

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Antimikrobiální substance získané extrakcí olejů

Bc. Karolína Morávková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Karolína Morávková**  
Osobní číslo: **C16452**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Antimikrobiální substance získané extrakcí olejů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši vztahující se k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakteriálním rodu *Arcobacter*.

2. Zpracujte literární rešerši na téma mikrobiální biofilmy a antimikrobiální komponenty olejů.

Experimentální část:

1. Z vybraných vzorků olivových olejů připravte extrakty ve vodné fázi. Následně otestujte přežívání vybraných kmenů arkobakterů i některých "srovnávacích bakterií" ve vybrané koncentraci olejového extraktu.

2. Vybrané kmeny vyšetřete z hlediska tvorby biofilmu Christensenovou metodou. Otestujte, jak bude tvorba bakteriálních biofilmů ovlivněna přítomností získaných olejových extraktů.

3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.

4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. David Šilha, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

## Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 5. 2018

Karolína Morávková

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D., za jeho rady a věcné připomínky, které mi pomohly při zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

## ANOTACE

Diplomová práce se zabývá antimikrobiálními látkami získanými extrakcí z olivových olejů. Teoretická část se zaměřuje na charakterizaci rodu *Arcobacter*, dále uvádí informace o tvorbě, metodách stanovení, detekci biofilmu a účinnosti antimikrobiálních látek, které se v olivových olejích vyskytují. V praktické části se následně experiment zaměřuje na šest vybraných zástupců arkobakterů a dva srovnávací mikroorganismy. Tvorba biofilmu byla zkoumána modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách. Pomocí kultivační metody byla ověřována účinnost antimikrobiálních látek z olivových olejů v časové expozici.

## KLÍČOVÁ SLOVA

olivové oleje, antimikrobiální látky, arkobaktery, biofilm, antioxidační kapacita

## TITLE

Antimicrobial substances obtained by oil extractions

## ANNOTATION

This thesis deals with antimicrobial substances obtained by extraction from olive oils. The theoretical part focuses on the characterization of the genus *Arcobacter*, as well as information about biofilm study, methods of determination and detection of biofilm and the effectiveness of antimicrobial agents which are found in olive oils. Then the experimental part is focused on six selected representatives of *Arcobacter* and two comparative microorganisms. Biofilm formation was investigated by modified Christensen method in microplates. Using the cultivation methods, the efficacy of antimicrobial agents from olive oils in time dependence was verified.

## KEYWORDS

olive oils, antimicrobial substances, genus *Arcobacter*, biofilm, antioxidant capacity

# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	11
SEZNAM ILUSTRACÍ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	15
1 ÚVOD .....	16
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	17
2.1 ROD <i>ARCOBACTER</i> .....	17
2.1.1 Morfologie .....	17
2.1.2 Patogeneze a faktory virulence .....	18
2.1.3 Laboratorní diagnostika .....	21
2.1.3.1 Vhodná média pro kultivaci .....	22
2.1.4 Výskyt a význam .....	23
2.1.5 Zástupci rodu <i>Arcobacter</i> .....	23
2.1.6 Antimikrobiální odolnost .....	24
2.2 BIOFILM A JEHO VÝZNAM .....	25
2.2.1 Tvorba biofilmu .....	26
2.2.1.1 Adheze buněk na povrch .....	26
2.2.1.2 Maturace biofilmu .....	27
2.2.1.2.1 <i>Quorum sensing</i> .....	28
2.2.1.3 Struktura biofilmu .....	29
2.2.2 Metody stanovení a důkazy biofilmu .....	30
2.2.2.1 Fenotypové metody .....	30
2.2.2.1.1 Mikroskopické metody .....	30
2.2.2.1.2 Christensenova metoda – zkumavková metoda .....	31
2.2.2.1.3 Christensenova metoda – v mikrotitračních destičkách .....	32

2.2.2.1.4	Kultivace na agaru s kongo červení.....	32
2.2.2.2	Genotypové metody .....	33
2.2.2.2.1	Geny asociované s tvorbou biofilmu .....	33
2.2.2.3	Další metody detekce biofilmu .....	33
2.2.3	Tvorba biofilmu u arkobakterů.....	35
2.3	ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY A JEJICH ÚČINEK .....	36
2.3.1	Antimikrobiální látky .....	37
2.3.2	Sloučeniny s antimikrobiálními účinky.....	37
2.3.2.1	Fenoly a polyfenoly.....	37
2.3.2.2	Chinony .....	38
2.3.2.3	Flavonoidy a katechiny .....	38
2.3.2.4	Taniny a kumariny .....	38
2.3.2.5	Terpenoidy a esenciální oleje.....	39
2.3.3	Olivové oleje a antimikrobiální testování.....	39
2.3.4	Antimikrobiální účinky olivových olejů .....	40
2.3.5	Antimikrobiální účinky esenciálních olejů na arkobaktery.....	41
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
3.1	Materiál, přístroje, pomůcky .....	42
3.1.1	Chemikálie.....	42
3.1.2	Technické vybavení.....	42
3.1.3	Pomůcky .....	43
3.1.4	Živná média a použité roztoky .....	43
3.2	Bakteriální kmeny .....	45
3.3	Testované vzorky .....	46
3.4	Příprava olejových extraktů .....	47
3.5	Přežívání vybraných bakterií v olejových extraktech .....	48
3.6	Příprava biofilmů – Christensenova metoda v MT destičkách .....	48



3.6.1	Příprava mikrotitrační destičky .....	49
3.6.2	Christensenova metoda – barvení biofilmu .....	50
3.7	Stanovení antioxidační kapacity vodné fáze olejových extraktů .....	52
3.7.1	Princip stanovení .....	52
3.7.2	Pracovní postup .....	52
3.7.3	Vyjádření výsledků.....	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	54
4.1	Kultivační metoda – přežívání vybraných bakterií v olejových extraktech.....	54
4.1.1	Olivový olej Ballester .....	55
4.1.2	Olivový olej Kyosos .....	57
4.1.3	Směsný olej Ondoliva.....	59
4.1.4	Rafinovaný olej Borges .....	61
4.1.5	Olej z pokrutin.....	63
4.1.6	Diskuze ke kultivačnímu hodnocení antimikrobiálního účinku extraktů .....	65
4.2	Vliv olejových extraktů na biofilmovou aktivitu vybraných bakterií.....	67
4.2.1	Stanovení „cut of score“ BHI bujónu .....	67
4.2.2	Výsledky tvorby biofilmu pro jednotlivé olivové oleje .....	68
4.2.2.1	Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484 .....	69
4.2.2.2	Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2013/8.....	71
4.2.2.3	Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050.....	73
4.2.2.4	Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13.....	75
4.2.2.5	Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517 .....	77
4.2.2.6	Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488.....	79
4.2.2.7	Tvorby biofilmu kmene <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	81
4.2.2.8	Tvorba biofilmu kmene <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223 .....	83
4.2.3	Diskuze k vlivu olejových extraktů na biofilmovou aktivitu bakterií.....	85
4.3	Antioxidační kapacita olejových extraktů.....	87

4.3.1	Diskuze k antioxidační kapacitě olejových extraktů .....	89
5	ZÁVĚR .....	90
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	92
7	PŘÍLOHY .....	103

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 <i>Přežívání vybraných kmenů rodu Arcobacter v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ballester</i> .....	55
Graf 2 <i>Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ballester A – Escherichia coli CCM 3954, B – Staphylococcus aureus CCM 4223</i> .....	55
Graf 3 <i>Přežívání vybraných kmenů rodu Arcobacter v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Kyosos</i> .....	57
Graf 4 <i>Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Kyosos A – Escherichia coli CCM 3954, B – Staphylococcus aureus CCM 4223</i> .....	57
Graf 5 <i>Přežívání vybraných kmenů rodu Arcobacter v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ondoliva</i> .....	59
Graf 6 <i>Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ondoliva A – Escherichia coli CCM 3954, B – Staphylococcus aureus CCM 4223</i> .....	59
Graf 7 <i>Přežívání vybraných kmenů rodu Arcobacter v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Borges</i> .....	61
Graf 8 <i>Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Borges A – Escherichia coli CCM 3954, B – Staphylococcus aureus CCM 4223</i> .....	61
Graf 9 <i>Přežívání vybraných kmenů rodu Arcobacter v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje z pokrutin</i> .....	63
Graf 10 <i>Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje z pokrutin A – Escherichia coli CCM 3954, B – Staphylococcus aureus CCM 4223</i> .....	63
Graf 11 <i>Kalibrační závislost inhibice (%) na koncentraci látky Trolox</i> .....	87

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 <i>Arcobacter cibarius</i> .....	17
Obrázek 2 <i>Arcobacter halophilus</i> .....	17
Obrázek 3 Vizualizace genomu - kmene <i>A. butzleri</i> RM4018.....	19
Obrázek 4 Působení <i>A. butzleri</i> v buněčné linii HT-29.....	20
Obrázek 5 Tvorba a struktura biofilmu.....	29
Obrázek 6 Elektronová mikrofotografie <i>E. coli</i> tvořící biofilm.....	30
Obrázek 7 Christensenova zkumavková metoda: a) silná tvorba biofilmu, b) střední tvorba biofilmu, c) negativní tvorba biofilmu.....	31
Obrázek 8 Pozitivní producent biofilmu <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 a negativní producent <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	32
Obrázek 9 Antimikrobiální aktivita testovaných produktů.....	36
Obrázek 10 Chemická struktura hlavních polyfenolů v olivovém oleji.....	40
Obrázek 11 Vzorky olejů pro experimentální část studie.....	47
Obrázek 12 Příprava mikrotitrační destičky pro stanovení biofilmové aktivity.....	49
Obrázek 13 Barvení destičky krystalovou violetí.....	50
Obrázek 14 Obarvený biofilm na stěnách a dně jamek mikrotitrační destičky.....	51
Obrázek 15 Připravená destička na proměření absorbance.....	51
Obrázek 16 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484 v přítomnosti extraktů z olejů.....	70
Obrázek 17 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter butzleri</i> UPa 2013/8 v přítomnosti extraktů z olejů.....	72
Obrázek 18 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050 v přítomnosti extraktů z olejů.....	74
Obrázek 19 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter cryaerophilus</i> UPa 2013/13 v přítomnosti extraktů z olejů.....	76
Obrázek 20 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter lanthieri</i> CCM 28517 v přítomnosti extraktů z olejů.....	78
Obrázek 21 Tvorba biofilmu kmene <i>Arcobacter thereius</i> CCM 24488 v přítomnosti extraktů z olejů.....	80
Obrázek 22 Tvorba biofilmu kmene <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 v přítomnosti extraktů z olejů.....	82

Obrázek 23 *Tvorba biofilmu kmene Staphylococcus aureus CCM 4223 v přítomnosti extraktů z olejů*.....84

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 <i>Výsledky vybraných biochemických a kultivačních testů pro některé zástupce <i>Arcobacter spp</i></i> .....	21
Tabulka 2 <i>Vzorky olivových olejů využité pro experiment</i> .....	46
Tabulka 3 <i>Výsledné hodnoty absorbancí kryst. violeti v destičce po obarvení nezaočkovaného BHI bujónu</i> .....	67
Tabulka 4 <i>Výsledné hodnoty absorbancí kryst. violeti v destičce po obarvení nezaočkovaného BHI bujónu</i> .....	67
Tabulka 5 <i>Kalibrační řada – naměřené absorbance a vypočítané hodnoty I (%)</i> .....	87
Tabulka 6 <i>Naměřené a vypočítané hodnoty antioxidační kapacity pro vzorky olivových extraktů</i> .....	88

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATB	antibiotika
CFU	colony forming units
DPPH ·	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylový radikál
EPS	exopolysacharidy
KA	krevní agar
LPS	lipopolysacharidy
M-H agar	Müller-Hinton agar
MHB	Müller-Hinton bujón
PBS pufr	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PK	pozitivní kontrola
QS	<i>quorum sensing</i>
SBA	Sheep Blood Agar
TJ	tight junction
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
TSA	trypton sojový agar (Tryptic Soy Agar)
TSB	trypton sojový bujón (Tryptic Soy Broth)
PCR	polymerázová řetězová reakce

# 1 ÚVOD

Ačkoliv je v klinických oborech spousta vědeckých poznatků, infekční nemoci jsou jednou z nejčastějších příčin onemocnění a úmrtnosti na celém světě. Problematikou, která se s tímto tématem pojí, je nadměrné užívání dezinfekčních prostředků, léčiv a antibiotik, což zvyšuje tvorbu bakteriální rezistence. Infekční onemocnění způsobená multirezistentními kmeny bakterií, jsou závažným problémem, jelikož odolnost rezistentních bakterií stále stoupá a některá antibiotika již na mikroorganismy nejsou účinná. Bakterie získávají rezistenci různými mechanismy, např. mutacemi, novými genetickými informacemi nebo také růstem v biofilmu.

Biofilmy představují složitější seskupení bakterií. V prostředí biofilmu bakterie mezi sebou komunikují a jsou chráněny před škodlivými vlivy z vnějšího prostředí. Na rozdíl od planktonních bakteriálních buněk mají bakterie v biofilmu výhodnější podmínky pro růst a rezistenci. Vykazují vysokou toleranci vůči širokému spektru antibiotik, a tak jsou příčinou onemocnění, akutních a chronických infekcí lidí i živočichů. Díky rezistenci biofilmu k antibiotikům i dalším ochranným mechanismům je obtížné jej odstranit.

V současné době jsou proto studovány účinky nových antimikrobiálních látek z rostlinných extraktů, které by byly schopny inhibovat tvorbu a růst bakterií. Dále je také zájem o bližší studium a porozumění působení biofilmu na hostitele a jeho imunitní systém. Cílem výzkumů je zlepšit veškeré léčebné postupy, taktéž podpořit výzkum nových antimikrobiálních léčiv a objasnit pochopení problému antimikrobiální rezistence.

Předmětem této diplomové práce je shrnout obecné poznatky o rodu *Arcobacter* a tvorbě bakteriálního biofilmu. V teoretické části práce je dále uveden i přehled metod používaných pro studium a detekci bakteriálního biofilmu. Poslední část se zaměřuje na olivové oleje a látky v nich obsažené, které se podílejí na antimikrobiálním účinku olivových olejů.

V experimentální části je práce zaměřena na tvorbu biofilmu v prostředí extraktů z olivových olejů, ke které bylo vybráno šest kmenů arkobakterů, dále jeden gram pozitivní a gram negativní mikroorganismus pro srovnání s arkobaktery. Experimentální část je doplněna o kulturační metodu, kde byla sledována schopnost extraktů z olivových olejů inhibovat bakteriální růst.



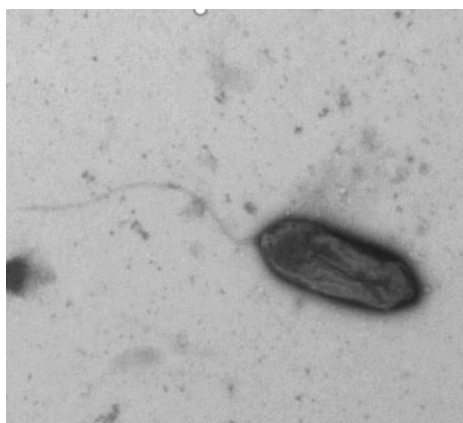
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 ROD *ARCOBACTER*

Mikroorganismy, které se dnes řadí do rodu *Arcobacter*, byly prvně izolovány roku 1977, a to z potracených plodů dobytka. Avšak arkobaktery byly v té době považovány za bakterie náležící do rodu *Campylobacter* (Fera et al. 2004). Teprve po taxonomických změnách byly tyto bakterie zařazeny do nově vzniklého rodu *Arcobacter* od roku 1991 (Fisher et al. 2014). Nyní jsou arkobaktery začleněny spolu s kampylobaktery do čeledi *Campylobacteraceae*, třídy *Epsilonproteobacteria* (Giacometti et al. 2015).

#### 2.1.1 Morfologie

Vzhledem k morfologii a genetickým vlastnostem mají bakterie rodu *Arcobacter* mnoho společného s kampylobaktery i helikobaktery (Fera et al. 2004). Buňky arkobakterů jsou spirálovité nebo mírně zakřivené tyčinky o rozměrech  $0,4\text{--}0,6 \times 0,5\text{--}2 \mu\text{m}$ . V mikroskopu pozorujeme nevětvící se tyčinky a ve starších kulturách přecházejí spirálovité buňky na kokoidní formy (Houf et al. 2005). Buňky arkobakterů netvoří pouzdra ani spory. U některých kmenů lze pozorovat tvorbu biofilmu. Většina druhů je pohyblivá, a to z pravidla prostřednictvím polárního bičíku na jednom konci buňky (Kim et al. 2010). Dle jednoho ze základních barvení v mikrobiologii, Gramova barvení, jsou arkobaktery zařazeny mezi gramnegativní bakterie (G-), a to díky struktuře jejich bakteriální stěny (Šilha et al. 2016).



**Obrázek č. 1:** *Arcobacter cibarius*  
(převzato z Houf et al. 2005).

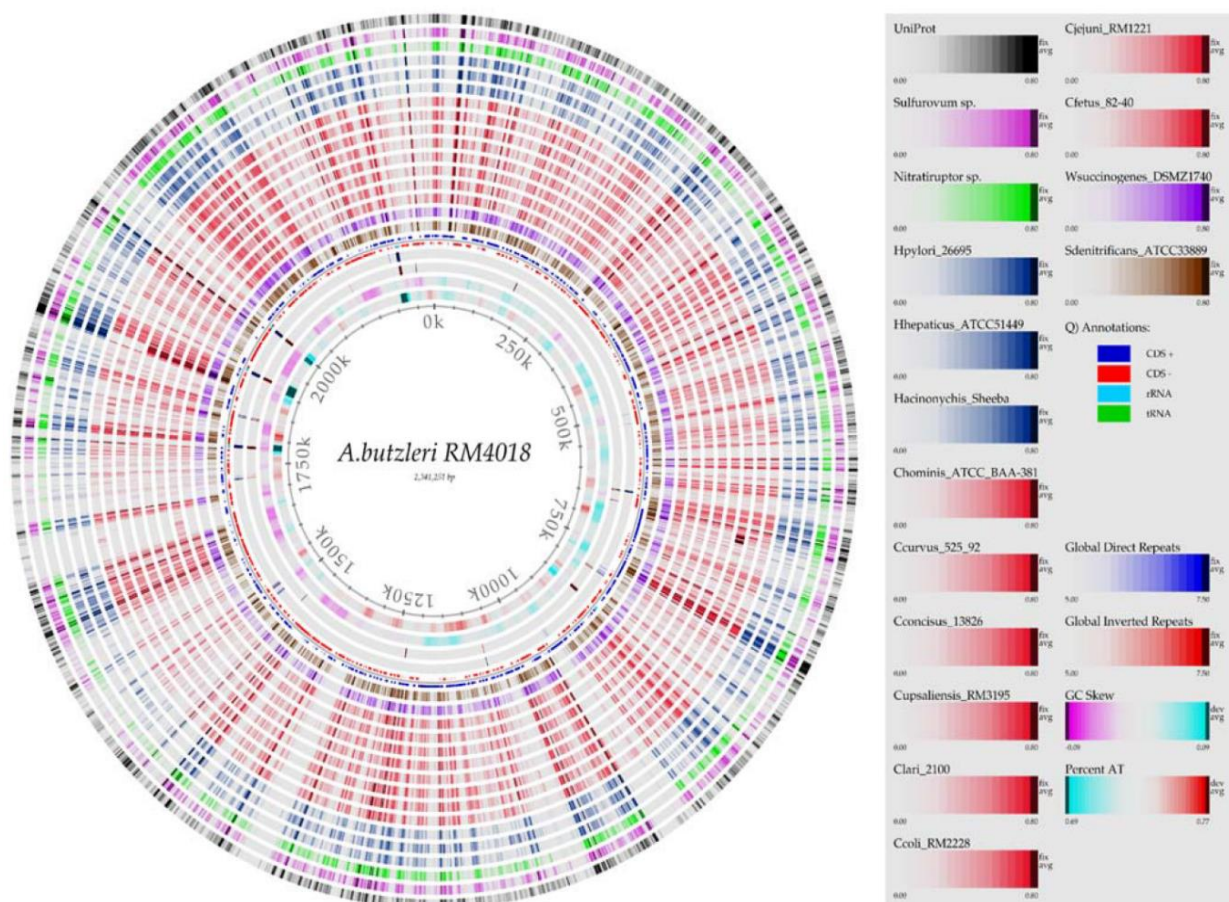


**Obrázek č. 2:** *Arcobacter halophilus*  
(převzato z Donachie et al. 2005).

### 2.1.2 Patogeneze a faktory virulence

K posouzení patogenity arkobakterů je zapotřebí vyhodnotit potenciální faktory virulence (Houf a Stephan 2007). Uběhlo několik let od samotné charakterizace rodu *Arcobacter*, ale mechanismy patogenity a faktory virulence nejsou stále zcela popsány a pochopeny (Levican et al. 2013). Jsou zatím získané pouze omezené informace o patogenitě těchto bakterií, tudíž je málo studií o *in vitro* adhezi, invazivitě a cytotoxicitě (Ho et al. 2006). Specifická adheze k tkáňovým buňkám je proto považována za jeden ze základních faktorů virulence pro většinu bakteriálních patogenů (Houf a Stephan 2007). Jejich schopnosti adheze, invazivity a cytotoxicity byly studovány u čtyř druhů arkobakterů (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius*) s použitím různých buněčných linií (HEp-2, HeLa, INT407, CHO a Caco-2). Výsledky ukázaly značnou variabilitu v adhezi, invazivitě a toxicitě v závislosti na kmenech i studovaných buněčných liniích (Levican et al. 2013). Další probíhající vědecké studie napomáhají k porozumění jejich mechanismům účinku i patogenity (Miller et al. 2007). Druhy arkobakterů působí cytotoxicky a jsou schopné měnit morfologii buněk. Arkobaktery pravděpodobně obsahují toxické molekuly (<10 kDa) a produkují toxiny, ale jaká je povaha těchto toxinů, to doposud nebylo objasněno. Možným důvodem pro omezené znalosti molekulárních mechanismů a patogenity arkobakterů je to, že se mírně liší od více prostudovaných zástupců *Campylobacter*. Informace o patogenitě arkobakterů tedy vychází hlavně ze znalostí získaných z druhů *Campylobacter* a dalších gastrointestinálních patogenů (Ho et al. 2006, Lehner et al. 2005).

Díky kompletní genomové sekvenaci kmene *Arcobacter butzleri* RM4018 byly získány informace o fyziologii a především genech, které jsou spojené s virulencí, což naznačuje, že *A. butzleri* je volně žijící mikroorganismus, který je oprávněně klasifikován jako potencionálně patogenní (Miller et al. 2007).

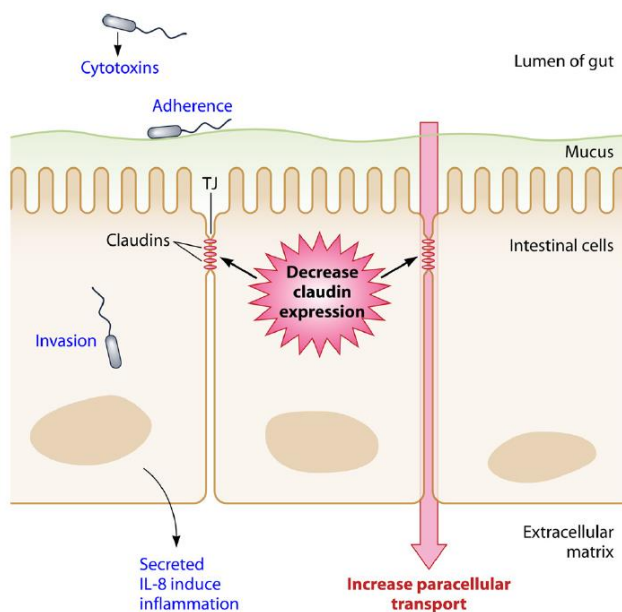


**Obrázek č. 3:** Vizualizace genomu – kmene *A. butzleri* RM4018 (převzato z Miller et al. 2007).

Získané informace z genomové sekvenace *A. butzleri* RM4018 slouží k usnadnění a určení nových druhů rodu *Arcobacter* a zároveň ke studiu jejich patogeneze (Collado et al. 2011). Indukce exprese interleukinu-8, který je považován za hlavní faktor virulence, byla detekována u *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius*. Taktéž byla odhalena přítomnost několika domnělých genů virulence, jako jsou *ciaB*, *cj1349* a *cadF*. Právě tyto geny jsou homologické s geny, které nesou mikroorganismy úzce příbuzné arkobakterům (Doudah et al. 2011). Geny *ciaB* v genomu *Campylobacter* spp. kódují invazivní protein. Gen *cj1349* v *C. jejuni* kóduje proteiny, které umožňují adhezi k hostitelským buňkám tím, že se navazují na fibronektin a *cadF* protein. Navíc existují homology s genem *irgA*, který kóduje vnější membránový protein ve *Vibrio cholerae* a *hecA* gen, který kóduje vláknitý hemaglutinin uropatogenní *Escherichia coli*. Výskyt těchto genů a jejich potenciální korelace s možností

adheze nebo invazivity v lidských buněčných liniích byla studována u všech druhů *Arcobacter* spp., a to je cílem i studií nadcházejících (Doudah et al. 2011, Levican et al. 2013).

Analýzy sekvencí 16S rRNA genů naznačují, že další potencionální nové druhy rodu *Arcobacter* zůstávají stále nepopsány (Collado a Figueras 2011, Lehner et al. 2005, Prouzet-Mauléon et al. 2006).



**Obrázek č. 4:** Působení *A. butzleri* v buněčné linii HT-29 (převzato z Collado a Figueras 2011).

Mechanismy působení a faktory virulence rodu *Arcobacter* se zkoumají na různých buněčných liniích. Například na obrázku č. 4 je uvedeno působení arkobakterů na střevní epitelální buňky. Arkobaktery prokázaly schopnost produkovat cytotoxické látky (Musmanno et al. 1997), a také schopnost snížit expresi claudinu v TJ s následnou dysfunkcí epitelální bariéry a souběžného zvýšení paracelulárního transportu (Doudah et al. 2011). Jako testovaný bakteriální kmen byl zvolen *A. butzleri* v lidských střevních epitelálních buňkách HT-29 (Bücker et al. 2009, Collado a Figueras 2011).

### 2.1.3 Laboratorní diagnostika

Bakterie rodu *Arcobacter* se liší od blízkce příbuzných kampylobakterů rozdílnými možnostmi růstu (Lehner et al. 2005). Arkobaktery jsou schopné růst za aerobních i mikroaerofilních podmínek a při teplotách, které jsou v rozmezí 15–37 °C (Kučerová et al. 2016, Stampi et al. 1999). Růst těchto bakterií byl pozorován také za nižších teplot, a to dokonce při 5 °C, což odpovídá např. teplotě podzemních vod (Šilha et al. 2014).

Co se týká biochemických vlastností, tak arkobaktery patří mezi mikroorganismy produkující oxidázu, produkce katalázy je variabilní. Žádný z arkobakterů naopak neprodukuje ureázu, vyjma jednoho kmene, kterým je *A. nitrofigilis* (Houf et al. 2005, Kučerová et al. 2016, Kim et al. 2010).

**Tabulka č. 1:** Výsledky vybraných biochemických a kultivačních testů pro některé zástupce *Arcobacter* spp.; + pozitivní; - negativní; +/- variabilní výsledek (převzato z Kim et al. 2010).

	<i>A. marinus</i>	<i>A. halophilus</i>	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. cibarius</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
<b>kataláza</b>	-	-	+	+	+	+/-	+
<b>ureáza</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>redukce nitrátů</b>	+	+	+	+	+	-	+/-
<b>hemolýza</b>	-	-	-	+/-	+	-	+/-
<b>aerobní růst</b>	+	+	+/-	+	+	-	+/-
<b>anaerobní růst</b>	-	+	+	+	+	+	+

Pro kultivaci se používají různé druhy kultivačních médií, která mohou být obohacena o krev nebo sérum. K identifikaci se využívají také selektivně-diagnostické půdy (Kim et al. 2010).

### 2.1.3.1 Vhodná média pro kultivaci

Pro bakterie rodu *Arcobacter* je vhodná kultivace na plotnách SBA (Sheep blood agar) při teplotě 37 °C, která je pro jejich růst optimální, avšak růst je možný při teplotě 10–40 °C. Kultivace probíhá po dobu tří dnů. Narostlé kolonie jsou nepravidelné, šedé a mají přibližně 4 mm v průměru (Kim et al. 2010).

Arkobaktery mohou také růst na krevním agaru za aerobních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Kolonie mají průměr 2 až 4 mm, jsou béžové až téměř bílé barvy se zaoblenými okraji. Všechny kmeny rostou na krevním agaru při laboratorní teplotě 25 °C i 37 °C za aerobních i mikroaerobních podmínek bez významných rozdílů. Naopak téměř žádné kmeny arkobakterů nerostou na krevním agaru za anaerobních podmínek při 30 °C (Levican et al. 2015, Collado a Figureas 2011).

Na TSA (Tryptic Soy Agar) agaru, který byl obohacený o 5 % ovčí krve jsou vyrostlé kolonie bez zóny hemolýzy. Bakteriální kmeny na TSA produkují oxidázu, katalázu a redukují dusičnany. Při kultivaci na agarovém TSA médiu se netvoří sulfan. Kolonie arkobakterů jsou oválné a vyrůstají v béžové barvě. Doba inkubace na TSA agaru je 48 hodin (Levican et al. 2015, Collado a Figureas 2011).

Všechny kmeny arkobakterů mohou být kultivovány na agaru M-H (Müller-Hinton) za aerobních podmínek po dobu 48 hodin a při teplotě 30 °C, kde vyrůstají jako mléčné kolonie kulatého tvaru s rovným okrajem (Šilha et al. 2016).

Za aerobních podmínek při 30 °C také všechny kmeny rostou na CCDA agaru (*Campylobacter* deoxycholate Agar) (Levican et al. 2015, Collado a Figueras 2011).

Jako selektivní médium se využívá Butzlerovo médium obsahující M-H agar s 5 % ovčí krve a cefoperazonem (Vandenberg et al. 2004).

## 2.1.4 Výskyt a význam

Bakteriální rod *Arcobacter* je v posledních letech stále zkoumanější, protože někteří ze zástupců jsou považováni za potenciální enteropatogeny. Arkobaktery mají širokou rozmanitost výskytu i hostitelů, z nichž některé patogenní druhy mohou způsobit gastrointestinální poruchy, mastitidy, aborty, endokarditidy, bakterémie a sepse u zvířat a především i lidí (Kučerová et al. 2016). V současné době je známo více než 25 druhů arkobakterů (Houf et al. 2005, Kim et al. 2010, Levican et al. 2015). Díky rozmanitému výskytu jistě budou izolovány nové druhy arkobakterů a rod *Arcobacter* se tak rozroste o další zástupce (Fera et al. 2008).

## 2.1.5 Zástupci rodu *Arcobacter*

Mezi patogenní druhy arkobakterů se zpravidla řadí *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius*, avšak pouze druhy *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. thereius* byly spojeny s lidským onemocněním (Šilha et al. 2014). Tyto mikroorganismy mohou ohrozit zdraví lidí a existují potvrzení o spojení těchto bakterií a humánních chorob (Collado et al. 2009). První klinický případ napadení lidského organismu způsobeného *A. cryaerophilus* byl popsán v roce 1988, a to průjmové onemocnění muže (Hsueh et al. 1997).

