

VÝSKYT ARKOBAKTERŮ A JEJICH PŘEŽÍVÁNÍ V PŘÍTOMNOSTI VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Simona Kučerová, David Šilha a Jarmila Vytřasová

*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

Abstract

Bacteria of the genus *Arcobacter* can cause unpleasant diseases in humans and animals, therefore their occurrence in foodstuffs must be eliminated. Samples of food and different types of water were tested for an occurrence of arcobacters in this study. Their identification was carried out by using multiplex PCR. Resistance of the genus *Arcobacter* against extracts from natural substances was evaluated by diffusion method. Finally, the minimum inhibitory concentration of extracts was determined for some arcobacters. *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* have been chosen for the experiments (collection strains and isolates obtained from foodstuffs). All tested extracts from natural substances have caused inhibition of arcobacters. There were slight differences among the various tested strains. Clearly, the most effective were extracts from Sea buckthorn. To verify the inhibitory effect on bacteria of the genus *Arcobacter* the experiment in the real food was attempted.

Souhrn

Bakterie rodu *Arcobacter* mohou způsobit nepříjemná onemocnění nejen lidí, ale i zvířat, a proto je třeba jejich výskyt v potravinách eliminovat. V této studii byly testovány vzorky potravin a vod na přítomnost arkobakterů a prováděna jejich identifikace metodou multiplex PCR. Dále bylo ověřeno přežívání těchto mikroorganismů v přítomnosti extraktů z rostlinných matric difúzní metodou v jamce a následně byla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro jednotlivé extrakty. Pro experimenty byly zvoleny kmeny *Arcobacter cryaerophilus* a *Arcobacter butzleri*, a to jak sbírkové kmeny, tak izoláty získané z potravin. Všechny testované extrakty z přírodních látek působily na bakterie rodu *Arcobacter* inhibičně. Mezi jednotlivými testovanými kmeny byly nepatrné odlišnosti, ale jednoznačně nejúčinnější proti arkobakterům byly rakytníkové extrakty. Pro ověření inhibičního účinku tohoto extraktu na bakterie rodu *Arcobacter* byl proveden pokus v reálné potravíně.

1. Úvod

Bakterie rodu *Arcobacter*, dříve známé jako "aerotolerantní kampylobaktery", patří do čeledi *Campylobacteraceae* [1] a mají mnoho společných fyziologických, morfologických a genetických vlastností s rody *Campylobacter* a *Helicobacter*. Jedná se o gramnegativní spirálovité tyčinky, které mohou růst v mikroaerofilním prostředí [2]. Od blízkce příbuzných kampylobakterů se liší schopností růstu za aerobních podmínek a při teplotách nižších než 30 °C [1].

Rod *Arcobacter* v současné době zahrnuje již 22 druhů [3-5], z nichž některé mohou způsobit aborty, mastitidy a gastrointestinální poruchy u zvířat [6], také bakterémie, endokarditidy, peritonitidy a průjmy u lidí [7]. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. thereius* jsou druhy, které mohou ohrozit zdraví lidí, protože existuje jasné potvrzení o spojení těchto bakterií a humánních chorob, zejména střevních a septikémií [8,9].

I přes velký pokrok v medicíně a množství vědeckých poznatků jsou infekční nemoci stále nejčastější příčinou nemocnosti a úmrtnosti na celém světě [10]. V současné době je velkým problémem šíření infekčních onemocnění způsobených multiresistentními kmeny bakterií [11]. Také v případě bakteriálních izolátů se ukázalo, že se v posledních deseti letech značně zvýšila odolnost bakterií proti celé řadě antibiotik [12]. Proto jsou potřebné nové antimikrobiální látky nebo nové přístupy k boji s tímto problémem [13].

Historicky byly přírodní látky a jejich deriváty neocenitelným zdrojem terapeutických možností [14]. Přírodní produkty jsou stále považovány za hlavní zdroj nových léčebných prostředků s možností cíleně působit proti nepřebornému množství nemocí, včetně těch infekčních [15]. Antimikrobiální látky pocházející z rostlin jsou nejčastěji sekundární metabolity, z nichž většina jsou fenoly nebo jejich substituované deriváty. Tyto metabolity mají různá pozitiva včetně antimikrobiálních vlastností [16]. Kromě těchto sloučenin jsou za antimikrobiální aktivitu dále zodpovědné chinony, flavonoidy, kumariny, terpeny a alkaloidy [17].

