

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja BEZEK

**PREPREČEVANJE FILMOTVORNOSTI BAKTERIJ
Campylobacter jejuni NA ABIOTSKIH POVRŠINAH
TER ADHEZIVNOSTI IN INVAZIVNOSTI NA
MODELU CELIČNIH LINIJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja BEZEK

**PREPREČEVANJE FILMOTVORNOSTI BAKTERIJ *Campylobacter*
jejuni NA ABIOTSKIH POVRŠINAH TER ADHEZIVNOSTI IN
INVAZIVNOSTI NA MODELU CELIČNIH LINIJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CONTROL OF BIOFILM FORMING ABILITY OF *Campylobacter*
jejuni ON ABIOTIC SURFACES AND ADHESION AND
INVASIVENESS IN CELL LINES MODEL**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

"Do not go where the path may lead, go instead where there is no path and leave a trail."

(Ralph Waldo Emerson)

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani in po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepu senata Univerze z dne, 9. 12. 2014, je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Raspor, za somentorico pa prof. dr. Sonja Smole Možina.

Doktorska disertacija je bila opravljena na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, na Inštitutu za higieno ter za tehnologijo mleka in živilstvo Veterinarske univerze na Dunaju in na Fakulteti za vede o zdravju Univerze na Primorskem ob finančni podpori Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in šport Republike Slovenije (št. 352593-1/2012).

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Katja SEME
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Bezek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 579.61:616-092:579.67(043.3)
KG	<i>Campylobacter jejuni</i> / filmotvornost / odpornost proti antibiotikom / genotipizacija / PFGE / MLST / naravne protimikrobne učinkovine / <i>Euodia ruticarpa</i> / evokarpin / humane črevesne epitelne celice E12 / mukus / bakteriofag PC5
AV	BEZEK, Katja, univ. dipl. mikr.
SA	RASPOR, Peter (mentor) / SMOLE MOŽINA, Sonja (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologije
LI	2016
IN	PREPREČEVANJE FILMOTVORNOSTI BAKTERIJ <i>Campylobacter jejuni</i> NA ABIOTSKIH POVRŠINAH TER ADHEZIVNOSTI IN INVAZIVNOSTI NA MODELU CELIČNIH LINIJ
TD	Doktorska disertacija
OP	XVI, 96, [3] str., 15 pregl., 25 sl., 1 pril., 197 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Sposobnost adhezije in tvorbe biofilma sta ena izmed ključnih dejavnikov, ki bakterijam rodu <i>Campylobacter</i> omogočajo, da so pri nas in v svetu vodilni vzrok bakterijsko povzročenih črevesnih okužb pri ljudeh. Za boljši pregled nad sposobnostjo adhezije in tvorbe biofilma bakterij <i>C. jejuni</i> smo na naboru 130 sevov skušali najti povezavo med filmotvornostjo na površini polistirena in lastnostmi, kot so izvor seva, odpornost proti antibiotikom ter genotip na podlagi tipizacij MLST in PFGE. Kljub veliki feno- in genotipski raznolikosti med sevi, so se izolati iz fecesa perutnine umestili v skupino z najvišjo stopnjo filmotvornosti. V nadaljevanju smo s kolorimetrično in gojitveno metodo določili, kakšen vpliv ima obdelava oziroma hrapavosti površine nerjavnega jekla tipov 304 in 316L, na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> . Kljub veliki dinamiki glede na sev, čas inkubacije in prisotnost kisika, je bila filmotvornost najnižja na krtačeni površini obeh tipov nerjavnega jekla. Problematika filmotvornosti bakterij <i>C. jejuni</i> ter pojav in širjenje odpornosti na obstoječa protimikrobnna sredstva je pred nas postavila izziv po iskanju novih aktivnih učinkovin, rastlinskega izvora. Preverili smo protimikrobní učinek izvlečka plodov <i>Euodia ruticarpa</i> (EREE) in posameznih frakcij izvlečka (frakcija Q, evodiamin, rutekarpin) ter njihov vpliv na preprečevanje filmotvornosti referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in njegovih mutantov <i>cmeB</i> ter <i>luxS</i> , na površini nerjavnega jekla. Vpliv testiranih učinkovin smo spremljali tudi na nivoju prisotnosti signalnih molekul AI-2. Na podlagi rezultatov preprečevanja filmotvornosti na abiotski površini nerjavnega jekla, smo učinek izvlečka in evokarpina, ki je bil v največjem deležu zastopan v frakciji Q, preizkusili še na biotski površini modela humanih črevesnih epitelnih celic E12. Vpliva izvlečka ali evokarpina na adhezivnost in invazivnost sevov <i>C. jejuni</i> iz naše živilske oskrbovalne verige, na izbranem celičnem modelu, nismo mogli potrditi. Gre namreč za kompleksen sistem ob prisotnosti mukopolisaharidov, ki lahko na <i>C. jejuni</i> delujejo kot kemoatraktanti in pa številnih receptorjev na površini epitelnih celic, ki v primerjavi z abiotsko površino, zvišajo možnost adhezije bakterij. Zato smo preizkusili še kombiniran sistem ob uporabi izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5. Čeprav dodatek izvlečka ali evokarpina ali bakteriofaga samega, na število bakterij <i>C. jejuni</i> 660/08 ni imel zaznavnega vpliva, je kombinacija posamezne učinkovine z bakteriofagom vplivala na zmanjšanje števila invadiranih bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579.61:616-092:579.67(043.3)
CX *Campylobacter jejuni* / adhesion and biofilm formation / antibiotic resistance / genotyping / PFGE / MLST / natural antimicrobials / *Euodia ruticarpa* / evocarpine / human intestinal epithelial cells E12 / mucus / PC5 bacteriophage
AU BEZEK, Katja
AA RASPOR, Peter (supervisor) / SMOLE MOŽINA, Sonja (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field Biotechnology
PY 2016
TI CONTROL OF BIOFILM FORMING ABILITY OF *Campylobacter jejuni* ON ABIOTIC SURFACES AND ADHESION AND INVASIVENESS IN CELL LINES MODEL
DT Doctoral Dissertation
NO XVI, 96, [3] p., 15 tab., 25 fig., 1 ann., 197 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The adhesion and biofilm formation ability are certainly one of the key factors enabling *Campylobacter* spp. to be a leading cause of gastrointestinal infections in humans worldwide. For a deeper insight of *C. jejuni* adhesion and biofilm formation phenomenon, we performed pheno- and genotyping of 130 strains. We tried to find a connection between adhesion and biofilm formation ability to polystyrene and characteristics, such as source of isolation, antibiotic resistance and MLST, as well as PFGE types. Based on our results, the *C. jejuni* strains with the highest biofilm forming ability were found among poultry faeces isolates. Further on we examined the impact of the surface roughness of stainless steel types 304 and 316L on *C. jejuni* adhesion and biofilm formation. Despite the great dynamics of biofilm formation depending on the strain, incubation time and atmospheric oxygen, the lowest level of adhesion and biofilm formation was observed on a brushed surface. The problem of *C. jejuni* adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces and its growing resistance to existing antimicrobial agents, presents a challenge to us to find new active compounds of plant origin. During our experimental work, we tested the antiadhesion and antibiofilm effect of *Euodia ruticarpa* fruit extract (EREE) and its fractions (fraction Q, evodiamine, rutaecarpine) on biofilm formation of *C. jejuni* NCTC 11168 reference strain and its *cmeB* in *luxS* mutants. Because the linkage between biofilm formation and quorum sensing, we measured the concentration of AI-2 signalling molecules as well. Based on the effective reduction of biofilm formation on stainless steel surface, we tested the anti-adhesive and anti-invasive activity of the extract and evocarpine on *C. jejuni* food chain isolates, on the E12 human intestinal epithelial line model. Subinhibitory concentrations did not yield significant reduction of overall adhered or invaded bacteria of the tested strains. Namely, the presence of mucopolysaccharides, which can act as a chemoattractants for *C. jejuni* and the presence of receptors on epithelial cells surface can influence the higher adherence in comparison with abiotic surfaces. We therefore decided to test the novel combined system of simultaneous treatment with the extract or evocarpine and PC5 bacteriophage. Although treatment with compounds or bacteriophage alone did not have significant impact on the adhesion or invasion of *C. jejuni* 660/08 strain, the combined effect of both bacteriophage and EREE or evocarpine was shown in the significant reduction of the number of invaded bacteria on the E12 cell line.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIV
KRATICE IN OKRAJŠAVE	XV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Campylobacter</i>	3
2.1.1 Patogeneza in virulentni dejavniki	5
2.2 SPOSOBNOST TVORBE BIOFILMA	6
2.2.1 Medcelična komunikacija	7
2.2.1.1 Medcelična komunikacija pri <i>C. jejuni</i>	8
2.2.2 Filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i>	8
2.2.3 Pregled metod za proučevanje biofilma na abiotskih kontaktnih površinah	10
2.2.3.1 Nerjavno jeklo kot abiotska kontaktna površina	11
2.2.4 Model celičnih linij kot biotska kontaktna površina za <i>C. jejuni</i>	11
2.2.4.1 Test adhezivnosti in invazivnosti na modelu celičnih linij	12
2.3 PREPREČEVANJE FILMOTVORNOSTI	13
2.3.1 Odpornost znotraj mikrobnega biofilma	13
2.3.2 Protimikrobne učinkovine naravnega izvora	14
2.3.3 Rastlinski izvlečki	15
2.3.3.1 <i>Euodia ruitcarpa</i>	17
2.3.4 Bakteriofagi kot možnost nadzora bakterij <i>C. jejuni</i>	18
2.3.4.1 Bakteriofag PC5	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 POTEK DELA	19
3.1.1 Tipizacija bakterij <i>C. jejuni</i>	19

3.1.2 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na površini nerjavnega jekla in na prisotnost signalnih molekul AI-2	20
3.1.3 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> ter bakteriofaga PC5 na adhezivnost in invazivnost <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	21
3.2 MATERIALI	22
3.2.1 Delovni mikroorganizmi	22
3.2.2 Izvleček plodov <i>E. ruitcarpa</i>	24
3.2.2.1 Priprava in fitokemijska analiza izvlečka	24
3.2.3 Nerjavno jeklo kot abiotska kontaktna površina	25
3.2.4 Celični liniji HT-29 in E12	26
3.2.5 Bakteriofag PC5	26
3.2.6 Mediji za delo z bakterijami	27
3.2.7 Reagenti in raztopine za delo z bakterijami	28
3.2.7.1 Reagenti in raztopine za delo z bakterijami	28
3.2.7.2 Reagenti in kiti za ugotavljanje živosti bakterij	28
3.2.7.3 Reagenti in raztopine za tipizacijo bakterij <i>C. jejuni</i> z MLST	29
3.2.7.4 Reagenti in raztopine za tipizacijo bakterij <i>C. jejuni</i> s PFGE	30
3.2.7.5 Mediji in raztopine za delo z bakteriofagom PC5	31
3.2.8 Mediji in raztopine za delo s celičnimi kulturami	31
3.2.9 Laboratorijski material in oprema	32
3.3 METODE DELA	34
3.3.1 Priprava delovnih kultur bakterij <i>C. jejuni</i>	34
3.3.2 Tipizacija bakterij <i>C. jejuni</i>	34
3.3.2.1 Filmotvornost na površini polistirena	35
3.3.2.2 Določanje odpornosti proti antibiotikom z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču	35
3.3.2.3 Tipizacija MLST	36
3.3.2.4 Tipizacija PFGE	37
3.3.3 Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i>	38
3.3.3.1 Določanje filmotvornosti s kolorimetrično metodo	38
3.3.3.2 Določanje filmotvornosti z gojitveno metodo	39
3.3.4 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> in posameznih frakcij na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na površini nerjavnega jekla	40
3.3.4.1 Protimikroben delovanje izvlečka na referenčni sev <i>C. jejuni</i> in njegova mutanta <i>cmeB</i> in <i>luxS</i>	40
3.3.4.2 Vpliv izvlečka na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na neobdelani površini nerjavnega jekla	41
3.3.4.3 Vpliv izvlečka na prisotnost signalnih molekul AI-2	41

3.3.5 Vpliv izvlečka <i>E. rutilarpa</i> in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	42
3.3.5.1 Osnovne metode dela s celičnimi kulturami	42
3.3.5.2 Določanje prisotnosti mukusa	43
3.3.5.3 Citotoksičnost izvlečka in evokarpina za celice E12	43
3.3.5.4 Protimikrobnno delovanje izvlečka in evokarpina na izolate bakterij <i>C. jejuni</i>	44
3.3.5.5 Priprava celičnih kultur pred nanosom bakterij <i>C. jejuni</i>	44
3.3.5.6 Vpliv izvlečka in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	44
3.3.6 Kombiniran vpliv izvlečka <i>E. rutilarpa</i> ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	45
3.3.6.1 Vpliv bakteriofaga PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> 660/08 na modelu celične linije E12	45
3.3.6.2 Fagocitnost izvlečka in evokarpina na bakteriofag PC5	46
3.3.6.3 Kombiniran vpliv izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> 660/08 na modelu celične linije E12	46
3.3.7 Statistično vrednotenje rezultatov	47
4 REZULTATI	48
4.1 TIPIZACIJA BAKTERIJ <i>C. jejuni</i>	48
4.1.1 Filmotvornost na površini polistirena	48
4.1.2 Odpornost proti antibiotikom	49
4.1.3 Tipizacija MLST	49
4.1.4 Tipizacija PFGE	50
4.1.5 Povezava med filmotvornostjo sevov <i>C. jejuni</i> in ostalimi lastnostmi	52
4.2 FILMOTVORNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA RAZLIČNO OBDELANI POVRŠINI NERJAVNEGA JEKLA	53
4.2.1 Vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i>, določen z metodo barvanja s kristal vijoličnim	53
4.2.1.1 Filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na različno obdelani površini nerjavnega jekla pri mikroaerofilnih pogojih	53
4.2.1.2 Filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na različno obdelani površini nerjavnega jekla pri aerobnih pogojih	55
4.2.2 Vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i>, določen z gojitveno metodo	56

4.3 VPLIV IZVLEČKA <i>E. ruitcarpa</i> NA FILMOTVORNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA POVRŠINI NERJAVNEGA JEKLA TER NA PRISOTNOST SIGNALNIH MOLEKUL	58
4.3.1 Protimikrobeno delovanje izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> in posameznih frakcij na referenčni sev <i>C. jejuni</i> in njegova mutanta <i>cmeB</i> in <i>luxS</i>	58
4.3.2 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> in posameznih frakcij na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na površini nerjavnega jekla	58
4.3.2.1 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> in posameznih frakcij na prisotnost signalnih molekul AI-2	61
4.4 VPLIV IZVLEČKA <i>E. ruitcarpa</i> IN EVOKARPINA NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA MODELU CELIČNE LINIJE E12	62
4.4.1 Model celične linije E12	62
4.4.1.1 Vizualizacija prisotnosti mukusa	63
4.4.1.2 Citotoksičnost izvlečka in evokarpina na celice E12	63
4.4.1.3 Fagocitnost EREE in evokarpina na bakteriofag PC5	64
4.4.2 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	65
4.4.2.1 Protimikrobeno delovanje izvlečka in evokarpina na izolate bakterij <i>C. jejuni</i>	65
4.4.2.2 Vpliv izvlečka in evokarpina na adhezivnost ter invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	66
4.5 KOMBINIRAN VPLIV IZVLEČKA <i>E. ruitcarpa</i> ALI EVOKARPINA Z BAKTERIOFAGOM PC5 NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> 660/08 NA MODELU CELIČNE LINIJE E12	67
4.5.1 Vpliv bakteriofaga PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> 660/08 na modelu celične linije E12	67
4.5.2 Kombiniran vpliv izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> 660/08 na modelu celične linije E12	68
5 RAZPRAVA	69
5.1 FILMOTVORNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA POLISTIRENU V POVEZAVI Z OSTALIMI LASTNOSTMI	70
5.2 FILMOTVORNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA POVRŠINI NERJAVNEGA JEKLA	71
5.2.1 Vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i>	72
5.2.2 Vpliv prisotnosti kisika na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na površini nerjavnega jekla	72

5.3 VPLIV IZVLEČKA <i>E. ruitcarpa</i> NA FILMOTVORNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA ABIOTSKI IN BIOTSKI POVRŠINI	73
5.3.1 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> na filmotvornost bakterij <i>C. jejuni</i> na površini nerjavnega jekla	74
5.3.2 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> na prisotnost signalnih molekul AI-2	75
5.3.3 Vpliv izvlečka <i>E. ruitcarpa</i> in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12	75
5.4 KOMBINIRAN VPLIV IZVLEČKA ALI EVOKARPINA Z BAKTERIOFAGOM PC5 NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA MODELU CELIČNE LINIJE E12	77
6 SKLEPI	78
7 POVZETEK (SUMMARY)	79
7.1 POVZETEK	79
7.2 SUMMARY	80
8 VIRI	82
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled učinkovin rastlinskega izvora, ki so se pokazale za uspešne pri preprečevanju filmotvornosti na abiotskih površinah, preprečevanju adhezivnosti in/ali invazivnost na modelu celičnih linij in kot motilci zaznavanja celične gostote pri bakterijah <i>Campylobacter</i>	16
Preglednica 2: Sevi <i>C. jejuni</i> , uporabljeni pri raziskovalnem delu	23
Preglednica 3: Vsebnost posameznih frakcij (mg/g) izvlečka plodov <i>E. ruticarpa</i> (EREE)	25
Preglednica 4: Trdni in tekoči mediji, uporabljeni za delo z bakterijami	27
Preglednica 5: Reagenti in raztopine, uporabljeni za delo z bakterijami	28
Preglednica 6: Reagenti in kiti za ugotavljanje živosti bakterij	28
Preglednica 7: Reagenti in raztopine za tipizacijo <i>C. jejuni</i> z MLST	29
Preglednica 8: Reagenti in raztopine za tipizacijo bakterij <i>C. jejuni</i> s PFGE	30
Preglednica 9: Mediji in raztopine, uporabljeni za delo z bakteriofagom PC5	31
Preglednica 10: Mediji, raztopine in reagenti uporabljeni za delo s celičnimi kulturami	31
Preglednica 11: V poskusih uporabljen laboratorijski material	32
Preglednica 12: Laboratorijska oprema uporabljena pri izvedbi eksperimentalnega dela	33
Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za tipizacijo MLST	36
Preglednica 14: Program pomnoževanja specifičnih odsekov DNK za tipizacijo MLST	36
Preglednica 15: Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) za izvleček <i>E. ruticarpa</i> (EREE) in posamezne frakcije, določene z metodo mikrodilucije za sev <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 ter mutanta <i>cmeB</i> in <i>luxS</i>	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Slika celic bakterij <i>C. jejuni</i> , pod transmisijskim elektronским mikroskopom (Cullen in Trent, 2010).	3
Slika 2: Primarni vir okužbe, poti prenosa in klinični znaki okužbe z bakterijami rodu <i>Campylobacter</i> (Kaakoush in sod., 2015).	4
Slika 3: Model razvoja biofilma po stopnjah (Cogan in Keener, 2004).	6
Slika 4: Kemijske strukture alkaloidov izvlečka <i>E. rutilarpa</i> (Liu in sod., 2005).	17
Slika 5: Shema določanja feno- in genotipskih lastnosti sevov <i>C. jejuni</i> .	19
Slika 6: Shema določanja vpliva različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost ter določanje vpliva izvlečka <i>E. rutilarpa</i> in posameznih frakcij (frakcija Q, evodiamin, rutekarpin) na filmotvornost in na prisotnost signalnih molekul AI-2 pri bakterijah <i>C. jejuni</i>	20
Slika 7: Shema določanja vpliva izvlečka <i>E. rutilarpa</i> (ERE) in evokarpina ter kombiniran učinek vsake izmed testiranih učinkovin z bakteriofagom PC5 na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij <i>C. jejuni</i> na modelu celične linije E12.	21
Slika 8: Hrapavost (Rq) štirih različno obdelanih površin nerjavnega jekla; neobdelana (3C), polirana (3D), krtačena (KR) in elektropolirana (EL) površina (Nipič in sod., 2016).	25
Slika 9: Delež sevov <i>C. jejuni</i> , odpornih proti različnemu številu razredov antibiotikov (0 R; občutljiv na vse, 4 R; odporni proti štirim različnim razredom antibiotikov), razvrščenih glede na vir izolacije.	49
Slika 10: Najpogosteji klonski kompleksi (CC) in pripadajoči sekvenčni tipi (ST), razporejeni po deležu zastopanosti glede na vir izolacije (perutnina, človek, govedo) sevov <i>C. jejuni</i> .	50
Slika 11: Genetska raznolikost izolatov <i>C. jejuni</i> na osnovi pulzne gelske elektroforeze (PFGE).	51
Slika 12: Razsevni diagram korespondenčne analize - prikaz profilov sposobnosti filmotvornosti na polistirenu, prikazane kot adhezivni razredi in vira izolacije testiranih sevov <i>C. jejuni</i> .	52
Slika 13: Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na filmotvornost (ΔA_{620}) referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (A, B) in mutanta luxS (C, D), pri mikroaerofilnih (A, C) in aerobnih (B, D) pogojih, po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji pri temperaturi 42 °C, določen z metodo barvanja s kristal vijoličnim. Filmotvornost je bila določena na kuponih nerjavnega jekla tipov AISI 304 in AISI 316L z različno površinsko obdelavo; neobdelana (3C), polirana (3D), krtačena (KR) in elektropolirana (EL) površina.	54

Slika 14: Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na filmotvornost (Log CFU/mL) referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 (A, B) in mutanta *luxS* (C, D) in število bakterij v suspenziji (B, D), po 24- in 48-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C, določen z gojitveno metodo. Filmotvornost je bila določena na kuponih nerjavnega jekla tipov AISI 304 in AISI 316L z različno površinsko obdelavo; neobdelana (3C), polirana (3D), krtačena (KR) in elektropolirana (EL) površina. 56

Slika 15: Filmotvornost (Log CFU/ml) referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* na neobdelani površini nerjavnega jekla tipa 304, po 1-, 24-, 48- in 72-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C. 59

Slika 16: Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* (A), frakcije Q (B), evodiamina (C) in rutekarpina (D) na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* na neobdelani površini nerjavnega jekla tipa 304, po 1-, 24-, 48- in 72-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C. * p≤0,05; v primerjavi s kontrolo. 60

Slika 17: Odstotek znižanja koncentracije AI-2 v supernatantu referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *cmeB* po 48-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C, ob dodatku izvlečka *E. ruticarpa* (EREE), frakcije Q, evodiamina in rutekarpina. 61

Slika 18: Intenziteta fluorescence po inkubaciji s PrestoBlue za celični liniji E12 (A) in HT-29 (B), nasajeni v različnih koncentracijah (celic/mL) po času, kar nakazuje rast celic. 62

Slika 19: Vizualizacija prisotnosti mukusa pri celičnima linijama E12 (A) in HT-29 (B) po barvanju z barvilom Alcian modro na osmi dan inkubacije pri 40-, 100- in 200-kratni povečavi. Puščica označuje granule v katerih naj bi prišlo do tvorbe mukusa. 63

Slika 20: Preživetje celic E12 po 48-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) in evokarpinom (B), določeno na osnovi vrednosti intenzitete fluorescence po dodatku reagenta PrestoBlue, normaliziranih na pozitivno kontrolo. 64

Slika 21: Titer bakteriofaga PC5 (Log PFU/mL) po 3- in 24-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) in evokarpinom (B). 64

Slika 22: Preživetje bakterij *C. jejuni* po 24-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) in evokarpinom (B), določeno na osnovi vrednosti intenzitete fluorescence po dodatku reagenta PrestoBlue, normaliziranih na pozitivno kontrolo. 65

Slika 23: Preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12, po 3-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) ali evokarpinom (B). Rezultati so predstavljeni kot relativno število bakterij *C. jejuni* glede na kontrolo s suspenzijo bakterij brez dodanih učinkovin. 66

Slika 24: Preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12, po različnih nastavitevah poskusa. Kontrola s suspenzijo bakterij *C. jejuni* (K1); hkratna infekcija s suspenzijo bakterij *C. jejuni* in bakteriofagom PC5 (P1); dodatek bakterij po 1-urni inkubaciji celic E12 z bakteriofagom (P2); dodatek bakteriofaga po 1-urni inkubaciji celic E12 z bakterijami (P3). Rezultati so predstavljeni kot relativno število bakterij *C. jejuni*, glede na kontrolo (K1). 67

Slika 25: Preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12, po različnih nastavivah poskusa. Kontrola s suspenzijo bakterij *C. jejuni* (K1); učinek bakteriofaga PC5 samega (P1); učinek bakteriofaga PC5 in izvlečka *E. ruticarpa* (ERE) (P2); učinek bakteriofaga PC5 in evokarpina (P3). Rezultati so predstavljeni kot relativno število bakterij *C. jejuni*, glede na kontrolo (K1). *, p≤0,05, v primerjavi s kontrolo.

68

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Sevi *C. jejuni* glede na leto in izvor izolacije, klonski kompleks (CC), sekvenčni tip (MLST) in odpornost proti antibiotikom (CIP-ciprofloksacin, ER-eritromicin, NAL-nalidiksinska kislina, STR-streptomicin, TET-tetraciklin, S-občutljivi)

KRATICE IN OKRAJŠAVE

ADMEM	po Dulbeccu prilagojen Eaglov medij za gojenje celičnih kultur (<i>angl.</i> Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
AFM	mikroskopija na atomsko silo (<i>angl.</i> Atomic Force Microscopy)
AI-2	avtoinduktor tipa 2
AISI	ameriški sistem standardov za jeklo (<i>angl.</i> American Industry of Steel and Iron)
ATCC	ameriška zbirka tipskih kultur (<i>angl.</i> American Type Culture Collection)
BHI	tekoče gojišče možgansko-srčni infuzijski bujon (<i>angl.</i> Brain Heart Infusion Broth)
CC	klonski kompleks (<i>angl.</i> Clonal Complex)
CFU	število kolonijskih enot (<i>angl.</i> Colony Forming Unit)
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
ddH ₂ O	bidestilirana voda
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E12	z metotreksatom (MTX) diferencirane humane črevesne epitelne celice (HT-29-MTX-E12)
ECACC	Evropska zbirka celičnih kultur (<i>angl.</i> European Collection of Authenticated Cell Cultures)
EDTA	(2-[2-(bis(karboksimetil)amino) etil-(karboksimetil)amino] ocetna kislina)
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (<i>angl.</i> European Food Safety Authority)
EPS	zunajcelične polimerne substance (<i>angl.</i> Extracellular Polymeric Substances)
<i>E. rutilarpa</i>	<i>Euodia rutilarpa</i>
EREE	izvleček iz plodov <i>Euodia rutilarpa</i> pridobljen z etanolno ekstrakcijo
EtOH	etanol

EUCAST	Evropski odbor za preskušanje občutljivosti na protimikrobna sredstva (angl. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing)
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)
HT-29	humane črevesne epitelne celice (angl. Human colorectal epithelial cell line)
EtOH	etanol
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
MDR	večkratno odporni (angl. Multidrug Resistant)
MHA	trdno gojišče Mueller Hinton (angl. Mueller Hinton Agar)
MHB	tekoče gojišče Mueller Hinton (angl. Mueller Hinton Broth)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. Minimal Inhibitory Concentration)
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. Multilocus Sequence Typing)
NCTC	zbirka bakterij, ki jih hrani Central Public Health Laboratory, London (angl. National Collection of Type Culture)
OD	optična gostota (angl. Optical Density)
PBS	fiziološka raztopina, puferirana s fosfatnim pufrom (angl. Phosphate Buffered Saline)
PFU	število plakotvornih enot (angl. Plaque Forming Unit)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed Field Gel Electrophoresis)
SPSS	programska oprema za prediktivno analitiko (angl. Statistical Package for the Social Sciences)
ST	sekvenčni tip (angl. Sequence Type)
QS	zaznavanje celične gostote (angl. Quorum Sensing)
TSA	trdno gojišče triptični sojin agar
VBNC	žive, vendar nekultivabilne celice (angl. Viable But Not Culturable)
<i>V. harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Campylobacter jejuni je pri nas in v svetu vodilni vzrok bakterijsko povzročenih črevesnih okužb pri ljudeh (VURS, 2014; The European ..., 2015). Kampilobakterioze so v večini primerov povezane z zaužitjem temperaturno nezadostno obdelanega piščančjega mesa, surovega mleka ali vode in pa neposrednega kontakta z okuženo živaljo (Maal-Bared in sod., 2012). Kot del normalne mikrobne črevesne mikrobiote pri perutnini, domačih in divjih živalih ter posledične prilagoditve na okolje prebavnega trakta gostitelja je moral ta komenzalni mikroorganizem za obstoj in preživetje v zunanjem okolju razviti učinkovite prilagoditvene mehanizme (Humphrey in sod., 2007). Na preživetje teh mikroaerofilnih in termofilnih bakterij lahko vpliva tvorba biofilma, prehod v stanje živih, vendar nekultivabilnih celic in interakcije z ostalimi mikroorganizmi (Bronowski in sod., 2014).

Adhezija bakterij na kontaktne površine in posledična tvorba biofilma imata zaznaven vpliv na povečano odpornost bakterij v številnih kliničnih okoljih kot tudi v industriji, vključno s celotno živilsko oskrbovalno verigo. Sposobnost pritrjevanja *C. jejuni* predstavlja predpogoj za nastanek večcelične združbe, ki omogoča bakterijam večjo odpornost in preživelost v okolju, kot tudi izhodišče za nadaljnjo kolonizacijo epitelnih celic črevesa in patogenezo. Za *C. jejuni* je značilna tudi velika raznolikost med sevi, ki se odraža tako v različni pogostosti pojavljanja v naravi, kot tudi v različni virulentnosti in posledično resnosti okužbe (Hofreuter in sod., 2008).

Celostno razumevanje strukture, kot je biofilm, zahteva multidisciplinaren pristop, s povezovanjem tehnologij za proučevanje vloge zunajceličnih polimernih substanc, vpliva okoljskih dejavnikov in lastnosti površine ter sprememb mikrobne združbe na molekularnem nivoju (Karunakaran in sod., 2011). Ustreznih in zanesljivih metod, ki bi nam omogočile jasno ločitev na nivoju adhezije in tvorbe biofilma, velikokrat nimamo na voljo. Za lažjo interpretacijo poskusov in rezultatov eksperimentalnega dela v sklopu te doktorske naloge smo se odločili, da za celostno dogajanje sledimo pojmu filmotvornost. Ta izraz torej povzema dogajanje od adhezije bakterij na kontaktno površino do večcelične tvorbe, obdane z zunajceličnimi polimernimi substancami.

Glede na povzročeno zdravstveno in ekonomsko breme je v primerjavi z ostalimi, s hrano povezanimi patogenimi bakterijami, naše znanje o odnosu *C. jejuni* z gostiteljem še vedno precej omejeno (Mills in sod., 2012; O Croinin in Backert, 2012; Backert in sod., 2013). Zaradi nepoznavanja primerenega živalskega modela je za študij dejavnikov vpliva na adhezivnost in invazivnost *C. jejuni* najbližje uporaba celičnih linij *in vitro* (Mills in sod., 2012; O Croinin in Backert, 2012). Model črevesnih epitelnih celic, kot so Caco-2 celice, velja za priznanega in velikokrat uporabljenega, vendar se z napredkom raziskovalnega področja vse bolj uveljavljajo tudi ostali celični modeli (Gagnon in sod., 2013).

Razvoj v smeri odkrivanja novih mehanizmov za nadzor in preprečevanja okužb s *C. jejuni* je bil še dodatno spodbuden s pojavom in širjenjem odpornosti med sevi, kar je v veliki meri posledica neracionalne uporabe protimikrobnih sredstev in s tem povzročenega selekcijskega pritiska. Uporabna vrednost izbranih aktivnih učinkovin bi bila lahko zasnovana na protiadhezijskem delovanju, kar bi predstavljalo nov način nadzora rasti in širjenja povzročiteljev, hkrati pa tudi nov način preprečevanja in zdravljenja okužb (Tan in sod., 2013; Zaki in sod., 2013).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

Osrednja tematika doktorske naloge je sposobnost pritrjevanja oz. adhezivnosti kot prve oziroma ključne stopnje filmotvornosti bakterij *C. jejuni* na abiotiske in biotske površine ter preprečevanje le-te. Na eni strani izziv predstavlja dejstvo, da z zunajceličnim matriksom obdana mikrobna združba na abiotiski površini predstavlja dejavnik preživetja, vir kontaminacije, širjenja in okužbe z mikroorganizmi ter medij za širjenje odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam; na drugi strani pa, da sposobnost pritrjevanja patogenim bakterijam omogoča preživetje znotraj gostitelja, saj so bakterijske celice manj izpostavljene delovanju peristaltike, delovanju celic imunskega sistema in ostalim protimikrobnim dejavnikom (Romanova in Gintzburg, 2011). Gre za aktualno raziskovalno področje, k razumevanju katerega želimo prispevati s pridobljenimi znanji in sklepi.

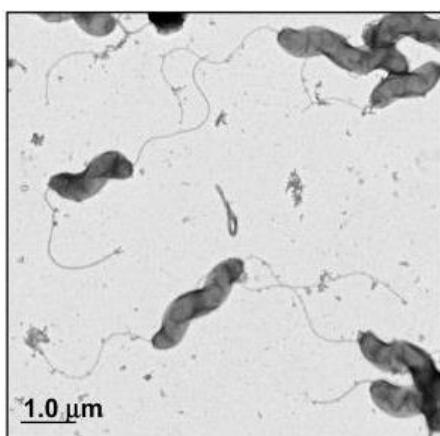
Postavili smo naslednje hipoteze:

1. Sposobnost adhezije in tvorbe biofilma je odvisna od tipa seva, opredeljenega s tipizacijo MLST in PFGE ter odpornostjo proti antibiotikom (rezistotipom);
2. Sposobnost adhezije in tvorbe biofilma bakterij *C. jejuni* na abiotskih površinah se razlikuje glede na površinsko obdelavo kontaktne površine nerjavnega jekla;
3. Izbrane učinkovine izvlečka plodov *Euodia ruticarpa* zavirajo tvorbo biofilma bakterij *C. jejuni* na abiotiski površini nerjavnega jekla;
4. Izbrane učinkovine izvlečka plodov *Euodia ruticarpa* zmanjšujejo adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* na celičnem modelu humanih črevesnih epitelnih celic;
5. Adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v celičnem modelu humanih črevesnih epitelnih celic dodatno znižuje hkratna uporaba izbrane rastlinske učinkovine in fagov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Campylobacter*

Ime rodu *Campylobacter* izhaja iz grške besede *campylo*, ki pomeni ukrivljen, in je stopilo v uporabo šele po letu 1963, čeprav sega prvi opis mikroorganizma (Theodor Escherich) že v daljno leto 1886 (Moore in sod., 2005; Silva in sod., 2011). Gre za 0,2–0,8 µm široke in 0,5–5 µm dolge, po Gramu negativne in nesporogene bakterije, z značilno spiralno obliko (Slika 1). So citokrom oksidaza pozitivni, mikraerofilni mikroorganizmi, ki najbolje rastejo v prilagojeni atmosferi s 5 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida in 85 % dušika (Humphrey in sod., 2007).

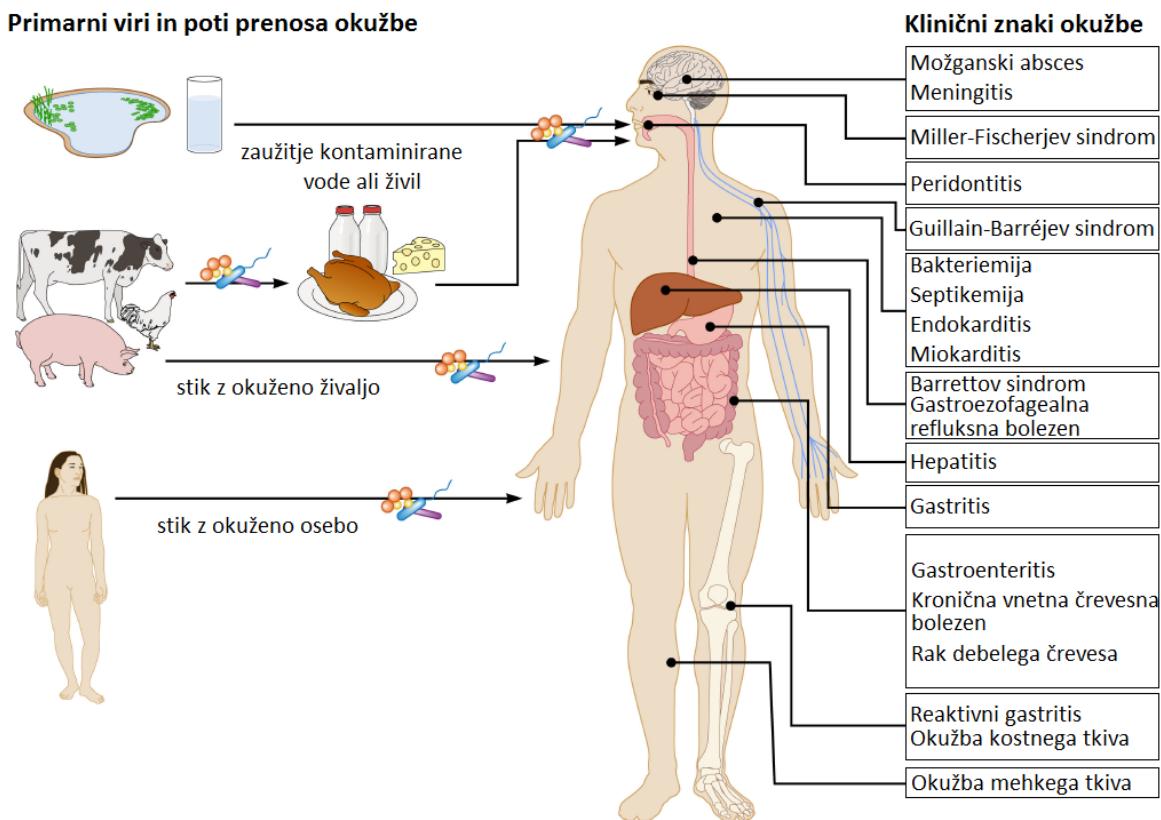


Slika 1: Slika celic bakterij *C. jejuni*, pod transmisjskim elektronским mikroskopom (Cullen in Trent, 2010).
Figure 1: *C. jejuni* cells under transmission electron microscope (Cullen and Trent, 2010).

Energije ne pridobivajo s fermentacijo ali oksidacijo ogljikovih hidratov, ampak kot vir uporabijo aminokisline ali vmesne produkte cikla trikarboksilnih kislin (Silva in sod., 2011). V za rast neugodnih razmerah preidejo v stanje živih, vendar nekultivabilnih celic (*angl. viable but nonculturable; VBNC*) (Jackson in sod., 2009). Termofilne vrste optimalno rastejo v temperturnem območju od 37 do 42 °C. Za razliko od nekaterih, s hrano povezanih povzročiteljev okužb, se *C. jejuni* pri temperaturi hladilnika ne razmnožuje, saj je minimalna temperatura rasti 30 °C (Park, 2002). Kljub temu je vrsta *C. jejuni* sposobna preživeti na surovem piščančjem mesu in koži pri 4 °C več kot 10 dni (El-Shibiny in sod., 2009a). Zaradi občutljivosti na povišane koncentracije NaCl je rast omejena z dostopnostjo vode v okolju in mora biti vodna aktivnost (a_w) najmanj 0,99. Optimalno območje rasti je pri vrednosti pH od 6,5 do 7,5 in pri vrednosti pH pod 4,9 ali nad 9,0 ne preživijo. Gibanje jim omogoča spiralno-vijačna oblika in polarni biček (Humphrey in sod., 2007; Silva in sod., 2011).

Kampilobakter je del normalne črevesne mikrobiote pri perutnini, prašičih, govedu, pticah in domačih ljubljencih, pri katerih v večini primerov ne povzroča bolezenskih sprememb (Humphrey in sod., 2007).

Pri ljudeh najpogosteje pride do okužbe po oralni poti, največkrat z zaužitjem topotno nezadostno obdelanega perutninskega mesa, kontaminirane vode ali nepasteriziranega mleka ter stika z okuženo živaljo ali osebo (Elvers in Park, 2002; Reeser in sod., 2007; Silva in sod., 2011; Kaakoush in sod., 2015). Piščanče meso predstavlja enega glavnih rezervoarjev mikroorganizma, saj je v Evropi povprečni delež s kampilobaktrom okuženih piščančjih trupov kar 75,8 % (Sulaeman in sod., 2012).



Slika 2: Primarni vir okužbe, poti prenosa in klinični znaki okužbe z bakterijami rodu *Campylobacter* (Kaakoush in sod., 2015).

Figure 2: The primary source of infection, routes of transmission and clinical signs of *Campylobacter* infection (Kaakoush et al., 2015).

V odvisnosti od infektivne doze, ki znaša od 500 do 800 bakterij, lahko od okužbe do nastopa simptomov (inkubacijska doba) traja od 2 do 5 dni (Young in sod., 2007). Gre za širok razpon od blagih do težkih simptomov, kot so trebušni krči, vodena, včasih krvava driska, glavobol in povečana telesna temperatura (Reeser in sod., 2007; Jaguszyn-Krynicka in sod., 2009; Dasti in sod., 2010). Navadno gre za akutno okužbo, ki je samoomejujoča in izzveni v roku enega tedna. Ob kroničnem poteku lahko pride do pojava avtoimunskih bolezni, kot so Guillain-Barréjev in Miller Fisherjev sindrom ter reaktivni artritis (Nachamkin, 2002; Reuter in sod., 2010). V 85 % vseh primerov kampilobakterioz je povzročitelj vrsta *C. jejuni*, ki ji v 10–25 % primerov okužb sledi *C. coli*, preostanek okužb pa pokrivajo vrste *C. lari*, *C. upsailensis* in *C. fetus* (Gilbreath in sod., 2011; Nguyen in sod., 2012).

2.1.1 Patogeneza in virulentni dejavniki

Na stopnjo patogenosti bakterij *C. jejuni* vplivajo številni dejavniki, kot so gibljivost, kemotaksa, sposobnost pritrjevanja, transmigracije ter invazije črevesnih celic in produkcija toksinov (Habib in sod., 2009; Backert in sod., 2013). Po okužbi pride najprej do prehoda bakterij skozi mukozni sloj črevesa, čemur sledi kolonizacija intestinalnih kript, ki predstavljajo optimalno nišo rasti *C. jejuni*. Ta se lahko nato z od aktina odvisnim ali z mikrotubuli posredovanim mehanizmom vključi v epitelno celico z različno stopnjo učinkovitosti (Bouwman in sod., 2013). Pomemben dejavnik življenjskega cikla *C. jejuni* kot komenzala ali patogena je gibanje v smeri gradiента komponent mukusa, saj naj bi mucini vrstno specifično vplivali na stopnjo patogenosti. Mukozni sloj je sestavljen pretežno iz glikoproteinov (mucini), ki jih izločijo celice epitelija ali submukoznih žlez in služijo kot fizična bariera ter past za patogene mikroorganizme na eni strani in kot matriks za ostale protimikrobne snovi na drugi (Navabi in sod., 2013). Prisotnost mucina vpliva tudi na višjo stopnjo izražanja genov *C. jejuni*, vključno s tistimi, ki sodelujejo pri gibljivosti (*flaA*), pritrjevanju (*jlpA*), invazivnosti (*ciaB*) in produkciji toksina (*cdt*) (Alemka in sod., 2012).

