

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

**Katedra biologických a biochemických věd**

**Tvorba biofilmů u klinicky významných bakterií čeledi *Campylobacteracea***

Bc. Sabina Sirotková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Sabina Sirotková**  
Osobní číslo: **C17453**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Tvorba biofilmů u klinicky významných bakterií čeledi  
*Campylobacteraceae***  
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 bakteriálním rodu *Campylobacter* a *Arcobacter*.
2. Zpracujte literární rešerši na téma mikrobiální biofilmy.

#### Experimentální část:

1. Vybrané kmeny arkobakterů a kampylobakterů vyšetřete z hlediska tvorby biofilmu Christensenovou metodou na různých materiálech - na plastu (mikrotitrační destičky) a na skle (zkumavky).
2. Tvorbu biofilmů zhodnoťte i z hlediska různých vnějších podmínek.
3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte a jednotlivé testované kmeny srovnajte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

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

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Karolína Morávková**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

**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 8. 5. 2019

.....

Bc. Sabina Sirotková

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Šilhovi Ph.D. a konzultantce Mgr. Karolíně Morávkové za odborné vedení, ochotu, cenné rady a pomoc při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svým blízkým, především rodině a svému příteli, za jejich psychickou a finanční podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá tvorbou biofilmu u klinicky významných bakterií čeledi *Campylobacteraceae*. Teoretická část se zabývá bakteriemi rodu *Campylobacter* a *Arcobacter*, definicí biofilmu, jeho strukturou a tvorbou. Praktická část se zabývá sledováním tvorby biofilmu u kampylobakterů a arkobakterů s využitím Christensenovy metody. Tvorba biofilmu byla sledována na plastových mikrotitračních destičkách a ve skleněných zkumavkách.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

biofilm, *Campylobacter*, *Arcobacter*, Christensenova metoda

## **TITLE**

Biofilm formation in clinical important bacteria of the *Campylobacteraceae* family

## **ANNOTATION**

This work is focused on biofilm formation in clinical important bacteria of the *Campylobacteraceae* family. The theoretical part is focused on bacteria of genus *Campylobacter* and *Arcobacter*, definition of biofilm, its structure and formation. The practical part is focused on the monitoring of biofilm formation by *Campylobacter* and *Arcobacter* using the Christensen method. Biofilm formation was monitored on plastic microtiter plates and in glass tubes.

## **KEYWORDS**

biofilm, *Campylobacter*, *Arcobacter*, Christensen method

# OBSAH

<b>0 ÚVOD</b> .....	15
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	16
<b>1.1 Čeleď <i>Campylobacteraceae</i></b> .....	16
1.1.1 Rod <i>Campylobacter</i> .....	16
1.1.1.1 Charakteristika a morfologie bakterií rodu <i>Campylobacter</i> .....	16
1.1.1.2 Taxonomie kampylobakterů .....	17
1.1.1.3 Izolace a kultivace kampylobakterů .....	18
1.1.1.4 Biochemické vlastnosti bakterií <i>Campylobacter</i> .....	18
1.1.1.5 Patogenita, patogeneze a antigenní struktura.....	19
1.1.1.6 Výskyt kampylobakterů .....	20
1.1.2 Rod <i>Arcobacter</i> .....	20
1.1.2.1 Historie rodu <i>Arcobacter</i> .....	20
1.1.2.2 Charakteristika a morfologie .....	20
1.1.2.3 Taxonomie arkobakterů .....	20
1.1.2.4 Kultivace .....	21
1.1.2.5 Biochemické vlastnosti rodu <i>Arcobacter</i> a jejich citlivost .....	21
1.1.2.6 Patogenita a patogeneze arkobakterů .....	21
1.1.2.7 Výskyt arkobakterů .....	21
<b>1.2 Mikrobiální biofilm</b> .....	23
1.2.1 Bakteriální biofilm .....	23
1.2.1.1 Historie bakteriálního biofilmu .....	24
1.2.1.2 Struktura biofilmu .....	24
1.2.1.3 Formování biofilmu .....	26
1.2.1.4 <i>Quorum sensing</i> .....	27

1. 2. 1. 5 Vlastnosti povrchů pro růst biofilmu .....	28
1. 2. 1. 6 Výskyt biofilmů .....	28
1. 2. 1. 7 Biofilm kampylobakterů a arkobakterů .....	29
1. 2. 2 Biofilm kvasinek .....	32
1. 2. 3 Biofilm plísní .....	33
<b>1. 3 Testování tvorby biofilmu .....</b>	<b>35</b>
1. 3. 1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách .....	35
1. 3. 2 Christensenova metoda ve zkumavkách .....	35
1. 3. 3 Kultivace na agaru s kongo-červení .....	35
1. 3. 4 Mikroskopické metody .....	36
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
<b>2. 1 Použité chemikálie, živné půdy, přístroje a pomůcky .....</b>	<b>37</b>
2. 1. 1 Chemikálie .....	37
2. 1. 2 Technické vybavení .....	37
2. 1. 3 Pomůcky .....	38
2. 1. 4 Živná média a použité roztoky .....	38
<b>2. 2 Použité bakteriální kmeny .....</b>	<b>39</b>
<b>2. 3 Pracovní postupy .....</b>	<b>40</b>
2. 3. 1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách .....	40
2. 3. 2 Christensenova metoda ve zkumavce .....	41
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
<b>3. 1 Tvorba biofilmu na plastu (mikrotitrační destičky) .....</b>	<b>43</b>
3. 1. 1 Tvorba biofilmu na plastu u arkobakterů .....	43
3. 1. 2 Tvorba biofilmu na plastu u kampylobakterů .....	54
<b>3. 2 Tvorba biofilmu na skle (zkumavky) .....</b>	<b>57</b>
3. 2. 1 Tvorba biofilmu na skle u arkobakterů .....	57



3. 2. 2 Tvorba biofilmu na skle u kampylobakterů.....	61
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>63</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>65</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Nárůst kolonii Campylobacter spp. na CCDA</i> .....	18
Obrázek 2 <i>Vývojová stádia tvorby biofilmu</i> .....	27
Obrázek 3 <i>Biofilm tvořený Campylobacter jejuni</i> .....	30
Obrázek 4 <i>Tvorba biofilmu na různých površích</i> .....	31
Obrázek 5 <i>Biofilm kvasinky Candida albicans</i> .....	33
Obrázek 6 <i>Biofilm plísně Aspergillus oryzae</i> .....	34
Obrázek 7 <i>Tvorba biofilmu ve skleněné zkumavce u kmene Arcobacter defluvii LMG 25694</i> .....	60

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 <i>Taxonomické zařazení rodu Campylobacter</i> .....	17
Tabulka 2 <i>Přehled bakteriálních kmenů rodu Arcobacter a Campylobacter</i> .....	40
Tabulka 3 <i>Rozmezí hodnot <math>A_{595}</math> a výsledek tvorby biofilmu</i> .....	43
Tabulka 4 <i>Tvorba biofilmů (hodnoty <math>A_{595}</math>) bakterií Arcobacter spp.</i> .....	44 - 46
Tabulka 5 <i>Tvorba biofilmů (hodnoty <math>A_{595}</math>) rodu Campylobacter spp.</i> .....	54
Tabulka 6 <i>Tvorba biofilmu kmenů rodu Arcobacter na skleněném povrchu</i> .....	57 - 59
Tabulka 7 <i>Tvorba biofilmu kmenů rodu Campylobacter na skleněném povrchu</i> .....	61

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter butzleri za různých podmínek (24 h kultivace)</i> .....	48
Graf 2 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter butzleri za různých podmínek - pokračování (24 h kultivace)</i> .....	48
Graf 3 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter cryaerophilus za různých podmínek (24 h kultivace)</i> .....	49
Graf 4 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter skirrowii, Arcobacter defluvii, Arcobacter thereius a Arcobacter lanthieri za různých podmínek (24 h kultivace)</i> .....	49
Graf 5 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter butzleri za různých podmínek (72 h kultivace)</i> .....	51
Graf 6 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter butzleri za různých podmínek – pokračování (72 h kultivace)</i> .....	51
Graf 7 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter cryaerophilus za různých podmínek (72 h kultivace)</i> .....	52
Graf 8 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Arcobacter skirrowii, Arcobacter defluvii, Arcobacter thereius a Arcobacter lanthieri za různých podmínek (72 h kultivace)</i> .....	52
Graf 9 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Campylobacter za různých podmínek (24 h kultivace)</i> .....	55
Graf 10 <i>Tvorba biofilmu u kmenů Campylobacter za různých podmínek (72 h kultivace)</i> .....	56

# SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

*A. – Arcobacter*

ATB – Antibiotika

BHI – Mozkosrdcová infuze

*C. – Campylobacter*

CAT – Kultivační agar s cefoperazonem, amfotericinem a teikoplaninem

CCDA – Kultivační agar s cefoperazonem, dřevěným uhlím a deoxycholátem sodným

CCM – Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

CCUG – Sběrka mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku

CDT – Cytoletální distendní toxin

CFU – Kolonie tvořící jednotka

CIN – Kultivační agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem

CLSM – Konfokální laserová skenovací mikroskopie

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

EPS – Extracelulární polymerní substance

GIT – Gastrointestinální trakt

LMG – Sběrka mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii

McF – Stupnice dle McFarlanda

MS – Microsoft

MTD – Mikrotitrační destička

NP – Pardubická nemocnice

NS – Svitavská nemocnice

ONN – Oblastní nemocnice Náchod, a.s.

PCR – Polymerázová řetězová reakce

*QS – Quorum sensing*

TSA – Trypton sojový agar

TSB – Trypton sojový bujón

UPa – Interní sbírka mikroorganismů Univerzity Pardubice

USA – Spojené státy americké

UV záření – Ultrafialové záření

## 0 ÚVOD

Diplomová práce se věnuje tvorbě biofilmu u klinicky významných bakterií čeledi *Campylobacteraceae*. Do této čeledi patří rod mj. *Campylobacter* a *Arcobacter*, což jsou gram-negativní bakterie. Jde o tyčinkovité buňky zahnuté do tvaru písmene S. Nejlépe tyto mikroorganismy rostou v aerobním, popř. mikroaerofilním prostředí. Tyto mikroby nejsou přirozenou součástí mikroflóry u člověka, ale při napadení je můžeme nacházet na sliznici ve střevech, urogenitálním traktu a v dutině ústní u člověka, dále u zvířat, ve vodě.

Bakterie v našem okolí mohou žít v planktonní formě nebo adherovat k povrchům a tvořit biofilm. Biofilm je tedy společenství mikroorganismů, které bakteriím přináší určité výhody. Tomuto způsobu života dává přednost většina bakterií. Typickými zástupci žijící v podobě biofilmu jsou stafylokoky, streptokoky, enterokoky, ale také bakterie rodu *Campylobacter* a *Arcobacter*. V potravinářském průmyslu či zdravotnictví představuje biofilm vážný problém.

K průkazu tvorby biofilmu se nejvíce využívá Christensenova metoda v mikrotitrační plastové destičce nebo ve zkumavkách, což bylo použito i v této studii. Dále lze využít kultivaci na agaru s kongo-červení či mikroskopické metody.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1. 1 Čeleď *Campylobacteraceae*

První sledování spirálovitě stočených mikroorganismů proběhlo již v roce 1886 Theodorem Escherichem (Nachamkin et al., 2008). K první izolaci těchto bakterií však došlo na počátku 20. století a pozorované bakterie byly nejdříve pojmenovány *Vibrio fetus*. V následujících letech se sledovaly další podobné organismy. V roce 1963 byly tyto bakterie zařazeny do nového rodu *Campylobacter* (Vandamme and De Ley, 1991).

Do čeledi *Campylobacteraceae* se řadí tyto rody *Campylobacter*, *Arcobacter* a *Sulfurospirillum*. Bakterie vykazují gram-negativní charakter, netvoří spory a rostou v mikroaerofilním prostředí. Tyčinkovité buňky mají typické zahnutí buněk do tvaru písmene S nebo do spirály. Kamylobaktery řadíme k nejrychleji se pohybujícím bakteriím, a to díky polárnímu bičíku na jednom či obou koncích buňky (Nachamkin et al., 2008).

Typický je pro tyto mikroorganismy růst v mikroaerofilním prostředí, u některých druhů je ale růst lepší v aerobních či anaerobních podmínkách. Příznačná růstová teplota je 30-37 °C. Nejlepší nárůst je v atmosféře s 5-10 % CO<sub>2</sub> a 3-5 % O<sub>2</sub> (Blackburn and McClure, 2009). Bakterie vytváří ploché, lesklé kolonie, mohou ale růst i v atypicky vypadajících koloniích (Doyle and Buchanan, 2013; Blackburn and McClure, 2009).

Bakterie čeledi *Campylobacteraceae* získávají energii metabolizováním aminokyselin a karboxylových kyselin. Energií nezískávají ze sacharidů. Tyto mikroorganismy vykazují přítomnost enzymů oxidáza a kataláza, redukují dusičnany a fumarát, produkují indol (Nachamkin et al., 2008).

Mikroorganismy rodů *Campylobacter* a *Arcobacter* jsou bakterie, které nejsou přirozenou součástí mikroflóry u člověka, při infekci je však nacházíme na slizniční vrstvě střev, urogenitálního traktu a ústní dutiny u člověka. Záchyt je zaznamenán také u zvířat (např. u skotu, prasat, ovcí, drůbeže) a v živočišných produktech (např. mléko). Infikována může být povrchová a podzemní voda, odkud se nákaza dále šíří (Lastovica et al., 2014).

### 1. 1. 1 Rod *Campylobacter*

#### 1. 1. 1. 1 Charakteristika a morfologie bakterií rodu *Campylobacter*

Název *Campylobacter* pochází z řeckého slova *kampylos*, které se překládá jako zakřivený. Buňky jsou malých rozměrů a vykazují spirálovitý charakter. Jedná se o gram-negativní tyčinky



netvořící spory a vyžadují nejčastěji mikroaerofilní podmínky kultivace. Polární bičík dělá z těchto bakterií nejrychleji se pohybující. Přítomnost těchto mikroorganismů při infekcích je potvrzen ve střevech člověka, zvířat a ptáků. Řadí se tedy mezi střevní patogeny, jenž mohou způsobit gastroenteritidu (Ray, 2004).

### 1. 1. 1. 2 Taxonomie kampylobakterů

Do rodu *Campylobacter* patří v současné době 25 genotypicky homologních druhů, 2 prozatimní druhy a 8 poddruhů: *C. avium*, *C. canadensis*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointertinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari* subsp. *concheus*, *C. lari* subsp. *lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* bv. *faecalis*, *C. sputorum* bv. *paraureolyticus*, *C. sputorum* bv. *sputorum*, *C. subantarcticus*, *C. troglodytis*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. volucris*, *C. sp. Doplhin DP* a *C. sp. Prairie Dog* (Kaakoush et al., 2015). Taxonomické zařazení rodu *Campylobacter* je zaznamenáno v **Tabulce 1**.

<b>DOMÉNA</b>	<i>Bacteria</i>
<b>KMEN</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>TŘÍDA</b>	<i>Epsilon Proteobacteria</i>
<b>ŘÁD</b>	<i>Campylobacterales</i>
<b>ČELEĎ</b>	<i>Campylobacteraceae</i>
<b>ROD</b>	<i>Campylobacter</i>

**Tabulka 1** – Taxonomické zařazení rodu *Campylobacter* (převzato a upraveno dle Takamiva et al. 2011)

### 1. 1. 1. 3 Izolace a kultivace kamylobakterů

K izolaci kamylobakterů lze využít několik metod, např. filtrační metodu či kultivaci na selektivním médiu. Kamylobaktery vyžadují speciální podmínky ke kultivaci (Hochel, 2009). Nejlepší pro jejich růst je atmosféra s 5 % O<sub>2</sub>, 8 % CO<sub>2</sub> a 87 % N<sub>2</sub>, jde tedy o mikroaerofilní prostředí. Optimální teplota pro růst těchto bakterií je 42 °C, růst je možný ale i v rozmezí 32-45 °C. Růst kamylobakterů je pomalý oproti ostatním bakteriím (Ray, 2004). Kultivační média musí obsahovat zhašedla kyslíkových radikálů, což je např. krev či aktivní uhlí. Nežádoucí doprovodná mikroflóra je potlačena směsí antibiotik (Hochel, 2009). Bakterie musí odolávat celé řadě vnějších vlivů, přičemž k zásadním patří O<sub>2</sub>, NaCl, nízká hodnota pH, teplota pod 30 °C a vysychání. Za mrazírenských teplot buňky přežívají i několik měsíců (Ray, 2004). Kolonie se vyznačují velmi rozmanitým vzhledem a tvarem (Sweileh et al., 2016). Nejvíce využívané je médium dle Skirrowa, pro rutinní izolaci poté CCDA (Griffiths et al., 1990). Vzhled typických kolonií můžete vidět na **Obrázku 1**.



**Obrázek 1** – Nárůst kolonií *Campylobacter* spp. na CCDA (www.eolabs.com)

### 1. 1. 1. 4 Biochemické vlastnosti bakterií *Campylobacter*

U kamylobakterů mluvíme o chemoorganotrofním způsobu života. Nedokáží fermentovat ani oxidovat sacharidy, hydrolyzovat tyrosin, kasein, škrob ani želatinu. Hydrolyzovat hippurát umí pouze *Campylobacter jejuni*. Kamylobakterie mají pozitivní oxidázovou i katalázovou aktivitu (Hochel, 2009; Sweileh et al., 2016). Umí redukovat dusičnany, ale s dusitany si

neporadí. Žádný zástupce z rodu *Campylobacter* netvoří pigmenty (Hochel, 2009). Nedávné studie prokázaly schopnost některých izolátů *C. coli* transportovat a metabolizovat glukózu (Vorwerk et al., 2015).

### **1. 1. 1. 5 Patogenita, patogeneze a antigenní struktura**

U bakterií rodu *Campylobacter* je potvrzena celá řada faktorů virulence (Kaakoush et al., 2015). Velký vliv na kolonizaci střevní sliznice má pohyblivost bakterie. Díky bičíkům jsou kampylobakterie schopné překonat peristaltiku a uchytit se na sliznici (Habib et al., 2013). K přežití mikroorganismů napomáhá tvorba katalázy a superoxidodismutázy, dále také získání železa z transferinu a laktoferinu, jenž jsou obsaženy v séru a sliznicích hostitele (Kaakoush et al., 2015).

Velký význam má v ohledu patogenity toxin CDT (cytolethal distending toxin), jenž je produkován bakteriemi tohoto rodu. CDT je složen ze 3 toxinů (CdtA, CdtB, CdtC) s podobnou molekulární hmotností a působí na epitelální buňky, u kterých naruší absorpční funkci střev a vznikne průjem. Kampylobakterie dále produkují enterotoxin, Shiga toxin a hepatotoxin. U kampylobakterů je potvrzen výskyt genů virulence *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *ciaB*, *ciaC*, *FlaC*, *KpsM*, *KpsT*, *KpsE*, *pVIR*, *wlaN*, *iam*, *dnaJ*, *racR*, *bla<sub>OXA-61</sub>*, *tet(O)*, *aph-3-1* a *cmeB* (Kaakoush et al., 2015).

K nákaze člověka dojde nejčastěji požitím infikované potravy či vody, může k ní dojít ale také kontaktem s nakaženými zvířaty nebo sexuálním stykem. Standardním vstupem infekce je trávicí ústrojí (Wilson et al., 2008). V trávicí soustavě dochází k adhezi na epitelální buňky, bakterie do nich proniknou a začnou se množit uvnitř vakuol a zde poté produkují cytotoxin CDT. Epitelální buňky se poškodí a vzniká zánět, u kterého dochází ke ztrátám tekutin a vzniká průjem (Kaakoush et al., 2015). Infekce se může rozšířit i dále do těla, kdy bakterie pronikají do krevního oběhu (Wilson et al., 2008).

Klasickou infekční dávkou pro člověka je  $10^2 - 10^4$  buněk (Kaakoush et al., 2015). Takto vysoká infekční dávka je spojena s citlivostí bakterií rodu *Campylobacter* na nízké pH (Wilson et al., 2008). K nákaze jsou více náchylní oslabení jedinci. Inkubační doba trvá 24 – 48 hodin, může však trvat až 7 dní (Habib et al., 2013).

