a odráží potřeby určitého druhu bakterií využívat k osídlení specifická prostředí (Reading and Sperandio, 2005).

1.2.2 Významné virulenční faktory bakterií

Bakterie jsou velmi různorodé živé organismy, vyznačující se schopností přizpůsobovat se nejrůznějším prostředím, včetně lidského těla. Pro zdolání různých nástrah lidského organismu jim napomáhá celá řada sofistikovaných nástrojů, díky kterým dochází k rozvrácení buněčných funkcí a propuknutí onemocnění (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Virulenčních faktorů je velké množství a jsou navzájem velmi odlišné. Důležitou úlohu v uplatnění těchto faktorů hrají regulační systémy buňky. Ty řídí procesy týkající se způsobu jejich uplatnění a v určitých případech mohou být za tyto faktory samy považovány (Tian *et al.*, 2016).

Mezi nejčastější virulenční faktory bakterií obecně patří jejich schopnost adheze k nejrůznějším materiálům, a to prostřednictvím pilů, produkcí mikrobiálních proteinů či tvorbou biofilmu. Dalšími významnými virulenčními faktory jsou invazivita, tvorba toxinů, tvorba pouzdra, chemotaxe či přítomnost bičíků a s nimi spojená pohyblivost. Faktorem virulence je také samotná imunitní odpověď hostitele (Griffiths, 2005; IFIS, 2009).

Všechny tyto zmíněné faktory poskytují možnost bakteriální kolonizace hostitelských buněk, čerpání důležitých živin, dále přispívají k poškození epitelu a také narušují obranné mechanismy hostitele (Palma *et al.*, 2016).

1.2.2.1 Adheze mikroorganismů

Adheze, neboli přilnavost, je vlastnost mikroorganismů, která získává značnou pozornost a stává se předmětem mnoha studií. Problémy spojené s adhezí mikroorganismů byly zaznamenány v mnoha odvětvích, ať už v oblasti týkající se vzniku infekcí nebo také například v oblasti čištění odpadních vod (Belaabed *et al.*, 2016).

Po proniknutí mikroorganismu do těla hostitele je právě přichycení patogenu na buněčný epitel stěžejní. Adheze totiž zabraňuje odplavení mikroorganismu a naopak umožňuje zahájení kolonizace. Vzniká tak infekce a dochází k množení a šíření daného patogenu organismem hostitele (Bolton, 2015; Griffiths, 2005).

Pily

Jednou z možností, kterou bakterie k adhezi často využívají, jsou dlouhé vláknité struktury zvané fimbrie neboli pily. Jedná se o orgány vyčnívající z povrchu těla bakterií,

kteřé jsou vázány ke glykoproteinovým či glykolipidovým receptorům na povrchu hostitelských epitelálních buněk (Griffiths, 2005; Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006). Jejich úkolem je kromě již zmíněné adheze také silou řízená kontrakce, pomocí které dochází k zlepšení jejich kontaktu s cílovým povrchem. Další úloha těchto struktur spočívá v podílení se na přenosu genetického materiálu během konjugace (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Produkce mikrobiálních proteinů

Bakterie dále kromě fimbrií a pilů disponují nepřeborným množstvím bakteriálních adhezínů, které mají schopnost rozpoznávat různé prvky na površích hostitelských buněk (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Některé bakterie mají na svém povrchu tzv. specifické buněčné povrchové proteiny, které se vyznačují schopností vazby na specifické receptory hostitelské buňky. Takovým příkladem může být střevní bakterie *Listeria monocytogenes*, jejíž povrchový protein internalin A (*InlA*) se specificky váže na receptor buněk střevního epitelu, E-kadherin (Griffiths, 2005). Dalšími příklady mikrobiálních proteinů, využívaných pro adhezi různými druhy patogenů, mohou být adhesivní glykoproteiny. Jsou jimi například vitronektin, fibrinogen nebo fibronektin, který může mít podobu jak sekrečních molekul, tak také molekul asociovaných s plazmatickou membránou buňky (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Tvorba biofilmu

Důležitou úlohu v bakteriální patogenezí a virulenci hraje také adheze prostřednictvím tvorby bakteriálního biofilmu. Jedná se o vrstvu bakteriálních buněk přisedlých na povrch substrátu a obalených hustou polysacharidovou maticí (Flemming and Wingender, 2010; Griffiths, 2005). Biofilmy se vyznačují schopností odolávat různým podmínkám prostředí, a proto jsou tak významným virulenčním faktorem některým bakteriím (Griffiths, 2005).

1.2.2.2 Invazivita a kolonizace

Pro úspěšný vnik infekce je v některých případech nezbytná také bakteriální invaze cílových buněk hostitele (Griffiths, 2005). Těmito cílovými buňkami jsou integrální adhesivní membránové receptory na povrchu hostitelských buněk, jako jsou například integriny, kadheriny či selektiny (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006). Dalším způsobem invaze může být přímá translokace bakteriálních proteinů do cytosolu hostitelské buňky. Tyto proteiny následně vyvolají přestavbu tzv. „*architektury*“ buněčné plazmatické membrány, a tím umožní následně vniknutí patogenu do buňky hostitele (Griffiths, 2005; Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Schopností invaze se vyznačují zejména tzv. intracelulární bakterie, kdy po jejich vniknutí do cílové buňky následuje intracelulární množení, šíření bakterií do dalších tkání nebo jejich přetrvávání v napadené buňce (Griffiths, 2005; Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

1.2.2.3 Motilita a chemotaxe

Motilita, neboli pohyblivost, je velmi důležitým virulenčním faktorem některých patogenních bakterií a je také významnou pomocí při kolonizaci hostitelských buněk. Pohyblivost je zajištěna zejména přítomností jednoho či více bičíků na povrchu bakteriální buňky. Právě díky bičíkům je pohyb bakterií nezávislý a spontánní. Některé bakterie jsou však schopny pohybu i bez použití bičíků, a to prostřednictvím tzv. „*klouzavého*“ pohybu. Bakterie šroubovitého tvaru využívají jako zdroj vlastního pohonu rotaci vnitřního axiálního vlákna (IFIS, 2009).

U některých druhů bakterií, jako jsou například kampylobaktery, je pro pohyblivost důležitá souhra bičíků a systému chemosenzorů. Jedná se o mechanismus zvaný chemotaxe, který pohyblivým bakteriím umožňuje vnímat okolní prostředí a pomocí bičíků se také pohybovat směrem k výhodnějším podmínkám nebo se naopak vzdálit od těch smrtících (Bolton, 2015; Pereira-Medrano *et al.*, 2013). Podobný mechanismus, zvaný aerotaxe, zase umožňuje bakteriím vnímat a reagovat na kyslíkové gradienty (Pereira-Medrano *et al.*, 2013).

Všechny tyto zmíněné způsoby umožňují bakteriím nejen se pohybovat ve směru živin, ale jsou také nezbytné pro přežití v rámci různých chemotaktických podmínek vyskytující se v těle hostitele (Bolton, 2015; IFIS, 2009).

1.2.3 Detekce a identifikace virulenčních faktorů

Faktory virulence jsou důležité pro propuknutí infekce, a proto je snaha vyvinout strategii, na základě které by bylo možné podniknout vhodná preventivní opatření, případně léčba. Tato strategie je označována jako tzv. „*antivirulentní terapie*“. Aby mohla být antivirulentní terapie vyvinuta, je nejprve nutná detekce a identifikace samotných virulentních faktorů, což může být velmi obtížné (Keen, 2012; Tian *et al.*, 2016).

Studiu, detekci a charakterizaci klíčových virulenčních genů bakterií napomohla aplikace metod molekulární biologie a genetiky, a to metoda polymerázové řetězové reakce, sekvenace či typizace bakterií pomocí MLST (Emaneini, 2016; Palma *et al.*, 2016).

Nejen molekulárně-biologické metody, ale například také použití dvojrozměrné elektroforézy (2-DE) ve spojení s MALDI/TOF hmotnostní spektrometrií, lze využít pro určení faktorů virulence, a to na základě proteomických vlastností bakterií. Právě tato metoda

byla předmětem jedné studie v roce 2016, kdy byly identifikovány některé virulenční faktory u bakterie *Cronobacter sakazakii* (Ye *et al.*, 2016). Zajímavým způsobem rychlé a citlivé detekce virulenčních faktorů je také metoda pomocí elektrického proteinového čipu. Touto metodou byly testovány například virulenční faktory některých vybraných druhů bakterií rodu *Staphylococcus*. Principem metody je enzymový sendvičový imunologický test (ELISA), který zahrnuje rozpoznání a vazbu příslušných virulenčních faktorů specifickými protilátkami. Samotná detekce takto navázaných virulenčních faktorů je na základě měření elektrického proudu enzymaticky uvolněné látky a jeho hodnota odpovídá množství daného faktoru (Quiel *et al.*, 2009).

1.2.4 Faktory virulence u arkobakterů

Jak již bylo uvedeno, faktory virulence jsou spojovány s patogenitou mikroorganismů (Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016). Zdá se, že toto platí i u bakterií rodu *Arcobacter*, nicméně jejich virulentní mechanismy nejsou stále dostatečně vysvětleny a pochopeny (Ferreira *et al.*, 2014; Girbau *et al.*, 2015). Dala by se však očekávat jistá podobnost některých virulenčních faktorů arkobakterů a kampylobakterů, jelikož, jak již bylo uvedeno, jsou tyto dva rody příbuzné. Na základě studie Miller *et al.* (2007) bylo prokázáno, že některé virulentní determinanty identifikované u bakterie *Campylobacter jejuni* mají homology u bakterie *Arcobacter butzleri*. Nebylo ovšem stanoveno, zda je funkce a role těchto homologů u obou druhů bakterií podobná.

Doposud bylo publikováno jen několik málo studií, které se otázkou virulence arkobakterů zabývají. Na jejich základě byla u některých druhů zjištěna přítomnost devíti domnělých virulenčních faktorů. Těmito virulenčními faktory jsou protein vázající fibronectin (*cj1349*, *cadF*), filamentární hemagglutinin (*hecA*), protein aktivující hemolyzin (*hecB*), hemolyzin a fosfolipáza (*tlyA*, *pldA*), integrální membránový protein (*mviN*), *Campylobacter* invazivní antigen B (*ciaB*) a vnější membránový protein (*irgA*) (Ferreira *et al.*, 2014; Girbau *et al.*, 2015; Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016).

Protein vázající fibronectin – *cj1349*, *cadF*

Protein vázající fibronectin je virulenční faktor kódovaný geny *cj1349* a *cadF*. Tyto geny podporují adhezi bakterie na buňky střevního epitelu. Protein *cadF*, o velikosti 37 kDa, indukuje i internalizaci bakteriální buňky, a to prostřednictvím enzymu guanosintrifosfatázy. Bylo zjištěno, že tento virulenční faktor je přítomen také u bakterií rodu *Campylobacter*, kde je kódován zejména genem *cadF* a zastává velmi podobné funkce, jako je to v případě arkobakterů (Bolton, 2015; Girbau *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2007).

Filamentární hemaglutinin – *hecA*

Tento virulenční faktor je kódován genem označovaným *hecA*. Protein *hecA* je členem filamentární hemaglutininové (FHA) rodiny a podílí se na adhezi a agregaci bakteriálních buněk k buňkám hostitelským. FHA proteiny jsou široce rozšířeny jak u rostlinných, tak také u živočišných patogenů. Další role filamentárního hemaglutininu spočívá v usmrcování epidermálních buněk (Girbau *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2007; Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016).

Protein aktivující hemolyzin – *hecB*

Protein aktivující hemolyzin (*hec B*) je důležitý virulenční faktor, který aktivuje tvorbu hemolyzinu (Girbau *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2007). Na základě jedné studie z roku 2012 byla velmi výrazně detekována přítomnost genů kódujících tento virulenční faktor především u kmenů izolovaných ze skotu (Doudah *et al.*, 2011).

Hemolyzin a fosfolipáza – *tlyA*, *pldA*

Buněčná hemolytická aktivita, kódovaná genem *tlyA*, je spojena s vnější membránovou fosfolipázou A, která je kódovaná genem *pldA* (Girbau *et al.*, 2015). Vnější membránová fosfolipáza A je přítomna u mnohých bakterií a plísní a jejím úkolem je hydrolyza acyl-esterových vazeb (Doudah *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že fosfolipázy jsou u celé řady patogenů spojené s lýzou erytrocytů (Grant *et al.*, 1997).

U bakterií rodu *Campylobacter* byla detekována vysoká proteinová podobnost obou těchto genů (Doudah *et al.*, 2011).

Integrální membránový protein – *mviN*

Gen *mviN* byl poprvé identifikován u bakterie *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, jako chromozomální gen, který způsobuje onemocnění u myši (Doudah *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že gen *mviN* detekovaný u arkobakterů kóduje protein zajišťující biosyntézu peptidoglykanu, avšak jeho virulentní schopnost či příspěvek k virulenci nebyly doposud prokázány (Girbau *et al.*, 2015). Homolog tohoto genu byl nalezen také u bakterie *Escherichia coli*, kde se určitým způsobem podílí na syntéze buněčné stěny (Doudah *et al.*, 2011).

Campylobacter* invazivní antigen B – *ciaB

Virulenční faktor *Campylobacter* invazivní antigen B (*ciaB*), kódovaný stejnojmenným genem, přispívá k invazi a kolonizaci hostitelské buňky, a to pomocí sekrečního systému (Girbau *et al.*, 2015). Protein *cia B* o velikosti 73 kDa a jeho mutantní

formy mají výrazně snížené funkční schopnosti, tedy adhezi a především invazi (Bolton *et al.*, 2015). Gen *ciaB* byl detekován nejen u arkobakterů, ale také u dalších organismů, jako jsou například *Campylobacter* spp., *Sulfurovum* spp. nebo *Nitratiruptor* spp. (Doudah *et al.*, 2011).

Vnější membránový protein – *irgA*

Gen *irgA* kóduje regulaci železa vnějších membránových proteinů. Spolu s genem *iroE*, který kóduje periplazmatický enzym, zajišťují samotné získávání železa a jsou nezbytné pro vznik a průběh bakteriální infekce (Girbau *et al.*, 2015). Vnější membránový protein byl identifikován také u bakterie *Vibrio cholerae*, kde pravděpodobně zastává stejnou funkci, jako v případě arkobakterů. Homology genů *irgA* a *iroE* byly dále prokázány v genomu ureopatogenní bakterie *Escherichia coli*, kde hrají důležitou úlohu v patogenezi infekce močových cest (Miller *et al.*, 2007).

Kromě výše uvedených faktorů virulence, byla u druhů *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius* zaznamenána také exprese interleukinu-8, což je cytokin, který je považován za velmi významný virulenční faktor bakterií (Doudah *et al.*, 2011). Dále bylo prokázáno, že některé druhy arkobakterů se vyznačují schopností tvorby biofilmu, což je spojeno s bakteriální virulencí, kolonizací, přežíváním bakterií v různých životních prostředích a také s rezistencí na antibiotika (Ferreira *et al.*, 2013).

Zdá se, že zmiňované faktory virulence jsou u jednotlivých druhů arkobakterů v různém zastoupení, avšak prozatím nebyly u všech známých druhů identifikovány. Jedním z druhů, u kterého byly detekovány všechny doposud známé faktory virulence je například kmen *Arcobacter butzleri* ATCC 49616 (ekv. k *A. butzleri* LMG 10828), který tedy může sloužit jako pozitivní kontrola při jejich stanovení (Doudah *et al.*, 2011).

I přes všechny dosavadní studie, týkající se virulenčních faktorů arkobakterů není známo, zdali jsou funkce a vlastnosti těchto faktorů podobné jako jejich homology u jiných druhů bakterií (Girbau *et al.*, 2015).

1.2.5 Detekce a identifikace virulenčních faktorů arkobakterů

Důležitým krokem k pochopení fyziologie, genetiky a virulence bakterií rodu *Arcobacter* je nezbytná sekvenční analýza jejich genomu (Girbau *et al.*, 2015; William *et al.*, 2007). Na základě jedné studie, která se zabývala analýzou právě genomové sekvence u jednoho z kmenů rodu *Arcobacter* (*A. butzleri* RM4018), byla zjištěna přítomnost domnělých virulenčních genů kódujících příslušné faktory (Girbau *et al.*, 2015). Další studie dokládá, že genom tohoto kmene kóduje celkem 25 membránových a cytoplazmatických

proteinů, obsahujících stejné domény, které jsou u jiných bakterií zapojeny do tvorby biofilmu, motility a virulence (Miller *et al.*, 2007).

Jednou z dalších vhodných metod detekce je využití polymerázové řetězové reakce. Současné konvenční PCR testy umožňují detekci každého z virulentně asociovaných genů arkobakterů zvlášť. Proto byla snaha vyvinout přesný, rychlý a jednoduchý *mPCR* test, kterým lze současně detekovat i více virulentních genů těchto bakterií v jedné reakci (Doudah *et al.*, 2011; Tabatabaei *et al.*, 2014; Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016).

A právě tato metoda byla úspěšně vyvinuta a optimalizována v rámci studie z roku 2016 v Kanadě, a to pro tři druhy arkobakterů, *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* a *Arcobacter skirrowii*. Metoda umožňuje detekci více virulentně asociovaných genů zároveň, a to pomocí tří samostatných *mPCR* testů. Tyto testy s kombinacemi dvojic či trojic PCR primerů byly dále ověřeny na izolátech zmiňovaných druhů arkobakterů, pocházejících ze zvířecích a lidských vzorků stolice (Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2016).

1.3 Biofilm

Je známo, že se bakterie vyskytují ve dvou formách, a to jak ve formě jednotlivých planktonních buněk, tak ve formě organizovaných struktur přichycených k povrchu nějakého substrátu (Bjarnsholt, 2013).

Biofilmy jsou tedy strukturovaná mikrobiální společenstva buněk, připojená k povrchu substrátu a obalená extracelulární matrix. Tyto extracelulární polymerní substance udržují buňky pohromadě (Flemming and Wingender, 2010). Buňky jsou v biofilmu často prostorově uspořádány ve strukturách, které usnadňují jejich vzájemnou metabolickou komunikaci (Costerton, 2009). Tyto struktury představují převážnou formu mikrobiálního života. Jsou všudypřítomné a mohou se vyvíjet na téměř každém povrchu. Lze je nalézt například v půdách, kanalizacích, v ústech, ve střevech, ale také na lékařských implantátech a dalších místech (Dautle *et al.*, 2003). Přisedlé buňky tvořící biofilm jsou velmi odolné vůči antimikrobiálním látkám, a právě tato zvýšená odolnost má značný vliv na léčbu infekcí, které s biofilmem souvisejí. Tvorba biofilmu je často považována za hlavní důvod, díky kterému léčba antimikrobiálními látkami selhává. Odhaduje se, že 65 – 80 % všech infekcí souvisí s bakteriálním biofilmem, což představuje závažný problém (Bjarnsholt, 2013).

Samotná tvorba a vývoj této struktury jsou ovlivněny mnoha faktory, jako jsou například vlastnosti povrchu, pH, množství dostupných živin, teplota, atd. Dále hraje svou roli také specifita bakteriálního kmene (Borucki *et al.*, 2003; Chae and Schraft, 2000; Donlan,

2002). Důležitou vlastností bakterií je schopnost odolávat extrémním podmínkám a vlivům jak fyzikálním, tak také chemickým či biologickým (Schindler, 2008).

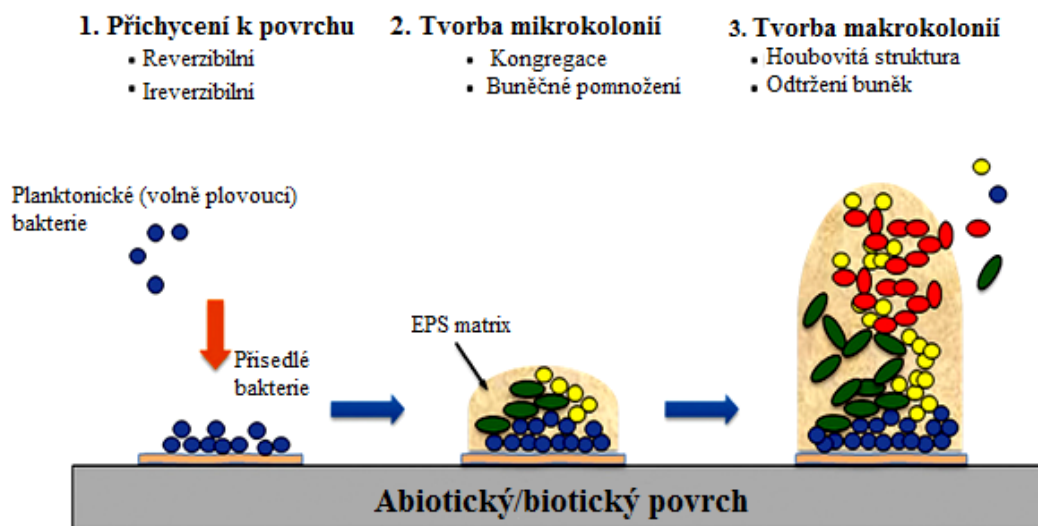
1.3.1 Historie biofilmu

První zmínky o existenci biofilmu se objevily před více než 300 lety, kdy nizozemský vědec Anthony van Leeuwenhoek studoval biologický materiál získaný z jeho vlastních zubů. Pomocí jednoduché mikroskopie objevil agregáty pohybujících se objektů. Tyto mikroskopické subjekty nazval jako tzv. „*animalcules*“ (Henrici, 1933). Více než o dvě století později vědci Heukelekian a Heller zkoumali technologie aerobního a anaerobního rozkladu odpadních pevných látek. Přišli s tvrzením, že růst mikroorganismů probíhá buď formou tvorby bakteriálního slizu, nebo koloniálního růstu připojeného k povrchu nějakého materiálu (Heukelekian and Helleer, 1940).

Strukturu, kterou tyto průkopnické teorie popisovaly, dnes nazýváme „*biofilm*“ (Costerton *et al.*, 1978).

1.3.2 Tvorba biofilmu a jeho složení

Vývoj mikrobiálního biofilmu může být popsán jako dynamický proces zahrnující několik po sobě jdoucích kroků (**Obr. 3**) (Dufour *et al.*, 2010)



Obr. 3 Schematické znázornění vývoje mikrobiálního biofilmu (upraveno Dufour *et al.*, 2010)

Jak znázorňuje obrázek výše, prvním krokem tvorby biofilmu je přichycení bakteriální buňky na vybraný abiotický či biotický povrch. Na povrchu takového substrátu jsou často přítomny molekuly, které mohou podporovat přilnavost bakterií (například živiny, slinné

proteiny, aj.). Počáteční přilnutí je zprostředkováno slabou reverzibilní van der Waalsovou interakcí mezi buněčným povrchem a substrátem (Donlan, 2002).

Ve druhém kroku dochází k dělení prvních připojených buněk, a tím k růstu a rozvoji mikrokolonií. Ty se postupně zvětšují, spojují a vytváří vrstvu buněk, která pokrývá povrch substrátu (O'Toole *et al.*, 2000).

Ve třetím kroku se tyto vrstvy začínají hromadit. Tím dochází ke zrání vytvořeného biofilmu. Zralý biofilm se vyznačuje makrokoloniemi, které jsou obklopeny vodními kanálky, kterými dochází k distribuci živin a signálních molekul. Pokud dojde k omezení přísunu živin, mohou se některé buňky biofilmu buď jednotlivě, nebo ve shlucích odpojit (O'Toole *et al.*, 2000). Mechanismy, které jednotlivé vývojové kroky biofilmu regulují, se pro různé druhy bakterií výrazně liší (Flemming and Wingender, 2010).

Biofilmy jsou tvořeny z 80 – 85 % extracelulární polymerní substancí (EPS) a pouze z 15 – 20 % buňkami (Kokare *et al.*, 2009). Vlastnosti EPS se mohou biofilm od biofilmu lišit, a to jak po chemické, tak po fyzikální stránce. Základní složky těchto substancí, jako jsou polysacharidy, proteiny či extracelulární DNA jsou u všech biofilmů stejné. Extracelulární polymerní látky hrají hlavní úlohu při udržování integrity biofilmu. Vzhledem k tomu, že tyto látky zajišťují vysokou hydrataci, mohou bránit vysychání. Dále mohou působit jako difuzní bariéra, která brání toxickým látkám, jako jsou antibiotika či dezinfekční prostředky v prostupu do biofilmu (Sutherland, 2001; Donlan, 2002; Flemming and Wingender, 2010).

1.3.2.1 Ochranná role extracelulárních polymerních látek

Primární funkcí, která je přičítána této biofilmové matrix je ochrana samotného biofilmu. Již několik studií se dříve zabývalo studiem prostupu antibiotik do biofilmu. Bylo prokázáno, že EPS mohou působit jako tzv. „*nepropustná bariéra*“ sloužící k omezení antimikrobiální penetrace, čímž jsou buňky biofilmu chráněny (Sutherland, 2001).

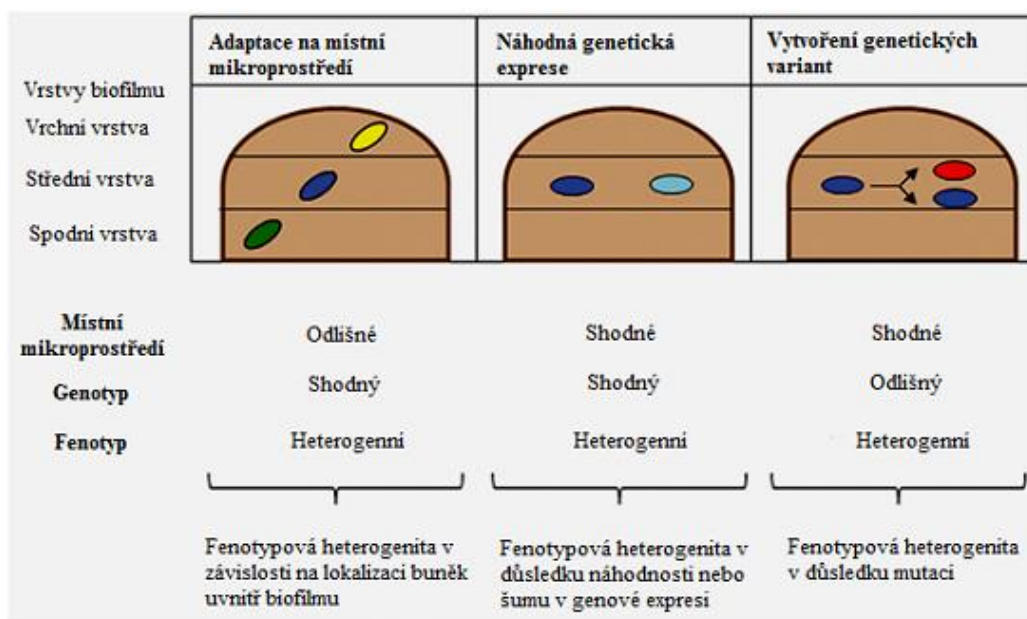
Například buňky v horní části kapalného rozhraní biofilmu umírají při léčbě antibiotiky, zatímco bakterie nacházející se hluboko uvnitř jsou schopny přežít (Govan and Deretic, 1996). EPS tak mohou být považovány za tzv. „*chemicky aktivní bariéru*“. Aniontové EPS se mohou vzájemně vázat, a tím zadržovat toxické těžké kovy, kationtové antimikrobiální peptidy a kladně nabitá antibiotika, jako jsou například aminoglykosidy (Nichols *et al.*, 1988). Naproti tomu je vazba relativně nenabitých antibiotik (například β -laktamy) na EPS téměř nulová (Zheng and Stewart, 2002).

1.3.2.2 Buněčná různorodost uvnitř biofilmu

Většina biofilmů nacházejících se v přírodě jsou polymikrobiálního charakteru. To znamená, že je zde zapojeno více druhů bakterií s různými fenotypy. Mikrobiální biofilmy vytvářejí velmi komplexní a heterogenní prostředí charakterizované širokou fyzikální, chemickou a biotickou rozmanitostí. Velmi zajímavým faktem je, že i u jednodruhových biofilmů existuje fenotypová heterogenita. Buňky stejných bakteriálních druhů mohou v biofilmu vykazovat různé fenotypy (Socransky and Haffajee, 2000).

K vysvětlení této různorodosti v rámci jednodruhových mikrobiálních biofilmů bylo navrženo několik procesů. Diferenciace buněk v biofilmu může záviset na podmínkách prostředí obklopujícího buňky. Odlišné koncentrační gradienty kyslíku, živin, iontů a chemikálií vytvářejí širokou škálu typů mikroprostředí, které poskytují vhodné podmínky pro bakteriální kolonizaci (Zobell, 1937; Socransky and Haffajee, 2000).

Na **Obr. 4** jsou znázorněny fenotypové diferenciace buněk v souvislosti s množstvím kyslíku a nutričními gradienty v jednodruhovém biofilmu.



Obr. 4 Procesy vzniku heterogenity v jednodruhovém biofilmu (upraveno Dufour *et al.*, 2010)

V tomto modelu jsou znázorněny tři odlišné fyziologické stavy. Buňky nacházející se v horních vrstvách biofilmu spotřebovávají veškerý dostupný kyslík a jejich růst tedy probíhá aerobně. Anaerobní mikroorganismy se vyvíjí pod aerobní vrstvou. Kyslíkem a živinami vyčerpané oblasti se nacházejí na spodních vrstvách struktury biofilmu. Za těchto okolností je

většina z přisedlých buněk metabolicky neaktivní nebo odumřelá. V důsledku toho vede jednotlivá bakteriální buněčná odpověď na místní mikroprostředí k fenotypové heterogenitě (Stewart and Franklin, 2008).

Vznik alternativních fenotypů také může nastat spontánně, a to v důsledku tzv. „šumu“ v genové expresi. Tento šum vzniká z náhodných výkyvů v koncentraci proteinu mezi jednotlivými buňkami. Stochastická (náhodná) genová exprese umožňuje buňkám čelit nepříznivým podmínkám v oblasti životního prostředí (Veening *et al.*, 2008).