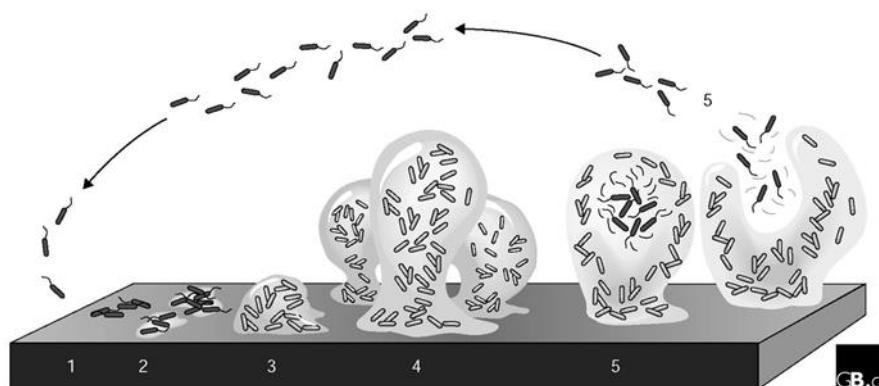
Kljub nepopolnemu poznavanju molekularnih mehanizmov patofiziologije okužbe ljudi s *C. jejuni* sta adhezija in invazivnost najverjetnejše osnovna dogodka za uspešno kolonizacijo in tudi posledične poškodbe epitelnih celic črevesa (Prasadi in Prasad, 2010; O Croinin in Backert, 2012). Bolton (2015) v preglednem članku povzema virulentne dejavnike, povezane z adhezijo in invazijo bakterij rodu *Campylobacter* na modelu epitelnih celic črevesa. Do sedaj poznani dejavniki adhezije so zunanji membranski protein CadF in fibronektin podoben protein FlpA, ki sodeluje pri adheziji na fibronektin; lipoprotein CapA; fosfolipaza A (*pldA*) pomembna za kolonizacijo piščancev; lipoprotein JlpA odgovoren za adhezijo na celice Hep-2; periplazmatski vezavni protein Peb1; transportni protein Peb3 in šaperon Peb4, ki sodeluje pri prenosu proteinov do zunanje membrane in sekrecijski sistem tipa IV (Bolton, 2015).

Poleg gibljivosti služi flagel med procesom invazije v epitelne celice črevesa tudi kot aparat T3SS za prenos ostalih proteinov. Kolonizacijo in invazijo omogočajo produkti genov *flaC* in *cia*, ki so ravno s pomočjo T3SS preneseni v citoplazmo epitelnih celic črevesa gostitelja. Manjša sposobnost invazije se je pokazala tudi pri sevih z mutacijo v genih *flaA*, *flaB*, *flgB* in *flgE* (Konkel in sod., 2004). Pri invaziji so pomembni še šaperon HtrA za pravilno zvitje adhezinov; protein VirK, katerega mutanti so bolj občutljivi na protimikrobne peptide; protein FspA, sodeljujoč pri sprožitvi apoptoze ter z invazijo povezan protein IamA, katerega vloga ni še popolnoma jasna (Dasti in sod., 2010; Bolton, 2015). Ostali virulentni dejavniki pri bakterijah *Campylobacter* so še citoletalni distendni toksin (Asakura in sod., 2008); lipooligosaharidi (Louwen in sod., 2008), polisaharidna kapsula in glikozilirani glikani na površini bakterijske celice (Bacon in sod., 2001) ter sistem za prevzem kovinskih ionov (Palyada in sod., 2004).

2.2 SPOSOBNOST TVORBE BIOFILMA

Bakterije so za preživetje znotraj širokega spektra zanje hitro spreminjačih se in ekstremnih pogojev razvile številne mehanizme. V naravnih okoljih jih tako navadno ne najdemo v obliki prosto plavajočih celic, ampak tvorijo celične skupke oz. aggregate (Karunakaran in sod., 2011). Večjo zaščito celicam omogoča tudi sposobnost adhezije na kontaktne površine in tvorba biofilma (Joshua in sod., 2006; Kalmokoff in sod., 2006; Reuter in sod., 2010). Biofilm predstavlja prostorsko strukturirano združbo, na površino pritrjenih in z zunajceličnimi polimernimi substancami obdanih mikroorganizmov, katerih vloga je odvisna od kompleksne mreže medsebojnih interakcij (Li in Tian, 2012; Maal-Bared in sod., 2012). Prednost rasti v obliki biofilma je večja zaščita celic pred delovanjem protimikrobnih snovi, biocidov ter kemijskih (pH, kisik) in fizikalnih (pritisk, temperatura) stresnih dejavnikov. Verjetnost dehidracije celic je zaradi vezave vode v polimerni matriks zmanjšana in ker so celice v neposredni bližini, lahko prihaja do izmenjave hranil, produktov metabolizma in genskega materiala (Annous in sod., 2009).

Dinamika tvorbe in sama struktura bakterijskega biofilma sta odvisni od številnih dejavnikov, kot so fiziološko stanje bakterijskega seva, fizikalno-kemijske lastnosti površine bakterijske celice in kontaktne površine, temperatura, prisotnost in dostopnost hranil, delež kisika v mediju ter jakost hidrodinamičnih sil (laminarni, turbulentni tok) (Reeser in sod., 2007; Reuter in sod., 2010; Nguyen in sod., 2012). Razvoj biofilma v osnovi poteka v petih zaporednih korakih (Slika 3), ki vključujejo (1) povratno pritrditev mikrobnih celic na površino; (2) tvorbo zunajceličnih polisaharidov in nepovratno pritrditev na površino; (3) izgubo gibalne sposobnosti celic in zorenje biofilma; (4) razvoj zrelega biofilma; (5) delni razkroj biofilma in sproščanje mikrobnih celic (Annous in sod., 2009; Sulaeman in sod., 2010).



Slika 3: Model razvoja biofilma po stopnjah (Cogan in Keener, 2004).

Figure 3: Model of biofilm development (Cogan and Keener, 2004).

Adhezivnost ali sposobnost pritrjevanje bakterij na kontaktno površino predstavlja začetni korak kolonizacije in kontaminacije in velja za enega bolj kompleksnih procesov, katerega mehanizem še vedno ni povsem pojasnjen. Gre za večstopenjski proces, pri katerem je nujno potrebna komunikacija med celicami (Asad in Opal, 2008; Bai in Rai, 2011). Adhezivnost je sestavljena iz dveh faz, in sicer začetne, povratne adhezije (fizična faza) ter nepovratne adhezije (molekularna faza) (An in Friedman, 1998). V prvi fazi gre za vpliv sile Brownovega gibanja, van der Waalsovih vezi, gravitacijske sile in hidrofobnih interakcij. Gibanje bakterij je lahko usmerjeno tudi s koncentracijskim gradientom kemoatraktantov (Gottenbos in sod., 2002). V drugi fazi pridejo v ospredje molekularno specifične interakcije med površino bakterijskih celic in površino substrata. Na to vplivajo tudi dejavniki okolja, kot so temperatura, čas izpostavitve, prisotnost in koncentracija bakterij, prisotnost protimikrobnih snovi in pretočni pogoji (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

Za razliko od planktonskih celic, adherirane celice tvorijo in se obdajo z zunajceličnimi polimernimi substancami (*angl. extracellular polymeric substances; EPS*). Sestava EPS je odvisna od vrste, pogojev rasti bakterij in medcelične komunikacije. EPS predstavlja tudi od 50–90 % skupne organske snovi biofilma in je v osnovi sestavljen iz polisaharidov, proteinov, nukleinskih kislin, lipidov in huminskih spojin (Sutherland, 2001; Denkhaus in sod., 2007). EPS zagotavlja mehansko stabilnost biofilma, posreduje adhezijo celic na površino in tvori kohezivno tridimenzionalno mrežo, ki povezuje in prehodno imobilizira celice v biofilm (Flemming in Wingender, 2010). Zaradi preklopa med prosto plavajočo in pritrjeno obliko rasti lahko posledično pride do sprememb v fiziologiji celic, sposobnosti preživetja v neugodnih pogojih in v sposobnosti virulence (Dykes in sod., 2003; Nguyen in sod., 2012).

2.2.1 Medcelična komunikacija

Medcelična komunikacija vključuje sintezo, izločanje in zaznavanje zunajceličnih signalnih molekul, ki po dosegu kritične mejne koncentracije sprožijo zaporedni prenos signala, ki vpliva na izražanje genov (Bassler, 1999; Elvers in Park, 2002; Xavier in Bassler, 2003; Waters in Bassler, 2005). Do s sistemom zaznavanja celične gostote (*angl. quorum sensing; QS*) posredovanega izražanja genov pride pri adheziji bakterij na površine, izločanju zunajceličnih polimernih substanc, sintezi biosurfaktantov, procesu sporulacije, kompetence, bioluminiscence ter pri izločanju virulentnih dejavnikov (Nadell in sod., 2008). Vlogo signalnih molekul pri po Gramu negativnih bakterijah imajo N-acilhomoserin laktoni (AI-1), pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa majhne peptidne molekule (Bassler, 1999; Plummer, 2012). Z avtoinduktorjem-2 (AI-2) posredovano zaznavanje celične gostote omogoča tako znotrajvrstno, kot tudi medvrstno komunikacijo pri bakterijah (Bassler, 1999; Sun in sod., 2004; Gölz in sod., 2012).

Signalne molekule AI-2 so bile prvič odkrite pri uravnavanju pojava bioluminiscence vrste *Vibrio harveyi* (Holmes in sod., 2009). Za sintezo AI-2 je potrebna aktivnost metaloencima (Fe^{2+}) LuxS, ki je S-ribozilhomocisteinaza in posreduje pretvorbo S-ribozilhomocisteina v homocistein in 4,5-dihidroksi-2,3-pantanedion (DPD). Temu sledi spontana ciklizacija DPD in nastanek mešanice furanonov, ki delujejo kot signalne molekule (AI-2) (Pei in Zhu, 2004; Plummer in sod., 2011; Gölz in sod., 2012). V tretjo skupino avtoinduktorjev (AI-3) pa spadajo hormonom podobne molekule, ki lahko posredujejo komunikacijo med prokariontskimi in evkariontskimi celicami in so bile prvič opisane pri enterohemoragični *E. coli* (EHEC) (Gölz in sod., 2012).

2.2.1.1 Medcelična komunikacija pri *C. jejuni*

Od celične gostote odvisna komunikacija med bakterijskimi celicami je eden izmed mehanizmov, ki so ključnega pomena pri uravnavanju preživetja in virulence *C. jejuni* (Moorhead in Griffiths, 2011). Prvi opis sinteze signalnih molekul pri vrsti *C. jejuni* sta leta 2002 podala Elvers in Park, ki sta s študijo pokazala prisotnost signala, ki sproži zaznavno raven bioluminiscence pri *V. harveyi*. Signalne molekule naj bi bile produkt encima LuxS ortolognega proteina (Cj1198) in dosežejo največjo koncentracijo v zgodnji stacionarni fazi rasti (Elvers in Park, 2002). Prisotnost signalnih molekul AI-2 naj bi igrala ključno vlogo tudi pri posredovanju filmotvornosti bakterij *C. jejuni* (Gölz in sod., 2012). Reeser in sod. (2007) so pokazali, da ima AI-2 pomembno vlogo pri razvoju biofilma *C. jejuni*, saj je bila stopnja tvorbe tega pri sevu z mutacijo v zapisu za protein LuxS opazno nižja. Še več, s povečanjem tvorbe biofilma pri mutantu *luxS* po dodatku medija brez celic, kjer je rasel divji sev M129, so pokazali sposobnost odzivanja na prisotnost signala (Reeser in sod., 2007). Ravno nasprotno pa so pokazali Holmes in sod. (2009), saj se *C. jejuni* v eksponentni fazi rasti ni odzval na prisotnost dodanega zunanjega signala AI-2, zato vloga AI-2 kot signalnih molekul še vedno ni popolnoma pojasnjena. Zaradi dvojne vloge LuxS kot ključnega encima v S-adenozilmetionin (SAM) obnovitveni poti in kot sinteznega proteina za prekurzorsko molekulo AI-2 težko sklepamo na mehanizem, ki je dejansko odgovoren za spremembo fenotipa (Plummer, 2012).

2.2.2 Filmotvornost bakterij *C. jejuni*

Bakterije rodu *Campylobacter* spp. lahko tvorijo enovrstno večcelično združbo ali pa kolonizirajo že obstoječ biofilm, saj gre v naravnih ekosistemih po navadi za soobstoj večjega števila različnih vrst mikroorganizmov (Sulaeman in sod., 2010; Kalia, 2013). V monokulturi tvorijo bakterije *C. jejuni* večcelično združbo v obliki biofilma na kontaktni površini, mrene na interfazi tekočina-zrak ter nepritrjenih skupkov (flokul) celic v tekočem mediju. Ravno oblika flokul je najbolj podobna tisti, ki je opažena v luminalnih kriptah v črevesu pri poskusih infekcije *in vivo* (Joshua in sod., 2006).

Čeprav molekularni mehanizmi nastanka biofilma še vedno niso popolnoma raziskani, gre za preko izražanja genov uravnan proces. Na adhezivnost bakterij *C. jejuni* na abiotiske kontaktne površine vpliva gibljivost, ki je ključnega pomena tudi pri okužbi in invaziji epitelnih celic prebavnega trakta (Moe in sod., 2010). V povezavi z gibljivostjo ima pomembno vlogo tudi samo izražanje proteinov bička (FlaA, FlaB, FliD, FlgG in FlgG2), ki se med tvorbo biofilma poveča, pri mutantu *flaAB* pa je stopnja nastajanja biofilma opazno nižja (Kalmokoff in sod., 2006; Reeser in sod., 2007). Čeprav naj bi prisotnost bičkov omogočila začetno stopnjo adhezije in posledično sestavljanje biofilma, pa njihova prisotnost ni predpogoj za samo tvorbo biofilma. Ključnega pomena je adhezija bakterij na podlago, z od bičkov odvisnim ali neodvisnim mehanizmom (Reuter in sod., 2010).

Campylobacter spp. lahko tvori zunajcelične polisaharide, ki ostanejo vezani na celice (kapsularni) ali pa se izločajo v okolico (sluz). Kapsularni polisaharidi vplivajo na adhezivnost prek spremembe fizikalno-kemijskih lastnosti površine celic, polisaharidi v sluzi pa prek spremembe narave kontaktne površine (Jeon in sod., 2009; Nguyen in sod., 2012). Bolj hidrofobna in pozitivno nabita površina naj bi omogočila več hidrofobnih interakcij in zmanjšanje elektrostatskega odboja ter s tem boljše možnosti za adhezijo (Nguyen in sod., 2012). Med preizkušenimi abiotskimi kontaktnimi površinami se bakterije *C. jejuni* lahko pritrđijo in tvorijo biofilm na različnih materialih, kot so nerjavno jeklo, polivinilklorid, nitrocelulozna membrana ter steklo (Kalmokoff in sod., 2006). Največja raznolikost v sposobnosti tvorbe biofilma med sevi se je pokazala v primeru nerjavnega jekla, ki ima med uporabljenimi najbolj hidrofobno površino (Gunther in Chen, 2009).

Posamezni sevi vrste *C. jejuni* se po stopnji adhezivnosti med seboj razlikujejo, kar je verjetno posledica hipervariabilnosti homopolimerne regije, ki nosi zapis za površinske molekule (lipooligosaharidi in polisaharidi) ter zapis za strukture površinskih proteinov (Sulaeman in sod., 2010). Nekateri sevi *C. jejuni* so naravno kompetentni in sposobni prevzema proste DNK iz okolja. Glede na to lahko znotraj večcelične združbe pogosteje pride do rekombinacije genetskega materiala, kar vodi tudi k večji genetski raznolikosti znotraj vrste (Young in sod., 2007). Pogostost genskega prenosa med celicami v biofilmu je večja kot med prosto plavajočimi celicami (Annous in sod., 2009). Reuter in sod. (2010) so pokazali, da je potek razvoja biofilma hitrejši pri višji koncentraciji kisika v atmosferi, vendar je bila količina nastalega biofilma že po treh dnevih primerljiva tisti pri mikraerofilnih pogojih inkubacije. Opazili so tudi, da se čez čas celice iz biofilma odcepljajo neodvisno od koncentracije kisika, kar nakazuje na odsotnost specifičnega mehanizma disperzije biofilma. Pri *C. jejuni* gre najverjetneje za kontinuiran proces sproščanja, odlepljene prosti plavajoče celice lahko ob nastopu zanje neugodnih okoljskih razmer propadejo ali pa se ponovno pritrđijo na že obstoječi biofilm (Reuter in sod., 2010).

2.2.3 Pregled metod za proučevanje biofilma na abiotiskih kontaktnih površinah

Za raziskovanje morfologije, fiziologije in genetike biofilma obstaja široka paleta mikroskopskih, mikrobioloških, molekularno-bioloških, kemijskih in fizikalnih pristopov (Denkhaus in sod., 2007). Kljub temu je zaradi kompleksnosti v dinamiki nastajanja in številnih spremenljivk naše razumevanje same organizacije in delovanja ter posledično tudi nadzora mikrobnega biofilma omejeno (Tan in sod., 2014). Za detekcijo in identifikacijo bakterij znotraj biofilma so na voljo raznolike metode, kot so standardne gojitvene metode, verižna reakcija s polimerazo, encimski imunski testi, uporaba biosenzorjev, bioluminiscenca in fluorescenčno označevanje. Kljub dostopnosti in uporabnosti pa so poglavitev pomanjkljivosti metod velikokrat daljši čas detekcije, potreba po obogativitvi ali označevanju ter sama ponovljivost rezultatov, ki zahteva osebje s strokovnim znanjem in izkušnjami (Abadian in sod., 2014; Tan in sod., 2014).

Kot neposredne metode za določanje števila in opazovanje morfologije celic na površini so na voljo različne mikroskopske tehnike, kot npr. laserska vrstična konfokalna mikroskopija (*angl. confocal laser scanning microscopy; CLSM*), s katero lahko opazujemo s fluorescentnimi barvili pripravljene vzorce ali pa mikroorganizme z zapisom za enega od fluorescentnih proteinov (Sanders in sod., 2007). Vsestranski podatek je tudi fiziološka aktivnost mikroorganizmov, ki jo lahko preverimo z uporabo barvil, ki zaradi aktivnosti encimov ali spremembe redoks potenciala, obarvajo žive celice (Schaule in sod., 2000). S kemijskimi in biokemijskimi analizami lahko določamo vsebnost vode, polisaharide in proteine, vsebnost celotnega organskega ogljika ter živost celic prek hidrolitične aktivnosti (Schaule in sod., 2000).

Kot neposredne metode poznamo še molekularno imunološke in genotipizacijske metode, kot so kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času in PCR z reverzno transkripcijo. Za neposredno določanje števila celic je v uporabi tudi pretočna citometrija. Sama identifikacija prisotne mikrobne združbe pa pogosto zahteva tudi posredne, gojitvene metode (CFU; število kolonijskih enot ali MPN; najbolj verjetno število mikroorganizmov) (Zhang in sod., 2013).

In vitro pridobljeni rezultati tvorbe biofilma so lahko zavajajoči, saj je *in vivo* substrat navadno pod vplivom mehanskih sil, se s časom spreminja in nanj vpliva tok bioloških tekočin (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Odkrivanja zapletene regulacije in mehanizma nastajanja biofilma bi se lahko lotili tudi z druge strani, in sicer z razvojem površin in materialov za nadzor same tvorbe biofilma. Pri tem vsekakor naletimo na izzive, kot so sinergističen in antagonističen učinek nekaterih površin, težaven razvoj univerzalnega sistema, potreba po študiju večvrstnega biofilma, kot ga najdemo v naravi. Večinskega deleža bakterij še vedno ne znamo gojiti v laboratorijskih pogojih, pa tudi odziv na fizikalne lastnosti površine je lahko različen že na nivoju seva (Renner in Weibel, 2011).

2.2.3.1 Nerjavno jeklo kot abiotska kontaktna površina

Prisotnost biofilma na delovni površini predstavlja tveganje za navzkrižno kontaminacijo živil ter posledično širjenje okužb. Biofilmi v prehrambni industriji predstavljajo veliko težavo, saj se poleg kopičenja nečistoč in kvarljivcev hrane v njem zadržujejo tudi patogeni mikroorganizmi, ki so v takšni tvorbi še dodatno zaščiteni pred protimikrobnimi in čistilnimi sredstvi ter postopki (Srey in sod., 2013). Izbera materiala za samo proizvodno linijo je zato ključnega pomena in veliko prednost pri izbiri ima ravno nerjavno jeklo, ki ponuja dobro mehansko in kemično odpornost (Partington, 2006). Pomemben vpliv na samo higienско stanje, torej nizko stopnjo oprijemanja nečistoč in visoko dostopnost za čistilna sredstva, ima hrapavost oziroma topografija same površine nerjavnega jekla (Faille in sod., 2000).

Metode vzorčenja in kvantifikacije biofilma na površini nerjavnega jekla so lahko vzorčenje z brisi, sonikacija, praskanje s površine, vorteksiranje s kroglicami in določanje števila kolonijskih enot, spremeljanje bioluminiscence, uporaba mikrotitrskih ploščic in mikroskopske metode. Poglavitni problem vseh metod predstavlja učinkovitost same metode na uspešno odstranitev bakterij s površine, dodatna težava pa je tudi nedostopnost predelov zaradi same hrapavosti površine ter vpliv neugodnih stresnih dejavnikov, zaradi katerih postanejo bakterijske celice negojoljive (Giaouris in sod., 2005).

2.2.4 Model celičnih linij kot biotska kontaktna površina za *C. jejuni*

Zaradi pomanjkanja ustreznega živalskega modela za študij kampilobakterioze je uporaba celičnih kultur trenutno najboljša izbira za poskuse *in vitro* (Alemka in sod., 2010a). Zaradi visoke specifičnosti interakcij *C. jejuni* z modelom epitelnih celic pri pregledu literature o *in vitro* študijah določanja adhezivnosti, invazivnosti, translokacije ali sposobnosti znotrajceličnega preživetja, velikokrat naletimo na neskladnost med rezultati. Dejavniki vpliva so lahko izbira bakterijskega seva, gibljivost, faza in stopnja rasti bakterij, izbira celične linije in konfluentnost epitelnih celic ter samo razmerje med številom bakterijskih in epitelnih celic. Uspešna vzpostavitev stika *C. jejuni* z modelom epitelnih celic je pogojena s tremi procesi (i) adhezijo; (ii) invazijo in (iii) preživetjem v znotrajceličnih veziklih (Backert in Hofreuter, 2013).

Sposobnost adhezije in invazije izolatov *C. jejuni* naj bi bila povezana procesa, vendar kljub temu sama adhezija ni zadostna za proces invazije (Christensen in sod., 2009). Gre tudi za sevno specifične interakcije bakterij z epitelijem in pojava ne gre posplošiti na celoten rod *Campylobacter* spp. Za proučevanje adhezije, invazije ter citotoksičnosti bakterij *C. jejuni* so najpogosteje uporabljene humane črevesne epitelne celice (Caco-2, HT-29, INT-407, T84), prašičje celice črevesa (IPEC-J2) pa tudi ostale, ki niso črevesnega izvora (HeLa, HepG2, LHM, COS-1 in Vero), redkejše pa so študije na primarnih celičnih linijah (Backert in Hofreuter, 2013).

Med posameznimi sevi *C. jejuni* različnega izvora ni bilo opaziti specifičnega tropizma, saj so bili neodvisno od izvora, sposobni adhezije in invazije ne glede na sam izvor celične linije (Gripp in sod., 2011). Za proučevanje interakcij z mukusom je prišla v uporabo celična linija E12 (HT-29-MTX-E12), ki je subklon celične linije humanih črevesnih epitelnih celic HT-29. Večslojna mukozna plast je po večini sestavljena iz gel-formirajočih glikoproteinov mucina, ki jih izloča spodaj ležeči sloj epitelnih celic (Linden in sod., 2008; Barr in sod., 2015).

Ob primerjavi izhodne celične linije HT-29 in subklona E12, ki izloča mukus so pokazali, da prisotnost mukoznega sloja značilno vpliva na število skupno adheriranih ter invadiranih bakterij *C. jejuni* (Alemka in sod., 2010a). V primeru bakterij *Helicobacter pylori* se te na celično linijo HT-29 niso adherirale, medtem ko je bila na celični liniji E12 adhezija značilno višja. Razlog za slednje bi bilo lahko večje število receptorjev v mukoznem sloju, kar omogoči učinkovito infekcijo (Linden in sod., 2008). Mukus izločajoča celična linija E12 naj bi bila tako boljši približek dejanskega stanja prebavnega trakta, saj je kolonizacija mukoznega sloja črevesa ena prvih stopenj uspešne okužbe spodaj ležečih celic (Behrens in sod., 2001).

2.2.4.1 Test adhezivnosti in invazivnosti na modelu celičnih linij

Pregled metod določanja adhezije, transmigracije, invazije in znotrajceličnega preživetja bakterij *C. jejuni* avtorjev Backerta in Hofreuterja (2013) povzema pregleden in jedrnat prikaz najpogosteje uporabljenih pristopov. Sam princip testa za določanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* na modelu celičnih linij je ta, da se na luminalno stran konfluentno poraslih epitelnih celic v mikrotitrski polistirenski ploščici nacepi bakterije in inkubira pri temperaturi 37 °C ter atmosferi s 5 % CO₂. Razmerje bakterij glede na število epitelnih celic (*angl.* multiplicity of infection; MOI) se navadno giblje med 10 in 500 in je odvisno od narave poskusa, tako kot tudi sam čas infekcije (Backert in Hofreuter, 2013).

Za določanje števila na epitelij adheriranih bakterij je še vedno najpogosteje uporabljena gojitvena metoda (*angl.* CFU-based adherence assay; CBA) (Russel in Blake, 1994). Po inkubaciji se suspenzija bakterij odstrani in površina epitelnih celic spere s PBS ali gojitvenim medijem. Sloj epitelnih celic se nato mehansko razbije ali pa lizira z dodatkom 0,1 % detergenta TritonX-100 ali 0,1 % natrijevega deoksiholata. Število bakterij, ki so se vezale na epitelij, se določi z metodo štetja na ploščah. Za določanje invazivnosti (sposobnost s strani patogena induciranega vstopa v evkariontsko celico) se po infekciji in spiranju epitelnih celic doda še antibiotik gentamicin v koncentraciji, ki ubije zunajcelično prisotne bakterije. Sledi liza epitelnih celic in določanje števila invadiranih bakterij z metodo štetja na ploščah (*angl.* gentamicin protection assay). Za bolj podrobne informacije same interakcije bakterij z epitelnimi celicami pa je bolj uporabna imunofluorescenčna mikroskopija, kjer gre za spremljanje s protitelesi ali fluorescentnimi barvili označenih bakterij (Backert in Hofreuter, 2013).

2.3 PREPREČEVANJE FILMOTVORNOSTI

Vzpostavitev nadzora nad s hrano povezanimi patogeni, vključujoč *Campylobacter* spp., predstavlja enega izmed ključnih ciljev za uspešno zagotavljanje varnosti živil in javnega zdravja (Klančnik in sod., 2012a). Zaradi varne in dolgoletne uporabe v tradicionalni medicini je bil širok nabor bioaktivnih rastlinskih komponent testiran tudi z namenom iskanja alternativnih protimikrobnih snovi. Dokazana protiadhezijska aktivnost nekaterih rastlinskih izvlečkov tako predstavlja možnost zmanjšanja kolonizacije bakterij na abiotiski površini ter na epiteliju črevesa in s tem širjenje ter pogostosti okužb. Uporaba rastlinskih izvlečkov se je za bolj učinkovito pokazala predvsem na stopnji preprečevanja adhezivnosti bakterij in manj učinkovito pri kasnejšem zaviranju rasti že obstoječega biofilma (Cerca in sod., 2005; Selim in sod., 2014).

2.3.1 Odpornost znotraj mikrobnega biofilma

Bakterije znotraj biofilma so tudi do 1000-krat bolj odporne proti antibiotikom in tudi do 3000-krat manj občutljive na dezinfekcijska sredstva kot pa bakterijske celice v suspenziji (Mah in O'Toole, 2001; Patel, 2005). Predlaganih je bilo nekaj mehanizmov, ki pripomorejo k večji odpornosti, kot je sama struktura biofilma, ki fizično prepreči prehajanje protimikrobnih snovi, počasnejša rast in pojav subpopulacije bakterij v dormantnem stanju, zaznavanje celične gostote ter sprožitev izražanja genov za izlivne črpalke ter ostale mehanizme odziva na stres (Paraje, 2011; Soto, 2013). Večja odpornost ne nudi samo zaščite pred neugodnimi dejavniki zunaj gostitelja, ampak služi tudi kot pomemben del obrambe pred komponentami imunskega sistema gostitelja (Costerton in sod., 2003; Patel, 2005).

Anderson in O'Toole (2008) sta mehanizme odpornosti opredelila na tiste, ki se pojavijo skupaj s samim nastanjajem biofilma in tiste sprožene kasneje zaradi okoliških dejavnikov. Delovanje protimikrobnih sredstev na mikroorganizme v zunanjem sloju biofilma je navadno popolnoma učinkovito, vendar zaradi matriksa kot fizične ovire doseže bakterije v notranjosti v subinhibitornih koncentracijah. Prisotnost protimikrobnih snovi v koncentraciji, ki ne ubije celotne populacije tarčnih mikroorganizmov pa lahko še dodatno povzroči razvoj in širjenje odpornosti (Szomolay in sod., 2005). Zaradi pomanjkanja kisika ali hranil v notranjosti biofilma se oblikujejo mikrookolja, kjer se metabolizem bakterij upočasni in so zato manj občutljive, saj so se protimikrobna sredstva v splošnem pokazala za bolj učinkovita na hitro rastoče bakterije (Patel, 2005). Del populacije lahko preide v dormantno stanje (*angl. persisters*), znotraj katerega bakterije niso dovezne na protimikrobna sredstva in so ravno te lahko odgovorne za obstojnost biofilma (Lewis, 2005). Pomemben dejavnik je tudi oksidativni stres in produkcija prostih kisikovih radikalov, ki še dodatno vplivajo na pogostost mutacij znotraj biofilma in pojav odpornosti na protimikrobna sredstva (Boles in Singh, 2008).

Eden od mehanizmov, ki bakterijam omogoča uravnavanje okolja znotraj celic z izločanjem za njih toksičnih snovi, kot so protimikrobnna sredstva, žolčne soli, težke kovine, metaboliti pa tudi signalne molekule, so izlivne črpalki (Soto, 2013). Pri *C. jejuni* se je kot učinkovit mehanizem odpornosti proti več različnim razredom antibiotikov in ostalim protimikrobnim sredstvom pokazala izlivna črpalka CmeABC, ki jo umeščamo v superdružino RND (*angl. resistance, nodulation, cell devision*) (Guo in sod., 2010). Izražanje gena z zapisom za periplazmatski fuzijski protein CmeA, transportni protein na notranji membrani CmeB in zunanji membranski protein CmeC, je uravnano s transkripcijskim represorjem CmeR. (Lin in sod., 2002). Črpalko CmeABC je poglavita pri odpornosti na žolčne soli in ima ključen pomen pri kolonizaciji prebavnega trakta piščancev (Lin in sod., 2003). Klančnik in sod. (2012b) so prek mutacije gena *cmeB* za transportni protein CmeB pokazali, da je izlivna črpalka CmeABC pomembna tudi pri odpornosti na testirane naravne fenolne spojine.

Za uspešen nadzor in premagovanje notranjih in zunanjih dejavnikov, ki omogočajo bakterijam odpornost znotraj biofilma, se moramo lotiti iskanja in preizkušanja novih strategij. Preprečevanje začetnih stopenj tvorbe biofilma je zato ena izmed najbolj obetavnih metod tako na abiotskih površinah kot tudi pri okužbah, saj so bakterije v biofilmih najpogosteji vir kroničnih bolezenskih stanj (Paraje, 2011)

2.3.2 Protimikrobne učinkovine naravnega izvora

Dejstva, da za prehrambno in farmacevtsko industrijo uporabne rastline velikokrat najdemo v naravnih okoljih z visoko gostoto mikroorganizmov nakazuje, da so te rastline skozi evolucijo najverjetneje razvile tudi nekakšne zaščitne mehanizme. Njihova uporaba v protimikrobne namene tako sega že v staro antiko, ko so začimbe, kot so kurkuma, česen, črni poper, klinčki, uporabljali za preprečevanje okužb prebavil, dihal in sečil (Packiavathy in sod., 2012). Poznano je protimikroben delovanje širokega spektra sekundarnih rastlinskih produktov, kot so fenoli, katehini, kinoni flavanoni, polifenoli, alkoholi, terpenoidi in poliacetileni (Zaki in sod., 2013).

Nekatere izmed dokazano protimikroben aktivnih učinkovin naravnega izvora, kot je karvakrol v origanu, so sestavni del tradicionalno uporabljenih zelišč in dodatkov za daljšo obstojnosti živil (Burt, 2004). Njihova uporabna vrednost ima lahko veliko širši obseg, saj se pogosto pokažejo tudi kot učinkovita protimikrobnna sredstva za zmanjšanje bremena s hrano prenosljivih patogenih bakterij. Karvakrol v subinhibitorni koncentraciji se je pokazal za učinkovitega pri zmanjšanju gibeljivosti bakterij *C. jejuni* in tudi do 45 % na preprečevanje invazivnosti na modelu celične linije INT-407 (van Alphen in sod., 2012). Razvoj uvedbe novih zaviralcev tvorbe biofilma temelji na ideji, da te snovi ne vplivajo na živost bakterij, s čimer se bi lahko izognili razvoju in širjenju odpornosti (Rabin in sod., 2015).

2.3.3 Rastlinski izvlečki

Izražanje različnih virulentnih dejavnikov pri bakterijah je lahko posredovano z mehanizmom zaznavanja gostote celic. Odkritje aktivnih učinkovin, ki bi jih lahko uporabili za zaviranje medcelične komunikacije in se s tem izognili selekcijskemu pritisku ter razvoju odpornosti, predstavlja enega obetavnejših pristopov obvladovanja okužb s patogenimi mikroorganizmi. Trenutno so predlagane vsaj štiri strategije posredovanja v medcelično komunikacijo: (1) zaviranje nastajanja signala; (2) oviranje širjenja signala; (3) blokirjanje receptorjev za signal in (4) zaviranje sistema za odzivanje na signal (Li in Tian, 2012). Z uporabo analogov signalnim molekulam bi se lahko izognili močnemu selekcijskemu pritisku in razvoju odpornosti bakterij na antibiotike (Li in Tian, 2012). Zaviralci zaznavanja celične gostote vplivajo tudi na večjo dovzetnost bakterijskih celic znotraj biofilma na antibiotike in s tem povečajo uspešnost samega protimikrobnega zdravljenja (Brackman in sod., 2011). Zaznavanje celične gostote naj bi imelo vpliv tudi na kvar hrane, saj so prek tega mehanizma uravnavani različni procesi razgradnje. Čeprav so v vzorcih pokvarjene hrane potrdili prisotnost signalnih molekul, njihova natančna vloga pri kvaru živil še ni popolnoma znana. Tudi s tem namenom bi lahko uvedba zaviralcev medcelične komunikacije pomenila daljšo obstojnost in varnost hrane (Bai in Rai, 2011).

Zaradi podobnosti v kemijski strukturi s signalnimi molekulami in sposobnosti razgradnje receptorjev zanje so tudi rastlinske izvlečke umestili na listo zaviralcev medcelične komunikacije (Kalia, 2013). Antagoniste zaznavanja celične gostote so našli pri višjih rastlinah, kot so grah, vanilija, maline, nageljne žbice, kostanj, kitajske zdravilne rastline in mediteranske začimbe. Določiti vpliv izvlečkov na posamezno stopnjo medceličnega signaliziranja je težko, saj lahko prek razgradnje signalnih molekul preprečijo njihovo vezavo na receptor, preprečujejo nastanek kompleksa ali pa spremenijo strukturo encima za sintezo signala (Tan in sod., 2013). Največjo aktivnost na medcelično komunikacijo ali tvorbo biofilma *Pseudomonas aeruginosa* je imel iberin (1-izotiocianato-3-(metilsulfinil) propan), iz izvlečka navadnega hrena (*Armoracia rusticana*) (Jakobsen in sod., 2012). Packiavathy in sod. (2012) so pokazali vpliv izvlečka kumina (*Cuminum cyminum*) na gibljivost in izločanje zunajceličnih lipopolisaharidov, kar je povezano tudi s samo tvorbo biofilma. Metil eugenol, kot aktivna učinkovina izvlečka, povzroči izgubo strukture biofilma ter v subinhibitornih koncentracijah *in vitro* preprečuje tvorbo biofilma pri *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* in *Serratia marcescens* (Packiavathy in sod., 2012; Kalia, 2013).

V preglednici 1 je kratek pregled rastlinskih izvlečkov in posameznih učinkovin rastlinskega izvora, ki so se pokazale za uspešne pri preprečevanju filmotvornosti bakterij *Campylobacter* na abiotskih kontaktnih površinah, na adhezivnost in/ali invazivnost na modelu celičnih linij ali na nivoju zaviranja medcelične komunikacije.

Preglednica 1: Pregled učinkovin rastlinskega izvora, ki so se pokazale za uspešne pri preprečevanju filmotvornosti na abiotskih površinah, preprečevanju adhezivnosti in/ali invazivnosti na modelu celičnih linij in kot motilci zaznavanja celične gostote pri bakterijah *Campylobacter*

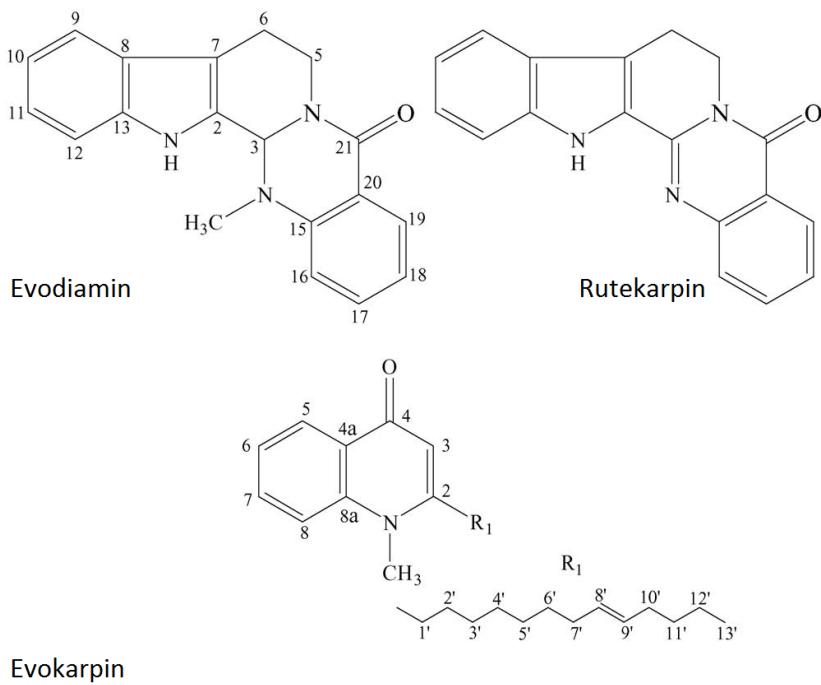
Table 1: An overview of compounds of plant origin with anti-biofilm, anti-adhesion and/or anti-invasion and quorum sensing disturbing potential of *Campylobacter*

Učinkovina	Delovanje	Referenca
Ingver (<i>Zingiber officinale</i>) Kajenski poper (<i>Capsicum annum</i>) Sladki koren (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) Ameriški slamnik (<i>Echinacea purpurea</i>)	preprečevanje adhezivnosti na humane črevesne epitelne celice HT-29	Bensch in sod., 2011
Akacija (<i>Acacia farnesiana</i>) Pelin (<i>Artemisia ludoviciana</i>) Opuncija (<i>Opuntia ficus-indica</i>) Artičoka (<i>Cynara scolymus</i>)	preprečevanje adhezivnosti in citotoksičnosti na modelu ledvičnih celic Vero	Castillo in sod., 2011
Origano (<i>Origanum minutiflorum</i>); karvakrol	zaviranje gibljivosti in invazivnosti na modelu humanih embrionalnih črevesnih epitelnih celic INT407	van Alphen in sod., 2012
Limona (<i>Citrus limon</i>) Citrona (<i>Citrus medica</i>) Grenka pomaranča (<i>Citrus aurantium</i>)	preprečevanje QS, tvorbe biofilma in gibljivosti	Castillo in sod., 2014
Navadna robida (<i>Rubus fruticosus</i>) Borovnica (<i>Cyanococcus</i>)	preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti na modelu humanih črevesnih epitelnih celic (INT407) in piščančjih fibroblastih (DF1)	Salaheen in sod. 2014
2(5H)-furanon iz rdeče alge (<i>Delisea pulchra</i>) Epigalokatehin galat (EGCG) iz zelenega čaja	preprečevanje QS, tvorbe biofilma in gibljivosti	Castillo in sod., 2015
Resveratrol (naravni oksidant iz družine polifenolov)	preprečevanje tvorbe biofilma	Duarte in sod., 2015
<i>Alpinia katsumadai</i> ; etanolni izvleček in ostanki destilacije	preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti na modelu piščančjih (PSI) in humanih (H4) črevesnih epitelnih celic	Pogačar in sod., 2015
<i>Euodia ruticarpa</i> ; etanolni izvleček podu, evodiamin, rutekarpin, frakcija Q	preprečevanje tvorbe biofilma in QS	Bezek in sod., 2016
Koriander (<i>Coriandrum sativum</i>); eterično olje in linalol	protimikrobro delovanje, preprečevanje tvorbe biofilma in QS	Duarte in sod., 2016
Timijan (<i>Thymus vulgaris L.</i>); izvleček in ostanki destilacije Oljka (<i>Olea europea L.</i>)	preprečevanje adhezivnosti na polistiren in na piščanče črevesne epitelne celice	Šikić-Pogačar in sod., 2016

* QS je kratica za izraz medcelična komunikacija (angl. quorum sensing)

2.3.3.1 *Euodia rutilarpa*

Euodia rutilarpa (A. Juss.) Benth. (*Tetradium rutilarpum* (A. Juss.) T. G. Hartley; Rutaceae) je že dolgo poznana po vsebnosti bioaktivnih učinkovin, saj služi kot bogat vir kvinolinonskih in indolokvinazolnih alkaloidov (Huang in sod., 2012). Glede na protimikrobovno aktivnost so se med njimi izkazali za najbolj obetavne evodiamin, rutekarpin in *cis*-evokarpin (Pan in sod., 2014; Wang in sod., 2013). Glavna alkaloida nezrelih plodov *E. rutilarpa*, rutekarpin in evodiamin sta poznana tudi po bioloških aktivnostih, kot so spodbujanje vazodilatacije, zaviranje občutka bolečine in zaviranje produkcije prostaglandinov (Liao in sod., 2011). Del kitajske medicine je usmerjen tudi kot podporno zdravljenje ob kemoterapiji, saj je pristop z zdravili z različnimi tarčnimi mesti bolj učinkovit. Tudi tukaj se pojavi *E. rutilarpa* kot sestavni del zeliščne formule, uporabljene za zdravljenje malignih tumorjev (Cao in sod., 2015). Suhi plodovi *E. rutilarpa* ali bolje poznani kot "Wu-zhu-yu" so del tradicionalne kitajske medicine, uporabljeni pri lajšanju gastrointestinalnih tegob, glavobola ter alergijskih bolezni, kot sta rinitis in astma (Liu in sod., 2005).