Mnoho druhů arkobakterů bylo izolováno z masa, nejvíce z masa drůbežního, kde prevalence výskytu dosahuje až 96 %. Přítomnost arkobakterů se prokázala také v prostředí zpracování drůbeže i vodních zdrojích. Jak již bylo zmíněno tyto mikroorganismy přežívají i při chladničkových teplotách, a tak mohou i snáze kontaminovat čerstvé potraviny (Mcdonnell a Russell 1999, Šilha et al. 2014).

Další druhy byly izolovány z lidské stolice a exkrementů zvířat trpících chorobami gastrointestinálního traktu, dále pak z abortovaných plodů skotu, a to zejména *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. thereius* a *A. trophiarum* (Šilha et al. 2016).

Dokonce se podařilo vyizolovat tyto mikroorganismy z mořského prostředí. Mezi zástupce patří *A. marinus*, *A. molluscorum*, *A. mytili*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum* (Levican et al. 2012). K nepatogenním druhům patří např. *A. nitrofigilis* a *A. halophilus*, které byly izolovány z různých míst, ale ani v jednom případě se nejednalo o lidi či zvířata. Mezi dalšího nepatogenního zástupce patří např. *A. defluvii* izolovaný z odpadních vod (Levican et al. 2012).

Mezi zcela nově klasifikované zástupce se řadí *A. cloaceae*, *A. suis*, *A. anaerophilus*, *A. ebronensis* a *A. aquimarinus* (Levican et al. 2012, Šilha et al. 2014).

### 2.1.6 Antimikrobiální odolnost

Antimikrobiální citlivost kmenů *Arcobacter* není doposud řádně probádána. Ačkoli testování citlivosti k ATB u bakterií rodu *Campylobacter* a *Arcobacter* není standardizováno, je využívána převážně disková difúzní metoda. Široké spektrum antimikrobiálních látek, včetně makrolidů, chloramfenikolu, tetracyklinů, aminoglykosidů, chinolonů aj. mají antimikrobiální potenciál proti těmto bakteriálním rodům (Hsueh et al. 1997).

I když v medicíně a dalších vědních oborech je velké množství vědeckých poznatků, stále jsou infekční nemoci jednou z nejčastějších příčin onemocnění a úmrtnosti na celém světě. Hrozba různých infekcí způsobených potravinami vede k častému používání dezinfekčních prostředků, což vyvolává obavy z možnosti vzniku bakteriální rezistence. Doporučená opatření ke snížení kontaminace potravin zahrnují biologickou bezpečnost a hygienu, jak ve výrobním průmyslu, tak i v domácnostech (Kučerová et al. 2016, McDonnell a Russell 1999).

Šíření infekčních onemocnění, která jsou způsobena multirezistentními kmeny bakterií, popřípadě bakteriálními izoláty, je závažným problémem zejména proto, že se v posledních letech značně zvýšila odolnost bakterií proti širokému spektru antibiotik. Rezistence bakterie získávají mutacemi, získem nových genetických informací, horizontálním přenosem genů, expresí tichých genů, růstem v biofilmu atd. (Šilha et al. 2014). Je potřeba nových antimikrobiálních látek nebo nových přístupů, které by mohly pomoci vyřešit tento problém (Kučerová et al. 2016).



## 2.2 BIOFILM A JEHO VÝZNAM

Biofilm je společenství mikroorganismů v mezibuněčné hmotě, které adhekuje na umělý nebo nativní povrch. Bakteriální biofilmy se tvoří tak, že se jednobuněčné mikroorganismy shromažďují, aby vytvořily mnohvrstevné shluky (mikrobiální komunitu), které je ohraničené vrstvou exopolysacharidů. Bakteriální buňky v biofilmu vykazují vlastnosti odlišné od planktonních buněk, zejména zvýšenou rezistenci na antimikrobiální látky a dezinfekce. Schopnost růstu mikroorganismů v biofilmu je též spojována s přirozenou rezistencí k účinkům antibiotik, což je z klinického hlediska považováno za důležitý faktor virulence (Mah a O'Toole 2001).

Biofilmy se tak díky svým schopnostem mohou tvořit prakticky kdekoliv. Snadno se vytvářejí na lékařských implantátech jako jsou katetry, kloubní náhrady a hlavice, srdeční implantáty, kontaktní čočky apod. Infekce mohou být často léčeny pouze odstraněním implantátu, což zvyšuje nároky na pacienta a následné náklady na léčbu. Závažné onemocnění způsobené bakteriálními biofilmy jsou infekce krevního oběhu. Bakterie rostoucí v biofilmu unikají obranným schopnostem hostitele a odolávají antimikrobiální léčbě. Schopnost růstu bakterií v biofilmu je spojována s přirozenou rezistencí těchto biofilmů k účinkům antibiotik (Quave et al. 2008, Mah a O'Toole 2001). Biofilmy jsou odolné vůči bakteriofágům i antimikrobiálním látkám, proto jsou biofilmové infekce rezistentní k antimikrobiální terapii a imunitnímu systému hostitele, což může způsobovat značné potíže (Prescott et al. 2005). Bakteriální biofilmy jsou také spojeny s velkým procentem (65 %) nozokomiálních infekcí (Licking 1999).

Mikroorganismy, které tvoří biofilm se vyskytují téměř ve všech přírodních ekosystémech, mohou se tvořit v přírodním i průmyslovém prostředí. Bakterie, které rostou v biofilmu, jsou několikanásobně rezistentnější, než planktonní buňky (Bassler 1999, Hoyle a Costerton 1991).

Na druhou stranu, tvorba biofilmu má i pozitivní vliv. Bakterie v trávicím traktu člověka, tvoří na povrchu střevní sliznice ochranou bariéru (střevní mikrobiom), který chrání střevo před kolonizujícími mikroorganismy. Dále se tvorby biofilmů využívá u čištění vod. Přítomnost biofilmů snižuje obsah amonných iontů, a to zajišťují nitrifikační bakterie, které amonné ionty oxidují (Dubánek a Chvála 2001).

## 2.2.1 Tvorba biofilmu

Studie jednotlivých druhů biofilmů ukázaly, že se biofilmy vytvářejí ve více krocích. Tvorba biofilmu může být považována za vývojový proces, který sdílí některé rysy jiných bakterií, avšak v přírodním prostředí je biofilm téměř vždy multidruhová mikrobiální komunita ukryvající bakterie, které sdílejí genetický materiál a spolupracují v rámci biofilmu. Přirozený biofilm je tedy vysoce diferencovaný a propracovaný systém (Watnick a Kolter 2000).

Samotný vznik biofilmu lze rozdělit do několika kroků – adheze buněk na povrch, následná akumulace a tvorba mikrokolonií a maturace biofilmu (Busscher a Mei 1997). Vývoji biofilmu obvykle předchází vznik pelikuly, tj. vrstvy iontů a molekul biologického původu, které se díky fyzikálním interakcím váží na čistý povrch. Pelikuly vznikají v prostředí, které je bohaté na organické látky, a to téměř během několika minut. Zato v organicky chudších prostředích vznikají v řádu několika hodin. Součástí tvorby pelikuly jsou proteiny, např. albuminy, dále pak glykoproteiny, ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , a makromolekuly. Pelikuly usnadňují vazbu bakterií a jejich přítomnost zjistí planktonní bakterie zcela náhodně (fáze atrakce) nebo s pomocí receptorů. Poté dochází k fázi adheze a později k fázi akumulace (Costerton et al. 1995).

### 2.2.1.1 Adheze buněk na povrch

V počáteční fázi adheze se uplatňují povrchové struktury bakterií jako bičíky, pili, proteiny, lipopolysacharidy (LPS) a velice významně exopolysacharidy (EPS) (Sutherland 2001). Počáteční vazba je také ovlivněna přiblížením bakterií k povrchu (Watnick a Kolter 2000) a je zprostředkována různými mechanismy, např. difúzí, elektrickým nábojem vznikajícím mezi povrchem a bakteriemi (tvorba vodíkových můstků, účastní se Van der Waalsovy síly a elektrostatická přitažlivost) i aktivním pohybem pomocí bičíků či pasivním pohybem (Davey a O'Toole 2000). Bakterie mohou tvořit přechodná spojení nebo spolupracují s jinými mikroorganismy, které již jsou připojené k povrchu. Toto přechodné spojení umožňuje bakteriím hledat místo, kde by se dále usadily (Watnick a Kolter 2000). Následně mikroorganismy pevně adherují za vzniku specifických chemických vazeb nebo jde o interakce mezi receptorem bakterie a adhezinem na povrchu určenému k osídlení, které jsou specifické pro každý bakteriální druh (Costerton 1999). Nejprve je adheze bakterií reverzibilní, slabá a bakteriální buňky ještě mohou osídlený povrch opustit a vrátit se zpět do planktonní formy (Maier et al. 2009).

### 2.2.1.2 Maturace biofilmu

K adhezi bakteriím se přidávají další adhezeující bakterie, které tvoří stabilní členy mikrokolonie, dochází k rozrůstání a dalšímu dělení (Watnick a Kolter 2000). Po adhezi bakterie aktivují geny, které produkují polysacharidy a exopolymery, které tvoří společně s bakteriemi základní stavební složku biofilmu. Dochází k množení bakterií a ke vzájemné koagregaci (Davey a O'Toole 2000). Díky výrazné produkci EPS dochází k dozrávání biofilmu (Sutherland 2001, Ahimou et al. 2007). Během několika hodin, někdy až dní vzniká trojrozměrná struktura biofilmu s houbovými strukturami bakterií a exopolysacharidů, tvořená dutinami a kanálky, které umožňují přísun živin i do hlubších vrstev biofilmu. K bakteriálnímu biofilmu se mohou dále navazovat i další druhy mikroorganismů. Po dosažení určité buněčné denzity se z vytvořeného biofilmu začínají oddělovat jednotlivé buňky nebo i celé shluky s částmi biofilmu. Uvolněné buňky se dostanou zpět do prostředí a mohou kolonizovat další povrchy, které jsou vhodné pro uchycení biofilmu (Watnick a Kolter 2000). Takto vzniká v biofilmu dynamická rovnováha, která je regulována živinami a podmínkami vnějšího prostředí, ale i bakteriemi – tj. systémem *quorum-sensing* (Davies et al. 1998) či produkcí látek, které rozrušují strukturu samotného biofilmu (Villverde et al. 1997). Aktivují se také geny pro syntézu enzymů degradujících hlenovou matici (Hudcová 2007), které podněcují uvolnění buněk z biofilmu (Busscher a Mei 1997).

Kmen, který je schopen tvořit biofilm, je obecně považován za virulentnější. Mnoho autorů se shoduje v tvrzení, že biofilmy tvoří především izoláty z hemokultur (Arciola et al. 2002). Co se týká hodnocení možností efektivní léčby infekcí způsobených mikroorganismy v biofilmové struktuře, je třeba znát citlivost k antimikrobiálním látkám mikroorganismů v biofilmu. Při stanovení citlivosti biofilmopozitivních bakterií k ATB se užívá minimální biofilm eradikující koncentrace antibiotika – MBEC (koncentrace antimikrobiálních látek, která zcela likviduje buňky v biofilmu) a minimální biofilm inhibující koncentrace – MBIC (koncentrace antimikrobiálních látek, která zastavuje jejich růst a množení) (Bardouniotis et al. 2001). MBEC a MBIC jsou vůči hodnotám minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) stanoveným běžným postupem na planktonní populaci vyšší až o čtyři řády. Tomuto tématu se věnuje mnoho autorů, ale zatím stále neexistuje standardní metodika ke stanovení MBEC a MBIC (Holá et al. 2004).

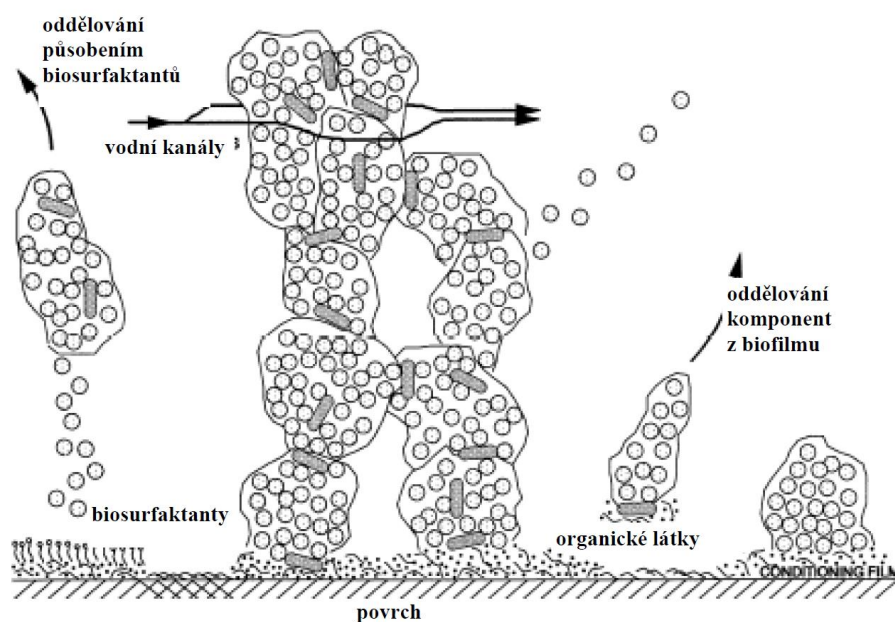
### 2.2.1.2.1 *Quorum sensing*

System QS (*quorum sensing*) je důležitý mechanismus regulace genové exprese a komunikace mezi bakteriemi v biofilmu (Hassan et al. 2011). Bakterie mají svou vlastní podobu komunikace. Komunikací bakterií je vysílání a příjem chemických signálů (Shrout a Nerenberg 2012). Jedná se o jakési vnímání množství bakterií v daném společenství, které mikroorganismům umožňuje reagovat a ovlivňovat život v populaci a adaptaci na životní podmínky (Duan a Surette 2007). Pojmenování *quorum sensing* vychází z poznatku, že vše závisí na bakteriálních buňkách, které musejí dosáhnout určité minimální populace, aby došlo k zahájení komunikace (Shrout a Nerenberg 2012). Vše je založeno na produkci signálních molekul nazývaných autoinduktory, které zvyšují svoji koncentraci v závislosti na buněčné denzitě (Bassler 1999). Roste-li množství bakteriálních buněk, úměrně stoupá i koncentrace autoinduktorů. Dosažením minimální stimulační koncentrace autoinduktoru vede ke změně genové exprese, čímž se může ovlivnit chování bakteriálních buněk (Miller a Bassler 2001, Reading a Sperandio 2006).

Grampozitivní a gramnegativní bakterie využívají QS pro regulaci fyziologických aktivit. Tyto procesy zahrnují virulenci, konjugaci, produkci antibiotik, sporulaci a tvorbu biofilmu. Obecně platí, že gramnegativní bakterie používají acylované homoserinové laktony jako autoinduktory a grampozitivní bakterie používají ke komunikaci různé oligopeptidy. Komunikace pomocí QS prostřednictvím autoinduktorů se vyskytuje jak uvnitř biofilmu, tak i vně mezi bakteriálními druhy, kde bakteriální autoinduktory dokáží vyvolat specifické reakce hostitelských organismů. Ačkoli povaha chemických signálů a mechanismů cílových receptorů QS bakterií se liší, tak schopnost vzájemné komunikace umožňující bakteriím koordinovat expresi genů a tedy i chování celého společenství je stejná (Bassler 1999, Gözl et al. 2012, Miller a Bassler 2001). Existuje několik typů signalizačních mechanismů QS, které bakterie využívají (Shrout a Nerenberg 2012).

### 2.2.1.3 Struktura biofilmu

Struktura biofilmu je podmíněná vlastnostmi prostředí, ve kterém se nacházejí mikroorganismy a dostupností živin, kyslíku ale i dalšími druhy bakterií. Složení biofilmu se liší, různá je i distribuce EPS v aerobních a anaerobních částech (Mah a O'Toole 2001). Samostatné bakterie, které adherují na povrch jsou základní jednotkou biofilmu. Také jednou ze základních složek jsou vodní kanálky, které tvoří oběhový systém, proudění vody kanálky zajišťuje přísun živin a výměnu metabolitů. Extracelulární hmota obsahuje polysacharidovou matrix další organické i anorganické složky. Matrix udržuje buňky v biofilmu a podílí se na adhezi. K dalším funkcím EPS matrix patří zejména ochrana bakteriálních buněk před ATB, UV zářením, změnou pH a dehydratací (Ahimou et al. 2007). V prostředí s vysokým obsahem živin jsou biofilmy mnohem kompaktnější a silnější, biofilm získává porézní strukturu s dutinami a kanálky a shluky bakteriálních buněk (Donlan 2001).



**Obrázek č. 5:** Tvorba a struktura biofilmu (převzato z Busscher a Mei 1997).

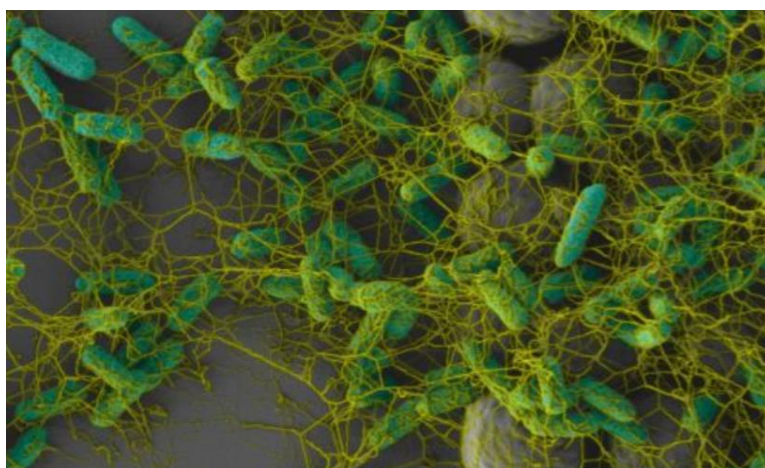
## 2.2.2 Metody stanovení a důkazy biofilmu

K průkazu tvorby biofilmu se používá celá řada metod, a to především fenotypové metody, při kterých se prokazuje růst a tvorba biofilmu biofilm-pozitivních bakterií a následně se vzniklá vrstva biofilmu obarví a detekuje. Nejčastěji se využívá kolorimetrická metoda – barvení pomocí krystalové violeti, která je široce používaná pro měření tvorby biofilmu (Niu a Gilbert 2004). Využitelné jsou i metody genotypové, při kterých se dokazuje přítomnost genů, které jsou zodpovědné za tvorbu biofilmu (Christensen et al. 1982).

### 2.2.2.1 Fenotypové metody

#### 2.2.2.1.1 Mikroskopické metody

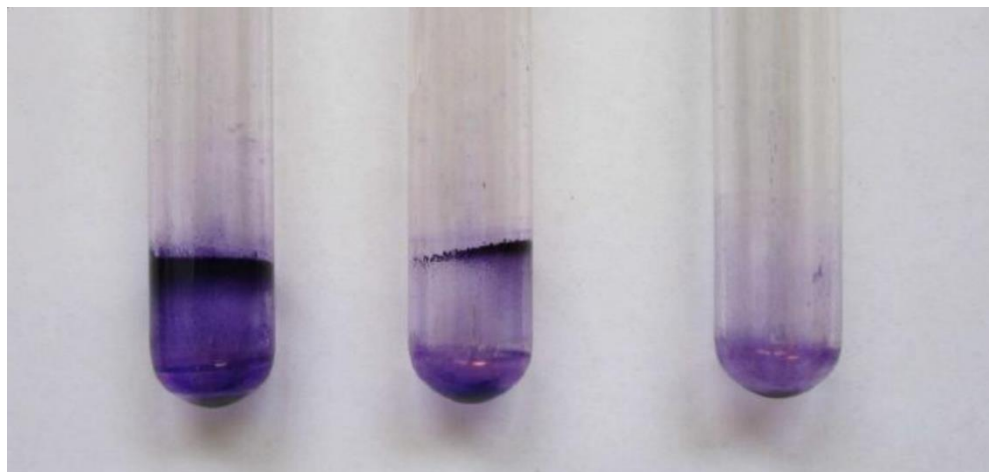
Mezi mikroskopické metody, které jsou využívány pro sledování tvorby biofilmů se využívá elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil i klasická světelná mikroskopie, u které se bakteriální buňky a biofilm zvýrazní barvivy (Christensen et al. 1985). Dále se využívá fluorescenční mikroskopie pro studium prostorového uspořádání biofilmu, a to jak bakteriálních buněk, tak i polysacharidové matrix (Hassan et al. 2011). Tuto techniku lze také využít k odlišení živých buněk od mrtvých buněk. Při studiu biofilmů se používá konfokální rastrovací laserová mikroskopie (CSLM), která poskytuje ostrý obraz, je vhodná také pro zobrazení struktur, které jsou ukryté pod biofilmem a poskládáním můžeme vytvořit 3D–strukturu (Chandra et al. 2001).



**Obrázek č. 6:** Elektronová mikrofotografie *E. coli* tvořící biofilm (převzato z Research from Harvard University 2013).

### 2.2.2.1.2 Christensenova metoda – zkumavková metoda

Christensenova zkumavková metoda je metoda průkazu tvorby biofilmů. Vybraný mikroorganismus je kultivován ve zkumavce s TSB (tryptonsojový bujón) a vzniklá biofilmová vrstva je obarvena (Christensen et al. 1982). Jako alternativní médium vhodné pro kultivaci je využíváno i BHI (Brain Heart Infusion) (Mulder a Degener 1998). Kultivační médium se zaočkuje mikrobiální suspenzí o buněčné hustotě 0,5-1 dle McFarlandovy zákalové stupnice, pipetuje se 100  $\mu$ l do 2 ml média TSB nebo BHI, aby výsledná hustota bakteriálních buněk v kultivačním médiu odpovídala  $10^6$ – $10^7$  buněk/ml. Se silnější bakteriální suspenzí roste i míra vrstvy biofilmu (Freeman et al. 1989, Stepanovic et al. 2001). Zaočkované médium se inkubuje v rozmezí 24 až 48 hodin, v závislosti na mikroorganismu a fyzikálních podmínkách (Hassan et al. 2011). Teplota inkubace je obvykle 37 °C (Stepanovic et al. 2003). Po skončení inkubaci jsou zkumavky vyprázdněny a promyty fosfátovým pufrům (pH 7,2), lze použít i fyziologický roztok, aby se vyplavily nezachycené buňky, následuje zafixování zkumavek (Baldassarri et al. 1993) a obarvení. Vrstva biofilmu se barví po dobu 20 minut, a to nejčastěji krystalovou violetí, dále pak safraninem, karbolfuchsinem nebo trypanovou modří. Zkumavky s obarvenou vrstvou v celé části značí biofilm-pozitivní kmeny, jako biofilm-negativní jsou hodnoceny zkumavky bez obarvené vrstvy (Freeman et al. 1989, Hassan et al. 2011).



**a)**

**b)**

**c)**

**Obrázek č. 7:** Christensenova zkumavková metoda: a) silná tvorba biofilmu, b) střední tvorba biofilmu, c) negativní tvorba biofilmu (převzato z Goldman 2009).

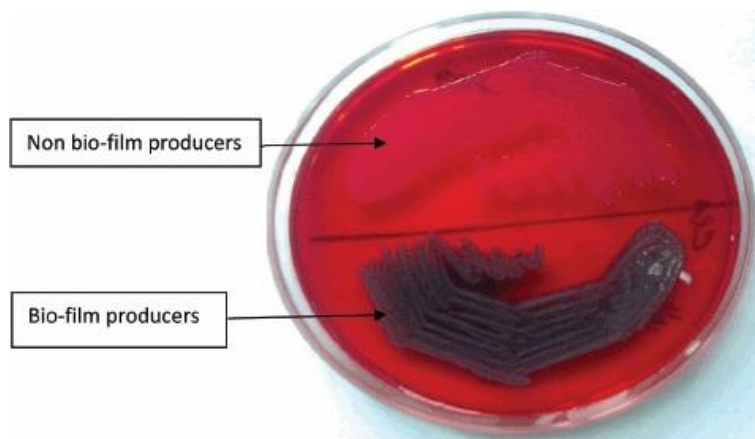
Christensenova zkumavková metoda se běžně provádí ve skleněných či v plastových zkumavkách. Nevýhodou však je, že metoda nedosahuje přesné kvantifikace biofilmu, výsledky jsou spíše subjektivní (Christensen et al. 1982).

#### 2.2.2.1.3 Christensenova metoda – v mikrotitračních destičkách

Metoda v mikrotitračních destičkách je založena na stejném principu jako Christensenova zkumavková metoda. Kultivace vybraného mikroorganismu probíhá v mikrotitrační destičce, a to ve stejném kultivačním médiu (TSB nebo BHI). Následuje inkubace, zafixování a obarvení (Hassan et al. 2011). Nárůst biofilmu je měřen spektrofotometricky, čím větší nárůst biofilmu, tím je větší i odezva (Christensen et al. 1985). Využívanější je však upravený postup, kdy se barvivo vymyje destilovanou vodou a do jamek se přidá ethanol. Zbarvení jamek v mikrotitrační destičce se měří opět spektrofotometricky (vlnová délka  $\lambda = 595$  nm). Absorbance jednotlivých jamek se potom porovnává s tzv. *cut off value*, která se vypočítá na základě absorbance jamek negativní kontroly (Knobloch et al. 2002, Stepanovic et al. 2000).

#### 2.2.2.1.4 Kultivace na agaru s kongo červení

Další metodou, která slouží k rozlišení biofilm-pozitivních a biofilm-negativních bakterií je kultivace na agaru s kongo červení (Hassan et al. 2011, Kaiser et al. 2013). Agarové médium je připraveno z mozko srdcové infuze, sacharózy a kongo červeně, tedy barviva, které specificky váže polysacharidy (Hassan et al. 2011, Růžička et al. 2006). Bakterie tvořící EPS (bakterie biofilm pozitivní) rostou v černých koloniích s výraznou precipitační zónou, kdežto bakterie biofilm negativní tvoří lesklé červené kolonie. Metoda kultivace na agaru s kongo červení je rychlá, citlivá a reprodukovatelná (Freeman et al. 1989, Knobloch et al. 2002).



**Obrázek č. 8:** Pozitivní producent biofilmu *S. epidermidis* ATCC 35984 a negativní producent *S. epidermidis* ATCC 12228 (převzato z Niveditha et al. 2012).



## 2.2.2.2 Genotypové metody

### 2.2.2.2.1 Geny asociované s tvorbou biofilmu

Ve vývoji biofilmu má důležitou roli skupina povrchových proteinů, první byl stanoven *Bap* (biofilm-associated protein) *Staphylococcus aureus*. Samotná tvorba biofilmu je komplikovaná, na procesu tvorby se totiž podílí mnoho genů. Geny spojené s tvorbou biofilmu u některých bakterií lze prokázat pomocí metody PCR. Protože přítomnost genu zodpovědného za tvorbu biofilmu nezaručí, jestli bude gen spojený s tvorbou biofilmu skutečně exprimován a testovaný kmen bude biofilm pozitivní (Knobloch et al. 2002). Průkazy genů zodpovědných za tvoření biofilmu se používají např. u stafylokoků, které nesou pro tvorbu biofilmu celý soubor genů. Souhrnně je soubor označován jako *ica* operon a nese geny *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* a represivní gen *icaR* (Kaiser et al. 2013). U rodu *Escherichia* gen *CsgBAC* kóduje tvorbu biofilmu. Klíčové geny indukující tvorbu biofilmu byly prokázány pouze u stafylokoků (Freboung et al. 2000).

### 2.2.2.3 Další metody detekce biofilmu

#### Metoda MALDI

Metoda MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) se používá pro studium biofilmu a zisku složení extracelulární matrix, dále pro studium proteinů, dalších molekul v biofilmu i samotných planktonických buněk (Hefford et al. 2005).

#### CDC biofilmový reaktor

CDC biofilmový reaktor slouží k tvorbě a studiu biofilmů. Celý systém se skládá ze skleněného reaktoru, v jeho víčku je 8 držáků s tzv. maticí pro biofilm, která může být z různých materiálů. Reaktor je připojen k nádobě se sterilním kultivačním médiem a tok kultivačního média je zajištěn peristaltickou pumpou. Ke kvantifikaci množství biofilmu a biofilm-pozitivních mikroorganismů je biofilm uvolněn z matrice pomocí ultrazvuku a intenzivního víření. Poté dochází ke kvantifikaci počtu mikroorganismů pozitivních na tvorbu biofilmu, pomocí desítkové ředící řady a aplikace na kultivační média (Macia et al. 2014, Donlan 2001).

### **RDR rotační diskový reaktor**

Rotační diskový reaktor (RDR) má ve spodní části rotující disk a obsahuje tyčový magnet, který umožňuje rotaci disku a cirkulaci kultivačního média. Cirkulace růstového média je dále zajištěna systémem hadiček a peristaltickou pumpou. RDR slouží pro studium odstranění narostlého biofilmu a látek, které budou schopné růst biofilmu inhibovat. Po době inkubace pro formaci studovaného biofilmu se reaktor zastaví a rotační disk se vynadá. Sterilní pinzetou se odstraní matrice z disku a ponoří se do fyziologického fosfátového pufru (Donlan 2001).

### **Metody molekulární biologie**

Nejvyužívanější metodou stanovení v buněčné biologii je PCR. Metoda multiplexní polymerázové řetězové reakce (mPCR) byla využita a optimalizována pro detekci biofilmu za použití interkalačních barviv ethidium monoazidu (EMA) a propidium monoazidu (PMA) (Hrušková et al. 2013, Pan a Breidt 2007).

### 2.2.3 Tvorba biofilmu u arkobakterů

Biofilmy poskytují podporu pro patogenní bakterie, a to v jejich přežití ve stresujícím prostředí. Byly publikovány studie, které se zabývaly distribucí, genetickou rozmanitostí a odolností vůči antibiotikům, taktéž schopností tvořit biofilm u arkobakterů (Duarte et al. 2015). Schopnost arkobakterů adherovat k inertním povrchům byla slabší, negativní vliv měla u některých druhů aerobní atmosféra. Celkové výsledky ukazují na schopnost kmenů *Arcobacter* tvořit biofilmy a taktéž působit jako sekundární kolonizátory (Ferreira et al. 2013).