Genetické mutace v biofilmu mohou být také přímou příčinou fenotypové heterogenity. Ve skutečnosti se genetické mutace tvoří z důvodu bodových mutací, inzercí či delecí, a tím přispívají ke zvýšení fenotypové variability biofilmu. Například adaptivní mutace, které pocházejí z pomalu rostoucí nebo tzv. „spící“ populace, mají za následek fenotypové variace, které přinášejí výhody v přežití populace jako celku za ztížených podmínek, a to i když jsou tyto mutace spontánní (Plakunov *et al.*, 2010).

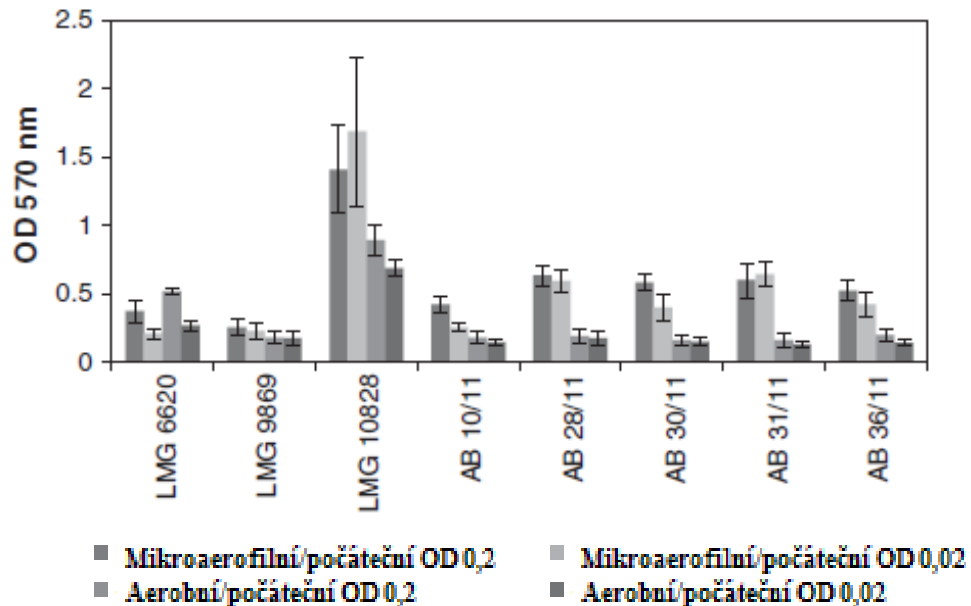
Fenotypově mohou vzniknout různé subpopulace v důsledku bakteriálních buněčných reakcí na místní mikroprostředí, stochastických šumů v genové expresi, genetických mutací či prostřednictvím bodových mutací disperze (Dufour *et al.*, 2010).

1.3.3 Tvorba biofilmu u arkobakterů

Arkobaktery jsou bakterie vyznačující se nejen širokou distribucí výskytu, variabilitou a odolností vůči různým antimikrobiálním látkám, ale také schopností tvorby mikrobiálních komunit, tzv. biofilmů. Všechny tyto faktory mohou představovat potenciální riziko vzniku alimentárních onemocnění, a tedy značné riziko pro lidské zdraví (Ferreira *et al.*, 2013; Chmielewski *et al.*, 2013).

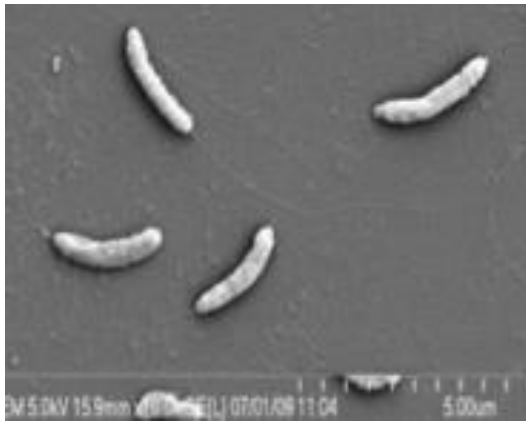
Jak již bylo uvedeno, biofilmy jsou nejčastější formou bakteriálního života a podporují jejich přežívání za nepříznivých a stresujících podmínek (Chmielewski *et al.*, 2013). Zdá se, že výjimkou nejsou ani arkobaktery, což potvrzuje například studie Ferreira *et al.* (2013), která se zabývala tvorbou biofilmu u *Arcobacter butzleri*. Autoři ve svém experimentu testovali celkem 32 různých izolátů této bakterie a u 72 % z nich byla potvrzena tvorba biofilmu. Například u referenčního kmene *Arcobacter butzleri* LMG 10828 byla detekována výrazná tvorba biofilmu za všech experimentálních podmínek, naproti tomu kmen *Arcobacter butzleri* LMG 9869 tvorbu biofilmu za stejných podmínek téměř nevykazoval (**Obr. 5**) (Ferreira *et al.*, 2013).

Bylo také zjištěno, že za aerobních podmínek se tvorba biofilmu u arkobakterů výrazně nezvyšuje, jako tomu nastává například u bakterie *Campylobacter jejuni*, kde má právě aerobní prostředí na tvorbu biofilmu významný vliv (Ferreira *et al.*, 2013).

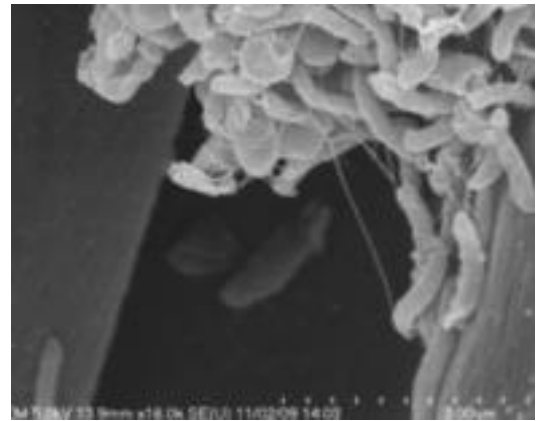


Obr. 5 Tvorba biofilmu tří referenčních kmenů *Arcobacter butzleri* LMG 6620, *Arcobacter butzleri* LMG 9869 *Arcobacter butzleri* LMG 10828 a pěti izolátů v závislosti na druhu atmosféry a počáteční optické densitě (OD) buněčné suspenze. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr + SD (upraveno Ferreira *et al.*, 2013)

Na základě studie, kterou se zabývali Pereira-Medrano *et al.*, (2013) bylo zjištěno, že flagelin (protein podílející se na tvorbě bičíků bakterií, včetně arkobakterů), je také s nejvyšší pravděpodobností zapojen do tvorby bakteriálního biofilmu. Toto tvrzení vzniklo na základě pozorování zvýšené regulace flagelinu na anodě, kde byla také detekována vrstva biofilmu bakterie *Arcobacter butzleri* (**Obr. 6**) (Pereira-Medrano *et al.*, 2013).



(A)



(B)

Obr. 6 Buňky bakterie *Arcobacter butzleri*, rastrovací elektronová mikroskopie, mikroaerofilní prostředí. (upraveno Pereira-Medrano *et al.*, 2013)

A – planktonické buňky bakterie *Arcobacter butzleri*, měřítko 5 μm ; *B* – biofilm bakterie *Arcobacter butzleri*, tvořený na elektrodě (anodě), měřítko 4 μm

Dalším příkladem tvorby biofilmu arkobakterů může být izolace těchto bakterií z biofilmu tvořícího se na krunýři živých humrů, ze stěn nádrží podzemní vody či z vícedruhového biofilmu tvořícího se uvnitř reaktorů (Ferreira *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že například *Arcobacter butzleri* je schopen tvorby biofilmu na materiálech jako je nerezová ocel, měď či plast (Kjeldgaard *et al.*, 2009).

I přesto, že jsou arkobaktery schopny tvorby biofilmu také v prostředí drůbežích jatek, doposud nebyla zaznamenána jejich přítomnost v prostředí potravinářských provozů (Giacometti *et al.*, 2013).

1.3.4 Metody detekce biofilmu u arkobakterů

Doposud bylo popsáno hned několik metod detekce bakteriálních biofilmů. Jedná se o metody, jako jsou například bioluminiscenční testy, piezoelektrické senzory, využití fluorescenční mikroskopie, značení radionuklidem, destičková metoda pro tkáňové kultury, Christensenova zkumavková metoda či Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách (Hasan *et al.*, 2011; Christensen *et al.*, 1985; Stepanović *et al.*, 2007).

1.3.4.1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách

Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, vyvinutá v roce 1985, je jednoduchá, účinná a nejčastěji používaná technika detekce a kvantifikace tvorby bakteriálních biofilmů (Christensen *et al.*, 1985; Stepanović *et al.*, 2000). I přes to, že byla tato metoda doposud podrobena mnoha modifikacím, které umožňují *in vitro* kultivaci

mikroorganismů a kvantifikaci tvorby biofilmu, je princip a jednotlivé kroky v postupu práce této metody v různých obměnách podobný (Christensen *et al.*, 1985).

Jamky sterilní mikrotitrační destičky, nejčastěji polyetylenové (**Obr. 7**), zde slouží jako tzv. „*kultivační nádoby*“ (Stepanović *et al.*, 2000). Po kultivaci suspenze příslušného mikroorganismu v testovaném živném mediu je vzniklý biofilm, který je adherovaný na stěny a dno jamek mikrotitrační destičky, fixován nejčastěji octanem sodným (2%) a obarven krystalovou violetí (0,1%). Přebytečné barvivo je poté odstraněno promytím sterilní destilovanou vodou, a po té je destička sušena obvykle při pokojové teplotě. K uvolnění navázaného barviva se nejčastěji využívá ethanol (96%) a následuje spektrofotometrické měření absorbance zbarveného roztoku při příslušné vlnové délce, která je ukazatelem množství vytvořeného biofilmu. Současně se také proměřuje nezaočkované médium, jako negativní kontrola. Dále se také velmi často proměřuje absorbance v průběhu utváření biofilmu, a to před kultivací destičky a bezprostředně po ní (Hasan *et al.*, 2011; Christensen *et al.*, 1985; Stepanović *et al.*, 2000; Šilhová-Hrušková *et al.*, 2015).



Obr. 7 Polyetylenová mikrotitrační destička (96 jamek) s buněčnou suspenzí příslušného mikroorganismu (fotoautor)

1.4 Ovlivnění tvorby biofilmu

1.4.1 Eliminace biofilmu

Biofilmy jsou nechvalně známé svou rezistencí k vnějším vlivům, čímž se jejich eliminace stává velice obtížnou. Také z tohoto důvodu jsou zdrojem mnoha chronických infekcí. Povaha struktury biofilmu a jeho fyziologické vlastnosti jsou odpovědné za jejich vnitřní rezistenci vůči antimikrobiálním látkám, ať už se jedná o antibiotika (ATB), dezinfekční látky či jiné (Lewis, 2001).

Díky rezistenci jsou mikroorganismy schopny růst i v přítomnosti zvýšené hladiny antimikrobiálních látek. Z tohoto důvodu se provádí testování minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je hodnota vyjadřující kvantitativně citlivost určité bakterie k antibakteriálnímu činidlu. Je to tedy nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která je schopna zabránit viditelnému růstu mikrobiální kultury za daný časový interval. MIC testy jsou často využívanými testy v odvětví bakteriologie a představují nejběžnější způsob stanovení náchylnosti mikroorganismu k antimikrobiálním látkám (Balows *et al.*, 1991). Koncentrace antimikrobiálního činidla, která má za následek snížení počtu živých buněk o 99,9 % se nazývá minimální baktericidní koncentrace (Lewis, 2000; Lewis, 2001).

Buňky v podobě biofilmu rostou v přítomnosti antimikrobiálních látek podstatně lépe, než buňky planktonní (Lewis, 2000).

Rezistence biofilmu vůči antimikrobiálním přípravkům může být způsobena například ztíženou možností průniku antimikrobiální látky skrze extracelulární matrix, přítomností rezistentního fenotypu v geneticky heterogenní populaci nebo pomalejším růstem buněk nacházejících se v biofilmu (Donlan and Costerton, 2009).

Prakticky pro všechny antimikrobiální látky platí, že jejich baktericidní účinek je efektivnější, jedná-li se o buňky, které se nacházejí v rostoucí fázi. Některá antibiotika růst buněk přímo vyžadují, aby byla schopná jejich usmrcení. Například antibiotika penicilin a ampicilin nejsou schopné usmrtit buňky ve stacionární (klidové) fázi vůbec. Rychlost jejich působení je pak úměrná rychlosti růstu bakterií (Costerton *et al.*, 1999).

Některé z dalších typů ATB, jako jsou například β -laktamy, cefalosporiny, aminoglykosidy či fluorochinolony mají tu vlastnost, že jsou schopné usmrtit i buňky ve fázi klidové. Ovšem jejich efektivita usmrcování výrazně stoupá pro rychle se dělící buňky (Costerton *et al.*, 1999).

Jako další mechanismy odpovědné za odolnost biofilmů je třeba zmínit například odolávání fagocytárním buňkám a dalším součástem obranného systému těla (Donlan and Costerton, 2009). Samotné či v kombinaci jsou tyto faktory užitečné pro vysvětlení přežití biofilmu v mnoha případech (Høiby *et al.*, 2010; Lewis, 2001).

V současné době jsou testovány různé způsoby, které by mohly být použity v boji proti formování biofilmů. Jakýkoliv inhibitor faktoru, který způsobuje perzistenci (odolnost biofilmu), může být v kombinaci s konvenčními antibiotiky účinný způsob, jak biofilm eliminovat (Lewis, 2001).

Nejúčinnějším způsobem, jak zabránit tvorbě biofilmu, by bylo ovlivnění samotného procesu *QS* (Shrout and Nerenberg, 2012).

1.4.1.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky buď přírodního, nebo syntetického původu. Inhibují růst nebo způsobují smrt mikroorganismů, a jsou proto využívána k léčbě infekčních onemocnění (Bednář, 1996; Guimarães, *et al.*, 2009).

Antibiotika přírodního původu a jejich polosyntetické deriváty zahrnují většinu klinicky významných antibiotik. Patří sem například β -laktamy (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karpabenemy), tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy či cyklické peptidy. Mezi ATB syntetického původu řadíme například sulfonamidy nebo fluorochinolony (Guimarães, *et al.*, 2009).

V současné době existuje na trhu celá řada antibiotik. Ovšem ne každá látka s antimikrobiálním účinkem může být použita jako lék. Musí splňovat požadavek tzv. „*selektivní toxicity*“, tedy účinek na eukaryotní buňky musí být zanedbatelný nebo nejlépe žádný (Bednář, 1996). Nadměrná spotřeba antibiotik má negativní dopad na zvyšování četnosti přirozeně rezistentních bakteriálních kmenů, které následně představují terapeutický problém (Bednář, 1996).

ATB mohou mít účinek buď bakteriostatický, pokud pouze zabraňují růstu a množení bakterií, nebo baktericidní, pokud dochází k usmrcení daného mikroorganismu (Bednář, 1996). **Tab. 1** ukazuje, že v některých případech mohou být koncentrace antibiotik potřebné k dosažení baktericidního účinku u biofilmu o 3 až 4 řády vyšší, než je koncentrace potřebná k eliminaci planktonních bakterií (Dunne, 2002; Donlan and Costerton, 2009).

Tab. 1 Citlivost antibiotik k různým druhům bakterií v planktonní formě nebo v biofilmu (upraveno Donlan and Costerton, 2002)

<i>Mikroorganismus</i>	<i>ATB</i>	<i>MIC</i> či <i>MBC</i> ($\mu\text{g/ml}$)*	<i>Efektivní koncentrace</i> ($\mu\text{g/ml}$) ⁺
<i>St. aureus</i>	vankomycin	2 (MBC)	20
<i>Ps. aeruginosa</i>	imipenem	1 (MIC)	> 1024
<i>E. coli</i>	ampicilin	2 (MIC)	512
<i>Ps. pseudomallei</i>	ceftazidim	8 (MBC)	800
<i>Str. sanguis</i>	doxycyklin	0,063 (MIC)	3,15

Pozn.: *MIC* – minimální inhibiční koncentrace; *MBC* – minimální baktericidní koncentrace; *ATB* – antibiotikum; * – pro planktonní fenotyp referenčního mikroorganismu; + – proti fenotypickému mikroorganismu; *St.* – *Staphylococcus*; *Str.* – *Streptococcus*; *Ps.* – *Pseudomonas*; *E.* – *Escherichia*

1.4.1.2 Čištění

Proces čištění bývá velice často podceňován. Snižování počtu mikroorganismů na povrchu, včetně těch v biofilmu, je z velké části ovlivněno právě čištěním. Je proto důležité, uvědomit si základy čištění, to znamená, jaké faktory mohou ovlivnit účinnost tohoto procesu, a jak může být tento proces čištění optimalizován (Grinstead, 2009).

Čištění je nejdůležitějším krokem k minimalizaci mikrobiální kolonizace. Před použitím desinfekčního prostředku se jím eliminuje velké množství mikroorganismů a zbylé buňky jsou poté náchylnější k desinfekci (Carpentier and Cerf, 1993).

Účinnost čistícího procesu (ÚČP) můžeme popsat následující rovnicí (Grinstead, 2009):

$$\text{ÚČP} = \text{doba působení} + \text{mechanické působení} + \text{chemické působení} + \text{teplota}$$

Obecně platí, čím delší bude doba působení čistícího prostředku ve styku se znečištěným povrchem, tím čistší povrch bude. To může být provedeno například cirkulací čistícího roztoku v uzavřeném systému nebo máčením znečištěného předmětu do čistícího roztoku. Povaha čistícího prostředku může také značně ovlivnit čas potřebný pro dostatečné působení činidla na znečištěném povrchu (Pap and Kiskó, 2008; Grinstead, 2009).

Důležité je také mechanické čištění, kde je zapotřebí dbát zvýšené opatrnosti, neboť může dojít k poškození povrchu, a to v případě, kdy byl tento proces použit nesprávně.

Vzniklé vrypy a trhliny, které jsou následkem častého a nepřiměřeného mechanického čištění, jsou naopak velmi vhodné k uchycení mikrobiálních buněk (Grinstead, 2009).

Chemické čisticí prostředky jsou vyráběny tak, aby je bylo možno použít za určitých podmínek, konkrétně v závislosti na tom, jaký povrch a od jakých látek je potřeba očistit. Například, povrchově aktivní látky jsou vhodné k čištění povrchů s vysokým obsahem tuku. Mnoho takových prostředků obsahuje také látky zásadité. Ty zabraňují opětovnému ulpívání odstraňované látky. V případě, že je povrch znečištěn minerálními látkami, můžeme použít kyseliny. Dalšími důležitými složkami v čisticích prostředcích, které se používají k eliminaci bakteriálních biofilmů, jsou například chelatační činidla, jako je EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina), rozpouštědla, fosfáty, inhibitory koroze, oxidační činidla (jako je například chlór), enzymy (proteázy, či enzymy hydrolyzující polysacharidy) a další (Chmielewski and Frank, 2003; Grinstead, 2009; Parkan *et al.*, 2004; Zottola and Sasahara, 1994).

Stejně jako doba působení, mechanické čištění či použitý čisticí prostředek, je k eliminaci bakteriálního biofilmu důležitá i vhodně zvolená teplota. Optimální teplota je navíc často ovlivněna povahou čisticího prostředku, který má být k čištění použit. Těkavé složky, jako je chlór nebo rozpouštědla mohou při příliš vysokých teplotách způsobovat potíže a enzymy, které bývají v čisticích prostředcích také obsaženy, mohou být inaktivovány. Vysoká teplota také ovlivňuje korozi kovových materiálů a způsobuje zhoršení vlastností plastových či pryžových povrchů (Grinstead, 2009).

1.4.2 Ovlivnění tvorby biofilmu arkobakterů

Jak již bylo uvedeno, některé druhy rodu *Arcobacter* jsou schopny tvorby biofilmu. To také dokládá spousta studií, které se touto problematikou zabývají (Ferreira *et al.*, 2013; Chmielewski *et al.*, 2013). Tvorbu biofilmu bakterií, včetně arkobakterů, lze ovšem ovlivnit mnohými způsoby, jako je například teplota a doba inkubace, prostředí, druh použité živné půdy či různé antimikrobiální a dezinfekční látky (Duarte *et al.*, 2015; Kjeldgaard *et al.*, 2009).

Předmětem studie, kterou se zabývali Kjeldgaard *et al.* (2009), bylo pozorování tvorby biofilmu *Arcobacter butzleri* v teplotním rozmezí 5 – 37 °C. Bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou a dobou inkubace se tvorba biofilmu výrazně zvyšuje. Dalším faktorem, který byl v této studii pozorován, bylo ovlivnění tvorby biofilmu použitou živnou půdou. Zjistili totiž, že biofilm bakterie *Arcobacter butzleri* se daleko lépe tvořil v živném médiu tzv.

„chicken meat juice medium“ (CMJ) oproti běžněji používanému BHI bujónu (Kjeldgaard *et al.*, 2009).

Ovlivnění růstu arkobakterů a jejich schopnosti tvorby biofilmu lze nejen již výše zmíněnými způsoby, ale také přírodními látkami, jako jsou například bylinky, koření, esenciální oleje, extrakty apod. (Irkin *et al.*, 2011).

1.4.2.1 Ovlivnění růstu a tvorby biofilmu arkobakterů přírodními látkami

Koření a bylinky jsou používány po celém světě a jejich antimikrobiální potenciál byl objeven již ve Starověku. Proto byla jejich antimikrobiální účinnost proti různým mikroorganismům přezkoumána, a to na základě mnohých studií a experimentů (Cowan, 1999).

Na základě studie z roku 2009 byla prokázána inhibice biofilmu bakterie *Listeria monocytogenes*, a to přírodními extrakty vybraných druhů bylin a koření. Po použití sedmi z 15 extraktů bylo pozorováno snížení tvorby biofilmu až o 50 % (Sandasi *et al.*, 2009). Jiným příkladem může být studie, která se zabývala eliminací zubního biofilmu bakterie *Streptococcus mutans*, působením extraktu tropické rostliny Salvadora perská (*Salvadora persica*) (Al-Sohaibani and Murugan, 2012).

Doposud bylo publikováno několik studií, které popisují antimikrobiální vliv léčivých přírodních látek a koření na bakterie rodu *Arcobacter*. Jednou takovou studií se zabývali Červenka *et al.*, (2006), která byla zaměřena na druhy *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Mezi testovanými přírodními látkami byly například skořice, šalvěj, rozmarýn, česnek, zázvor či hřebíček, a to ve formě alkoholových extraktů (chloroform, methanol). Pomocí diskové difúzní metody bylo zjištěno, že všechny testované extrakty mají v různé míře schopnost inhibovat růst těchto bakterií (Červenka *et al.*, 2006).

Hřebíček vonný (*Eugenia aromaticum*)

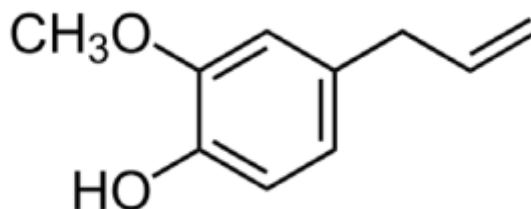
Hřebíček vonný, který můžeme vidět na **Obr. 8**, je pupenem tropického stromu hřebíčkovce vonného (*Eugenia aromaticum*) (Charles, 2013).



Obr. 8 Hřebíček vonný (*Eugenia aromaticum*) (www.webozdravi.cz)

Hřebíčkovce vonný je stálezelený, až 15 metrů vysoký strom, který původně pochází z jihovýchodní Asie (Moluky, Indonésie). Ovšem dnes je hojně pěstován po celém světě, zejména v Indonésii, Zanzibaru, Madagaskaru, Filipínách nebo v Brazílii (Charles, 2013).

Hlavními složkami hřebíčku jsou esenciální oleje (silice), lipidy, vitamíny, proteiny, sacharidy, flavonoidy, fenolové kyseliny a triterpeny (Geng *et al.*, 2007; Charles, 2013; Steglich *et al.*, 2000). Nejvíce zastoupeným esenciálním olejem v hřebíčku je eugenol (85 %), jehož chemická struktura je znázorněna na **Obr. 9** (Burt, 2004; Charles 2013).



Obr. 9 Chemická struktura eugenolu (Burt, 2004)

Jedná se o přírodní látku, která je často používána pro léčbu chronických či akutních gastritid, průjmů nebo nadýmání. Pro své baktericidní a sedativní účinky se eugenol využívá také v zubním lékařství a při zánětech ústní dutiny a krku (Burt, 2004; Geng *et al.*, 2007; Charles 2013). Obecně se esenciální oleje, extrahované se sušených pupat hřebíčku, lokálně používají k ulevění od bolesti svalů, pro podporu hojení ran, při revmatismu či při osteoporóze (Chaieb *et al.*, 2007; Charles 2013).

Obecně má hřebíček také antiseptické, anestetické, protinádorové a antioxidační účinky. Také bylo zjištěno, že extrakt z hřebíčku může působit antistresově (Geng *et al.*, 2007; Charles 2013).

Hřebíček si našel uplatnění nejen v lékařství a lékárnictví, ale pro své silné aromatické vlastnosti, štiplavost, sladkost a pálivost také v potravinářském průmyslu, kde slouží jako dochucovadlo a oblíbené koření. S jeho dalším využitím se setkáváme také v kosmetice a parfumerii (Geng *et al.*, 2007).

Badyán (*Illicium verum*)

Badyán (hvězdicový anýz, čínský anýz) je plodem stromu badyáníku pravého (*Illicium verum*), což je stálezelený strom, dorůstající výšky až 12 metrů (Charles, 20013). Původem badyán pochází z jižních a jihozápadních provincií Číny a Severního Vietnamu, ovšem v dnešní době je široce pěstován také ve Španělsku, Francii, Itálii nebo Maroku (Charles 2013; Wang *et al.*, 2011).

Samotné plody badyánu svým tvarem připomínají osmicípé hvězdy, kde se v každém z těchto cípů ukrývá hnědé, lesklé semínko (**Obr. 10**) (Charles, 2013; Wang *et al.*, 2011).



Obr. 10 Badyán (*Illicium verum*) (www.daryodprirody.cz)

Hlavními složkami badyánu jsou minerální látky, katechiny, proantokyanidin a esenciální oleje (5 – 9 %), které jsou v největší míře obsaženy především v oplodí a semínkách (Charles, 2015). Hlavní složkou těchto esenciálních olejů je *trans*-(E)-anetol (95 %), který je hlavním důvodem antimikrobiální a antimykotické aktivity badyánu. Loupaná semena navíc obsahují asi 55 % mastných kyselin, včetně kyseliny olejové, linolové, myristové a stearové (De *et al.*, 2002; IFIS, 2009).

Badyán se vyznačuje nejen již zmíněnou antimikrobiální aktivitou, ale působí také proti nadýmání, bolestem břicha a průjmům. Jeho aktivní složky mají široké farmakologické působení, a to zejména antioxidační, sedativní, analgetické a protinádorové (Charles, 2015; Kanatt *et al.*, 2014). Dále bylo prokázáno, že žvýkání plodů badyánu usnadňuje vykašlávání, zbavuje hleny a uvolňuje tak dýchací cesty. I z těchto důvodů je častou součástí sirupů a pastilek proti bolestem v krku a kašli (Charles, 2015).

Podobně jako hřebíček, si i badyán, pro svou aromatickou vůni a nasládlou chuť, našel uplatnění v potravinářském průmyslu, kde slouží především jako koření (Charles, 2013). Badyánové oleje se s oblibou používají jako aromatická dochucovadla u cukrářských výrobců, tabáku, likérů či různých farmaceutických přípravků (De *et al.*, 2002; IFIS, 2009).

Muškatový oříšek (*Myristica fragrans*)

Muškatovník vonný je stálezelený, až 20 metrů vysoký strom původem pocházející z Indonésie, ovšem v dnešní době je hojně pěstován také v jižní Indii, na Srí Lance, Sumatře nebo v Malajsii. Samotný muškátový oříšek, známý především jako koření, je vysušené semeno plodu již zmíněného stromu. Červený dužnatý plod a zároveň obal oříšku, je v sušené podobě známý jako koření muškátový květ. Muškátový oříšek je šedavý a asi 3 cm v průměru velký oválný útvar s charakteristickým vrásčitým povrchem, jak je patrné z **Obr. 11** (Charles, 2015).



Obr. 11 Muškátový oříšek (*Myristica fragrans*) (www.rehabilitace.info)

Muškatový oříšek se vyznačuje nejen svou nasládlou, citrusovou a pronikavou ořechovou vůní, ale především hořkosladkou a pikantní chutí, připomínající chuť již zmíněného hřebíčku vonného (Charles, 2015).

Hlavními složkami muškátového oříšku jsou především esenciální oleje, etherické extrakty, škrob, glukóza, fruktóza, sacharóza, bílkoviny a vláknina. Esenciální oleje, které jsou jednou z nejvíce zastoupených složek, obsahují organické sloučeniny, jako jsou α -pineny, β -pineny či myristicin. Dále tato semena obsahují až 75 % mastných olejů, známých jako muškátové máslo (Charles, 2015).