Slika 4: Kemijske strukture alkaloidov izvlečka *E. ruticarpa* (Liu in sod., 2005).

Figure 4: Chemical structures of alkaloids of *E. ruticarpa* extract (Liu et al., 2005).

2.3.4 Bakteriofagi kot možnost nadzora bakterij *C. jejuni*

Bakteriofagi so zaradi njihove tarčne specifičnosti ponovno obudili zanimanje tako na nivoju zagotavljanja varnosti hrane kot tudi na nivoju protimikrobnih terapij (Cairns in sod., 2009; Ryu in sod., 2014). Bakteriofagi predstavljajo alternativo konvencionalno uporabljenim protimikrobnim sredstvom za nadzor s hrano prenosljivih mikroorganizmov. Kot učinkoviti so se pokazali pri zmanjšanju števila bakterij *C. jejuni* na površini piščančje kože (Atterbury in sod., 2003) in govejega mesa (Bigwood in sod., 2008).

Terapija z bakteriofagi je bila učinkovita tudi pri zmanjšanju števila bakterij v prebavnem traktu piščancev (Carvalho in sod., 2010). Kot poglavito pomanjkljivost tega pristopa navajajo pojav odpornosti gostitelja na bakteriofag, zato se je terapija z bakteriofagi pokazala kot najbolj učinkovita nekaj dni pred zakolom piščancev (El-Shibiny in sod., 2009b). Uporabe bakteriofagov za nadzor biofilma *C. jejuni* na stekleni površini so prvič opisali Siringan in sod. (2011). Bakteriofagi so naravno prisotni v mukoznem sloju prebavnega trakta, kjer se prek imunoglobulinom podobne domene vežejo na glikanske ostanke in tako vplivajo na zmanjšanje pritrjevanja in kolonizacijo mukoznega sloja s patogenimi bakterijami ter posledično znižajo patogeni učinek na epitelne celice črevesa (Barr in sod., 2013).

2.3.4.1 Bakteriofag PC5

Za *C. jejuni* specifičen bakteriofag PC5 sodi v družino *Myoviridae* in je glede na morfologijo in velikost genoma (150 kb) umeščen v skupino III. Izoliran je bil iz vzorca slepega črevesa piščancev v Sloveniji. Janež in sod. (2014) so pokazali, da je prisotnost kapsule ključna za interakcijo z bakterijskim gostiteljem *C. jejuni*. Pokazali so tudi, da odpornost testiranih sevov *C. jejuni* na antibiotike ni v korelaciji z nedovzetnostjo na bakteriofage (Janež in sod., 2014).

3 MATERIALI IN METODE

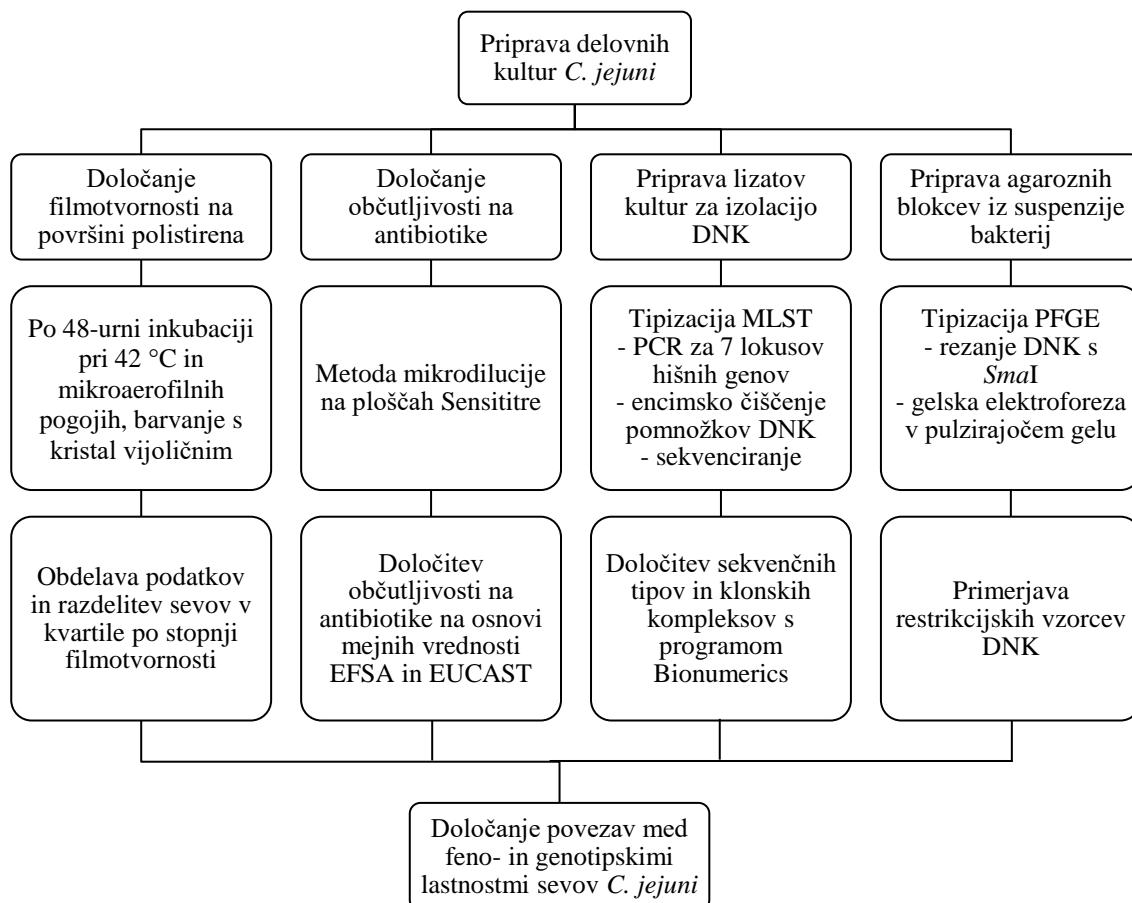
V tem poglavju so povzeti materiali in metode, ki smo jih uporabili pri izvedbi eksperimentalnega dela v okviru doktorske naloge.

3.1 POTEK DELA

Eksperimentalno delo v okviru doktorske naloge je potekalo, kot je ponazorjeno s shematskim prikazom v nadaljevanju. Zaradi lažje sledljivosti je potek dela shematsko prikazan po tematskih sklopih.

3.1.1 Tipizacija bakterij *C. jejuni*

Prvi sklop poskusov je povzemal iskanje morebitnih povezav med filmotvornostjo sevov *C. jejuni* znanega izvora z ostalimi eksperimentalno določenimi feno- in genotipskimi lastnostmi. Shematski potek dela je prikazan na sliki 5.

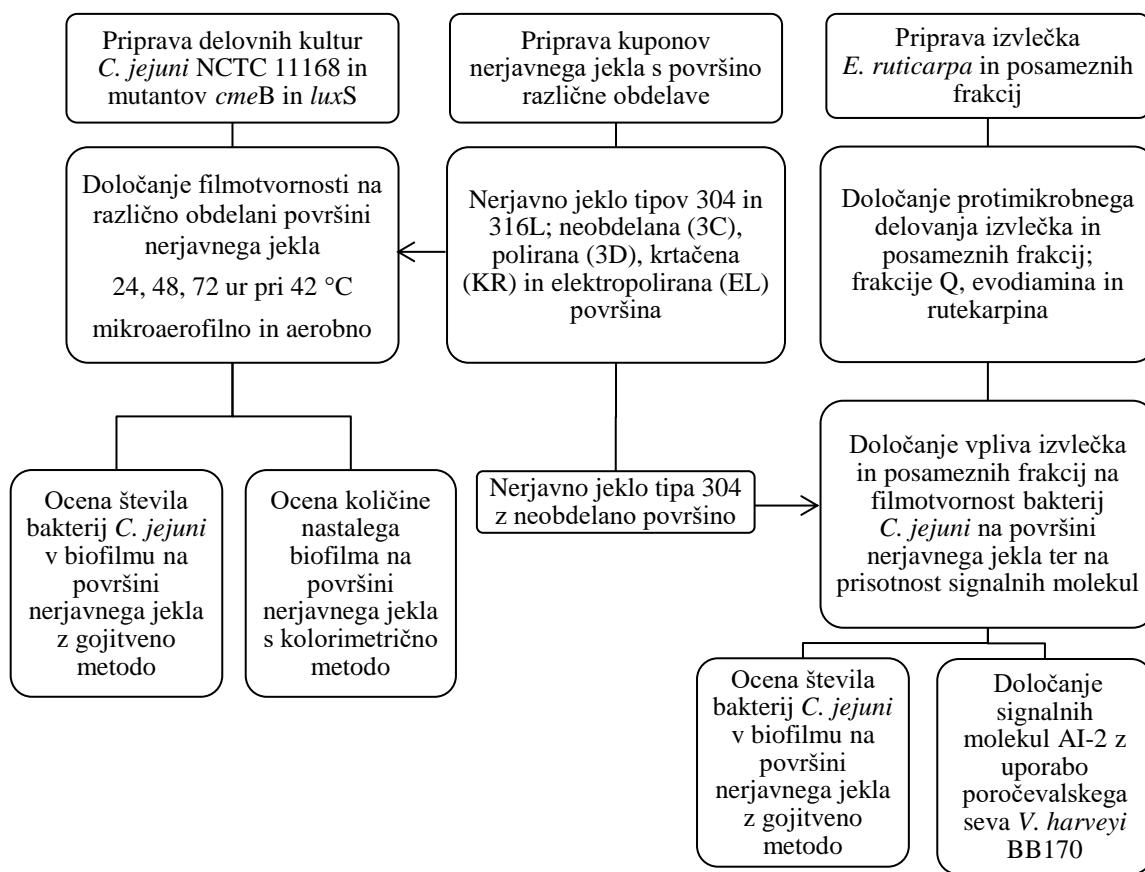


Slika 5: Shema določanja feno- in genotipskih lastnosti sevov *C. jejuni*.

Figure 5: Flowchart of feno- and genotyping of *C. jejuni* strains.

3.1.2 Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla in na prisotnost signalnih molekul AI-2

Znotraj drugega sklopa poskusov smo z uporabo kolorimetrične in gojitvene metode najprej določali, kakšen vpliv ima hrapavost površine nerjavnega jekla na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *luxS*. Zaradi večje odpornosti bakterij v biofilmu in pojava ter širjenja odpornosti na antibiotike je iskanje alternativnih metod za preprečevanje adhezivnosti ter tvorbe biofilma v porastu. Zato smo v nadaljevanju določali vpliv izvlečka plodov *E. ruticarpa* in posameznih frakcij na preprečevanje filmotvornosti referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter njegovih mutantov *cmeB* in *luxS*, na površini nerjavnega jekla. Sočasno smo preverili tudi, kakšen vpliv imajo uporabljeni učinkovini na prisotnost signalnih molekul AI-2. Izraz filmotvornost smo uvedli kot izraz za skupno poimenovanje adhezivnosti in tvorbe biofilma, na abiotiski kontaktni površini. Shematski potek dela je prikazan na sliki 6.

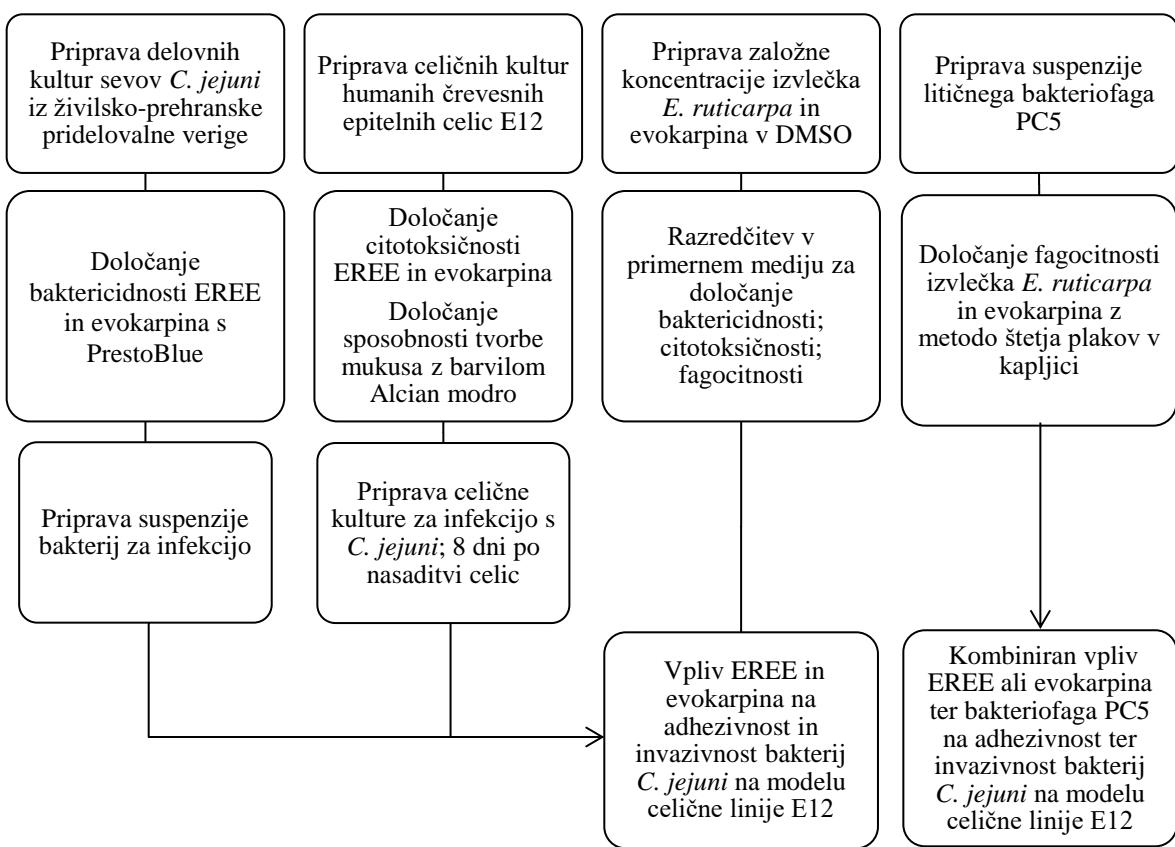


Slika 6: Shema določanja vpliva različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost ter določanje vpliva izvlečka *E. ruticarpa* in posameznih frakcij (frakcija Q, evodiamin, rutaecarpin) na filmotvornost in na prisotnost signalnih molekul AI-2 pri bakterijah *C. jejuni*

Figure 6: Flowchart of determining the effect of roughness of stainless steel surface and determining the effect of *E. ruticarpa* fruit extract and its fractions (fraction Q, evodiamine, rutaecarpine) on biofilm formation of *C. jejuni* on stainless steel surface and the effect of *E. ruticarpa* extract on the presence of signalling molecules AI-2.

3.1.3 Vpliv izvlečka *E. raticarpa* ter bakteriofaga PC5 na adhezivnost in invazivnost *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Kot najbolj učinkovita pri preprečevanju filmotvornosti testiranih sevov *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla sta se izkazala izvleček plodov *E. raticarpa* in frakcija Q. Vpliv izvlečka in evokarpina, ki je bil v največjem deležu (41,7%) zastopan v frakciji Q, smo zato preizkusili tudi na modelu humanih črevesnih epitelnih celic E12. V nadaljevanju smo nato preverili še kombiniran učinek posamezne testirane učinkovine; izvlečka in evokarpina v kombinaciji z litičnim bakteriofagom PC5. Shematski potek dela je prikazan na sliki 7.



Slika 7: Shema določanja vpliva izvlečka *E. raticarpa* (EREE) in evokarpina ter kombiniran učinek vsake izmed testiranih učinkovin z bakteriofagom PC5 na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12.

Figure 7: Flowchart of determining the anti-adhesive and anti-invasive effect of *E. raticarpa* extract (EREE) and evocarpine and its's combined effect with PC5 bacteriophage of *C. jejuni* on E12 cell line model.

3.2 MATERIALI

V tem poglavju je povzet material, ki smo ga uporabili pri eksperimentalnem delu v sklopu doktorske naloge.

3.2.1 Delovni mikroorganizmi

Vsi sevi bakterij *C. jejuni*, ki smo jih uporabili za izvedbo raziskovalnega dela v sklopu doktorske naloge, so del zbirke Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Za sklop poskusov, kjer smo iskali morebitne povezave med filmotvornostjo bakterij *C. jejuni* na polistirenu in ostalimi eksperimentalno določenimi feno- in genotipskimi lastnostmi, smo uporabili nabor 130 sevov z znanim virom izolacije (Preglednica 2). Gre za izolate iz Slovenije (n = 79), Avstrije (n = 30), Nemčije (n = 18), Bosne in Hercegovine (n = 1), Srbije (n = 1) ter referenčni sev *C. jejuni* ATCC 33560. Od teh je bila izvor 61 sevov perutnina, 40 je bilo humanih izolatov, 21 sevov je bilo povezano z govedom, 8 sevov *C. jejuni* pa je bilo izoliranih iz okolja.

Za sklop poskusov, kjer smo določali vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost, smo uporabili referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 ter njegova mutanta *cmeB* in *luxS*. Mutacija pri obeh sevih je bila izvedena z naravno transformacijo, kot opisano prej (Wang and Taylor, 1990; Klančnik in sod., 2012b). Nadaljnje poskuse določanja vpliva izvlečka *E. rutilarpa* in posameznih frakcij na filmotvornost ter prisotnost signalnih molekul AI-2 smo izvedli, kot navaja Bezek in sod. (2016). Za zaznavanje signalnih molekul AI-2 smo uporabili poročevalski sev *V. harveyi* BB170 (Vilchez in sod., 2007 in Taga in Xavier, 2011).

Pri določanju vpliva izvlečka *E. rutilarpa* in evokarpina na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti na modelu celične linije E12 smo uporabili seve *C. jejuni*, izolirane iz fecesa piščanca (11186/08 in 660/08), piščančjega mesa (K49/4) in kravjega mleka (670/08) ter referenčni sev NCTC 11168 (Preglednica 2, osenčeno). Za poskus določanja kombiniranega vpliva izvlečka *E. rutilarpa* ali evokarpina z bakteriofagom PC5 smo na podlagi referenčnih podatkov (Janež in sod., 2014) in predposkusov, kot ustreznega gostitelja uporabili sev *C. jejuni* 660/08.

Preglednica 2: Sevi *C. jejuni*, uporabljeni pri raziskovalnem delu

Table 2: *C. jejuni* strains, used in the experiments

Zap. št.	Sev	Vir	Zap. št.	Sev	Vir	Zap. št.	Sev	Vir
1	H7	človek	45	IVZ1374	perutnina	89	161	perutnina*
2	258	okolje	46	MRC-10/00019	človek	90	01/427/11z	človek
3	02/64/10c	človek	47	IVZ1539	perutnina	91	MRC-11/00015	človek
4	267	perutnina*	48	BfR-CA-07874	govedo	92	02/16/09c	človek
5	670/08	govedo	49	9581	človek	93	2252/09	perutnina*
6	BfR-CA-07401	perutnina	50	BfR-CA-11327	perutnina	94	MRC-10/00032	človek
7	BfR-CA-10767	govedo*	51	53191	človek	95	154	perutnina*
8	IVZ128c	perutnina	52	1292/08	govedo*	96	61035	perutnina
9	08/000314	govedo*	53	02/81/09c	govedo*	97	02/154/12c	človek
10	BfR-CA-06399	govedo	54	CFA12	perutnina	98	660/08	perutnina*
11	BfR-CA-07255	govedo	55	53124	perutnina	99	965/09	perutnina*
12	BfR-CA-07345	perutnina	56	885/2/08	perutnina	100	9152	človek
13	BfR-CA-07731	govedo	57	BfR-CA-06345	divja ptica*	101	02/84/10c	človek
14	BfR-CA-11627	govedo*	58	BfR-CA-06894	perutnina	102	ATCC 33560	govedo*
15	MRC-11/01076	govedo*	59	BfR-CA-11192	govedo*	103	01/711/11c	človek
16	9090	človek	60	K49/4	perutnina	104	MRC-10/00171	govedo*
17	9387	govedo*	61	BfR-CA-06896	govedo	105	MRC-13/00006	človek
18	9493	človek	62	266	okolje	106	71	perutnina*
19	9711	človek	63	885/1/08	perutnina	107	02/90/09c	človek
20	57360	perutnina	64	BfR-CA-07021	perutnina	108	132	perutnina
21	58429	perutnina	65	1297/08	perutnina*	109	9N	perutnina
22	60089	perutnina	66	128	perutnina	110	1591/08	perutnina*
23	08/000256	govedo*	67	02/109/12c	človek	111	08/000368	govedo*
24	1190/09	perutnina	68	MRC-12/00284	človek	112	02/321/12c	človek
25	1518/08	perutnina*	69	02/136/09c	človek	113	4N	perutnina
26	609/08	govedo*	70	02/77/11c	človek	114	C2	perutnina
27	BfR-CA-07507	perutnina	71	846/09	perutnina*	115	9544	človek
28	BfR-CA-08284	govedo	72	H1	človek	116	816	okolje
29	IVZ1416	perutnina	73	196	perutnina*	117	1604	okolje
30	MRC-09/00028	govedo*	74	C33	perutnina	118	CFA5	perutnina
31	57359	perutnina	75	130	perutnina	119	193	perutnina*
32	122/08	perutnina*	76	654/08	človek	120	180/08	govedo*
33	123/08	perutnina*	77	MRC-13/01900	perutnina*	121	02/35/10c	človek
34	1728/08	govedo*	78	9091	človek	122	17697/26	okolje
35	211/08	govedo*	79	9795	človek	123	02/55/11c	človek
36	244/08	perutnina*	80	9829	človek	124	59	perutnina*
37	375/06	človek	81	57357	perutnina	125	179	perutnina*
38	573/03	človek	82	60057	perutnina	126	183	perutnina*
39	BfR-CA-11317	govedo*	83	01/302/12z	človek	127	216	perutnina*
40	186	govedo*	84	02/13/10c	človek	128	70	perutnina*
41	1186/08	perutnina*	85	02/195/12c	človek	129	1603	okolje
42	1271/08	perutnina*	86	IVZ276	perutnina	130	07/807	okolje
43	BfR-CA-11386	govedo*	87	IVZ808	perutnina	131	NCTC 11168	človek
44	01/669/10z	človek	88	IVZ809	perutnina			

* pri viru seva *C. jejuni* pomeni, da je bil sev izoliran iz fecesa živali

3.2.2 Izvleček plodov *E. ruticarpa*

V poskusih smo uporabili kemijsko okarakteriziran izvleček plodov *E. ruticarpa* (A. Juss.) Benth. (Rutaceae) (ERE) in posamezne frakcije izvlečka; evodiamin, rutekarpin, evokarpin ter frakcijo Q; z 41,7 % deležem evokarpina. Izvleček in posamezne frakcije so bile pripravljene na Oddelku za farmakognozijo, Inštituta za farmacevtske znanosti, Univerze v Gradcu Avstrija, kot opisano pod točko 3.2.2.1. Založno koncentracijo izvlečka in posameznih frakcij smo pripravili v topilu DMSO in jih za posamezen poskus še dodatno redčili v ustreznom mediju. Vsebnost topila DMSO v vseh končnih raztopinah je bila $\leq 1\%$.

3.2.2.1 Priprava in fitokemijska analiza izvlečka

Za pripravo izvlečka plodov *E. ruticarpa* (Plantasia; kat. št. 040377, Oberndorf, Avstria) je bilo 100 g rastlinskega materiala najprej izpostavljeni maceraciji v 1 L EtOH (96 %) 72 ur pri sobni temperaturi. Sledila sta filtracija in koncentriranje izvlečka z uporabo rotacijskega uparjalnika pri nizkem pritisku in temperaturi 40 °C. Izkoristek na 100 g rastlinskega materiala je bil 18,6 %. Posamezne frakcije so bile ločene z uporabo tankoplastne kromatografije s silika gelom kot stacionarno fazo in kvantificirane s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (angl. High performance liquid chromatography; HPLC) na koloni Zorbax SB C-18, 3,5 µm, 2,1 mm \times 150 mm (Agilent) in gradientnim spiranjem z 0,1 % mravljično kislino v vodi (eluent A) in 0,1 % mravljično kislino (eluent B).

4(1H)-kvinolinonski alkaloidi so bili kvantificirani pri valovni dolžini 318 nm, ob uporabi *cis*-evokarpina kot zunanjega standarda (Wube in sod., 2011), evodiamin pri valovni dolžini 265 nm in rutekarpin pri valovni dolžini 336 nm. Posamezne frakcije so bile nato identificirane z uporabo tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo (angl. High-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-mass spectrometry; LC-PDA-ESI-MS), kot opisano prej (Sugimoto in sod., 1988; Tang in sod., 1996; Zhou in sod. 2010).

Potrjena je bila prisotnost 13 strukturno različnih komponent EREE, med katerimi dve do zdaj še nista bili opisani (6, 7). V največjem deležu sta bila prisotna indolokvinazolna alkaloida evodiamin in rutekarpin ter 4(1H)-kvinolinon 9. Delež kvinolinonskih alkaloidov v frakciji Q je bil naslednji; 3 (6,3 %), 4 (9,5 %), 5 (0,7%), 8 (20,2%), 9 (41,7%), 10 (0,7%) in 11 (20,9%) (Preglednica 3).

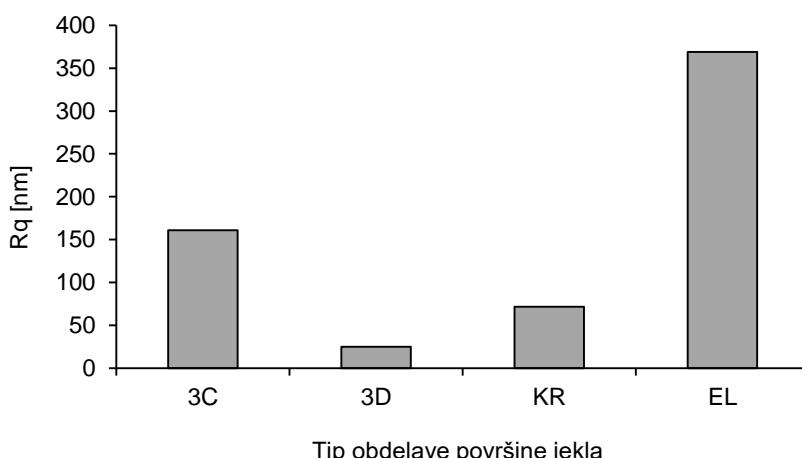
Preglednica 3: Vsebnost posameznih frakcij (mg/g) izvlečka plodov *E. ruticarpa* (EREEL)
Table 3: Content of individual fractions (mg/g) of *E. ruticarpa* fruit extract (EREEL)

Komponenta	mg/g EREE	STD (n=4), mg/g	% EREE (w/w)
Evodiamin (1)	36,45	1,49	3,64
Rutekarpin (2)	50,40	0,65	5,04
1-Metil-2-nonil-4(1H)-kvinolinon (3)	2,83	0,04	0,28
1-Me-2-(Z-6-undecenil)-4(1H)-kvinolinon (4)	5,55	0,06	0,56
1-Me-2-(4Z,7Z-tridecadienil)-4(1H)-kvinolinon (5)	2,09	0,02	0,21
1-Me-2-(pentadecatrienil)-4(1H)-kvinolinon (6)	2,06	0,03	0,21
1-Me-2-(pentadecatrienil)-4(1H)-kvinolinon (7)	0,39	0,03	0,04
1-Me-2-undecil-4(1H)-kvinolinon (8)	9,09	0,14	0,91
Evokarpin (1-Metil-2-8Z-tridecen-il-4(1H)-kvinolinon) (9)	51,55	0,71	5,16
1-Me-2-(6Z,9Z-pentadecadienil)-4(1H)-kvinolinon (10)	14,21	0,29	1,42
1-Methyl-2-tridecil-4(1H)-kvinolinon (11)	16,30	0,19	1,63
1-Me-2-(6Z/10Z-pentadecenil)-4(1H)-kvinolinon (12)	2,00	0,05	0,20
1-Me-2-(6Z/10Z-pentadecenil)-4(1H)-kvinolinon (13)	1,60	0,01	0,16

* število v oklepaju za posamezno frakcijo pomeni vrstni red ločevanja s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

3.2.3 Nerjavno jeklo kot abiotika kontaktna površina

Za določanje vpliva hrapavosti oz. različne obdelave kontaktne površine na filmotvornost bakterij *C. jejuni* smo uporabili kupone nerjavnega jekla (1×1 cm; 2 mm) tipov 304 in 316L. Gre za zlitino kroma in niklja, pri čemer je jeklo tipa 316L zaradi vsebnosti molibdena bolj odporno proti koroziji in oksidaciji. Hrapavost površine je bila določena z mikroskopom na atomsko silo, kot so opisali Nipič in sod. (2016). Glede na obdelavo površine kuponov smo imeli kupone z neobdelano (3C), polirano (3D), krtačeno (KR) in elektropolirano (EL) površino (Slika 8).



Slika 8: Hrapavost (Rq) štirih različno obdelanih površin nerjavnega jekla; neobdelana (3C), polirana (3D), krtačena (KR) in elektropolirana (EL) površina (Nipič in sod., 2016).

Figure 8: Roughness (Rq) of four differently treated stainless steel surfaces: untreated (3C), polished (3D), brushed (KR) and electropolished (EL) surface (Nipič et al., 2016).

V nadalnjih poskusih določanja vpliva izvlečka *E. ruitcarpa* in posameznih frakcij smo uporabili diske (12 mm × 1,2 mm) neobdelane površine nerjavnega jekla tipa 304. Za diske okrogle oblike smo se odločili z namenom zmanjšati morebitno napako zaradi neravnih robov. Kuponi in diskki so bili pred uporabo razmaščeni v 96 % EtOH ter sterilizirani v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

3.2.4 Celični liniji HT-29 in E12

Za izvedbo *in vitro* poskusov smo uporabili humani črevesni epitelni celični liniji HT-29 in E12, ki izvirata iz adenokarcinoma debelega črevesa človeka. Celično linijo HT-29 smo pridobili iz banke celičnih linij ATCC (*angl. American Type Culture Collection*) in celično linijo E12 iz banke celičnih linij ECACC (*angl. European Collection of Authenticated Cell Cultures*). HT-29 celična linija je zaradi sposobnosti diferenciacije v enterocite zelo uporabna kot model za epitelij tankega črevesa pri človeku. Celična linija E12 je subklon izvorne celične linije HT-29, ki se je po tretiranju z metotreksatom diferencirala v mukus izločajoče celice (Lesuffleur in sod., 1990).

3.2.5 Bakteriofag PC5

Uporabili smo litični bakteriofag PC5 iz zbirke Centra odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolu (COBIK). Bakteriofag, shranjen v 1× pufru SM smo najprej s postopkom ultrafiltracije skozi pore velikosti 0,22 µm pripravili v mediju za gojenje celičnih kultur in določili titer (PFU/mL). Vse metode dela, uporabljene pri delu z bakteriofagom PC5, so bile opisane prej (Carlson, 2005; Janež in sod., 2014). Tako pripravljeno suspenzijo bakteriofaga smo uporabili pri nadalnjih poskusih določanja vpliva izvlečka *E. ruitcarpa* in evokarpina na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12.

3.2.6 Mediji za delo z bakterijami

Za vzdrževanje, gojenje in shranjevanje sevov bakterij smo uporabili medije, navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Trdni in tekoči mediji, uporabljeni za delo z bakterijami
Table 4: Solid and liquid media used for experimental work with bacteria

SESTAVA	PRIPRAVA
Autoinducer Bioassay medij (AB)	
Natrijev klorid; NaCl (Merck, Nemčija) Magnezijev sulfat; MgSO ₄ (Merck, Nemčija) Kazamino kisline (Becton Dickinson, ZDA) dH ₂ O 1 M K-fosfatni pufer (pH=7,0) L-arginin (Merck, Nemčija) glicerol (Kemika, Hrvaška)	Gojišče smo pripravili kot je bilo opisano prej (Bassler in sod., 1994). Natehtali smo 17,5 g NaCl, 12,3 g MgSO ₄ , 2 g kazamino kislin ter jih raztopili v 1 L dH ₂ O in vrednost pH umerili na 7,5. Po sterilizaciji smo aseptično dodali še 10 ml 1 M K-fosfatnega pufra, 10 ml 0,1 M L-arginina in 10 ml glicerola. Do uporabe smo medij shranili pri 4 °C.
Tekoče gojišče možgansko-srčni infuzijski bujon (BHI)	
Osnovni medij; Brain Heart Infusion (Merck, Nemčija) dH ₂ O	19,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Do uporabe smo medij shranili pri 4 °C.
Tekoče gojišče Mueller-Hinton bujon (MHB)	
Osnovni medij; Mueller Hinton Broth (Oxoid, Anglija) dH ₂ O	10,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Do uporabe smo medij shranili pri 4 °C.
Trdno gojišče Mueller Hinton agar (MHA)	
Osnovni medij; Mueller Hinton Agar (Oxoid, Anglija) dH ₂ O	19 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Gojišče smo aseptično vlili v sterilne petrijevke in plošče z medijem do uporabe shranili pri 4 °C.
Trdno selektivno gojišče Columbia krvni agar	
Osnovni medij; Columbia Agar Base (Oxoid, Anglija) Sterilna defibrilirana konjska kri (Oxoid, Anglija) Dodatek za rast; <i>Campylobacter</i> Growth Supplement (Oxoid, Anglija) Dodatek za selektivnost; Columbia Selective Supplement Skirrow (Oxoid, Anglija) dH ₂ O	19,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Po sterilizaciji smo medij ohladili na 45 °C in aseptično dodali 25 mL defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C) ter raztopini dodatka za rast (Oxoid, SR232E) in selektivnost (Oxoid, SR0069E). Gojišče smo premešali in aseptično vlili v sterilne petrijevke. Do uporabe smo medij shranili pri 4 °C.
Trdno selektivno gojišče Karmali	
Osnovni medij; <i>Campylobacter</i> blood free medium base (Oxoid, Anglija) Dodatek za selektivnost; <i>Campylobacter</i> Selective Supplement (Oxoid, Anglija) dH ₂ O	23,35 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Po sterilizaciji smo medij ohladili na 45 °C in aseptično dodali raztopino dodatka za selektivnost (Oxoid, SR0167E). Gojišče smo premešali in aseptično vlili v sterilne petrijevke in plošče z medijem do uporabe shranili pri 4 °C.
Trdno gojišče triptični sojin agar (TSA)	
Osnovni medij; Tryptic Soy Agar (Oxoid, Anglija) dH ₂ O	20 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Ko se je gojišče ohladilo na 45 °C smo ga aseptično vlili v sterilne petrijevke in plošče z medijem do uporabe shranili pri 4 °C.

3.2.7 Reagenti in raztopine za delo z bakterijami

To poglavje povzema reagente in raztopine, ki smo jih uporabili za delo z bakterijami, glede na posamezen sklop poskusov.

3.2.7.1 Reagenti in raztopine za delo z bakterijami

Preglednica 5: Reagenti in raztopine, uporabljeni za delo z bakterijami

Table 5: Reagents and solutions used for experimental work with bacteria

RAZTOPINE, REAGENTI	PRIPRAVA
Fiziološka raztopina puferirana s fosfatnim pufrom (PBS)	
PBS tablete (Oxoid, Anglija) dH ₂ O	Po navodilih proizvajalca smo eno tableto PBS raztopili v 100 mL dH ₂ O in raztopino sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Do uporabe smo raztopino PBS shranili pri 4 °C.
Kristal vijolično	
Kristal vijolično (Merck, Nemčija) ddH ₂ O	Komercialno pripravljeno založno raztopino kristal vijoličnega smo redčili z ddH ₂ O, do želene končne koncentracije.
EtOH	
Absolutni etanol EtOH (Merck, Nemčija) ddH ₂ O	Absolutni etanol smo zmešali z ddH ₂ O v želenem razmerju in ga nato do uporabe shranili pri 4 °C.
Dimetildulfoksid (DMSO)	
DMSO (Sigma-Aldrich, ZDA)	DMSO smo uporabili kot topilo za pripravo založne koncentracije izvlečka <i>E. ruticarpa</i> in posameznih frakcij.

3.2.7.2 Reagenti in kiti za ugotavljanje živosti bakterij

Preglednica 6: Reagenti in kiti za ugotavljanje živosti bakterij

Table 6: Reagents and kits used for bacteria viability testing

REAGENTI, KITI	PRIPRAVA
Kit za določanje živosti bakterij na podlagi luminiscence	
CellTiter-Glo Luminescence Viability assay (Promega, ZDA)	Kit smo uporabili po navodilih proizvajalca in prek jakosti luminiscence, ki je proporcionalna količini prisotnega ATP, določili živost bakterij.
Komercialne mikrotitrskne ploščice za določanje odpornosti proti antibiotikom	
<i>Campylobacter</i> Sensititre EUCLAMP microtiter plates (Thermo Fisher Scientific, ZDA)	Komercialno pripravljene mikrotitrskne ploščice smo uporabili po navodilih proizvajalca za določanje odpornosti proti sedmim antibiotikom (eritromicin, ciprofloksacin, gentamicin, kloramfenikol, nalidiksinska kislina, streptomicin in tetraciklin).
Reagent za določanje živosti celic na podlagi fluorescence	
PrestoBlue cell viability reagent (Invitrogen, ZDA)	Reagent smo uporabili po navodilih proizvajalca in ga dodali suspenziji bakterij v končni koncentraciji 10 % ter po 1,5 h inkubaciji izmerili intenzitetu fluorescence pri vzbujevalni valovni dolžini 535 nm in emisijski valovni dolžini 595 nm.

3.2.7.3 Reagenti in raztopine za tipizacijo bakterij *C. jejuni* z MLST

Preglednica 7: Reagenti in raztopine za tipizacijo *C. jejuni* z MLST

Table 7: Reagents and solutions for the MLST typing of *C. jejuni*

RAZTOPINE, REAGENTI	PRIPRAVA
Reagent za lizo celic in ekstrakcijo DNA	
PrepMan® Ultra (Applied Biosystems, ZDA)	Lizate celic smo pripravili po navodilih proizvajalca.
Mešanica PCR za tipizacijo MLST	
Pufer za PCR; 5 X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, ZDA) MgCl ₂ ; 25 mM (Promega, ZDA) Mešanica dNTP; 100 mM (Roche, Švica) Začetni oligonukleotidi; 100 µM (Sigma-Aldrich, ZDA) Voda za PCR (Sigma, ZDA) DNK polimeraza; GoTaq® Flexi DNA Polymerase; 5 U/µL (Promega, ZDA)	Iz založnih koncentracij smo komponente za mešanico pripravili v končnih koncentracijah kot sledi; pufer za PCR v 1× končni koncentraciji; MgCl ₂ v končni koncentraciji 2 mM; mešanico dNTP v končni koncentraciji 0,2 mM; DNA polimerazo smo pripravili v končni koncentraciji 0,5 U/µL; in začetne oligonukleotide v končni koncentraciji 5 pmol/µL.
50× TEA pufer	
Tris baza; 0,4 M (Sigma-Aldrich, ZDA) Oacetna kislina; 100 % (Merck, Nemčija) Na ₂ EDTA × 2H ₂ O; 0,02 M (Sigma-Aldrich, ZDA) dH ₂ O	Natehtali smo 242 g Tris baze in 37,2 g Na ₂ EDTA × 2H ₂ O in jih raztopili v 750 mL dH ₂ O. Nato smo odmerili še 57,1 ml acetne kisline in dopolnili dH ₂ O do 1000 mL in raztopili komponente s pomočjo magnetnega mešala. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) in ga do uporabe shranili pri 4 °C.
Molekulske označevalec dolžin pomnožkov DNK	
DNK lestvica; 100 bp (Thermo Scientific, ZDA) Nanašalni pufer, 6× (Thermo Scientific, ZDA) Voda za PCR (Sigma-Aldrich, ZDA)	Molekulske označevalec smo pripravili tako, da smo zmešali 100 µL DNK lestvice, 100 µL nanašalnega pufra in 350 µL vode za PCR. Mešanico smo do uporabe shranili pri 4 °C.
Agarozna gelska elektroforeza	
1× TEA pufer Agaroza za rutinsko uporabo (Sigma-Aldrich, ZDA)	1× TEA pufer smo pripravili z redčenjem 50× TEA pufra v dH ₂ O. Pripravili smo 1 % agarozni gel.
Raztopina etidijevega bromida	
Etidijev bromid (Sigma-Aldrich, ZDA) dH ₂ O	Agarozni gel smo barvali v raztopini etidijevega bromida v končni koncentraciji 0,5 µg/mL.
Mešanica za encimsko čiščenje PCR pomnožkov za tipizacijo MLST	
Rakova alkalna fosfataza; 1U/µL (Fermentas, ZDA) 10× defosforilacijski pufer SAP (Fermentas, ZDA) Eksonukleaza I; 20 U/µL (New England Biolabs, ZDA)	Mešanico za encimsko čiščenje smo pripravili iz 150 µL rakove alkalne fosfataze, 30 µL 10× pufra SAP in 7,5 µL eksonukleaze I. Mešanico smo do uporabe shranili pri -20 °C.
Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje	
Začetni oligonukleotidi v koncentraciji 100 µM - aspartaza (<i>aspA</i>) - glutamin sintetaza (<i>glnA</i>) - citrat sintaza (<i>gltA</i>) - serin hidroksil metil transferaza (<i>glyA</i>) - fosfo-glukomutaza (<i>pgm</i>) - transketolaza (<i>tkt</i>) - α podenota ATP sintaze (<i>uncA</i>) ddH ₂ O za PCR (Sigma-Aldrich, ZDA).	Začetne oligonukleotidov v založni koncentraciji 100 µM smo pripravili tako, da smo 10 µL redčili v 90 µL ddH ₂ O za PCR in dobili delovno koncentracijo 10 pmol/µL.