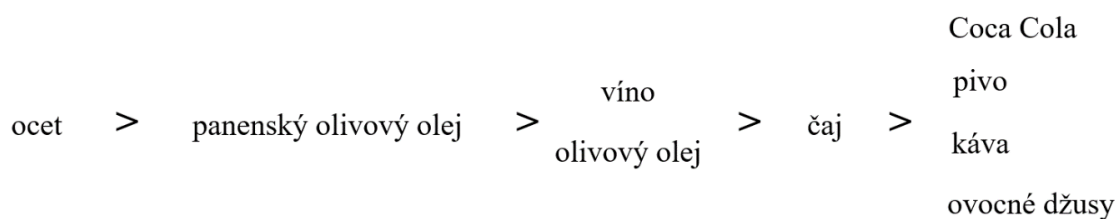
Pro další experimenty na potvrzení tvorby biofilmu byl využit *A. butzleri* ATCC 49616 a další izoláty arkobakterů z drůbeže. *A. butzleri* byl inkubován v BHI nebo M-H bujónu po dobu 18 hodin při 37 °C. Kultury byly zředěny a přeneseny do mikrotitrační destičky. Sterilní BHI nebo M-H živný bujón sloužil jako negativní kontrola. Destička byla dále inkubována při 37 °C po dobu 24 až 72 hodin. Po inkubaci byly buňky promyty a obarveny krystalovou violetí, poté se destička vysušila a proměřila se absorbance. Sledovala se tvorba biofilmu na nerezových kupónech, které byly umístěny do zkumavek. Množství biofilmu se zvyšovalo společně s teplotou a taktéž i inkubační dobou. *A. butzleri* ATCC 49616 vytvořil biofilm na nerezové oceli při 5, 10 i 21 °C po 24 hodinách inkubace (Kjeldgaard et al. 2009).

Dále pak lze využít již zmíněnou PCR reakci s interkalačními barvivy, kde analýzou kmenů rodu *Arcobacter*, lze zjistit, jestli jsou vybrané kmeny biofilm pozitivní či nikoliv. Z výsledků vyplývá, že mezi druhy bakterií v rodu *Arcobacter* je značná variabilita (Hrušková et al. 2013).

## 2.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY A JEJICH ÚČINEK

V přírodním prostředí existují bakterie převážně v biofilmové struktuře. Jak již bylo uvedeno, biofilmy mohou zahrnovat populace jednoho druhu bakterií nebo populace smíšené. Bakterie v biofilmech jsou extrémně odolné vůči antibakteriálním činidlům a způsobují vážné problémy pro antimikrobiální terapii, proto je z hlediska vědy velký zájem o studium antimikrobiálních látek (Plyuta et al. 2013).

Mikrobiologové zkoumají antimikrobiální účinnost celé řady rostlinných sloučenin, které jsou získané z bylin, koření, olejů i potravin, dále samozřejmě z kávy, čaje a vína. Mělo by být podrobena studiím více rostlinných sloučenin k určení účinnosti v systémech celého organismu, včetně studie toxicity, jakož i posouzení účinků na normální mikroflóru. Také alternativní mechanismy prevence a léčba infekcí by měla být zahrnuta v počáteční fázi studií (Cowan 1999). Následně je uvedené pořadí dle antimikrobiální aktivity nápojů a pochutin (Brenes et al. 2007, Medina et al. 2007, Okabe et al. 2003).



**Obrázek č. 9:** Antimikrobiální aktivita vybraných produktů (převzato z Brenes et al. 2007).

### **2.3.1 Antimikrobiální látky**

Rostlinné antimikrobiální látky jsou sekundární metabolity a mnoho z nich patří mezi fenoly nebo jejich substituované deriváty (Cowan 1999). Kromě těchto sloučenin vykazují antimikrobiální aktivitu také chinony, flavonoidy, kumariny, terpeny a alkaloidy (Collado et al. 2009). Sekundární metabolity slouží jako obranné látky s různými mechanismy proti mikroorganismům, hmyzu nebo býložravcům (Cowan 1999, Villverde et al. 1997).

Z těchto důvodů se provádí screening látek, které by mohly potenciálně zabránit tvorbě biofilmu a problémům s rezistencí k ATB. Fenolické sloučeniny inhibují růst mnoha druhů mikroorganismů, ale navzdory tomu je působení fenolických sloučenin na mikroorganismy stále málo prostudované, a to zejména vliv rostlinných fenolických látek na bakteriální biofilmy (Brenes et al. 2007).

Přirozeným procesem, kterým obecně potraviny prochází je kontaminace a následná degradace řadou mikroorganismů. Výskyt bakterií v potravinách závisí na mnoha faktorech jako je pH,  $a_w$ , teplota, obsah chemických látek a konzervačních látek (Sheth et al. 1988). Po přírodních konzervačních látkách, které by mohly zabránit růstu nepříznivých mikroorganismů nebo zpozdit nástup poškození potravin, se zvyšuje poptávka mezi výrobci (Medina et al. 2007). Problémem je, že počet ohnisek alimentárních onemocnění stále roste (Brenes et al. 2007).

### **2.3.2 Sloučeniny s antimikrobiálními účinky**

#### **2.3.2.1 Fenoly a polyfenoly**

Fenolické látky, které jsou produkovány rostlinami, mají schopnost ovlivňovat adhezi bakterií, mezibuněčnou komunikaci a tvorbu biofilmu (Villverde et al. 1997).

Katechol a pyrogallol jsou hydroxylované fenoly, toxické pro mikroorganismy. Katechol má dvě hydroxy skupiny a pyrogallol má tři hydroxy skupiny. Hydroxylové skupiny na fenolech jsou považovány za zdroj antimikrobiální účinnosti, zvýšená hydroxylace tedy vede ke zvýšení antimikrobiální účinnosti. Eugenol je zástupce nacházející se v hřebíčkovém oleji a je považován za bakteriostatický proti řadě bakterií (Cowan 1999).

### 2.3.2.2 Chinony

Chinony jsou aromatické sloučeniny se dvěma oxoskupinami. Vyskytují se v přírodě a jsou vysoce reaktivní. Kromě toho, že poskytují zdroj stabilních volných radikálů, je známo, že chinony tvoří s některými aminokyselinami v bílkovinách komplexy, což často vede k inaktivaci proteinů a ztrátě jejich funkce. Z tohoto důvodu je rozsah antimikrobiálních účinků chinonů široký (Nowicka et al. 2009).

### 2.3.2.3 Flavonoidy a katechiny

Jsou to účinné antimikrobiální látky proti širokému spektru mikroorganismů. Jejich činnost je pravděpodobně způsobena schopností reagovat s extracelulárními a rozpustnými bílkovinami a s komplexem bakteriální buněčné stěny. Více lipofilní flavonoidy mohou narušit také mikrobiální membrány (Cowan 1999, Rice-Evans et al. 1996).

Katechiny jsou flavonoidy, které se vyskytují v zeleném čaji. Už dávno bylo zjištěno, že čaje působí antimikrobiálně a že obsahují směs katechinových sloučenin. Tyto sloučeniny například inhibovaly *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, shigelly a další mikroorganismy v *in vitro* testech. Katechiny inaktivovaly cholerový toxin ve *V. cholerae* a inhibovaly bakteriální glukosyltransferázy v *S. mutans* (Cowan 1999).

### 2.3.2.4 Taniny a kumariny

Hydrolyzovatelné taniny jsou založeny na kyselině galové, obvykle jako vícečetné estery D-glukózy, zatímco četnější kondenzované taniny pocházejí z flavonoidních monomerů. Alternativně mohou být taniny tvořeny polymerací chinonových jednotek (Pleszczyńska a Szczodrak 2005).

Kumariny jsou fenolické látky vyrobené z kondenzovaných benzenových a  $\alpha$ -pyroneových kruhů. Jejich význam pochází převážně z jejich antitrombotické, protizánětlivé a vazodilatační schopnosti. Warfarin je zvláště známý kumarin, který je používán jako perorální antikoagulant a také může mít antivirový a antimikrobiální účinek (Keating a O'Kennedy 1997, O'Kennedy a Thornes 1997).

### 2.3.2.5 Terpenoidy a esenciální oleje

Terpeny nebo terpenoidy jsou účinné proti mnohým bakteriím, virům a též působí na protozoa. Mechanismus působení terpenů není plně znám, pravděpodobně dochází k porušení membrány lipofilními sloučeninami. Vědci našli v potravinách terpenoidy přítomné v éterických olejích rostlin, např. v oleji z bazalky, kapsaicin z chilli papriček, který má široké spektrum biologických aktivit u člověka nebo diterpén a afromodiol z kamerunského koření (Cowan 1999, Wan et al. 1998).

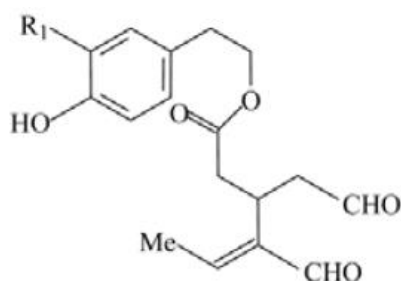
### 2.3.3 Olivové oleje a antimikrobiální testování

Existuje několik druhů olivových olejů, prvním z nich je panenský olivový olej, který se získává přímo z čerstvých oliv za pomoci přesně definovaných postupů, kdy teplota nepřesahuje 25 °C. Dále směs olivového oleje a rafinovaného olivového oleje a také olivový olej získaný z pokrutin. Všechny olivové oleje obsahují stejné množství mastných kyselin, ale důležité je, že mají různý obsah fenolických sloučenin. Obsah fenolických sloučenin je podstatně vyšší v panenském olivovém oleji. Záleží i na odrůdě oliv, to také určuje fenolické složení a kvalitu panenského olivového oleje. Požití fenolických sloučenin obsažených v olivovém oleji může přispět k vyvážení střevní mikroflóry (Medina et al. 2006).

Testuje se i celá řada olejů, které jsou obohaceny o jiný olej či příměsí. Slunečnicový olej bez přídavku olivového oleje, koření nebo bylin nevykazuje antimikrobiální účinky. U olivových olejů to neplatí, různé složky oleje jsou zodpovědné za baktericidní účinek. Nejvyšší baktericidní aktivita byla zjištěna u extra panenského olivového oleje, následovaného olejem olivovým a olejem z pokrutin. Mezi testované mikroorganismy patřila celá řada gram pozitivních i gram negativních kmenů. Jediný mikroorganismus, který přežil expozici ve vybraných olejích byla *Candida albicans*. Překvapivě byl extrakt z olivových listů schopen inhibovat růst *C. albicans*. Účinné látky extraktu z olivových listů se liší od sloučenin v olivových olejích, extrakt z listů oliv byl mnohem více inhibující pro růst *E. coli*, než pro *C. albicans*. Co se týká testovaných bakterií, většina z nich přežila maximálně hodinovou inkubaci v panenském olivovém oleji. Antimikrobiální látky olivových olejů vykazují baktericidní účinky pro *S. aureus*, *L. monocytogenes*, slabší pro *S. enterica* a *S. sonnei*. Olivový olej vykazuje silnou antibakteriální aktivitu proti potravinářským patogenům, ale musí být zohledněna také jeho fenolická aktivita, pH a další faktory (Medina et al. 2006).

### 2.3.4 Antimikrobiální účinky olivových olejů

Výtažky z olivového oleje byly používány v medicíně po celá staletí, ale teprve koncem šedesátých let devatenáctého století začali vědci přisuzovat olejům antimikrobiální účinnost, zejména fenolickým sloučeninám (Kalemba a Kunicka 2003). Studií o antimikrobiální aktivitě polyfenolů olivových olejů je velice málo, spíše jde o studie, které jsou zaměřeny na identifikaci složek fenolů zodpovědných za antimikrobiální aktivitu. Byly popsány čtyři sloučeniny, které jsou nejvíce zodpovědné za antimikrobiální aktivitu, a to hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein a ligstrosid. Především se jedná o jejich aglykony a dialdehydicke formy, které mají silnou bakteriocidní aktivitu (Medina et al. 2007). Hydroxytyrosol a tyrosol, však nejsou hlavními fenolickými činidly v panenském olivovém oleji (Brenes et al. 2007).



Dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycon ( $R_1=OH$ )  
Dialdehydic form of decarboxymethyl ligstroside aglycon ( $R_1=H$ )

**Obrázek č. 10:** Chemická struktura hlavních polyfenolů v olivovém oleji (převzato z Brenes et al. 2007)

Oleuropein je jednou z hlavních fenolických sloučenin obsažených v olivovém oleji. Je tvořený glukózou, kyselinou elenolovou a hydroxytyrosolem. Jeho použití jako přirozené antimikrobiální přídatné látky v potravinách je však omezeno kvůli silně hořké chuti. Baktericidní účinek je přisuzován dalším sloučeninám oleje a jednoduchým fenolům. Oleuropein, katechiny, kyselina chlorogenová, karvacrol, cinnamaldehyd a thymol jsou mimo jiné, nejvíce přirozeně se vyskytující fenolické sloučeniny s antimikrobiální aktivitou (Brenes et al. 2007).

Baktericidní účinnost mnoha typů olivových olejů byla sledována proti mikroorganismům *in vitro*. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla pozorována v panenských olivových olejích, následovaly olivové oleje a oleje, u kterých klesal obsah fenolických sloučenin. Antimikrobiální účinek je obecně vyšší proti grampozitivním bakteriím, oproti gramnegativním bakteriím (Medina et al. 2006).



Silná baktericidní aktivita vyvolaná polyfenoly olivového oleje proti potravinářským patogenům, byla hodnocena u kmenů *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subs. *enterica*, *Yersinia* sp. a *Shigella sonnei*. Tyto poznatky otevírají možnost využití olivového oleje k potlačení růstu mikroorganismů a tím menšímu poškození potravin (Brenes et al. 2007). Olivový olej vykazuje baktericidní účinek nejen proti škodlivým bakteriím, ale také proti prospěšným mikroorganismům. Avšak ne všechny oleje, které jsou klasifikované jako olivové oleje mají shodné baktericidní účinky. Tato aktivita závisí na obsahu některých fenolických sloučenin (Medina et al. 2006).

### **2.3.5 Antimikrobiální účinky esenciálních olejů na arkobaktery**

V minulosti byl zkoumán inhibiční účinek některých aromatických látek z rostlinných olejů na kmeny rodu *Arcobacter*. Pro testování byly využity tři kmeny *Arcobacter butzleri*, dva kmeny *Arcobacter cryaerophilus* a jeden kmen *Arcobacter skirrowii*. Největší inhibici vykazoval cinnamaldehyd, následně thymol, carvacol, kyselina kofeinová, kyselina taninová a eugenol. Tyto sloučeniny vykazují antimikrobiální aktivitu proti různým mikroorganismům. Taktéž byly zkoumány koncentrace tří nejsilnějších aromatických látek rostlinného oleje. Celkově byl cinnamaldehyd nejúčinnější proti všem testovaným arkobakterům, kromě *A. butzleri*, kde byly výsledky smíšené. Aktivity thymolu a carvacolu byly závislé na koncentraci a na bakteriálním druhu. Také bylo zjištěno, že byliny a léčivé rostlinné extrakty působily jako účinné inhibitory na všechny kmeny rodu *Arcobacter*. Na základě pokusů bylo tedy zjištěno, že cinnamaldehyd nejvíce inhiboval růst *Arcobacter* spp. Protože arkobaktery se chovají různě v reakci na organické sloučeniny, výsledky jedné studie by měly být interpretovány s opatrností, proto je třeba provést další studie, které pomohou objasnit způsob působení cinnamaldehydu na různé druhy bakterií rodu *Arcobacter* (Červenka et al. 2008).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál, přístroje, pomůcky

#### 3.1.1 Chemikálie

Ethanol 96 %	Lach-ner, Neratovice, ČR
Octan sodný	Lachema, Neratovice, ČR
oxalát amonný	PENTA, ČR
NaCl	PENTA, ČR
KCl	PENTA, ČR
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PENTA, ČR
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	PENTA, ČR
krystalová violet'	Alchemia, Brno, ČR

#### 3.1.2 Technické vybavení

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

### 3.1.3 Pomůcky

Běžné plastové, skleněné a kovové laboratorní potřeby

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

### 3.1.4 Živná média a použité roztoky

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

složení:

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

pH (25 °C) = 7,3 ± 0,2

Pro přípravu TSA půdy byla navážena prášková směs v poměru 40 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut a po ochlazení na cca 50 °C rozlit do Petriho misek.

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

složení:

hovězí masová infuze	z 300 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. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut a po ochlazení na cca 50 °C rozlit do Petriho misek.

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

složení:

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

pH (25 °C) = 7,4 ± 0,2

Pro přípravu BHI bujónu byla navážena prášková směs v poměru 37 g směsi na 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut.

- **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 minut.

- **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**

složení:

NaCl	8 g
KCl	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2,9 g

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

### 3.2 Bakteriální kmeny

V diplomové práci bylo k testování využito 8 bakteriálních kmenů, které pocházejí ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (kmeny označené CCUG), z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (kmeny označené CCM), interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (kmeny označené UPa) a ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii (kmeny označené LMG). Jedná se o následující kmeny:

*Arcobacter butzleri* CCUG 30484

*Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

*Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

*Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

*Arcobacter lanthieri* LMG 28517

*Arcobacter thereius* LMG 24488

*Escherichia coli* CCM 3954

*Staphylococcus aureus* CCM 4223

Všechny testované kmeny byly uchovány naočkované na TSA agaru v Petriho miskách při chladničkové teplotě. Pro delší dobu uskladnění byly kmeny zaočkovány do BHI bujónu a kultivovány v termostatu při 25 °C. Během práce byly z bujónu mikroorganismy vyočkovány opět na TSA agar, jednalo se o kmeny, se kterými se pracovalo omezenou dobu, aby se zabránilo změnám mikroorganismům díky častému pasážování.

Před každým testováním byly kmeny přeočkovány na TSA agar a kultivovány. U arkobakterů probíhala kultivace při 30 °C po dobu 48-72 hodin. V případě *E. coli*

a *S. aureus* byla kultivace 24 hodin při 37 °C. Pro testování antimikrobiálních účinků olejů byla připravena buněčná suspenze ve fyziologickém roztoku o denzitě odpovídající stupni č. 1 McFarlandovy zákalové stupnice ( $10^8$  cfu/ml), která byla dle potřeby experimentu upravena desítkovým ředěním. Pro kontrolu skutečné denzity bylo vyočkováno 100  $\mu$ l suspenze  $10^3$  cfu/ml na TSA agar.

Pro sledování tvorby biofilmů bylo pracováno s buněčnou suspenzí o denzitě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice.

### 3.3 Testované vzorky

Do diplomové práce byly zahrnuty vzorky olivových olejů z obchodní sítě v ČR. Příprava extraktů z olejů probíhala vždy dle postupu uvedeného v kap. 3.4 tak, aby byla zajištěna reprezentativnost vzorků v daných experimentech.

**Tabulka č. 2:** Vzorky olivových olejů využité pro experiment.

Název	Výrobce / distribuce	Země původu
<b>Olej Ballester</b> (extra panenský)	Master Martini CE s.r.o., ČR	Španělsko
<b>Olej Kyosos</b> (extra panenský)	H. M. WEIHS, Vídeň, AUT	Řecko
<b>Olej Ondoliva</b> (extra panenský 20 % + olivový 80 %)	Urzante, S. L., ESP	Španělsko
<b>Olej Borges</b> (extra panenský + rafinovaný olivový)	Borges Branded Foods, S.L.U., ESP	Španělsko
<b>Olej z pokrutin</b>	Basic, Albert, ČR	Španělsko



Obrázek č. 11: Vzorky olejů pro experimentální část studie (foto autor).

### 3.4 Příprava olejových extraktů

Vzorek oleje se smísil v poměru 1:1 s PBS pufrům. Takto vzniklá směs se intenzivně promíchala na vortexu (3-5 min), a poté byla centrifugována (9000 rpm) po dobu 3 minut. Po proběhlé centrifugaci byla odpipetována vodná fáze do sterilní zkumavky, se kterou se pokračovalo dále v experimentu.

### 3.5 Přežívání vybraných bakterií v olejových extraktech

Byla připravena mikrobiální suspenze vybraného kmene o bakteriální denzitě odpovídající stupni č. 1 dle McFarlandovy zákalové stupnice. Pro toto testování byla bakteriální suspenze naředěna desítkovým ředěním z počáteční denzity  $10^8$  cfu/ml na  $10^6$  cfu/ml. Samotné testování probíhalo tak, že se smísilo 900  $\mu$ l odebrané vodné fáze po extrakci oleje a 100  $\mu$ l bakteriální suspenze. Po určité expozici bylo provedeno vyočkování 100  $\mu$ l na povrch M-H agaru.

Pro experiment byly zvoleny následující časové expozice:

$t_0 = 0$  minut

$t_5 = 5$  minut

$t_{10} = 10$  minut

$t_{30} = 30$  minut

$t_{60} = 60$  minut

$t_{3h} = 3$  hodiny

$t_{6h} = 6$  hodin

$t_{24h} = 24$  hodin

Tyto časové expozice byly zvoleny pro všechny zástupce rodu *Arcobacter*, pro některé vzorky bylo u kmenů *S. aureus* a *E. coli* nutné časovou expozici zvýšit až na 48–72 hodin. Kultivace probíhala při 30–37 °C po dobu 48–72 hodin. Všechny experimenty byly provedeny v dubletu a experiment byl opakovaný 2x.

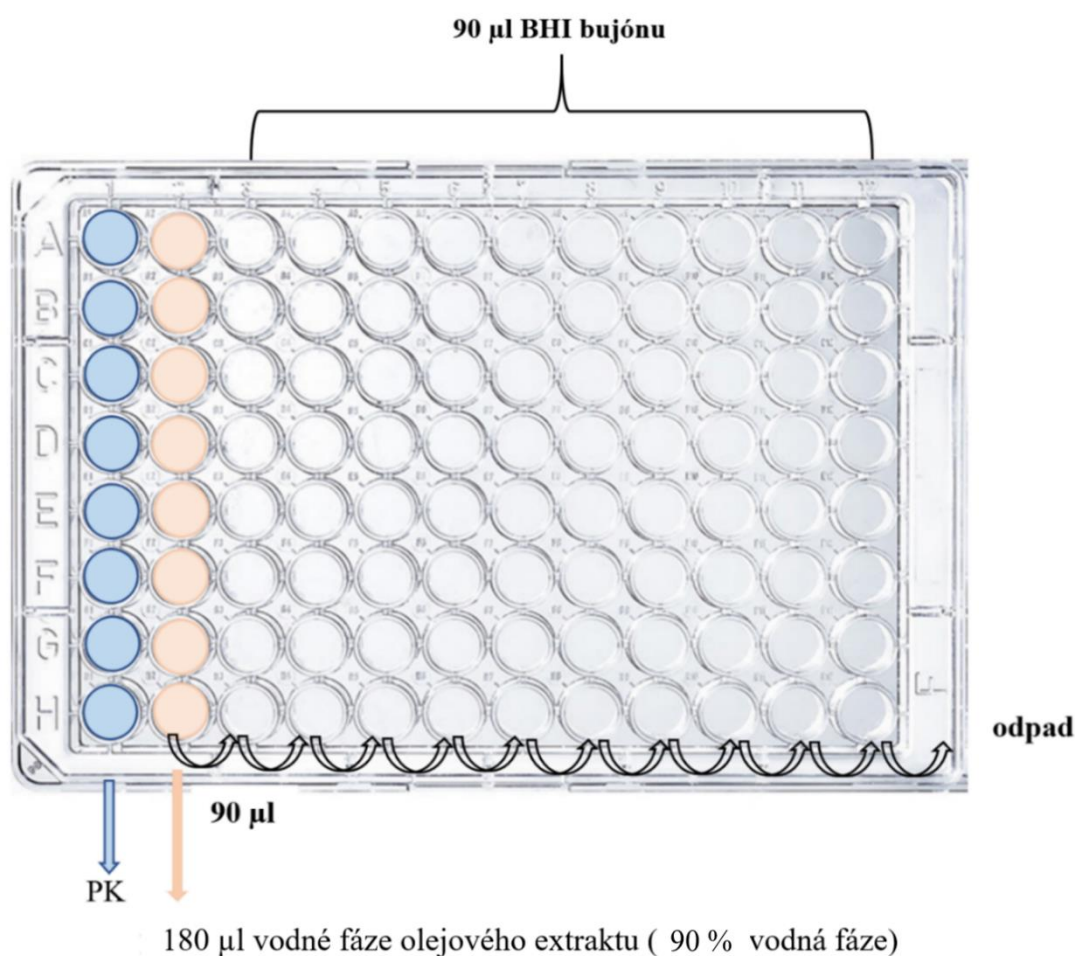
### 3.6 Příprava biofilmů – Christensenova metoda v MT destičkách

Každý bakteriální kmen byl testován na tvorbu biofilmu v prostředí všech testovaných vzorků olejů. Nejprve byla připravena vodná fáze olejového extraktu, a to dle postupu uvedeného v kap. 3.4. Poté byla připravena bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice, která se posléze pipetovala do mikrotitrační destičky.



### 3.6.1 Příprava mikrotitrační destičky

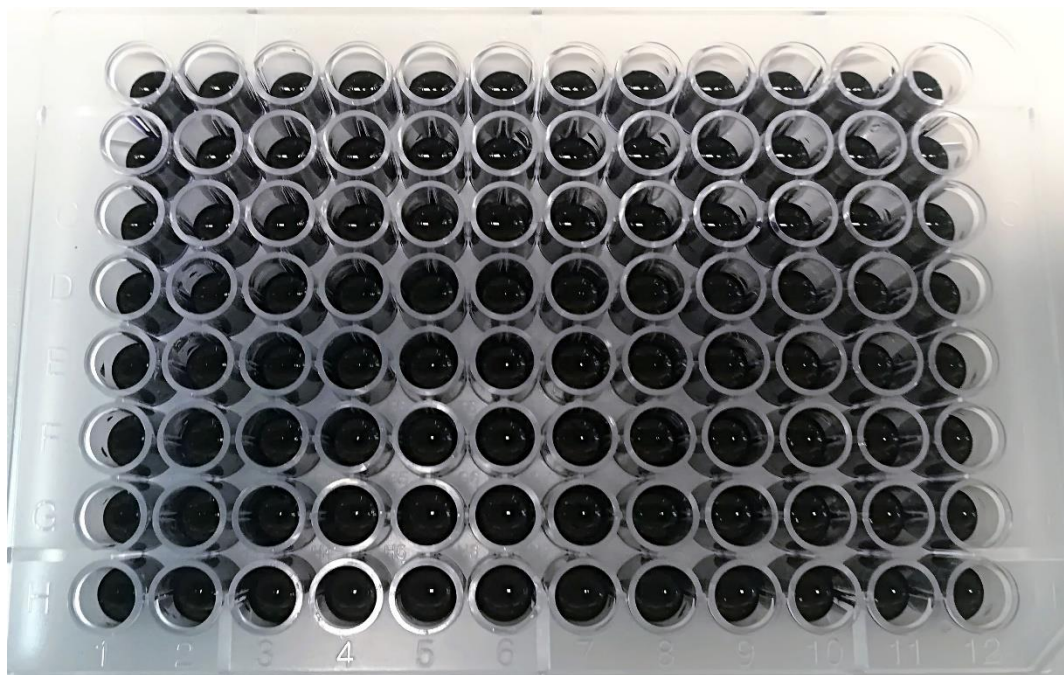
- 1) Do prvního sloupečku mikrotitrační destičky bylo napipetováno 90  $\mu$ l BHI bujónu. První sloupeček sloužil tak sloužil jako pozitivní kontrola (PK).
- 2) V druhém sloupečku bylo napipetováno 180  $\mu$ l vodné fáze extraktu oleje.
- 3) Do jamek 3.-12. sloupečku bylo opět napipetováno 90  $\mu$ l BHI bujónu.
- 4) Poté se vždy přeneslo 90  $\mu$ l z 2. sloupečku do 3., tzn. pokračovalo se dvojkovým ředěním do posledního sloupečku a zbylý objem byl vyhozen do odpadu. Takto vznikla v destičce koncentrační řada, kdy v každé pouici daného sloupce byla stejná koncentrace vodné fáze extraktu oleje.
- 5) Zvolená koncentrační řada vodné fáze extraktu oleje: 90 %; 45 %; 22,5 %; 11,25 %; 5,625 %; 2,813 %; 1,406 %; 0,703 %; 0,352 %; 0,176 %; 0,088 %.
- 6) Do každé jamky takto připravené destičky bylo napipetováno 10  $\mu$ l buněčné suspenze, tzn. objem v každé jamce byl 100  $\mu$ l.



**Obrázek č. 12:** Příprava mikrotitrační destičky pro stanovení biofilmové aktivity.

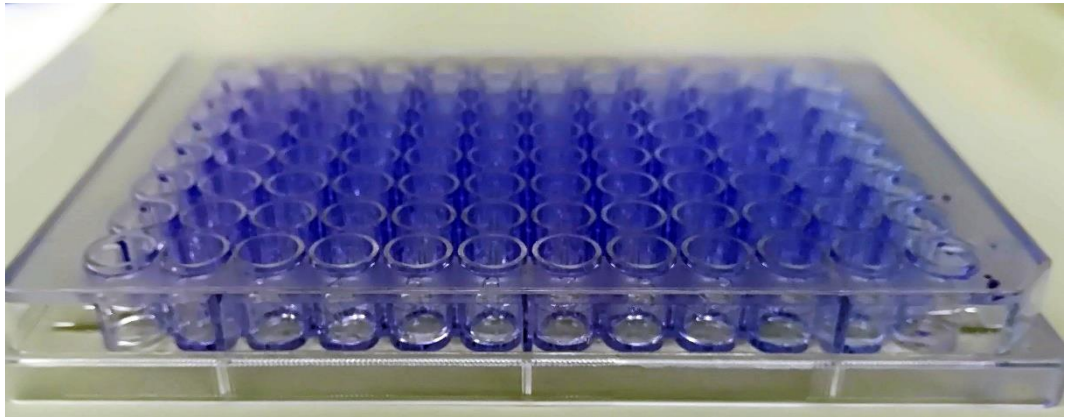
### 3.6.2 Christensenova metoda – barvení biofilmu

- 1) Po založení destičky byla proměřena absorbance při  $\lambda = 595$  nm na přístroji Tecan.
- 2) Poté byla destička opatřena víčkem a uzavíratelnou fólií a nechala se inkubovat v termostatu při 30 °C po dobu 3 dnů.
- 3) Po proběhlé kultivaci byla opět proměřena absorbance při  $\lambda = 595$  nm na přístroji Tecan.
- 4) Dále byl obsah celé destičky vytřepán do odpadu.
- 5) Následně byla destička 3x opatrně promyta destilovanou vodou a mikrotitrační destička byla vysušena 45 minut v termostatu.
- 6) Po vysušení bylo do destičky pipetováno 100  $\mu$ l 2 % octanu sodného, který zafixoval vytvořený biofilm. Octan sodný se nechal působit 15 minut.
- 7) Opět se obsah destičky vytřepal do odpadu.
- 8) Takto upravená destička byla barvena krystalovou violetí, do každé jamky bylo pipetováno 100  $\mu$ l krystalové violeti, která se nechala působit 15 minut.



