

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja KLANČNIK

**ODZIV BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* NA TEMPERATURNI IN
OKSIDATIVNI STRES**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**RESPONSE OF *Campylobacter jejuni* ON TEMPERATURE AND
OXIDATIVE STRESS**

DISERTATION THESIS

Ljubljana, 2006

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, s področja biotehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo in Katedre za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo, v laboratorijih Katedre za biokemijo in Katedre za elektronsko mikroskopijo Oddelka za biologijo ter Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani in v laboratorijih Raziskovalnega centra Technology & Food Unit, Melle, Belgija (The Institute for Agricultural and Fisheries Research – ILVO, Melle, Belgium).

Na osnovi sklepov Senata Biotehniške fakultete in Senata Univerze z dne 27. 10. 2003 je bil odobren neposreden prehod na doktorski študij s področja biotehnologije in z dne 15. 02. 2005 tema doktorske disertacije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter RASPOR
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Marija GUBINA
 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
 Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 21. december 2006

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka:
Anja KLANČNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 579.22 + 579.26: 579.67 (043) = 863
KG	bakterije/ <i>Campylobacter jejuni</i> /stres/oksidativni stres/temperaturni stres/stradanje/kultivabilnost celic/živost celic/morfologija celic/izražanje genov/antioksidativni obrambni sistemi
AV	KLANČNIK, Anja, univ. dipl. inž. živil. tehnol.
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
LI	2006
IN	ODZIV BAKTERIJ <i>Campylobacter jejuni</i> NA TEMPERATURNI IN OKSIDATIVNI STRES
TD	Doktorska disertacija – področje biotehnologije
OP	XVI, 136 str., 30 pregl., 43 sl., 1 pril., 240 vir
IJ	SL
JI	sl/en
AI	Čeprav so bakterije <i>Campylobacter jejuni</i> vodilni povzročitelji črevesnih okužb ljudi v razvitih državah, je njihov odziv na stresne razmere in zmožnost preživetja v okolju izven črevesja slabo raziskan. Kampilobakterji nimajo ključnih regulatorjev stresnega odziva, npr. RpoS in SoxRS, odgovornih za prehod v stacionarno fazo in oksidativni stresni odziv. Kljub temu stresne razmere zaznajo in nanje reagirajo, pri čemer povečajo navzkrižno odpornost. Preučevali smo vpliv nizkih temperatur (25 °C), topotnega stresa (48 °C, 55 °C), peroksidnega stresa (3 mM H ₂ O ₂) ter oksidativnega stresa (atmosferska koncentracija kisika) v kombinaciji s predstresom (hladni stres, stradanje) na bakterije <i>C. jejuni</i> iz različnih rastnih faz. Stresni odziv, viden v zmanjšani živosti (barvanje z barvili LIVE/DEAD® BacLight™ pred fluorescentno mikroskopijo) ter kultivabilnosti (CFU mL ⁻¹) se je odrazil tudi v spremembji morfologije celic (TEM). Prehod iz spiralne v kokoidno obliko je bil ne glede na rastno fazo in stresne pogoje hitrejši pri stradanih kulturah. Dolgotrajna izpostavitev stresom pa je povzročila tudi prehod v degenerativne oblike. Ocenili smo tudi izražanje stresnih genov z metodama RT-PCR in PCR v realnem času, znotrajcelično oksidacijo z 2',7'-diklorofluoresceinom ter aktivnost antioksidativnih encimov katalaze in superoksid dismutaze. V stresnih pogojih je bil viden prehod kampilobakterjev iz spiralne v krajošo spiralno in kokoidno obliko, kar velikokrat sovpada s prehodom v stanje VBNC. Živost in kultivabilnost celic nakazuje boljšo preživelost kulture iz eksponentne faze rasti ter tako odsotnost prepoznavnega fenotipskega odgovora bakterij <i>C. jejuni</i> v stacionarni fazi rasti. Dokazali smo boljšo preživelost, predvsem predhodno 5 ur stradane kulture <i>C. jejuni</i> na topotni stres. Stradanje se je odrazilo tudi v znižanju znotrajcelične oksidacije, vendar ni vplivalo na aktivnost katalaze ali superoksid dismutaze v primerjavi z osnovno kulturo. Dodatni topotni stres je vplival na povečanje ROS v stradani kulturi, vendar ni bil zadosten za aktivacijo antioksidativnega encimskega sistema. S tem smo potrdili zmanjšano metabolno aktivnost stradane kulture. Kljub očitnim fiziološkim in metabolnim spremembam pa razlike v izražanju stresnih genov, ocenjene z metodo RT-PCR, po izpostavitvi različnim stresom niso bile zaznavne, niti v predhodno stradani kulturi. Z metodo PCR v realnem času smo se osredotočili le na topotni stres in izražanje genov <i>groEL</i> in <i>rpoD</i> . Oba testirana gena sta bila topotno inducibilna, predvsem po dolgotrajnejšem topotnem stresu pri 55 °C. Stresni odziv bakterij v živilih in razmerah proizvodne in oskrbovalne verige vpliva na sposobnost preživetja celic, zato je pomemben dejavnik pri zagotavljanju varnih živil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	UDC 579.22 + 579.26: 579.67 (043) = 863
CX	bacteria/ <i>Campylobacter jejuni</i> //stress /temperature stress/oxidative stress/culturability/viability/morphology/gene expression/antioxidative defence systems
AU	KLANČNIK, Anja
AA	SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology
PY	2006
TI	STRESS RESPONSE OF <i>Campylobacter jejuni</i> ON TEMPERATURE AND OXIDATIVE STRESS
DT	Dissertation thesis
NO	XVI, 136 p., 30 tab., 43 fig., 1 ann., 240 ref.
LA	SL
AL	sl/en
AB	Although <i>Campylobacter jejuni</i> is the leading cause of bacterial diarrhoeal disease in humans worldwide, its potential to adapt to the stressful conditions and survive in extra-intestinal environment is still poorly understood. <i>C. jejuni</i> has evolved systems to sense and respond to environmental stimuli and changes in the food production/processing environment resulting in increased stress resistance. Campylobacters lack stress adaptive responses of other food-borne bacteria, such as stationary phase (<i>RpoS</i>) and oxidative (<i>SoxRS</i>) stress response factors. We tested the effect of low temperature (25 °C), heat stress (48 °C, 55 °C), peroxide (3 mM H ₂ O ₂) and oxidative stress (atmosphere oxygen concentration) with prestress combination (cold stress, starvation) on <i>C. jejuni</i> cells from different growth phases. Stress response of campylobacters, visible in viability (LIVE/DEAD® BacLight™ dying before fluorescent microscopy) and culturability (CFU mL ⁻¹) decline reflected also in changes of cell morphology (TEM). We estimated also gene expression using RT-PCR and real-time PCR, intracellular oxidation using 2',7'-dichlorofluorescein and activity of catalase and superoxide dismutase antioxidant enzymes. However, under stress conditions campylobacters transit from a spiral to shorter spiral or more resistant coccoid form, usually accompanied by a transformance into VBNC state. Viability and culturability from both growth phases showed that exponential growth phase cells survive stress better than stationary phase cells, which implicates the absence of phenotypic stationary phase response of <i>Campylobacter</i> culture. Cold and heat resistance increased in starved <i>C. jejuni</i> cells, especially in exponentially growing phase cells after 5 h starvation before thermal treatment. Furthermore, 5 h starvation led to decreased intracellular oxidation and consequently no change in activity of antioxidant enzymes was observed compared to fed culture. Influence of additional heat stress increased ROS in starved culture, but it was not high enough to induce enzymatic antioxidant defence system. Despite physiological and metabolical changes of the cells we were not able to document clear differences in the expression of other stresses after heat treatment or oxidative stresses applied, using RT-PCR. During starvation, no induction of expression of any of these genes was noticed. Quantitative real-time PCR analyses showed that longer heat stress at 55 °C was necessary to evidently increase the amount of <i>groEL</i> and <i>rpoD</i> transcripts. Knowledge of survival mechanisms under different environmental stress conditions is important for better intervention and control of campylobacters in the food chain. In addition, adaptive stress response during thermal and/or oxidative challenge is crucial also for survival of microbial cells during host-pathogen infection.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XII
KAZALO PRILOG	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XVI

1 UVOD	1
1.1 UVOD.....	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ROD CAMPYLOBACTER.....	3
2.1.1 Zgodovinski pregled in klasifikacija.....	3
2.1.2 Fiziološke in genetske značilnosti	3
2.1.3 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz	4
2.1.3.1 Epidemiologija.....	4
2.1.3.2 Patogeneza	5
2.2 STRESNI POGOJI IN ODZIV MIKROORGANIZMOV	7
2.2.1 Stres	7
2.2.2 Definicija in mehanizem splošnega stresnega odziva.....	7
2.2.3 Stresni odziv na nivoju mikrobne celice.....	9
2.2.3.1 Definicija in pomen stanja VBNC	9
2.2.3.2 Stanje VBNC in kokoidnost pri kampilobakterjih.....	11
2.2.4 Stresni odziv na nivoju mikrobne populacije	12
2.2.4.1 Celično signaliziranje	12
2.2.4.2 Biofilmi	12
2.2.5 Hladni stres	13
2.2.5.1 Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva	13
2.2.5.2 Odziv na hladni stres pri kampilobakterjih	13
2.2.6 Toplotni stres	13
2.2.6.1 Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva	13
2.2.6.2 Proteini HSP, inducirani s topotnim stresom.....	14
2.2.6.3 Proteini HSP pri bakterijah <i>C. jejuni</i>	16
2.2.6.3.1 Izražanje temperaturno reguliranih genov	16
2.2.6.3.2 Mehanizmi regulacije izražanja temperaturno reguliranih genov	17
2.2.6.4 Odziv na topotni stres pri kampilobakterjih	18
2.2.7 Stradanje.....	18
2.2.7.1 Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva	18
2.2.7.2 Proteini stradanja in odziv pri kampilobakterjih.....	19

2.2.8 Oksidativni stres.....	20
2.2.8.1 Reaktivne kisikove zvrsti.....	20
2.2.8.2 Antioksidativni obrambni sistemi.....	21
2.2.8.2.1 Encimski antioksidativni obrambni sistemi.....	21
2.2.8.2.2 Neencimski antioksidativni obrambni sistemi.....	22
2.2.8.3 Odziv na oksidativni stres.....	22
2.2.9 Prilagoditev na stres in varnost živil	22
2.2.9.1 Živilsko predelovalna veriga	22
2.2.9.2 Kampilobakterji v živilih.....	24
2.3 MERJENJE STRESNEGA ODZIVA.....	25
2.3.1 Merjenje stresnega odziva z ugotavljanjem živosti celic	25
2.3.1.1 Metode spremljanja živosti z uporabo fluorescentnih barvil.....	25
2.3.1.1.1 Membranska integriteta.....	26
2.3.1.1.2 Membranski potencial	26
2.3.1.1.3 Respiracijska aktivnost.....	27
2.3.1.1.4 Encimska aktivnost	27
2.3.1.1.5 Prisotnost nukleinskih kislin	27
2.3.1.1.6 Metode PCR za ugotavljanje živosti celic	28
2.3.2 Merjenje stresnega odziva z oceno tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS)	28
2.3.2.1 Ocena znotrajcelične oksidacije.....	28
2.3.2.2 Merjenje encimske aktivnosti	29
2.3.2.2.1 Katalaza.....	29
2.3.2.2.2 Superoksid dismutaza.....	29
2.3.3 Merjenje stresnega odziva na nivoju mRNA.....	29
2.3.3.1 RT-PCR	30
2.3.3.2 PCR v realnem času	30
2.3.3.3 Sledenje produktov PCR preko vezave barvil na DNA.....	31
2.3.3.4 Geni, preučevani z metodama RT – PCR in PCR v realnem času.....	32
3 MATERIALI IN METODE	33
3.1 MATERIALI.....	34
3.1.1 Bakterijski sevi	34
3.1.2 Gojišča za izolacijo, namnoževanje in shranjevanje bakterij C. jejuni	35
3.1.3 Reagenti, raztopine	36
3.1.3.1 Reagenti in raztopine za izvedbe stresov	36
3.1.3.2 Reagenti in raztopine za ugotavljanje živosti bakterij	37
3.1.3.3 Reagenti in raztopine za ugotavljanje morfologije s fazno kontrastnim in elektronskim mikroskopom	37
3.1.3.4 Reagenti in raztopine za oceno znotrajcelične oksidacije	38
3.1.3.5 Reagenti in raztopine za pripravo celičnega ekstrakta za določanje encimske aktivnosti.....	38
3.1.3.6 Reagenti in raztopine za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu.....	39
3.1.3.7 Določanje aktivnosti antioksidativnih obrambnih encimov v celičnem ekstraktu.....	39
3.1.3.8 Reagenti in raztopine za izolacijo DNA	40
3.1.3.9 Ugotavljanje izražanja genov z metodo RT – PCR in PCR v realnem času.....	41
3.1.3.9.1 Reagenti in raztopine za izolacijo RNA	41
3.1.3.9.2 Reagenti in raztopine za preverjanje prisotnosti RNA na gelu.....	42
3.1.3.9.3 Reagenti in raztopine za obdelavo RNA z DNazo	43
3.1.3.9.4 Reagenti in raztopine za sintezo cDNA.....	44
3.1.3.9.5 Reagenti in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR	44
3.1.3.10 Reagenti in raztopine za določanje pomnožkov PCR	45