Cílem této práce bylo ověření přežívání arkobakterů v přítomnosti extraktů z rostlinných matric, a to jak v případě sbírkových kmenů, tak i izolovaných kmenů z potravin. Pro testování byly zvoleny dva nejčastěji se vyskytující druhy bakterií tohoto rodu v prostředí České republiky [18].

2. Experimentální část

2.1 Izolace *Arcobacter* spp. ze vzorků

Pro izolaci *Arcobacter* spp. z potravin živočišného nebo rostlinného původu bylo naváženo 25 g vzorku do homogenizačního sáčku a přidáno 225 ml *Arcobacter* bujónu s CAT suplementem (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie). Po důkladné homogenizaci probíhalo pomnožení při 30 °C 48 hodin. Dalším krokem byla pasivní filtrace přes membránový filtr o průměru pórů 0,45 μm (Pall Corporation, Port Washington, USA). Filtr byl položen na TSA agar a na něj bylo po kapkách napipetováno 100 μl pomnožené suspenze. Pasivní prostup bakteriální mikroflóry trval 30 minut při laboratorní teplotě a poté byl filtr z agarového média odstraněn. Následovala další kultivace při 30 °C trvající 48 hodin. Presumptivní kolonie

Arcobacter spp. byly přeočkovány na TSA agar a po kultivaci identifikovány metodou m-PCR [19,20].

Izolace arkobakterů z vod byla prováděna obdobným postupem. Objem vzorku vody (1 ml) byl přímo zaočkován do 9 ml *Arcobacter* bujónu s CAT suplementem pro přímé pomnožení vzorku. Dále byla také prováděná membránová filtrace, při které bylo filtrováno 100 ml vody přes filtr o průměru pórů 0,45 μm . Tento filtr byl následně stočen do zkumavky s 9 ml *Arcobacter* bujónu s CAT suplementem a filtrát byl znovu přefiltrován přes filtr o průměru pórů 0,22 μm . S druhým membránovým filtrem se postupovalo stejně jako v předešlém případě. Po pomnožení následovala pasivní filtrace a detekce metodou m-PCR.

Analyzované vzorky potravin (maso, ryby, mořské plody a zelenina) byly zakoupeny v běžné obchodní síti v České republice. Vzorky vod byly odebrány z čističek odpadních vod (ČOV Havlíčkův Brod a Choteč) a povrchových vod z okolí Pardubic. Počet testovaných vzorků v závislosti na jejich typu je uveden v Grafu 1 i s uvedením počtu pozitivních vzorků.

2.2 Mikrobiální kmeny

Při testování byly použity kmeny *Arcobacter cryaerophilus* CCM 3934 pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně, *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku. Dále byl použit *Arcobacter cryaerophilus* 2015/16 (izolát z lososa) a *Arcobacter butzleri* 2015/6 (izolát z krůtího krku) ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Pardubice. Oba tyto kmeny byly izolovány z potravin v rámci této studie.

Tyto mikrobiální kultury byly uchovávány v tekutém BHI bujónu (HiMedia, Mumbai, Indie) v termostatu při 25 °C nebo naočkovány na TSA agaru (HiMedia) při chladničkové teplotě. Před vlastním experimentem byly kultury přeočkovány na TSA agar a kultivovány 48 hodin při 30 °C. Po kultivaci na TSA agaru byla připravena suspenze buněk ve fyziologickém roztoku odpovídající stupni č. 3 McFarlandovy zákalové stupnice ($9 \cdot 10^8$ cfu/ml). Suspenze byla dále naředěna (desítkové ředění ve fyziologickém roztoku) na přibližnou densitu buněk v řádu 10^7 cfu/ml, která byla používána pro testování. Pro ověření přesného počtu buněk v připravené buněčné suspenzi byla na Mueller-Hinton agar (HiMedia) vyočkována densita buněk 10^3 cfu/ml.

2.3 Extrakty z rostlinných matric

Rostliny, použité pro přípravu extraktů, byly zakoupeny v běžné obchodní síti České republiky nebo pocházely od drobných pěstitelů z okolí Pardubic. Specifikace části rostliny, která byla pro přípravu extraktu použita a jejich původ jsou uvedeny v Tabulce 1.