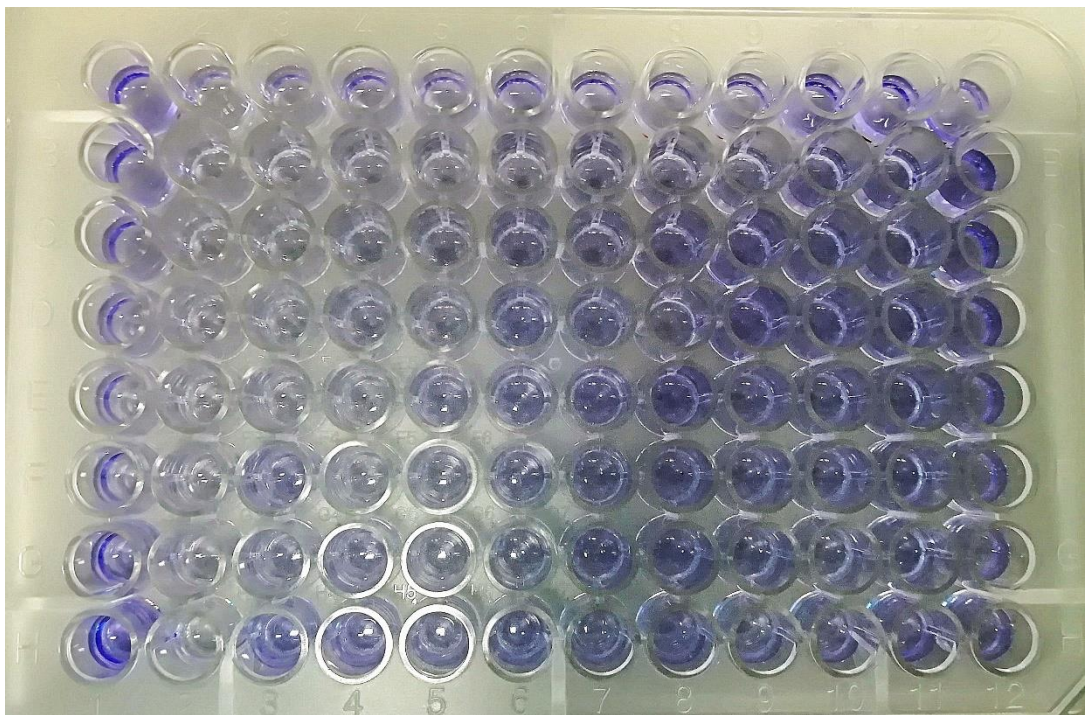
Obrázek č. 13: Barvení destičky krystalovou violetí (foto autor).

- 9) Obarvená destička se 5x opatrně promyla destilovanou vodou a nechala se vysušit po dobu 30 minut.



**Obrázek č. 14:** Obarvený biofilm na stěnách a dně jamek mikrotitrační destičky (foto autor).

- 10) Dále byl pipetován 96 % ethanol o objemu 200  $\mu$ l, destička se nechala zvortexovat 5 minut.  
11) Připravila se nová destička, do které bylo přepipetováno 100  $\mu$ l z destičky původní, samozřejmě byla zachována i stejná pozice jamek.



**Obrázek č. 15:** Připravená destička na proměření absorbance (foto autor).

- 12) Posledním krokem bylo proměření absorbance při  $\lambda = 595$  nm na přístroji Tecan. Tmavší zbarvení jamky znázorňovalo silnější tvorbu biofilmu.  
13) Naměřené výsledky byly zpracovány do grafu.

## **3.7 Stanovení antioxidační kapacity vodné fáze olejových extraktů**

### **3.7.1 Princip stanovení**

Vhodně naředěný roztok olivového oleje byl přidán k čerstvě připravenému roztoku DPPH radikálu. Při vlnové délce 517 nm byl sledován úbytek absorbance a docházelo k odbarvení fialového roztoku DPPH radikálu (zcela redukovaný roztok DPPH radikálu je žlutě zbarven) vlivem antioxidačních látek obsažených v olivovém oleji. Výsledky byly na základě spektrofotometrické analýzy při 517 nm vyjádřeny jako % inhibice DPPH radikálu.

### **3.7.2 Pracovní postup**

Do 100 ml odměrné baňky byl připraven základní roztok látky Trolox o koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  v 95 % ethanolu. Z tohoto základního roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentracích 5, 10, 15, 20 a 25  $\mu\text{g/ml}$  do 10 ml odměrných baněk, vše bylo doplněno destilovanou vodou po rysku a důkladně promícháno.

Ke stanovení antioxidační kapacity bylo do zkumavek s víčkem pipetováno 500  $\mu\text{l}$  vzorku oleje, dále 500  $\mu\text{l}$  kalibračních roztoků a do poslední zkumavky bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  destilované vody, která sloužila jako slepý pokus. Do všech zkumavek se poté přidalo dávkovačem HandyStep 5 ml methanolického roztoku DPPH radikálu o koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . Vše se ponechalo 20 minut reagovat na temném místě při laboratorní teplotě. Přesně po 20 minutách se změnil úbytek absorbance při 517 nm.

K proměření připravených a zreagovaných vzorků byl použit program VISIONlite Fixed. Do přístroje byla vložena kyveta s destilovanou vodou a proměřeno pozadí. Postupně byly proměřeny všechny kalibrační roztoky od nejkonzentrovanejšího po nejméně koncentrovaný, poté vzorky olivových olejů, a nakonec slepý pokus.

### 3.7.3 Vyjádření výsledků

Metoda využívající redukce DPPH radikálu ke stanovení antioxidační kapacity je brána jako orientační, tak výsledky byly uváděny v procentech DPPH radikálu inhibovaného při reakci (%). Výpočet byl proveden dle následujícího vztahu:

$$I (\%) = \frac{A_{sp} - A_{vz}}{A_{sp}} \cdot 100$$

Hodnota  $A_{sp}$  byla absorbance slepého pokusu a  $A_{vz}$  byla absorbance vzorku (resp. kalibračních roztoků). Byla sestavena kalibrační řada včetně příslušné rovnice regrese, korelačního koeficientu a následně vypočteny hodnoty antioxidační kapacity pro vzorky olivových olejů.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Rostoucí počet ohnisek onemocnění způsobených patogeny je velkým problémem, proto jsou zkoumány antimikrobiální vlastnosti mnoha rostlinných látek (např. rostlinných olejů a látek z nich izolovaných, bylin a koření), které by přispěly k řešení mikrobiální rezistence. Nové poznatky ohledně antimikrobiálních látek, které by byly schopny tento problém eliminovat a přispět k léčbě onemocnění, jsou cílem této práce.

Jelikož dochází k vzestupu rezistence některých patogenů, je zřejmé, že je zapotřebí výzkumů, které by pomohly objasnit povahu rezistence patogenů k antibiotikům, a také problematiku mikrobiálních biofilmů (Paraje 2011).

Již po staletí jsou známy příznivé zdravotní účinky extraktů z mnoha druhů rostlin, které se používají jako ochucovadla v potravinách. Olivové oleje, zejména panenské olivové oleje s vysokým obsahem fenolických sloučenin mohou také inhibovat růst patogenních bakterií. Také bylo zjištěno, že olivové oleje byly schopny inhibovat bakterie a tento účinek nebyl pozorován u jiných olejů (např. z kukuřice, slunečnice, sóji, řepky a bavlny) (Brenes et al. 2007).

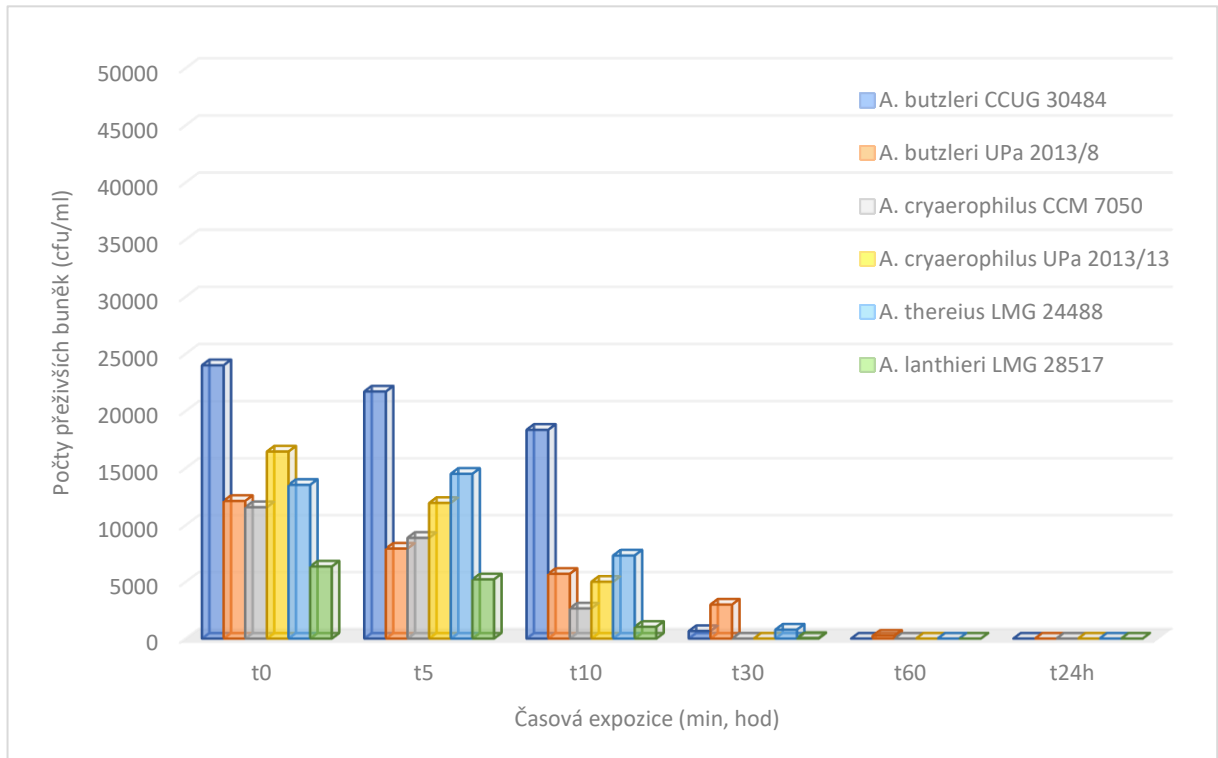
Náplní mé diplomové práce bylo zhodnotit antimikrobiální účinnost extraktů z pěti olivových olejů na vybrané bakteriální kmeny. Extrakty byly testovány pomocí kultivačních metod a modifikovanou Christensenovou metodou.

### 4.1 Kultivační metoda – přežívání vybraných bakterií v olejových extraktech

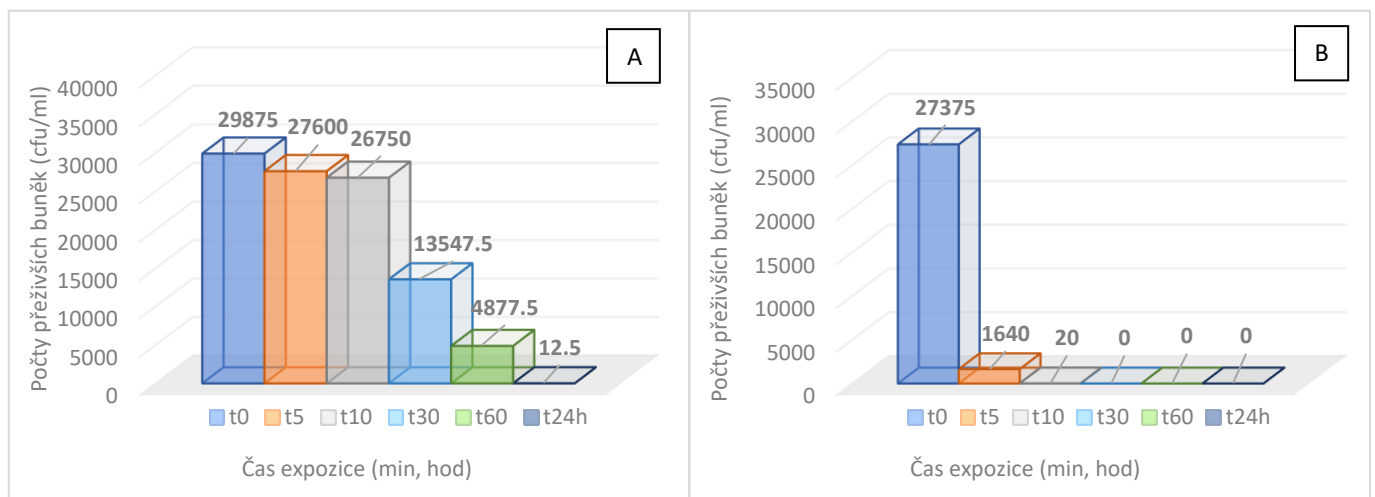
Schopnost růstu a přežívání v 90 % olejových extraktech byla sledována u šesti kmenů rodu *Arcobacter*, a to konkrétně *Arcobacter butzleri* CCUG 30484, *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8, *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050, *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13, *Arcobacter lanthieri* LMG 28517 a *Arcobacter thereius* LMG 24488. Dále bylo testování provedené také u kmenů srovnávacích (*Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223). Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 1–15. Vždy se pracovalo s čerstvě připravenou bakteriální kulturou a živnými médii, aby byly minimalizovány odchylky ve výsledcích. Byla dodržována stejná teplota i délka inkubace. U testovaných extraktů byla taktéž sledována jejich sterilita před každým testováním. Na základě testování byly zjištěny údaje o antibakteriální aktivitě olejových extraktů vůči každému bakteriálnímu kmenu.

### 4.1.1 Olivový olej Ballester

V následujících grafech jsou zaznamenány počty přeživších buněk po časové expozici, ve vodné fázi olivového oleje Ballester (graf č. 1–2).



**Graf č. 1:** Přežívání vybraných kmenů rodu *Arcobacter* v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ballester.



**Graf č. 2:** Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ballester  
A – *Escherichia coli* CCM 3954, B – *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

V grafu č. 1 je zaznamenána závislost přežívání vybraných kmenů akrobakterů v prostředí olejového extraktu z oleje Ballester. Jak je patrné z grafu, mezi expozicemi 10–30 minut došlo k velkému poklesu životaschopnosti buněk a po delší expozici už nebyly kmeny schopné přežít. *A. butzleri* UPa 2013/8 byl nejodolnějším z testovaných arkobakterů a přežíval expozici i 30 minut, a to v počtu  $3 \times 10^3$  cfu/ml. Růst kmene *A. cryaerophilus* CCM 7050 byl jako u většiny akrobakterů potlačen po 30 minutách, naopak izolát *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 vykazoval větší odolnost. Kmen *A. thereius* CCM 24488 vykazoval druhou největší odolnost, po 5 minutách svůj růst zvýšil a i po 30 minutách byl schopen přežívání. Nejméně aktivním kmenem byl *A. lanthieri* LMG 28517, po deseti minutách byl jeho růst velmi snížen a v další časové expozici už kmen nebyl vůbec schopen kolonie tvořit.

Trend výsledků časových závislostí na přežívání buněk byl klesající u všech vybraných kmenů arkobakterů. Extrakt z oleje Ballester byl schopen inhibovat růst všech kmenů již v čase  $t_{60}$ , citlivější kmeny již při čase  $t_{30}$ . To tedy dokládá, že tento olivový extrakt obsahoval antimikrobiální látky, díky kterým byla schopnost přežívání arkobakterů plně potlačena již po jedné hodině expozice.

Co se týká srovnávacích mikroorganismů (graf č. 2), testovaný kmen *Escherichia coli* CCM 3954 byl schopen v olejovém extraktu přežít po jedné hodině, a to v počtech  $4,9 \times 10^3$  cfu/ml. Tento kmen byl dokonce schopen přežít expozici 24 hodin. Docházelo tedy k postupné inhibici buněk *E. coli*, avšak podstatně pomaleji než u arkobakterů.

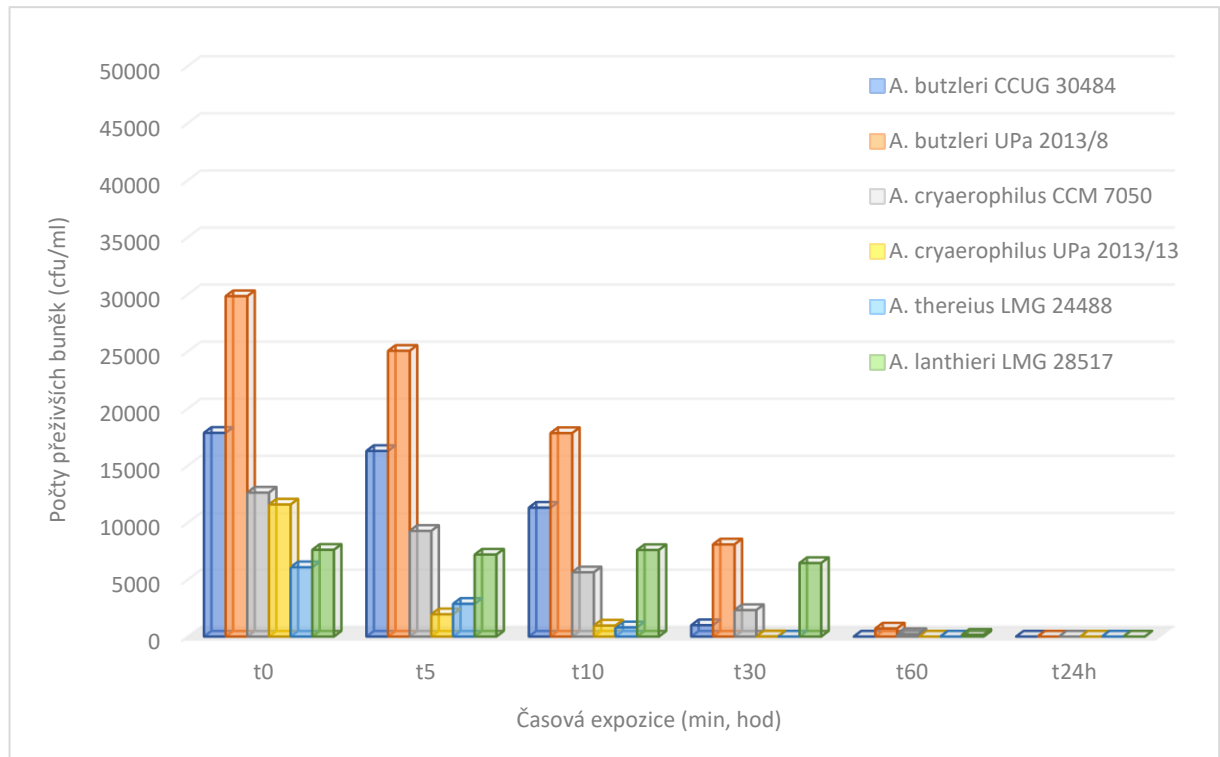
*Staphylococcus aureus* CCM 4223 byl extraktem inhibován neúčinněji. Kompletní inhibice byla viditelná již po 10 minutách, ale už po 5 minutách expozice byl růst kmene potlačen na velice nízkou hodnotu počtu buněk, která odpovídala počtům akrobakterů až po 30 minutách expozice.

Celkově byl extrakt z oleje Ballester byl antibakteriálně nejúčinnějším ze všech testovaných extraktů proti vybraným bakteriálním kmenům. U ostatních testovaných extraktů byla zaznamenána nižší antimikrobiální účinnost vůči testovaným kmenům.

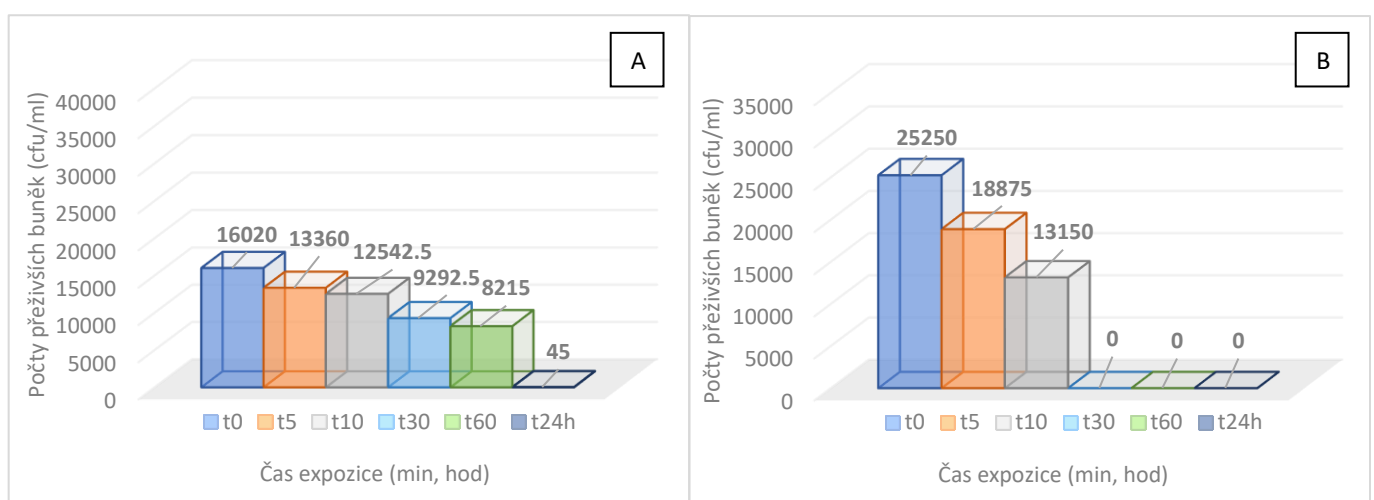


## 4.1.2 Olivový olej Kyosos

V následujících grafech jsou zaznamenány počty přeživších buněk po časové expozici, ve vodné fázi olivového oleje Kyosos (graf č. 3–4).



**Graf č. 3:** Přežívání vybraných kmenů rodu *Arcobacter* v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Kyosos.



**Graf č. 4:** Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Kyosos  
A – *Escherichia coli* CCM 3954, B – *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

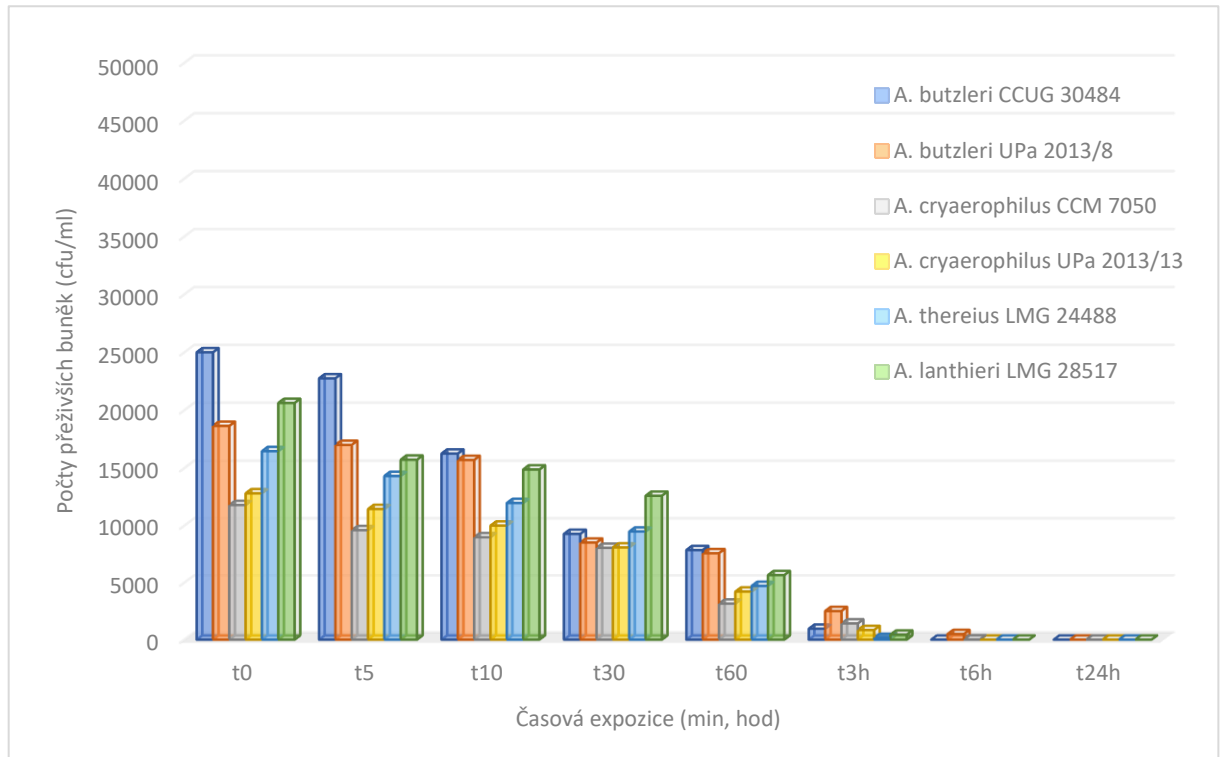
V grafu č. 3 je zaznamenána závislost přežívání arkobakterů v extraktu z oleje Kyosos. Jako jediný z testovaných arkobakterů byl kmen *A. butzleri* UPa 2013/8 schopen přežít i po jedné hodině expozice. Naopak sbírkový kmen *A. butzleri* CCUG 30484 byl mnohem více citlivý a již po 30 minutách expozice v daném prostředí byly počty životaschopnosti buněk v počtu  $1 \times 10^3$  cfu/ml. Závislost přežívání sbírkového kmene *A. butzleri* a izolátu *A. butzleri* v extraktu oleje Kyosos byla pro tyto dva kmeny přesně opačná oproti extraktu Ballester. Kmen *A. cryaerophilus* CCM 7050 měl průběh přežívání velice podobný jako u předchozího extraktu, ale jeho růst byl potlačen až po jedné hodině expozice. U izolátu *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 byla inhibice rychlejší, po pěti minutách bylo přežívání velmi eliminováno a celkově se jednalo o nejrychlejší inaktivaci ze všech arkobakterů, již po 30 minutách expozice došlo k úplné inhibici. Přežívání *A. thereius* LMG 24488 bylo plně potlačeno také po třiceti minutách expozice. Trend výsledků časových závislostí byl klesající u zmíněných kmenů arkobakterů. Výjimku tvořil kmen *A. lanthieri* LMG 28517, který vykazoval přežívání na konstantní úrovni až do 30 minut expozice, avšak po 60 minutách byl již i tento kmen inhibován. Extrakt z oleje Kyosos byl schopen inhibovat růst všech kmenů již v čase  $t_{60}$ . Kmeny *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 a *A. thereius* LMG 24488 dokonce v čase  $t_{30}$ . To potvrzuje, že tento olivový extrakt obsahoval dostatek antimikrobiálních látek, díky kterým byla schopnost růstu potlačena. Extrakt z oleje Kyosos vykazoval velice podobné účinky jako extrakt z oleje Ballester.

V případě srovnávacích mikroorganismů (graf č. 4), byl testovaný kmen *Escherichia coli* CCM 3954 schopen přežít expozici po 1 hodině, dokonce i po 24 hodinách, avšak to již pouze v počtu  $4,5 \times 10^1$  cfu/ml. Trend růstu je opět klesající a růst u tohoto kmene je podobný jako u předchozího extraktu z oleje Ballester.

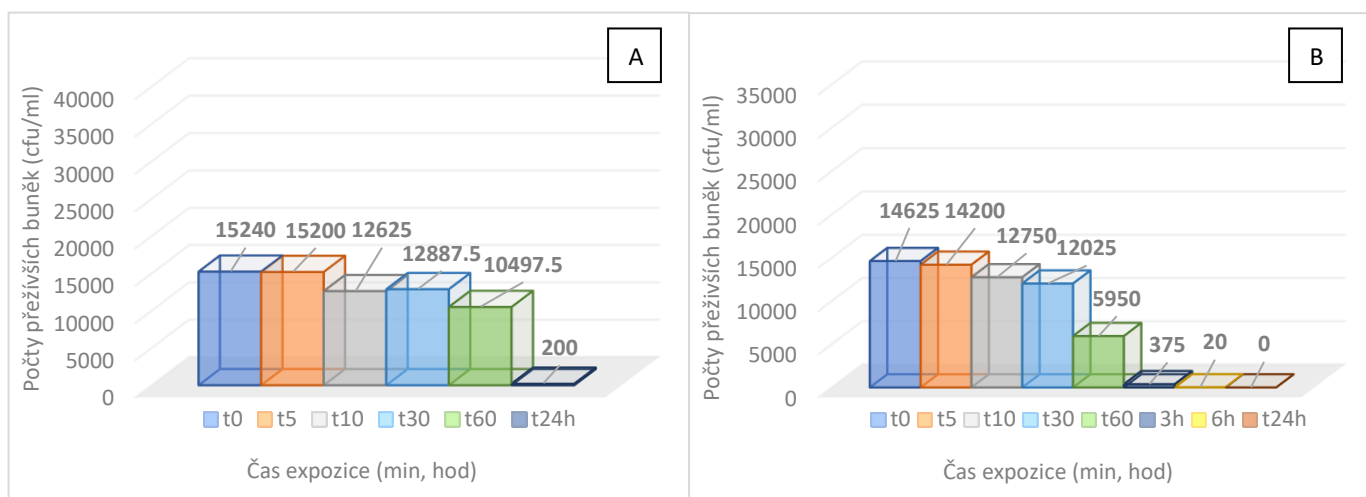
Na zvolený kmenem *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (graf č. 4), působil extrakt neúčinněji. *S. aureus* nebyl schopen přežít po 30 minutách. Z čehož vyplývá, že extrakt z oleje Kyosos opět obsahoval antimikrobiální látky, které nejlépe inhibovaly grampozitivní bakterii.

### 4.1.3 Směsný olej Ondoliva

V následujících grafech jsou zaznamenány počty přeživších buněk po časové expozici, ve vodné fázi směsného olivového oleje Ondoliva (graf č. 5–6).



**Graf č. 5:** Přežívání vybraných kmenů rodu *Arcobacter* v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ondoliva.