Výtažky a esenciální oleje z muškátového oříšku se vyznačují širokou škálou lékařských účinků. Působí proti nadýmání, bolestem břicha, žaludečním křečím, nevolnostem, zvracení či průjmům. Dále tlumí horečky, astma a mají protinádorové a antioxidační účinky (Duan *et al.* 2009, Charles, 2015). Muškátový oříšek má také antimikrobiální, antibakteriální a protizánětlivé účinky, a proto se využívá k ulevení od bolesti u artritid či při revmatismu (Charles, 2015, Lee and Park, 2011). Dále bylo prokázáno, že extrakt z muškátového oříšku vykazuje silnou inhibiční aktivitu proti bakterii *Streptococcus mutans*, což je ústní patogen způsobující vznik zubních kazů (Chung *et al.*, 2006). Důležitou vlastností muškátového oříšku, a to především z důvodu přítomnosti již zmíněného myristicinu, jsou návykové a halucinogenní účinky při jeho nadměrné konzumaci (Charles, 2015).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál a metody

2.1.1 Chemikálie

Agaróza	(Top–Bio, Česká republika)
Ethanol 96%	(Lach–ner, Česká republika)
Methanol 99,96%	(Lach–ner, Česká republika)
Dimethylsulfoxid 98%	(Penta, Česká republika)
Octan sodný p.a.	(Sigma–Aldrich, Německo)

2.1.2 Reagencie a primery pro PCR

Chlorid hořečnatý 25 mmol/l	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
10× PCR pufr	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
dNTP mix	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
DNA <i>Taq</i> polymeráza	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
Ethidium bromid monoazid	(Top–Bio, Česká republika)
DNA Marker 200–1500 bp	(Top–Bio, Česká republika)
PCR voda	(Top–Bio, Česká republika)
PCR vkládací pufr	(Top–Bio, Česká republika)
Primery pro PCR	(Generi biotech, Česká republika)
<i>cadF</i> –F (1251K1)	5'–TTA CTC CTA CAC CGT AGT–3'
<i>cadF</i> –R (1251K2)	5'–AAA CTA TGC TAA CGC TGG TT–3'
<i>ciaB</i> –F (1251K3)	5'–TGG GCA GAT GTG GAT AGA GCT TGG A–3'
<i>ciaB</i> –R (1251K4)	5'–TAG TGC TGG TCG TCC CAC ATA AAG–3'
<i>cj1349</i> –F (1251K5)	5'–CCA GAA ATC ACT GGC TTT TGA G–3'
<i>cj1349</i> –R (1251K6)	5'–GGG CAT AAG TTA GAT GAG GTT CC–3'
<i>irgA</i> –F (1251K7)	5'–TGC AGA GGA TAC TTG GAG CGT AA CT–3'
<i>irgA</i> –R (1251K8)	5'–GTA TAA CCC CAT TGA TGA GGA GCA–3'
<i>hecA</i> –F (1251K9)	5'–GTG GAA GTA CAA CGA TAG CAG GCT C–3'
<i>hecA</i> –R (1251L0)	5'–GTC TGT TTT AGT TGC TCT GCA CTC–3'
<i>hecB</i> –F (1251L1)	5'–CTA AAC TCT ACA AAT CGT GC–3'
<i>hecB</i> –R (1251L2)	5'–CTT TTG AGT GTT GAC CTC–3'

<i>mviN</i> -F (1251L3)	5'-TGC ACT TGT TGC AAA ACG GTG-3'
<i>mviN</i> -R (1251L4)	5'-TGC TGA TGG AGC TTT TAC GCA AGC-3'
<i>pldA</i> -F (1251L5)	5'-TTG ACG AGA CAA TAA GTG CAG C-3'
<i>pldA</i> -R (1251L6)	5'-CGT CTT TAT CTT TGC TTT CAG GGA-3'
<i>tlyA</i> -F (1251L7)	5'-CAA AGT CGA AAC AAA GCG ACT G-3'
<i>tlyA</i> -R (1251L8)	5'-TCC ACC AGT GCT ACT TCC TAT A-3'

10× TE pufr (Tris-EDTA)

Složení:	0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	100 ml

Roztoky byly smíseny s 880 ml destilované vody.

10× TBE pufr (Tris-Borát-EDTA)

Složení:	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	108 g
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
	kyselina boritá	55 g

Navážka 108 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla smíšena s 55 g kyseliny borité, 40 ml kyseliny ethylendiamintetraoctové a 960 ml destilované vody.

1× TBE pufr (Tris-Borát-EDTA)

Složení:	10× TBE pufr	100 ml
	destilovaná voda	900 ml

10× TBE pufr byl naředěn 900 ml destilované vody.

2.1.3 Pracovní roztoky

Fyziologický roztok

Složení:	chlorid sodný	8,5 g
----------	---------------	-------

Navážka 8,5 g chloridu sodného byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

20% Dimethylsulfoxid

Složení:	DMSO 98%	8 ml
----------	----------	------

8 ml DMSO (98%) bylo smíšeno s 42 ml sterilní destilované vody.

Sterilní destilovaná voda

Složení: destilovaná voda 450 ml

Destilovaná voda byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut.

Krystalová violet'

(HiMedia, Indie)

Složení: krystalová violet' 2 g
šřavelan amonný 0,8 g
ethanol 20 ml
destilovaná voda 80 ml

2% agarózový gel s ethidium bromidem

Složení: agaróza 1,6 g
1× TBE pufr 80 ml
ethidium bromid 4 µl

Agaróza byla za tepla rozpuřtěna v 1× TBE pufru a po ochlazení byly ke vzniklé směsi přidány 4 µl ethidium bromidu.

2% agarózový gel s GelRed™

Složení: agaróza 1,6 g
1× TBE pufr 80 ml
GelRed™ (Biotium, USA) 4 µl

Agaróza byla za tepla rozpuřtěna v 1× TBE pufru a po ochlazení byly ke vzniklé směsi přidány 4 µl GelRed™.

1% agarózový gel s ethidium bromidem

Složení: agaróza 1,2 g
1× TBE pufr 80 ml
ethidium bromid 4 µl

Agaróza byla za tepla rozpuřtěna v 1× TBE pufru a po ochlazení byly ke vzniklé směsi přidány 4 µl ethidium bromidu.

2.1.4 Pevná a tekutá kultivační média

TSA agar (HiMedia, India)

Složení:	enzymatický hydrolyzát kaseinu	15 g/l
	sójový pepton	5 g/l
	chlorid sodný	5 g/l
	agar	15 g/l

pH (25 °C) = 7,3 ± 0,2

Navážka 40 g práškové směsi byla smísena s 1000 ml destilované vody a vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

BHI bujón (HiMedia, Indie)

Složení:	telecí mozková infuze	12,5 g/l (z 200g/l)
	hovězí srdcová infuze	5 g/l (z 250 g/l)
	proteosový pepton	10 g/l
	chlorid sodný	5 g/l
	hydrogenfosforečnan disodný	2,5 g/l
	dextróza	2 g/l

pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

Navážka 37 g práškové směsi byla smísena s 1000 ml destilované vody a vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

2.1.5 Pomůcky a potřeby

Běžné laboratorní gumové, kovové, skleněné a plastové pomůcky

Kahan

Filtrační papír

Mikrozkumavky (BioTech, Česká republika)

Sterilní zkumavky (Meus, Itálie)

Mikropipety automatické (Discovery, Německo)

Mikropipety automatické (Eppendorf, Německo)

Mikropipety automatické (Thermo Scientific, Spojené státy americké)

Mikropipety automatické (Biohit, Německo)

SPL mikrotitrační destičky 32096	(SPL Live Sciences, Korea)
(96 jamkové s plochým dnem, polystyrenové, sterilní)	
2.1.6 Přístroje	
Analytické váhy KERN 440-43	(Kern, Německo)
Laboratorní předvážky Mark ES 1001	(BEL, Itálie)
Autokláv PS 20A	(BMT, Česká republika)
Autokláv Sterilab	(BMT, Česká republika)
Biologický termostat BT120M	(Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104.2	(BMT, Česká republika)
BACMED 6iG2	(Aspiag, Česká republika)
Digestoř laboratorní	(Merci, Česká republika)
Elektroforetická vana OWL EASYCAST B1A	(Sigma, Spojené státy americké)
Elektroforetický zdroj EC-250-90	(Sigma, Spojené státy americké)
Chladnička a mraznička RK 6201BW	(Gorenje, Slovinsko)
Chladnička ZRA 40100 WA	(Zanussi, Česká republika)
Mikrovlnná trouba	(LG, Korea)
Laminární box Hotte MSC 9 standard	(Jouan, Francie)
McFarland densitometr	(Laboserv, Česká republika)
Termoblok SBH 130 DC	(Stuart [®] , Velká Británie)
Termocykler (Biometra)	(BioTech, Česká republika)
UV dekontaminační box UVC/T-AR	(Biosan, Litva)
UV transuminátor Viber Lourmot	(Chemos, Česká republika)
Vortex	(BioTech, Česká republika)
Třepačka IKA [®] Vortex MS 3 Digital	(Merci, Česká republika)
Mini centrifuga MPW15	(MPW, Česká republika)
Mini třepačka IKA [®] MS 1	(Sigma-Aldrich, Česká republika)

2.2 Použité bakteriální kmeny

K detekci virulenčních faktorů a pro sledování tvorby biofilmu a jeho ovlivnění přírodními extrakty byly použity referenční a sbírkové kmeny rodu *Arcobacter*. Tyto použité bakteriální kmeny pocházely ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (CCUG), Sbírký mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii (LMG), České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM) a Interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (UPa). Jako srovnávací kmeny byly použity *Cronobacter sakazakii* CCM 3461, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Přehled všech bakteriálních kmenů použitých v této studii je uveden v **Tab. 2**.

Tab. 2 Přehled bakteriálních kmenů použitých ve studii

Bakteriální druh	Kmenové označení
<i>A. butzleri</i>	LMG 10828; CCUG 30484; UPa 2012/3; UPa 2012/4; UPa 2013/3; UPa 2013/4; UPa 2013/5; UPa 2013/7; UPa 2013/8; UPa 2013/10; UPa 2013/11; UPa 2013/15; UPa 2013/18; UPa 2013/19; UPa 2013/20; UPa 2013/21; UPa 2013/22; UPa 2013/24; UPa 2013/25; UPa 2013/26; UPa 2013/27; UPa 2013/30; UPa 2013/31; UPa 2013/32; UPa 2013/33; UPa 2013/36; UPa 2013/37; UPa 2013/38; UPa 2013/39; UPa 2013/40; UPa 2013/41; UPa 2013/42; UPa 2013/43; UPa 2013/44; UPa 2013/45; UPa 2013/46; UPa 2013/47; UPa 2013/48; UPa 2013/49; UPa 2014/28; UPa 2014/51; UPa 2014/54; UPa 2014/57; UPa 2015/1; UPa 2015/2; UPa 2015/5; UPa 2015/6; UPa 2015/7; UPa 2015/9; UPa 2015/11; UPa 2015/12; UPa 2015/13; UPa 2015/14; UPa 2015/15; UPa 2015/16; UPa 2015/18; UPa 2015/19; UPa 2015/20
<i>A. cryaerophilus</i>	CCM 7050; CCM 3934; UPa 2012/1; UPa 2012/2; UPa 2013/1; UPa 2013/6; UPa 2013/12; UPa 2013/13; UPa 2013/14; UPa 2013/16; UPa 2013/17; UPa 2013/28; UPa 2013/29; UPa 2013/35; UPa 2014/58; UPa 2014/58a; UPa 2014/58d; UPa 2014/59
<i>A. skirrowii</i>	LMG 6621
<i>A. defluvii</i>	LMG 25694
<i>A. thereius</i>	LMG 24488
<i>A. lanthieri</i>	LMG 28517
<i>C. sakazakii</i>	CCM 3461
<i>E. coli</i>	CCM 3953
<i>St. aureus</i>	CCM 3954

Pozn.: A. – *Arcobacter*; C. – *Cronobacter*; E. – *Escherichia*; St. – *Staphylococcus*; UPa – Interní sbírka mikroorganismů Univerzity Pardubice; LMG – Sbírký mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii; CCM – Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně; CCUG – Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku

Bakteriální kmeny rodu *Arcobacter* a dále bakterie *Cronobacter sakazakii* CCM 3461, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953 byly uchovávány v ledničce při 4 °C na TSA agarovém médiu. Avšak pro dlouhodobé uchovávání těchto kultur byly zaočkovány do BHI bujónu a uchovávány při 30 °C v takto tekutém prostředí. Před samotným testováním byly kultury přeočkovány na TSA agar a kultivovány 48 hodin při 30 °C.

2.3 Příprava přírodních extraktů s antimikrobiálním účinkem

Ovlivnění tvorby biofilmu u vybraných kmenů arko-bakterů a kontrolních bakteriálních kmenů *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953 bylo ověřeno v případě tří připravených extraktů v laboratorních podmínkách. Z jednotlivých matric byly připraveny extrakty, které byly následně testovány jako potenciální činidla pro ovlivnění tvorby biofilmu. Informace, které se týkají matric pro extrakci, včetně dané specifikace, shrnuje **Tab. 3**.

Tab. 3 Přehled použitých matric k přípravě extraktů

Český název	Botanický název	Výrobce
Hřebíček vonný	<i>Eugenia aromaticum</i>	Avokádo, Česká republika
Badyán	<i>Illicium verum</i>	Avokádo, Česká republika
Muškatový oříšek	<i>Myristica fragrans</i>	Vitana, Česká republika

2.3.1 Příprava extraktů z vybraných druhů koření

Testované druhy koření, tedy hřebíček vonný, badyán a muškátový oříšek, byly nejprve rozmělněny v třecí misce, homogenizovány, naváženy na laboratorních vahách a smíseny s patričným množstvím 99,96% methanolu (**Tab. 4**). Louhování v alobalém přikryté kádince probíhalo po dobu 4 dní v temnu za laboratorní teploty. Po uplynutí této doby byly extrakty zfiltrány přes filtrační papír, nality na Petriho misky (Ø 12 cm) a vloženy do termostatu vyhřátého na 37 °C. Po odpaření rozpouštědla byl vysušený extrakt rozpuštěn v 20% DMSO tak, aby výsledná koncentrace extraktu činila 100 mg/ml. Takto připravené extrakty byly před samotným použitím znovu zfiltrány. V průběhu trvání experimentu byla pravidelně ověřována mikrobiální čistota extraktů kultivačně na TSA agaru.

Tab. 4 Přehled použitých navážek matric a objemů extrakčního činidla pro extrakci

Název	Navážka	Objem methanolu (99,96%)
Hřebíček vonný	30 g	60 ml
Badyán	49,6 g	100 ml
Muškatový oříšek	69,6 g	100 ml

2.4 Detekce virulenčních faktorů bakterií rodu *Arcobacter* pomocí *mPCR*

Pro detekci a identifikaci genů kódujících virulenční faktory vybraných kmenů rodu *Arcobacter* byla využita metoda multiplex PCR. Přehled testovaných bakterií je uveden v kapitole 2.2 *Použité bakteriální kmeny*. Výchozí podmínky pro *mPCR* byly nastaveny dle dostupné literatury, avšak některé kroky či parametry bylo nutné optimalizovat.

2.4.1 Příprava lyzátů testovaných bakterií

Do mikrozkušavek bylo napipetováno 200 μl 10 \times TE pufru, který byl následně zaočkován několika koloniemi testovaného bakteriálního kmene. Dále byly zkumavky vortexovány a lyzovány suchým teplem při 110 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. Po ochlazení byly vzorky opět vortexovány, a tím připraveny k dalšímu použití.

2.4.2 Příprava reakčních *mPCR* směsí

Pro detekci a identifikaci genů kódujících virulenční faktory arkobakterů byla nutná příprava celkem tří různých sad *mPCR* směsí (1, 2, 3), vzhledem k tomu, že není možná detekce všech faktorů virulence naráz v rámci jednoho experimentu. Každá z těchto směsí, připravovaných v UV dekontaminačním boxu, obsahovala reagentie a primery, jejichž názvy korespondovaly s názvy jednotlivých virulenčních faktorů. V **Tab. 5** je uveden přehled složení a také pipetovaných objemů jednotlivých komponent pro zmíněné směsi, vztažené na jeden vzorek. Pomocí těchto PCR směsí byla provedena analýza faktorů virulence v případě všech bakteriálních kmenů zahrnutých do této diplomové práce.

Tab. 5 Složení PCR směsí (1, 2, 3) pro jeden vzorek (celkový objem 25 μl)

Reagentie a primery	Směs 1	Směs 2	Směs 3
PCR voda	16,1 μl	16,05 μl	16,05 μl
MgCl ₂	3 μl	3 μl	3 μl
10 \times PCR pufr	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl
dNTP mix	2 μl	2 μl	2 μl
<i>ciaB</i> –F	0,025 μl	–	–
<i>ciaB</i> –R	0,025 μl	–	–
<i>cj1349</i> –F	0,025 μl	–	–
<i>cj1349</i> –R	0,025 μl	–	–
<i>hecA</i> –F	–	0,025 μl	–
<i>hecA</i> –R	–	0,025 μl	–

Tab. 5 – Pokračování Složení PCR směsí (1, 2, 3) pro jeden vzorek (celkový objem 25 μ l)

Reagencie a primery	Směs 1	Směs 2	Směs 3
<i>irgA</i> -F	–	0,025 μ l	–
<i>irgA</i> -R	–	0,025 μ l	–
<i>pldA</i> -F	–	0,025 μ l	–
<i>pldA</i> -R	–	0,025 μ l	–
<i>hecB</i> -F	–	–	0,025 μ l
<i>hecB</i> -R	–	–	0,025 μ l
<i>tlyA</i> -F	–	–	0,025 μ l
<i>tlyA</i> -R	–	–	0,025 μ l
<i>mviN</i> -F	–	–	0,025 μ l
<i>mviN</i> -R	–	–	0,025 μ l
<i>Taq</i> polymeráza	0,3 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l
buněčný lyzát	1 μ l	1 μ l	1 μ l

Takto vzniklé směsi o celkovém objemu 25 μ l byly následně pro každý testovaný bakteriální kmen vloženy do termocykleru s teplotním programem popsáním níže.

Teplotní program termocykleru

úvodní denaturace	95 °C; 4 minuty	
denaturace	95 °C; 30 sekund	} 30 cyklů
annealing	56 °C; 45 sekund	
polymerace	72 °C; 45 sekund	
závěrečná syntéza DNA	72 °C; 5 minut	

2.4.3 Separace a vizualizace PCR produktů

Vzniklé PCR produkty byly separovány elektroforézou v 2% agarózovém gelu, který byl připraven krátkým povařením 1,6 g agarózy s 80 ml 1 \times TBE pufru. Po ochlazení a následném přidání 4 μ l ethidium bromidu byl připravený gel nalit do elektroforetické vany s hřebínky a ponechán ztuhnout (30 minut). Následně byl gel zalit 1 \times TBE pufrem, sloužícím jako elektrolyt. Před samotným dávkováním do gelu bylo vždy 10 μ l PCR produktu promícháno s 5 μ l vkladacího pufru. Do jedné z pozic bylo také dávkováno 5 μ l DNA markeru o velikosti

produktů 200 – 1500 bp. Po proběhnutí elektroforézy (90 minut, 100 V) byla provedena vizualizace pomocí UV transluminátoru při vlnové délce 300 nm a získané záznamy byly zpracovány pomocí softwaru Bio-Capt. V rámci každé PCR reakce byla zahrnuta i pozitivní kontrola (*Arcobacter butzleri* LMG 10828) a negativní kontrola (*Cronobacter sakazakii* CCM 3461).

2.4.4 Optimalizované kroky PCR reakce

Pro detekci genů kódujících virulenční faktory arkobakterů byla základem studie Whiteduck-Léveillé *et al.* (2016), ovšem u některých z dílčích kroků byla nutná další optimalizace. Optimalizovanými kroky byl především správný poměr objemu *m*PCR směsi vs. lyzátu, teplotní program termocykleru a vhodné složení agarózového gelu.

Optimalizace byla provedena v případě kmene *Arcobacter butzleri* LMG 10828, který byl vždy používán jako pozitivní kontrola vzhledem k tomu, že je známo, že u tohoto kmene jsou v genomu přítomny všechny z v této práci sledovaných genů.

2.4.4.1 Optimalizace poměru objemu *m*PCR směsi vs. buněčného lyzátu

V rámci optimalizace bylo testováno, zda je poměr PCR směsi a lyzátu, stanovený dle odborné literatury a předešlých studií, vhodný pro tento experiment. Byl testován poměr 23 μ l PCR směsi a 2 μ l buněčného lyzátu a dále poměr 24 μ l PCR směsi a 1 μ l lyzátu.

2.4.4.2 Optimalizace teplotního programu termocykleru

Pro optimalizaci teplotního programu termocykleru u každé ze tří testovaných směsí byla provedena gradientová PCR tak, aby bylo možné určit, která ze sledovaných teplot annealingu je optimální pro detekci genů kódujících virulenční faktory arkobakterů. Gradientový teplotní program termocykleru pro zjištění vhodné teploty annealingu je popsán níže.

Gradientový teplotní program termocykleru – optimalizace annealing teploty

úvodní denaturace	95 °C; 4 minuty	
denaturace	95 °C; 30 sekund	} 30 cyklů
annealing	51 – 62 °C; 45 sekund	
polymerace	72 °C; 45 sekund	
závěrečná syntéza DNA	72 °C; 5 minut	

2.4.4.3 Optimalizace složení agarózového gelu

Pro správnou separaci a vizualizaci vzniklých *m*PCR produktů byla nutná optimalizace přípravy agarózového gelu. Pro testování byl připraven agarózový gel (1,5% a 2%) smísením vhodného množství agarózy a 1× TBE pufru. Dále bylo optimalizováno barvení gelu, a to s využitím ethidium bormidu, či GelRedu.

2.5 Testování tvorby biofilmu arkobakterů v přítomnosti extraktů z přírodních látek

Pro detekci a kvantifikaci tvorby biofilmu a jeho ovlivnění přírodními extrakty byla u vybraných druhů arkobakterů a bakterií *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953 použita modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách.

2.5.1 Příprava bakteriální suspenze

Z čerstvě nakultivované bakteriální kultury příslušného kmene byla připravena bakteriální suspenze. 2 ml fyziologického roztoku byly inokulovány příslušným kmenem tak, aby vznikla suspenze o denzitě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice (10^8 CFU/ml). Skutečná denzita takto připravené bakteriální suspenze byla vždy kultivačně ověřena na povrchu TSA agaru. Po následné kultivaci (24 h, 30 °C) byly spočítány kolonie, jejichž počet byl v řádu stovek.

2.5.2 Příprava koncentrační řady testovaných extraktů

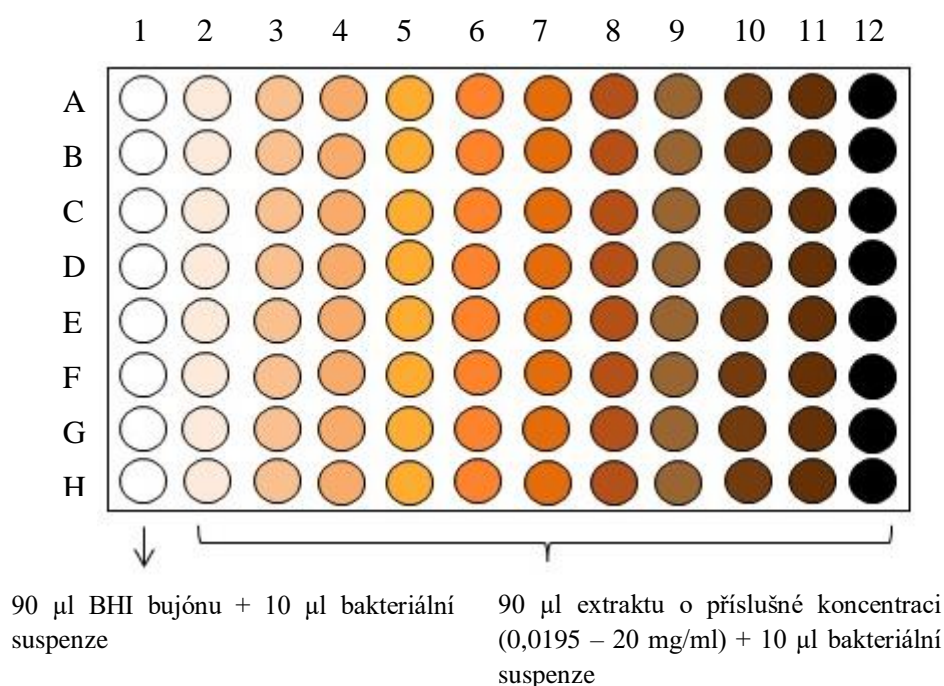
Z již připravených extraktů o koncentraci 100 mg/ml byla dvojkovým ředěním připravena koncentrační řada v rozmezí 20 – 0,0195 mg/ml, a to v BHI bujónu.

2.5.3 Christensenova metoda pro detekci biofilmu arkobakterů

Modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách byla sledována tvorba biofilmu a její ovlivnění přírodními extrakty u arkobakterů. Jednalo se o kmeny *Arcobacter butzleri* LMG 10828, *Arcobacter butzleri* CCUG 30484, *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8, *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13, *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050, *Arcobacter defluvii* LMG 25694, *Arcobacter thereius* LMG 24488 a *Arcobacter lanthieri* LMG 28517. Dále byly v rámci experimentu hodnoceny také bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953, a to jako srovnávací kmeny.

Vlastní postup

Do příslušných jamek plastové mikrotitrační destičky o 96 jamkách s plochým dnem bylo pipetováno po 90 μ l BHI bujónu a po 90 μ l testovaného přírodního extraktu o koncentraci v rozmezí 20 – 0,0195 mg/ml. Poté bylo do všech jamek destičky pipetováno 10 μ l bakteriální suspenze testovaného kmene o buněčné denzitě 10^8 CFU/ml (0,5 stupeň McFarlanda). Schéma rozložení jednotlivých pozic testovaných koncentrací extraktu do mikrotitrační destičky znázorňuje **Obr. 12**.



Obr. 12 Schéma rozložení jednotlivých pozic testovaných koncentrací extraktu do mikrotitrační destičky

Takto připravená mikrotitrační destička uzavřená víčkem byla následně kultivována v plastovém sáčku po dobu 24 hodin při 30 °C za aerobních podmínek. Vždy před a po kultivaci byla destička spektrofotometricky proměřena při 595 nm (A_{595}). Po kultivaci a měření byla následně mikrotitrační destička promyta sterilní destilovanou vodou (3 \times) a sušena (35 °C, 30 min). Fixace vytvořeného biofilmu byla provedena pipetováním 100 μ l roztoku octanu sodného (2%, 15 min, 25 °C) do každé pozice. Dále byl vytvořený biofilm barven 100 μ l krystalové violeti (15 min, 25 °C). Po obarvení byla mikrotitrační destička opět promyta (5 – 7 \times) a sušena (35 °C, 30 min). Následně bylo do každé jamky pipetováno 200 μ l 96% ethanolu (5 min vortexováno), a poté bylo z každé jamky pipetováno 100 μ l do nové mikrotitrační destičky. Na závěr bylo provedeno spektrofotometrické proměření absorbance

zbarveného roztoku krystalové violeti při vlnové délce 595 nm (A_{595}), což je hodnota, která odpovídá množství vytvořeného biofilmu.

Dále byla připravena negativní kontrola, a to pipetováním 100 μ l BHI bujónu do každé z jamek mikrotitrační destičky. Naměřená hodnota tohoto nezaočkovaného média ($A_{595} = 0,1119$) dále sloužila pro výpočet tvorby čistého biofilmu u vybraných bakteriálních kmenů. Stejným způsobem byly proměřeny jednotlivé koncentrace pro čisté extrakty, a takto získané hodnoty byly stejně jako v případě negativní kontroly použity pro zmíněný výpočet.

V rámci mikrotitrační destičky bylo provedeno vždy celkem osm opakování pro všechny experimentální podmínky. K hodnocení výsledků tvorby biofilmu bylo pro jednotlivé koncentrace extraktů stanoveno tzv. „cut of score“ (v případě této studie se jedná o přírůstek absorbance vlivem přítomnosti daného testovaného extraktu), viz **Tab. 6**.

Tab. 6 Výčet extraktů/koncentrací a jejich „cut of score“

X	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A_{595}^A	0,126	0,130	0,124	0,131	0,131	0,129	0,133	0,136	0,141	0,139	0,176
A_{595}^*	0,014	0,018	0,012	0,019	0,019	0,017	0,021	0,024	0,029	0,027	0,064
A_{595}^B	0,113	0,116	0,117	0,128	0,129	0,125	0,122	0,120	0,123	0,134	0,213
A_{595}^*	0,001	0,004	0,005	0,017	0,018	0,013	0,011	0,008	0,011	0,022	0,101
A_{595}^C	0,124	0,129	0,130	0,130	0,131	0,136	0,132	0,134	0,132	0,141	0,267
A_{595}^*	0,012	0,017	0,018	0,019	0,020	0,024	0,020	0,022	0,020	0,029	0,155

Pozn.: ^A medián naměřených absorbancí pro extrakt z hřebíčku v přítomnosti BHI bujónu; ^B medián naměřených absorbancí pro extrakt z badyánu v přítomnosti BHI bujónu; ^C medián naměřených absorbancí pro extrakt z muškátového oříšku v přítomnosti BHI bujónu; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; A_{595}^* – hodnota absorbance čistého extraktu po odečtení hodnoty negativní kontroly ($A_{595} = 0,112$).

Za biofilm pozitivní byly označeny kmeny, jejichž $A_{595} > A_{595, \text{BHI bujónu}}$ a jako biofilm negativní byly označeny kmeny, jejichž $A_{595} \leq A_{595, \text{BHI bujónu}}$. Naměřené hodnoty byly statisticky hodnoceny, a to pomocí programu Excel 2010 MS Office (Microsoft, USA) a Statistica 12 (StatSoft, USA). Extrémní hodnoty byly testovány Deanovým-Dixonovým testem a případné odlehlé hodnoty byly s pravděpodobností 95 % vyloučeny. Ze zbylých hodnot byl určen medián a směrodatná odchylka (StDev). Směrodatné odchylky jsou patrné z **Obr. 20 – 30** a **Příloh 1 – 11**. Byl zde uvažován i možný zdroj chyb, čímž je např. vliv nedostatečného vymytí barviva, či vliv složek přítomného extraktu, což vede k nárůstům naměřených absorbancí. Stejně tak byly vyloučeny vysoké hodnoty absorbancí v porovnání s ostatními naměřenými hodnotami.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Virulenční faktory *Arcobacter* spp.