Membrána kampylobakterů obsahuje lipopolysacharidový a proteinový antigen (Ellström et al., 2013; Hoppe et al., 2013). Tento rod se dle Pennerova schématu rozlišuje do 65 sérotypů dle lipopolysacharidového antigenu. Dle Liorova schématu je zjištěno 110 sérotypů, což se dělí podle bičíkového proteinu (Pike et al., 2013).

### **1. 1. 1. 6 Výskyt kampylobakterů**

Největším rezervoárem kampylobakterií je zažívací trakt hospodářských zvířat, domácích mazlíčků, ptáků i člověka. Získat je lze ze syrových potravin živočišného původu, ale také zeleniny, mořských plodů a vody. Nejčastěji dochází k epidemii požitím nedostatečně tepelně zpracovaného drůbežího masa, nepasterizovaného mléka, povrchové vody a dále křížovou kontaminací v domácnosti nebo v provozech stravování (Kaakoush et al., 2015).

Nejdůležitějším zástupcem je *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, které jsou nejčastěji izolovány od lidí trpících průjmovým onemocněním. Kampylobakterióza se vyskytuje v mnoha zemích po celém světě a v některých zemích počet případů převyšuje počet salmonelóz a shigelóz (Ray, 2004).

### **1. 1. 2 Rod *Arcobacter***

#### **1. 1. 2. 1 Historie rodu *Arcobacter***

První zmínka o těchto bakteriích byla v roce 1977 (Ellis et al., 1977). Vandamme a De Ley v roce 1991 navrhly název nového rodu *Arcobacter*, neboť do té doby šlo o „aerotolerantní kampylobaktery“ (Ho et al., 2007; Snelling et al., 2006).

#### **1. 1. 2. 2 Charakteristika a morfologie**

Název *Arcobacter* pochází z latinského slova *arcus*, což znamená *luk* (Vandamme et al., 1991). Arkobaktery řadíme mezi lidské patogeny, mají ale i jistý veterinární význam (Motarjemi and Adams, 2006). Jde o bakterie s gram-negativním charakterem buněčné stěny, netvoří spory, mají tyčinkovitý tvar. Morfologické a metabolické vlastnosti mají shodné s mikroorganismy rodu *Campylobacter*, liší se však v aerotoleranci (Lawaley et al., 2012). Polární bičík umožňuje buňkám pohyb (Motarjemi and Adams, 2006).

#### **1. 1. 2. 3 Taxonomie arkobakterů**

Do tohoto rodu se v současní době řadí 28 druhů: *A. aquamarinus*, *A. defluvii*, *A. cloacae*, *A. ellisii*, *A. suis*, *A. venerupis*, *A. acticola*, *A. anaerophilus*, *A. bivalviorum*, *A. ebronensis*, *A. lekithochrous*, *A. nitrofigilis*, *A. pacificus*, *A. mytili*, *A. halophilus*, *A. molluscorum*, *A. marinus*, *A. canallis*, *A. faecis*, *A. lanthieri*, *A. porcinus*, *A. thereius*, *A. trophiarum*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis*, *A. skirrowi*, *A. cibarius* (Figueras et al., 2017).

#### **1. 1. 2. 4 Kultivace**

Zásadním rozdílem u arkobakterů je jejich schopnost růst za aerobních podmínek a za nízkých teplot. Růstová teplota u bakterií rodu *Arcobacter* se nachází v rozmezí 15-37 °C (Lawley et al., 2012). Optimum je pro kultivaci však 30 °C (Phillips, 2001).

Dříve se ke kultivaci využívaly půdy určené pro bakterie rodu *Campylobacter*. Tyto agary byly však ke kultivaci arkobakterů nevhodné, kvůli jejich toleranci kyslíku. V současnosti se upřednostňuje kultivace na krevním agaru, CAT agaru, CCDA agaru, CIN agaru (Phillips, 2001). Kolonie jsou bílé až šedivé, malé, bez pigmentace (Motarjemi and Adams, 2006).

#### **1. 1. 2. 5 Biochemické vlastnosti rodu *Arcobacter* a jejich citlivost**

U většiny kmenů bakterií rodu *Arcobacter* je pozitivní oxidázová i katalázová reakce, dále také ureázová aktivita a redukce dusičnanů (Ricke et al., 2015; Vandenberg et al., 2004). Arkobaktery jsou citlivé na NaCl, ampicilin, tetracyklin, kanamycin a streptomycin. Odolné jsou naopak k erythromycinu (Vandenberg et al., 2004).

#### **1. 1. 2. 6 Patogenita a patogeneze arkobakterů**

U bakterií rodu *Arcobacter* není zcela znám způsob nákazy, přesto že se mnoho studií tímto tématem zabývá. Pravděpodobnými spouštěči jsou hemaglutininy, interleukiny a toxin, který má za následek invazi a/nebo adhezi na epiteliální buňky ve střevech. Přítomnost toxinu CDT u arkobakterů potvrzena nebyla, ale cytotoxické látky produkují (Ricke et al., 2015). U arkobakterů byly potvrzeny mnohé faktory virulence. Jde o 9 významných genů virulence: *cadF*, *ciaB*, *cjl349*, *irgA*, *hecA*, *hecB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*. Tyto faktory pomáhají bakteriím k adhezi, invazi, lýze erytrocytů, získávání a udržení železa (Heimesaat et al., 2015).

Infekce ohrožuje všechny věkové skupiny, ale nejvíce malé děti. Typická cesta nákazy je fekálně-orálním způsobem. Velikost infekční dávky ani inkubační doba není přesně stanovena. Nákazu doprovází vodnatý průjem, bolesti břicha a horečka. Tyto příznaky se u nemocného objevují obvykle 3-15 dnů. Rod *Arcobacter* není zahrnut do rutinního testování, proto jsou epidemie zaznamenány pouze ojediněle (Lawley et al., 2012).

#### **1. 1. 2. 7 Výskyt arkobakterů**

Izolace bakterií rodu *Arcobacter* je možná z různých míst, neboť jsou velmi rozšířené (Lastovica et al., 2014). Způsobují onemocnění střevního traktu hlavně u lidí, ale také

zvířat (Nachamkin et al., 2008). Arkobaktery nejsou přirozenou součástí střevní mikroflóry u drůbeže, jako je tomu u kampylobakterů (Lawley et al., 2012).

Výskyt je možný v mokřadní půdě, dále také v odpadní, pitné, podzemní, sladkovodní i mořské vodě. Enormní výskyt těchto bakterií je zaznamenán u drůbežího, vepřového a hovězího masa, dále také ale u nepasterizovaného mléka, mušlí, škeblí a mořských ryb. Přítomnost arkobakterů byla potvrzena také z výtěrů dutiny ústní u koček a psů, ale také i u mývalů, opic, nosorožců, goril a alpaků (Lastovica et al., 2014).

## 1. 2 Mikrobiální biofilm

### 1. 2. 1 Bakteriální biofilm

Bakterie nacházíme všude kolem nás a jsou neodmyslitelnou součástí našeho života. Jejich výskyt může být v planktonní formě nebo v podobě biofilmu (Davey and O'Toole, 2000). Biofilm je společenství mikroorganismů, které přilne k různým povrchům, ale i k sobě navzájem (Kvasničková et al., 2016). Způsobu tohoto života dává přednost velká část mikroorganismů, jenž se vyskytují v přírodě (Davey and O'Toole, 2000). Prokázalo se, že biofilmy nejsou jen slizovitá vrstva bakterií, ale představují komplexní, strukturované a koordinované komunity s vysokou úrovní organizace (Kvasničková et al., 2016). Biofilmy mohou být složeny z populace jediného bakteriálního druhu nebo z několika (Davey and O'Toole, 2000). K typickým zástupcům, kteří tvoří biofilmy, patří stafylokoky (např. *Staphylococcus aureus*), streptokoky (např. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*), dále také enterokoky, anaerobní bakterie a gram-negativní tyčinky, kam patří tedy i rod *Campylobacter* a *Arcobacter* (Davey and O'Toole, 2000).

Toto společenství má vlastní obranný a komunikační systém (Aparna and Yadav, 2008). Bakterie rostoucí v biofilmu se vyznačují zvýšenou odolností k obranným mechanismům hostitele a jsou spojovány s vysokou přirozenou rezistencí k vlivu antibiotik. Tento fakt je společný všem druhům biofilmů (Holá, 2012). Buňky žijící v biofilmu jsou např. až 1000krát více rezistentní vůči antibiotikům než kultury planktonické (Mulcahy et al., 2008). V této formě se vyskytují nejen buňky naší přirozené mikroflóry, ale také bakterie patogenní, které způsobují onemocnění řady orgánů a celých soustav, proto je zkoumání biofilmů pro medicínu velmi důležité (Holá, 2012). Biofilmy se mohou rozrůstat na abiotických i biotických površích, kde jsou poté zdrojem infekce u lidí, ale i zvířat a rostlin (Aparna and Yadav, 2008). V současné době existují dva možné způsoby jak zabránit tvorbě biofilmu. První z nich je ochranná a snaží se zabránit adhezi bakterie na povrch a tím předejít tvorbě biofilmu. Druhou možností je úplné odstranění již vzniklého biofilmu, tedy eradikace (Kvasničková et al., 2016). Buňky uvnitř biofilmu mezi sebou vzájemně komunikují a dochází k výměně genetické informace. Tato výměna se děje především konjugací a přenosem plazmidů, které kódují geny zajišťující např. rezistenci k antibiotikům (Mulcahy et al., 2008). Biofilm představuje pro bakterie významnou ochranu a to před celou řadou nežádoucích vlivů vnějšího prostředí, což může být například UV záření, dehydratace, salinita, přítomnost toxických kovů, velmi nízké pH, nebezpečí fagocytózy, ale i před některými antibakteriálními prostředky a antibiotiky (Hall-Stooley et al., 2004).

### **1. 2. 1. 1 Historie bakteriálního biofilmu**

První biofilmy, které se zkoumaly, byly viditelné pouhým okem. Díky tomu se zařadily k prvním předmětům zkoumání v počátcích rozvoje mikrobiologie (Aparna and Yadav, 2008). Anthony van Leeuwenhoek s postupem doby pomocí jednoduchých mikroskopů pozoroval bakterie na povrchu zubů a tím došlo k objevení mikrobiálních biofilmů (Donlan, 2002). Dále Heukelekian a Heller pozorovali růst bakterií a tvorbu biofilmu na láhvi v mořské vodě. Zjistili, že počet bakterií na láhvi je dramaticky vyšší než v okolním prostředí – v tomto případě v mořské vodě (Heukelekian and Heller, 1940). K velkému rozmachu došlo až s nástupem elektronové mikroskopie (Donlan, 2002). Jones et al. (1969) používali elektronovou mikroskopii ke zkoumání biofilmů na prachových filtrech v čistírně odpadních vod. Zde se ukázalo, že biofilm je tvořen různými bakteriemi – průkaz byl založen na rozdílné morfologii buněk. Vědci zjistili, že matricový materiál obklopující a uzavírající buňky uvnitř v biofilmu je polysacharid. V tomto výzkumu využili specifickou látku polysacharidové povahy „Ruthenium red“, která se dokázala spojit s činidlem oxidu osmičelého (Jones et al., 1969). Roku 1973 byly studovány mikrobiální slizy v průmyslových vodních systémech. Tato studie ukázala, že jsou velmi odolné vůči dezinfekčním látkám, jako je chlor (Characklis, 1973). Výzkum v roce 1978, který byl veden Costertonem, vysvětlil mechanismy, kterými se mikroby drží materiálu (Costerton et al., 1978). Tento vědec je považován za ‚otce biofilmu‘, neboť poprvé sepsal publikaci zabývající se dlouho známou schopností bakterií zachytit se a vytvářet slizké povlaky na pevném povrchu. Tato fakta nezávisle na sobě potvrdil ve stejném roce i Gibbons, jenž se zabýval klinickým významem kmenů *Streptococcus* na zubní sklovině (Kvasničková et al., 2016). Studium biofilmů zaznamenalo v následujících letech značný rozmach a začaly se využívat metody skenovací elektronové mikroskopie nebo standardní mikrobiologické techniky. Za poslední desetiletí ovlivnilo chápání biofilmů především využití laserového mikroskopu k charakterizaci ultrastruktury biofilmu a vyšetřování genů, které se podílejí na adhezi buněk a tím i tvorbě biofilmu (Donlan, 2002). Mechanismy tvorby biofilmů byly částečně objasněny, přesto zůstává mnoho jevů i v současné době nezodpovězeno (Kvasničková et al., 2016)

### **1. 2. 1. 2 Struktura biofilmu**

Struktura biofilmu je heterogenní. Rozdílnost je ve složení a distribuci extracelulárních polymerních látek, aerobních a anaerobních zónách, ale také samotným složením mikroorganismů. Stavbu ovlivňuje také interakce různých částic (ne mikrobiálních) z hostitele



a z prostředí. Příkladem je studie zabývající se biofilmem na srdečních chlopních, kde bylo zaznamenáno hromadění erytrocytů a fibrinu. Fibrin chrání strukturu biofilmu před leukocyty hostitele a může tak dojít k infekční endokarditidě. Dalším příkladem je uchycování minerálů v biofilmu tvořícím se na močovém katétu, což má za následek inkrustaci katétu a následnou blokadu jeho funkce. Tyto minerály vznikají vysrážením díky zvyšujícímu se pH. Nárůst pH je způsoben volným amoniakem, který vznikne hydrolýzou močoviny v moči, což způsobují bakterie žijící v biofilmu. Tato reakce je řízena enzymem ureázou (Donlan, 2002). Heterogenita struktury biofilmu je v prostoru i v čase (Kvasničková et al., 2016).

Tyto mikrobiální systémy mohou existovat jako volné či přisedlé agregáty, jednovrstevné nebo trojrozměrné struktury, které jsou propleteny vodními kanálky, které umožňují transport živin, kyslíku a odpadních složek v celém systému k buňkám nebo od buněk do okolního prostředí (Kvasničková et al., 2016). Difúzi živin, kyslíku a dokonce i antimikrobiálních látek zajišťuje tekoucí proud v těchto kanálech (Donlan, 2002). Vodní kanálky fungují také jako filtry, které do své stavby zachytávají různé částice jako například minerály (Kvasničková et al., 2016).

Jak již bylo řečeno, biofilmy mohou mít různou strukturu, na níž mají zásadní vliv organismy, které daný biofilm vytvářejí. Tloušťka biofilmu je ovlivněna počtem organismů. Biofilmy jednodruhové jsou tenčí (15 – 30  $\mu\text{m}$ ), zatímco směsný biofilm bývá silnější (40  $\mu\text{m}$ ) (Donlan, 2002). Rozhodujícími faktory pro výslednou šířku je dostupnost živin a rozložení mikrobiálních buněk (Kvasničková et al., 2016).

Biofilm je tvořen seskupením mikrobiálních buněk a mezibuněčné hmoty (matrix), kterou nacházíme ve volném prostoru mezi buňkami (Tolker-Nielsen and Molin, 2000). Jde o směs extracelulárních polymerních substancí (EPS). EPS představuje 50 – 90 % z celkového organického uhlíku uvnitř biofilmu a je považován za primární matricový materiál (Flemming and Wingender, 2001). Tato směs se liší v každém biofilmu jak v chemických tak i fyzikálních vlastnostech. Skládá se především tedy z polysacharidů, jenž některé mohou být neutrální nebo polyaniontové. Velice důležitá je přítomnost uronových kyselin (např. D-glukuronová, D-galakturonová a mannurová) nebo vázaných pyruvátů, neboť umožňují sdružovat dvojmocné kationty vápníku a hořčíku, u nichž bylo prokázáno, že zesilují polymery a tím zajišťují větší vazebnou sílu ve vzniklém biofilmu (Sutherland, 2001; Flemming and Wingender, 2001). U některých grampozitivních bakterií může být chemické složení zcela jiné a může být především kationtové (Donlan, 2002). Součástí matrix je i extracelulární DNA, jejíž funkce a původ výskytu v obalu biofilmu není zcela objasněna. Vědci se domnívají, že plní roli

přenašeče elektronů, slouží v komunikaci nebo je využívána jako pomocná konstrukce pro pohyb buněk uvnitř seskupení (Flemming and Wingender, 2001).

EPS do své struktury vnáší velké množství vody vodíkovými vazbami, ale u některých bakterií může být hydrofobní. Může se tedy zcela lišit ve své rozpustnosti. Složení a struktura polysacharidů uvnitř EPS určuje jejich primární konformaci. EPS sacharidy nejsou u všech biofilmů jednotné, mění se prostorově i časově (Sutherland, 2001). Výzkumy ukázaly, že různé organismy produkují rozdílný počet EPS a množství se zvyšuje s věkem biofilmu. Syntéza je ovlivněna dostupností živin v růstovém médiu, přebytkem uhlíku, omezením dusíku, draslíku a fosfátu, ale také pomalým růstem bakterií. EPS se spojuje s kovovými ionty, dvojmocnými kationty a jinými makromolekulami (např. proteiny, DNA, lipidy) (Donlan, 2002). Buňky v biofilmu jsou chráněny před vlivem antibiotik díky omezené penetraci těchto látek přes matrix. Biofilmová matrice dokáže zamezit vstupu antimikrobiálních léčiv jako jsou beta-laktámy či aminoglykosidy, ale fluorochinolony pronikají okamžitě. Matrice poskytuje krátkodobý ochranný účinek, ale při dlouhodobém působení antibiotik nevykazuje významnou roli (Mulcahy et al., 2008).

### **1. 2. 1. 3 Formování biofilmu**

Vývoj biofilmu má 5 společných etap. První stupeň začíná bakteriální adhezí k určitému povrchu, po které následuje tvorba mikrokolonií, následuje zrání a konečná fáze životního cyklu je známá jako disperze, tedy uvolňování buněk, proto aby kontaminovaly další povrchy (Abdallah et al., 2014).

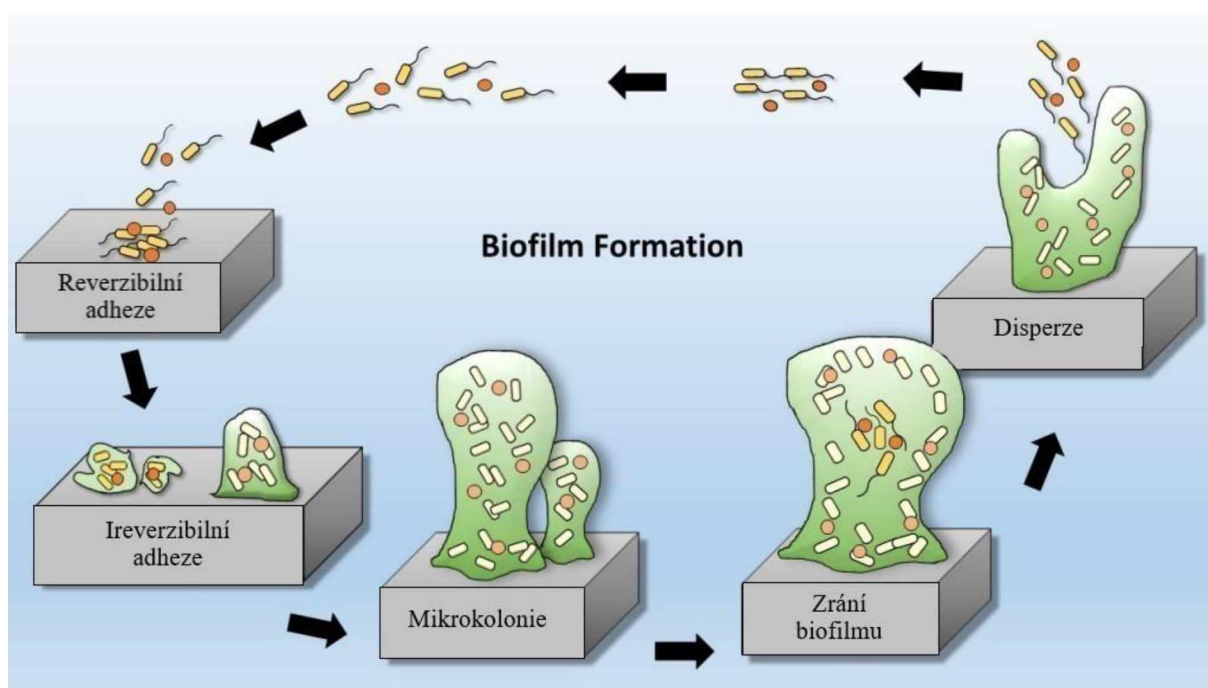
Bakteriální adheze k povrchu představuje první a podstatný krok tvorby biofilmu. Jedná se o reverzibilní (vratný) děj (Renner and Weibel, 2011). Je usnadněn mnoha fyzikálními, chemickými a biologickými vlivy a přilnavost je tedy ovlivněna okolním prostředím okolo buněk – teplota, organická hmota, pH. Jakmile se bakteriální buňky přiblíží k požadovanému povrchu, začnou na ní působit fyzikální síly jako jsou van der Waalsovy, hydrofobní či elektrostatické interakce nebo acidobazické vlivy. Výsledná síla umožní buňce adhezi k povrchu (Renner and Weibel, 2011; Weidenmaier and Peschel, 2008). Existují studie popisující afinitu pohyblivých bakterií k určitým povrchům. Následně dochází k expresi genů uvnitř bakterie, jenž se podílejí na stavbě biofilmu a inhibují motilitu (Karatan and Watnick, 2009).