**Graf č. 6:** Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Ondoliva  
A – *Escherichia coli* CCM 3954, B – *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

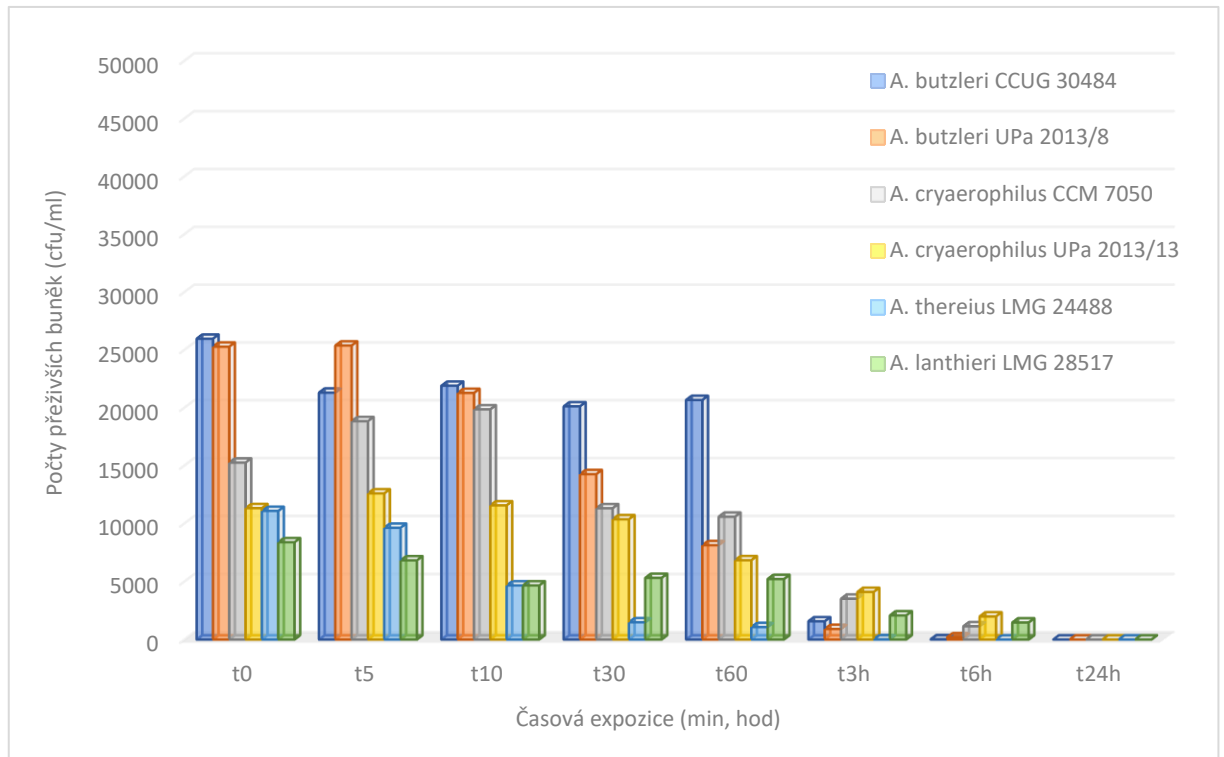
Z důvodu nižší antimikrobiální aktivity dalších vzorků olejových extraktů bylo dále zvoleno více expozičních časů pro jednotlivá testování, jak je patrné z následujících grafů č. 5–10. V grafu č. 5 byla zaznamenána závislost přežívání arkobakterů v extraktu ze směsného oleje Ondoliva. Po 3 hodinách došlo k značnému snížení schopnosti přežívání arkobakterů a plná inhibice nastala až po 6 hodinách expozice. Podobný průběh jako kmen *A. butzleri* CCUG 30484 vykazoval i izolát *A. butzleri* UPa 2013/8, který ale dokázal přežít i po 6 hodinách, a to v počtech  $4,9 \times 10^2$  cfu/ml. Byl jediným arkobakterem, který po takto dlouhé expozici přežíval. Kmeny *A. cryaerophilus* CCM 7050 a *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 měly průběh přežívání velice podobný, jejich přežívání bylo silně potlačeno po 3 hodinách expozice. Po šesti hodinách ani jeden kmen nebyl schopen přežít. Ve srovnání s předchozími extrakty byl trend přežívání *A. lanthieri* LMG 28517 i *A. thereius* LMG 24488 vyšší. Dokonce kmen *A. lanthieri* LMG 28517 byl velmi odolným kmenem, a po třiceti minutách přežíval nejvíce ze všech testovaných arkobakterů. Žádný z kmenů nepřežíval po 24 hodinách. Trend výsledků časových závislostí byl klesající u všech vybraných kmenů arkobakterů. Extrakt z oleje Ondoliva byl schopen inhibovat růst všech kmenů až po 6 hodinách, což potvrzuje nižší schopnost inhibice oproti předchozím extraktům.

Testovaný srovnávací kmen *Escherichia coli* CCM 3954 (graf č. 6) byl schopen přežít po všech zvolených expozicích, dokonce tvořil kolonie po 24 hodinách v počtu  $2 \times 10^2$  cfu/ml. Trend růstu je opět klesající, průběh přežívání u tohoto kmene je podobný jako u předchozího extraktu z oleje Kyosos.

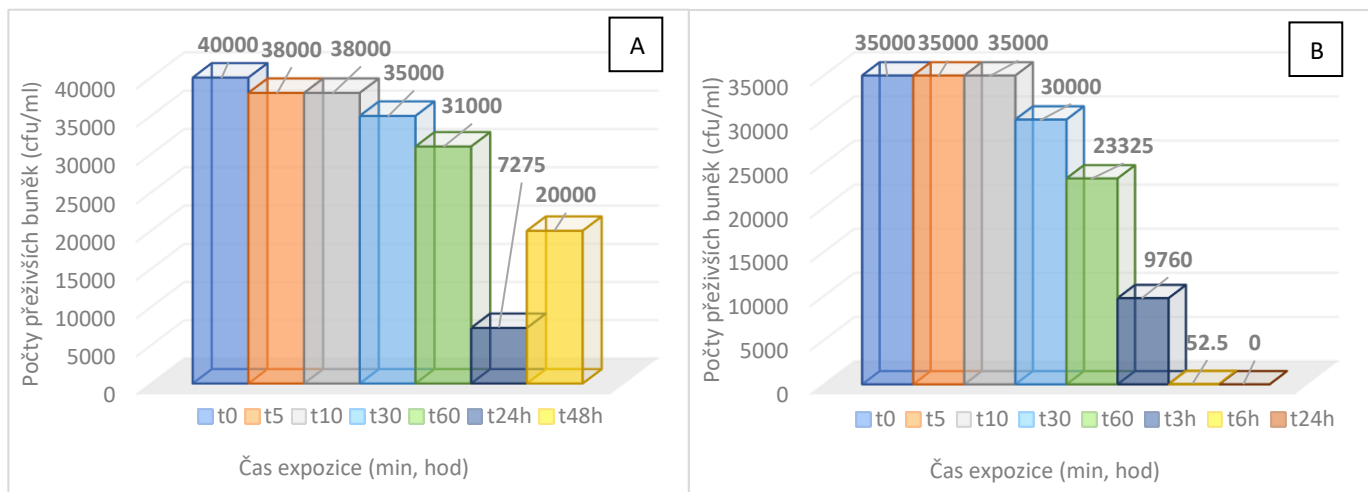
Druhý zvolený srovnávacím kmenem *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (graf č. 6), byl schopen přežít po 6 hodinách, viditelná inaktivace byla až po 24 hodinách expozice, což je oproti předchozím extraktům podstatně pomalejší inhibice. Na oba srovnávací mikroorganismy měl tento extrakt podobné účinky, lépe však inhiboval *S. aureus* CCM 4223. Extrakt nebyl schopen potlačit růst po kratší expozici. Z čehož vyplývá, že extrakt z oleje Ondoliva nebyl dostatečně silný, aby znemožnil přežívání vybraných mikroorganismů, jako extrakty z oleje Ballester a Kyosos.

#### 4.1.4 Rafinovaný olej Borges

V následujících grafech jsou zaznamenány počty přeživších buněk po časové expozici, ve vodné fázi rafinovaného oleje Borges (graf č. 7–8).



**Graf č. 7:** Přežívání vybraných kmenů rodu *Arcobacter* v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Borges.



**Graf č. 8:** Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje Borges  
A – *Escherichia coli* CCM 3954, B – *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

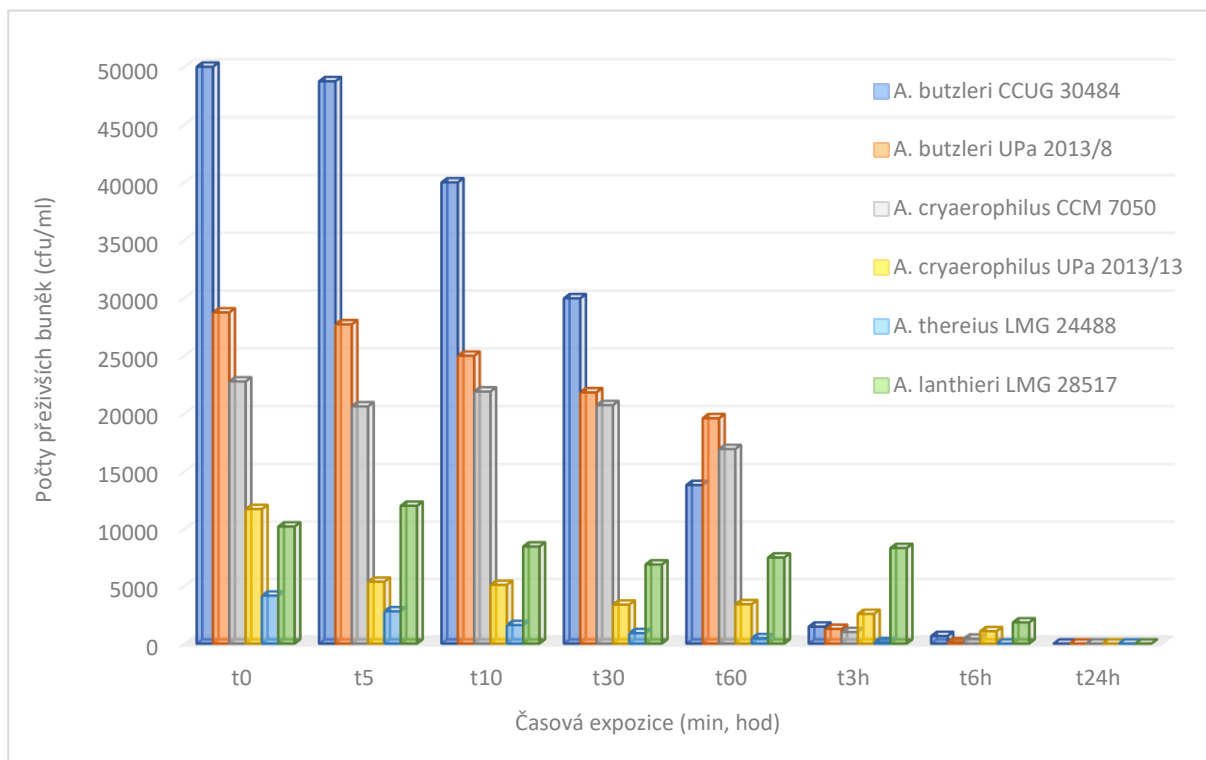
V grafu č. 7 je zaznamenána závislost přežívání arkobakterů v extraktu z rafinovaného oleje Borges. Jak můžeme vidět v grafu, nejvíce přežívání kmene *A. butzleri* CCUG 30484 bylo až do hodinové expozice téměř konstantní. Až po 3 hodinách došlo k velkému snížení přežívání a po 6 hodinách už tento kmen nebyl v tomto vzorku schopen vůbec přežít. Kmen *A. butzleri* UPa 2013/8 přežíval taktéž konstantně, až po 30 minutách docházelo k největší inaktivaci buněk. Po šesti hodinách dokázal přežít pouze v počtech  $1,9 \times 10^2$  cfu/ml. Odlišný průběh přežívání vykazoval kmen *A. cryaerophilus* CCM 7050, který po 10 minutách expozice přežívání zvýšil. Dokonce byl schopen přežít po 6 hodinách expozice v počtech  $1,1 \times 10^3$  cfu/ml. Stejně tak i izolát *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, který vykazoval konstantní průběh přežívání až do jedné hodiny. Byl schopen přežít po 6 hodinách expozice, kdy tvořil téměř  $2 \times 10^3$  cfu/ml, nejvíce ze všech testovaných arkobakterů. Trend výsledků přežívání se u kmene *A. lanthieri* LMG 28517 významně nelišil, největší inaktivace proběhla až po 24 hodinách expozice. Kmenem, který byl nejdříve inhibován byl *A. thereius* LMG 24488, již po 30 minutách expozice došlo ke snížení přežívání a jako jediný z arkobakterů nepřežíval po 3 hodinách expozice. Trend výsledků časových závislostí byl klesající a nejvýznamnější inhibice u arkobakterů proběhla až po 6 hodinách. Extrakt z oleje Borges byl schopen inhibovat růst všech kmenů až po 24 hodinách.

Co se týká srovnávacího kmene *Escherichia coli* CCM 3954 (graf č. 8), byl schopen přežít po všech zvolených časových expozicích, dokonce přežíval po 24 hodinách, a po 48 hodinách přežívání ještě znásobil na počet  $2 \times 10^4$  cfu/ml. Extrakt z oleje Borges tedy nebyl schopen růst *E. coli* CCM 3954 vůbec inhibovat. *E. coli* dosahovala nejvyšších počtů právě v extraktu z oleje Borges.

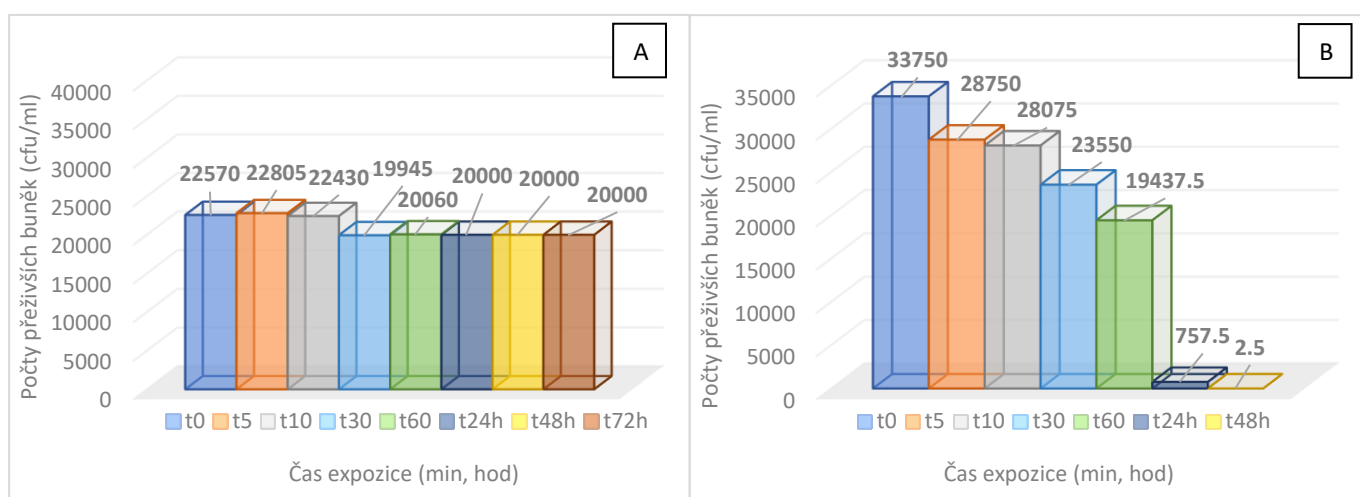
Další zvolený srovnávací kmen *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (graf č. 8), vykazoval viditelnou inhibici až po 24 hodinách jako v předchozím extraktu. Z čehož vyplývá, že extrakt z oleje Borges dokázal růst *S. aureus* oproti *E. coli* potlačit. Antimikrobiální vlastnosti extraktu oleje Borges byly velmi slabé oproti předchozím extraktům, což naznačují i vysoké hodnoty přežívání u srovnávacích mikroorganismů.

### 4.1.5 Olej z pokrutin

V následujících grafech jsou zaznamenány počty přeživších buněk po časové expozici, ve vodné fázi oleje z pokrutin (graf č. 9–10).



**Graf č. 9:** Přežívání vybraných kmenů rodu *Arcobacter* v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje z pokrutin.



**Graf č. 10:** Přežívání srovnávacích kmenů v přítomnosti 90 % vodné fáze oleje z pokrutin  
A – *Escherichia coli* CCM 3954, B – *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

Pro poslední kultivaci (graf č. 9) byla zaznamenána závislost přežívání arkobakterů v extraktu oleje z pokrutin. Ze všech testovaných extraktů byla zaznamenána nejvyšší aktivita *A. buzleri* CCUG 30484 právě v extraktu z pokrutin. Trend přežívání začal značně klesat po jedné hodině expozice, ale po 6 hodinách expozice byl stále kmen schopen přežít v počtech  $6,7 \times 10^2$  cfu/ml. Kmen *A. butzleri* UPa 2013/8 dosahoval téměř konstantního trendu přežívání až do jedné hodiny, po 3 hodinách expozice byla zaznamenána silná inhibice, po 6 hodinách expozice byl kmen taktéž schopen přežít. Stejně tak i kmen *A. cryaerophilus* CCM 7050 vykazoval podobný průběh jako kmeny předcházející, až do jedné hodiny expozice vykazoval téměř konstantní průběh přežívání, ale po 6 hodinách expozice už skoro nebyl schopen přežít. Kmen *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 vykazoval taktéž obdobný průběh přežívání, přežíval po 6 hodinách expozice v počtech  $1,1 \times 10^3$  cfu/ml. Kmen *A. lanthieri* LMG 28517 vykazoval odlišný průběh, po 3 hodinách expozice byl přežít nejvíce ze všech testovaných arkobakterů, taktéž přežíval nejvíce i po 6 hodinách expozice. Naopak kmenem, který byl nejvíce citlivým byl *A. thereius* LMG 24488, který téměř nepřežíval po 3 hodinách expozice. Extrakt z oleje z pokrutin byl schopen inhibovat růst všech kmenů až po 24 hodinách. To tedy potvrzuje, že tento olivový extrakt byl také málo účinný a přežívání nebylo potlačeno dříve stejně jako u extraktu Borges.

Srovnávací mikroorganismu *Escherichia coli* CCM 3954 (graf č.10) vykazoval takřka neměnnou závislost přežívání. Tento kmen byl schopen přežít po všech zvolených časových expozicích, dokonce přežíval po 72 hodinách expozice v počtu  $2 \times 10^4$  cfu/ml. Extraktem z pokrutin nedošlo k žádnému ovlivnění u kmene *E. coli* CCM 3954. Extrakt oleje z pokrutin tedy nebyl schopen přežívání vůbec inhibovat ani nijak ovlivnit.

Další srovnávací mikroorganismus, jímž byl kmen *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (graf č. 10) snížil trend přežívání až po 24 hodinách expozice. Byl schopen přežít i po 48 hodinách expozice v počtu  $2,5 \times 10^0$  cfu/ml. Z toho plyne, že extrakt oleje z pokrutin dokázal růst *S. aureus* oproti *E. coli* potlačit.

Antimikrobiální vlastnosti extraktu oleje z pokrutin byly velmi slabé, což je zřejmé ze všech grafů. Extrakt oleje z pokrutin byl nejslabším ze všech testovaných olejů a nedokázal plně potlačit přežívání všech testovaných mikroorganismů. Což koresponduje i s další studií (viz kap. 4.5), stanovení antioxidační kapacity olejů.



#### 4.1.6 Diskuze ke kultivačnímu hodnocení antimikrobiálního účinku olejových extraktů

Již bylo publikováno několik studií o antimikrobiální účinnosti vybraných olejů, bylin, koření. Látky v olivovém oleji, zejména dialdehydová forma dekarboxymethylu, tj. oleuropein vykazuje silné baktericidní účinky (Brenes et al. 2007). Baktericidní účinnost mnoha různých typů olivových olejů byla studována proti několika mikroorganismů *in vitro* (Medina et al. 2006).

Brenes et al. (2007) uvádí, že všechny testované bakterie byly citlivé na panenský olivový olej, přičemž účinek byl obecně vyšší proti grampozitivním nežli gramnegativním bakteriím.

Grampozitivní bakterie byly taktéž citlivější vůči éterickým olejům více než gramnegativní bakterie, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* patřili mezi nejcitlivější bakterie (Gutierrez et al. 2008). Silná inhibiční aktivita byla zaznamenána také proti kmenům *Salmonella enterica subs. enterica*, *Yersinia* sp. a *Shigella sonnei*. Olivové oleje navíc vykazovaly baktericidní účinky proti střevním mikroorganismům *Escherichia coli* a *Clostridium perfringens* (Brenes et al. 2007).

Toto tvrzení potvrzuje výsledky z mé studie, bakterie *S. aureus* byla inhibována v extraktu z olivových olejů nejdříve a nepřežívala takovou expozici jako ostatní testované gramnegativní bakterie. *Escherichia coli* nebyla schopná přežít po 24 h expozici v extraktech z extra panenských olivových olejů.

Radford et al. (1991) potvrdil rychlejší devitalizaci *S. enterica* a *L. monocytogenes* ve vejcích a majonéze, která byla vyrobená z panenského olivového oleje než v té, která byla připravena ze slunečnicového oleje. Naproti tomu všechny buňky *L. monocytogenes* byly usmrceny po 30 minutách v panenském olivovém oleji (Brenes et al. 2007). V mé studii grampozitivní bakterie *S. aureus* dokázala taktéž přežít v extraktu z panenského olivového oleje pouhých 30 minut.

Esenciální oleje, stejně jako olivové oleje jsou známé pro své antimikrobiální a antioxidační vlastnosti a jsou již široce používány v potravinářském průmyslu (Duarte et al. 2016). Ela et al. (1996) například testovali 16 éterických olejů s antimikrobiální účinností proti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* a *Candida albicans*, a to pomocí difúzní metody. Zjistili, že bazalka a petržel inhibovala růst *S. aureus*, *E. coli*, *A. niger* a *C. albicans* (Ela et al. 1996, Elgayyar et al. 2001). V další studii byly sledovány

antimikrobiální účinky 32 esenciálních olejů. Bylo zjištěno, že oregano bylo nejúčinnějším inhibitorem proti kvasinkám (Conner a Beuchat 1984).

Medina et al. (2006) provedli dva experimenty, které hodnotily vliv fenolických látek na přežití vybraných mikroorganismů. Výsledky z prvního experimentu potvrdily, že přežívání *S. sonnei* bylo vyšší, pokud se zvyšoval poměr pufru při tvorbě extraktu z olivového oleje, i z extraktu oleje z pokrutin. S tím souvisí, že koncentrace polyfenolů klesala v extraktu s vyšším obsahem pufru. V druhém experimentu byla srovnávána baktericidní účinnost směsi olej–pufr a čistého extraktu, opět byl testován olivový olej a olej z pokrutin. Překvapivě přežití *S. enterica* v extraktu z olivového oleje bylo nejrychleji inaktivováno, dokonce vícenásobně, než ve směsi olivový olej–pufr. Extrakt oleje z pokrutin vykazoval podobné účinky jako směs olivový olej–pufr, nejpomalejší inaktivace byla stanovena u směsi olej z pokrutin–pufr. Olivový olej vykazoval silnou antibakteriální aktivitu a polyfenolovou aktivitu, se kterou ale souvisí i další faktory (např. pH a teplota).

V další studii byla zjištěna silná aktivita olejových extraktů bohatých na fenolické sloučeniny proti bakterii *H. pylori*. Látky z olivového oleje mohou pronikat do žaludeční šťávy a zůstávají stabilní celé hodiny v kyselém prostředí. Testované látky z oleje působily silně baktericidně proti osmi testovaným kmenům *H. pylori*. Z testovaných fenolických sloučenin ve vodné fázi byl nejvíce přítomen hydroxytyrosol. Baktericidní koncentrace fenolických sloučenin z olejů byla mnohem nižší než koncentrace fenolických sloučenin z čaje, vína a rostlinných výtažků. Extrakty byly účinné dokonce proti některým kmenům, které jsou odolné na antibiotika. Nejúčinnější látkou proti tomuto mikroorganismu z olivového oleje byla vyhodnocena dialdehydová forma aglykonu dekarboxymethyl ligstrosid. Koncentrace antibiotik, která jsou potřebná k usmrcení této bakterie je nižší, ovšem olivový olej je potravinou a ne léčivem, a proto jeho baktericidní aktivita by měla být považována pouze za preventivní (Romero et al. 2007).

## 4.2 Vliv olejových extraktů na biofilmovou aktivitu vybraných bakterií

### 4.2.1 Stanovení „cut of score“ BHI bujónu

Mikrotitrační destička pro určení hodnoty BHI bujónu byla připravena identicky, jako destička pro přípravu biofilmu. Zjištěním hodnoty, kterou vykazuje BHI bujón a jeho složky v procesu barvení krystalové violeti bylo možné získat skutečný a reálný pohled na tvorbu biofilmu jednotlivých sledovaných kmenů.

Byla proměřena absorbance na přístroji Tecan a vypočten medián (0,123) a směrodatná odchylka (0,0103) z naměřených výsledků. Hodnota mediánu ze všech měření byla následně vynesena do grafů a znázorněna červenou barvou.

**Tabulka č. 3:** Výsledné hodnoty absorbancí kryst. violeti v destičce po obarvení nezaočkovaného BHI bujónu.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0,1163	0,1198	0,1216	0,1289	0,1244	0,1185	0,1246	0,1165
2	0,1261	0,1196	0,1259	0,1278	0,1267	0,0839	0,1252	0,1271
3	0,1181	0,1209	0,1246	0,1208	0,1215	0,1201	0,1255	0,1208
4	0,1217	0,1295	0,1265	0,1251	0,1258	0,1143	0,1158	0,1191
5	0,1220	0,1230	0,1241	0,1190	0,1206	0,1165	0,1199	0,1174
6	0,1198	0,1243	0,1250	0,1255	0,1262	0,1240	0,1246	0,1282
7	0,1159	0,1161	0,1246	0,1187	0,1189	0,1172	0,1275	0,1251
8	0,1200	0,1221	0,1238	0,1181	0,1204	0,1187	0,1150	0,1245
9	0,1206	0,1138	0,1231	0,1196	0,1157	0,1233	0,1238	0,1233
10	0,1177	0,1209	0,1148	0,1149	0,1232	0,1280	0,1296	0,1268
11	0,1221	0,1264	0,1245	0,1229	0,1271	0,1232	0,1260	0,1189
12	0,1146	0,1274	0,1239	0,1207	0,1219	0,1235	0,1259	0,1229

**Tabulka č. 4:** Výsledné hodnoty absorbancí kryst. violeti v destičce po obarvení nezaočkovaného BHI bujónu.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0,1223	0,1257	0,1260	0,1254	0,1258	0,1273	0,1270	0,1218
2	0,1515	0,1562	0,1689	0,1613	0,1722	0,1616	0,1586	0,1680
3	0,1196	0,1163	0,1252	0,1177	0,1243	0,1238	0,1269	0,1511
4	0,1131	0,1281	0,1324	0,1272	0,1256	0,1386	0,1187	0,1422
5	0,1157	0,1281	0,1225	0,1209	0,1156	0,1202	0,1222	0,1294
6	0,1198	0,1188	0,1169	0,1202	0,1257	0,1201	0,1210	0,1188
7	0,1190	0,1166	0,1096	0,1197	0,1207	0,1319	0,1244	0,1270
8	0,1564	0,1210	0,1239	0,1154	0,1177	0,1318	0,1196	0,1300
9	0,1200	0,1135	0,1153	0,1151	0,1250	0,1262	0,1210	0,1188
10	0,1152	0,1137	0,1166	0,1145	0,1189	0,1224	0,1297	0,1250
11	0,1151	0,1212	0,1237	0,1162	0,1214	0,1318	0,1200	0,1259
12	0,1172	0,1286	0,1150	0,1265	0,1182	0,1253	0,1210	0,1302

#### 4.2.2 Výsledky tvorby biofilmu pro jednotlivé olivové oleje

Pro zjištění tvorby biofilmu byla použita modifikovaná Christensenova metoda. Christensenova metoda a její modifikace patří k nejčastěji využívaným metodám pro průkaz biofilmu. Tato metoda je vhodná pro průkaz grampozitivních i gramnegativních mikroorganismů. Výhoda oproti zkumavkové metodě je především v interpretaci a výsledky nejsou zatíženy subjektivní chybou při odečtu (Christensen et al. 1985)

Často využívaná doba kultivace při stanovení biofilmové aktivity je 18 hodin (Christensen 1982). Dále se využívá také kultivace 24–48 hodin (Freeman et al. 1989, Mulder a Degener 1998). V publikacích, které se zabývají studiem biofilmu se často autoři neshodují, jaké médium je pro tvorbu biofilmu nejvhodnější. Například je pro tvorbu biofilmu vhodné zvolit TSB médium (Baldassari et al. 1993). Dále lze zvolit MHB médium (Duarte et al. 2015) nebo BHI bujón (Knobloch et al. 2002). Kultivační teplota, která je ideální pro tvorbu biofilmu je 30–37 °C (Duarte et al. 2015, Freeman et al. 1989, Stepanovic et al. 2001).

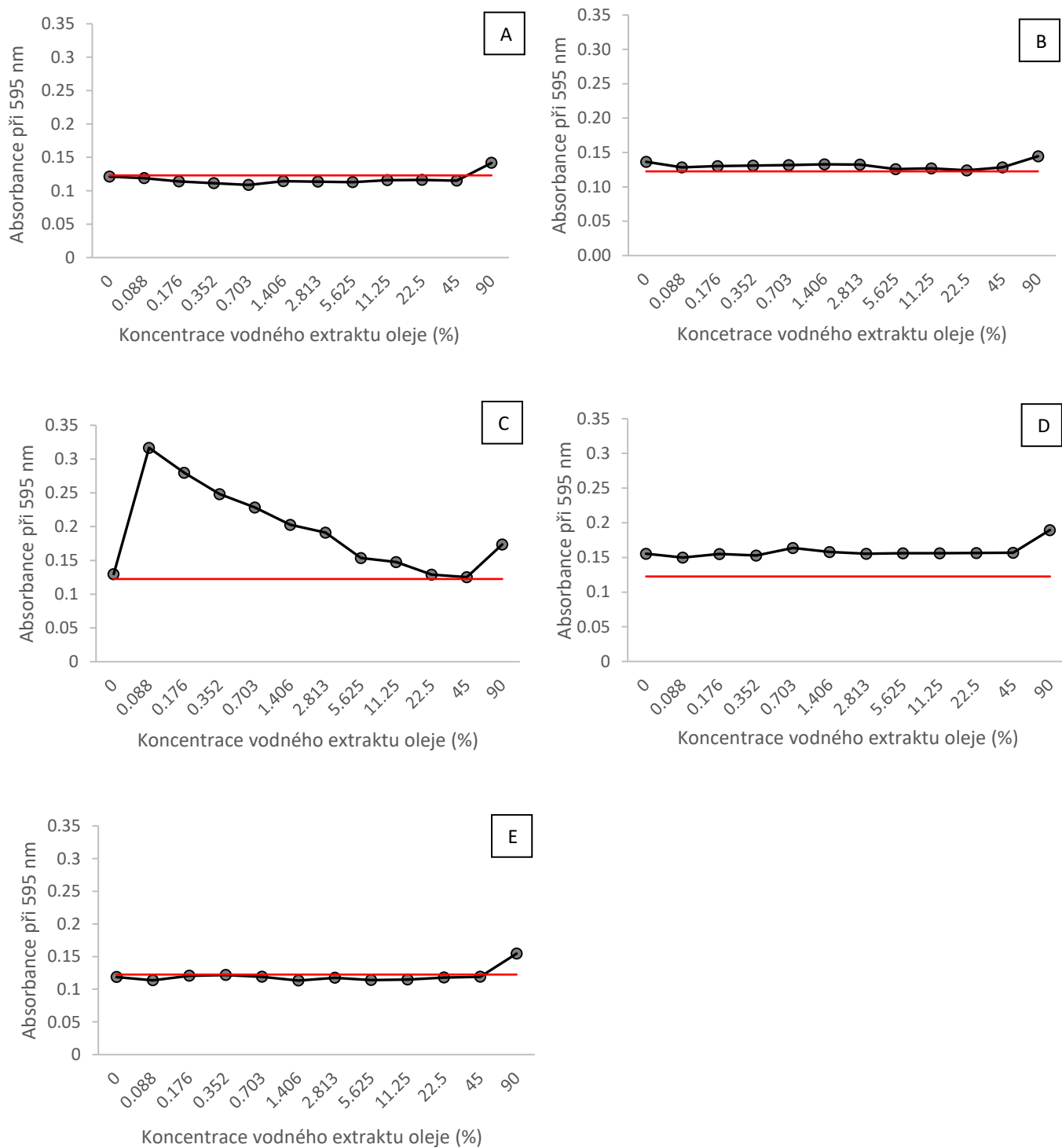
Schopnost tvorby biofilmu byla sledována u šesti kmenů rodu *Arcobacter* a kmenů srovnávacích (viz kap. 3.2), a to při zvolených koncentracích vodných extraktů (viz obrázky č. 16–23).