V rámci této diplomové práce bylo testováno celkem 76 kmenů arkobakterů na přítomnost genů, kódujících virulenční faktory těchto bakterií. Jednalo se o kmeny izolované z klinických materiálů, vod a potravin různého původu. Jako pozitivní kontrola byl použit kmen *Arcobacter butzleri* LMG 10828, jako negativní kontrola byla použita bakterie *Cronobacter sakazakii* CCM 3461. Přehled všech testovaných kmenů je uveden v **Tab. 7**.

Cílovými detekovanými geny byly *cj1349* (659 bp, protein mající schopnost vázat fibronektin), *hecA* (537 bp, filamentární hemaglutinin), *hecB* (528 bp, protein aktivující hemolyzin), *tlyA* (230 bp, hemolyzin), *pldA* (293 bp, fosfolipáza), *mviN* (294 bp, integrální membránový protein), *ciaB* (284 bp, *Campylobacter* invazivní antigen B) a *irgA* (437 bp, vnější membránový protein).

Pro testování byla využita metoda multiplexní polymerázová řetězová reakce (*mPCR*), vyvinutá a popsaná autory Whiteduck-Léveillé *et al.* (2016). Vzhledem k tomu, že metoda v našich podmínkách neposkytovala zcela správnou detekci jednotlivých genů a separaci PCR produktů, byla nutná další optimalizace.

3.1.1 Optimalizace *mPCR* pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů

Optimalizace multiplex PCR spočívala v nalezení správného poměru objemu *mPCR* směsi vs. buněčného lyzátu, zjištění optimálního teplotního programu termocyklieru a v nalezení vhodného složení agarázového gelu pro separaci PCR produktů.

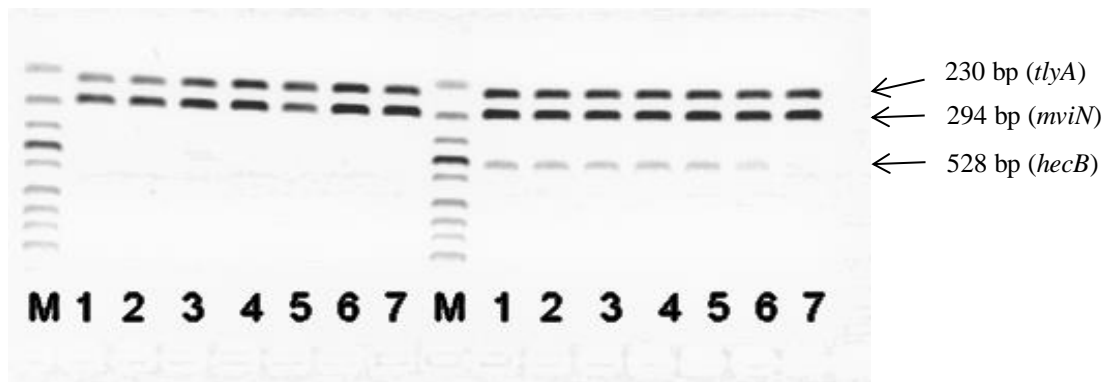
Výsledky zjištění optimálního poměru reakční *mPCR* směsi a buněčného lyzátu znázorňují **Obr. 13 – 15**. Dále obrázky znázorňují zjištění optimální teploty pro proces annealingu, čehož bylo docíleno pomocí gradientové PCR.



Obr. 13 Gradientová mPCR pro rod *Arcobacter* (*Arcobacter butzleri* LMG 10828; mPCR směs 1 vlevo; mPCR směs 2 vpravo)

1 – 53 °C; 2 – 54 °C; 3 – 55 °C; 4 – 56 °C; 5 – 57 °C; 6 – 58 °C; 7 – 59 °C; M – DNA marker 200 – 1500 bp
Reakční roztok obsahoval 24 μ l mPCR směsi a 1 μ l buněčného lyzátu

Na elektroforetickém záznamu multiplex PCR pro reakční směs 1 (**Obr. 13**) jsou patrné odezvy při všech sledovaných teplotách kromě teplot 53 °C a 54 °C, kde jsou oproti ostatním teplotám patrné slabší odezvy u genu *cj1349* (659 bp). Na stejném obrázku elektroforetického záznamu pro směs 2 je patrná slabší odezva u genu *hecA* (537 bp), a to pro teploty 53 °C a 58 °C. U teploty 59 °C tento produkt zcela chybí.



Obr. 14 Gradientová mPCR pro rod *Arcobacter* (*Arcobacter butzleri* LMG 10828) a vliv složení reakční směsi (mPCR směs 3)

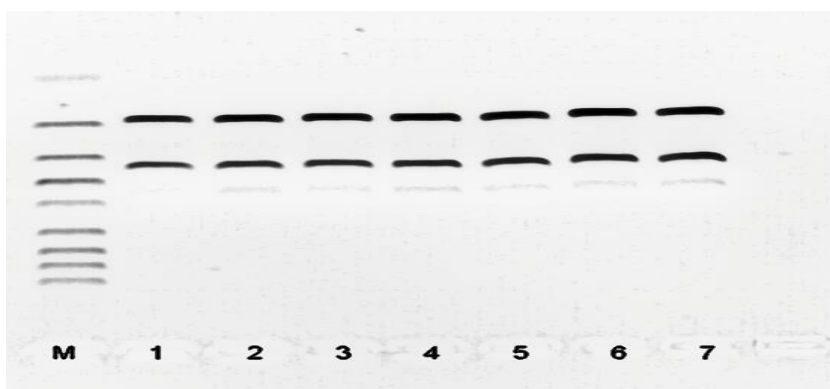
1 – 53 °C; 2 – 54 °C; 3 – 55 °C; 4 – 56 °C; 5 – 57 °C; 6 – 58 °C; 7 – 59 °C; M – DNA marker 200 – 1500 bp.
23 μ l PCR směsi + 2 μ l buněčného lyzátu (vlevo) vs. 24 μ l PCR směsi + 1 μ l buněčného lyzátu (vpravo)

Jak je znázorněno v pravé části **Obr. 14**, u reakční směsi 3 byla při teplotách 58 °C – 59 °C zaznamenána oproti ostatním testovaným teplotám taktéž velice slabá odezva. Na základě výše uvedených výsledků, byla za vhodnou teplotu annealingu vybrána jednotná teplota 56 °C, a to pro všechny analýzy. Tato teplota byla zvolena také autory Whiteduck-Léveillé *et al.* (2016), dle jejichž studie byl experiment sestaven. Lze tedy konstatovat, že na

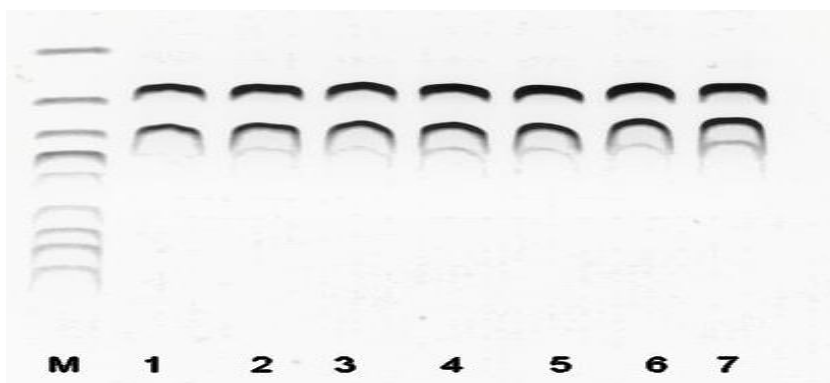
základě námi provedené optimalizace teplotního programu termocyklieru byly dodrženy stejné teplotní podmínky, jako ve své studii uvádějí zmínění autoři.

Výsledky optimalizace poměru objemu reakční směsi vs. buněčného lyzátu znázorňuje taktéž **Obr. 14**. Z elektroforetického záznamu je patrné, že při použití 23 μ l směsi a 2 μ l lyzátu byla na gelu zaznamenána pouze velmi slabá odezva pro dané teploty. Proto byla připravena také varianta 24 μ l směsi a 1 μ l lyzátu, která se u všech směsí (1, 2, 3) ukázala být vhodnou pro další testování.

Důležitým krokem optimalizace bylo vhodné složení agarózového gelu (2%, 1,5%) a jeho způsob barvení, a to buď ethidium bormidem či GelRedem. Výsledky jsou uvedeny na příkladu testování PCR směsi 3. Z **Obr. 15** je patrné, že pro další experimenty byl zvolen 2% agarózový gel barvený ethidium bormidem, kde oproti 2% gelu barveném GelRedem (**Obr. 16**) došlo k viditelné separaci daných produktů. Při použití 1,5% agarózového gelu došlo k separaci pouze DNA markeru (záznam není v práci uveden). Všechny uvedené agarózové gely byly elektroforeticky separovány za jednotných podmínek 90 minut při napětí 100 V. Postup přípravy těchto gelů je uveden v kapitole 2.1.3 *Pracovní roztoky*.



Obr. 15 Gradientová *m*PCR pro rod *Arcobacter* (*Arcobacter butzleri* LMG 10828; *m*PCR směs 2), 2% agarózový gel barvený ethidium bromidem
1 – 53 °C; 2 – 54 °C; 3 – 55 °C; 4 – 56 °C; 5 – 57 °C; 6 – 58 °C; 7 – 59 °C; M – DNA marker 200 – 1500 bp

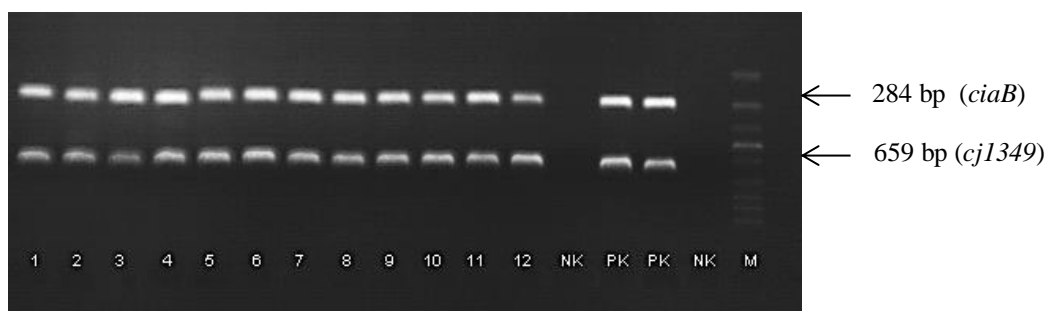


Obr. 16 Gradientová *mPCR* pro rod *Arcobacter* (*Arcobacter butzleri* LMG 10828; *mPCR* směs 2), 2% agarózový gel barvený GelRedem
 1 – 53 °C; 2 – 54 °C; 3 – 55 °C; 4 – 56 °C; 5 – 57 °C; 6 – 58 °C; 7 – 59 °C; M – DNA marker 200 – 1500 bp

3.1.2 Detekce virulenčních faktorů bakterií rodu *Arcobacter* optimalizovanou metodou

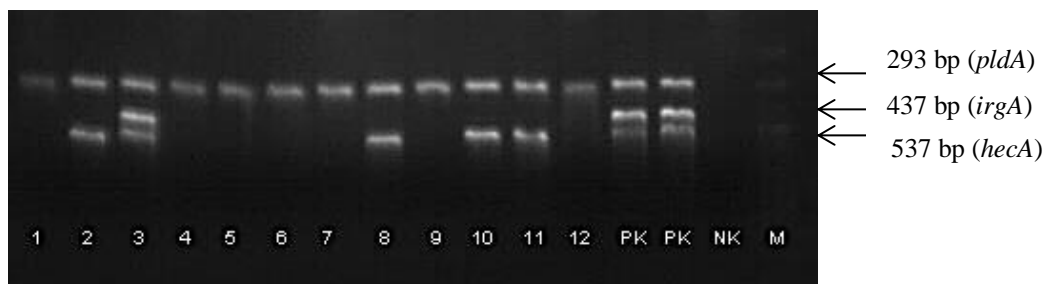
Metoda multiplexní polymerázové řetězové reakce vyvinutá autory Whiteduck-Léveillé *et al.* (2016), byla aplikována na detekci virulentně asociovaných genů bakterií rodu *Arcobacter*. Výchozí podmínky, které byly převzaty z dřívější studie, byly dále optimalizovány, viz kapitola 3.1.1 *Optimalizace mPCR pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů*. V rámci této diplomové práce bylo na přítomnost virulenčních faktorů molekulárně biologickou metodou otestováno celkem 57 kmenů *Arcobacter butzleri*, 18 kmenů *Arcobacter cryaerophilus* a 1 kmen *Arcobacter skirrowii*.

Příklady výsledků elektroforetických záznamů pro *mPCR* směs 1 – 3, které jsou viditelné na **Obr. 17 – 19**, znázorňují způsob detekce virulenčních faktorů vybraných testovaných kmenů arkobakterů.



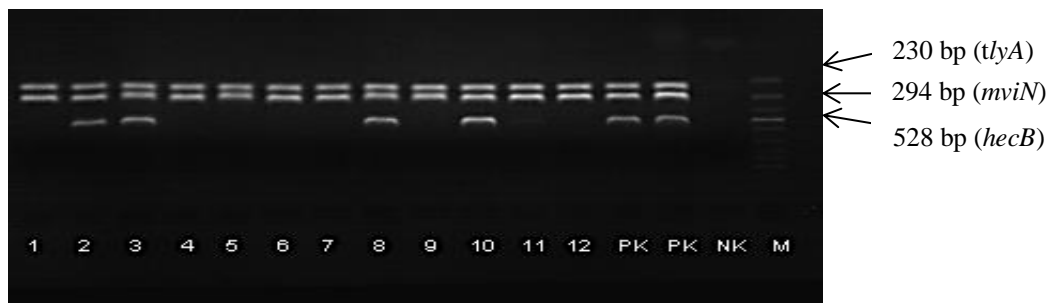
Obr. 17 Elektroforetický záznam *mPCR* pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, (*mPCR* směs 1)

1 – Ab. UPa 2013/38; 2 – Ab. UPa 2013/39; 3 – Ab. UPa 2013/40; 4 – Ab. UPa 2013/41; 5 – Ab. UPa 2013/42; 6 – Ab. UPa 2013/43; 7 – Ab. UPa 2013/44; 8 – 2013/45; 9 – Ab. UPa 2013/46; 10 – Ab. UPa 2013/47; 11 – Ab. UPa 2013/48; 12 – Ab. UPa 2013/49; PK – pozitivní kontrola (*Arcobacter butzleri* LMG 10828); NK – negativní kontrola (*Cronobacter sakazakii* CCM 3461); M – DNA marker 200 – 1500 bp



Obr. 18 Elektroforetický záznam *mPCR* pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, (*mPCR* směs 2)

1 – *Ab. UPa 2013/38*; 2 – *Ab. UPa 2013/39*; 3 – *Ab. UPa 2013/40*; 4 – *Ab. UPa 2013/41*; 5 – *Ab. UPa 2013/42*; 6 – *Ab. UPa 2013/43*; 7 – *Ab. UPa 2013/44*; 8 – 2013/45; 9 – *Ab. UPa 2013/46*; 10 – *Ab. UPa 2013/47*; 11 – *Ab. UPa 2013/48*; 12 – *Ab. UPa 2013/49*; PK – pozitivní kontrola (*Arcobacter butzleri* LMG 10828); NK – negativní kontrola (*Cronobacter sakazakii* CCM 3461); M – DNA marker 200 – 1500 bp



Obr. 19 Elektroforetický záznam *mPCR* pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, (*mPCR* směs 3)

1 – *Ab. UPa 2013/38*; 2 – *Ab. UPa 2013/39*; 3 – *Ab. UPa 2013/40*; 4 – *Ab. UPa 2013/41*; 5 – *Ab. UPa 2013/42*; 6 – *Ab. UPa 2013/43*; 7 – *Ab. UPa 2013/44*; 8 – 2013/45; 9 – *Ab. UPa 2013/46*; 10 – *Ab. UPa 2013/47*; 11 – *Ab. UPa 2013/48*; 12 – *Ab. UPa 2013/49*; PK – pozitivní kontrola (*Arcobacter butzleri* LMG 10828); NK – negativní kontrola (*Cronobacter sakazakii* CCM 3461); M – DNA marker 200 – 1500 bp

Takovýmto způsobem byly vyhodnoceny elektroforetické záznamy všech 76 testovaných kmenů arkobakterů. Celkový přehled výsledků je uveden v **Tab. 7**.

Tab. 7 Detekce virulenčních faktorů *Arcobacter* spp. molekulárně-biologickou mPCR reakcí – přehled výsledků

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Geny virulence							
		<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>pldA</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>tlyA</i>	<i>mviN</i>	<i>hecB</i>
<i>A. butzleri</i>	LMG 10828 ^{PK}	+	+	+	+	+	+	+	+
	CCUG 30484	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2012/3 ^A	+	+	+	-	-	+	+	+
	UPa 2012/4 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/3 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/4 ^B	+	+	+	-	+	+	+	+
	UPa 2013/5 ^K	+	+	+	+	+	+	+	+
	UPa 2013/7 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/8 ^A	+	+	+	-	+	+	+	+
	UPa 2013/10 ^A	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/11 ^A	+	+	+	+	-	+	+	+
	UPa 2013/15 ^A	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/18 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/19 ^B	+	+	+	-	-	+	+	+
	UPa 2013/20 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/21 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/22 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/23 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/24 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/25 ^C	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/26 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/30 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/31 ^B	+	+	+	-	-	+	+	+
	UPa 2013/32 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/33 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/36 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+
	UPa 2013/37 ^A	+	+	+	-	+	+	+	+
	UPa 2013/38 ^A	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/39 ^A	+	+	+	+	-	+	+	+
	UPa 2013/40 ^B	+	+	+	+	+	+	+	+
	UPa 2013/41 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/42 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/43 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/44 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/45 ^A	+	+	+	-	+	+	+	+
	UPa 2013/46 ^A	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2013/47 ^A	+	+	+	-	+	+	+	+
	UPa 2013/48 ^A	+	+	+	-	+	+	+	-
	UPa 2013/49 ^A	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2014/51 ^B	+	+	+	-	+	+	+	-
	UPa 2014/54 ^B	+	-	-	-	-	+	-	-
	UPa 2014/57 ^B	+	+	+	+	-	+	+	-
	UPa 2015/1 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2015/2 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2015/5 ^A	+	+	+	+	+	+	+	+
	UPa 2015/6 ^B	+	+	+	+	-	+	+	+
	UPa 2015/7 ^B	+	-	+	-	+	+	+	-
	UPa 2015/9 ^B	+	-	+	-	+	+	+	-
	UPa 2015/11 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2015/12 ^B	-	-	+	-	+	-	-	-
	UPa 2015/13 ^B	+	+	+	-	-	+	+	-
	UPa 2015/14 ^B	+	+	+	-	+	+	+	-
	UPa 2015/15 ^B	+	+	+	-	+	+	+	-
	UPa 2015/16 ^B	+	+	+	-	+	+	+	+
	UPa 2015/18 ^B	+	+	+	-	+	+	+	+

Tab. 7 – Pokračování Detekce virulenních faktorů *Arcobacter* spp. molekulárně-biologickou *m*PCR reakcí – přehled výsledků

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Geny virulence							
		<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>pldA</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>tlyA</i>	<i>mviN</i>	<i>hecB</i>
<i>A. butzleri</i>	UPa 2015/19 ^C	+	+	+	–	–	+	+	+
	UPa 2015/20 ^C	+	+	+	–	+	+	+	–
<i>A. cryaerophilus</i>	CCM 3934	+	–	–	–	–	–	+	–
	CCM 7050	+	–	–	–	–	–	+	–
	UPa 2012/1 ^A	+	–	–	–	–	+	+	–
	UPa 2012/2 ^A	+	–	–	–	–	+	+	–
	UPa 2013/1 ^B	+	–	–	–	–	+	+	–
	UPa 2013/12 ^A	+	–	–	–	–	+	+	–
	UPa 2013/13 ^A	+	–	+	–	–	+	+	–
	UPa 2013/14 ^A	+	–	–	–	–	–	+	–
	UPa 2013/16 ^A	+	–	–	–	–	–	+	–
	UPa 2013/17 ^B	+	–	–	–	–	–	+	–
	UPa 2013/28 ^B	+	–	–	–	–	–	+	–
	UPa 2013/29 ^B	+	–	–	–	–	–	+	–
	UPa 2013/35 ^A	+	–	+	–	–	–	+	–
	UPa 2014/58 ^B	–	–	–	–	–	–	–	–
	UPa 2014/58a ^B	+	–	–	–	–	–	+	–
UPa 2014/58d ^B	+	–	–	–	–	–	+	–	
UPa 2014/59 ^B	+	–	–	–	–	+	–	–	
<i>A. skirrowii</i>	LMG 6621	+	+	–	–	+	–	+	+
<i>C. sakazakii</i>	CCM 3461 ^{NK}	–	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: UPa – interní sbírka mikroorganismů Univerzity Pardubice; LMG – Sběrka mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii; CCM – Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně; CCUG – Sběrka mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku; kmen pozitivní na přítomnost virulenního faktoru (+); kmen negativní na přítomnost virulenního faktoru (–); ^A vzorek izolovaný z vody; ^B vzorek izolovaný z potravin; ^C klinický izolát; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola; A. – *Arcobacter*; C. – *Cronobacter*

Optimalizovanou metodou *m*PCR pro detekci virulentně asociovaných genů arko-bakterů bylo otestováno celkem 76 kmenů těchto bakterií. Z celkového počtu bylo 56 kmenů *Arcobacter butzleri*, 18 kmenů *Arcobacter cryaerophilus* a 1 kmen *Arcobacter skirrowii*. Pozitivní kontrola *Arcobacter butzleri* LMG 10828 byla zvolena na základě studií autorů Doudah *et al.* (2011) a Tabatabaei *et al.* (2014) z důvodu, že tento kmen má prokázaný výskyt všech testovaných genů ve svém genomu, a je tedy vhodným kmenem pro optimalizaci a zhodnocení správného průběhu reakce.

Na základě výsledků, které shrnuje **Tab. 7** lze říci, že z celkového počtu 76 testovaných kmenů byl u 96,1 % kmenů detekován gen *ciaB*, u 71,1 % gen *cj1349*, u 76,1 % gen *pldA*, u 11,8 % gen *irgA*, u 26,3 % gen *hecA*, u 82,9 % gen *tlyA*, u 94,7 % gen *mviN* a u 26,3 % testovaných kmenů byl detekován gen *hecB*. Všechny tyto uvedené geny jsou prokázány virulenními faktory u těchto bakterií.

Zjištění, že geny *ciaB* a *mviN* byly detekovány u nejvyššího počtu kmenů potvrzuje také studie, kterou se zabývali autoři Tabatabaei *et al.* (2014). Ti publikovali, že u všech testovaných kmenů *A. butzleri* (113) byly tyto geny detekovány. Vysoké procentuální zastoupení těchto genů prokázali také u kmenů *A. cryaerophilus*, což se shoduje s výše uvedenými výsledky diplomové práce, tj. z celkového počtu 18 testovaných kmenů tohoto druhu byl gen *ciaB* detekován u 16 kmenů (88,9 %) a u 15 kmenů gen *mviN* (83,3 %). Naopak u žádného z kmenů zmíněného rodu nebyly detekovány geny *cj1349*, *pIdA*, *irgA* a *hecA*. Gen *tlyA*, který byl zde prokázán u 38,9 % kmenů, byl ve studii autorů Tabatabaei *et al.* (2014) detekován u 37,5 % kmenů, což také potvrzuje správnost zde uváděných výsledků.

Geny, které byly celkově detekovány s nejnižším procentuálním zastoupením, tedy *irgA* (11,8 %), *hecA* (26,3 %) a *hecB* (26,3 %) byly zároveň geny detekované v nejnižší míře ve studii autorů Doudah *et al.* (2011), což tedy potvrzuje shodu mezi našimi a dříve publikovanými výsledky.

Jediným kmenem druhu *A. skirrowii* byl na přítomnost virulentně asociovaných genů testován kmen *A. skirrowii* LMG 6621. Výsledky získané u tohoto kmene jsou taktéž uvedeny v tabulce výše. Mezi detekovanými geny byly *ciaB*, *cj1349*, *hecA* a *mviN*, tedy geny, které měly nejvyšší prevalenci v genomech všech testovaných arko-bakterů v rámci této práce. Dále byl u tohoto kmene detekován gen *hecB*, který byl v rámci celé studie detekován jen u 26,3 % kmenů. Jelikož se jedná o jediný testovaný kmen tohoto rodu, není zde možné statistické zhodnocení.

Z výsledků diplomové práce dále vyplývá, že pouze u čtyř z celkového počtu 76 testovaných kmenů, tedy u 5,2 %, bylo detekováno všech 8 virulentně asociovaných genů. Jednalo se o zástupce druhu *Arcobacter butzleri*, a to kmeny *A. butzleri* UPa 2013/5, *A. butzleri* UPa 2013/36, *A. butzleri* UPa 2013/40 a *A. butzleri* UPa 2015/5. Tomuto zjištění se přiklánějí výsledky studií autorů Doudah *et al.* (2011) a Tabatabaei *et al.* (2014), kde z testovaných druhů arko-bakterů byla pouze v případě druhu *A. butzleri* detekována přítomnost všech testovaných genů. Naopak, ani jeden z virulentně asociovaných genů nebyl v rámci diplomové práce detekován u kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2014/58, což tedy představuje pouhé 1,3 % ze všech testovaných kmenů.

Z hlediska původu vzorku bylo z celkového počtu 71 testovaných kmenů arko-bakterů, patřících do interní sbírky Univerzity Pardubice, izolováno celkem 22 kmenů z vodního prostředí, 45 kmenů z potravin různého původu a 4 kmeny byly izolovány z klinických materiálů. U kmenů izolovaných z vodního prostředí byly ve 100 % případů detekovány geny

ciaB a *mviN*. Naopak u nejnižšího počtu kmenů (18 %) byl detekován gen *irgA*. Stejně také u kmenů izolovaných z potravin byly s nejvyšším procentuálním zastoupením detekovány geny *ciaB* (93,3 %) a *mviN* (91,1 %), naopak u nejméně kmenů byl detekován gen *irgA* (6,7 %). U všech kmenů pocházejících z klinických materiálů byly detekovány geny *ciaB*, *cj1349*, *pldA*, *tlyA* a *mviN*, u 50 % případů geny *hecA* a *hecB* a u 25 % gen *irgA*. Na základě uvedených výsledků ovšem nelze jednoznačně říci, že původ testovaných kmenů má vliv na uvedené výsledky.

Vlivem původu vzorků na druhu a množství detekovaných virulentně asociovaných genů arkoobakterů se ve své studii zabývali také autoři Doudah *et al.* (2011). Z důvodu vyššího celkového počtu kmenů zařazených ve studii (182 kmenů *A. butzleri*, 99 kmenů *A. cryaerophilus* a 38 kmenů *A. skirrowii*), sledovali také druhovou závislost získaných výsledků na původu vzorků. Například zjistili, že v případě druhu *A. butzleri* byl gen *hecB* ve vysoké míře detekován jak u kmenů izolovaných z dobytka, tak také z lidských izolátů. V případě druhu *A. cryaerophilus* byl gen *hecB* detekován častěji u kmenů z lidských izolátů, na rozdíl od izolátů pocházejících z dobytka, prasat a drůbeže, kde byl tento gen detekován minimálně.

Některé virulentně asociované geny arkoobakterů, jejichž detekce byla mimo jiné předmětem této diplomové práce, byly s jistou podobností nalezeny také v genomu jiných bakteriálních druhů, jak uvádějí mnohé odborné studie (Kalendar, 2007; Konkel *et al.*, 1999; Inoue, 2008). Například homolog genu *cj1349* byl detekován s více než 60% podobností u bakterií *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* a *Campylobacter curvus* (Konkel *et al.*, 2005; Monteville *et al.*, 2003). Homology genů *ciaB*, *mviN* a *tlyA* byly detekovány u bakterie *Campylobacter jejuni*, což dokazuje studie autorů Miller *et al.* (2007).

Dále gen *mviN* byl ve studii autorů Inoue *et al.* (2008) detekován s podobností 53 % také u bakterie *Escherichia coli*. Jiní autoři, jako například Istivan *et al.* (2006) u této bakterie detekovali homolog genu *pldA*, který byl v rámci diplomové práce detekovaný u 76 % testovaných arkoobakterů.

Na základě výsledků, kterých bylo v této práci dosaženo, lze tedy říci, že geny, které zde byly detekovány s nejvyšším procentuálním zastoupením (*ciaB*, *cj1349*, *mviN*, *tlyA*, *pldA*) byly v rámci odborných studií detekovány nejen u bakterií rodu *Arcobacter*, ale přítomnost homologů těchto genů byla zjištěna také u taxonomicky příbuzných kampylobakterů, či dalších Gram-negativních bakterií.

3.2 Testování tvorby biofilmu arkobakterů v přítomnosti extraktů z přírodních látek

Tato diplomová práce se dále zabývala testováním schopnosti tvorby biofilmu *Arcobacter* spp. v přítomnosti přírodních extraktů. Pro testování bylo vybráno celkem 9 kmenů těchto bakterií. Tyto kmeny byly vybrány vzhledem k jejich vyšší tvorbě biofilmu v prostředí i bez přítomnosti přírodních extraktů, a to jak na základě provedených experimentů, tak také z dostupné literatury. Dále byly pro porovnání biofilmové aktivity vybrány bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Escherichia coli* CCM 3954. Přehled všech použitých kmenů bakterií rodu *Arcobacter* vybraných pro zmíněné testování je uveden níže. Metodou vhodnou pro testování schopnosti tvorby biofilmu a jeho ovlivnění byla zvolena Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách.