Navážka 20 g matrice byla opláchnuta destilovanou vodou, nakrájena na menší části a zalita 100 ml 96% ethanolu (Lach-ner, ČR). V uzavřené nádobě probíhalo louhování v temnu při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin za občasného promíchání. Poté byl extrakt zfiltrován přes filtrační papír (Whatman Grade 1), nalit do Petriho misek a umístěn do termostatu vyhřívaného na 37 °C. Po úplném odpaření rozpouštědla následovalo rozpuštění vysušeného extraktu v 15 ml dvou různých rozpouštědel- v 96% ethanolu a PBS pufru. Každý získaný extrakt byl nejprve sterilizován filtrací přes membránový filtr o průměru pórů 0,45 µm, nalit do sterilní plastové zkumavky a uchováván v temnu při teplotě 4 °C (maximálně 6 měsíců).

Tabulka 1. Vzorky rostlin použité pro přípravu extraktů

Typ rostliny	Původ	Část rostliny	Rozpouštědlo
Petržel hladkolistá	Itálie	list	ethanol
Mířík celer	ČR	bulva	ethanol
Zázvor lékařský	Čína	oddenek	ethanol
Kopr vonný	Itálie	list	ethanol
Máta peprná	Keňa	list	ethanol
Rakytník řešetlákový	ČR	bobule	ethanol / PBS pufr

2.4 Difúzní metoda v jamce pro testování antimikrobiální citlivosti

Přesný objem mikrobiální suspenze (2 ml) o přibližné densitě buněk 10^7 cfu/ml byl napipetován na Mueller-Hinton agar, rozlit po celém povrchu půdy a nechán při laboratorní teplotě 15 minut vsakovat. Po uplynutí této doby byla přebytečná suspenze odpipetována do odpadu a miska byla ponechána při laboratorní teplotě, aby se mikrobiální suspenze dostatečně vsákla do agaru. V dalším kroku byly do agarové plotny vyhloubeny jamky sterilním korkovrtem. Do jamky byl napipetován testovaný extrakt a misky byly inkubovány při 30 °C 48 hodin. V průběhu kultivace byla kontrolována hladina extraktů v jamkách, popřípadě byly extrakty doplněny. Po celé kultivaci následovalo odečtení velikostí inhibičních zón. Experiment byl proveden ve třech opakováních a výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z naměřených hodnot \pm směrodatná odchylka.

2.5 Stanovení MIC – mikrodiluční metoda

Zjištění minimální inhibiční koncentrace testovaného extraktu bylo provedeno v polyethylenové mikrotitrační destičce o 96 jamkách s plochým dnem (Nunclon™ delta

Surface, Dánsko). Do všech jamek bylo napipetováno 50 μ l Mueller-Hinton bujónu (HiMedia, Indie) a 50 μ l mikrobiální suspenze o densitě buněk 10^7 cfu/ml. Souběžně byl proveden také slepý pokus (pouze v Mueller-Hinton bujónu) pro ověření sterility živného média. Dále bylo do každé jamky přidáno 50 μ l extraktu, který byl různě naředěn Mueller-Hinton bujónem tak, aby v každé jamce byla jiná výsledná koncentrace testovaného extraktu (1 – 12 %). Po kultivaci při 30 °C trvající 48 hodin bylo provedeno vyočkování na Mueller-Hinton agar. MIC byla stanovena jako nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla, která inhibovala růst bakterií. Experiment byl proveden ve třech opakováních a výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ze získaných hodnot \pm směrodatná odchylka.