Doposud vratná adheze se stává již nevratnou, a to především sekrecí adhezinů vlastní bakteriální buňkou. Jak již bylo zmíněno, extracelulární matrice obsahuje řadu sloučenin, proto

působí v biofilmu jako opěra pro stabilizaci trojrozměrné struktury. V této části začíná proces dozrávání biofilmu vedoucí k uzavření matrice (Abdallah et al., 2014).

Poslední fáze zahrnuje disperzi, která umožňuje bakteriím, aby opustily strukturu biofilmu, kontaminovaly jiné povrchy a celý cyklus se tak opakoval. K disperzi dochází vlivem několika faktorů, což může být změna v dostupnosti živin, úbytek kyslíku a jiné stresové stavy, jenž podporují expresi genů zapojujících se do disperze (Koo et al., 2013).

Celý proces formování biofilmu je znázorněn na **Obrázku 2**.



**Obrázek 2** – Vývojová stádia tvorby biofilmu (převzato a upraveno dle Haque et al., 2018)

#### 1. 2. 1. 4 *Quorum sensing*

*Quorum sensing* (*QS*) je pro bakterie způsob komunikace mezi buňkami (De Kievit, 2009). Bakterie schopna *QS* produkuje a uvolňuje chemické signální molekuly, které se nazývají autoinduktory. Dle autoinduktorů lze systémy mikrobů dělit do 4 skupin (Turan et al., 2017). Koncentrace autoinduktorů se zvyšuje v souvislosti s rostoucí hustotou buněčné populace. Bakterie jsou schopny detekovat minimální koncentraci těchto látek a měnit tím expresi genů, chování a lépe se přizpůsobit okolí, proto je tento proces i chrání. Díky těmto signálům synchronizují bakterie své chování v celé populaci, proto fungují jako mnohobuněčné organismy. Nicméně na signalizaci má vliv různorodá skupina molekul (De Kievit, 2009).

Výzkumy ukázaly, že bakterie nejsou schopny komunikace pouze prostřednictvím signálních molekul stejného druhu, ale komunikují i s jinými druhy. Je také jisté, že *QS* se netýká pouze bakterií (Miller and Bassler, 2001). *QS* byl poprvé pozorován u luminiscenční mořské bakterie *Vibrio fischeri*, ale o komunikaci a vzájemné spolupráci mezi bakteriemi se vědělo již dříve (Turan et al., 2017). Tímto objevem se odhalila alternativní možnost léčby infekčních onemocnění, neboť *QS* reguluje virulenci bakterií. Inhibitory *QS* ovlivňují virulenci mikrobů bez dopadu na jejich schopnost života, proto nedochází ke vzniku rezistence (De Kievit, 2009). Mezibuněčnou komunikaci bakterií ovlivňují také rostlinné extrakty, které ale neobsahují dostatečné množství inhibitorů, aby mohly být využity pro terapeutické účely. Inhibitory lze najít v ovoci, zelenině, čerstvých bylinách či kořeni a slouží zejména jako preventivní léčebné látky (Truchado et al., 2015).

#### **1. 2. 1. 5 Vlastnosti povrchů pro růst biofilmu**

Povrchy, na které bakterie adherují a vytvoří biofilm, mají několik charakteristik. K tvorbě mikrokolonií dochází spíše na drsnější ploše, což je dáno snížením smykových sil. Další vliv na rychlost a rozsah uchycení mikrobů mají fyzikálně-chemické vlastnosti. Mikroorganismy se rychleji připojí k hydrofobnímu povrchu (plasty, teflon, silikon, latex) než k hydrofilnímu (sklo, kovy). Některé studie ale toto tvrzení vyvracejí (Donlan, 2002). Dokonalým místem pro uchycení bakterie a tvorbu biofilmu jsou nerovnosti, trhliny, kouty a zlomy, protože tato místa jsou špatně dostupná při čištění a dezinfekci (Chmielewski and Frank, 2003).

#### **1. 2. 1. 6 Výskyt biofilmů**

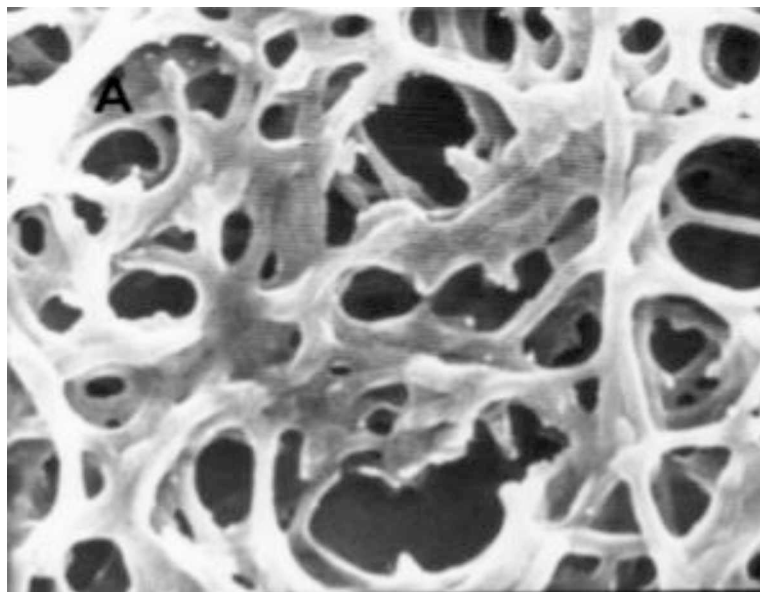
Prvně popsáným biofilmem byl zubní plak, což je shluk přichycených streptokoků na zubní sklovinu. Zubní plak může mít za následek tvorbu zubního kazu, zánět dásní a středouší (Holá, 2012). V medicíně mají bakterie v biofilmu také negativní vliv, neboť rostou např. na implantovaných kloubních náhradách, plastových pomůckách, srdečních chlopních, katetrech, chirurgických stehách, zdeformované tkáni nebo i na kontaktních čočkách (Abdallah et al., 2014).

Bakterie schopné růstu v podobě biofilmu nenacházíme pouze v oblasti medicíny, ale v celé řadě dalších odvětví. Výskyt je zaznamenán v půdách, odpadech, vodě a na místech s vodou spojených (Dautle et al., 2003; Rulík and Holá, 2012). Pro člověka je nebezpečná kontaminace ploch v domácnostech a také potravin, což nejčastěji bývá ovoce a zelenina (Dautle et al., 2003).

### 1. 2. 1. 7 Biofilm kampylobakterů a arkobakterů

Bakterie rodu *Campylobacter* mají schopnost tvořit biofilm, díky kterému odolávají fyzikálním, environmentálním a biologickým vlivům (Kaakoush et al., 2015). Kampylobaktery mají zvýšenou odolnost v podobě biofilmu. Bylo popsáno, že přežívá až 24 dní, kdežto v planktonickém typu života pouze 12 dní (Joshua et al., 2006). V roce 2006 proběhla komplexní studie o tvorbě biofilmu bakterie *Campylobacter jejuni* a tato studie ukázala, že jsou tyto bakterie schopny tvořit 3 odlišné typy biofilmu (Siringan et al., 2011; Kaakoush et al., 2015). Pro kampylobaktery je život v podobě biofilmu zásadní, neboť takto lépe snáší a odolávají vnějším podmínkám při nakažení hostitele. Bylo prokázáno, že tvorba biofilmu probíhá více v aerobních podmínkách (Reuter et al., 2010). Wirtanen a Salo (2005) tvrdí, že každý mikroorganismus za příznivých podmínek (vlhký povrch, živiny a fyziologické prostředí) má proměnlivou schopnost tvořit biofilm. U *C. jejuni*, stejně jako u jiných zoonotických bakterií, dochází ke změnám ve fyziologii působením vnějších vlivů (Svensson et al., 2009). V jedné studii byla sledována účinnost antibiotik na biofilm vytvořený kampylobaktery. Mezi vysoce účinná ATB patří streptomycin, erythromycin, gentamicin, tetracyklin, neomycin a penicilin. U antibiotik cephalexin a kanamycin byla zjištěna až 98-100 % účinnost. Malý vliv měly naopak léky riphapicin, ampicilin a norfloxacin (Balogu et al., 2014). Dle nedávných studií existuje nová látka TYPLEX®, která vykazuje jedinečný účinek proti enteropatogenům, neboť zabráňuje tvorbě biofilmu. Jedná se o syntetický komplex L-tyrosinu a trojmocného železa. Studie prokázala vliv této látky na *C. jejuni* a snížila schopnost této bakterie přilnout k plastovému povrchu a vytvořit tak biofilm (Khattak et al., 2018).

Biofilm tvořený bakterií *Campylobacter jejuni* lze vidět na **Obrázku 3**.

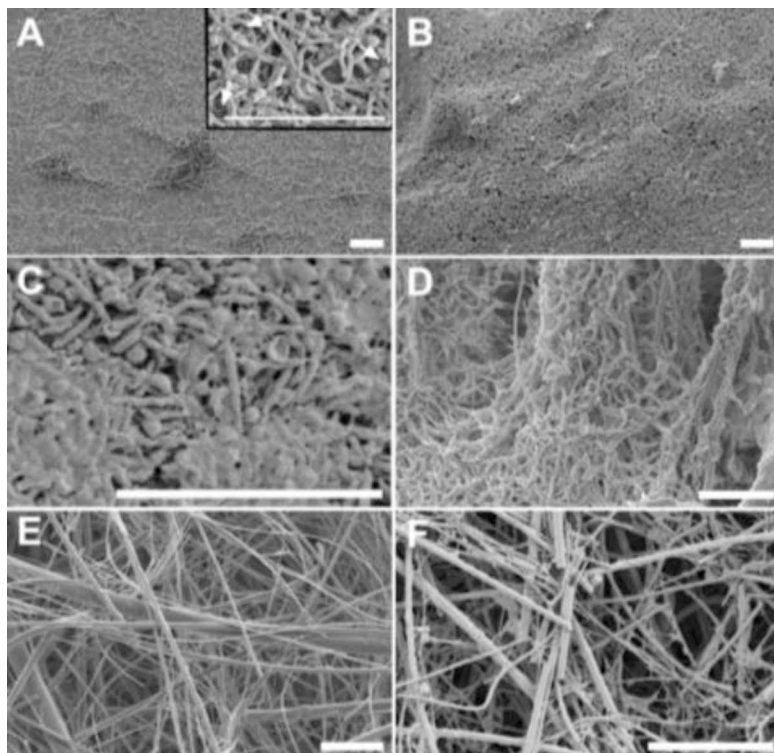


**Obrázek 3** – Biofilm tvořený *Campylobacter jejuni* (Joshua et al., 2006)

*Campylobacter jejuni* tvoří biofilm na abiotických površích, jako je např. polyvinylchlorid, plast, nerezová ocel nebo sklo, ale také na živých tkáních (Epps et al., 2013). Schopnost růstu na povrchu se liší mezi jednotlivými kmeny *C. jejuni* (Feng et al., 2016). Biofilmy tvořené touto bakterií nacházíme v GIT traktu drůbeže, ve vodních systémech, v zařízeních pro chov zvířat, ale v zařízeních na zpracování potravin. Biofilm kampylobakterů bývá tvořen spolu s dalšími mikroby, např. *Staphylococcus aureus* či *Salmonella enterica*. Předpokládá se, že tyto mikroorganismy poskytují ochranu *C. jejuni* před antimikrobiálním vlivem a aerobním stresem (Feng et al., 2016). Vhodným „spolutvůrcem“ je *Pseudomonas aeruginosa*, neboť spotřebovává kyslík a vytváří tak příznivé prostředí pro růst a přežití kampylobakterů (Ica et al., 2012). Růst biofilmu *C. jejuni* je snížen v přítomnosti NaCl a sacharózy, což má za následek osmotický stres indukovaný těmito sloučeninami. Teplotní a kyslíkové změny mění hustotu biofilmu (Reeser et al., 2007; Reuter et al., 2010). Sledované biofilmy tvořené bakteriemi rodu *Campylobacter* byly vždy na rozhraní kapalina-vzduch. Testované byly mikroaerofilní i anaerobní zástupci kampylobakterů. Mikroaerofilní kmeny nevykazovaly na plastu žádný růst, kdežto anaerobní kmeny biofilm tvořily. Velká řada studií se zabývala pouze *C. jejuni*, ale toto zjištění ukazuje, že schopnost tvořit biofilm mají spíše bakterie v anaerobním prostředí ve srovnání tedy s mikroaerofilním (Gunther and Chen, 2009). Klíčovou roli při tvorbě biofilmu tedy hraje kyslík. Oh et al. (2016) ve své studii prokázali, že aerobní podmínky zvyšují tvorbu biofilmu u mikroorganismu *Campylobacter jejuni* prostřednictvím oxidačního stresu. Aerobní podmínky podporují vývoj životaschopného, ale nekultivovatelného *C. jejuni*. V jedné studii byl biofilm sledován po různou časovou dobu kultivace. Bakterie *Campylobacter jejuni* a

*Campylobacter coli* se po 6denní kultivaci zařadily mezi mikroorganismy středně tvořící biofilm, přičemž po 48 h kultivaci spadaly do skupiny slabě pozitivních kmenů (Šilhová-Hrušková et al., 2015).

Na **Obrázku 4** můžeme vidět tvorbu biofilmu na různých površích.



**Obrázek 4** – Tvorba biofilmu na různých površích: A – nerezová ocel, B – nitrocelulóza, C – nitrocelulóza (ukazuje extracelulární materiál pokrývající buňky), D – sklo, E – negativní kontrola na sklu, F – mutant *C. jejuni* vykazující ztrátu schopnosti přilnout na sklo (Kalmokoff et al., 2006).

Mikroorganismy rodu *Campylobacter* využívají k vytvoření biofilmu *CsrA*, což je aktivátor tvorby biofilmu a jde o homodimerní protein vázaný na RNA. U *E. coli* byl identifikován jako postranskripční regulátor translace, který je zodpovědný za potlačení nebo aktivaci mnoha důležitých procesů. V jedné studii zkoumali úlohu *CsrA* v patogenezi právě u *C. jejuni*, ale do současné doby není známo jak je *CsrA* regulován. Pro tuto studii byl vyvinut mutant kampylobaktera, který postrádal postranskripční regulátor *CsrA*. Mutant vykazoval změny v několika vlastnostech souvisejících s virulencí, včetně odolnosti proti oxidativnímu stresu, motilitě, adherenci. Tyto účinky právě naznačují, že *CsrA* je důležitým regulátorem, jenž se podílí na patogenezi kampylobakterů. Biofilm byl barven krystalovou violetí. Mutant tvořil velmi slabý biofilm, kdežto normální typ vytvořil hustou vrstvu biofilmu. Výsledky tedy naznačují, že *CsrA* je aktivátorem tvorby biofilmů u *C. jejuni*. Tento závěr je pozoruhodný vzhledem k tomu, že tento protein u jiných bakterií tvorbu biofilmu potlačuje (Fields and Thompson, 2008).

Bakterie rodu *Arcobacter* mají také schopnost tvořit biofilmy, proto díky této vlastnosti přežívají nepříznivé vlivy prostředí. Toto přežívání v podobě biofilmu má za následek, že dochází k opakovaným kontaminacím potravin, neboť biofilm tvoří v prostorách pro zpracování potravin (Giacometti et al., 2013). Ferreira et al. (2013) ve své studii uvádí, že divoké kmeny tvoří více biofilmu než sbírkové kmeny arko-bakterů. To však neodpovídá výsledkům v jiné studii, kde tvorba biofilmu byla téměř v totožné míře (Šilhová-Hrušková et al., 2013). Kjeldgaard et al. (2009) sledovali tvorbu biofilmu u sbírkového kmene *A. butzleri*, tak i u izolátu získaného z reálného prostředí. Biofilm sledovali na mikrotitračních destičkách a také na nerezové oceli, a to při různých teplotách a dobách kultivace. Všechny sledované arko-baktery tvořily biofilm a množství vytvořeného biofilmu se zvyšovalo s časem a teplotou. V jiné studii ale uvádějí, že bakterie *Arcobacter butzleri* a *Arcobacter cryaerophilus* vykazují největší tvorbu biofilmu již po 24 h, poté dochází k postupnému poklesu či k žádné výrazné změně (Šilhová-Hrušková et al., 2015).

### 1. 2. 2 Biofilm kvasinek

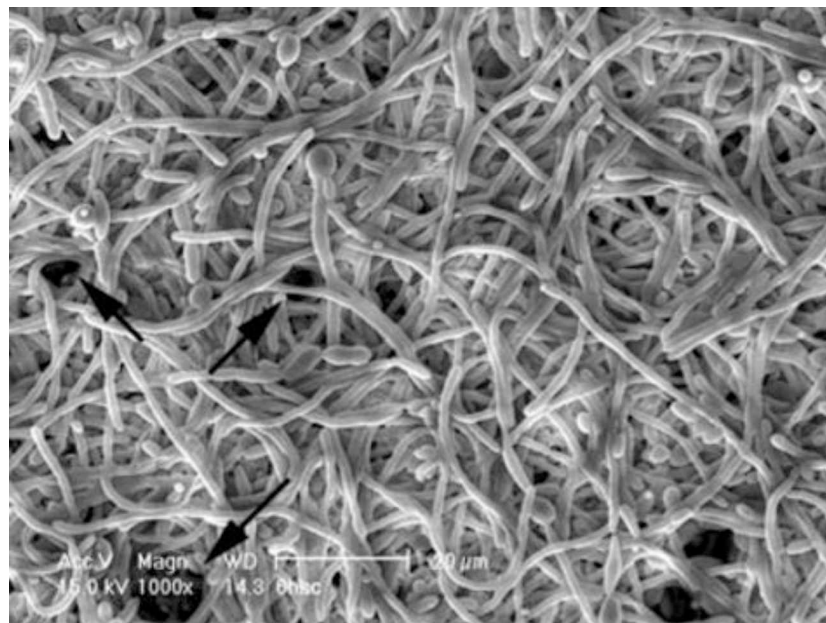
O tvorbě biofilmu u kvasinek je známo výrazně méně informací než u bakteriálního biofilmu, ale v posledních desetiletích zájem roste. Především se jedná o studium biofilmu u kvasinky rodu *Candida*. Druhy *Candida* jsou známé jako hlavní původci nozokomiálních infekcí, neboť kolonizují živé i umělé povrchy (Douglas, 2003). Biofilmy kvasinek jsou velmi rozšířené a byly prokázány téměř u všech zdravotnických pomůcek, jako jsou steny, implantáty, trubice, kardiostimulátory a různé typy katétrů (Seneviratne et al., 2008). O přichycení buňky k danému povrchu rozhodují vlastnosti povrchu a buňky kvasinek (Douglas, 2003). Kvasinky přirozeně obývají různé části lidského těla, včetně dutiny ústní, gastrointestinálního traktu, pochvy či kůže. Za určitých podmínek mohou způsobit infekce (Seneviratne et al., 2008). Léčba takovýchto infekcí je velmi obtížná, neboť kvasinky rostoucí v biofilmu jsou odolné k antimykotickým látkám, proto nejvhodnější cestou léčby je odstranit infikovaný implantát. (Douglas, 2003). Velmi důležité, jak předcházet nemocím způsobených biofilmy, je vhodná péče o implantát a dodržení aseptických podmínek při práci s nimi (Holá et al., 2007). Zásadní roli při tvorbě kvasinkového biofilmu hraje přítomnost hyf a pseudohyf, jenž vznikají spojováním jednotlivých buněk k dalším a vytvoří se útvary v podobě řetízků (Holá et al., 2007).