Arcobacter thereius LMG 24488

Arcobacter butzleri LMG 10828

Arcobacter lanthieri LMG 28517

Arcobacter butzleri CCUG 30484

Arcobacter defluvii LMG 25694

Arcobacter cryaerophilus CCM 7050

Arcobacter skirrowii LMG 6621

Arcobacter cryaerophilus UPa 2013/13

Arcobacter butzleri UPa 2013/8

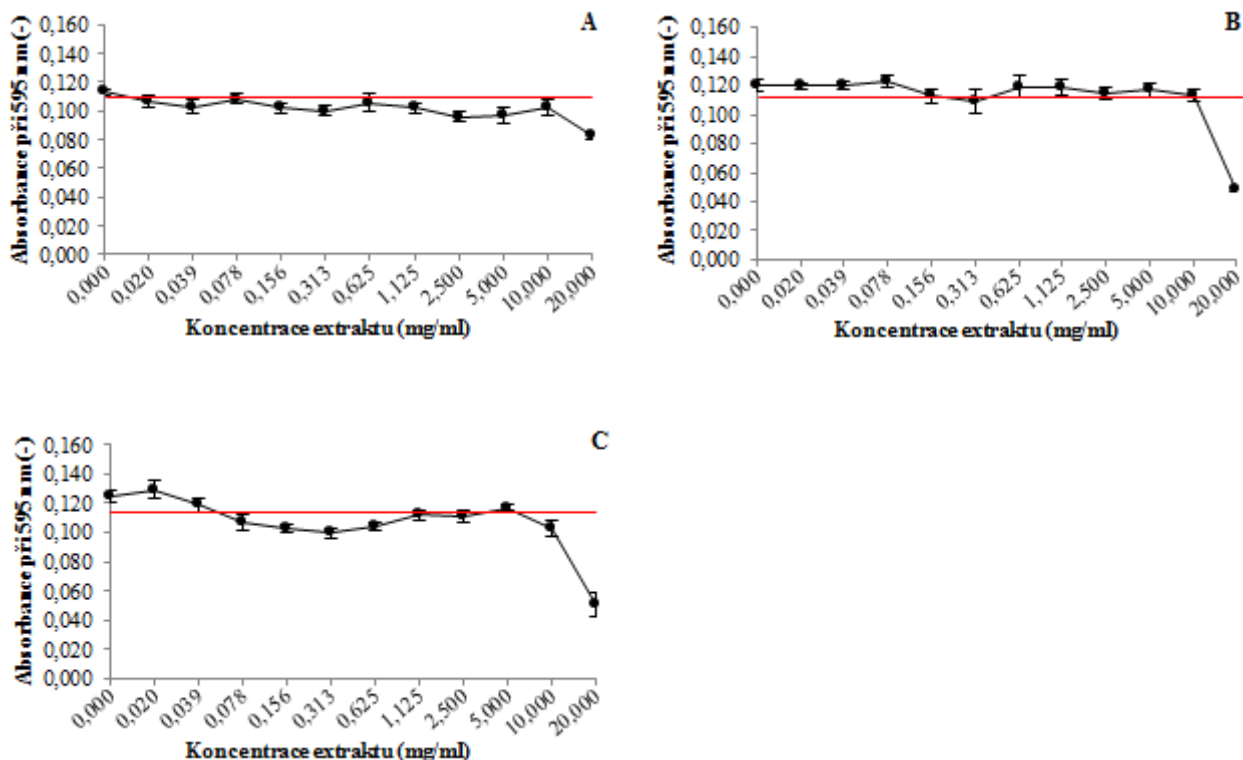
Pro testování byly zvoleny extrakty z vybraných druhů koření, a to z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku. Tato koření byla zvolena na základě dostupných odborných studií, jejichž předmětem byla právě jejich antibakteriální účinnost. Postup přípravy těchto extraktů a další potřebné informace viz kapitola 2.3 Příprava přírodních extraktů s antimikrobiálním účinkem.

3.2.1 Výsledky testování schopnosti tvorby biofilmu u *Arcobacter* spp. a jejího ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku

Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách byla u 9 kmenů testována schopnost tvorby biofilmu a možnost jejího ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku. Jednotlivá naměřená data jsou souhrnně uvedena v tabulkách (viz kapitola 6 Přílohy). Grafické znázornění závislosti naměřených hodnot absorbancí, které korespondují s množstvím vytvořeného biofilmu testovaných kmenů na jednotlivých koncentracích daného extraktu, zobrazují Obr. 20 – 30. Z hlediska přehlednosti jsou výsledky prezentovány dle jednotlivých testovaných kmenů.

Tvorba biofilmu *Arcobacter thereius* LMG 24488

Na **Obr. 20** jsou uvedeny výsledky tvorby biofilmu u kmene *A. thereius* LMG 24488 v přítomnosti jednotlivých extraktů.



Obr. 20 Tvorba biofilmu kmene *A. thereius* LMG 24488 v přítomnosti přírodních extraktů

A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Jak je z obrázku výše patrné, naměřená hodnota absorbance v nulovém bodě osy x, tedy hodnota korespondující s množstvím vytvořeného neovlivněného biofilmu, se u tohoto kmene pohybuje okolo hodnoty $A_{595} = 0,120$. Jedná se tedy o hodnotu mírně nad červenou linií, což potvrzuje, že je tento kmen biofilm pozitivní.

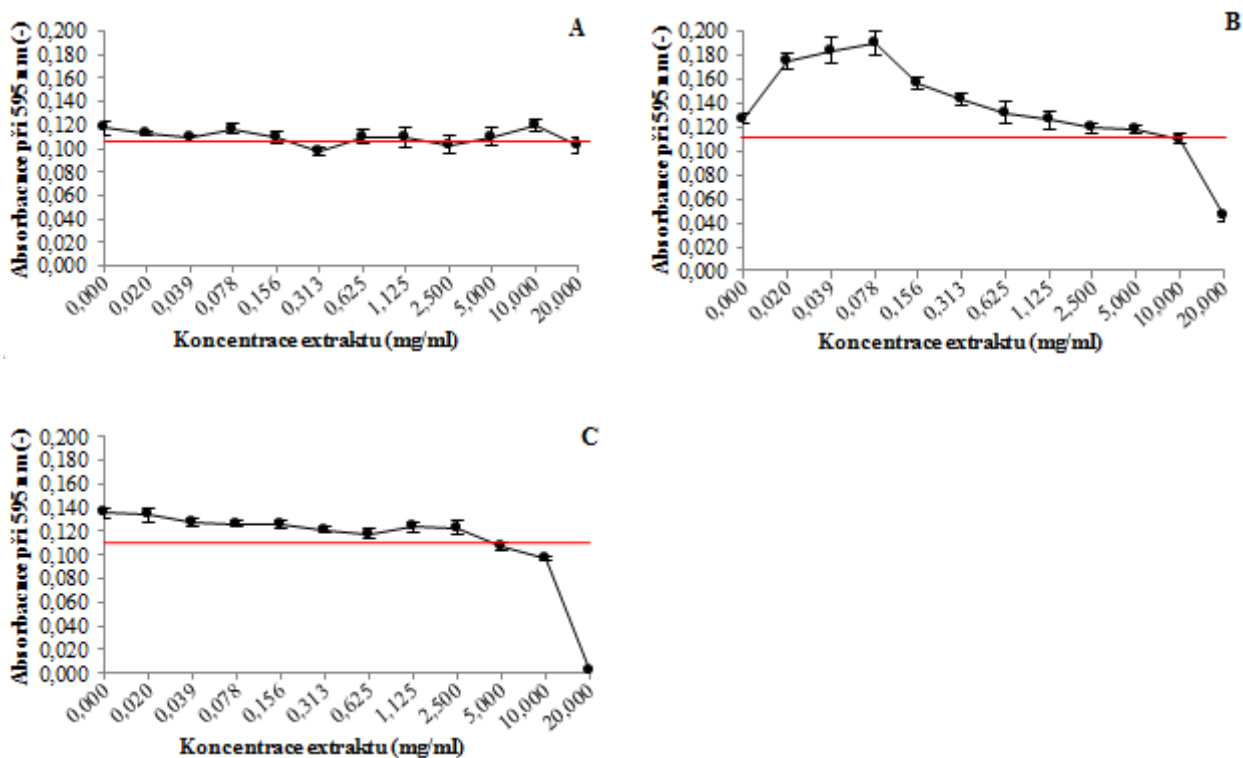
Trend dosažených výsledků je u kmene *A. thereius* LMG 24488, s ohledem na tolerovanou chybu měření, velmi podobný ve všech případech testovaných extraktů. V případě hřebíčkové extraktu (**Obr. 20A**) je patrný pokles tvorby biofilmu pod hodnotu absorbance 0,112 již při koncentraci extraktu 0,020 mg/ml. To tedy dokládá, že kmen není schopen tvorby biofilmu již při nejnižší testované koncentraci tohoto extraktu. Dále z grafu na **Obr. 20A** vyplývá, že s koncentrací 20 mg/ml výrazně klesá také veškerá aktivita tohoto kmene.

Oproti tomu, z grafického znázornění tvorby biofilmu v přítomnosti extraktu z badyánu je patrné (**Obr. 20B**), že kmen je schopen odolávat koncentracím tohoto extraktu v rozmezí 0,020 – 10 mg/ml, a tím tedy biofilm za daných podmínek tvořit.

Průběh grafického znázornění tvorby biofilmu v přítomnosti extraktu z muškátového oříšku (**Obr. 20C**) znázorňuje, že kmen *A. thereius* LMG 24488 tvoří biofilm pouze v přítomnosti dvou nejnižších koncentrací. Dále je z grafu patrné, že kmen již není schopen vyšším koncentracím odolávat a biofilm tedy netvoří. Stejně jako v případě extraktů z hřebíčku a badyánu, i zde je patrný rapidní pokles biofilmové aktivity u nejvyšší z testovaných koncentrací.

Tvorba biofilmu *Arcobacter lanthieri* LMG 28517

Výsledky tvorby biofilmu u kmene *A. lanthieri* LMG 28517 v přítomnosti testovaných extraktů znázorňuje **Obr. 21**.



Obr. 21 Tvorba biofilmu kmene *A. lanthieri* LMG 28517 v přítomnosti přírodních extraktů

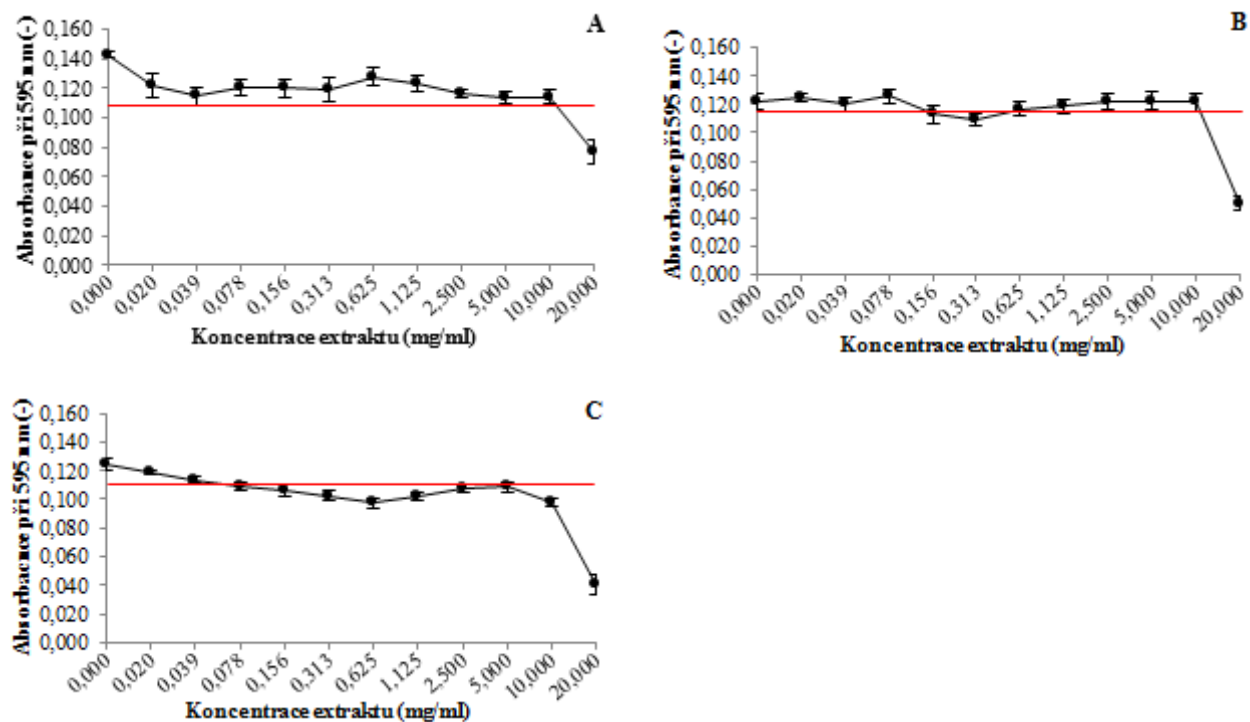
A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorpance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Stejně jako v předešlém případě se jedná o kmen schopný tvorby biofilmu, což dokládá hodnota v bodě s nulovou koncentrací, která je opět vyšší než hodnota, kterou

znázorňuje červená linie. Průběh grafu na **Obr. 21A**, kde je znázorněna závislost tvorby biofilmu tohoto kmene na koncentraci hřebíčkového extraktu, je velmi podobný trendu dosažených výsledků u kmene *A. thereius* LMG 24488. Za povšimnutí ovšem stojí grafické znázornění biofilmové aktivity kmene *A. lanthieri* LMG 28517 v přítomnosti badyánového extraktu (**Obr. 21B**). Zde je patrná masivní produkce biofilmu u koncentrací 0,020 – 0,078 mg/ml, což naznačuje, že zvýšená tvorba biofilmu je pravděpodobně šokovou reakcí kmene na přítomnost daného extraktu. Dále můžeme z grafu vyčíst, že s postupně zvyšující se koncentrací extraktu dochází k poklesu biofilmové aktivity až na hodnotu absorbance okolo 0,112. V případě testování extraktu z muškátového oříšku (**Obr. 21C**) dochází k postupnému klesání tvorby biofilmu již od počáteční hodnoty. Společným znakem u všech tří testovaných extraktů je opět významný pokles biofilmové aktivity *A. lanthieri* LMG 28517 v bodě s nejvyšší koncentrací.

Tvorba biofilmu *Arcobacter defluvii* LMG 25694

Dalším z kmenů, který je v rámci tohoto experimentu testován, je kmen *Arcobacter defluvii* LMG 25694.



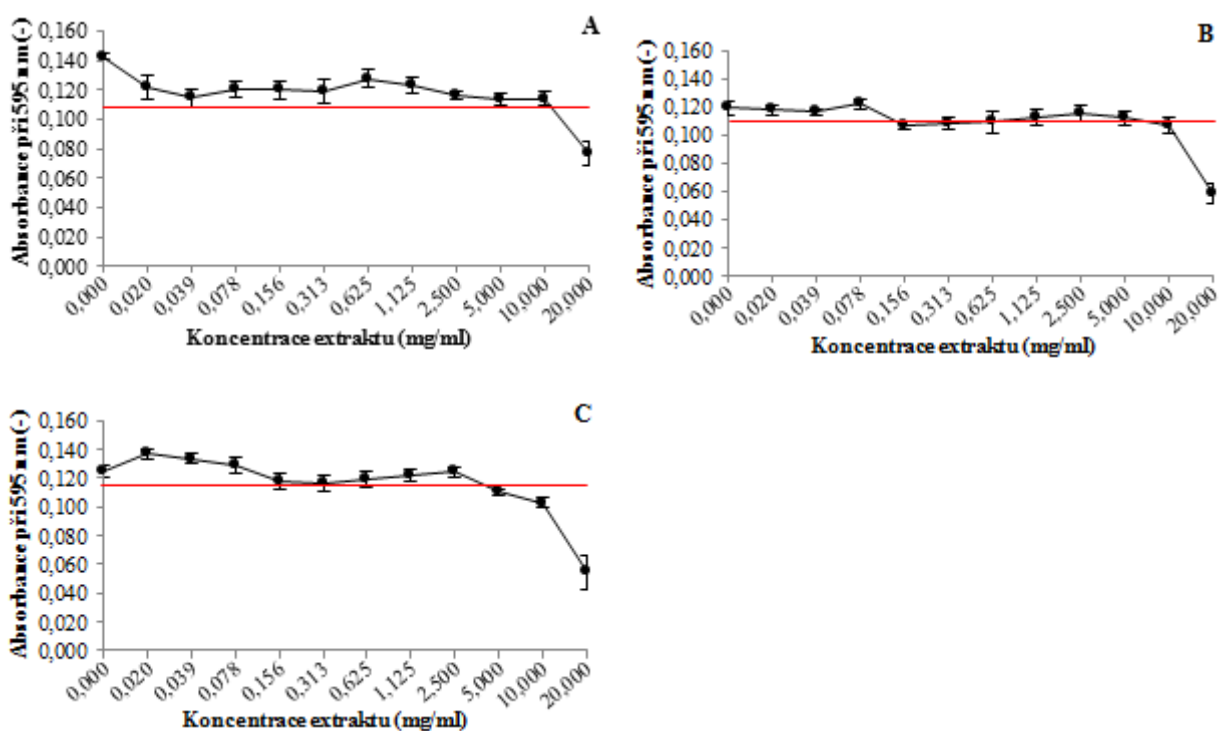
Obr. 22 Tvorba biofilmu kmene *A. defluvii* LMG 25694 v přítomnosti přírodních extraktů

A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Jak z **Obr. 22** vyplývá, jedná se o kmen, jehož biofilmová aktivita není příliš vysoká. V případě extraktu z hřebíčku (**Obr. 22A**) se hodnoty pro jednotlivé koncentrace pohybují těsně nad úrovní nulové linie. Pouze u koncentrace extraktu 20 mg/ml je zřejmý nápadný pokles měřené absorbance. U extraktu z badyánu (**Obr. 22B**) není patrný zásadní výkyv grafického průběhu naměřených hodnot, ovšem pokles u nejvyšší koncentrace byl opět zaznamenán. V případě testování extraktu z muškátového oříšku (**Obr. 22C**) bylo zjištěno, že daný kmen není schopen tvorby biofilmu již při koncentracích od 0,039 mg/ml, a lze také komentovat velmi podobný grafický průběh, stejně jako u dvou předešlých extraktů.

Tvorba biofilmu *Arcobacter skirrowii* LMG 6621

Dále byl testován kmen *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, jehož výsledky biofilmové aktivity zaznamenává **Obr. 23**.



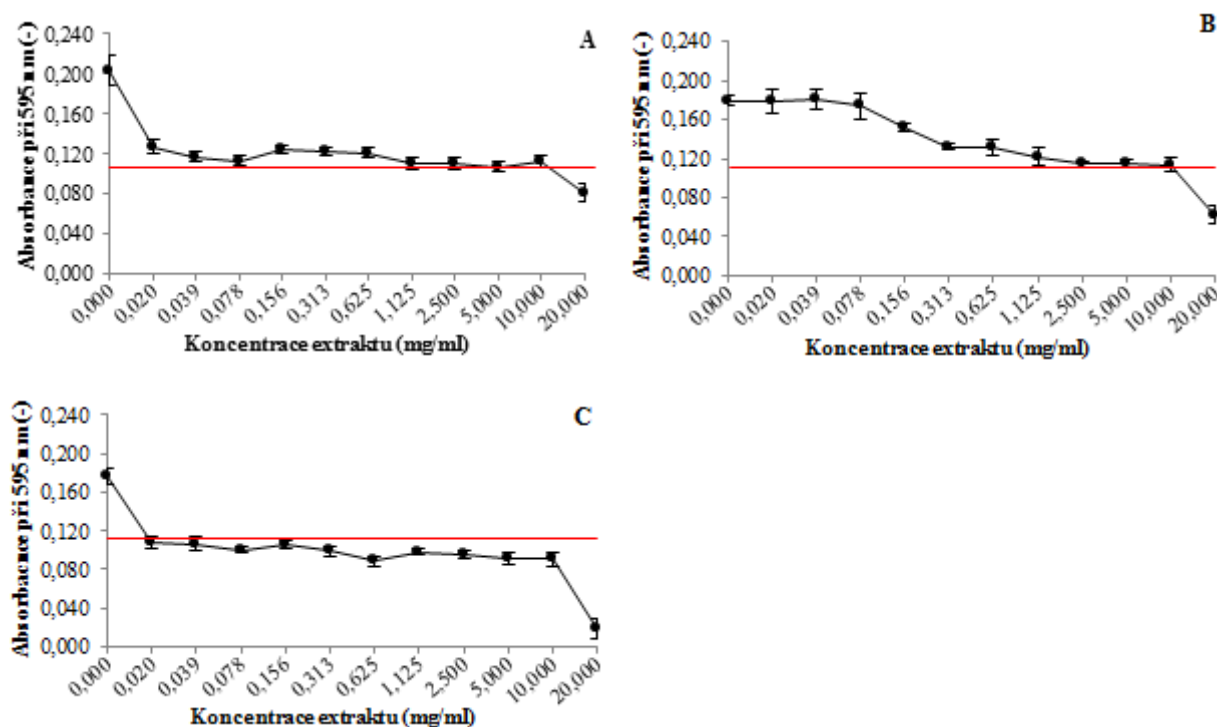
Obr. 23 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 v přítomnosti přírodních extraktů
 A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Naměřená hodnota absorbance neovlivněného biofilmu se pohybuje v rozmezí $A_{595} = 0,120 - 0,130$, tedy v rozmezí nad stanovenou hranicí biofilmové aktivity. V případě

extraktu z hřebíčku (**Obr. 23A**) se hodnoty pohybují v oblasti červené linie, a lze tedy s ohledem na chybu měření konstatovat, že tvorba biofilmu je v celém průběhu měření takřka minimální. V případě extraktu z muškátového oříšku je nejprve patrný mírný nárůst biofilmové aktivity, a to zřejmě v důsledku způsobeného šoku, podobně jako v případě badyánového extraktu u kmene *A. lanthieri* LMG 2851. Poté se tvorba vytvořeného biofilmu snižuje a s hodnotou koncentrace extraktu 20 mg/ml klesá až na hodnotu 0,064 mg/ml.

Tvorba biofilmu *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

Dále byly v rámci diplomové práce testovány 3 kmeny druhu *Arcobacter butzleri*. Jedním z nich byl kmen *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8.



Obr. 24 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 v přítomnosti přírodních extraktů

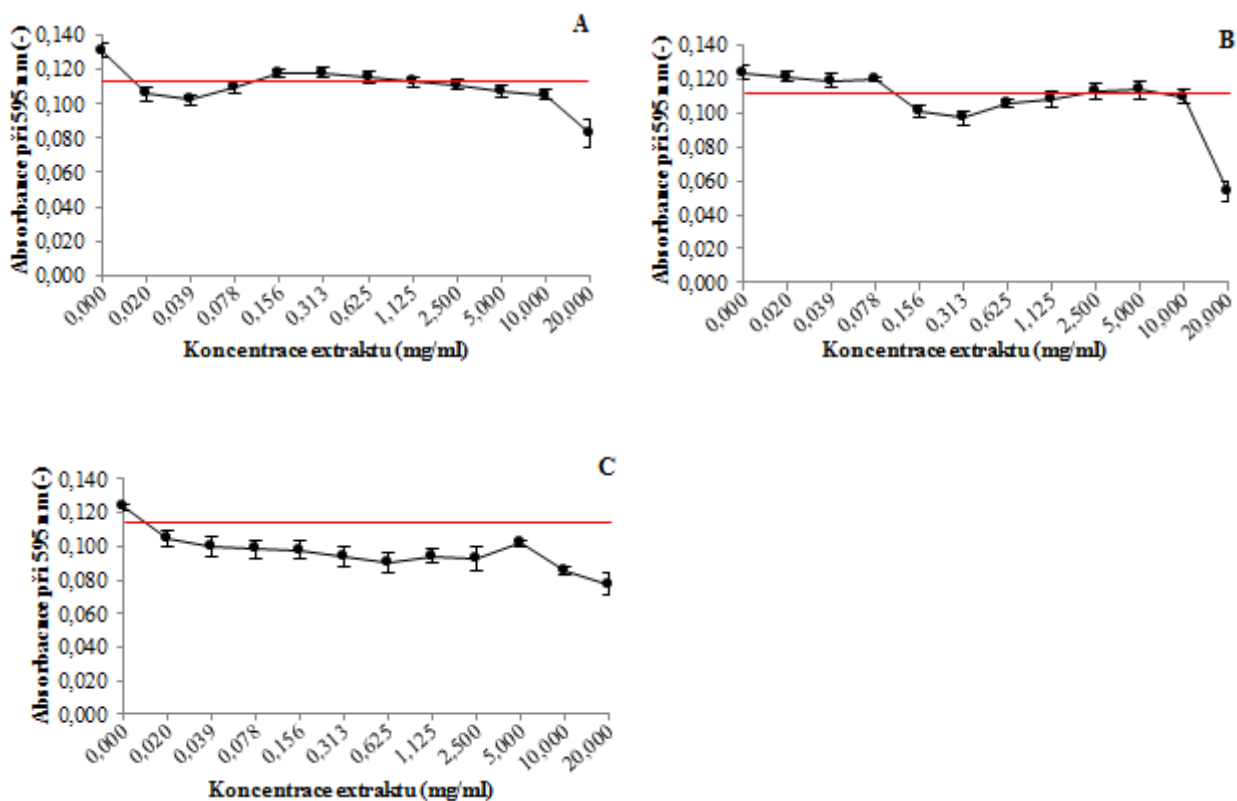
A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Kmen *A. butzleri* UPa 2013/8, patřící do interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice, byl již na základě předešlých studií shledán jako velmi silně biofilm tvořící kmen. Tento fakt dokládá i velmi vysoká hodnota absorbance naměřená v bodě s nulovou koncentrací extraktu ($A_{595} = 0,180 - 0,200$), korespondující s hodnotou čistého biofilmu.

Z uvedeného důvodu je pravděpodobná také vyšší biofilmová aktivita v přítomnosti extraktů, oproti ostatním testovaným kmenům. Tento předpoklad dokládá **Obr. 24**, kdy jsou v případě extraktu z hřebíčku (**Obr. 24A**) a badyánu (**Obr. 24B**) zaznamenány hodnoty nad úroveň vyobrazené červené linie, a to až do koncentrace extraktů 10 mg/ml. Hodnota koncentrace 20 mg/ml se zdá být s životaschopností bakterie, natož s tvorbou biofilmu neslučitelná, stejně jako u všech doposud uvedených kmenů arkobakterů. Biofilmovou aktivitu zmíněného kmene v přítomnosti extraktu z muškátového oříšku zaznamenává graf na **Obr. 24C**. Z grafu je patrné, že již v přítomnosti nejnižší testované koncentrace není kmen *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 tvorby biofilmu schopen, což značí výraznější vliv tohoto extraktu na daný kmen, než u předešlých dvou extraktů.

Tvorba biofilmu *Arcobacter butzleri* LMG 10828

Druhým testovaným kmenem druhu *A. butzleri* byl *Arcobacter butzleri* LMG 10828.



Obr. 25 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* LMG 10828 v přítomnosti přírodních extraktů

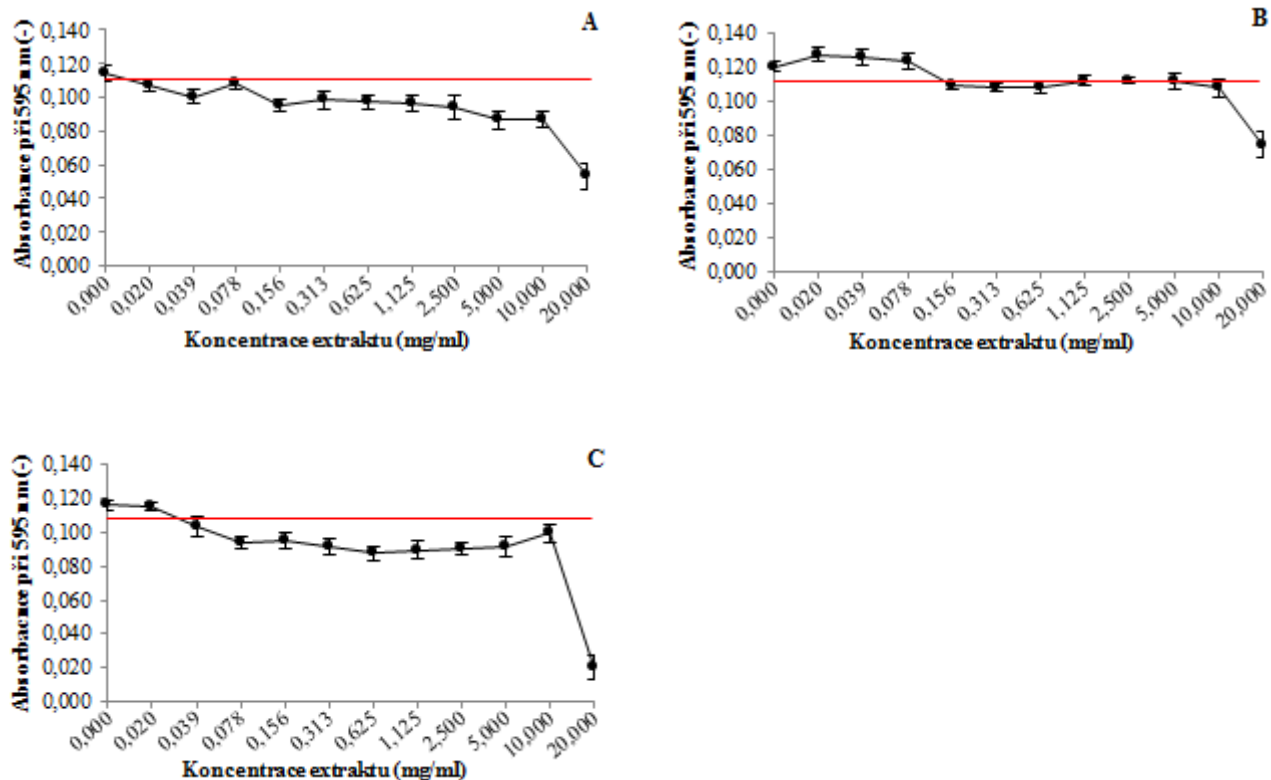
A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorpance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Jedná se o kmen, který byl v minulosti předmětem mnoha odborných studií, nejen z důvodu přítomnosti všech domnělých virulenčních faktorů, ale také z hlediska biofilmové aktivity. Naměřené hodnoty absorbancí neovlivněného biofilmu tohoto kmene, tak také hodnoty absorbancí ovlivněné testovanými přírodními extrakty znázorňuje **Obr. 25**.