#### 4.2.2.1 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

Na obrázku č. 16 jsou uvedeny výsledky tvorby biofilmu u kmene *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 v přítomnosti vodných extraktů připravených z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,120-0,150$ . Daný kmen je tedy biofilm pozitivním kmenem.

Schopnost *Arcobacter butzleri* navázat se k různým povrchům a velmi snadno tvořit biofilm, potvrzují četné studie. Výsledky ukazují, že počet buněk členěných do biofilmu *Arcobacter butzleri* závisí na délce expozice a také teplotě (Assanta et. al 2002).

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl víceméně podobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů. Biofilmová aktivita byla zpravidla na téměř konstantní úrovni, avšak ke zvýšené tvorbě biofilmu docházelo při nejvyšší koncentraci testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu. V případě vodného extraktu z oleje Ondoliva (graf C) je patrný výrazný nárůst tvorby biofilmu až k hodnotě  $A_{595} = 0,32$  již při koncentraci 0,088 %. To tedy dokládá, že olivový extrakt obsahoval látky, na které tento kmen reagoval zvýšenou tvorbou biofilmu již při nejnižší koncentraci. Avšak v dalších vyšších koncentracích extraktu, které byly sledovány ve vztahu ke tvorbě biofilmu, již docházelo k postupnému snižování biofilmové aktivity.

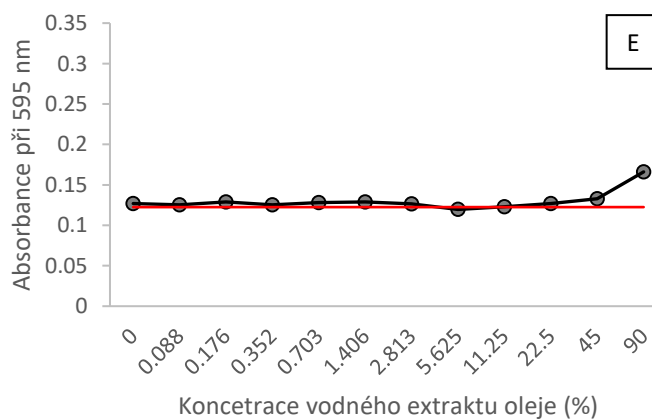
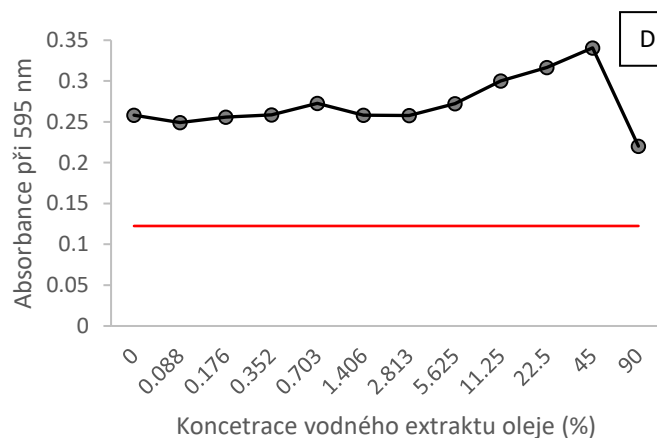
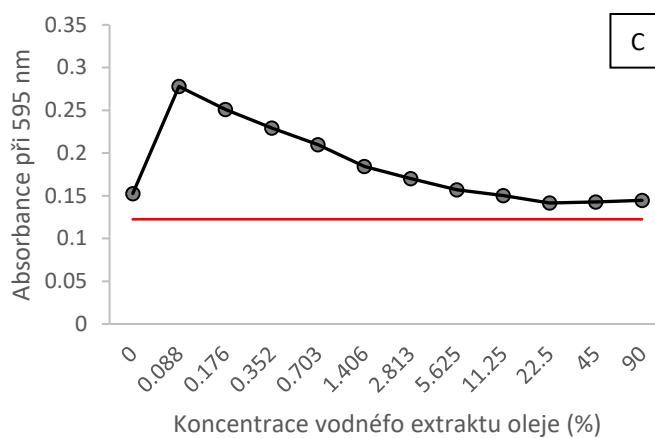
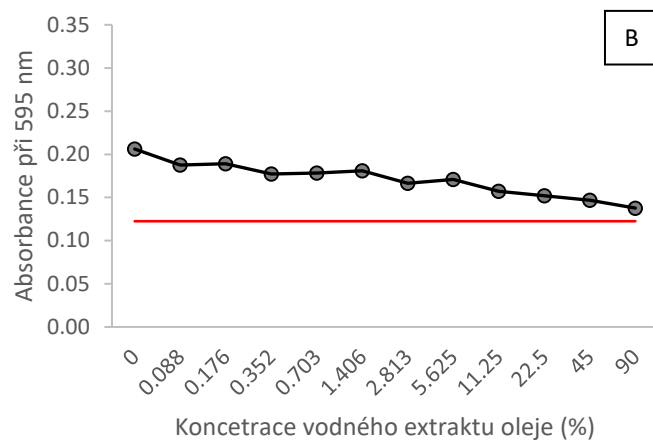
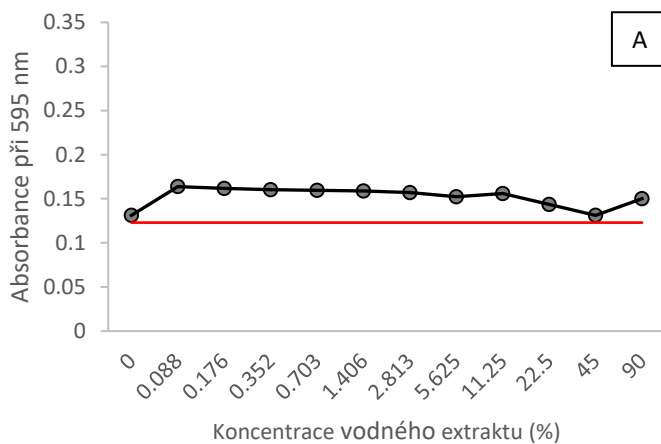


**Obrázek č. 16:** Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 v přítomnosti extraktů z olejů  
 A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,  
 E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )

#### 4.2.2.2 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

Na obrázku č. 17 jsou zaznamenány křivky tvorby biofilmu u kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 v přítomnosti vodných extraktů připravených z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,125-0,255$ . Daný kmen je tedy biofilmpozitivním kmenem.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl víceméně podobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů. Biofilmová aktivita byla zpravidla na téměř konstantní úrovni, avšak ke zvýšené tvorbě biofilmu docházelo při nejvyšší koncentraci testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu. Ve vodném extraktu z oleje Ballester (graf A) byl zaznamenán nárůst tvorby biofilmu při nejnižší testované koncentraci 0,088 %, nárůst biofilmu byl téměř konstantní, až s vyšší koncentrací (45%) došlo ke snížení biofilmové aktivity. V případě vodného extraktu z oleje Ondoliva (graf C) je opět patrný výrazný nárůst tvorby biofilmu až k hodnotě  $A_{595} = 0,28$ , již při koncentraci 0,088 %. To tedy dokládá, že olivový extrakt obsahoval látky, na které tento kmen reagoval zvýšenou tvorbou biofilmu již při nejnižší koncentraci. Avšak v dalších vyšších koncentracích extraktu, které byly sledovány ve vztahu ke tvorbě biofilmu, již docházelo k postupnému snižování biofilmové aktivity. V grafu D, ve vodném extraktu z oleje Borges byla zaznamenána rostoucí biofilmová aktivita až do koncentrace 45 % a s nejsilnější koncentrací vodného extraktu došlo k prudkému snížení biofilmové aktivity až k hodnotě  $A_{595} = 0,22$ .



**Obrázek č. 17:** Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 v přítomnosti extraktů z olejů

A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,

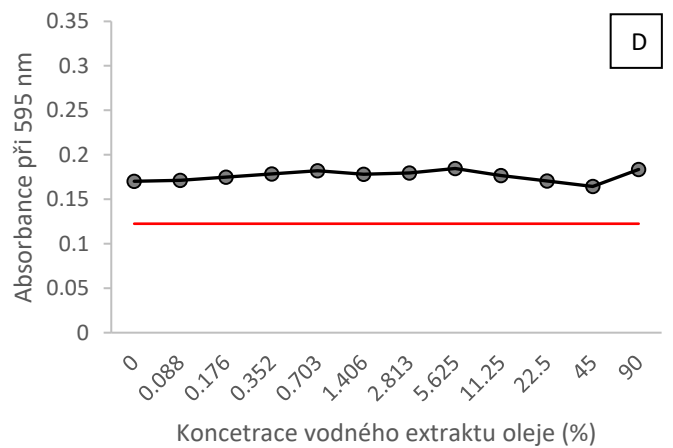
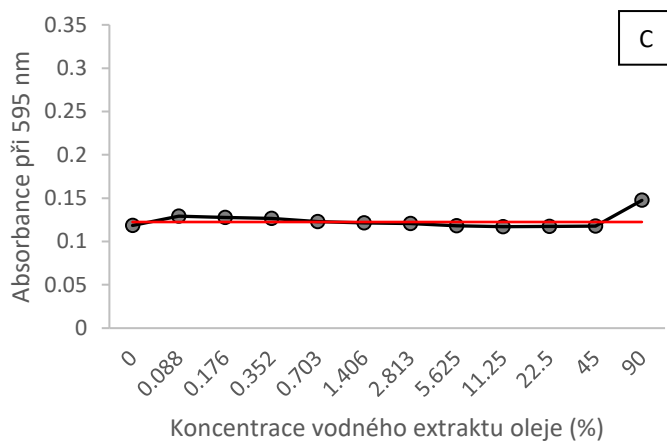
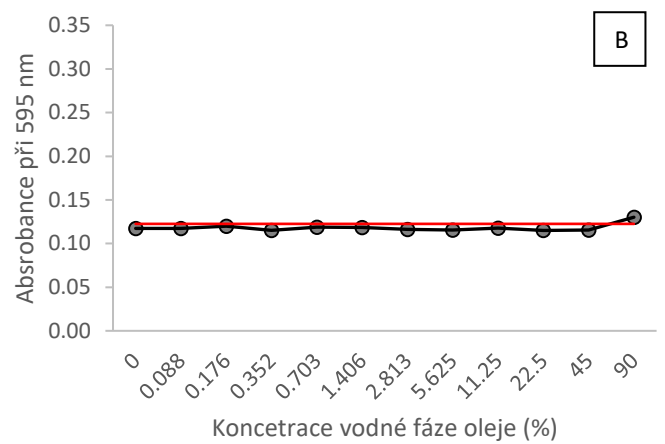
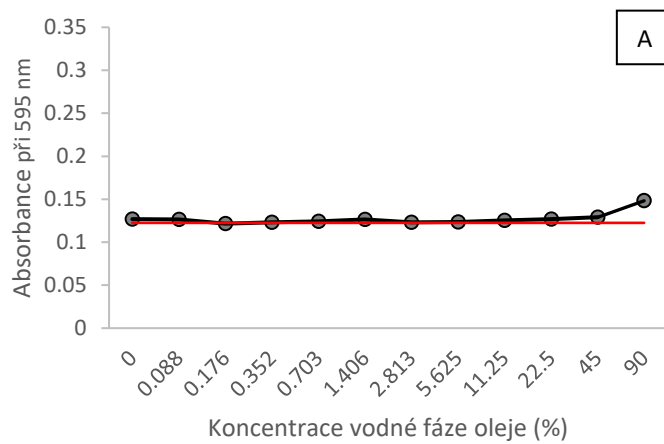
E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )



#### 4.2.2.3 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

Na obrázku č. 18 jsou uvedeny výsledky tvorby biofilmu u kmene *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050 v přítomnosti připravených vodných extraktů z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,120-0,170$ . Daný kmen je tedy biofilm pozitivním kmenem.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl velice podobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů, nebyly zaznamenány žádné odchylky. Biofilmová aktivita byla zpravidla na téměř konstantní úrovni, avšak ke zvýšené tvorbě biofilmu docházelo při nejvyšší koncentraci testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu. Ve vodném extraktu z oleje z pokrutin (graf E) byl zaznamenán silný nárůst tvorby biofilmu při nejvyšší testované koncentraci 90 %, a to až k hodnotě  $A_{595} = 0,22$ . Ze všech testovaných extraktů bylo největší viditelné zvýšení zaznamenáno právě u extraktu z pokrutin. To tedy dokládá, že olivový extrakt obsahoval látky, na které tento kmen reagoval zvýšenou tvorbou biofilmu až při nejvyšší testované koncentraci.



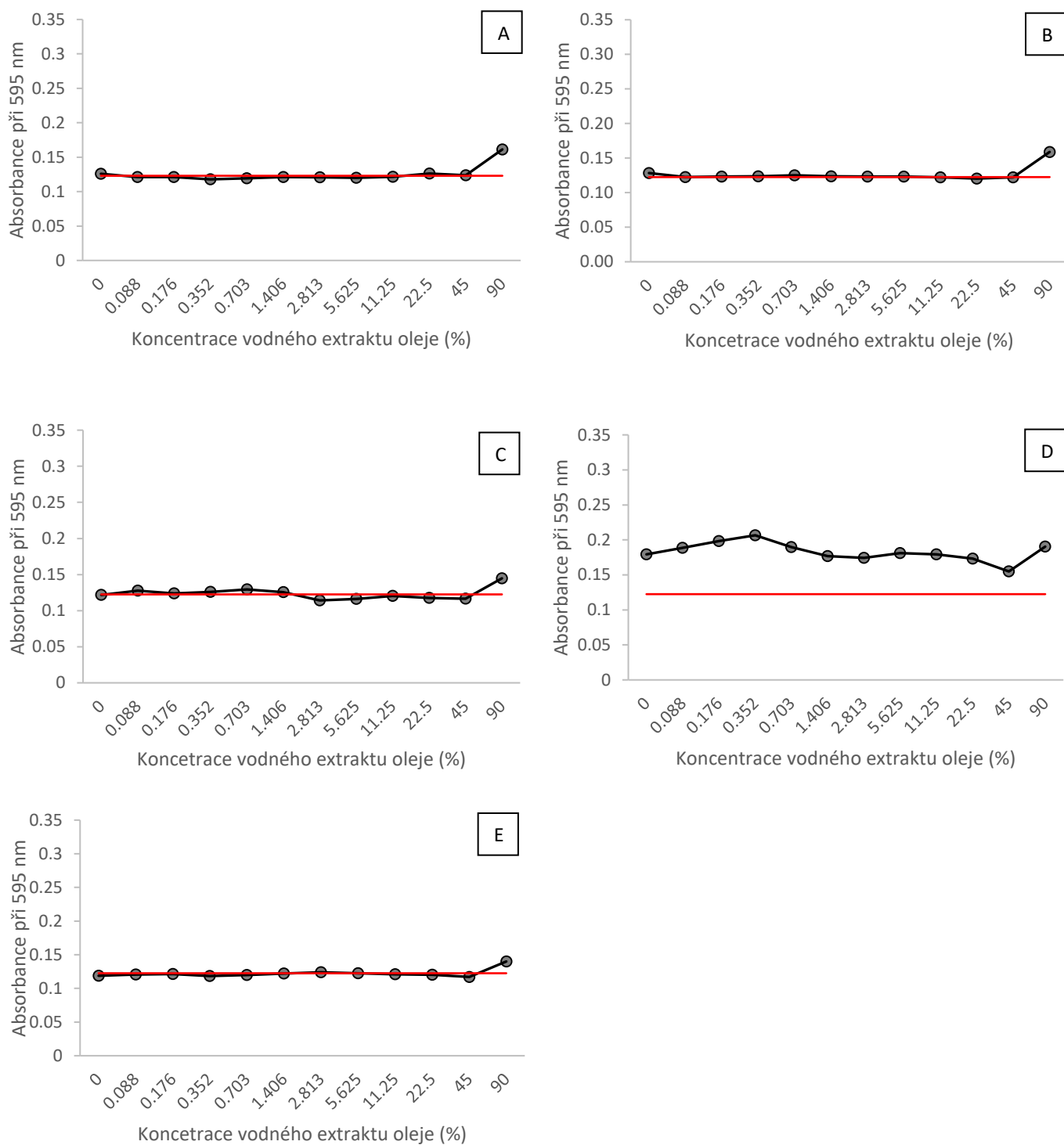
**Obrázek č. 18:** Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050 v přítomnosti extraktů z olejů  
 A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,  
 E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )

#### 4.2.2.4 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

Na obrázku č. 19 jsou zaznamenány výsledky tvorby biofilmu u kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 v přítomnosti vodných extraktů, které byly připraveny z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,120-0,170$ . Daný kmen je tedy biofilm pozitivním kmenem.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl obdobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů, nebyly zaznamenány žádné významné změny v trendu všech získaných křivek. Biofilmová aktivita byla zpravidla na téměř konstantní úrovni, ke zvýšené tvorbě biofilmu docházelo při nejvyšší koncentraci všech testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu.

Trend naměřených výsledků tvorby biofilmu byl u kmene *A. cryaerophilus* UPa 2013/13 ve srovnání se získanými výsledky biofilmu u *A. cryaerophilus* CCM 7050 téměř analogický.

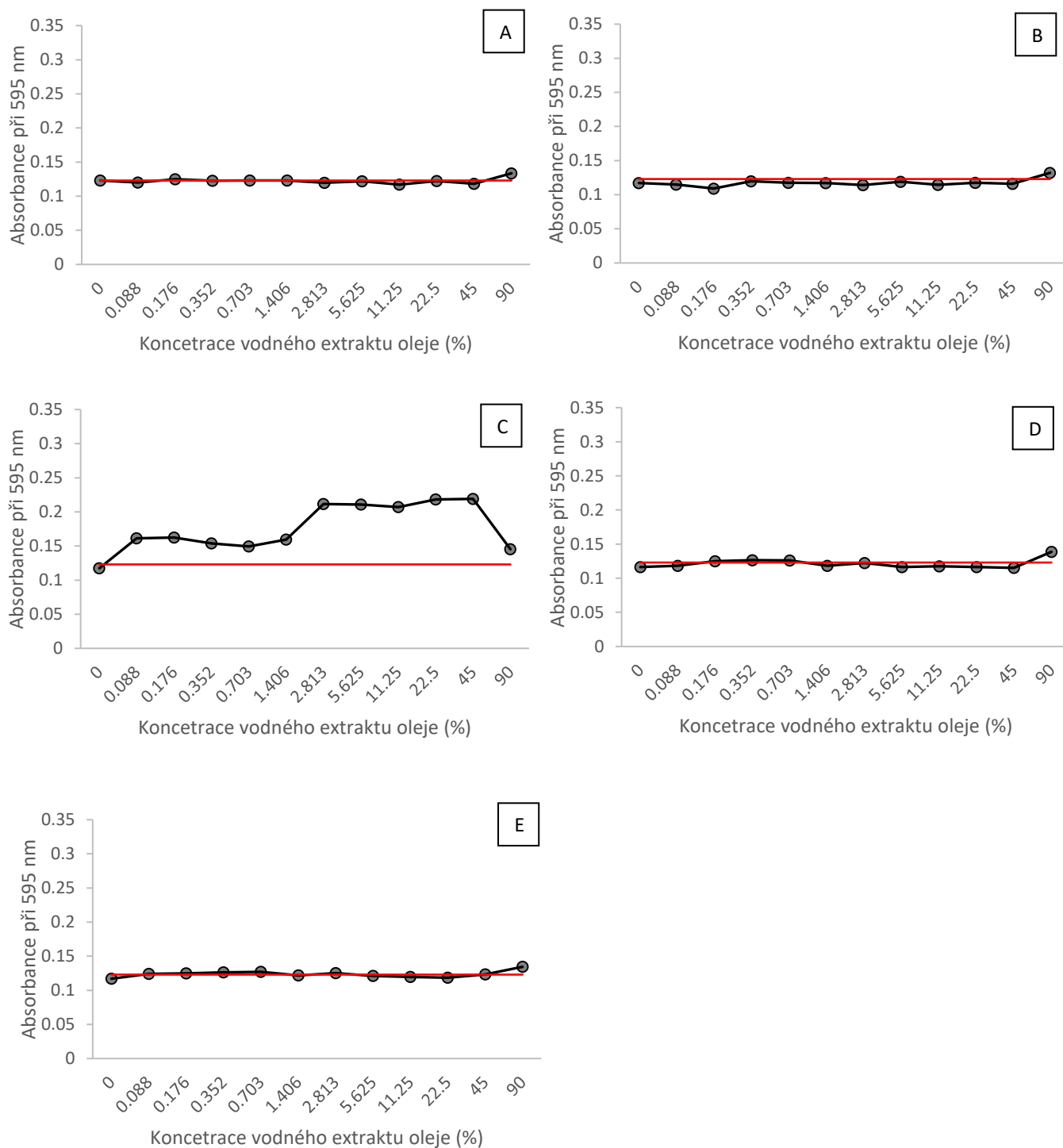


**Obrázek č. 19:** Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13 v přítomnosti extraktů z olejů  
 A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,  
 E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )

#### 4.2.2.5 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter lanthieri* LMG 28517

Uvedené výsledky (graf č. 20) odpovídají tvorbě biofilmu u kmene *Arcobacter lanthieri* LMG 28517 v přítomnosti připravených vodných extraktů z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje okolo hodnoty  $A = 0,125$ . Daný kmen je tedy biofilmpozitivním kmenem.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl téměř podobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů. Biofilmová aktivita byla zpravidla na téměř konstantní úrovni, avšak ke zvýšené tvorbě biofilmu mírně docházelo při nejvyšší koncentraci testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu. V případě vodného extraktu z oleje Ondoliva (graf C) je patrný výrazný nárůst tvorby biofilmu až k hodnotě  $A_{595} = 0,21$  již při koncentraci 2,813 %. To tedy dokládá, že olivový extrakt obsahoval látky, na které tento kmen reagoval zvýšenou tvorbou biofilmu již při tak nízké koncentraci. V dalších vyšších koncentracích extraktu, které byly sledovány ve vztahu ke tvorbě biofilmu, byla biofilmová aktivita konstantní až do koncentrace 45 % ( $A_{595} = 0,219$ ), s nejvyšší koncentrací ale naopak docházelo k prudkému snížení biofilmové aktivity na hodnotu  $A_{595} = 0,145$ .

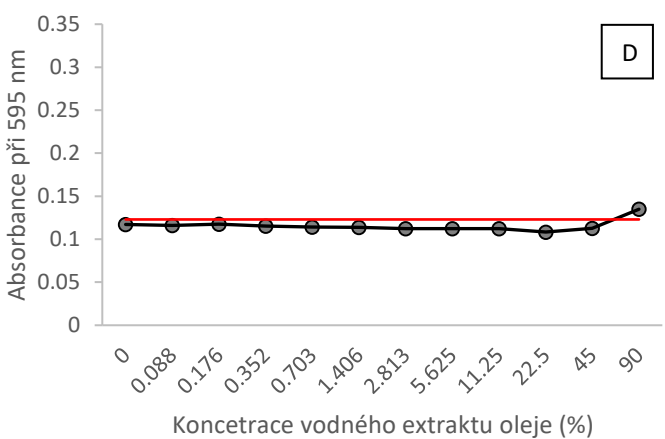
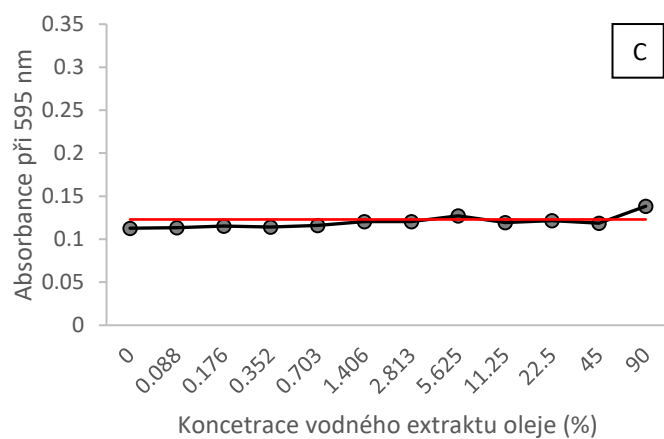
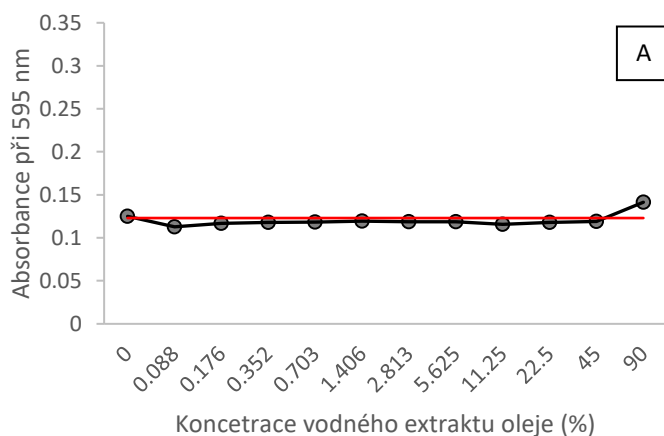


**Obrázek č. 20:** Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter lanthieri* LMG 28517 v přítomnosti extraktů z olejů  
 A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,  
 E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )

#### 4.2.2.6 Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter thereius* LMG 24488

Na obrázku č. 21 jsou uvedeny výsledky tvorby biofilmu u kmene *Arcobacter thereius* LMG 24488 v přítomnosti připravených vodných extraktů z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,125$ . Daný kmen je tedy biofilmpozitivním kmenem.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl takřka stejný pro všechny testované vzorky olejových extraktů. Biofilmová aktivita byla zpravidla na téměř konstantní úrovni, nedocházelo k žádnému významnému výkyvu biofilmové aktivity, avšak ke zvýšené tvorbě biofilmu mírně docházelo při nejvyšší koncentraci testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu. Všechny testované extrakty z olejů víceméně významně neovlivnily průběh biofilmové aktivity u tohoto kmene.



**Obrázek č. 21:** Tvorba biofilmu kmene *Arcobacter thereius* LMG 24488 v přítomnosti extraktů z olejů  
 A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,  
 E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )

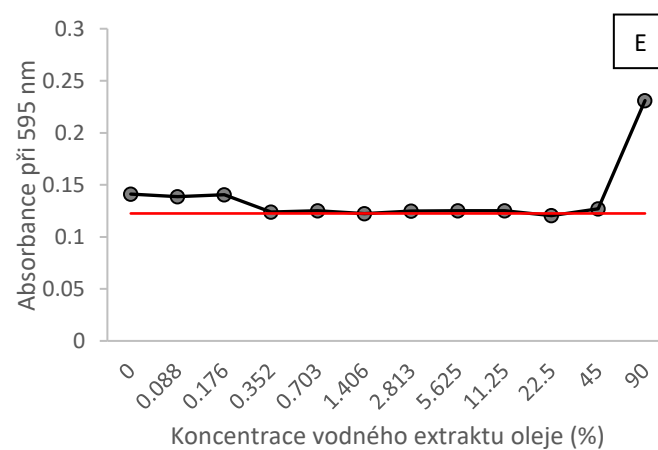
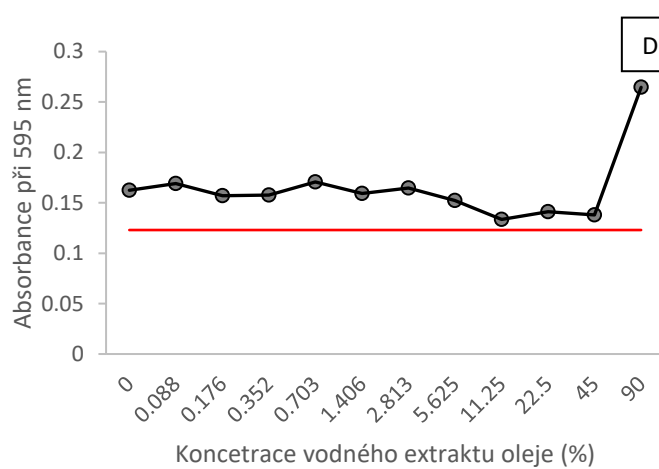
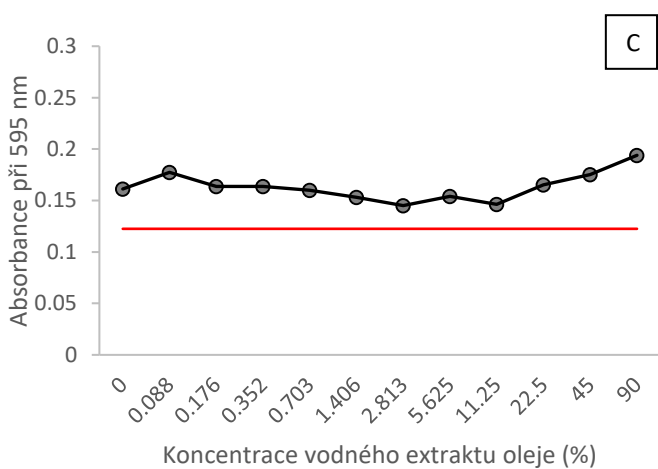
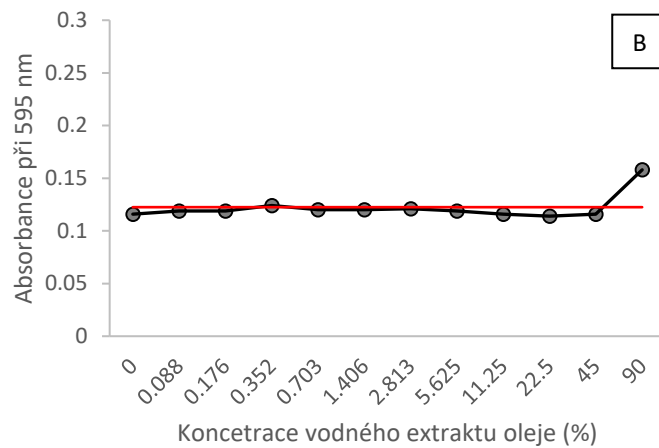
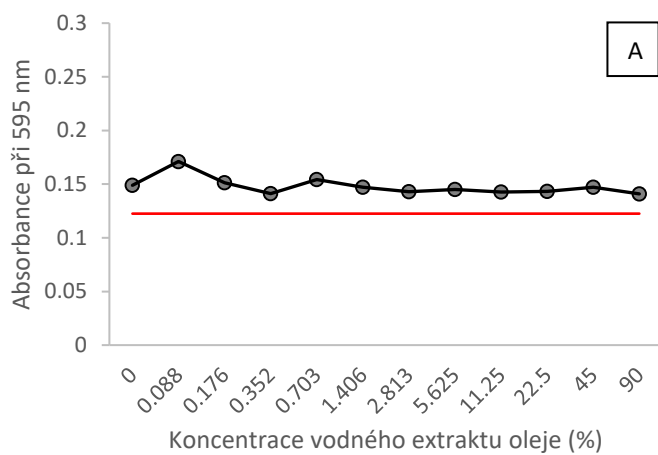


#### 4.2.2.7 Tvorby biofilmu kmene *Escherichia coli* CCM 3954

Na obrázku č. 22 jsou uvedeny výsledky tvorby biofilmu u kmene *Escherichia coli* CCM 3954 v přítomnosti vodných extraktů z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,125-0,162$ . Daný kmen je tedy biofilmopozitivním kmenem.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl podobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů. Biofilmová aktivita byla téměř na konstantní úrovni, ke zvýšené tvorbě biofilmu docházelo při nejvyšší koncentraci testovaných extraktů. To lze vysvětlit stresovými podmínkami, ve kterých již bakterie nedokázaly přežít v planktonní formě a ihned tvořily biofilmovou strukturu.