3.2.7.4 Reagenti in raztopine za tipizacijo bakterij *C. jejuni* s PFGE

Preglednica 8: Reagenti in raztopine za tipizacijo bakterij *C. jejuni* s PFGE

Table 8: Reagents and solutions for the PFGE typing of *C. jejuni*

RAZTOPINE, REAGENTI, KITI	PRIPRAVA
1 M Tris HCl pufer; pH = 8	
Tris (hidroksimetil) aminometan (Sigma, ZDA) dH ₂ O	Natehtali smo 121,1 g Tris (hidroksimetil) aminometana in ga raztopili v 800 ml dH ₂ O ter umerili pH na vrednost 8 ter dopolnili z dH ₂ O do 1 L. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) in ga do uporabe shranili pri 4 °C.
10× PBS pufer; pH = 7,4	
Natrijev klorid; NaCl (Sigma, ZDA) Kalijev klorid; KCl (Sigma, ZDA) Natrijev hidrogenfosfat; Na ₂ HPO ₄ (Sigma, ZDA) Kalijev dihidreogenfosfat; KH ₂ PO ₄ (Sigma, ZDA) dH ₂ O	Natehtali smo 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ in dodali 800 mL dH ₂ O ter umerili pH na vrednost 7,4. Nato smo dopolnili z dH ₂ O do 1 L in pufer sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) ter ga do uporabe shranili pri 4 °C.
0,5 M EDTA; pH = 8	
Etilendiamintetraocetna kislina; EDTA (Sigma, ZDA) dH ₂ O	Natehtali smo 186,1 g EDTA in dodali 800 mL dH ₂ O ter pH umerili na vrednost 8. Nato smo dopolnili z dH ₂ O do 1 L ter pufer sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) in ga do uporabe shranili pri 4 °C.
TE pufer	
1 M Tris HCl pufer (pH = 8) 0,5 M EDTA (pH = 8) dH ₂ O	Odmerili smo 10 mL 1 M Tris HCl pufra in 2 mL 0,5 M raztopine EDTA in dopolnili z vodo do 1 L. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) in ga do uporabe shranili pri 4 °C.
Pufer za lizo celic	
1 M pufer Tris (pH = 8) 0,5 M EDTA (pH = 8) Lauroilsarkozin (Sigma, ZDA) dH ₂ O	V 375 mL dH ₂ O smo raztopili 25 mL 1M Tris pufra, 50 mL 0,5 M raztopine EDTA in 5 g lauroilsarkozina. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) ter ga do uporabe shranili pri 4 °C.
0,5× Tris-Borate EDTA (TBE) pufer	
10× TBE pufer; pH = 8,3 (Roth, Nemčija) ddH ₂ O	Komercialno pripravljeno 10× raztopino TBE pufra smo redčili z ddH ₂ O do končne koncentracije 0,5× TBE in ga do uporabe shranili pri sobni temperaturi.
1% agarozni gel za pripravo agaroznih blokcev	
SeaKem Gold agaroza (Lonza, Švica) TE pufer	V 25 mL pufra TE smo raztopili 0,25 g SeaKem gold agaroze in jo pred pripravo agaroznih blokcev inkubirali v vodni kopeli pri 56 °C.
1% agarozni gel za gelsko elektroforezo	
SeaKem Gold agaroza (Lonza, Švica) TE pufer	V 150 mL 0,5× TBE pufra smo raztopili 1,5 g SeaKem Gold agaroze in jo za pripravo elektroforetskega gela ohladili na 55 °C in vili v model za elektroforezo.
Etidijev bromid	
Etidijev bromid (Sigma-Aldrich, ZDA) ddH ₂ O	Za barvanje elektroforetskega gela smo pripravili raztopino etidijevega bromida tako, da smo 50 µL etidijevega bromida v založni koncentraciji 10 mg/mL raztopili v 500 mL ddH ₂ O.

3.2.7.5 Medji in raztopine za delo z bakteriofagom PC5

Preglednica 9: Medji in raztopine, uporabljeni za delo z bakteriofagom PC5

Table 9: Media and solutions, used in the experiments with PC5 bacteriophage

RAZTOPINE, REAGENTI	PRIPRAVA	
0,7 % mehki agar	Osnovni medij; Mueller Hinton Broth (Oxoid, Anglija) Agar (Biolife, Italija) dH ₂ O	Natehtali smo 4,2 g osnovnega medija in 1,4 g agarja in ju raztopili v 200 mL dH ₂ O ter sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Gojišče smo prenesli v vodno kopel nastavljeno na 55 °C in ga svežega uporabili za določanje titra bakteriofaga.
Solno magnezijev (SM) pufer	Natrijev klorid; NaCl (Merck, Nemčija) 2 % raztopina želatine (Merck, Nemčija) Magnezijev sulfat heptahidrat; MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, ZDA) 1 M Tris-HCl (pH = 7,5) dH ₂ O	Za 4× založno raztopino SM pufra smo natehtali 11,6 g NaCl in 4 g MgSO ₄ ·7H ₂ O ter odmerili 100 mL 1 M pufera Tris-HCl in 10 mL 2% želatine. Nato smo dopolnili z dH ₂ O do 500 mL in pufer sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) in ga do uporabe shranili pri 4 °C. Za pripravo 1× SM pufra smo založno raztopino primerno redčili z dH ₂ O.

3.2.8 Medji in raztopine za delo s celičnimi kulturami

V preglednici 10 so navedeni medji, raztopine ter reagenti, ki smo jih uporabili pri delu s celičnimi kulturami.

Preglednica 10: Medji, raztopine in reagenti uporabljeni za delo s celičnimi kulturami

Table 10: Media, solutions and reagents, used for the work with cell lines in culture

RAZTOPINE, REAGENTI	PRIPRAVA
Medij za vzdrževanje celičnih kultur	
Osnovni medij; Advanced Dulbrecco Modified Eagle Medium (ADMEM; Gibco, ZDA) ali enakovredno Mega Cell (Sigma-Aldrich, ZDA) Fetalni goveji serum; FBS (Gibco, ZDA) GlutaMAX (Gibco, ZDA)	Osnoven medij za namnoževanje in vzdrževanje celičnih kultur smo pripravili tako, da smo komercialnemu mediju dodali FBS v končni koncentraciji 5 % in GlutaMAX v končni koncentraciji 1 %.
Fiziološka raztopina puferirana s fosfatnim pufrom (PBS; pH = 7,4)	
PBS (Gibco, ZDA)	Za delo s celičnimi kulturami smo uporabili že pripravljeno raztopino PBS.
Gentamicin	
Gentamicin (Thermo Fisher Scientific, ZDA) v založni koncentraciji 50 mg/mL	Gentamicin smo uporabljali kot dodatek mediju za gojenje celičnih kultur, v končni koncentraciji 30 µg/mL.
Alcian modro	
Barvilo Alcian blue (Merck, Nemčija) Ocetna kislina (Sigma-Aldrich, ZDA)	Uporabili smo že pripravljeno komercialno barvilo Alcian modro, ki smo mu dodali ocetno kislino v končni koncentraciji 3 %.
Dimetilsulfoksid (DMSO)	
DMSO (Sigma-Aldrich, ZDA)	DMSO v končni koncentraciji 5–10 %, skupaj s FBS in ADMEM, smo uporabljali za shranjevanje celičnih linij.

3.2.9 Laboratorijski material in oprema

To poglavje povzema laboratorijski material in opremo, ki smo jo uporabili pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Preglednica 11: V poskusih uporabljen laboratorijski material

Table 11: Laboratory materials, used in the experiments

LABORATORIJSKI MATERIJAL	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Anaerobni lonci, posode	AG0025A Genbox	Oxoid, Anglija BioMérieux, Francija
Avtomatske pipete in nastavki	10 µL, 20–200 µL, 1000 µL, 10 mL	Eppendorf, Nemčija Gilson, Francija
Burker-Türk števna komora	/	Brand, Nemčija
Filtri s porami 0,22 µm	SLGV033RS,	Merck, Nemčija
Gojitvene posode za celice	T-25, T-75	TPP, Švica
Krioepruvete	2 mL	Greiner Bio-One, Nemčija
Merilni valji	/	Plastibrand, Nemčija
Mikrocentrifugirke	1,5 in 2 mL	Eppendorf, Nemčija
Parafilm	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, ZDA
Polistirenske mikrotitrskie ploščice	96F 6F, 24F, 96F	Nunc, Danska TPP, Švica
Plastične centrifugirke	15 in 50 mL	TPP, Švica
Plastične cepilne zanke	10 µL	Labortehnika Golias, Slovenija
Plastične kivete	/	Sarstedt, Nemčija
Plastični sterilni lončki	100 mL	Labortehnika Golias, Slovenija
Plastične sterilne pipete	5 mL, 10 mL, 25 mL	
Steklene čaše in epruvete	/	Brand, Nemčija
Borosilikatne kroglice	premer 2 mm	Sigma-Aldrich, ZDA
Steklenice z navojem	250 mL, 500 mL, 1000 mL	Duran, Nemčija
Sterilne plastične petrijeve plošče	Fi 70 in Fi 90	Labortehnika Golias, Slovenija

Poleg naštetega smo uporabili še preostanek laboratorijskega pribora ter potrošni material, kot so stojala za epruvete in mikrocentrifugirke, štoparice, pincete, ročni števec kolonij, zaščitne rokavice, vrečke za avtoklaviranje odpadnega materiala.

Preglednica 12: Laboratorijska oprema uporabljena pri izvedbi eksperimentalnega dela
Table 12: Laboratory equipment, used in the experimental work

LABORATORIJSKA OPREMA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Aparatura za PCR	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, ZDA
Aparatura za PFGE	Chef DR III	Bio-Rad, ZDA
Avtoklav	Tip 500×700 A-21 in A-63 C	Sutjeska, Beograd Kambič, Slovenija
Brezprašna komora	SMBC 122AV in LFVP9	IskraPIO, Slovenija
Centrifuga za 1,5 in 2 mL epice	MiniSpin	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga z možnostjo hlajenja	3K30 Heraeus Multifuge 1-R	Sigma, ZDA Kendro, ZDA
Čitalec mikrotitrskih ploščic	Safire 2 in Infinite f200	Tecan Trading, AG Švica
Digestorij	Tip 382	Med-lab Rauh, Slovenija
Hladilnik	/	Zanussi, Japonska Gorenje, Slovenija
Inkubator	I 150 C MIR 153	Kambič, Slovenija Sanyo, Japonska
Inkubator za celične kulture	Heracell 150	Heraeus, Nemčija
Invertni mikroskop s kamero Olympus	IX 51	Olympus, Japonska
Magnetno mešalo	RCT basic	IKA, Nemčija
Mikrovalovna pećica	Cook n'grill 1300	Sanyo, Japonska
pH meter	Seven multi	Mettler Toledo, ZDA
Plinski gorilnik	/	/
Plinska jeklenka z mešanico plinov	10 % CO ₂ , 3 % O ₂ , 87 % N ₂	Istrabenz, Slovenija
Sistem za dokumentiranje gelov	Gel Doc 2000	Bio-Rad, ZDA
Sistem za agarozno gelsko elektroforezo	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, ZDA
Spektrofotometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, ZDA
Sušilna omara	SO-250	Elektromedicina, Slovenija
Tehtnice	PB 1502-S Sartorius, analytic ME5 in CP 2202S-OCE	Mettler Toledo, ZDA GMBH, Nemčija Sartorius, Švica
Termoblok	Thermomixer comfort	Eppendorf, Nemčija
Vakuumska črpalka	Air CADet	Cole Parmer, ZDA
Vodna kopel	WB-13EHK in Julabo	Kambič, Slovenija
Vrtinčno mešalo	Yellowline 104 EV	Ika, Belgija Tehtnica, Slovenija
Zamrzovalna omara -80 °C	MDF-U5386S-PE HERAfreeze HFU T Series	Panasonic, Japonska Thermo Scientific, ZDA
Zamrzovalnik -20 °C	/ MDF-U333	LHT, Slovenija Sanyo, Japonska

Poleg zgoraj navedenega laboratorijskega materiala in opreme smo uporabili še programsko opremo, kot so Bionumerics (Applied Maths, Belgija), Magellan (Tecan, Švica), Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, ZDA), SPSS 21.0 (*angl. Statistical Package for the Social Sciences*; IBM, ZDA).

3.3 METODE DELA

V tem poglavju so opisane metode dela, ki smo jih uporabili za izvedbo posameznih tematskih sklopov poskusov v okviru doktorske naloge. Prvi sklop poskusov se nanaša na nabor 130 sevov *C. jejuni*, znotraj katerega smo skušali najti povezavo med stopnjo filmotvornosti, z izbranimi feno- in genotipskimi lastnostmi sevov. V okviru drugega sklopa poskusov smo določali vpliv hrapavosti, oz. različne obdelave površine nerjavnega jekla na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni*. Na izbrani površini nerjavnega jekla smo nato določali vpliv izvlečka plodov *E. ruticarpa* in posameznih frakcij izvlečka na filmotvornost in prisotnost signalnih molekul AI-2 referenčnega seva *C. jejuni*. Tretji sklop je povzemal poskuse na modelu humanih črevesnih epitelnih celic E12. Preverjali smo vpliv izvlečka *E. ruticarpa* in njegove frakcije evokarpina na preprečevanje adhezivnosti ter invazivnosti izbranih sevov *C. jejuni*. Tretji sklop poskusov smo dopolnili še z določanjem kombiniranega vpliva izvlečka ali evokarpina na adhezivnost in invazivnost seva *C. jejuni* 660/08, na modelu celične linije E12.

3.3.1 Priprava delovnih kultur bakterij *C. jejuni*

Sevi bakterij *C. jejuni*, ki smo jih uporabili pri poskusih, so bili trajno shranjeni v mediju BHI z dodatkom 20 % glicerola in 5 % defibrilirane konjske krvi, pri temperaturi –80 °C. Posamezen sev smo najprej nacepili na sterilno selektivno trdno gojišče v petrijevkah in plošče inkubirali 24 ur pri temperaturi 42 °C in mikraerofilnih pogojih (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂). Za vse nadaljnje poskuse smo uporabili kulturo bakterij *C. jejuni* v eksponentni fazi rasti. Samo pripravo inokuluma smo prilagodili glede na posamezen sklop poskusov in je opisana pri sami izvedbi.

3.3.2 Tipizacija bakterij *C. jejuni*

Na naboru 130 sevov *C. jejuni* z znanim virom izolacije smo kot fenotipski lastnosti z metodo barvanja s kristal vijoličnim določili filmotvornost na polistirenu ter odpornost proti antibiotikom z uporabo komercialnih plošč Sensititre. Genotip smo določili na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) in gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE). Povezavo med filmotvornostjo sevov *C. jejuni* na površini polistirena, z ostalimi testiranimi lastnostmi, smo najprej preverili s pomočjo prikaza v obliki razsevnega diagrama korespondenčne analize. Statistično značilnost povezav med posameznimi lastnostmi smo nato preverili z uporabo Pearsonovega testa hi-kvadrat (χ^2) v programu SPSS. Kot statistično značilno smo ovrednotili rezultate s stopnjo značilnosti $p \leq 0,05$.

3.3.2.1 Filmotvornost na površini polistirena

Filmotvornost sevov *C. jejuni* smo določali v polistirenskih mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinami in ravnim dnom, po predhodno opisani metodi barvanja s kristal vijoličnim, z nekaj prilagoditvami (Stepanović in sod., 2000; Teh in sod., 2010). Če povzamemo, so bili sevi shranjeni pri -80°C najprej nacepljeni na trdno selektivno gojišče Karmali. Po prekonočni inkubaciji pri 42°C in mikraerofilnih pogojih smo biomaso ene kolonije prenesli v 10 mL gojišča MHB in kulturo inkubirali prek noči. Za pripravo inokuluma smo prekonočno kulturo redčili do končne optične gostote $\text{OD}_{600} = 0,02$. Za posamezen sev smo po 200 μL kulture inokuluma odpipetirali v 16 vdolbin polistirenske mikrotitrskie ploščice in kot negativno kontrolo uporabili sterilen medij brez dodanega inokuluma bakterij. Ploščice smo inkubirali 42 ur pri 42°C in mikraerofilnih pogojih. Po inkubaciji smo suspenzijo bakterij odpipetirali in vdolbine trikrat sprali s pufrom PBS. Mikrobeno biomaso na površini polistirena smo fiksirali s feniranjem 10 minut pri 60°C . Sledilo je 15-minutno barvanje z 1 % kristal vijoličnim, po katerem smo nevezano barvilo sprali pod tekočo vodo in ploščice ponovno posušili s feniranjem 10 minut pri 60°C . Vezano barvilo smo nato sprostili z dodatkom 200 μL 98 % etanola. Filmotvornost sevov smo določili na podlagi izmerjenih vrednosti absorbance kristal vijoličnega v raztopini, pri valovni dolžini 595 nm. Najprej smo preverili statistično značilnost razlik med izmerjenimi vrednostmi absorbance kristal vijoličnega za posamezen sev in vrednostmi negativne kontrole z uporabo programske opreme SPSS. Nato smo od izmerjenih vrednosti v raztopino sproščenega kristal vijoličnega za posamezen sev odšteli povprečno vrednost vezanega kristal vijoličnega negativne kontrole (ΔA_{595}). Seve smo glede na vrednosti absorbance kristal vijoličnega razvrstili v kvartile, kot navajajo Naves in sod. (2008). Presejalni test določanja filmotvornosti sevov *C. jejuni* je bil izveden v eni biološki in 16 tehničnih ponovitvah, za kar smo se odločili na osnovi same namembnosti testa.

3.3.2.2 Določanje odpornosti proti antibiotikom z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču

Odpornost sevov *C. jejuni* proti 7 različnim antibiotikom (ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu, kloramfenikolu, nalidiksinski kislini, streptomycinu in tetraciklinu) smo določili po navodilih proizvajalca komercialnih mikrotitrskih ploščic Sensititre®, s prilagoditvami kot navaja Kovač (2011). Inokulum bakterij *C. jejuni* smo pripravili iz prekonočne kulture na površini trdnega gojišča. Biomaso smo z vatenko prenesli v 5 mL gojišča Sensititre® CAMHBT in koncentracijo glede na skalo McFarland umerili na vrednost 0,5. Nato smo 100 μL suspenzije bakterij prenesli v 11 mL gojišča Sensititre® CAMHBT+LHB in po 100 μL pripravljenega inokuluma prenesli v vdolbine plošč Sensititre®, jih pokrili s folijo in inkubirali 24 ur pri 42°C in mikraerofilnih pogojih. Glede na odčitane vrednosti MIK smo na podlagi mejnih vrednosti določili občutljivost na antibiotike (Technical specifications ..., 2012; EUCAST, 2015). Kot večkratno odporne seve smo določili tiste, ki so bili odporni proti vsaj trem različnim razredom antibiotikov.

3.3.2.3 Tipizacija MLST

Razvrstitev sevov *C. jejuni* glede na multilokusna zaporedja sedmih hišnih genov je bila izvedena, kot opisano prej (Dingle in sod., 2001; Kovač in sod., 2014). Za izolacijo DNK smo uporabili reagent PrepMan® Ultra, po navodilih proizvajalca. V 100 µL reagenta smo iz površine trdnega gojišča prenesli biomaso bakterij *C. jejuni* in jo resuspendirali z mešanjem na vrtinčniku. Sledila je 10 minutna inkubacija v vodni kopeli pri temperaturi 100 °C, nato 2 min hlajenje pri sobni temperaturi ter centrifugiranje pri 12000 obratih/minuto. Nato smo 50 µL supernatanta, kjer se je nahajala DNK, prenesli v novo mikrocentrifugirko in vzorce do uporabe shranili pri –20 °C. Za vsak sev je bilo za pomnožitev zapisa za sedem hišnih genov (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) narejenih sedem reakcij PCR. Sestava reakcijske mešanice za PCR, v končnem volumnu 50 µL, je prikazana v preglednici 13.

Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za tipizacijo MLST

Table 13: Reaction mix composition for MLST typing

Posamezna komponenta	Količina za eno reakcijo PCR [µL]
Pufer za PCR; 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	9,2
MgCl ₂	3,7
dNTP	3,7
DNK polimeraza; GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,1
Mešanica začetnih oligonukleofidov - L in R	4,6
Voda za PCR	27,7
DNK	1,0

Program pomnožitve specifičnih odsekov DNK je naveden v preglednici 14. Prisotnost in velikost pomnožkov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, ki je je potekala pod pogoji: 120 V, 400 mA, 25–30 minut. Agarozni gel smo po končani elektroforezi 10 minut inkubirali v raztopini etidiyevega bromida in rezultate vizualizirali pod UV-svetlobo.

Preglednica 14: Program pomnoževanja specifičnih odsekov DNK za tipizacijo MLST

Table 14: The amplification program of specific DNA segments for MLST typing

Korak	Temperatura [°C]	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	96	8 min	1
Denaturacija	94	30 s	30
Naleganje začetnih oligonukleotidov	52	30 s	
Podaljševanje verige	72	1 min	
Končno podaljševanje verige	72	7 min	1
Ohlajanje	4	∞	1

Pred pošiljanjem vzorcev za določanje nukleotidnega zaporedja (Macrogen, Južna Koreja) smo pomnožke DNK še encimsko čistili z mešanico ExoISAP, v aparaturi za PCR. Najprej je potekala razgradnja ssDNA 45 min pri 37 °C, nato inaktivacija encimov 20 min pri temperaturi 80 °C, čemur je sledilo ohlajanje. V posamezno vdolbino mikrotitrsko ploščice smo nato dodali še 5 µL začetnih oligonukleotidov za sekvenciranje (5 pmol/µL) in plosče do pošiljanja shranili pri –20 °C.

Na podlagi znanih nukleotidnih zaporedij smo z uporabo programa BioNumerics in medmrežne baze podatkov MLST (Jolley in Maiden, 2010) za vsak sev določili sekvenčni tip in klonski kompleks. Podatki tipizacije MLST za 42 sevov so bili dostopni iz predhodnih raziskav našega laboratorija (Kovač in sod., 2014).

3.3.2.4 Tipizacija PFGE

Tipizacijo PFGE sevov *C. jejuni* smo izvedli po korakih prosto dostopnega PulseNet protokola (Pulsenet International, 2013), pri čemer smo za rezanje genomske DNK uporabili restriktični encim *SmaI*.

3.3.2.4.1 Priprava agaroznih blokcev

Iz prekonočne kulture na trdnem gojišču TSA smo najprej pripravili suspenzijo bakterij tako, da smo biomaso resuspendirali v 2 mL 1× PBS pufra, do optične gostote OD₆₁₀ = 0,68. Nato smo 400 µL suspenzije prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke, dodali 20 µL proteinaze K in vsebino vklopili v 400 µL raztopljene agaroze pri 56 °C. Modelčke z agaroznimi blokci smo za 5 minut postavili na 4 °C, da so se strdili. Agarozne blokce smo potisnili v 5 mL prej pripravljenega pufra za lizo celic, ki smo mu dodali še 25 µL Proteinaze K. Agarozne blokce smo nato 2 uri stresali v vodni kopeli pri 54 °C in 120 obratih/min. Po inkubaciji smo agarozne blokce sprali in sicer 2× z 10 mL ddH₂O, ogrete na 54 °C za 10 minut s stresanjem pri 54 °C in 120 obratih/min in še 3× s pufrom TE s stresanjem pri 54 °C in 120 obratih/min. Agarozne blokce smo prenesli v 5 mL pufra TE in jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.3.2.4.2 Restrikcija genomske DNK v agaroznih blokcih in gelska elektroforeza

Agarozni blokec z genomsko DNK bakterij *C. jejuni* smo s skalpelom razrezali na približno 2 do 2,5 mm velike koščke in posameznega prenesli v 100 µL predrestriktičskega pufra ter jih 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo pufer odstranili in dodali 100 µL restriktičske mešanice encima *SmaI* (50 U/µL) v ustreznom pufru in blokce 4 ure inkubirali pri 25 °C. Fragmente DNK smo ločili v 1 % (v/v) SeaKem Gold agaroznem gelu v 0,5× TBE pufru, na sistemu Chef DR III. Elektroforeza je potekala 22,5 ur pri temperaturi 14 °C in pri napetosti 6 V/cm ter kotu spremenjanja smeri toka 120 °. Začetni in končni pulzni čas sta bila 5 oziroma 55 sekund. Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 minut s stresanjem v raztopini etidijevega bromida, ki smo jo pripravili tako, da smo 50 µl etidijevega bromida (10 mg/mL) raztoplili v 500 mL ddH₂O. Po razbarvanju v dH₂O smo gel fotografirali pod UV svetlobo z digitalnim dokumentacijskim sistemom Gel Doc 2000. Stopnjo sorodnosti med sevi smo določili na osnovi primerjave restriktičskih vzorcev DNK in kot tesno sorodne označili tiste seve, ki se med seboj razlikovali v največ treh fragmentih (Tenover in sod., 1995).

Slike v formatu TIFF (*angl.* Tagged Image File Format) smo analizirali s pomočjo uporabe programa BioNumerics verzija 6,6. Kot standardno DNK s fragmenti znane velikosti, na katero smo normalizirali naše vzorce in za kontrolo same izvedbe PFGE smo uporabili sev *Salmonella* ser. Braenderup H9812.

3.3.3 Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij *C. jejuni*

Za določanje vpliva hrapavosti oz. površinske obdelave kontaktne površine na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovega mutanta *luxS* smo uporabili kupone iz nerjavnega jekla, tipov 304 in 316L. Kupone nerjavnega jekla smo inkubirali skupaj s suspenzijo bakterij v tekočem gojišču MHB ter po 24, 48 in 72 urah inkubacije s kolorimetrično in gojitveno metodo ovrednotili biomaso pritrjenih bakterij.

Princip kolorimetrične metode je obarvanje pritrjenih celic, spiranje ter razbarvanje z alkoholom in spektrofotometrično določanje količine vezanega barvila. Kristal vijolično je kationsko barvilo, ki se veže na negativno nabite površinske molekule in zunajcelične polisaharide (Li in sod., 2003). Količina vezanega barvila je prenosorazmerna mikrobnim biomasi, vendar lahko na vezavo barvila vplivajo morfološke in fiziološke lastnosti celic ter kemikske interakcije barvila z ostalimi snovmi (Niu in Gilberti, 2004). Na drugi strani pa je princip gojitvene metode ta, da najprej iz preiskovane površine mehansko odstranimo pritrjene celice v suspenzijo, naredimo redčitveno vrsto in določimo njihovo število prek CFU/ml (Sanders in sod., 2007; Reeser in sod., 2007).

3.3.3.1 Določanje filmotvornosti s kolorimetrično metodo

Filmotvornost na različno obdelani površini kuponov iz nerjavnega jekla smo določili za referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovega mutanta *luxS*. Nastali biofilm smo kvantificirali z merjenjem absorbance raztopine barvila kristal vijolično, ki se je vezalo na mikrobeno biomaso na površini kuponov nerjavnega jekla po prej opisani metodi (O'Toole in Kolter., 1998; Kubota in sod., 2008).

Inokulum smo pripravili iz prekonočne kulture posameznega seva *C. jejuni* tako, da smo jo $10\times$ redčili v sterilnem gojišču MHB brez dodane krvi in dobro premešali. Nato smo 3 mL razredčene kulture dodali v vdolbino mikrotitrsko ploščico, kamor smo predhodno aseptično namestili kupone z enako obdelano površino v 3–4 ponovitvah. Uporabili smo mikrotitrsko ploščico s šestimi vdolbinami ali pa sterilne petrijevke premera 3 cm. Kupone posamezne površine smo uporabili tolkokrat, da smo poskus lahko izvedli v časovnih intervalih 24, 48 in 72 ur inkubacije pri temperaturi 42 °C in mikraerofilnih pogojih. Kot negativno kontrolo smo kuponom posamezne površine dodali enak volumen sterilnega gojišča MHB in inkubirali pod istimi pogoji. Po inkubaciji smo suspenzijo bakterij oziroma sterilnega gojišča pri negativnih kontrolah odstranili in kupone 3× sprali s 3 mL PBS. Pritrjene celice in nastali biofilm smo nato fiksirali s sušenjem 10 min pri ~60 °C.

Kupone smo po dodatku 1 % kristal vijoličnega za 15 min inkubirali pri sobni temperaturi. Barvilo smo odstranili in kupone 3× sprali s 3 mL PBS ter jih posušili pri ~60 °C. Kupone nerjavnega jekla smo prenesli v novo mikrotitrsko ploščico s 24 vdolbinami in dodali 300 µL 96 % EtOH ter 2 min stresali na stresalniku. Nato smo 200 µL raztopine kristal vijoličnega v EtOH prenesli v novo mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami in s čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerili absorbanco pri valovni dolžini 620 nm. Izračunali smo povprečno vrednost absorbance negativnih kontrol za posamezno površino in jo odsteli od vrednosti absorbance barvila na kuponih, inkubiranih s suspenzijo bakterij (ΔA_{620}). Vrednosti ΔA_{620} smo uporabili kot merilo za filmotvornost sevov *C. jejuni* na različno obdelani površini nerjavnega jekla. Poskus smo znotraj vsake izmed dveh časovno ločenih bioloških ponovitev izvedli vsaj v treh paralelkah.

3.3.3.2 Določanje filmotvornosti z gojitveno metodo

Kot drugo metodo določanja filmotvornosti referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *luxS* smo uporabili določanje števila v biofilmu viabilnih bakterij s štetjem na trdnem gojišču poraslih kolonij (CFU/mL), kot opisano prej (Sanders in sod., 2007; Reeser in sod., 2007). Poskus smo nastavili enako kot pri določanju filmotvornosti z metodo barvanja s kristal vijoličnim, opisano pod točko 3.3.3.1. Poskus smo znotraj ene same biološke ponovitve izvedli vsaj v treh paralelkah za posamezno površino.

Po inkubaciji in odstranitvi supernatanta smo kupone 3× sprali s 3 mL PBS. Posamezen kupon smo nato prenesi v epruveto, kamor smo predhodno aseptično dodali 2 mL PBS in 10–15 borosilikatnih kroglic. Na površino kuponov vezane bakterije smo z mešanjem na vrtinčniku sprostili v PBS. Nato smo iz suspenzije bakterij v PBS pripravili redčitveno vrsto ter posamezne razredčine vzorca nacepili na trdno gojišče MHA. Po 48-urni inkubaciji pri 42 °C in mikroaerofilnih pogojih smo iz števila kolonij na števnih ploščah izračunali povprečno število kolonijskih enot, na 1 mL izhodnega vzorca (CFU/mL) po enačbi (1):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 * n_2) * R} \quad \dots (1)$$

- N število enot, ki tvorijo kolonije
- $\sum C$ vsota vseh kolonij na števnih ploščah
- n_1 število petrijevk pri prvi razredčitvi vzorca
- n_2 število petrijevk pri drugi razredčitvi vzorca
- R prva razredčitev vzorca, pri kateri smo prešteli kolonije

3.3.4 Vpliv izvlečka *E. rutilarpa* in posameznih frakcij na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla

S težnjo po odkritju učinkovine, ki bi imela zavirajoči učinek na adhezivnost oz. tvorbo biofilma bakterij *C. jejuni*, smo preverili tovrsten potencial izvlečka plodov *E. rutilarpa* ter posameznih frakcij; frakcije Q, evodiamina in rutekarpina. Za izbrane učinkovine smo najprej določili vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) in jih v poskusu uporabili v koncentracijah, ki za *C. jejuni* niso bile baktericidne (0,25 MIK). Na izbrani površini nerjavnega jekla smo filmotvornost bakterij *C. jejuni* določili z gojitveno metodo. Po inkubaciji smo na diske nerjavnega jekla nevezane ali slabo vezane bakterije sprali s PBS in diske aseptično prenesli v sterilne plastične epruvete s PBS in steklenimi kroglicami. Vsebino smo premešali na vrtinčniku in iz suspenzije bakterij pripravili redčitveno vrsto ter posamezne redčitve nacepili na površino trdnega gojišča MHA. Iz števila poraslih kolonij smo dobili koncentracijo na diske pritrjenih bakterij. Hkrati smo določili tudi vpliv izvlečka in posameznih frakcij na koncentracijo v supernatantu prisotnih signalnih molekul AI-2.

3.3.4.1 Protimikrobeno delovanje izvlečka na referenčni sev *C. jejuni* in njegova mutanta *cmeB* in *luxS*

Za določanje vrednosti MIK smo najprej pripravili založno raztopino izvlečka *E. rutilarpa* in posameznih frakcij v topilu DMSO. Nadaljnji koraki so sledili prej opisani metodi (Klančnik in sod., 2009). Delovno raztopino učinkovin smo pripravili tako, da smo 50 µL osnovne raztopine razredčili v 450 µL tekočega gojišča MHB. Nato smo po 100 µL delovne raztopine prenesli v prve vrstice mikrotitrske ploščice s 96 vdolbinami in naredili dvakratne razredčitve v MHB. V vdolbine z različnimi koncentracijami testnih učinkovin smo dodali 50 µL premešane pripravljene kulture sevov *C. jejuni*. Sledila je 24-urna inkubacija pri 42 °C in mikraerofilnih pogojih. Po inkubaciji smo vrednosti MIK določili s pomočjo komercialno dostopnega reagenta CellTiter-Glo® in luminiscenco izmerili s čitalcem mikrotitrskih ploščic. Kot vrednost MIK smo določili koncentracijo, pri kateri po 24-urni inkubaciji ni bilo izmeriti luminiscence ozziroma živosti bakterij. Kot kontrola je služila suspenzija bakterij, brez dodanih učinkovin in pa suspenzija bakterij s koncentracijami topila, enakimi kot pri razredčitvah samih testiranih učinkovin. Poskus smo znotraj vsake izmed dveh časovno ločenih bioloških ponovitev izvedli vsaj v štirih paralelkah.

3.3.4.2 Vpliv izvlečka na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na neobdelani površini nerjavnega jekla

Za pripravo inokuluma smo biomaso ene kolonije posameznega seva s površine trdnega selektivnega gojišča prenesli v 5 mL tekočega gojišča MHB, obogatenega s konjsko krvjo v končni koncentraciji 5 %. Sledila je inkubacija 24 ur pri 42 °C v mikraerofilnih pogojih. Prekonočno kulturo smo v razmerju 1 : 10 redčili v svežem gojišču MHB brez dodane krvi in slednje uporabili kot inokulum. Koncentracijo bakterij v inokulumu smo nato določili naknadno z metodo štetja kolonij na površini trdnega gojišča MHA.

Za določanje vpliva izvlečka *E. ruticarpa* in posameznih frakcij (frakcija Q z 41,7 % deležem evokarpina, evodiamin in rutekarpin) na preprečevanje filmotvornosti referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* smo uporabili diske iz nerjavnega jekla tipa 304 (okrogli, 12 mm × 1,2 mm). V vsako izmed vdolbin mikrotitrsko ploščice s 24 vdolbinami smo najprej aseptično namestili disk nerjavnega jekla. V posamezno vdolbino smo nato dodali pripravljen inokulum bakterij ter učinkovine v končni koncentraciji 0,25 MIK. Hkrati smo kot pozitivno kontrolo uporabili diske, s suspenzijo sevov, brez dodanih učinkovin ter kot negativno kontrolo uporabili diske s sterilnim medijem. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 1 uro, 24 ur, 48 ur in 72 ur, pri 42 °C in mikraerofilnih pogojih. Vpliv učinkovin na preprečevanje filmotvornosti smo določili posredno, prek določanja števila viabilnih celic bakterij na površini nerjavnega jekla, kot opisano pod točko 3.3.3.2. Poskus smo znotraj vsake izmed dveh časovno ločenih bioloških ponovitev izvedli vsaj v treh paralelkah.

3.3.4.3 Vpliv izvlečka na prisotnost signalnih molekul AI-2

Pri poskusu določanja vpliva izvlečka *E. ruticarpa* in posameznih frakcij na preprečevanje filmotvornosti bakterij *C. jejuni* smo vzporedno določili tudi vpliv na prisotnost signalnih molekul AI-2, kot opisano prej (Taga in Xavier, 2011; Vilchez in sod., 2007). Po 48-urni inkubaciji smo iz suspenzije nad diskimi nerjavnega jekla najprej pripravili supernatant brez bakterijskih celic (*angl. cell-free supernatant; CFS*). Suspenzijo smo najprej 5 min centrifugirali pri 9500 g in supernatant filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,22 µm in do uporabe shranili pri temperaturi –20 °C. Za detekcijo prisotnosti signalnih molekul AI-2 smo prekonočno kulturo poročevalskega seva *V. harveyi* BB170 razredčili v tekočem mediju AB v razmerju 1 : 5000 in 90 µL odpipetirali v vdolbine 96F mikrotitrsko ploščico. Poročevalskemu sevu v mikrotitrski ploščici smo nato dodali 10 µL CFS bakterij *C. jejuni* in vsakih 30 minut med inkubacijo pri 30 °C izmerili luminiscenco, vse do najvišjega signala pri kontrolnem sevu *V. harveyi* BB170. Rezultate smo prikazali kot odstotek znižanja koncentracije signalnih molekul AI-2, ob dodatku posameznih frakcij ali izvlečka *E. ruticarpa*, v primerjavi s pozitivno kontrolo brez dodanih testiranih učinkovin.

3.3.5 Vpliv izvlečka *E. rutilarpa* in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Glede na rezultate določanja vpliva izvlečka *E. rutilarpa* in posameznih frakcij na preprečevanje filmotvornosti bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla smo se za nadaljnje delo odločili učinek najobetavnejših preizkusiti tudi na modelu celične linije E12. Vpliv izvlečka in evokarpina, ki je bil v največjem deležu zastopan v frakciji Q, smo testirali na sevih *C. jejuni*, ki prihajajo iz živilske oskrbovalne verige. Vse poskuse smo izvedli v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinami in volumnom 100 µL, po 3-urni inkubaciji pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂, na osnovi prej opisanih metod dela (van Alphen in sod., 2008; Alemka in sod. 2010a; Pogačar in sod., 2015).

3.3.5.1 Osnovne metode dela s celičnimi kulturami

Za delo s celičnimi kulturami je potrebna visoka stopnja aseptičnosti in laboratorijska oprema, kot sta inkubator s prilagojeno atmosfero in invertni mikroskop. Celično kulturo med poskusi vzdržujemo z menjavo medija in presajanjem, ko je to potrebno. Inkubacija celic poteka pri temperaturi 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ (Martínez-Maqueda in sod., 2015). Celične linije so bile trajno shranjene v mediju ADMEM z 20 % FBS ter 10 % DMSO, pri temperaturi –80 °C in koncentraciji vsaj 3×10⁶ celic/ml. Pri odmrzovanju smo kriovalo najprej postavili v vodno kopel pri 37 °C za toliko časa, da je vsebina prešla v tekoče stanje in suspenzijo celic prenesli v sveži medij ADMEM z dodanim gentamicinom ter pustili, da so se celice pritrdile. Da bi se izognili morebitnemu citotoksičnemu učinku DMSO, smo celicam na koncu delovnega dne zamenjali medij. Za gojenje celic smo uporabili medij ADMEM, dopolnjeno z 10 mM glutamina, 5 % FBS ter antibiotikom gentamicinom v končni koncentraciji 30 µg/mL. Za spiranje celic smo uporabili 1× PBS, za ločevanje celic od podlage pa 0,025 % raztopino tripsina z dodatkom 0,75 mM EDTA. Rast celic smo spremljali s pomočjo invertnega mikroskopa in jim na vsake 3 dni zamenjali medij ter jih presadili, ko so prerasle dno gojitvene posode. Za pripravo celic v suspenziji želene koncentracije smo celice po ločevanju od podlage prešteli na Bürker-Türk števni komori in koncentracijo preračunali iz števila celic v definiranem območju, znanega volumna. Število celic v 1 ml vzorca smo izračunali s pomočjo enačbe (2):

$$X = \frac{\bar{N} * R * F}{V_{\text{vzorca}} [\text{mL}]} \quad \dots (2)$$

X število celic na 1 mL vzorca

\bar{N} povprečno število preštetih celic (v kvadratu s stranico 1 mm)

F faktor števne mrežice ($F = 1000 \text{ mm}^3 / 0,1 \text{ mm}^3$)

R redčitev vzorca

3.3.5.2 Določanje prisotnosti mukusa

Za določanje prisotnosti kislih mukopolisaharidov smo uporabili barvilo Alcian modro, po predhodno opisani metodi (D'Agostino in sod., 2012). Celični liniji E12 in HT-29 smo v kulturi gojili do konfluentnosti in jih po tripsinizaciji pripravili v padajoči koncentraciji ter nasadili v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami. Prisotnost kislih mukopolisaharidov smo določali dnevno. Najprej smo odstranili medij in celice 10 min fiksirali z raztopino ledeno mrzlega etanola (95 %) in ocetne kisline (5 %). Celice smo pri sobni temperaturi 5 min inkubirali z raztopino barvila Alcian modro (1 %) in ocetne kisline (3 %). Nato smo celice trikrat sprali s PBS in s pomočjo invertnega mikroskopa vizualizirali prisotnost modro obarvanih mukopolisaharidov.

3.3.5.3 Citotoksičnost izvlečka in evokarpina za celice E12

Princip same metode določanje citotoksičnosti z reagentom PrestoBlue je fluorimetrično in kolorimetrično zaznavanje metabolne aktivnosti celic prek redukcije resazurina v resorufin. Primeren je za določanje preživetja oziroma viabilnosti celičnih linij različnega izvora kot tudi bakterij in kvasovk. Moder nefluorescenten resazurin lahko prosto prehaja v celice, kjer se zaradi encimatske dejavnosti v mitohondrijih ali citosolu reducira v rdeče obarvan fluorescenten resorufin (Invitrogen, 2012; Lall in sod., 2013). Reagent smo uporabili po navodilih proizvajalca (Invitrogen 2010). Za določanje citotoksičnosti izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina smo celice nasadili na ploščo s 96 vdolbinami v treh paralelkah. V posamezno vdolbino smo odpipetirali po $100 \mu\text{L}$ suspenzije celic v gostoti 1×10^5 celic/mL. Ploščico s celicami smo inkubirali 24 ur v inkubatorju pri temperaturi 37°C in atmosferi s 5 % CO_2 .

Po 24 urah smo gojitveni medij odstranili, celice enkrat sprali s PBS in jim dodali predhodno pripravljene učinkovine v padajoči koncentraciji ter v kontrolne vdolbine celicam dodali samo medij z ustrezno koncentracijo topila (DMSO) in celice inkubirali še nadaljnjih 48 ur. Po 48 urah smo dodani medij z ali brez učinkovin odstranili, celice dvakrat sprali s PBS in jim dodali $100 \mu\text{L}$ svežega gojišča z reagentom PrestoBlue v končni koncentraciji 10 % in ploščico inkubirali še 90 minut. Nato smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerili intenziteto fluorescence pri vzbujevalni valovni dolžini 535 nm in emisijski valovni dolžini 595 nm ($F_{535/595}$) (Tecan Group, 2013). Izmerjeno vrednost intenzitete fluorescence vdolbin s celicami in testiranimi učinkovinami smo normalizirali na vrednost pozitivnih kontrol in rezultate prikazali kot preživetje celic. Poskus smo izvedli v dveh časovno ločenih bioloških ponovitvah in vsaj treh paralelkah.