K významným zástupcům těchto kvasinek řadíme kvasinky *Candida parapsilosis* a také *Candida albicans* (Holá et al., 2007). Kvasinky *Candida albicans* tvoří dvouvrstevnou



strukturu biofilmu, která je rezistentní k antifungálním látkám, včetně amfotericinu B a flukonazolu. V jedné studii bylo prokázáno, že biofilm tvořený kvasinkou *Candida non-albicans* způsobí infekci spíše než biofilm kvasinky *Candida albicans*. Vědci v této studii využívali klinické izoláty získané z krevního řečiště. K infekci kvasinkou *Candida albicans* zpravidla nedochází z již vytvořeného biofilmu (Douglas, 2003).

Biofilm vytvořený kvasinkou *Candida albicans* je zobrazen na **Obrázku 5**, kde lze vidět heterogenní povahu biofilmu složeného z hyf, pseudohyfa, extracelulárních polymerních látek.



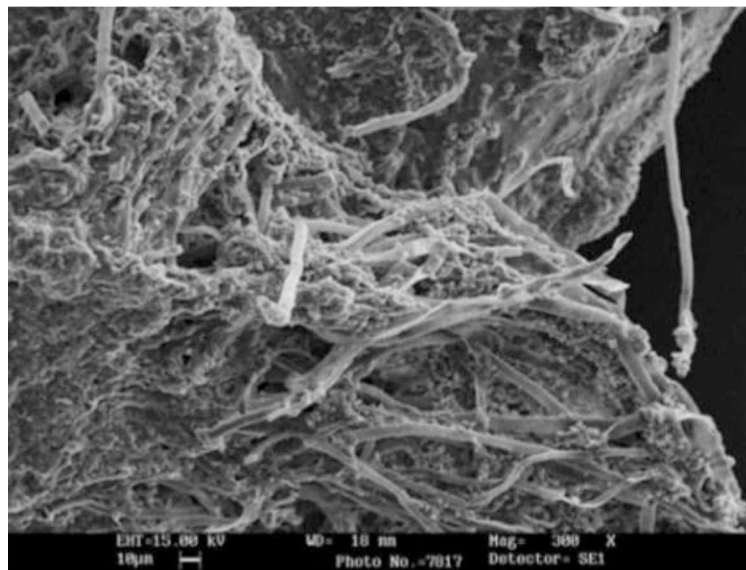
**Obrázek 5** – Biofilm kvasinky *Candida albicans*, elektronová mikroskopie (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ) (převzato a upraveno dle Seneviratne et al., 2008)

### 1. 2. 3 Biofilm plísní

Nejméně probádanou oblastí je biofilm plísní, tedy vláknitých hub. Plísně jsou zdrojem mnoha důležitých produktů, včetně antibiotik, enzymů, organických látek, kyselin a dalších metabolitů. Pro tvorbu a růst biofilmu je vyhovující prostředí s vysokou vlhkostí. Plísně jsou všudypřítomné, velmi přizpůsobivé a rostou na různých površích (Gamarra et al., 2010).

K hlavním zástupcům patří *Aspergillus fumigatus*, jakožto běžně a všude se vyskytující plíseň. Tato plíseň je velmi dobře přizpůsobitelná okolním podmínkám a do prostředí uvolňuje tisíce konidií. Způsobuje závažná a často smrtelná onemocnění – invazivní plicní aspergilózu (Kaur and Singh, 2013). Další plísní popsanou ve spojitosti s tvorbou biofilmu je *Aspergillus niger*, což je průmyslově významný druh a je široce využíván pro biotechnologické aplikace (Gamarra et al., 2009).

Biofilm vytvořený plísní *Aspergillus oryzae* je zobrazen na **Obrázku 6**.



**Obrázek 6** – Biofilm plísně *Aspergillus oryzae*, elektronová mikroskopie (měřítko 10 µm) (převzato a upraveno dle Gamarra et al., 2009)

### **1. 3 Testování tvorby biofilmu**

Bakterie, které žijí v podobě biofilmu, způsobují závažné infekce u lidí. Biofilm je chráněn před antimikrobiálními látkami. Existují různé způsoby ke zjištění produkce biofilmu, může jít o fenotypové metody, např. Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách nebo ve zkumavkách, dále kultivace na agaru s kongo-červení. Dále lze kvantifikovat vrstvu biofilmu zjištěním počtu CFU po předchozí sonifikaci, barvením se spektrofotometrickým měřením, kolorimetrickou metodou (resazurin) a konfokální mikroskopií. Pro zjištění tvorby biofilmu lze využít také genotypové metody, např. PCR. Nejvíce vhodná je metoda Christensenova v mikrotitračních destičkách, neboť vykazuje spolehlivé a reprodukovatelné výsledky (Hassan et al., 2011).

#### **1. 3. 1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách**

Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách je považována za „zlatou“ metodu pro detekci biofilmů. Prvním krokem je ošetření jamek kulturami a živným médiem. Destičky se inkubují při určité teplotě a po danou dobu. Po inkubaci se obsah jamek vyklepne a jamky jsou promyty pufrům či destilovanou vodou, čímž dojde k odstranění volných planktonních buněk. Biofilm na dně jamek je následně fixován 2% octanem sodným a barven krystalovou violetí či genciánovou violetí. Nadbytečná barva je vymyta deionizovanou vodou a destičky se poté suší. Nárůst vzniklého biofilmu se proměří na spektrofotometru při odpovídající vlnové délce maxima absorbance. Dle hodnot absorbancí se bakterie následně dělí do 3 skupin: silně biofilmopozitivní, slabě biofilmopozitivní a biofilmnegativní (Hassan et al., 2011).

#### **1. 3. 2 Christensenova metoda ve zkumavkách**

Christensenova metoda ve zkumavkách je obdobná jako ta v mikrotitračních destičkách. Jediným a podstatným rozdílem je to, že kultivace a sledování tvorby biofilmu probíhá ve zkumavkách. Testovaná bakterie je kultivována ve zkumavce, která je následně obarvena. Barva se zde využívá taktéž krystalová violet, trypanová modř či safranin. Výsledek se hodnotí na vnitřní straně zkumavky (Nyenje et al., 2013).

#### **1. 3. 3 Kultivace na agaru s kongo-červení**

Tato metoda probíhá na BHI agaru doplněném o sacharózu a barvivo kongočerveně. Studie ukázaly, že jde o metodu s nižší přesností, ale je snadno proveditelná, rychlá, levnější než ostatní testy a hodnocení je založeno na vizuální analýze barvy kolonií. Výhodou jsou taktéž

životaschopné kolonie na médiu, které lze využít pro další analýzy. Přidáním či náhradou některých látek nebo změnou kultivačních parametrů se může přesnost metody zvýšit. Bakterie tvořící biofilm vyrostou na agaru v černých koloniích, zatímco mikroorganismy nežijící v podobě biofilmu v červených koloniích. Pro vyhodnocování existuje barevná stupnice (Kaiser et al., 2013).

### **1. 3. 4 Mikroskopické metody**

V současnosti nejvíce využívanou technikou ke studiu struktury biofilmu je konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM). Jde o nejuniverzálnější metodu. V jedné studii bylo navrženo CLSM s využitím 96-jamkové mikrotitrační destičky, čímž se tato kombinace ukázala jako velmi dobrá náhradní metoda k jiným technikám. Toto spojení nám umožňuje kvalitativní a kvantitativní hodnocení biofilmové struktury *in situ* (Oliveira and Maria de Lourdes, 2010).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2. 1 Použité chemikálie, živné půdy, přístroje a pomůcky

#### 2. 1. 1 Chemikálie

Ethanol 96%	Lach-ner, Neratovice, ČR
Octan sodný	Lach-ner, Neratovice, ČR
Oxalát amonný	PENTA, ČR
NaCl	PENTA, ČR
Krystalová violet	Alchemia, Brno, ČR

#### 2. 1. 2 Technické vybavení

Analytické váhy	Kern, Německo
Autokláv PS 20 A	BMT, ČR
Biologický termostat	MMM-Group, Kanada
Biologický termostat ST 3 COMF/S	POL-EKO, Polsko
Centrifuga Z 300 K	Hermle, Německo
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT	BMT, ČR
Chladnička RK 6201 BW	Gorenje, Slovinsko
Chladnička ZRA 40100 WA	Zanussi, ČR
McFarland densitometr	Biosan, USA
Mikropipety automatické	Discovery, Německo
Mikropipety automatické	Eppendorf, Německo
Sterilizátor parní Sterilab 25 1	BTM, ČR
Sterilizátor parní Sterimat Plus 25 1	BTM, ČR
Tecan Infinite® 200 PRO	Tecan, Švýcarsko
Třepačka a vortex IKA MS 3 Digital	IKA, USA
Třepačka Vomado vortex	Benchmark, USA

### 2. 1. 3 Pomůcky

Běžné plastové, skleněné a kovové laboratorní vybavení

Mikrotitrační destičky, 96 jamek s plochým dnem, PE SPL Life Science Co., Korea

### 2. 1. 4 Živná média a použité roztoky

- **TSA (Trypton Soya Agar)** – HiMedia, Indie

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

K přípravě TSA byla použita sypká prášková směs v poměru 40 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na cca 50 °C byl roztok rozlit do Petriho misek.

- **BHI bujón (Brain Heart Infusion Broth)** – HiMedia, Indie

složení: telecí mozková infuze	z 200 g/l
hovězí srdcová infuze	z 250 g/l
proteasový pepton	10 g/l
chlorid sodný	5 g/l
hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,5 g/l
dextrosa	2 g/l

pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

K přípravě BHI bujónu byla použita sypká prášková směs v poměru 37 g na 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Fyziologický roztok**

K přípravě fyziologického roztoku byl použit chlorid sodný v poměru 8,5 g na 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Krystalová violet'**

K přípravě krystalové violeti bylo použito 2,5 g krystalové violeti, která byla rozpuštěna ve 100 ml ethanolu. Tento připravený roztok se smísil se 400 ml 1% roztoku oxalátu amonného.

## **2. 2 Použité bakteriální kmeny**

Pro sledování tvorby biofilmu na různých površích a za různých kultivačních podmínek byly použity referenční a sbírkové kmeny rodu *Arcobacter* a *Campylobacter*. Některé bakteriální kmeny byly získány z Svitavské nemocnice, Pardubické nemocnice a Oblastní nemocnice Nachod, a.s. Dále byly použity bakteriální kmeny pocházející ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (CCUG), Sbírký mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii (LMG), České sbírký mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM) a Interní sbírký mikroorganismů Univerzity Pardubice (UPa). Přehled kmenů rodu *Arcobacter* a *Campylobacter* použitých v této práci je uveden v **Tabulce 2**.

**Tabulka 2** – Přehled kmenů rodu *Arcobacter* a *Campylobacter* použitých pro testování

<b>Bakteriální druh</b>	<b>Kmenové označení</b>
<i>A. butzleri</i>	LMG 10828; CCUG 30484; CCM 3933; UPa 2012/3; UPa 2013/3; UPa 2013/10; UPa 2013/15; UPa 2013/30; UPa 2013/31; UPa 2013/32; UPa 2013/33; UPa 2013/36; UPa 2013/37; UPa 2014/51; UPa 2014/54; UPa 2015/1; UPa 2015/5; UPa 2015/6; UPa 2015/7; UPa 2015/9; UPa 2015/10; 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; UPa 2015/25; UPa KK; UPa 24A; UPa 30B; UPa 39(3); UPa 49B; UPa 65A; UPa 132A; UPa 138A; UPa 141
<i>A. cryaerophilus</i>	CCM 7050; UPa 2012/1; UPa 2013/1; UPa 2013/12; UPa 2013/13; UPa 2013/14; UPa 2013/16; UPa 2013/17; UPa 2013/28; UPa 2013/35; UPa 2014/58; UPa 2014/58a; UPa 2014/58d; UPa 2014/59; UPa 130
<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. jejuni</i>	CCM 6214; NP 2896; NS 3668; NS 3800; NS 4088; NS 4091
<i>C. coli</i>	NP 2359; NS 3803; NS 4062
<i>Campylobacter sp.</i>	ONN 366

**Pozn.:** *A.* – *Arcobacter*; *C.* – *Campylobacter*; *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; *NP* – Pardubická nemocnice; *NS* – Svitavská nemocnice; *ONN* – Oblastní nemocnice Náchod, a.s.

## 2. 3 Pracovní postupy

### 2. 3. 1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách

Ke sledování tvorby biofilmu byla využita modifikovaná Christensenova metoda, která byla prováděna v mikrotitračních destičkách (plast).

#### *Vlastní postup*

Čistá kultura vyšetřovaného kmene byla přenesena sterilní kličkou do zkumavky s 2 – 3 ml fyziologického roztoku. Suspenze byla upravena tak, aby odpovídala buněčné densitě 0,5 McF ( $10^8$  CFU/ml). Do příslušných jamek plastové mikrotitrační destičky o 96 jamkách s plochým dnem bylo pipetováno 90  $\mu$ l BHI bujónu a 10  $\mu$ l bakteriální suspenze. Takto připravená destička byla spektrofotometricky proměřena při 595 nm na přístroji Tecan Infinite® 200 PRO.



Takto připravená mikrotitrační destička uzavřená víčkem byla následně kultivována v termostatu při 30 °C pro bakterie *Arcobacter* nebo při 42 °C pro kmeny *Campylobacter* po dobu 24 h nebo 72 h a to buď v aerobním či mikroaerofilním prostředí. Po skončení kultivace byla destička opět spektrofotometricky proměřena. Nejdříve byl obsah destičky vyklepnut do odpadu a následně došlo k promývání sterilní destilovanou vodou (10 ml špička, ne příliš velkým tlakem). Destička se takto promyla minimálně 3x. Poté se destička sušila 45 minut při 25 °C či v termostatu při 37 °C, což vysušení značně urychlilo. Následovala fixace biofilmu na stěnách jamky, k čemuž se používal 2% octan sodný (100 µl, 15 minut). Po 15 minutách se činidlo vykleplo do odpadu a následně došlo k barvení biofilmu krystalovou violetí (100 µl, 15 minut). Barvivo bylo poté vyklepnuto do odpadu a destička byla promývána 3-5x sterilní destilovanou vodou. Následovalo opět sušení po dobu 30 minut. Po vyschnutí destičky se do všech jamek napipetovalo 200 µl 96% ethanolu a destička se vložila na 5 minut do vortexu. Následovalo přenesení 100 µl objemu do nové destičky. Odebírání probíhalo z cca poloviny objemu, ne ze dna. Nová destička byla proměřena při vlnové délce 595 nm. Takto získaná absorbance udávala hodnotu, která odpovídá množství vytvořeného biofilmu.

Následovalo vyhodnocování získaných dat. Za biofilm pozitivní byly označeny kmeny, jejichž  $A_{595} > A_{595, \text{BHI bujónu}}$ , dále jako biofilm negativní byly označeny všechny kmeny, které měly  $A_{595} < A_{595, \text{BHI bujónu}}$ . Ke statistickému vyhodnocování naměřených hodnot byl využit program Excel 2010 MS Office (Microsoft, USA) a Statistica 12 (StatSoft, USA). Extrémní hodnoty byly testovány Deanovým-Dixovým testem a případně byly s pravděpodobností 95% vyloučeny. Ze zbylých hodnot byl stanoven medián a směrodatná odchylka (StDev). Uvažovalo se zde i nad možnými zdroji chyb, což může být např. nedostatečně vymyté barvivo. Tyto chyby vedou k nárůstu naměřených absorbancí. Takto ovlivněné hodnoty absorbancí v porovnání s ostatními naměřenými hodnotami byly vyloučeny.

### **2. 3. 2 Christensenova metoda ve zkumavce**

#### ***Vlastní postup***

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno po 2 ml kultivačního média, tedy BHI bujónu. Následovalo zaočkování 100 µl bakteriální suspenze (0,5 McF), která byla připravena stejným postupem jako u Christensenovy metody v MTD (viz. 2. 3. 1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách). Takto připravené zkumavky byly kultivovány při 30 °C pro bakterie *Arcobacter* nebo při 42 °C pro kmeny *Campylobacter* po dobu 24 h nebo 72 h a to buď

v aerobním či mikroaerofilním prostředí. Po kultivaci byl obsah zkumavek vylit do odpadu a zkumavky byly promyty sterilní destilovanou vodou a sušeny při 37 °C. Následně byla vnitřní strana zkumavek barvena krystalovou violetí při 25 °C po dobu 20 minut. Obsah zkumavek byl vylit a zkumavky byly opět promyty sterilní destilovanou vodou a sušeny při 37 °C. Poté bylo provedeno vizuální hodnocení tvorby biofilmu.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo prokázat tvorbu biofilmu u bakteriálních kmenů rodu *Arcobacter* a *Campylobacter*. Biofilm byl sledován na plastových mikrotitračních destičkách a ve skleněných zkumavkách. Různá byla i doba a prostřebí inkubace – 24 nebo 72 hodin a aerofilní či mikroaerofilní prostředí. Za základě výsledků absorbance byla určena tvorba biofilmu. Výsledky těchto laboratorních experimentů jsou uvedeny níže.

#### 3. 1 Tvorba biofilmu na plástu (mikrotitrační destičky)

Tvorba bakteriálního biofilmu byla testována na mikrotitračních destičkách. Živné médium bylo použito BHI. Tvorba biofilmu byla zkoumána u bakterií izolovaných z vody, potravin nebo se jednalo o klinické izoláty. Produkce biofilmu byla hodnocena na základě výsledné hodnoty absorbance, která je přímo úměrná množství vytvořeného bakteriálního biofilmu.

Testované bakterie vytvořily na povrchu plastové mikrotitrační destičky vrstvu biofilmu, který byl posuzován dle výsledné hodnoty absorbance při vlnové délce 595 nm ( $A_{595}$ ). Hodnota absorbance neinokulovaného BHI bujónu byla 0,1110, což je v následujících grafech znázorněno vodorovnou linií (blank). Rozmezí hodnot absorbancí dle jednotlivých zvolených kategorií je znázorněno v **Tabulce 3**.

