

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv přírodních látek na přežívání *Arcobacter*-like species a tvorbu biofilmu

Disertační práce

Autor práce: Mgr. Karolína Švarcová

Školitel: doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

Školitel–specialista: Ing. David Šilha, Ph.D.

2023

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

**Influence of natural substances on the survival of *Arcobacter*-like species
and their biofilm formation**

Doctoral thesis

Author: Mgr. Karolína Švarcová

Supervisor: doc. Ing. Marcela Pejchalová, PhD

Supervisor–specialist: Ing. David Šilha, PhD

2023

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nakladů, 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 směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 4. 2023

Mgr. Karolína Švarcová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli–specialistovi, Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D., za jeho cenné rady a věcné připomínky, které mi pomohly při zpracování disertační práce. Další z díky směřuji doc. Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. a celému kolektivu KBBV (zejména Janče a Páje). Za spolupráci na analytických experimentech děkuji týmu Katedry analytické chemie, Fakulty chemicko-technologické v Pardubicích, a to především doc. Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D., doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. a Ing. Blance Švecové, Ph.D. Můj největší dík však patří mému muži, mé rodině a přátelům, bez jejichž podpory by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

ANOTACE

Teoretická část disertační práce je zaměřena na aktuální taxonomické informace a charakteristiky rodů *Campylobacter*, *Arcobacter* a *Sulfurospirillum*. Dále jsou v textu uvedeny informace o tvorbě mikrobiálního biofilmu, metodách detekce a sledování produkce biofilmu. V rámci experimentální části práce byly hodnoceny účinky látek s potenciálním antimikrobiálním účinkem jak na planktonní buňky, tak také na buňky ve struktuře biofilmu. Mezi sledované látky s antimikrobiálním účinkem byla zahrnuta antibiotika, hydrosoly a extrakty z olejů. Analýza olejových extraktů byla provedena pomocí kapalinové chromatografie a pomocí plynové chromatografie byl hodnocen obsah biologicky aktivních látek v hydrosolech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Arcobacter-like species, antibiotika, antimikrobiální látky, biofilm, *Campylobacter* spp., extrakty, hydrosoly, přírodní matrice

TITLE

Influence of natural substances on the survival of *Arcobacter*-like species and their biofilm formation

ANNOTATION

The theoretical part of the dissertation is focused on current taxonomic information and characteristics of the genera *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Sulfurospirillum*. In addition, information on microbial biofilm formation, detection methods and monitoring of biofilm production are presented. In the experimental part of the work, the effects of substances with potential antimicrobial activity on both planktonic cells and cells in the biofilm structure were evaluated. The substances with antimicrobial effect included antibiotics, hydrosols and oil extracts. The oil extracts were analyzed by liquid chromatography and the content of biologically active substances in the hydrosols was evaluated by gas chromatography.

KEYWORDS

Arcobacter-like species, antibiotics, antimicrobial substances, biofilm, *Campylobacter* spp., extracts, hydrosols, natural matrices

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM ZKRATEK	13
1 ÚVOD	15
2 TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 Třída <i>Campylobacteria</i>	16
2.1.1 Rod <i>Campylobacter</i>	17
2.1.1.1 Izolace a identifikace kampylobakterů	18
2.1.1.2 Výskyt kampylobakterů a způsobovaná onemocnění	19
2.1.2 <i>Arcobacter</i> -like species	21
2.1.2.1 Charakteristika <i>Arcobacter</i> -like species	22
2.1.2.2 Izolace a identifikace <i>Arcobacter</i> -like species	23
2.1.2.3 Faktory virulence <i>Arcobacter</i> -like species a způsobovaná onemocnění	24
2.1.3 Rod <i>Sulfurospirillum</i>	25
2.2 Vybrané látky s antimikrobiálním potenciálem	26
2.2.1 Antibiotika	27
2.2.2 Esenciální oleje a hydrosoly	29
2.2.3 Olivové oleje	31
2.2.4 Metody testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám	34
2.3 Bakteriální biofilm	36
2.3.1 Tvorba biofilmu	38
2.3.2 <i>Quorum sensing</i>	39
2.3.3 Statické metody detekce biofilmu	40
2.3.4 Dynamické metody detekce biofilmů	41
2.3.5 Mikroskopické metody	42

2.3.6	Další metody detekce biofilmu.....	44
2.3.7	Prevence vzniku biofilmu a možnosti jeho degradace	44
3	CÍLE PRÁCE	45
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
4.1	Laboratorní vybavení	46
4.2	Použité chemikálie	47
4.3	Použitá média	47
4.4	Experimentální metodiky	50
4.4.1	Použité mikrobiální kmeny a příprava buněčné suspenze.....	50
4.4.2	Sledování tvorby biofilmu na skleněném povrchu	51
4.4.3	Sledování tvorby biofilmu na plastovém povrchu.....	52
4.4.4	Vliv antibiotik na přežívání <i>Arcobacter</i> -like species	53
4.4.4.1	Stanovení minimální inhibiční (baktericidní) koncentrace	53
4.4.4.2	Sledování tvorby biofilmu v přítomnosti antibiotik.....	53
4.4.5	Biologická aktivita a chemické složení hydrosolů	54
4.4.5.1	Příprava hydrosolů hydrodestilací.....	54
4.4.5.2	Příprava hydrosolů destilací vodní parou.....	54
4.4.5.3	Chemická analýza hydrosolů pomocí GC-MS.....	55
4.4.5.4	Chemická analýza hydrosolů pomocí GC-FID	55
4.4.5.5	Hodnocení antimikrobiálních vlastností hydrosolů	56
4.4.5.6	Hodnocení tvorby biofilmu v přítomnosti hydrosolů.....	56
4.4.6	Chemické složení a biologická aktivita olejových extraktů	57
4.4.6.1	Příprava olejových extraktů	57
4.4.6.2	Chemická analýza olejových extraktů	57
4.4.6.3	Sledování antimikrobiálních vlastností olejových extraktů	58
4.4.6.4	Sledování tvorby biofilmu v přítomnosti olejových extraktů	59
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	60

5.1	Tvorba biofilmu <i>Arcobacter</i> -like species na plastovém (polystyrenovém) povrchu.....	60
5.2	Tvorba biofilmu <i>Arcobacter</i> -like species na skleněném (borosilikátovém) povrchu	61
5.3	Tvorba biofilmu <i>Campylobacter</i> spp. na plastovém (polystyrenovém) povrchu	64
5.4	Tvorba biofilmu <i>Campylobacter</i> spp. na skleněném (borosilikátovém) povrchu.....	64
5.5	Vliv antibiotik na <i>Arcobacter</i> -like species.....	67
5.5.1	Vliv antibiotik na planktonní buňky <i>Arcobacter</i> -like species	67
5.5.2	Vliv antibiotik na tvorbu biofilmu <i>Arcobacter</i> -like species.....	71
5.6	Vliv hydrosolů na <i>Arcobacter</i> -like species	76
5.6.1	Chemické složení hydrosolů.....	76
5.6.1.1	Chemická analýza hydrosolů z levandule	77
5.6.1.2	Chemická analýza hydrosolů z vavřínu	78
5.6.1.3	Chemická analýza hydrosolů z fenyklu	80
5.6.1.4	Chemická analýza hydrosolů z hřebíčku.....	80
5.6.2	Antimikrobiální potenciál hydrosolů.....	81
5.6.2.1	Antimikrobiální účinky nezakoncentrovaných hydrosolů	81
5.6.2.2	Antimikrobiální účinky 50× zakoncentrovaných hydrosolů	82
5.6.3	Biofilmová tvorba v prostředí hydrosolů	86
5.7	Vliv olejových extraktů na <i>Arcobacter</i> -like species	89
5.7.1	Chemická analýza olejových extraktů.....	89
5.7.2	Vliv pufrovaných olejových extraktů na planktonní buňky	92
5.7.3	Vliv nepufrovaných olejových extraktů na planktonní buňky	94
5.7.4	Vliv pufrovaných olejových extraktů na tvorbu biofilmu	97
5.7.5	Vliv nepufrovaných olejových extraktů na tvorbu biofilmu	100
6	ZÁVĚR	103
7	SEZNAM LITERATURY	106
8	SEZNAM PŘÍLOH	118

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Fylogenetický strom prezentující rozdělení druhů kampylobakterů do pěti skupin – skupina <i>C. fetus</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. concisus</i> a <i>C. ureolyticus</i> (Costa a Iraola, 2019).	18
Obrázek 2 – Rozdělení <i>Arcobacter</i> -like species do čtyř klastřů (Perez-Cataluna et al., 2018).	21
Obrázek 3 – Buňky <i>Al. cryaerophilus</i> LMG 7537 (a, b) a <i>Al. skirrowii</i> LMG 6621 (c, d) zachyceny elektronovým mikroskopem (Hoa et al., 2007).	22
Obrázek 4 – Mechanismus účinku esenciálních olejů a cílové struktury mikrobiálních buněk (Nazzaro et al., 2013).	30
Obrázek 5 – Proces výroby olivového oleje (Preddy a Watson, 2010).	32
Obrázek 6 – Diskový difúzní test provedený na M-H agarech (EUCAST, 2021).	34
Obrázek 7 – E-test pro stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (Schumacher et al., 2018).	35
Obrázek 8 – Postup pro provedení mikrodiluční metody (Andrews et al., 2019).	36
Obrázek 9 – Stádia tvorby bakteriálního biofilmu (Zhang et al., 2020).	38
Obrázek 10 – Obarvený bakteriální biofilm v mikrotitrační destičce připravený pro spektrofotometrické vyhodnocení (foto autor).	40
Obrázek 11 – Dynamické metody využívané pro tvorbu biofilmu. Zleva – CDC biofilmový reaktor, Drip flow reaktor a rotační diskový reaktor (dostupné z: https://biofilms.biz/).	42
Obrázek 12 – 3D vizualizace obarveného biofilmu pomocí CSLM. Vlevo je snímek biofilmu <i>P. aeruginosa</i> , vpravo obarvené vstřvy biofilmu <i>E. coli</i> (Cattò a Cappitelli, 2019).	43
Obrázek 13 – Detekce <i>Arcobacter</i> -like species a vytvořeného biofilmu pomocí fluorescenčních sond ARC ⁹⁴ -TRITC a EUB ³³⁸ -FLUOS. Vlevo je snímek vytvořeného biofilmu, vpravo planktonní buňky tvořící biofilm (Moreno et al., 2003).	43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Přehled <i>Arcobacter</i> -like species použitých v rámci studie.	50
Tabulka 2 – Přehled kmenů kampylobakterů a dalších kmenů použitých v rámci studie.	51
Tabulka 3 – Seznam vzorků olivových olejů s popisem jejich zeměpisného původu.	57
Tabulka 4 – Biofilmová tvorba kmenů <i>Al. butzleri</i> na plastovém/skleněném povrchu.	62
Tabulka 5 – Biofilmová tvorba kmenů <i>Al. cryaerophilus</i> na plastovém/skleněném povrchu.	63
Tabulka 6 – Biofilmová tvorba sbírkových <i>Arcobacter</i> -like species na plastovém/skleněném povrchu	63
Tabulka 7 – Biofilmová tvorba kmenů <i>Campylobacter</i> na plastovém/skleněném povrchu ...	65
Tabulka 8 – Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) antibiotik stanovené pro 60 <i>Arcobacter</i> -like species izolovaných v rámci České republiky a sbírkových kmenů.....	69
Tabulka 9 – Multirezistence <i>Arcobacter</i> -like species.	71
Tabulka 10 – Výsledky chemické analýzy 50× koncentrovaných hydrosolů získaných parní destilací (SD) a hydrodestilací (HD), počty identifikovaných sloučenin a výčet třech dominantních složek vzorků, n=3.....	76
Tabulka 11 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolech z levandule.	77
Tabulka 12 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolech z vavřínu. .	79
Tabulka 13 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolech z fenyklu. .	80
Tabulka 14 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolech z hřebíčku. .	81
Tabulka 15 – Antimikrobiální potenciál hydrosolů koncentrovaných pomocí SPE vůči <i>Arcobacter</i> -like species – výsledky inhibičních zón v mm (včetně disku o průměru 6 mm) ± standardní odchylka a minimálních inhibičních/baktericidních koncentrací v %, n=4.	83
Tabulka 16 – Antimikrobiální potenciál hydrosolů koncentrovaných pomocí SPE vůči vybraným kmenům – výsledky inhibičních zón v mm (včetně disku o průměru 6 mm) ± standardní odchylka a minimálních inhibičních/baktericidních koncentrací v %, n=4.	84
Tabulka 17 – Srovnání účinnosti antibiotik a antimykotik (inhibiční zóny v mm včetně disku o průměru 6 mm ± standardní odchylka), n=4.....	85
Tabulka 18 – Limity detekce a kvantifikace (LOD, resp. LOQ), kalibrační rozmezí, regresní rovnice a příslušné korelační faktory analyzovaných fenolických sloučenin.....	89
Tabulka 20 – Celkový obsah polyfenolů (GAE mg/l) stanovený v různých olejových extraktech.....	90

Tabulka 21 – Obsah fenolických sloučenin v olejových extraktech stanovený pomocí HPLC-CoulArray (mg/l).	90
--	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Tvorba biofilmu <i>Al. butzleri</i> v prostředí antibiotik.....	72
Graf 2 – Tvorba biofilmu dalších kmenů v prostředí antibiotik.. ..	74
Graf 3 – Biofilmová tvorba v prostředí nekoncentrovaných hydrosolů.. ..	87
Graf 4 – Biofilmová tvorba v prostředí 50× zakoncentrovaných hydrosolů.. ..	87
Graf 5 – Chromatografický záznam získaný pomocí HPLC-CoulArray.....	91
Graf 6 – Přežívání testovaných kmenů v přítomnosti 90% pufrovaných olejových extraktů.. ..	93
Graf 7 – Přežívání testovaných kmenů v přítomnosti 90 % nepufrovaných olejových extraktů.. ..	95
Graf 8 – Tvorba biofilmu v prostředí pufrovaných olejových extraktů.....	98
Graf 9 – Tvorba biofilmu v prostředí nepufrovaných olejových extraktů.....	101

SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Arcobacter</i>
Al.	<i>Aliarcobacter</i>
ATB	antibiotika
BEOO	pufrovaný vodný extrakt olivového oleje (z <i>angl.</i> Buffered Extracts of Olive Oils)
C.	<i>Campylobacter</i>
CFU	kolonie tvořící jednotky (z <i>angl.</i> Colony Forming Units)
CLSI	Institut klinických a laboratorních norem (z <i>angl.</i> Clinical and Laboratory Standards Institute)
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie (z <i>angl.</i> Confocal Laser Scanning Microscopy)
EO	esenciální (éterické) oleje
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (z <i>angl.</i> European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (z <i>angl.</i> Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)
GFP	zelený fluorescenční protein (z <i>angl.</i> Green Fluorescent Protein)
HD	hydrodestilace
H _{HD}	hydrosol získaný hydrodestilací
H _{HD_SPE}	hydrosol získaný hydrodestilací a koncentrovaný SPE
SPE	extrakce pevnou fází (z <i>angl.</i> Solid Phase Extraction)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z <i>angl.</i> High-Performance Liquid Chromatography)

H _{SD}	hydrosol získaný parní destilací
H _{SD_SPE}	hydrosol získaný parní destilací a koncentrovaný SPE
LOD	limit detekce (z <i>angl.</i> Limit Of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (z <i>angl.</i> Limit Of Quantification)
MALDI-TOF/MS	hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu a laserovou desorpčí/ionizací za účasti matrice (z <i>angl.</i> Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight/Mass Spectrometry)
MBC	minimální baktericidní koncentrace (z <i>angl.</i> Minimum Bactericidal Concentration)
MBEC	minimální biofilm eradikující koncentrace (z <i>angl.</i> Minimal Biofilm Eradication Concentration)
MBIC	minimální biofilm inhibující koncentrace (z <i>angl.</i> Minimal Biofilm Inhibitory Concentration)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z <i>angl.</i> Minimum Inhibitory Concentration)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z <i>angl.</i> Polymerase Chain Reaction)
QS	<i>quorum sensing</i>
SD	parní destilace
S.	<i>Sulfurospirillum</i>
WEEO	nepufrovaný vodný extrakt olivového oleje (z <i>angl.</i> Water non-buffered Extracts of Olive Oils)

1 ÚVOD

Bohatá a pestrá strava je důležitou součástí jídelníčku člověka. Zvýšený zájem o stravu a zdravý životní styl má za následek vyšší spotřebu čerstvých surovin v mnoha regionech světa. Nicméně stoupá i zájem o bezpečnost čerstvých produktů a nezávadnost potravin, která však může být ohrožena např. zbytky pesticidů, toxiny nebo patogenními mikroorganismy. Alimentární a infekční onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Problematikou, která se s tímto tématem pojí, je nadměrné užívání chemických látek, dezinfekčních prostředků, léčiv (zejména antibiotik), což zvyšuje tvorbu bakteriální rezistence. Bakteriální onemocnění způsobená multirezistentními kmeny bakterií jsou závažným problémem, jelikož odolnost rezistentních bakterií stále stoupá a některá antibiotika již na mikroorganismy nejsou dostatečně účinná. Bakterie získávají rezistenci různými mechanismy, např. mutacemi, přijímáním nových genetických informací nebo růstem v biofilmu.

Vzhledem k narůstající rezistenci mikroorganismů je vhodné věnovat pozornost antimikrobiálním účinkům přírodních látek, popř. jejich synergickému působení s antibiotiky. Biologická aktivita přírodních látek by mohla pomoci s narůstajícím problémem rezistence jak planktonních buněk, tak také biofilmových struktur. Řada rostlinných matric vykazuje určité antimikrobiální účinky. Jedná se např. o byliny, čaje nebo esenciální oleje a jejich vedlejší produkty získané destilací (hydrosoly).

V rámci studie byla hodnocena biofilmová tvorba u kmenů z čeledi *Campylobacteraceae* a *Arcobacteraceae* izolovaných z potravin, vody a klinických vzorků. Tvorba biofilmu byla monitorována v aerobní a mikroaerofilní atmosféře po 24 nebo 72 hod. kultivace na různém kultivačním povrchu, a to pomocí modifikované Christensenovy metody. Dále byly sledovány účinky vybraných matric s potenciálním antimikrobiálním účinkem (antibiotika, hydrosoly a extrakty z olejů) na planktonní buňky a na tvorbu biofilmu *Arcobacter*-like species a dalších vybraných mikroorganismů. U jednotlivých testovaných matric byla provedena chemická analýza pomocí kapalinové a plynové chromatografie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Třída *Campylobacteria*

Rody *Campylobacter*, *Arcobacter* (Vandamme et al., 1991a) a *Sulfurospirillum* (Scanlon et al., 2013; Schumacher et al., 1992) byly řazeny do třídy *Epsilonproteobacteria*, a to díky blízkým genotypovým a fenotypovým podobnostem. Dle nedávných výsledků byla navržena reklasifikace třídy *Epsilonproteobacteria* na třídu *Campylobacteria*. Taktéž rod *Arcobacter* byl přečleněn do samostatné čeledi *Arcobacteraceae* (Chieffi et al., 2020; Waite et al., 2017; Waite et al., 2018).

Dle stavby buněčné stěny patří tyto mikroorganismy mezi Gram-negativní bakterie. Buňky tvaru tyčinek jsou 0,2–0,8 µm široké a 0,5–5,0 µm dlouhé. Buňky mohou být lehce zakřivené do tvaru písmene *S*, *V* nebo být stočeny do tvaru spirály. Výjimečně se mohou vyskytovat v dlouhých řetízcích, zejména ve starších kulturách mohou buňky vykazovat i kokoidní tvar (Debruyne et al., 2008; Ursing et al., 1994). V nepříznivém prostředí netvoří spory. Pohyblivost je umožněna pomocí jednoduchého polárního bičíku nebo příležitostně více bičíky na jednom nebo obou koncích buňky (Debruyne et al., 2008).

Pro tyto mikroorganismy je typický růst v mikroaerofilním prostředí, některé druhy jsou však schopny růst za aerobních či anaerobních podmínek. Optimální růstová teplota těchto bakterií je 30–42 °C. Bakterie čeledi *Campylobacteraceae* a *Arcobacteraceae* nezískávají energii rozkladem sacharidů, metabolizují však aminokyseliny a karboxylové kyseliny. Obsahují enzymy oxidázu i katalázu, redukují dusičnany i fumarát a produkují indol (Debruyne et al., 2008; Nachamkin et al., 2008). Některé kmeny jsou schopné tvorby biofilmu (Kjeldgaard et al., 2009).

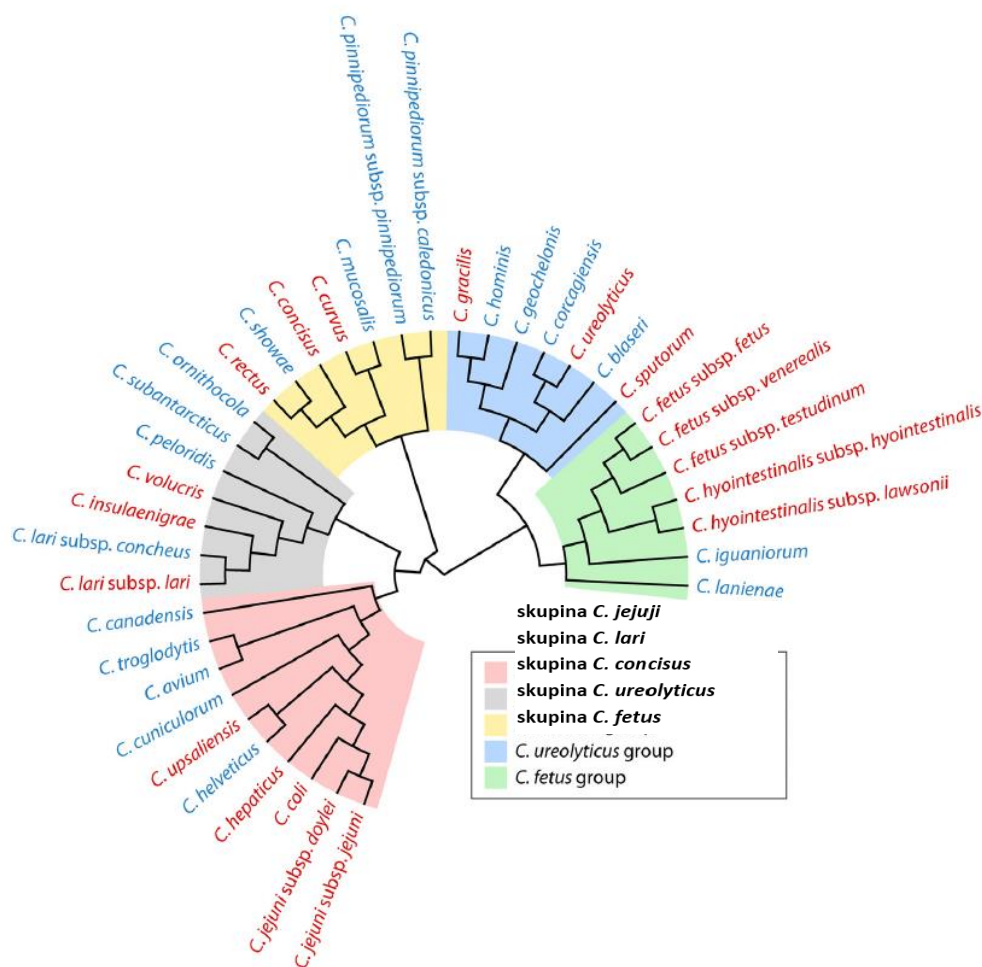
Zástupci čeledí *Campylobacteraceae* a *Arcobacteraceae* se vyskytují hlavně jako komenzálové či parazité u lidí i jiných teplotokrevných živočichů, avšak nepovažují se za jejich přirozenou mikroflóru. Při onemocnění je můžeme nacházet na střevní sliznici, v urogenitálním traktu či ústní dutině člověka. Taktéž byla jejich přítomnost zaznamenána v živočišných produktech, mořských plodech či v povrchové a podzemní vodě (Ursing et al., 1994; Lastovica et al., 2014; Šilha et al., 2019a).

2.1.1 Rod *Campylobacter*

Theodor Escherich pozoroval a popsal tyto spirálovité mikroorganismy již v roce 1886. Roku 1909 bylo zaznamenáno první onemocnění zvířat způsobené v souvislosti s těmito bakteriemi. Avšak mikroorganismy, dnes známé jako kampylobaktery, byly poprvé popsány až o řadu let později. Nejprve byly dnešní kampylobaktery zařazeny do rodu *Vibrio*. V roce 1963 byly *Vibrio fetus* a *Vibrio bubulus* začleněny mezi kampylobaktery na základě různých molekulárně biologických parametrů. Nicméně až v roce 1980 byly kampylobaktery uznány jako původce onemocnění člověka (Debruyne et al., 2008; Silva et al., 2011).

Název *Campylobacter* je odvozen z řeckého slova „*kampylos*“, což znamená zakřivený. Kampylobaktery jsou extrémně rychle pohybující se bakterie (Keener et al., 2004). Jedinou výjimkou je *Campylobacter gracilis*, který je nepohyblivým druhem (Silva et al., 2011). Většina druhů kampylobakterů roste za mikroaerofilních podmínek a vyžaduje tak atmosféru se sníženým obsahem kyslíku (Ursing et al., 1994). Avšak zastoupení mají i kmeny preferující striktně anaerobní prostředí (Kaakoush et al., 2015; Ursing et al., 1994). Kampylobaktery řadíme mezi termotolerantní mikroorganismy, optimální teplota růstu je mezi 37–42 °C, nejsou však schopny růst při 30 °C (Silva et al., 2011).

Rod *Campylobacter* se skládá ze 30 druhů a 11 poddruhů. Kampylobaktery lze rozdělit do několika skupin, jmenovitě *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. concisus* a *C. ureolyticus* (Costa a Iraola, 2019). Jednotlivé druhy a poddruhy kampylobakterů jsou uvedeny na Obrázku 1.



Obrázek 1 – Fylogenetický strom prezentující rozdělení druhů kampylobakterů do pěti skupin – skupina *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. concisus* a *C. ureolyticus* (Costa a Iraola, 2019).

2.1.1.1 Izolace a identifikace kampylobakterů

Kampylobaktery je možné izolovat pomocí membránové filtrace. Na povrch membránového filtru přiloženého na obohacené selektivní či neselektivní médium se aplikuje bakteriální suspenze a nechá se pasivně filtrovat. Kultivace půd probíhá po odstranění membránového filtru (Hochel, 2009). Všechny kmeny rodu *Campylobacter* mají extrémně náročné růstové podmínky, nejspolehlivěji rostou na bohatých médiích a vyžadují speciální kultivační podmínky (Gunther a Chen, 2009). Selektivní a obohacovací média musí obsahovat krev nebo aktivní uhlí a směs vhodných antibiotik. Jelikož vzorky z potravin i z environmentálního prostředí obsahují často nízké počty kampylobakterů, je důležité začlenit i pomnožovací krok. Pro izolaci a průkaz kampylobakterů je nutné testovaný vzorek pomnožovat např. v bujonu dle Boltona, který obsahuje cefoperazon, vankomycin, trimetoprim a amfotericin B. Mezi nejvíce využívaná pevná média patří média dle Skirrowa, mCCDA

(modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoloperazonem) agar, agar dle Butzlera, agar dle Karmaliho či agar dle Prestona (Silva et al., 2011).

Nejúčinnější metody vhodné pro detekci a identifikaci *Campylobacter* spp. jsou založené na polymerázové řetězové reakci, fluorescenční *in situ* hybridizaci nebo latexové aglutinaci (Silva et al., 2011). Méně běžnou metodou identifikace a charakterizace kampylobakterů je analýza profilů buněčných mastných kyselin či studium proteinových profilů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Hochel, 2009).

2.1.1.2 Výskyt kampylobakterů a způsobovaná onemocnění

Ke vzniku bakteriálního onemocnění přispívá řada rizikových faktorů. Mezi tyto faktory se řadí např. konzumace nedostatečně tepelně upravených potravin, přímý kontakt s hospodářskými zvířaty, znečištění přírodního prostředí či křížová kontaminace v domácnosti. Pití nedezinfikované vody je v tomto ohledu hlavním rizikovým faktorem v rozvojových zemích (Gautret et al., 2012; Ravel et al., 2011; Ricotta et al., 2014).

Primárním zdrojem kampylobakterů je zpravidla drůbeží maso. Mnoho druhů se hojně nachází v drůbežářských farmách i jejich okolním prostředí, včetně půdy, vodních zdrojů a vzduchu. Vzhledem k tomu, že kmeny *C. jejuni* přežívají ve slepičích exkrementech i několik dní, mohou být potenciálně z tohoto zdroje také přeneseny do životního prostředí nebo dále na člověka. Taktéž bylo potvrzeno, že kampylobaktery jsou schopny kolonizovat selata, avšak toto nebylo prokázáno u mláďat skotu. Psi a kočky jsou také hostiteli různých druhů kampylobakterů, ale zpravidla se nejedná o hlavní zdroj přenosu těchto bakterií na člověka (Gautret et al., 2012; Kaakoush et al., 2015). *Campylobacter jejuni* je primárním lidským patogenem, který způsobuje 90–95 % všech kampylobakterových infekcí. *C. jejuni* je jedním ze šesti mikroorganismů způsobujících cestovatelské gastrointestinální infekce. Mezi další zástupce způsobující střevní onemocnění patří *Campylobacter coli* a *Campylobacter fetus* (Costa a Iraola, 2019; Moore et al., 2005).

Kampylobaktery jsou nejčastější příčinou průjmových onemocnění na celém světě, v Evropě je každoročně postiženo kampylobakteriózou 1 % obyvatel. Pro člověka je odhadována infekční dávka 10^2 – 10^4 buněk (Kaakoush et al., 2015). V rozvojových zemích je míra přenosu kampylobakterů alimentární cestou mezi 5–20 %. Během letních měsíců dochází k největšímu nárůstu počtů kampylobakterióz. Kampylobakterióza nejčastěji postihuje děti do 4 let a dále věkovou skupinu od 15 do 44 let (Fischer a Paterek, 2020). Gastroenteritida je výsledkem infekčního stavu kampylobakteriózy. Kampylobakterové infekce jsou však spojeny s řadou dalších závažných onemocnění jako je onemocnění jícnu, paradentóza, funkční

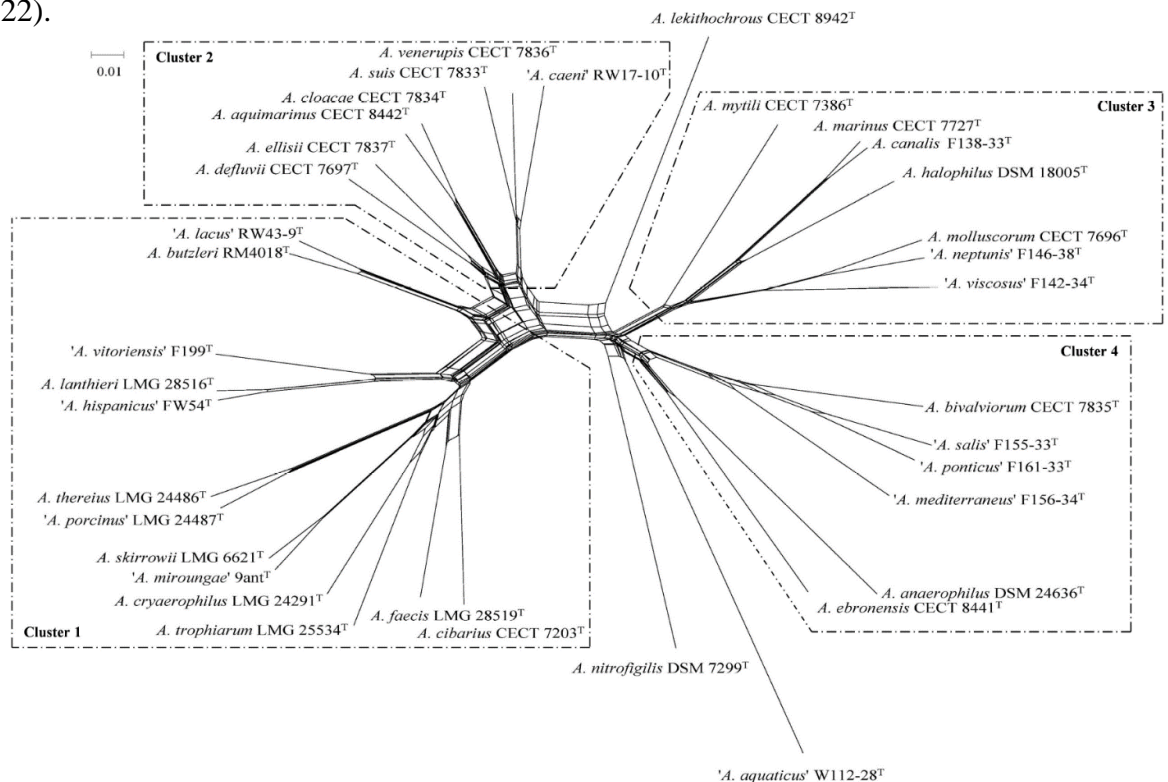
gastrointestinální poruchy, celiakie, cholecystitida, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida nebo rakovina tlustého střeva. Při dlouhodobé infekci mohou kampylobaktery způsobit Guillain-Barrého a Miller Fisherův syndrom (Costa et al., 2019; Kaakoush et al., 2015).

U bakterií rodu *Campylobacter* je známa celá řada faktorů virulence. Důležitým virulenčním faktorem je polární bičík složený z proteinu flagellinu, který je kódovaný geny *flA* a *flB*. Adheze je zprostředkována pomocí adhezinových faktorů, k nejvýznamnější patří *cadF*. Tento protein je součástí vnější membrány kampylobakterů a má schopnost vázat se na fibronektin. K dalším virulenčním vlastnostem *Campylobacter* spp. patří produkce toxinů. Mezi nejvíce prozkoumané patří toxin CDT, který je obvykle složen z několika podjednotek (*CdtA*, *CdtB*, *CdtC*). Toxin CDT působí na epiteliální buňky střev a tím narušuje jejich absorpční funkci. Kampylobaktery také mohou produkovat enterotoxiny, Shiga toxin, či hepatotoxin (Kaakoush et al., 2015).

2.1.2 *Arcobacter*-like species

Prvotní zmínka o těchto mikroorganismech pochází až z roku 1977, jelikož dříve byly mylně považovány za kampylobaktery, resp. později za aerotolerantní kampylobaktery. Teprve roku 1991 byly arkobaktery podrobněji popsány (Vandenberg et al., 2004) jako samostatný rod *Arcobacter*. Aktuálně se však tyto bakterie řadí do samostatné čeledi *Arcobacteraceae* (Waite et al., 2018).

S ohledem na analýzu fragmentů 16S rRNA bylo navrženo rozdělení původního rodu *Arcobacter* do šesti různých taxonomických celků, a to rodů *Arcobacter* (*A.*), *Aliarcobacter* (*Al.*), *Pseudarcobacter* (*Ps.*), *Haloarcobacter* (*H.*), *Malacobacter* (*M.*) a *Poseidonibacter* (*Po.*) (Perez-Cataluna et al., 2019). Byl navržen také rod *Arcomarinus* (*Ar.*), ale jeho oficiální zařazení nebylo prozatím potvrzeno (Chieffi et al., 2020). *Arcobacter*-like species byly rozděleny na základě fylogenetické analýzy jaderného genomu do 4 monofyletických klastrů. Schéma rozdělení *Arcobacter*-like species je uvedeno na Obrázku 2. První klastr zahrnuje kmeny patřící do rodu *Aliarcobacter*. Druhý klastr zahrnuje rod *Pseudoarcobacter*, třetí klastr rod *Malacobacter* a čtvrtý klastr rod *Haloarcobacter* (Perez-Cataluna et al., 2018). V současnosti je řazeno k *Arcobacter*-like species celkem asi 36 druhů (Chieffi et al., 2020; Zhou et al., 2022). Jejich počet se však poměrně rychle zvyšuje, jen za poslední roky bylo popsáno několik nových druhů (Fanelli et al., 2019; Perez-Cataluna et al., 2018; Zhou et al., 2022).

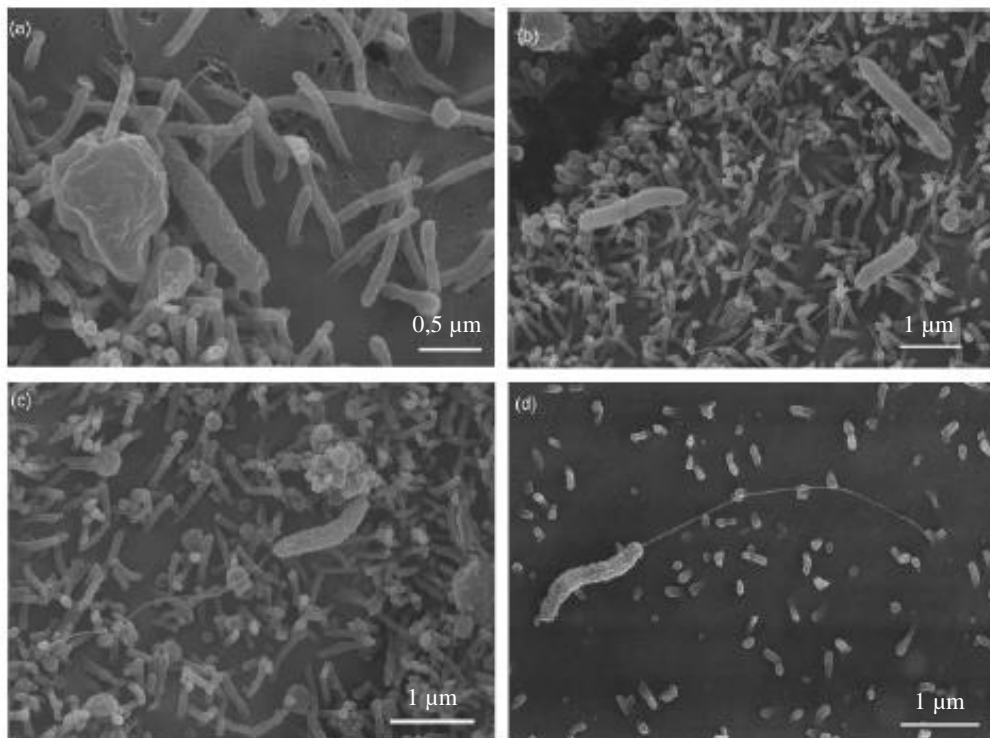


Obrázek 2 – Rozdělení *Arcobacter*-like species do čtyř klastrů (Perez-Cataluna et al., 2018).

2.1.2.1 Charakteristika *Arcobacter*-like species

Arcobacter v překladu znamená zakřivený, připomínající tvar luku. Zástupci *Arcobacter*-like species (Obrázek 3) jsou díky bičíku na konci buňky schopny vývrtkového pohybu (Perez-Cataluna et al., 2019). *Arcobacter*-like species se příliš neliší morfologií a metabolickými vlastnostmi od kampylobakterů. Produkce katalázy je značně variabilní, mohou však růst za aerobních i mikroaerofilních podmínek při teplotě 15–37 °C, což je charakteristický znak, který odlišuje *Arcobacter*-like species od rodu *Campylobacter* (Collado a Figueras, 2011; Šilha et al., 2016).

V roce 2002 byl druh *Al. butzleri* zahrnut na seznam mikroorganismů ohrožujících lidské zdraví (ICMSF, 2002). Mezi patogenní druhy pro člověka se zpravidla řadí pouze čtyři zástupci, a to *Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus*, *Al. skirrowii* a *Al. thereius*. Vliv *Arcobacter*-like species na lidské zdraví není doposud plně prostudován (Collado a Figueras, 2011).



Obrázek 3 – Buňky *Al. cryaerophilus* LMG 7537 (a, b) a *Al. skirrowii* LMG 6621 (c, d) zachyceny elektronovým mikroskopem (Hoa et al., 2007).