3.3.5.4 Protimikrobovo delovanje izvlečka in evokarpina na izolate bakterij *C. jejuni*

Izbrane seve bakterij *C. jejuni* izolirane iz živilske oskrbovalne verige (11186/08, 660/08, K49/4 in 670/08), ter referenčni sev NCTC 11168 smo najprej oživeli na površini trdnega selektivnega gojišča. Za določanje vrednosti MIK smo uporabili reagent PrestoBlue, na osnovi predhodno opisane metode (Lall in sod., 2013). V vdolbine mikrotitrskih plošč 96F smo najprej odpipetirali po 90 µL v sterilnem gojišču MHB pripravljenih redčitev izvlečka *E. rutilarpa* in evokarpina. Nato smo k posamezni razredčini testirane učinkovine dodali še 10 µL suspenzije bakterij, pripravljene iz biomase prekonočne kulture posameznega seva *C. jejuni*. Mikrotitrskih ploščic smo pokrili ter 24 ur inkubirali pri temperaturi 42 °C in mikraerofilnih pogojih. Po inkubaciji smo v vsako vdolbino mikrotiterske ploščice dodali 10 µL reagenta PrestoBlue in po 90 min inkubacije pomerili intenzitetu fluorescence pri vzbujevalni valovni dolžini 535 nm in emisijski valovni dolžini 595 nm. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili suspenzijo bakterij z dodano enako koncentracijo topila DMSO kot pri posameznih redčitvah testiranih učinkovin. Izmerjene vrednosti intenzitete fluorescence pri testnih vdolbinah smo normalizirali na vrednost pozitivnih kontrol in rezultate prikazali kot preživetje bakterij. Poskus smo znotraj vsake izmed dveh časovno ločenih bioloških ponovitev izvedli vsaj v treh paralelkah.

3.3.5.5 Priprava celičnih kultur pred nanosom bakterij *C. jejuni*

Po tripsinizaciji smo suspenzijo humanih črevesnih epitelnih celic E12 v svežem mediju redčili do želene koncentracije in 100 µL suspenzije celic v gostoti 1×10^5 celic/mL odpipetirali v vdolbine mikrotitrskih ploščic 96F. Ploščico smo inkubirali pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂. Celice smo vsakodnevno spremljali s pomočjo invertnega mikroskopa in od tretjega dne naprej celicam dnevno menjavali medij. Zadnjih 48 ur smo uporabili medij brez dodanega antibiotika. Pred nanosom suspenzije bakterij osmi dan od nasaditve celic smo medij najprej odstranili in sloj celic sprali s PBS.

3.3.5.6 Vpliv izvlečka in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Za določanje vpliva izvlečka *E. rutilarpa* in evokarpina na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije, smo uporabili 8 dni staro kulturo humanih črevesnih epitelnih celic E12. Celice smo pred poskusom infekcije pripravili, kot je opisano v poglavju 3.3.5.5. Inokulum bakterij *C. jejuni* za infekcijo celic smo pripravili iz prekonočne kulture na trdnem gojišču MHA tako, da smo biomaso resuspendirali v 4 mL medija ADMEM brez dodanega antibiotika. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali suspenzijo bakterij ter razredčino učinkovine v končni koncentraciji 0,75 MIK, ki smo jo določili s PrestoBlue, opisano pod točko 3.3.5.4. Kot kontrola nam je služila suspenzija bakterij, ki smo ji dodali sterilen medij ADMEM, volumsko enako, kot je bilo posamezne učinkovine.

Nato smo $100 \mu\text{L}$ pripravljene suspenzije bakterij in preiskovanih učinkovin prenesli na celice E12 in 3 ure inkubirali pri 37°C in atmosferi s 5 % CO_2 . Po inkubaciji smo suspenzijo bakterij odstranili in sloj epitelnih celic $3\times$ sprali s pufrom PBS, ogretim na 37°C . Za določanje skupnega števila adheriranih bakterij smo sloj epitelnih celic 15 minut lizirali ob dodatku 0,1 % detergenta Triton-X-100. Suspenzijo iz ene vdolbine na mikrotitrski ploščici smo uporabili za pripravo redčitvene vrste v PBS ter posamezne razredčine vzorca nacepili na trdno gojišče MHA. Za določanje števila invadiranih bakterij smo po koraku spiranja na celice E12 nanesli $100 \mu\text{L}$ medija ADMEM z gentamicinom v končni koncentraciji $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ in inkubirali 1 uro. Celice smo nato znova sprali s pufrom PBS in jih 15 minut lizirali ob dodatku 0,1 % detergenta Triton-X-100. Iz lizata celic smo v pufru PBS pripravili redčitveno vrsto ter posamezne razredčine vzorca nacepili na trdno gojišče MHA. Po 48-urni inkubaciji pri 42°C in mikroaerofilnih pogojih smo iz števila kolonij na števnih ploščah izračunali povprečno število kolonijskih enot na mL izhodnega vzorca (CFU/mL) z uporabo enačbe 1.

3.3.6 Kombiniran vpliv izvlečka *E. ruticarpa* ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Za določanje vpliva izvlečka *E. ruticarpa* ali evokarpina ter litičnega bakteriofaga PC5 smo prav tako uporabili 8 dni staro kulturo celic E12. Suspenzijo bakterij seva *C. jejuni* 660/08 smo pripravili enako, kot opisano pod točko 3.3.5.6. Najprej smo preverili, kako dodatek litičnega bakteriofaga PC5 ob različnih nastavitevah poskusa, vpliva na število skupno adheriranih in invadiranih bakterij *C. jejuni*. V nadaljevanju eksperimentalnega dela je sledilo določanje fagocitnosti testiranih učinkovin in vpliv kombiniranega učinka izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5. Takšnega koncepta poskusa v literaturi še nismo zasledili, zato smo metodo prilagodili namenu.

3.3.6.1 Vpliv bakteriofaga PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12

Glede na potrebno začetno interakcijo bakteriofaga z gostiteljem smo najprej preizkusili ali enourna predinkubacije celic E12 z bakteriofagom oziroma bakterijami vpliva na samo učinkovitost bakteriofaga na število skupno adheriranih oziroma invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08. Za poskus infekcije smo suspenzijo bakterij seva *C. jejuni* 660/08 smo pripravili enako, kot je opisano pod točko 3.3.5.6. in uporabili suspenzijo bakteriofaga v mediju ADMEM, z začetnim titrom $1\times10^8 \text{ PFU}/\text{mL}$. Poskus smo nastavili tako, da smo za infekcijo 8 dni starega sloja celic E12 uporabili suspenzijo bakterij (K1); suspenzijo bakterij in bakteriofaga, ki smo jo istočasno nanesli na sloj celic (P1); suspenzijo bakteriofaga, ki smo jo najprej eno uro inkubirali na sloju celic in nato dodali še suspenzijo bakterij (P2); ter suspenzijo bakterij, ki smo jo najprej eno uro inkubirali na sloju celic in nato za dve uri dodali še suspenzijo bakteriofaga (P3).

3.3.6.2 Fagocitnost izvlečka in evokarpina za bakteriofag PC5

Za določanje fagocitnosti izvlečka in evokarpina smo izhodno suspenzijo bakteriofaga PC5 redčili v 1× pufru SM do 10^{-2} in 10 µL odpipetirali k predhodno pripravljenim padajočim koncentracijam testiranih učinkovin na mikrotitrski ploščici 96F v dveh paralelkah. Po 3- in 24-urni inkubaciji pri temperaturi 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ smo z metodo štetja plakov v kapljici (*angl. spot assay*) določili titer bakteriofaga PC5. Najprej smo na 90 mm ploščah z gojiščem MHA pripravili 0,7 % mehki agar MHA, ki smo mu pred razlitjem dodali 500 µL prekonočne suspenzije gostiteljskega seva *C. jejuni* 660/08. Po inkubaciji smo nato 10 µL razredčine vzorcev v 1× pufru SM nakapljali na površino mehkega agarja in plošče inkubirali 24 ur pri 42 °C in mikroaerofilnih pogojih. Iz preštetih plakov v kapljici na površini mehkega agarja smo izračunali število PFU/mL s pomočjo enačbe (3):

$$P = \frac{\bar{N} * R}{V_{vzorca} [\text{mL}]} \quad \dots (3)$$

- X titer bakteriofaga [PFU/ml]
- \bar{N} povprečno število plakov
- R redčitev vzorca

3.3.6.3 Kombiniran vpliv izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali suspenzijo bakterij in posamezno razredčino učinkovine v končni koncentraciji 0,75 MIK in suspenzijo bakteriofaga PC5. Kot ena izmed kontrol nam je služila suspenzija bakterij, ki smo ji dodali sterilni medij ADMEM, volumsko enako, kot je bilo posamezne učinkovine (K1). Druga kontrola pa je bila suspenzija bakteriofaga, ki smo mu dodali enak volumen sterilnega medija ADMEM, kot je bila razredčina učinkovin (P1). Nato smo 100 µL pripravljene suspenzije bakterij in posamezne učinkovine; izvlečka *E. rutilarpa* (P2) ali evokarpina (P3) z dodanim bakteriofagom PC5 prenesli na celice E12 in 3 ure inkubirali pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂.

Skupno število adheriranih bakterij smo določili, kot je opisano pod točko 3.3.5.6. Hkrati smo določili tudi titer bakteriofaga tako, da smo po 10 µL razredčine vzorca nanesli na površino trate bakterijske kulture v 0,7 % mehkem agarju. Po 48-urni inkubaciji plošč smo določili število plakov s štetjem čistin na trati bakterijske kulture.

3.3.7 Statistično vrednotenje rezultatov

Za statistično vrednotenje rezultatov eksperimentalnega dela smo uporabili programsko opremo SPSS 21.0 (IBM, ZDA). Za preverjanje statistično značilnih razlik smo uporabili Mann-Whitneyev U test, kjer smo imeli dva neodvisna vzorca, in Kruskal-Wallis test, kjer smo imeli več kot dva neodvisna vzorca, saj proučevane številske spremenljivke niso bile normalno porazdeljene. Kot statistično značilno smo ovrednotili rezultate s stopnjo značilnosti $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

Izhajajoč iz postavljenih delovnih hipotez smo preverili, (I) ali je filmotvornost sevov *C. jejuni* na površini polistirena povezana z odpornostjo proti antibiotikom ali z genotipom na osnovi tipizacij MLST in PFGE; (II) ali različna obdelava površine nerjavnega jekla vpliva na filmotvornost bakterij *C. jejuni*; (III) ali izvleček plodov *E. ruticarpa* in posamezne frakcije izvlečka v subinhibitorni koncentraciji vplivajo na filmotvornost ter prisotnost signalnih molekul AI-2 bakterij *C. jejuni*; (IV) ali izvleček in evokarpin vplivata tudi na število skupno adheriranih in invadiranih bakterij *C. jejuni* iz živilske oskrbovalne verige na modelu celične linije E12; (V) ali hkratna uporaba izvlečka ali evokarpina ter bakteriofaga PC5 še dodatno zniža število skupno adheriranih in invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12.

4.1 TIPIZACIJA BAKTERIJ *C. jejuni*

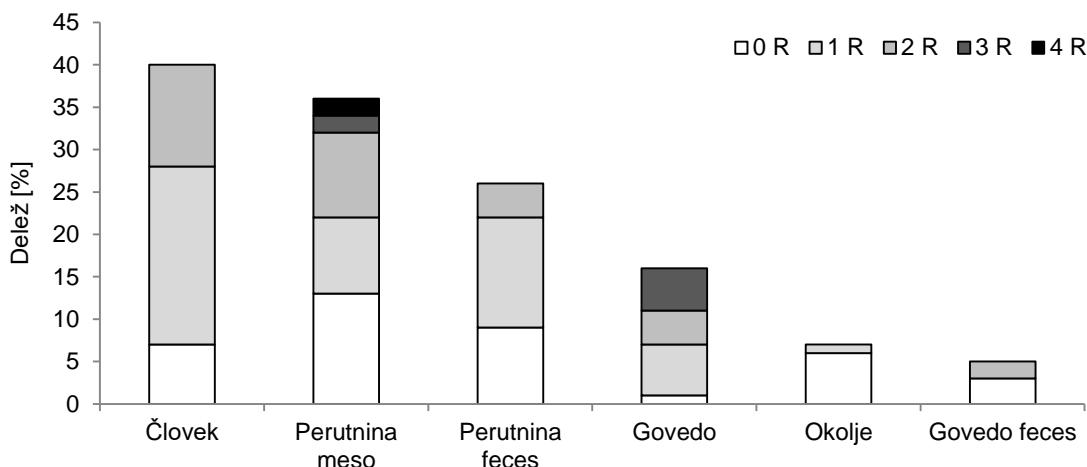
Za boljši vpogled v ozadje sposobnosti adhezije in tvorbe biofilma bakterij *C. jejuni* smo na naboru 130 sevov kot fenotipski lastnosti z uporabo kolorimetrične metode določili filmotvornost na polistirenu in z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču odpornost proti izbranim antibiotikom (rezistotip). Kot metodi za genotipizacijo smo uporabili MLST in PFGE. Rezultati določenih lastnosti so povzeti v Prilogi A.

4.1.1 Filmotvornost na površini polistirena

Metodo določanja filmotvornosti s kristal vijoličnim smo uporabili glede na namembnost, saj smo jo smatrali za najprimernejšo za hiter pregled velikega števila sevov. Vrednosti vezanega kristal vijoličnega na mikrobeno biomaso po 48-urni inkubaciji pri 42 °C in mikroaerofilnih pogojih so bile za vse testirane seve ($n = 130$) statistično značilno različne ($p \leq 0,05$) od vrednosti negativnih kontrol. Vrednosti absorbance kristal vijoličnega v raztopini so bile po odsteti vrednosti veznega barvila pri negativnih kontrolah v razponu od 0,042 do 0,0054 (ΔA_{595}). Glede na izračunane vrednosti ΔA_{595} smo seve razvrstili v kvartile kot sledi; sevi z najvišjo filmotvornostjo na polistirenu v prvem kvartilu so bili opredeljeni kot močno adherentni (I), sledili so zmerno adherentni (II), šibko adherentni (III) ter neadherentni sevi (IV). Razvrstitev sevov v adhezivne razrede je slonela na predpostavki, da je adhezivnost osnova za tvorbo biofilma. Povezava med filmotvornostjo sevov *C. jejuni* na polistirenu in ostalimi lastnostmi je prikazana na sliki 12.

4.1.2 Odpornost proti antibiotikom

Med testiranimi sevi se je za najbolj razširjeno pokazala odpornost proti kinolonomu, ciprofloksacinu ($n = 86$; 66,2 %) in nalidiksinski kislini ($n = 83$; 63,8 %). Pri 61,4 % sevov ($n = 80$) se je pokazala navzkrižna odpornost proti obema antibiotikoma. Nekoliko manjše število sevov je bilo odpornih proti tetraciklinu ($n = 42$; 32,3 %), čemur sledi odpornost proti streptomicinu ($n = 3$; 2,3 %) in eritromicinu ($n = 2$; 1,5 %). Največ odpornih sevov najdemo med izolati človeškega izvora ($n = 40$) in perutnine ($n = 61$). Trije sevi perutninskega izvora so bili večkratno odporni, dva izmed njih tudi proti 4–5 različnim antibiotikom (ciprofloksacin, nalidiksinska kislina, tetraciklin, eritromicin in/ali streptomicin) (Slika 9). Večina okoljskih izolatov je bilo dovzetnih na vse testirane antibiotike ($n = 5/6$). Vsi testirani sevi so bili dovzetni na gentamicin in kloramfenikol.



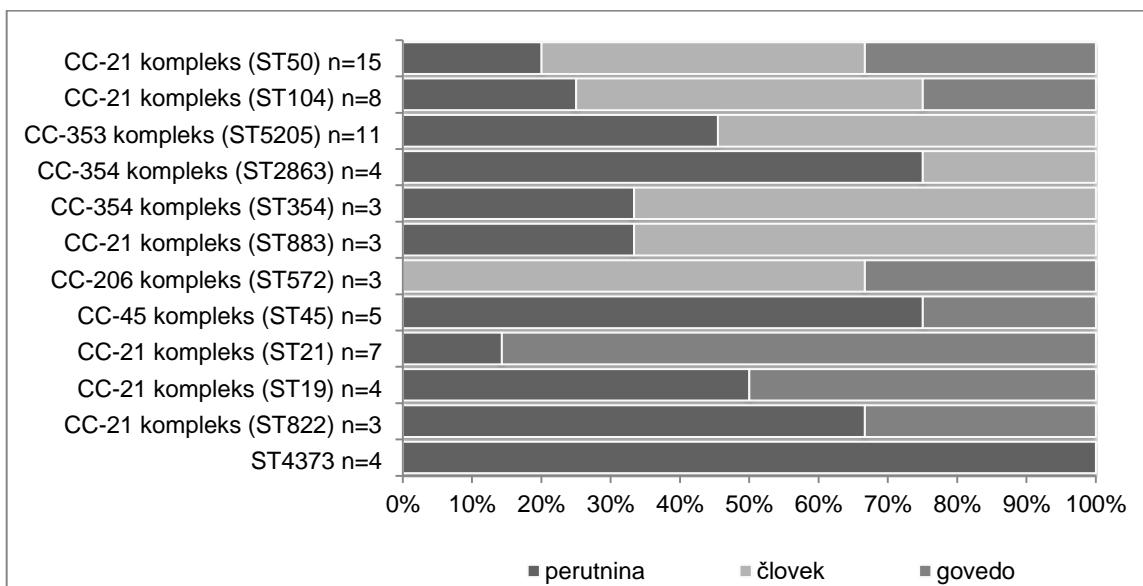
Slika 9: Delež sevov *C. jejuni*, odpornih proti različnemu številu razredov antibiotikov (0 R; občutljiv na vse, 4 R; odporni proti štirim različnim razredom antibiotikov), razvrščenih glede na vir izolacije.

Figure 9: Percentage of *C. jejuni* strains, resistant to a different number of classes of antibiotics (0 R; susceptible to all, 4 R; resistant to four different classes), classified according to the source of isolation.

4.1.3 Tipizacija MLST

Med 130 izolati *C. jejuni* smo s tipizacijo MLST tipizacijo določili 63 različnih sekvenčnih tipov (angl. sequence type; ST) in 18 klonskih kompleksov (angl. clonal complex; CC). Osmih izolatov nismo mogli umestiti k nobenem izmed CC (ST881, ST905, ST1367, ST2655, ST4373, ST4800, ST5207 in ST6309). Med najpogostejšimi so bili CC-21 ($n = 44$; 33,8%), CC-353 ($n = 18$; 13,8%), CC-45 ($n = 12$; 9,2%) in CC-354 ($n = 9$; 6,9%). Za nekaj klonskih kompleksov smo določili nove sekvenčne tipe, in sicer za CC-22 (ST7514), CC-52 (ST2100) in CC-353 (ST5205, ST7301 in ST7516). Razporeditev najpogostejših CC glede na vir izolata je prikazana na sliki 10.

Primerjava z bazo podatkov PubMLST je pokazala, da so izolati globalno razširjenih klonskih kompleksov CC-21 (n = 1812), CC-19 (n = 522), CC-50 (n = 1057), CC-45 (n = 1165), CC-354 (n = 425), CC-883 (n = 108) predhodno že bili izolirani v Nemčiji, ne pa tudi v Avstriji in Sloveniji. Med slovenskimi sevi so prevladovali klonski kompleksi CC-104, CC-5205 in CC-2863, ki so se večkrat pojavili tudi pri drugih izolatih na območju Evrope.

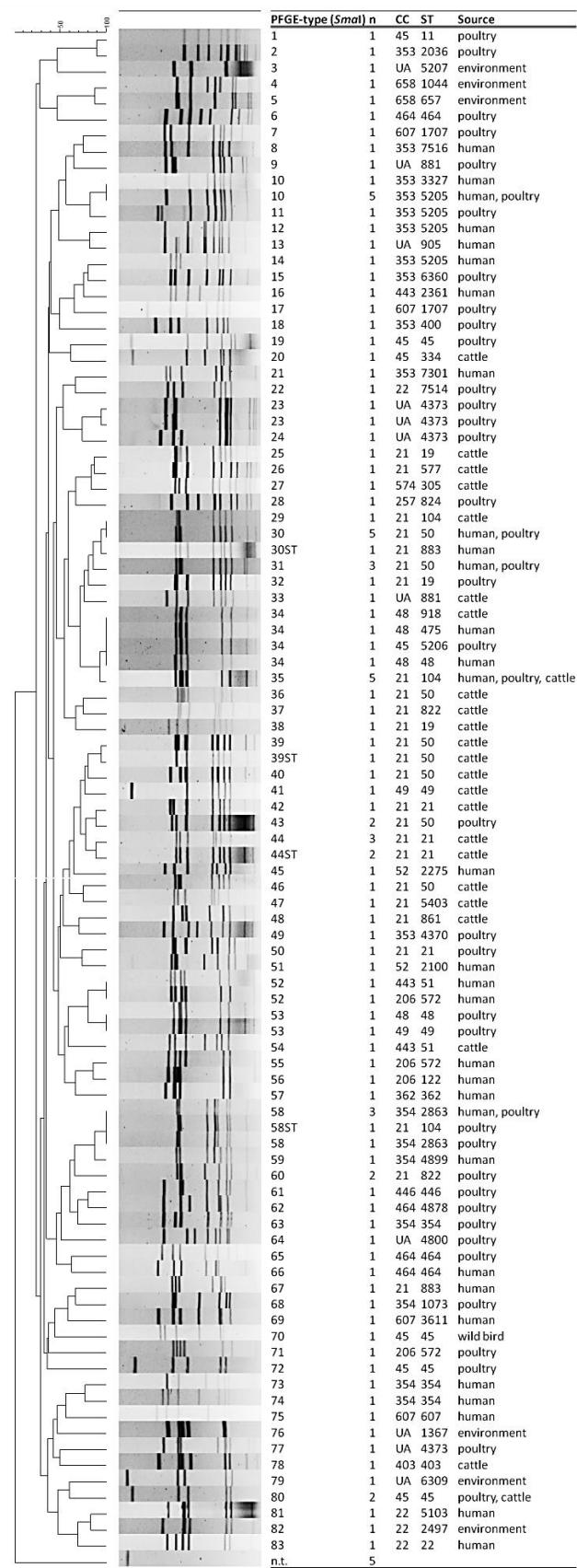


Slika 10: Najpogostejsi klonski kompleksi (CC) in pripadajoči sekvenčni tipi (ST), razporejeni po deležu zastopanosti glede na vir izolacije (perutnina, človek, govedo) sevov *C. jejuni*.

Figure 10: The most common clonal complexes (CC) and corresponding sequence types (ST), arranged according to the proportion of appearance among *C. jejuni* isolates.

4.1.4 Tipizacija PFGE

Za tipizacijo PFGE je bilo na voljo skupno 117 sevov *C. jejuni*, ki smo jim pripisali 83 različnih profilov tipizacije PFGE s *SmaI*. Petih izolatov z uporabljenim encimom ni bilo mogoče tipizirati. V vsakega izmed štirinajstih profilov *SmaI* (*SmaI10*, *SmaI23*, *SmaI30*, *SmaI31*, *SmaI34*, *SmaI35*, *SmaI43*, *SmaI44*, *SmaI44ST*, *SmaI52*, *SmaI53*, *SmaI58*, *SmaI60* in *SmaI80*) smo umestili od dva do šest izolatov. Za vsakega izmed profilov PFGE *SmaI10*, *SmaI30*, *SmaI31* in *SmaI34* smo ugotovili visoko epidemiološko povezano med perutnino in sporadičnimi primeri okužbe pri ljudeh v Sloveniji (Slika 11). Pokazali smo, da je bila diskriminatorna moč PFGE tipizacije z določenimi 83 različnimi *SmaI* profili višja kot za MLST tipizacijo, pri kateri smo lahko izolate umestili v 63 različnih sekvenčnih tipov.

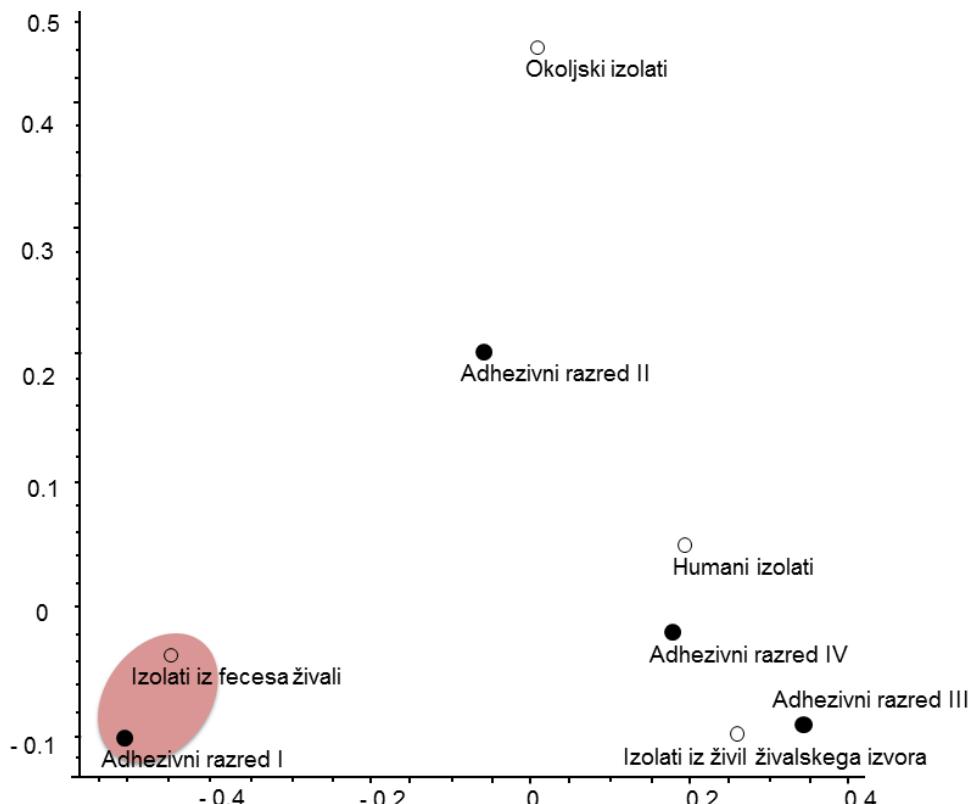


Slika 11: Genetska raznolikost izolatov *C. jejuni* na osnovi pulzne gelske elektroforeze (PFGE).

Figure 11: Genetic diversity of *C. jejuni* isolates based on the pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

4.1.5 Povezava med filmotvornostjo sevov *C. jejuni* in ostalimi lastnostmi

Edina statistično značilna povezava, ki smo jo uspeli potrditi, je bila med filmotvornostjo bakterij *C. jejuni* na površini polistirena in virom izolacije (Slika 12). Sevi z največjo sposobnostjo filmotvornosti (I + II) na površini polistirena so bili med izolati iz iztrebkov živali ($n = 28/130; 21,5\%$), med katerimi je bilo 60,7 % močno adherentnih (I) in 39,3 % zmerno adherentnih (II) (Priloga A). Med najbolj adherentne sodijo predvsem perutninski ($n = 20$) in goveji fekalni izolati ($n = 8$). Perutninski in goveji izolati iz mesa in mleka so se umestili predvsem v kategoriji z nižjo filmotvornostjo III + IV ($n = 27/130$). Šibko adherentnih je bila tudi večina izolatov, ki pripadajo klonskemu kompleksu CC-353 ($n = 12/18$). Prav tako se je 71,4 % sevov splošno razširjenega sekvenčnega tipa ST-21 umestilo med neadherentne ($n = 5/7$) in večina sevov s ST-5205 v III ali IV razred ($n = 9/11; 81,8\%$). Nekoliko bolj zaskrbljujoč pa je pojav boljše adherentnih (I + II) fekalnih izolatov perutnine in goveda, odpornih na fluorokinolone in/ali tetraciklin ($n = 16/130$). Glede na sposobnost filmotvornosti na površini polistirena v povezavi z odpornostjo na vsaj tri različne antibiotike pa je razporeditev sevov v kategoriji I+II ($n = 16/38$) primerljiva z razporeditvijo v kategoriji III+IV ($n = 22/38$).



Slika 12: Razsevni diagram korespondenčne analize - prikaz profilov sposobnosti filmotvornosti na polistirenu, prikazane kot adhezivni razredi in vira izolacije testiranih sevov *C. jejuni*.

Figure 12: Correspondence analysis diagram representing the profiles of adhesion and biofilm formation ability on polystyrene, shown as adhesive classes and isolation source of *C. jejuni* strains.

4.2 FILMOTVORNOST BAKTERIJ *C. jejuni* NA RAZLIČNO OBDELANI POVRŠINI NERJAVNEGA JEKLA

Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na količino nastalega biofilma oziroma filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *luxS* smo določali s kolorimetrično metodo barvanja s kristal vijoličnim ter gojitveno metodo določanja števila viabilnih celic *C. jejuni* (CFU/ml) na površini posameznega kupona nerjavnega jekla.

4.2.1 Vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij *C. jejuni*, določen z metodo barvanja s kristal vijoličnim

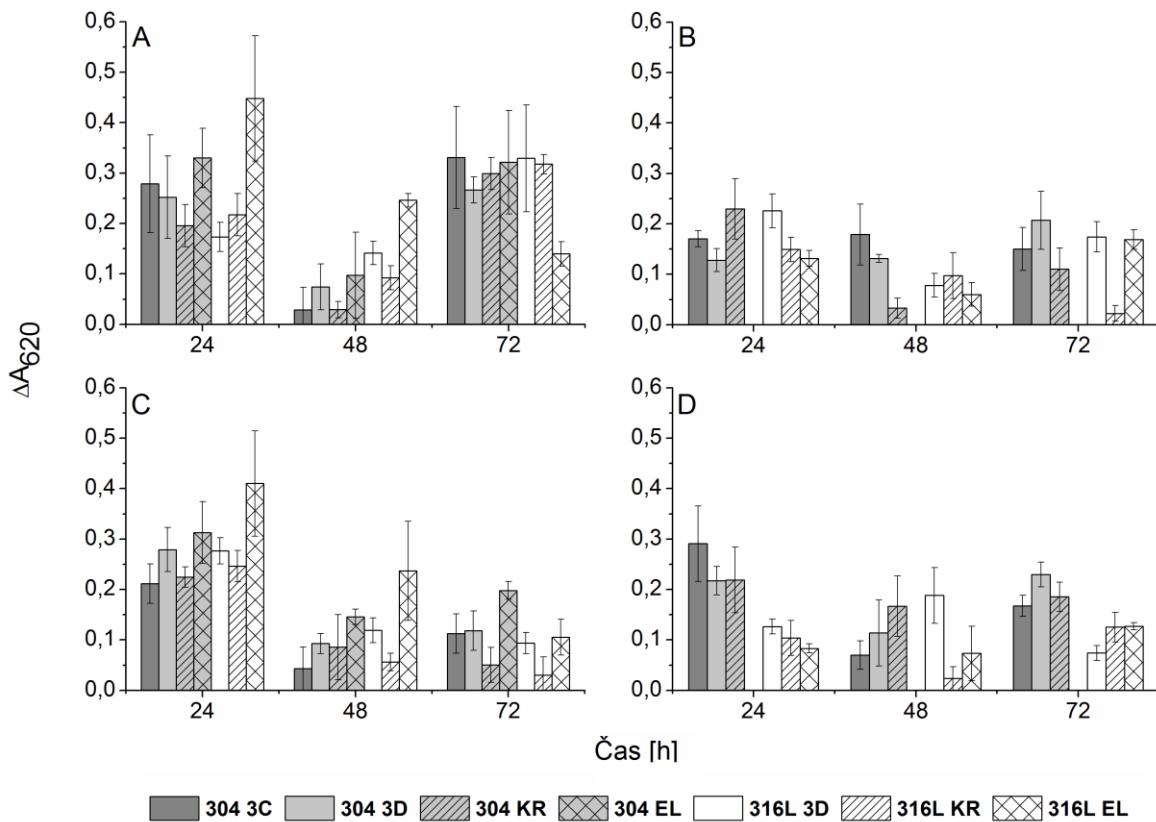
Količino nastale biomase smo določali po 24, 48 in 72-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih in aerobnih pogojih in temperaturi 42 °C. Suspenzijo bakterij nad kuponi nerjavnega jekla smo po inkubaciji zavrgli, ostanke gojišča in nevezane bakterijske celice sprali, pritrjene bakterije in zunajcelični matriks pa toplotno fiksirali na površino nerjavnega jekla. Po fiksaciji smo kupone barvali s kristal vijoličnim, povrsino posušili in vezano barvilo raztopili v etanolu ter pomerili absorbanco na biomaso vezanega barvila. Rezultati so prikazani kot vrednost absorbance kristal vijoličnega v raztopini, izmerjene pri valovni dolžini 620 nm, od katere smo odšteli vrednosti negativne kontrole (ΔA_{620}). Kot kontrola so nam služili kuponi nerjavnega jekla posamezne površine z dodanim sterilnim medijem, inkubirani pri enakih pogojih (Slika 13).

4.2.1.1 Filmotvornost bakterij *C. jejuni* na različno obdelani površini nerjavnega jekla pri mikroaerofilnih pogojih

Filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 je bila po 24-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih statistično značilno višja ($p \leq 0,05$) na elektropolirani (EL) kot na krtačeni (KR) površini obeh tipov jekla ter višja kot na polirani (3D) površini tipa jekla 316L (Slika 13A). Prav tako je bila stopnja filmotvornosti po 48 urah inkubacije v primerjavi z ostalimi površinami višja na elektropolirani površini (EL) tipa jekla 316L. Dinamika se spremeni po 72-urni inkubaciji, ko je količina nastalega biofilma na elektropolirani površini (EL) jekla tipa 316L manjša v primerjavi z ostalimi površinami nerjavnega jekla. Opaziti je tudi časovno dinamiko same tvorbe biofilma, saj je bila absorbanca vezanega barvila po 48 urah inkubacije statistično značilno nižja ($p \leq 0,05$) kot po 24 ali 72 urah inkubacije.

Filmotvornost po 24-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih (Slika 13C) je bila za mutanta *luxS* na elektropolirani površini (EL) jekla tipa 316L statistično značilno višja ($p \leq 0,05$) kot na krtačeni površini (KR) obeh tipov jekla, ter višja kot na neobdelani površini (3C) tipa jekla 304 in polirani površini (3D) tipa jekla 316L. Filmotvornost na krtačeni površini (KR) tipa 304 pa je bila statistično nižja kot na polirani površini (3D) obeh tipov jekla.

Po 48 urah inkubacije je bila filmotvornost na elektropolirani površini (EL) tipa 316L statistično višja kot na krtačeni (KR) površini tipa 316L ter višja kot na neobdelani (3C) in polirani (3D) površini tipa 304. Po 72-urni inkubaciji pa je filmotvornost na krtačeni površini (KR) tipa jekla 304 statistično značilno nižja ($p \leq 0,05$) kot na neobdelani (3C) in polirani (3D) površini. Količina nastalega biofilma na površini nerjavnega jekla med referenčnim sevom in mutantom *luxS* je po 24- in 48-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih primerljiva, po 72 urah inkubacije pa za sev *luxS* manjša.



Slika 13: Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na filmotvornost (ΔA_{620}) referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 (A, B) in mutanta *luxS* (C, D), pri mikroaerofilnih (A, C) in aerobnih (B, D) pogojih, po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji pri temperaturi 42 °C, določen z metodo barvanja s kristal vijoličnim. Filmotvornost je bila določena na kuponih nerjavnega jekla tipov AISI 304 in AISI 316L z različno površinsko obdelavo; neobdelana (3C), polirana (3D), krtačena (KR) in elektropolirana (EL) površina.

Figure 13: Effect of stainless steel surface treatment on adhesion and biofilm formation (ΔA_{620}) of *C. jejuni* NCTC 11168 (A, B) and its *luxS* mutant strain (C, D) under microaerobic (A, C) and aerobic (B, D) conditions at 42 °C after 24, 48 and 72 h of incubation time, assessed with crystal violet staining method. Four differently treated stainless steel surfaces of AISI 304 and AISI 316L types were used; untreated (3C), polished (3D), brushed (KR) and electropolished (EL) surface.

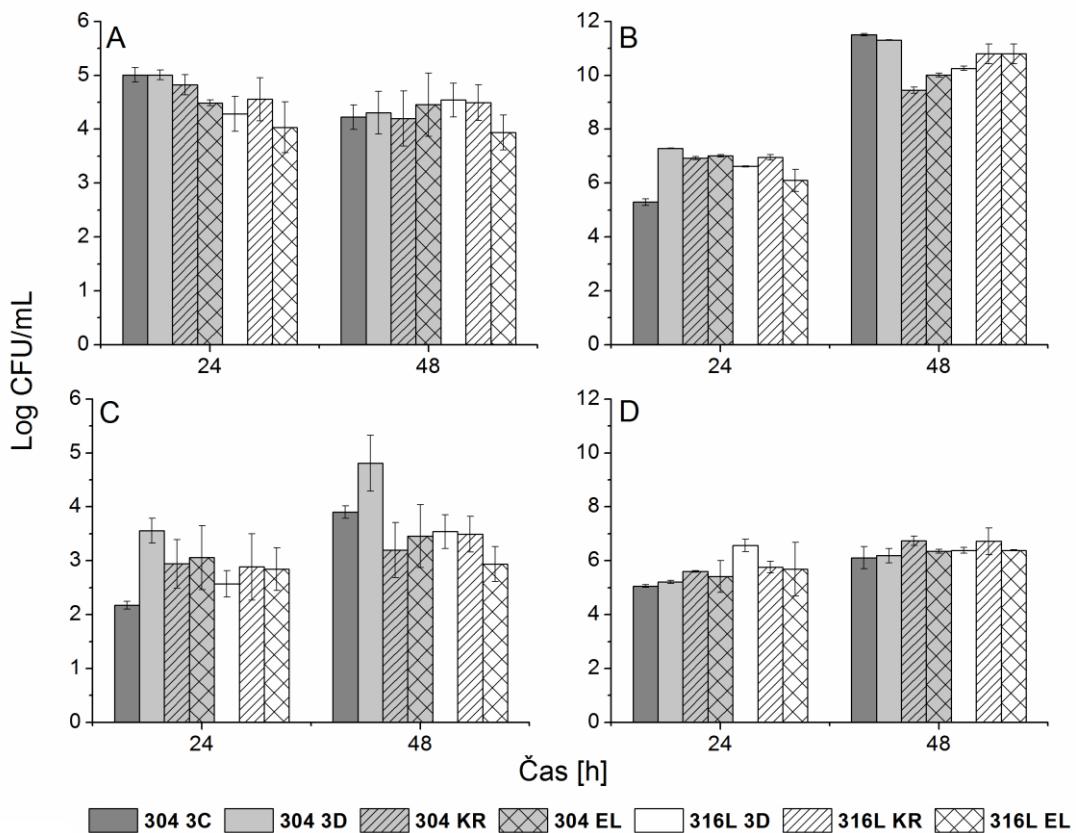
4.2.1.2 Filmotvornost bakterij *C. jejuni* na različno obdelani površini nerjavnega jekla pri aerobnih pogojih

Dinamika tvorbe in količina nastalega biofilma na različno obdelani površini kuponov nerjavnega jekla je bila glede na prisotnost kisika različna za oba testirana seva *C. jejuni* (Slika 13). Po 24-urni inkubaciji pri aerobnih pogojih je bila filmotvornost za referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 (Slika 13B) najvišja na polirani površini (3D) tipa 316L ter krtačeni površini (KR) tipa 304. Po 48-urni inkubaciji je bila filmotvornost najvišja na neobdelani (3C) in polirani (3D) površini tipa 304, na preostalih površinah pa je bila v primerjavi s 24-urno inkubacijo filmotvornost znatno nižja. Na krtačeni površini (KR) tipa 304 in polirani (3D) ter elektropolirani (EL) površini tipa 316L je bilo po 48-urni inkubaciji statistično manj ($p \leq 0,5$) biofilma kot na preostalih testiranih površinah. Količina nastalega biofilma se po 72-urni inkubaciji med različno obdelanimi površinami ni statistično značilno razlikovala, z najnižjo opaženo filmotvornostjo na krtačeni površini (KR) tipa 316L.

Filmotvornost mutanta *luxS* je bila pri aerobnih pogojih (Slika 13D) po 24-urni inkubaciji statistično značilno ($p \leq 0,5$) najnižja na elektropolirani površini (EL) nerjavnega jekla tipa 316L ter najvišja na neobdelani (3C), polirani (3D) ter krtačeni (KR) površini jekla tipa 304. Po 48-urah inkubacije je bila filmotvornost na neobdelani površini (3C) jekla tipa 304 ter krtačeni površini jekla (KR) tipa 316L statistično značilno nižja ($p \leq 0,05$) kot na ostalih testiranih površinah. Po 72-urni inkubaciji je opaziti razliko v stopnji filmotvornosti med uporabljenima tipoma jekla in sicer je filmotvornost na vseh različno obdelanih površinah tipa 316L nižja kot na tipu 304. Filmotvornost seva *luxS* je bila po 72-urni inkubaciji najnižja na polirani (3D) površini jekla tipa 316L. Kot površina z najnižjo stopnjo filmotvornosti se je pri aerobnih pogojih inkubacije na primeru obeh sevov izkazala krtačena površina (KR), ki je bila po hrapavosti takoj za polirano površino (3C), ki pa ima najnižjo stopnjo hrapavosti (Slika 8).

4.2.2 Vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij *C. jejuni*, določen z gojitveno metodo

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo želeli preveriti ustreznost oziroma primerljivost kolorimetrične metode barvanja s kristal vijoličnim z gojitveno metodo določanja tvorbe biofilma. Z uporabo gojitvene metode smo poleg števila viabilnih bakterij referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *luxS* na različno obdelani površini nerjavnega jekla (Slika 14A, C) določili število bakterij v suspenziji (Slika 14B, D).



Slika 14: Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla na filmotvornost (Log CFU/mL) referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 (A, B) in mutanta *luxS* (C, D) in število bakterij v suspenziji (B, D), po 24- in 48-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C, določen z gojitveno metodo. Filmotvornost je bila določena na kuponih nerjavnega jekla tipov AISI 304 in AISI 316L z različno površinsko obdelavo; neobdelana (3C), polirana (3D), krtačena (KR) in elektropolirana (EL) površina.

Figure 14: Effect of stainless steel surface treatment on adhesion and biofilm formation (Log CFU/mL) of *C. jejuni* NCTC 11168 (A, B) and its *luxS* mutant strain (C, D) and on the number of viable bacteria in suspension (B, D), under microaerobic conditions at 42 °C after 24 and 48 h incubation time, assessed with plating method. Four differently treated stainless steel surfaces of AISI 304 and AISI 316L types were used; untreated (3C), polished (3D), brushed (KR) and electropolished (EL) surface.