V případě vodného extraktu z oleje Ballester (graf A) je patrný nárůst tvorby biofilmu až k hodnotě  $A_{595} = 0,171$  již při nejnižší koncentraci 0,088 %. To tedy dokládá, že olivový extrakt obsahoval látky, na které tento kmen reagoval zvýšenou tvorbou biofilmu již při tak nízké koncentraci. V dalších vyšších koncentracích extraktu, které byly sledovány ve vztahu ke tvorbě biofilmu, byla biofilmová aktivita konstantní až do nejvyšší testované koncentrace 90 %. V nejslabších vodných extraktech (graf D a E) byla biofilmová aktivita takřka konstantní, ale poté byl zaznamenán vysoký nárůst biofilmové aktivity u nejsilnější testované koncentrace (90 %) až k hodnotám  $A_{595} = 0,230-0,265$ .



**Obrázek č. 22:** Tvorba biofilmu kmene *Escherichia coli* CCM 3954 v přítomnosti extraktů z olejů

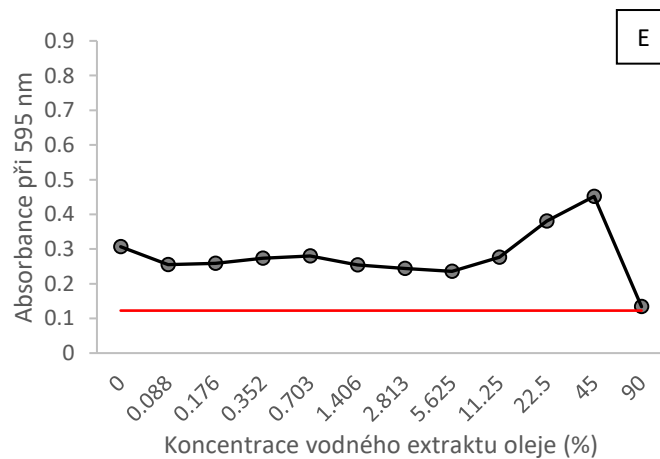
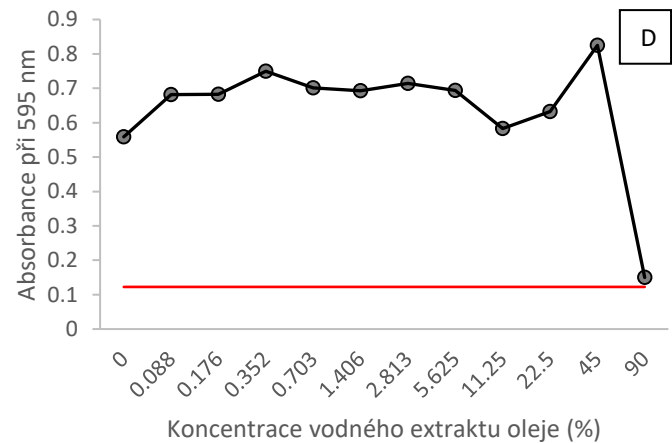
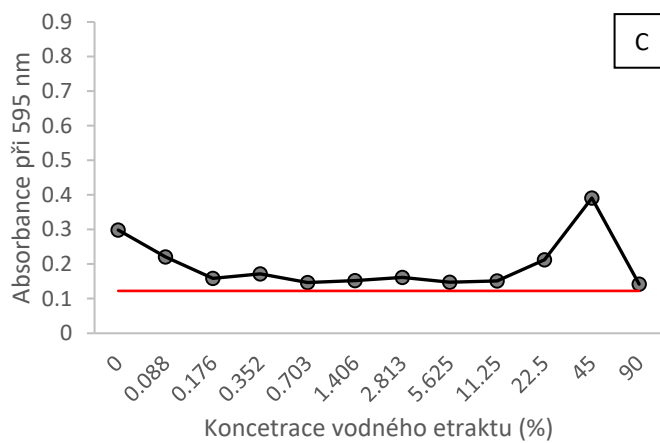
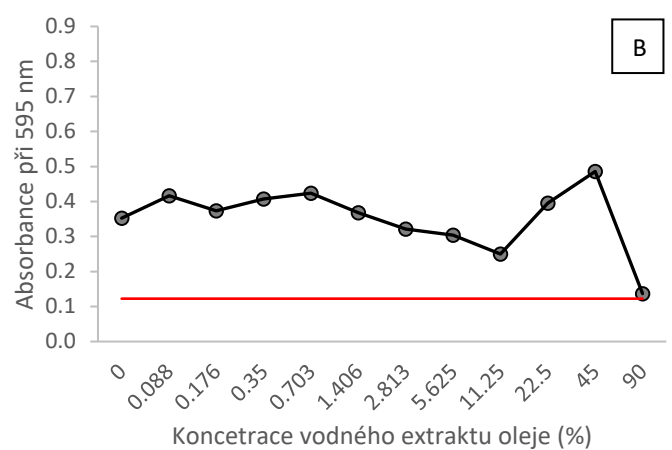
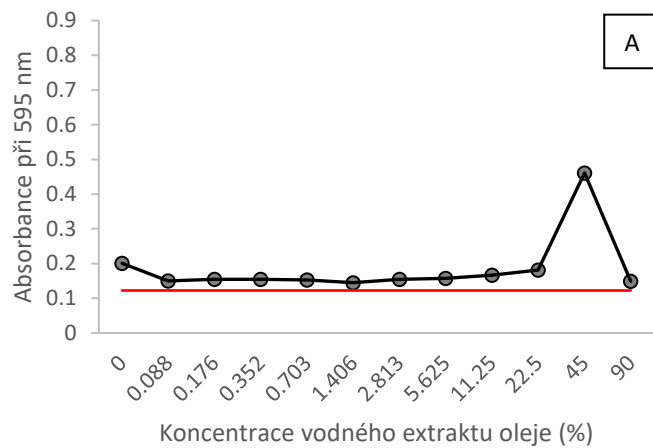
A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges, E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujónu ( $A_{595} = 0,125$ )

#### 4.2.2.8 Tvorba biofilmu kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4223

Na obrázku č. 23 jsou uvedeny výsledky tvorby biofilmu u kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4223 v přítomnosti připravených vodných extraktů z vybraných vzorků olejů. Hodnota, vypovídající o extrakty neovlivněné biofilmové aktivitě daného kmene, se pohybuje v hodnotách  $A = 0,201–0,559$ . Daný kmen je tedy biofilmopozitivním kmenem. Hodnoty absorbance tedy značí, že kmen vykazoval největší biofilmovou aktivitu ze všech zvolených mikroorganismů.

Trend tvorby biofilmu zaznamenaný pro různé koncentrace olejového extraktu byl podobný pro všechny testované vzorky olejových extraktů. Biofilmová aktivita byla téměř na konstantní úrovni, ke zvýšené tvorbě biofilmu docházelo při koncentraci 22,5 % u všech testovaných extraktů. Závislost naměřených výsledků u kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4223 byl velice zajímavá.

V případě všech vodných extraktů z olejů bylo nejzajímavější částí rozmezí koncentrací 22,5 %–90 %. Jak je patrné ze všech grafů, vysoký nárůst tvorby biofilmu začal od koncentrace 22,5 %. U 45 % koncentrace byla naměřená biofilmová aktivita nejvyšší pro všechny olejové extrakty. To tedy dokládá, že olivové extrakty obsahovaly látky, na které tento kmen reagoval zvýšenou tvorbou biofilmu. Vyhodnocené absorbance biofilmové aktivity dosahovaly rozmezí  $A_{595} = 0,400–0,830$ . V nejvyšších koncentracích extraktů, které byly sledovány ve vztahu ke tvorbě biofilmu, biofilmová aktivita prudce klesla až k hranici červené linie. Což značí, že biofilmová aktivita byla značně potlačena.



**Obrázek č. 23:** Tvorba biofilmu kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4223 v přítomnosti extraktů z olejů  
 A – extrakt z oleje Ballester, B – extrakt z oleje Kyosos, C – extrakt z oleje Ondoliva, D – extrakt z oleje Borges,  
 E – extrakt z oleje z pokrutin; červená linie – hodnota absorbance BHI bujóny ( $A_{595} = 0,125$ )

### 4.2.3 Diskuze k vlivu olejových extraktů na biofilmovou aktivitu bakterií

Biofilmová aktivita závisela na daném extraktu, na který mikroorganismus reagoval zvýšenou, či sníženou tvorbou biofilmu. Podobné chování v extraktech vykazovaly kmeny *A. butzleri* a také kmeny *A. cryaerophilus*. Zvolené extrakty nebyly tak silné, aby dokázaly tvorbu biofilmu u arkobakterů a *E. coli* plně potlačit. Co se týká kmene *S. aureus*, pouze 90 % olejové extrakty dokázaly biofilmovou aktivitu snížit. Stejně tak jako u kultivační metody, potlačení tvorby biofilmu bylo efektivnější pro grampozitivní mikroorganismus.

Rostlinné výtažky vykazují omezenou bakteriostatickou aktivitu a ve skutečnosti mnohé extrakty podporují růst planktonních forem bakteriálních buněk. Extrakty by měly mít co nejvyšší obsah antimikrobiálních látek, aby byly schopny inhibice tvorby biofilmu (Quave et al. 2008). Navíc většina studií o antimikrobiální aktivitě je omezena na analýzu bakteriostatických a baktericidních vlastností rostlinných extraktů. Dále se zkoumají mechanismy, jako např. snížení tvorby biofilmu prostřednictvím inhibice *quorum sensing* (Quave et al. 2008, Rasmussen a Givskov 2006).

Byla studována antimikrobiální a antibiofilmová aktivita koriandrového esenciálního oleje a jeho hlavní sloučeniny linaloolu proti kmenům *Campylobacter jejuni* a *Campalobacter coli*, a také jejich vliv na systém QS. Výsledky studie prokázaly, že obě sloučeniny vykazují aktivitu proti kampylobakterům a inhibují tvorbu biofilmu *in vitro*. Kromě toho výsledky poukazují na antibakteriální, antibiofilmovou aktivitu. Což naznačuje, že koriandrový extrakt a linalool, by se mohly používat v potravinářském průmyslu, aby se prodloužila skladovatelnost potravin bez nutnosti chemických přísad nebo konzervačních látek (Duarte et al. 2016).

Protože jsou akrobaktery velice podobné kampylobakterům, s velkou pravděpodobností by se při testování akrobakterů dospělo k obdobným výsledkům, proto by bylo zajímavé otestovat přežívání a tvorbu biofilmů akrobakterů v extraktu koriandrového esenciálního oleje.

V další studii bylo prokázáno, že látka kurkumin, která byla extrahována z kurkumy, inhibuje tvorbu biofilmu uropatogenů. Dokáže ovlivňovat QS u *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* a *Serratia marcescens*. Potenciál antibiofilmové aktivity kurkuminu na uropatogeny, stejně tak i jeho účinnost proti vytvořeným biofilmům, byla zkoumán pomocí světelného mikroskopu a konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Zjistilo se také, že léčba kurkuminem potlačuje faktory, které souvisí s QS, jako je produkce exopolysacharidů, produkce alginátu a motilita uropatogenů. Dále bylo zdokumentováno, že kurkumin zvyšuje citlivost kmenů na konvenční antibiotika (Packiavathy et al. 2014).

V jiné studii byl zkoumán účinek farnesolu na methicilin rezistentní a další kmeny *S. aureus*. Farnesol je látka s antimikrobiálními vlastnostmi, která inhibuje QS u zmíněných mikroorganismů. Při testování životaschopnosti a při stanovení tvorby biofilmu bylo prokázáno, že farnesol inhibuje tvorbu biofilmu a ohrožuje integritu buněčné membrány. Inhibice tvorby biofilmu byla úspěšná zároveň při zvyšování antimikrobiální účinnosti všech antibiotik, ke kterým byly kmeny citlivé. Bylo provedeno synergické testování farnesolu a gentamicinu na vytvořené biofilmy, které byly vystaveny různým koncentracím obou látek. Pozorovaná senzibilizace rezistentních kmenů na antimikrobiální látky a pozorovaný synergický účinek s gentamicinem naznačují potenciální aplikaci farnesolu jako adjuvantního terapeutického činidla pro prevenci infekcí souvisejících s biofilmem a pro podporu zvrácení rezistence vůči lékům. Zásadní je potřeba rozvoje nových antimikrobiálních látek k léčbě rostoucího počtu infekcí, kde odolnost vůči antibiotikům představuje vážnou hrozbu v případech, kdy se jedná právě o biofilmy (Jabra-Rizk et al. 2006).

Další studie potvrzují, že rostlinné extrakty a esenciální oleje mají antimikrobiální potenciál, kterého by šlo využít jako preventivní nebo léčebné terapie pro řadu onemocnění. I když je to povzbudivé, je potřeba dalších klinických studií. Je důležité zjistit, zda by byl léčebný postup s extrakty výhodný, buď samostatně nebo v kombinaci s konvenční terapií. Zejména studie, které se zabývají dostatečnou účinností, standardizací extraktů a obsahu účinných látek by přinesly velkou hodnotu (Palombo 2009).

### 4.3 Antioxidační kapacita olejových extraktů

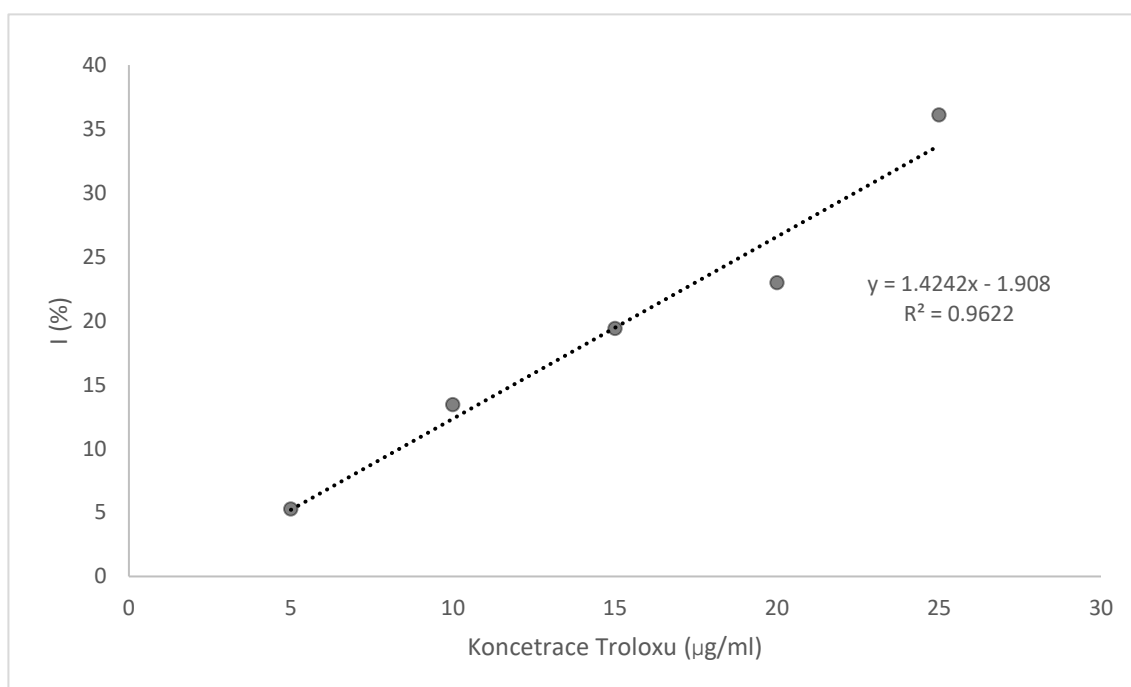
Naměřené hodnoty pro kalibrační závislost byly zaznamenány do tabulky, I (%) byla vypočtena dle následujícího vztahu a dále byla vynesena do grafu:

Hodnota slepého vzorku činila  $A_{sp} = 0,587$

$$I (\%) = \frac{A_{sp} - A_{vz}}{A_{sp}} \cdot 100$$

Tabulka č. 5: Kalibrační řada – naměřené absorbance a vypočítané hodnoty I (%)

c (μg/ml)	A	I (%)
5	0,556	5,281
10	0,508	13,458
15	0,473	19,421
20	0,452	22,998
25	0,375	36,116



Graf č. 11: Kalibrační závislost inhibice (%) na koncentraci látky Trolox.

Z rovnice regrese byly dále vypočítány hodnoty antioxidační kapacity pro jednotlivé vzorky olivových olejů. Olivový olej Ballester a Kyosos nebylo potřeba pro přípravu vzorku během měření ředit do zvoleného rozsahu kalibrační řady. Ostatní vzorky olejových extraktů bylo třeba upravit, jelikož antioxidační kapacita byla velmi slabá, proto se pro experiment použily vzorky 3x koncentrovanější.

**Tabulka č. 6:** Naměřené a vypočítané hodnoty antioxidační kapacity pro vzorky olivových extraktů.

<b>vzorek extraktu</b>	<b>A</b>	<b>Průměr A</b>	<b>I (%)</b>	<b>* Výsledek (µg/ml)</b>	<b>** Korekce (µg/ml)</b>
<b>Ballester</b>	0,403 0,403 0,402	0,4027	31,403	20,71	<b>20,71</b>
<b>Kyosos</b>	0,537 0,538 0,537	0,5373	8,461	4,601	<b>4,601</b>
<b>Ondoliva</b>	0,452 0,452 0,452	0,452	22,998	14,809	<b>4,94</b>
<b>Borges</b>	0,536 0,537 0,536	0,5363	8,631	4,721	<b>1,57</b>
<b>pokrutiny</b>	0,543 0,542 0,543	0,5427	7,553	3,963	<b>1,32</b>

\* Antioxidační kapacita (µg/ml).

\*\* Antioxidační kapacita po zohledněné úpravě vzorku před měřením (µg/ml).



### 4.3.1 Diskuze k antioxidační kapacitě olejových extraktů

Wilkins a Board uvedli, že více než 1 340 rostlin je známých jako potenciální zdroj antimikrobiálních a antioxidačních látek, ale jen málo jich bylo doposud vědecky studováno (Wilkins a Board 1989).

Brenes et al. testovali vodný extrakt z panenského olivového oleje, který vykazoval nejsilnější antibakteriální účinky, poté víno, olivové oleje a čajové výtažky. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu z olejů vykazovaly panenské olivové oleje, následovaly olivové oleje a oleje z pokrutin (Brenes et al. 2007). Což potvrzuje i výsledky z naší studie, nejvyšší antimikrobiální kapacitu vykazoval panenský olivový olej.

Během několika posledních let jsou látky s antioxidačními účinky v popředí zájmu odborníků nejen v medicíně, ale i potravinářství, zejména díky pozitivními účinkům na lidské zdraví. Jsou to látky, které ve vhodné koncentraci dokáží zabránit oxidaci substrátu. Nahromaděním reaktivních forem kyslíku, dochází ke vzniku oxidačního stresu. Lidský organismus využívá antioxidační látky, aby eliminoval právě reaktivní formy kyslíku. Pro svoji ochranu organismus nevyužívá pouze antioxidanty, které se syntetizují v těle, ale především antioxidanty z potravy (ovoce, zelenina, luštěniny, oleje aj.) (Fidler a Kolářová 2009). Mezi nejvýznamnější přírodní antioxidanty patří vitamín E, vitamín C, fenolové látky a další. Antioxidanty, které se do potravin dodávají by měly být zdravotně nezávadné a účinné v nízkých koncentracích.

Antioxidační aktivita je schopnost látky nebo směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Antioxidační kapacita popisuje dobu trvání antioxidačního účinku, ale antioxidační aktivita je charakterizována jako dynamika průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu. Antioxidační účinek látek je dán specifickou strukturou. Kromě struktury ovlivňuje antioxidační aktivitu antioxidantů i pH a teplota (Šulc et al. 2007).

Posledním testováním bylo tedy stanovení antioxidační kapacity olejových extraktů. Ze získaných výsledků této diplomové práce vychází, že nejvyšší hodnoty antioxidační kapacity dosahoval extrakt z oleje Ballester, který dosahoval antioxidační kapacity 20,71  $\mu\text{g/ml}$ . Poté extrakt z oleje Kyosos 4,601  $\mu\text{g/ml}$ , extrakt ze směsného oleje Ondoliva 4,94  $\mu\text{g/ml}$ , extrakt z rafinovaného oleje Borges 1,57  $\mu\text{g/ml}$  a extrakt z oleje z pokrutin 1,32  $\mu\text{g/ml}$ . Významná antioxidační aktivita byla zjištěna u většiny olivových extraktů, a to souvisí i s jejich fenolickým obsahem (McDonald et al. 2001). Proto by bylo výhodné zjistit, jaké přesně fenolické látky v olejových extraktech jsou nejvíce zodpovědné za antimikrobiální aktivitu a také jejich přesné množství.

## 5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla experimentálně sledována tvorba biofilmu v prostřední vodných extraktů z olejů a dále byla za pomoci kultivační metody sledována schopnost bakterií přežívat v přítomnosti vodných extraktů z olejů. Náplní mé práce bylo zhodnotit účinnost pěti vodných extraktů z olivových olejů proti osmi bakteriálním kmenům. Experiment probíhal se šesti vybranými zástupci rodu *Arcobacter* a dvěma srovnávacími mikroorganismy, jednalo se o gramnegativní (*E. coli* CCM 3957) a grampozitivní (*S. aureus* CCM 4223) bakterii.

Všechny vodné extrakty vykazovaly antimikrobiální schopnosti během kultivačních experimentů. Nejcitlivějším kmenem k testovaným extraktům byl *S. aureus* CCM 4223, naopak nejvíce rezistentní bakterií byla *E. coli* CCM 3957. Nejodolnější bakterií z vybraných arkobakterů v kultivační metodě byl *A. butzleri* CCUG 30484, naopak kmenem, který nepřežíval v takové míře byl *A. thereius* LMG 24488, tento kmen byl většinou nejrychleji inaktivován olejovým extraktem. Ze všech testovaných extraktů byla největší antimikrobiální kapacita zaznamenána u extraktu z extra panenského olivového oleje Ballester, který dokázal inhibovat všechny testované mikroorganismy, a to po 1 hodině expozice. Extrakt z oleje Ballester dosahoval antioxidační kapacity 20,71  $\mu\text{g/ml}$ . Naopak nejslabší antimikrobiální kapacitu vykazoval olej z pokrutin, u kterého se podařilo inhibovat plně pouze arkobaktery, ale až po 24 hodinách expozice. Extrakt oleje z pokrutin dosahoval antioxidační kapacity 1,32  $\mu\text{g/ml}$ .

Všechny testované bakteriální kmeny byly biofilm pozitivní, srovnávací mikroorganismy vykazovaly oproti arkobakterům silnější tvorbu biofilmu. Ve tvorbě bakteriálního biofilmu byl nejaktivnější bakterií *S. aureus* CCM 4223, na tento kmen extrakty ze všech olejů působily velice podobně. Při 45 % koncentraci všech extraktů byla tvorba biofilmu *S. aureus* potlačena na limitní hranici tvorby biofilmu, a poté se již tvorba biofilmu nezvýšila. U kmenů *A. butzleri* došlo v extraktu z oleje Ondoliva k značnému zvýšení tvorby biofilmu, již při nejnižší koncentraci 0,088 %. Tímto lze předpokládat, že tento extrakt obsahoval antimikrobiální látky, na které kmeny reagovaly právě zvýšenou tvorbou biofilmu při nejnižší koncentraci. U arkobakterů a *E. coli* CCM 3957 v rozmezí 45–90 % koncentrací extraktů množství bakteriálního biofilmu stoupl, což zřejmě značilo snahu bakterií o přežití v nepříznivých podmínkách a rychlé soustředění do odolnější formy biofilmu. Nejintenzivnější nárůst biofilmů u gramnegativních bakterií byl detekován převážně u slabších extraktů. Zde jsme se přesvědčili, že jednotlivé bakteriální druhy se značně liší v nárocích na kultivační

podmínky a tím pádem i v kvantitě a kvalitě vytvořeného biofilmu. Doposud se testováním olejových extraktů na arkobaktery i další mikroorganismy zabývalo limitní množství prací a bylo dosaženo minimálních výsledků, proto by bylo zajímavé dále práci rozvinout a obohatit tak získané informace. V případě některých olivových extraktů by se mohlo jednat o významné a účinné látky, které by byly určeny pro další testování. Aby mohly tyto sloučeniny najít uplatnění, je zapotřebí ještě řady dalších testů a klinických studií.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

1. AHIMOU, F., M. J. SEMMENS, G. HAUGSTAD and P. J. NOVAK. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9), s. 2905–2910.
2. ARCIOLA, C. R., L. BALDASSARRI and L. MONTANARO. 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), s. 557–562.
3. ASSANTA, M. A., D. ROY, M.-J. LEMAY and D. MONTPETIT. Attachment of *Arcobacter butzleri*, a New Waterborne Pathogen, to Water Distribution Pipe Surfaces. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(8), s. 1240–1247.
4. BALDASSARRI, L., W. A. SIMPSON, G. DONELLI and G. D. CHRISTENSEN. Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1993, 12(11), s. 866–868.
5. BARDOUNIOTIS, E., W. HUDDLESTON, H. CERI and M. E. OLSON. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 203(2), s. 263–267.
6. BASSLER, B. L. (1999): How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by *quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(6), s. 582–587.
7. BRENES, M., E. MEDINA, C. ROMERO and A. DE CASTRO. Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry Hi Tech*, 2007, 18(4), s. 6-8.
8. BÜCKER R., H. TROEGER, J. KLEER, M. FROMM and J.-D.SCHULZKE. *Arcobacter butzleri* Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200, s. 756–764.
9. BUSSCHER, H. J. and H. J. VAN DER MEI. Physico–Chemical Interactions in Initial Microbial Adhesion and Relevance for Biofilm Formation. *Advances in Dental Research*, 1997, 11(1), s. 24–32.
10. COLLADO, L. and M. J. FIGUERAS. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology reviews*, 2011, 24(1), s. 174–192.

11. COLLADO, L., I. CLEENWERCK, S. VAN TRAPPEN, P. DE VOS and M. J. FIGUERAS. *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(6), s. 1391–1396.
12. CONNER, D. E. and L. R. BEUCHAT. Effect of essential oils from plants on growth of spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 1984, 49, s. 429–434.
13. COSTERTON, J. W., Z. LEWANDOWSKI, D. E. CALDWELL, D. R. KORBER and H. M. LAPPIN-SCOTT. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 1995, 49, s. 711–745.
14. COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, 11(3), s. 217–221.
15. COWAN M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(4), s. 564–582.
16. ČERVENKA, L., I. PEŠKOVÁ, M. PEJCHALOVÁ a J. VYTŘASOVÁ. Inhibition of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* by Plant Oil Aromatics. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(1), s. 165–169.
17. DAVEY, M. E. and G. A. O'TOOLE. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4), s. 847–867.
18. DAVIES, D. G., M. R. PARSEK, J. P. PEARSON, B. H. IGLEWSKI, J. W. COSTERTON and E. P. GREENBERG. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, 280(5361), s. 295–298.
19. DONACHIE, S.P., J. P. BOWMAN, S. ON and M. ALAM. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55, s. 1271–1277.
20. DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 2001, 7(2), s. 277–281.
21. DOUIDAH, L., L. DE ZUTTER, J. BARÉ, P. DE VOS, P. VANDAMME, O. VANDENBERG, A.-M. VAN DEN ABEELE and K. HOUF. Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 50(3), s. 735–741.
22. DUAN, K. and M. G. SURETTE. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 las and rhl quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(13), s. 4827–4836.

23. DUARTE, A., A. C. ALVES, S. FERREIRA, F. SILVA and F. C. DOMINGUES. Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 2015, 77(2), s. 244–250.
24. DUARTE, A., A. LUÍS, M. OLEASTRO and F. DOMINUGUES. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, 2016, 61, s. 115–122.
25. DUBÁNEK, V. a J. CHVÁLA. *Technologie kontinuálně provzdušňované biofilmové nitrifikace při úpravě podzemní vody na vodu pitnou*, FER&MAN Technology, 2001. Dostupné z: <http://www.smv.cz/res/archive/014/001650.pdf>.
26. ELA, M. A., N. S. EL-SHAER and N. B. GHANEM. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 1996 51(12), s. 993–994.
27. ELGAYYAR, M., F. A. DRAUGHON, D. A. GOLDEN and J. R. MOUNT. Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *Journal of Food Protection*, 2001, 64 (7), s. 1019–1024.
28. FERA, M. T., T. L. MAUGERI, C. GUGLIANDOLO, C. BENINATI, M. GIANNONE, E. LA CAMERA and M. CARBONE. Detection of *Arcobacter* spp. in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea. *American Society for Microbiology*, 2004, 70(3), s. 1271–1276.
29. FERA, M.T., T. L. MAUGERI, C. GUGLIANDOLO, E. LA CAMERA, V. LENTINI, A. FAVALORO, BONANNO D. and M. CARBONE. Induction and Resuscitation of Viable Nonculturable *Arcobacter butzleri* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): s. 3266–3268.
30. FERREIRA, S., M. J. FRAQUEZA, J. A. QUEIROZ, F. C. DOMINGUES and M. OLEASTRO. 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(1): s. 82–88.
31. FIDLER, M. a L. KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické Listy* 103, 2009, s. 232–235.
32. FISHER, J.C., A. LEVICAN, M. J. FIGUERAS and S. L. MCLELLAN. (2014): Population dynamics and ecology of *Arcobacter* in sewage. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 525(5). Dostupný z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4224126/>.

33. FREBOURG, N. B., S. LEFEBVRE, S. BAERT and J. F. LEMELAND. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(2), s. 877–880.
34. FREEMAN, D. J., F. R. FALKINER and C. T. KEANE. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 1989, 42(8), s. 872–874.
35. GIACOMETTI, F., A. LUCCHI, A. DI FRANCESCO, M. DELOGU, E. GRILLI, I. GUARNIERO, L. STANCAMPIANO, G. MANFREDA, G. MERIALDI and A. SERRAINO. *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination. *Applied Environmental Microbiology*, 2015, 81(15), s. 5055–5063.
36. GOLDMAN, E. and L. H. GREEN. Practical Handbook of Microbiology. *CRC Press Book* (2), 2009. ISBN: 978-0-8493-9365-5.
37. GÖLZ, G., S. SHARBATI, S. BACKERT and T. ALTER. *Quorum sensing* dependent phenotypes and their molecular mechanisms in *Campylobacterales*. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2012, 2(1), s. 50–60.
38. GUTIERREZ, J., G. RODRIGUER, C. BARRY-RYAN and P. BOURKE. 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(9), s. 1846–1854.
39. HASSAN, A., J. USMAN, F. KALEEM, M. OMAIR, A. KHALID and M. IQBAL. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2011, 15(4), s. 305–311.
40. HEFFORD, M. A., S. D'AOUS, T. D. CYR, J. W. AUSTIN, G. SANDERS, E. KHERADPIR and M. L. KALMOKOFF. Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(3), s. 197–208.
41. HO, H. T. K., L. J. A. LIPMAN and W. GAASTRA. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*, 2006, 115(1–3), s. 1–13.
42. HOLÁ, V., F. RŮŽIČKA, R. TEJKALOVÁ a M. VOTAVA. Stanovení citlivosti k antibiotikům u biofilmopozitivních forem mikroorganismů. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2004, 10(5), s. 218–222.