2.6 Antimikrobiální účinek v reálné potravíně

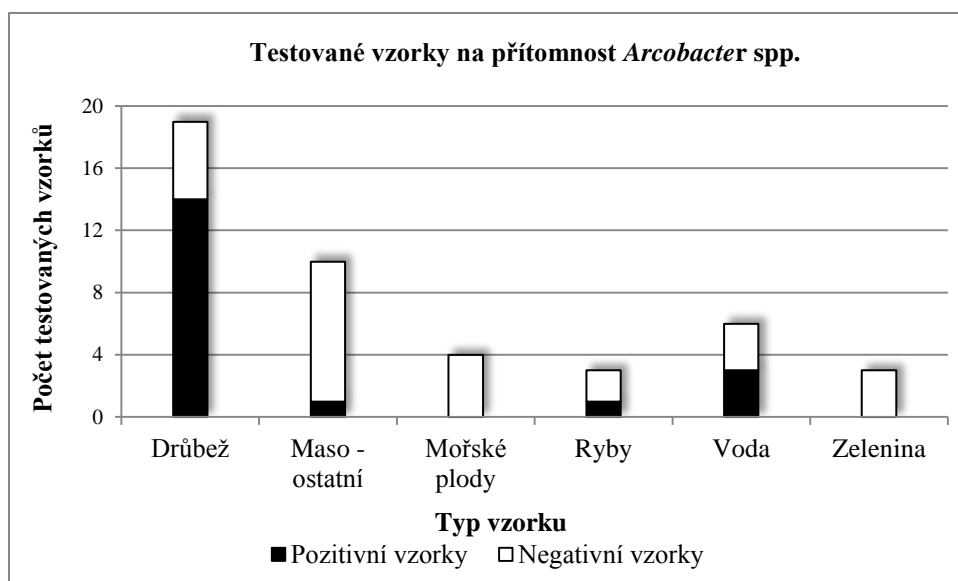
Jako vhodná potravina byla pro tento účel zvolena komerční masozeleninová dětská výživa (Hamé, Kunovice). K navážce 10 g sterilní dětské výživy bylo přidáno 100 μ l bakteriální suspenze *A. butzleri* CCUG 30484 o densitě buněk 10^7 cfu/ml, 4 ml rakytníkového extraktu v ethanolu, 40 ml fyziologického roztoku a vše bylo důkladně homogenizováno (primární směs). Z této původní směsi byla připravena tři ředění (směs byla naředěna 10 \times , 100 \times a 1000 \times fyziologickým roztokem). Z primární směsi i ze všech tří ředění bylo ihned 100 μ l inokulováno na Mueller-Hinton agary (čas t_0).

Připravená primární směs i všechna tři ředění byla dále uchovávána při 4 °C a po 48 hodinách bylo provedeno další vyočkování na nové Mueller-Hinton agary (čas t_1). Současně byl prováděn i slepý pokus bez přídavku 4 ml extraktu a pokus s čistým rozpouštědlem (přídavek 4 ml 96% ethanolu). Po kultivaci byl zhodnocen nárůst na miskách a byla pousouzena účinnost extraktu na arkobaktery v reálné potravíně. Experiment byl proveden ve dvou opakováních a výsledky jsou graficky znázorněny jako log počtu cfu/ml \pm směrodatná odchylka v závislosti na ředění směsi.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Izolace *Arcobacter* spp. ze vzorků

V rámci této práce bylo testováno celkem 45 vzorků. Jednalo se nejen o vzorky masa, ale i o vnitřnosti, ryby, mořské plody, zeleninu, odpadní a povrchové vody. Ze všech testovaných vzorků bylo celkem 19 vzorků pozitivních na přítomnost arkobakterů. U pozitivních zachytů se v 17 případech jednalo o *A. butzleri* a ve 2 případech o *A. cryaerophilus*. Obrázek 1 znázorňuje počet testovaných vzorků v závislosti na jejich typu. Viditelně jsou označeny i pozitivní a negativní záchyty bakterií rodu *Arcobacter*.



Obrázek 1. Poměr pozitivních a negativních vzorků testovaných na přítomnost *Arcobacter* spp.

Skutečnost, že ze vzorků potravin je nejčastěji izolován *A. butzleri* a *A. cryaerophilus*, byla prokázána i v další studii. Při těchto experimentech byl identifikován *A. butzleri* v 96 ze 122 případů. Zbýlých jedenáct izolátů bylo identifikováno jako *A. cryaerophilus* a patnáct jako *A. skirrowii* [21].

3.2 Difúzní metoda v jamce pro testování antimikrobiální citlivosti

Extrakty z rostlin, které byly vybrány jako vhodné pro testování antimikrobiální citlivosti na bakterie rodu *Arcobacter*, byly získány dle postupu, který je uvedený v Experimentální části. Po důkladném opláchnutí rostliny, jejím pokrácení, louhování v ethanolu a následném odpaření rozpouštědla do sucha byly všechny vysušené extrakty rozpuštěny jak v etanolu, tak v PBS pufru. Při prvních testech však bylo zjištěno, že extrakty rozpuštěné v PBS pufru nemají na arkobaktery žádný inhibiční účinek, s výjimkou extraktu z rakytníku. Z tohoto důvodu byly z testování vyřazeny a dále se pokračovalo pouze s extrakty rozpuštěnými v ethanolu, pouze v případě rakytníkových extraktů byly použity extrakty oba (v ethanolu i PBS pufru).