**Tabulka 3** – Rozmezí hodnot  $A_{595}$  a výsledek biofilmu

Rozmezí hodnot $A_{595}$	Výsledek
$A_{595} < 0,1110$	biofilm-negativní
$0,1200 > A_{595} > 0,1110$	slabě biofilm-pozitivní
$0,1500 > A_{595} > 0,1200$	středně biofilm-pozitivní
$A_{595} > 0,1500$	silně biofilm-pozitivní

**Pozn.:**  $A_{595}$  – absorbance naměřená při vlnové délce 595 nm

##### 3. 1. 1 Tvorba biofilmu na plástu u arkobakterů

Christensenovou metodou v plastové mikrotitrační destičce bylo na tvorbu biofilmu otestováno celkem 59 kmenů bakterií rodu *Arcobacter*. Z celkového počtu bylo 40 kmenů *Arcobacter butzleri*, 15 kmenů *Arcobacter cryaerophilus*, 1 kmen *Arcobacter skirrowii*, 1 kmen *Arcobacter defluvii*, 1 kmen *Arcobacter thereius*, 1 kmen *Arcobacter lanthieri*. Výsledky absorbancí získaných testováním arkobakterů jsou shrnuty v **Tabulce 4**

**Tabulka 4 –** Tvorba biofilmů (hodnoty  $A_{595}$ ) bakterií *Arcobacter* spp.

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>A. butzleri</i>	LMG 10828	0,1260 ± 0,0024**	0,1301 ± 0,0048**	0,1320 ± 0,0080**	0,1778 ± 0,0171***
	CCUG 30484	0,1518 ± 0,0048***	0,1792 ± 0,0070***	0,1778 ± 0,0220***	0,2406 ± 0,0213***
	CCM 3933	0,1184 ± 0,0030*	0,1143 ± 0,0025*	0,1197 ± 0,0040*	0,1947 ± 0,0153***
	UPa 2012/3 <sup>A</sup>	0,1241 ± 0,0028**	0,1226 ± 0,0026**	0,1560 ± 0,0027***	0,1246 ± 0,0051**
	UPa 2013/3 <sup>B</sup>	0,1729 ± 0,0106***	0,2621 ± 0,0050***	0,1289 ± 0,0092**	0,1357 ± 0,0038**
	UPa 2013/10 <sup>A</sup>	0,1121 ± 0,0031*	0,1162 ± 0,0015*	0,1133 ± 0,0056*	0,1247 ± 0,0024**
	UPa 2013/15 <sup>A</sup>	0,1156 ± 0,0027*	0,1206 ± 0,0035**	0,1396 ± 0,0047**	0,1415 ± 0,0041**
	UPa 2013/30 <sup>B</sup>	0,1492 ± 0,0046**	0,1782 ± 0,0062***	0,1235 ± 0,0039**	0,1368 ± 0,0048**
	UPa 2013/31 <sup>B</sup>	0,1210 ± 0,0045**	0,1256 ± 0,0021**	0,1256 ± 0,0086**	0,1321 ± 0,0060**
	UPa 2013/32 <sup>B</sup>	0,1410 ± 0,0059**	0,1393 ± 0,0046**	0,1232 ± 0,0033**	0,1230 ± 0,0044**
	UPa 2013/33 <sup>B</sup>	0,1116 ± 0,0035*	0,1172 ± 0,0018*	0,1216 ± 0,0029**	0,1273 ± 0,0067**
	UPa 2013/36 <sup>A</sup>	0,1200 ± 0,0039**	0,1295 ± 0,0039**	0,1197 ± 0,0030*	0,1286 ± 0,0034**
	UPa 2013/37 <sup>A</sup>	0,1809 ± 0,0058***	0,2072 ± 0,0073***	0,1236 ± 0,0025**	0,1350 ± 0,0080**
	UPa 2014/51 <sup>B</sup>	0,1232 ± 0,0024**	0,1220 ± 0,0020**	0,1254 ± 0,0067**	0,1217 ± 0,0062**
	UPa 2014/54 <sup>B</sup>	0,1167 ± 0,0036*	0,1161 ± 0,0020*	0,1288 ± 0,0048**	0,1241 ± 0,0056**
	UPa 2015/1 <sup>B</sup>	0,1294 ± 0,0023**	0,1320 ± 0,0036**	0,1183 ± 0,0037*	0,1215 ± 0,0037**
	UPa 2015/5 <sup>A</sup>	0,1517 ± 0,0119***	0,2019 ± 0,0098***	0,1182 ± 0,0034*	0,1204 ± 0,0043**
	UPa 2015/6 <sup>B</sup>	0,1251 ± 0,0042**	0,1311 ± 0,0027**	0,1178 ± 0,0025*	0,1253 ± 0,0051**
	UPa 2015/7 <sup>B</sup>	0,2327 ± 0,0109***	0,1695 ± 0,0057***	0,1204 ± 0,0034**	0,1258 ± 0,0038**
	UPa 2015/9 <sup>B</sup>	0,1270 ± 0,0032**	0,1274 ± 0,0043**	0,1198 ± 0,0037*	0,1291 ± 0,0031**
	UPa 2015/10 <sup>B</sup>	0,1408 ± 0,0065**	0,1404 ± 0,0042**	0,1368 ± 0,0047**	0,1375 ± 0,0048**
	UPa 2015/11 <sup>B</sup>	0,1339 ± 0,0026**	0,1365 ± 0,0023**	0,1757 ± 0,0204***	0,2161 ± 0,0294***
	UPa 2015/12 <sup>B</sup>	0,1761 ± 0,0101***	0,1348 ± 0,0026**	0,1169 ± 0,0038*	0,1215 ± 0,0042**
	UPa 2015/13 <sup>B</sup>	0,1198 ± 0,0030*	0,1377 ± 0,0029**	0,1390 ± 0,0111**	0,1456 ± 0,0072**
	UPa 2015/14 <sup>B</sup>	0,1298 ± 0,0038**	0,1356 ± 0,0040**	0,1241 ± 0,0056**	0,1357 ± 0,0045**
	UPa 2015/15 <sup>B</sup>	0,1769 ± 0,0076***	0,2128 ± 0,0085***	0,1420 ± 0,0058**	0,1270 ± 0,0055**
	UPa 2015/16 <sup>B</sup>	0,1978 ± 0,0052***	0,3752 ± 0,0101***	0,1466 ± 0,0071**	0,2167 ± 0,0107***

**Tabulka 4 – Pokračování Tvorba biofilmů (hodnoty  $A_{595}$ ) bakterií *Arcobacter* spp.**

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>A. butzleri</i>	UPa 2015/18 <sup>B</sup>	0,1312 ± 0,0070**	0,1959 ± 0,0086***	0,1195 ± 0,0070*	0,1269 ± 0,0073**
	UPa 2015/19 <sup>C</sup>	0,1334 ± 0,0036**	0,1340 ± 0,0023**	0,1322 ± 0,0055**	0,1493 ± 0,0073**
	UPa 2015/20 <sup>C</sup>	0,1393 ± 0,0034**	0,1390 ± 0,0043**	0,1282 ± 0,0052**	0,1428 ± 0,0065**
	UPa 2015/25 <sup>B</sup>	0,3009 ± 0,0354***	0,1601 ± 0,0046***	0,1505 ± 0,0163***	0,1463 ± 0,0195**
	UPa KK <sup>B</sup>	0,1090 ± 0,0028 <sup>X</sup>	0,1170 ± 0,0048*	0,1192 ± 0,0081*	0,1214 ± 0,0042**
	UPa 24A <sup>B</sup>	0,1384 ± 0,0064**	0,4177 ± 0,0234***	0,1687 ± 0,0149***	0,2463 ± 0,0360***
	UPa 30B <sup>B</sup>	0,1308 ± 0,0055**	0,1180 ± 0,0060*	0,1368 ± 0,0060**	0,1182 ± 0,0034*
	UPa 39(3) <sup>C</sup>	0,1426 ± 0,0061**	0,1338 ± 0,0057**	0,2396 ± 0,0168***	0,1635 ± 0,0101***
	UPa 49B <sup>B</sup>	0,1299 ± 0,0029**	0,1280 ± 0,0049**	0,1237 ± 0,0035**	0,1216 ± 0,0198**
	UPa 65A <sup>B</sup>	0,1296 ± 0,0062**	0,1278 ± 0,0024**	0,1276 ± 0,0103**	0,1728 ± 0,0141***
	UPa 132A <sup>B</sup>	0,1273 ± 0,0060**	0,1510 ± 0,0051***	0,1134 ± 0,0144*	0,1252 ± 0,0043**
	UPa 138A <sup>B</sup>	0,1410 ± 0,0062**	0,2648 ± 0,0303***	0,1215 ± 0,0175**	0,1532 ± 0,0120***
	UPa 141 <sup>B</sup>	0,1229 ± 0,0043**	0,1365 ± 0,0044**	0,1155 ± 0,0050*	0,1339 ± 0,0118**
	<i>A. cryaerophilus</i>	CCM 7050	0,1329 ± 0,0040**	0,1377 ± 0,0054**	0,1162 ± 0,0024*
UPa 2012/1 <sup>A</sup>		0,1229 ± 0,0019**	0,1209 ± 0,0030**	0,1259 ± 0,0027**	0,1287 ± 0,0055**
UPa 2013/1 <sup>B</sup>		0,1185 ± 0,0028*	0,1270 ± 0,0042**	0,1498 ± 0,0048**	0,1428 ± 0,0083**
UPa 2013/12 <sup>A</sup>		0,1192 ± 0,0042*	0,1286 ± 0,0029**	0,1458 ± 0,0042**	0,1536 ± 0,0079***
UPa 2013/13 <sup>A</sup>		0,1281 ± 0,0029**	0,1654 ± 0,0036***	0,1244 ± 0,0023**	0,1337 ± 0,0074**
UPa 2013/14 <sup>A</sup>		0,1358 ± 0,0056**	0,1439 ± 0,0091**	0,1334 ± 0,0064**	0,1364 ± 0,0036**
UPa 2013/16 <sup>A</sup>		0,1212 ± 0,0037**	0,1229 ± 0,0029**	0,1241 ± 0,0033**	0,1287 ± 0,0054**
UPa 2013/17 <sup>B</sup>		0,1177 ± 0,0034*	0,1174 ± 0,0019*	0,1267 ± 0,0047**	0,1294 ± 0,0054**
UPa 2013/28 <sup>B</sup>		0,1168 ± 0,0020*	0,1220 ± 0,0018**	0,1327 ± 0,0058**	0,1366 ± 0,0050**
UPa 2013/35 <sup>A</sup>		0,1300 ± 0,0069**	0,1949 ± 0,0108***	0,1180 ± 0,0056*	0,1181 ± 0,0021*
UPa 2014/58 <sup>B</sup>		0,1290 ± 0,0075**	0,1222 ± 0,0029**	0,1417 ± 0,0115**	0,1450 ± 0,0035**
UPa 2014/58a <sup>B</sup>		0,1281 ± 0,0049**	0,1368 ± 0,0061**	0,1550 ± 0,0059***	0,2417 ± 0,0240***
UPa 2014/58d <sup>B</sup>		0,1443 ± 0,0073**	0,1367 ± 0,0050**	0,1514 ± 0,0128***	0,1768 ± 0,0140***
UPa 2014/59 <sup>B</sup>		0,1271 ± 0,0075**	0,1318 ± 0,0064**	0,1472 ± 0,0061**	0,1354 ± 0,0057**
UPa 130 <sup>B</sup>		0,1247 ± 0,0060**	0,1314 ± 0,0042**	0,1211 ± 0,0100**	0,1157 ± 0,0031*

**Tabulka 4 – Pokračování** Tvorba biofilmů (hodnoty  $A_{595}$ ) bakterií *Arcobacter* spp.

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>A. skirrowii</i>	LMG 6621	0,1264 ± 0,0038**	0,1299 ± 0,0041**	0,1361 ± 0,0057**	0,1291 ± 0,0038**
<i>A. defluvi</i>	LMG 25694	0,2275 ± 0,0345***	0,3788 ± 0,0080***	0,4139 ± 0,0305***	0,5093 ± 0,0403***
<i>A. theaeus</i>	LMG 24488	0,1240 ± 0,0024**	0,1269 ± 0,0043**	0,1195 ± 0,0034*	0,1274 ± 0,0037**
<i>A. lanthieri</i>	LMG 28517	0,1254 ± 0,0023**	0,1322 ± 0,0034**	0,1226 ± 0,0075**	0,1397 ± 0,0110**

**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 biofilm-negativní (X); kmen slabě biofilm-pozitivní (\*); kmen středně biofilm-pozitivní (\*\*); kmen silně biofilm-pozitivní (\*\*\*); <sup>A</sup> vzorek izolovaný z vody; <sup>B</sup> vzorek izolovaný z potravin; <sup>C</sup> klinický izolát; A. – *Arcobacter*

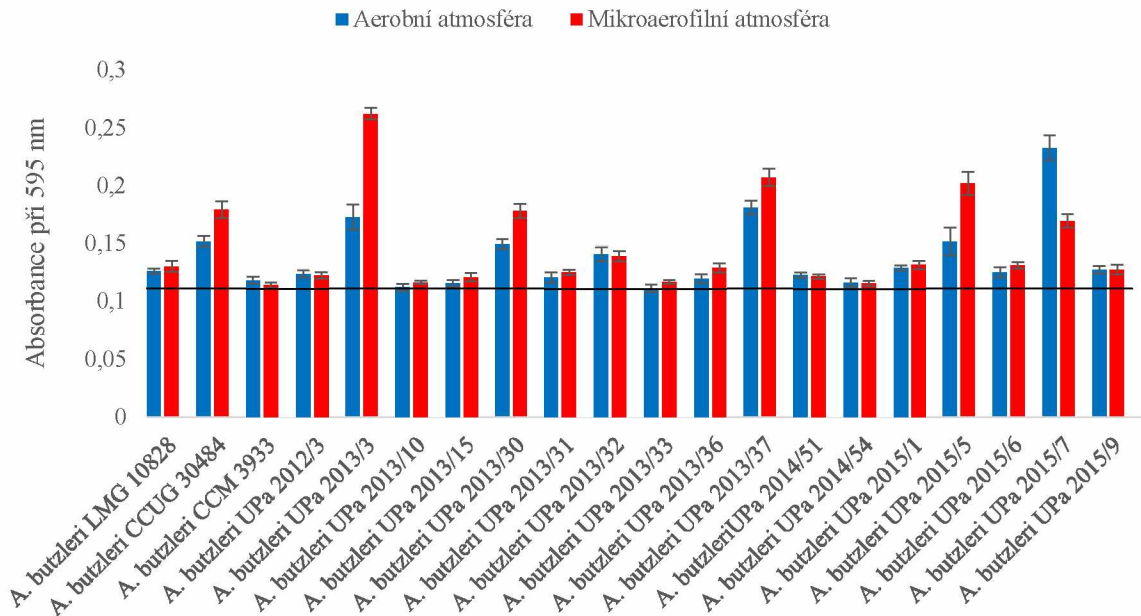
Na základě výsledků, které shrnuje **Tabulka 4** lze říci, že z celkového počtu 59 sledovaných kmenů byla potvrzena tvorba biofilmu u 98,4 % kmenů. Tato vysoká procentuální hodnota poukazuje na určité riziko těchto bakterií, a to zejména v potravinářství. Kjeldgaard et al. (2009) a Ferreira et al. (2013) uvedli dokonce 100 % schopnost tvorby biofilmu u testovaných kmenů arkobakterů. Výsledky těchto studií se tedy v podstatě shodují s výsledky naší studie.

Schopnost tvorby biofilmu bývá ovlivněna vnějšími faktory. Girbau et al. (2017) uvedli ve své studii, že arkobaktery tvoří biofilm za aerobních a mikroaerofilních podmínek, což se potvrdilo i v naší studii. Girbau et al. (2017) dále prokázali, že aerobní prostředí podporuje adhezi buněk izolátů, jenž v mikroaerofilní atmosféře biofilm netvořily. Na některé druhy má aerobní prostředí opačný vliv, což Ferreira et al. (2013) prokázali ve své studii, neboť pouze 19,7 % z celkového počtu sledovaných izolátů bylo schopno adherovat a tvořit biofilmovou strukturu v aerobních podmínkách. V naší studii byly kmeny sledovány v aerobním i mikroaerofilním prostředí. Po 24 h kultivaci nebyly u 73,5 % ze všech testovaných kmenů znatelné žádné významné rozdíly v tvorbě biofilmu v aerobním a mikroaerofilním prostředí. U 7,7 % kmenů byl zaznamenán nárůst biofilmu vytvořeného v mikroaerofilním prostředí oproti tomu vytvořenému v prostředí aerobním. Tento nárůst tvorby biofilmu byl nejvíce pozorován zejména u kmenů *Arcobacter cryaerophilus*. Pouze u 1,2 % kmenů biofilmová tvorba poklesla v mikroaerofilním prostředí, což bylo patrné především u kmenů *Arcobacter butzleri*. Nejvyšší hodnota absorbance a tedy i biofilmové tvorby v aerobním prostředí byla zaznamenána u *Arcobacter butzleri* UPa 2015/25 ( $A_{595}=0,3009$ ) a u *A. butzleri* UPa 2015/7 ( $A_{595}=0,2327$ ). Oba zmíněné kmeny arkobakterů byly izolovány z potravin. Z testovaných zástupců *A. cryaerophilus* tvořil nejvíce biofilmu kmen *A. cryaerophilus* 2014/58d (izolát z vody;

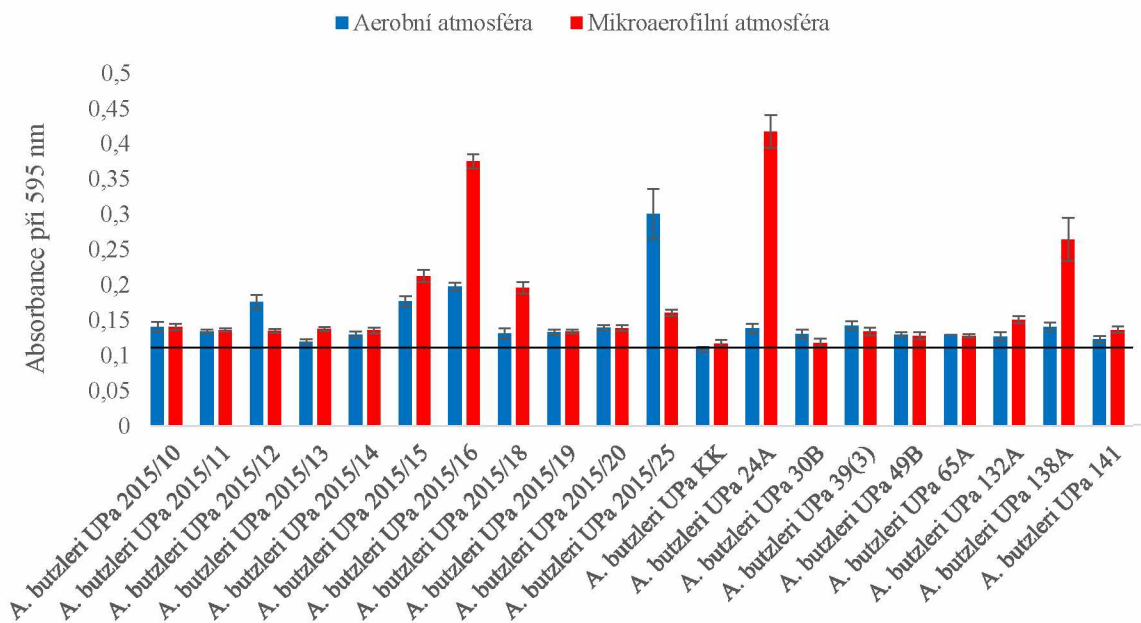
$A_{595}=0,1443$ ). Značně vysoká tvorba biofilmu byla zaznamenána také u sbírkového kmene *A. defluvii* LMG 25694, který vykazoval 0,2275 hodnotu absorbance. V mikroaerofilních podmínkách šlo o nejvyšší hodnotu absorbance 0,4177 u *Arcobacter butzleri* UPa 24A, jenž byl izolován z potravin, konkrétně z masa. Další vysoká hodnota absorbance 0,3752 byla sledována u *A. butzleri* 2015/16, taktéž izolovaného z potravin. U *A. cryaerophilus* byla zaznamenána nejvyšší tvorba biofilmu u kmene 2013/35 s absorbcí 0,1949. Tento mikroorganismus byl izolován z vody. Ze sbírkových kmenů nejvíce biofilmu tvořil opět *A. defluvii* LMG 25694. Nejméně aktivní se jevil *A. butzleri* UPa KK izolovaný z potravin.

Většina kmenů v naší studii byla hodnocena jako středně biofilm-pozitivní v aerobních podmínkách (78 %). Pouze 10 kmenů bylo hodnoceno za silně biofilm-pozitivní ( $A_{595}>0,1500$ ) a 10 kmenů za slabě-biofilm pozitivní ( $0,1200>A_{595}>0,1110$ ). Girbau et al. (2017) ve svém výzkumu zjistili, že většina testovaných kmenů arkobakterů (77,8 %), jenž mají schopnost přilnout k povrchu, se zařadily mezi slabě biofilm-pozitivní bakterie. Je třeba však zdůraznit, že i slabě biofilm-pozitivní kmeny jsou potenciálně nebezpečné. Hodnoty v mikroaerofilních podmínkách po 24 h kultivaci zůstaly téměř totožné, zvýšil se akorát počet silně biofilm-pozitivních arkobakterů (16 kmenů). Výrazná tvorba biofilmu v mikroaerofilním prostředí po 24 h byla sledována u *A. butzleri* UPa 2015/16 ( $A_{595}=0,3752$ ) a dále také u *A. defluvii* ( $A_{595}=0,3788$ ). Naopak nejméně aktivní byl *A. butzleri* CCM 3933 ( $A_{595}=0,1143$ ), který se zařadil mezi slabě biofilm-pozitivní mikroby.