2.1.2.2 Izolace a identifikace *Arcobacter*-like species

Výskyt *Arcobacter*-like species je velice rozmanitý. Tyto bakterie jsou často izolovány z potravin i životního prostředí (Fanelli, et al., 2019; Šilha et al., 2018). Nejvíce druhů bylo doposud izolováno z potravin živočišného původu, jelikož hospodářská zvířata patří k nejčastějšímu rezervoáru *Arcobacter*-like species. Prevalence v drůbežím mase dosahuje až 96 %. Tyto mikroorganismy lze izolovat také z nejrůznějších vodních zdrojů, jako jsou řeky, jezera, odpadní, ale i pitné vody (Perez-Cataluna et al., 2019). V posledních letech je velmi běžná izolace z mořského prostředí, primárně jsou izoláty získávány z mořské vody, ryb nebo měkkýšů (Collado et al., 2009). Mnoho druhů bylo izolováno od lidí i zvířat trpících chorobami gastrointestinálního traktu (Perez-Cataluna et al., 2018; Šilha et al., 2016).

K izolaci a identifikaci *Arcobacter*-like species lze využít řadu metod, např. vhodně modifikované metodiky využívané pro detekci bakterií rodu *Campylobacter* nebo specifické metodiky určené přímo k izolaci *Arcobacter*-like species (Collado a Figueras, 2011). Izolace může zahrnovat pomnožovací krok, tzn. pomnožení v selektivním bujónu, po kterém následuje pasážování na selektivním médiu (Šilha et al., 2015). K izolaci *Arcobacter*-like species lze využít neselektivní média jako je TSA agar (Trypton Soya Agar), BHI agar (Brain Heart Infusion), M-H (Müller-Hinton) agar a krevní agar. Téměř žádné kmeny však nerostou na krevním agaru za anaerobních podmínek (Levicán et al., 2015). *Arcobacter*-like species nehemolyzují erytrocyty a na krevním agaru rostou bez pigmentace za aerobních i mikroaerofilních podmínek. Modifikací krevního agaru je SBA agar (Sheep Blood Agar), kde mikroorganismy vyrůstají jako šedé kolonie s nepravidelným okrajem, opět bez zóny hemolýzy. Pro izolování *Arcobacter*-like species z potravin se využívá též médium CAT, které obsahuje cefoperazon, amphotercin B a teicoplanin. Za aerobních podmínek lze tyto bakterie dále kultivovat na modifikovaném mCCDA agaru, Karmaliho agaru, či selektivním chromogenním médiem CASA (Ramees et al., 2017; Šilha et al., 2015).

Identifikace *Arcobacter*-like species klasickými kultivačními technikami je náročná, a to zejména kvůli velké podobnosti *Arcobacter*-like species s kamylobaktery. Využívanou alternativou k biochemické identifikaci *Arcobacter*-like species patří molekulárně-biologické identifikační a detekční metody. Jedná se např. o konvenční polymerázovou řetězovou reakci (PCR) nebo další metody založené na PCR, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a hmotnostní spektrometrie s maticí asistovanou laserovou desoprcí/ionizací (MALDI-TOF MS). Většina metod založených na polymerázové řetězové reakci se zaměřuje na identifikaci *Arcobacter*-like species nebo na identifikaci domnělých genů virulence. Dalšími využívanými

molekulárními metodami, které lze kombinovat s metodou PCR jsou pulsní gelová nebo gradientová denaturační elektroforéza a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Doudah et al., 2012; Moreno et al., 2003).

2.1.2.3 Faktory virulence *Arcobacter*-like species a způsobovaná onemocnění

Významným faktorem, přispívajícím k přenosu *Arcobacter*-like species, je konzumace nedostatečně tepelně upravených potravin a kontaminované pitné vody. Onemocnění vyvolané *Arcobacter*-like species je velice podobné kamylobakterióze. Projevuje se silnou bolestí břicha, kterou doprovází průjem, horečka či zvracení. Příznaky akrobakteriózy trvají zpravidla 3–15 dní. Dostačující je obvykle domácí léčba, někdy s podáním antibiotik. Výjimečně je nutná hospitalizace pacienta (Vandenberg et al., 2004). *Arcobacter*-like species mohou způsobovat také bakteriémií, endokarditidu, peritonitidu, gastroenteritidu či celou řadu dalších onemocnění (Fanelli et al., 2019).

Aktuální informace o patogenitě *Arcobacter*-like species vychází především z dřívějších studií zabývajících se patogenitou bakterií *Campylobacter* spp. Invazivita, adhezivita, produkce toxinů a také prozánětlivého cytokinu IL-8 má značný význam při vzniku infekcí způsobených *Arcobacter*-like species (Hoa et al., 2007). V genomu typového kmene *Al. butzleri* ATCC 49616 bylo identifikováno deset genů (faktorů virulence), mezi něž patří *cadF* a *cj1349*, *ciaB*, *hecA*, *iroE*, *hecB*, *irgA*, *mviN*, *pldA* a *tlyA* (Miller et al., 2007). *CadF* a *cj1349* jsou geny kódující proteiny vnější membrány a usnadňující adhezi bakteriální buňky na střevní epitel. Gen *ciaB* se účastní invaze do hostitelské buňky. Gen *pldA* kóduje fosfolipázu A vnější membrány, která hydrolyzuje acylesterové vazby. Gen *tlyA* je gen tvorby hemolyzinu, gen *irgA* kóduje receptor vnější membrány pro enterobaktin, gen *hecA* patří mezi vláknité hemaglutininové adheziny a gen *hecB* kóduje protein aktivující hemolyzin (Doudah et al., 2012). Bičíky *Arcobacter*-like species mohou hrát roli v invazi do buněk či v kolonizaci buněk hostitele.

2.1.3 Rod *Sulfurospirillum*

Vznik rodu *Sulfurospirillum* se datuje k roku 1992, prvním popsáným druhem byl *Sulfurospirillum deleyianum* (Goris a Diekert, 2016; Vandamme et al., 1991b). Biochemický profil zástupců odpovídá čeledi *Campylobacteraceae*. Všechny druhy vykazují oxidázovou aktivitu (Chieffi et al., 2020; Debruyne et al., 2008). Mírně zakřivené sulfurospirily se mohou shlukovat a tvořit tak spirálovité řetězce. Pohyb je umožněn skrze polární bičík (Debruyne et al., 2008; Goris a Diekert, 2016). Většina dosud izolovaných bakterií rodu *Sulfurospirillum* roste za mikroaerofilních podmínek, optimální teplotou je 20–30 °C. Příznivé pH pro růst je 7–7,5 (Debruyne et al., 2008). V současné době se do rodu *Sulfurospirillum* (*S.*) řadí sedm druhů. Jmenovitě jde o druhy *S. arcachonense*, *S. arsenophilum*, *S. barnesii*, *S. cavolei*, *S. deleyianum*, *S. denitrificans*, a *S. halorespirans* (Debruyne et al., 2008; Goris a Diekert, 2016; Vandamme et al., 1991a; Vandamme et al., 1991b).

Bakterie rodu *Sulfurospirillum* většinou detekujeme v půdě, podzemní vodě nebo prostředích znečištěných organohalogenidy, arzenem, selenem či v prostředí bohatém na síru. Oblasti kontaminované ropou i odpadní vody, obsahující toxické látky a průmyslové zbytky, jsou častým zdrojem bakterií rodu *Sulfurospirillum*. Sulfurospirily se hojně nacházejí též v mořském prostředí, převážně v sedimentech (Debruyne et al., 2008; Goris a Diekert, 2016).

Postupy izolace sulfurospiril zahrnují pomnožovací krok. Obvykle rostou na médiu obsahujícím pyruvát a fumarát, doplněnými o mravenčan a dusičnan jako energetické substráty. Mořské druhy zpravidla rostou pomaleji, většina s výjimkou halofilních mořských druhů roste nejlépe při nízkých koncentracích solí (Goris a Diekert, 2016). Doposud žádný druh *Sulfurospirillum* spp. nebyl klasifikován jako patogenní nebo žijící souběžně s lidským nebo zvířecím hostitelem. Taktéž nebylo zaznamenáno žádné onemocnění způsobené těmito bakteriemi (Debruyne et al., 2008; Vandamme et al., 1991a).

2.2 Vybrané látky s antimikrobiálním potenciálem

Antimikrobiálně působící látky se přidávají do různých potravin a potravinářských výrobků, popř. se v nich přirozeně vyskytují. Přírodní antimikrobiální látky a jejich extrakty jsou dnes velmi vyhledávanou alternativou syntetických konzervačních látek využívaných v potravinářství i medicíně (Atanasov et al., 2015). Hlavní funkcí všech antimikrobiálních sloučenin je potlačení životaschopnosti mikroorganismů (Davidson a Zivanovic, 2003). Rostlinné matrice mají celou řadu účinků např. antibakteriální, antivirové a antimykotické, díky obsahu biologicky aktivních látek. Zhruba u 30 000 sloučenin získaných z rostlinných matric již byly popsány jejich antimikrobiální účinky. Mezi sekundární metabolity izolované z rostlin patří zejména sloučeniny ze skupiny fenolů, alkaloidů, saponinů, taninů a flavonoidů. Inhibiční účinek je přisuzován zejména hydroxylovým skupinám fenolických sloučenin. Působením hydroxylových skupin totiž dochází k narušení membránové struktury bakteriálních buněk. Fenolické sloučeniny mohou inhibovat např. Gram-pozitivní bakterie, ale naopak nemusí být účinné proti Gram-negativním bakteriím (Tajkarimi et al., 2010). Dokonce i samotné mikroorganismy produkují některé antimikrobiálně působící sekundární metabolity (Hayek et al., 2013).

Mnohé studie však prezentují negativní účinky některých syntetických sloučenin na lidské zdraví (Santoyo et al., 2006). Bezpečnost přírodních i syntetických antimikrobiálních látek je vždy nutné podrobně studovat, a to zejména mechanismy jejich účinků. Oblast výzkumu antimikrobiálních látek je zaměřena na vhodné používání či synergickou účinnost s jinými antimikrobiálními látkami (Brenes et al., 2007; Medina et al., 2007; Smid a Gorris, 1999; Smigielski et al., 2018). Využívání antimikrobiálních látek by však nemělo přispívat k rozvoji rezistence mikroorganismů (Buchanan a Edelson, 1999; Foster, 1995). Bylo např. prokázáno, že některé bakterie mohou získat rezistenci k organickým kyselinám po předchozím vystavení nízkým hodnotám pH (Davidson a Harrison, 2002). Vývoj účinných kombinací přírodních antimikrobiálních látek by mohl vést k novým metodám dezinfekce či snížení životaschopnosti mikroorganismů, a to nejen jejich planktonních ale i biofilmových forem. Nezbytný je vždy správný výběr účinné antimikrobiální látky a také její vhodné koncentrace. Využití antimikrobiálních látek z rostlinných zdrojů v kombinaci se syntetickými látkami by mohlo poskytnout zajímavé antimikrobiální účinky proti celé řadě patogenů (Hayek et al., 2013; Shan et al., 2007; Tiwari et al., 2009).

2.2.1 Antibiotika

Ubikvitní výskyt bakterií a časté používání antibiotik a dalších antimikrobiálních látek přispívá k nárůstu mikrobiální rezistence. Nadměrným užíváním antimikrobiálních látek se dostává velké množství jejich reziduí do životního prostředí. Původně citlivý mikroorganismus si může v důsledku antimikrobiální léčby rezistenci rozvinout (Baseti et al., 2013). Pokud se jedná o biofilmové infekce, je potřeba brát v úvahu mnohonásobně zvýšenou rezistenci buněk v biofilmu k mnohým antimikrobiálním látkám. Velice problematická je multirezistence mikroorganismů k mnoha antibiotikům. Vhodné kombinace antibiotik či antimikrobiálních látek by mohly zpomalit vývoj a šíření rezistence (Baseti et al., 2013; Sosa et al., 2010).

Antibiotika byla původně získávána jako produkt mikrobiálního metabolismu. Účinek antibiotik je založen na inhibici růstu bakterií (bakteriostatická antibiotika) nebo potlačení životaschopnosti bakterií (baktericidní antibiotika). Existuje však celá řada kritérií, podle kterých můžeme antibiotika členit. Na základě chemické struktury a způsobů účinku můžeme běžná antibiotika rozdělit do mnoha skupin (např. beta-laktamy, tetracykliny, sulfonamidy, aminoglykosidy, fluorochinolony, makrolidy nebo glykopeptidy). Mezi hlavní mechanismy účinků antibiotik patří narušení biosyntézy buněčné stěny, buněčné membrány, proteinů, nukleových kyselin nebo specifické inhibice enzymů (Zhuang et al., 2021).

Jelikož pro *Arcobacter*-like species neexistují mezinárodně přijatá kritéria pro testování citlivosti k antibiotikům, využívají se zejména kritéria dle CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) nebo EUCAST (*European Commite on Antimicrobial Susceptibility Testing*) doporučené pro kampakobaktery nebo čeled' *Enterobacteriaceae* (Šilha et al., 2017). Mezi antibiotika doporučená k léčbě gastrointestinálních arkoobakterióz se řadí aminoglykosidy a tetracykliny (Rathlavath et al., 2017). U některých *Arcobacter*-like species byla zjištěna vysoká míra rezistence např. ke klindamycinu, azithromycinu, či ciprofloxacinu. V řadě studií je popisována také multirezistence *Arcobacter*-like species (Šilha et al., 2017; Šilha et al., 2019b).

Beta-laktamová antibiotika

Beta-laktamy patří mezi často užívaná antibiotika k léčbě bakteriálních infekcí. Tato antibiotika se vážou na proteiny vázající penicilin a inhibují syntézu buněčné stěny jak Gram-pozitivních, tak Gram-negativních bakterií (Zhuang et al., 2021). Typickým znakem všech beta-laktamových antibiotik je přítomnost beta-laktamového kruhu. Štěpením beta-laktamového kruhu pomocí beta-laktamáz dochází ke ztrátě antibiotického účinku. Beta-laktamová antibiotika jsou proto kombinována s inhibitory beta-laktamáz

(např. s kyselinou klavulánovou, sulbaktamem a tazobaktamem). Mezi beta-laktamová antibiotika se řadí peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy (Durand et al., 2018).

Glykopeptidová antibiotika

Mechanismus účinku glykopeptidových antibiotik spočívá v inhibici biosyntézy peptidoglykanových mureinů, které představují základní stavební jednotky buněčné stěny. Glykopeptidová antibiotika jsou užívána při infekcích vyvolaných Gram-pozitivními bakteriemi, které nelze potlačit beta-laktamovými antibiotiky. Mezi glykopeptidová antibiotika se řadí vankomycin, teikoplanin, oritavancin a televancin (Durand et al., 2018).

Chinolony

Jako chinolonová chemoterapeutika jsou označovány deriváty 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylové kyseliny (Lincová et al., 2007). Starší chinolony postrádají v molekule atom fluoru. Novější chinolony (fluorochinolony) atom fluoru v molekule obsahují a vykazují širší spektrum účinku. Mechanismus účinku flurochinolonů spočívá v blokaci bakteriální topoizomerázy, tím dochází ke vzniku zlomů v bakteriální DNA. Chinolony vykazují baktericidní účinek. K široce používaným chinolonům se řadí např. norfoxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin a moxifloxacin (Van Bambeke et al., 2005; Zhuang et al., 2021).

Linkosamidy

Linkosamidy jsou sloučeniny izolované ze *Streptomyces lincolnensis* (Lincová et al., 2007). Přestože chemická struktura makrolidů (např. erythromycin) a linkosamidů (např. linkomycin, klindamycin, celesticetin) je odlišná, jejich mechanismus účinku je stejný, tzn. inhibují syntézu proteinů. Mezi linkosamidová antibiotika používaná v klinické praxi patří linkomycin a klindamycin. Klindamycin je obvykle účinnější při léčbě bakteriálních infekcí způsobených anaerobními druhy než linkomycin (Spížek a Řezanka, 2004).

Makrolidy

Všechna makrolidová antibiotika mají shodný mechanismus účinku, po průniku do bakteriální buňky zastavují proteosyntézu. Makrolidy jsou účinné zejména proti Gram-pozitivním bakteriím (podobně jako peniciliny). Z makrolidů je nejčastěji používán erythromycin, spiramycin, roxithromycin, klarithromycin a azithromycin (Havlík, 2010).

Aminoglykosidy

Aminoglykosidová antibiotika jsou přirozenými produkty plísní. Obvykle se rozdělují do dvou skupin. Antibiotika pocházející z rodu *Streptomyces*, jež mají koncovku mycin (streptomycin, neomycin, kanamycin, amikacin, tobtamycin) a antibiotika produkovaná rodem *Micromonospora*, které mají koncovku micin (gentamicin, netilmicin, isepamicin). Aminoglykosidy jsou širokospektrální baktericidní antibiotika. Rychlý baktericidní účinek aminoglykosidů je však provázen rizikem toxicity (Hera et al., 2016).

Tetracyklinová antibiotika

Tetracykliny jsou jednou z nejvíce používaných skupin antibiotik při léčbě různých infekčních onemocnění. Tetracyklinová antibiotika patří mezi širokospektrální antibiotika, inhibují proteosyntézu a působí tak bakteriostaticky (Durand et al., 2018). Mezi tetracyklinová antibiotika je řazen např. tetracyklin, tigecyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin a demekloxyklin. Polosyntetické tetracykliny jsou lymecyklin, methacyklin, minocyklin, rolitetracyklin a doxycyklin. Novější tetracykliny zahrnují ervacyklin, sarecyklin a omadacyklin (Shutter a Akhondi, 2022).

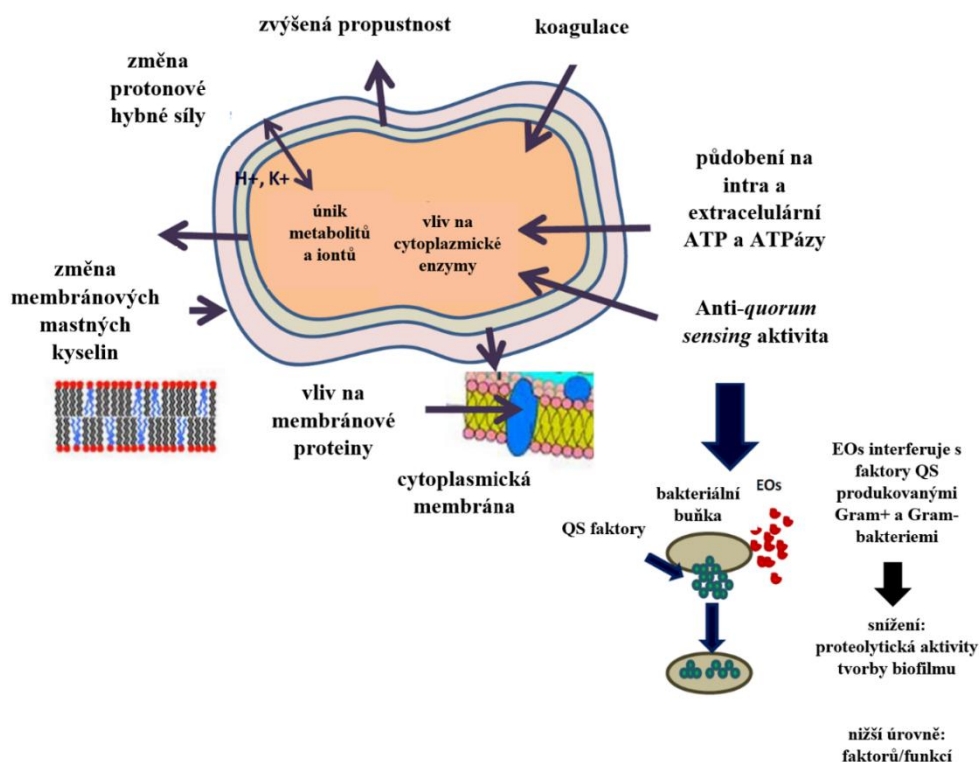
2.2.2 Esenciální oleje a hydrosoly

Přírodní matrice a z nich získané esenciální oleje jsou používány k různým účelům již od starověku (Shan et al., 2007). Rostlinné éterické oleje se vyznačují svým aroma, taktéž jsou vynikajícím zdrojem přírodních konzervačních látek. Předpokládá se, že tato vlastnost je spojena zejména s vysokým obsahem fenolických sloučenin (Dudonné et al., 2009). Rostliny jsou také významným zdrojem biologicky aktivních látek, avšak způsob jejich účinku se liší od běžných chemických léčiv (Hemaiswarya et al., 2008). V současné době je přibližně 10 % esenciálních olejů využitelných pro farmaceutický, agronomický, potravinářský a kosmetický průmysl. Značné využití esenciálních olejů je také v aromaterapii (Hajhashemi et al., 2003; Silva et al., 2003).

Esenciální oleje (EO) lze z rostlin extrahovat několika způsoby. Jednou z nejstarších a nejpoužívanějších metod je doposud destilace (Sowndhararajan et al., 2017). Esenciální oleje jsou obvykle získávány parní destilací nebo hydrodestilací. Produkty se mohou lišit v kvalitě a množství extrahovaných látek. Chemické složení esenciálních olejů je velice pestré, jedná se o složité a komplexní přírodní směsi, které mohou obsahovat 20–60 složek (Bakkali et al., 2008; Pichersky et al., 2006). Mezi hlavní složky esenciálních olejů a hydrosolů patří monoterpeny a seskviterpeny (Kalemba a Kunicka, 2003; Mohamed et al., 2010; Sowndhararajan et al.,

2017), dále aldehydy, alkoholy, ketony, kyseliny, estery nebo fenyylpropanoidy (Diao et al., 2014; Hamedi et al., 2017; Lu et al., 2010; Kalemba a Kunicka, 2003).

Esenciální oleje a sloučeniny rostlinného původu se vyznačují antimikrobiálními účinky proti patogenním i nepatogenním bakteriím (Burt, 2004; Dorman a Deans, 2000), kvasinkám (Belletti et al., 2010) a plísním (Kamble a Patil, 2008; Viuda-Martos et al., 2008). Z tohoto důvodu mají potenciál být vhodnou alternativou k syntetickým antimikrobiálním látkám (Koné et al., 2019; Negi et al., 2012; Oussalah et al., 2007). Mohou však také synergicky reagovat s jinými látkami, což vede ke zlepšení jejich antimikrobiálních vlastností (Dinesh a Cheorun, 2013). Esenciální oleje, jako látky lipofilní povahy narušují např. bakteriální buněčnou stěnu, poškozují cytoplazmatickou membránu a membránové proteiny. Sloučeniny přítomné v EO jsou schopné interferovat s proteiny v buněčné stěně bakterií, které se podílejí na transportu nezbytných molekul do buňky. Účinky EO vedou obvykle k destabilizaci fosfolipidové dvojvrstvy, ztrátě životně důležitých intracelulárních složek, inaktivaci enzymatických mechanismů a lýzi buňky. U bakterií je permeabilizace membrán spojena se ztrátou iontů, snížením membránového potenciálu, zhroucením protonové pumpy a vyčerpáním rezervy ATP (Bakkali et al, 2008; Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006). Antimikrobiální aktivitu EO nelze přičíst jednomu mechanismu, podílí se na ní různé biochemické a strukturální mechanismy (Obrázek 4) (Nazzaro et al., 2013; Nuñez a Aquino, 2012).



Obrázek 4 – Mechanismus účinku esenciálních olejů a cílové struktury mikrobiálních buněk (Nazzaro et al., 2013).

Vedlejšími produkty destilace esenciálních olejů jsou jejich vodné roztoky – hydrosoly (hydroláty). V literatuře se též užívá označení hydrofloráty, aromatické vody či květinové vody (Edris, 2009; Rajeswara Rao, 2013). Hydrosoly obsahují různé množství bioaktivních komponent (Labadie et al., 2015; Smigielski et al., 2018; Zheljazkov a Astatkie, 2011). Rozdíl ve složení hydrosolů a esenciálních olejů je však především kvantitativní (Hamedi et al., 2017). Koncentrace dominantních složek hydrosolů je nižší než koncentrace stejných látek v esenciálních olejích (D'Amato et al., 2018; Karampoula et al., 2016; Smigielski et al., 2013).

Díky obsahu biologicky aktivních látek vykazují éterické oleje i hydrosoly antimikrobiální aktivitu. Dle některých studií (Tornuk et al., 2011; Kunicka-Styczyńska et al., 2015) mají mnohé hydrosoly slibné antimikrobiální vlastnosti, proto mohou mít další potenciální využití. Hydrosoly lze aplikovat v medicíně (Baydar et al., 2004; Rai et al., 2017; Smigielski et al., 2018) nebo v potravinářství, hojně se využívají též v aromaterapii (Inouye et al. 2008; Inouye et al., 2009; Hussien et al., 2011). Praktické využití je v literatuře popisováno zejména pro hydroláty získané destilací vavřínu (Ozturk et al., 2016), levandule (Moon et al., 2006), fenyklu, hřebíčku, šalvěže (Tornuk et al., 2011), rozmarýnu (Ozturk et al., 2016), tymiánu (Sagdic a Ozcan, 2003), hřebíčku, skořice a kardamonu (Hussien et al., 2011).

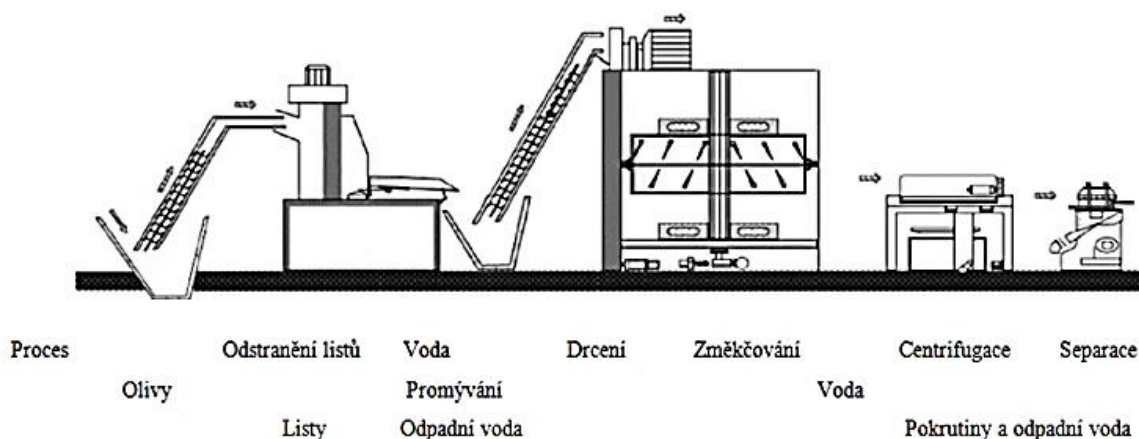
2.2.3 Olivové oleje

Rostlinné oleje se získávají z olejnin, tj. z rostlin obsahujících průmyslově zpracovatelný tuk v semenech, plodech nebo dalších částech (Kučerová et al., 2007). Mezi nejvýznamnější olejninu se řadí sója, řepka, další brukvovité olejninu, slunečnice a především olivy. K největším evropským producentům oliv patří Španělsko, Itálie a Řecko, proto se olivový olej neodmyslitelně pojí se středomořskou kuchyní. V České republice jsou olejninu druhou nejpěstovanější skupinou plodin, a to zejména díky nárůstu využívání řepky olejné jak v potravinářství, tak i v dalších odvětvích průmyslu (Zukalová, 2016).

Olivové oleje obsahují řadu látek nezbytných pro lidský organismus. Samotný olivový olej se získává z plodů olivovníku evropského (*Olea europaea* L.), a to lisováním, extrakcí nebo jinými mechanickými postupy. Produktem je surový olej nevhodný ke konzumaci. Z toho důvodu prochází dalšími úpravami (rafinace) pro získání požadovaných vlastností. Při lisování olejnin s vyšším obsahem tuku (včetně oliv) se využívá vyšších tlaků. Vedlejším produktem jsou pokrutiny, které se mohou využívat pro další lisování nebo jsou od lisování rovnou odděleny (Obrázek 5). Cílem je získat světlý olej s neutrální chutí a vůní. Panenský olivový olej se získává přímo z čerstvých oliv, přičemž teplota nepřesahuje 25 °C. Nejvyšší kvalitu mají oleje lisované bez pecek. Oleje lisované za studena neprocházejí rafinací (Dobeš a Hejlová, 1988;

Kadlec et al., 2009; Owen et al., 2000). Mezi směsné oleje se řadí např. směsi olivového oleje a rafinovaného olivového oleje míchaného v různých poměrech. Do této kategorie méně kvalitních olejů spadá také olej získaný z pokrutin, který lze taktéž míchat s olivovým olejem vyšší kvality. Všechny olivové oleje obsahují téměř stejné množství mastných kyselin, avšak obsah fenolických sloučenin je různý. Nejvyšší obsah fenolických sloučenin byl zaznamenán v panenském olivovém oleji (Medina et al., 2006).

Během zpracování oliv jsou uvolněny nebo vytvořeny fenolické sloučeniny. Fenolické látky jsou finálně rozděleny v závislosti na jejich vlastnostech a rozpustnosti ve vodné a tukové fázi. Část fenolických látek je zachycena ve výliscích z oliv. V důsledku toho vstupuje jen zlomek fenolických sloučenin do olejové fáze. Množství antioxidantů v olivovém oleji dosahuje 1–2 % z celkového množství antioxidantů v olivách. Zbytek se ztrácí odpadní vodou (přibližně 53 %) a pokrutinami (přibližně 45 %).



Obrázek 5 – Proces výroby olivového oleje (Preddy a Watson, 2010).

Rostlinné oleje patří mezi jednoduché lipidy, skládají se z mastných kyselin a glycerolu. Hlavní složkou jsou glyceroly, které představují více než 98 % z celkové hmotnosti oleje (Servili et al., 2004). Na glycerol jsou esterovou vazbou vázány acyly, které však zpravidla nejsou stejné. Mohou se lišit svou délkou a stupněm nenasycenosti. Výsledný olej je tvořen směsí různých typů triacylglycerolů (TAG) (Dostál et al., 2012). V olivovém oleji představuje kyselina olejová přibližně 85 % všech mastných kyselin (Panayotis et al., 2002). Oleje dále obsahují malé diacylglyceroly (DAG), monoacylglyceroly (MAG) a volné mastné kyseliny (MK). Avšak další složky oleje (pouze asi 2 %), obsahují více než 230 chemických sloučenin (např. alifatické uhlovodíky, triterpenické alkoholy, steroly, těkavé sloučeniny a antioxidanty). Mezi hlavní antioxidanty olejů patří karoteny a fenolické sloučeniny, které zahrnují lipofilní a hydrofilní fenoly. Zatímco lipofilní fenoly (tokoferoly) lze nalézt i v jiných rostlinných

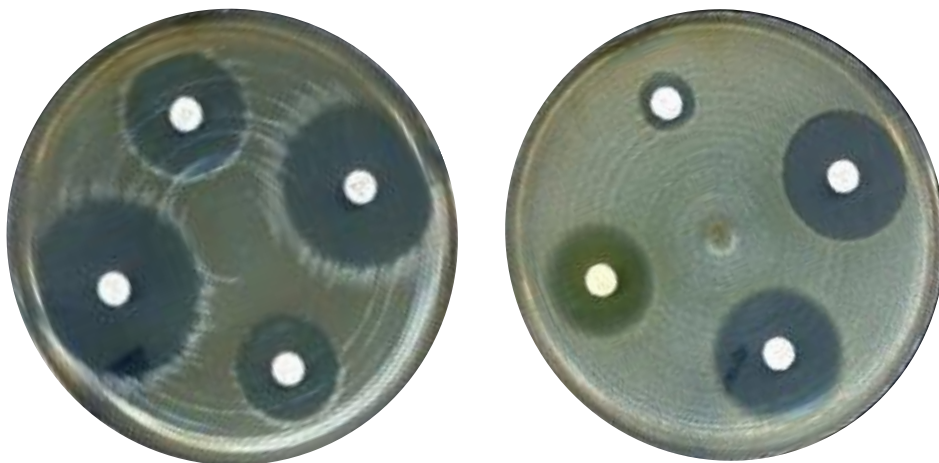
olejích, některé hydrofilní fenoly olivových olejů nejsou v jiných olejích přítomné (Dostál et al., 2012; Foster et al., 2009, Servili et al., 2004). Převládající sloučeniny hydrofilních fenolů vyskytující se v olivových olejích jsou fenolové alkoholy, fenolové kyseliny, flavonoidy, lignany a secoiridoidy (Servili et al., 2004). Hlavními fenylalkoholy v panenském olivovém oleji jsou hydroxytyrosol a tyrosol (Angerosa et al., 1996; Tsimidou et al., 1992). Hydroxytyrosol se nachází ve větším množství ve vodných vedlejších produktech zpracování oleje, tj. hydrosolech, na rozdíl od jiných hydrofilních fenolů (Plastina et al., 2019). Dalšími fenolickými sloučeninami v panenském olivovém oleji jsou secoiridoidní deriváty jako je oleuropein, ligstrosidové aglykony a dialdehydové formy dekarboxymethyloleuropeinu. Velké množství oleuropeinu však degraduje při zpracování olivového oleje (Panayotis et al., 2002). Tyto secoiridoidy vznikají z glukosidů oleuropeinu a ligstrosidu přítomného v olivách, které jsou hydrolyzovány endogenní β -glukosidázou během drcení (Plastina et al., 2019). Jsou to tedy nově vznikající amfifilní sloučeniny, které jsou přeneseny do olejové i vodné fáze. V limitním množství byl zaznamenán i verbascoid, který je dalším prekurzorem hydroxytyrosolu (Preedy a Watson, 2010; Servili et al., 2004). Lignany byly také detekovány u většiny olivových olejů, stejně jako luteolin i apigenin. Další a méně významné polyfenoly v olivových olejích jsou hydroxytyrosolglykol, katechol, tyrosol-acetát, vanilin, kyselina p-kumarová, vanilová, skořicová a také kyselina ferulová (Brenes et al., 2007; Japón-Luján et al., 2006).

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazují panenské olivové oleje, následně oleje olivové a oleje z pokrutin. Antimikrobiální účinnost olejů je obecně vyšší ke Gram-pozitivním bakteriím, oproti bakteriím Gram-negativním (Medina et al., 2006). Mezi hlavní antimikrobiální sloučeniny patří hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein a ligstrosid. Silnou baktericidní aktivitu mají zejména aglykony těchto komponent a též dialdehydické formy (Medina et al., 2007). Ve srovnání s jinými rostlinnými oleji mají fenolické frakce olivových olejů příznivý účinek na zdraví, a také přispívají k typickým organoleptickým vlastnostem olivových olejů. Spolehlivé určení složek olivových olejů není vždy přímé, jelikož neexistuje žádná univerzální metoda pro tato stanovení. Metoda HPLC je nejpoužívanější chromatografickou metodou pro identifikaci sloučenin přítomných v olivových olejích (Preedy a Watson, 2010; Servili et al., 2004).

2.2.4 Metody testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám

Agarová difúzní metoda

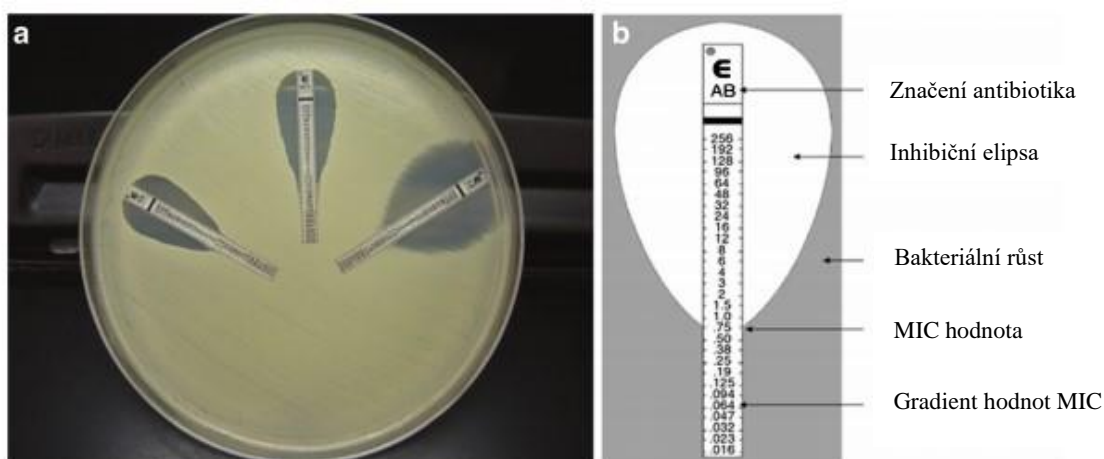
Agarová difúzní metoda je jednou z nejvíce používaných metod v klinických laboratořích. Výhodou je zejména univerzálnost metody. Princip metody spočívá v položení disků napuštěných určitými koncentracemi antibiotik (popř. dalších antimikrobiálních látek) na povrch agarového média inokulovaného testovaným mikroorganismem. Testované antimikrobiální látky difundují do agarového média a mikroorganismus roste v závislosti na citlivosti či rezistenci k dané látce. Citlivý mikroorganismus neroste v blízkém okolí disku s antimikrobiální látkou a vytváří tak inhibiční zónu. Po inkubaci (zpravidla 24 hod. při 37 °C, popř. dle nároku dané kultury) se měří průměr inhibičních zón okolo jednotlivých disků (Obrázek 6). Získané hodnoty se porovnají s daty o hraničních koncentracích antibiotik dle pravidelných reportů vydávaných CLSI či EUCAST (CLSI, 2019; EUCAST, 2021).



Obrázek 6 – Diskový difúzní test provedený na M-H agarech (EUCAST, 2021).

Gradientová difúzní metoda (E-test)

Gradientová difúzní metoda je metoda kvantitativní. Pracuje se s komerčně dodávanými proužky porézního stripu, který obsahuje přesně definovanou koncentrační řadu daného antibiotika. Odečítaným výsledkem je inhibiční zóna, avšak také minimální inhibiční koncentrace testované látky, viz Obrázek 7 (Schumacher et al., 2018).



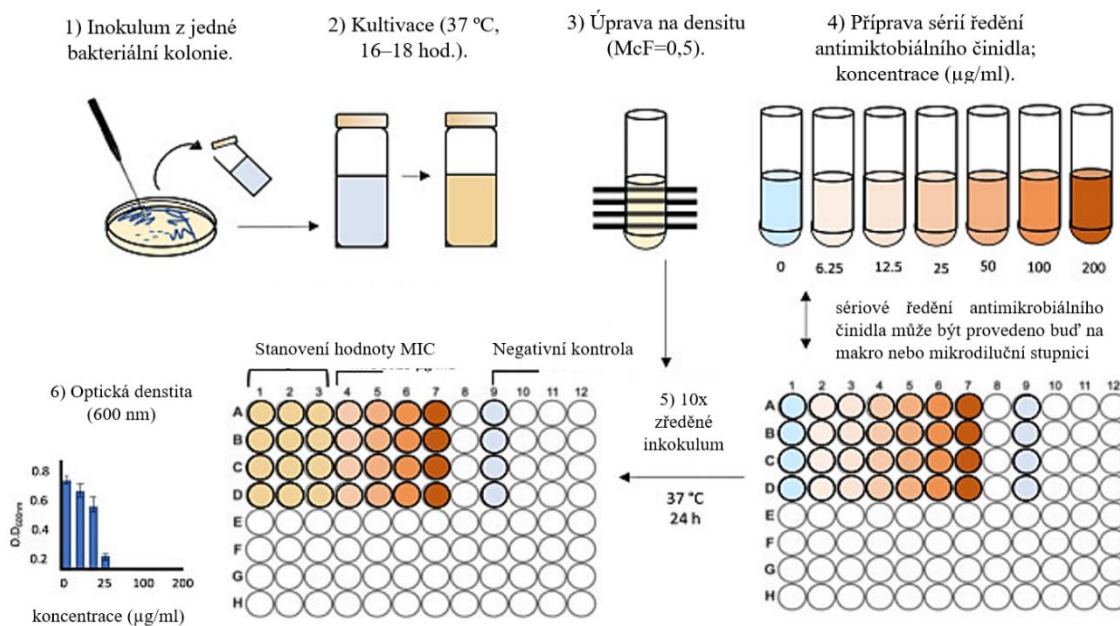
Obrázek 7 – E-test pro stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik. (a) Vzhled inhibičních zón. (b) Schéma znázornění inhibiční zóny s vyhodnocením MIC (Schumacher et al., 2018).

Agarová a bujónová diluční metoda

Princip agarové diluční metody spočívá v přípravě sestavy Petriho misek s vhodným agarovým médiem obsahujícím definované koncentrace antibiotik nebo dalších antimikrobiálních látek. Na povrch média je naočkováno větší množství testovaných kmenů v tzv. spotech. Petriho miska bez nárůstu daného kmene odpovídá minimální inhibiční koncentraci (Mani et al., 2018).