3.1.3.10.1	Reagenti in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR v realnem času	45
3.1.4	Začetni oligonukleotidi	46
3.1.4.1	Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR in spremljanju izražanja genov z metodo RT-PCR.....	46
3.1.4.2	Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri spremljanju izražanja genov z metodo PCR v realnem času.....	47
3.1.5	Laboratorijski pribor in oprema	47
3.2	METODE.....	49
3.2.1	Revitalizacija sevov	49
3.2.2	Namnožitev bakterijske biomase	49
3.2.3	Izvedba predstresov	49
3.2.3.1	Stradanje	49
3.2.3.2	Hladni predstres	49
3.2.4	Izvedba stresov	49
3.2.4.1	Hladni stres	49
3.2.4.2	Toplotni stres	50
3.2.4.3	Oksidativni stres	50
3.2.5	Vzorčenje	50
3.2.6	Ugotavljanje kultivabilnosti.....	50
3.2.7	Ugotavljanje živosti in morfologije celic s fluorescentnim mikroskopom.....	51
3.2.7.1	AODC	51
3.2.7.2	LIVE/DEAD® BacLight™	51
3.2.7.3	Kvantifikacija celic	51
3.2.8	Opazovanje morfologije celic s fazno kontrastnim, fluorescentnim in elektronskim mikroskopom.....	52
3.2.8.1	Fazno kontrastni mikroskop	52
3.2.8.2	Fluorescentni mikroskop	52
3.2.8.3	Presevna elektronska mikroskopija (TEM)	53
3.2.9	Ocena znotrajcelične oksidacije preko tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti	53
3.2.10	Spremljanje encimskih antioksidativnih obrambnih sistemov	54
3.2.10.1	Priprava celičnega ekstrakta za določanje encimske aktivnosti.....	54
3.2.10.2	Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu	55
3.2.10.3	Določanje aktivnosti antioksidativnih obrambnih encimov v celičnem ekstraktu	55
3.2.10.3.1	Katalaza	55
3.2.10.3.2	Superoksid dismutaza	56
3.2.11	Izolacija DNA	57
3.2.12	Izolacija RNA	57
3.2.13	Obdelava z DNazo	58
3.2.14	Preverjanje učinkovitosti tretiranja z DNazo z reakcijo PCR - 40 ciklov.....	59
3.2.15	Obratno prepisovanje in sinteza cDNA (kot I. faza RT-PCR ali predstopnja PCR v realnem času)	60
3.2.16	Reakcija PCR (kot II. faza RT-PCR).....	60
3.2.16.1	Izbor genov	61
3.2.16.2	Optimizacije metode PCR	61
3.2.17	Metoda PCR v realnem času.....	62
3.2.17.1	Izbor genov	63
3.2.17.2	Izbira in priprava začetnih oligonukleotidov	63
3.2.17.3	Priprava standardne krivulje	63
3.2.17.4	Reakcija PCR v realnem času	64

3.2.17.5	Preverjanje kontaminacije vzorcev RNA z genomsko DNA	64
3.2.17.6	Obdelava rezultatov	64
3.2.18	Statistična obdelava rezultatov	66
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	67
4.1	RASTNA KRIVULJA	67
4.2	VPLIV NIZKE TEMPERATURE IN/ALI STRADANJA NA BAKTERIJE <i>C. JEJUNI</i>.....	68
4.2.1	Živost celic	69
4.2.2	Kultivabilnost in kokoidnost celic.....	70
4.3	VPLIV HLADNEGA PREDSTRESA IN/ALI STRADANJA NA TOPLITNO ODPORNOST BAKTERIJ <i>C. JEJUNI</i>	72
4.4	VPLIV KRATKOTRAJNEGA TOPLITNEGA IN OKSIDATIVNEGA STRESA NA BAKTERIJE <i>C. JEJUNI</i>	74
4.4.1	Živost, kokoidnost in kultivabilnost celic.....	74
4.4.2	Vpliv stradanja na pridobljeno navzkrižno odpornost	77
4.4.3	Ugotavljanje stresnega odziva celic na različne strese na nivoju transkriptoma.....	79
4.4.3.1	Izražanje genov z metodo RT-PCR	79
4.4.3.2	Kvantifikacija izražanja izbranih genov z metodo PCR v realnem času	81
4.5	VPLIV DOLGOTRAJNEGA TOPLITNEGA STRESA NA BAKTERIJE <i>C. JEJUNI</i>	83
4.5.1	Živost, kokoidnost ter kultivabilnost celic	83
4.5.2	Vpliv kloramfenikola	87
4.5.3	Ugotavljanje stresnega odziva celic na dolgotrajni topotni stres z metodo PCR v realnem času na nivoju transkriptoma	89
4.5.3.1	Kvantifikacija izražanja genov <i>groEL</i> in <i>rpoD</i> pri <i>C. jejuni</i> K49/4.....	89
4.5.3.1.1	Kvantifikacija izražanja genov pri drugih sevih <i>C. jejuni</i>	91
4.6	VPLIV DOLGOTRAJNEGA OKSIDATIVNEGA STRESA NA BAKTERIJE <i>C. JEJUNI</i>	92
4.6.1	Izpostavitev celic vodikovem peroksidu.....	92
4.6.2	Inkubacija celic <i>C. jejuni</i> pri atmosferski koncentraciji kisika.....	93
4.6.2.1	Vpliv predstradanja na celice med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika.....	93
4.6.2.2	Vpliv gojišča na celice pri atmosferski koncentraciji kisika.....	97
4.7	VPLIV STRADANJA IN/ALI TOPLITNEGA STRESA NA ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO TER ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM BAKTERIJ <i>C. JEJUNI</i>	103
4.7.1	Vpliv stradanja na raven oksidantov v celici ter indukcijo antioksidativnega obrambnega sistema	104
4.7.2	Vpliv dodatnega topotnega stresa na raven oksidantov v celici ter indukcijo antioksidativnega obrambnega sistema	105
4.8	VPLIV RAZLIČNIH STRESOV NA MORFOLOGIJO BAKTERIJ <i>C. JEJUNI</i>	106
5	SPLOŠNA RAZPRAVA	110

5.1 ODZIV BAKTERIJ KULTURE <i>C. JEJUNI</i> NA TEMPERATURNI IN OKSIDATIVNI STRES	110
5.1.1 Odziv osnovne kulture	110
5.1.2 Odziv stradane kulture	111
5.2 VPLIV MEDIJA NA BAKTERIJE <i>C. JEJUNI</i>.....	113
5.2.1 Vpliv gojišča na bakterije <i>C. jejuni</i> med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika	113
5.2.2 Vpliv stradanja na bakterije <i>C. jejuni</i>	113
5.2.3 Vpliv predstradanja ter pridobljenega navzkrižna odpornosti <i>C. jejuni</i>	114
5.3 MOLEKULARNO-GENETSKI IN CELIČNI NIVO ODZIVA BAKTERIJ <i>C. JEJUNI</i> NA STRESE.....	115
5.3.1 Izražanje genov	115
5.3.2 Znotrajcelična oksidacija ter antioksidativni obrambni sistem.....	115
5.4 PREDLOGI ZA NADALJNJE DELO.....	116
6 SKLEPI	117
7 POVZETEK (SUMMARY).....	118
7.1 POVZETEK	118
7.2 SUMMARY	120
8 VIRI	122
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1:	Izražanje proteinov HSP pri <i>C. jejuni</i> kot odziv na dvig temperature iz 37 na 42 °C	17
Preglednica 2.2:	Dejavniki, ki povzročajo stresni odziv mikroorganizmov iz živil v različnih fazah živilsko predelovalne verige (Youself in Courtney, 2003).....	23
Preglednica 2.3:	Kriteriji in metode določevanja živosti mikroorganizmov (Breeuwer in Abee, 2000) ..	25
Preglednica 3.1:	Bakterijski sevi <i>C. jejuni</i> , uporabljeni pri eksperimentalnem delu.....	34
Preglednica 3.2:	Trdna in tekoča gojišča, uporabljena pri eksperimentalnem delu	35
Preglednica 3.3:	Reagenti, pufri in raztopine za izvedbo stresov	36
Preglednica 3.4:	Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanje živosti celic.....	37
Preglednica 3.5:	Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanje morfologije celic	37
Preglednica 3.6:	Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanje znotrajcelične oksidacije	38
Preglednica 3.7:	Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanju encimske aktivnosti.....	38
Preglednica 3.8:	Reagenti, pufri in raztopine za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu.....	39
Preglednica 3.9:	Reagenti, pufri in raztopine za določanje aktivnosti antioksidativnih obrambnih encimov v celičnem ekstraktu.....	39
Preglednica 3.10:	Reagenti, pufri in raztopine za izolacijo DNA	40
Preglednica 3.11:	Reagenti, pufri in raztopine za izolacijo RNA	41
Preglednica 3.12:	Reagenti, pufri in raztopine za določanje prisotnosti RNA na gelu	42
Preglednica 3.13:	Reagenti, pufri in raztopine za obdelavo RNA z DNazo	43
Preglednica 3.14:	Reagenti, pufri in raztopine za sintezo cDNA.....	44
Preglednica 3.15:	Reagenti, pufri in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR.....	44
Preglednica 3.16:	Reagenti, pufri in raztopine za določanje pomnožkov PCR	45
Preglednica 3.17:	Reagenti, pufri in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR v realnem času.....	45
Preglednica 3.18:	Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR in ugotavljanje izražanja genov z metodo RT-PCR.....	46
Preglednica 3.19:	Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje izražanja genov z metodo PCR v realnem času	47
Preglednica 3.20:	Laboratorijski pribor za izvedbo eksperimentalnega dela.....	47
Preglednica 3.21:	Laboratorijska oprema za izvedbo eksperimentalnega dela	48
Preglednica 3.22:	Optimizacija temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov pri metodi RT-PCR	61
Preglednica 4.1:	Relativno izražanje genov <i>groEL</i> / 16S rRNA in <i>rpoD</i> / 16S rRNA 10-ih različnih sevov kulture <i>C. jejuni</i> po 20 min topotnem stresu pri 48 °C in 55 °C z metodo PCR v realnem času, (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena stresu)	91
Preglednica 4.2:	Spremembe nivoja znotrajcelične oksidacije, ocenjene kot fluorescenčna intenziteta, med 5-urno inkubacijo <i>C. jejuni</i> K49/4 v gojišču Preston (osnovna kultura) ali fiziološki raztopini (stradana kultura)	104
Preglednica 4.3:	Aktivnost katalaze in superoksid dismutaze (SOD) pri <i>C. jejuni</i> K49/4 iz eksponentne faze rasti (0 h) ter po 5-urni inkubaciji (5 h) v gojišču (osnovna kultura) ali fiziološki raztopini (stradana kultura). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti ± standardna deviacija	104

Preglednica 4.4:	Spremembe nivoja znotrajcelične oksidacije, ocenjene kot fluorescenčna intenziteta, po izpostavitvi stradane kulture topotnemu stresu glede na osnovno kulturo <i>C. jejuni</i> K49/4	105
Preglednica 4.5:	Aktivnost katalaze in superoksid dismutaze (SOD) pri <i>C. jejuni</i> K49/4 pred (0 h) in po topotnemu stresu v osnovni in stradani kulturi. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm standardna deviacija	105

KAZALO SLIK

Slika 2.1:	Stopnje invazije bakterij <i>C. jejuni</i> v črevesnem traktu (van Vliet in Ketley, 2001). (1) gibljivost; (2) kemotaksa; (3) oksidativni obrambni mehanizem; (4) adhezija; (5) invazija; (6) izdelovanje toksina; (7) pridobivanje železa; (8) stresni odziv na spremembe temperature; (9) kokoidna oblika.	6
Slika 2.2:	Možne interakcije fizioloških stanj mikrobne celice pod stresnimi pogoji (Youself in Courtney, 2003).	7
Slika 2.3:	Polimeraza RNA prokariontov, sestavljena iz podenot 2α , 2β , 1ω in dejavnika σ (Ellis, 2003)..	8
Slika 2.4:	Dva modela prenosa signala preko celične ovojnica (Hellingwerf in sod., 1998). Pri obeh modelih sledi prenos signala zaporedje reakcij signalnega procesiranja in transdukcije pred končnim odgovorom oz. spremembami (1) izražanja genov, (2) encimske aktivnosti ali (3) rotacije bička.	9
Slika 2.5:	Možen model interakcij regulatornih dejavnikov, vključenih v tvorbo VBNC (Rice in sod., 2000). Polne črte predstavljajo smer znanega odziva, prekinjene črte pa potencialno indukcijo fiziološkega stanja. Črta v obliki 'T' predstavlja potencialno blokado odziva. SIMC: s stradanjem inducirana ohranjena kultivabilnost.	10
Slika 2.6:	Mehanizem delovanja proteinov HSP (Abee in Wouters, 1999). Neaktivne ali nestabilne proteine prepoznajo proteinaze (1) ali šaperonski kompleksi (2), ki vodijo v razgradnjo proteinov na manjše peptide ali tvorijo aktivne in toplotno stabilne proteine.	14
Slika 2.7:	Shematski prikaz vključitve molekulskih šaperonov v pravilno zvijanje polipeptidnih verig (Vorob'eva, 2004). (a) Dnak in DnaJ reagirajo z nastajajočo polipeptidno verigo. (b) Nastane terciaren kompleks, ki vključuje DnaK, DnaJ in nezviti protein. (c) GrpE inducira nastanek ADP in sledi vezava ATP; delno zvit protein se sprosti in prenese k kompleksu GroEL/GroES. (d) Vezava zvitih intermediatov v osrednji odprtini šaperona GroEL. (e) Ko-šaperon GroES se premakne med dva konca cilindra GroEL. (f) Zvit protein izgubi afiniteto do ko-šaperona in izstopi iz odprtine šaperona GroEL.	15
Slika 2.8:	Model regulacije proteinov HSP z represorjem HrcA v bakterijah <i>B. subtilis</i> (Herman in Gross, 2000).	18
Slika 3.1:	Shematični prikaz opravljenih eksperimentov (KL – kloramfenikol; ATM. KONC. - atmosferska koncentracija).....	33
Slika 3.2:	Shematski potek priprave ter izvedbe metode PCR v realnem času.	62
Slika 4.1:	Rastna krivulja seva <i>C. jejuni</i> K49/4. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti vsaj treh neodvisnih ponovitev.	67
Slika 4.2:	Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne ter stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med 42-dnevno inkubacijo pri optimalni (42 °C) in nizki temperaturi (25 °C). Standardne deviacije niso prikazane.	68
Slika 4.3:	Živost (%) in kokoidnost (%) celic osnovne ter stradane kulture <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti med 42-dnevno inkubacijo pri optimalni (42 °C) in nizki temperaturi (25 °C). Standardne deviacije niso prikazane.	69
Slika 4.4:	Kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne ter stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) in stacionarne (S) faze rasti med 42-dnevno inkubacijo pri optimalni (42 °C) in nizki temperaturi (25 °C). Standardne deviacije niso prikazane.	71
Slika 4.5:	Vpliv stradanje pri 4 ali 42 °C ter hladnega predstresa z ali brez dodatka kloramfenikola (KL) na živost (%) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne ter stacionarne faze rasti po toplotnemu stresu (55 °C, 3 min). Napake predstavljajo standardne deviacije	72
Slika 4.6:	Živost (%) osnovne in 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne ter stacionarne faze rasti pred in po izpostavitvi toplotnemu ali oksidativnemu stresu. Napake predstavljajo standardne deviacije	75