Je velmi pozitivní, že všechny testované extrakty působily na arkobaktery antimikrobiálně. Tabulka 2 znázorňuje výsledky testování antimikrobiální citlivosti difúzní metodou v jamce se čtyřmi kmeny arkobakterů. Mezi jednotlivými kmeny sice byly nepatrné odlišnosti, ale jednoznačně lze říci, že arkobaktery jsou nejcitlivější na extrakt rakytníku v ethanolu. Stejně tak extrakt z rakytníku v PBS inhiboval bakterie rodu *Arcobacter* velmi dobře napříč všemi testovanými kmeny. Při těchto experimentech byla zaznamenána

Tabulka 2. Stanovení inhibičního vlivu extraktů z rostlinných matic na vybrané kmeny arkoobakterů (difúzní metoda v jamce, mikrodiluční metoda), $n = 3$, výsledky vyjádřeny jako průměr \pm SD.

	<i>A. butzleri</i> CCUG 30484	<i>A. butzleri</i> 2015/6	<i>A. cryaerophilus</i> CCM 3934	<i>A. cryaerophilus</i> 2015/16
Průměrné velikosti inhibičních zón [mm]				
Petržel v EtOH	11,7 \pm 0,6	12,0 \pm 0,0	22,5 \pm 0,7	12,0 \pm 0,0
Kopr v EtOH	14,3 \pm 2,2	13,0 \pm 1,0	31,5 \pm 4,9	23,0 \pm 1,4
Zázvor v EtOH	14,3 \pm 2,3	12,0 \pm 0,0	16,3 \pm 2,5	18,0 \pm 0,0
Máta v EtOH	12,5 \pm 1,0	12,5 \pm 0,7	26,3 \pm 1,2	15,0 \pm 2,8
Celer v EtOH	13,3 \pm 0,9	16,0 \pm 1,4	16,0 \pm 1,7	22,3 \pm 2,2
Rakytník v EtOH	28,5 \pm 2,4	24,5 \pm 2,1	23,0 \pm 1,0	25,5 \pm 0,7
Rakytník v PBS pufru	18,0 \pm 2,0	20,5 \pm 0,7	28,0 \pm 0,0	20,3 \pm 1,5
Ethanol (96%)	16,0 \pm 0,1	15,3 \pm 0,1	15,3 \pm 0,1	15,5 \pm 0,1
PBS pufr	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
MIC [%]				
Petržel v EtOH	5,0 \pm 1,4	4,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	2,0 \pm 1,4
Kopr v EtOH	3,0 \pm 0,0	4,5 \pm 0,7	5,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,7
Zázvor v EtOH	6,5 \pm 0,7	4,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	2,0 \pm 1,4
Máta v EtOH	3,5 \pm 2,1	3,0 \pm 1,4	5,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,7
Celer v EtOH	7,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	3,5 \pm 0,7
Rakytník v EtOH	3,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0	2,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,7
Rakytník v PBS pufru	3,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0

MIC – minimální inhibiční koncentrace

PBS – fosfátový pufr

průměrná velikost inhibičních zón 20,7 mm (rakytník v PBS pufru) a 25,4 mm (extrakt rakytníku v ethanolu).

Antimikrobiální účinnost vodných a ethanolových extraktů z listů rakytníku difúzní metodou v jamce již byla zjišťována i v jiných studiích, kde byla zjištěna průměrná velikost inhibičních zón 8 mm [22], avšak tato studie se zabývala účinky extraktů na jiné mikroorganismy. Oba typy extraktů působily antimikrobiálně na všechny testované bakterie – grampozitivní i gramnegativní. Vodný extrakt z listů rakytníku nejlépe inhiboval *Pseudomonas aeruginosa* (průměrná velikost inhibičních zón 18 mm) a ethanolový extrakt nejvíce inhiboval *Bacillus cereus* (průměrná velikost inhibičních zón 19,2 mm).