Hodnota naměřené absorbance, vyjadřující množství čistého biofilmu se pohybovala v rozmezí $A_{595} = 0,120 - 0,130$. Tato hodnota je ve srovnání s ostatními testovanými kmeny v této studii spíše průměrná, tj. ne tak vysoká, jak by se u tohoto kmene, na základě předešlých odporných studií, dalo očekávat. Grafické znázornění závislosti naměřených absorbancí na daných koncentracích extraktů je velmi podobné jak v případě extraktu z hřebíčku (**Obr. 25A**), tak také v případě extraktu z badyánu (**Obr. 25B**). Jednotlivé body takřka kopírují nulovou linii, což značí minimální biofilmovou aktivitu tohoto kmene za daných podmínek. V případě extraktu z muškátového oříšku (**Obr. 25C**) je tvorba již od nejnižší testované koncentrace zcela potlačena.

Tvorba biofilmu *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

Posledním z kmenů *Arcobacter butzleri* vybraným pro tento experiment byl kmen *Arcobacter butzleri* CCUG 30484. Biofilmovou aktivitu tohoto kmene v přítomnosti extraktů z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku zaznamenává **Obr. 26**.

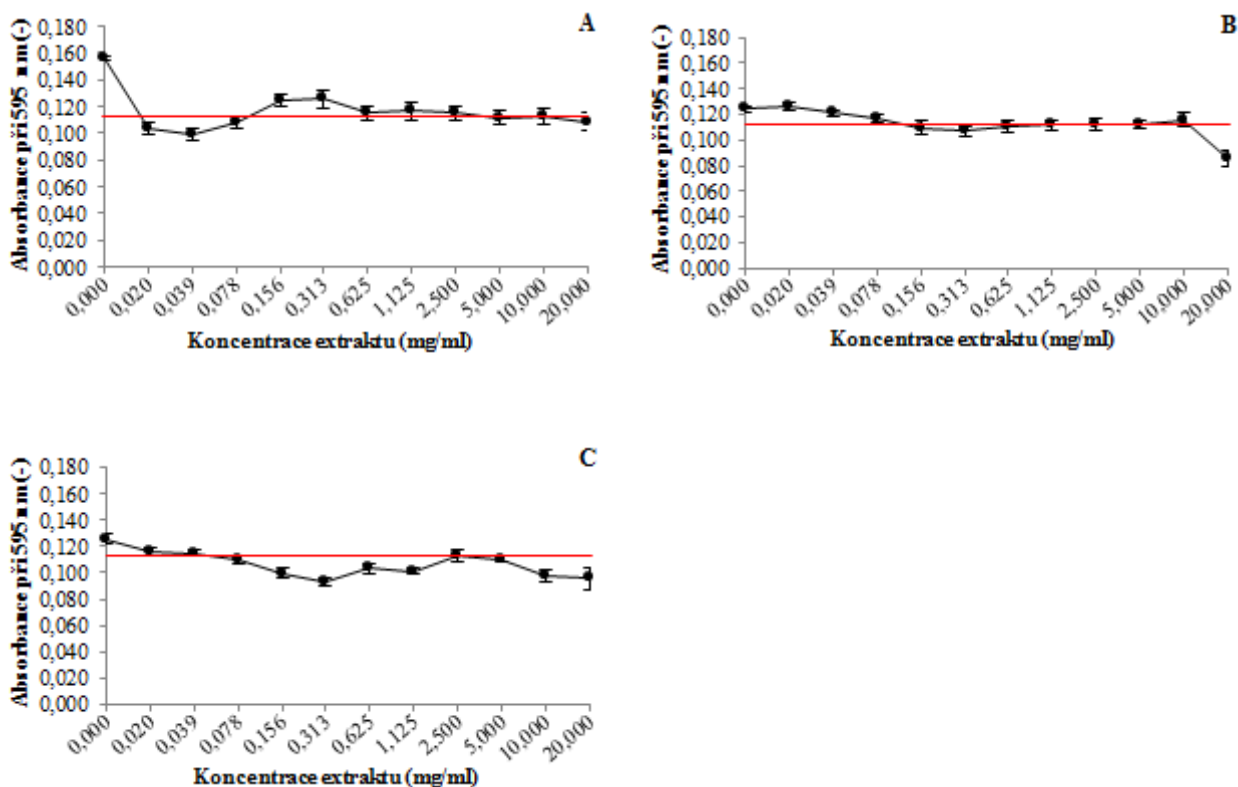


Obr. 26 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 v přítomnosti přírodních extraktů
 A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Trend dosažených výsledků je u všech tří testovaných extraktů velmi podobný. V případě badyánového extraktu (**Obr. 26B**) však nejprve dochází k mírnému nárůstu biofilmové aktivity, podobně jako u kmene *A. butzleri* UPa 2013/8. U všech tří testovaných extraktů opět dochází k výraznému poklesu hodnot v bodě s nejvyšší testovanou koncentrací.

Tvorba biofilmu *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

V rámci této diplomové práce byly dále na tvorbu a ovlivnění biofilmu přírodními extrakty testovány dva kmeny druhu *Arcobacter cryaerophilus*. Jedním z nich byl kmen *A. cryaerophilus* CCM 7050.

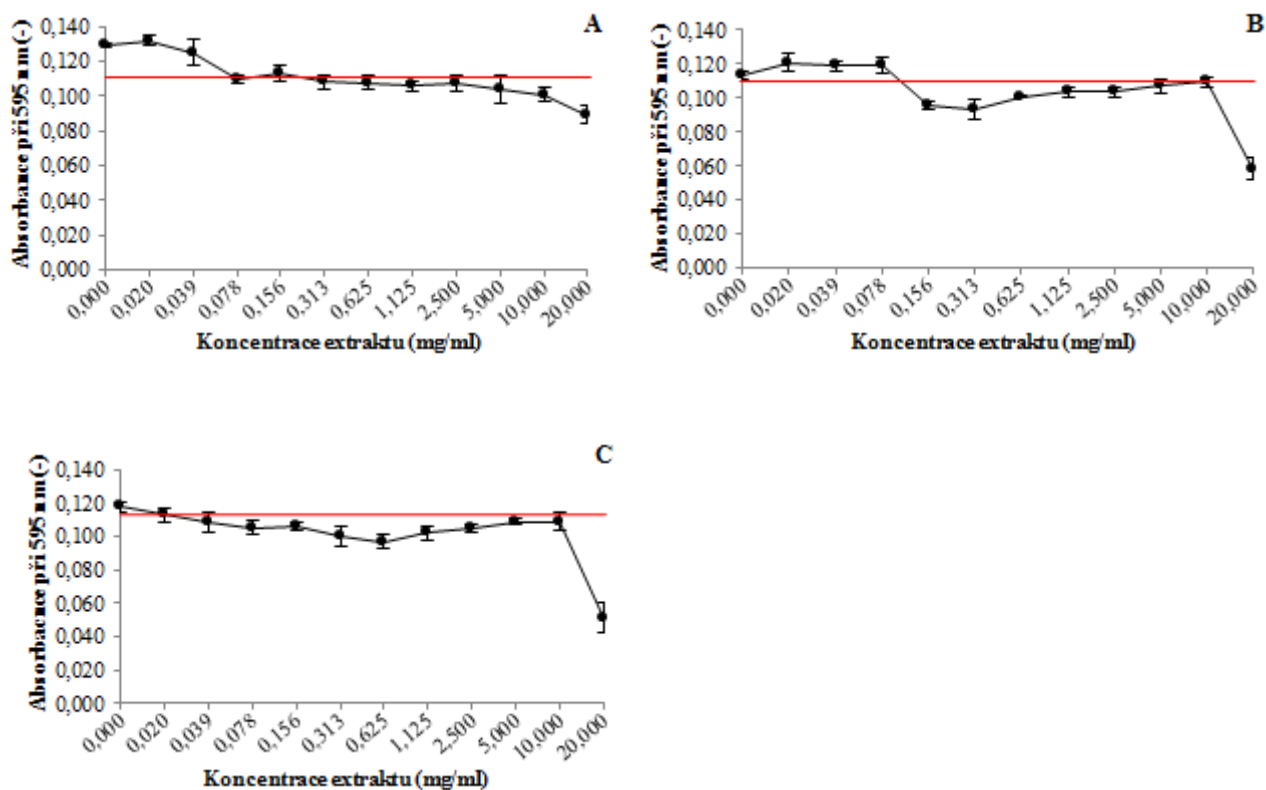


Obr. 27 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050 v přítomnosti přírodních extraktů
 A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Z **Obr. 27** vyplývá, že hodnota neovlivněného biofilmu naměřená u toho kmene je v porovnání s ostatními kmeny o něco vyšší. Grafické záznamy pro jednotlivé extrakty ovšem nenaznačují výraznější změny v dosavadním trendu oproti ostatním testovaným kmenům. Z grafu na **Obr. 27A**, kde je znázorněna závislost tvorby biofilmu tohoto kmene v přítomnosti hřebíčkového extraktu, lze vyčíst nejprve pokles naměřených hodnot pod úroveň nulové linie ($A_{595} = 0,1119$). Poté je z grafu patrný náhlý nárůst biofilmové aktivity s hodnotou absorbance 0,125 v bodě koncentrace 0,3125 mg/ml. Od tohoto bodu biofilmová aktivita kmene *A. cryaerophilus* CCM 7050 opět klesá. V případě badyánového extraktu (**Obr. 27B**) je patrný velmi podobný grafický průběh, jako tomu nastává u kmene *A. butzleri* CCUG 30484 (**Obr. 27B**). Opět je zde viditelný nejprve mírný vzestup biofilmové aktivity, poté pokles a následné kopírování červené linie až na hodnotu absorbance 0,089 v bodě koncentrace 20 mg/ml. Grafické znázornění tvorby biofilmu kmene *A. cryaerophilus* CCM 7050 v přítomnosti extraktu z muškátového oříšku (**Obr. 27C**) se odehrává prakticky v celém měřeném koncentračním rozsahu pod červenou linií a k tvorbě biofilmu zde tedy nedochází.

Tvorba biofilmu *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

Poslední kmen rodu *Arcobacter*, zařazený pro testování tvorby biofilmu v přítomnosti přírodních extraktů, byl kmen *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13.



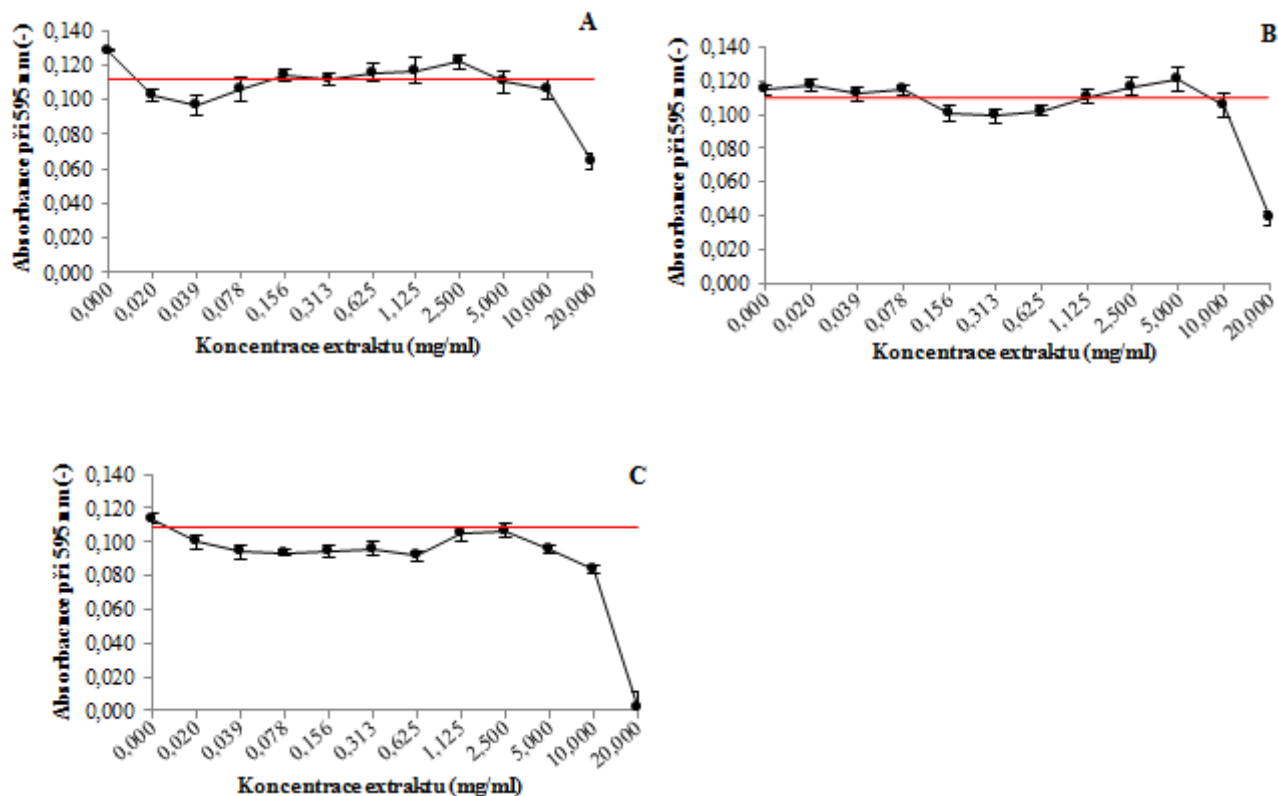
Obr. 28 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 v přítomnosti přírodních extraktů
A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Zjištěná hodnota absorbance, odpovídající čistému biofilmu, se u tohoto kmene pohybovala v rozmezí 0,110 – 0,130. Z důvodu, že se nejedná o příliš vysokou hodnotu, ani biofilmová aktivita v přítomnosti přírodních extraktů není vysoká. To dokládá **Obr. 28**, který zobrazuje závislosti naměřených absorbancí na daných koncentracích jednotlivých testovaných extraktů. Lze konstatovat, že trend dosažených výsledků pro badyánový extrakt (**Obr. 28B**) se opět velmi shoduje s trendem výsledků některých předešlých kmenů, včetně *A. cryaerophilus* CCM 7050.

Tvorba biofilmu *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Na závěr byly testovány dva srovnávací kmeny, a to zástupce jak Gram-negativních bakterií *Escherichia coli* CCM 3954, tak také Gram-pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Výsledky zjištěné biofilmové aktivity kmene *Escherichia coli* CCM 3954 v přítomnosti testovaných extraktů znázorňuje **Obr. 29**.



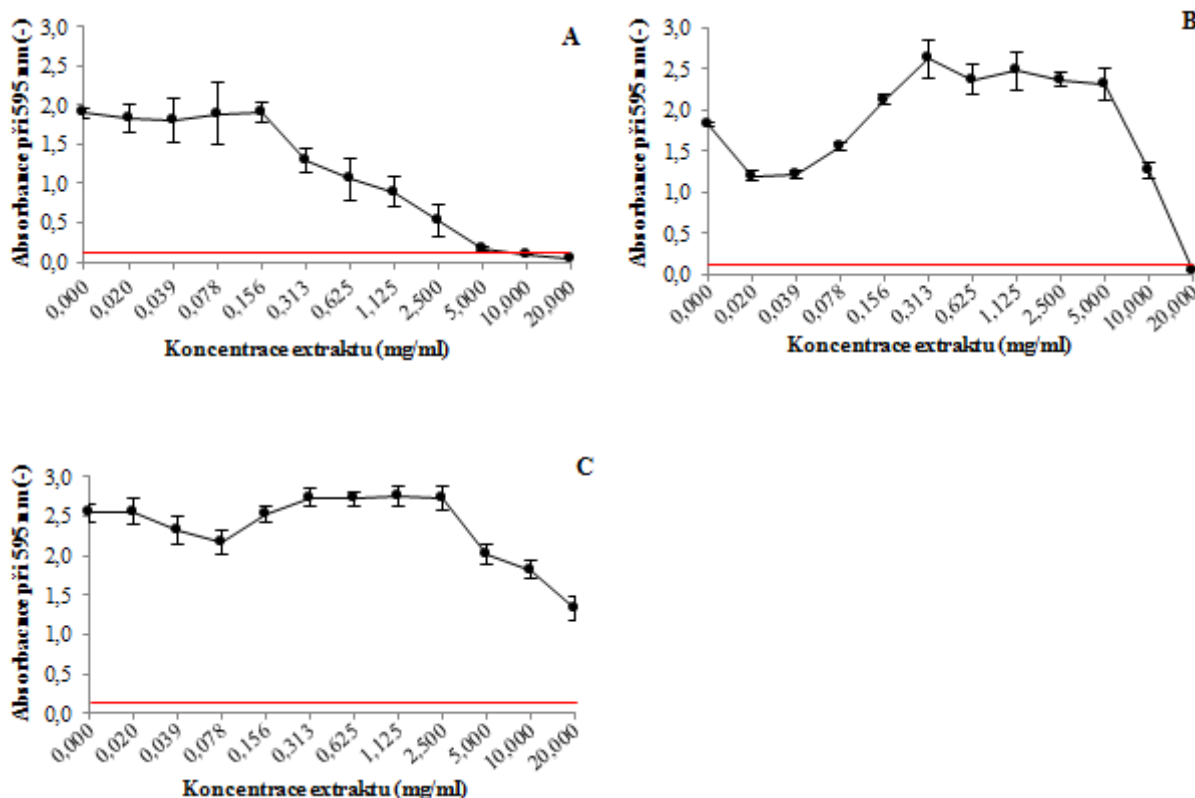
Obr. 29 Tvorba biofilmu kmene *Escherichia coli* CCM 3954 v přítomnosti přírodních extraktů

A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Z uvedeného grafu vyplývá, že hodnota absorbance v bodě s nulovou koncentrací extraktu, odpovídající vytvořenému čistému biofilmu této bakterie, je velmi blízká hodnotám naměřeným u kmenů *Arcobacter* spp. Stejně tak i trend dosažených výsledků závislosti naměřených absorbancí na koncentracích jednotlivých extraktů se příliš neliší od těch získaných u arko-bakterů. Z **Obr. 29** lze dále vyčíst, že u žádné z testovaných koncentrací daného extraktu nebyla zaznamenána výrazná tvorba biofilmu. Naopak se hodnoty pohybují spíše pod úrovní limitní hodnoty absorbance neovlivněného BHI bujónu, tj.

$A_{595} = 0,112$. Zdá se tedy, že stejně jako u arko-bakterií mají testované extrakty na kmen *Escherichia coli* CCM 3954 takové účinky, které tvorbu biofilmu výrazně potlačují.

To se však nedá říci o bakteriálním kmeni *Staphylococcus aureus* CCM 3953, jehož biofilmová aktivita v přítomnosti testovaných extraktů je znázorněna na **Obr. 30**.



Obr. 30 Tvorba biofilmu kmene *Staphylococcus aureus* CCM 3953 v přítomnosti přírodních extraktů

A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ($A_{595} = 0,112$)

Ze všech grafů na **Obr. 30** je na první pohled patrné, že se jedná o bakterii s výraznou schopností tvorby biofilmu. Hodnota naměřené absorbance odpovídající množství vytvořeného biofilmu se při nulové koncentraci extraktu pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,5, tedy mnohonásobně výše, než v případě arko-bakterií. Dále lze také komentovat odlišný grafický trend všech grafů, oproti trendu, který byl sledován u předešlých testovaných kmenů. V případě hřebíčkového extraktu (**Obr. 30A**) se hodnoty naměřených absorbancí s rostoucí koncentrací extraktu stále snižují a teprve od hodnoty koncentrace extraktu 10 mg/ml klesají pod úroveň stanovené limitní hodnoty. V případě extraktu z badyánu a muškátového oříšku

(Obr. 30B, C) je grafický průběh sledovaných proměnných odlišný. Z grafu na Obr. 30B je patrné, že v přítomnosti nejnižších testovaných koncentrací dochází k výraznému poklesu biofilmové aktivity. Poté s koncentrací extraktu 0,078 mg/ml produkce biofilmu kmene *St. aureus* CCM 3953 opět stoupá. Na rozdíl od hřebíčkového extraktu, dochází k výrazné tvorbě biofilmu také při koncentraci extraktu 10 mg/ml. U posledního z testovaných extraktů (Obr. 30C) dochází k produkci biofilmu *St. aureus* v celém koncentračním rozsahu. Z popsanych výsledků tedy vyplývá, že nejvýraznější vliv na tvorbu biofilmu této bakterie byl zaznamenán u extraktu z hřebíčku, naopak nejnižší vliv u extraktu z muškátového oříšku.

3.2.2 Závěrečné zhodnocení výsledků detekce a kvantifikace biofilmu arkobakterů v přítomnosti přírodních extraktů

Tato diplomová práce se mimo jiné zabývala detekcí biofilmu bakterií rodu *Arcobacter* a možným ovlivněním vytvořeného biofilmu přírodními extrakty. Metodou zvolenou pro zmíněné testování byla modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách (Christensen *et al.*, 1985).

Výsledky uvedené v kapitole 3.2.1 *Výsledky testování schopnosti tvorby biofilmu u Arcobacter spp. a jeho ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku* dokazují, že jsou tyto bakterie skutečně schopné tvorby biofilmu, jak ve svých publikacích uvádějí autoři Ferreira *et al.* (2013), Kjeldgaard *et al.* (2009) a další.

Obecně lze konstatovat, že z devíti testovaných kmenů arkobakterů vykazoval nejvyšší biofilmovou aktivitu kmen *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 s hodnotou naměřené absorbance $A_{595} = 0,180 - 0,200$, která odpovídá množství biofilmu vytvořeného bez přítomnosti přírodních extraktů. Naopak u kmenů *A. butzleri* CCUG 30484 a *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byla detekována nejnižší schopnost tvorby biofilmu s hodnotami v průměru okolo $A_{595} = 0,120$, což je hodnota znatelně nižší, než v předešlém případě.

U ostatních šesti testovaných kmenů arkobakterů, včetně kmene *A. butzleri* LMG 10828, byla naměřena absorbance v rozmezí $A_{595} = 0,120 - 0,140$. Tento kmen byl z hlediska tvorby biofilmu také předmětem studie autorů Ferreira *et al.* (2013). Ti v rámci své studie, taktéž s využitím Christensenovy metody, detekovali naopak velmi vysokou biofilmovou aktivitu, a to za nejrůznějších testovaných podmínek. Odlišnost výsledků mohla být způsobena například druhem použitého živného média, kterým byl v naší studii BHI bujón,

oproti Mueller – Hinton bujónu použitým ve studii Ferreira *et al.* (2013). Dále mohou být rozdílné výsledky způsobeny podmínkami, za kterých byla mikrotitrační destička inkubována. V rámci našeho experimentu inkubace probíhala 24 hodin při 30 °C, ovšem ve zmíněné studii byly podmínky inkubace 48 hodin při 37 °C. Je pravděpodobné, že všechny zmíněné aspekty mohly hrát v dosažených výsledcích velkou roli, zejména pak podmínky inkubace.

Za podmínek stanovených v tomto experimentu, tedy přítomnost extraktů z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku, bylo dále testováno všech devět kmenů arkobakterů a dva srovnávací kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Escherichia coli* CCM 3954.

Obecně lze na základě grafických záznamů naměřených výsledků, které jsou znázorněny na **Obr. 20 – 30** konstatovat, že všechny testované extrakty vykazovaly velmi podobný vliv na tvorbu biofilmu u všech kmenů arkobakterů, tj. trend dosažených výsledků je ve všech případech testovaných extraktů velmi podobný. Za povšimnutí stojí především pokles biofilmové aktivity hluboko pod stanovenou limitní hranici při hodnotě koncentrace extraktu 20 mg/ml, a to u všech testovaných kmenů.

Dále lze pozorovat také podobnost v trendu získaných výsledků u jednotlivých kmenů v rámci jednoho extraktu. Například v případě badyánového extraktu je zejména u kmenů *A. butzleri* UPa 2013/8, *A. lanthieri* LMG 28517 a *A. butzleri* CCUG 30484 zaznamenána zvýšená tvorba biofilmu u koncentrací 0,012 – 0,078 mg/ml. Bakterie tedy okamžitou tvorbou biofilmu pravděpodobně reagují na nepříznivé podmínky, které daný extrakt představuje.

Jediným testovaným kmenem druhu *Arcobacter skirrowii* byl kmen *A. skirrowii* LMG 6621. Šilhová *et al.* (2015) prokázali pomocí fluorescenční *in situ* hybridace schopnost tvorby biofilmu tohoto kmene na kuponech z nerezové oceli. I to potvrzuje námi uváděné výsledky, tedy, že je tento kmen na tvorbu biofilmu pozitivní. Dále bylo zjištěno, že všechny testované extrakty v rámci této studie jistým způsobem ovlivňují tvorbu vytvořeného biofilmu tohoto kmene, a to již v přítomnosti minimálních testovaných koncentrací.

V případě hřebíčkové extraktu dochází obecně u všech testovaných kmenů k okamžitému poklesu biofilmové aktivity, a to hned při koncentraci extraktů 0,012 mg/ml. Tato skutečnost potvrzuje velmi silné antimikrobiální vlastnosti hřebíčku, které ve svých studiích popisují například Červenka *et al.* (2006). Stejně jako v naší studii, autoři zaznamenali silný antibakteriální vliv hřebíčkového extraktu (methanol/DMSO, 20 mg/ml) u všech testovaných kmenů arkobakterů, včetně *A. butzleri* CCUG 30484. I přes to, že se nejednalo o testování tvorby biofilmu jako takového, lze konstatovat, že při koncentraci 20 mg/ml, se v obou případech prokázala vysoká eliminační schopnost tohoto extraktu.

Z výše uvedených výsledků lze dále soudit, že testované extrakty nemají prokazatelný selektivní účinek na rod *Arcobacter*, tj. výsledky jsou si natolik podobné, že jednotlivé druhy nelze rozlišit na základě tohoto experimentu. Ve studii autorů Červenka *et al.* (2006), kteří testovali antibakteriální vliv přírodních extraktů na planktonní buňky *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*, byla tato skutečnost také zaznamenána.

V rámci našeho experimentu byla testována také bakterie *Escherichia coli* CCM 3954. Hodnota naměřené absorbance se v bodě s nulovou koncentrací extraktu pohybovala v průměru okolo $A_{595} = 0,120$, což tedy dokládá, že bakterie je biofilm pozitivní, jak uvádějí mnohé studie. Mohsenipour *et al.* (2015), kteří sledovali inhibiční účinky extraktu z česneku na tvorbu biofilmu *E. coli* zjistili, že tento extrakt (ethanol/DMSO) inhiboval tvorbu biofilmu v průměru o 50 %, a to v případě všech testovaných koncentrací (5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml). V našem případě došlo k poklesu biofilmové aktivity o více než 50 % pouze v případě koncentrace extraktu 20 mg/ml. Stejně, jako v této studii, dále zjistili, že schopnost inhibice biofilmové aktivity extraktů stoupá se zvyšující se koncentrací.

U bakterie *St. aureus* CCM 3953 byla v rámci našeho experimentu zjištěna několikanásobně vyšší biofilmová aktivita oproti ostatním testovaným kmenům. Skutečnost, že tato bakterie velmi významně tvoří biofilm, dokazují i studie autorů Babra *et al.* (2013) či Szczuka *et al.* (2012). Stepanović *et al.* (2000) zaznamenali u 85 % kmenů *St. aureus* silnou a velmi silnou tvorbu biofilmu. Také u tohoto kmene byla v rámci studie autorů Mohsenipour *et al.* (2015) v přítomnosti česnekového extraktu detekována inhibice vytvořeného biofilmu o 50 %. Podobný jev se u kmene *St. aureus* CCM 3953 potvrdil také v našem experimentu, a to v případě extraktu z muškátového oříšku, kdy s koncentracemi extraktu 5 mg/ml, 10 mg/ml a 20 mg/ml biofilmová aktivita klesala cca na polovinu výchozí hodnoty.

Výsledky předložené studie ukazují, že všechny z testovaných extraktů tvorbu biofilmu vybraných kmenů arkobakterů inhibují. Tímto se také potvrzuje antibakteriální vliv testovaných přírodních látek, jak bylo již v minulosti prokázáno.

4 ZÁVĚR

Pomocí multiplexní polymerázové řetězové reakce (mPCR) byly detekovány virulentně asociované geny celkem u 76 kmenů druhů *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. V našich podmínkách však metoda neposkytovala zcela správnou detekci jednotlivých genů a separaci PCR produktů, a proto byla nutná další optimalizace. Dále byla pomocí modifikované Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách testována tvorba biofilmu u vybraných kmenů rodu *Arcobacter* a jeho ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku.

Multiplexní polymerázová řetězová reakce je často využívanou metodou molekulární biologie. Umožňuje rychlou, specifickou a citlivou detekci hned několika cílových genů současně v jedné reakci. Touto metodou byly detekovány geny kódující virulenční faktory vybraných kmenů *Arcobacter* spp. U jednotlivých kmenů byly detekovány geny v různých kombinacích, což naznačuje značnou variabilitu ve virulenčních vlastnostech těchto bakterií.