Slika 4.7: Kokoidnost (%) osnovne in 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne ter stacionarne faze rasti pred in po izpostavitvi topotnemu ali oksidativnemu stresu. Napake predstavljajo standardne deviacije	75
Slika 4.8: Kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne in 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne ter stacionarne faze rasti pred in po izpostavitvi topotnemu ali oksidativnemu stresu. Napake predstavljajo standardne deviacije.....	76
Slika 4.9: Vpliv stradanja z ali brez dodatka kloramfenikola (KL) na živost (%) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti. Napake predstavljajo standardne deviacije.	78
Slika 4.10: Primer agarozne gelske elektroforeze pomnožkov RT - PCR gena <i>flaA</i> celic <i>C. jejuni</i> med inkubacijo pri različnih pogojih stresa.	80
Slika 4.11: Primer izražanja gena <i>flaA</i> osnovne in stradane (5 h in 24 h) kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne ter stacionarne faze rasti med inkubacijo v stresnih razmerah z metodo RT - PCR, (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena pogojem stresa). Napake predstavljajo standardne deviacije	80
Slika 4.12: Relativno izražanje genov <i>groEL</i> / 16S rRNA in <i>rpoD</i> / 16S rRNA osnovne in 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne ter stacionarne faze rasti med inkubacijo pri različnih pogojih stresa z metodo PCR v realnem času, (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena pogojem stresa).	81
Slika 4.13: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po topotnem stresu pri 48 in 55 °C.	84
Slika 4.14: Kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po topotnem stresu pri 48 in 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.	84
Slika 4.15: Živost (%) in kokoidnost (%) 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po topotnem stresu pri 48 in 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.	86
Slika 4.16: Kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po topotnem stresu pri 48 in 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.	86
Slika 4.17: Vpliv stradanja z ali brez dodatka kloramfenikola na živost (%) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po topotnem stresu pri 48 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.	88
Slika 4.18: Vpliv stradanja z ali brez dodatka kloramfenikola (KL) na živost (%) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti med topotnim stresom pri 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.....	89
Slika 4.19: Relativno izražanje gena <i>groEL</i> / 16S rRNA in <i>rpoD</i> / 16S rRNA celic <i>C. jejuni</i> po topotnem stresu (48 ali 55 °C) z metodo PCR v realnem času (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena pogojem stresa). Napake predstavljajo standardne deviacije	90
Slika 4.20: Živost, kokoidnost (%) in kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne ter 5 h stradane kulture <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti po inkubaciji s 3 mM vodikovim peroksidom.....	92
Slika 4.21: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.....	93
Slika 4.22: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.....	94
Slika 4.23: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.	95
Slika 4.24: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.	96

Slika 4.25: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne kulture celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.....	97
Slika 4.26: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne kulture celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.....	98
Slika 4.27: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.....	99
Slika 4.28: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.....	100
Slika 4.29: Živost (%) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika – primerjava rezultatov fluorescenčne mikroskopije (FM) ter pretočne citometrije (FC).....	101
Slika 4.30: Primer rezultatov pretočne citometrije celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v svežem gojišču po 15 h izpostavitvi atm. konc. kisika.....	102
Slika 4.31: Morfologija bakterij <i>C. jejuni</i> pod elektronskim mikroskopom kontrolne kulture in po izpostavitvi atmosferski koncentraciji kisika (foto: Klančnik, 2005).....	106
Slika 4.32: Morfologija bakterij <i>C. jejuni</i> pod elektronskim mikroskopom po izpostavitvi 3 mM vodikovemu peroksidu in nizkim temperaturam (25 °C) (foto: Klančnik, 2005).	107
Slika 4.33: Morfologija bakterij <i>C. jejuni</i> pod elektronskim mikroskopom po izpostavitvi topotnemu stresu pri 48 in 55 °C (foto: Klančnik, 2005).	108

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje mase proteinov v celičnem ekstraktu bakterije *C. jejuni* K49/4 (metoda po Bradfordu, 1976).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratica-okrajšava	Pomen
${}^1\text{O}_2$	singletni kisik
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
cDNA	komplementarna DNA
CFU	število mikroorganizmov, ki lahko tvorijo kolonije (angl. colony forming units)
Ct	točka, v kateri je signal fluorescence vzorca višji od signala fluorescence ozadja
DCFL	2,7-diklorofluorescein-9-lakton
DEPC	dietil pirokarbonat
ddH ₂ O	bidestilirana voda
ddH ₂ O DEPC	bidestilirana voda z dodatkom DEPC
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E	eksponentna faza rasti
FI	fluorescenčna intenziteta
H ₂ DCF	dihidro-2,7-diklorofluorescein
H ₂ DCFDA	dihidro-2,7-diklorofluoresceindiacetat
HO [•]	hidroksilni radikal
HOCl	hipoklorova kislina
HOONO	peroksinitrit
Proteini HSP	proteini topotnega stresa (angl. heat-shock proteins)
M	mol/L
MA	mikroaerofilna atmosfera (3 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida, 87 % dušika)
mM	10^{-3} mol/L
NBT	nitro modro tetrazolium (angl. nitro blue tetrazolium)
NO [•]	reakтивni dušikov oksid
O ₂ ^{•-}	superoksidni anion
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PI	propidijev jodid
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)
rRNA	ribosomska RNA
RT-PCR	obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo
S	stacionarna faza rasti
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. sodium dodecyl sulfate)
T	temperatura
T _m	talilna temperatura
VBNC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (angl. viable but not culturable)
w/v	g/mL

1 UVOD

1.1 UVOD

Nesporogene, po Gramu negativne bakterije rodu *Campylobacter*, z značilno spiralno obliko so danes znane kot povzročiteljice bolezni, najpogosteje zaradi uživanja kontaminirane hrane, navzkrižne kontaminacije ter neposrednega stika z živalmi (Ketley, 1997). Termotolerantni vrsti *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* sta med najpogostejšimi povzročitelji bakterijsko povzročenih enteritisov pri ljudeh v razvitem svetu in v deželah v razvoju (Wassenaar in Newell, 2000).

Bakterije *C. jejuni* rastejo v ozkem temperaturnem območju med 30 °C in 45 °C in ne prenesejo koncentracije kisika nad 5 %, koncentracije 2 % NaCl, a_w pod 0,987 in vrednosti pH pod 4,9 (Park, 2002). V neugodnih okoljskih pogojih se prilagodijo stresnim razmeram in si s tem zagotovijo preživetje. Pri tem lahko preidejo iz tipične spiralne v kokoidno obliko, kar velikokrat sovпадa tudi s prehodom v živo, a nekultivabilno stanje (angl. viable but nonculturable, VBNC). Odziv kampilobakterjev na stres vključuje sintezo novih proteinov, kot so npr. proteini stradanja (npr. Pex) ali proteini toplotnega stresa (npr. GroEL), dinamično prilagoditev preko genetske heterogenosti ter druge mehanizme. Dokazano pa je, da kampilobakterji ne vsebujejo znanih mehanizmov prilagoditve na stresne razmere, ki so jih razvile druge bakterije prenosljive s hrano (npr. RpoS, SoxRS ali proteinov hladnega stresa – Csp) (Parkhill in sod., 2000). Zaradi stresnih razmer razvijejo odpornost, ki jih ščiti pred močnejšim stresom istega ali drugih tipov. Posledica takega fiziološkega odziva celic je t.i. navzkrižna odpornost (Abbe in Wouters, 1999). Slednja je pri kampilobakterjih izrazitejša v kulturi, predhodno izpostavljeni stradanju (Cappelier in sod., 2000). Prisotnost kampilobakterjev v živilih kljub opisani občutljivosti celic je sprožila t.i. "Campylobacter paradox" (Solomon in Hoover, 1999).

Pri predelavi živil so bakterije *C. jejuni* izpostavljene predvsem toplotnemu in oksidativnemu stresu. Toplotnemu stresu so izpostavljene zaradi postopkov predelave in priprave živil, oksidativni stres pa predstavlja že sama prisotnost atmosferskega kisika (Park, 2002). Ker so nesposobni razmnoževanja v živilih, predstavlja živilo le vektor prenosa kampilobakterjev iz živalskih gostiteljev do človeka. Tradicionalne metode detekcije temeljijo na kultivabilnosti mikroorganizma, ki pa v primeru celic VBNC ne dajejo verodostojnih rezultatov. Ostale tehnike v živilski mikrobiologiji se šele uvajajo in do danes še niso v rutinski uporabi. Zagotovitev varnih izdelkov v proizvodnji živil je možna preko nadzora mehanizmov, ki v celici spodbudijo prehod v odpornejša stanja (Moore, 2001).

V naši nalogi smo se osredotočili na odziv osnovne in stradane kulture *C. jejuni* na kratkotrajni in dolgotrajni temperaturni ali oksidativni stres. Kultivabilnost celic smo ugotavljali s štetjem kolonij na ploščah; skupno število ter število živih celic pa s fluorescentnim mikroskopom po barvanju z barvilom LIVE/DEAD® BacLight™. Morfologijo smo opazovali s svetlobnim ter s transmisiskim elektronskim mikroskopom. Na molekularno-genetskem nivoju smo ugotavljali izražanje genov z metodama RT-PCR in PCR v realnem času. Na celičnem nivoju smo preučili tudi vpliv stradanja in dodatnih stresov na antioksidativni obrambni sistem bakterij *C. jejuni* preko znotrajcelične oksidacije ter aktivnosti ključnih encimov antioksidativnega obrambnega sistema.

Prav zaradi velike občutljivosti na stres in istočasne visoke incidence kampilobakterioz je rod *Campylobacter* posebej zanimiv predmet študij v živilski mikrobiologiji. Preučevanje stresnega odgovora kampilobakterjev je pomembno za razumevanje njihovega preživetja v proizvodno-prodajni verigi ter s tem zmanjšanja števila okužb pri ljudeh in živalih.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen dela je bil študij stresnega odziva, ki vpliva na rastne in ostale fiziološke posebnosti bakterij vrste *C. jejuni*, s tem pa na zanesljivost njihovega pravočasnega odkrivanja v vzorcih živil in okolja. Preučevali smo vpliv različnih stresnih pogojev (nizke temperature, toplotni stres, peroksidni stres, oksidativni stres, stradanje) na morfologijo, prehod v fiziološko stanje VBNC, izražanje stresnih genov, znotrajcelično oksidacijo, encimsko aktivnost in preživelost bakterij *C. jejuni* iz eksponentne in stacionarne faze rasti. Oceniti smo želeli vpliv predhodnih stresov (hladni stres in/ali stradanje) na povečano sposobnost preživetja celic po naknadni izpostavitvi toplotnemu ali oksidativnemu stresu. Cilji so bili naslednji:

- Ugotoviti vpliv nizkih temperatur, toplotnega, peroksidnega in oksidativnega stresa na morfologijo, kultivabilnost in živost bakterij *C. jejuni* iz eksponentne in stacionarne faze rasti;
- Ugotoviti vpliv hladnega predstresa in/ali stradanja na temperaturno ter oksidativno odpornost bakterij *C. jejuni*;
- Ugotoviti vpliv predhodnega stradanja in/ali toplotnega, peroksidnega in oksidativnega stresa na izražanje stresnih genov bakterij *C. jejuni*;
- Ugotoviti vpliv predhodnega stradanja in/ali toplotnega stresa na znotrajcelično aktivnost in antioksidativni obrambni sistem.

Postavili smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1

Stresne razmere okolja vplivajo na morfologijo, kultivabilnost, izražanje stresnih genov in živost kampilobakterjev. Stresni odziv celic je odvisen od fiziološkega stanja celic, predvsem od faze rasti. Stresne razmere sprožijo prehod kampilobakterjev iz spiralne v kokoidno obliko, kar lahko sovpada z izgubo kultivabilnosti.

Hipoteza 2

Kombinirani stres (temperaturni ali oksidativni stres v kombinaciji s predhodnim subletalnim predstresom v obliki stradanja ali izpostavitve nizkim temperaturam) ima specifičen učinek na mikrobne celice. Stradanje kot predstres, predvsem v prvih urah, sproži sintezo stresnih proteinov in poveča odpornost celic proti toplotnemu, ne pa tudi proti oksidativnemu stresu.

Hipoteza 3

Stresni odziv sproži izražanje genov, vključenih v splošni in specifični obrambni mehanizem celice. Predvidevamo, da prihaja do sprememb na nivoju izražanja genov za toplotni stres in stradanje (*groEL*, *hspG*, *dnaK*), oksidativni stres (*ahpC* in *sodB*) ter virulenco (*flaA*). Prisotnost kloramfenikola kot inhibitorja sinteze proteinov ne vpliva na transkripcijo genov, a zmanjša odpornost proti toplotnemu stresu.