Porovnání hodnot absorbancí (biofilmové aktivity) za aerobního a mikroaerofilního prostředí po 24 h kultivaci arkobakterů můžeme vidět v **Grafu 1-4**.

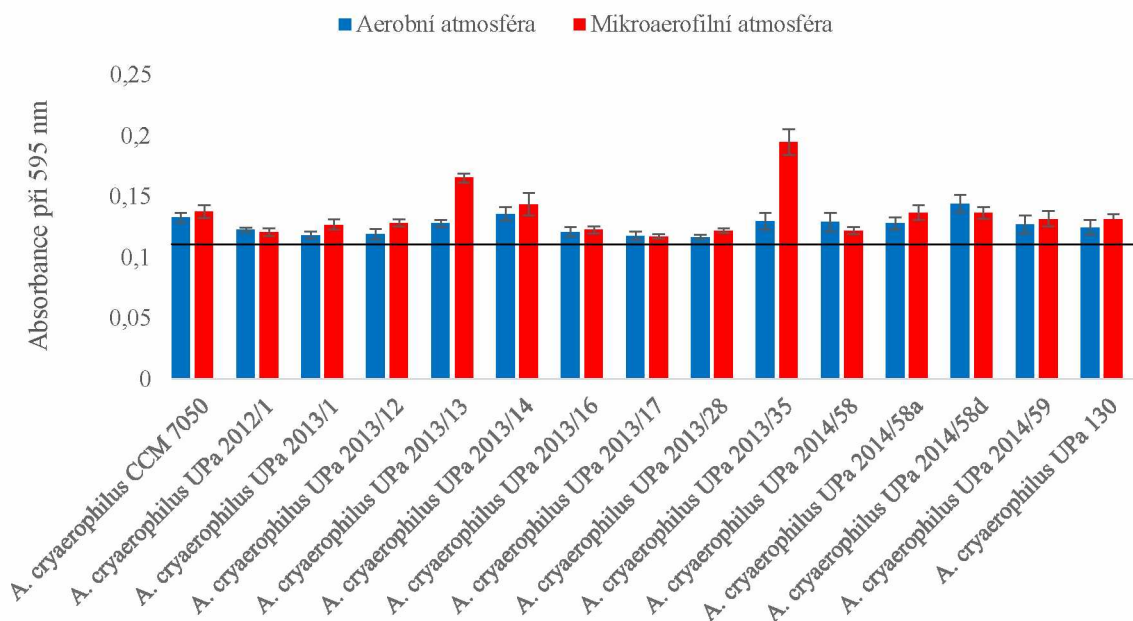


**Graf 1** – Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter butzleri* za různých podmínek (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 24 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.

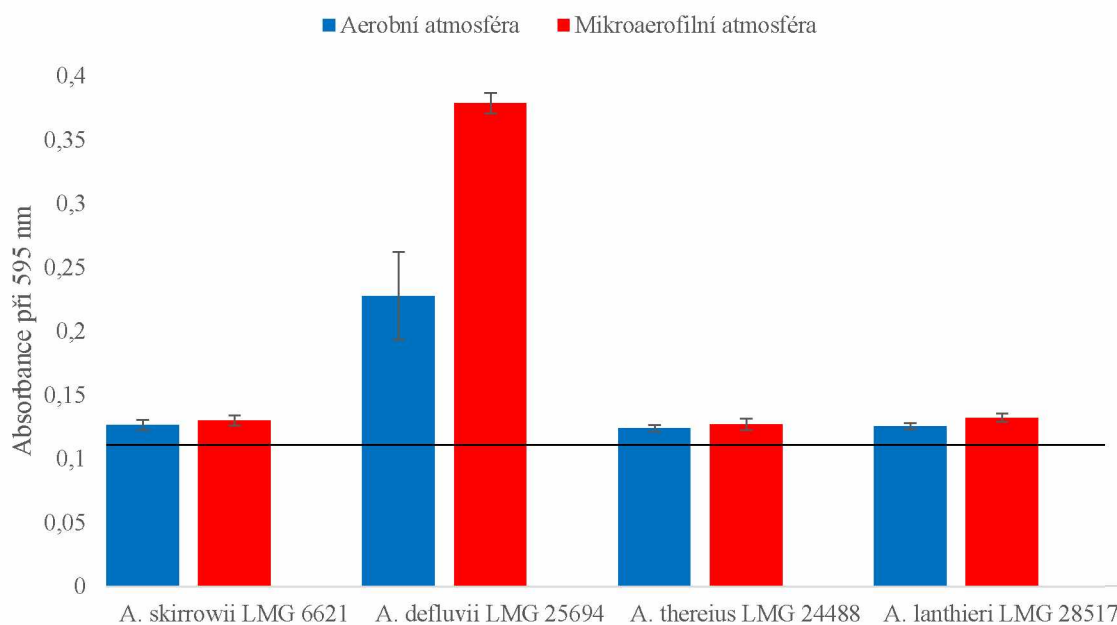


**Graf 2** – Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter butzleri* za různých podmínek – pokračování (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 24 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.





**Graf 3** - Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter cryaerophilus* za různých podmínek (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 24 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.



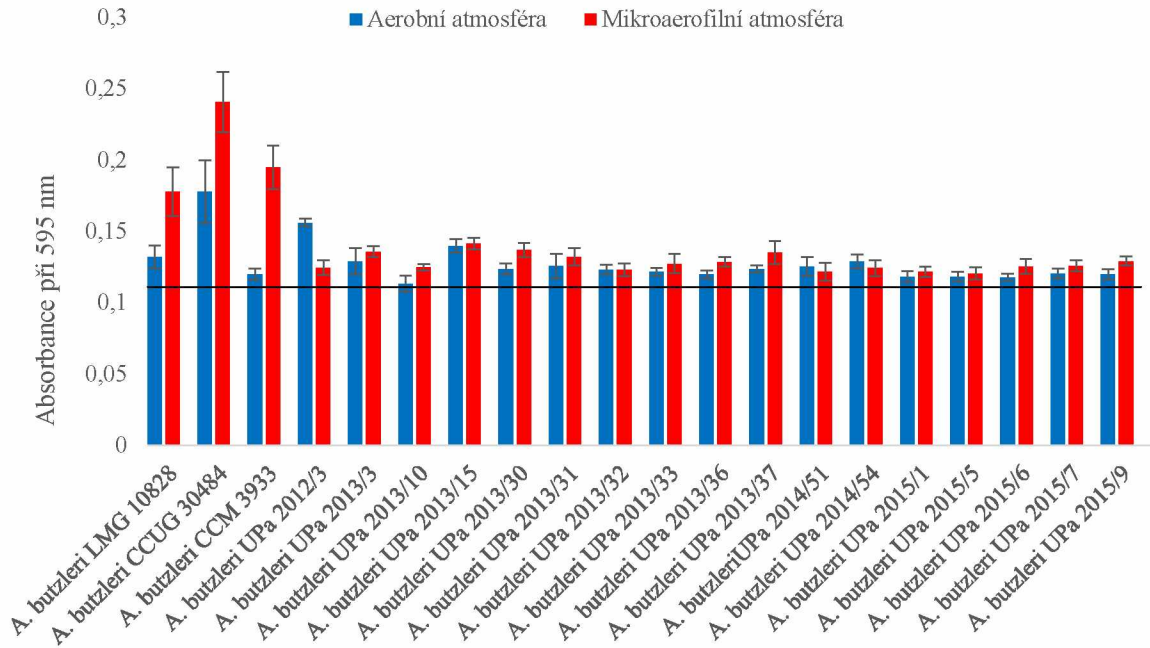
**Graf 4** - Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter skirrowii*, *Arcobacter defluvii*, *Arcobacter thereius* a *Arcobacter lanthieri* za různých podmínek (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 24 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.

Po 72 h kultivaci byly rozdíly v tvorbě biofilmu za aerobních a mikroaerofilních podmínek znatelnější. Zvýšená tvorba biofilmu v mikroaerofilním prostředí po 72 h kultivaci byla zaznamenána u 19 kmenů, což odpovídá 11,2 % ze všech testovaných arkobakterů. K největšímu navýšení biofilmové tvorby došlo u kmenů *Arcobacter butzleri*. U většiny kmenů (78,8 %) zůstala biofilmová tvorba na stejné úrovni nebo s minimálním rozdílem. U 4 kmenů po 72 h kultivaci byl potvrzen pokles tvorby biofilmu. Kmen *Arcobacter defluvii* LMG 25694 byl po 72 h hodnocen jako nejvíce biofilm-pozitivní (aerobní atmosféra  $A_{595}=0,4139$ ; mikroaerofilní atmosféra  $A_{595}=0,6093$ ). V aerobním prostředí dále značné množství biofilmu tvořil kmen *A. butzleri* UPa 39(3), který byl klinickým izolátem. Z testovaných bakterií *A. cryaerophilus* měl schopnost nejvíce tvořit biofilm kmen *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2014/58a (aerobní atmosféra  $A_{595}=0,1550$ ). V mikroaerofilních podmínkách vykazoval vysokou hodnotu absorbance *A. butzleri* 24A (izolát z potravin;  $A_{595}=0,2463$ ) a sbírkový kmen *A. butzleri* CCUG 30484 ( $A_{595}=0,2406$ ), dále také *A. cryaerophilus* UPa 2014/58a ( $A_{595}=0,2417$ ).

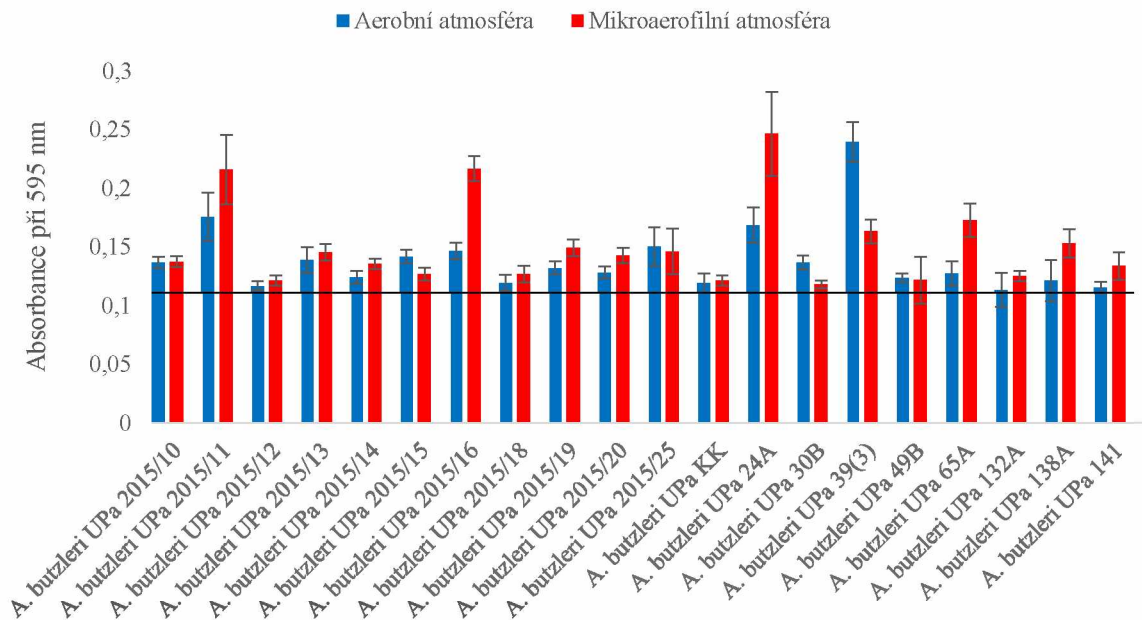
Stejně jako po 24 h kultivaci v aerobním prostředí byla většina (35 kmenů) bakterií zařazena mezi středně biofilm-pozitivní. Obdobně tomu bylo po kultivaci v mikroaerobním prostředí. Značný rozdíl byl zaznamenán u slabě biofilm-pozitivních bakterií, kdy po aerobní kultivaci bylo do této kategorie zařazeno 15 kmenů a po mikroaerofilní kultivaci již pouze 3 kmeny. Šilhová-Hrušková et al. (2015) ve své studii uvedli, že mikroorganismy *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* tvořily nejvíce biofilmu po 24 h a poté docházelo k postupnému poklesu absorbancí. V naší studii toto nelze potvrdit, neboť hodnoty absorbancí po delší kultivaci (72 h) neklesaly.

Zajímavý je kmen *A. butzleri* CCUG 30484, u kterého se tvorba biofilmu zvýšila po 72 h kultivaci ( $A_{595}=0,1518$  po 24 h, aerobní prostředí;  $A_{595}=0,1778$  po 72 h, aerobní prostředí). Hodnoty absorbancí se zvýšily také v mikroaerofilním prostředí, a to jak po 24 h tak i po 72 h kultivaci ( $A_{595}=0,1792$  po 24 h;  $A_{595}=0,2406$  po 72 h). Obdobný trend byl sledován i u *Arcobacter defluvii* LMG 25694.

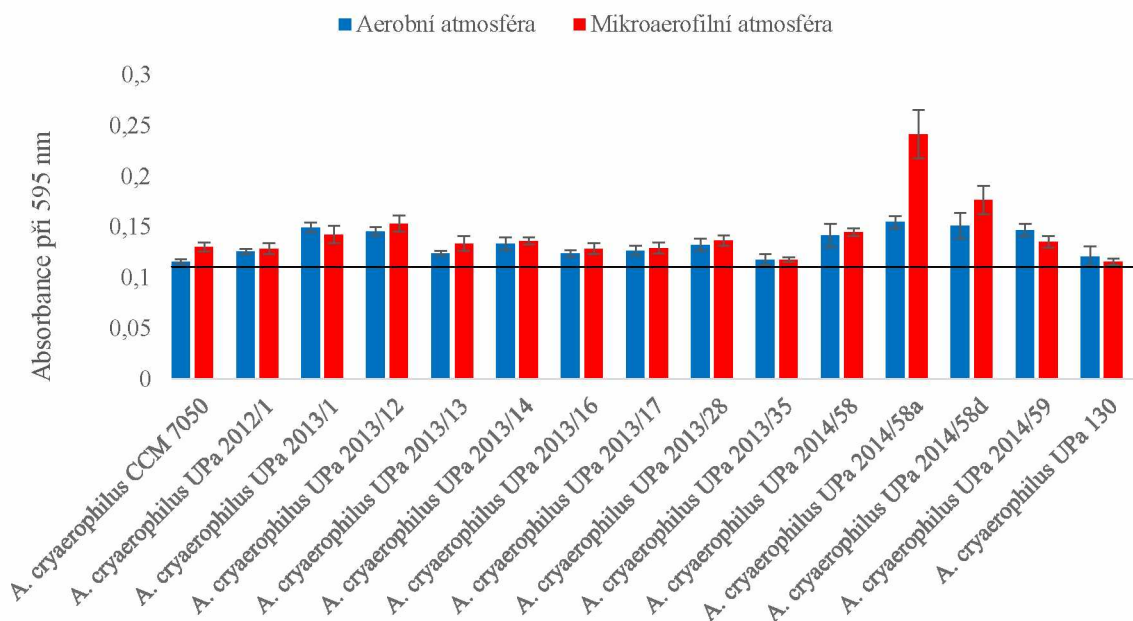
**Graf 5-8** znázorňuje tvorbu biofilmu u jednotlivých kmenů *Arcobacter* v aerobním a mikroaerofilním prostředí po 72 h kultivaci.



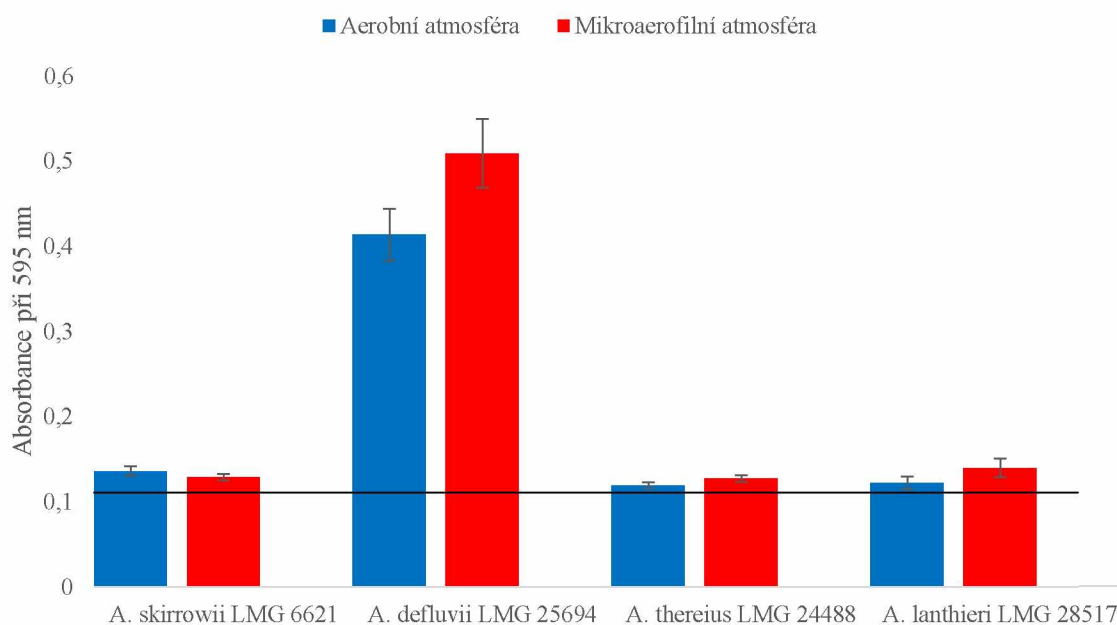
**Graf 5** - Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter butzleri* za různých podmínek (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 72 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankovou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.



**Graf 6** - Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter butzleri* za různých podmínek – pokračování (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 72 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankovou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.



**Graf 7** - Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter cryaerophilus* za různých podmínek (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 72 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.



**Graf 8** - Tvorba biofilmu u kmenů *Arcobacter skirrowii*, *Arcobacter defluvii*, *Arcobacter thereius* a *Arcobacter lanthieri* za různých podmínek (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 30 °C, 72 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.

Kjeldgaard et al. (2009) zjistili, že množství vytvořeného biofilmu se zvyšuje s rostoucím časem a teplotou kultivace. To však z výsledků naší studie nevyplývá, jelikož hodnoty absorbancí po 72 h kultivaci nevykazovaly významné zvýšení oproti kultivaci trvající 24 h. Šilhová-Hrušková et al. (2015) uvedli ve své studii stejné tvrzení, neboť testované bakterie vykazovaly nejvyšší tvorbu biofilmu po 24 h kultivaci s následným poklesem biofilmové tvorby s rostoucí dobou kultivace. Následně došlo k poklesu hodnot absorbancí či k minimální změně.

Šilhová-Hrušková et al. (2013) uvedli, že tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z reálného prostředí je téměř shodná s kmeny sbírkovými. Ferreira et al. (2013) ve své studii tvrdili pravý opak, neboť divoké kmeny vykazovaly větší schopnost přilnout a vytvořit biofilm než ve srovnání s kmeny sbírkovými. Naše výsledky poukazují na minimální rozdíly v tvorbě biofilmu mezi sbírkovými a divokými kmeny arkobakterů.

Girbau et al. (2017) pracovali s izoláty, které izolovali z různých druhů potravin. Izoláty, s největší tvorbou biofilmu, byly izolovány z mušlí, drůbeže a syrového mléka. Naopak žádný vzorek vepřového a hovězího masa neobsahoval adherentní kmen arkobakterů. V naší studii nejvíce biofilm tvořili bakterie izolované z kuřecího a rybího masa.