Bujónová diluční metoda slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům a antimikrobiálním látkám (Obrázek 8). Mikrodiluční bujónová metoda však umožňuje testování většího počtu bakteriálních kmenů v mikrotitrační destičce a pro vyhodnocení citlivosti kmenů se využívá zpravidla spektrofotometrická detekce. Nejnižší koncentrace testované látky, která je schopná potlačit růst mikroorganismů, udává hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC). Minimální baktericidní koncentrace (MBC) odpovídá nejnižší koncentraci antimikrobiální látky potřebné k usmrcení mikroorganismu (Andrews et al., 2019).

Pro stanovení citlivosti buněk v biofilmu se užívá minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC) neboli koncentrace antimikrobiálních látek, která zcela likviduje buňky v biofilmu. Minimální biofilm inhibující koncentrace (MBIC) je koncentrace antimikrobiálních látek, která zastavuje jejich růst a množení (Bardouniotis et al., 2001). MBEC a MBIC se zpravidla liší od hodnot MIC a MBC planktonních buněk, a to až o čtyři koncentrační řády (Holá et al., 2004).



Obrázek 8 – Postup pro provedení mikrodiluční metody (Andrews et al., 2019).

2.3 Bakteriální biofilm

Anthony van Leeuwenhoek popsal biofilm již v 17. století, a to pomocí primitivního mikroskopu. Až o dvě století později byl bakteriální biofilm pozorován v souvislosti s perzistentní infekcí způsobenou *P. aeruginosa* u pacienta s cystickou fibrózou. První obrázek biofilmu byl publikován v roce 1977 a zobrazoval navzájem přilnuté bakterie s určitou vrstvou matrix. Teprve až profesor Costerton zavedl pojem „biofilm“ do povědomí lékařské mikrobiologie a prokázal, že jsou buňky ve struktuře biofilmu odolnější k antimikrobiálním látkám ve srovnání s planktonními buňkami. Jako první začal přednášet o biofilmu a infekcích způsobovaných biofilmy. Upozornil také na chronické infekce vznikající v souvislosti s tvorbou mikrobiálních biofilmů. Dnes se dokonce odhaduje, že bakteriální biofilmy jsou zodpovědné přibližně za 80 % všech případů bakteriálních infekcí. K samotnému výzkumu biofilmu přispěl také rozvoj mikroskopických technik, např. světelné mikroskopie, konfokální

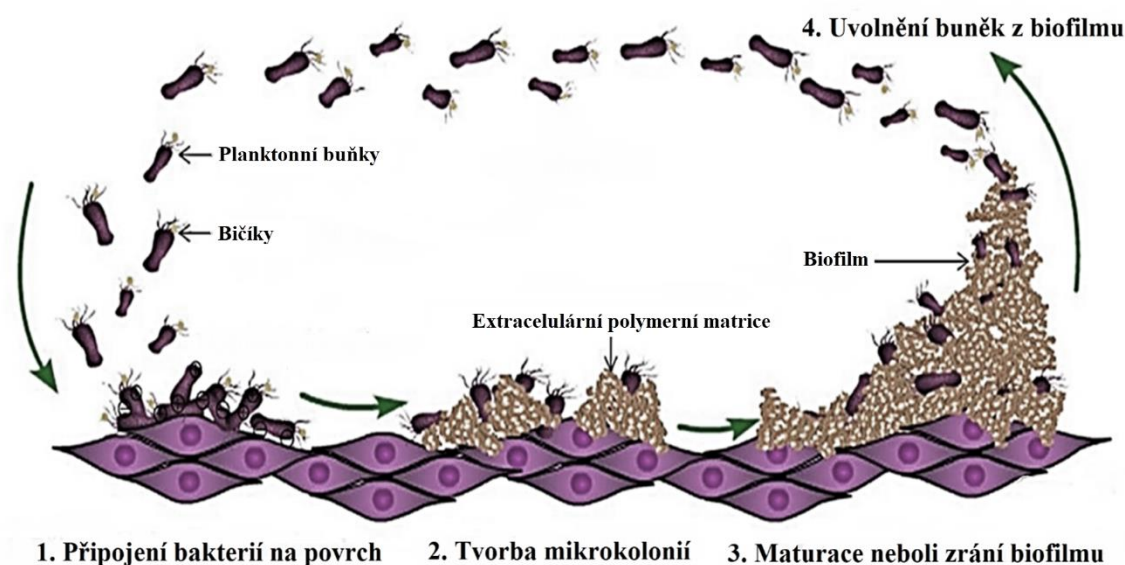
skenovací mikroskopie (CLSM) i elektronové mikroskopie (EM) (Hoiby, 2017). Vědecké studie posledních několika desetiletí potvrdily asociaci bakteriálních biofilmů s akutními a chronickými infekcemi, které mohou být pro člověka smrtelné. Bakteriální biofilmy jsou považovány za odolné a perzistentní struktury odolávající konvenčním metodám léčby (Vasudevan, 2014).

Mikrobiální biofilm je definován jako společenství mikroorganismů obklopené vlastní maticí. Tato společenství mohou být tvořena jedním nebo i více druhy bakterií (Paluch et al., 2020). Mikroorganismy tvořící biofilm mohou adherovat na nejrůznější povrchy a vyskytují se prakticky kdekoliv. Velice často se vyskytují na lékařských implantátech jako jsou katetry, kloubní náhrady, srdeční implantáty nebo kontaktní čočky. Infekce mohou být často léčeny odstraněním implantátu, což zvyšuje nároky na pacienta a finanční náklady na léčbu. Infekce krevního oběhu jsou závažná onemocnění způsobené mikroorganismy v biofilmu. Schopnost mikroorganismů tvořit biofilm je spojována s jejich přirozenou rezistencí k účinkům antibiotik. Z klinického hlediska je tvorba biofilmu považována za důležitý faktor virulence (Mah a O'Toole, 2001; Paluch et al., 2020).

Bakterie rostoucí v biofilmu vykazují vlastnosti odlišné od planktonních buněk, zejména zvýšenou rezistenci na antimikrobiální látky a dezinfekce. Jednou strategií k inhibici tvorby biofilmu je snížení bakteriální adheze. Lze toho dosáhnout úpravou povrchů antimikrobiálními látkami, jako jsou nanočástice na bázi kovů nebo povrchově aktivní látky. Pro úplné odstranění vytvořeného biofilmu je nutné použít sloučeniny, které jsou schopné proniknout do jeho struktury nebo ho mohou mechanicky narušit (Paluch et al., 2020). Tvorba biofilmu nemá pouze negativní vliv, např. v trávicím traktu člověka tvoří bakteriální biofilm ochranou bariéru (střevní mikrobiom) před kolonizujícími mikroorganismy (Abdallah et al., 2014).

2.3.1 Tvorba biofilmu

V životním prostředí se bakterie zřídka vyskytují v planktonní formě. Bakterie dávají přednost tvorbě biofilmu, který zvyšuje jejich ochranu proti škodlivým vlivům (Davey a O'Toole, 2000). Tvorba biofilmu je složitý vývojový proces, který probíhá ve více krocích (Obrázek 9). Vytvořený biofilm je vysoce diferencovaný a propracovaný systém, ve kterém bakterie spolupracují a sdílí svůj genetický materiál (Abdallah et al., 2014; Watnick a Kolter, 2000).



Obrázek 9 – Stádia tvorby bakteriálního biofilmu (Zhang et al., 2020).

Vývoj biofilmu začíná pravděpodobně vznikem pelikuly, což je vrstva iontů (Na^+ , K^+) a molekul biologického původu (albumin, glykoproteiny, další makromolekuly), které usnadňují vazbu bakterií na povrch. Pelikuly vznikají v prostředí bohatém na organické látky během několika minut, v chudších prostředích vznikají v řádu několika hodin. Po tvorbě pelikul dochází k fázi adheze (Costerton et al., 1995). Bakteriální buňky mohou adherovat na různé typy povrchů nebo koadherovat mezi sebou (Abdallah et al., 2014). Nejprve se uplatňují povrchové struktury bakterií (bičičky, pili, liposacharidy a různé proteiny). Adheze je ovlivněna i prostřednictvím fyzikálních faktorů (Davey a O'Toole, 2000). Z počátku je adheze bakterií reverzibilní, bakteriální buňky tak mohou osídlený povrch opustit a vrátit se zpět do planktonní formy (Maier et al., 2009).

Biofilmové struktury mohou být tvořeny na abiotických i biotických površích. Vlastnosti některých povrchů dokonce usnadňují mikrobiální adhezi. Adheze k hydrofobním a nepolárním povrchům je obvykle vyšší ve srovnání s hydrofilními povrchy. Kolonizaci

povrchu ovlivňuje také jeho struktura, drsné povrchy jsou kolonizovány častěji než hladké povrchy (Paluch et al., 2020). Po proběhlé adhezi produkují bakterie polysacharidy, primárně exopolysacharidy a exopolymery, které tvoří základní stavební složky biofilmu (Ahimou et al., 2007; Davey a O'Toole, 2000). Během několika hodin (popř. i dní) vzniká trojrozměrná struktura biofilmu tvořená bakteriemi, exopolysacharidy a kanálky, které tvoří oběhový systém pro přísun živin i odvod metabolitů. Výsledná struktura biofilmu závisí na vlastnostech prostředí, dostupnosti živin, kyslíku ale i na buňkách mikroorganismů. V prostředí s vysokým obsahem živin jsou biofilmy mnohem kompaktnější a silnější (Ahimou et al., 2007). Po dosažení určité buněčné denzity se z vytvořeného biofilmu začínají oddělovat jednotlivé buňky nebo i celé části biofilmu, které mohou kolonizovat další povrchy (Watnick a Kolter, 2000). Takto vzniká v biofilmu dynamická rovnováha, která je regulována množstvím živin, podmínkami vnějšího prostředí a především komunikačním systémem *quorum sensing* (Davies et al., 1998).

2.3.2 *Quorum sensing*

Tvorbu bakteriálního biofilmu u některých patogenních a oportunisticky patogenních bakterií řídí komunikační systém *quorum sensing* (Paluch et al., 2020). *Quorum sensing* (*QS*) vychází z předpokladu, že bakteriální buňky musí dosáhnout určité minimální populace, aby mezi nimi došlo k zahájení komunikace (Shrout a Nerenberg, 2012). Doslova jde o vnímání množství bakterií v biofilmu, které bakteriím umožňuje reagovat a ovlivňovat život v populaci biofilmu a adaptovat se tak na nepříznivé životní podmínky (Duan a Surette, 2007).

Systém *QS* je založen na produkci a uvolňování extracelulárních chemických signalizačních molekul (autoinduktorů). Tyto signální molekuly interagují po dosažení příslušné prahové koncentrace s receptorovým proteinem, což vede ke změnám v expresi specifických genů. Stoupne-li množství bakteriálních buněk v biofilmu, úměrně stoupne i koncentrace autoinduktorů. Mnoho bakterií se může přizpůsobit nepříznivému prostředí regulováním genů zodpovědných za tvorbu biofilmu, virulenčními faktory nebo přenosem genetického materiálu v procesu transformace nebo konjugace (Vasudevan, 2014).

Autoinduktory Gram-negativních bakterií jsou homoserinové laktony. Tyto molekuly dokáží vyvolat specifické reakce hostitelských organismů. *QS* systém u *Pseudomonas aeruginosa* kontroluje tvorbu biofilmu a expresi mnoha faktorů virulence (např. produkce elastázy, proteázy, alkalické fosfatázy a exotoxinu A). U bakterie *Vibrio fischeri* je systém *QS* zodpovědný za kódování luciferázy. Autoinduktory Gram-pozitivních bakterií jsou krátké oligopeptidy. Příkladem Gram-pozitivní bakterie využívající *QS* systém k produkci exotoxinů

či tvorbě biofilmu je *Staphylococcus aureus*. Slibnou strategií v boji s biofilmy by mohla být možnost ovlivnění *QS* systému (Paluch et al., 2020).

2.3.3 Statické metody detekce biofilmu

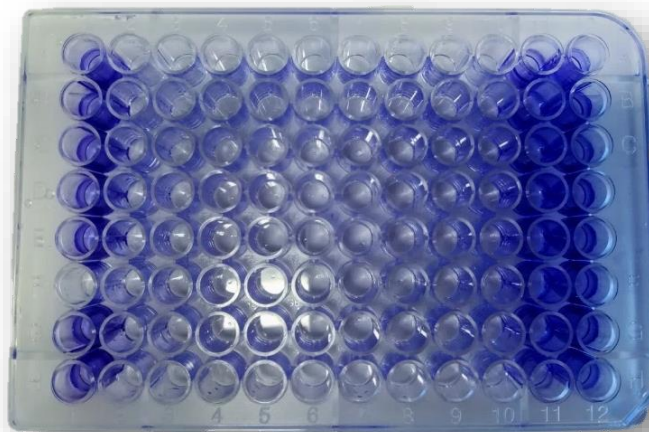
Fenotypové metody mohou na základě kultivačních technik prokázat růst biofilm-pozitivních bakterií nebo pomocí kolorimetrické metody detekovat vzniklou vrstvu biofilmu.

Vizuální detekce

Prvně byla ke kvantifikaci bakteriálního biofilmu využita zkumavková metoda. Ve zkumavce probíhá kultivace ve zvoleném médiu a vzniklá biofilmová vrstva je následně obarvena. Tato metoda je časově náročná a obtížně standardizovatelná, jelikož se publikované studie liší v nastavených podmínkách experimentů (Crémet et al., 2013). Zkumavky jsou barveny nejčastěji krystalovou violetí, safraninem, karbolfuchsinem nebo trypanovou modří. Zlatým standardem detekce tvorby biofilmu je metoda barvení krystalovou violetí. Obarvená vrstva ve zkumavce značí biofilm-pozitivní kmeny (Christensen et al., 1985).

Spektrofotometrická detekce

Využívanější obdobu zkumavkové metody je metoda testování biofilmu v mikrotitrační destičce (Christensen et al., 1985; Stepanovic et al., 2007). Tato metoda je založena na kultivaci mikroorganismu v jamkách mikrotitrační destičky. Po proběhlé inkubaci a specifickém barvení bakteriálního biofilmu v mikrotitrační destičce je využívána spektrofotometrická detekce, jež je vhodná k přesnému hodnocení biofilmové tvorby (Obrázek 10). Výsledkem je hodnota absorbance, která se porovnává s tzv. *cut off value* (absorbance negativní kontroly). Kmeny, jejichž absorbance je vyšší než *cut off value*, jsou považovány za biofilm-pozitivní a kmeny, jejichž absorbance je nižší než *cut off value*, se považují za biofilm-negativní (Knobloch et al., 2002).



Obrázek 10 – Obarvený bakteriální biofilm v mikrotitrační destičce připravený pro spektrofotometrické vyhodnocení (foto autor).

Kultivace na agaru s kongočervení

Z kultivačních metod lze zvolit kultivaci na agaru s kongočervení. Tato metoda umožňuje selektivní rozpoznávání biofilm-pozitivních kmenů, které vyrůstají na tomto agaru v černých koloniích a biofilm-negativních kmenů, jenž vyrůstají v červených koloniích. Avšak nevýhodou je velice výrazná subjektivita hodnocení, z toho důvodu se kultivace na agaru s kongočervení využívá převážně k orientačnímu hodnocení biofilm-pozitivity. Stanovení biofilm-pozitivity či biofilm-negativity daného kmene by proto mělo být doplněno dalším testováním (Freeman et al., 1989).

2.3.4 Dynamické metody detekce biofilmů

Dynamické systémy věrohodněji simulují podmínky *in vivo*. Mezi tři standardizované metody pro studium biofilmu patří otočný diskový reaktor, CDC biofilmový reaktor a Drip flow reactor.

CDC biofilmový reaktor

CDC biofilmový reaktor je komerčně dostupné zařízení, které slouží k pozorování biofilmové tvorby a následnému studiu biofilmů. Systém je složený ze skleněného reaktoru (Obrázek 11), do kterého je umístěno víčko s držáky kuponů. Lze využívat celou řadu materiálů vhodných pro tvorbu biofilmu. K reaktoru je také připojeno kultivační médium, upravené dle nastaveného experimentu, jehož tok je zajištěn peristaltickou pumpou. Pro následnou kvantifikaci biofilmu se využívá ultrazvukování nebo mechanické očištění kuponů (Chavant et al., 2007; Lebeaux et al., 2013).

Drip flow reactor

Drip flow reactor se skládá ze čtyř nebo šesti paralelních testovacích kanálů (Obrázek 11), z nichž každý je schopen pojmout jeden kupon, mikroskopické sklíčko nebo např. stent. Hadička přivádí čerstvé kultivační médium přímo do komůrek. Průtok média je regulován pumpou tak, aby docházelo pouze k prokapávání čerstvého média do komůrek. Tento reaktor je využíván zejména pro studium kontaminace zdravotnického materiálu a lékařských přístrojů (Chavant et al., 2007; Lebeaux et al., 2013).

Rotační diskový reaktor

Rotační diskový biofilmový reaktor se skládá z teflonového a kaučukového kotouče, který obsahuje šest odnímatelných kuponů. Vyjímatelné kupony jsou vyrobeny z různých materiálů. Spodní část rotujícího disku obsahuje tyčový magnet, který umožňuje rotaci disku

a rovnoměrné proudění média (Obrázek 11). Po ukončené době inkubace se vyjme rotační disk a za pomoci pinzety se odstraní kupony, které následně slouží pro další studium biofilmu (Chavant et al., 2007; Lebeaux et al., 2013).



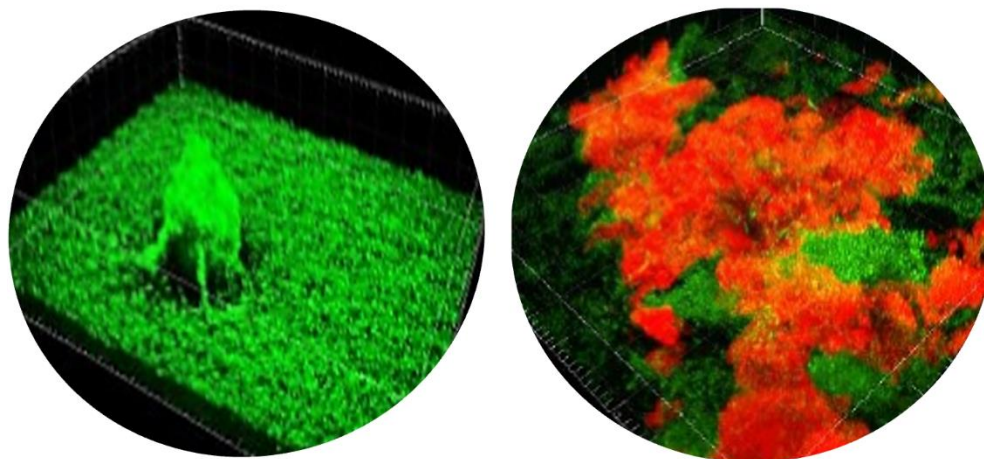
Obrázek 11 – Dynamické metody využívané pro tvorbu biofilmu. Zleva – CDC biofilmový reaktor, Drip flow reactor a rotační diskový reaktor (dostupné z: <https://biofilms.biz/>).

2.3.5 Mikroskopické metody

Mikroskopické techniky patří k velice využívaným metodám zobrazení a detekce biofilmových struktur. Využit lze např. světelnou mikroskopii, konfokální laserovou skenovací mikroskopii, elektronovou mikroskopii, mikroskopii atomárních sil (AFM) a mnohé další. Ve spojení se specifickými barvivy či molekulárními sondami lze identifikovat i vícedruhové biofilmy.

Konfokální laserová skenovací mikroskopie

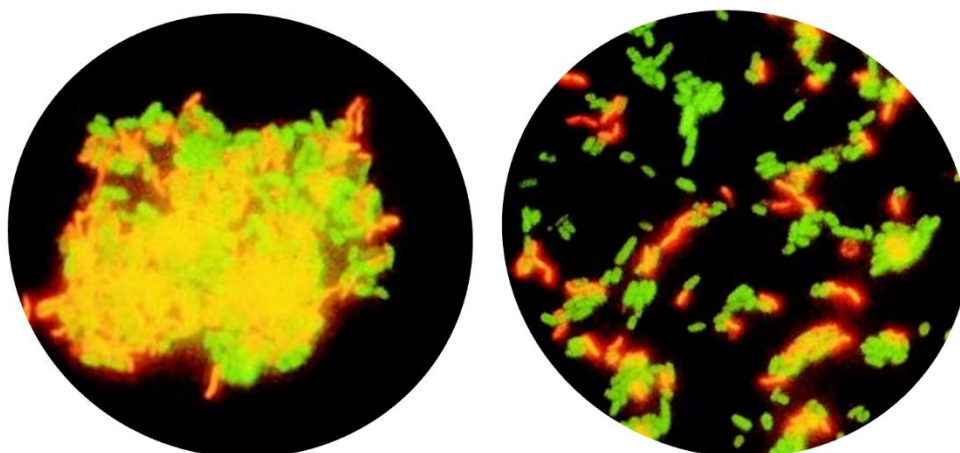
Tato mikroskopovací metoda umožňuje nedestruktivní zobrazení biofilmové struktury. Můžeme zachytit zřetelný obraz uspořádání biofilmu, bakteriálních buněk i okolní matrix. Díky optickým řezům je CLSM schopna vyobrazit struktury ukryté pod povrchem biofilmu, následným složením optických řezů získáme 3D strukturu bakteriálního biofilmu (Cattò a Cappitelli, 2019), jak je uvedeno na Obrázku 12.



Obrázek 12 – 3D vizualizace obarveného biofilmu pomocí CSLM. Vlevo je snímek biofilmu *P. aeruginosa*, vpravo obarvené vstvy biofilmu *E. coli* (Cattò a Cappitelli, 2019).

Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopii lze využít při studiu prostorového uspořádání jednotlivých složek biofilmu. K zobrazení biofilmu pomocí fluorescenční mikroskopie lze použít barviva vhodná k označení bakteriálních buněk, např. DAPI, SYTO-9, SYBR-Green, Hoechst nebo akridinovou oranž. Akridinová oranž se využívá pro vizualizaci bakteriální populace uvnitř biofilmu, oranžově jsou obarveny buňky rychle rostoucí a zelenou barvu mají buňky stagnující v růstu. Další alternativou zobrazení biofilmu je použití specifických fluorescenčních sond (Obrázek 13), které umožňují identifikaci jednotlivých mikroorganismů. Mikroorganismy v biofilmu lze lokalizovat také pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Velmi častá je také genetická modifikace mikroorganismů, zacílená na expresi zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) (Shashkova a Leake, 2017).



Obrázek 13 – Detekce *Arcobacter*-like species a vytvořeného biofilmu pomocí fluorescenčních sond ARC⁹⁴-TRITC a EUB³³⁸-FLUOS. Vlevo je snímek vytvořeného biofilmu, vpravo planktonní buňky tvořící biofilm (Moreno et al., 2003).

2.3.6 Další metody detekce biofilmu

Vedle výše popsaných metod jsou využívány i molekulární techniky, které se zaměřují na sledování genů zodpovědných za tvorbu biofilmu. Geny spojené s tvorbou biofilmu lze prokázat pomocí metody PCR, avšak přítomnost genu nevyovídá o genové expresi a o tom, zda bude daný kmen tvořit biofilm. Samotná tvorba biofilmu je komplikovaná, na procesu tvorby se totiž podílí mnoho genů. Např. geny kódující syntézu povrchových proteinů nebo polysacharidového mezibuněčného adhesinu. Metody průkazu genů zodpovědných za tvorbu biofilmu mají velký potenciál využití (Arciola et al., 2002). Pro studium biofilmu, složení extracelulární matrix, proteinů a dalších molekul v biofilmu lze využít MALDI-TOF/MS. Při studiu biofilmu se MALDI-TOF/MS využívá zejména ke znalostem o složení extracelulární substance nebo při studiu syntézy bílkovin v biofilmových i planktonních buňkách (Hefford et al., 2005).

2.3.7 Prevence vzniku biofilmu a možnosti jeho degradace

Ve zdravotnictví či potravinářském průmyslu představuje biofilm vážný problém, neboť účinek běžných antimikrobiálních prostředků často selhává. Eliminace bakteriálního biofilmu spočívá především v jeho mechanickém odstranění s následnou antibiotickou léčbou, což způsobuje komplikace především pro pacienty. Pro účinnou eliminaci bakteriálních biofilmů je nezbytná kombinace antibiofilmových sloučenin s účinnými antibiotiky (Vasudevan, 2014). Poměrně účinná je synergická aplikace antibiotik, avšak dávky antibiotik, po kterých již nedochází k obnově biofilmové matrice, jsou pro podání *in vivo* příliš vysoké (Martelli et al., 2018; Thenmozhi et al., 2009). Antimikrobiální látky, které jsou schopny narušovat biofilmové struktury jsou cílem řady výzkumů. Taktéž povrchově aktivní látky snižují proces kolonizace abiotických i biotických povrchů. Velké efektivity dosahují nanomateriály s modifikovaným antimikrobiálním povrchem, který znemožňuje bakteriální adhezi. Např. kolonizace povrchů nepatogenními bakteriemi by mohla zabránit adhezi patogenních bakterií či usnadnit odstranění vytvořených biofilmů. Jelikož bakteriální biofilmy obsahují smíšenou populaci mikroorganismů, je velice obtížné nalézt účinnou antimikrobiální látku. Lze konstatovat, že budoucnost biofilmových onemocnění a jejich následné léčby je nejistá. Neexistují ideální řešení vhodná pro eradikaci biofilmu, avšak vhodná řešení by mohly přinést multidisciplinární přístupy (Sandasi et al., 2010; Vasudevan, 2014).

3 CÍLE PRÁCE

Cílem výzkumu v rámci této disertační práce bylo prohloubení znalostí o bakteriích *Arcobacter*-like species. Jedná se o bakterie popsané již před relativně dlouhou dobou, avšak mnohé jejich vlastnosti nebyly dosud popsány. Zaměření celé studie lze rozdělit do následujících tematických oddílů:

- 1) Tvorba biofilmů *Arcobacter*-like species za různých experimentálních podmínek a na různých materiálových površích.
- 2) Hodnocení antimikrobiálního účinku vybraných antibiotik na planktonní buňky, ale také jejich vliv na tvorbu bakteriálního biofilmu.
- 3) Hodnocení biologického účinku hydrosolů získaných destilací přírodních matric, a to na planktonní buňky i tvorbu biofilmu. Chemická analýza připravených hydrosolů.
- 4) Hodnocení biologického účinku extraktů z olivových olejů, a to na planktonní buňky i tvorbu biofilmu. Chemická analýza připravených olejových extraktů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Laboratorní vybavení

Analytické váhy	Kern, Německo
Aparatura pro destilaci vodní parou	
Aparatura pro hydrodestilaci	
Autokláv Systec VX-40	Systec, Německo
Autosampler pal-Combi	CTC Analytics AG, Švýcarsko
BACMED 6iG2	Aspiag, Česká republika
Běžné plastové, skleněné a kovové laboratorní potřeby	
Biologický termostat	MMM-Group, Kanada
Biologický termostat ST 3 COMF/S	POL-EKO, Polsko
Centrifuga Z 300 K	Hermle, Německo
Dispenzor ST6090	Oxoid, Velká Británie
GC 2010-FID a autosampler AOC-20i	Shimadzu, Japonsko
GC 2010-GCMS-QP2010 Plus	Shimadzu, Japonsko
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT	BMT, Česká republika
Injekční membránový nylonový filtr	Labicom, Česká republika
Chladnička RK 6201 BW	Gorenje, Slovinsko
Chladnička ZRA 40100 WA	Zanussi, Česká republika
Kapilární kolona Supelco	Supelco, Spojené státy americké
LC-CoulArray (celý systém)	ESA, Spojené státy americké
McFarland denzitometr	Biosan, Spojené státy americké
Mikropipety automatické	Discovery, Německo
Mikropipety automatické	Eppendorf, Německo
Mikrotitrační destičky s plochým dnem	PE SPL Life Sciences Co., Korea
Odplyňovač Vacuum Degasser DG 3014	ECOM, Česká republika
pH-metr Schott CG 842	Schott, Německo
Spektrofotometr Genesys 50 UV-VIS	Sigma-Aldrich, Spojené státy americké
Sterilizátor parní Sterilab 25 l	BMT, Česká republika
Sterilizátor parní Sterimat Plus 25 l	BMT, Česká republika

Tecan Infinite® M200 PRO	Tecan, Švýcarsko
Topné hnízdo LTHS 2000	Thermo Fisher Scientific, Česká republika
Třepačka a vortex IKA MS 3 Digital	IKA, Spojené státy americké
Třepačka Vornado vortex	Benchmark, Spojené státy americké
Zařízení pro demineralizovanou vodu Millipore	Millipore, Spojené státy americké

4.2 Použité chemikálie

Acetonitril, p.a.	Merck, Německo
Ethanol, 96 %	Lach:Ner, Česká republika
Ethanol, p.a. nedenaturovaný	Merck, Německo
KCl, p.a.	PENTA, Česká republika
KH ₂ PO ₄ , p.a.	PENTA, Česká republika
Krystalová violet'	Sigma Aldrich, Spojené státy americké
Kyselina mravenčí, 98–100%	Lach:Ner, Česká republika
Methanol, p.a.	Merck, Německo
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, p.a.	PENTA, Česká republika
NaCl, p.a.	PENTA, Česká republika
Octan amonný, 99%	Honeywell Fluka, Švýcarsko
Octan sodný, p.a.	Lach:Ner, Česká republika
Oxalát amonný, p.a.	PENTA, Česká republika
Redestilovaná voda	Univerzita Pardubice, Česká republika

4.3 Použitá média

- TSA (Trypton Soya Agar) – HiMedia, Indie

Složení:

enzymatický hydolyzát 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

Pro přípravu TSA půdy byla navážena prášková směs v poměru 40 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklá živná půda byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 min a po ochlazení na cca 50 °C rozlita do Petriho misek.

- **M-H agar** (Müeller-Hinton agar) – HiMedia, Indie

Složení:

hovězí srdcová infuze	2 g/l,
kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l,
škrob	1,5 g/l,
agar	17 g/l.

pH (25 °C) = 7,3 ± 0,1

Pro přípravu M-H půdy byla navážena prášková směs v poměru 38 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklá živná půda byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 min a po ochlazení na cca 50 °C rozlita do Petriho misek.

- **M–H bujón II.** (Müeller-Hinton broth II.) – Sigma Aldrich, Spojené státy americké

Složení:

kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l,
hovězí extrakt	3 g/l,
škrob	1,5 g/l.

pH (25 °C) = 7,3 ± 0,1

Pro přípravu M-H bujónu II byla navážena prášková směs v poměru 22 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklá živná půda byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 min. Následně byl bujón obohacen o 5 % fetálního bovinního séra.

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

Složení:

telecí mozková infuze	12,5 g/l,
hovězí srdcová infuze	5 g/l,
proteasový pepton	10 g/l,
chlorid sodný	5 g/l,
hydrogenfosforečnan disodný	2,5 g/l,
glukosa	2 g/l.

pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

Pro přípravu BHI bujónu byla navážena prášková směs v poměru 37 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklé živné médium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 min.

- **Fyziologický roztok**

Pro přípravu fyziologického roztoku byl navážen chlorid sodný v poměru 8,5 g na 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 min.

- **Sabouraud dextrosový agar – HiMedia, Indie**

Složení:

glukosa	40 g/l,
cykloheximid	0,40 g/l,
směs peptonů	10 g/l,
chloramfenikol	0,05 g/l,
agar	15 g/l.

pH (25 °C) = 5,6 ± 0,2

Pro přípravu bylo naváženo 65,5 g média a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Vzniklé živné médium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 min.

- **Krystalová violet'**

Pro přípravu krystalové violeti bylo naváženo 2,5 g práškové krystalové violeti, která byla rozpuštěna ve 100 ml ethanolu, a takto připravený roztok se smísil se 400 ml 1% oxalátu amonného.

- **PBS pufr (Phosphate Buffer Saline)**

Složení:

NaCl	8 g,
KCl	0,2 g,
KH ₂ PO ₄	0,2 g,
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,9 g.

Jednotlivé složky byly naváženy dle návodu a rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

4.4 Experimentální metodiky

4.4.1 Použité mikrobiální kmeny a příprava buněčné suspenze

V rámci experimentů disertační práce bylo k testování využito celkem 64 *Arcobacter*-like species, 10 kmenů rodu *Campylobacter* a 5 dalších mikrobiálních kmenů (Tabulka 1 a 2). Jednotlivé kmeny pocházely ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (kmeny označené CCUG), ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii (kmeny označené LMG), z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (kmeny označené CCM), interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (kmeny označené UPa), z Nemocnice Pardubického kraje a.s. – Pardubická nemocnice (kmeny označené NP), z Nemocnice Pardubického kraje a.s. – Svitavská nemocnice (kmeny označené NS) a z Oblastní nemocnice Náchod, a.s. (kmeny značené ONN).

Tabulka 1 – Přehled *Arcobacter*-like species použitých v rámci studie.

Kmeny <i>Arcobacter</i> -like species		
<i>Al. butzleri</i> CCUG 30848	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/10 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> CCM 3934
<i>Al. butzleri</i> LMG 10828	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/11 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> CCM 7050
<i>Al. butzleri</i> UPa 2012/3 ^A	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/12 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2012/1 ^A
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/3 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/13 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/1 ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/6	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/14 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/12 ^A
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/9	<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/3 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/13 ^A
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/10 ^A	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/15 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/14 ^A
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/15 ^A	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/16 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/16 ^A
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/30 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/18 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/17 ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/31 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/19 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/28 ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/32 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/20 ^C	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/35 ^A
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/33 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/25 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/58 ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/36 ^A	<i>Al. butzleri</i> UPa 24A ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/58A ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/36 ^A	<i>Al. butzleri</i> UPa 30B ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/58D ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/37 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 39-3 ^C	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/59 ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2014/51 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 49B ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 130 ^B
<i>Al. butzleri</i> UPa 2014/54 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 65A ^B	<i>Pd. defluvii</i> LMG 29654
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/1 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 132A ^B	<i>Al. lanthieri</i> LMG 28517
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/5 ^A	<i>Al. butzleri</i> UPa 138A ^B	<i>Al. skirrowii</i> LMG 6621
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/6 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa 141B ^B	<i>Al. thereius</i> LMG 24488
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/7 ^B	<i>Al. butzleri</i> UPa KK ^B	
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/9 ^B	<i>Al. cryaerophilus</i> CCM 3933	

Legenda: *Al.* – *Aliarcobacter*; *Pd.* – *Pseudoarcobacter*; ^A kmeny izolované z vody; ^B kmeny izolované z potravin; ^C klinické izoláty; UPa – kmeny z interní sbírky Univerzity Pardubice; CCUG – kmeny získané ze sbírky University Göteborg, LMG – kmeny získané z belgické sbírky Co-ordinated Collections of Microorganisms, CCM – kmeny z české sbírky mikroorganismů Czech Collection of Microorganisms.

Tabulka 2 – Přehled kmenů kampylobakterů a dalších kmenů použitých v rámci studie.

Kmeny rodu <i>Campylobacter</i>	Ostatní mikroorganismy
<i>C. jejuni</i> CCM 6214	<i>S. aureus</i> CCM 4232
<i>C. jejuni</i> NP 2896 ^C	<i>E. faecalis</i> CCM 4224
<i>C. jejuni</i> NS 3668 ^C	<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955
<i>C. jejuni</i> NS 3800 ^C	<i>E. coli</i> CCM 3954
<i>C. jejuni</i> NS 4088 ^C	<i>C. albicans</i> CCM 8186
<i>C. jejuni</i> NS 4091 ^C	
<i>C. coli</i> NP 2395 ^C	
<i>C. coli</i> NS 3803 ^C	
<i>C. coli</i> NS 4062 ^C	
<i>Campylobacter</i> sp. ONN 366 ^C	

Legenda: *C.* – *Campylobacter*; *S. aureus* – *Staphylococcus aureus*; *E. faecalis* – *Enterococcus faecalis*; *P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*; *E. coli* – *Escherichia coli*; *C. albicans* – *Candida albicans*; ^C klinické izoláty; CCM – kmeny z české sbírky mikroorganismů Czech Collection of Microorganisms; NP – kmeny z Pardubické nemocnice; NS – kmeny ze Svitavské nemocnice; ONN – kmeny z Oblastní nemocnice Náchod.

Před každým testováním byly kmeny přepasážovány na TSA agar. Kultivace *Arcobacter*-like species probíhala při 30 °C po dobu 48–72 hod. Kultivace kampylobakterů probíhala při 42 °C po dobu 48–72 hod. Kultivace *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* probíhala při 37 °C po dobu 24 hod. a v případě *C. albicans* kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 hod.

Pro dílčí experimenty byla připravena buněčná suspenze o buněčné denzitě odpovídající 1,5–3×10⁸ CFU/ml. Buněčná denzita byla vždy upravena naředěním na požadovanou koncentraci pro dané experimentální účely.

4.4.2 Sledování tvorby biofilmu na skleněném povrchu

Tvorba biofilmu byla monitorována ve zkumavkách z borosilikátového skla, do kterých byl pipetován BHI bujón (2 ml) a buněčná suspenze (100 µl). Po inkubaci za specifických podmínek *Arcobacter*-like species při teplotě 30 °C a pro *Campylobacter* spp. při teplotě 42 °C po dobu 24 hod., resp. 72 hod. za aerobní či mikroaerofilní atmosféry byla sledována tvorba biofilmu. Po kultivaci byl obsah zkumavek vylit do odpadu a zkumavky byly promyty sterilní destilovanou vodou a vysušeny při 37 °C. Následně byla vnitřní strana skleněných zkumavek barvena 1% krystalovou violetí po dobu 15 min. Poté byly zkumavky znovu promyty destilovanou vodou a zcela vysušeny při 37 °C. Hodnocení tvorby biofilmu bylo provedeno vizuálně, a to porovnáním se slabě adherentním kmenem *E. coli* CCM 3954 a silně adherentním kmenem *S. aureus* CCM 4224. Všechny experimenty byly opakovány alespoň třikrát. Kmeny netvořící biofilm byly označeny (N), kmeny tvořící biofilm byly kategorizovány jako slabě adherentní (W), středně adherentní (M) a silně adherentní (S).

4.4.3 Sledování tvorby biofilmu na plastovém povrchu

Pro stanovení biofilmu na plastovém povrchu byly využity 96-jamkové mikrotitrační polystyrénové destičky s plochým dnem (PE SPL Life Sciences Co., Korea), do kterých byl pipetován BHI bujón (90 μ l) a buněčná suspenze (10 μ l) o denzitě odpovídající $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. *Arcobacter*-like species byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24 hod. nebo 72 hod. v aerobním či mikroaerofilním prostředí. Bakterie rodu *Campylobacter* byly kultivovány při teplotě 42 °C po dobu 24 hod. nebo 72 hod., a to opět buď v aerobním či mikroaerofilním prostředí. Mikrotitrační destička byla spektrofotometricky proměřena při vlnové délce 595 nm před inkubací i po proběhlé inkubaci. Následně byl obsah celé destičky vytřepán do odpadu, destička byla opatrně promyta destilovanou vodou a vysušena při 37 °C. Po vysušení bylo do destičky pipetováno 100 μ l 2 % octanu sodného (15 min), který sloužil k fixaci vytvořeného biofilmu. Obsah destičky byl vytřepán do odpadu, a takto upravená destička byla 15 min barvena 1% krystalovou violetí (100 μ l). Obarvená destička byla promyta destilovanou vodou a vysušena při 37 °C. Vytvořený komplex biofilm-krystalová violet' byl solubilizován 96% ethanolem (200 μ l), následně byla měřena absorbance v nové destičce při vlnové délce 595 nm. Kmeny *Arcobacter*-like species byly kategorizovány podle klasifikačního systému jako kmeny neadherentní (N; $OD \leq OD_C$), slabě adherentní (W; $OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$), středně adherentní (M; $2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$) a silně adherentní (S; $4 \times OD_C < OD$), kde hodnota OD_C (cut-off OD) je definována jako trojnásobek směrodatné odchylky nad průměrem OD negativní kontroly (hodnota slepého pokusu). Naměřené a vypočítané hodnoty OD/OD_C (0,111/0,120) byly pro všechna měření stejné.