Hipoteza 4

Po izpostavitvi stresnih pogojem pride do sprememb znotrajcelične oksidacije in metabolne aktivnosti, iz česar lahko ocenimo obseg oksidativnega stresa ter antioksidativni odziv celice.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD CAMPYLOBACTER

2.1.1 Zgodovinski pregled in klasifikacija

Domnevno je že leta 1886 T. Escherich iz črevesne mukoze dojenčkov izoliral kampilobakterjem podobne bakterije (Dekeyser in sod., 1972). Iz začetka 20. stoletja je več zapisov o splavih pri ovkah in govedu z vrsto, prvotno poimenovano *Vibrio fetus* subsp. *jejuni* (Solomon in Hoover, 1999). Leta 1957 je E. King na podlagi seroloških in biokemijskih testov ločil kampilobakterje od ostalih vrst rodu *Vibrio* in jih poimenoval vibrijem-podobni (angl. *Vibrio* related). Ker so se te bakterije od rodu *Vibrio* razlikovale tudi po vsebnosti gvanina in citozina v njihovi DNA sta jih Seabald in Veron leta 1963 uvrstila v nov rod *Campylobacter* (grški pomeni 'campylo' ukrivljen) (Roberts in sod., 1996). *Vibrio fetus* subsp. *jejuni* je bil tako preimenovan v *C. jejuni*. Prva sta kampilobakterje iz bolnika z akutnim enterokolitisom izolirala Dekeyser in Butzler leta 1968 (Dekeyser in sod., 1972; Butzler, 2000). Ko je Skirrow leta 1977 prvič nakazal prenos kampilobakterjev na človeka s hrano, so se raziskave usmerile v razvoj ustrezne metodologije in kasneje fiziologije, predvsem najpomembnejše vrste *C. jejuni* (Skirrow, 1977; Park, 2002).

Leta 1984 so v prvi izdaji Bergeyevega priročnika za sistematizacijo bakterij taksonomsko uvrstili rod *Campylobacter*, skupaj z rodovoma *Helicobacter* in *Arcobacter*, v družino *Campylobactereaceae*. Med 16 vrstami so potencialno patogene za človeka: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter hyoilealis*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter cinaedi* in *Campylobacter helveticus* (Moore in sod., 2005).

2.1.2 Fiziološke in genetske značilnosti

Nesporogene, po Gramu negativne bakterije rodu *Campylobacter* imajo značilno spiralno obliko oz. obliko, podobno črki S in so 0,5 - 5 µm dolge ter 0,2 - 0,9 µm široke. Gibljivost jim omogočajo spiralno-vijačna oblika ter enopolarni ali bipolarni bički. Na ustreznih gojiščih tvorijo *C. jejuni* različne kolonije: ravne, ploščate z neravnim robom, okrogle, izbočene in lesketajoče, sivkaste, pogosto z majhnim, temnejšim centrom (Roberts in sod., 1996).

Danes rod *Campylobacter* vsebuje 16 vrst, od katerih so *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* in *C. upsaliensis* termotolerantne vrste. Netermotolerantne vrste, med katerimi je najbolj raziskan *C. fetus* subsp. *fetus*, rastejo pri optimalni temperaturi 25 °C ter med 35 °C in 37 °C, a ne pri 42 °C (Skirrow, 1977). Medtem ko *C. jejuni* redko povzroča bakteriemijo, se *C. fetus* subsp. *fetus* pogosto razširi iz prebavil v krvni obtok (Gubina in sod., 1976).

Termotolerantne bakterije vrste *C. jejuni* rastejo v ozkem temperaturnem območju med 30 °C in 45 °C, optimalno med 37 °C in 42 °C (Doyle in Roman, 1981). Pod 30 °C se kampilobakterji ne razmnožujejo, vendar so pri temperaturi 15 °C še vedno metabolno aktivni (Hazeleger in sod., 1998). Bolje preživijo v ohlajenih živilih pri temperaturi hladilnika, kot v živilih, hranjenih pri sobni temperaturi ali v zamrzovalniku pri -20 °C (Roberts in sod., 1996).

Kljub mikroaerofilnemu metabolizmu (vir energije je oksidativna fosforilacija oz. respiracija) so celice občutljive na toksične kisikove radikale in ne prenesejo atmosferske koncentracije kisika. Optimalno atmosfero sestavljajo deleži: 5 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida, 85 % dušika. Tudi ostali okoljski dejavniki vplivajo na rast kampilobakterjev, saj ne prenesejo koncentracije 2 % NaCl, a_w pod 0,987 in vrednosti pH pod 4,9 (Roberts in sod., 1996). Majhen genom kampilobakterjev (1,6 do 1,7 Mb) z visokim deležem adenina in timina je morda vzrok zahteve po rastnih dejavnikih oz. kompleksnih medijih. Značilnost genoma kampilobakterjev je prisotnost hipervariabilnih nukleotidnih zaporedij, predvsem v genih za biosinteze poti, površinske strukture ter v genih neznanih funkcij (Parkhill in sod., 2000). Poleg neobičajnih rastnih zahtev ter občutljivosti na strese iz okolja bakterije rodu *Campylobacter* počasi rastejo tudi v optimalnih pogojih (Corry in sod., 1995; Park, 2002).

Kljub nesposobnosti razmnoževanja v živilih in znani občutljivosti celic uradna poročila mnogih držav podajajo visoko incidenco kampilobakterjev v nekaterih živilih in tudi relativno visoko incidenco humanih kampilobakterioz. To velja tudi za Slovenijo, kjer je v zadnjih letih prijavljenih 50 – 60 primerov na 100.000 prebivalcev (Epidemiološko spremljanje..., 2005). V Ljubljanski regiji je bilo od leta 1996 do 1998 povprečno prijavljenih 150 do 200 črevesnih okužb, katerim je bil vzrok *Campylobacter* spp. (Stantič-Pavlinič in sod., 2000). Statističnih podatkov o monitoringu živil ni veliko, vendar nekatere raziskave kažejo na visok delež (več kot 75 %) kontaminiranih vzorcev piščančjega mesa v prodaji (Smole Možina in sod., 2004; Uzunović-Kamberović in sod., 2006). Ti rezultati so tudi vzpodbudili raziskave vzrokov, ki lahko botrujejo t.i. "*Campylobacter* paradoxu", kot sta velikokrat neskladje med občutljivostjo teh bakterijskih celic in pogostostjo bolezni, ki jih povzročajo poimenovali nekateri raziskovalci (Solomon in Hoover, 1999).

2.1.3 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz

2.1.3.1 Epidemiologija

Bakterije *C. jejuni* spadajo med t.i. patogene bakterije s povečanim pojavljjanjem, predvsem zaradi spremenjene bakterijske ekologije, prenosa na ljudi, mikrobnih mutacij, selekcij in prilagoditev, novega načina življenja ter prehranjevanja (npr. sveža živila, vnaprej pripravljeni obroki), sprememb v pridelavi in predelavi živil (masovna proizvodnja, priljubljenost perutninskega mesa), tesnejšega stika z domačimi živalmi in pojavljanja na novih geografskih področjih. Zaradi povečanega zavedanja problema in izpopolnjenih metod odkrivanja, je izolacija pogosteje (Meng in Doyle, 1998; Altekrose in sod., 1999).

Bakterije rodu *Campylobacter* povzročajo bolezen kampilobakteriozo, ki se kot zoonoza lahko prenaša na ljudi preko neposrednega stika z živalmi, v katerih so kampilobakterji naravni del črevesne mikrobne združbe (divje ptice, perutnina, govedo, prašiči, konji, ovce, zajci, glodavci in domače živali) (Pearson in sod., 1996). Kampilobakterizo lahko povzroča tudi uživanje okuženih svežih živil (zelena solata, melona, kumara, korenje, jagode) (Kärenlampi in Hänninen, 2004), uživanje okužene in nezadostno obdelane hrane (piščančje meso, morski sadeži, nepasterizirano mleko, neklorirana voda) (Evans in sod., 2003), slaba higiena ali navzkrižni prenos iz topotno neobdelanih živil (npr. mesa) (Dekeyser in sod., 1972; Berndtson in sod., 1996).

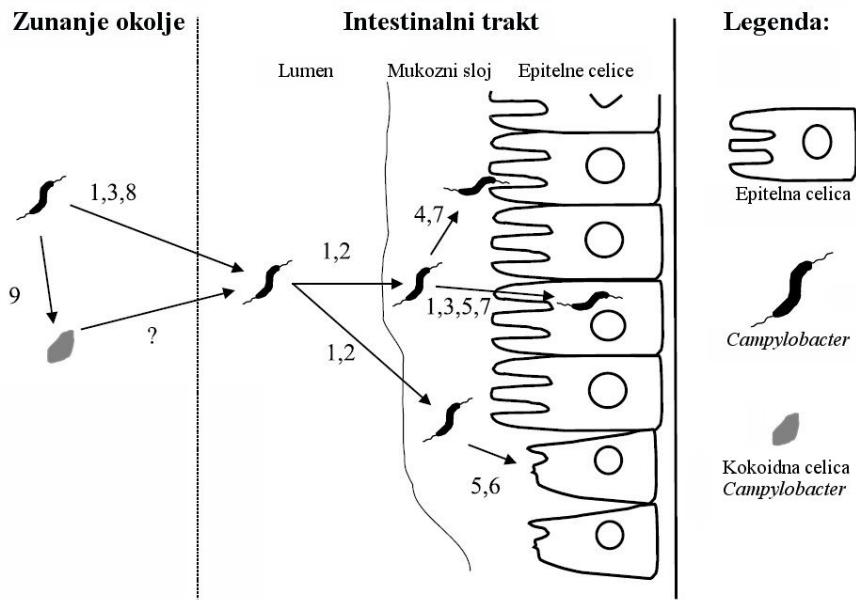
Kampilobakterioza je vodilni vzrok bakterijske driske v razvitem svetu. V mnogih državah se okužbe pojavljajo pogosteje kot s salmonelami in šigelami skupaj (Tauxe, 2000; Tauxe, 2002). Kritična skupina so bolniki z zmanjšano odpornostjo, otroci in starejši. Okužbe s kampilobakterji so ponavadi sporadične in le redko pride do izbruha (Walker in sod., 1986; Crushell in sod., 2004). V večini držav naj bi bil *C. jejuni* odgovoren za več kot 90 % okužb, *C. coli* pa le za 3 - 5 % humanih kampilobakterioz, vendar nekatere raziskave trdijo tudi drugače (Roberts in sod., 1996).

Pri zapletih zaradi ponavljačne kampilobakterioze se lahko razvije Reiterjev sindrom, ki je revmatološko obolenje, in Guillain-Barreov sindrom (GBS) (v 0,1 %), ki se zaradi okvare perifernega živčnega sistema kaže kot motnja v delovanju hrbteničnega mozga in se razvije v akutno nevromuskularno paralizo z oslabelostjo okončin in dihalnih mišic (Nachamkin in sod., 1998; Hadden in Gregson, 2001).

2.1.3.2 Patogeneza

Z zaužitjem okuženega živila vstopijo kampilobakterji v prebavni trakt gostitelja. *C. jejuni* v gostitelju kolonizira (naseljuje) mukozni sloj, ki prekriva črevesne epitelne celice med ileumom in kolonom po vezavi (adheziji) s površinskimi fimbrijskimi strukturami (Ketley, 1997). Najpomembnejša virulentna dejavnika sta tvorba toksinov in vdor v epitelne celice (invazivnost) (slika 2.1). Kampilobakterji tvorijo enterotoksine, ki jih je slovenska raziskovalka prof. Gubina odkrila že leta 1982 (Gubina in sod., 1982) in citotoksine (Wassenaar, 1997; Wooldridge in Ketley, 1997). Pri iskanju pritrilnega mesta ter pri prehodu kampilobakterjev v gostiteljsko celico ima ključno vlogo gibljivost in spiralno-vijačna oblika celic (Szymanski in sod., 1995). Invazivnost celic je nizka, saj manj kot 1 % bakterij vdre v epitelne celice *in vivo* ali *in vitro*. Proteini toplotnega stresa, ki nastanejo pri odzivu celice na temperaturni stres, so pomemben virulentni dejavnik, saj mutant DnaJ ni bil sposoben kolonizacije piščancev (Konkel in sod., 1998; Snelling in sod., 2005a).

Kljub mnogim znanim virulentnim dejavnikom mehanizem humane okužbe s kampilobakterji še ni popolnoma pojasnjen. Infektivna doza gibljivih sevov, sposobnih pritrditve na črevesno sluznico, je majhna (50 - 100 celic) (Robinson, 1981). Odvisna je od seva ter že razvite odpornosti gostitelja zaradi predhodne okužbe s kampilobakterji (Solomon in Hoover, 1999). Zaradi sposobnosti znotrajceličnega preživetja v fagocitih in črevesnih epitelnih celicah so kampilobakterji tudi fakultativni znotrajcelični paraziti (Day in sod., 2000). Znotraj gostiteljske celice so izpostavljeni stresnim pogojem (npr. stradanju), na katere morajo ustrezno odgovoriti, da preživijo. Med mnogimi virulentnimi dejavniki, kot so geni, vpleteni v izločanje (*flhA*, *flhB*, *flgB*, *flgE2*), gibanje (*flaA*, *flaB*), adhezijo (*cadF*), kolonizacijo (*docA*, *docB*), invazivnost (*ciaB*, *iamA*), tvorbo citotoksinov (*cdtA-C*), sta za patogenezo ter znotrajcelično preživetje pomembna tudi gena *katA* ter *sodB* (Pesci in sod., 1994; Day in sod., 2000; Müller in sod., 2005).



Slika 2.1: Stopnje invazije bakterij *C. jejuni* v črevesnem traktu (van Vliet in Ketley, 2001). (1) giblivos; (2) kemotaksi; (3) oksidativni obrambni mehanizem; (4) adhezija; (5) invazija; (6) izdelovanje toksina; (7) pridobivanje železa; (8) stresni odziv na spremembe temperature; (9) kokoidna oblika.