Ukázalo se také, že *A. cryaerophilus* je daleko citlivější na extrakt z kopru (průměrná velikost inhibičních zón 27,3 mm), než *A. butzleri* (průměrná velikost inhibičních zón 13,7 mm). Pokud mezi sebou porovnáme sbírkové kmeny a izoláty, získané v rámci této práce, je patrné, že sbírkové kmeny byly ve většině případů k použitým extraktům citlivější.

3.3 Stanovení MIC – mikrodiluční metoda

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace bylo nejprve orientačně stanoveno rozmezí, ve kterém se bude MIC pohybovat testem ve zkumavkách. Pro každý testovaný extrakt bylo připraveno 5 zkumavek s různou koncentrací testovaného extraktu (100 %, 75 %, 50 %, 25 % a 5 %), Mueller-Hintonovým bujónem a bakteriální suspenzí. Po kultivaci bylo provedeno vyočkování na TSA agar. Nárůst bakterií rodu *Arcobacter* nebyl u některých extraktů pozorovatelný napříč všemi koncentracemi vůbec, u jiných pouze při koncentraci extraktu rovné 5 %. Z tohoto důvodu bylo v mikrotitrační destičce pracováno v rozmezí koncentrací extraktů 1 % – 12 %, aby byla přesně zachycena MIC. Stanovené minimální inhibiční koncentrace pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny v tabulce 2.

Jako velmi účinné se opět ukázaly rakytníkové extrakty, u kterých byla minimální inhibiční koncentrace velmi nízká u všech testovaných kmenů. Z tabulky 2 je patrné, že testované kmeny *Arcobacter cryaerophilus* jsou k rakytníkovému extraktu v ethanolu citlivější, než bylo zjištěno u testovaných kmenů *Arcobacter butzleri*. Minimální inhibiční koncentrace rakytníkového extraktu v PBS pufru byla stejná u všech testovaných kmenů a to 3 %.

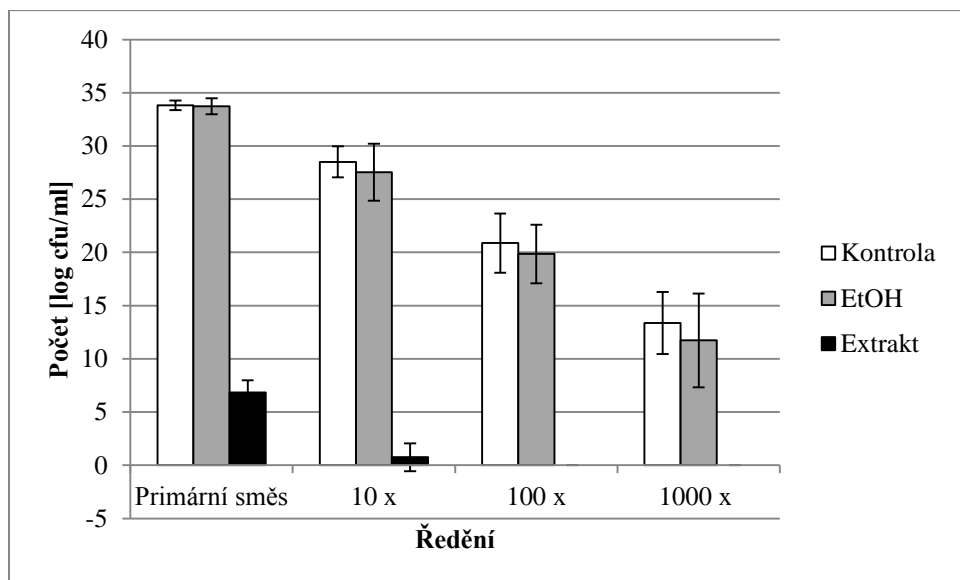
3.4 Antimikrobiální účinek v reálné potravíně

Pro testování antimikrobiálních účinků extraktu na *A. butzleri* CCUG 30484 v modelu reálné potraviny (masozeleninová dětská výživa) byl zvolen extrakt z rakytníku v ethanolu. Současně byl proveden i slepý pokus bez přídavku extraktu (potravinová matrice s přídavkem bakteriální suspenze) a experiment s přídavkem čistého rozpouštědla (96% ethanol). Počet kolonií narostlých na miskách vyjádřený jako log cfu/ml po 48 hodinové kultivaci je patrný obrázcích 2 a 3.