Schopnost tvořit biofilm se liší u kmenů stejného druhu, což se dle výsledků potvrzuje i v naší studii. Tato rozdílnost byla popsána i u jiných bakterií, např. u *Salmonella enterica* či *Listeria monocytogenes*. Nelze jednoznačně určit, jaké kultivační podmínky jsou či nejsou pro formování biofilmu vhodné, neboť každý určitý kmen se chová odlišně (Girbau et al., 2017; Šilhová-Hrušková et al., 2015). Existuje několik faktorů, jenž výrazně ovlivňují formování biofilmu. Vliv vnitřních faktorů u *A. butzleri* způsobuje rozdílnou schopnost adherovat k abiotickým povrchům za stejných kultivačních podmínek. Tvorba biofilmu je velmi ovlivněna také faktory vnějšími, jako je dostupnost živin, podmínky prostředí či vlastnosti povrchu. Značný vliv mají kultivační média, neboť ovlivňují adhezi (Girbau et al., 2017). Autoři publikací zabývající se biofilmy se často neshodují, které kultivační médium je nejvhodnější. Pro tvorbu biofilmu je vhodné zvolit TSB médium (Baldassari et al., 1993), dále lze zvolit BHI bujón (Knobloch et al., 2002). Nízká tvorba biofilmu byla zaznamenána u Mueller-Hinton média (Girbau et al., 2017). Důležitou roli v tvorbě biofilmu hraje také druh materiálu. Arkobaktery mohou biofilm tvořit na nerezové oceli, mědi a plastových površích. Girbau et al. (2017) testovali na mikrotitrační plastové destičce 42 izolátů *A. butzleri*. Na plastovém povrchu tvořilo 21,4 % kmenů biofilm. Tato procentuální hodnota je značně nižší než v jiných

v publikacích, kde uváděli až 4x vyšší tvorbu biofilmu na plastu (Kjeldgaard et al., 2009; Ferreira et al., 2013).

### 3. 1. 2 Tvorba biofilmu na plastu u kampylobakterů

Pomocí Christensenovy metody v mikrotitrační destičce bylo otestováno také 10 kmenů bakterií rodu *Campylobacter* z hlediska tvorby biofilmu. Z celkového počtu se jednalo o 6 kmenů *Campylobacter jejuni*, 3 kmeny *Campylobacter coli* a 1 kmen byl bez bližšího určení (*Campylobacter* sp.). Všechny sledované kmeny kampylobakterů byly klinické izoláty získané z okolních nemocnic.

Výsledky absorbancí pro kampylobaktery jsou znázorněny v **Tabulce 5**.

**Tabulka 5** – Tvorba biofilmů (hodnoty  $A_{595}$ ) bakterií *Campylobacter* spp.

<i>Campylobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>C. jejuni</i>	CCM 6214	0,1206 ± 0,0031**	0,1152 ± 0,0020*	0,0926 ± 0,0060 <sup>X</sup>	0,1166 ± 0,0019*
	NP 2896 <sup>C</sup>	0,1256 ± 0,0033**	0,1186 ± 0,0029*	0,0920 ± 0,0062 <sup>X</sup>	0,1165 ± 0,0023*
	NS 3668 <sup>C</sup>	0,1253 ± 0,0023**	0,1268 ± 0,0025**	0,1143 ± 0,0028*	0,1171 ± 0,0028*
	NS 3800 <sup>C</sup>	0,1210 ± 0,0029**	0,1272 ± 0,0022**	0,1148 ± 0,0027*	0,1214 ± 0,0030**
	NS 4088 <sup>C</sup>	0,1237 ± 0,0200**	0,1268 ± 0,0050**	0,1187 ± 0,0039*	0,1290 ± 0,0044**
	NS 4091 <sup>C</sup>	0,1242 ± 0,0031**	0,1249 ± 0,0081**	0,1127 ± 0,0042*	0,1178 ± 0,0045*
<i>C. coli</i>	NP 2359 <sup>C</sup>	0,1226 ± 0,0026**	0,1250 ± 0,0023**	0,1184 ± 0,0030*	0,1248 ± 0,0070**
	NS 3803 <sup>C</sup>	0,1208 ± 0,0035**	0,1161 ± 0,0030*	0,0941 ± 0,0057 <sup>X</sup>	0,1158 ± 0,0028*
	NS 4062 <sup>C</sup>	0,1205 ± 0,0042**	0,1147 ± 0,0037*	0,0941 ± 0,0053 <sup>X</sup>	0,1180 ± 0,0038*
<i>Campylobacter</i> sp.	ONN 366 <sup>C</sup>	0,1320 ± 0,0070**	0,1299 ± 0,0035**	0,1145 ± 0,0051*	0,1175 ± 0,0068*

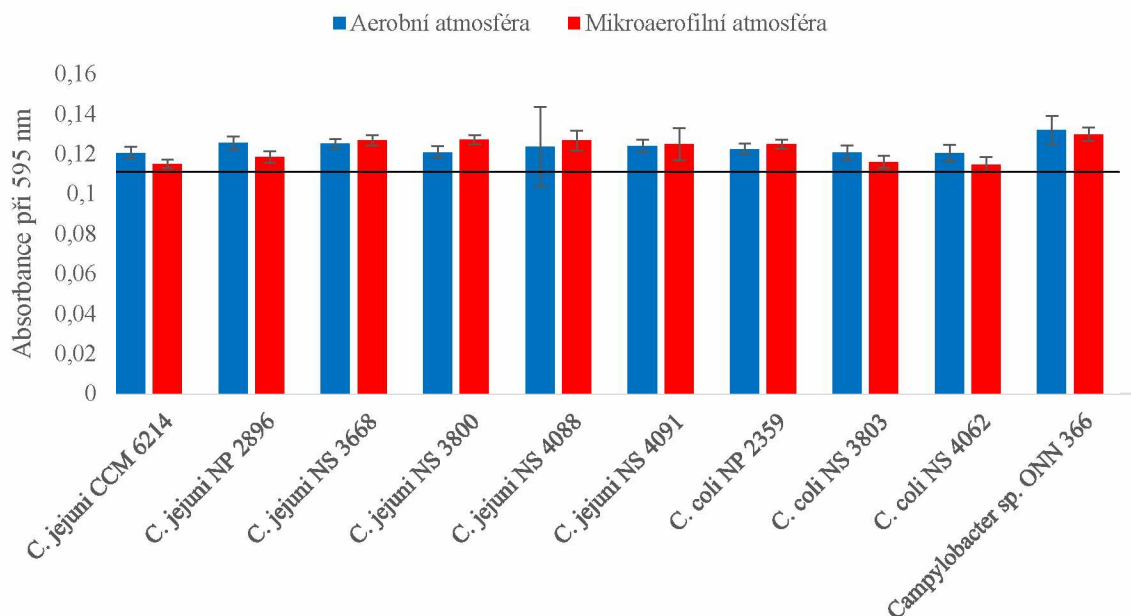
**Pozn.:** NP – Nemocnice Pardubice; NS – Nemocnice Svitavy; ONN – Oblastní nemocnice Náchod; kmen biofilm-negativní (<sup>X</sup>); kmen slabě biofilm-pozitivní (<sup>^</sup>); kmen středně biofilm-pozitivní (<sup>^\*</sup>); kmen silně biofilm-pozitivní (<sup>^\*\*</sup>); <sup>A</sup> vzorek izolovaný z vody; <sup>B</sup> vzorek izolovaný z potravin; <sup>C</sup> klinický izolát; C. – *Campylobacter*

Dle výsledků, které jsou uvedeny v **Tabulce 5**, lze říci, že z celkového počtu tvořilo 100 % kampylobakterů biofilm v aerobním prostředí po 24 h kultivaci. Po 72 h kultivaci bylo množství kampylobakterů tvořících biofilm značně méně, a to pouze 60 %. Z celkového počtu tedy 4 kmeny netvořily biofilm vůbec a 6 kmenů se zařadilo do kategorie slabě biofilm-pozitivní. Z našich výsledků lze tedy usoudit, že bakterie rodu *Campylobacter* tvoří nejvíce biofilm po 24 h kultivační době, neboť při delší kultivaci se tvorba biofilmu značně snížila.

Šilhová-Hrušková et al. (2015) však uvedli pravý opak, neboť v jejich studii *C. coli* a *C. jejuni* po 6ti denní kultivaci spadali mezi středně biofilm-pozitivní, zatímco po 48 h kultivační době se zařadili do kategorie slabě biofilm-pozitivní. V naší studii schopnost tvořit biofilm ztratil *C. jejuni* CCM 6214, *C. jejuni* NP 2896, *C. coli* NS 3803 a *C. coli* NS 4062.

Po 24 h kultivaci nebyl u 60 % kmenů znatelný žádný větší rozdíl hodnot absorbancí mezi prostředím aerobním a mikroaerofilním. U 40 % kmenů způsobilo mikroaerofilní prostředí pokles absorbancí a tyto kmeny se zařadily mezi slabě biofilm-pozitivní mikroorganismy. Zvýšení adheze v mikroaerofilním prostředí nebylo zaznamenáno ani u jednoho kmene. Z našich výsledků je zřetelné, že bakterie rodu *Campylobacter* biofilm lépe tvoří v aerobním prostředí. Reuter et al. (2010) prokázali lepší adhezi a tvorbu biofilmu v aerobních podmínkách. Oh et al. (2016) ve své publikaci uvedli taktéž, že aerobní prostředí napomáhá k tvorbě biofilmu u kampylobakterů. V této studii prokázali, že zvýšení tvorby biofilmu u *Campylobacter jejuni* je spojeno s oxidačním stresem. Naše výsledky se shodují s výsledky v těchto studiích. Zvýšení tvorby biofilmu může nastat i v prostředí se sníženým obsahem kyslíku v kombinaci s vysokými teplotami, což uvedli ve své studii Reeser et al. (2007).

Porovnání tvorby biofilmu v aerobním a mikroaerobním prostředí po 24 h kultivaci je znázorněno v **Grafu 9**.

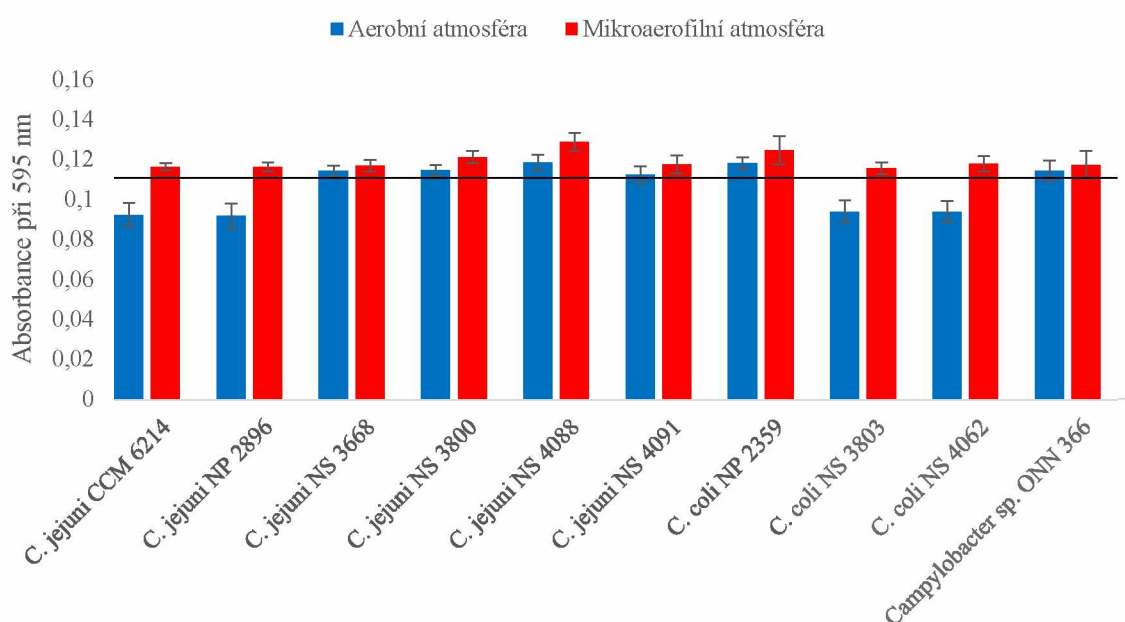


**Graf 9** - Tvorba biofilmu u jednotlivých kmenů *Campylobacter* (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 42 °C, 24 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.



Po 72 h kultivaci byla tvorba biofilmu vyšší v mikroaerofilním prostředí než v podmínkách aerobních. Většina kmenů (70 %) se po mikroaerofilní kultivaci zařadila do slabě biofilm-pozitivní skupiny. Pouze 30 % kmenů spadala mezi středně biofilm-pozitivní bakterie. U 70 % kmenů se zvýšila tvorba biofilmu v mikroaerofilním prostředí ve srovnání s prostředím aerobním.

Porovnání tvorby biofilmu v aerobním a mikroaerobním prostředí po 72 h kultivaci lze vidět v **Grafu 10**.



**Graf 10** - Tvorba biofilmu u jednotlivých kmenů *Campylobacter* (Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách; aerobní a mikroaerofilní podmínky, 42 °C, 72 h, n=24, ± směrodatná odchylka); vodorovná linie ( $A_{595}=0,1110$ ) reprezentuje blankoou hodnotu získanou experimentem s neinokulovaným BHI bujónem.



### 3. 2 Tvorba biofilmu na skle (zkumavky)

Dále byla sledována produkce biofilmu u klinicky významných bakterií čeledi *Campylobacteraceae* pomocí Christensenovy zkumavkové metody. Ke sledování tvorby biofilmu byly použity totožné kmeny jako při hodnocení biofilmové aktivity na plastu (kapitola 3.1).

U Christensenovy zkumavkové metody byla subjektivně hodnocena vrstva vytvořeného a následně obarveného biofilmu. Hodnocení tvorby biofilmu bylo buď negativní (-), slabě biofilm-pozitivní (+), středně biofilm-pozitivní (++) nebo silně biofilm-pozitivní (+++).

Christensenová zkumavková metoda bývá hodnocena jako méně přesná, neboť zde dochází k subjektivnímu hodnocení. Pro potvrzení zda bakterie biofilm tvoří či nikoliv, by měly být využity ještě další doplňující metody.

#### 3. 2. 1 Tvorba biofilmu na skle u arkobakterů

Dle výsledků v **Tabulce 6** lze říci, že bakterie rodu *Arcobacter* na sklo adherují méně než na plastový povrch mikrotitrační destičky. Plastový povrch arkobakterům vyhovuje více, lze tedy říci, že preferují hydrofobní materiál. Po 24 h kultivaci v aerobním prostředí tvořilo biofilm 89,4 % a v mikroaerofilním prostředí biofilm produkovalo 87,6 % kmenů. Girbau et al. (2017) ve své studii sledovali tvorbu biofilmu u izolátů arkobakterů a uvedli, že 7 z 9 izolátů bylo schopno adherovat na skleněný povrch.

**Tabulka 6** – Tvorba biofilmu kmenů rodu *Arcobacter* na skleněném povrchu

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>A. butzleri</i>	LMG 10828	++	+	+++	+
	CCUG 30484	+++	++	+++	++
	CCM 3933	-	++	-	-
	UPa 2012/3 <sup>A</sup>	+++	+	+++	+
	UPa 2013/3 <sup>B</sup>	+++	+++	+++	-
	UPa 2013/10 <sup>A</sup>	+	++	+++	+++
	UPa 2013/15 <sup>A</sup>	+++	-	+++	+
	UPa 2013/30 <sup>B</sup>	+++	+++	+	+++
	UPa 2013/31 <sup>B</sup>	+++	+++	++	+

Tabulka 6 – Pokračování Tvorba biofilmu kmenů rodu *Arcobacter* na skleněném povrchu

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>A. butzleri</i>	UPa 2013/32 <sup>B</sup>	++	-	++	+
	UPa 2013/33 <sup>B</sup>	+++	++	-	+
	UPa 2013/36 <sup>A</sup>	++	+	+++	+
	UPa 2014/51 <sup>B</sup>	++	-	+++	+
	UPa 2014/54 <sup>B</sup>	++	+	+++	++
	UPa 2015/1 <sup>B</sup>	+++	+	+++	+
	UPa 2015/5 <sup>A</sup>	+++	+	+++	++
	UPa 2015/6 <sup>B</sup>	-	-	+	-
	UPa 2015/7 <sup>B</sup>	+++	++	+++	+
	UPa 2015/9 <sup>B</sup>	-	-	+++	+
	UPa 2015/10 <sup>B</sup>	+	+	+++	+
	UPa 2015/11 <sup>B</sup>	-	-	+++	+++
	UPa 2015/12 <sup>B</sup>	-	-	-	-
	UPa 2015/13 <sup>B</sup>	-	-	+++	-
	UPa 2015/14 <sup>B</sup>	+	++	++	-
	UPa 2015/15 <sup>B</sup>	-	-	+++	-
	UPa 2015/16 <sup>B</sup>	+++	+	++	+++
	UPa 2015/18 <sup>B</sup>	++	+	+++	+
	UPa 2015/20 <sup>C</sup>	-	-	+++	-
	UPa 2015/25 <sup>B</sup>	+	-	+++	+
	UPa KK <sup>B</sup>	+++	++	+++	+++
	UPa 24A <sup>B</sup>	+++	+++	+++	+++
	UPa 30B <sup>B</sup>	+	-	+++	+
	UPa 39(3) <sup>C</sup>	-	++	-	-
	UPa 49B <sup>B</sup>	+	-	+++	+
	UPa 65A <sup>B</sup>	+	+	+++	+++
	UPa 132A <sup>B</sup>	+	+	+++	+++
UPa 138A <sup>B</sup>	+++	++	+++	++	
UPa 141 <sup>B</sup>	+	+	+++	+++	
<i>A. cryaerophilus</i>	CCM 7050	++	++	+	+
	UPa 2012/1 <sup>A</sup>	+++	++	++	+

**Tabulka 6 - Pokračování** Tvorba biofilmu kmenů rodu *Arcobacter* na skleněném povrchu

<i>Arcobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>A. cryaerophilus</i>	UPa 2013/1 <sup>B</sup>	-	+	++	++
	UPa 2013/12 <sup>A</sup>	-	-	+	+
	UPa 2013/13 <sup>A</sup>	++	++	+	+
	UPa 2013/14 <sup>A</sup>	-	+	-	-
	UPa 2013/16 <sup>A</sup>	++	+	+	+++
	UPa 2013/17 <sup>B</sup>	+++	+	+++	+
	UPa 2013/28 <sup>B</sup>	+++	+	+++	+
	UPa 2013/35 <sup>A</sup>	++	++	+++	++
	UPa 2014/58 <sup>B</sup>	+	+	+++	++
	UPa 2014/58a <sup>B</sup>	+	+	+++	+++
	UPa 2014/58d <sup>B</sup>	-	-	+++	++
	UPa 2014/59 <sup>B</sup>	-	++	+	-
	UPa 130 <sup>B</sup>	+	-	+++	+++
<i>A. skirrowii</i>	LMG 6621	-	-	++	++
<i>A. defluvii</i>	LMG 25694	+++	+++	+++	+++
<i>A. thereius</i>	LMG 24488	-	-	+++	+
<i>A. lanthieri</i>	LMG 28517	+	-	++	-

**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 biofilm-negativní (-); kmen slabě biofilm-pozitivní (+); kmen středně biofilm-pozitivní (++); kmen silně biofilm-pozitivní (+++); <sup>A</sup> vzorek izolovaný z vody; <sup>B</sup> vzorek izolovaný z potravin; <sup>C</sup> klinický izolát; A. – *Arcobacter*

Po 24 h kultivační době v aerofilním prostředí se mezi silně biofilm-pozitivní bakterie zařadilo 20 kmenů rodu *Arcobacter*, z tohoto počtu bylo 16 kmenů *A. butzleri*, 3 kmeny *A. cryaerophilus* a 1 kmen *A. defluvii*. Izoláty, jenž biofilm tvořily silně, byly nejvíce izolovány z potravin. Po stejné kultivační době v mikroaerofilním prostředí se do této kategorie řadilo již pouze 6 arkobakterů, což bylo 5 kmenů *A. butzleri* a 1 kmen *A. defluvii*. Z našich výsledků lze usoudit, že arkobaktery adherují a tvoří biofilm lépe v aerobním prostředí než v prostředí mikroaerobním. Tento trend se potvrzuje i po 72 h kultivaci, kde rozdíl mezi podmínkami aerobními a mikroaerobními byly ještě větší. Po kultivaci v aerobním prostředí se silně biofilm-pozitivních jevílo 37 kmenů arkobakterů, v mikroaerofilním prostředí se jednalo o 20 kmenů. Z našich výsledků je taktéž zřejmé, že delší kultivační doba ve skleněných zkumavkách

arkobakterům prospívá, neboť k silně biofilm-pozitivním kmenům se zařadilo více kmenů než po 24 h kultivaci.