43. HOUF, K. and R. STEPHAN. Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(2), s. 408–413.
44. HOUF, K., L. W. STEPHEN, T. COENYE, J. MAST, J. VAN HOOFF and P. VANDAMME. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(2), s. 713–717.
45. HOYLE, B. D. and J. W. COSTERTON. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research*, 1991, 37, s. 91–105.
46. HRUŠKOVÁ, L., P. MOTŮKOVÁ a J. VYTRÁSOVÁ. 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(12), s. 797–802.
47. HSUEH, P.-R., L.-J. TENG, P.-C. YANG, S.-K. WANG, S.-C. CHANG, S.-W. HO, W.-C. HSIEH and K.-T. LUH. Bacteremia Caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *Journal of Clinical mikrobiology*, 1997, 35(2), s. 489–491.
48. HUDCOVÁ, T. Rod *Pseudomonas*: základní charakteristika, tvorba biofilmu. *Bioprospect*, 2007, 17(2), s. 25–28.
49. CHANDRA, J., D. M. KUHN, P. K. MUKHERJEE, L. L. HOYER, T. McCORMICK and M. A. GHANNOUM. (2001): Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18), s. 5385–5394.
50. CHRISTENSEN G. D., W. A. SIMPSON, A. L. BISNO and E. H. BEACHEY. Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infection and Immunity*, 1982, 37(1), s. 318–326.
51. CHRISTENSEN G. D., W. A. SIMPSON, J. J. YOUNGER, L. M. BADDOUR, F. F. BARRETT, D. M. MELTON and E. H. BEACHEY. (1985): 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), s. 996–1006.
52. JABRA-RIZK, M. A., T. F. MEILLER, C. E. JAMES and M. E. SHIRTLIFF. Effect of Farnesol on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, 50(4), s. 1463–1469.



53. KAISER, T. D. L., E. M. PEREIRA, K. R. NETTO DOS SANTOS, E. L. N. MACIEL, R. P. SCHUENCK and A. P. F. NUNES. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, 75(3), s. 235–239.
54. KALEMBA, D. and A. KUNICKA. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, 10(10): s. 813–829.
55. KEATING, G. J. and R. O'KENNEDY. The chemistry and occurrence of coumarins, *John Wiley & Sons*, 1997, s. 348.
56. KIM, H. K., C. Y. HWANG and B. C. CHO. *Arcobacter marinus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60, s. 531–536.
57. KJELDGAARD, J., K. JØRGENSEN and H. INGMER. Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiol*, 2009, 131(2-3), s. 256–259.
58. KNOBLOCH, J. K. M., C. MATTHIAS, A. HORSTKOTTE, H. ROHDE and D. MACK. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, 2002, 191, s. 101–106.
59. KUČEROVÁ S., D. ŠILHA a J. VYTRÁSOVÁ. Výskyt arkobakterů a jejich přežívání v přítomnosti vybraných přírodních látek. *Sborník příspěvků ze semináře*, 2016, s. 97–107. ISBN: 978-80-7560-005-9.
60. LEHNER, A., T. TASARA and R. STEPHAN. (2005): Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102(2), s. 127–135.
61. LEVICAN, A., A. ALKESKAS, C. GÜNTER, J. S. FORSYTHE and M. J. FIGUERAS. Adherence to and Invasion of Human Intestinal Cells by *Arcobacter* Species and Their Virulence Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16), s. 4951–4957.
62. LEVICAN, A., L. COLLADO and M. J. FIGUERAS. *Arcobacter cloaceae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 36(1), s. 22–27.
63. LEVICAN, A., S. RUBIO-ARCOS, A. MARTINEZ-MURCIA, L. COLLADO and M. J. FIGUERAS. (2015): *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, 38(1): s. 30–35.

64. LICKING, E. Getting a grip on bacterial slime. *Business Week*, 1999, 13(9), s. 98–100.
65. MACIA, M. D., E. ROJO-MOLINERO and A. OLIVER. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20, s. 981–990.
66. MAH, T.-F. C. and G. A. O'TOOLE. (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 2001, 9(1), s. 34–39.
67. MAIER, R. M., I. L. PEPPER and C. P. GERBA. *Environmental Microbiology*, Second Edition, 2009. ISBN: 978-0-12-370519-8.
68. MCDONALD, S., P. PRENZLER, M. ANTOLOVICH and K. ROBARDS. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 2001, 73(1), s. 73–84.
69. MCDONNELL, G. and A. D. RUSSELL. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(1), s. 147–179.
70. MEDINA, E., A. DE CASTRO, C. ROMERO and M. BRENES. 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, s. 4954–4961.
71. MEDINA, E., C. ROMERO, M. BRENES and A. De CASTRO. Antimicrobial Activity of Olive Oil, Vinegar, and Various Beverages against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(5), s. 1194–1199.
72. MILLER, M. B. and B. L. BASSLER. *Quorum Sensing in Bacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55, s. 165–199.
73. MILLER, W.G., C. T. PARKER, M. RUBENFIELD, G. L. MENDZ, M. M. S. M. WÖSTEN, D. V. USSERY, J. F. STOLZ, T. T. BINNEWIES, P. F. HALLIN, G. WANG, J. A. MALEK, A. ROGOSIN, L. H. STANKER and R. E. MANDRELL. The Complete Genome Sequence and Analysis of the *Epsilonproteobacterium Arcobacter butzleri*. 2007. Dostupný z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001358>.
74. MULDER, J. G. and J. E. DEGENER. Slime-producing properties of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 1998, 4(12), s. 689–694.
75. MUSMANNO, R.A., M. RUSSI, H. LIOR and N. FIGURA. In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *Microbiologica*, 1997, 20, s. 63–68.

76. NIU, C. and E. S. GILBERT. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(12), s. 6951–6956.
77. NIVEDITHA, S., S. PRAMODHINI, S. UMADEVI, S. KUMAR and S. STEPHEN. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). *Journal of Clinical and Diagnostic Research for doctors*, 2012, 6(9), s. 1478–1482.
78. NOWICKA, B., R. SZYMAŃSKA and J. KRUK. Chinony prenylowe – występowanie, biosynteza i funkcje. *Postępy Biochemii*, 2009, 55(3), s. 307–314.
79. O’KENNEDY, R. and R. D. THORNES. Coumarins: biology, applications of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Applied Microbiology*, 1997, 84, s. 152–158.
80. OKABE, Y., Y. YAMAMOTO, K. YASUDA, K. HOCHITO and N. ISHII. (2003): The antibacterial effects of coffee on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2003, 34, s. 85–87.
81. PACKIAVATHY, I. A. S. V., S. PRIYA, S. K. PANDIAN and A. V. RAVI. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 2014, 148, s. 453–460.
82. PALOMBO, E. A. (2009): 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*, 2009, (2011), s. 1–16.
83. PAN, Y. and J. BREIDT. Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73(24), s. 8028–8031.
84. PARAJE, M. G. Antimicrobial resistance in biofilms. 2011. Dostępny z: <https://pdfs.semanticscholar.org/d20a/2765de7e291141c7ac1929790af14d547d5f.pdf>.
85. PLESZCZYŃSKA, M. and J. SZCZODRAK. Taniny i ich rozkład enzymatyczny. *Biotechnologia*, 2005, 1(68), s. 152–165.
86. PLYUTA, V., J. ZAITSEVA, E. LOBAKOVA, N. ZAGOSKINA, A. KUZNETSOV and I. KHMEL. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2013, 121(11): 1073–1081.

87. PRESCOTT, M., P. HARLEY and A. KLEIN. Microbiology, 6th ed., 2005, s. 1–1088. ISBN-13: 978-0072951752.
88. PROUZET-MAULÉON, V., L. LABADI, N. BOUGES, A. MÉNARD and F. MÉGRAUD. *Arcobacter butzleri*: Underestimated Enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(2), s. 307–309.
89. QUAVE C. L., L.R. W. PLANO, T. PANTUSOA and B. C. BENNETT. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 118, s. 418–428.
90. RADFORD, S. A., C. C. TASSOU, G. J. E. NYCHAS and R. G. BOARD. The influence of different oils on the death rate of *Salmonella enteritidis* in homemade mayonnaise. *Letters in Applied Microbiology*, 1991, 12, s. 125–128.
91. READING, N. C. and V. SPERANDIO. *Quorum sensing*: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 254, s. 1–11.
92. Harvard University. *Harvard University* [online]. Clinging to crevices, *E. coli* thrive: Study reveals role of flagellum in helping biofilms colonize rough surfaces. 2013. Dostupné z: <https://www.seas.harvard.edu/news/2013/04/clinging-crevices-e-coli-thrive>.
93. RICE-EVANS, C. A., N. J. MILLER and G. PAGANGA. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(7), s. 933–956.
94. ROMERO, C., E. MEDINA, J. VARGAS, M. BRENES and A. DE CASTRO. *In Vitro* Activity of Olive Oil Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2007, 55, s. 680–686.
95. RŮŽIČKA, F., V. HOLÁ a M. VOTAVA. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi. *Česká lékařská společnost J. E. Purkyně*, 2006, 55(1), s. 23–29.
96. SHETH, N. K., T. R. WISNIEWSKI and T. R. FRASON. Survival of enteric pathogens in common beverages an a vitro study. *The American Journal of Gastroenterology*, 1988, 83(6), s. 658–660.
97. SHROUT, J. D. and R. NERENBERG. (2012): Monitoring Bacterial Twitter: Does *Quorum Sensing* Determine the Behavior of Water and Wastewater Treatment Biofilms? *Environmental Science and Technology*, 2012, 46, s. 1995–2005.
98. STAMPI, S., G. DE LUCA, O. VAROLI and F. ZANETTI. Occurrence, Removal and Seasonal Variation of Thermophilic *Campylobacters* and *Arcobacter* in Sewage Sludge. *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, 1999, 202, s. 19–27.

99. STEPANOVIC, S., N. DJUKIC, N. OPAVSKI and S. DJUKIC. Significance of inoculum size in biofilm formation by staphylococci. *The New Microbiologica*, 2003, 26(1), s. 29–132.
100. STEPANOVIC, S., D. VUKOVIC, I. DAKIC, B. SAVIC and M. SVABIC-VLAHOVIC. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40(2), s. 175–179.
101. STEPANOVIC, S., D. VUKOVIC, P. JEZEK, M. PAVLOVIC and M. SVABIC-VLAHOVIC. (2001): Influence of dynamic conditions on biofilm formation by *Staphylococci*. *European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2001, 20(7), s. 502–504.
102. SUTHERLAND, I. W. (2001): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 2001, 147, s. 3–9.
103. ŠILHA, D., L. HRUŠKOVÁ, I. BROŽKOVÁ, P. MOŤKOVÁ and J. VYTRÁSOVÁ. Survival of selected bacteria from the genus *Arcobacter* on various metallic surfaces. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, 53(3), s. 217–223.
104. ŠILHA, D., L. ŠILHOVÁ, J. VYTRÁSOVÁ, I. BROŽKOVÁ and M. PEJCHALOVÁ. 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), s. 326–329.
105. ŠULC, M., J. LACHMAN, K. HAMOUZ, M. ORSÁK, P. DVOŘÁK a V. HORÁČKOVÁ. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické Listy 101*, 2007, s. 584–591.
106. VANDENBERG, V., A. DEDISTE, K. HOUF, S. IBEKWEM, H. SOUAYAH, S. CADRANEL, N. DOUAT, G. ZISSIS, J. P. BUTZLER and P. VANDAMME. *Arcobacter* Species in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(10), s. 1863–1867.
107. VILLVERDE, S., P. A. GARCÍA-ENCINA and F. POLANCI. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Pergamon*, 1997, 31(5), s. 1180–1186.
108. WAN, J., A. WILCOCK and M. J. COVENTRY. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Applied Microbiology*, 1998, 84(2), s.152–158.

109. WATNICK, P. and R. KOLTER. Minireview-Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(10), s. 2675–2679.
110. WILKINS, K. M. and R. G. BOARD. Natural antimicrobial systems. In Mechanisms of action of food preservation procedures. *Elsevier Applied Science*, 1989, (11), s. 285–362.

## 7 PŘÍLOHY

Tabulky experimentálně naměřených hodnot pro sestavení grafů tvorby biofilmů v přítomnosti jednotlivých extraktů:

### Extrakt z oleje Ballester:

#### 1) *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,121	0,119	0,114	0,111	0,109	0,114	0,114	0,113	0,116	0,116	0,115	0,142
medián bez úpravy	0,121	0,119	0,114	0,111	0,109	0,113	0,114	0,113	0,116	0,115	0,115	0,143
směrodatná odchylka	0,0038	0,0056	0,0028	0,0025	0,0027	0,0025	0,0023	0,0022	0,0028	0,0032	0,0029	0,0054

#### 2) *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,161	0,164	0,162	0,160	0,160	0,159	0,157	0,152	0,156	0,144	0,131	0,150
medián bez úpravy	0,163	0,171	0,162	0,160	0,162	0,157	0,157	0,152	0,153	0,143	0,131	0,150
směrodatná odchylka	0,0084	0,0050	0,0055	0,0083	0,0100	0,0059	0,0047	0,0052	0,0062	0,0041	0,0041	0,0032

#### 3) *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,127	0,126	0,122	0,123	0,124	0,127	0,123	0,123	0,125	0,127	0,129	0,148
medián bez úpravy	0,127	0,128	0,122	0,123	0,125	0,127	0,123	0,125	0,125	0,127	0,127	0,152
směrodatná odchylka	0,0032	0,0039	0,0036	0,0027	0,0023	0,0025	0,0042	0,0072	0,0040	0,0046	0,0062	0,0072

#### 4) *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,126	0,121	0,121	0,118	0,119	0,121	0,121	0,120	0,122	0,126	0,124	0,161
medián bez úpravy	0,126	0,123	0,121	0,118	0,119	0,122	0,120	0,120	0,122	0,128	0,124	0,161
směrodatná odchylka	0,0019	0,0053	0,0050	0,0053	0,0043	0,0123	0,0063	0,0024	0,0047	0,0090	0,0103	0,0065

#### 5) *Arcobacter lanthieri* LMG 28517

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,123	0,120	0,125	0,123	0,123	0,123	0,120	0,122	0,117	0,123	0,118	0,134
medián bez úpravy	0,120	0,120	0,125	0,123	0,123	0,123	0,120	0,121	0,117	0,123	0,118	0,133
směrodatná odchylka	0,0056	0,0022	0,0055	0,0044	0,0056	0,0070	0,0066	0,0038	0,0049	0,0050	0,0043	0,0070

6) *Arcobacter thereius* LMG 24488

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,125	0,113	0,117	0,118	0,118	0,119	0,119	0,119	0,116	0,118	0,119	0,141
medián bez úpravy	0,123	0,113	0,117	0,118	0,118	0,120	0,119	0,119	0,116	0,118	0,119	0,140
směrodatná odchylka	0,0058	0,0021	0,0025	0,0036	0,0019	0,0038	0,0029	0,0033	0,0047	0,0025	0,0028	0,0081

7) *Escherichia coli* CCM 3954

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,145	0,142	0,148	0,143	0,144	0,144	0,141	0,157	0,147	0,141	0,155	0,174
medián bez úpravy	0,149	0,141	0,147	0,143	0,143	0,145	0,143	0,147	0,154	0,141	0,151	0,171
směrodatná odchylka	0,0138	0,0065	0,0119	0,0120	0,0122	0,0131	0,0117	0,0167	0,0202	0,0132	0,0124	0,0144

8) *Staphylococcus aureus* CCM 4223

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,201	0,150	0,155	0,155	0,153	0,145	0,159	0,157	0,167	0,181	0,461	0,149
medián bez úpravy	0,194	0,150	0,153	0,155	0,153	0,156	0,155	0,157	0,167	0,180	0,439	0,151
směrodatná odchylka	0,0292	0,0053	0,0142	0,0198	0,0065	0,0112	0,0089	0,0081	0,0090	0,0162	0,0749	0,0067

**Extrakt z oleje Kyosos:**

1) *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,136	0,128	0,130	0,131	0,132	0,133	0,132	0,126	0,127	0,124	0,128	0,145
medián bez úpravy	0,136	0,129	0,131	0,131	0,132	0,133	0,130	0,126	0,127	0,124	0,128	0,144
směrodatná odchylka	0,0047	0,0036	0,0020	0,0026	0,0038	0,0047	0,0072	0,0071	0,0037	0,0040	0,0041	0,0060

2) *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,63	11,3	23	45	90
medián	0,206	0,188	0,189	0,177	0,178	0,181	0,167	0,171	0,157	0,152	0,147	0,138
medián bez úpravy	0,206	0,188	0,189	0,181	0,180	0,180	0,169	0,171	0,158	0,161	0,156	0,136
směrodatná odchylka	0,0357	0,0215	0,0207	0,0270	0,0121	0,0196	0,0123	0,0170	0,0161	0,0222	0,0253	0,0056

3) *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,117	0,117	0,120	0,115	0,119	0,118	0,116	0,115	0,118	0,115	0,115	0,130
medián bez úpravy	0,117	0,117	0,120	0,116	0,119	0,117	0,117	0,115	0,114	0,115	0,113	0,130
směrodatná odchylka	0,0039	0,0042	0,0041	0,0040	0,0025	0,0067	0,0058	0,0024	0,0046	0,0023	0,0030	0,0097



4) *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,63	11,3	23	45	90
medián	0,128	0,123	0,123	0,124	0,125	0,124	0,123	0,123	0,122	0,120	0,122	0,159
medián bez úpravy	0,125	0,123	0,123	0,122	0,126	0,124	0,123	0,123	0,119	0,118	0,122	0,159
směrodatná odchylka	0,0093	0,0059	0,0111	0,0075	0,0066	0,0051	0,0028	0,0042	0,0070	0,0050	0,0068	0,0098

5) *Arcobacter lanthieri* LMG

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,117	0,115	0,109	0,120	0,118	0,117	0,114	0,119	0,115	0,118	0,116	0,132
medián bez úpravy	0,117	0,115	0,109	0,120	0,118	0,117	0,114	0,119	0,115	0,117	0,116	0,132
směrodatná odchylka	0,0012	0,0032	0,0026	0,0032	0,0026	0,0036	0,0028	0,0026	0,0019	0,0017	0,0041	0,0021

6) *Arcobacter thereius* LMG 24488

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,120	0,120	0,125	0,121	0,123	0,124	0,128	0,121	0,123	0,118	0,114	0,132
medián bez úpravy	0,121	0,120	0,124	0,128	0,125	0,125	0,128	0,121	0,123	0,120	0,114	0,135
směrodatná odchylka	0,0032	0,0039	0,0043	0,0052	0,0044	0,0055	0,0027	0,0070	0,0051	0,0052	0,0041	0,0077

7) *Escherichia coli* CCM 3954

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,116	0,119	0,119	0,124	0,120	0,120	0,121	0,119	0,116	0,114	0,116	0,158
medián bez úpravy	0,118	0,119	0,119	0,122	0,120	0,120	0,122	0,119	0,118	0,115	0,117	0,157
směrodatná odchylka	0,0052	0,0022	0,0048	0,0096	0,0028	0,0034	0,0034	0,0036	0,0054	0,0043	0,0055	0,0090

8) *Staphylococcus aureus* CCM 4223

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,35	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,352	0,416	0,374	0,407	0,423	0,368	0,322	0,304	0,250	0,396	0,486	0,137
medián bez úpravy	0,358	0,421	0,377	0,407	0,476	0,396	0,343	0,374	0,307	0,396	0,486	0,137
směrodatná odchylka	0,0422	0,0609	0,0591	0,0405	0,0771	0,0883	0,0726	0,0722	0,0720	0,0550	0,0888	0,0199

**Extrakt z oleje Ondoliva:**

1) *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,130	0,317	0,280	0,248	0,229	0,203	0,191	0,154	0,148	0,129	0,125	0,174
medián bez úpravy	0,132	0,319	0,288	0,258	0,233	0,204	0,183	0,163	0,148	0,136	0,128	0,180
směrodatná odchylka	0,0091	0,0144	0,0205	0,0228	0,0145	0,0112	0,0182	0,0181	0,0122	0,0181	0,0152	0,0198

2) *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,152	0,278	0,251	0,229	0,210	0,184	0,177	0,157	0,150	0,142	0,143	0,145
medián bez úpravy	0,152	0,278	0,252	0,230	0,227	0,193	0,172	0,185	0,151	0,150	0,147	0,145
směrodatná odchylka	0,0078	0,0132	0,0110	0,0305	0,0214	0,0134	0,0132	0,0230	0,0101	0,0154	0,0098	0,0090

3) *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,119	0,129	0,128	0,127	0,123	0,121	0,121	0,118	0,117	0,117	0,118	0,148
medián bez úpravy	0,119	0,127	0,128	0,127	0,123	0,121	0,121	0,118	0,117	0,117	0,118	0,149
směrodatná odchylka	0,0027	0,0048	0,0055	0,0070	0,0031	0,0021	0,0030	0,0022	0,0034	0,0046	0,0042	0,0099

4) *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,119	0,121	0,121	0,118	0,120	0,122	0,124	0,122	0,121	0,120	0,117	0,140
medián bez úpravy	0,119	0,121	0,123	0,118	0,120	0,122	0,124	0,122	0,121	0,121	0,117	0,140
směrodatná odchylka	0,0027	0,0038	0,0050	0,0042	0,0032	0,0039	0,0035	0,0040	0,0030	0,0050	0,0045	0,0059

5) *Arcobacter lanthieri* LMG 28517

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,117	0,161	0,163	0,154	0,149	0,150	0,211	0,211	0,207	0,218	0,219	0,145
medián bez úpravy	0,117	0,162	0,166	0,157	0,150	0,150	0,211	0,206	0,205	0,225	0,224	0,148
směrodatná odchylka	0,0038	0,0072	0,0215	0,0168	0,0211	0,0064	0,0267	0,0226	0,0085	0,0184	0,0091	0,0130

6) *Arcobacter thereius* LMG 24488

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,113	0,113	0,115	0,114	0,116	0,120	0,121	0,127	0,119	0,122	0,119	0,138
medián bez úpravy	0,113	0,114	0,115	0,118	0,120	0,125	0,126	0,130	0,120	0,122	0,121	0,138
směrodatná odchylka	0,0032	0,0057	0,0148	0,0110	0,0110	0,0110	0,0116	0,0106	0,0066	0,0030	0,0087	0,0108

7) *Escherichia coli* CCM 3954

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,161	0,177	0,164	0,164	0,160	0,153	0,145	0,154	0,146	0,165	0,175	0,194
medián bez úpravy	0,164	0,175	0,164	0,164	0,161	0,155	0,145	0,154	0,146	0,161	0,167	0,205
směrodatná odchylka	0,0122	0,0109	0,0181	0,0155	0,0148	0,0088	0,0069	0,0121	0,0141	0,0122	0,0188	0,0490

8) *Staphylococcus aureus* CCM 4223

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,299	0,220	0,159	0,172	0,146	0,152	0,162	0,147	0,151	0,212	0,391	0,142
medián bez úpravy	0,267	0,203	0,209	0,195	0,149	0,152	0,158	0,145	0,151	0,195	0,385	0,144
směrodatná odchylka	0,0703	0,0354	0,0505	0,0206	0,0172	0,0236	0,0131	0,0140	0,0089	0,0342	0,0266	0,0427

## Extrakt z oleje Borges:

### 1) *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,155	0,150	0,155	0,153	0,164	0,158	0,155	0,156	0,156	0,156	0,157	0,190
medián bez úpravy	0,155	0,150	0,156	0,153	0,164	0,158	0,155	0,156	0,156	0,158	0,155	0,196
směrodatná odchylka	0,0056	0,0029	0,0054	0,0030	0,0059	0,0075	0,0064	0,0067	0,0072	0,0099	0,0048	0,0314

### 2) *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,258	0,249	0,256	0,258	0,273	0,258	0,258	0,272	0,300	0,317	0,341	0,220
medián bez úpravy	0,262	0,253	0,259	0,260	0,273	0,258	0,254	0,277	0,293	0,301	0,318	0,220
směrodatná odchylka	0,0252	0,0152	0,0213	0,0154	0,0135	0,0249	0,0306	0,0277	0,0193	0,0282	0,0423	0,0454

### 3) *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,170	0,171	0,175	0,179	0,182	0,178	0,179	0,185	0,177	0,171	0,164	0,184
medián bez úpravy	0,170	0,171	0,175	0,179	0,182	0,179	0,180	0,184	0,177	0,171	0,164	0,184
směrodatná odchylka	0,0051	0,0032	0,0053	0,0030	0,0068	0,0084	0,0048	0,0089	0,0029	0,0049	0,0043	0,0073

### 4) *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,179	0,189	0,198	0,207	0,190	0,177	0,174	0,181	0,179	0,173	0,155	0,190
medián bez úpravy	0,179	0,193	0,198	0,207	0,188	0,181	0,187	0,185	0,181	0,173	0,154	0,190
směrodatná odchylka	0,0067	0,0313	0,0095	0,0144	0,0111	0,0095	0,0114	0,0067	0,0093	0,0082	0,0052	0,0140

### 5) *Arcobacter lanthieri* LMG 28517

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,116	0,118	0,125	0,127	0,126	0,118	0,122	0,117	0,118	0,117	0,115	0,139
medián bez úpravy	0,116	0,118	0,125	0,127	0,126	0,118	0,122	0,116	0,117	0,116	0,115	0,153
směrodatná odchylka	0,0057	0,0054	0,0038	0,0035	0,0064	0,0048	0,0044	0,0038	0,0021	0,0054	0,0028	0,0739

### 6) *Arcobacter thereius* LMG 24488

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,117	0,116	0,118	0,115	0,114	0,114	0,112	0,112	0,112	0,108	0,113	0,135
medián bez úpravy	0,113	0,117	0,118	0,115	0,114	0,114	0,113	0,112	0,112	0,108	0,113	0,148
směrodatná odchylka	0,0060	0,0042	0,0022	0,0020	0,0019	0,0029	0,0033	0,0016	0,0050	0,0021	0,0015	0,0378

7) *Escherichia coli* CCM 3954

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,162	0,169	0,157	0,158	0,171	0,159	0,165	0,152	0,133	0,141	0,138	0,265
medián bez úpravy	0,162	0,166	0,156	0,158	0,166	0,159	0,164	0,152	0,133	0,140	0,138	0,248
směrodatná odchylka	0,0095	0,0090	0,0092	0,0138	0,0162	0,0159	0,0191	0,0119	0,0107	0,0076	0,0092	0,0254

8) *Staphylococcus aureus* CCM 4223

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,559	0,681	0,683	0,750	0,702	0,693	0,714	0,694	0,583	0,633	0,825	0,150
medián bez úpravy	0,559	0,681	0,686	0,778	0,702	0,693	0,699	0,685	0,604	0,674	0,812	0,153
směrodatná odchylka	0,0589	0,0617	0,0444	0,1205	0,0508	0,1099	0,0739	0,1399	0,0769	0,1273	0,1031	0,0124

**Extrakt z oleje z pokrutin:**

1) *Arcobacter butzleri* CCUG 30484

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,119	0,114	0,121	0,122	0,119	0,113	0,117	0,114	0,115	0,118	0,119	0,155
medián bez úpravy	0,119	0,114	0,122	0,122	0,119	0,116	0,117	0,114	0,115	0,118	0,119	0,155
směrodatná odchylka	0,0057	0,0112	0,0049	0,0034	0,0036	0,0050	0,0048	0,0035	0,0030	0,0045	0,0041	0,0187

2) *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,127	0,126	0,129	0,125	0,128	0,129	0,127	0,120	0,123	0,127	0,133	0,166
medián bez úpravy	0,127	0,126	0,128	0,125	0,129	0,129	0,127	0,123	0,124	0,123	0,133	0,177
směrodatná odchylka	0,0034	0,0037	0,0044	0,0070	0,0085	0,0043	0,0054	0,0057	0,0050	0,0059	0,0075	0,0205

3) *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,135	0,114	0,118	0,122	0,127	0,137	0,125	0,139	0,134	0,133	0,133	0,220
medián bez úpravy	0,137	0,114	0,118	0,122	0,128	0,137	0,127	0,138	0,139	0,133	0,135	0,230
směrodatná odchylka	0,0078	0,0041	0,0054	0,0028	0,0067	0,0082	0,0078	0,0083	0,0153	0,0106	0,0101	0,0375

4) *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2013/13

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,122	0,128	0,124	0,126	0,129	0,125	0,114	0,116	0,120	0,118	0,116	0,145
medián bez úpravy	0,122	0,128	0,122	0,124	0,127	0,125	0,115	0,117	0,121	0,119	0,118	0,144
směrodatná odchylka	0,0060	0,0047	0,0043	0,0052	0,0064	0,0038	0,0060	0,0043	0,0032	0,0050	0,0057	0,0093

5) *Arcobacter lanthieri* LMG 28517

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,117	0,124	0,125	0,126	0,127	0,122	0,125	0,121	0,120	0,119	0,123	0,134
medián bez úpravy	0,117	0,124	0,125	0,126	0,127	0,122	0,125	0,123	0,120	0,119	0,123	0,138
směrodatná odchylka	0,0030	0,0060	0,0057	0,0026	0,0061	0,0058	0,0059	0,0044	0,0061	0,0029	0,0053	0,0361

6) *Arcobacter thereius* LMG 24488

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,122	0,119	0,118	0,124	0,127	0,127	0,124	0,124	0,121	0,119	0,113	0,135
medián bez úpravy	0,123	0,119	0,118	0,124	0,127	0,129	0,125	0,124	0,121	0,120	0,114	0,137
směrodatná odchylka	0,0068	0,0036	0,0029	0,0030	0,0032	0,0062	0,0050	0,0048	0,0045	0,0038	0,0048	0,0071

7) *Escherichia coli* CCM 3954

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,141	0,139	0,140	0,124	0,125	0,122	0,125	0,125	0,125	0,120	0,127	0,231
medián bez úpravy	0,141	0,138	0,137	0,130	0,127	0,126	0,127	0,128	0,126	0,120	0,127	0,232
směrodatná odchylka	0,0055	0,0078	0,0134	0,0208	0,0073	0,0095	0,0071	0,0169	0,0075	0,0060	0,0059	0,0211

8) *Staphylococcus aureus* CCM 4223

koncentrace (%)	0	0,088	0,176	0,352	0,703	1,406	2,813	5,625	11,25	22,5	45	90
medián	0,307	0,255	0,259	0,273	0,280	0,254	0,244	0,235	0,276	0,380	0,452	0,134
medián bez úpravy	0,310	0,210	0,259	0,273	0,301	0,214	0,244	0,235	0,280	0,376	0,490	0,140
směrodatná odchylka	0,0444	0,0401	0,0634	0,0649	0,0542	0,0435	0,0280	0,0377	0,0236	0,0639	0,0824	0,0294