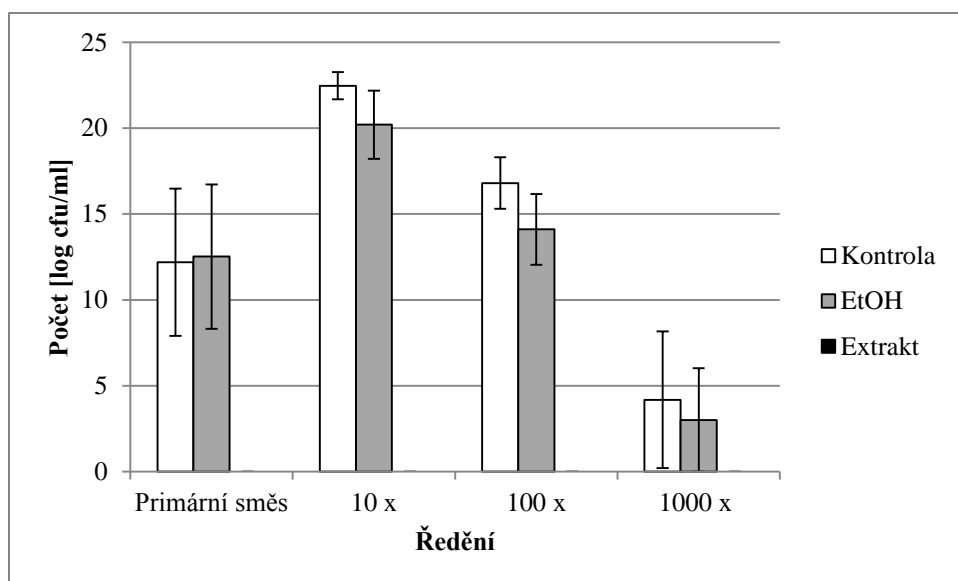
Směs obsahující potravinovou matrici s přídavkem rakytníkového extraktu (t_0) obsahovala po kultivaci velmi malé množství životaschopných buněk *A. butzleri* CCUG 30484. Došlo tedy pravděpodobně k jejich inhibici přítomným ethanolovým extraktem z rakytníku. Při experimentech bez přidaného rakytníkového extraktu byla kultivace pozitivní a testovaný kmen arkobakterů dané podmínky použité potraviny po tuto dobu bez problému

přežíval. Stejně tak byly vykultivovány životaschopné buňky i ze směsi potravinové matrice s přídavkem 96% ethanolu. Počet narostlých kolonií byl jen nepatrně nižší než u slepého pokusu, viz obr. 2. Smísením všech složek testované směsi byl totiž přidán 96% ethanol naředěn na výslednou koncentraci kolem 7 %.

Po 48 hodinovém uchování inokulovaných potravin při chladničkové teplotě a následném vyočkování (t_1) byly po kultivaci zachyceny nižší počty buněk než v předešlém případě, kdy vyočkování proběhlo ihned po smísení všech složek (t_0). Snížení počtu buněk arkobakterů mohlo být způsobeno tím, že masozeleninová dětská výživa měla pH 4,35, což je mnohem nižší hodnota pH, než která je optimální pro bakterie rodu *Arcobacter*. Arkobaktery mohou růst při pH 5,5 – 5,9, ale většina kmenů roste v rozmezí pH 6,8 – 8,0 [23]. Po poměrně dlouhé expozici arkobakterů (48 hodin) mohlo tedy již dojít k jejich eliminaci vlivem samotné matrice. Ve směsi obsahující potravinovou matrici s přídavkem rakytníkového extraktu (t_1) nebyly zachyceny již žádné kultivovatelné buňky, respektive Petriho misky byly již bez nárůstu sledovaného kmene arkobakterů, viz obr. 3. Nižší počet vykultivovaných buněk u primární směsi, než u směsí ředěných fyziologickým roztokem ($10\times$ a $100\times$), mohl být také způsoben nevhodným pH potravinové matrice. V primární směsi totiž byly buňky arkobakterů vystaveny většímu množství neředěné potravinové matrice.