Biofilm po 24 h v aerobních podmínkách vůbec netvořilo 18 kmenů, 13 kmenů biofilm tvořilo slabě a středně pozitivních bylo 8 arkobakterů. Nejméně aktivní po 24 h kultivaci v aerobním prostředí byly kmeny *Arcobacter cryaerophilus*, neboť 10 kmenů z celkového počtu 15, biofilm tvořilo slabě nebo zcela netvořilo. V prostředí mikroaerofilním se nejméně aktivní jeví *A. butzleri*, protože 29 kmenů tvořilo biofilm slabě či vůbec. Středně biofilm-pozitivních arkobakterů po mikroaerofilní kultivaci bylo 14.

Po 72 h kultivační době, jak lze vidět v **Tabulce 6**, v aerobním prostředí bylo biofilm-negativních 5 kmenů, 9 kmenů produkovalo biofilm slabě a mezi středně pozitivní se řadilo 8 arkobakterů. Nejméně aktivní se opět jevil *A. cryaerophilus*, neboť 6 kmenů z 15 tvořilo biofilm slabě nebo biofilm netvořilo vůbec. V mikroaerofilním prostředí byl opět málo aktivní *A. butzleri*.

Tvorbu biofilmu na skleněné zkumavce lze vidět na **Obrázku 7**.



**Obrázek 7** – Tvorba biofilmu ve skleněné zkumavce u kmene *A. defluvii* LMG 25694 – zkumavka vlevo aerobní atmosféra po 24 h; zkumavka vpravo mikroaerofilní atmosféra po 24 h (foto autor)

### 3. 2. 2 Tvorba biofilmu na skle u kampylobakterů

Christensenovou zkumavkovou metodou byly otestovány také stejné kmeny rodu *Campylobacter*, které byly již sledovány na plastu (kapitola 3.1).

Z **Tabulky 7** lze vyhodnotit, že růst kampylobakterů na skleněném povrchu je znatelně nižší než na plastových mikrotitračních destičkách. Po 24 h kultivaci v aerobních podmínkách biofilm netvořily 3 kmeny, slabě biofilm-pozitivních bylo 6 kmenů a pouze 1 kmen se zařadil do středně biofilm-pozitivních bakterií. Silná tvorba biofilmu nebyla zaznamenána ani u jednoho testovaného kmene. Po mikroaerofilní kultivaci biofilm netvořilo 7 kampylobakterů, 2 kmeny tvořily slabý biofilm a pouze 1 kmen vytvořil středně pozitivní biofilm. Teh et al. (2010) ve své publikaci uvedl, že pouze malé množství kmenů *Campylobacter* je schopno vytvořit silný biofilm. Toto tvrzení se shoduje i s dalšími studiemi, které vedl Joshua et al. (2006) a Reeser et al. (2007). Naše výsledky také ukazují, že *Campylobacter* není schopný adherovat na skleněný povrch a tvořit silný biofilm.

**Tabulka 7** – Tvorba biofilmu kmenů rodu *Campylobacter* na skleněném povrchu

<i>Campylobacter</i> spp.	Kmenové označení	Expozice 24 hodin		Expozice 72 hodin	
		Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.	Aerobní atm.	Mikroaerofilní atm.
<i>C. jejuni</i>	CCM 6214	++	++	++	++
	NP 2896 <sup>C</sup>	+	+	-	+
	NS 3668 <sup>C</sup>	-	-	+	+
	NS 3800 <sup>C</sup>	-	+	-	-
	NS 4088 <sup>C</sup>	-	-	-	-
	NS 4091 <sup>C</sup>	+	-	-	-
<i>C. coli</i>	NP 2359 <sup>C</sup>	+	-	-	+
	NS 3803 <sup>C</sup>	+	-	-	-
	NS 4062 <sup>C</sup>	+	-	-	+
<i>Campylobacter</i> sp.	ONN 366 <sup>C</sup>	+	-	-	+

**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 biofilm-negativní (-); kmen slabě biofilm-pozitivní (+); kmen středně biofilm-pozitivní (++); kmen silně biofilm-pozitivní (+++); <sup>A</sup> vzorek izolovaný z vody; <sup>B</sup> vzorek izolovaný z potravin; <sup>C</sup> klinický izolát; C. – *Campylobacter*

V aerobním prostředí po 72 h kultivaci biofilm vytvořilo 80 % kmenů. Pouze 1 kmen vytvořil slabý a 1 kmen střední biofilm. V mikroaerofilním prostředí počet biofilm negativních kmenů klesl na 40 % z celkového počtu. Slabě biofilm-pozitivních bylo 5 kmenů a 1 kmen se zařadil do středně biofilm-pozitivní kategorie. Kmen *Campylobacter jejuni* CCM 6214 si po rozdílné kultivační době i po rozdílných vnějších podmínkách udržel schopnost tvorby biofilmu a zařadil se mezi středně biofilm-pozitivní bakterie. Lze tedy říci, že jde o nejvíce aktivní kmen ze všech testovaných kampylobakterů.

## 4 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla pro stanovení tvorby biofilmu u klinicky významných bakterií čeledi *Campylobacteraceae* využita Christensenova zkumavková metoda a její modifikace v plastové mikrotitrační destičce. Christensenova metoda ve zkumavkách je velmi subjektivní, neboť je hodnocena pouze vizuálně. Výsledky z této metody by měly být prověřeny další metodou. Stanovení přítomnosti biofilmu na mikrotitračních destičkách je mnohem přesnější, neboť tvorba biofilmu je hodnocena dle změřené hodnoty absorbance na spektrofotometru. Testování se podrobilo celkem 59 kmenů rodu *Arcobacter* a 10 kmenů rodu *Campylobacter*. Tvorba biofilmu byla sledována v aerobním a mikroaerofilním prostředí po 24 nebo 72 h kultivační době.

Většina arkobakterů (98,4 %) prokázala schopnost tvorby biofilmu na plastovém materiálu mikrotitrační destičky. Nejvíce biofilmu v aerobním prostředí po 24 h kultivaci tvořil *Arcobacter butzleri* UPa 2015/25. V mikroaerofilních podmínkách tvořil biofilm nejvíce *Arcobacter butzleri* UPa 24A. Oba vzorky byly izolovány z potravin, konkrétně z masa. Až 78 % kmenů po 24 h kultivaci v aerobních podmínkách byla vyhodnocena jako středně biofilm-pozitivní. Po 72 h kultivační době v aerobním prostředí se 19 kmenů zařadilo do silně biofilm-pozitivní kategorie. V aerobním i mikroaerofilním prostředí měl největší schopnost tvořit biofilm *Arcobacter defluvii* LMG 25694. Delší kultivace tvorbu biofilmu téměř nijak neovlivnila. Hodnoty absorbancí u sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z reálného prostředí jsou velmi podobné a nebyl zde zaznamenán rozdíl. Biofilm tvořily nejvíce bakterie izolované z kuřecího a rybího masa.

U kamylobakterů jsme zjistili, že nejvíce tvoří biofilm po 24 h, neboť tvorba biofilmu byla zaznamenána u 100 % testovaných kmenů. Po 72 h kultivaci toto číslo kleslo na 60 %. Zvýšení tvorby biofilmu v mikroaerofilním prostředí po 24 h kultivaci nebylo zaznamenáno ani u jednoho kmene, což naznačuje že adheze je u kamylobakterů lepší v aerobních podmínkách. Opak nastal po 72 h kultivační době, kde biofilm tvořilo více kmenů v prostředí mikroaerofilním.

Při porovnání výsledků ze zkumavkové metody a metody v mikrotitrační destičce je jasné zřetelné, že bakterie rodu *Arcobacter* lépe adherují na plastový povrch než na sklo. Po 24 h kultivaci v aerobním prostředí se mezi silně biofilm-pozitivní bakterie zařadilo 20 kmenů arkobakterů a v mikroaerofilním prostředí tento počet klesl na 6 kmenů. Z našich výsledků je znatelné, že bakterie rodu *Arcobacter* v aerobním prostředí lépe adherují na sklo než v prostředí

mikroaerofilním. Dále je také zřejmé, že delší kultivační doba ve skleněných zkumavkách arkobakterům prospívá, neboť silný biofilm tvořilo více kmenů než po 24 h kultivaci.

Růst kampylobakterů na skleněném povrch je nižší než na plastových mikrotitračních destičkách. Většina kmenů (90 %) se po 24 h kultivaci v aerobním prostředí zařadilo mezi slabě biofilm-pozitivní či biofilm netvořily vůbec. Žádný kmen rodu *Campylobacter* nevytvořil silný biofilm. Až 80 % kmenů po 72 h v aerobních podmínkách netvořilo biofilm. V mikroaerofilním prostředí se počet biofilm negativních snížil.

Jelikož všechny testované bakterie tvořily biofilm a vykytují se ve zdravotnictví či potravinářském průmyslu, měl by být kladen velký důraz na hygienu a čistotu prostředí.



## POUŽITÁ LITERATURA

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N. E.** (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, 196(7), 453-472.
- Aparna, M. S., Yadav, S.** (2008). Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(6), 526-530.
- Baldassarri, L., Simpson, W. A., Donelli, G., Christensen, G. D.** (1993). Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 12(11), 866-868.
- Blackburn, Clive de W., McClure, P. J.** (2009). *Foodborne pathogens: Hazard, risk analysis and control*. 2nd ed. Cambridge, England: Woodhead. ISBN 978-1-84569-362-6.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, K. J.** (1978). How bacteria stick. *Sci Am*, 238(1), 86-95.
- Dautle, M. P., Wilkinson, T. R., Gauderer, M. W.** (2003). Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *Journal of pediatric surgery*, 38(2), 216-220.
- Davey, M. E., O'toole, G. A.** (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867.
- De Kievit, T. R.** (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*, 11(2), 279-288.
- Donlan, R. M.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Douglas, L. J.** (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1), 30-36.
- Doyle, M. P., Buchanan, R.** (2013). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4th ed. Washington DC, USA: ASM Press. ISBN 978-1-55581-626-1.
- Duarte, A., Alves, A. C., Ferreira, S., Silva, F., Domingues, F. C.** (2015). Resveratrol inclusion complexes: antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 77, 244-250.

- Ellis, W. A., Neil, S. D., O'Brien, J. J., Ferguson, H. W., Hanna, J.** (1977). Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organism from bovine fetuses. *Veterinary Record*, 100, 451-452.
- Ellström, P., Feodoroff, B., Hänninen, M-L., Rautelin, H.** (2013). Characterization of clinical *Campylobacter jejuni* isolates with special emphasis on lipooligosaccharide locus class, stative virulence factors and host response. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 134-139.
- Epps, S. V., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., Nisbet, D. J.** (2013). Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal Environmental Research Public Health*, 10(12), 6292–6304. DOI: 10.3390/ijerph10126292. ISSN 1660-4601.
- Fields, J. A., Thompson, S. A.** (2008). *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3411-3416.
- Flemming, H. C., Wingender, J.** (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 9-16.
- Feng, J., Lamour, G., Xue, R., Mirvakliki, M. N., Hatzikiriakos, S. G., Xu, J., Lu, X.** (2016). Chemical, physical and morphological properties of bacterial biofilms affect survival of encased *Campylobacter jejuni* F38011 under aerobic stress. *International journal of food microbiology*, 238, 172-182.
- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., Oleastro, M.** (2013). 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*, 162(1), 82-88.
- Gamarra, N. N., Villena, G. K., Gutiérrez-Correa, M.** (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 545-551.
- Giacometti, F., Serraino, A., Marchetti, G., Bonerba, E., Florio, D., Bonfante, E., Rosmini, R.** (2013). Isolation of *Arcobacter butzleri* in environmental and food samples collected in industrial and artisanal dairy plants. *Italian Journal of Food Safety*, 2(3), 34.
- Griffiths, P. L., Park, R. W. A.** (1990). *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(3), 281-301.

- Gunther IV, N. W., Chen, C. Y.** (2009). The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food microbiology*, 26(1), 44-51.
- Habib, I., De Zutter, L., Uyttendaele, M.** (2013). *Campylobacter* species. In *Food Microbiology. American Society of Microbiology*, 263-286.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P.** (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95.
- Hanning, I., Donoghue, D. J., Jarquin, R., Kumar, G. S., Aguiar, V. F., Metcalf, J. H., Slavik, M.** (2009). *Campylobacter* biofilm phenotype exhibits reduced colonization potential in young chickens and altered in vitro virulence. *Poultry science*, 88(5), 1102-1107.
- Haque, M., Mosharaf, M. K., Tanvir, M., Hasan, Z., Khan, A. A., Molla, A. H., Talukder, M.** (2018). Metal-Adapted Bacteria Isolated from Wastewaters Produce Biofilms by Expressing Proteinaceous Curli Fimbriae and Cellulose Nanofibres. *Frontiers in microbiology*, 9, article 1334.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M.** (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305-311.
- Heimesaat, M. M., Karadas, G., Alutis, M., Fischer, A., Kühl, A. A., Breithaupt, A., Götz, G.** (2015). Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Gut pathogens*, 7(1), 28.
- Heukelekian, H., Heller, A.** (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of bacteriology*, 40(4), 547.
- Ho, H. T., Lipman, L. J., Hendriks, H. G., Tooten, P. C., Ultee, T., Gaastra, W.** (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 51-58.
- Hochel, I.** (2009). Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* spp. *Chemické listy*, 103(10), 814-822.
- Holá, V.** (2012). Mikrobiální biofilmy: Biofilmová společenství lidského těla a biofilmové infekce. *Živa*. 2012(6), 271-275.

- Hoppe, S., Bier, F. F., Nickisch-Rosenegk, M.** (2013). Rapid Identification of novel immunodominant proteins and characterization of a specific linear epitope of *Campylobacter jejuni*. *Public Library of Science One*, 8(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0065837.
- Characklis, W. G.** (1973). Attached microbial growths-I. Attachment and growth. *Water Research*, 7(8), 1113-1127.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F.** (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
- Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H. D., Ahmed, B., Call, D. R., Beyenal, H.** (2012). Characterization of mono-and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1033-1038.
- Jones, S. M., Yerly, J., Hu, Y., Ceri, H., Martinuzzi, R.** (2007). Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS microbiology letters*, 268(1), 16-21.
- Joshua, G. P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V., Wren, B. W.** (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152(2), 387-396.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P., Nunes, A. P. F.** (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(3), 235-239.
- Kaakoush, N. O., Mitchell, H. M., Man, S. M.** (2015). *Campylobacter*. In *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, 1187-1236. ISBN 9780123971692.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T. L., Foss, M., Lau, P. C., Sanders, G., Szymanski, C. M.** (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4312-4320.
- Karatan, E., Watnick, P.** (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310-347.
- Kaur, S., Singh, S.** (2013). Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology*, 52(1), 2-9.

- Khattak, F., Paschalis, V., Green, M., Houdijk, J. G. M., Soultanas, P., Mahdavi, J.** (2018). TYPLEX® Chelate, a novel feed additive, inhibits *Campylobacter jejuni* biofilm formation and cecal colonization in broiler chickens. *Poultry science*, 97(4), 1391-1399.
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K., Ingmer, H.** (2009). Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International journal of food microbiology*, 131(2-3), 256-259.
- Knobloch, J. K. M., C. Mathias, A. Horstkotte, H. Rohde, D. Mack** (2002). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, 191, 101-106.
- Koo, H., Falsetta, M. L., Klein, M. I.** (2013). The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *Journal of dental research*, 92(12), 1065-1073.
- Kvasničková, E., Paldrychová, M., Maťátková, O., Masák, J.** (2016). Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické listy*, 110(7), 485-490.
- Lastovica A. J., Stephen L. W. On, Li Zheng** (2014). The Family *Campylobacteraceae*: The Prokaryotes. *Springer Berlin Heidelberg*, 11(20), 307-335.
- Lawley, R., L. Curtis, J. Davis** (2012). *The Food Safety Hazard Guidebook*. 2nd ed. London UK: *Royal Society of Chemistry Publishing*. ISBN 978-1-84973-381-6.
- Miller, M. B., Bassler, B. L.** (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Motarjemi, Y., M. Adams** (2006). *Emerging foodborne pathogens*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-963-5.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S.** (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Public Library of Science pathogens*, 4(11), 1553-7374.
- Nachamkin I., Szymanski C. M., Blaser M. J.** (2008). *Campylobacter*. 3rd ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*. 695. ISBN 978-1-55581-437-3.
- Nyenje, M., Green, E., Ndip, R.** (2013). Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules*, 18(8), 9582-9593.

- Oliveira, A., Maria de Lourdes, R. S.** (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC research notes*, 3(1), 260.
- Phillips, C. A.** (2001). *Arcobacter* spp. in food: isolation, identification and control. *Trends in Food Science & Technology*, 12(8), 263-275.
- Pike, B. L., Guerry, P., Poly, F.** (2013). Global Distribution of *Campylobacter jejuni* Penner Serotypes: A Systematic Review. *Public Library of Science One*, 8(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0067375.
- Ray, B.** (2004). *Fundamental food microbiology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-8493-1610-3.
- Renner, L. D., Weibel, D. B.** (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin*, 36(5), 347-355.
- Reeser, R. J., R. T. Medler, S. J. Billington, B. H. Jost, L. A. Joens** (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 1908–1913.
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., van Vliet, A. H.** (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 76(7), 2122-2128.
- Ricke, S. C., Donaldson, J. R., Phillips, C.** (2015). *Food safety: emerging issues, technologies, and systems*. Boston: Academic Press. ISBN 978-0-12-800245-2.
- Rulík, M., Holá, V.** (2012). Mikrobiální biofilmy: Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén. *Živa*, 2012(3), 104-106.
- Seneviratne, G., Zavahir, J. S., Bandara, W. M. M. S., Weerasekara, M. L. M. A. W.** (2008). Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 739.
- Siringan, P., Connerton, P. L., Payne, R. J., Connerton, I. F.** (2011). Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 77(10), 3320-3326.
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., Dooley, J. S. G.** (2006). Under the microscope: *Arcobacter*. *Letters in applied microbiology*, 42(1), 7-14.

- Sutherland, I. W.** (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- Svensson, S. L., Davis, L. M., MacKichan, J. K., Allan, B. J., Pajaniappan, M., Thompson, S. A., Gaynor, E. C.** (2009). The CprS sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Molecular microbiology*, 71(1), 253-272.
- Sweileh, W. M., Al-Jabi, S. W., Sawalha, A. F., AbuTaha, A. S., Zyoud, S. H.** (2016). Bibliometric analysis of publications on *Campylobacter*: (2000–2015). *Journal of Health, Population and Nutrition*, 35(1), 39.
- Šilhová-Hrušková, L., Mořková, P., Šilha, D., Vyřasová, J.** (2015). Hodnocení tvorby biofilmu vybraných patogenů vyskytujících se v potravinářském průmyslu. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 64(3), 169-174.
- Takamiya, M., Ozen, A., Rasmussen, M., Alter, T., Gilbert, T., Ussery, D. W., Knøchel, S.** (2011). Genome Sequence of *Campylobacter jejuni* strain 327, a strain isolated from a turkey slaughterhouse. *Standards in genomic sciences*, 4(2), 113.
- Teh, K. H., Flint, S., French, N.** (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International journal of food microbiology*, 143(3), 118-124.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., Molin, S.** (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of bacteriology*, 182(22), 6482-6489.
- Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., Allende, A.** (2015). Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), 189-204.
- Turan, N. B., Chormey, D. S., Büyükpınar, Ç., Engin, G. O., Bakirdere, S.** (2017). Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination. *Trends in Analytical Chemistry*, 91, 1-11.
- Vandamme, P., De Ley, J.** (1991). Proposal for a New Family *Campylobacteraceae*. *International journal of systematic bacteriology*. 41(3), 451-455.

- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Vandamme, P.** (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerging infectious diseases*, 10(10), 1863.
- Vorwerk, H., Huber, C., Mohr, J., Bunk, B., Bhujji, S., Wensel, O.** (2015). A transferable plasticity region in *Campylobacter coli* allows isolates of an otherwise non-glycolytic food-borne pathogen to catabolize glucose. *Molecular Microbiology*, 98, 809–830.
- Weidenmaier, C., Peschel, A.** (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 276.
- Wilson, D. J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A. J., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Diggle, P. J.** (2008). Tracing the source of campylobacteriosis. *Public Library of Science genetics*, 4(9), 1553-7404.
- Wirtanen, G., Salo, B.** (2005). Biofilm risk. *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*. Elsevier, 46 – 68.