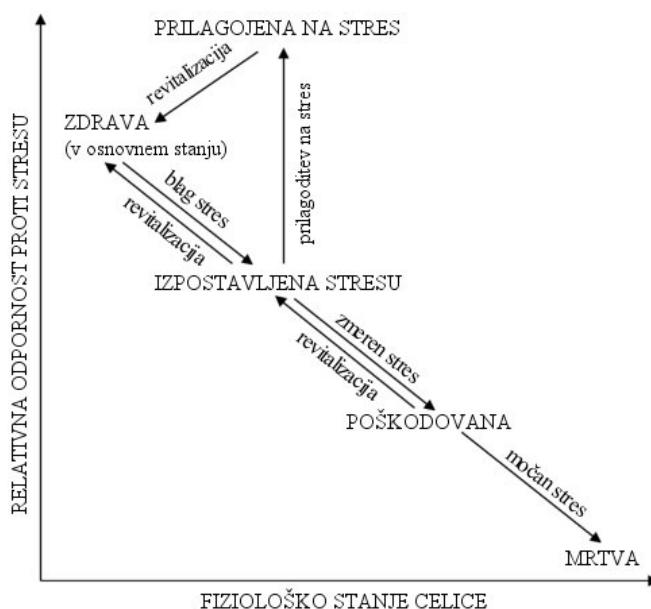
Figure 2.1: The different phases of *C. jejuni* invasion of the intestine (van Vliet and Ketley 2001). (1) motility; (2) chemotaxis; (3) oxidative stress defence; (4) adhesion; (5) invasion; (6) toxin production; (7) iron acquisition; (8) temperature stress response; (9) coccoid form.

Čeprav ni veliko znanega o načinu povzročanja bolezni, so bipolarni bički kampilobakterjev med najpomembnejšimi virulentnimi dejavniki. S hitrim gibanjem *C. jejuni* predre mukozni sloj črevesnih celic in poveča možnost vezave ter invazije celic. Pri bakterijah *C. jejuni* je pri izražanju strukturne komponente flagelina najpomembnejši gen *flaA*. Tudi gen *flaB* je nujno potreben za normalno giblivos celic. FlaA mutanti so nesposobni kolonizacije 3 dni starega piščanca in niso sposobni *in vitro* invazije humanih epitelnih celic črevesnega trakta (Ketley, 1997; Carrillo in sod., 2004).

2.2 STRESNI POGOJI IN ODZIV MIKROORGANIZMOV

2.2.1 Stres

Stres povzroči vsak odmik od optimalnih pogojev (npr. fizikalni, kemijski, biološki), ki vplivajo na rast in preživetje celic. Blag, t.i. subletalni stres ne povzroči izgube živosti celic, a lahko vpliva na njihovo fiziologijo, kar se odraži v rasti celic. Zmerni stres zmanjša rast in tudi živost celic. Močan, t.i. letalni stres pa povzroči nepopravljive poškodbe celice ter smrt večine mikrobne populacije (slika 2.2) (Youself in Courtney, 2003, Vorob'eva, 2004).



Slika 2.2: Možne interakcije fizioloških stanj mikrobne celice pod stresnimi pogoji (Youself in Courtney, 2003).

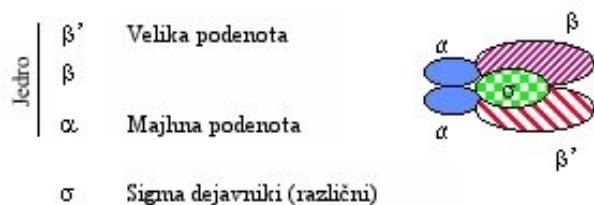
Figure 2.2: Proposed interrelations among physiological states of microbial cell subjected to different stresses (Youself and Courtney, 2003).

2.2.2 Definicija in mehanizem splošnega stresnega odziva

Preživetje organizmov v naravi je odvisno od njihove sposobnosti zaznavanja in ustreznegra odzivanja na spremembe okolja. Pri izpostavitvi celic potencialno škodljivim kemičnim in fizikalnim vplivom okolja se sprožijo molekularni mehanizmi stresnega odziva, ki poleg zaščite in popravila že nastalih molekularnih poškodb pridobijo večjo odpornost celic proti novim stresnim pogojem (Abee in Wouters, 1999). Celica se dinamično prilagodi preko izražanja genov, vključenih v obrambni mehanizem, sinteze novih proteinov in spremembe encimske aktivnosti. Spremembe se odrazijo v prilagoditvi celičnega metabolizma, vzdrževanju homeostaze, zmanjšanju reprodukcije, zmanjšanju nivoja nukleinskih kislin (RNA, DNA), spremembah celične velikosti oz. prehodu v odpornejše fiziološke oblike (Youself in Courtney, 2003).

Specifični stresni odgovor se sproži pri izpostavitvi celice določenim in že znanim stresnim pogojem ter vključuje npr. odziv na topotni, hladni, kislinski, ozmotski stres; stradanje; prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti, metalov, ionov, poškodbe DNA. Prilagoditev na spremembe okolja, s katerimi celica še ni bila seznanjena (t.i. navzkrižna prilagoditev), sproži splošni stresni odgovor celice preko signalne transdukcije, induciranih mutacij, prehoda v odpornejše oblike, pridobljene odpornosti proti antibiotikom, prehoda v stacionarno fazo, itd.. Vedno pomembnejši oz. bolje poznan postaja odziv celic na nivoju mikrobine populacije, kot so celično signaliziranje, nastanek biofilmov in programirana celična smrt (Hohnson, 2003).

Skupen regulatorni mehanizem prokariontskih organizmov vključuje modifikacijo centralnega reagulatorja izražanja genov, t.i. sigma dejavnika (σ), ki z vezavo spremeni specifično promotorsko prepoznavnost polimeraze RNA in s tem omogoči prepis DNA v RNA ter izražanje genov (slika 2.3) (Madigan in sod., 2000).



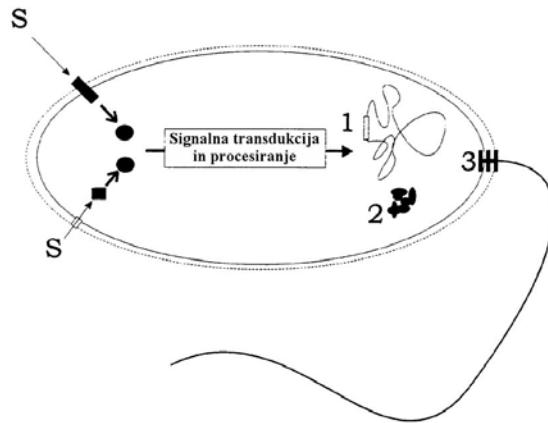
Slika 2.3: Polimeraza RNA prokariontov, sestavljena iz podenot 2α , 2β , 1ω in dejavnika σ (Ellis, 2003).

Figure 2.3: RNA polymerase of prokaryotic organisms consist of 2α , 2β , 1ω subunits and σ -factor (Ellis, 2003).

Eden glavnih sigma dejavnikov je σ^70 . Ta je pri po Gramu negativnih bakterijah kodiran z genoma *rpoS* ali *rpoD* in je odgovoren za prepis večine genov za vzdrževalne funkcije. Posebne tipe promotorskih zaporedij prepoznajo alternativni sigma dejavniki, ki uravnavaajo izražanje regulonov, vključenih v splošne ali specifične stresne odgovore (Rees in sod., 1995; Petersen in sod., 2003).

V primerjavi z ostalimi črevesnimi bakterijami je stresni odziv kampilobakterjev slabo raziskan. V mnogih po Gramu negativnih bakterijah, npr. *E. coli*, je splošen stresni odziv reguliran z alternativnimi sigma dejavniki (σ^{32} oz. σ^S , σ^E , σ^N in σ^B). Sigma dejavnika σ^S , ki je ključen za preživetje celic v stacionarni fazi in pri izpostavljenosti različnim okoljskim stresom pri večini po Gramu negativnih bakterij, kampilobakterji nimajo. Je produkt gena *RpoS* in pri *E. coli* kontrolira izražanje več kot 50 genov (Hengge-Aronis, 1999; Parkhill in sod., 2000). Kampilobakterji nimajo niti drugih ključnih regulatorjev stresnega odziva, npr. SoxRS in OxyR, ki sta odgovorna za oksidativni stresni odziv, ozmoregulatorjev BetAB, GbsAB, OtsAB, ProP ali proteinov hladnega stresa CspA (Park, 2002). Poleg proteinov topotnega stresa (npr. GroELS, DnaJ, DnaK, Lon) pa vsebuje *C. jejuni* dva negativna regulatorja topotnega stresa HspR in HrcA. Kljub odsotnosti omenjenih mehanizmov preživetja kampilobakterji preživijo izven črevesja (Murphy in sod., 2006).

Proces, pri katerem celica zunanje signale zaznava s senzorskimi proteini in jih v spremenjeni obliki prenese do ostalega regulacijskega sistema ter tako nanje odgovori z znotrajceličnim odzivom, se imenuje signalna transdukcija. Poznana sta dva osnovna modela signalne transdukcije. V prvem pride do prenosa zunajceličnega signala preko membranskega proteina, v drugem pa signalna molekula vstopi v celico s pasivno difuzijo ali preko prepustne membrane (slika 2.4) (Hellingwerf in sod., 1998).



Slika 2.4: Dva modela prenosa signala preko celične ovojnice (Hellingwerf in sod., 1998). Pri obeh modelih sledi prenosu signala zaporedje reakcij signalnega procesiranja in transdukcije pred končnim odgovorom oz. spremembami (1) izražanja genov, (2) encimske aktivnosti ali (3) rotacije bička.

Figure 2.4: Two modes of signal transfer across the bacterial cell envelope (Hellingwerf in sod., 1998). In both cases a series of reactions must follow for signal processing and transduction before the final response, in terms of a modulation of (1) gene expression, (2) enzyme activity or (3) flagellar rotation, can be elicited.

Pri večini bakterij pride med prehodom v stacionarno fazo do strukturnih, fizioloških in metabolnih sprememb s sintezo zaščitnih proteinov ter tako večje odpornost na stresne pogoje (Murphy in sod., 2006). Homolog RpoS pri *C. jejuni* ni prisoten (Parhill in sod., 2000). Celice *C. jejuni* so najbolj odporne v eksponentni fazi, sledita zgodnja stacionarna in stacionarna faza (Kelly in sod., 2001). Vendar so tudi celice *C. jejuni* podvržene določenim fiziološkim spremembam ob prehodu v stacionarno fazo, kot je npr. sprememb sestave membranskih lipidov. Le te vplivajo na povečano membransko integriteto in odpornost proti povečanemu pritisku, a ne topotnemu ter kislinskemu stresu (Martinez-Rodriguez in Mackay, 2005). Nihanja rasti v stacionarni fazi razlagajo kot pojav mutantov z boljšo preživelostjo, fenomen so poimenovali s kratico GASP (ang. growth advantage in stationary phase) (Zambrano in sod., 1993). Vzrok je lahko nastanek nove populacije celic (Martinez-Rodriguez in sod., 2004).

2.2.3 Stresni odziv na nivoju mikrobne celice

2.2.3.1 Definicija in pomen stanja VBNC

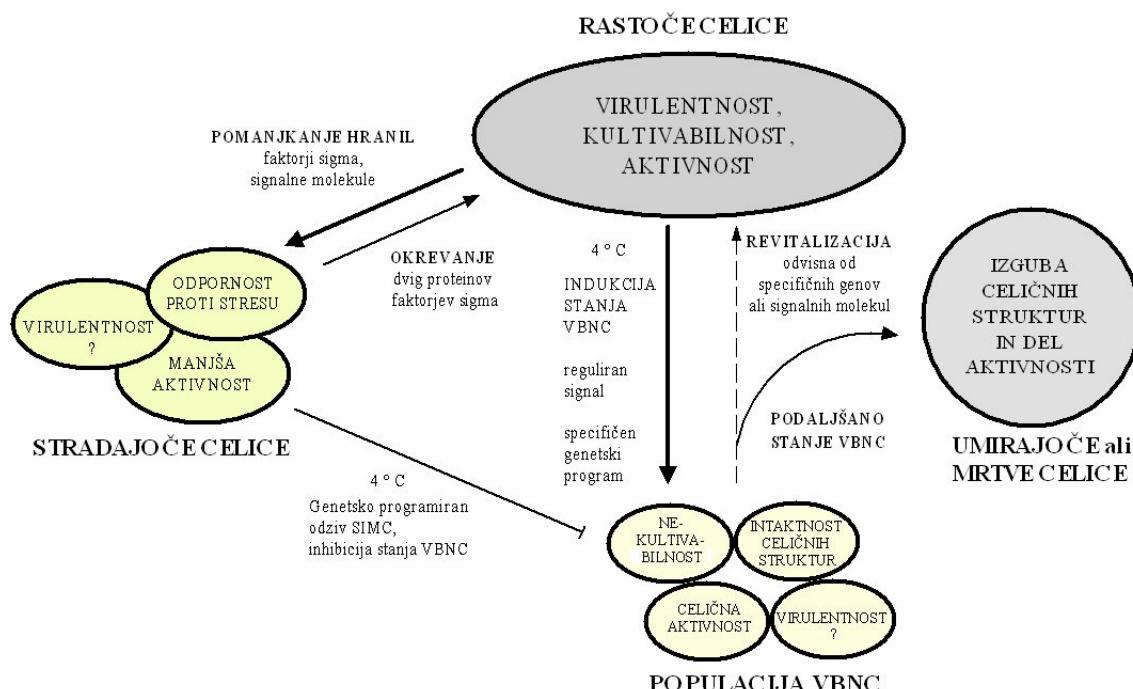
Izenačevanje kultivabilnosti ter živosti ni odpravilo dvoumnih opisov celic, vidnih pod mikroskopom, a nezmožnih tvorbe kolonij na gojiščih (npr. mrtve, nežive, oslabljene, subletalno ali letalno poškodovane ter umirajoče celice). Colwell je leta 1982 za nekultivabilne celice s spremenljivimi in težko določljivimi fiziološkimi lastnostmi uvedel termin: živo, a nekultivabilno (VBNC) (Colwell, 2000). Nekateri avtorji zagovarjajo tudi poimenovanje metabolno aktivno, a nekultivabilno stanje (angl. active but not culturable, ABNC) (Mackey, 2000).