Obrázek 2. Přežívání arkobakterů v reálné potravíně – log počtu cfu/ml v závislosti na ředění (*A. butzleri* CCUG 30484, expozice t_0), $n = 2$, výsledky vyjádřeny jako průměr \pm SD



Obrázek 3. Přežívání arkobakterů v reálné potravíně – log počtu cfu/ml v závislosti na ředění (*A. butzleri* CCUG 30484, expozice t_1), $n = 2$, výsledky vyjádřeny jako průměr \pm SD

4. Závěr

V posledních letech prudce stoupá množství multiresistentních kmenů bakterií. Stejně tak je tomu i u arkobakterů, u nichž byla prokázána resistance k některým běžně využívaným antibiotikům. Je také známo, že přírodní produkty jsou zdrojem antimikrobiálních látek a navíc splňují současnou tendenci využívání přírodních látek. Proto je velmi pozitivní, že všechny testované extrakty z přírodních látek působily na bakterie rodu *Arcobacter* inhibičně. Mezi jednotlivými testovanými kmeny byly nepatrné odlišnosti, ale jednoznačně nejúčinnější proti arkobakterům byl rakytníkový extrakt v ethanolu a rakytníkový extrakt rozpuštěný v PBS pufru.

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory projektů Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice (projekt SGFChT 07/2015 a SGFChT 07/2016).

Literatura

1. Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., De Ley J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41** (1991) 88-103.
2. Lehner A., Tasara T., Stephan R.: *Int. J. Food Microbiol.* **102** (2005) 127-131.
3. Whiteduck-Léveillé J., Lapen D.R., Whiteduck-Léveillé K., Cloutier M., Tambong J.T., Xu R., Topp E., Arts M.T., Chao J., Adam Z., Lévesque C.A., Villemur R., Talbot G., Khan I.U.H.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65** (2015) 2709-2716.

4. Levican A., Rubio-Arcos S., Martinez-Murcia A., Collado L., Figueras M.J.: Syst. Appl. Microbiol. **38** (2015) 30-35.
5. Zhang Z., Yu C., Wang X., Yu S., Zhang X-H.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **66** (2015), 542-547.
6. Levican A., Collado L., Figueras M. J.: Syst. Appl. Microbiol. **36** (2013), 22-27.
7. Figueras M.J., Levican A., Pujol I., Ballester F., Rabada Quilez M.J., Gomez-Bertomeu F.: New Microbe. New Infect. **2** (2014) 31-37.
8. Shah A H., Saleha A.A., Zunita Z., Murigaiyah M.: Trends Food Sci. Tech. **22** (2011) 225-236.
9. Van Den Abeele A.-M., Vogelaers D., Van Hende J., Houf K.: Emerg. Infect. Dis. **20** (2014) 1746-1749.
10. Moellering R.C., Graybill J.R., McGowan J.E., Corey L.: Am. J. Infect. Contr. **35** (2007) S1-S23.
11. Albuquerque W.F., Macrae A., Sousa O.V., Vieira G.H.F., Vieira R.H.S.F.: Braz. J. Microbiol. **38** (2007) 131-134.
12. Valsangiacomo C., Dolina M., Peduzzi R., Jaggli M.: Clin. Microbiol. Infect. **6** (2000) 393-394.
13. Liu I.X., Durham D.G., Richards R.M.: J. Pharm. Pharmacol. **52** (2000) 361-336.
14. Koehn F.E., Carter G.T.: Nat. Rev. Drug Discov. **4** (2005) 206-220.
15. Clardy J., Walsh C.: Nature, **432** (2004) 829-837.
16. Gyawali R., Ibrahim S.A.: Food Control **46** (2014) 412-429.
17. Lai P., Roy J.: Curr. Med. Chem. **11** (2004) 1451-1460.
18. Šilha D., Šilhová-Hrušková L., Vytřasová J.: Folia Microbiol. **60** (2015) 515-521.
19. Houf K., Tutenel A., De Zutter L., Van Hoof J., Vandamme P.: FEMS Microbiol. Lett. **193** (2000) 89-94.
20. Hrušková L., Motřková P., Vytřasová J.: Can. J. Microbiol. **59** (2013) 797-802.
21. Kabeya H., Maruyama S., Morita Y. a kol.: Int. J. Food Microbiol. **90** (2004) 303-308.
22. Upadhyay N.K., Yogendra Kumar M.S., Gupta A.: Food Chem. Toxicol. **48** (2010) 3443-3448.
23. Forsythe J.S.: *Arcobacter*. In: *Emerging foodborne pathogens* (Adams M., Motarjemi Y., eds.), 1st edition. Woodhead Publishing, Cambridge, 2006, s. 181-212.