4.4.4 Vliv antibiotik na přežívání *Arcobacter*-like species

4.4.4.1 Stanovení minimální inhibiční (baktericidní) koncentrace

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) byly stanoveny mikrodiluční metodou v 96-jamkových mikrotitračních polystyrenových destičkách s plochým dnem. Ze zásobních roztoků ATB byly připraveny koncentrační řady antibiotik (0,03–256 mg/l) v Mueller-Hintonově bujónu II (MH-II, Merck, Německo). Každá jamka (celkový objem 100 μ l) byla naočkována buněčnou suspenzí, konečná buněčná denzita odpovídala $1,5 \times 10^6$ CFU/ml. Z každé jamky bylo provedeno vyočkování na neselektivní médium TSA, a to po předchozí kultivaci po dobu 24 hod. při teplotě 30 °C za aerobních podmínek. Hodnota MIC byla hodnocena jako nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibovala viditelný růst mikroorganismů (99,9 %). Dále byly vyjádřeny také hodnoty MIC₅₀ a MIC₉₀ jako koncentrace, při kterých bylo viditelně inhibováno 50 %, resp. 90 % testovaných kmenů. Jako minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla označena nejnižší koncentrace antibiotik potřebná k usmrcení 99,9 % bakterií subkultivovaných na TSA médium. Každý experiment byl proveden alespoň čtyřikrát.

Protože neexistují mezinárodně přijatá kritéria pro testování citlivosti *Arcobacter*-like species k antibiotikům, byly kmeny klasifikovány na základě hraničních hodnot doporučených pro *Campylobacter coli* (erythromycin, ciprofloxacin a tetracyklin) a čeleď *Enterobacteriaceae* podle CLSI a EUCAST (Švarcová et al., 2022b).

4.4.4.2 Sledování tvorby biofilmu v přítomnosti antibiotik

Vliv antibiotik na tvorbu biofilmu byl sledován v 96-jamkových mikrotitračních polystyrenových destičkách s plochým dnem. Mikrotitrační destička obsahovala pozitivní kontrolu tvorby biofilmu (PK) a koncentrační řadu antibiotik, ke kterým byla přidána buněčná suspenze $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Stanovení tvorby biofilmu bylo provedeno identicky, viz kapitola 4.4.3. Pro experimentální práci bylo vybráno šest antibiotik od firmy Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké), konkrétně, ampicilin (AMP), ciprofloxacin (CIP), klindamycin (DA), erythromycin (E), gentamicin (GE) a tetracyklin (TE). Zásobní roztoky antibiotik byly připraveny v destilované vodě o koncentraci 1024 mg/l. Před použitím byly zásobní roztoky antibiotik skladovány dle návodu výrobce, a to při 2–8 °C, resp. -20 °C.

4.4.5 Biologická aktivita a chemické složení hydrosolů

Rostlinný materiál pro přípravu hydrosolů byl zakoupen od různých distributorů, okvětní lístky levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.) původem z Chorvatska (Mediate, Česká republika), listy vavřínu vznešeného (*Laurus nobilis* L.) původem z Brazílie (Kasia Vera, Česká republika), plody hřebíčkovce kořenného (*Syzygium aromaticum* L.) původem z Madagaskaru (Kasia Vera, Česká republika) a semínka fenyklu pravého (*Foeniculum vulgare* Mill.) pocházející z České republiky (Kasia Vera, Česká republika). Hydrosoly těchto matric byly získány pomocí hydrodestilace a destilace vodní parou. Příprava hydrosolů a jejich chemická analýza byla provedena ve spolupráci s Katedrou analytické chemie.

4.4.5.1 Příprava hydrosolů hydrodestilací

Hydrodestilace byla provedena v hydrodestilačním systému. Příslušné množství rostlinného materiálu bylo naváženo do destilační baňky společně s demineralizovanou vodou (1500 ml), voda byla dále doplňována podle potřeby a zahřívána společně s rostlinným materiálem topným hnízdem. Esenciální olej i hydrosol byly shromážděny v separátoru. Esenciální olej byl oddělen od vodné fáze a uskladněn. Destilace probíhala do té doby, dokud se destiloval esenciální olej. Čas destilace se pohyboval v rozmezí 220–310 min a objem hydrosolu se pohyboval v rozmezí 1,7–2 l, průměrná rychlost destilace byla 6,9 ml/min. Konečný testovaný vzorek hydrosolu vznikl smícháním hydrosolů ze tří destilačních běhů. Hydrosol získaný procesem hydrodestilace byl označen HD.

4.4.5.2 Příprava hydrosolů destilací vodní parou

Destilační baňka naplněná demineralizovanou vodou (1500 ml) byla zahřívána topným hnízdem (voda byla doplňována podle potřeby). Na destilační baňku byl připojen destilační nástavec opatřený sítkou, který obsahoval rostlinný vzorek. Vydestilované složky oleje s vodní parou odcházely do chladiče, kde byla směs ochlazena. Vzniklý destilát byl zachycen ve sběrném zařízení, které bylo opatřeno vývodem pro odtok hydrosolu. Získaný hydrosol byl vložen do tmavé baňky a skladován při teplotě 4 °C. Destilace probíhala do té doby, dokud se destiloval esenciální olej. Čas destilace se pohyboval v rozmezí 260–345 min a objem hydrosolu se pohyboval v rozmezí 1,7–2 l, rychlost destilace se pohybovala v rozmezí 5,3–6,7 ml/min. Finální vzorek hydrosolu byl získán smícháním hydrosolů ze tří destilačních běhů. Hydrosol získaný procesem parní destilace byl označen písmeny SD.

Získané hydrosoly (SD i HD) byly dále koncentrovány na kolonce Separon SGX C18 (modifikovaný oktadecylsilikagel, 60 μm , 0,5 g) pomocí 96% ethanolu. Sorbent v koloně byl nejprve aktivován methanolem (5 ml) a nakonec byl promyt sterilní destilovanou vodou (10 ml). Vzorek hydrosolu (100 ml) byl protlačen přes kolonku a následně pomocí ethanolu (2 ml) proběhla eluce zakonzentrovaného hydrosolu z kolonky. Takto byly získány 50 \times koncentrované hydrosoly H_{SD_SPE} a H_{HD_SPE} .

4.4.5.3 Chemická analýza hydrosolů pomocí GC-MS

Analýza získaných hydrosolů byla provedena pomocí plynového chromatografu GC 2010, ve spojení s GC-MS-QP2010 Plus hmotnostně selektivním detektorem (oba Shimadzu, Japonsko) a Combi Pal Autosamplerem (CTC Analytics, Švýcarsko). Chromatograf byl vybaven kapilární kolonou SLB-5ms (30 m \times 0,25 mm, tloušťka fólie 2,5 μm ; Supelco, Spojené státy americké). Helium 5.0 (Linde, Česká republika) bylo použito jako nosný plyn při konstantním průtoku 30 cm/s. Teplotní program byl nastaven na 40 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 min, poté byl termostat vyhříván na teplotu 250 $^{\circ}\text{C}$ s rychlostí 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a finální teplota byla udržována po dobu 10 min. Teplota nástřiku a převodníku do detektoru byla nastavena na 200 $^{\circ}\text{C}$. Dávován byl 1 μl hydrosolu v dělicím poměru 1:50. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu elektronové ionizace, ionizační energie byla 70 eV a byly měřeny ionty v rozsahu m/z 33–500. Identifikace složek esenciálního oleje byla provedena pomocí hmotnostních spekter, které byly porovnávány s knihovnou spekter Národního institutu pro standardy a technologii (NIST '14 Mass Spectral Library) a knihovnou FFNSC (Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds GCMS library), verifikace byla provedena na základě porovnání retenčních indexů (Adams, 2007; Linstrom a Mallard, 2001).

4.4.5.4 Chemická analýza hydrosolů pomocí GC-FID

Analýza získaných hydrosolů byla provedena pomocí plynového chromatografu GC 2010 ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem (Shimadzu, Japonsko) a autosamplerem Combi Pal (CTC Analytics, Švýcarsko). Chromatografické podmínky byly totožné jako u GC-MS analýz. Teplota nástřiku byla nastavena na 200 $^{\circ}\text{C}$ a teplota detektoru na 260 $^{\circ}\text{C}$. Dávovaný objem vzorku (1 μl) byl vsříknut v dělicím poměru 1:50. Identifikace složek byla provedena na základě vypočítaných retenčních indexů, pomocí retenčního indexu podle Van den Doola a Kratze a výsledků identifikace sloučenin z MS analýzy. Porovnávala se naměřená data retenčních časů složek vzorků, retenčních časů řady alkanů (C8–C40) a známých retenčních indexů podle van den Doola a Kratze. Procentuální zastoupení jednotlivých

sloučenin ve vzorcích bylo vypočteno z poměrů ploch příslušných píků a celkové plochy píků v chromatogramu.

4.4.5.5 Hodnocení antimikrobiálních vlastností hydrosolů

Pro testování antimikrobiálního potenciálu hydrosolů byla využita disková difúzní metoda, která patří mezi standardní metody sloužící ke stanovení citlivosti mikroorganismů k různým antimikrobiálním látkám. Buněčná suspenze o buněčné denzitě odpovídající $1,5\text{--}3\times 10^8$ CFU/ml byla pomocí stěrového tampónu nanášena na příslušné agarové médium. Poté byly za pomoci dispenzoru ST6090 (Oxoid, Velká Británie) nanášeny blankové disky impregnované 8 μ l testovaného hydrosolu (popř. ethanolu jako kontroly). Po proběhlé kultivaci (30–37 °C) byly odečteny inhibiční zóny pomocí automatického analyzátoru BACMED 6iG2 (Aspiag, Česká republika). Každý experiment byl proveden alespoň třikrát a zobrazené inhibiční zóny jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota vč. směrodatné odchylky.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) byly stanoveny mikrodiluční metodou v 96-jamkových mikrotitračních polystyrenových destičkách s plochým dnem. Ze zásobních roztoků hydrosolů byly připraveny koncentrační řady antibiotik (0,02–50 %) v M-H bujónu II. Každá jamka (celkový objem 100 μ l) byla naočkována buněčnou suspenzí, konečná buněčná denzita odpovídala $1,5\times 10^6$ CFU/ml. Po kultivaci po dobu 24 hod. při teplotě 30 °C za aerobních podmínek bylo provedeno vyočkování na M-H agar v případě *Arcobacter*-like species. Hodnota MIC byla hodnocena jako nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibovala viditelný růst mikroorganismů (99,9 %). Jako minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla označena nejnižší koncentrace antibiotik potřebná k usmrcení 99,9 % mikroorganismů subkultivovaných na M-H agar nebo Sabouraud dextrózový agar. Každý experiment byl proveden alespoň čtyřikrát.

4.4.5.6 Hodnocení tvorby biofilmu v přítomnosti hydrosolů

Vliv hydrosolů na tvorbu biofilmu byl sledován v 96-jamkových mikrotitračních polystyrenových destičkách s plochým dnem. Mikrotitrační destička obsahovala pozitivní kontrolu tvorby biofilmu (PK) a nekoncentrované a 50 \times zakoncentrované hydrosoly, ke kterým byla přidána buněčná suspenze $1,5\times 10^8$ CFU/ml. Stanovení tvorby biofilmu bylo provedeno identicky, viz kapitola 4.4.3.

4.4.6 Chemické složení a biologická aktivita olejových extraktů

4.4.6.1 Příprava olejových extraktů

Vzorky olivových olejů byly zakoupeny od distributorů v České republice. Detailní údaje o jednotlivých olejích jsou uvedeny v Tabulce 3. Olivové oleje byly skladovány ve tmě, při pokojové teplotě a byly zpracovány ihned po jejich otevření.

Vzorky olejových extraktů byly připraveny extrakcí s PBS pufrem (BEOO) a také s destilovanou vodou (WEOO), a to vždy smícháním vzorku oleje s extrakčním činidlem v poměru 1:1. Takto vzniklá emulze byla intenzivně extrahována na třepačce za účelem extrahování látky do vodné fáze. Následovala centrifugace (9000 rpm; centrifuga Z 300 K, Hermle, Německo) po dobu 5 min, po které byl shromážděn extrakt olivového oleje (WEOO a BEOO) sloužící jako matrice pro následné testování.

Tabulka 3 – Seznam vzorků olivových olejů s popisem jejich zeměpisného původu.

Olivový olej	Kategorizace	Distributor	Země původu
Ballester	Extra panenský olivový olej	Master Martini CE s.r.o., CZE	Španělsko
Kyosos	Extra panenský olivový olej	H. M. Weihs, Wiena, AUT	Řecko
Ondoliva	Extra panenský olivový olej a olivový olej	Urzante, S. L., ESP	Španělsko
Borges	Extra panenský olivový olej a rafinovaný olej	Borges Branded Foods, S.L.U., ESP	Španělsko
Ondoliva	Pokrutinový olej	Urzante, S. L., ESP	Španělsko

4.4.6.2 Chemická analýza olejových extraktů

Chemická analýza olejových extraktů byla provedena ve spolupráci s Katedrou analytické chemie. Před chromatografickou analýzou byly připravené extrakty zfiltrány přes injekční membránový nylonový filtr o průměru pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika). Demineralizovaná voda byla získána čištěním destilované vody v systému Millipore (Millipore, Spojené státy americké). Hydroxytyrosol ($\geq 90\%$), tyrosol ($\geq 95\%$) a oleuropein ($\geq 98\%$) byly zakoupeny od společnosti Merck (Merck, Německo).

HPLC-CoulArray a stanovení celkového obsahu polyfenolů

Systém HPLC s elektrochemickou detekcí obsahoval CoulArray detektor s 8 elektrochemickými celami typ 5600A (ESA, Spojené státy americké) s aplikačním softwarem CoulArray pro Windows (ESA, Spojené státy americké), vakuový odplyňovač Vacuum Degasser DG 3014 (ECOM, Česká republika), chromatografické pumpy typ LC-10AD, termostat pro kolonu, směšovač, tlumič pulzů a dávkovací ventil (10 μ l). Zvolena byla chromatografická kolona Gemini C₁₈ (150×3 mm, 3 μ m) (vše ESA, Spojené státy americké). Jako mobilní fáze A (MF A) byl vybrán 5 mM vodný roztok octanu amonného s kyselinou mravenčí (pH~3) a jako mobilní fáze B (MF B) acetonitril. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,4 ml/min s lineárním gradientem eluce (0 min, 0–30 min: 5–60 % MP B). Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Na jednotlivé kanály byly vloženy potenciály 200–900 mV. U standardních látek byly odečteny jejich odezvy při jednotlivých potenciálech a sestaveny závislosti ploch píků na vložných potenciálech, tedy hydrodynamické voltamogramy (viz Příloha 3).

Celkový obsah fenolů v extraktech byl stanoven pomocí metody s Folin–Ciocalteu činidlem. Externí kalibrace byla provedena s použitím kyseliny gallové v koncentračním rozsahu 0,1–50 mg/l. Do 1 ml extraktu byl přidán 1 ml 95% ethanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 5 min byl přidán 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Tato směs byla ponechána 60 min při laboratorní teplotě. Poté byla měřena absorbance směsi pomocí spektrofotometru Genesys 50 UV-VIS (Sigma-Aldrich, USA) při vlnové délce 765 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE). Všechna stanovení byla provedena čtyřikrát a výsledky jsou vyjádřeny jako průměr vč. směrodatné odchylky.

4.4.6.3 Sledování antimikrobiálních vlastností olejových extraktů

Pro testování antimikrobiálních účinků olejových extraktů byla připravena buněčná suspenze o denzitě 3×10^8 CFU/ml. Následným ředěním byla buněčná denzita upravena na požadovanou koncentraci 3×10^6 CFU/ml. Ve zkumavce bylo smícháno 900 μ l WEOO, popř. BEOO a 100 μ l bakteriální suspenze (3×10^6 CFU/ml). Z každé zkumavky bylo provedeno vyočkování na M-H agar, a to po různých časových expozicích (0 min, 5 min, 10 min, 30 min a 60 min) při laboratorní teplotě. Kultivace probíhala po dobu 24 hod. při teplotě 30 °C za aerobních podmínek. Některé bakteriální kmeny přeživaly vybrané časové expozice, proto byly časové expozice doplněny (3 a 6 hod.) a kultivační doba prodloužena 48–72 hod. při teplotě 30 °C za aerobních podmínek. Testování bylo provedeno vždy v dubletu a celkově byl experiment nezávisle opakován dvakrát.

4.4.6.4 Sledování tvorby biofilmu v přítomnosti olejových extraktů

Vliv olejových extraktů na tvorbu biofilmu byl sledován v 96-jamkových mikrotitračních polystyrenových destičkách s plochým dnem. Mikrotitrační destička obsahovala pozitivní kontrolu tvorby biofilmu (PK) a koncentrační řadu olejových extraktů (0,088–90 %), ke kterým byla přidána buněčná suspenze $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Stanovení tvorby biofilmu bylo provedeno identicky, viz kapitola 4.4.3.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Zvýšená odolnost bakterií vůči antimikrobiálním látkám je celosvětově velmi znepokojivá, proto je důležité sledovat antimikrobiální rezistenci mikroorganismů (Quave et al., 2008). Přírodní extrakty mají vysoký obsah potenciálně antimikrobiálních sloučenin, s možností ovlivnění tvorby biofilmu. Proto jsou mechanismy vedoucí ke snížení tvorby biofilmu široce studovány (Quave et al., 2008; Rasmussen a Givskov, 2006).

Experimentální část disertační práce je zaměřena na zkoumání antimikrobiálních a antibiofilmových účinků vybraných antimikrobiálních látek vůči *Arcobacter*-like species a dalším kmenům. Mezi experimentálně testované látky byla zařazena antibiotika a také vybrané přírodní matrice (hydrosoly a olejové extrakty).

5.1 Tvorba biofilmu *Arcobacter*-like species na plastovém (polystyrenovém) povrchu

Výsledné hodnoty tvorby biofilmu ukazují, že se kmeny mezi sebou významně liší (Tabulky 4–6). Biofilmová tvorba kmenů byla ovlivněna např. kultivační atmosférou u 31 (52,5 %) *Arcobacter*-like species. Z tohoto počtu vykazovalo 27 kmenů (87,1 %) významně zvýšenou tvorbu biofilmu za mikroaerofilních podmínek kultivace. Pouze u pěti kmenů (8,5 %) se tvorba biofilmu zvýšila naopak za aerobních kultivačních podmínek.

Dalším sledovaným faktorem ovlivňujícím tvorbu biofilmu byla doba expozice. Např. u kmene *Al. butzleri* UPa 39-3 byla zaznamenána zvýšená produkce biofilmu za aerobních podmínek po 24 i 72 hod. kultivace. Dle výsledků uvedených v Tabulkách 4–6 bylo 18,6, resp. 11,9 % izolátů kategorizováno jako neadherentní, 78,0, resp. 79,7 % jako slabě adherentní a 3,4, resp. 8,5 % bylo zařazeno do kategorie středně adherentní za aerobních, resp. mikroaerofilních podmínek po 24 hod. expozice. Po 72 hod. expozice bylo kategorizováno 25,4, resp. 5,1 % izolátů jako neadherentní, 71,2, resp. 88,1 % jako slabě adherentních a 3,4, resp. 5,1 % bylo zařazeno do kategorie středně adherentních za aerobních nebo mikroaerofilních podmínek. Podle naměřených hodnot absorbancí docházelo k formování biofilmu slabě adherentních izolátů při hodnotách od 0,121–0,240, u středně adherentních kmenů byl rozsah tvorby biofilmu od 0,241–0,418. Pouze jeden kmen (1,7 %) byl hodnocen jako silně adherentní za mikroaerofilních podmínek, a to po 72 hod. kultivace. Pouze u některých kmenů bylo pozorováno zvýšené množství vytvořeného biofilmu po delší době kultivace. Např. u kmene *Pd. defluvii* LMG 25694 se množství detekovaného biofilmu zvýšilo o více než 80,0 % po 72 hod. kultivace v aerobním prostředí. Obdobný trend byl pozorován

u klinického izolátu *Al. butzleri* UPa 39-3. Naopak u kmene *Al. butzleri* UPa 2015/7 pokleslo množství detekovaného biofilmu po 72 hod. kultivace. Avšak u většiny kmenů byla pozorována přibližně stejná míra tvorby biofilmu po 24 i 72 hod. expozice za jinak stejných podmínek.

5.2 Tvorba biofilmu *Arcobacter-like species* na skleněném (borosilikátovém) povrchu

U většiny kmenů (98,3 %) byla potvrzena schopnost adheze k borosilikátovému povrchu za alespoň některých experimentálních podmínek (Tabulky 4–6). Tvorba biofilmu byla ovlivněna kultivační atmosférou celkem u 43 kmenů (72,9 %). Z tohoto množství vykazovalo 38 kmenů (88,4 %) zvýšenou tvorbu biofilmu za aerobních podmínek kultivace.

Na základě výsledků je patrné, že 27,1, resp. 32,2 % izolátů bylo hodnoceno jako neadherentní, 30,5, resp. 45,8 % jako slabě adherentní, 40,7, resp. 20,3 % jako středně adherentní a 1,7, resp. 1,7 % kmenů bylo zařazeno do kategorie silně adherentních za aerobních a mikroaerofilních podmínek po 24 hod. expozice. Po 72 hod. expozice bylo 8,5, resp. 23,7 % kmenů hodnoceno jako neadherentní, 20,3, resp. 49,2 % jako slabě adherentní, 67,8, resp. 25,4 % jako středně adherentní a 3,4, resp. 1,7 % bylo zařazeno do kategorie středně adherentních za aerobních nebo mikroaerofilních podmínek kultivace. Vyšší biofilmová tvorba na skleněném povrchu za aerobní atmosféry byla pozorována u mnoha kmenů.

Kmeny *Al. skirrowii* LMG 6621 ani *Al. thereius* LMG 24488 netvořily biofilm po 24 hod. kultivace na skleněném materiálu, ale po delší době kultivace byla tvorba biofilmu relativně vysoká. Podobný jev byl pozorován u kmene *Al. butzleri* UPa 2015/13, *Al. butzleri* UPa 2015/15, *Al. butzleri* UPa 2015/20, *Al. cryaerophilus* 1B UPa 2014/58A a *Al. cryaerophilus* 1B UPa 130 (po delší době expozice byla pozorována vyšší produkce biofilmu jak za aerobních, tak i mikroaerofilních podmínek). Výsledky také naznačily, že kultivace v aerobní nebo mikroaerofilní atmosféře může ovlivnit schopnost bakteriální tvorby biofilmu na abiotických površích.

Tabulka 4 – Biofilmová tvorba kmenů *Al. butzleri* na plastovém/skleněném povrchu.

Kmeny	Expozice 24 hod.		Expozice 72 hod.	
	Aerobní	Mikroaerofilní	Aerobní	Mikroaerofilní
<i>Al. butzleri</i> UPa 2012/3 ^A	W (0,124)/M	W (0,123)/W	W (0,156)/M	W (0,125)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/3 ^B	W (0,173)/M	M (0,262)/M	W (0,129)/M	W (0,136)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/10 ^A	N (0,112)/W	N (0,116)/W	N (0,113)/M	W (0,125)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/15 ^A	N (0,116)/M	W (0,121)/N	W (0,140)/M	W (0,142)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/30 ^B	W (0,149)/M	W (0,178)/M	W (0,124)/W	W (0,137)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/31 ^B	W (0,121)/M	W (0,126)/M	W (0,126)/W	W (0,132)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/32 ^B	W (0,141)/W	W (0,139)/N	W (0,123)/W	W (0,123)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/33 ^B	N (0,112)/W	N (0,117)/W	W (0,122)/N	W (0,127)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/36 ^A	W (0,121)/W	W (0,130)/W	N (0,120)/M	W (0,129)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2013/37 ^B	W (0,181)/M	W (0,207)/M	W (0,124)/M	W (0,135)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 2014/51 ^B	W (0,123)/W	W (0,122)/N	W (0,125)/M	W (0,122)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2014/54 ^B	N (0,117)/M	N (0,116)/W	W (0,129)/M	W (0,124)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/1 ^B	W (0,129)/M	W (0,132)/W	N (0,118)/M	W (0,122)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/5 ^A	W (0,152)/M	W (0,202)/W	N (0,118)/M	W (0,121)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/6 ^B	W (0,125)/N	W (0,131)/N	N (0,117)/W	W (0,125)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/7 ^B	M (0,233)/M	W (0,170)/W	W (0,120)/M	W (0,126)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/9 ^B	W (0,127)/W	W (0,127)/W	N (0,120)/W	W (0,129)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/10 ^B	W (0,141)/W	W (0,140)/W	W (0,137)/M	W (0,138)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/11 ^B	W (0,134)/N	W (0,137)/N	W (0,176)/M	W (0,216)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/12 ^B	W (0,176)/N	W (0,135)/N	N (0,117)/N	W (0,122)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/13 ^B	N (0,120)/N	W (0,138)/N	W (0,139)/M	W (0,146)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/14 ^B	W (0,130)/W	W (0,136)/M	W (0,124)/M	W (0,136)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/15 ^B	W (0,177)/N	W (0,213)/N	W (0,142)/M	W (0,127)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/16 ^B	W (0,198)/M	M (0,375)/W	W (0,147)/M	W (0,217)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/18 ^B	W (0,131)/M	W (0,196)/W	N (0,120)/N	W (0,127)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/19 ^B	W (0,133)/N	W (0,134)/N	W (0,132)/M	W (0,149)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/20 ^C	W (0,139)/N	W (0,139)/N	W (0,128)/M	W (0,143)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 2015/25 ^B	M (0,301)/W	W (0,160)/N	W (0,151)/M	W (0,146)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa KK ^B	N (0,109)/M	N (0,117)/W	N (0,119)/M	W (0,121)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 24A ^B	W (0,138)/M	M (0,418)/M	W (0,169)/M	M (0,246)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 30B ^B	W (0,131)/W	N (0,118)/N	W (0,137)/M	N (0,118)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 39-3 ^C	W (0,143)/N	W (0,134)/M	M (0,240)/N	W (0,164)/N
<i>Al. butzleri</i> UPa 49B ^B	W (0,130)/W	W (0,128)/N	W (0,124)/M	W (0,122)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 65A ^B	W (0,130)/W	W (0,128)/W	W (0,128)/M	W (0,173)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 132A ^B	W (0,127)/W	W (0,151)/W	N (0,113)/M	W (0,125)/M
<i>Al. butzleri</i> UPa 138A ^B	W (0,141)/M	M (0,265)/W	W (0,122)/M	W (0,153)/W
<i>Al. butzleri</i> UPa 141B ^B	W (0,123)/W	W (0,137)/W	N (0,116)/M	W (0,134)/M

Legenda: *Al.* – *Aliarcobacter*; ^A kmeny izolované z vody; ^B kmeny izolované z potravin; ^C klinické izoláty; UPa – kmeny izolované na Univerzitě Pardubice; N – neadherentní; W – slabě adherentní; M – středně adherentní; S – silně adherentní.

Tabulka 5 – Biofilmová tvorba kmenů *Al. cryaerophilus* na plastovém/skleněném povrchu.

Kmeny	Expozice 24 hod.		Expozice 72 hod.	
	Aerobní	Mikroaerofilní	Aerobní	Mikroaerofilní
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2012/1 ^A	W (0,130)/M	W (0,121)/W	W (0,126)/M	W (0,129)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/1 ^B	N (0,119)/N	W (0,127)/W	W (0,150)/M	W (0,143)/M
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/12 ^A	N (0,119)/N	W (0,129)/N	W (0,146)/W	W (0,154)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/13 ^A	W (0,128)/M	W (0,165)/M	W (0,124)/W	W (0,134)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/14 ^A	W (0,136)/N	W (0,144)/W	W (0,133)/N	W (0,136)/N
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/16 ^A	W (0,121)/M	W (0,123)/W	W (0,124)/W	W (0,129)/M
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/17 ^B	N (0,118)/M	N (0,117)/W	W (0,127)/W	W (0,129)/M
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/28 ^B	N (0,117)/M	W (0,122)/W	W (0,133)/M	W (0,137)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2013/35 ^A	W (0,130)/M	W (0,195)/M	N (0,118)/M	N (0,118)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/58 ^B	W (0,129)/W	W (0,122)/W	W (0,142)/M	W (0,145)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/58A ^B	W (0,128)/W	W (0,137)/W	W (0,155)/M	M (0,242)/M
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/58D ^B	W (0,144)/N	W (0,137)/N	W (0,151)/M	W (0,177)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 2014/59 ^B	W (0,127)/N	W (0,132)/M	W (0,147)/W	W (0,135)/N
<i>Al. cryaerophilus</i> UPa 130 ^B	W (0,125)/W	W (0,131)/N	W (0,121)/S	N (0,116)/M

Legenda: *Al.* – *Aliarcobacter*; ^A kmeny izolované z vody; ^B kmeny izolované z potravin; UPa – kmeny izolované na Univerzitě Pardubice; N – neadherentní; W – slabě adherentní; M – středně adherentní; S – silně adherentní.

Tabulka 6 – Biofilmová tvorba sbírkových *Arcobacter*-like species na plastovém/skleněném povrchu.

Kmeny	Expozice 24 hod.		Expozice 72 hod.	
	Aerobní	Mikroaerofilní	Aerobní	Mikroaerofilní
<i>Al. butzleri</i> CCUG 30484	W (0,152)/M	W (0,179)/W	W (0,178)/M	M (0,241)/W
<i>Al. butzleri</i> LMG 10828	W (0,126)/M	W (0,130)/W	W (0,132)/M	W (0,178)/W
<i>Al. cryaerophilus</i> CCM 3933	N (0,118)/N	N (0,114)/M	N (0,120)/W	W (0,195)/N
<i>Al. cryaerophilus</i> CCM 7050	W (0,133)/M	W (0,138)/M	N (0,116)/W	W (0,130)/W
<i>Pd. defluvii</i> LMG 25694	W (0,228)/S	M (0,379)/S	M (0,414)/S	S (0,504)/S
<i>Al. lanthieri</i> LMG 28517	W (0,125)/W	W (0,132)/N	W (0,123)/M	W (0,140)/N
<i>Al. skirrovii</i> LMG 6621	W (0,126)/N	W (0,130)/N	W (0,136)/M	W (0,129)/M
<i>Al. thereius</i> LMG 24488	W (0,124)/N	W (0,127)/N	N (0,120)/M	W (0,127)/W

Legenda: *Al.* – *Aliarcobacter*; *Pd.* – *Pseudoarcobacter*; CCUG – kmeny získané ze sbírky University Göteborg; LMG – kmeny získané ze belgické sbírky Co-ordinated Collections of Microorganisms; CCM – kmeny z české sbírky mikroorganismů Czech Collection of Microorganisms; N – neadherentní, W – slabě adherentní, M – středně adherentní, S – silně adherentní.

5.3 Tvorba biofilmu *Campylobacter* spp. na plastovém (polystyrenovém) povrchu

Dle výsledků uvedených v Tabulce 7 bylo 0, resp. 40,0 % izolátů hodnoceno jako neadherentní a 100, resp. 60,0 % bylo zařazeno do kategorie slabě adherentní za aerobních nebo mikroaerofilních podmínek kultivace po 24 hod. expozice. Po 72 hod. expozice bylo hodnoceno 100, resp. 70,0 % izolátů jako neadherentní a 0, resp. 30,0 % kmenů jako slabě adherentní za aerobních a mikroaerofilních podmínek. Absorbance odpovídající tvorbě slabého biofilmu se pohybovala v rozmezí $A_{595} = 0,121-0,132$. U 10 kmenů (100 %) kampylobakterů byla schopnost přilnout k plastovému povrchu potvrzena alespoň za některých experimentálních podmínek. Tvorba biofilmu byla ovlivněna také kultivační atmosférou u 7 kmenů (70,0 %), z nichž 4 kmeny (57,1 %) vykazovaly zvýšenou tvorbu biofilmu za aerobních kultivačních podmínek. Všechny kampylobaktery vykazovaly adhezenci na plastový povrch za aerobních podmínek po 24 hod. expozice. Získané výsledky v tomto případě naznačují, že mikroaerofilně rostoucí kampylobaktery vykazují vyšší produkci biofilmu za nepříznivých podmínek atmosféry. Avšak vyšší množství vytvořeného biofilmu bylo pozorováno u kmene *C. coli* NP 2395 za mikroaerofilních podmínek. U většiny testovaných kmenů nebyla pozorována tvorba biofilmu (70,0 %) po 72 hod. expozice. Výjimkou byly kmeny *C. jejuni* NS 3800, *C. jejuni* NS 4088 a *C. coli* NP 2395, u kterých byla zaznamenána tvorba biofilmu po 72 hod.

5.4 Tvorba biofilmu *Campylobacter* spp. na skleněném (borosilikátovém) povrchu

Čtyři kmeny (57,1 %) z celkového počtu biofilm-pozitivních kmenů vykazovaly zvýšenou adhezenci za mikroaerofilních podmínek kultivace. Celkově bylo hodnoceno 30,0, resp. 70,0 % izolátů jako neadherentní a 60,0, resp. 20,0 % bylo zařazeno do kategorie slabě adherentních za aerobních či mikroaerofilních podmínek po 24hod. expozici (Tabulka 7). Po 72 hod. expozice bylo 80,0, resp. 50,0 % kmenů hodnoceno jako neadherentní a 10,0, resp. 40,0 % bylo zahrnuto do kategorie slabě adherentních za aerobních nebo mikroaerofilních podmínek. Nejvyšší produkce biofilmu na borosilikátovém povrchu byla pozorována u kmene *C. jejuni* CCM 6214 za všech experimentálních podmínek. Po 24 hod. aerobní kultivace byla u kampylobakterů pozorována pouze slabá tvorba biofilmu. U kmenů *C. jejuni* NS 3668, *C. jejuni* NS 3800 a *C. jejuni* NS 4088 za daných podmínek nebyla tvorba biofilmu zaznamenána vůbec. Po delší kultivaci (72 hod.) za aerobních podmínek nevykazovalo

schopnost tvořit biofilm až 80,0 % kmenů (s výjimkou kmenů *C. jejuni* CCM 6214 a *C. jejuni* NS 3668).

Tabulka 7 – Biofilmová tvorba kmenů *Campylobacter* na plastovém/skleněném povrchu.

Kmeny	Expozice 24 hod.		Expozice 72 hod.	
	Aerobní	Mikroaerofilní	Aerobní	Mikroaerofilní
<i>C. jejuni</i> CCM 6214	W (0,121)/M	N (0,115)/M	N (0,093)/M	N (0,117)/M
<i>C. jejuni</i> NP 2896 ^C	W (0,126)/W	N (0,119)/W	N (0,092)/N	N (0,117)/W
<i>C. jejuni</i> NS 3668 ^C	W (0,125)/N	W (0,127)/N	N (0,114)/W	N (0,117)/W
<i>C. jejuni</i> NS 3800 ^C	W (0,121)/N	W (0,127)/W	N (0,115)/N	W (0,121)/N
<i>C. jejuni</i> NS 4088 ^C	W (0,124)/N	W (0,127)/N	N (0,119)/N	W (0,129)/N
<i>C. jejuni</i> NS 4091 ^C	W (0,124)/W	W (0,125)/N	N (0,113)/N	N (0,118)/N
<i>C. coli</i> NP 2395 ^C	W (0,123)/W	W (0,125)/N	N (0,118)/N	W (0,125)/N
<i>C. coli</i> NS 3803 ^C	W (0,121)/W	N (0,116)/N	N (0,094)/N	N (0,116)/N
<i>C. coli</i> NS 4062 ^C	W (0,121)/W	N (0,115)/N	N (0,094)/N	N (0,118)/W
<i>Campylobacter</i> sp. ONN 366 ^C	W (0,132)/W	W (0,130)/N	N (0,115)/N	N (0,118)/W

Legenda: *C* – *Campylobacter*; ^C klinický izolát; CCM – kmeny z české sbírky mikroorganismů Czech Collection of Microorganisms, NP – kmeny získané z nemocnice v Pardubicích, NS – kmeny získané z nemocnice ve Svitavách, ONN – kmeny získané z Oblastní nemocnice Náchod; N – neadherentní, W – slabě adherentní, M – středně adherentní, S – silně adherentní.

Schopnost mikroorganismů tvořit biofilm je považována za důležitý faktor virulence. Tvorba biofilmu *Arcobacter*-like species a kamylobakterů byla popsána již dříve, a to např. na nerezových, měděných, skleněných nebo plastových površích (Ferreira et al., 2013; Gunther a Chen, 2009; Girbau et al. 2017; Kjeldgaard et al., 2009; Šilha et al., 2014). *Arcobacter*-like species jsou v literatuře obecně popisovány jako slabí producenti biofilmu (Girbau et al. 2017). Mnoho studií také ukazuje, že ani kamylobaktery nejsou silnými producenty biofilmu (Gunther a Chen, 2009; Reeser et al., 2007; Teh et al., 2010), což potvrzují i naše výsledky. Dle získaných výsledků lze konstatovat, že kamylobaktery vykazovaly mírně vyšší biofilmovou tvorbu v jejich přirozeném mikroaerofilním prostředí (Gunther a Chen, 2009). V některých studiích byla zaznamenána vyšší tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z masa (Girbau et al. 2017), která se v našich výsledcích neprokázala jako statisticky významná. Schopnost *Arcobacter*-like species adherovat k polystyrénovému povrchu mikrotitračních destiček byla potvrzena za různých experimentálních podmínek. Některé studie uvádějí značnou schopnost *Arcobacter*-like species tvořit bakteriální biofilm (Ferreira et al., 2013; Kjeldgaard et al., 2009). Avšak v další studii se tato skutečnost potvrdila pouze u 21,4 % studovaných kmenů (Girbau et al. 2017). Je ale zřejmé, že tvorba biofilmu je variabilní a za určitých podmínek kmen nemusí biofilm vůbec tvořit, dokonce i když byl dříve popisován jako biofilm-pozitivní. Tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z reálného prostředí se významně neliší od sbírkových kmenů, jak bylo prokázáno také v předchozí studii (Hrušková et al., 2013).

Další studie však uvádí, že *Arcobacter*-like species izolované z prostředí, vykazovaly větší schopnost tvořit biofilm ve srovnání se sbírkovými kmeny (Ferreira et al., 2013).

Vnější faktory (podmínky prostředí nebo vlastnosti povrchu) ovlivňují také tvorbu biofilmu. Jak již bylo zmíněno, nelze obecně definovat, které kultivační podmínky jsou nebo nejsou vhodné pro tvorbu biofilmu (Girbau et al. 2017; Šilhová-Hrušková et al., 2015). Dostupnost živin nebo složení použitého kultivačního média má významný vliv na tvorbu biofilmu. Mezi hojně využívaná kultivační média patří trypton-sojový bujón (Prakash et al., 2017) nebo BHI bujón (Knobloch et al., 2002).

Biofilmová tvorba je značně ovlivněna i kultivační atmosférou (Ferreira et al., 2013; Girbau et al. 2017). Aerobní prostředí může podporovat adhezní vlastnosti některých kmenů, zatímco jiné kmeny jsou stimulovány mikroaerofilními podmínkami (Ferreira et al., 2013). Toto tvrzení potvrzují i dřívější studie, které dospěly k podobným závěrům. Bylo publikováno, že nepřírozená aerobní atmosféra podporuje tvorbu biofilmu kampylobakterů (Gunther a Chen, 2009; Reuter et al., 2010). Tvorba biofilmu *C. jejuni* je často hodnocena jako intenzivnější za aerobních podmínek (Reuter et al., 2010), to může být vysvětleno reakcí na oxidační stres. Významná biofilmová tvorba *Campylobacter* spp. může být zaznamenána při nižších teplotách a po relativně krátké době expozice. Na základě našich výsledků můžeme potvrdit vyšší produkci biofilmu v aerobní atmosféře, avšak některé kmeny vykazovaly zvýšenou tvorbu biofilmu i po expozici v mikroaerofilní atmosféře.