Filmotvornost izražena kot povprečno število viabilnih bakterij na površini kuponov nerjavnega jekla je bila po 24-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih za referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 statistično značilno ($p \leq 0,05$) najnižja na elektropolirani (EL) in polirani (3D) površini tipa jekla 316L, čemur je sledila elektropolirana (EL) površina tipa 304 (Slika 14A). Slednje ni bilo sorazmerno s številom bakterij v suspenziji (Slika 14B). Po 48-urni inkubaciji se število viabilnih bakterij na površini kuponov nerjavnega jekla med različno obdelanimi površinami ni razlikovalo. Število bakterij v suspenziji je bilo po 48-urni inkubaciji večje, ob nespremenjenem številu viabilnih bakterij na površini jekla, kar nakazuje na neodvisnost koncentracije celic v suspenziji s številom celic na površini jekla.

Pri mutantu *luxS* je bilo po 24-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih (Slika 14C) najnižje število viabilnih celic na neobdelani površini (3C) jekla tipa 304. Število bakterij po 48-urni inkubaciji pa je bilo najvišje na polirani površini (3D) jekla tipa 304. Če pogledamo število bakterij seva *luxS* v suspenziji, je med časoma inkubacije primerljivo. Dinamika filmotvornosti na različno obdelani površini nerjavnega jekla določeni z gojitveno metodo ni primerljiva s kolorimetrično metodo in intenzitetu vezanega barvila. Kot primer je bila za referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 filmotvornost določena z gojitveno metodo po 24- in 48-urni inkubaciji najvišja na elektropolirani površini (EL) jekla tipa 316L (Slika 13C) in ravno na isti površini najnižja pri določanju s kolorimetrično metodo. Prav tako pri gojitveni metodi določanja filmotvornosti po 48-urni inkubaciji ni opaziti padca števila celic na površini, ki je bil pokazan z metodo barvanja s kristal vijoličnim.

4.3 VPLIV IZVLEČKA *E. rutilarpa* NA FILMOTVORNOST BAKTERIJ *C. jejuni* NA POVRŠINI NERJAVNEGA JEKLA TER NA PRISOTNOST SIGNALNIH MOLEKUL

Vpliv kemijsko okarakteriziranega etanolnega izvlečka (EREE) in posameznih učinkovin *E. rutilarpa* na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *luxS* in *cmeB* smo določali na neobdelani površini nerjavnega jekla tipa 304 z uporabo gojitvene metode. Sočasno nas je zanimal tudi vpliv na prisotnost signalnih molekul, količino katerih smo določali v supernatantu po 24- in 48-urni inkubaciji s poročevalskim sevom *V. harveyi* BB170.

4.3.1 Protimikrobnlo delovanje izvlečka *E. rutilarpa* in posameznih frakcij na referenčni sev *C. jejuni* in njegova mutanta *cmeB* in *luxS*

Na vse testirane seve *C. jejuni* je imel največji protimikrobn učinek skupni izvleček plodov *E. rutilarpa*. Med sevi se je za najmanj občutljivega pokazal referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168, najnižje vrednosti MIK pa so bile določene za mutanta *cmeB* (MIC = 64–256 µg/ml). Izkazalo se je, da imata evodiamin in rutekarpin poleg mešanice kinolonov (frakcija Q), ki prestavlajo največji delež izvlečka, le zmeren protimikroben učinek na testirane seve *C. jejuni*, z izjemo na mutanta v efluksni črpalki *cmeB* (Preglednica 15). Ti rezultati kažejo na pomembno vlogo efluksa kot mehanizma odpornosti *C. jejuni* na izvleček *E. rutilarpa* in na testirane frakcije.

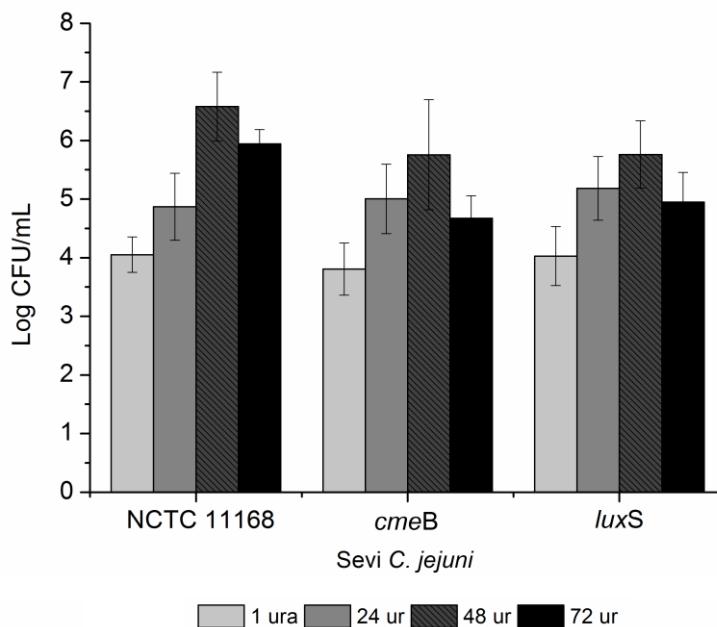
Preglednica 15: Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) za izvleček *E. rutilarpa* (EREE) in posamezne frakcije, določene z metodo mikrodilucije za sev *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutanta *cmeB* in *luxS*
Table 15: Minimal inhibitory concentration (MIC) values of *E. rutilarpa* extract (EREE) and its fractions, determined with microdilution method for *C. jejuni* 11168 and its *cmeB* in *luxS* mutant strains

Sev	MIK (µg/ml)			
	EREE	Frakcija Q	Evodiamin	Rutekarpin
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	1024	1024	1024	1024
mutant <i>cmeB</i>	64	256	64	256
mutant <i>luxS</i>	512	1024	1024	1024

4.3.2 Vpliv izvlečka *E. rutilarpa* in posameznih frakcij na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla

Testirani sevi *C. jejuni* so se bili že po 1 uri inkubacije sposobni adherirati na površino nerjavnega jekla (4 Log CFU/mL), nakar število bakterij na površini diskov nerjavnega raste in je najvišje po 48-urni inkubaciji. Statistično značilna razlika v koncentraciji bakterij med sevi *C. jejuni* je bila vidna po 48-urni inkubaciji, ko je najvišje vrednosti dosegel referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168. Pri mutantih *luxS* in *cmeB* med 24-, 48- in 72-urno inkubacijo ni bilo statistično značilnih razlik v številu (Slika 15).

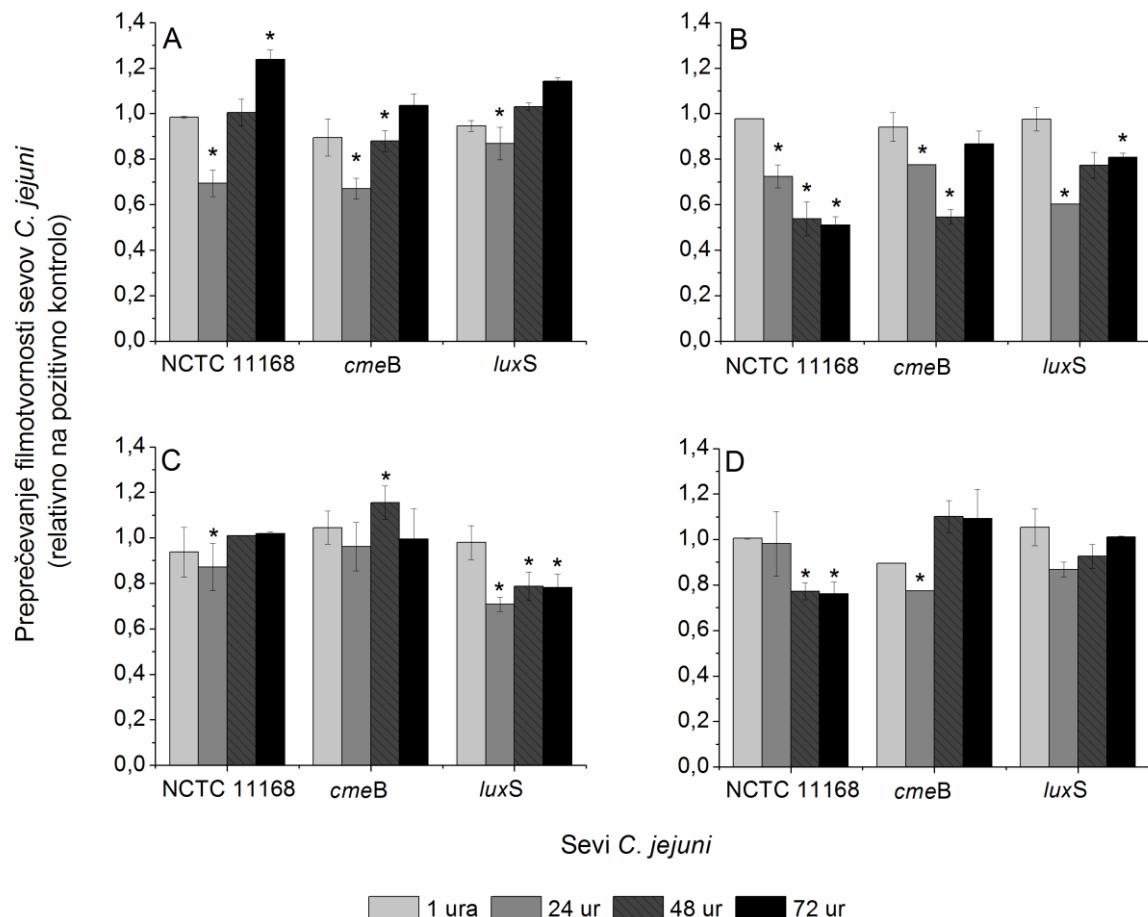
Sama dinamika spreminjaanja števila CFU/ml oziroma stopnje filmotvornosti na površini nerjavnega jekla po 1, 24, 48 in 72-urni inkubaciji (Slika 15) kaže tudi na samo kompleksnost fenomena adhezivnosti in tvorbe polimernega matriksa.



Slika 15: Filmotvornost (Log CFU/ml) referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* na neobdelani površini nerjavnega jekla tipa 304, po 1-, 24-, 48- in 72-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C.

Figure 15: Adhesion and biofilm formation of *C. jejuni* NCTC 11168 and its *cmeB* and *luxS* mutants on untreated stainless steel surface (type 304) after 1, 24, 48 and 72 h of incubation under microaerobic conditions at 42 °C.

Glede na takojšnjo sposobnost adhezije testiranih sevov *C. jejuni* (Slika 15) smo se odločili določiti vpliv izvlečka *E. ruticarpa* (ERE) in njegovih frakcij (frakcija Q, evodiamin in rutekarpin) na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* na neobdelani površini diskov iz nerjavnega jekla, tipa 304. Rezultati so prikazani relativno na pozitivno kontrolo, za katero je služilo število viabilnih celic posameznega seva na površini nerjavnega jekla, brez dodanih testiranih učinkovin. Ob dodatku testiranih učinkovin (ERE, frakcija Q, evodiamin, rutekarpin) v končni koncentraciji 0,25 MIK je v primerjavi s kontrolo opaziti zaznaven učinek na preprečevanje filmotvornosti (Slika 16). Ta učinek je bil različen glede na sam čas inkubacije (1, 24, 48 in 72 ur), testiran sev *C. jejuni* ter uporabljeno učinkovino. Statistično značilnega upada števila CFU/mL po dodatku izvlečka *E. ruticarpa* oziroma njegovih frakcij po prvi uri inkubacije ni bilo opaziti. Po vseh treh nadaljnjih časovnih točkah (24, 48 in 72 ur) je na primeru referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ob dodatku rutekarpina in frakcije Q prišlo do statistično značilne nižje filmotvornosti (Slika 16B in 16D). Enak učinek smo opazili tudi na mutanta *cmeB* in *luxS*, in sicer po vseh treh časih inkubacije (24, 48 in 72 ur) ob dodatku frakcije Q (Slika 16B), ter učinek na znižanje filmotvornosti po 24 urah inkubacije ob dodatku rutekarpina (Slika 16D).



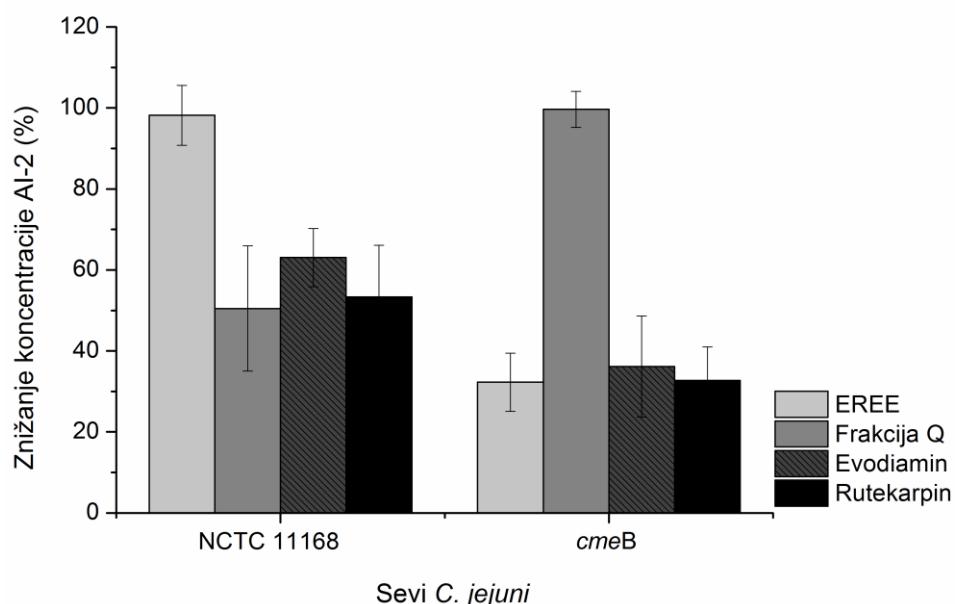
Slika 16: Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* (A), frakcije Q (B), evodiamina (C) in rutaecarpina (D) na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* na neobdelani površini nerjavnega jekla tipa 304, po 1-, 24-, 48- in 72-urni inkubaciji pri mikraerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C. * $p \leq 0,05$; v primerjavi s kontrolo.

Figure 16: Effect of *E. ruticarpa* extract (EREE) (A), fraction Q (B), evodiamine (C) and rutaecarpine (D) on adhesion and biofilm formation of *C. jejuni* NCTC 11168 strain and its *cmeB* and *luxS* mutants on untreated stainless steel surface (type 304) after 1, 24, 48 and 72 h of incubation under microaerobic conditions at 42 °C. * $p \leq 0,05$; compared with control.

Dodatek izvlečka *E. ruticarpa* je statistično značilno ($p \leq 0,05$) vplival na nižjo filmotvornost na površini nerjavnega jekla vseh treh testiranih sevov po 24 urah inkubacije (Slika 16A). Kljub prisotnosti efluksa kot možnega mehanizma odpornosti proti testiranim učinkovinam se je filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 na površini nerjavnega jekla znižala ob dodatku izvlečka *E. ruticarpa* (Slika 16A), rutaecarpina (Slika 16D) in frakcije Q (Slika 16B), kjer se je kot najbolj učinkovita na znižanje filmotvornosti pokazala ravno slednja. Ob dodatku evodiamina je prišlo do znižanja filmotvornosti pri mutantu *luxS* po 24, 48 in 72 urah inkubacije, ter sevu NCTC 11168 po 24 urah inkubacije (Slika 16C). V nasprotju s pričakovanji se je ob dodatku evodiamina filmotvornost seva *cmeB* po 48 urah inkubacije celo zvišala (Slika 16C), prav tako pri sevu NCTC 11168 ob dodatku izvlečka *E. ruticarpa* po 72 urah inkubacije (Slika 16A).

4.3.2.1 Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* in posameznih frakcij na prisotnost signalnih molekul AI-2

Zunajcelično koncentracijo AI-2 referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovih mutantov *cmeB* in *luxS* smo določali z merjenjem bioluminescence poročevalskega seva *V. harveyi* BB170. Mutant *luxS* nam je služil kot negativna kontrola, saj gre za mutacijo gena za protein, ki sodeluje pri sintezi AI-2, kar smo potrdili tudi z odsotnostjo signala v CFS (rezultati niso prikazani). Dodatek izvlečka *E. ruticarpa* in njegovih frakcij je statistično značilno ($p \leq 0,05$) vplival na znižanje prisotnosti AI-2 bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *cmeB*. Največji vpliv na znižanje koncentracije AI-2 ($>90\%$) je imel izvleček *E. ruticarpa* po 48-urni inkubaciji pri sevu NCTC 11168 in dodatek frakcije Q pri mutantu *cmeB* (Slika 17).



Slika 17: Odstotek znižanja koncentracije AI-2 v supernatantu referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *cmeB* po 48-urni inkubaciji pri mikroaerofilnih pogojih in temperaturi 42 °C, ob dodatu izvlečka *E. ruticarpa* (EREE), frakcije Q, evodiamina in rutekarpina.

Figure 17: Percentage of AI-2 concentration reduction by *E. ruticarpa* extract (EREE) and its fractions in cell free supernatants of *C. jejuni* NCTC 11168 and its *cmeB* mutant strain after 48-hour incubation under microaerobic conditions at 42 °C.

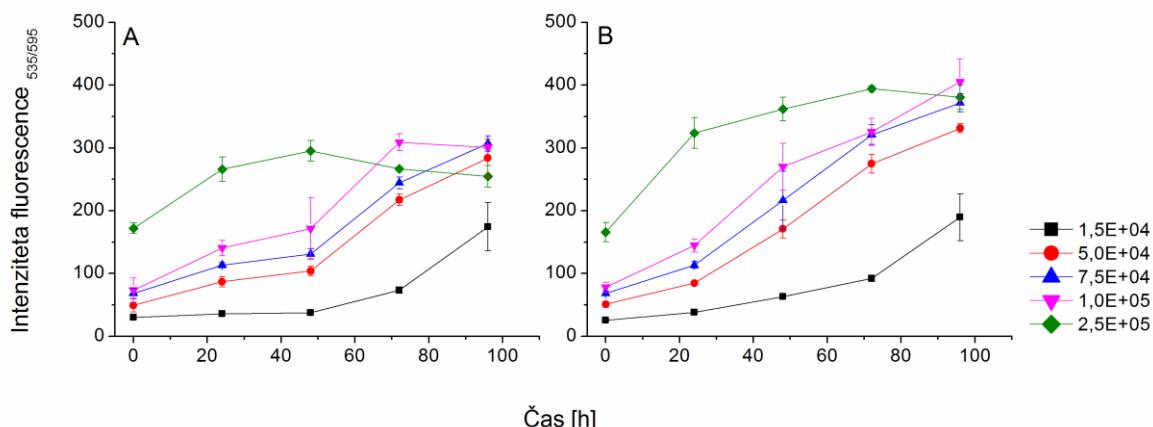
Izkazalo se je, da lahko rastlinski izvlečki služijo tudi kot potencialni inhibitorji QS, ne da bi pri tem vplivali na samo viabilnost bakterij (Truchado in sod., 2015). Na podlagi naših rezultatov določanja vpliva testiranih učinkovin na filmotvornost in na sintezo signalnih molekul AI-2 težko sklepamo na neposredno povezavo med filmotvornostjo in QS.

4.4 VPLIV IZVLEČKA *E. RUTICARPA* IN EVOKARPINA NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ *C. jejuni* NA MODELU CELIČNE LINIJE E12

Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina na preprečevanje adhezivnosti izbranih sevov *C. jejuni*, ki prihajajo iz naše živilske oskrbovalne verige, smo preverili na modelu humanih črevesnih epitelnih celic E12. Učinkovine smo uporabili v koncentracijah, ki niso baktericidne za bakterije, niti citotoksične za črevesne celice. Protimikrobnoučinkovitost in citotoksičnost izvlečka ter evokarpina smo določili z uporabo barvila PrestoBlue. Celice smo za poskus infekcije z bakterijami *C. jejuni* pripravili tako, da so tvorile mukus, kar smo predhodno določili ob vizualni primerjavi z izvorno celično linijo HT-29.

4.4.1 Model celične linije E12

V kontekstu tega dela raziskovalne naloge smo se najprej lotili izbire ustreznega modela humanih črevesnih epitelnih celic. Zaradi težnje po vzpostavitvi sistema, ki bi bil odsev stanja ob okužbi s *C. jejuni*, smo izbrali celično linijo E12, podklon celične linije črevesnih epitelnih celic HT-29. Kot osnovo za izvedbo nadaljnjih poskusov smo na podlagi intenzitete fluorescence določili rastni krivulji obeh celičnih linij, pri različnih začetnih koncentracijah celic/mL. Pokazalo se je, da ima celična linija HT-29 nekoliko hitrejšo rast, vendar sta dinamiki grafov med celičnima linijama primerljivi (Slika 18).

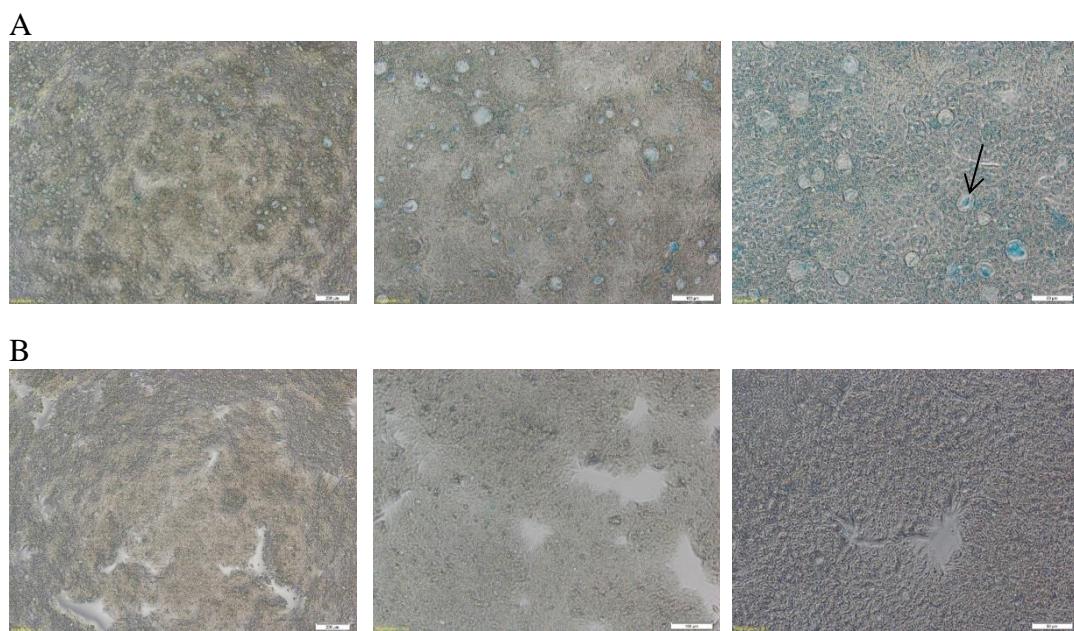


Slika 18: Intenziteta fluorescence po inkubaciji s PrestoBlue za celični liniji E12 (A) in HT-29 (B), nasajeni v različnih koncentracijah (celic/mL) po času, kar nakazuje rast celic.

Figure 18: The fluorescence intensity after incubation of cell lines E12 (A) and HT-29 (B) with PrestoBlue seeded at various concentrations (cells/mL) in time, which indicates the growth of cells.

4.4.1.1 Vizualizacija prisotnosti mukusa

Spremljanje tvorbe mukusa prek vizualizacije intenzitete barvila Alcian modro nas je pripeljalo do osmega dne od nasaditve celic, ko je bila razlika v intenziteti na mukolipisaharide vezanega barvila med celičnima linijama jasno vida (Slika 19). Po daljšem času inkubacije so pri celični liniji E12 vidne granule, katerih notranjost se je obarvala z barvilm, česar pri celični liniji HT-29 nismo opazili oziroma so bile te strukture bolj redke. Enako so pokazali D'Agostino in sod. (2012).

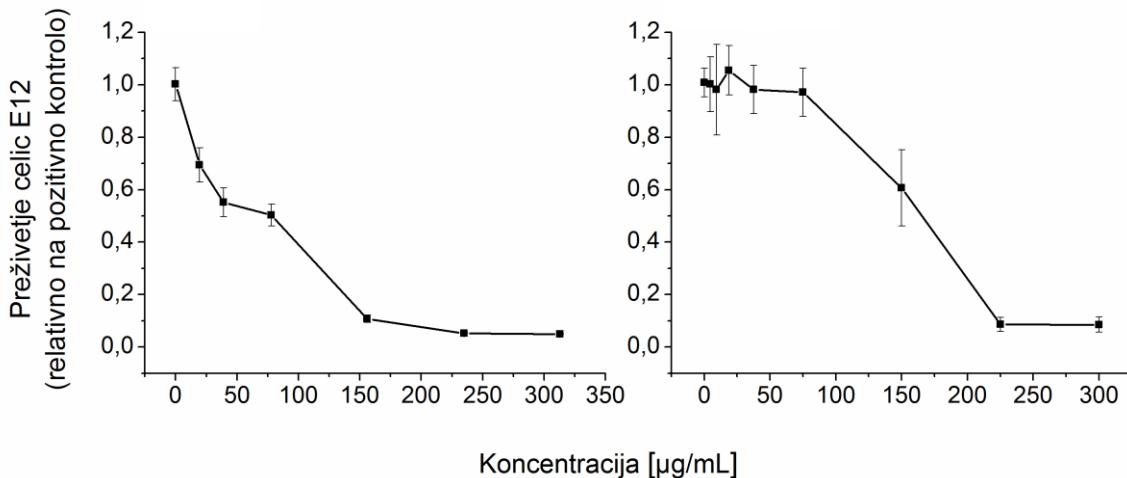


Slika 19: Vizualizacija prisotnosti mukusa pri celičnima linijama E12 (A) in HT-29 (B) po barvanju z barvilm Alcian modro na osmi dan inkubacije pri 40-, 100- in 200- kratni povečavi. Puščica označuje granule v katerih naj bi prišlo do tvorbe mukusa.

Figure 19: Representative images of mucin production by cell lines E12 (A) and HT29 at day 8: 4 \times objective; 10 \times objective; 20 \times objective. Mucin was visualized by Alcian blue staining. Mucin droplets are marked arrowed.

4.4.1.2 Citotoksičnost izvlečka in evokarpina na celice E12

Citotoksičnost EREE in evokarpina na humane črevesne epitelne celice E12 smo določili z barvilm za določanje viabilnosti PrestoBlue, po 48-urni izpostavitevi celic padajoči koncentraciji testiranih učinkovin. Zaradi avtofluorescence učinkovin smo celice po inkubaciji najprej 2 \times sprali s PBS in dodali svež medij z dodanim reagentom PrestoBlue. Živost celic smo prikazali kot relativno vrednost fluorescence po inkubaciji s testiranimi učinkovinami glede na pozitivno kontrolo (Slika 20). Srednja inhibitorna koncentracija (IC_{50}) za EREE je bila 78 μ g/mL ter 150 μ g/mL za evokarpin. V nadaljnjih poskusih smo izbrali koncentracije, ki so bile $< IC_{50}$.

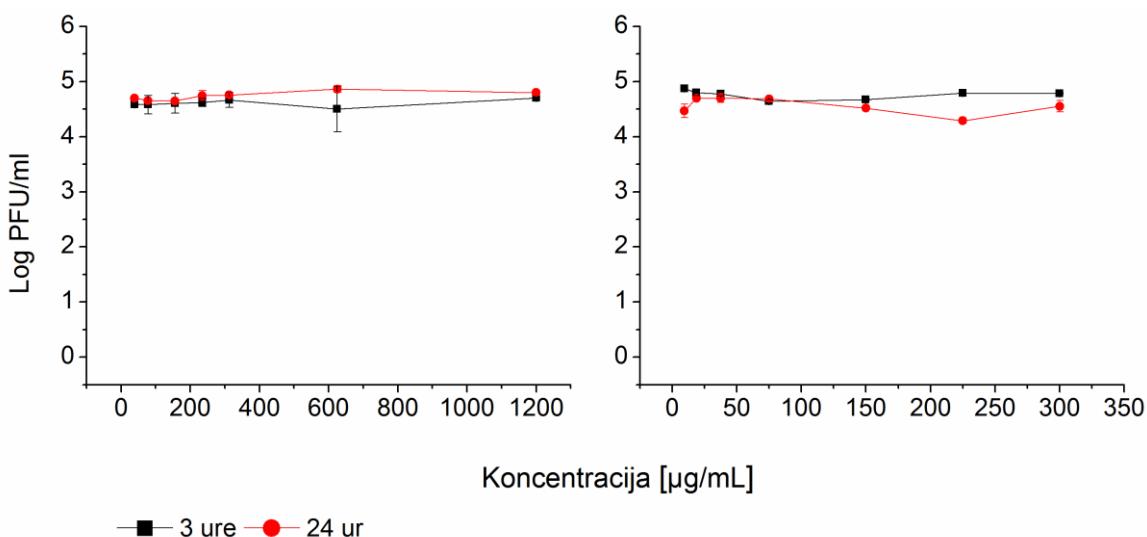


Slika 20: Preživetje celic E12 po 48-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) in evokarpinom (B), določeno na osnovi vrednosti intenzitete fluorescence po dodatku reagenta PrestoBlue, normaliziranih na pozitivno kontrolo.

Figure 20: Survival of E12 cell line after 48-hour incubation with *E. ruticarpa* extract (A) and evokarpinom (B), determined on the basis of the values of fluorescence intensity after the incubation with PrestoBlue, normalized to a positive control.

4.4.1.3 Fagocitnost EREE in evokarpina na bakteriofag PC5

Pred poskusom določanja kombiniranega učinka bakteriofaga PC5 z EREE oziroma evokarpinom smo preverili tudi, ali ti dve testirani učinkovini vplivata na titer bakteriofaga PC5 (PFU/mL). Pokazalo se je, da niti EREE niti evokarpin v testiranem koncentracijskem razponu ne vplivata na število PFU/mL (Slika 21).



Slika 21: Titer bakteriofaga PC5 (Log PFU/mL) po 3- in 24-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) in evokarpinom (B).

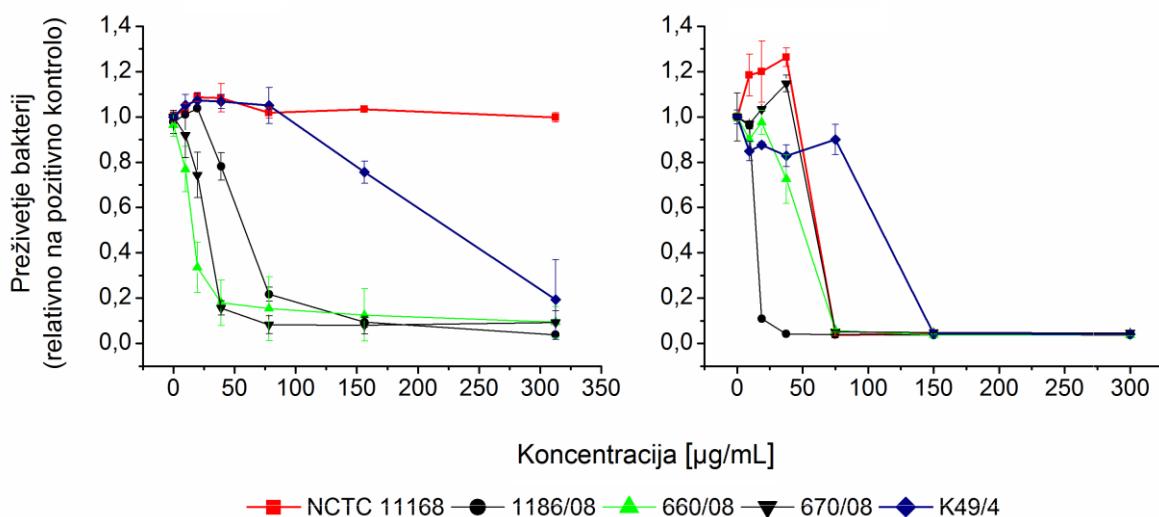
Figure 21: Bacteriophage titer (Log PFU/mL) after 3 and 24 hour incubation time with *E. ruticarpa* extract (A) and evocarpine (B).

4.4.2 Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Za poskuse določanja vpliva izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* smo uporabili humane črevesne epitelne celice E12, po osmih dneh inkubacije na mikrotitrski ploščici 96F.

4.4.2.1 Protimikrobnno delovanje izvlečka in evokarpina na izolate bakterij *C. jejuni*

Baktericidnost izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina na seve *C. jejuni* iz živilske oskrbovane verige smo določili z uporabo enake metode kot za določanje citotoksičnosti na celice E12. Po 24-urni inkubaciji bakterij s padajočo koncentracijo testiranih učinkovin smo dodali barvilo PrestoBlue in po 90 min inkubacije izmerili fluorescenco. Rezultati so prikazani kot živost bakterij, relativno na pozitivno kontrolo brez dodanih učinkovin. Za najmanj občutljiv sev na obe testirani učinkovini se je pokazal izolat *C. jejuni* K49/4. Vrednost MIK izvlečka *E. ruticarpa* za *C. jejuni* NCTC 11168 je bila $\geq 312 \mu\text{g/mL}$, za sev K49/4 je bila $312 \mu\text{g/mL}$, za vse ostale seve pa $78,13 \mu\text{g/mL}$. MIK evokarpina za K49/4 je bila $112,5 \mu\text{g/mL}$, temu so sledili sevi *C. jejuni* NCTC 11168, 660/08 in 670/08 z vrednostjo MIK = $75 \mu\text{g/mL}$ in sev *C. jejuni* 11189/08 z MIK = $18,78 \mu\text{g/mL}$. Pri določanju baktericidnosti za evokarpina smo za seva *C. jejuni* NCTC 11168 in 670/08 pri koncentraciji $37,5 \mu\text{g/mL}$ opazili nenavaden dvig krivulje nad pozitivno kontrolo. Lahko bi sklepali, da gre za autofluorescenco evokarpina ali reakcijo z dodanim barvilm, navsezadnje pa tudi da v določeni koncentraciji evokarpin pozitivno vpliva na bakterije.



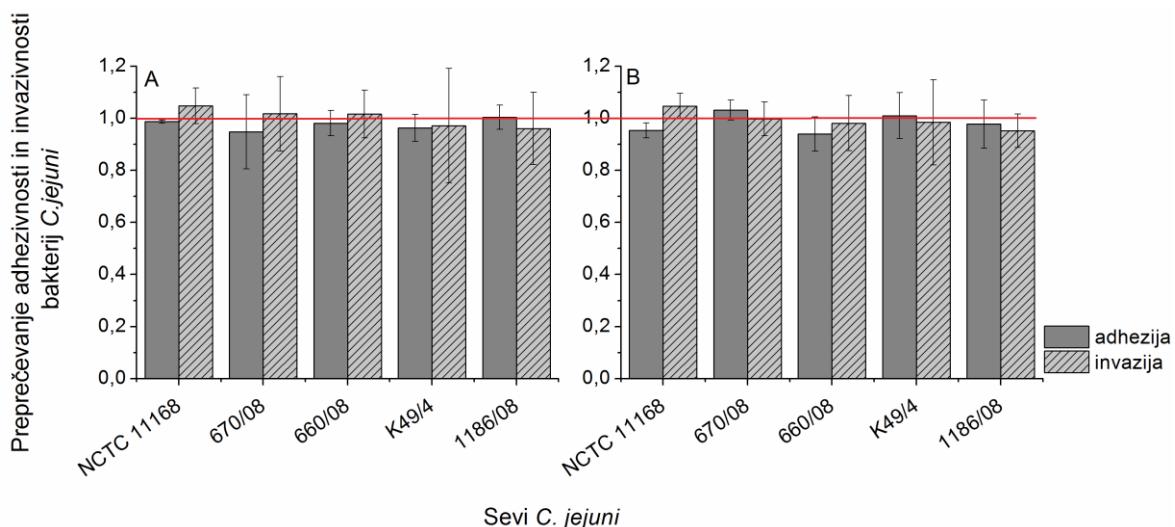
Slika 22: Preživetje bakterij *C. jejuni* po 24-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) in evokarpinom (B), določeno na osnovi vrednosti intenzitete fluorescencije po dodatku reagenta PrestoBlue, normaliziranih na pozitivno kontrolo.

Figure 22: Survival of *C. jejuni* strains after 24 hour incubation time with *E. ruticarpa* extract (A) and evocarpine (B) determined on the basis of the values of fluorescence intensity after the incubation with PrestoBlue , normalized to a positive control.

4.4.2.2 Vpliv izvlečka in evokarpina na adhezivnost ter invazivnost bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Testirali smo vpliv izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina v subinhibitorni koncentraciji (0,75 MIK), ki je bila hkrati tudi $< IC_{50}$ na število skupno adheriranih in invadiranih bakterij *C. jejuni* na modelu humanih epitelnih celic črevesa E12. Število bakterij smo določili po 3-urni inkubaciji pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂.

Iz rezultatov lahko vidimo, da dodatek izbrane koncentracije izvlečka (Slika 23A) ali evokarpina (Slika 23B) ni statistično značilno ($p \leq 0,05$) vplival na zmanjšanje skupnega števila adheriranih ali invadiranih bakterij izbranih sevov *C. jejuni*. Na osnovi naših predhodnih rezultatov določanja vpliva testiranih učinkovin na preprečevanje filmotvornosti na površini nerjavnega jekla bi lahko našo študijo še dodatno razširili in preizkusili učinek pod različnimi pogoji.



Slika 23: Preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12, po 3-urni inkubaciji z izvlečkom *E. ruticarpa* (A) ali evokarpinom (B). Rezultati so predstavljeni kot relativno število bakterij *C. jejuni* glede na kontrolo s suspenzijo bakterij brez dodanih učinkovin.

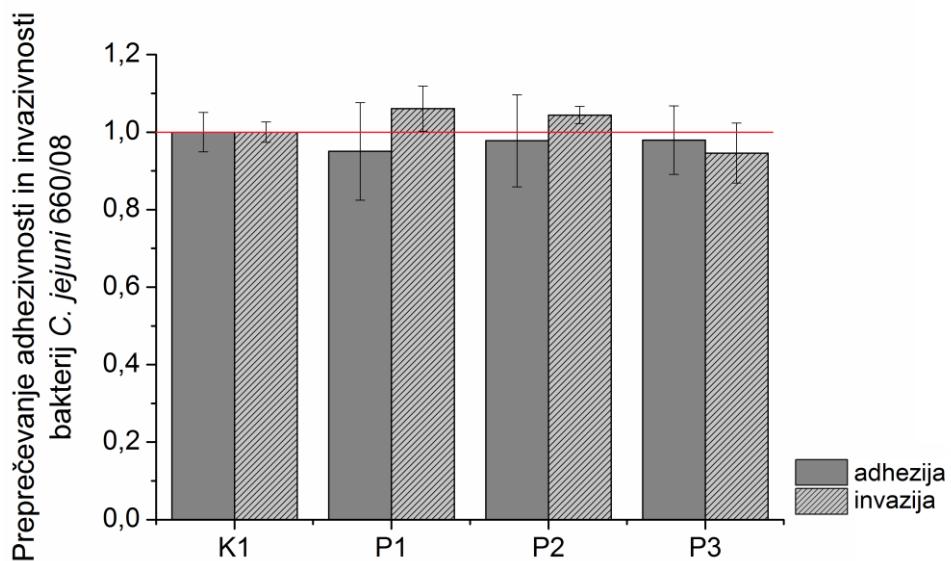
Figure 23: Inhibition of the total number of adhered and invaded *C. jejuni* on the cell line model E12, after 3 hour incubation with *E. ruticarpa* extract (A) or evocarpine (B). The data are presented as the relative number of viable *C. jejuni* bacteria, versus control.

4.5 KOMBINIRAN VPLIV IZVLEČKA *E. RUTICARPA* ALI EVOKARPINA Z BAKTERIOFAGOM PC5 NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ *C. jejuni* 660/08 NA MODELU CELIČNE LINIJE E12

Ob uporabi izvlečka ali njegove frakcije evokarpina v koncentracijah, ki niso baktericidne za *C. jejuni*, niti citotoksične za celično linijo E12 ali fagocitne za bakteriofag PC5, smo preverili kombiniran učinek delovanja z litičnim bakteriofagom PC5. Izbor bakteriofaga je temeljil na podatkih o občutljivosti sevov *C. jejuni*.

4.5.1 Vpliv bakteriofaga PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12

Interakcija bakteriofaga PC5 z bakterijami *C. jejuni* na modelu celične linije E12 do sedaj še ni bil opisana. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da različna postavitev poskusov s predhodno izpostavitvijo sloja celic E12 ali bakterijam ali bakteriofagu po 3-urni inkubaciji ni imela vpliva na končno število skupno adheriranih ali invadiranih bakterij *C. jejuni* (Slika 24).

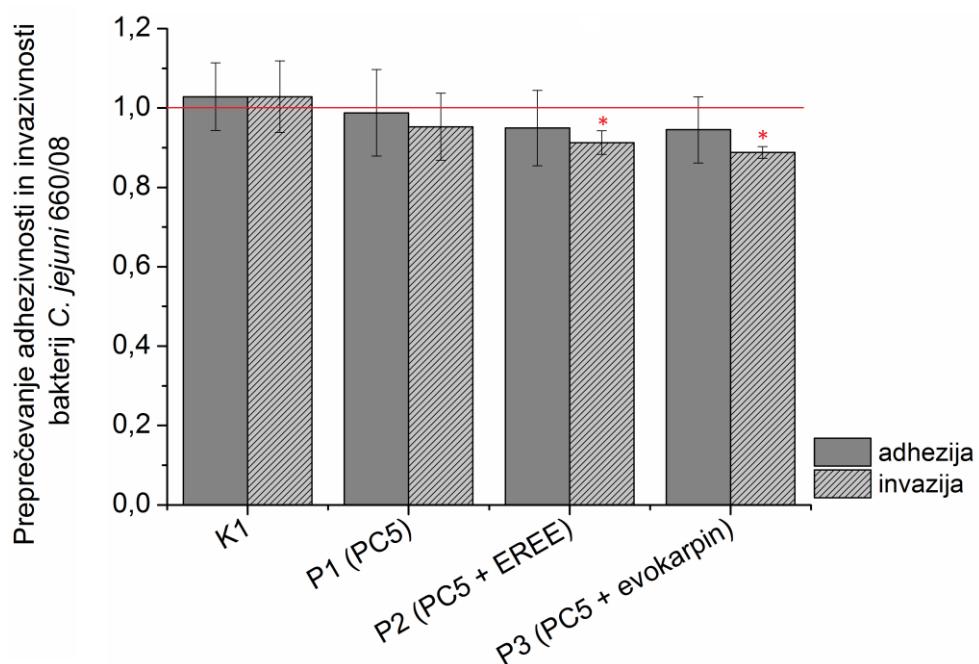


Slika 24: Preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12, po različnih nastavivah poskusa. Kontrola s suspenzijo bakterij *C. jejuni* (K1); hkratna infekcija s suspenzijo bakterij *C. jejuni* in bakteriofagom PC5 (P1); dodatek bakterij po 1-urni inkubaciji celic E12 z bakteriofagom (P2); dodatek bakteriofaga po 1-urni inkubaciji celic E12 z bakterijami (P3). Rezultati so predstavljeni kot relativno število bakterij *C. jejuni*, glede na kontrolo (K1).