Fiziološke in molekularne osnove pretvorbe celic v stanje VBNC niso dobro znane, vendar sta prepoznavni dve fazi: (1) izguba kultivabilnosti, a ohranitev celične integritete, nepoškodovane membrane in nukleinskih kislin (DNA, RNA) ter možnosti revitalizacije;

(2) postopna izguba celične integritete, delna razgradnja nukleinskih kislin (RNA, v nekaterih primerih DNA) ter s tem nezmožnost revitalizacije, izguba živosti oz. smrt celice (Weichert, 1999).

Prehod v stanje VBNC se tudi razlikuje od 'stradajočega stanja' celic, v katerem je vidna manjša aktivnost metabolizma a prisotnost kultivabilnih celic. Le to so dokazali tudi s proteinskim profilom, ki se je pri celicah v stanju VBNC razlikoval od celic v eksponentni fazì rasti (Oliver, 2005).

Stanje VBNC naj bi bil del obrambnega odgovora ne-sporotvornih bakterij na spremembe okolja (Yamamoto, 2000). Spremljala naj bi ga stabilizacija in odebeline celične stene, sprememba strukture in prepustnosti membrane, zmanjšan prenos hranil, kondenzacija citoplazme, skrčenje celice in nezmožnost razmnoževanja, zmanjšanje metabolne aktivnosti s sintezo novih proteinov stresnega odziva ter nadaljnje izražanje različnih genov (Beumer in sod., 1992; Weichert, 1999). S tem se poveča celična stabilnost in odpornost proti različnim stresom (slika 2.5) (McDougald in sod., 1998).



Slika 2.5: Možen model interakcij regulatornih dejavnikov, vključenih v tvorbo VBNC (Rice in sod., 2000). Polne črte predstavljajo smer znanega odziva, prekinjene črte pa potencialno indukcijo fiziološkega stanja. Črta v obliki 'T' predstavlja potencialno blokado odziva. SIMC: s stradanjem inducirana ohranjena kultivabilnost.

Figure 2.5: A possible model for the interaction of regulatory factors involved in VBNC response (Rice et al., 2000). Solid arrows depict directions of known response while broken arrows indicate potential lines of induction of physiological states. The sideways 'T' indicates the inhibition of blockage of a response. SIMC: starvation-induced maintenance of culturability.

Identifikacija genov, izraženih po tvorbi VBNC, nakazuje genetsko programiran odziv, ki je del življenskega cikla (Yamamoto, 2000). Ni še dokazov ali je stanje VBNC posledica prilagoditve, pri čemer bi pričakovali sposobnost povrnitve v prvotno obliko in ponovne kultivabilnosti v ugodnih pogojih (t.i. revitalizacijo) (Weichert, 1999), ali predstopnja

programirane celične smrti oz. apoptoze zaradi porušenja celičnih struktur (McDougald in sod., 1998).

Ponovno kultivabilnost bakterij so preko *in vitro* poskusov dosegli z dodatkom hranil (Roszak in sod., 1984), svežega medija (McDougald in sod., 1998), prenosom v vodno okolje (Pearson in sod., 1993; Thomas in sod., 2002), znižanjem temperature (Oliver in sod., 1995), zvišanjem temperature (Wai in sod., 1996) ali po tretiranju s kislinami (Chaveerach in sod., 2003). Preko *in vivo* poskusov prehoda nekultivabilnih celic skozi prebavni trakt živalskih modelov (Jones in sod., 1991; Saha in sod., 1991), so za povrnitev kultivabilnosti ugotovili potrebno prisotnost signalnih molekul celic črevesja oz. ostalih aktivno rastočih bakterijskih celic ali dejavnikov zarodnih celic (McDougald in sod., 1998; Cappelier in sod., 1999b). Hitrejši prehod v kultivabilno obliko so pri *Micrococcus luteus* dosegli s prisotnostjo signalnih molekul živih kultivabilnih celic v stacionarni fazi (Kaprelyants in sod., 1994). Supernatant nekultivabilnih stradanih celic prav tako povzroči prehod rastočih celic v nekultivabilno stanje (McDougald in sod., 1998). Obstaja pa tudi možnost, da je kultivabilnost le posledica namnožitve in rasti nekaj preostalih kultivabilnih celic v kulturi (Kell in sod., 1998; Viable but..., 2000).

Prehod v stanje VBNC so opisali pri mnogih patogenih bakterijah, npr.: *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi* (Roszak in sod., 1984; Cho in Kim, 1999), *Listeria monocytogenes* (Besnard in sod., 2000), *E. coli* (Arana in sod., 1997; Nyström, 2001), *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* ter *C. jejuni* (Rollins in Colwell, 1986; Hazeleger in sod., 1995).

2.2.3.2 Stanje VBNC in kokoidnost pri kampilobakterjih

Pri bakterijah rodu *Campylobacter* sta prehod v nekultivabilno obliko oz. stanje VBNC prvič opisala Rollins in Colwell (1986).

Izgubo kultivabilnosti so pri kampilobakterjih povezovali z morfološkimi spremembami celic iz spiralne v kokoidno obliko (Moran in Upton, 1987). Vendar so te prvotne domneve zanikali po dokazu spiralnih bacilov v populaciji celic VBNC ter odvisnosti tvorbe kokoidne oblike od pogojev okolja in morfologije seva. Prehoda v kokoidno obliko, domnevno pasivnega procesa brez povezave z aktivno sintezo proteinov (Hazeleger in sod., 1995), naj bi bile sposobne mlajše spiralne celice (Moore, 2001; Lazaro in sod., 1999). Degenerativne spremembe kokoidne oblike dokazujejo z manjšo vsebnostjo nukleinskih kislin, peptidov, zmanjšano celično integriteto, poškodbami mikrostruktur in membrane (Moran in Upton, 1986; Beumer in sod., 1992).

Ponovno kultivabilnost so pri kampilobakterjih, pri katerih se *in vitro* regeneracija ni obnesla, pridobili z uporabo prebavnega trakta živalskih modelov oz. inokulacijo piščancev, miši in glodalcev s *C. jejuni* (Jones in sod., 1991; Cappelier in sod., 1999a; Baffone in sod., 2006). Kot najboljši medij za okrevanje celic VBNC *C. jejuni* pa so se izkazale zarodne celice (Talibart in sod., 2000). Revitalizacija je odvisna od lastnosti seva in starosti celic VBNC (Tholozan in sod., 1999). Kot dokazujejo tudi najnovejše raziskave, je pomembna dolgorajna prisotnost živih kampilobakterjev v stanju VBNC v vodnih okoljih (vključno s pitno vodo) in s tem pri prenosu okužb na ljudi (Baffone in sod., 2006). S poznavanjem omenjenih dejavnikov bi lahko razvili občutljiv medij za določanje prisotnosti kampilobakterjev v stanju VBNC (Talibart in sod., 2000).

2.2.4 Stresni odziv na nivoju mikrobne populacije

2.2.4.1 Celično signaliziranje

Celično signaliziranje (angl. quorum sensing, QS) omogoča celicam različnih vrst komunikacijo in koordinacijo delovanja s tvorbo, izločanjem in zaznavo zunajceličnih signalnih molekul (avtoinduktorjev oz. feromonov). Te molekule se akumulirajo v rastnem mediju ob dovolj visoki celični gostoti (v eksponentni faziji rasti). Pri po Gramu negativnih bakterijah avtoinduktorje I predstavljajo N-acetil homoserin laktoni (AHL), pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa majhni peptidi. Pri obeh omenjenih skupinah bakterij so prisotni še avtoinduktorji II oz. furanosil boratni diestri (Bassler, 1999; Schauder in Bassler, 2001).

Medcelično komunikacijo so prvič opisali pri *Vibrio fischeri*, pri *C. jejuni* pa leta 2002 (Elvers in Park, 2002). Genom vrste *C. jejuni* ne tvori encima za sintezo avtoinduktorjev AHL, vsebuje pa zapis za protein LuxS, povezan z regulacijo toksina CDT (Jeon in sod., 2005). Protein LuxS je potreben za tvorbo signalnih molekul pri več kot 30 bakterijah. Sistemi komunikacije s sosednjimi celicami so pomembni pri kolonizaciji, virulentnosti, tvorbi biofilmov in regulaciji fizioloških procesov (npr. odzivu na stresne pogoje) (Hardman in sod., 1998; Lazazzera, 2000).

2.2.4.2 Biofilmi

S pritrditvijo bakterijske populacije na površino ali druge celice ter tvorbo zunajceličnih polisaharidov nastane struktura biofilma. Le ta je prepletena s kanali, po katerih poteka prenos vode, hrani, kisika ter metabolnih odpadkov. Strukturi nudi zaščito matriks iz polisaharidov. Polisaharidni matriks nudi zaščito bakterijskim celicam, vendar so v biofilmih bakterije izpostavljene stradanju, dehidraciji in oksidativnemu stresu, kar omogoča prilagoditev na te in druge strese. V biofilmih so lahko prisotni aerobni, mikroaerofilni in anaerobni organizmi, saj koncentracija kisika ni enaka v vseh plasteh (Murphy in sod., 2006).

Kampilobakterji v biofilmih med izpostavitvijo oksidativnemu stresu, pomanjkanju hrani ali spremembam temperature bolje preživijo v vodnih okoljih, na nerjavečem jeklu ali steklu. Pri tem lahko preidejo v stanje VBNC (Buswell in sod., 1998; Trachoo in sod., 2002).

2.2.5 Hladni stres

2.2.5.1 Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva

Znižanje temperature povzroči zmanjšano tekočnost in prepustnost celične membrane za različne substrate. Stresni odziv omogoči povečanje števila nenasičenih maščobnih kislin in zmanjšanje dolžine nasičenih maščobnih kislin, s tem pa večjo tekočnost in sposobnost membrane za črpanje snovi ter sintezo hranil v celici (Wouters in sod., 2000).

Ob nizkih temperaturah pride do izražanja različnih proteinov hladnega stresa:

- proteini CAP (angl. cold acclimatization protein) – sintetizirani so pri stalno nizkih temperaturah;
- proteini CIP (angl. cold induced proteins) – inducirani so ob nenadni izpostavitvi mikroorganizma nizkim temperaturam;
- proteini CSP (angl. cold shock proteins) – proteini prilagoditve celic na hladni stres imajo nizko molekularno maso in so pomembni pri procesih prepisa in regulacije ostalih proteinov. Velikokrat sovpadajo s proteini CIP (Wouters in sod., 2000).

2.2.5.2 Odziv na hladni stres pri kampilobakterjih

Sekvenca genoma je pokazala, da kampilobakterji nimajo proteinov hladnega stresa (Parkhill in sod., 2000) in zato niso sposobni rasti pri temperaturi, nižji od 30 °C (Hazeleger in sod., 1998). Preživelost je pod minimalno rastno temperaturo celo boljša, višje temperature pa povzročijo hiter prehod iz spiralne v nekultivabilno kokoidno obliko (Buswell in sod., 1998). Zmožnost prilagoditve in regulacija izražanja genov je pri kampilobakterjih med izpostavitvijo nizkim temperaturam še neznanka. Analize pri temperaturi 4 °C in 10 °C so pokazale zmanjšano izražanje genov, vključenih v kemotakso, biosintezo bička in gibljivost ter povečano izražanje genov, vključenih v energetski metabolizem. Dokazali so tudi povečano izražanje genov, ki kodirajo proteine oksidativnega obrambnega mehanizma, kot sta *sodB* in *Cj0358*, kar nakazuje na to da bakterije *C. jejuni* zaznajo hladni stres kot oksidativni in je le-ta nato glavna komponenta odziva na hladni stres. Pri zaznavanju in odzivu na hladni stres naj bi bila pomembna tudi dvo-komponentna signalna transdukcija (Stintzi in Whitworth, 2003; Moen in sod., 2005). Kampilobakterji torej trošijo veliko energije pri nizkih temperaturah. Znano je, da je fenotip sevno variabilna lastnost z genetskimi osnovami, zato tudi odpornost proti nizkim temperaturam variira med sevi *C. jejuni* (Murphy in sod., 2006).

2.2.6 Toplotni stres

2.2.6.1 Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva

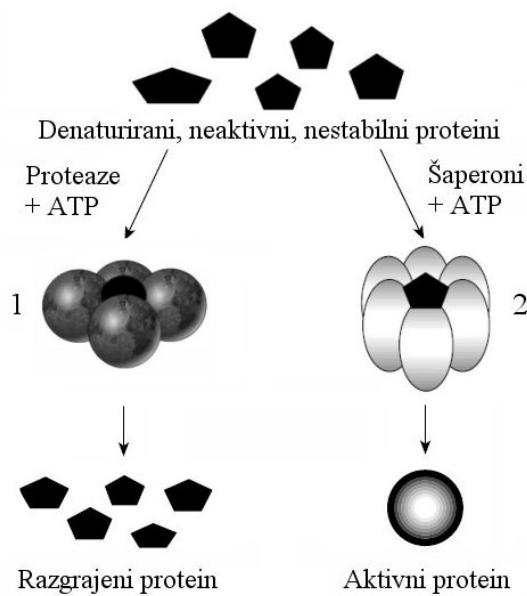
V celici je veliko topotno občutljivih snovi, med katerimi so najpomembnejši ribosomi, nukleinske kisline, citoplazemski in membranski proteini. Ribosomi lahko pri povišani temperaturi zaradi koagulacije beljakovinskih podenot izgubijo specifično sekundarno in terciarno strukturo. Visoke temperature povzročijo povečano občutljivost nukleinskih kislin ter vplivajo na tekočnost membrane ter membranskih proteinov. Glavni vzrok celične smrti po izpostavitvi visokim temperaturam še ni povsem pojasnjen (Abee in Wouters, 1999).

Visoka temperatura sproži mehanizme celičnega prilagajanja, kar vodi v univerzalno obrambo funkcij in homeostaze, čeprav se posamezne komponente zaznavanja in odzivanja preko signalne transdukcije razlikujejo celo v isti vrsti bakterij. Odziv na topotni stres vključuje indukcijo specifičnega seta genov, ki kodirajo proteine topotnega stresa (angl. heat shock protein, HSP).