Doba kultivace má také významný vliv na tvorbu biofilmu. Neplatí však vždy tvrzení, že s delší dobou kultivace můžeme zaznamenat vyšší množství vytvořeného biofilmu. To pravděpodobně souvisí i s odlišnou buněčnou tolerancí vůči vlivům prostředí nebo náchylnosti buněk biofilmu k odlupování. Avšak někteří autoři zmiňují, že množství vytvořeného biofilmu se zvyšuje s rostoucí dobou kultivace (Kjeldgaard, et al., 2009). U mnoha kmenů zahrnutých do naší studie nebyla po 72 hod. pozorována tvorba biofilmu. To může souviset s odlupováním vytvořené „integrální“ vrstvy biofilmu na daném materiálu (Girbau et al., 2017). Další studie potvrdily tvorbu biofilmu na nerezové oceli u 14,3 % studovaných kmenů *Al. butzleri* (Assanta et al., 2002; Kjeldgaard, et al., 2009). Závěry současných studií proto popisují schopnost kmenů *Al. butzleri* přilnout k široce používaným materiálům v potravinářském průmyslu (Girbau et al., 2017; Šilhová-Hrušková et al., 2015). Perzistence patogenních bakterií v prostředí zpracování potravin vede k nárůstu alimentárních infekcí, které jsou celosvětovým problémem veřejného zdraví a jejich prevence je hlavním cílem bezpečnosti potravin.

5.5 Vliv antibiotik na *Arcobacter*-like species

Účinnost vybraných antibiotik (ampicilin, ciprofloxacin, klindamycin, erythromycin, gentamicin a tetracyklin) byla testována na planktonní buňky a také na schopnost tvorby biofilmu *Arcobacter*-like species.

5.5.1 Vliv antibiotik na planktonní buňky *Arcobacter*-like species

V rámci experimentů byla sledována citlivost 60 kmenů *Arcobacter*-like species k vybraným antimikrobiálním látkám používaným v klinické praxi. Počty kmenů, u kterých byla zjištěna citlivost, resp. rezistence k jednotlivým antibiotikům a také hodnoty MIC jsou uvedeny v Tabulce 8.

Získaná data ukazují, že kmeny *Arcobacter*-like species jsou většinou citlivé k makrolidovým antibiotikům, aminoglykosidům a chinolonům. Z výsledků uvedených v Tabulce 8 vyplývá, že 47 ze 60 (78,3 %) kmenů bylo citlivých k ampicilinu, 57 ze 60 (95,0 %) kmenů k ciprofloxacinu, 7 ze 60 (11,7 %) kmenů ke klindamycinu, 60 ze 60 (100 %) k erythromycinu, 59 ze 60 (98,3 %) ke gentamicinu a 24 ze 60 (40,0 %) k tetracyklinu. Hodnoty MIC₅₀ a MIC₉₀ byly pro testovaná antibiotika téměř shodné (maximálně rozdíl jednoho ředění). Významný rozdíl mezi zjištěnými koncentracemi MIC₅₀ a MIC₉₀ byl však pozorován u ampicilinu (8 a 64 mg/l) a tetracyklinu (4 a 64 mg/l) pro kmeny *Al. butzleri*. Jako nejúčinnější antibiotikum k potlačení *Arcobacter*-like species byl hodnocen erythromycin (MIC₅₀/MIC₉₀ 2 mg/l, resp. 4 mg/l), gentamicin (kmeny *Al. butzleri* – MIC₅₀/MIC₉₀ 0,25 mg/l, resp. 1 mg/l; kmeny *Al. cryaerophilus* – MIC₅₀/MIC₉₀ 0,5 mg/l, resp. 1 mg/l) a ciprofloxacin (kmeny *Al. butzleri* – MIC₅₀/MIC₉₀ 0,06 mg/l, resp. 0,13 mg/l). Naopak u mnoha kmenů byla zaznamenána značná rezistence k linkosamidům.

Většina kmenů (88,3 %) byla rezistentní především ke klindamycinu. Kmeny *Arcobacter*-like species byly odolné také vůči beta-laktamovým antibiotikům (ampicilin; hodnoty MIC₅₀/MIC₉₀ 8 mg/l, resp. 64 mg/l pro kmeny *Al. butzleri* a hodnoty MIC₅₀/MIC₉₀ 8 mg/l, resp. 128 mg/l pro kmeny *Al. cryaerophilus*) a tetracyklinům (tetracyklin; hodnoty MIC₅₀/MIC₉₀ 4 mg/l, resp. 64 mg/l). Úroveň rezistence odpovídala 21,7 % pro ampicilin, 5,0 % pro ciprofloxacin, 88,3 % pro klindamycin, 1,7 % pro gentamicin a 60,0 % pro tetracyklin. Žádný ze studovaných kmenů nevykazoval rezistenci k erythromycinu.

Zároveň byla zaznamenána vysoká úroveň multirezistence. U kmene *Al. butzleri* LMG 10828 byla popsána rezistence vůči čtyřem antibiotikům a lze jej tedy považovat za multirezistentní kmen. Podobně i kmen *Al. butzleri* UPa 2013/12 byl hodnocen jako

rezistentní k ampicilinu, ciprofloxacinu, klindamycinu a tetracyklinu (viz Tabulka 9). Devět kmenů (15,0 %) vykazovalo rezistenci ke kombinaci tří antibiotik – v sedmi případech se jednalo o kombinaci ampicilinu, klindamycinu a tetracyklinu, ve dvou případech to byla kombinace ciprofloxacinu, klindamycinu a tetracyklinu. Několik studií také uvádí multirezistenci vůči více antibiotikům, což odpovídá i našim výsledkům (Rathlavath et al., 2017; Šilha et al., 2017). Označení multirezistentních kmenů se mezi studii odlišuje.

Onemocnění způsobené *Arcobacter*-like species lze v některých případech léčit podáním vhodných antibiotik. Mnoho studií doporučuje tetracykliny a aminoglykosidy jako antibiotika první volby při léčbě arkobakteriózy (Aski et al., 2016; Kayman et al., 2012; Rathlavath et al., 2017). V dřívější studii bylo uvedeno, že žádný z testovaných kmenů nevykazoval rezistenci ke gentamicinu nebo tetracyklinu (Ferreira et al., 2014). Naše výsledky shodně potvrdily citlivost ke gentamicinu u všech kmenů *Arcobacter*-like species. Bylo však zjištěno, že 65,0 % testovaných kmenů bylo rezistentní k tetracyklinu. Podle našich výsledků by bylo možné použít ciprofloxacin (chinolony) k léčbě arkobakteriózy. Četnou citlivost *Arcobacter*-like species k ciprofloxacinu uvádějí i další studie (Ferreira et al., 2013; Houf et al., 2004; Vandenberg et al., 2006). Celkově nejnižší úroveň rezistence byla pozorována k erythromycinu, gentamicinu a ciprofloxacinu, což je v souladu s dříve publikovanými studii (Abay et al., 2011; Aski et al., 2016; Ferreira et al., 2013; Vandenberg et al., 2006).

Tabulka 8 – Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) antibiotik stanovené pro 60 *Arcobacter*-like species.

	Počet izolátů citlivých k daným koncentracím antibiotik a vyjádřené MIC (MBC) (mg/l)															MIC ₅₀	MIC ₉₀	R
	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256				
Ampicilin																		
<i>Al. butzleri</i> (50)			1	3	2	1	4	5	15	7	6	5	1		8	64	24 %	
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)									1	2				8	128	0 %		
<i>Ab</i> CCUG 30484										1								
<i>Ab</i> LMG 10828													1					
<i>Ac</i> CCM 3933										1								
<i>Ac</i> CCM 3934								1										
<i>Ac</i> CCM 7050								1										
<i>Pd</i> LMG 25694								1										
<i>As</i> LMG 6621									1									
Ciprofloxacin																		
<i>Al. butzleri</i> (50)	20	13	12	3							1	1		0,06	0,13	4 %		
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)	1		1									1		0,13	64	33,3 %		
<i>Ab</i> CCUG 30484		1																
<i>Ab</i> LMG 10828			1															
<i>Ac</i> CCM 3933		1																
<i>Ac</i> CCM 3934		1																
<i>Ac</i> CCM 7050			1															
<i>Pd</i> LMG 25694		1																
<i>As</i> LMG 6621		1																
Klindamycin																		
<i>Al. butzleri</i> (50)		2		1	3	1	2	2	5	7	15	6	6		32	128	86 %	
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)							1			1	1			16	32	100 %		
<i>Ab</i> CCUG 30484												1						
<i>Ab</i> LMG 10828													1					
<i>Ac</i> CCM 3933								1										
<i>Ac</i> CCM 3934										1								
<i>Ac</i> CCM 7050												1						
<i>Pd</i> LMG 25694								1										
<i>As</i> LMG 6621								1										

Legenda: *Ab*–*Al. butzleri*; *Ac*–*Al. cryaerophilus*; *Pd*–*Pd. defluvi*; *As*–*Al. skirrowii*. Hraniční hodnoty rezistence byly převzaty z EUCAST a CLSI. Šedé stínování označuje rezistentní kmeny. R – procento rezistentních kmenů.

Tabulka 8 – (Pokračování) – Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) antibiotik stanovené pro 60 *Arcobacter*-like species.

	Počet izolátů citlivých k daným koncentracím antibiotik a vyjádřené MIC (MBC) (mg/l)															MIC ₅₀	MIC ₉₀	R
	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256				
Erythromycin																		
<i>Al. butzleri</i> (50)		1		3	4	8	13	17	4						2	4	0 %	
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)						1	1	1							2	4	0 %	
<i>Ab</i> CCUG 30484					1													
<i>Ab</i> LMG 10828									1									
<i>Ac</i> CCM 3933									1									
<i>Ac</i> CCM 3934									1									
<i>Ac</i> CCM 7050									1									
<i>Pd</i> LMG 25694						1												
<i>As</i> LMG 6621				1														
Gentamicin																		
<i>Al. butzleri</i> (50)		12		22	9	6	1								0,25	1	0 %	
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)				1	1	1									0,5	1	0 %	
<i>Ab</i> CCUG 30484					1													
<i>Ab</i> LMG 10828									1									
<i>Ac</i> CCM 3933						1												
<i>Ac</i> CCM 3934				1														
<i>Ac</i> CCM 7050				1														
<i>Pd</i> LMG 25694		1																
<i>As</i> LMG 6621					1													
Tetracyklin																		
<i>Al. butzleri</i> (50)				3	2	8	10	7	5	7	4	1	3		4	64	54 %	
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)							1			1	1			16	32	66,7 %		
<i>Ab</i> CCUG 30484													1					
<i>Ab</i> LMG 10828													1					
<i>Ac</i> CCM 3933												1						
<i>Ac</i> CCM 3934									1									
<i>Ac</i> CCM 7050									1									
<i>Pd</i> LMG 25694										1								
<i>As</i> LMG 6621										1								

Legenda: *Ab*–*Al. butzleri*; *Ac*–*Al. cryaerophilus*; *Pd*–*Pd. defluvi*; *As*–*Al. skirrowii*. Hraniční hodnoty rezistence byly převzaty z EUCAST a CLSI. Šedé stínování označuje rezistentní kmeny. R – procento rezistentních kmenů.

Tabulka 9 – Multirezistence *Arcobacter*-like species.

	Kombinace rezistence						
	AMP, CLI	AMP, TET	CLI, TET	AMP, CLI, TET	CIP, CLI, TET	AMP, CIP, CLI, TET	AMP, CLI, GEN, TET
<i>Al. butzleri</i> (50)	3	1	17	6	1	1	
<i>Al. cryaerophilus</i> (3)				1	1		
<i>Ab</i> CCUG 30484			1				
<i>Ab</i> LMG 10828							1
<i>Ac</i> CCM 3933			1				
<i>Ac</i> CCM 3934			1				
<i>Ac</i> CCM 7050			1				
<i>Pd</i> LMG 25694			1				
<i>As</i> LMG 6621			1				

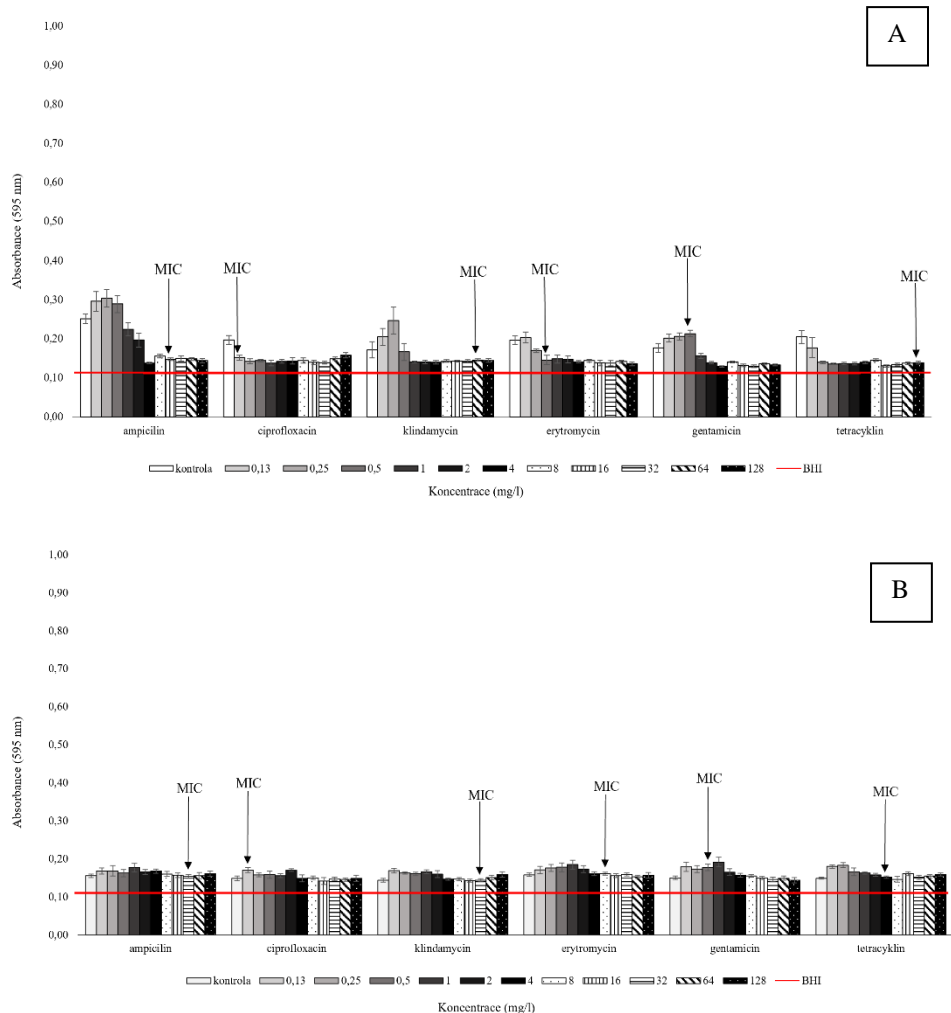
Legenda: *Ab*–*Al. butzleri*; *Ac*–*Al. cryaerophilus*; *Pd*–*Pd. defluvii*; *As*–*Al. skirrowii*. AMP–ampicilin; CIP–ciprofloxacin; CLI–klindamycin; GEN–gentamicin; TET–tetracyklin. Multirezistence byla definována jako rezistence ke dvěma a více antibiotikům.

5.5.2 Vliv antibiotik na tvorbu biofilmu *Arcobacter*-like species

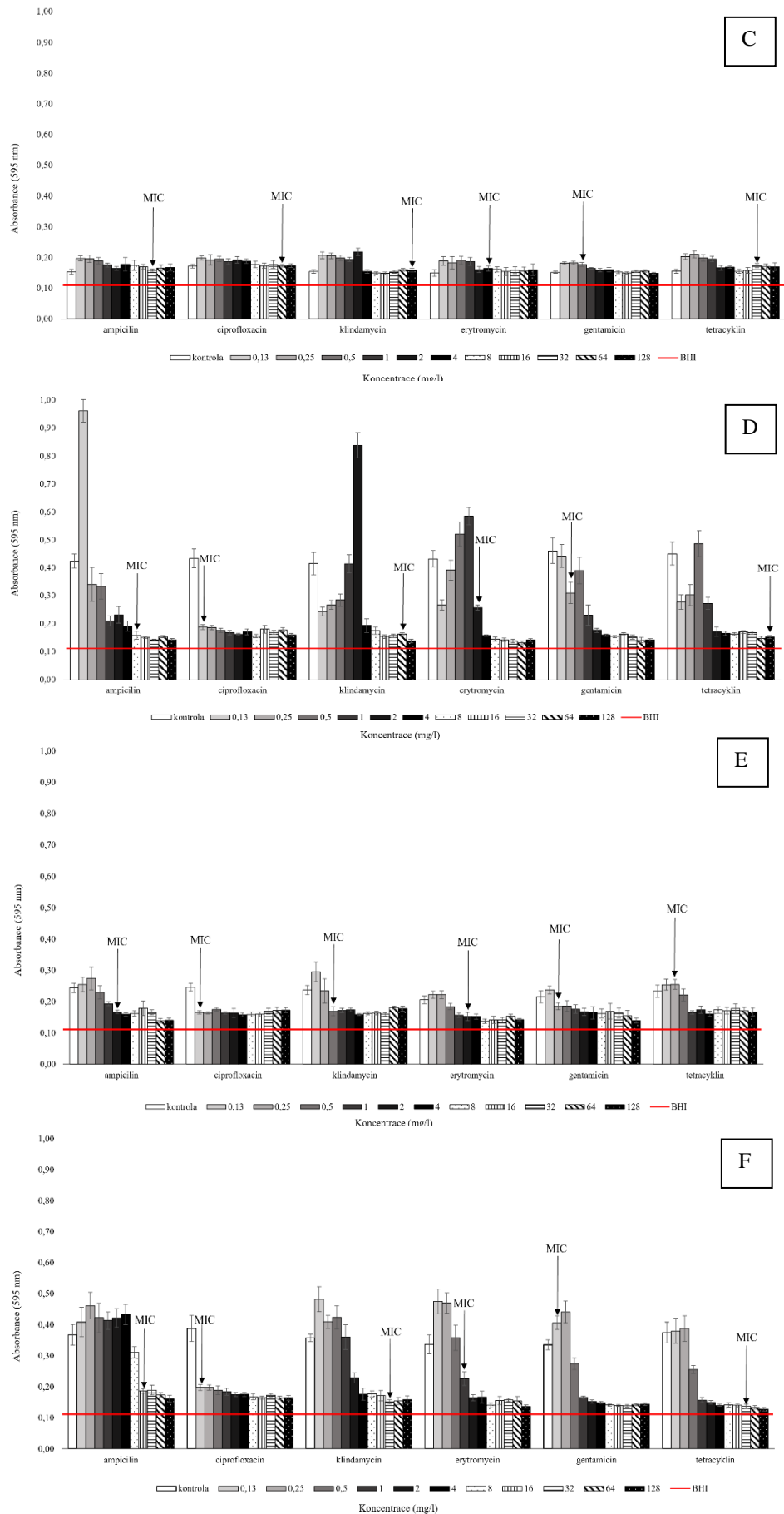
Schopnost tvorby biofilmu byla sledována u 10 kmenů v přítomnosti různých koncentrací antibiotik (Graf 1 a 2). Všechny kmeny vykazovaly schopnost tvorby biofilmu, avšak jednotlivé kmeny se mezi sebou lišily v intenzitě vytvořeného biofilmu. Vyšší schopnost tvorby biofilmu byla pozorována zejména u kmenů v prostředí s nižší koncentrací (zpravidla koncentrace 0,13–2 mg/l) antibiotik. Např. kmen *Al. butzleri* CCUG 30484 vykazoval zvýšenou schopnost tvorby biofilmu při koncentraci antibiotik v rozsahu 0,5–1 mg/l. Naopak vyšší koncentrace antibiotik vedla ke snížení tvorby biofilmu.

U kmene *Pd. defluvii* LMG 25694 byl zaznamenán významný pokles tvorby biofilmu v prostředí koncentrace ampicilinu shodné nebo větší než 32 mg/l a koncentrace klindamycinu shodné nebo větší než 8 mg/l. Nicméně již koncentrace 4 mg/l byla u ampicilinu i klindamycinu vyhodnocena jako MIC pro planktonní buňky tohoto kmene. Podobně zvýšená produkce biofilmu byla zaznamenána u kmene *Al. butzleri* UPa 2013/30 v přítomnosti některých sledovaných antibiotik (ampicilin, klindamycin, erythromycin, gentamicin a tetracyklin), a to až do koncentrace 2, resp. 4 mg/l. Podobný trend byl pozorován i u dalších kmenů. Toto lze vysvětlit stresovými podmínkami prostředí, na které bakterie reagovaly přechodem z planktonní formy do odolnější formy biofilmu. Při vyšších koncentracích antibiotik tak byla tvorba biofilmu významně potlačena (viz Graf 1 a 2). Výsledky naznačují, že koncentrace antibiotik pod hodnotami MIC by mohly významně ovlivnit tvorbu bakteriálního biofilmu. Ke značnému poklesu tvorby biofilmu došlo např. u kmene *Al. butzleri* CCUG 30484 v prostředí ampicilinu o koncentraci shodné nebo větší než 2 mg/l a u *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13 při koncentraci klindamycinu shodné nebo větší než 2 mg/l. Tvorba biofilmu kmene

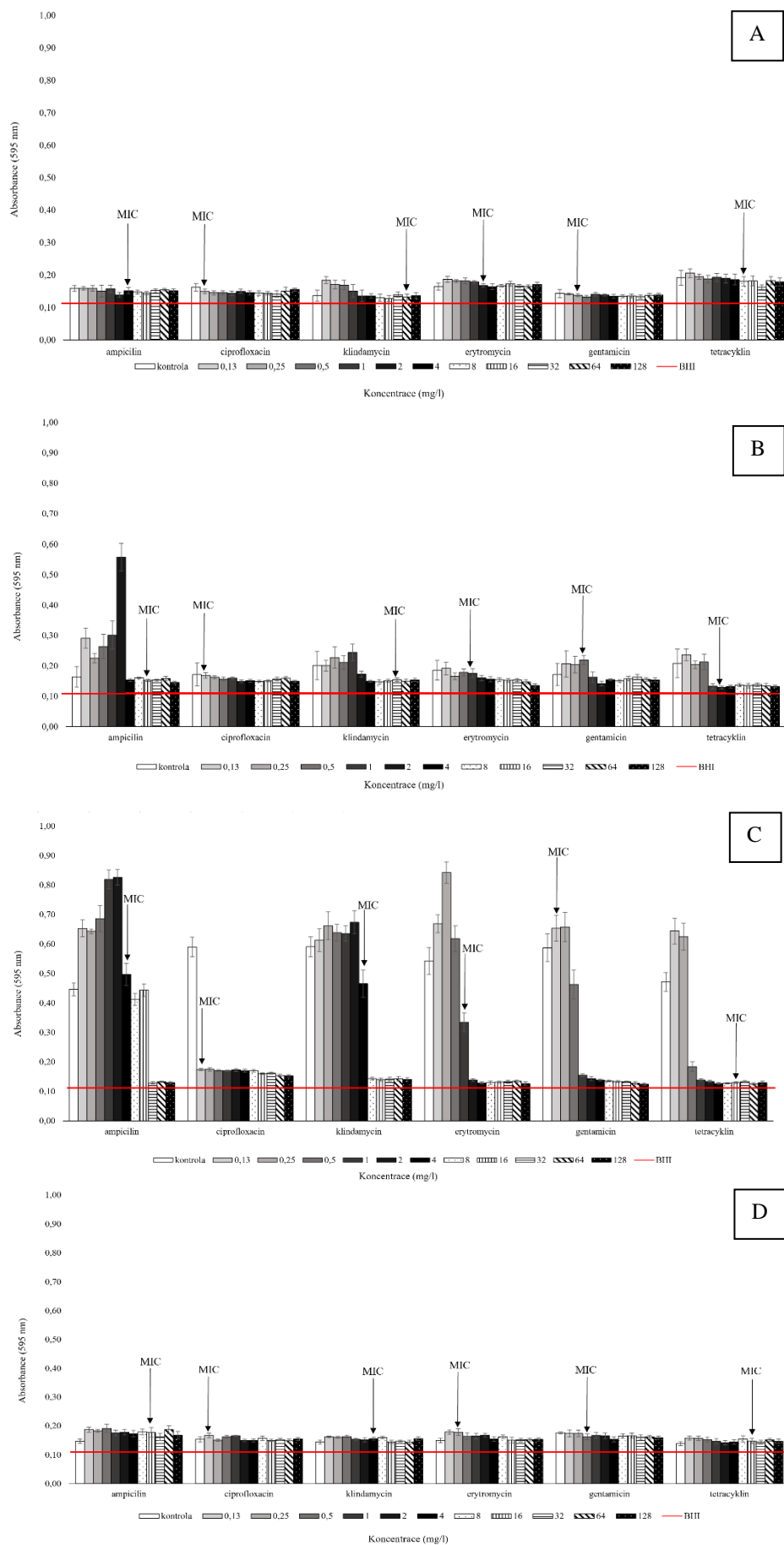
Al. butzleri UPa 2015/14 byla snížena při koncentraci ampicilinu 16 mg/l, což přesně odpovídá koncentraci MIC stanovené pro planktonní buňky téhož kmene. Značná inhibice tvorby biofilmu byla pozorována také u ciprofloxacinu, a to již při nejnižší testované koncentraci, např. pro kmen *Al. butzleri* CCUG 30484, *Pd. defluvii* LMG 25694, *Al. butzleri* UPa 2013/30, *Al. butzleri* UPa 2015/13 a *Al. butzleri* UPa 2015/14. Minimální inhibiční koncentrace ciprofloxacinu dosahovala hodnot 0,06 mg/l pro všechny uvedené kmeny. Ciprofloxacin byl hodnocen jako neúčinnější antibiotikum vhodné k potlačení biofilmové tvorby *Arcobacter*-like species. Tvorba biofilmu představuje potenciální nebezpečí infekce a také riziko pro lidské zdraví, zejména kvůli rezistentním kmenům a také jejich schopnosti vytvářet biofilmy v prostředí koncentrací stanovených jako MIC pro planktonní buňky.



Graf 1 – Tvorba biofilmu *Al. butzleri* v prostředí antibiotik. (A) *Al. butzleri* CCUG 30484; (B) *Al. butzleri* UPa 2013/6 (izolát z potravin); (C) *Al. butzleri* UPa 2013/9 (izolát z odpadních vod); (D) *Al. butzleri* UPa 2013/30 (izolát z potravin); (E) *Al. butzleri* UPa 2015/13 (izolát z potravin); (F) *Al. butzleri* UPa 2015/14 (izolát z potravin). Horizontální červená linie představuje vliv BHI bujónu (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií – biofilm-pozitivita). MIC – minimální inhibiční koncentrace stanovená pro planktonní buňky *Arcobacter*-like species.



Graf 1 – Pokračování – Tvorba biofilmu *Al. butzleri* v prostředí antibiotik. (A) *Al. butzleri* CCUG 30484; (B) *Al. butzleri* UPa 2013/6 (izolát z potravin); (C) *Al. butzleri* UPa 2013/9 (izolát z odpadních vod); (D) *Al. butzleri* UPa 2013/30 (izolát z potravin); (E) *Al. butzleri* UPa 2015/13 (izolát z potravin); (F) *Al. butzleri* UPa 2015/14 (izolát z potravin). Horizontální červená linie představuje vliv BHI bujónu (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií – biofilm-pozitivita). MIC – minimální inhibiční koncentrace stanovená pro planktonní buňky *Arcobacter*-like species.



Graf 2 – Tvorba biofilmu dalších kmenů v prostředí antibiotik. (A) *Al. cryaerophilus* CCM 7050; (B) *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13 (izolát z vody); (C) *Pd. defluvii* LMG 25694; (D) *Al. skirrowii* LMG 6621. Horizontální červená linie představuje vliv BHI bujónu (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií –biofilm-positivita). MIC – minimální inhibiční koncentrace stanovená pro planktonní buňky *Arcobacter*-like species.

Buňky v prostředí biofilmu mohou být významným zdrojem infekce (Passerini de Rossi et al., 2009). Hodnoty MIC stanovené pro planktonní buňky neodpovídají koncentracím inhibujícím tvorbu biofilmu (Tezel et al., 2016). Vliv samotného prostředí hraje zásadní roli pro planktonní buňky, ale také pro tvorbu biofilmu (Jabra-Rizk et al., 2006). *Arcobacter*-like species jsou v literatuře popisovány většinou jako slabí producenti biofilmu (Girbau et al., 2017; Šilha et al., 2021; Šilhová-Hrušková et al., 2015). Avšak výsledky ukazují, že některé kmeny jsou schopny také poměrně intenzivní tvorby biofilmu, a to dokonce i v přítomnosti antibiotik. Antibiotika mohou významně indukovat tvorbu biofilmu u různých bakteriálních kmenů *in vitro* v koncentracích nižších než MIC (Tezel et al., 2016). Použití tetracyklinu může vést ke zvýšené tvorbě biofilmu (Kaplan, 2011), toto tvrzení však nebylo v naší studii potvrzeno. Na základě publikovaných výsledků lze předpokládat, že tvorba biofilmu je podporována přítomností antibiotik v koncentracích nižších než MIC (Duarte et al., 2015). Na druhou stranu u některých mikroorganismů bylo v minulosti zjištěno, že sub-inhibiční koncentrace antibiotik vede k inhibici tvorby biofilmu (Kaplan, 2011). Taktéž ciprofloxacin, amikacin a kolistin snižují tvorbu biofilmu *E. coli*, takže tato antibiotika by mohla být užitečná při léčbě infekcí spojených s biofilmem způsobených podobnými kmeny (Wojnicz a Tichaczek-Goska, 2013). Podle našich výsledků byl ciprofloxacin nejúčinnějším antibiotikem i při nižších koncentracích. Bylo také publikováno, že nejnižší koncentrace fluorochinolonů způsobila snížení původního množství biofilmu (Passerini de Rossi et al., 2009). Díky vícedruhovým biofilmům a zvýšené toleranci na antibiotika i antimikrobiální látky je třeba kombinovat různé strategie, aby se zlepšila jejich účinnost (Ciofu et al., 2017). Zvýšení tvorby biofilmu při sub-inhibičních koncentracích antibiotik je pravděpodobně užitečnou strategií patogenních bakterií, jež usnadňuje jejich přežití po intenzivní antibiotické terapii, jelikož v lidském organismu zůstávají nízké koncentrace léčiv (Costerton et al., 1999; Plyuta et al., 2013). Přestože jsou kmeny citlivé na antibiotika, mohou vykazovat vysokou rezistenci v důsledku jejich schopnosti tvořit biofilm. Pro správné nastavení terapeutické dávky antibiotik je třeba postupovat s ohledem na to, že tvorba biofilmu umožňuje některým mikroorganismům uniknout účinkům některých antibiotik.

5.6 Vliv hydrosolů na *Arcobacter*-like species

5.6.1 Chemické složení hydrosolů

Hydrosoly získané hydrodestilací a parní destilací levandule (*Lavandula angustifolia* Mill.), hřebíčku (*Syzygium aromaticum* L.), fenyklu (*Foeniculum vulgare* Mill.) a vavřínu (*Laurus nobilis* L.) byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) a pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).

Tabulka 10 prezentuje výsledky analýz koncentrovaných hydrosolů získaných parní destilací (SD) a hydrodestilací (HD). Obsah jednotlivých sloučenin je vyjádřen jako procento celkové plochy píku v získaných chromatogramech z analýzy pomocí GC-FID, jedná se tedy o přibližné hodnoty.

Tabulka 10 – Výsledky chemické analýzy 50× koncentrovaných hydrosolů získaných parní destilací (SD) a hydrodestilací (HD), počty identifikovaných sloučenin a výčet třech dominantních složek vzorků, n=3.

Hydrosol z	Počty píků v chromatogramu		Počty identifikovaných sloučenin (celkový obsah)		Hlavní složky hydrosolů (celkový obsah)	
	SD	HD	H _{SD_SPE}	H _{HD_SPE}	H _{SD_SPE}	H _{HD_SPE}
Levandule	186	172	48 (90,0 %)	48 (93,2 %)	1,8-Cineol (20,6 %)	Linalool (23,2 %)
					(Z)-Linalol furanoxid (11,9 %)	1,8-Cineol (19,5 %)
					α-Terpineol (10,4 %)	α-Terpineol (13,0 %)
Bobkový list	227	166	33 (78,0 %)	33 (79,4 %)	1,8-Cineol (56,4 %)	1,8-Cineol (54,1 %)
					4-Terpineol (6,0 %)	4-Terpineol (7,1 %)
					α-Terpineol (5,0 %)	α-Terpineol (6,4 %)
Fenykl	87	68	13 (84,1 %)	11 (85,1 %)	Estragol (37,4 %)	Estragol (33,0 %)
					Fenchon 22,5 %)	Fenchon (26,5 %)
					p-Methoxy Cinnamaldehyd (7,0 %)	Eugenol (5,6 %)
					Eugenol (89,1 %)	Eugenol (92,7 %)
Hřebíček	98	80	9 (99,3 %)	9 (99,3 %)	Eugenyl acetát (9,3 %)	Eugenyl acetát (5,6 %)
					Chavikol (0,4 %)	Chavikol (0,4 %)

Legenda: HD – hydrosol získán hydrodestilací, SD – hydrosol získán parní destilací.

5.6.1.1 Chemická analýza hydrosolů z levandule

Celkem bylo v levandulových hydrosolech identifikováno 48 sloučenin, a to pomocí hmotnostní spektrometrie a porovnáním vypočtených retenčních indexů s údaji z literatury (Tabulka 11). Hlavní skupinou identifikovaných sloučenin byly oxidované monoterpeny. Největší rozdíl v chemickém složení levandulových hydrosolů byl zaznamenán v obsahu linaloolu (23,2 % v H_{HD_SPE} , resp. 7,9 % v H_{SD_SPE}). Linalool patří mezi hlavní sloučeniny obsažené v levandulových olejích. Další dominantní sloučeninou levandulových olejů byl linalylacetát. Hydrolyzou linalylacetátu však vzniká také linalool (Chlodwig a Novak, 2015), což může vést k vyššímu obsahu linaloolu v hydrosolech získaných hydrodestilací (HD). Poměrně vysoký rozdíl byl pozorován v poměru derivátů linaloolu k obsahu kumarinů. Dominantní sloučeninou v získaných hydrosolech byl 1,8-cineol (20,6 % v H_{SD_SPE} , resp. 19,5 % v H_{HD_SPE}), který je často popisovaný jako významná látka levandulových olejů (Politi et al., 2020).

Tabulka 11 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolech z levandule.

CAS	Sloučenina	RI	% celkové plochy píků	
			H_{SD_SPE}	H_{HD_SPE}
<i>Oxidované monoterpeny</i>				
7392-19-0	Bois de Rose oxide/Linaloyl oxid	968	0,19±0,05	0,11±0,01
54750-70-8	(E)-Dehydroxy linalool oxid	987	0,09±0,01	0,08±0,03
54750-69-5	(Z)-Dehydroxy linalool oxid	1004	0,10±0,02	<0,10
470-67-7	1,4-Cineol	1014	<0,10	<0,10
470-82-6	1,8-Cineol	1030	20,63±0,20	19,49±0,22
5989-33-3	(Z)-Linalool furanoxid	1070	11,93±0,19	7,85±0,12
34995-77-2	(E)-Linalool furanoxid	1086	9,11±0,01	5,86±0,09
78-70-6	Linalool	1101	7,91±0,14	23,24±0,25
29957-43-5	Hotrienol	1103	0,78±0,01	0,46±0,01
471-16-9	Sabinol	1139	0,13±0,01	0,16±0,01
76-22-2	Kafr	1144	0,42±0,01	0,45±0,01
---	Lilac aldehydový isomer (B or C)	1148	<0,10	<0,10
1786-08-9	Nerol oxid	1151	0,37±0,03	0,19±0,01
5986-38-9	(E)-Ocimenol	1154	<0,10	<0,10
513-20-2	Sabina keton	1158	<0,10	<0,10
30460-92-5	Pinocarvon	1160	<0,10	<0,10
53447-47-5	Lilac aldehyd D	1163	<0,10	<0,10
14009-71-3	(Z)-Linalool pyranoxid	1169	1,27±0,07	1,05±0,01
39028-58-5	(E)-Linalool pyranoxid	1174	1,03±0,07	0,8±0,01
562-74-3	4-Terpineol	1179	1,11±0,01	1,24±0,01
500-02-7	Cryptone	1185	0,94±0,05	0,8±0,01
13741-21-4	2,6-Dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol	1190	5,88±0,77	2,18±0,04
98-55-5	α -Terpineol	1194	10,36±0,41	12,97±0,14
80-57-9	Verbenon	1207	0,19±0,01	0,15±0,0

Legenda: H_{HD_SPE} – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný hydrodestilací, H_{SD_SPE} – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný parní destilací, RI – retenční index.

Tabulka 11 – Pokračování – Identifikované sloučeniny v 50× zakonzentrovaných hydrosolích z levandule.

CAS	Sloučenina	RI	% celkové plochy píků	
			H _{SD_SPE}	H _{HD_SPE}
1197-07-5	(E)-Carveol	1219	<0,10	<0,10
106-25-2	Nerol	1225	0,65±0,06	0,92±0,02
18675-34-8	Neodihydrocarveol	1231	5,87±0,78	4,94±0,11
122-03-2	Cuminaldehyd	1240	0,12±0,01	0,12±0,01
106-24-1	Geraniol	1252	1,00±0,09	2,34±0,02
51276-33-6	2,6-Dimethyl-1,7-octadien-3,6-diol	1273	1,11±0,16	0,25±0,01
536-60-7	Cumin alkohol	1291	0,41±0,06	0,34±0,01
39725-34-3	4-Hydroxy-crypton	1322	0,22±0,03	<0,10
160152-34-1	3-Oxo-p-menth-1-en-7-al	1336	0,12±0,01	<0,10
7712-46-1	8-Hydroxycarvotanaceton	1427	<0,10	<0,10
26184-88-3	α-Bisabolol oxide B	1653	0,13±0,01	0,13±0,01
3790-71-4	(2Z,6E)-Farnesol	1684	0,18±0,02	0,22±0,01
<i>Další sloučeniny</i>				
111-27-3	Hexyl alkohol	872	0,23±0,01	0,19±0,01
3391-86-4	1-Okten-3-ol	981	0,15±0,01	0,15±0,01
589-98-0	3-Oktanol	999	0,14±0,01	0,14±0,01
106-68-3	3-Oktanon	985	0,83±0,10	0,88±0,02
---	Cymen isomer	1022	<0,10	<0,10
1073-11-6	Lavender lakton	1035	0,84±0,04	2,00±0,02
1604-28-0	6-Methyl-3,5-heptadien-2-on	1103	0,62±0,01	0,73±0,02
24903-95-5	Nopinon	1137	0,15±0,01	0,13±0,01
97-53-0	Eugenol	1351	0,53±0,06	1,26±0,02
91-64-5	Kumarin	1432	3,60±0,54	0,82±0,01
17092-92-1	Dihydroactinidiolid	1524	<0,10	<0,10
531-59-9	7-Methoxykumarin (Hernianin)	1720	0,2±0,05	<0,10

Legenda: H_{HD_SPE} – 50× zakonzentrovaný hydrosol získaný hydrodestilací, H_{SD_SPE} – 50× zakonzentrovaný hydrosol získaný parní destilací, RI – retenční index.

5.6.1.2 Chemická analýza hydrosolů z vavřínu

V obou typech vavřínových hydrosolů bylo identifikováno celkem 33 sloučenin (Tabulka 12). Většina identifikovaných sloučenin patřila mezi oxidované monoterpeny. Majoritní sloučeninou byl 1,8-cineol, a to v obou typech hydrosolů. Esenciální olej z vavřínu obsahuje vysoké hladiny 1,8-cineolu, linaloolu, R-terpinylacetátu, ale také eugenolu, methyleugenolu a elemicinu (Diaz-Maroto et al., 2001; Lira et al., 2009).

Tabulka 12 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolech z vavřínu.