Figure 24: Inhibition of the total number of adhered and invaded *C. jejuni* 660/08 on the cell line model E12, following different experimental sets. Control with *C. jejuni* suspension (K1); simultaneous infection (P1); addition of the bacteria after a 1-hour incubation of E12 with bacteriophage PC5 (P2); addition of bacteriophages after 1-hour incubation, of E12 with bacteria (P3). The data are presented as the relative number of viable *C. jejuni* bacteria, versus control (K1).

4.5.2 Kombiniran vpliv izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12

Na podlagi rezultatov vpliva bakteriofaga PC5 na število skupno adheriranih ozira in invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 smo nadaljnje poskuse infekcije celic E12 izvedli ob hkratni infekciji s suspenzijo bakteriofaga in bakterij. Kombiniran vpliv izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5 na število skupno adheriranih ter invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12 smo določili po 3-urni inkubaciji pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂. Rezultat je prikazan kot število skupno adheriranih in invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 relativno na kontrolo (K1), za katero nam je služilo število bakterij, določenih po infekciji sloja celic E12 samo s suspenzijo bakterij. Na modelu celične linije E 12 smo pokazali, da kombinacija izvlečka ali evokarpina skupaj z bakteriofagom, po 3-urni inkubaciji statistično značilno ($p \leq 0,05$) vpliva na zmanjšanje števila invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 (Slika 25).



Slika 25: Preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12, po različnih nastavitevah poskusa. Kontrola s suspenzijo bakterij *C. jejuni* (K1); učinek bakteriofaga PC5 samega (P1); učinek bakteriofaga PC5 in izvlečka *E. ruticarpa* (EREE) (P2); učinek bakteriofaga PC5 in evokarpina (P3). Rezultati so predstavljeni kot relativno število bakterij *C. jejuni*, glede na kontrolo (K1). *, $p \leq 0,05$, v primerjavi s kontrolo.

Figure 25: Inhibition of the total number of adhered and invaded *C. jejuni* 660/08 on the cell line model E12, following different experimental sets. Control with *C. jejuni* suspension (K1); effect of bacteriophage P5 alone (P1); combined effect of bacteriophage P5 and *E. ruticarpa* extract (EREE) (P2); combined effect of bacteriophage P5 and evocarpine (P3). The data are presented as the relative number of viable *C. jejuni* bacteria, versus control (K1). *, $p \leq 0,05$, compared to control.

5 RAZPRAVA

Kampilobakterioza sodi med zoonoze saj se iz živali, kot rezervoarja okužbe, prenaša na ljudi (VURS 2014). V EU je kampilobakter zadnje desetletje najpogostejši povzročitelj s hrano povezanih zoonoz in število primerov presega število zbolelih za salmonelozo (The European ..., 2015). Učinkovito cepivo za preprečevanje okužbe še ni bilo odkrito, predvsem zaradi problema visoke stopnje variabilnosti med sevi in pomanjkanja znanja o možnih antigenih, ki so poglavitni pri vzbujanju imunskega odziva (Sulaeman in sod., 2010). Molekularni mehanizmi, odgovorni za patogenezo, sposobnost zadrževanja in preživetja za rod *Campylobacter* spp. so edinstveni in različni od ostalih, s hrano povezanih patogenih bakterijah, kot npr. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Staphylococcus aureus* (Sulaeman in sod., 2010, Turanova in sod., 2015).

Ravno adhezija na površino in tvorba večcelične združbe, ki bakterijam nudi večjo zaščito pred neugodnimi dejavniki okolja, sta najverjetnejše kritični točki preživetja *C. jejuni* tako zunaj kot tudi v gostitelju (Reuter in sod., 2010; Sulaeman in sod., 2010). Adhezija bakterij na kontaktne površine in nastanek biofilma imata zaznaven vpliv na povečano odpornost bakterij v številnih kliničnih okoljih kot tudi v industriji, vključno s celotno živilsko oskrbovalno verigo (Joshua in sod., 2006; Kalmokoff in sod., 2006; Reuter in sod., 2010). Biofilm predstavlja enega zaščitnih mehanizmov bakterij rodu *Campylobacter* spp. pred zanje neugodnimi dejavniki in služi kot rezervoar živih bakterij (Reuter in sod., 2010). Mehanizem zaznavanja celične gostote se pojavlja kot sestavni del celotne regulacijske genske mreže in je pomembna tudi pri uravnavanju prilagoditve bakterij na bivanje v večcelični združbi (Li in Tian, 2012). Poznavanje molekularnega mehanizma nastajanja biofilma bi bilo tako ključno za določitev kritičnih točk in strategije nadzora tvorbe biofilma na površinah, predvsem v prehrambeni industriji in medicini (Annous in sod., 2009).

Zaradi naraščajoče odpornosti *C. jejuni* na obstoječa protimikrobnna sredstva se že vrsto let pojavlja trend iskanja novih aktivnih učinkovin naravnega izvora z drugačnim tarčnim delovanjem kot pri antibiotikih. Uporaba učinkovin v koncentracijah, ki bakterij ne izpostavijo selektivnemu pritisku in posledičnemu razvoju odpornosti ter delujejo učinkovito na mehanizem medcelične komunikacije ali filmotvornost bakterij, predstavlja obetavno možnost preprečevanja okužb v prihodnosti. Veliko rastlinskih izvlečkov je že stoletja del tradicionalne kitajske medicine za lajšanje širokega spektra simptomov. Nekateri izmed njih pa ne samo zmanjšujejo simptome vnetja pri bakterijskih okužbah, ampak imajo tudi protimikrobn učinek, kar bi lahko izkoristili kot potencialno uporabno tudi pri okužbah s hrano prenosljivimi patogeni kot je *C. jejuni*.

5.1 FILMOTVORNOST BAKTERIJ *C. JEJUNI* NA POLISTIRENU V POVEZAVI Z OSTALIMI LASTNOSTMI

Na podlagi naših rezultatov se je kot statistično značilno pokazalo, da skupina izolatov *C. jejuni* z najvišjo sposobnostjo filmotvornosti izvira iz fecesa živali, predvsem perutnine in goveda. Na drugi strani so se v skupino z najnižjo filmotvornostjo umestili izolati iz piščančjega mesa in mleka goveda. Da imajo sevi *C. jejuni*, izolirani neposredno iz živih živali ali njihovih trupov, nižjo sposobnost pritrjevanja na abiotiske površine je bilo pokazano že prej (Reuter in sod., 2010; Sulaeman in sod., 2010). Najpogostejsa pot okužbe piščančjih farm je horizontalni prenos bakterij *C. jejuni*, zato uporaba in upoštevanje dobre higienske prakse lahko zniža tveganje za prenos okužbe med jatami. Hansson in sod. (2005) so na podlagi pojavnosti tipov PFGE pokazali, da je širjenje okužb s *C. jejuni* med perutninskimi jatami in klavnico povezano s plastičnimi transportnimi škatlami, ki so bile dokazano vir širjenja tega patogena med farmami (Hansson in sod., 2005). Izmed različnih pristopov so se ravno dodatno očiščene transportne škatle pokazale kot učinkovit ukrep za znižanje prenosa okužb s *C. jejuni* med farmami (Ridley in sod., 2011). Višja filmotvornost izolatov iz fecesa v naši študiji lahko predstavlja dopolnilo k odgovoru na vprašanja o prekuženosti piščančjih farm in zadrževanju *C. jejuni* v sami okolini farme. Glede na naše rezultate bi lahko sklepali, da je višja filmotvornost izolatov *C. jejuni* iz fecesa živali ena izmed prilagoditev tega patogenega mikroorganizma za ohranjanje znotraj naravnega gostitelja pa tudi kot dejavnik zadrževanja in širjenja v naravi.

Povezave med filmotvornostjo na polistirenu in genotipi sevov *C. jejuni* znotraj naše raziskave nismo našli. Višjo filmotvornost sevov *C. jejuni* smo pričakovali znotraj splošno razširjenega sekvenčnega tipa ST-21, ti sevi pa so se večinoma umestili v skupino z nižjo filmotvornostjo. Tudi Gripp in sod. (2011) so na osnovi tipizacije MLST, metabolizma, izražanja proteinov in interakcije z evkariontskimi celicami, na primeru izolatov iz perutnine, človeka, goveda in s hrano povezanimi izolati skušali najti povezavo znotraj pripadajočega ST-21. Rezultati so pokazal na izjemno raznolikost med fenotipskimi lastnostmi sevov s ST-21, ki zaradi rekombinacij in fagom sorodnim zaporedjem kažejo veliko raznolikost tudi na genetski ravni (Gripp in sod., 2011). Večina sevov s ST-5205 v naši študiji se je umestila v III. ali IV. adhezivni razred. Povezanost s pripadnostjo klonskemu kompleksu se je pokazala v primeru CC-353, saj večina sevov imela nižjo filmotvornost. Vse dobljene rezultate, ki nakazujejo na morebitno povezanost genotipa, določenega s tipizacijo PFGE ali MLST, bi bilo treba preveriti na še večjem naboru sevov.

Odpornost proti določenim skupinam antibiotikov, kot so na primer makrolidi, zmanjša fitnes sevov *C. jejuni* (Han in sod., 2009). Prav tako so Lapierre in sod. (2016) pokazali statistično značilno povezavo med prisotnostjo genov za virulenco, predvsem tistih, odgovornih za invazijo in večjo občutljivostjo na antibiotike. Kljub temu da večkratno odporni izolati *C. jejuni* v naši študiji niso bili zastopani v velikem številu, gre predvsem za seve z nižjo sposobnostjo filmotvornosti na polistirenu.

Čeprav biofilm kot tvorba predstavlja večje tveganje za pojav odpornosti proti antibiotikom, predvsem zaradi tesnejšega stika med mikroorganizmi in posledično višje frekvence horizontalnega prenosa genov (Svensson in sod., 2014), pa odpornost proti antibiotikom lahko predstavlja prevelik napor za bakterijsko celico. Nekoliko bolj skrb vzbujajoče je, da so se ravno izolati iz fecesa perutnine in goveda z višjo stopnjo filmotvornosti pokazali kot večinoma odporni proti fluorokinolonom in/ali tetraciklinu. Bae in Jeon (2013) sta pokazala da so bile iz biofilma odcepljene bakterije *Campylobacter* spp. odpornejše na fluorokinolone, pri čemer pa vseeno ni bilo opažene statistično značilne povezave med odpornostjo sevov *C. jejuni* proti ciprofloxacinu in/ali nalidiksinski kislini in stopnjo adhezivnosti posameznega seva (Bae in Jeon, 2013).

5.2 FILMOTVORNOST BAKTERIJ *C. jejuni* NA POVRŠINI NERJAVNEGA JEKLA

Sposobnost adhezije bakterij je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti površine bakterijske celice in same kontaktne površine, hidrodinamskih pojavov ter ostalih okoliških dejavnikov (Olszewska, 2013; Nguyen in sod., 2012). V kontekstu preverjanja vpliva okoljskih dejavnikov na sposobnost adhezije in tvorbe biofilma na abiotski površini je bilo usmerjenih že veliko raziskav. Kljub temu na primeru *C. jejuni* zaradi pomanjkanja ponovljivosti in primerljivosti poskusov še vedno ni jasno, kateri in v kakšni kombinaciji dejavniki vplivajo na omenjena procesa (Jeon in sod., 2009; Nguyen in sod., 2012). Predvsem pri začetnih stopnjah tvorbe biofilma ima pomembno vlogo sestava samega substrata in njegove fizikalno-kemijske lastnosti, saj se stopnja adhezije na raznolike površine razlikuje (Nguyen in sod., 2010).

Rezultati določanja filmotvornosti sevov *C. jejuni* na različno obdelani površini nerjavnega jekla med uporabljenima metodama v naši študiji niso primerljivi. Zaradi pomanjkljivosti tradicionalnih metod menimo, da bi uporaba hitrejše, zanesljivejše in ponovljivejše metode za oceno sposobnosti adhezije in tvorbe biofilma, predstavljala velik napredek, saj sta omenjeni lastnosti mikroorganizmov pomembna dejavnika (Chavant in sod., 2007). Na podlagi rezultatov določanja vpliva različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij *C. jejuni* z gojitveno metodo bi lahko sklepali, da metoda za ta namen ni dovolj občutljiva. Razlika v hrapavosti glede na obdelavo površine je reda velikosti nanometrske skale, kar pa je bilo za odstranitev bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla s kroglicami uporabljene dimenzije premalo natančno, da bi lahko jasno videli razliko v številu celic glede na različno obdelavo kontaktne površine. Tukaj se pojavi še problem stanja VBNC, v katerega preidejo bakterije v neugodnih razmerah, zato je mogoče, da vse odstranjene bakterije iz kuponov jekla v suspenziji na površini trdnega gojišča pri danih pogojih niso zrasle.

5.2.1 Vpliv različno obdelane površine nerjavnega jekla na filmotvornost bakterij *C. jejuni*

V naši študiji smo z uporabo kolorimetrične metode uspeli pokazati, da se filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta *luxS* razlikuje glede na površinsko obdelavo nerjavnega jekla. Več statistično značilnih razlik v količini nastale biomase med površinami smo uspeli pokazati z uporabo kolorimetrične metode barvanja s kristal vijoličnim, kot pa z gojitveno metodo določanja CFU/ml. Razprava v nadaljevanju zato sloni na rezultatih, pridobljenih s kolorimetrično metodo določanja tvorbe biofilma, v odvisnosti tako od same obdelave kontaktne površine kot tudi prisotnosti kisika.

Arnold in Bailey (2000) sta pokazala, da je bila adhezivnost bakterij na površino elektropoliranega jekla v primerjavi z neobdelano površino nižja, s posledično počasnejšim nastajanjem biofilma. Kljub temu pa so bila naša pričakovanja ravno nasprotna, saj je hrapavost elektropolirane površine (370 nm) najvišja izmed testiranih, kar poveča tudi samo kontaktno površino pritrjevanja, zato smo pričakovali več nastalega biofilma. Slednje smo potrdili tudi z rezultati, saj je bila absorbanca vezanega barvila na elektropolirani površini (EL) po 24- in 48-urni inkubacij pri mikroaerofilnih pogojih za oba seva najvišja. Filmotvornost pri mikroaerofilnih pogojih je bila najnižja na krtačeni površini (KR), kar velja za oba seva in oba testirana tipa jekla.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je obdelava oziroma sama hrapavost površine pomemben dejavnik, ki vpliva na količino nastalega biofilma. Tako se lahko bolj hrapavo površino z več vdolbinami ujame in zadrži večje število bakterij (Whitehead in sod., 2006), kar jim nudi še dodatno zaščito pred stresnimi dejavniki okolja (Palmer in sod., 2007). Za uspešen nadzor in preprečevanje širjenja ter kontaminacije s *C. jejuni* je treba vzeti v obzir več dejavnikov in uporabiti kombinacijo ukrepov. K temu lahko veliko prispeva izbira materiala s površinsko obdelavo takšnega profila, ki najbolj preprečuje nastanek mikrobnega biofilma. Krtačena površina je tista, ki jo lahko na podlagi rezultatov našega eksperimentalnega dela izberemo kot najbolj relevantno za uporabo v perutninski predelovalni industriji, kjer prihaja do najpogostejšega stika *C. jejuni* s površino nerjavnega jekla. Z uporabo na filmotvornost najmanj občutljive površine bi se tako lahko ciljno izognili pogostosti kontaminacij in povečali nadzor.

5.2.2 Vpliv prisotnosti kisika na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla

Dinamika tvorbe biofilma v aerobnih pogojih, določena s kolorimetrično metodo, je različna tisti pri mikroaerofilnih pogojih. Slednje se nanaša tako na testirana seva kot tudi na čas inkubacije in na površinsko obdelavo nerjavnega jekla. Filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC11168 v aerobnih pogojih je pri vseh časih inkubacije nižja kot pri mikroaerofilnih pogojih.

Čeprav gre za mikroaerofilne bakterije, so prisotnost kisika obeležili kot za filmotvornost stimulirajoč dejavnik, saj naj bi celice strmele po formaciji tvorbe, ki bi jim nudila še dodatno zaščito (Reuter in sod., 2010). Čeprav bi lahko sposobnost tvorbe biofima smatrali kot enega izmed obrambnih mehanizmov na stresne dejavnike okolja pa je iz drugega zornega kota zaskrbljujoče, da so bakterije *C. jejuni* kljub prisotnosti kisika sposobne usmeriti vso energijo v spremembo fenotipa in tako predstavljajo še večjo nevarnost za kontaminacijo in okužbo. Slednje se nekako navezuje tudi na že prej pokazano sposobnost preživetja *C. jejuni* tudi do 15 ur pri aerobnih pogojih s primerljivim številom kot bakterije v kontroli pri mikroaerofilnih pogojih (Mihaljević in sod. 2007). Na samo sposobnost preživetja pa med drugim vpliva tudi začetna koncentracija bakterij (Kaakoush in sod., 2007), ki je bila pri izvedbi našega poskusa približno 10^7 CFU/mL, pri čemer je tudi verjetnost za medcelično komunikacijo in s tem povezano filmotvornostjo večja.

Predhodne študije določanja tvorbe biofilma seva NCTC 11168 v steklenih epruvetah s kolorimetrično metodo (Reuter in sod. , 2010) so nakazale na vpliv oksidativnega stresa na povečano tvorbo biofilma. Turonova in sod. (2015) ob primerjavi dveh referenčnih sevov *C. jejuni* (NCTC 11168 in 81-176) in uporabi konfokalnega laserskega mikroskopa pokažejo, da je odziv na stopnji ultrastrukture nastalega biofilma ob prisotnost kisika sevno specifičen. Vse kaže na to, da se znotraj različno strukturiranih biofilmov nahajajo subpopulacije bakterij, ki so različno izpostavljene kisiku. Za potrditev prisotnosti kisika kot odgovornega dejavnika za nastanek biofilma in moduliranje preživetja *C. jejuni* s pomočjo različnih populacij so potrebne še dodatne raziskave na molekularnem nivoju (Turonova in sod., 2015).

5.3 VPLIV IZVLEČKA *E. RUTICARPA* IN POSAMEZNIH FRAKCIJ NA FILMOTVORNOST BAKTERIJ *C. jejuni* NA ABIOTSKI IN BIOTSKI POVRŠINI

V kontrolnem poskusu brez dodanih testiranih učinkovin smo pokazali, da sta referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 in njegov mutant *luxS* sposobna adhezije na površino nerjavnega jekla že po eni uri inkubacije pri mikroaerofilnih pogojih. Pri sevu *luxS* gre za mutacijo gena, katerega produkt naj bi bil ključen člen pri nastanku signalnih molekul AI-2 in posledično medcelične komunikacije, kar pa vpliva na zmanjšano gibljivost, nižjo količino nastalega biofilma in pa tudi na nižjo sposobnosti kolonizacije (Plummer in sod., 2011). Ne glede na slednje pa se je v našem primeru izkazalo, da se filmotvornost mutanta *luxS* ni statistično razlikovala od seva NCTC 11168, kljub odsotnosti signalnih molekul AI-2 pri sevu *luxS*. Tudi Reeser in sod. (2007) so s pomočjo mutanta *luxS* pokazali potencialno vlogo AI-2 pri nastajanju biofilma bakterij *C. jejuni* saj je bila količina nastalega biofilma pri mutantu nižja kot za referenčni sev. Po drugi strani pa so Winzer in sod. (2002) na podlagi fenotipskih razlik med mutantom *luxS* in referenčnim sevom pokazali, da poleg same mutacije v genu *luxS* vpliva na sposobnost adhezije še motena aktivacija metilnega cikla in ne samo odsotnost AI-2 signala.

Seva imata skoraj enak podvojitveni čas (Elvers in Park, 2002), Turanova in sod. (2015) pa navajajo, da stopnja rasti najverjetneje tudi ni neposredno povezana s sposobnostjo tvorbe ter količino nastalega biofilma.

Pri določanju vpliva izvlečka *E. rutilarpa* na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na abiotiski kontaktni površini nerjavnega jekla in na modelu celične linije E12 kot biotski površini rezultati niso bili v skladu s pričakovanji. Čeprav se je pri poskusih določanja vpliva na filmotvornost na nerjavnem jeklu pokazal potencialen učinek izvlečka *E. rutilarpa* in frakcije Q (z 41,7 % deležem evokarpina) na preprečevanje filmotvornosti, pa na biotski površini nismo mogli potrditi zastavljene hipoteze. Gre namreč za dva popolnoma različna sistema, pri čemer je sklop interakcij patogena, kot je *C. jejuni* z modelom epitelnih celic črevesa še vedno nepoznan in rezultati študij težko primerljivi. Čeprav sam mehanizem adhezije in invazije bakterij *C. jejuni* na epitelne celice črevesa še vedno ni povsem pojasnjen, gre verjetno v prvi vrsti za interakcijo adhezinov na površini bakterijske celice z glikoproteini ali glikolipidi na površini tarčne epitelne celice. Ravno zaradi slednjega je razvoj v smeri protiadhezijskih sredstev v prvi vrsti na osnovi analogov receptorjev in principu kompetitivne inhibicije (Wang in sod., 2015). Sklepamo, da je prisotnost adhezinov na površini gostiteljske celice in mukopolisaharidov, ki delujejo celo kot kemoatraktanti za *C. jejuni*, omogočilo višjo stopnjo adhezivnosti bakterij, v primerjavi z abiotsko površino nerjavnega jekla. Ravno slednje bi bil lahko vzrok nepričakovanega rezultata in hkrati opozorilo za kritičen pristop k interpretaciji rezultatov uporabe izvlečkov pri preprečevanju filmotvornosti na abiotiski površini, katerega učinkovitost na biotski površini *in vitro* je lahko vprašljiva.

5.3.1 Vpliv izvlečka *E. rutilarpa* na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla

Vpliv na znižanje tvorbe biofilma ob dodatku izvlečka *E. rutilarpa* in izbranih frakcij (frakcija Q, evodiamin, rutekarpin) smo po 24-urni inkubaciji opazili pri vseh testiranih sevih, učinek pa je bil po daljši inkubaciji (48 in 72 ur) manj očiten. Višje število CFU/ml bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla ob dodatku izvlečka in evodiamina bi bilo lahko posledica prisotnosti določenih komponent oziroma kombinacije le-teh, kar lahko spodbudi pritrjevanje, kot navajajo tudi Sandasi in sod. (2010). Prav tako je lahko prišlo do razgradnje komponent zaradi same metabolne aktivnosti bakterij *C. jejuni*, ali pa je prisotnost različnih komponent izvlečka delovala antagonistično, kot opisano v primeru protimikrobnega učinka kinolonov in evokarpina na mikrobakterije (Hochfellner in sod., 2015). Slednje moramo vzeti v obzir, saj ne gre zanemariti možnih interakcij med različnimi komponentami izvlečka, kar bi lahko pomembno vplivalo na samo učinkovitost testiranih komponent. Nedavno se je izkazalo, da ima evokarpin, ki predstavlja približno 42 % frakcije Q, višjo protimikrobnou aktivnost na hitro rastoče seve mikrobakterij kot večina standardnih zdravil in kot tak predstavlja obetavno spojino za razvoj novih derivatov z izboljšano protimikrobnou aktivnostjo (Wube in sod., 2011).

5.3.2 Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* na prisotnost signalnih molekul AI-2

Zaradi poenostavitev proučevanja signaliziranja med bakterijskimi celicami je bila večina dosedanjih študij zaznavanja celične gostote opisana v kontekstu prostoživečih celic. Razumevanje istega mehanizma znotraj biofilma je nekoliko težje, saj lahko na sintezo, stabilnost, porazdelitev ter učinkovitost vezave signalnih molekul na receptorje vplivajo različni fizikalni in kemijski dejavniki ter dostopnost in razpoložljivost hranil (Li in Tian, 2012). V teoriji imajo lahko na s signalnimi molekulami posredovano zaznavanje celične gostote vpliv dejavniki, kot so prisotnost in koncentracija signalnih molekul, omejeno prehajanja molekul, dostopnost tarčnih receptorjev in nivo sinteze ter razgradnje drugega vira avtoinduktorja (Platt in Fuqua, 2010). Preverili smo potencial inhibitornega učinka izvlečka *E. ruticarpa* in posameznih frakcij na prisotnost signalnih molekul, v povezavi s samo filmotvornostjo bakterij *C. jejuni*. Čeprav znotraj naše študije nismo mogli potrditi neposredne povezave filmotvornosti s prisotnostjo molekul AI-2, pa je dodatek izvlečka *E. ruticarpa* in predvsem frakcije Q tudi do 90 % vplivala na znižanje koncentracije AI-2. Za potrditev ključnega mehanizma, na katerega je nižja koncentracija AI-2 vplivala, bi morali v študijo vključiti širši nabor virulentnih dejavnikov bakterij *C. jejuni*, kot so recimo gibljivost in produkcija toksinov. Rezultati naše študije kažejo na to, da aktivnost AI-2 ni ključna za znižanje števila CFU/mL testiranih sevov *C. jejuni* sevov na površini nerjavnega jekla.

Čeprav vloga signalnih molekul AI-2 pri QS bakterij *C. jejuni* še vedno ni povsem pojasnjena (Holmes in sod., 2009), ne smemo zanemariti vloge AI-2 pri uravnavanju komunikacije tako znotraj vrste kot tudi med različnimi vrstami Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij (Miller in Bassler, 2001). Prisotnost signala znotraj večcelične združbe lahko pomembno vpliva na vse mikroorganizme, sposobne medcelične komunikacije. Glede na pogostost okužb s kampilobaktrom in vse večje število na antibiotike odpornih sevov, bi bil lahko ravno mehanizem zaznavanja celične gostote tarča nadzora v prihodnosti (Plummer in sod., 2011).

5.3.3 Vpliv izvlečka *E. ruticarpa* in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12

Protiadheziven potencial rastlinskih izvlečkov tako na abiotiske kot tudi biotske površine je bil opisan na primeru etanolnega izvlečka timijana. Subinhibitorne koncentracije izvlečka so tudi do 30 % vplivale na preprečevanje adhezivnosti izolata *C. jejuni* K49/4 iz piščančjega mesa, na polistiren kot tudi na modelu prašičjih epitelnih črevesnih celic (PSI 1) in humanih epitelnih celicah tankega črevesa (H4) (Šikić Pogačar in sod., 2016). Kljub dokazani učinkovitosti izvlečka in evokarpina na preprečevanje filmotvornosti na površini nerjavnega jekla pa na modelu celične linije E12 nismo dobili potrditve rezultatov prvega dela študije.

Čeprav naj bi mukozna plast v črevesu služila kot zaščita spodaj ležečega tkiva pred mehanskimi, kemijskimi, encimskimi in bila ovira za okužbo s patogenimi mikroorganizmi, pa je *C. jejuni* razvil prilagoditvene mehanizme za uspešno kolonizacijo. Še več, interakcija *C. jejuni* z mukusom naj bi celo modulirala njegovo patogenost pri človeku, saj naj bi bila ravno razlika v sestavi mukusa dejavnik, zaradi katerega pri perutnini ne pride do pojava simptomov okužbe (Alemka in sod., 2010b, 2012). Neuspešen poskus delovanja izvlečka in evokarpina na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* bi bil lahko posledica prisotnosti mukusa, ki ne le da onemogoča dostopnost naših testiranih učinkovin, ampak lahko celo omogoča še večjo afiniteto in pritrjevanje sevov *C. jejuni*. Vsekakor pa smo mnenja, da je za uspešno proučevanje interakcij bakterij z mukusom potreben multidisciplinarni pristop s strokovnjaki s področja mikrobiologije, biologije mukusa, kemije in glikobiologije, kot navajajo Naughton in sod. (2014).

Na osnovi rezultatov naše študije nismo mogli potrditi hipoteze o učinku izvlečka *E. rutilarpa* na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni* na modelu celične linije E12. Navedli bomo nekaj dejavnikov, za katere menimo, da bi bili lahko vzrok takšnega izzida. Adhezija *C. jejuni* na celice, ki izločajo mukus, se je pokazala za veliko boljšo, v primerjavi s celicami, ki mukusa ne izločajo (Alemka in sod. 2010a). Slednje bi lahko doprineslo k večji sposobnosti interakcije uporabljenih sevov *C. jejuni* in posledično adhezijo ter invazijo, na katero dodatek testiranih učinkovin ni imel statistično značilnega učinka. Eden izmed dejavnikov bi bila lahko tudi uporabljena koncentracija učinkovin, saj je bila zaradi sledenja vrednosti MIK in IC₅₀ precej nizka. Ob primerjavi naših rezultatov s študijo Pogačar in sod (2015), ki so pokazali isto stopnjo protiadhezijske učinkovitosti izvlečka *Alpinia katsumadai* na bakterije *C. jejuni* K49/4 v širšem koncentracijskem območju pa je razvidno, da ne gre vedno sklepati na koncentracijsko odvisnost vpliva testiranih učinkovin. Po drugi strani pa je uporabljena koncentracija izvlečka in evokarpina enaka vrednosti 0,75 MIK in za bakterije lahko predstavlja stresni dejavnik, kar bi lahko vplivalo na še večjo adhezivnost oziroma invazivnost bakterij na modelu izbrane celične linije. Učinek testiranih alkaloidov smo določali po 3-urni inkubaciji, lahko pa bi dogajanje spremljali v daljšem časovnem obdobju in mogoče prišli tudi do neke dinamike delovanje, ki bi nam dala dodatne odgovore.

Poleg konvencionalnih zdravil se kot tako imenovana komplementarna zdravila uporabljajo tudi zelišča. Vedno več raziskav je usmerjenih v odkrivanje dodatnih učinkov, ki jih imajo zelišča tradicionalne medicine, uporabljena za lajšanje gastrointestinalnih težav. Slednje bi imelo doprinos tudi k odkritju novih struktur, ki so poglavite pri stiku patogena z gostiteljem, in bi tako vodile k razvoju nove generacije zdravil (Bensch in sod., 2011).

5.4 KOMBINIRAN VPLIV IZVLEČKA ALI EVOKARPINA Z BAKTERIOFAGOM PC5 NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ *C. jejuni* NA MODELU CELIČNE LINIJE E12

Testiranja kombiniranega vpliva rastlinskih izvlečkov z bakteriofagom na preprečevanje adhezivnosti ali invazivnosti bakterij *C. jejuni* na celičnem modelu, pri pregledu literature nismo našli. Samo dogajanje v tako kompleksnem sistemu, kot je model mukus izločajočih humanih črevesnih epitelnih celic E12, prisotnost bakteriofaga in rastlinskega izvlečka je zato pred nas postavilo nov izziv za nadaljnje raziskovalno delo. Pri preizkušanju različnih nastavitev poskusa je Šikić Pogačar (2016) pokazala, da je za preprečevanje adhezivnosti bakterij *C. jejuni* K49/4 na modelu prašičjih epitelnih celic (PSI) najučinkovitejša predhodna inkubacija epitelnih celic z izbranimi rastlinskimi izvlečki. Ta učinek bi bil lahko dosežen zaradi vezave izvlečkov na receptorje epitelnih celic, kar bi onemogočilo hkratno vezavo bakterij na receptorje (Šikić Pogačar, 2016). Barr in sod. (2015) so pokazali, da 24-urna predhodna izpostavitev pljučnih epitelnih celic A549 bakteriofagu T4 po 18-urni inkubaciji zmanjša število bakterij *E. coli* v primerjavi s kontrolo brez bakteriofagov. Bakteriofagi so tako prek uspešne adhezije na mukozni sloj učinkovito zmanjšali okužbo epitelnih celic z bakterijami (Barr in sod., 2015). Za zmanjšanje števila bakterij je torej potrebna učinkovita predhodna vezava bakteriofaga na mukozni sloj, ki pa je lahko odvisna od raznih vezavnih proteinov na površini bakteriofaga, kot je to protein kapside Hoc v primeru faga T4 (Barr in sod., 2013).

V naši študiji dodatek izvlečka ali evokarpina ali bakteriofaga sam po sebi ni imel učinka na zmanjšanje števila skupno adheriranih ali invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08. Ob kombinirani uporabi izvlečka ali evokarpina z bakteriofagom PC5 pa je prišlo do statistično značilnega zmanjšanja števila invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12. Na osnovi dobljenih rezultatov in ugotovitev drugih avtorjev lahko sklepamo v smeri neznanega kombiniranega učinka, ki ga ima hkratna prisotnost izvlečka in bakteriofaga na znižanje števila invadiranih, ne pa tudi na število skupno adheriranih bakterij *C. jejuni* 660/08. Čeprav so nekateri avtorji (Biswas in sod., 2000; Zheng in sod., 2006) potrdili korelacijo med adhezivnostjo in invazivnostjo sevov *C. jejuni* na humane črevesne epitelne celice, v našem primeru pri sevu *C. jejuni* 660/08 najverjetneje ne gre za povezana oziroma odvisna dogodka. Slednje so pokazali tudi Christensen in sod. (2009), nakar nas Backert in Hofreuter (2013) v preglednem članku ponovno opozarjata na specifičnost interakcij, ki so sevno specifične in rezultati študij zelo težko primerljivi. Dobljeni rezultati kombiniranega učinka izvlečka in bakteriofaga PC5 so pred nas vsekakor postavili nove neznanne in predmet nadaljnjega raziskovanja. Potencial nadaljnjega raziskovalnega dela bi bil lahko tako usmerjen na sam molekularni nivo dogajanja, kakor tudi na nivo imunskega odziva celic, saj bi že vpliv na zmanjšanje vnetja pozitivno vplivalo na sam izid okužbe z bakterijami *C. jejuni*.

6 SKLEPI

Med raziskovalnim delom v sklopu doktorske naloge smo si skušali odgovoriti na postavljene hipoteze in tako prišli do sledečih sklepov:

- Nabor 130 izolatov *C. jejuni* vključenih v našo študijo, odraža visoko feno- in genotipsko raznolikost. Z uporabo presejalne metode barvanja s kristal vijoličnim, za določanje filmotvornosti bakterij *C. jejuni* na polistirenu smo pokazali, da so se izolati iz feca živali umestili v najvišji adherentni razred. Filmotvornost znotraj testiranega nabora sevov *C. jejuni* ni bila povezana z ostalimi eksperimentalno določenimi lastnostmi, kot so odpornost na antibiotike ali tipizacije na osnovi MLST in PFGE.
- Površinska obdelava kontaktne površine oziroma hrapavost nerjavnega jekla vpliva na filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovega mutanta *luxS*. Najnižjo stopnjo filmotvornosti *C. jejuni* smo v največ primerih dosegli na krtačeni površini obeh testiranih tipov nerjavnega jekla, 304 in 316L.
- Vpliv površinske obdelave nerjavnega jekla se je razlikoval glede na uporabljeno metodo določanja filmotvornosti, sev bakterij *C. jejuni* in tudi glede na prisotnost kisika. Razlika med različno obdelanimi površinami kuponov iz nerjavnega jekla je bila bolj prepoznavna ob uporabi kolorimetrične metode barvanja s kristal vijoličnim kot ob uporabi gojitvene metode. Sev *C. jejuni* z mutacijo v proteinu LuxS, ki sodeluje pri sintezi signalnih molekul AI-2 je pri mikroaerofilnih pogojih sposoben enake stopnje filmotvornosti kot referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168. Filmotvornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 je bila ob prisotnosti kisika nižja kot pri mikroaerofilnih pogojih inkubacije.
- Izvleček *Euodia ruticarpa* (EREE) se je pokazal kot učinkovito protimikrobn sredstvo za bakterije *C. jejuni*. Dodatek izvlečka *E. ruticarpa*, frakcije Q, evodiamina in evokarpina v subinhibitorni koncentraciji (0,25 MIK) se je pokazal kot učinkovit pri preprečevanju filmotvornosti bakterij *C. jejuni* na abiotski površini nerjavnega jekla.
- Dodatek izvlečka *E. ruticarpa* ali evokarpina v subinhibitorni koncentraciji po 3-urni inkubaciji na modelu humanih črevesnih epitelnih celicah E12 ni imel vpliva na zmanjšanje števila skupno adheriranih ali invadiranih bakterij sevov *C. jejuni*.
- Delovanje izvlečka *E. ruticarpa* na preprečevanje filmotvornosti bakterij *C. jejuni* na abiotski površini nerjavnega jekla in biotski površini modela celičnih linij, zaradi večje kompleksnosti slednjega ne more biti primerljivo.
- Ob kombinirani uporabi izvlečka *E. ruticarpa* ali evokarpina z bakteriofagom PC5 je prišlo do statistično značilnega zmanjšanja števila invadiranih bakterij *C. jejuni* 660/08 na modelu celične linije E12.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Bakterije *C. jejuni* so odgovorne za največji delež bakterijsko povzročenega gastroenteritisa v svetu, vendar za nas še vedno predstavljajo veliko neznanko, ki sloni na veliki feno- in genotipski raznolikosti med sevi. Izziv za nas je tako predstavljalno iskalnje povezave med filmotvornostjo na površini polistirena in lastnostmi kot so izvor sevov, odpornost proti antibiotikom in genotip na podlagi tipizacij MLST in PFGE. To bi odprlo nove raziskovalne možnosti, ki bi nam v prihodnosti prinesle ključne odgovore o izvoru sevov *C. jejuni* oziroma sposobnosti njihovega preživetja izven gostitelja ter pogostosti pojavljanja okužb. Izraz filmotvornost smo uvedli kot izraz za skupno poimenovanje adhezivnosti in tvorbe biofilma, na abiotiski kontaktni površini. Raziskovalno delo je bilo usmerjeno tudi k pridobitvi ključnih podatkov, ki bi razširili spekter našega vedenja o okoljskih in intrinzičnih dejavnikih, ki vplivajo na sposobnost filmotvornosti bakterij *C. jejuni*, tako na abiotiske kot tudi biotske kontaktne površine.

Znotraj naše študije smo pokazali, da je filmotvornost sevov *C. jejuni* povezana s samim virom izolacije, saj je bila filmotvornost na površini polistirena pri izolatih iz fecesa živali statistično značilno višja kot pri ostalih. Slednje kaže na pomembnost sposobnosti adhezije in tvorbe biofilma na zadrževanje bakterij *C. jejuni* znotraj gostitelja pa tudi povečanje možnosti za preživetje v okolju. Na podlagi rezultatov lahko vidimo, da na filmotvornost na nerjavnem jeklu kot abiotiski kontaktni površini lahko vpliva veliko dejavnikov. Razlike so vidne zaradi same obdelave površine nerjavnega jekla, glede na uporabljen sev, čas inkubacije ter prisotnost kisika. Očitno je, da je ta občutljiv mikroorganizem sposoben nepredvidljivega odziva na dejavnike okolja, ki pa lahko vodi v nenadzorovano širjenje mikrobne kontaminacije in povečano odpornost. Na preprečevanje filmotvornosti na abiotiskih kontaktnih površinah lahko vplivamo s samo izbiro materiala in površinsko obdelavo tega. Kot pokazano, se je krtačena površina nerjavnega jekla izkazala za najbolj obetavno, saj je filmotvornost testiranih sevov *C. jejuni* na tej najnižja.

Problematika filmotvornosti bakterij *C. jejuni* na abiotiskih in biotskih površinah je pred nas postavila izziv po iskanju učinkovitih protiadheziskih sredstev, za katere še ni znano, da bi bakterije *C. jejuni* razvile odpornost. Med eksperimentalnim delom smo zato testirali učinek izvlečka plodov *E. rutticarpa* in posameznih frakcij na filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavnega jekla ter vpliv na adhezivnosti in invazivnosti na modelu celične linije E12. Testirane učinkovine, ki prej še niso bile opisane niti po kemijski sestavi niti po svoji protimikrobnii učinkovitosti na *C. jejuni* so se pokazale kot potencialno učinkovita protimikrobnia sredstva in tudi kot zaviralci filmotvornosti na površini nerjavnega jekla.

Kljub vidnemu učinku izvlečka *E. ruticarpa* in predvsem frakcije Q na preprečevanje filmotvornosti in na znižanje prisotnosti signalnih molekul AI-2 pa je učinek še vedno prenizek, da bi lahko govorili o potencialni uporabni vrednosti tako v živilski industriji kot tudi pri preprečevanju okužb tega s hrano povezanega patogena.

Naše eksperimentalno delo je obsegalo tudi do sedaj še neopisan kombiniran učinek izvlečka *E. ruticarpa* in bakteriofaga na preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti na modelu celične linije E12. Ta se je sicer pokazal za učinkovitega pri zmanjšanju števila invadiranih bakterij *C. jejuni*, vendar bi bilo za samo razumevanje dogajanja potrebno nadaljnje raziskovalno delo. Uporaba novih aktivnih sredstev za preprečevanje adhezivnosti *C. jejuni* bi predstavljala predvsem pot k manjši rabi antibiotikov in s tem povezanega problema pojavljanja in širjenja rezistence patogenih bakterij. S pridobljenimi podatki v sklopu te doktorske naloge pa lahko vseeno prispevamo k boljšemu razumevanju narave tega s hrano prenosljivega mikroorganizma in se usmerimo k učinkovitejšemu obvladovanju mikrobiološke varnosti v živilsko-prehranski oskrbovalni verigi.

7.2 SUMMARY

There is a great diversity of phenotypic and genotypic characteristics of *C. jejuni* strains responsible for the vast majority of bacterially induced gastroenteritis cases worldwide. The challenge for us was to find the links between the adhesion and biofilm formation ability and properties, such as the origin of strains, antibiotic resistance and MLST and PFGE based genotype. This would open new research opportunities, enabling us to find key answers about the origin of *C. jejuni* strains, their survival factors outside the host, and the incidence of infections. The research work was also focused on the acquisition of key data that would extend our knowledge about the environmental and intrinsic factors influencing the biofilm formation ability of *C. jejuni*, both on abiotic and biotic contact surfaces.

We have shown that the biofilm formation ability of the *C. jejuni* strains tested was linked with the source of isolation and that animal faeces isolates were more adhesive to polystyrene in comparison with other strains. This pointed out the importance of adhesion and biofilm formation ability on the retention of this pathogen within the host and also on its survival in the environment. The inhibition of adhesion and biofilm formation on abiotic contact surfaces can also be influenced by the selection of the material and its surface roughness. Based on our results we can see that the formation of biofilm on a stainless steel surface can be affected by many factors. Differences due to the surface roughness were observed depending on the strain used, the time of incubation, and the presence of oxygen. As shown by the results, the brushed surface of stainless steel proved to be most promising. However, this rather sensitive microorganism is capable of unpredictable responses to environmental factors, which can lead to uncontrolled proliferation, microbial contamination and increased resistance.

The ability of *C. jejuni* to adhere to biotic and abiotic surfaces was a challenge for us to find an anti-adhesion agent against which *C. jejuni* had not yet developed resistance. During our experimental work we tested the fruit extract of *E. ruticarpa* and its fractions, which had not yet been tested for their anti-adhesion, anti-biofilm and antimicrobial activity – some compounds in these fractions were chemically characterised for the first time. Although extract and its fractions did show potential for inhibiting the biofilm formation and influenced the AI-2 concentration, this effect was still too low to have a useful value, both in the food industry and for preventing the infections of this food-related pathogen. In our study, the anti-adhesive and anti-invasive effect of *E. ruticarpa* extract and evocarpine of *C. jejuni* strains on the E12 cell line model could neither be observed.