2.2.6.2 Proteini HSP, inducirani s topotnim stresom

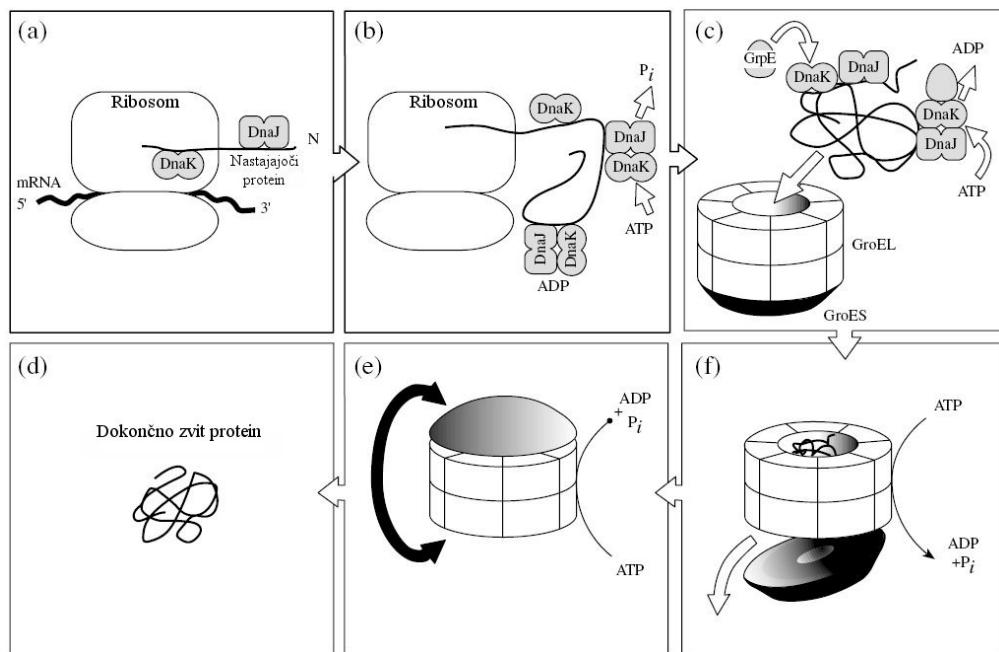
Skupna zaščitna funkcija HSP med izpostavitvijo stresu je šaperonsko ali proteazno delovanje (slika 2.6). Tako tvorijo aktivne, naravne in/ali stabilne proteine topotnega stresa s pravilnim delovanjem ter omogočijo prilagajanje celice in njeno preživetje (Ellis in Hartl, 1999; Vorob'eva, 2004).

Molekularni šaperoni imajo primarno vlogo v metabolnih poteh proteinov in se vežejo na nezvite ali delno zvite proteine, s čimer preprečijo nepravilno zvijanje, sestavljanje in združevanje ter pospešijo pravilno medsebojno sestavljanje, popravljanje in oblikovanje topotno občutljivih proteinov (slika 2.7). Najpomembnejša družina šaperonov je DnaK (Hsp 70) s ko-šaperonom DnaJ (Hsp 40) ter sprostivtem dejavnikom GrpE. Druga je GroEL (Hsp60) s ko-šaperonom GroES. Vezava in sprostitev proteinskih substratov je odvisna od hidrolize ATP (Herman in Gross, 2000; Vorob'eva, 2004).



Slika 2.6: Mehanizem delovanja proteinov HSP (Abee in Wouters, 1999). Neaktivne ali nestabilne proteine prepoznaajo proteinaze (1) ali šaperonski kompleksi (2), ki vodijo v razgradnjo proteinov na manjše peptide ali tvorijo aktivne in topotno stabilne proteine.

Figure 2.6: Mechanism of HSP proteins action (Abee and Wouters, 1999). Inactive, denatured, or unstable proteins are recognized by proteases (1) or the chaperone complex (2); correspondingly, such proteins are either cleaved into small peptides or recovered by HSP proteins (resulting in active proteins with natural conformation and normal stability).



Slika 2.7: Shematski prikaz vključitve molekulskih šaperonov v pravilno zvijanje polipeptidnih verig (Vorob'eva, 2004). (a) Dnak in DnaJ reagirajo z nastajajočo polipeptidno verigo. (b) Nastane terciaren kompleks, ki vključuje DnaK, DnaJ in nezviti protein. (c) GrpE inducira nastanek ADP in sledi vezava ATP; delno zvit protein se sprosti in prenese k kompleksu GroEL/GroES. (d) Vezava zvitih intermediatov v osrednji odprtini šaperona GroEL. (e) Ko-šaperon GroES se premakne med dva konca cilindra GroEL. (f) Zvit protein izgubi afiniteto do ko-šaperona in izstopi iz odprtine šaperona GroEL.

Figure 2.7: Schematic representation of the involvement of molecular chaperones in the proper folding of polypeptide chains in bacteria (Vorob'eva, 2004). (a) DnaK and DnaJ interact with the nascent polypeptide chain. (b) A tertiary complex is formed, including DnaK, DnaJ, and the unfolded protein. (c) GrpE induces ADP formation, followed by ATP binding; the partially folded protein is released and transferred to the GroEL/GroES complex. (d) Binding of the folded intermediate in the central cavity of GroEL. Hydrolysis of ATP (bound to GroEL), the protein enters the cavity, where it is folded. (e) Chaperonin GroES moves between the two ends of the GroEL cylinder. (f) The completely folded protein loses its affinity for the chaperonin and exits the cavity of GroEL.

Proteazni kompleksi razgradijo ter iz celice odstranijo citoplazemske proteine, ki jih z delovanjem šaperonov ni bilo mogoče popraviti in so ostali poškodovani. Pri tem se sprostijo aminokisline, ki jih celica uporabi pri sintezi novih proteinov. Tri družine proteaz (Clp, FtsH in Lon) imajo tudi notranje šaperonsko delovanje, kar pomeni, da po odstranitvi iz proteaznega kompleksa delujejo kot šaperoni (Herman in Gross, 2000).

Glede na homologijo sekvenč in tipično molekulsko maso so proteini HSP razdeljeni v družine: Hsp 110, Hsp 100, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60, Hsp 40, Hsp 10 in nizko molekularni Hsp. Stresni proteini se med seboj razlikujejo v substratni specifičnosti in celičnih funkcijah (Santorno, 2000).

2.2.6.3 Proteini HSP pri bakterijah *C. jejuni*

Po izpostavitvi topotnemu stresu so pri kampilobakterjih dokazali prisotnost vsaj 24 proteinov, med njimi GroEL, GroES, DnaJ, DnaK in Lon (Konkel in sod., 1998). Analiza genoma *C. jejuni* pa je omogočila identifikacijo dodatnih homologov proteinov topotnega stresa, npr. HrcA, GrpE in HspR (Parkhill in sod., 2000). Konkel in sod. (1998) so jih karakterizirali kot skupino medsebojno reguliranih proteinov s temperaturno odvisno sintezo, ki se poveča ob zvišanju temperature ali kot odgovor na druge strese, npr. spremembe v dostopnosti hranil, alkalni pH stres, kombiniran aerobni in topotni stres. Najbolj intenzivno sta bila raziskana šaperonska gena GroEL in DnaK (Thies in sod., 1999).

2.2.6.3.1 Izražanje temperaturno reguliranih genov

Izražanje temperaturno reguliranih genov, ki predstavljajo drugo obrambno linijo kampilobakterjev, poteka ves čas med izpostavitvijo visokim temperaturam. Večina genov, katerih izražanje se je z dvigom temperature povečalo, kodira proteine neznanih funkcij, kar kaže na omejitve pri razumevanju fiziologije bakterij *C. jejuni*. Glede na specifične vzorce izražanja so določili štiri razrede, od katerih razreda A in D predstavlja gene z zmanjšanim, razreda B in C pa gene s povečanim izražanjem:

- razred A: geni so vključeni v sintezo in modifikacijo ribosomskih proteinov, ki nadzorujejo rast in preusmeritev energije v zaščito ter prilagoditev celice;
- razred B: geni topotnega stresa (proteinov HSP) (preglednica 2.1); geni za respiracijo bakterij, ki vzdržujejo rast *C. jejuni* v pogojih z zmanjšanimi koncentracijami kisika;
- razred C: geni so pomembni za gibeljivost in s tem kolonizacijo kampilobakterjev v gostitelju, npr. proteini, vključeni v kemotakso, tvorbo in gibeljivost flagelina; geni, ki kodirajo proteine energetskega metabolizma, celične stene, itd.;
- razred D: geni, ki kodirajo proteine membrane, površinskih struktur ter proteine, vključene v sintezo in modifikacijo makromolekul (Stintzi, 2003).

Vloga termoregulacije pri izražanju virulenčnih dejavnikov v patogenezi bakterij, kot so *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. in *Yersinia* spp., nakazuje tudi vlogo pri patogenezi *C. jejuni* (Konkel in sod., 1998).

Preglednica 2.1: Izražanje proteinov HSP pri *C. jejuni* kot odziv na dvig temperature iz 37 na 42 °C

Table 2.1: Expression *C. jejuni* HSP proteins in response to a temperature upshift from 37 to 42°C

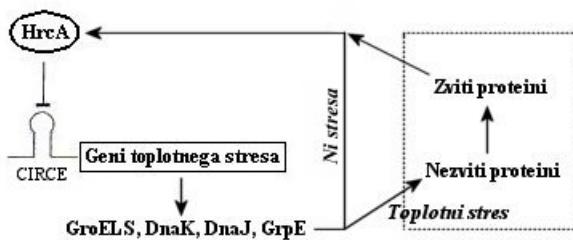
Geni	Oznaka seva	Produkt ali funkcije gena (Parkhill in sod., 2000)	Geni topotnega stresa, izraženi kot odziv na dvig temperature iz 37 na 42 °C (Stintzi, 2003)
----	<i>Cj0125c</i>	Homolog protina DksA	-
<i>tig</i>	<i>Cj0193c</i>	Sprožilni dejavnik (peptidil-propil cis/trans izomeraza, šaperon)	-
<i>htrA</i>	<i>CjNCTC11168</i>	Proteaza, odstrani nezvite proteine iz celične ovojnici	+
<i>clpB</i>	<i>Cj0509</i>	Proteaza	+
<i>lon</i>	<i>Cj0509</i>	Proteaza, odvisna od ATP	+
<i>htpG</i>	<i>Cj0518</i>	Proteini HSP družine hsp 90	-
<i>hslU</i>	<i>Cj0662c</i>	Potencialni proteini HSP	+
<i>hslV</i>	<i>Cj0663c</i>	Potencialni proteini HSP	-
<i>hrcA</i>	<i>Cj0757</i>	Potencialni regulator topotnega stresa	+
<i>grpE</i>	<i>Cj0758</i>	Proteini HSP	+
<i>dnaK</i>	<i>Cj0759</i>	Proteini HSP	+
----	<i>Cj0954c</i>	Potencialni homolog proteina DnaJ	+
----	<i>Cj1034c</i>	Potencialni homolog proteina DnaJ	+
<i>clpA</i>	<i>Cj1108</i>	ATP-odvisna proteaza, ATP-vezavna podenota	+
<i>groES</i>	<i>Cj1220</i>	Šaperon 10kD	+
<i>groEL</i>	<i>Cj1221</i>	Šaperon 60kD	+
<i>cbpA</i>	<i>Cj1229</i>	Potencialni DNA vezavni protein	+
<i>hspR</i>	<i>Cj1230</i>	Potencialni transkripcijski regulator topotnega stresa	+
<i>dnaJ</i>	<i>Cj1260c</i>	Šaperon DnaJ	+

2.2.6.3.2 Mehanizmi regulacije izražanja temperaturno reguliranih genov

Mehanizmi regulacije odgovora na topotni stres so pri *C. jejuni* še precej neraziskani. Odkrili so tri možne regulatorne sisteme za nastanek proteinov topotnega stresa: regulon RacR-RacS za izražanje genov pri 37 °C in 42 °C, HrcA in HspR (Bras in sod., 1999; Stintzi, 2003).

Homolog gena *hrcA* je v skupini z genoma topotnega stresa *grpE* in *dnaK*, iz česar sklepajo, da deluje kot negativni regulator omenjenih genov. Hipoteza je podprtta z identifikacijo *cis*-deluočega regulatornega elementa CIRCE (kratka obrnjena ponavljaljoča se regija) (angl., controlling inverted repeat of chaperone expression), ležečega više od gena *hrcA* in više od začetnega mesta prepisa operona *groESL* (slika 2.8) (Thies in sod., 1999). To nakazuje njegovo vlogo pri represiji pod normalnimi rastnimi pogoji in topotnem stresu (Stintzi, 2003). Pred ostalimi geni iz razreda B ga niso določili. Predvidevajo, da ostale gene iz razreda B negativno regulira HspR. Le-ta regulira izražanje genov, kot so: *dnaK*, *groELS*, *cbpA*, *grpE*, *clpB*, na operonu *hrcA-grpE-dnaK*. Pri *C. jejuni* lahko HspR regulira tudi izražanje HrcA ter genov, vključenih npr. v gibeljivost, odpornost proti stresom, morfologijo in virulenco. Sklepajo, da je HspR ključni regulator prilagoditve bakterij *C. jejuni* v okolju ali v gostiteljskih organizmih (Andersen in sod., 2005; Brøndsted in sod., 2005).

Bakterije *C. jejuni* tako pri sočasni regulaciji različnih genov topotnega stresa kot odziv na dvig temperature ali druge strese uporabijo kompleksno regulatorno mrežo večih strategij (Stintzi, 2003).



Slika 2.8: Model regulacije proteinov HSP z represorjem HrcA v bakterijah *B. subtilis* (Herman in Gross, 2000).

Figure 2.8: Mechanism of HSP proteins regulation with HrcA repressor in *B. subtilis* (Herman and Gross, 2000).