CAS	Sloučenina	RI	% celkové plochy píků	
			H _{SD_SPE}	H _{HD_SPE}
<i>Oxidované monoterpeny</i>				
470-67-7	1,4-Cineol	1014	<0,10	<0,10
470-82-6	1,8-Cineol	1030	56,38±0,35	54,05±0,63
78-70-6	Linalool	1099	0,30±0,04	0,52±0,01
29957-43-5	Hotrienol	1101	<0,10	<0,10
36262-12-1	Dehydrosabina keton	1120	0,10±0,01	0,10±0,01
471-16-9	Sabinol	1136	<0,10	<0,10
1786-08-9	Nerol oxid	1151	<0,10	<0,10
513-20-2	Sabina keton	1157	0,52±0,03	0,55±0,01
30460-92-5	Pinocarvon	1160	0,36±0,05	0,33±0,01
562-74-3	4-Terpineol	1178	5,97±0,79	7,10±0,08
13741-21-4	2,6-Dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol	1189	0,66±0,05	0,39±0,01
98-55-5	α-Terpineol	1193	4,97±0,30	6,37±0,09
80-57-9	Verbenon	1207	<0,10	<0,10
99-48-9	Carveol	1218	0,18±0,01	0,35±0,01
18679-48-6	2-Hydroxy-1,8-cineol	1225	0,36±0,02	0,46±0,01
22626-43-3	cis-p-Mentha-1(7),8-diene-2-ol	1228	0,45±0,01	0,82±0,01
494-99-5	Homoveratrol	1236	<0,10	<0,10
122-03-2	Cuminaldehyd	1240	<0,10	<0,10
51276-33-6	2,6-Dimethyl-1,7-octadien-3,6-diol	1272	0,40±0,05	0,15±0,01
536-60-7	Cumin alcohol	1288	0,74±0,07	1,34±0,02
89-83-8	Thymol	1298	0,16±0,02	0,13±0,01
22539-72-6	p-Mentha-1,4-dien-7-ol	1328	0,15±0,01	0,21±0,01
<i>Další sloučeniny</i>				
100-52-7	Benzaldehyd	960	<0,10	<0,10
110-93-0	6-Methyl-5-hepten-2-on	985	<0,10	0,15±0,01
1073-11-6	Lavender lakton	1037	<0,10	0,10±0,01
6090-09-1	Limona keton	1130	<0,10	<0,10
76-49-3	Bornyl acetát	1283	<0,10	<0,10
81781-24-0	1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-5-yl acetát	1337	1,00±0,02	1,20±0,04
97-53-0	Eugenol	1350	2,21±0,15	2,41±0,05
57709-95-2	1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-yl acetát	1357	0,13±0,01	0,13±0,01
121-33-5	Vanilin	1393	0,48±0,07	0,29±0,01
93-15-2	Methyleugenol	1399	1,82±0,10	1,72±0,04
17092-92-1	Dihydroactinidiolid	1524	0,15±0,01	0,11±0,01

Legenda: H_{HD_SPE} – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný hydrodestilací, H_{SD_SPE} – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný parní destilací, RI – retenční index.

5.6.1.3 Chemická analýza hydrosolů z fenyklu

Ve fenyklových hydrosolech bylo identifikováno celkem 13 sloučenin (Tabulka 13). Dominantními zaznamenanými sloučeninami byly estragol a fenchon, které tvořily téměř 60 % ze všech identifikovaných sloučenin. Estragol a fenchon patří mezi významné složky fenyklových esenciálních olejů (Mota et al., 2015; Pouryousef, 2014). Další významnou identifikovanou složkou fenyklových esenciálních olejů bývá v literatuře popisován (E)-anethol (Xiao et al., 2017).

Tabulka 13 – Identifikované sloučeniny v 50× zakonzentrovaných hydrosolech z fenyklu.

CAS	Sloučenina	RI	% celkové plochy píků	
			H _{SD_SPE}	H _{HD_SPE}
142-62-1	Kyselina kapronová	982	0,21±0,03	n.i.
470-82-6	1,8-Cineol	1030	2,78±0,02	3,83±0,10
122-78-1	Fenylacetaldehyd	1042	0,13±0,01	n.i.
1195-79-5	Fenchon	1086	22,51±0,12	26,53±0,15
78-70-6	Linalool	1099	0,27±0,01	0,21±0,01
76-22-2	Camphor	1144	0,66±0,01	0,85±0,08
140-67-0	Estragol	1196	37,38±0,46	33,01±0,09
99-48-9	Carveol	1218	2,55±0,01	2,33±0,01
99-49-0	Carvon	1242	2,20±0,01	2,28±0,02
123-11-5	p-Anisaldehyd	1253	5,17±0,05	5,46±0,19
97-53-0	Eugenol	1350	2,49±0,04	5,64±0,26
93-28-7	Eugenyl acetát	1513	0,75±0,03	1,02±0,04
1963-36-6	p-Methoxy Cinnamaldehyd	1567	7,05±0,24	3,99±0,13

Legenda: H_{HD_SPE} – 50× zakonzentrovaný hydrosol získaný hydrodestilací, H_{SD_SPE} – 50× zakonzentrovaný hydrosol získaný parní destilací, RI – retenční index; n.i. – bez identifikace.

5.6.1.4 Chemická analýza hydrosolů z hřebíčku

V hřebíčkových hydrosolech bylo identifikováno celkem 9 sloučenin (Tabulka 14). Hlavní identifikované sloučeniny patřily mezi fenolické deriváty, konkrétně se jednalo o eugenol (92,7 % v H_{HD_SPE}, 89,1 % v H_{SD_SPE}) a eugenylacetát (9,4 % v H_{HD_SPE}, 5,6 % v H_{SD_SPE}). Největší zastoupení eugenolu a eugenylacetátu potvrzuje i dřívější studie (Vanin et al., 2014). Eugenylacetát může hydrolyzovat za vzniku eugenolu. Eugenylacetát je podobný linalylacetátu, který je hydrolyzován také během hydrodestilace levandulového oleje.

Tabulka 14 – Identifikované sloučeniny v 50× zakoncentrovaných hydrosolích z hřebíčku.

CAS	Sloučenina	RI	% celkové plochy píků	
			H _{SD_SPE}	H _{HD_SPE}
97-53-0	Eugenol	1360	89,08±0,12	92,72±0,04
93-28-7	Eugenyl acetate	1516	9,35±0,09	5,56±0,05
501-92-8	Chavicol	1253	0,37±0,02	0,40±0,02
121-33-5	Vanilin	1393	0,30±0,01	0,36±0,02
458-36-6	Coniferyl aldehyde	1727	0,15±0,01	0,20±0,01
119-36-8	Methyl salicylate	1189	<0,10	<0,10
87-44-5	(E)-β-Caryophyllene	1417	<0,10	<0,10
6753-98-6	α-Caryophyllene	1451	<0,10	<0,10
120-51-4	Benzyl benzoate	1764	<0,10	<0,10

Legenda: H_{HD_SPE} – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný hydrodestilací, H_{SD_SPE} – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný parní destilací, RI – retenční index.

5.6.2 Antimikrobiální potenciál hydrosolů

Antimikrobiální účinnost připravených hydrosolů byla sledována diskovou difúzní metodou u osmi *Arcobacter*-like species (*Al. butzleri* LMG 10828, *Al. butzleri* CCUG 30484, *Al. butzleri* UPa 2012/3, *Al. cryaerophilus* CCM 7050, *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13, *Al. lanthieri* LMG 28517, *Al. skirrowii* LMG 6621 a *Al. thereius* LMG 24488). Antimikrobiální potenciál byl sledován i v případě některých dalších mikroorganismů (*S. aureus* CCM 4223, *E. faecalis* CCM 4224, *E. coli* CCM 3954, *P. aeruginosa* CCM 3955 a *C. albicans* CCM 8186). Všechny experimenty byly provedeny v případě hydrosolů bez další úpravy, avšak i u těch, které byly před testováním 50× zakoncentrovány pomocí SPE.

5.6.2.1 Antimikrobiální účinky nezakoncentrovaných hydrosolů

U většiny testovaných hydrosolů získaných parní destilací a hydrodestilací nebyla zaznamenána antimikrobiální aktivita proti sledovaným mikroorganismům. Z tohoto důvodu jsou data prezentována pouze v rámci příloh (Příloha 1 a 2). Žádný kmen *Arcobacter*-like species nebyl potlačen hydrosoly získanými z levandule, fenyklu či vavřínu. Avšak hydrosoly hřebíčku vykazovaly slabou antimikrobiální aktivitu vůči kmeni *Al. thereius* LMG 24488 (H_{HD} – inhibiční zóna 6,5±0,3 mm; H_{SD} – inhibiční zóna 6,8±0,4 mm). Slabá antimikrobiální aktivita hřebíčkového hydrosolu byla pozorována také u dalších Gram-negativních bakterií.

Všechny hydrosoly vykazovaly slabou antimikrobiální aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla pozorována v případě hydrosolů z fenyklu a hřebíčku. Kmen *E. faecalis* CCM 4224 byl inhibován zejména hydrosoly z vavřínu (H_{HD} – inhibiční zóna 7,8±1,3; H_{SD} – inhibiční zóna 7,8±0,5 mm), fenyklu (H_{HD} – inhibiční zóna 7,8±0,5; H_{SD} – inhibiční zóna 7,8±0,5 mm) i hřebíčku (H_{HD} – inhibiční zóna 7,5±0,5; H_{SD} –

inhibiční zóna $7,5 \pm 0,6$ mm). Kmen *C. albicans* CCM 8186 nebyl testovanými hydrosoly vůbec inhibován.

5.6.2.2 Antimikrobiální účinky 50× zakoncentrovaných hydrosolů

Hydrosoly po jejich zakoncentrování pomocí SPE vykazovaly významnou antimikrobiální aktivitu (viz Tabulky 15 a 16). Vyšší inhibiční účinek koncentrovaných hydrosolů byl evidentně částečně způsoben přítomností extrakčního činidla s jistým antimikrobiálním účinkem (ethanol). Byl však hodnocen i vliv samotného extrakčního činidla. Inhibiční zóny rozpouštědla byly zjištěny pouze v rozmezí 6,3–9 mm (MIC v rozmezí 1,6–12,5 %) v závislosti na testovaných kmenech (viz Tabulky 15 a 16).

Obecně lze říci, že většina hydrosolů získaných parní destilací vykazovala vyšší antimikrobiální účinky ve srovnání s hydrosoly získanými hydrodestilací. Koncentrované hydrosoly hřebíčku vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu ze všech testovaných vzorků.

Levandulový hydrosol získaný parní destilací vykazoval nejsilnější antimikrobiální aktivitu proti *Al. butzleri* CCUG 30484 a *Al. thereius* LMG 24488 ($13,5 \pm 0,6$, resp. $13,3 \pm 0,9$ mm inhibiční zóny). Naopak růst kmene *Al. butzleri* UPa 2012/3 více inhiboval hydrosol levandule získaný hydrodestilací (inhibiční zóna $12,8 \pm 0,3$ mm). Kmen *Al. butzleri* UPa 2012/3 byl naopak nejcitlivější na hydrosoly vavřínu a hřebíčku získané parní destilací (inhibiční zóny $14,0 \pm 0,8$, resp. $14,5 \pm 0,3$ mm). Nejvyšší rezistence *Arcobacter*-like species byla pozorována v případě fenyklového hydrosolu.

Životaschopnost *E. coli* byla taktéž nejvíce potlačena hydrosoly hřebíčku. Kmen *C. albicans* CCM 8186 nebyl inhibován ani koncentrovanými hydrosoly z levandule. Naopak růst této kvasinky byl potlačen vavřínovým hydrosolem získaným parní destilací. Avšak hřebíčkový hydrosol byl nejúčinnější v potlačení životaschopnosti *C. albicans* CCM 8186 (inhibiční zóna $23,5 \pm 0,7$ mm; MIC 1,6 %).

Tabulka 15 – Velikost inhibičních zón v mm (včetně disku o průměru 6 mm) ± standardní odchylka a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace v %, n=4, pro 50× zakoncentrované hydrosoly.

		<i>Ab</i> LMG 10828	<i>Ab</i> CCUG 30484	<i>Ab</i> UPa 2012/3	<i>Ac</i> CCM 7050	<i>Ac</i> UPa 2013/13	<i>Al</i> LMG 28517	<i>As</i> LMG 6621	<i>At</i> LMG 24488	
Levandule	IZ	HHD_SPE	9,5±0,3	8,8±0,3	12,8±0,3	8,3±0,5	8,0±0	11,3±1,0	9,0±0,8	11,5±0,3
		HSD_SPE	10,8±0,3	13,5±0,6	10,5±0,3	9,5±0,9	11,5±0,1	11,8±0,3	10,3±0,5	13,3±0,9
	MIC (MBC)	HHD_SPE	0,4/0,8	0,8/0,8	0,8/1,6	0,8/0,8	0,8/0,8	0,8/0,8	0,4/0,4	0,8/1,6
		HSD_SPE	0,4/0,4	0,4/0,8	1,6/1,6	0,4/0,8	0,4/0,4	0,4/0,8	0,4/0,4	0,4/0,8
Fenykl	IZ	HHD_SPE	7,8±0,2	9,0±0,8	10,5±0,9	9,8±0	8,5±1,3	10,8±0,5	7,8±0,5	12,0±0,1
		HSD_SPE	10,8±0	10,8±0,5	10,8±0,9	10,0±0,2	10,0±0,8	11,8±0	10,3±0,3	11,3±0,5
	MIC (MBC)	HHD_SPE	1,6/1,6	3,1/3,1	1,6/3,1	0,8/0,8	1,6/1,6	1,6/1,6	0,8/0,8	1,6/1,6
		HSD_SPE	0,8/1,6	1,6/3,1	1,6/1,6	0,4/0,8	0,8/0,8	0,8/1,6	0,4/0,4	0,8/0,8
Bobkový list	IZ	HHD_SPE	8,0±0,2	9,0±0,8	9,0±0	9,5±0,3	9,5±0,3	11,3±0,3	9,0±0,3	10,8±0
		HSD_SPE	10,5±0,3	9,5±0,6	14,0±0,8	10,3±0,3	10,0±0,3	10,5±0,6	12,5±0,7	13,3±0,6
	MIC (MBC)	HHD_SPE	1,6/1,6	1,6/1,6	1,6/3,1	0,8/1,6	0,8/1,6	1,6/3,1	1,6/3,1	1,6/1,6
		HSD_SPE	0,8/1,6	0,8/1,6	0,8/1,6	0,8/1,6	0,8/1,6	1,6/3,1	1,6/1,6	0,8/0,8
Hřebíček	IZ	HHD_SPE	10,5±0,3	12,0±0,9	13,0±0,6	10,5±0,3	14,3±0,5	12,0±0,6	12,0±0,9	14,8±0,5
		HSD_SPE	12,5±0,7	13,5±0,4	14,5±0,3	12,5±0,3	16,5±0,3	12,8±0,7	11,0±0,3	15,5±0,7
	MIC (MBC)	HHD_SPE	0,1/0,1	0,2/0,2	0,8/0,8	0,2/0,2	0,4/0,4	0,4/0,4	0,2/0,2	0,4/0,4
		HSD_SPE	0,1/0,1	0,1/0,1	0,8/0,8	0,1/0,1	0,1/0,1	0,4/0,4	0,1/0,1	0,2/0,4
Kontrola (EtOH)	IZ	8,0±0,8	7,7±0,5	7,7±0,5	8,0±0,8	7,0±0,8	6,7±0,5	8,3±0,5	8,0±0,8	
	MIC (MBC)	3,1/6,3	3,1/6,3	3,1/6,3	1,6/3,1	3,1/3,1	3,1/3,1	1,6/3,1	3,1/3,1	

Legenda: *HHD_SPE* – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný hydrodestilací; *HSD_SPE* – 50× zakoncentrovaný hydrosol získaný parní destilací; *Kontrola (EtOH)* – rozpouštědlo bez aktivních složek; *IZ* – inhibiční zóna; *MIC* – minimální inhibiční koncentrace; *MBC* – minimální baktericidní koncentrace; *Ab* – *Al. butzleri*; *Ac* – *Al. cryaerophilus*; *Al* – *Al. lanthieri*; *As* – *Al. skirrowii*; *At* – *Al. thereius*.

Tabulka 16 – Velikost inhibičních zón v mm (včetně disku o průměru 6 mm) ± standardní odchylka a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace v %, n=4, pro 50× zakoncentrované hydrosoly.

			<i>Sa</i> CCM 4223	<i>Ef</i> CCM 4224	<i>Pa</i> CCM 3955	<i>Ec</i> CCM 3954	<i>Ca</i> CCM 8186
Levandule	IZ	H _{HD_SPE}	8,5±0,7	7,5±0,6	8,5±0,4	8,8±0,5	6,0±0
		H _{SD_SPE}	8,3±0,5	9,5±0,3	10,5±0,3	9,0±0,3	6,0±0
	MIC (MBC)	H _{HD_SPE}	1,6/3,1	3,1/3,1	1,6/3,1	1,6/3,1	6,3/6,3
		H _{SD_SPE}	1,6/3,1	1,6/3,1	1,6/1,6	1,6/3,1	6,3/6,3
Fenykl	IZ	H _{HD_SPE}	10,8±0,9	9,3±0,9	11,0±0,8	11,3±0,5	10,5±0,6
		H _{SD_SPE}	11,3±0,7	15,0±0,1	11,5±0,8	11,5±0,3	11,8±0,7
	MIC (MBC)	H _{HD_SPE}	3,1/6,3	3,1/6,3	3,1/3,1	1,6/3,1	1,6/3,1
		H _{SD_SPE}	3,1/6,3	1,6/3,2	1,6/3,1	1,6/3,1	1,6/3,1
Bobkový list	IZ	H _{HD_SPE}	9,5±0,3	11,0±0,8	10,3±0,7	10,3±0,7	9,8±0,9
		H _{SD_SPE}	9,5±0,6	12,3±0,5	11,5±0,9	10,5±0,9	13,3±0,9
	MIC (MBC)	H _{HD_SPE}	1,6/1,6	6,3/12,5	1,6/3,1	3,1/6,3	1,6/3,1
		H _{SD_SPE}	1,6/1,6	6,3/6,3	3,1/6,3	1,6/3,1	0,4/0,8
Hřebíček	IZ	H _{HD_SPE}	15,8±0,7	15,3±0,3	11,3±0,1	13,5±0,7	14,8±0,4
		H _{SD_SPE}	15,5±0,9	18,8±0,9	12,8±0,7	14,0±0,8	23,5±0,7
	MIC (MBC)	H _{HD_SPE}	0,4/0,4	0,8/0,8	0,8/1,6	3,1/6,3	6,3/6,3
		H _{SD_SPE}	0,4/0,8	0,4/0,8	0,4/0,8	1,6/3,1	1,6/3,1
Kontrola (EtOH)	IZ		7,3±0,5	9,0±0,8	8,7±0,5	8,0±0	6,3±0,5
	MIC (MBC)		12,5/12,5	12,5/12,5	3,1/6,3	6,3/12,5	6,3/12,5

Legenda: H_{HD_SPE} – hydrosol získaný hydrodestilací 50× zakoncentrovaný pomocí SPE; H_{SD_SPE} – hydrosol získaná parní destilací 50× zakoncentrovaný pomocí SPE; Kontrola (EtOH) – rozpouštědlo bez aktivních složek; IZ – inhibiční zóna; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace; *Sa* – *S. aureus*; *Ef* – *E. faecalis*; *Pa* – *P. aeruginosa*; *Ec* – *E. coli*; *Ca* – *C. albicans*.

Tabulka 17 shrnuje výsledky inhibičních účinků běžných antimikrobiálních látek pro porovnání inhibičních zón antibiotik/antimykotik a hydrosolů. Z tabulky je patrné, že antimikrobiální účinky antibiotik jsou vyšší.

Tabulka 17 – Srovnání účinnosti antibiotik a antimykotik (inhibiční zóny v mm včetně disku o průměru 6 mm ± standardní odchylka), n=4.

	AMP	CIP	DA	E	TE	FCA
<i>Ab</i> CCUG 30484	6,0±0	43,5±2,1	7,5±0,7	37,5±0,7	31,5±2,1	<i>n.t.</i>
<i>Ab</i> LMG 10828	6,0±0	34,5±0,7	6,0±0	23,0±0	16,0±0	<i>n.t.</i>
<i>Ab</i> UPa 2012/3	6,0±0	39,0±1,4	6,0±0	29,0±1,4	24,0±1,4	<i>n.t.</i>
<i>Ac</i> CCM 7050	6,0±0	25,0±0	6,0±0	31,5±0,7	27,5±0,7	<i>n.t.</i>
<i>Ac</i> UPa 2013/13	6,0±0	36,5±0,7	6,0±0	30,5±0,7	29,0±1,4	<i>n.t.</i>
<i>Al</i> LMG 28517	6,0±0	37,0±1,4	6,0±0	22,0±2,8	17,5±0,7	<i>n.t.</i>
<i>As</i> LMG 6621	6,0±0	41,0±1,4	23,0±2,8	30,0±0	34,0±2,8	<i>n.t.</i>
<i>At</i> LMG 24488	6,0±0	32,5±0,7	35,5±0,7	11,0±0	35,0±0	<i>n.t.</i>
<i>Sa</i> CCM 4232	27,0±0	25,5±0,5	27,0±1,4	28,0±2,8	14,5±0,7	<i>n.t.</i>
<i>Ef</i> CCM 4224	13,0±0	22,0±0	7,0±0	17,5±0,7	29,0±1,4	<i>n.t.</i>
<i>Pa</i> CCM 3955	6,0±0	34,0±1,4	6,0±0	8,5±0,7	13,5±0,7	<i>n.t.</i>
<i>Ec</i> CCM 3954	6,0±0	31,0±1,4	6,0±0	9,5±0,7	20,5±0,7	<i>n.t.</i>
<i>Ca</i> CCM 8186	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	16,0±1,4

Legenda: AMP – ampicilin, CIP – ciprofloxacin, DA – klindamycin, E – erythromycin, TE – tetracyklin, FCA – fluconazol, *n.t.* – nestován; *Ab* – *Al. butzleri*; *Ac* – *Al. cryaerophilus*; *Al* – *Al. lanthieri*; *As* – *Al. skirrowii*; *At* – *Al. thereius*; *Sa* – *S. aureus*; *Ef* – *E. faecalis*; *Pa* – *P. aeruginosa*; *Ec* – *E. coli*; *Ca* – *C. albicans*.

Esenciální oleje jako přírodní extrakty a hydrosoly získané jako vedlejší produkty se mohou stát spolehlivými alternativami v antimikrobiální terapii. Je však nutné hledat vhodné alternativy k antimikrobiálním látkám (Nikolic et al., 2013). V literatuře nalezneme pouze omezené informace o antimikrobiálních účincích hydrosolů, jelikož mnoho studií popisuje právě antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů. Větší antimikrobiální aktivita EO je způsobena především vyšší koncentrací hlavních esenciálních složek. Důležité však je, že i získané hydrosoly mají stále antimikrobiální aktivitu (Bajer et al., 2017), a lze je tak dále používat, zejména v jejich koncentrované formě.

Již dříve bylo publikováno, že Gram-negativní bakterie jsou odolnější vůči esenciálním olejům ve srovnání s Gram-pozitivními bakteriemi (Trombetta et al., 2005). V případě Gram-pozitivních bakterií byla v rámci disertační práce pozorována slabá antimikrobiální aktivita sledovaných hydrosolů. Nejvyšší antimikrobiální účinnost na Gram-pozitivní bakterie byla pozorována v případě hydrosolů z fenyklu a hřebíčku. Podobné antimikrobiální účinky fenyklového esenciálního oleje a také extraktu byly uvedeny i v dřívějších publikacích (Kwiatkowski et al., 2017; Roby et al., 2013). Hřebíčkovým olejům a extraktům se přisuzují inhibiční účinky proti *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *E. coli* (De Oliveira et al., 2019). Také linalool je účinný proti širokému spektru mikroorganismů (Carson a Riley, 1995). A právě vysoký obsah linaloolu významně zvyšuje antimikrobiální účinky (Herman a Tambor, 2016). Získané výsledky dokazují, že připravené nekoncentrované hydrosoly nemají signifikantní

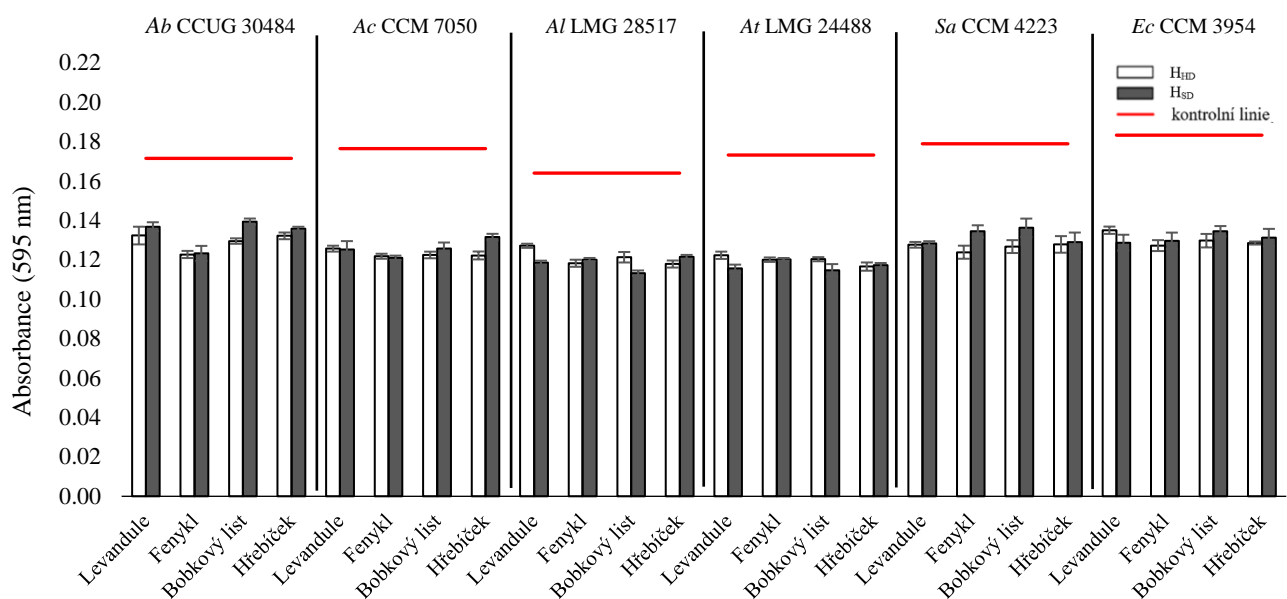
antimikrobiální potenciál proti testovaným mikroorganismům, což potvrzují i další studie (Kunicka-Styczynska et al., 2015; Lira et al., 2009; Smigielski et al., 2018).

Antimikrobiální účinky levandulového oleje i hydrosolu byly již dříve popsány v literatuře (Akhondzadeh et al., 2003; Lu et al., 2010; Verma et al., 2010). Taktéž eugenol a eugenylacetát mají vysoký antimikrobiální potenciál (Vanin et al., 2014) a právě tyto sloučeniny byly detekovány v hydrosolích vavřínu. Hydrosoly vavřínu se vyznačují zejména antifungální aktivitou (Sahan, 2011). Hydrosoly hřebíčku vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu ze všech testovaných matric. Hřebíček je velmi bohatým zdrojem různých antimikrobiálních látek (Cai a Wu, 1996). U jeho hlavní aromatické složky eugenolu byly popsány značné antimikrobiální a antifungální účinky (Chaieb et al., 2007; Ferreira et al. 2018; Lee a Shibamoto, 2001; Vanin et al., 2014). Antimikrobiální účinek hřebíčkového hydrosolu je mimo jiné podpořen i obsahem eugenylacetátu. V literatuře se uvádí, že začlenění acetátu do molekuly může zvýšit celkový antimikrobiální účinek (Dorman a Deans, 2000).

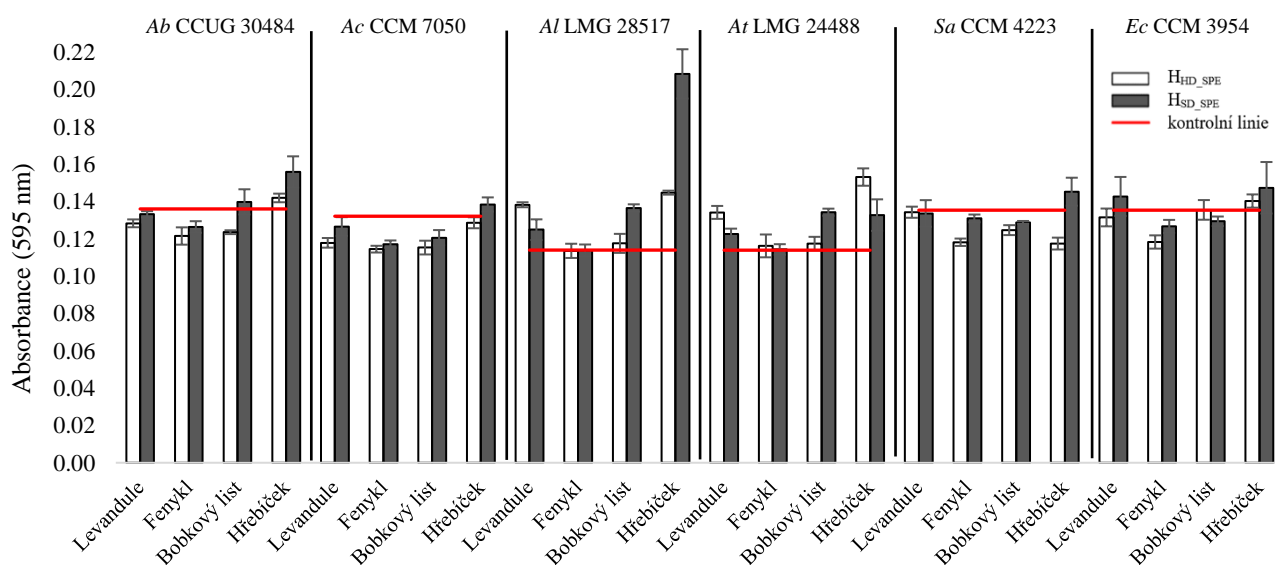
5.6.3 Biofilmová tvorba v prostředí hydrosolů

Tvorba biofilmu *Al. butzleri* CCUG 30484, *Al. cryaerophilus* CCM 7050, *Al. lanthieri* LMG 28517, *Al. thereius* LMG 24488, *S. aureus* CCM 4223 a *E. coli* CCM 3954 byla studována také v přítomnosti hydrosolů. Dle našich výsledků lze všechny použité mikrobiální kmeny považovat za biofilm-pozitivní. Některé kmeny vykazovaly významný pokles množství biofilmu vytvořeného v přítomnosti nekoncentrovaných hydrosolů. Např. biofilmová tvorba kmenů *Al. thereius* a *Al. lanthieri* poklesla v prostředí hydrosolu z vavřínu získaného parní destilací až o 35,9 % (Graf 3). Na druhé straně byla zjištěna mírně snížená biofilmová tvorba *Al. butzleri* (pokles až o 18,7 % v přítomnosti H_{SD} z vavřínu).

Výrazně odlišné výsledky byly získány v přítomnosti koncentrovaných hydrosolů. V případě koncentrovaných hydrosolů totiž byla u některých testovaných kmenů zjištěna zvýšená tvorba biofilmu ve srovnání s množstvím biofilmu vytvořeného v prostředí bez vzorku hydrosolu. Rychlé zvýšení schopnosti tvorby biofilmu bylo pozorováno v prostředí H_{SD_SPE} z hřebíčku např. u kmene *Al. lanthieri* LMG 28517 a u *Al. thereius* LMG 24488 (H_{SD_SPE} z hřebíčku). Tvorba biofilmu *Al. butzleri* CCUG 30484, *Al. cryaerophilus* CCM 7050 a *S. aureus* CCM 4223 však byla snížena (ve srovnání s dalšími kmeny) v prostředí koncentrovaných hydrosolů z levandule, fenyklu a vavřínu (Graf 4). Pro porovnání biofilmové tvorby *Arcobacter*-like species a dalších „modelových“ mikroorganismů jsou v Grafech 3 a 4 prezentována i data pro *Escherichia coli* CCM 3954 a *S. aureus* CCM 4223.



Graf 3 – Biofilmová tvorba v prostředí nekoncentrovaných hydrosolů. Sloupce H_{HD} představují hydrosoly získané hydrodestilací; H_{SD} – hydrosoly získané parní destilací. Červená linie – biofilmová tvorba kmenů ve vodě; hodnoty nad/pod červenou linií – zvýšená/snížená tvorba biofilmu v důsledku přítomnosti hydrosolů; Ab – *Al. butzleri*; Ac – *Al. cryaerophilus*; Al – *Al. lanthieri*; At – *Al. thereius*; Sa – *S. aureus*; Ec – *E. coli*.



Graf 4 – Biofilmová tvorba v prostředí 50× zakoncentrovaných hydrosolů. Sloupce H_{HD} představují hydrosoly získané hydrodestilací; H_{SD} – hydrosoly získané parní destilací. Červená linie – biofilmová tvorba kmenů v extrakčním rozpouštědle (EtOH); hodnoty nad/pod červenou linií – zvýšená/snížená tvorba biofilmu v důsledku přítomnosti hydrosolů; Ab – *Al. butzleri*; Ac – *Al. cryaerophilus*; Al – *Al. lanthieri*; At – *Al. thereius*; Sa – *S. aureus*; Ec – *E. coli*.

Charakterizace nových antimikrobiálních látek je velmi důležitá, jelikož odolnost mikroorganismů se stále zvyšuje. Inhibování planktonních buněk, ale také biofilmové tvorby, by přineslo značné benefity (Jabra-Rizk et al., 2006). Bakterie v prostředí biofilmu jsou odolnější než planktonní buňky (Waite et al., 2018) a velmi obtížně odstranitelné z různých povrchů či prostředí (Quave et al., 2008; Rasmussen a Givskov, 2006; Švarcová et al., 2022a). Za určitých okolností může zvýšenou tvorbu biofilmu vyvolávat také expozice látek s vyšším antimikrobiálním účinkem (Gomes et al., 2009).

V prostředí hydrosolů byla tvorba biofilmu snížena u všech testovaných kmenů narozdíl od tvorby biofilmu v prostředí bez přítomnosti hydrosolů. Rostlinné esenciální oleje i jejich komponenty mají často antimikrobiální potenciál a významně snižují tvorbu biofilmu (Palombo, 2011; Sandasi et al., 2008). Již dříve byl popsán antibiofilmový účinek esenciálních olejů levandule a hřebíčku (Bazargani a Rohloff, 2016). Bylo potvrzeno, že farnesol indukuje pokles produkce biofilmu (D'Amato et al., 2018). Chemickou analýzou byl zjištěn obsah farnesolu v hydrosolu z levandule, byť pouze v nízké koncentraci, ale zjevně se zajímavou antibiofilmovou aktivitou. Také bylo popsáno, že esenciální olej z koriandru a jeho hlavní složka (linalool) byla schopna inhibovat produkci mikrobiálního biofilmu *in vitro* (Duarte et al., 2016). Je známo, že kurkumin obecně zvyšuje citlivost některých kmenů (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* a *S. marcescens*) k antibiotikům a inhibuje biofilmovou tvorbu (Packiavathy et al., 2014). Zvýšenou tvorbu biofilmu v přítomnosti hřebíčkových hydrosolů lze vysvětlit reakcí na nepříznivé a stresové podmínky, jelikož ochrannou funkcí některých mikroorganismů je právě tvorba biofilmu (Kim et al., 2016; Oliveira et al., 2015).

5.7 Vliv olejových extraktů na *Arcobacter*-like species

5.7.1 Chemická analýza olejových extraktů

Olejové extrakty připravené dle popsaného postupu (viz kapitola 4.4.6.1) byly chemicky analyzovány pomocí HPLC-CoulArray. Tento vícekanálový elektrochemický detektor byl vybrán jako selektivní a citlivý analyzátor pro sloučeniny s elektrochemickým chováním (bioaktivní polyfenolické sloučeniny přítomné v olivových olejích).

Analýzou bylo zjištěno, že hydroxytyrosol, tyrosol a izomery i deriváty oleuropeinu jsou hlavními složkami pufrovaných i nepufrovaných vodných extraktů. Jednotlivé sloučeniny byly identifikovány porovnáním s retenčními časy a voltametrickým profilem proměřených standardních sloučenin. Obsah hydroxytyrosolu a tyrosolu byl stanoven metodou kalibrační křivky. Izomery a deriváty oleuropeinu byly vyjádřeny jako součet píků (Graf 5) a jejich obsah byl vztážen k oleuropeinu jako standardu. Pro jednotlivé sloučeniny byly také stanoveny limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ). Šum základní linie byl vždy vyhodnocen z pěti nástřiků slepého pokusu (mobilní fáze A). LOD byly stanoveny s použitím nižších koncentrací standardů pro S/N 3:1. Podobně byly vypočteny i LOQ z S/N 10:1. Hodnoty LOD a LOQ pro hydroxytyrosol, tyrosol a oleuropein spolu s kalibračními rozsahy, regresními rovnicemi a příslušnými korelačními koeficienty R^2 jsou shrnuty v Tabulce 18.

Tabulka 18 – Limity detekce a kvantifikace (LOD, resp. LOQ), kalibrační rozmezí, regresní rovnice a příslušné korelační faktory analyzovaných fenolických sloučenin.

	Standardy	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	Kalibrační rozmezí (mg/l)	Regresní rovnice	R^2
HPLC-CoulArray	Hydroxytyrosol	0,068	0,227	0,5–25,0	$y = 16,796x - 5,9317$	0,9714
	Tyrosol	0,025	0,168	0,5–25,0	$y = 17,622x + 18,891$	0,9654
	Oleuropein	0,126	0,423	0,5–25,0	$y = 3,833x + 0,1662$	0,9963

Legenda: LOD – limit detekce; LOQ – limit kvantifikace.

Obsah hydroxytyrosolu, tyrosolu a celkový obsah derivátů oleuropeinu byl kvantifikován v nepufrovaných (WEOO) i pufrovaných (BEOO) extraktech olivových olejů. Výsledky obsahu celkových polyfenolů a jednotlivých fenolických sloučenin jsou uvedeny v Tabulce 19 a 20. Celkový obsah polyfenolů byl měřen spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE v mg/l). Extrakty z extra panenského olivového oleje vykazovaly nejvyšší celkový obsah polyfenolů (43,50–93,23 mg/l), následované vzorkem směsného olivového oleje, pokrutinového oleje a rafinovaného olivového oleje.

Tabulka 19 – Celkový obsah polyfenolů (GAE mg/l) stanovený v různých olejových extraktech.

	Extra panenský olivový olej (Ballester)	Extra panenský olivový olej (Kyosos)	Směsný olivový a slunečnicový olej (Ondoliva)	Rafinovaný olivový olej (Borges)	Olej z pokrutin (Ondoliva)
WEEO	79,82 ± 5,04	43,50 ± 2,92	11,09 ± 0,80	0,36 ± 0,03	0,49 ± 0,02
BEOO	93,23 ± 2,84	49,05 ± 1,65	15,22 ± 0,80	0,43 ± 0,01	0,47 ± 0,01

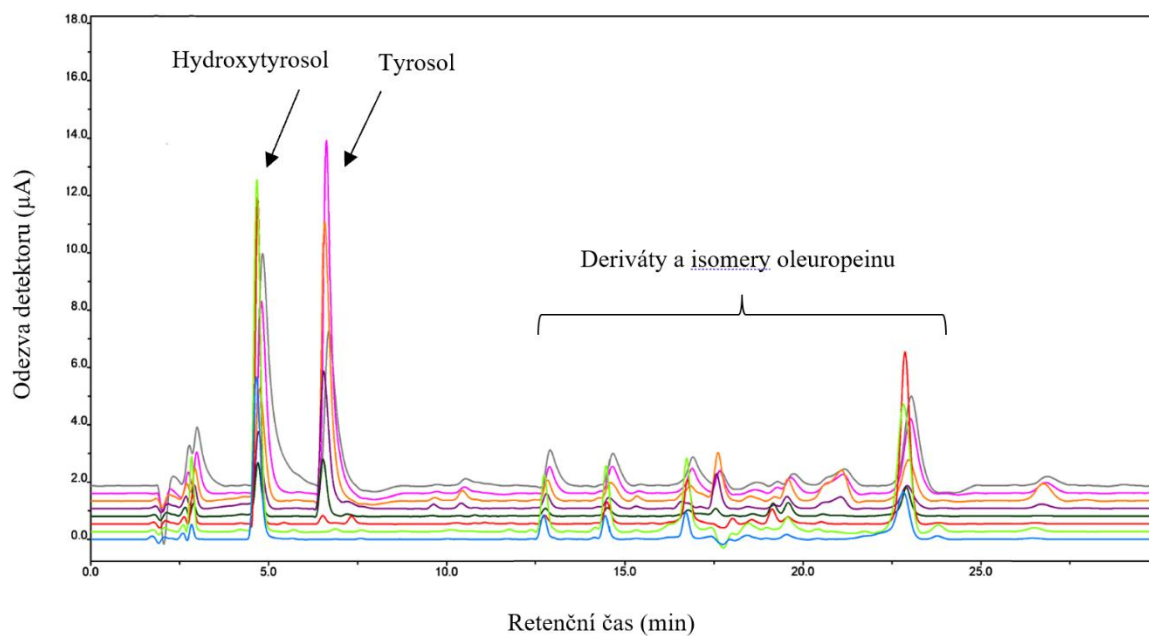
Legenda: WEEO – nepufrovaný vodný extrakt olivového oleje; BEOO – pufrovaný vodný extrakt olivového oleje.