In our experiments, the combined effects of alkaloids of plant origin and bacteriophages were also assessed. Owing to their effectiveness in reducing the number of invaded *C. jejuni* bacteria, further investigation would be reasonable. These new active agents for preventing the adhesion and biofilm formation of *C. jejuni* could reduce the use of antibiotics and the related problem of the increasing emergence and spread of resistance. The data acquired during the preparation of this thesis have broadened our understanding of this foodborne microorganism and suggest possible improvements to safety management in food production and supply chain.

8 VIRI

- Abadian P.N., Kelley C.P., Goluch E.D. 2014. Cellular analysis and detection using surface plasmon resonance techniques. *Analytical Chemistry*, 86, 6: 2799–2812
- Adams M., Kunert O., Haslinger E., Bauer R. 2004. Inhibition of leukotriene biosynthesis by quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Medica*, 70, 10: 904–908
- Alemka A., Clyne M., Shanahan F., Tompkins T., Corcionivoschi N., Bourke B. 2010a. Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties. *Infection and Immunity*, 78, 6: 2812–2822
- Alemka A., Whelan S., Gough R., Clyne M., Gallagher M.E., Carrington S.D., Bourke B. 2010b. Purified chicken intestinal mucin attenuates *Campylobacter jejuni* pathogenicity in vitro. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 898–903
- Alemka A., Corcionivoschi N., Bourke B. 2012. Defense and adaptation: the complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 15, doi:10.3389/fcimb.2012.00015: 6 str.
- An Y.H., Friedman R.J. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43, 3: 338–348
- Anderson G.G., O'Toole G.A. 2008. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322: 85–105
- Annous B.A., Fratamico P., Smith J.L. 2009. Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*, 74, 1: 24–37
- Arnold J. W., Bailey G. W. 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Pollution Science*, 79, 12: 1839–1845
- Asad S., Opal S.M. 2008. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Critical Care*, 12, 6: 236, doi:10.1186/cc7101: 11 str.
- Asakura M., Samosornsuk W., Hinenoya A., Misawa N., Nishimura K., Matsuhisa A., Yamasaki S. 2008. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52, 2: 260–266
- Atterbury R.J., Connerton P.L., Dodd C.E.R., Rees C.E.D. Connerton, I.F. 2003. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 10: 6302–6306
- Backert S., Boehm M., Wessler S., Tegtmeyer N. 2013. Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Communication and Signaling*, 11: 72, doi:10.1186/1478-811X-11-72: 15 str.

- Backert S., Hofreuter D. 2013. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. Journal of Microbiological Methods, 95, 1: 8–23
- Bacon D.J., Szymanski C.M., Burr D.H., Silver R.P., Alm, R.A., Guerry P. 2001. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Molecular Microbiology, 40, 3: 769–777
- Bae J., Jeon B. 2013. Increased emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in biofilm. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57, 10: 5195–5196
- Bensch K., Tiralongo J., Schmidt K., Matthias A., Bone K.M., Lehmann R., Tiralongo E. 2011. Investigations into the antiadhesive activity of herbal extracts against *Campylobacter jejuni*: Anti-campylobacter adhesion activity of phytotherapeutics. Phytotherapy Research 25, 8: 1125–1132
- Bai A.J., Rai V.R. 2011. Bacterial Quorum sensing and food industry. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10, 3: 184–194
- Barr J.J., Auro R., Furlan M., Whiteson K.L., Erb M.L., Pogliano J., Stotland A., Wolkowicz R., Cutting A.S., Doran K.S., Salamon P., Youle M., Rohwer F. 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 110, 26: 10771–10776
- Barr J.J., Auro R., Sam-Soon N., Kassegne S., Peters G., Bonilla N., Hatay M., Mourtada S., Bailey B., Youle M., Felts B., Baljon A., Nulton J., Salamon P., Rohwer F. 2015. Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 112, 44: 13675–13680
- Bassler B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology, 2, 6: 582–587
- Bassler B.L., Wright M., Silverman M.R. 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. Molecular Microbiology, 13, 2: 273–286
- Behrens I., Stenberg P., Artursson P., Kissel T. 2001. Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. Pharmaceutical Research, 18, 8: 1138–1145
- Bezek K., Kurinčič M., Knauder E., Klančnik A., Raspor P., Bucar F., Smole Možina S., 2016. Attenuation of adhesion, biofilm formation and quorum sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. Phytotherapy Research, doi:10.1002/ptr.5658: 6str.
- Bigwood T., Hudson J.A., Billington C., Carey-Smith G.V., Heinemann J.A. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. Food Microbiology, 25, 2: 400–406
- Biswas D., Itoh K., Sasakawa C. 2000. Uptake pathways of clinical and healthy animal isolates of *Campylobacter jejuni* into INT-407 cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 29, 3: 203–211

- Boles B.R., Singh P.K. 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 105, 34: 12503–12508
- Bolton D.J. 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiology, 48: 99–108
- Bouwman L.I., Niewold, P., van Putten, J.P.M. 2013. Basolateral invasion and trafficking of *Campylobacter jejuni* in polarized epithelial cells. PLoS ONE, 8, 1: e54759, doi:10.1371/journal.pone.0054759: 11 str.
- Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H.J., Coenye T. 2011. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 6: 2655–2661
- Bronowski C., James C.E., Winstanley C. 2014. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiology Letters, 356, 1: 8–19
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 3: 223–253
- Cairns B.J., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., Payne R.J.H. 2009. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage–host dynamics and their application to phage therapy. PLoS Pathogens, 5, 1: 1–10
- Cao R., Zhang H., Guo J., Liu X. H., Liu C., Zhu C.-H., Wu X. Z. 2015. A novel pharmacological method to study the chinese medicinal formula Hua-Zheng-Hui-Sheng-Dan. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 436807, doi:10.1155/2015/436807: 11 str.
- Carvalho C.M., Gannon B.W., Halfhide D.E., Santos S.B., Hayes C.M., Roe J.M., Azeredo J. 2010. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. BMC Microbiology, 10: 232, doi:10.1186/1471-2180-10-232: 11 str.
- Castillo S.L., Heredia N., Contreras J.F., García S. 2011. Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Food Science, 76, 6: M421–426
- Castillo S., Heredia N., Arechiga-Carvajal E., García S. 2014. Citrus extracts as inhibitors of quorum sensing, biofilm formation and motility of *Campylobacter jejuni*. Food Biotechnology, 28: 106–122
- Castillo S., Heredia N., García S. 2015. 2(5H)-Furanone, epigallocatechin gallate, and a citric-based disinfectant disturb quorum-sensing activity and reduce motility and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. Folia Microbiologica, 60, 1: 89–95
- Cerca N., Martins S., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J. 2005. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. Research in Microbiology, 156, 5-6: 650–655
- Carlson K. 2005. Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches. V: Bacteriophages biology and applications. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 428–485

- Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hebraud M., Bernardi T. 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 3: 605–612
- Christensen J.E., Pacheco S.A., Konkel M.E. 2009. Identification of a *Campylobacter jejuni*-secreted protein required for maximal invasion of host cells. *Molecular Microbiology*, 73, 4: 650–662
- Cogan N.G., Keener J.P. 2004. The role of the biofilm matrix in structural development. *Mathematical Medicine and Biology*, 21, 2: 147–166
- Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 10: 1466–1477
- Cullen T.W., Trent M.S., 2010. A link between the assembly of flagella and lipooligosaccharide of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 11: 5160–5165
- D'Agostino E.M., Rossetti D., Atkins D., Ferdinando D., Yakubov G.E. 2012. Interaction of tea polyphenols and food constituents with model gut epithelia: The protective role of the mucus gel layer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12: 3318–3328
- Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.E., Gross U. 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 4: 205–211
- Denkhaus E., Meisen S., Telgheder U., Wingender J. 2007. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchimica Acta*, 158, 1: 1–27
- Dingle K.E., Colles F.M., Wareing D.R., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J., Urwin R., Maiden M.C. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1: 14–23
- Duarte A., Alves A.C., Ferreira S., Silva F., Domingues F.C. 2015. Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 77: 244–250
- Duarte A., Luís Á., Oleastro M., Domingues F.C. 2016. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, 61: 115–122
- Dykes G.A., Sampathkumar B., Korber D.R. 2003. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 1: 1–10
- El-Shibiny A., Connerton P., Connerton I. 2009a. Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 2–3: 197–202
- El-Shibiny A., Scott, A., Timms A., Metawea Y., Connerton P., Connerton I. 2009b. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *Journal of Food Protection*, 72, 4: 733–740

- Elvers K.T., Park S.F. 2002. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a *luxS* encoded signalling molecule. *Microbiology*, 148, 5: 1475–1481
- EUCAST. 2015. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5_0_Breakpoint_Table_01.pdf (junij, 2014)
- Faille C., Membre J.-M., Ussier J.-P., Bellon-Fontaine M.-N., Carpentier B., Laroche M.-A., Benezech T. 2000. Influence of physicochemical properties on the hygienic status of stainless steel with various finishes. *Biofouling*, 15, 4: 261–274
- Flemming H.C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 9: 623–633
- Gagnon M., Zihler Berner A., Chervet N., Chassard C., Lacroix C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods*, 94, 3: 274–279
- Giaouris E., Chorianopoulos N., Nychas G.J.E. 2005. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection*, 68, 10: 2149–2154
- Gilbreath J.J., Cody W.L., Merrell D.S., Hendrixson D.R. 2011. Change is good: variations in common biological mechanisms in the epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 1: 84–132
- Götz G., Sharbati S., Backert S., Alter T. 2012. Quorum sensing dependent phenotypes and their molecular mechanisms in *Campylobacteriales*. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2, 1: 50–60
- Gottenbos B., Busscher H.J., Van Der Mei H.C., Nieuwenhuis P. 2002. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13, 8: 717–722
- Gripp E., Hlahla D., Didelot X., Kops F., Maurischat S., Tedin K., Alter T., Ellerbroek L., Schreiber K., Schomburg D., Janssen T., Bartholomäus P., Hofreuter D., Woltemate S., Uhr M., Brenneke B., Grüning P., Gerlach G., Wieler L., Suerbaum S., Josenhans C. 2011. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics*, 12: 584, doi:10.1186/1471-2164-12-584: 21 str.
- Gunther N.W., Chen C.Y. 2009. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiology*, 26, 1: 44–51
- Guo B., Lin J., Reynolds D.L., Zhang Q. 2010. Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1: 77–83
- Habib I., Louwen R., Uyttendaele M., Houf K., Vandenberg O., Nieuwenhuis E.E., Miller W.G., van Belkum A., De Zutter L. 2009. Correlation between genotypic diversity, lipooligosaccharide gene locus class variation, and Caco-2 cell invasion potential of *Campylobacter jejuni* isolates from chicken meat and humans: contribution to virulotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 13: 4277–4288

- Han F., Pu S., Wang F., Meng J., Ge B. 2009. Fitness cost of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 5: 462–466
- Hansson I., Ederoth M., Andersson L., Vagsholm I., Olsson Engvall E. 2005. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. Journal of Applied Microbiology, 99, 5: 1149–1157
- Hochfellner C., Evangelopoulos D., Zloh M., Wube A., Guzman J.D., McHugh T.D., Kunert O., Bhakta S., Bučar F. 2015. Antagonistic effects of indoloquinazoline alkaloids on antimycobacterial activity of evocarpine. Journal of Applied Microbiology, 118, 4: 864–872
- Hofreuter D., Novik V., Galan J.E. 2008. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. Cell Host Microbe, 4, 5: 425–433
- Holmes K., Tavender T.J., Winzer K., Wells J.M., Hardie K.R. 2009. AI-2 does not function as a quorum sensing molecule in *Campylobacter jejuni* during exponential growth in vitro. BMC Microbiology, 9: 214, doi:10.1186/1471-2180-9-214: 11 str.
- Huang X., Li W., Yang X-W. 2012. New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa*. Fitoterapia, 83, 4: 709–714
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. International Journal of Food Microbiology, 117, 3: 237–257
- Invitrogen. 2010. PrestoBlue cell viability reagent protocol. Life Technologies, 2010. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PrestoBlue_Reagent_PIS_15Oct10.pdf (junij 2014)
- Invitrogen. 2012. PrestoBlue® Cell Viability Reagent Frequently Asked Questions. Life Technologies, 2012. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf> (junij, 2014)
- Jackson D.N., Davis B., Tirado S.M., Duggal M., van Frankenhuyzen J.K., Deaville D., Wijesinghe M.A., Tessaro M., Trevors J.T. 2009. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. Antonie Van Leeuwenhoek, 96, 4: 377–394
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Łaniewski P., Wyszyńska A. 2009. Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. Expert Review of Vaccines, 8, 5: 625–645
- Jakobsen T.H., Bragason S.K., Phipps R.K., Christensen L.D., van Gennip M., Alhede M., Skindersoe M., Larsen T.O., Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. 2012. Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 78, 7: 2410–2421
- Janež N., Kokosin A., Zaletel E., Vranac T., Kovač J., Vuckovic D., Smole Možina S., Curin Serbec V., Zhang Q., Accetto T., Podgornik A., Peterka M. 2014. Identification and characterisation of new *Campylobacter* group III phages of animal origin. FEMS Microbiology Letters, 359, 1: 64–71
- Jeon B., Muraoka W., Scupham A., Zhang Q. 2009. Roles of lipooligosaccharide and capsular polysaccharide in antimicrobial resistance and natural transformation of *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 63, 3: 462–468

- Jolley K. A., Maiden M.C. 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11, 1: 595–606
- Joshua G.W., Guthrie-Irons C., Karlyshev A.V., Wren B.W. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152, 2: 387–396
- Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 3: 687–720
- Kalia V.C. 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31, 2: 224–245
- Kalmokoff M., Lanthier P., Tremblay T.L., Foss M., Lau P.C., Sanders G., Austin J., Kelly J., Szymanski C.M. 2006. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 188, 12: 4312–4320
- Karunakaran E., Mukherjee J., Ramalingam B., Biggs C.A. 2011. “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 6: 1869–1881
- Katsikogianni M., Missirlis Y.F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*, 8: 37–57
- Klančnik A., Guzej B., Kolar M.H., Abramovič H., Možina S.S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8: 1744–1752
- Klančnik A., Groblacher B., Kovač J., Bučar F., Možina S.S. 2012a. Anti-*Campylobacter* and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 5: 1249–1262
- Klančnik A., Možina S.S., Zhang Q. 2012b. Anti-*Campylobacter* activities and resistance mechanisms of natural phenolic compounds in *Campylobacter*. *PLoS One*, 7, 12: e51800, doi:10.1371/journal.pone.0051800: 10 str.
- Konkel M.E., Klena J.D., Rivera-Amill V., Monteville M.R., Biswas D., Raphael B., Mickelson J. 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 186, 11: 3296–3303
- Kovač J. 2011. Molekularna identifikacija in tipizacija bakterij *Campylobacter jejuni* iz različnih virov ter njihova odpornost proti antibiotikom. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.
- Kovač J., Čadež N., Lusicky M., Nielsen E.M., Ocepek M., Raspor P., Možina S.S. 2014. The evidence for clonal spreading of quinolone resistance with a particular clonal complex of *Campylobacter jejuni*. *Epidemiology & Infection*: 142, 12: 2595–2603
- Kubota H., Senda S., Nomura N., Tokuda H., Uchiyama H. 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 4: 381–386

- Lall N., Henley-Smith C.J., De Canha M.N., Oosthuizen C.B., Berrington D. 2013. Viability reagent, PrestoBlue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. International Journal of Microbiology, doi:10.1155/2013/420601: 5 str.
- Lapierre L., Gatica M.A., Riquelme V., Vergara C., Yañez J.M., San Martín B., Sáenz L., Vidal M., Martínez M.C., Araya P., Flores R., Duery O., Vidal R. 2016. Characterization of antimicrobial susceptibility and its association with virulence genes related to adherence, invasion, and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from animals, meat, and humans. Microbial Drug Resistance, doi:10.1089/mdr.2015.0055: 13 str.
- Lesuffleur T., Barbat A., Dussault E., Zweibaum A. 1990. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. Cancer Research, 50, 19: 6334–6343
- Lewis K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry-Moscow, 70, 2: 267–274
- Li X., Yan Z., Xu J. 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Microbiology, 149: 353–362
- Li Y.H., Tian X. 2012. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors (Basel), 12, 3: 2519–2538
- Liao J.F., Chiou, W.F., Shen, Y.C., Wang, G.J., Chen, C.F. 2011. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (*Wuzhuyu*) and its major bioactive components. Chinese Medicine, 6: 6, doi:10.1186/1749-8546-6-6: 8 str.
- Lin J., Overbye Michel L., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46, 7: 2124–2131
- Lin J., Sahin O., Michel L. O., Zhang Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity, 71, 8: 4250–4259
- Linden S.K., Sutton P., Karlsson N.G., Korolik V., McGuckin M.A. 2008. Mucins in the mucosal barrier to infection. Mucosal Immunology, 1: 183–197, doi:10.1038/mi.2008.5: 14 str.
- Liu R., Chu X., Sun A., Kong L. 2005. Preparative isolation and purification of alkaloids from the Chinese medicinal herb *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A, 1074, 1-2: 139–144
- Louwen R., Heikema A., van Belkum A., Ott A., Gilbert M., Ang W., Endtz H.P., Bergman M.P., Nieuwenhuis E.E. 2008. The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. Infection and Immunity, 76, 10: 4431–4438
- Maal-Bared R., Bartlett K.H., Bowie W.R., Hall E.R. 2012. *Campylobacter* spp. distribution in biofilms on different surfaces in an agricultural watershed (Elk Creek, British Columbia): using biofilms to monitor for *Campylobacter*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 215, 3: 270–278

- Mah T.F., O'Toole G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 1: 34–39
- Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. 2015. HT29 Cell Line. V: The Impact of Food Bioactives on Health. Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wicher H. (eds.). Cham, Springer International Publishing: 113–124
- Mihaljević R.R., Sikić, M., Klančnik A., Brumini G., Možin, S.S., Abram, M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43, 2-3: 120–125
- Miller M.B., Bassler B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 1: 165–199
- Mills D.C., Gundogdu O., Elmi A., Bajaj-Elliott M., Taylor P.W., Wren B.W., Dorrell N. 2012. Increase in *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal epithelial cells under low-oxygen coculture conditions that reflect the in vivo environment. *Infection and Immunity*, 80, 5: 1690–1698
- Moe K.K., Mimura J., Ohnishi T., Wake T., Yamazaki W., Nakai M., Misawa N. 2010. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 4: 411–416
- Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., McDowell D.A., Megraud F., Millar B.C., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J.R., Rooney P.J., Sails A., Whyte P. 2005. *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 36, 3: 351–382
- Moorhead S.M., Griffiths M.W. 2011. Expression and characterization of cell-signalling molecules in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 3: 786–800
- Nachamkin I. 2002. Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*, 4, 4: 399–403
- Nadell C.D., Xavier J.B., Levin S.A., Foster K.R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 6, 1: e14, doi:10.1371/journal.pbio.0060014: 9 str.
- Naughton J., Duggan G., Bourke B., Clyne M. 2014. Interaction of microbes with mucus and mucins: recent developments. *Gut Microbes*, 5, 1: 48–52
- Navabi N., McGuckin M.A., Linden S.K. 2013. Gastrointestinal cell lines form polarized epithelia with an adherent mucus layer when cultured in semi-wet interfaces with mechanical stimulation. *PLoS One*, 8, 7: e68761, doi:10.1371/journal.pone.0068761: 15 str.
- Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Rodríguez-Cerrato V., Ponte M.C., Soriano F. 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2: 585–590
- Nguyen V.T., Turner M. S., Dykes G. A. 2010. Effect of temperature and contact time on *Campylobacter jejuni* attachment to, and probability of detachment from, stainless steel. *Journal of Food Protection*, 73, 5: 832–838

- Nguyen V.T., Fegan N., Turner M.S., Dykes G.A. 2012. Role of attachment to surfaces on the prevalence and survival of *Campylobacter* through food systems. *Journal of Food Protection*, 75, 1: 195–206
- Nipič D., Godič Torkar K. Oder M., Bezek K., Dražić G., Raspor P., Bohinc K. 2016. Bacterial biofilm formers change behaviour as affected by environmental triggers (osebni vir, januar 2016)
- Niu C., Gilberti E.S. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12: 6951–6956
- O Croinin T., Backert S. 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 25, doi: 10.3389/fcimb.2012.00025: 13 str.
- Olszewska M.A. 2013. Microscopic findings for the study of biofilms in food environments. *Acta Biochimica Polonica*, 60, 4: 531–537
- O'Toole G.A., Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30, 2: 295–304
- Packiavathy I.A.S.V., Priya S., Pandian S.K., Ravi A.V. 2014. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin—an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 148: 453–460
- Palmer J., Flint S. Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 9: 577–588
- Palyada K., Threadgill D., Stintzi A. 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 186, 14: 4714–4729
- Pan X., Bligh SWA, Smith E. 2014. Quinolone alkaloids from fructus *Euodiae* show activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 28, 2: 305–307
- Paraje M.G. 2011. Antimicrobial resistance in biofilms. V: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas (ed.). Formatech. <http://www.formatech.info/microbiology3/book/736-744.pdf> (junij 2016)
- Park S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 3: 177–188
- Partington E. 2006. Stainless steel in the food and beverage industry. Luksemburg, Euro Inox. http://www.worldstainless.org/Files/issf/non-image-files/PDF/Euro_Inox/StSt_in_FoodandBeverage_EN.pdf (junij, 2016)
- Patel R., 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437: 41–47
- Pei D., Zhu J. 2004. Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 5: 492–497
- Platt T.G., Fuqua C. 2010. What's in a name? The semantics of quorum sensing. *Trends in Microbiology*, 18, 9: 383–387

- Plummer P., Zhu J., Akiba M., Pei D., Zhang Q. 2011. Identification of a key amino acid of LuxS involved in AI-2 production in *Campylobacter jejuni*. PLoS One, 6, 1: e15876, doi:10.1371/journal.pone.0015876: 9 str.
- Plummer P.J. 2012. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 6, 2: 22, doi: 10.3389/fcimb.2012.00022: 9 str.
- Pogačar M.Š., Klančnik A., Bucar F., Langerholc T., Možina S.S. 2015. *Alpinia katsumadai* extracts inhibit adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* in animal and human foetal small intestine cell lines. Phytotherapy Research, 29, 10: 1585–1589
- Prasadi D., Prasad K.N. 2010. Environmental factors affect the survival and expression of virulent cytolethal distending toxin of *Campylobacter jejuni*. Journal of Environmental Research And Development, 5, 2: 413–420
- Pulsenet International. 2013.
http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL03_CampyPFG_Eprotocol.pdf (januar 2015)
- Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O. 2015. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. Future Medicinal Chemistry, 7, 5: 647–671
- Reeser R.J., Medler R.T., Billington S.J., Jost B.H., Joens L.A. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. Applied and Environmental Microbiology, 73, 6: 1908-1913
- Renner L.D., Weibel D.B. 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. MRS Bulletin, 36, 5: 347-355
- Reuter M., Mallett A., Pearson B.M., van Vliet A.H. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology, 76, 7: 2122-2128
- Ridley A., Morris V., Gittins J., Cawthraw S., Harris J., Edge S., Allen V. 2011. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. Journal of Applied Microbiology, 111, 1: 233–244
- Romanova I.M., Gintsburg A.L. 2011. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii, 3: 99–109
- Russell R.G., Blake D.C. 1994. Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity, 62, 9: 3773–3779
- Ryu K., Biswas D., Ahn J. 2014. Effect of bacteriophage on the susceptibility, motility, invasion, and survival of *Salmonella Typhimurium* exposed to the simulated intestinal conditions. Archives of Microbiology, 196, 3: 201–208
- Salaheen S., Nguyen C., Hewes D., Biswas D. 2014. Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*. Food Control, 46: 174–181
- Sandası M., Leonard C.M., Viljoen A.M. 2010. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*: Anti-biofilm activity. Letters in Applied Microbiology, 50, 1: 30–35

- Sanders S.Q., Boothe D.H., Frank J.F., Arnold J.W. 2007. Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 70, 6: 1379–1385
- Schaule G., Griebe T., Flemming H.C. 2000. Steps in biofilm sampling and characterization in biofouling cases. V: Biofilms. Flemming H.C., Szewzyk U., Griebe T. (eds.). Pennsylvania, Technomic Publishing Company, Inc.: 1–21
- Selim S.A., Adam M.E., Hassan S.M., Albalawi A.R. 2014. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14: 179, doi:10.1186/1472-6882-14-179: 8 str.
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 2: 200, doi: 10.3389/fmicb.2011.00200: 12 str.
- Siringan P., Connerton P.L., Payne R.J., Connerton I.F. 2011. Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 10: 3320–3326
- Soto S.M. 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4, 3: 223–229
- Srey S., Jahid, I.K., Ha S.D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 2: 572–585
- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 2: 175–179
- Sulaeman S., Le Bihan G., Rossero A., Federighi M., De E., Tresse O. 2010. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 4: 1303–1312
- Sugimoto T., Miyase T., Kuroyanagi M., Ueno A. 1988. Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* BENTHAM. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36: 4453–4461
- Sulaeman S., Hernould M., Schaumann A., Coquet L., Bolla J.M., De E., Tresse O. 2012. Enhanced adhesion of *Campylobacter jejuni* to abiotic surfaces is mediated by membrane proteins in oxygen-enriched conditions. *PLoS One*, 7, 9: e46402, doi:10.1371/journal.pone.0046402: 14 str.
- Sun J., Daniel R., Wagner-Dobler I., Zeng A.P. 2004. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biology*, 4: 36, doi:10.1186/1471-2148-4-36: 11 str.
- Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3–9

- Svensson S.L., Pryjma M., Gaynor E.C. 2014. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. PloS One, 9, 8: e106063, doi:10.1371/journal.pone.0106063: 13 str.
- Szomolay B., Klapper I., Dockery J., Stewart P.S. 2005. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. Environmental Microbiology, 7, 8: 1186–1191
- Šikić Pogačar M. 2016. Adhezivnost bakterije *Campylobacter jejuni* K49/4 v celičnih linijah črevesnih epitelnih celic in protiadhezijska učinkovitost izbranih rastlinskih izvlečkov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij Bioznanosti: 124 str.
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Bucar F., Langerholc T., Smole Možina S. 2016. Anti-adhesion activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract, thyme post-distillation waste, and olive (*Olea europaea* L.) leaf extract against *Campylobacter jejuni* on polystyrene and intestine epithelial cells. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96, 8: 2723–2730
- Taga M.E., Xavier K.B. 2011. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. V: Current protocols in microbiology. Coico R., McBride A., Quarles J.M., Stevenson B., Taylor R.K. (eds.). New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 1C.1.1-1C.1.15
- Tan L.Y., Yin W.F., Chan K.G. 2013. *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon*—natural food sources with anti-quorum sensing properties. Sensors (Basel), 13, 3: 3975–3985
- Tan S.Y., Chew S.C., Givskov M., Yang L. 2014. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. Current Opinion in Biotechnology, 26: 1–6
- Tang Y.Q., Feng X.Z., Huang L. 1996. Quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa*. Phytochemistry, 43, 3: 719–722
- Tecan Group Ltd. 2013. Männedorf, Tecan Trading AG. http://neotec.co.il/wp-content/uploads/2014/03/AN_PrestoBlue_397847_V1-0.pdf (november, 2014)
- Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. bacteria transmitted through food. 2012. EFSA Journal, 10, 6: 2742, doi:10.2903/j.efsa.2012.2742: 64 str.
- Teh K.H., Flint S., French N. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. International Journal of Food Microbiology, 143, 3: 118–124
- Tenover F.C., Arbei, R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology, 33, 9: 2233–2239
- The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. 2015. EFSA Journal, 13, 12: 4329, doi:10.2903/j.efsa.2015.4329: 191 str.

- Turonova H., Briandet R., Rodrigues R., Hernould M., Hayek N., Stintzi A., Pazlarova J., Tresse O. 2015. Biofilm spatial organization by the emerging pathogen *Campylobacter jejuni*: comparison between NCTC 11168 and 81-176 strains under microaerobic and oxygen-enriched conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6: 709, doi:10.3389/fmicb.2015.00709: 11 str.
- van Alphen L.B., Bleumink-Pluym N.M., Rochat K.D., van Balkom B.W., Wosten M.M., van Putten J.P. 2008. Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 10, 1: 53–66
- van Alphen L.B., Burt S.A., Veenendaal A.K.J., Bleumink-Pluym N.M.C., van Putten J.P.M. 2012. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. *PLoS ONE* 7: e45343, doi:10.1371/journal.pone.0045343, 7 str.
- Vilchez R., Lemme A., Thiel V., Schulz S., Sztajer H., Wagner-Döbler I. 2007. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2: 489–496
- VURS. 2014. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz 2013. Ljubljana, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin: 87 str.
- Wang Y., Taylor D.E. 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 2: 949–955
- Wang X.X., Zan K., Shi S.P., Zeng K.W., Jiang Y., Guan Y., Xiao C.L., Gao H.Y., Wu L.J., Tu P.F. 2013. Quinolone alkaloids with antibacterial and cytotoxic activities from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Fitoterapia*, 89: 1–7
- Wang S., Wang J., Mou H., Luo B., Jiang X. 2015. Inhibition of adhesion of intestinal pathogens (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella Typhimurium*) by common oligosaccharides. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 4: 360–365
- Waters C.M., Bassler B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*, 21: 319–346
- Whitehead K.A., Rogers D., Colligon J., Wright C., Verran J., 2006. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51, 1: 44–53
- Winzer K., Hardie K.R., Williams P. 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology*, 5, 2: 216–222
- Wube A.A., Hüfner A., Thomaschitz C., Blunder M., Kollroser M., Bauer R., Bučar F. 2011. Design, synthesis and antimycobacterial activities of 1-methyl-2-alkenyl-4(1H)-quinolones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 1: 567–579
- Xavier K.B., Bassler B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 2: 191–197
- Young K.T., Davis L.M., Dirita V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 9: 665–679

- Zaki A.A., Shaaban M.I., Hashish N.E., Amer M.A., Lahloub M.F. 2013. Assessment of anti-quorum sensing activity for some ornamental and medicinal plants native to Egypt. *Scientia Pharmaceutica*, 81, 1: 251–258
- Zhang W., McLamore E.S., Garland N.T., Leon J.V., Banks M.K. 2013. A simple method for quantifying biomass cell and polymer distribution in biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 94, 3: 367–374
- Zheng J., Meng J., Zhao S., Singh R., Song W. 2006. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *Journal of Food Protection*, 69, 4: 768–774
- Zhou X., Zhao Y., Lei P., Cai Z., Liu H. 2010. Chromatographic fingerprint study on *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by HPLC/DAD/ESI-MS(n) technique. *Journal of Separation Science*, 33, 15: 2258–2265

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Petru Rasporju za mesto mlade raziskovalke in za vso pomoč pri nastajanju te doktorske naloge, predvsem pa sem hvaležna, da me je naučil samostojnega dela in pomembnosti sodelovanja. Najlepša hvala somentorici prof. dr. Sonji Smole-Možina, da mi je omogočila delo na tematiki ter sodelovanje v sklopu različnih projektov, za vso predano znanje ter pomoč tekom doktorskega študija.

Komisiji za zagovor doktorske naloge, prof. dr. Mojci Narat, prof. dr. Katji Seme in prof. dr. Davidu Stoparju se zahvaljujem za potrežljivost ter konstruktivne komentarje in predloge, ki so doprinesli k pri oblikovanju in izboljšanju vsebine doktorske naloge.

Iskrena hvala prof. dr. Maji Čemažar za vso pomoč in nasvete pri delu s celičnimi kulturami, za konstruktivno reševanje problemov in spodbudo. Hkrati se zahvaljujem vsem zaposlenim na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta; prof. dr. Gregorju Serši, da mi je omogoči delo v njihovem laboratoriju; gospe Miri za predajo znanja o lepem ravnanju s celičnimi kulturami in vsem raziskovalkam za prijetno vzdušje.

Najlepša hvala prof. dr. Darji Barlič Maganja za priložnost dela na FVZ Izola, vso podporo in pomoč pri zaključku doktorske naloge. Hvala prof. dr. Franzu Bucarju iz Inštituta za Farmakologijo za pripravo rastlinskih izvlečkov in pomoč pri pisanju članka. Hvala dr. Beatrix Stessl iz Veterinarske fakultete za vodenje in strokovno pomoč v času izmenjave na Dunaju. Hvala dr. Matjažu Peterka, Niki in Jasmini iz centra odličnosti COBIK za vso strokovno pomoč pri delu z bakteriofagi.

Najlepša hvala VSEM sodelavcem na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. Hvala za nepozabne, prisrčne trenutke in spodbudne besede, brez katerih bi človek že v startu vrgel puško v koruzo. Lepo se zahvaljujem Jasni, ki me je naučila kako krotiti kampilobaktra in je bila z veliko strpnostjo vedno pripravljena pomagati tako strokovno kot prijateljsko. Najlepša hvala dr. Anji Klančnik za pripravo mutant, nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu. Najlepša hvala Juretu za vse uporabne nasvete, potrežljivost in predajo znanja iz tisočerih področij. Hvala cimrom Boštjanu, Mihatu in Patriku za dobro voljo in pomoč pri boju s podatki in statističnimi zagatami. Nataši in Katji hvala za vso podporo in prijetno druženje.

Najlepša hvala vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani in me spodbujali, predvsem pa Katarini Ž, cimrama Katarini in Nini, Evi W. in Kristijanu, za pozitivno energijo in spodbudne besede v pravem trenutku. Najlepša hvala Karmen Ulčnik za pomoč pri urejanju sestavkov v angleškem jeziku. Luka, hvala za vso potrežljivost, spodbudo in razumevanje ter strokovno pomoč sotrpinki.

Hvala mag. Vesni Ješe Janežič za vso pomoč pri reševanju problemov v sklopu doktorskega študija, prijaznost in hiter odziv. Hvala dr. Karmen Stopar za pregled in pomoč pri oblikovanju doktorske naloge.

Najlepša hvala Ireni in Jožitu z družinama za pomoč na 1001 način. Mama draga hvala, da si me naučila vztrajnosti in me podpirala, ko je bilo najtežje. Dragi ati hvala ti, da si verjel vame in me spodbujal pri nemogočem, vem da bi bil ponosen name.

PRILOGE

Priloga A

Sevi *C. jejuni* glede na leto in izvor izolacije, klonski kompleks (CC), sekvenčni tip (MLST) in odpornost proti antibiotikom (CIP-ciprofloxacin, ER-eritromicin, NAL-nalidiksinska kislina, STR-streptomicin, TET-tetraciklin, S-občutljivi)

Štev	Leto	Izvor	CC	MLST	AM-Odpornost	Štev	Adhezivnost razred II	Leto	Izvor	CC	MLST	AM-Odpornost			
Austrija															
08/000314	2008	govedo*	21	21	CIP+NAL+TET	MRC-10/000171	2010	govedo*	443	51	CIP+NAL+TET				
08/000256	2008	govedo*	21	50	CIP+NAL+TET	196	2012	perutina*	257	824	CIP+NAL				
MRC-09/00028	2009	govedo*	21	50	CIP+NAL+TET	161	2012	perutina*	353	6360	NAL				
186	2012	govedo*	21	822	S	71	2012	perutina*	446	446	S				
08/000368	2008	govedo*	574	305	CIP+NAL+TET	193	2012	perutina*	ND	881	CIP+NAL				
267	2012	perutina*	22	7514	CIP+NAL	179	2012	perutina*	ND	4373	S				
MRC-13/01900	2013	perutina*	353	4370	CIP+TET	183	2012	perutina*	ND	4373	S				
154	2012	perutina*	354	1073	S	70	2012	perutina*	ND	4800	CIP+NAL				
216	2012	perutina*	ND	4373	CIP+NAL	9N	2007	perutina	464	464	CIP+NAL+TET				
MRC-12/00284	2012	človek	52	2275	CIP+NAL+TET	4N	2007	perutina	607	1707	CIP+TET				
MRC-11/00015	2011	človek	353	7516	CIP+NAL+TET	CFA5	2008	perutina	ND	ND	S				
MRC-10/00032	2010	človek	354	354	CIP+NAL+TET	MRC-10/00019	2010	človek	21	883	CIP+NAL+TET				
MRC-13/00006	2013	človek	443	2361	CIP+NAL+TET	H1	2009	človek	206	572	CIP+NAL				
Nemčija															
BfR-CA-06894	2008	perutina	45	45	CIP+NAL+TET	BfR-CA-07401	2009	perutina	21	19	CIP+NAL				
BfR-CA-07021	2008	perutina	45	4917	S	Slovenija									
609/08	2008	govedo*	21	50	CIP+NAL	1518/08	2008	perutina*	21	50	CIP+NAL+TET				
1728/08	2008	govedo*	21	104	CIP+NAL	122/08	2008	perutina*	21	104	CIP+NAL				
211/08	2008	govedo*	21	104	CIP+NAL	1591/08	2008	perutina*	464	4878	CIP				
180/08	2008	govedo*	ND	891	CIP+NAL	57360	2009	perutina	21	50	CIP+NAL+TET				
670/08	2008	govedo*	21	19	S	IV/ZI/416	2012	perutina	21	50	S				
123/08	2008	perutina*	21	104	CIP+NAL	885/2/08	2008	perutina	45	45	S				
1186/08	2008	perutina*	21	822	CIP+NAL	TV/276	2013	perutina	353	5205	CIP+NAL				
1271/08	2008	perutina*	21	822	CIP+NAL	375/06	2006	človek	21	104	CIP+NAL				
1297/08	2008	perutina*	45	5206	S	573/03	2003	človek	21	104	CIP+NAL				
660/08	2008	perutina*	354	2863	S	01/669/10z	2010	človek	21	883	S				
60089	2009	perutina*	21	50	CIP+NAL+TET	53191	2009	človek	48	475	CIP+NAL				
885/1/08	2008	perutina	45	583	S	02/109/12c	2012	človek	52	2100	CIP+NAL				
61035	2009	perutina	354	2863	CIP+TET	654/08	2008	človek	353	3327	CIP+NAL				
9493	2009	človek	21	50	CIP+NAL	01/302/12z	2012	človek	353	5205	CIP+NAL				
266	2007	okolje	45	583	S	01/71/11c	2011	človek	443	51	CIP+NAL				
						02/35/10c	2010	človek	ND	905	CIP+NAL+TET				
						816	2008	okolje	658	657	CIP+NAL				
						1604	2008	okolje	658	1044	S				
						1769/26	2006	okolje	ND	1367	S				

se nadaljuje...

Nadaljevanje priloge A: Sevi *C. jejuni* glede na leto in izvor izolacije, klonski kompleks (CC), sekvenčni tip (MLST) in odpornost proti antibiotikom (CIP-ciprofloksacin, ER-eritromicin, NAL-nalidiksinska kislina, STR-streptomicin, TET-tetraciklin, S-občutljivi)

Ser	Leto	Izvor	CC	MLST	AM-Odpornost	Adhezivni razred III		Adhezivni razred IV		Ser	Leto	Izvor	CC	MLST	AM-Odpornost	
						Austria	Nemčija	Austria	Nemčija							
59	2012	perutina*	ND	4373	CIP+NAL CIP+NAL	MRC-11/01076	BFR-CA-11627	2013	govedo*	21	21	CIP+NAL+TET				
CFA12	2008	perutina človek	49	49	CIP+NAL CIP+TET+NAL	Nemčija	BFR-CA-11317	2013	govedo*	21	21	CIP+NAL+TET				
H7	2009		22	22			BFR-CA-11386	2013	govedo*	21	577	CIP+NAL+TET				
Nemčija							BFR-CA-06399	2008	govedo	21	861	CIP+NAL+TET				
BFR-CA-10767	2012	govedo*	21	19	CIP+NAL+TET	BFR-CA-07731	2009	govedo	21	21	S					
BFR-CA-11192	2013	govedo*	45	45	CIP+NAL	BFR-CA-07874	2009	govedo	21	21	CIP+NAL+TET					
BFR-CA-07255	2009	govedo	21	21	CIP+NAL+TET	BFR-CA-07345	2009	penutina	21	21	CIP+NAL+TET					
BFR-CA-08284	2010	govedo	21	50	S							S				
BFR-CA-06896	2008	govedo	45	334	S											
BFR-CA-07507	2009	perutina	21	50	CIP+NAL+TET											
BFR-CA-11327	2013	perutina	48	48	CIP+NAL+TET											
Slovenija																
9387	2009	govedo*	21	50	CIP+NAL	02/81/09c		2009	govedo*	49	49	S				
129208	2008	govedo*	48	918	S			2009	penutina*	206	572	CIP+NAL+TET				
244108	2008	perutina*	21	104	CIP+NAL			2009	penutina*	354	2863	CIP+NAL+TET				
225209	2009	perutina*	334	354	S			2009	penutina	21	50	CIP+TET+NAL+ER+STR				
IVZL128c	2013	perutina	21	19	CIP+NAL	IVZL1374		2012	penutina	21	883	S				
1190109	2009	perutina	21	50	CIP+NAL+TET	IVZL1559		2013	penutina	21	5008	CIP+NAL				
57339	2010	perutina	21	104	CIP+NAL	53124		2009	penutina	45	45	CIP+NAL+TET				
K4914	2002	perutina	45	230	S			2001	penutina	353	2036	CIP+NAL				
128	2001	perutina	45	11	S			2009	penutina	353	5205	S				
60037	2009	perutina	333	5205	S			2013	penutina	353	5205	CIP				
IVZB08	2013	perutina	353	5205	CIP			2001	penutina	464	464	S				
9090	2009	človek	21	50	CIP+NAL+TET	02/64/10c		2010	človek	22	5103	S				
02/77/11c	2011	človek	206	572	CIP+NAL	9711		2009	človek	21	50	CIP+NAL+TET				
02/13/10c	2010	človek	333	5205	CIP+NAL	9381		2009	človek	48	48	S				
02/19/5/12c	2012	človek	333	5205	CIP+NAL	02/136/09c		2009	človek	206	122	TET				
01/42/7/11z	2011	človek	353	7301	CIP+NAL+TET	9091		2009	človek	353	5205	CIP+NAL				
02/16/09c	2009	človek	334	354	CIP+NAL	9795		2009	človek	353	5205	CIP+NAL				
02/15/4/12c	2012	človek	334	2863	CIP+NAL+TET	9829		2010	človek	362	362	CIP+NAL				
9152	2009	človek	354	4899	CIP+NAL	02/55/11c		2011	človek	ND	2655	S				
02/90/09c	2009	človek	446	446	S			2008	okolje	ND	5207	S				
02/321/12c	2012	človek	607	607	NAL			2007	okolje	ND	6309	S				
9544	2009	človek	607	3611	S											
258	2007	okolje	22	2497	S											
Srbija																
C2	2006	perutina	607	1707	CIP+TET+NAL+ER+STR	ATCC 35560		ND	govedo*	353	400	CIP+NAL+STR+TET				
										403	403	TET				