U nejvyššího počtu kmenů byly detekovány geny *ciaB* a *mviN* s procentuálním zastoupením 96,1 % a 94,7 %. Naopak u nejnižšího počtu kmenů byly detekovány geny *irgA* (11,8 %), *hecA* (26,3 %) a *hecB* (26,3 %). Dále bylo na základě předkládané diplomové práce zjištěno, že pouze v případě čtyř kmenů (5,2 %) bylo v jejich genomu nalezeno všech 8 virulentně asociovaných genů. Jednalo se o kmeny *A. butzleri* UPa 2013/5, *A. butzleri* UPa 2013/36, *A. butzleri* UPa 2013/40 a *A. butzleri* UPa 2015/5. Z důvodu, že se jedná o kmeny izolované z různých druhů prostředí nelze jednoznačně říci, že původ testovaných vzorků má vliv na uvedené výsledky. Žádný z virulentně asociovaných genů naopak nebyl detekován u kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2014/58, což představuje pouhé 1,3 % ze všech testovaných kmenů.

Pro sledování a kvantifikaci tvorby biofilmu bakterií je často využívána Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Jedná se o metodu rychlou, reprodukovatelnou a jednoduchou. Touto metodou byla sledována tvorba biofilmu u devíti zástupců rodu *Arcobacter*, a to v přítomnosti přírodních extraktů. Mezi jednotlivými druhy ani kmeny nebyla zaznamenána výrazná variabilita. Nejvyšší biofilmová aktivita, však byla zaznamenána u kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8. Hodnota naměřené absorpance, která odpovídá množství vytvořeného biofilmu bez přítomnosti přírodních extraktů, byla u tohoto kmene $A_{595} = 0,180 - 0,200$. Naopak nejnižší schopnost tvorby biofilmu byla detekována u

kmenů *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 a *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 s hodnotami absorbance v průměru $A_{595} = 0,120$.

Na základě testování vybraných kmenů na tvorbu biofilmu v přítomnosti extraktů z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku lze říci, že u všech testovaných kmenů arkobakterů došlo k eliminaci biofilmové aktivity.

V případě extraktu z hřebíčku byl obecně u všech kmenů zaznamenán okamžitý pokles tvorby biofilmu již při koncentraci 0,012 mg/ml, což také potvrzuje velmi silné antimikrobiální vlastnosti hřebíčku, jak bylo již v minulosti prokázáno. U extraktů z badyánu a muškátového oříšku nebyl takto silný vliv zaznamenán, ovšem u badyánového extraktu, a to zejména u kmenů *A. butzleri* UPa 2013/8, *A. lanthieri* LMG 28517 a *A. butzleri* CCUG 30484 byla detekována zvýšená biofilmová aktivita u koncentrací 0,012 – 0,078 mg/ml. Tímto bakterie pravděpodobně reagují na nepříznivé podmínky, které daný extrakt představuje. U všech extraktů bylo v rámci experimentu dále zjištěno, že při hodnotě koncentrace extraktu 20 mg/ml klesla biofilmová aktivita testovaných kmenů hluboko pod stanovenou limitní hranici ($A_{595} = 0,112$).

Pro srovnání byly dále testovány kmeny *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Zatímco u kmene *E. coli* CCM 3954 byla naměřená hodnota absorbance, odpovídající množství vytvořeného biofilmu, srovnatelná s hodnotou naměřenou u arkobakterů, v případě kmene *St. aureus* CCM 3953 byly tyto hodnoty až několikanásobně vyšší ($A_{595} = 1,8 - 2,5$). Zaznamenán byl také odlišný trend dosažených výsledků oproti trendu výsledků dosažených v případě všech ostatních testovaných kmenů. Nejvýraznější vliv na tvorbu biofilmu byl zaznamenán u extraktu z hřebíčku, stejně jako ve všech předešlých případech.

Závěrem bych ráda podotkla, že i přes to, že byla práce časově náročná, bylo dosaženo zajímavých výsledků, které rozšířily dosavadní výzkumnou oblast. Celkově mne práce velmi obohatila, a to nejen z hlediska teoretických znalostí, ale především z hlediska praktických dovedností.

5 PŘÍLOHY

Příloha 1 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter thereius* LMG 24488 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,113	0,121	0,121	0,121	0,121	0,119	0,122	0,123	0,120	0,126	0,130	0,147
A₅₉₅**	0,113	0,107	0,103	0,109	0,102	0,100	0,105	0,102	0,096	0,097	0,1023	0,083
StDev	0,0023	0,0044	0,0050	0,0038	0,0039	0,0039	0,0062	0,0039	0,0037	0,0054	0,0059	0,0031

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,120	0,120	0,125	0,128	0,129	0,127	0,132	0,129	0,123	0,128	0,135	0,149
A₅₉₅**	0,120	0,112	0,121	0,123	0,113	0,111	0,111	0,119	0,115	0,117	0,113	0,048
StDev	0,0045	0,002	0,0028	0,0039	0,0055	0,0081	0,0073	0,006	0,0042	0,0048	0,0042	0,0018

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,125	0,130	0,123	0,113	0,119	0,117	0,118	0,122	0,111	0,128	0,125	0,151
A₅₉₅**	0,125	0,123	0,119	0,107	0,103	0,100	0,104	0,112	0,111	0,117	0,103	0,050
StDev	0,0041	0,0063	0,0052	0,0053	0,003	0,0033	0,0028	0,0033	0,0038	0,0026	0,0059	0,0081

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 2 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter lanthieri* LMG 28517 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,117	0,127	0,127	0,129	0,128	0,117	0,127	0,131	0,127	0,139	0,146	0,167
A₅₉₅**	0,117	0,113	0,109	0,117	0,111	0,098	0,111	0,111	0,103	0,11	0,111	0,103
StDev	0,0059	0,0013	0,0023	0,0044	0,0046	0,0036	0,006	0,008	0,0081	0,0073	0,0054	0,0072

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,126	0,175	0,187	0,195	0,172	0,160	0,145	0,136	0,127	0,128	0,132	0,146
A₅₉₅**	0,126	0,174	0,183	0,189	0,156	0,143	0,132	0,125	0,119	0,117	0,11	0,045
StDev	0,0042	0,0070	0,0110	0,0102	0,0050	0,0044	0,0099	0,0073	0,0048	0,0039	0,0044	0,0039

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,136	0,146	0,145	0,145	0,144	0,141	0,142	0,144	0,145	0,128	0,126	0,157
A₅₉₅**	0,136	0,134	0,128	0,127	0,126	0,122	0,118	0,124	0,123	0,107	0,096	0,0013
StDev	0,0041	0,0056	0,0036	0,0027	0,0031	0,0023	0,0044	0,0045	0,0062	0,0028	0,0016	0,0032

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 3 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter defluvii* LMG 25694 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,143	0,136	0,133	0,132	0,139	0,138	0,145	0,144	0,140	0,142	0,141	0,141
A₅₉₅**	0,143	0,122	0,115	0,121	0,120	0,119	0,128	0,123	0,117	0,114	0,114	0,077
StDev	0,021	0,0077	0,0057	0,0056	0,0061	0,0077	0,0065	0,0058	0,0024	0,0037	0,0051	0,0076

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,122	0,126	0,124	0,131	0,129	0,127	0,130	0,129	0,130	0,133	0,143	0,151
A₅₉₅**	0,122	0,125	0,120	0,126	0,113	0,111	0,117	0,119	0,122	0,122	0,122	0,050
StDev	0,0059	0,0031	0,0052	0,0048	0,0062	0,0041	0,0052	0,0049	0,0053	0,0061	0,006	0,0049

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,125	0,131	0,131	0,127	0,125	0,122	0,122	0,122	0,129	0,129	0,127	0,196
A₅₉₅**	0,125	0,119	0,114	0,109	0,106	0,103	0,098	0,102	0,108	0,108	0,098	0,041
StDev	0,0042	0,0014	0,0025	0,0023	0,0037	0,0031	0,0035	0,0029	0,0031	0,0035	0,0028	0,007

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 4 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,127	0,123	0,123	0,124	0,138	0,137	0,134	0,140	0,138	0,137	0,137	0,151
A₅₉₅**	0,127	0,109	0,104	0,112	0,119	0,118	0,117	0,119	0,114	0,109	0,111	0,087
StDev	0,0014	0,0027	0,0045	0,0044	0,0055	0,0075	0,0048	0,0057	0,0053	0,0052	0,0039	0,0048

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,112	0,123	0,120	0,123	0,124	0,126	0,123	0,123	0,124	0,123	0,129	0,160
A₅₉₅**	0,112	0,118	0,117	0,122	0,107	0,109	0,111	0,112	0,116	0,113	0,107	0,059
StDev	0,0051	0,004	0,0022	0,0034	0,0024	0,0047	0,0077	0,0057	0,006	0,005	0,0051	0,0073

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,125	0,137	0,138	0,134	0,135	0,134	0,132	0,133	0,133	0,121	0,125	0,156
A₅₉₅**	0,125	0,137	0,134	0,129	0,118	0,116	0,119	0,122	0,124	0,111	0,103	0,055
StDev	0,0044	0,0033	0,0031	0,006	0,0053	0,0051	0,0053	0,0043	0,0032	0,0021	0,0034	0,0119

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 5 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter butzleri* LMG 10828 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,131	0,120	0,120	0,122	0,136	0,137	0,130	0,134	0,135	0,136	0,132	0,147
A₅₉₅**	0,131	0,106	0,102	0,111	0,118	0,118	0,115	0,113	0,111	0,107	0,105	0,083
StDev	0,0036	0,0041	0,0029	0,0034	0,0028	0,0027	0,0034	0,0033	0,0031	0,0036	0,003	0,0081

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,124	0,122	0,123	0,125	0,117	0,114	0,118	0,118	0,121	0,124	0,131	0,154
A₅₉₅**	0,124	0,121	0,119	0,119	0,101	0,097	0,105	0,108	0,113	0,113	0,111	0,054
StDev	0,004	0,0031	0,004	0,0013	0,0037	0,0044	0,0023	0,0047	0,0044	0,0054	0,0043	0,0059

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,123	0,117	0,116	0,117	0,116	0,114	0,115	0,115	0,114	0,122	0,114	0,133
A₅₉₅**	0,123	0,105	0,099	0,098	0,098	0,094	0,091	0,094	0,093	0,102	0,085	0,0776
StDev	0,0018	0,0054	0,0058	0,0056	0,0056	0,0057	0,0058	0,0038	0,0068	0,0019	0,0029	0,0061

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 6 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,115	0,122	0,119	0,120	0,114	0,118	0,114	0,118	0,118	0,115	0,114	0,117
A₅₉₅**	0,115	0,107	0,101	0,108	0,095	0,098	0,097	0,097	0,094	0,087	0,087	0,053
StDev	0,0047	0,0037	0,0045	0,0027	0,0031	0,0055	0,0043	0,0046	0,0067	0,0057	0,0051	0,008

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,124	0,122	0,123	0,125	0,117	0,114	0,118	0,118	0,121	0,124	0,131	0,154
A₅₉₅**	0,124	0,121	0,119	0,119	0,101	0,097	0,105	0,108	0,113	0,113	0,111	0,054
StDev	0,004	0,0031	0,004	0,0013	0,0037	0,0044	0,0023	0,0047	0,0044	0,0054	0,0043	0,0059

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,123	0,117	0,116	0,117	0,116	0,114	0,115	0,115	0,114	0,122	0,114	0,233
A₅₉₅**	0,123	0,105	0,099	0,098	0,098	0,094	0,091	0,094	0,093	0,102	0,085	0,078
StDev	0,0018	0,0054	0,0058	0,0056	0,0056	0,0057	0,0058	0,0038	0,0058	0,0019	0,0026	0,0061

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 7 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,203	0,141	0,135	0,125	0,143	0,141	0,138	0,133	0,134	0,135	0,139	0,145
A₅₉₅**	0,203	0,127	0,117	0,113	0,124	0,122	0,121	0,111	0,111	0,107	0,113	0,081
StDev	0,015	0,0066	0,0048	0,005	0,0036	0,004	0,0054	0,006	0,0055	0,0048	0,0064	0,0089

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,179	0,179	0,186	0,179	0,124	0,122	0,145	0,132	0,123	0,125	0,135	0,163
A₅₉₅**	0,179	0,179	0,182	0,174	0,152	0,132	0,131	0,122	0,114	0,114	0,113	0,062
StDev	0,005	0,0124	0,0104	0,0135	0,0044	0,0029	0,0079	0,0088	0,0035	0,0042	0,0073	0,0089

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,176	0,120	0,123	0,119	0,124	0,119	0,113	0,119	0,117	0,111	0,119	0,174
A₅₉₅**	0,176	0,108	0,106	0,101	0,106	0,099	0,089	0,098	0,096	0,091	0,090	0,019
StDev	0,0080	0,0058	0,0076	0,0035	0,0037	0,0055	0,0052	0,0038	0,0048	0,0062	0,0066	0,0113

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 8 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,130	0,146	0,143	0,122	0,132	0,127	0,125	0,127	0,131	0,133	0,128	0,153
A₅₉₅**	0,130	0,132	0,125	0,111	0,114	0,108	0,108	0,106	0,107	0,104	0,101	0,089
StDev	0,0011	0,003	0,0076	0,0019	0,0046	0,0044	0,0044	0,0026	0,0043	0,008	0,0037	0,0054

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,113	0,137	0,136	0,130	0,112	0,111	0,114	0,114	0,112	0,118	0,131	0,159
A₅₉₅**	0,113	0,121	0,119	0,119	0,096	0,093	0,101	0,104	0,103	0,107	0,111	0,058
StDev	0,0022	0,0057	0,0027	0,005	0,0020	0,0063	0,0009	0,0029	0,0025	0,0044	0,0030	0,0066

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,117	0,125	0,125	0,124	0,124	0,119	0,121	0,122	0,126	0,129	0,138	0,206
A₅₉₅**	0,117	0,113	0,108	0,105	0,106	0,100	0,097	0,102	0,105	0,109	0,109	0,051
StDev	0,0027	0,0038	0,0059	0,0042	0,0029	0,0059	0,0040	0,0043	0,0028	0,0019	0,0051	0,0090

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 9 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,156	0,118	0,118	0,120	0,143	0,145	0,132	0,138	0,139	0,140	0,139	0,173
A₅₉₅**	0,156	0,104	0,099	0,108	0,124	0,125	0,115	0,117	0,115	0,112	0,113	0,109
StDev	0,0018	0,0049	0,0045	0,0044	0,0049	0,0071	0,0053	0,0065	0,0049	0,0052	0,0063	0,0064

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,124	0,127	0,125	0,122	0,126	0,125	0,123	0,122	0,121	0,123	0,138	0,186
A₅₉₅**	0,124	0,126	0,121	0,117	0,109	0,107	0,110	0,112	0,113	0,112	0,116	0,085
StDev	0,0022	0,003	0,0028	0,0029	0,0057	0,0041	0,0045	0,0043	0,0046	0,0031	0,0059	0,0066

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,126	0,116	0,119	0,115	0,116	0,111	0,117	0,112	0,121	0,121	0,120	0,197
A₅₉₅**	0,126	0,116	0,115	0,110	0,100	0,093	0,104	0,101	0,113	0,111	0,098	0,096
StDev	0,0034	0,003	0,0028	0,0026	0,0039	0,0025	0,0038	0,0024	0,0046	0,0026	0,0042	0,0084

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 10 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Escherichia coli* CCM 3954 v přítomnosti přírodních extraktů

<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,128	0,117	0,115	0,117	0,132	0,131	0,133	0,138	0,145	0,139	0,133	0,147
A₅₉₅**	0,128	0,102	0,096	0,105	0,114	0,112	0,116	0,117	0,122	0,111	0,106	0,064
StDev	0,0007	0,0039	0,0059	0,0069	0,0034	0,0038	0,0049	0,0073	0,0041	0,006	0,006	0,0048

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,115	0,118	0,116	0,120	0,117	0,117	0,116	0,121	0,125	0,132	0,127	0,140
A₅₉₅**	0,115	0,117	0,112	0,114	0,101	0,099	0,102	0,111	0,117	0,121	0,105	0,039
StDev	0,0031	0,0033	0,004	0,0026	0,0053	0,0042	0,003	0,0046	0,0055	0,0068	0,0071	0,00421

<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	0,114	0,112	0,111	0,112	0,113	0,116	0,115	0,115	0,128	0,116	0,113	0,157
A₅₉₅**	0,114	0,100	0,094	0,093	0,095	0,096	0,091	0,105	0,107	0,096	0,084	0,002
StDev	0,0029	0,004	0,0044	0,0019	0,0033	0,0039	0,0035	0,0043	0,004	0,0023	0,0024	0,0087

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

Příloha 11 Tabulky s naměřenými daty biofilmové aktivity kmene *Staphylococcus aureus* CCM 3953 v přítomnosti přírodních extraktů

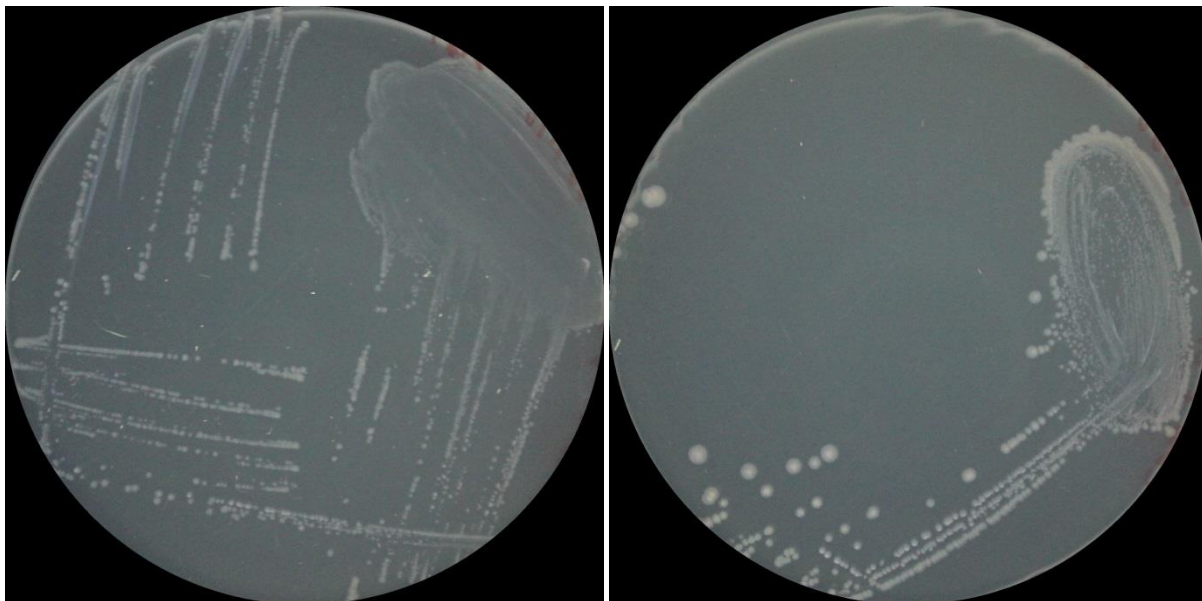
<i>Extrakt z hřebíčku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	1,895	1,856	1,817	1,905	1,932	1,303	1,051	0,905	0,536	0,202	0,111	0,111
A₅₉₅**	1,895	1,842	1,799	1,893	1,913	1,283	1,051	0,884	0,513	0,174	0,084	0,047
StDev	0,062	0,1789	0,2769	0,3891	0,133	0,1548	0,2796	0,1923	0,2042	0,0248	0,0023	0,0023

<i>Extrakt z badyánu</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	1,823	1,203	1,222	1,562	2,143	2,638	2,386	2,492	2,383	2,331	1,284	0,144
A₅₉₅**	1,823	1,203	1,218	1,557	2,127	2,621	2,373	2,4582	2,375	2,320	1,262	0,043
StDev	0,0207	0,0588	0,0439	0,0461	0,055	0,2222	0,1762	0,2336	0,0938	0,1962	0,0916	0,0094

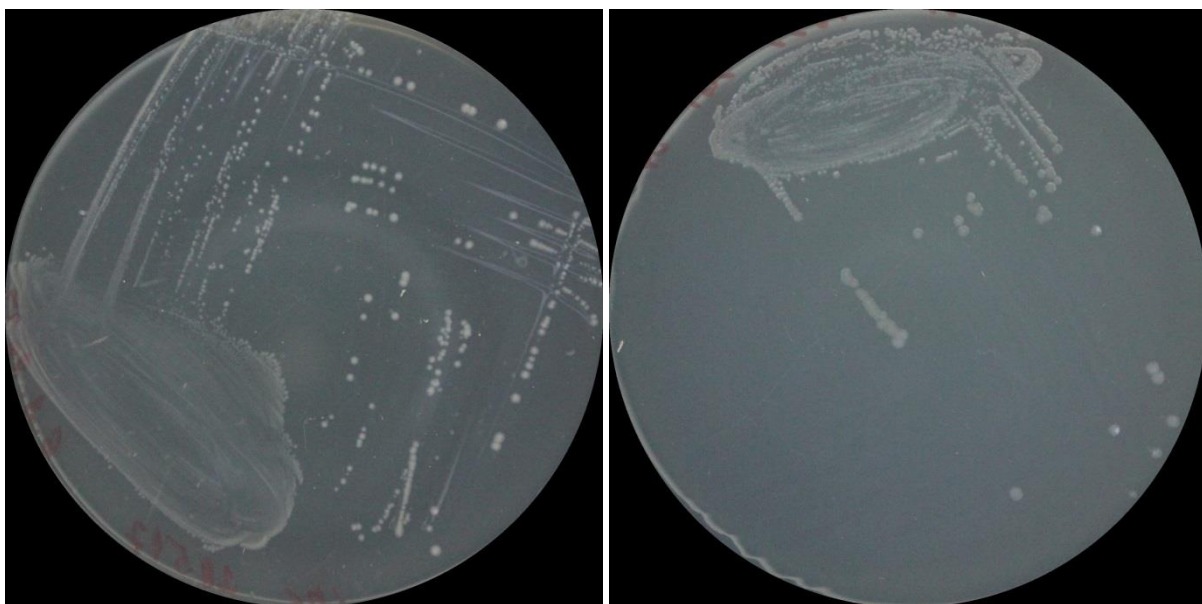
<i>Extrakt z muškátového oříšku</i>												
X	0	0,020	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,125	2,5	5	10	20
A₅₉₅*	2,545	2,572	2,340	2,178	2,542	2,760	2,742	2,769	2,750	2,044	1,853	1,483
A₅₉₅**	2,545	2,560	2,323	2,160	2,523	2,740	2,718	2,749	2,729	2,024	1,824	1,328
StDev	0,1123	0,1709	0,1857	0,1517	0,1091	0,1119	0,095	0,1266	0,1613	0,1278	0,1122	0,1495

Pozn.: * medián naměřených absorbancí bez početní úpravy (vliv absorbance BHI bujónu, extraktu); ** medián naměřených absorbancí po početní úpravě, odpovídající biofilmové aktivitě daného kmene; X – koncentrace daného extraktu v mg/ml; StDev – směrodatná odchylka měření

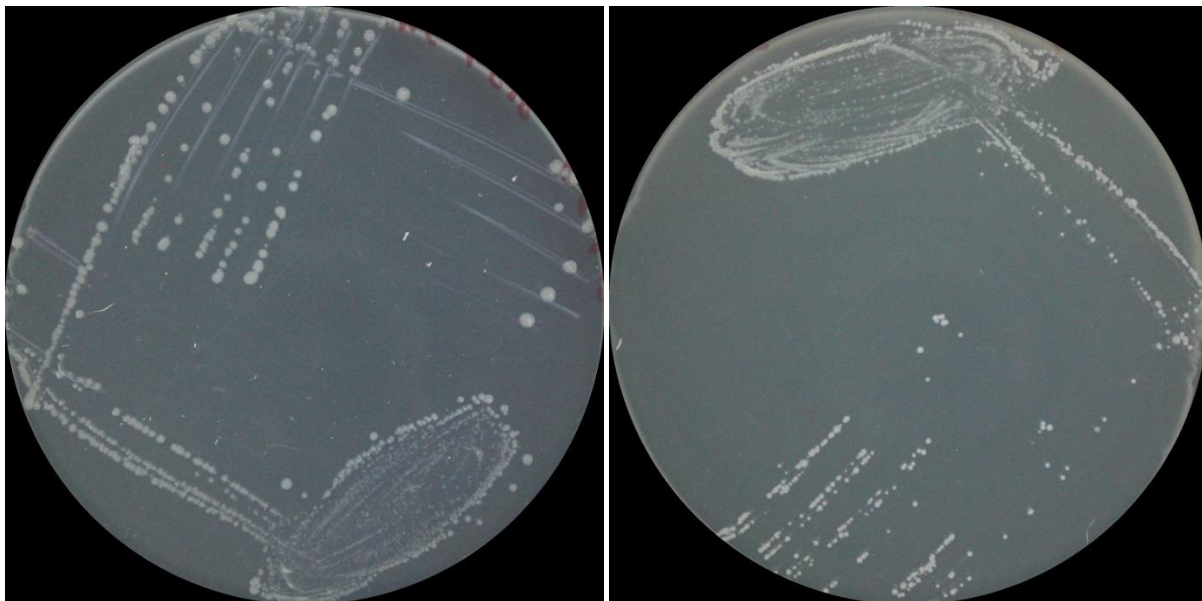
Příloha 13 *Arcobacter thereius* LMG 24488 (vlevo) a *Arcobacter lanthieri* LMG 28517 (vpravo), (TSA, 30 °C/ 24 h)



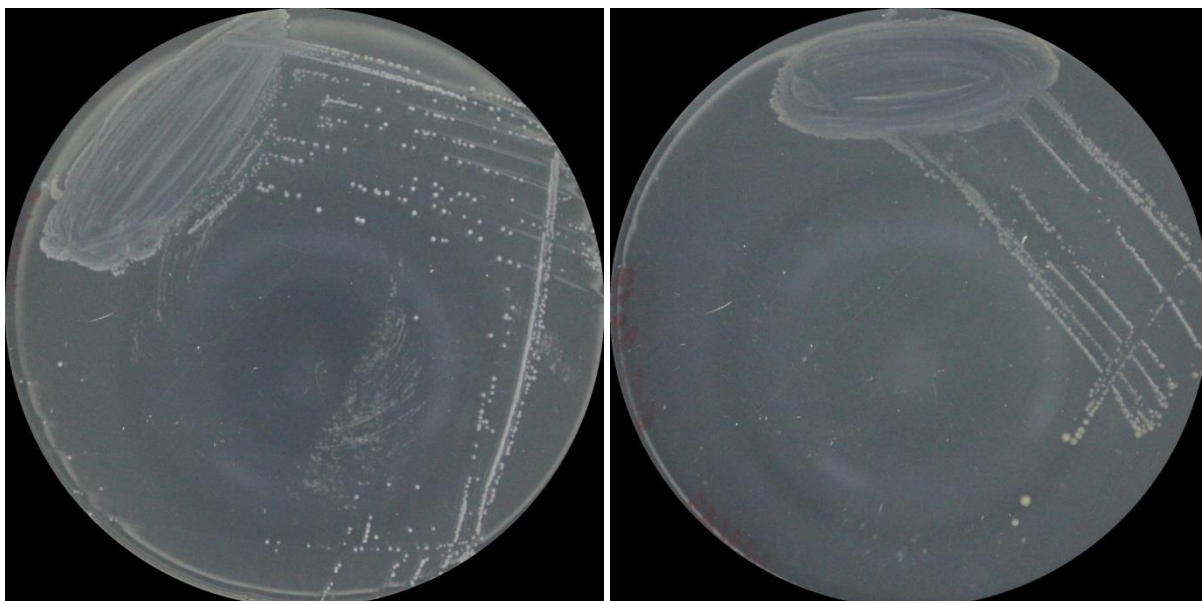
Příloha 14 *Arcobacter defluvii* LMG 25694 (vlevo) a *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 (vpravo), (TSA, 30 °C/24 h)



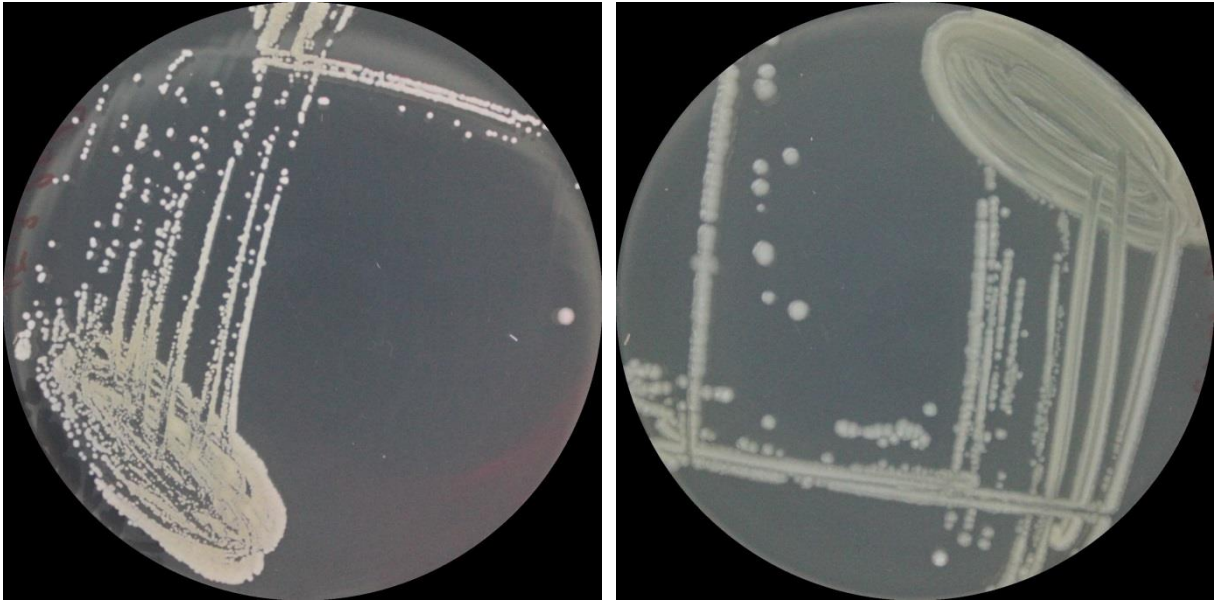
Příloha 15 *Arcobacter butzleri* LMG 10828 (vlevo) a *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 (vpravo), (TSA, 30 °C/24 h)