Tabulka 20 – Obsah fenolických sloučenin v olejových extraktech stanovený pomocí HPLC-CoulArray (mg/l).

		Extraktoly olivových olejů				
		Extra panenský olivový olej (Ballester)	Extra panenský olivový olej (Kyosos)	Směsný olivový a slunečnicový olej (Ondoliva)	Rafinovaný olivový olej (Borges)	Olej z pokrutin (Ondoliva)
HPLC-CoulArray (WEEO)	Hydroxytyrosol	9,82 ± 0,12	9,01 ± 0,24	0,40 ± 0,01	<LOD	<LOD
	Tyrosol	8,93 ± 0,12	10,17 ± 0,06	<LOD	<LOD	<LOD
	Deriváty Oleuropeinu	52,64 ± 1,84	29,20 ± 1,95	0,99 ± 0,15	<LOD	<LOD
HPLC-CoulArray (BEOO)	Hydroxytyrosol	9,97 ± 1,81	7,97 ± 0,08	0,93 ± 0,08	<LOD	<LOD
	Tyrosol	12,30 ± 2,04	12,49 ± 0,72	2,70 ± 0,07	<LOD	<LOD
	Deriváty Oleuropeinu	10,26 ± 0,44	7,69 ± 0,01	0,79 ± 0,15	<LOD	<LOD

Legenda: WEEO – nepufrovaný vodný extrakt olivového oleje; BEOO – pufrovaný vodný extrakt olivového oleje.

Výsledné hodnoty celkového obsahu fenolických látek korespondují s detekovaným obsahem fenolických sloučenin pomocí HPLC-CoulArray. Obecně lze konstatovat, že byl celkový obsah polyfenolů vždy vyšší pro vzorky extrahované v PBS pufu (BEOO). Celkový obsah polyfenolů v extraktech extra panenského olivového oleje (Ballester, Kyosos) byl prakticky shodný se součtem sledovaných sloučenin stanoveným pomocí HPLC-CoulArray. Vodné extrakty extra panenských olivových olejů obsahovaly nejvyšší množství bioaktivních sloučenin, na které byly analýzy zaměřeny. Konkrétně bylo detekováno 71,4 mg/l aktivních látek ve španělském extra panenském olivovém oleji Ballester a 48,3 mg/l v řeckém extra panenském olivovém oleji Kyosos. Rafinovaný olivový olej měl velmi nízké množství sledovaných bioaktivních látek, a to pravděpodobně v důsledku jejich ztráty během procesu rafinace. Ve směsném olivovém a slunečnicovém oleji (Ondoliva) a také olivovém oleji z pokrutin (Ondoliva) nebyly sledované bioaktivní látky zaznamenány vůbec, resp. byly pod LOD.

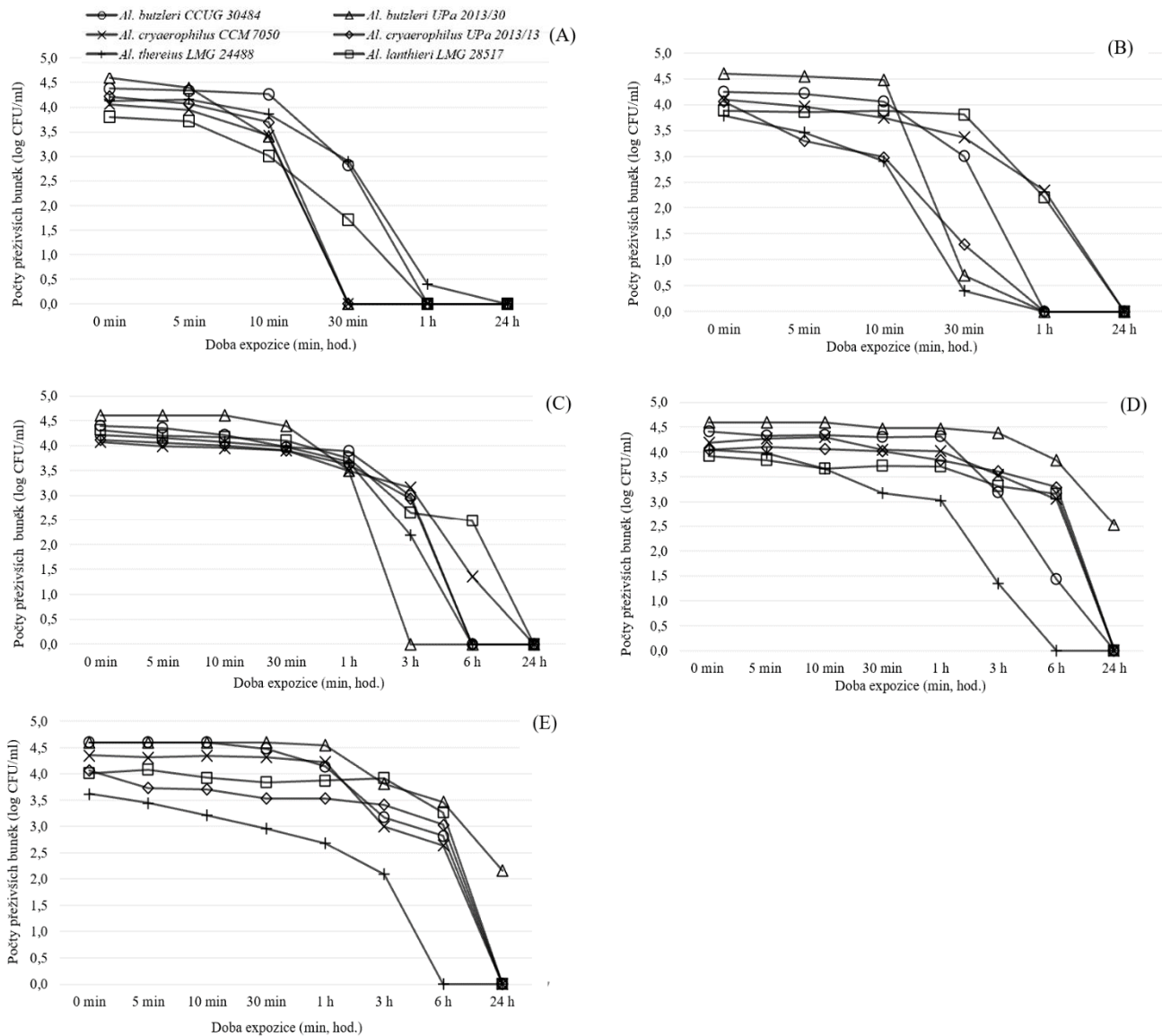


Graf 5 – Chromatografický záznam získaný pomocí HPLC-CoulArray (nepufrovaný extrakt z extra panenského olivového oleje Ballester). Chromatografické podmínky: Kolona Gemini C₁₈ (150×3 mm, 3 µm) kolona, MP A: 5 mM vodný roztok octanu amonného s kyselinou mravenčí (pH~3), MP B: acetonitril, průtok 0,4 ml/min, lineární gradientová eluce: 0–30 min: 5–60% MP B, dávkování 10 µl, teplota 40 °C, detekce při potenciálech 200–900 mV.

5.7.2 Vliv pufrovaných olejových extraktů na planktonní buňky

Antimikrobiální aktivita extraktů z olivového oleje byla pozorována u vybraných kmenů *Arcobacter*-like species (*Al. butzleri* CCUG 30484, *Al. butzleri* UPa 2013/30, *Al. cryaerophilus* CCM 7050, *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13, *Al. lanthieri* LMG 28517 a *Al. thereius* LMG 24488), viz Graf 6.

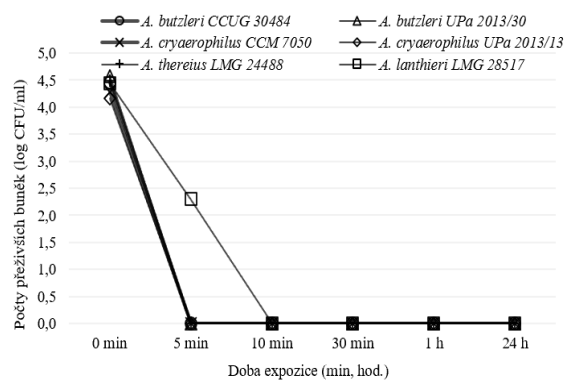
Nejsilnější antimikrobiální účinek byl pozorován u extraktů z extra panenského olivového oleje. Extrakty ze španělského extra panenského olivového oleje plně inhibovaly kmeny *Al. butzleri* UPa 2013/30, *Al. cryaerophilus* CCM 7050 a *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13, a to již po 30 min expozice. Kmen *Al. thereius* LMG 24488 dokázal přežít i expozici 60 min, avšak ve velmi malém počtu přeživších buněk. Mírně nižší antimikrobiální účinek byl pozorován u extraktu připraveného z řeckého extra panenského olivového oleje. V tomto případě byla kompletní inhibice většiny kmenů pozorována po expozici 60 min, výjimkou byly kmeny *Al. lanthieri* LMG 28517 a *Al. cryaerophilus* CCM 7050. Zajímavý rozdíl byl pozorován mezi kmeny *Al. cryaerophilus*. Izolát z odpadní vody (*Al. cryaerophilus* UPa 2013/13) byl citlivější na účinky extraktu z řeckého extra panenského olivového oleje v porovnání se sbírkovým kmenem téhož druhu (*Al. cryaerophilus* CCM 7050). Další olejové extrakty vykazovaly nižší antimikrobiální účinnost ve srovnání s extrakty z extra panenského olivového oleje. Extrakt ze směsného olivového oleje byl schopen inhibovat kmen *Al. butzleri* UPa 2013/30 až po 3 hod. expozice. Avšak po 30 min byl celkový pokles počtu životaschopných buněk pouze 0,2 log CFU/ml. V případě extraktu z rafinovaného olivového oleje byla úplná inhibice většiny testovaných kmenů pozorována až po 24 hod. expozice. Výjimkou byl kmen *Al. thereius* LMG 24488, u kterého byl pokles životaschopných buněk pozorován již po expozici 60 min a k úplné inhibici došlo až po 6 hod. expozice. Životaschopnost kmene *Al. butzleri* UPa 2013/30 nebyla potlačena ani po 24 hod. expozice. Extrakt z pokrutinového olivového oleje vykazoval nejnižší antimikrobiální účinnost ve srovnání se všemi ostatními pufrovanými olejovými extrakty. Nejcitlivějším kmenem byl *Al. thereius* LMG 24488, který byl inhibován po 6 hod. expozice extraktem z pokrutinového oleje.



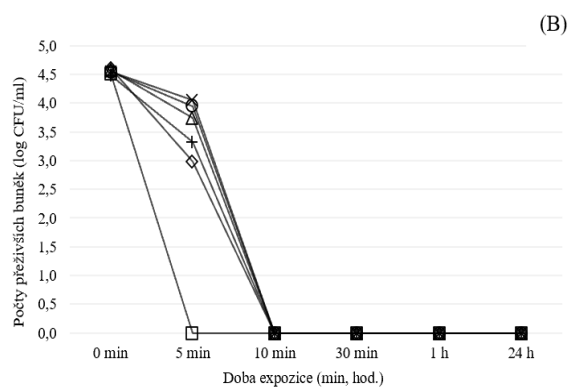
Graf 6 – Přežívání testovaných kmenů v přítomnosti 90% pufovaných olejových extraktů; (A) – extrakt ze špnělského extra panenského olivového oleje; (B) – extrakt z řeckého extra panenského olivového oleje; (C) – extrakt ze směsného olivového oleje; (D) – extrakt z rafinovaného oleje; (E) – extrakt z pokrutinového oleje; *Al* – *Aliarcobacter*.

5.7.3 Vliv nepufrovaných olejových extraktů na planktonní buňky

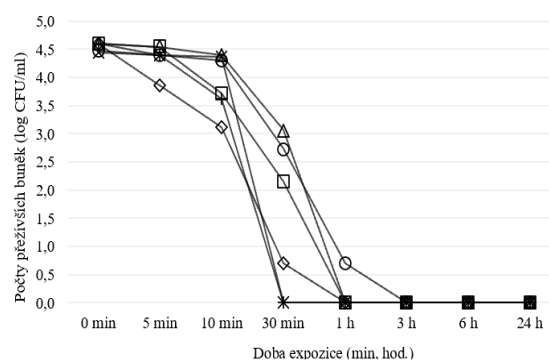
Vodný extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje vykazoval nejvyšší antimikrobiální účinnost (Graf 7). Extrakt z tohoto oleje byl schopen inhibovat většinu sledovaných kmenů již po 5 min expozice. Po této velmi krátké expozici se počet životaschopných buněk snížil až o 5 log CFU/ml. Jedinou výjimkou byl kmen *Al. lanthieri* LMG 28517, u kterého klesl počet životaschopných buněk o 2 log CFU/ml po 5 min expozice, avšak po 10 min expozice byly buňky již zcela devitalizovány. Extrakt ze směsného olivového oleje inhiboval kmene *Arcobacter*-like species po expozici 30–180 min. Nejodolnějším kmenem byl *Al. butzleri* CCUG 30484, u kterého bylo přežívání pozorováno i po 60 min expozice, i když v počtech buněk již o 4 log řády nižším ve srovnání s výchozím počtem buněk. Extrakt z rafinovaného oleje velmi silně inhiboval kmene *Al. thereius* LMG 24488 a *Al. cryaerophilus* CCM 7050 (snížení o 4–5 log CFU/ml). Nejnižší antimikrobiální účinek byl pozorován u extraktu z pokrutinového olivového oleje, k úplné inhibici došlo až po 3–24 hod. expozice. Např. u kmene *Al. lanthieri* LMG 28517 nedošlo během 6 hod. expozice k téměř žádnému poklesu životaschopných buněk. Získané výsledky z chemických analýz potvrdily, že extrakty z extra panenských olivových olejů obsahovaly nejvíce bioaktivních sloučenin, což potvrzuje i testování antimikrobiální účinnosti olejových extraktů. Nejvyšší antimikrobiální účinek byl pozorován u extraktů z extra panenských olivových olejů a nejnižší antimikrobiální účinek byl zaznamenán u extraktu z pokrutinového olivového oleje.



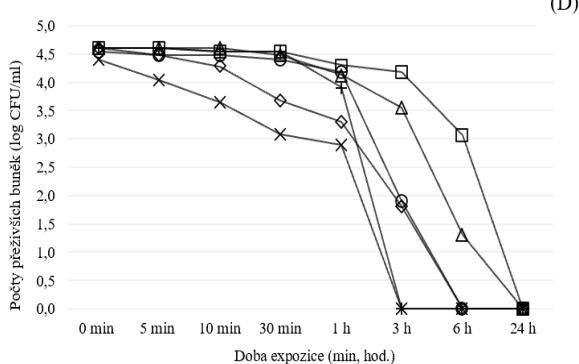
(A)



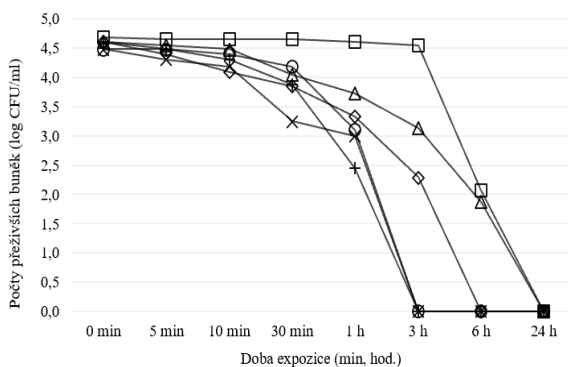
(B)



(C)



(D)



(E)

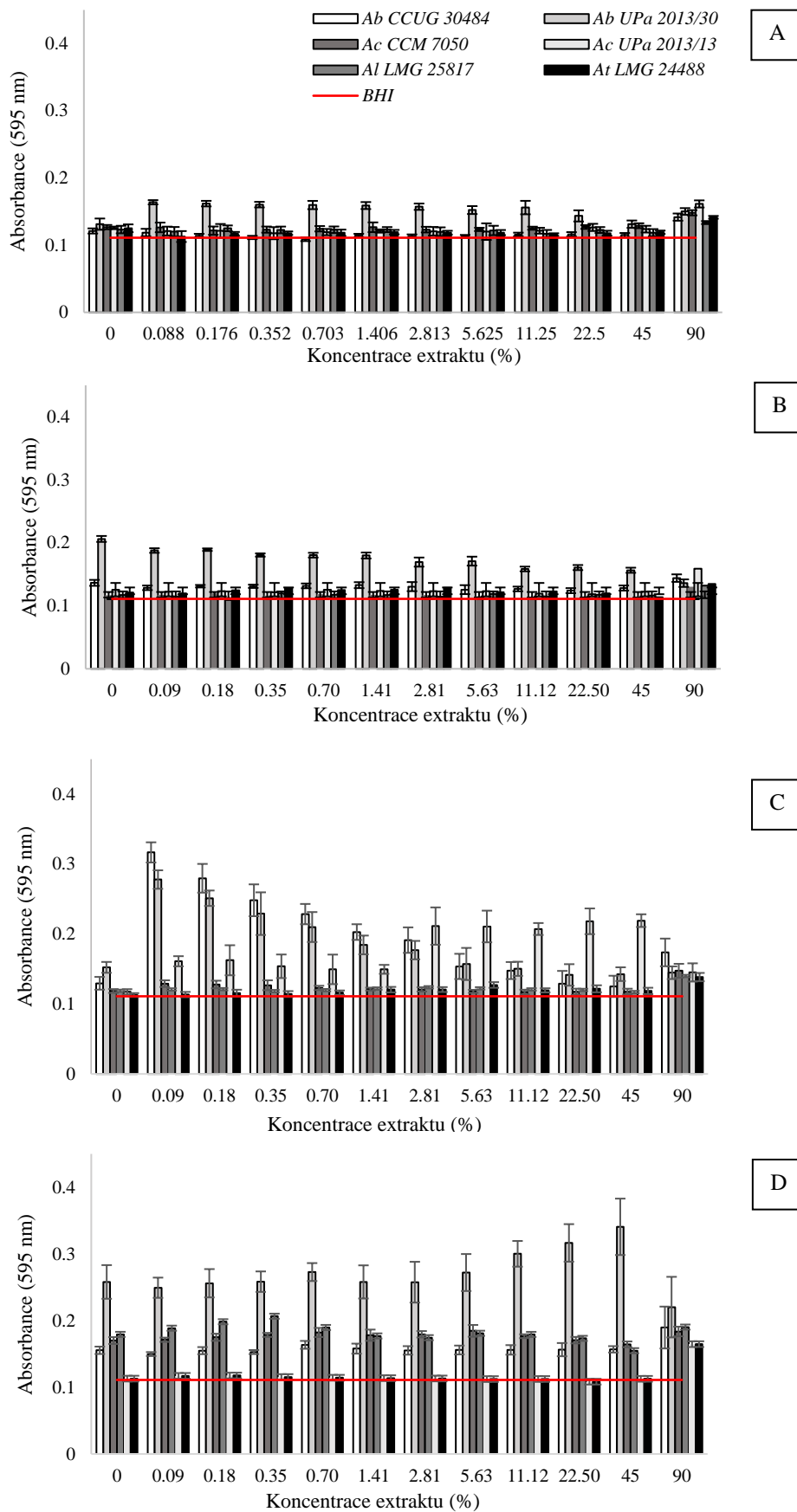
Graf 7 – Přežívání testovaných kmenů v přítomnosti 90% nepufrovaných olejových extraktů; (A) – extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje; (B) – extrakt z řeckého extra panenského olivového oleje; (C) – extrakt ze směsného olivového oleje; (D) – extrakt z rafinovaného oleje; (E) – extrakt z pokrutinového oleje; *Al* – *Aliarcobacter*.

Panenský olivový olej obsahuje značné množství fenolických sloučenin s příznivým vlivem na lidské zdraví na rozdíl od jiných jedlých rostlinných olejů (Funatogawa et al., 2004; Nohynek et al., 2006). Olivový olej dále vykazuje silný baktericidní účinek proti některým alimentárním patogenům (Medina et al., 2006; Nazzaro et al., 2019) a lze jej použít i jako konzervant (Medina et al., 2006). Stejně tak i extrakty připravené z olejů vykazují určité biologické vlastnosti (Brenes et al., 2007; Medina et al., 2006). Dostupná data z literatury potvrzují, že antibakteriální účinek panenského olivového oleje je obecně vyšší proti Gram-pozitivním bakteriím ve srovnání s Gram-negativními bakteriemi (Brenes et al., 2007; Gutierrez et al., 2008). Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zaznamenána v případě extra panenského olivového oleje, následována dalšími druhy olivových olejů a olejů z olivových pokrutin.

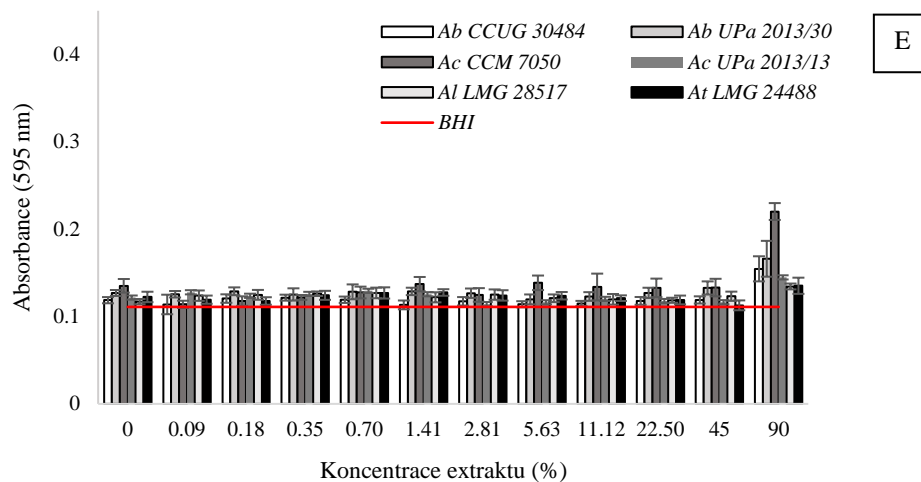
Antimikrobiální aktivita olivových olejů byla po mnoho let připisována zejména oleuropeinu a 2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethanolu (Furneri et al., 2004; Kubo et al., 1985; Perri et al., 1999). V posledních letech se antimikrobiální účinek přisuzuje dialdehydové formě aglykonu dekarboxymethyl oleuropeinu a dialdehydové formě dekarboxymethyl ligstrosidového aglykonu (Klikarová et al., 2019; Medina et al., 2006; Ríos et al., 2005). Tyrosol, hydroxytyrosol a deriváty oleuropeinu jsou hojně zastoupeny v olejových extraktech (Pereira et al., 2007).

5.7.4 Vliv pufrovaných olejových extraktů na tvorbu biofilmu

Schopnost tvořit biofilm byla sledována u vybraných kmenů *Arcobacter*-like species v přítomnosti různých koncentrací olejových extraktů (Graf 8). Lze konstatovat, že nejvyšší testovaná koncentrace olejových extraktů vedla obvykle ke zvýšené tvorbě biofilmu. To bylo pravděpodobně způsobeno zvýšeným stresem působícím na planktonní buňky, které již v této formě nemohly přežít a okamžitě se zaměřily na tvorbu bakteriálního biofilmu. Tvorba biofilmu u kmene *Al. butzleri* UPa 2013/30 se v různých koncentracích extraktů z extra panenských olivových olejů výrazně nezměnila. V přítomnosti extraktu ze směsného olivového oleje došlo k výraznému nárůstu tvorby biofilmu již při nejnižší testované koncentraci (0,1 %). Při vyšších koncentracích extraktu však došlo k signifikantnímu snížení tvorby biofilmu. Podobný trend byl pozorován také u kmene *Al. butzleri* CCUG 30484. V případě extraktu z rafinovaného olivového oleje došlo ke zvýšení tvorby biofilmu téměř v celém koncentračním rozmezí (0,1–90 %). Naopak u kmene *Al. butzleri* UPa 2013/30 byla zaznamenána zvyšující se tvorba biofilmu (0,1–45 %) v přítomnosti extraktu z rafinovaného olivového oleje. Inhibice tvorby biofilmu byla u kmene *Al. thereius* LMG 24488 pozorována v přítomnosti koncentrací extraktu z rafinovaného olivového oleje (0,1–45 %) a nízkých koncentrací extraktu ze směsného olivového oleje (0,1–0,7 %). Silný nárůst tvorby biofilmu byl pozorován u kmene *Al. cryaerophilus* CCM 7050 v prostředí extraktu z pokrutinového oleje, a to v nejvyšší koncentraci. V tomto případě došlo téměř ke zdvojnásobení tvorby biofilmu ve srovnání se stavem tvorby biofilmu bez vlivu olejového extraktu.



Graf 8 – Tvorba biofilmu v prostředí pufovaných olejových extraktů. (A) – extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje; (B) – extrakt z řeckého extra panenského olivového oleje; (C) – extrakt ze směsného olivového oleje; (D) – extrakt z rafinovaného oleje; (D) – extrakt z pokrutinového oleje. Ab – *Al. butzleri*; Ac – *Al. cryaerophilus*; Al – *Al. lanthieri*; At – *Al. thereius*. Horizontální linie představuje hodnotu pozadí BHI bujónu bez aktivních látek (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií – biofilm-pozitivita).

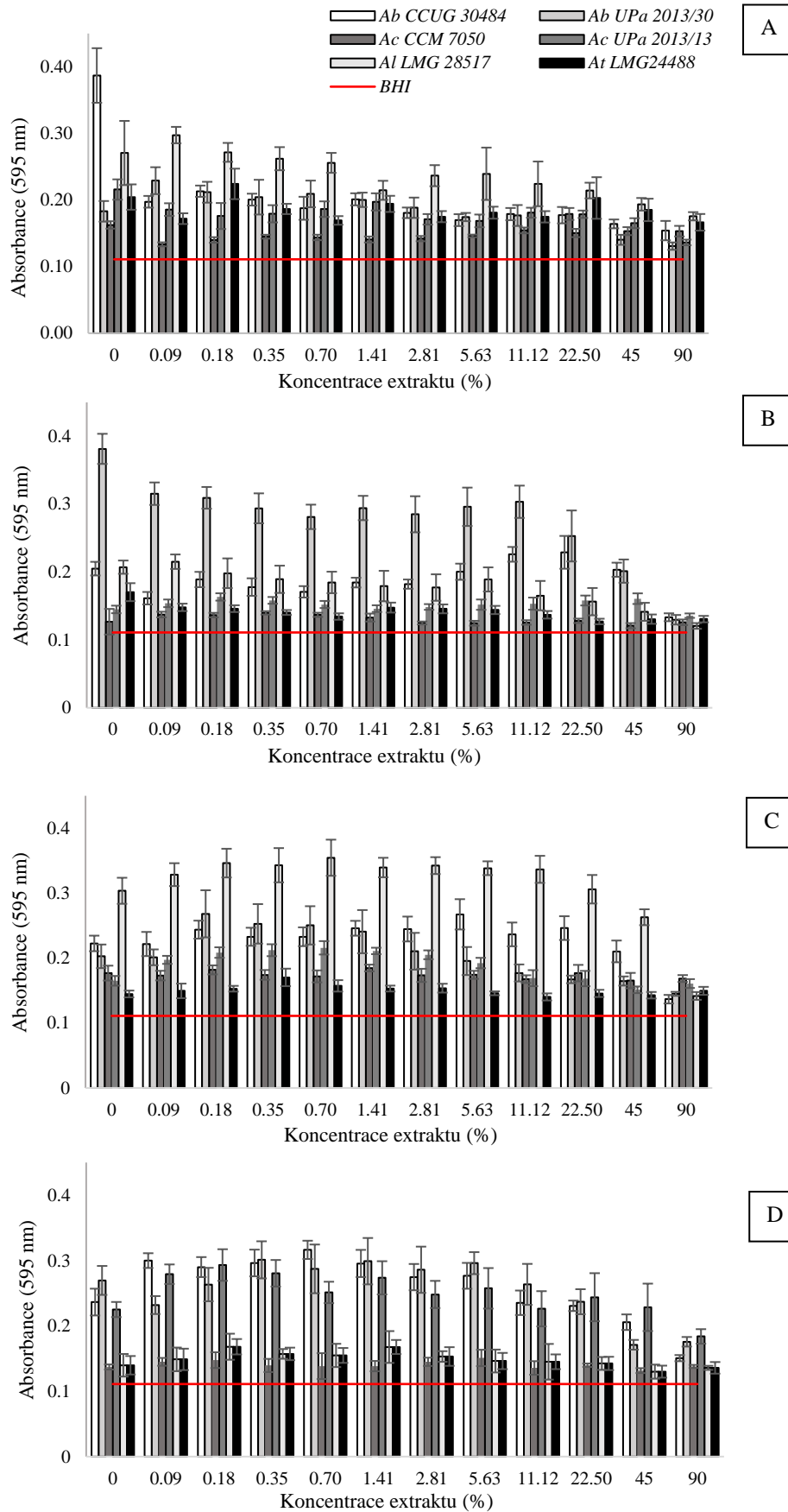


Graf 8 – Pokračování –Tvorba biofilmu v prostředí pufrovaných olejových extraktů. (A) – extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje; (B) – extrakt z řeckého extra panenského olivového oleje; (C) – extrakt ze směsného olivového oleje; (D) – extrakt z rafinovaného oleje; (D) – extrakt z pokrutinového oleje. *Ab* – *Al. butzleri*; *Ac* – *Al. cryaerophilus*; *Al* – *Al. lanthieri*; *At* – *Al. thereius*. Horizontální linie představuje hodnotu pozadí BHI bujónu bez aktivních látek (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií – biofilm-pozitivita).

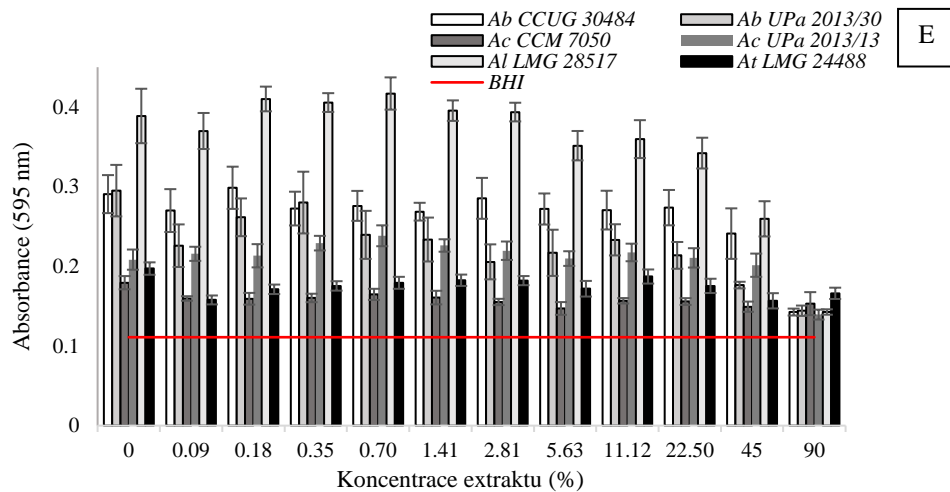
5.7.5 Vliv nepufrovaných olejových extraktů na tvorbu biofilmu

Důležitou roli má i hodnota pH připravených extraktů, která nebyla v případě nepufrovaných olejových extraktů nikterak upravena. Hodnota pH nepufrovaných extraktů byla v bazickém rozmezí (pH ~ 8,73) a může tak mít vliv na tvorbu biofilmu. Např. tvorba biofilmu kmene *Al. butzleri* UPa 2013/30 byla mnohonásobně zvýšená v prostředí extraktu ze španělského extra panenského olivového oleje a řeckého extra panenského olivového oleje. U tohoto kmene byla zaznamenána zvýšená tvorba biofilmu až o 50 % ve srovnání s tvorbou biofilmu bez vlivu extraktů z extra panenských olivových olejů. Velmi podobný trend byl pozorován u kmene *Al. lanthieri* LMG 28517, ten však netvořil biofilm v takové míře (Graf 9). Můžeme pozorovat, že v 90% olejových extraktech docházelo k výraznému snížení biofilmové tvorby, někdy tyto hodnoty dosahovaly až k limitu positivity tvorby biofilmu.

Některé *Arcobacter*-like species jsou schopny intenzivní tvorby biofilmu, dokonce i v přítomnosti olejových extraktů, které vykazují baktericidní účinek proti planktonním buňkám (Švarcová et al., 2022b). Naopak při nižších koncentracích extraktů byl pozorován významný nárůst tvorby biofilmu s postupným poklesem při vyšších koncentracích. V tomto případě se jedná o extrakty s vyšším inhibičním účinkem na planktonní buňky. Lze konstatovat, že jde o reakci mikroorganismů na nepříznivé podmínky prostředí (Šilha et al., 2021). Antimikrobiální a antibiofilmové účinky olivových olejů jsou vyšší než u jiných rostlinných olejů, pravděpodobně díky vysokému obsahu mastných kyselin, které přispívají k antimikrobiální aktivitě (Medina et al., 2006; Pereira et al., 2007). Fenolické sloučeniny jsou hlavním zdrojem sloučenin s antimikrobiálními účinky v olivových olejích, což potvrzuje mnoho dalších studií (Friedman et al., 2003; Furneri et al., 2004; Keceli a Robinson, 2002). Olivový olej z pokrutin obsahuje výrazně nižší obsah fenolických látek než ostatní oleje, což potvrzují i předchozí studie (Keceli a Robinson, 2002; Medina et al., 2006). Medina a jeho kolektiv (2006) publikovali, že vliv olejových extraktů na přežití vybraných mikroorganismů závisí na extrakčním činidle a jeho množství. Obsah fenolických sloučenin s antioxidační a antimikrobiální aktivitou v oleji nebo jeho extraktech také závisí na jejich polaritě a chemické struktuře (Friedman et al., 2003).



Graf 9 – Tvorba biofilmu v prostředí nepufrovaných olejových extraktech. (A) – extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje; (B) – extrakt z řeckého extra panenského olivového oleje; (C) – extrakt ze směsného olivového oleje; (D) – extrakt z rafinovaného oleje; (D) – extrakt z pokrutinového oleje. *Ab* – *Al. butzleri*; *Ac* – *Al. cryaerophilus*; *Al* – *Al. lanthieri*; *At* – *Al. thereius*. Horizontální linie představuje hodnotu pozadí BHI bujónu bez aktivních látek (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií – biofilm-pozitivita).



Graf 9 – Pokračování – Tvorba biofilmu v prostředí nepufrovaných olejových extraktech. (A) – extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje; (B) – extrakt z řeckého extra panenského olivového oleje; (C) – extrakt ze směsného olivového oleje; (D) – extrakt z rafinovaného oleje; (E) – extrakt z pokrutinového oleje. *Ab* – *Al. butzleri*; *Ac* – *Al. cryaerophilus*; *Al* – *Al. lanthieri*; *At* – *Al. thereius*. Horizontální linie představuje hodnotu pozadí BHI bujóny bez aktivních látek (hodnoty pod linií – biofilm-negativita; hodnoty nad linií – biofilm-pozitivita).

6 ZÁVĚR

Arcobacter-like species patří mezi potenciálně nebezpečné bakterie, a proto je vhodné monitorovat jejich výskyt. Je zapotřebí porozumět mechanismům patogenity a případně způsobům, jak ovlivnit přežívání těchto bakterií jak v planktonní formě, tak i ve formě biofilmu. Odolnost vůči antimikrobiálním látkám představuje hrozbu, zejména v případech, kdy se jedná o biofilmy, jelikož bakterie v prostředí biofilmu jsou mnohonásobně rezistentnější než buňky planktonní.

Hlavním bodem této studie bylo hodnocení biofilmové tvorby testovaných mikroorganismů. Tvorba bakteriálního biofilmu byla sledována u 69 kmenů čeledi *Campylobacteraceae* a *Arcobacteraceae*. Množství vytvořeného biofilmu bylo hodnoceno v aerobní a mikroaerofilní atmosféře po 24 nebo 72 hod. kultivace na různém kultivačním povrchu. Výsledné hodnoty ukazují, že se kmeny mezi sebou významně liší v intenzitě i samotné tvorbě biofilmu. Jednotlivé bakteriální druhy se liší i v nárocích na kultivační podmínky a tím pádem i v kvantitě a kvalitě vytvořeného biofilmu. Nelze tedy jednoznačně říci, jaké podmínky jsou nejlepší pro formování biofilmu. Např. v případě kmene *Pd. defluvii* LMG 25694 bylo po 72 hod. kultivace v aerobním prostředí zaznamenáno zvýšení biofilmu o více než 80,0 %. Většina kmenů ale nevykazovala rozdíly v produkci biofilmu po 24 nebo 72 hod. expozice.

Dalším cílem této studie bylo hodnocení účinků několika druhů antimikrobiálních látek na planktonní buňky a tvorbu biofilmů *Arcobacter*-like species. Mezi testované látky s antimikrobiálním potenciálem byla vybrána komerčně dostupná antibiotika, hydrosoly získané parní destilací nebo hydrodestilací ze čtyř rostlinných matric a olejové extrakty získané extrakcí z olivových olejů různé kvality.

Citlivost k vybraným antibiotikům byla sledována celkem u 60 *Arcobacter*-like species. Výsledky potvrdily, že *Arcobacter*-like species byly citlivé na makrolidy, aminoglykosidy a chinolony. Erythromycin, gentamicin a ciprofloxacin byly vyhodnoceny jako neúčinnější antibiotika na potlačení *Arcobacter*-like species. Naopak u mnoha kmenů byla zaznamenána značná rezistence k linkosamidům, např. 88,3 % kmenů bylo rezistentních ke klindamycinu. Žádný kmen nevykazoval rezistenci k erythromycinu. Byla však potvrzena vysoká úroveň multirezistence. Z testovaných kmenů vykazovalo 15,0 % rezistenci ke kombinaci tří antibiotik, nejčastěji se jednalo o kombinaci ampicilinu, klindamycinu a tetracyklinu. Vyšší tvorba biofilmu byla také pozorována u kmenů v přítomnosti nižších koncentrací antibiotik. S vyšší

koncentrací antibiotik docházelo ke snížení biofilmové tvorby. Největší míra potlačení biofilmové tvorby *Arcobacter*-like species byla zaznamenána u ciprofloxacinu.

V hydrosolech z levandule byl nejčastěji zastoupenou sloučeninou 1,8-cineol a linalool. Stejně tak i v hydrosolech vavřínu byl dominantní sloučeninou v obou typech hydrosolů 1,8-cineol. Hlavní sloučeniny v hydrosolech fenyklu, estragol a fenchon, tvořily téměř polovinu obsahu fenyklových hydrosolů. Nejhojněji zastoupené sloučeniny identifikované v hřebíčkových hydrosolech byly eugenol a eugenylacetát. Antimikrobiální účinnost nekoncentrovaných i koncentrovaných hydrosolů byla hodnocena vůči 8 *Arcobacter*-like species a také *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Candida albicans* CCM 8186 pomocí diskové difúzní metody. U většiny testovaných nekoncentrovaných hydrosolů H_{HD} a H_{SD} nebyla zaznamenána žádná antimikrobiální aktivita proti sledovaným mikroorganismům, naopak koncentrované hydrosoly vykazovaly významnou antimikrobiální aktivitu. Rezistence *Arcobacter*-like species byla pozorována zejména k fenyklovému hydrosolu. Biofilmová tvorba kmenů v prostředí hydrosolů nebyla významně ovlivněna v případě nezakcentrovaných hydrosolů, avšak u koncentrovaných hydrosolů bylo zaznamenáno rychlé zvýšení tvorby biofilmu. Největší nárůst vytvořeného biofilmu byl zaznamenán v prostředí hydrosolu hřebíčku.