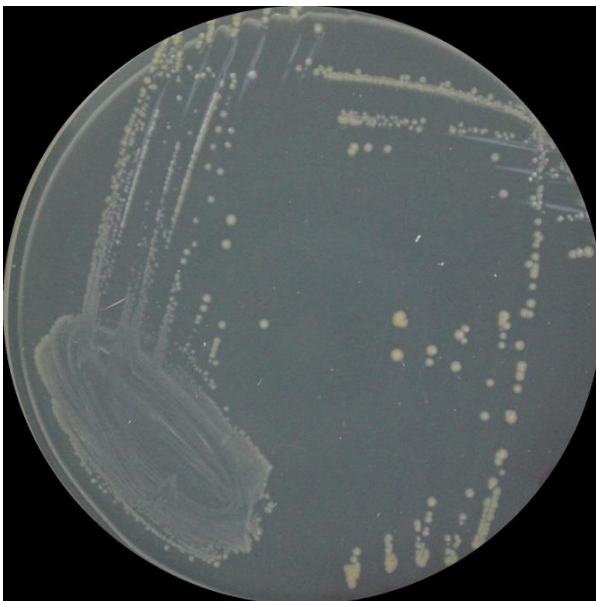
Příloha 16 *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 (vlevo) a *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 (vpravo), (TSA, 30 °C/24 h)



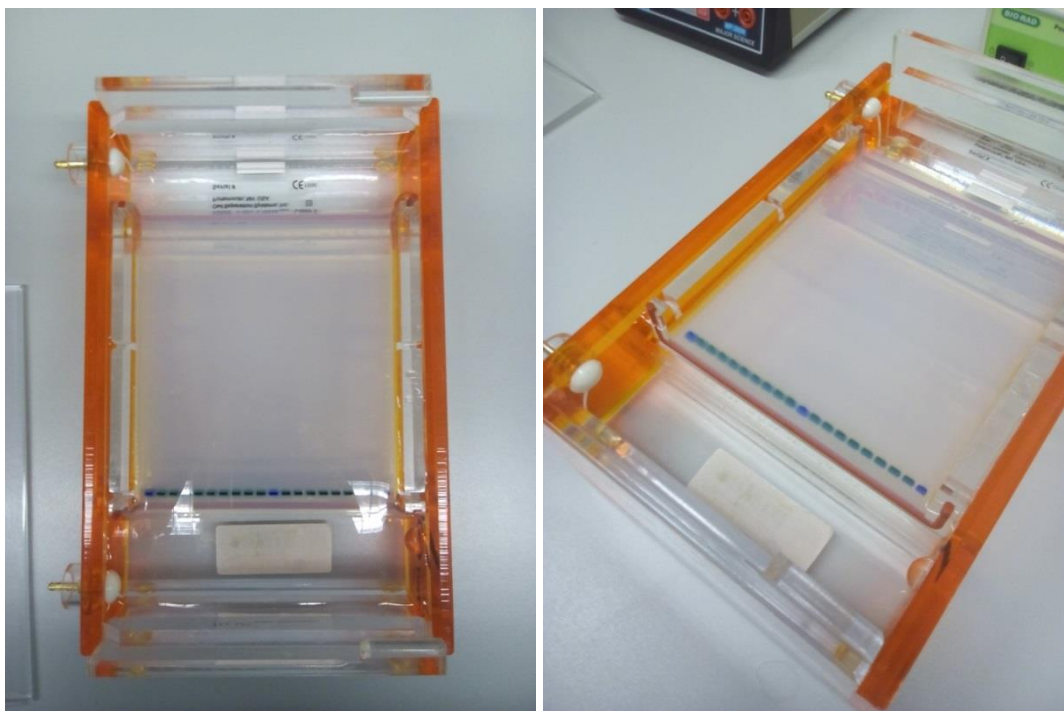
Příloha 17 *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (vlevo) a *Escherichia coli* 3954 (vpravo)
(TSA, 30 °C/24 h)



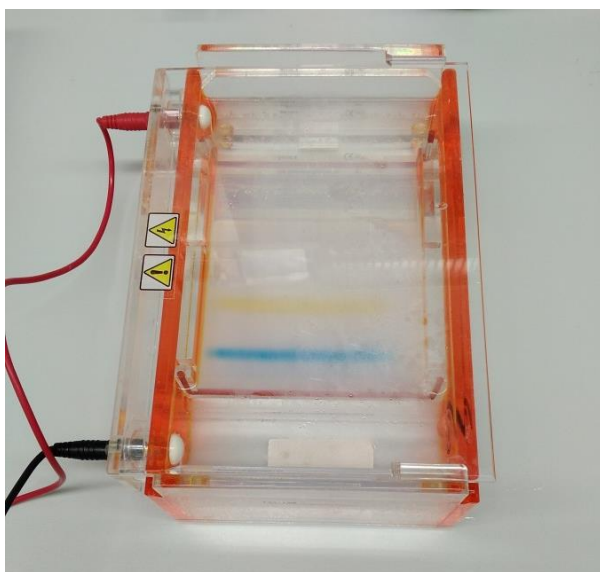
Příloha 18 *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050 (TSA, 30 °C/24 h)



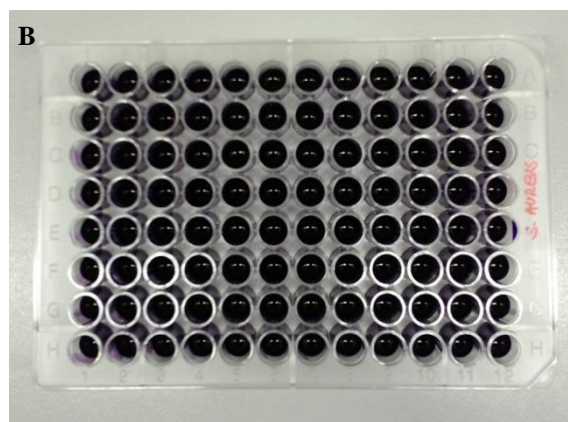
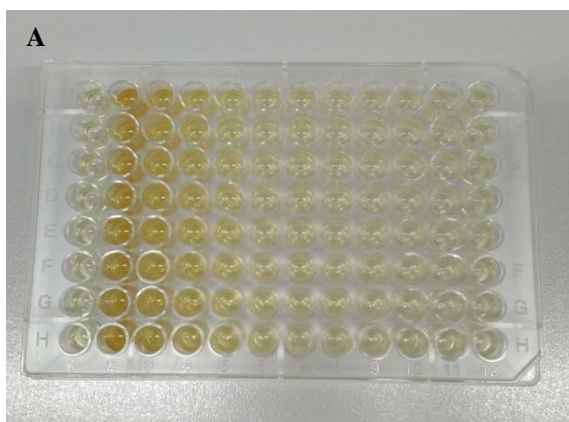
Příloha 19 Gelová elektroforéza – Příprava elektroforetické vany, pipetování vzorků



Příloha 20 Gelová elektroforéza – průběh separace



Příloha 21 Christensenova metoda pro detekci tvorby biofilmu



A – Mikrotitrační destička po kultivaci (24 h, 30 °C); **B** – Mikrotitrační destička po obarvení 1% krystalovou violetí; **C** – Mikrotitrační destička před výsledným spektrofotometrickým měřením vytvořeného biofilmu

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDELBAQI, K., MÉNARD, A., PROUZET-MAULEON, V., BRINGAUD, F., LEHOURS, P., MÉGRAUD, F. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007, **49** (3), 337-345.

ALISPAHIC, M., HUMMEL, K., JANDRESKI-CVETKOVIC, D., NÖBAUER, K., RAZZAZI-FAZELI, E., HESS, M., HESS, C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology.* 2010, **59**, 295-301.

ALMEIDA, N. F., YAN, S., CAI, R., CLARKE, C. R., MORRIS, C. E., SCHAAD, N. W., SCHUENZEL, E. L., LACY, G. H., SUN, X., JONES, J. B., CASTILLO, J. A., BULL, C. T., LEMAN, S., GUTTMAN, D. S., SETUBAL, J. C., VINATZER, B. A. PAMDB, A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology.* 2010, **100**, 208-215.

AL-SOHAIBANI, S., MURUGAN, K. Anti-biofilm activity of *Salvadora persica* on cariogenic isolates of *Streptococcus mutans*: *in vitro* and molecular docking studies. 2012, **28** (1), 29-38.

ASKI, S., TABATABAIE, M., KHOSHBAKHT, R., RAEISI, M. Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. isolated from cattle and sheep in Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2016, **44**, 37-40.

BABRA, CH., TIWARI, J. G., PIER, G., THEIN, T. H., SUNAGAR, R. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiologica.* 2013, **58**, 469-74.

BALOWS, A., HAUSLER, W. J., HERMANN, K. L., ISENBERG, H., SHADOMY, H. J. Manual of Clinical Microbiology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1991, **33** (6), 442.

BARBUDDHE, S., B., MAIER, T., SCHWARZ, G., KOSTRZEWA, M., HOF, H., DOMANN, E., CHAKRABORTY, T., HAIN, T. Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2008, **74** (17), 5402-5407.

BÁRTOVÁ, E. PCR (polymerázová řetězová reakce). Poslední revize 2011. Dostupné z http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz.

BEDNÁŘ, M. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1.vyd. Praha: Marvil. 1996. ISBN 8023802976.

BELAABED, R., ELABED, S., ADDAOU, A., LAAJAB, A., RODRÍGUEZ, M., A., LAHSINI, A. Synthesis of LTA zeolite for bacterial adhesion. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2016, **55** (4), 152-158.

BERTELLI, C., GREUB, G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical mikrobiologie. *Clin Microbiol Infect*. 2013, **19**, 803-813.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2013, **121**, 1-58.

BLACKBURN, C., MCCLURE P. J. Foodborne Pathogens, Hazards, Risk Analysis and Control. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. 2009, 1232, Electronic ISBN: 9781845696337.

BOLTON, D., J. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*. 2015, **48**, 99-108.

BORUCKI, M. K., PEPPIN, J. D., WHITE, D. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, **69** (12), 7336-7342.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of food Microbiology*. 2004, **94**, 223-253.

- CARPENTIER, B., CERF, O.** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993, **75**, 499-511.
- COLLADO, L., FIGUERAS, M. J.** Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, **24** (1), 174-192.
- COLLADO, L., GUARRO, J., FIGUERAS, M. J.** Prevalence of *Arcobacter* in Meat and Shellfish. *Journal of Food Protection*. 2009, **72**, 1102-1106.
- COSTERTON, J. W.** Biofilms. *Microbial Elsevier*. 2009, 183-188.
- COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., CHENG, K. J.** How bacteria stick. *Scientific American*. 1978, **238** (1), 86-95.
- COWAN, M., M.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**, (4), 564-582.
- ČERVENKA, L., PEŠKOVÁ, I., FOLTÝNOVÁ, E., PEJCHALOVÁ, M., BROŽKOVÁ, I., VYTRÁSOVÁ, J.** Inhibitory Effects of Some Spice and Herb Extracts Against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*. *Current Microbiology*. 2006, **53** (5), 435-439.
- DAINTITH, J., MARTIN, E.** Dictionary of Science (6th Edition). 2010, 647-650. Electronic ISBN 978-1-61583-540-9.
- DAUTLE, M. P., WILKINSON, T. R., GAUDERER, M. W. L.** Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *Journal of Pediatric Surgery*. 2003, **38** (2), 216-220.
- DE, M., DE, A. K., SEN, P. BANERJEE, A. B.** Antimicrobial Properties of Star Anise (*Illicium verum* Hook f). *PHYTOTHERAPY RESEARCH*. 2002, **16**, 94-95. DOI: 10.1002/ptr.989.
- DONLAN, R. M.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002, **8** (9), 881-890.
- DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W.** Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, **15** (2), 167-193.

- DOUIDAH, L., DE ZUTTER, L., BARÉ, J., DE VOS, P., VANDAMME, P., VANDENBERG, O., A-M., VAN DEN ABEELE, HOUF, K.** Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, **50** (3), 735-741.
- DUAN, L., TAO, H-W., HAO, X-J., GU, Q-Q., ZHU, W-M.** Cytotoxic and antioxidative phenolic compounds from the traditional Chinese medicinal plant, *Myristica fragrans*. *Planta Med*. 2009, **75** (11), 1241-1245.
- DUARTE, A., ALVES, A. C. FERREIRA, S., SILVA, F., DOMINIQUES, F. C.** Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*. 2015, **77**, 244-250.
- DUFOUR, D., LEUNG, V., LÉVESQUE, C. M.** Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2010, **22** (1), 2-16.
- DUNNE, W. M.** Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, **15** (2), 155-166.
- EMANEINI, M., JABALAMELI, F., MIRSALEHIAN, A., GHASEMI, A., BEIGVERDI, R.** Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance pattern and clonal complexes of group B streptococci isolated from neonates. *Microbial Pathogenesis*. 2016, **99**, 119-122.
- FALLAS-PADILLA, L., K., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C., E., JARAMILLO, H., F., ECHANDI, M. L. A.** *Arcobacter*: Comparison of Isolation Methods, Diversity, and Potential Pathogenic Factors in Commercially Retailed Chicken Breast Meat from Costa Rica. *Journal of Food Protection*. 2014, **77** (6), 880-884.
- FERNÁNDEZ, H., KRAUSE, S., VILLANUEV, M., P.** *ARCOBACTER BUTZLERI* AN EMERGING ENTEROPATHOGEN: COMMUNICATION OF TWO CASES WITH CHRONIC DIARRHEA. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004, **35**, 216-218, ISSN 1517-8382.

- FERREIRA, S., FRAQUEZA, M. J., QUEIROZ, J. A., DOMINGUES, F., C., OLEASTRO, M.** Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, **162**, 82-88.
- FERREIRA, S., QUEIROZ, J. A., OLEASTRO, M., DOMINGUES, F., C.** Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*. 2014, **76**, 19-25.
- FLEMMING, H. C., WINGENDER, J.** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010, **8**, 623-633.
- GENG, Y., LIU, J., LV, R., YUAN, J., LIN, Y., WANG, X.** An efficient method for extraction, separation and purification of eugenol from *Eugenia caryophyllata* by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*. 2007, **57** (2), 237-241.
- GIACOMETTI, F., SERRAINO, A., MARCHETTI, G., BONERBA, E., FLORIO, D., BONFANTE, E., ZANONI, R. G., ROSMINI, R.** Isolation of *Arcobacter butzleri* in environmental and food samples collected in industrial and artisanal dairy plants. *Italian Journal of Food Safety*. 2013, **2**, 121-123.
- GIRBAU, C., GUERRA, C., MARTÍNEZ-MALAXETXEARRIA, I., ALONSO, R., FERNÁNDEZ-ASTORGA, A.** Prevalence of ten putative virulence genes in the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* isolated from food products. *Food Microbiology*. 2015, **52**, 146-149.
- GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ-TOMÉ, S., GARCÍA, T., MARTÍN, R.** Genus-specific PCR assay for screening *Arcobacter* spp. in chicken meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, **94** (6), 1218-1224.
- GOVAN, J. R., DERETIC, V.** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews*. 1996, **60** (3), 539-574.

- GRANT, K. A., BELANDJA, I. U., DEKKER, N., RICHARDSON, P. T., PARK, S. F.** Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and Immunity*. 1997, **65** (4), 1172-1180.
- GRIFFITHS, M.** Understanding Pathogen Behaviour - Virulence, Stress Response and Resistance. *Elsevier*. 2005, 99-114, 549-596. Electronic ISBN 978-1-84569-022-9.
- GRINSTEAD, D.** Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. In: *Biofilms in Food and Beverage Industries*. 2009, 331-358.
- GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T.** Antibiotics: Therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química Nova*. 2010, **33** (3), 667-679.
- HENRICI, A. T.** Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology*. 1933, **25**, 277-287.
- HEUKELEKIAN, H., HELLER, A.** Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*. 1940, **40**, 547-558.
- HO, T. K. H., LIPMAN, L. J. A., GAASTRA, W.** *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*. 2006, 1-13.
- HOGAN, D. A., VIK, A., KOLTER, R.** A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology*. 2004, **54**, 1212-1223.
- HUONGA, T., KOMÍNKOVÁ, M., GURÁŇA, R., RUTTKAY-NEDECKÝ, B., KOPEL, P., TRNKOVÁ, L., ZÍTKA, O., Adama, V., KIZEK, R.** Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, **1**, 64-66.
- HUTCHISON, C., A.** DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35** (18), 6227-6237.
- CHAE, M. S., SCHRAFT, H.** Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, **62** (1-2), 103-111.

CHARLES, D. J. Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. *Springer Science+Business Media New York*. 2013, 165-169; 245-255. DOI 10.1007/978-1-4614-4310-0_1.

CHMIELEWSKI, R. A. N., FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2003, **2**, 22-32.

CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., BADDOUR, L. M., BARRETT, F. F., MELTON, D. M., BEACHEY, E. H. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *Journal of clinical mikrobiology*. 1985, **22** (6), 996-1006.

CHUNG, J., Y., CHOO, J., H., LEE, M., H., HWANG, J., K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*. 2006, **13** (4), 261-266.

IFIS (International Food Information Service). *Dictionary of Food Science and Technology* (2nd Edition). 2009. Dostupné z <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDFSTE001/dictionary-food-science/dictionary-food-science>

INOUE, A., MURATA, Y., TAKAHASHI, H., FUJISAKI, S., KATO, J. Involvement of an essential gene, mviN, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2008, **190** (21), 7298-7301.

IRKIN, R., ABABY, S., AYDIN, F. Inhibitory Effects of Some Plant Essential Oils Against *Arcobacter butzleri* and Potential for Rosemary Oil as a Natural Food Preservative. *Journal of Medicinal Food*. 2011, **14** (3), 291-296.

ISTIVAN, T. S., COLOE, P. J. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology*. 2006, **152**, 1263-1274.

KALENDAR, R. FastPCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm

- KANATT, S., R. CHAWLA, S. P., SHARMA, A.** Antioxidant and radio-protective activities of lemon grass and star anise extracts. *Food Bioscience*. 2014, **6**, 24-30.
- KEEN, E.** Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease. *Frontiers in Cellular and Infection Mikrobiology*. 2012, **161** (2), 2235-2988.
- KJELDGAARD, J., JÖRGENSEN, K., INGMER, H.** Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, **131**, 256-259.
- KOKARE, C. R., CHAKRABORTY, S., KHOPADE, A. N., MAHADIK, K. R.** Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*. 2009, **8**, 159-168.
- KONKEL, M. E., CHRISTENSEN, J. E., KEECH, A. M., MONTEVILLE, M. R., KLENA, J. D., GARVIS, S. D.** Identification of a fibronectin-binding domain within the *Campylobacter jejuni cadF* protein. *Molecular Microbiology*. 2005, **57** (4), 1022-1035.
- KOUBKOVÁ, L., VOJTĚŠEK, B., VYZULA, R.** Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin Onkol*. 2014, **27** (1), 61-68.
- LAISHRAM, M., RATHLAVATH, S., LEKSHMI, M., KUMAR, S., NAYAK, B. B.** Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from fresh seafood and the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **232**, 87-89.
- LEE, JY., PARK, W.** Anti-inflammatory effect of myristicin on RAW 264.7 macrophages stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Molecules*. 2011, **16** (8), 7132-7142.
- LEWIS, K.** Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, **64** (3), 503-514.
- LEWIS, K.** Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, **45** (4), 999-1007.
- MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., MONCANY, M.** Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2002, **16**, 47-51.

- MILLER, W. G., PARKER, T. C., RUBENFIELD, M., MENDZ, G. L., WÖSTEN, M. M. S. M., USSERY, D. W., STOLZ, J. F., BINNEWIES, T. T., HALLIN, P. F., WANG, G., MALEK, J. A., ROGOSIN, A., STANKER, L., H., MANDRELL, R. E.** The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLOS ONE*. 2007, **2** (12). Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001358>.
- MILLER, W. G., WESLEY, I. V., ON, S. L. W., HOUF, K., MÉGRAUD, F., WANG, G., YEE, E., SRIJAN, A., MASON, C. J.** First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC Microbiology*. 2009, **9** (196).
- MILLER, M. B., BASSLER, B. L.** Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2001, **55** (1), 165-199.
- MONTEVILLE, M. R., YOON, J. E., KONKEL, M. E.** Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the *cadF* outer membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*. 2003, **149**, 153-165.
- MOTARJEMI, Y., ADAMS, M.** Emerging Foodborne Pathogens. 2006, 181-221. Electronic ISBN 978-1-84-569139-4.
- MOTARJEMI, Y., MOY, G., TODD, E.** Encyclopedia of food safety. *Elsevier*. 2014, 344-346, 369-380. ISBN 978-0-12-378613-5.
- NICHOLS, W. W., DORRINGTON, S. M., SLACK, M. P., WALMSLEY, H. L.** Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988, **32** (4), 518-523.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER R.** Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 2000, **54** (1), 49-79.
- ON, S., L., W., STACEY, A., SMYTH, J.** Isolation of *Arcobacter butzleri* from a Neonate with Bacteraemia. *Journal of Infection*. 1995, **31**, 225-227.
- PALMA, N., GOMES, C., RIVEROS, M., GARCÍA, W., MARTÍNEZ-PUCHOL, S., RUIZ-ROLDÁN, L., MATEU, J., GARCÍA, C., JACOBS, J., OCHOA, T. J., RUIZ, J.** Virulence factors profiles and ESBL production in *Escherichia coli* causing bacteremia in Peruvian children. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016, **86** (1), 70-75.

- PAP, K., KISKO, G.** Efficacy of disinfectants against static biofilms on stainless steel surface. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science*. 2008. Electronic ISSN 1588-2535.
- PARKAR, S. G., FLINT, S. H., BROOKS, J. D.** Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, **96** (1), 110-116.
- PENTIMALLI, D., PEGELS, N., GARCÍA, T., MARTÍN, R., GONZÁLEZ, I.** Specific PCR Detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in Chicken Meat. *Journal of Food Protection*, 2009, **72** (7), 1491-1497.
- PEREIRA-MEDRANO, A. G., KNIGHTON, M., FOWLER, G. J. S., LER, Z. Y., PHAM, T. K., OW, S. Y., FREE, F., WARD, B., WRIGHT, P. C.** Quantitative proteomic analysis of the exoelectrogenic bacterium *Arcobacter butzleri* ED-1 reveals increased abundance of a flagellin protein under anaerobic growth on an insoluble electrode. *Journal of proteomics*. 2013, **78**, 197-210.
- PÉREZ-LOSADA, M., ARENAS, M., CASTRO-NALLAR, M.** Multilocus Sequence Typing of Pathogens: Methods, Analyses, and Applications. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)*. 2017, 383-404.
- PHILLIPS, C. A.** *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. *Trends in Food Science & Technology*. 2001, **12**, 263-275.
- PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P.,** Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*. 2006, **124**, 715-727.
- PLAKUNOV, V. K., STRELKOVA, E. A., ZHURINA, M. V.** Persistence and adaptative mutagenesis in biofilms. *Microbiology*. 2010, **79**, 424-434.
- QUIEL, A., JÜRGEN, B., PIECHOTTA, G., LE FOLL, A., P., ZIEBANDT, A., K., KOHLER, C., KÖSTER, D., ENGELMANN, S., ERCK, C., HINTSCHE, R., WEHLAND, J., HECKER, M., SCHWEDER, T.** Electrical protein array chips for the detection of staphylococcal virulence factors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010, **85**, 1619-1627.

- READING, N. C., SPERANDIO, V.** Quorum sensing: the many languages of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014, **105** (2), 289-305.
- RICKE, S. C., DONALDSON, J. R., PHILLIPS, C. A.** Food Safety - Emerging Issues, Technologies, and Systems. 2015, 235-263. Electronic ISBN 978-0-12800-404-3.
- ROBINSON, R., K.** Encyclopedia of Food Microbiology. *Elsevier*. 2000, **1-3**, 252-258. Electronic ISBN 978-0-08-052359-0.
- SALAS-MASSO, N., ANDREE, K. B., FURONES, M. D., FIGUERAS, M. J.** Enhanced recovery of *Arcobacter* spp. using NaCl in culture media and re-assessment of the traits of *Arcobacter marinus* and *Arcobacter halophilus* isolated from marine water and shellfish. *Science of the Total Environment*. 2016, **566–567**, 1355-1361.
- SANDASI, M., LEONARD, V., M., VILJOEN, A., M.** The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, **50** (1), 30-35.
- SEDLÁČEK, I.** Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 2006, 270, ISBN 80-210-4207-9.
- SHAH, A. H., SALEHA, A. A., ZUNITA, H., MURUGAIYAH, M.** *Arcobacter* - An emerging threat to animals and animal origin food products? *Trends Food Sci. Technol.* 2011, **22**, 225-236.
- SHARMA, I. M., PETCHIAPPAN, A., CHATTERJI, D.** Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role of c-di-gmp and methods to study this second messenger. *IUBMB Life*. 2014, **66** (12), 823-834.
- SHROUT, J. D., NERENBERG, R.** Monitoring bacterial twitter: Does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? *Environmental Science and Technology*. 2012, **46** (4), 1995-2005.
- SCHINDLER, J.** Ze života bakterií. Praha: Academia. 2008. ISBN 978-80-200-1666-9.
- SCHUSTER, S., C.** Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*. 2008, **5** (1), 16-18.

- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002, **28** (1), 12-55.
- STEGLICH, W., FUGMANN, B., LANG-FUGMANN, S. RÖMPP** Encyclopedia Natural Products. *Thieme Medical Publishers Inc.* 2000, 220. Electronic ISBN 978-1-62198-379-8.
- STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., SAVIĆ, B., ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000, **40** (2), 175-179.
- STEWART, P. S., FRANKLIN, M. J.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, **6** (3), 199-210.
- SUTHERLAND, I.** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001, **147**, 3-9.
- SZCZUKA, E., URBANSKA, K., PIETRYKA, M., KAZNOWSKI, A.** Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiologica*. 2013, **58** (1), 47-52.
- ŠILHA D., HRUŠKOVÁ, L., BROŽKOVÁ, I., MOŤKOVÁ, P., VYTRÁSOVÁ J.** Survival of selected bacteria from the genus *Arcobacter* on various metallic surfaces. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2014, **53** (3), 217-223.
- ŠILHA, D., ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ, L., VYTRÁSOVÁ, J.** Modified isolation method of *Arcobacter* spp. from different environmental and food samples. *Folia Microbiologica*. 2015, **60** (6), 515-521.
- ŠILHOVÁ, L., MOŤKOVÁ, P., ŠILHA, D., VYTRÁSOVÁ, J.** Fish detection of *Campylobacter* and *Arcobacter* adhered to stainless steel coupons. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2015, **4** (4): 347-351.
- ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ, L., MOŤKOVÁ, P., ŠILHA, D., VYTRÁSOVÁ, J.** Hodnocení tvorby biofilmu vybraných patogenů vyskytujících se v potravinářském průmyslu. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. 2015, **64** (3), 169-174.
- TABATABAEI M., ASKI, H. S., SHAYEGH, H., KHOSHBAKHT, R.** Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis*. 2014, **66**, 1-4.

TIAN, S., TORRES, R., BALLESTER, A-R., LI, B., VILANOVA, L., GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: Virulence and resistance. *Postharvest Biology and Technology*. 2016, **122**, 11-21.

VEENING, J. W., SMITS, W. K., KUIPERS, O. P. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2008, **62** (1), 193-210.

WANG, G. W., HU, W-T., HUANG, B-K, QIN, L-P. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, **136** (1), 10-20.

WATERS, CH. M., BASSLER, B. L. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005, **21** (1), 319.

WATSON, R. R., PREEDY, V. R. Genetically Modified Organisms in Food - Production, Safety, Regulation and Public Health. *Elsevier*. 2016, Electronic ISBN 978-0-12802-530-7.

WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, J., CLOUTIER, M., TOPP, E., LAPENA, D. R., TALBOT, G., VILLERMUR, R., KHAN, I. U. H. Development and evaluation of multiplex PCR assays for rapid detection of virulence-associated genes in *Arcobacter* species. *Journal of Microbiological Methods*. 2016, **121**, 59-65.

WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, K., WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, J., CLOUTIER, M., TAMBONG, J. T., XU, R., TOPP, E., ARTS, M. T., CHAO, J., ADAM Z., LÉVESQUE, C. A., LAPEN, D. R., VILLEMUR, R., KHAN, I. U. H. Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*. 2016, **39**, 93-99.

www.webozdravi.cz

<http://www.webozdravi.cz/zelena-lekarna/hrebicek-koreni-ktere-plati-na-bolave-zuby>

(Staženo dne 1. 2. 2017)

www.daryodprirody.cz

<http://daryodprirody.cz/badyan-badyanik-pravy-badyan-fructus/> (Staženo dne 1. 2. 2017)

www.rehabilitace.info

<http://www.rehabilitace.info/bylinky/muskatovy-orech-a-zdravi-na-zanicene-dasne-usinani-i-revmatismu/> (Staženo dne 1. 2. 2017)

www.ncbi.nlm.nih.gov

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> (Stáženo dne 11. 12. 2016)

www.ncbi.nlm.nih.gov

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=28196>

YE, Y., LI, H., LING, N., HAN, Y., WU, Q., XU, X., JIAO, R., GAO, J. Identification of potential virulence factors of *Cronobacter sakazakii* isolates by comparative proteomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **217**, 182-188.

YESILMEN, S., VURAL, V., ERKAN, M. E., YILDIRIM, I. H. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, **188**, 11-14.

ZOBELL, C. E. The influence of solid surface upon the physiological activities of bacteria in seawater. *Journal of Bacteriology*. 1937, **33**, 86.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*. 1994, **23** (2), 125-148.