Dále byla sledována životaschopnost *Arcobacter*-like species v nepufrovaných (WEEO) a pufrovaných (BEEO) vodných extraktech olivových olejů. Extrakty olivových olejů různé kvality byly analyzovány pomocí HPLC s elektrochemickou CoulArray detekcí. Hlavní detekované složky byly hydroxytyrosol, tyrosol, izomery a deriváty oleuropeinu. Vodné extrakty extra panenských olivových olejů obsahovaly nejvyšší množství bioaktivních látek. Španělský extra panenský olivový olej obsahoval 71,4 mg/l biologicky aktivních látek a řecký extra panenský olivový olej obsahoval 48,3 mg/l biologicky aktivních látek. Ostatní extrakty vykazovaly velmi nízké množství sledovaných bioaktivních látek, u dvou olejů byly všechny sledované bioaktivní látky pod LOD. Nejsilnější antimikrobiální účinek byl pozorován u extraktů z extra panenských olivových olejů, což koresponduje s výsledky chemického složení připravených extraktů. *Arcobacter*-like species byly inhivovány pufrovanými extrakty ze španělského extra panenského olivového oleje již po 30 min expozice. Mírně nižší antimikrobiální účinek byl pozorován u extraktu z řeckého extra panenského olivového oleje. Další olejové extrakty vykazovaly nižší antimikrobiální účinnost ve srovnání s extrakty z extra panenských olivových olejů. Nepufrovaný extrakt ze španělského extra panenského olivového oleje inhiboval většinu *Arcobacter*-like species již po 5 min expozice. Kmen *Al. thereius* LMG

24488 dokázal přežít expozici 60 min v extraktech s nejvyšším obsahem antimikrobiálních látek. Extrakt ze směsného olivového oleje plně inhiboval kmeny *Arcobacter*-like species po expozici 30–180 min. Vyšší koncentrace extraktů z olivových olejů obvykle vedly ke zvýšené tvorbě biofilmu. V prostředí nejvyšší testované koncentrace nepufrovaných olejových extraktů však došlo k potlačení biofilmové tvorby. Pravděpodobně došlo ke zvýšení stresových podmínek pro planktonní buňky, které v této formě nemohly přežít a okamžitě se soustředily do odolnější formy biofilmu.

Tvorba biofilmu patří mezi významný faktor virulence, představuje potenciální nebezpečí a také značné riziko pro lidské zdraví. Neexistuje jediný mechanismus tvorby biofilmu, zdá se však, že v mnoha případech hraje roli buněčný stres. Plné pochopení tohoto procesu může pomoci vývoji nových antimikrobiálních látek, které by byly schopny potlačovat jeho tvorbu.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Abay, S., Kayman, T., Hizlisoy, H. and Fuat, A. In vitro Antibacterial Susceptibility of *Arcobacter butzleri* Isolated from Different Sources. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2011, 74, p. 613–616.
2. Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. and Chihib, N. E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*. 2014, 196(7), p. 453–472.
3. Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, *Carol Stream*. 2007.
4. Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G. and Novak, P. J. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(9), p. 2905–2910.
5. Akhondzadeh, S., Kashani, L., Fotouhi, A., Jarvandi, S., Mobaseri, M., Moin, M., Khani, M., Jamshidi, A.H., Baghalian, K. and Taghizadeh, M. Comparison of *Lavandula angustifolia* Mill. tincture and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized trial. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2003, 27, p. 123–127.
6. Andrews, D. L., Nann, T., Lipson, R. and Bradshaw, D. R. *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology*, 2nd Edition. 2019.
7. Angerosa F., d'Alessandro, N., Corana, F. and Mellerio, G. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1996, 736, p. 195–203.
8. Arciola, C. R., Baldassarri, L. and Montanaro, L. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *Journal of Biomedical Materials*. 2002, 59(3), p. 557–562.
9. Aski, S., Tabatabaei, H., Khoshbakht, M. and Raeisi, M. Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. isolated from cattle and sheep in Iran. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2016, 44, p. 37–40.
10. Assanta, M. A., Roy, D., Lemay, M. J. and Montpetit, D. Attachment of *Arcobacter butzleri*, a New Waterborne Pathogen, to Water Distribution Pipe Surfaces. *Journal of Food Protection*. 2002, 65, p. 1240–1247.
11. Atanasov, A., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E., Rollinger, J., Schuster, D., Breuss, J., Bochkov, V., Mihovilovic, M., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. and Stuppner, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*. 2015, 33(8), p. 1582–1614.
12. Bajer, T., Šilha, D., Ventura, K. and Bajerová, P. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. *Industrial Crops and Products*. 2017, 100, p. 95–105.
13. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46, p. 446–475.
14. Bardouniotis, E., Huddleston, W., Ceri, H. and Olson, M. E. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 203(2), p. 263–267.
15. Bassetti, M. and Righi, E. Multidrug – resistance bacteria: what is the threat? *The Hematology ASH education Programme*. 2013, 2013(1), p. 428–432.
16. Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G. and Karadogan, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 2004, 15(3), p. 169–172.
17. Bazargani, M. M. and Rohloff, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 2016, 61, p. 156–164.
18. Belletti, N., Sylvain, S., Kamdem, G., Tabanelli, R., Lanciotti, F. and Gardini, F. Modeling of combined effects of citral, linalool and β -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-

- based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 136, p. 283–289
19. Biosurface Technologies. [online]. Biofilm reactor and flow cells: ©1994 BioSurface Technologies Corporation [cit. 3.3.2023]. Dostupné z: <https://biofilms.biz/>
 20. Brenes, M., Medina, E., Romero, C. and De Castro, A. Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry Hi Tech*. 2007, 18(4), p. 6–8.
 21. Buchanan, R.L. and Edelson, S.G. pH-Dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *Journal of Food Protection*. 1999, 62, p. 211–218.
 22. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 94, p. 223–253.
 23. Cai, L. N. and Wu, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*. 1996, 59, p. 987–990.
 24. Carson, C. F. and Riley, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. 1995, 78, p. 264–269.
 25. Cattò, C. and Cappitelli, F. Testing polymer surfaces against biofilm: Where to start? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20 (15), p. 1–60.
 26. Ciofu, O., Rojo-Molinero, E., Macia, M. D. and Oliver, A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2017, 125, p. 304–319.
 27. CLSI. Autoverification of Medical Laboratory Results for Specific Disciplines, 1st ed. CLSI guideline AUTO15. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2019.
 28. Collado, L. and Figueras, M. J. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, 24(1), p. 174–192.
 29. Collado, L., Guarro, J. and Figueras, M. J. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*. 2009, 72(5), p. 1102–1106.
 30. Costa, D. and Iraola, G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019, 32(4), p. 1–24.
 31. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldweell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 1995, 49, p. 711–745.
 32. Costerton, J.W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999, 284, p. 1318–1322.
 33. Crémet, L., Corvec, S., Batard, E., Auger, M., Lopez, I., Pagniez, F., Dauvergne, S. and Caroff, N. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013, 75, p. 252–255.
 34. D'Amato S., Serio, A., Lopez, C. Ch. and Paparella, A. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food Applications. *Food Control*. 2018, 86, p. 126–137.
 35. Davey, M. E. and O'Toole, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, 64(4), p. 847–867.
 36. Davidson, P. M. and Zivanovic, S. The use of natural antimicrobials. *Food preservation techniques*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. 2003. ISBN 978-1-85573-530-9.
 37. Davidson, P. M. and Harrison, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*. 2002, 56(11), p. 69–78.
 38. Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. P., Costerton, J. W. and Greenberg, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998, 280(5361), p. 295–298.
 39. De Oliveira, S. P., Cunha, G. S. P., Prates, J. P. B., Fonseca, F. S. A., De Souza, K. S. S., Azevedo, A. M., Xavier, A., Santos, E. M. S., Santos, H. O. and De Almeida, A. C. Antimicrobial activity of essential oils extracted from clove and lemongrass against pathogenic bacteria isolated from bovine, swine and poultry feces. *Journal Semina Ciências Agrárias*. 2019, 40, p. 1937–1950.
 40. Debruyne, L., Gevers, D., Vandamme, P. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae* *Campylobacter*, 3rd ed. Edited by Nachamkin, I., Szymanski, C. M., Blaser, M. J. *ASM Press*, Washington, DC. 2008.
 41. Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. and Mauriello, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene,

- cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, p. 2745–2749.
42. Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H. and Xu, J. G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*. 2014, 35 (1), p. 109–116.
 43. Diaz-Maroto, M. C., Perez-Coello, M. S. and Cabezudo, M. D. Effect of drying method on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, p. 4520–4524.
 44. Dinesh, D. and Cheorun, J. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, 34, p. 96–108.
 45. Dobeš, M. a Hejlová, Š. Hygiena a technologie tuků a potravinářských polotovarů. Brno: Vysoká škola veterinární. 1988, p. 175.
 46. Dorman, H. J. D. and Deans, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 88, p. 308–316.
 47. Dostál, J., H. Bochořáková, H. Paulová, J. Sláma, J. Slanina, J. Tallová, J. Tomandl a Tomandlová, M. *Lékařská chemie II: Bioorganická chemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2012. ISBN 978-80-210-5538-4.
 48. Doudah, L., de Zutter, L., Bare, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O. and Houf, K. Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, 50(3), p. 735–741.
 49. Duan, K. and Suerette, M. G. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 las and rhl quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189(13), p. 4827–4836.
 50. Duarte, A., Alves, A. C.; Ferreira, S., Silva, F. and Domingues, F. C. Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*. 2015, 77, p. 244–250.
 51. Duarte, A., Luis, A., Oleastro, M. and Domingues, F. C. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*. 2016, 61, p. 115–122.
 52. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. and Merillon, J. M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57, p. 1768–1774.
 53. Durand, G. A., Raoult, D. and Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019, 53 (4), p. 371–382.
 54. Edris, A. E. Identification and Absolute Quantification of the Major Water-Soluble Aroma Components Isolated from the Hydrosols of Some Aromatic Plants. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 2009, 12(2), p. 155–161.
 55. EUCAST [online]. Disk diffusion methodology. ©The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST 2023. [12/2021]. Dostupné z: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/.
 56. Fanelli, F., Pinto Di, A., Mottola, A., Mule, G., Chieffi, D., Baruzzi, F. and Fusco, V. Genomic characterization of *Arcobacter butzleri* isolated from shellfish: Novel insight into antibiotic resistance and virulence determinants. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10, p. 1–17.
 57. Ferreira, F. M., Delmonte, C. C., Novato, T. L. P., Monteiro, C. M. O., Daemon, E., Vilela, F. M. P. and Amaral, M. P. H. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2018, 32, p. 41–47.
 58. Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J., Domingues, F. and Oleastro, M. Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, 162, p. 82–88.
 59. Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. and Domingues, F. C. Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*. 2014, 76, p. 19–25.

60. Fischer, G. H. and Paterek, E. *Campylobacter*. Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC. StatPearls Publishing 2021. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537033/?report=reader#_NBK537033_pubdet_
61. Foster R., Williamson, C. S. and Lunn, J. Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin*. 2009, 34(1), p. 4–47.
62. Foster, J. W. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Critical Reviews in Microbiology*. 1995, 21, p. 215–237.
63. Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1989, 42, p. 872–874.
64. Friedman, M., Henika, P. R. and Mandrell, R. E. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*. 2003, 66, p. 1811–1821.
65. Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H. and Hirai, Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannis derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology*. 2004, 48, p. 251–261.
66. Furneri, P. M., Piperno, A., Saija, A. and Bisignano, G. Antimicoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, 20, p. 293–296.
67. Gautret, P., Cramer, J. P., Field, V., Caumes, E., Jensenius, M., Gkrania-Klotsas, E., de Vries, P. J., Grobusch, M. P., Lopez-Velez, R., Castelli, F., Schlagenhaut, P., Hervius, Askling H., von Sonnenburg, F., Lalloo, D. G., Loutan, L., Rapp, C., Basto, F., Santos O'Connor, F., Weld, L. and Parola, P. Infectious diseases among travellers and migrants in Europe. *European Travel and Tropical Medicine Network*. 2012, 17(26), p. 1–11.
68. Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Muruaga, G., Carmona, S., Alonso, R. and Fernandez-Astorga, A. Study of Biofilm Formation Ability of Foodborne *Arcobacter butzleri* under Different Conditions. *Journal of Food Protection*. 2017, 80, p. 758–762.
69. Gomes, F. I. A., Teixeira, P., Azeredo, J. and Oliveira, R. Effect of Farnesol on Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*. 2009, 59, p. 118–122.
70. Goris T. and Diekert G. The Genus *Sulfurospirillum*. In: Adrian L., Löffler F. (eds) *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2016.
71. Gunther, N. W. and Chen, Ch-Y. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiology*. 2009, 26, p. 44–51.
72. Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection*. 2008, 71, p. 1846–1854.
73. Hajhashemi, V., Ghannadi, A. and Sharif, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, 89, p. 67–71.
74. Hamedí, A., Moheimani, S. M., Sakhteman, A., Etemadfard, H. and Moein, M. An overview on indications and chemical composition of aromatic waters (hydrosols) as functional beverages in Persian nutrition culture and folk medicine for hyperlipidemia and cardiovascular conditions. *Journal of Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017, p. 1–18.
75. Havlík, J. Makrolidová antibiotika a jejich využití v ambulanci praxi. *Medicína Pro Praxi*. 2010, 7 (10), p. 365–367.
76. Hayek, S. A., Gyawali, R. and Ibrahim, S. A. Antimicrobial natural products. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education*. 2013, p. 910–921.
77. Hefford, M. A., D'asous, S., Cyr, T. D., Austin, J. W., Sanders, G., Kheradpir, E., Kalmokoff and M. L. Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*. 2005, 51(3), p. 197–208.
78. Hemaiswarya, S., and Doble, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008, 15, p. 639–652.
79. Hera, A., Hoza, J., Konšťák, S., Marek, J., Marešová, V., Nyč, O., Sechser, T., Švihovec, J., Urbášková, P., Vlček, J. a Žemličková, H. Aminoglykosidy. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně. *Subkomise pro antibiotickou politiku (SKAP)*. 2016, p. 1–17.

80. Herman, A. and Tambor, K. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Current Microbiology*. 2016, 72, p. 165–172.
81. Hoa, T. K. H., Lipman, L. J. A., Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T. and Gaastra, W. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007, 50(1), p. 51–58.
82. Hochel, I. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. *Chemické Listy*. 2009, 103, p. 814–822.
83. Hoiby, N. A short history of microbial biofilms and biofilm Infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2017, 125, p. 272–275.
84. Holá, V., Růžička, F., Tejkalová, R. a Votava, M. Stanovení citlivosti k antibiotikům u biofilmopozitivních forem mikroorganismů. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2004, 10(5), s. 218–222.
85. Houf, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J. P., van Hoof, J. and Vandamme, P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microbial Drug Resistance*. 2004, 10, p. 243–247.
86. Hrušková, L., Mot'ková, P. and Vytrásová, J. Multiplex polymerase chain reaction using ethidium monoazide and propidium monoazide for distinguishing viable and dead cells of arcobacters in biofilm. *Canadian Journal of Microbiology*. 2013, 59, p. 797–802.
87. Hussien, J., Teshale, C. and Mohammed, J. Assessment of the antimicrobial effects of some Ethiopian aromatic spice and herb hydrosols. *International Journal of Pharmacology*. 2011, 7, p. 635–640.
88. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *myrtaceae*): A short review. *Phytotherapy Research*. 2007, 21, p. 501–506.
89. Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M. and Bernardi, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, 68(3), p. 605–612.
90. Chieffi, D., Fanelli F. and Fusco, V. *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020, 19, p. 2071–2109.
91. Chlodwig, F. and Novak, J. Sources of Essential Oils. In *Handbook of Essential Oils*; CRC ©2010 by Taylor and Francis Group, LLC. 2015, p. 39–71.
92. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985, 22(6), p. 996–1006.
93. ICMSF. Microorganisms in foods 7–microbiological testing in food safety management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2002. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
94. Inouye, S., Takahashi, M. and Abe, S. A comparative study on the composition of fourty four hydrosols and their essential oils. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*. 2008, 2, p. 89–104.
95. Inouye, S., Takahashi, M. and Abe, S. Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2009, 50, p. 243–251.
96. Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., James, C. E. and Shirliff, M. E. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006, 50, p. 1463–1469.
97. Japón-Luján R., Luque-Rodríguez, J. M. and Luque de Castro, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1108, p. 77–86.
98. Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M. and Man, S.M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015, 28(3), p. 687–720.

99. Kadlec P., Melzoch, K. a Voldřich, M. Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin. *Key Publishing*. 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.
100. Kalemba, D. and Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, 10(10), p. 813–829.
101. Kamble, V. A. and Patil, S. D. Spice-derived essential oils: effective antifungal and possible therapeutic agents. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2008, 14(3–4), p. 129–143.
102. Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *International Journal of Artificial Organs*. 2011, 34, p. 737–751.
103. Karampoula, F., Giaouris, E., Deschamps, J., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E. and Dubois-Brissonnet, F. Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against biofilms of *Salmonella Typhimurium*: Real-time visualization of bacterial inactivation by CLSM. *Applied Environmental Microbiology*. 2016, 82, p. 5309–5319.
104. Kayman, T., Abay, S., Hizlisoy, H., Atabay, H. İ., Diker, K. S. and Aydin, F. Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: Molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. *Journal of Medical Microbiology*. 2012, 10, p. 1439–1444.
105. Keceli, T. and Robinson, R. K. Antimicrobial activity of phenolic extracts from virgin olive oil. *Milchwissenschaft*. 2002, 57, p. 436–440.
106. Keener, K. M., Bashor, M. P., Curtis, P. A., Sheldon, B. W. and Kathariou, S. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2004, p. 105–116.
107. Kim, Y. G., Lee, J. H., Gwon, G., Kim, S. I., Park, J. G. and Lee, J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*. 2016, 6, p. 1–11.
108. Kjeldgaard, J., Jorgensen, K. and Ingmer, H. Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiol.* 2009, 131(2–3), p. 256–259.
109. Klikarová, J., Rotondo, A., Cacciola, F., Česlová, L., Dugo, P., Mondello, L. and Rigano, F. The Phenolic Fraction of Italian Extra Virgin Olive Oils: Elucidation Through Combined Liquid Chromatography and NMR Approaches. *Food Analytical Methods*. 2019, 12, p. 1759–1770.
110. Knobloch, J. K. M., Matthias, C., Horstkotte, A., Rohde, H. and Mack, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 2002, 191, p. 101–106.
111. Koné, A. P., Desjardins, Y., Gosselin, A., Cinq-Marsa, D., Guaya, F. and Saucier, L. Plant extracts and essential oil product as feed additives to control rabbit meat microbial quality. *Meat Science*. 2019, 150, p. 111–121.
112. Kubo, I., Matsumoto, A. and Takase, I. A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (*Oleaceae*). Is oleuropein a phytoalexin precursor? *Journal of Chemical Ecology*. 1985, 11, p. 251–263.
113. Kučerová J., Pelikán M. a Hřivna, L. *Zpracování a zbožíznalství rostlinných produktů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 2007. ISBN 978–80–7375–088–6.
114. Kunicka-Styczynska, A., Smigielski, K., Prusinowska, R., Rajkowska, K., Kusmider, B. and Sikora, M. Preservative activity of lavender hydrosols in moisturizing body gels. *Letters of Applied Microbiology*. 2015, 60 (1), p. 27–32.
115. Kwiatkowski, P., Mnichowska-Polanowska, M., Pruss, A., Masiuk, H., Dzieciol, M., Giedrys-Kalemba, S. and Sienkiewicz, M. The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers. *Burns*. 2017, 43, p. 1544–1551.
116. Labadie, C., Ginies, C., Guinebretiere, M. H., Renard, C. M. G. C., Cerutti, C. and Carlin, F. Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota. *Food Research International*. 2015, 76, p. 576–586.
117. Lastovica, A. J., Stephen, L. W. and On, L. Z. The Family *Campylobacteraceae*: The Prokaryotes. *Springer Berlin Heidelberg*. 2014, 11(20), p. 307–335.
118. Lebeaux, D., Chauhan, A. and Rendueles, O. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*, 2013, 2, p. 288–356.

119. Lee, K. G. and Shibamoto, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry. *Food Chemistry*. 2001, 74, p. 443–448.
120. Levican, A., Rubio-Arcos, S., Mastinez-Murica, A., Collado, L. and Figueras, M. J. *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015, 38(1), p. 30–35.
121. Lincová, D., Farghali, H., Kršiak, M., et al. Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé doplněné a přepracované vydání. 2007. Praha: Galén, 672 s., ISBN: 978-80-7262-373.
122. Linstrom, P. and Mallard, W. The NIST Chemistry WebBook [Internet]: A Chemical Data Resource on the. 2001. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2001.
123. Lira, P. D., Reeta, D., Tkacik, E., Ringuelet, J., Coussio, J. D., van Baren, C. and Bandoni, A. L. Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. *Industrial Crops and Products*. 2009, 30 (2), p. 259–264.
124. Lu, H., Li, H., Li, X. L. and Zhou, A. G. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 2010, 4, p. 309–313.
125. Mah, T. F. C. and O’Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001, 9(1), p. 34–39.
126. Maier, R. M., Pepper, I. L. and Gerba, C. P. Environmental Microbiology, Second Edition. 2009. ISBN: 978-0-12-370519-8.
127. Mani, I., Vasilieva, L. and Alexopoulou, A. Changing in epidemiology of bacterial infections in cirrhosis-The role of drug-resistant bacteria. *Acta Microbiologica Hellenica*. 2018, 63, p. 7–18.
128. Martelli, G. and Giacomini, D. “Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds.” *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, 158, p. 91–105.
129. Medina E., De Castro, A., Romero, C. and Brenes, M. Comparison of the concentration of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, p. 4954–4961.
130. Medina E., Romero, C., Brenes, M., De Castro, A. Antimicrobial Activity of Olive Oil, Vinegar, and Various Beverages against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*. 2007, 70(5), p. 1194–1199.
131. Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wosten, M. M., Ussery, D. W. and Mandrell, R. E. The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS ONE*. 2007, 2(12), p. 1–21.
132. Mohamed, A., El-Sayed, M. A., Hegazy, M. E., Helaly, S. E., Esmail, A. M. and Mohamed, N. S. Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Records of Natural Products*. 2010, 4 (1), p. 1–25.
133. Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D. A., Megraud, F. and Millar, B. C. *Campylobacter*. *Veterinary Research*. 2005, 36, p. 351–382.
134. Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Hernández, M. and Hernández, J. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(2), p. 1181–1186.
135. Mota, A. S., Martins, M. R., Arantes, S., Lopes, V. R., Bettencourt, E., Pombal, S., Gomes, A. C. and Silva, L. A. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* Fruits. *Natural Product Communications*. 2015, 10, p. 673–676.
136. Nachamkin I., Szymanski C. M. and Blaser M. J. *Campylobacter* (3rd Edition). *American Society for Microbiology*. 2008.
137. Nazzaro, F., Fratianni, F., Cozzolino, R., Martignetti, A., Malorni, L., De Feo, V., Cruz, A.G. and d’Acierno, A. Antibacterial Activity of Three Extra Virgin Olive Oils of the Campania Region, Southern Italy, Related to Their Polyphenol Content and Composition. *Microorganisms*. 2019, 7, p. 1–10.
138. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 2013, 6, p. 1451–1474.
139. Negi, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, p. 1567–17.

140. Nikolic, M., Markovic, T., Mojovic, M., Pejin, B., Savic, A., Peric, T., Markovic, D., Stevic, T. and Sokovic, M. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*. 2013, 49, p. 561–567.
141. Nohynek, L. J., Alakomi, H., Khäkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K. and Puupponen-Pimiä, R. H. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanism of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006, 54, p. 18–32.
142. Nuñez, L. and D' Aquino, M. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, p. 1255–1260.
143. Oliveira, N. M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W. M., Kolter, R., Kim, W. and Foster, K. R. Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS Biology*. 2015, 13, p. 1–23.
144. Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L. and Lacroix, M. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *Journal of Food Protection*. 2007, 70, p. 901–908.
145. Owen R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B. and Bartsch, H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*. 2000, 1, p. 107–112.
146. Ozturk, L., Tornuk, F., Caliskan-Aydigan, O., Zeki Durak, M. and Sagdiç, Ö. Decontamination of iceberg lettuce by some plant hydrosols. *Food Science and Technology*. 2016, 74, p. 48–54.
147. Packiavathy, I., Priya, S., Pandian, S. K. and Ravi, A. V. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*. 2014, 148, p. 453–460.
148. Palombo, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, p. 1–15.
149. Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E. and Jermakow, K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104, p. 1871–1881.
150. Panayotis S. R., Karathanos, V. T. and Mantzavinou, A. Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, p. 596–601.
151. Passerini de Rossi, B., García, C., Calenda, M., Vay, C. and Franco, M. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin on biofilms and planktonic cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009, 34, p. 260–264.
152. Pereira, A. P., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B.; Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. and Pereira, J. A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*. 2007, 12, p. 1153–1162.
153. Perez-Cataluna, A., Salas-Masso, N. and Figueras, M. J. *Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018, 68(4), p. 1258–1264.
154. Perez-Cataluna, A., Salas-Masso, N., Dieguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L. and Figueras, M. J. Erratum: Corrigendum: Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: Getting order from the caos. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10, p. 1.
155. Perri, E., Rafaelli, A. and Sindona, G. Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ion spray mass spectrometry-selected reaction monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47, p. 4156–4160.
156. Pichersky, E., Noel, J. P. and Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*. 2006, 311, p. 808–811.
157. Plastina P., Benincasa, C., Perri, E., Fazio, A., Augimeri, G. Poland, M., Witkamp, R. and Meijerink, J. Identification of hydroxytyrosyl oleate, a derivative of hydroxytyrosol with anti-inflammatory properties, in olive oil by-products. *Food Chemistry*. 2019, 249, p. 105–113.
158. Plyuta, V., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagoskina, N., Kuznetsov, A. and Khmel, I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2013, 121, p. 1073–1081.

159. Politi, M., Menghini, L., Conti, B., Bedini, S., Farina, P., Cioni, P. L., Braca, A. and De Leo, M. Reconsidering hydrosols as main products of aromatic plants manufactory: The lavandin (*Lavandula intermedia*) case study in Tuscany. *Molecules*. 2020, 25, p. 1–19.
160. Pouryousef, M. Variation in the essential oil constituents in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* from different locations of Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 2014, 26, p. 441–445.
161. Prakash, P., Singh, A., Achra, A., Singh, G. P.; Das, A. and Singh, R. K. Standardization and classification of In vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2017, 9, p. 93–101.
162. Preedy V. and R. Watson. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. *Academic Press*. 2010. ISBN:978-0-12-374420-3.
163. Quave, C. L., Plano, L. R., Pantuso, T. and Bennett, B. C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, 118, p. 418–428.
164. Rai, M., Paralikar, P., Jogee, P., Agarkar, G., Ingle, A. P., Derita, M. and Zacchino, S., Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, 519, p. 67–78.
165. Rajeswara Rao, B. R. Hydrosols and water-soluble essential oils: Medicinal and biological properties. Recent progress in medicinal plants. *Essential Oils*. 2013, 36, p. 119–140.
166. Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S. and Singh, R. K. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 2017, 37(1), p. 136–161.
167. Rasmussen, T. B. and Givskov, M. Quorum sensing inhibitors: A bargain of effects. *Microbiology*. 2006, 152, p. 895–904.
168. Rathlavath, S., Kohli, V., Singh, A. S., Lekshmi, M., Tripathi, G., Kumar, S. and Nayak, B. B. Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 263, p. 32–37.
169. Ravel, A., Nesbitt, A., Marshall, B., Sittler, N. and Pollari, F. Description and burden of travel-related cases caused by enteropathogens reported in a Canadian community. *Journal of Travel Medicine*. 2011, 18, p. 8–19.
170. Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H. and Joens, L. A. Characterization of *Campylobacter jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73, p. 1908–1913.
171. Ricotta, E. E., Palmer, A., Wymore, K., Clogher, P., Oosmanally, N., Robinson, T., Lathrop, S., Karr, J., Hatch, J., Dunn, J., Ryan, P., Blythe, D. Epidemiology and antimicrobial resistance of international travel-associated *Campylobacter* infections in the United States, 2005–2011. *American Journal of Public Health*. 2014, 104, p. 108–114.
172. Ríos, J. J., Gil, M. J. and Gutiérrez-Rosales, F. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1093, p. 167–176.
173. Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H. and Khalel, K. I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*. 2013, 44, p. 437–445.
174. Sagdic, O. and Ozcan, M., Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*. 2003, 14 (3), p. 141–143.
175. Sahan, Y. Effect of *Prunus laurocerasus* L. (Cherry laurel) leaf extracts on growth of bread spoilage fungi. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2011, 17, p. 83–92.
176. Sandasi, M., Leonard, C. M. and Viljoen, A. M. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, 50(1), p. 30–35.
177. Sandasi, M., Leonard, C. M., Viljoen, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. 2008, 19, p. 1070–1075.

178. Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J. and Reglero, G. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Antimicrobial Activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of Optimal Extraction Parameters. *Journal of Food Protection*. 2006, 69, (2), p. 369–375.
179. Scanlon, K. A., Cagney, C., Walsh, D., McNulty, D., Carroll, A., McNamara, E. B., McDowell, D. A. and Duffy, G. Occurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, 163, p. 6–13.
180. Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. and Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*. 2004, p. 113–127.
181. Shan, B., Cai, Yi-Z., Brooks, J. D. and Corke, H. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 117(1), p. 112–119.
182. Shashkova, S. and Leake, M. C. Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. *Bioscience Reports*. 2017, 37(4), p. 1–19.
183. Shutter, M. C. and Akhondi, H. Tetracycline. Treasure Island (FL). *StatPearls Publishing*. 2022.
184. Schumacher, W., Kroneck, P. M. H. and Pfennig, N. Comparative systematic study on *Spirillum*, *Campylobacter* and *Wolinella* species: description of *Spirillum* as *Sulfurospirillum deleyianum* gen. nov., spec. nov. *Archives of Microbiology*. 1992, 158, p. 287–293.
185. Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C. and Habibovic, P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018, 37(2), p. 187–208.
186. Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L. and Matos, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, 89, p. 277–283.
187. Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A. and Teixeira, P. *Campylobacter* spp. as a food borne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*. 2011, 2, p. 12.
188. Smid, E. J. and Gorris, L. G. M. Natural antimicrobials for food preservation, in Handbook of Food Preservation, Rhaman, M.S., Ed., Marcel Dekker, New York. 1999.
189. Smigielski, K. B., Prusinowska, R., Krosowiak, K. and Sikora, M. Comparison of qualitative and quantitative chemical composition of hydrolate and essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*). *The Journal of Essential Oil Research*. 2013, 25, p. 291–299.
190. Smigielski, K., Prusinowska, R., Stobiecka, A., Kunicka-Styczynska, A. and Gruska, R. Biological Properties and Chemical Composition of Essential Oils from Flowers and Aerial Parts of Lavender (*Lavandula angustifolia*). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2018, 21 (5), p. 1303–1314.
191. Sosa, A., Amábile-Cuevas, C. F., Byarugaba, D. K., Hsueh, P. R., Kariuki, S. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. 1. Aufl. Springer New York. 2010. doi:10.1007/978-0-387-89370-9.
192. Sowndhararajan, K., Deepa, P., Kim, M., Park, S. J. and Kim, S., A Review of the Composition of the Essential Oils and Biological Activities of Angelica Species. *Scientia Pharmaceutica*. 2017, 85 (3), p. 1–14.
193. Spížek, J., Řezanka, T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64, p. 455–464.
194. Stepanovic, S., Vukovic, D., Holá, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. and Růžička, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2007, 115, p. 891–899.
195. Šilha, D., Hrušková, L., Brožková, I., Mořková, P. and Vytřasová, J. Survival of selected bacteria from the genus *Arcobacter* on various metallic surfaces. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2014, 53, p. 217–223.
196. Šilha, D., Morávková, K., Škodová, G. and Vytřasová, J. Viability and biofilm formation of *Arcobacter* spp. at various processing temperatures. *Journal of Food*. 2019a, 58(3), p. 208–213.

197. Šilha, D., Pejchalová, M. and Šilhová, L. Susceptibility to 18 drugs and multidrug resistance of *Arcobacter* isolates from different sources within the Czech Republic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017, 9, p. 74–77.
198. Šilha, D., Širotková, S., Švarcová, K., Hofmeisterová, L., Koryčanová, K. and Šilhová, L. Biofilm Formation Ability of *Arcobacter*-Like and *Campylobacter* Strains under Different Conditions and on Food Processing Materials. *Microorganisms*. 2021, 9, p. 1–21.
199. Šilha, D., Šilhová, L., Vytrásová, J., Brožková, I. and Pejchalová, M. Survival of selected bacteria of *Arcobacter* genus in disinfectants and possibility of acquired secondary resistance to disinfectants. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2016, 5(4), p. 326–329.
200. Šilha, D., Šilhová-Hrušková, L. and Vytrásová, J. Modified isolation method of *Arcobacter* spp. from different environmental and food samples. *Folia Microbiologica*. 2015, 60(6), p. 515–521.
201. Šilha, D., Vacková, B. and Šilhová, L. Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic. *Folia Microbiologica*. 2019b, 64, p. 25–31.
202. Šilhová-Hrušková, L., Moťková, P., Šilha, D., Vytrásová, J. Detection of biofilm formation by selected pathogens relevant to the food industry. *Epidemiologie, Mikrobiologie a Imunologie*. 2015, 64, p. 169–175.
203. Švarcová, K., Hofmeisterová, L., Švecová, B. and Šilha, D. In Vitro Activity of Water Extracts of Olive Oil against Planktonic Cells and Biofilm Formation of *Arcobacter*-like Species. *Molecules*. 2022a, 27, p. 1–15.
204. Švarcová, K., Pejchalová, M. and Šilha, D. The Effect of Antibiotics on Planktonic Cells and Biofilm Formation Ability of Collected *Arcobacter*-like Strains and Strains Isolated within the Czech Republic. *Antibiotics*. 2022b, 11, p. 1–11.
205. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A. and Cliver, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 2010, p. 1199–1121.
206. Teh, K. H., Flint, S. and French, N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 143, p. 118–124.
207. Tezel, U. B., Akcelik, N., Yuksel, F. N., Karatuğ, N. and Akcelik, M. Effects of sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella* Infantis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016, 30, p. 1184–1191.
208. Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J. and Pandian, K.S. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2009, 57, p. 284–294.
209. Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. and Cullen, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food*. 2009, 57(14), p. 5987–6000.
210. Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdiç, Ö., Bayram, O. and Yetim, H. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 148, p. 30–35.
211. Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. and Bisignano, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, 49, p. 2474–2478.
212. Tsimidou M., G. Papadopoulos and Boskou, D. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil Part I. *Food Chemistry*, 1992, 45, p. 141–144.
213. Turina, A. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A. and Perillo, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. 2006, 122, p. 101–113.
214. Ursing, J. B., H. Lior, and Owen, R. J. Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, 44, p. 842–845.
215. Van Bambeke, F., Michot, J. M., Van Eldere, J. and Tulkens, P. M. Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005, 11 (4), p. 256–280.

216. Vandamme, P. and De Ley, J. Proposal for a New Family *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991b, 41(3), p. 451–455.
217. Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991a, 41(1), p. 88–103.
218. Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S. and Vandamme, P. *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*. 2004, 10(10), p. 1863–1867.
219. Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J. P. and Dediste, A. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, 57, p. 908–913.
220. Vanin, A. B., Orlando, T., Piazza, S. P., Puton, B. M. S., Cansian, R. L., Oliveira, D. and Paroul, N. Antimicrobial and antioxidant activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced by enzymatic esterification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 174, p. 1286–1298.
221. Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 2014, 1(3), p. 84–98.
222. Verma, R. S., Rahman, L. U., Chanotiya, C. S., Verma, R. K., Chauhan, A., Yadav, A., Singh, A. and Yadav, A. K. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2010, 75, p. 343–348.
223. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 2008, 19, p. 1130–1138.
224. Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Hugenholtz, P. and Addendum, P. Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8, p. 1–19.
225. Watnick, P. and Kolter, R. Minireview-Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*. 2000, 182(10), p. 2675–2679.
226. Wojnicz, D. and Tichaczek-Goska, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013, 44, p. 259–265.
227. Xiao, Z. B., Chen, J. Y., Niu, Y. W. and Chen, F. Characterization of the key odorants of fennel essential oils of different regions using GC-MS and GC-O combined with partial least squares regression. *Journal of Chromatography B*. 2017, 1063, p. 226–234.
228. Zhang, L., Liang, E., Cheng, Y. Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020, 128, p. 1–15.
229. Zheljaskov, V. D. and Astatkie, T. Effect of residual distillation water of 15 plants and three hormones on scotch spearmint (*Mentha x gracilis* Sole). *Industrial Crops and Products*. 2011, 33, p. 704–709.
230. Zhou, G., Wang, M., Wang, H., Chen, X., Gu, Y., Shao, Z., Zhang, J. and Zhang, M. Species classification and novel plasmid identifications in *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter cryaerophilus-like* organisms. *Frontiers Microbiology*. 2022, 13, p. 1–12.
231. Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A. and Leung, K.Y. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*. 2021, 15, p. 285–292.
232. Zukalová. Kvalita nejvýznamnějších pěstovaných olejnin v ČR (řepka, hořčice, slunečnice, mák). Prosperující olejny 2016: sborník přednášek a posterů. Praha *Agricultura – Scientia – Prosperitas*, 2016. s. 158.

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Antimikrobiální aktivita hydrosolů vůči <i>Arcobacter</i> -like species.....	119
Příloha 2 – Antimikrobiální aktivita hydrosolů vůči vybraným kmenům.....	120
Příloha 3 – Hydrodynamické voltamogramy – hydroxytyrosol, tyrosol a oleuropein.....	121

Příloha 1 – Antimikrobiální aktivita hydrosolů vůči *Arcobacter*-like species – odchylka inhibičních zón v mm (včetně disku o průměru 6 mm) ± standardní odchylka, n=4.

		Levandule	Fenykl	Bobkový list	Hřebíček
<i>Ab</i> LMG 10828	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>Ab</i> CCUG 30484	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>Ab</i> UPa 2012/3	H _{HD}	6,0±0,00	6,5±0,58	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,5±1,91	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>Ac</i> CCM 7050	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>Ac</i> UPa 2013/13	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>Al</i> LMG 28517	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>As</i> LMG 6621	H _{HD}	6,0±0,00	6,3±0,50	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>At</i> LMG 24488	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,5±0,58
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,8±0,50

Legenda: H_{HD} – hydrosol získaný hydrodestilací; H_{SD} – hydrosol získaná parní destilací; *Ab* – *A. butzleri*; *Ac* – *A. cryaerophilus*; *Al* – *A. lanthieri*; *As* – *A. skirrowii*; *At* – *A. thereius*.

Příloha 2 – Antimikrobiální aktivita hydrosolů vůči vybraným kmenům – odchylka inhibičních zón v mm (včetně disku o průměru 6 mm) ± standardní odchylka, n=4.

		Levandule	Fenykl	Bobkový list	Hřebíček
<i>Sa</i> CCM 4232	H _{HD}	6,5±0,58	8,0±0,00	7,3±0,50	7,8±0,50
	H _{SD}	6,8±0,96	8,0±0,00	7,3±0,50	8,3±0,96
<i>Ef</i> CCM 4224	H _{HD}	6,3±0,50	7,8±1,25	7,8±0,50	7,5±1,73
	H _{SD}	6,3±0,50	7,8±1,25	7,8±0,50	7,5±0,58
<i>Pa</i> CCM 3955	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	7,3±0,50
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	7,0±0,00
<i>Ec</i> CCM 3954	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	7,3±0,50
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	7,0±0,00
<i>Ca</i> CCM 8186	H _{HD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
	H _{SD}	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00

Legenda: H_{HD} – hydrosol získaný hydrodestilací; H_{SD} – hydrosol získaná parní destilací; *Sa* – *S. aureus*; *Ef* – *E. faecalis*; *Pa* – *P. aeruginosa*; *Ec* – *E. coli*; *Ca* – *C. albicans*.

Příloha 3 – Hydrodynamické voltamogramy – hydroxytyrosol, tyrosol a oleuropein.