2.2.6.4 Odziv na topotni stres pri kampilobakterjih

Optimalno območje rasti bakterij *C. jejuni* je med 30 °C in 45 °C, uvrščamo jih med organizme, občutljive na visoke temperature (Roberts in sod., 1996). Temperatura 52 °C ne uniči kampilobakterjev, 5 minutna inkubacija pri 55 °C pa povzroči propad večine populacije. Tudi 12 urna inkubacija pri 47 °C povzroči propad celic. Pri *C. coli* so pri 56 °C ugotovili ne-logaritemsko zmanjševanje števila celic (Moore in Madden, 2000).

Dokazan je vpliv medija ter faze rasti pri odpornosti kampilobakterjev proti visokim temperaturem (55 °C). Po 1 do 6 minutni inkubaciji pri 55 °C je boljša kultivabilnost celic v eksponentni fazì rasti ter v gojišču, v katerem so se razmnoževale. Zaščitne snovi starega gojišča so proteini, ki izboljšajo topotno odpornost kampilobakterjev (Murphy in sod., 2003).

Tudi v kontaminacijskem ciklu morajo kampilobakterji zaznati spremembo temperature ter se nanjo prilagoditi. Zaznavanje temperaturnih sprememb lahko uporabijo tudi kot senzor dogajanja in okolja, saj je temperatura npr. v piščančjem prebavnem traktu 42 °C, v človeškem pa 37 °C (Brøndsted in sod., 2005).

2.2.7 Stradanje

2.2.7.1 Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva

Bakterije so izpostavljene stradanju, kadar izčrpajo zalogo limitirajočega hranila v danem okolju. *In vitro* lahko stradanje sprožimo z odstranitvijo hranljivega gojišča. Med stradanjem preidejo bakterije v stanje nizke metabolne aktivnosti. Zmanjša se celični volumen ter posledično poveča površina, preko katere komunicirajo z okoljem. Razpoložljivo metabolno energijo usmerijo v iskanje hranil, sintezo razgradnih encimov, ki delujejo kot lovci substrata in alkalnih fosfataz (npr. proteaz, lipaz, glutamin sintetaz) ter v genetsko usmerjen prehod v odpornejša stanja (Matin, 1992; Moore, 2001). Prehod v stacionarno fazò rasti ali stanje VBNC spremljajo temeljite strukturne in fiziološke spremembe, predvsem na nivoju membranskih struktur. To prispeva k povečani odpornosti bakterij proti stradanju ter temperaturnemu, oksidativnemu, ozmotskemu in kislinskemu stresu (Rees in sod., 1995).

2.2.7.2 Proteini stradanja in odziv pri kampilobakterjih

Med stradanjem se zaradi zmanjšanega metabolizma zmanjša tudi sinteza proteinov. Pomembni pa so dodatno sintetizirani proteini stradanja, katerih sinteza poteka v časovnem zaporedju: (1) zgodnji proteini - prisotni po 15 minutnem stradanju, (2) srednji proteini - prisotni po 4 urnem stradanju in (3) pozni proteini - prisotni proti koncu stradanja. Sinteza specifičnih proteinov stradanja je dokazana pri bakterijah: *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Vibrio* spp. in *Pseudomonas* spp. (Matin, 1990; Matin, 1992).

Odziv na stradanje pri bakterijah *E. coli* vključuje indukcijo 50 do 60 genov (npr. *katG*, *katE*, *xthA*, *dps*, *otsBA*, *proU*, *proP1*). Kot odgovor stradane kulture *C. jejuni* na povišane temperature so karakterizirali proteine Cst in Pex (Cappelier in sod., 2000). Proteini Cst sodelujejo pri asimilaciji hranilnih snovi v celici. Proteini Pex (npr. GroEL, DnaK, HtpG) pa preko proteolitične aktivnosti tvorijo dostopne amino kisline za sintezo novih proteinov.

Regulacija proteinov stradanja poteka pri *E. coli* preko sigma dejavnika σ^S (RpoS), odgovornega za preživetje po Gramu negativnih celic v stacionarni fazi in med izpostavitvijo stresom (Abee in Wouters, 1999). Homolog RpoS pri *C. jejuni* ni prisoten (Parhill in sod., 2000) in zato je stacionarna faza občutljivejša na strese. Prilagoditev najverjetnejše poteka preko genetskih sprememb, saj vsebuje genom vsaj 25 odsekov DNA z veliko frekvenco mutacij, gibanjem ter prehodom v kokoidno obliko (Boucher in sod., 1994; Parkhill in sod., 2000). Med stradanjem se pri bakterijah *C. jejuni* sproži 'stringent' stresni odgovor, reguliran preko homologa *spoT*. Odgovoren je za preživetje celic v specifičnih stresnih pogojih, virulentnost ter pridobljeno odpornost celic proti antibiotikom (Gaynor in sod., 2005).

Če sintezo proteinov stradanja preprečimo z mutacijo ali dodatkom inhibitorja (npr. kloramfenikola), se celice ne morejo prilagoditi na pogoje stradanja (Cappelier in sod., 2000). Vloga proteinov stradanja pri prehodu celic v stanje VBNC še ni pojasnjena, saj se proteinski profil stradajočih celic razlikuje od proteinskega profila celic v stanju VBNC (Oliver in sod., 1991; Cappelier in sod., 2000). Kloramfenikol, ki prepreči sintezo proteinov, ne vpliva na tvorbo kokoidne oblike VBNC (Matin, 1992).

Raziskave kultivabilnosti in živosti *C. jejuni* v vodi kažejo na različno preživelost celic: od 2 tednov do 4 mesecev (Chan in sod., 2001; Cools in sod., 2003). Hkratna inkubacija pri temperaturah med 4 °C in 10 °C pa preživelost podaljša (Buswell in sod., 1998; Thomas in sod., 2002). Med stradanjem, predvsem v prvih 2 do 5 urah, je najbolj izboljšana toplotna odpornost *C. jejuni* (Cappelier in sod., 2000).

2.2.8 Oksidativni stres

Oksidativni stres nastane po izpostavitvi celic proksidantom, ki so reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species, ROS). Pri tem se ravnotežje med tvorbo ROS in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov celice poruši (Sigler in sod., 1999; Storz in Imlay, 1999).

2.2.8.1 Reaktivne kisikove zvrsti

Reaktivne kisikove zvrsti so:

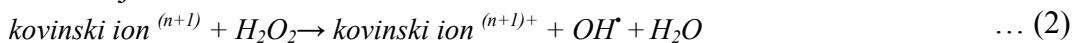
- Molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih oz. t.i. **prosti kisikovi radikali**, kot so npr. superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (HO^{\cdot}), hidroperoksilni radikal (HO_2^{\cdot}), dušikov oksid (NO^{\cdot}), peroksilni radikal (RO_2^{\cdot}). Prosti radikali so spojine (atom, ion, molekula) z vsaj enim nesparjenim elektronom, ki se v živi celici največkrat tvorijo med prenosom elektronov v dihalni verigi.
- **Reaktivne spojine kisika** so spojine z vodikom, klorom in dušikom, kot so npr. singletni kisik (1O_2), ozon (O_3), vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kislina ($HOCl$), peroksinitrit ($ONOO^-$). Le ti niso prosti radikali, vendar med nastanjem v različnih celičnih procesih spodbujajo celico k tvorbi prostih radikalov (Sigler in sod., 1999; Storz in Imlay, 1999).

Primarni ROS (npr. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , 1O_2) nastanejo v celici med procesi, npr. redukcijo kisika v dihalni verigi med oksidativnim metabolizmom (enačba 1); različnimi prenašalnimi sistemi; avtooksidacijo kisika s celičnimi reduktanti (npr. NADH); Fentonovo reakcijo ob prisotnosti različnih kovin (npr. Fe, Cu) (enačba 2). Tako se lahko ROS tvorijo že med normalnim (mikro)aerobnim metabolizmom, prenosom do ljudi, kontaktom s humanim imunskim sistemom, prehodom iz rastne v stacionarno fazo ali pa med izpostavitvijo antibiotikom, ksenobiotikom in ionizacijskemu sevanju (Fridovich, 1998; Curtin in sod., 2002).

Redukcija kisika



Fentonova reakcija



Primarni ROS, od katerih je najbolj toksičen hidroksilni radikal, lahko še naprej reagirajo s celičnimi makromolekulami (lipidi, proteini, DNA) in tako nastanejo sekundarne ROS (npr. hidroperoksidi, peroksilni radikali, aldehidi). Povečanju tvorbe ROS sledi aktivacija obrambnega sistema celice s konstantnim izražanjem encimov za detoksifikacijo ROS in odstranjevanjem poškodb (Sigler in sod., 1999, Potter in sod., 2000).

2.2.8.2 Antioksidativni obrambni sistemi

Pri normalnih pogojih rasti bakterij z aerobnim metabolizmom so naravn antioksidativni obrambni sistemi slabo izraženi, a so dovolj učinkoviti, da obdržijo koncentracijo ROS na osnovni, neškodljivi ravni. Pod pogoji stresnih dejavnikov (npr. oksidativni stres, topotni stres, ionizirajoče sevanje, etanol, težke kovine) se za zaščito pred poškodbami sprožijo primarni encimski (npr. katalaza, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza) in neencimski (npr. glutation, tioredoksin) antioksidativni obrambni sistemi. Le-ti preko vezave kovinskih ionov, encimske odstranitve ROS, neposredne reakcije z ROS ter prilagoditvijo prenašalne elektronske verige v manjšo tvorbo O_2^- preprečijo njihovo tvorbo, jih odstranijo ali povečajo odpornost celičnih komponent (Sigler in sod., 1999).

Preden se nastale ROS akumulirajo v celici in vplivajo na biomolekule ter celični metabolizem, nastopijo sekundarni antioksidativni obrambni sistemi, ki oksidirane molekule in celične poškodbe popravijo. Mednje sodijo specifični popravljalni sistemi DNA, proteolitični sistemi za odstranjevanje oksidiranih proteinov ter lipolitični sistemi (npr. fosfolipaze peroksidaze in acetil transferaze) za odstranjevanje oksidiranih lipidov (Storz in Imlay, 1999; Potter in sod., 2000).

V primeru, ko celica ni sposobna preprečiti nadaljnje akumulacije ROS, lahko le te povzročijo oksidativne poškodbe na vseh glavnih skupinah biomolekul (proteinih, lipidih, nukleinskih kislinah) ter komponentah celičnega metabolizma (organelih - mitohondrijih, jedru, membranah, encimih). V skrajnem primeru sprožijo mehanizem programirane apoptoze oz. celične smrti (Sigler in sod., 1999; Storz in Imlay, 1999).

2.2.8.2.1 Encimski antioksidativni obrambni sistemi

Bakterije se pred oksidativnim stresom zaščitijo tako, da sintetizirajo encime, ki popravljajo škodo, narejeno z ROS, in encime, ki reagirajo s toksičnimi spojinami ter jih tako deaktivirajo. Številni encimi, kot so npr. superoksid dismutaza, katalaza (Kat), alkil hidroperoksid reduktaza (Ahp), peroksidaza, glutation sintetaza in glutation reduktaza, inducirani pri nizkih koncentracijah oksidantov, sestavljajo primarno obrambo proti oksidativnemu stresu (Sigler in sod., 1999; Storz in Imlay, 1999).

V antioksidativnem obrambnem sistemu bakterij *C. jejuni* ima v prvi liniji obrambe glavno vlogo superoksid dismutaza, ki ščiti celico s katalizo pretvorbe O_2^- v H_2O_2 (enačba 4). Pri bakterijah vrste *C. jejuni* in *C. coli* je prisoten le FeSOD, kodiran na genu *sodB*, katerega regulacija izražanja še ni jasna (Pesci in sod., 1994; Parkhill in sod., 2000).

Pri peroksidnemu stresu imata vodilno vlogo alkil hidroperoksid reduktaza in katalaza. Slednja je pomembna pri visokih koncentracijah H_2O_2 , ki nastane s superoksid dismutazo preko številnih encimskih in neencimskih reakcij ali prehaja čez membrane celice iz okolja. Katalaza, ki je pri *C. jejuni* in *C. coli* kodirana le na genu *katA*, razgradi H_2O_2 do kisika in vode (enačba 3). Protein AhpC ima pomembno vlogo pri zaščiti *C. jejuni* pred poškodbami zaradi oksidativnega stresa v stacionarni fazni rasti (Grant in Park, 1995, Baillon in sod., 1999).

Pri kampilobakterjih so prisotni še endonukleaza IV, ki služi za popravila DNA, ter za O_2^- neobčutljiva encima fumaraza in akonitaza. Prisoten je tudi encim glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, ki zviša redukcijski potencial celice in z zmanjšanim vnosom železa vpliva na manjšo tvorbo OH^- . Pri oksidativnem stresu se sintetizira še mnogo drugih encimov, katerih vloga še ni v celoti pojasnjena (Storz in Imlay, 1999).

2.2.8.2.2 Neencimski antioksidativni obrambni sistemi

Alternativni mehanizem eliminacij ROS in vzdrževanja redoks stanja celice je neencimski sistem preko znotrajceličnega tripeptida glutationa. Glutation deluje kot lovilec ROS z aktivno tiolno (-SH) skupino, pri čemer nastane oksidiran glutation, sposoben odstranjevanja oksidantov iz raztopine. Glutation lahko direktno reagira z HO[•] in ga reducira do vode (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.2.8.3 Odziv na oksidativni stres

Bakterije *C. jejuni* so mikroaerofilni organizmi in zahtevajo kisik kot končni akceptor elektronov v dihalni verigi. Na atmosfersko koncentracijo kisika ali njegove redukcijske produkte (predvsem superoksidni anion) so občutljivi in ob njihovi prisotnosti nesposobni rasti. Kljub odsotnosti dejavnika SoxRS, znanega pri drugih mikroorganizmih, so kampilobakterji sposobni prilagoditve in preživetja pri podaljšani izpostavitvi oksidativnemu ali drugim stresom (Jones in sod., 1993; Park, 2002).

Mehanizmi odpornosti proti povečani koncentraciji kisika in metabolizem za odstranjevanje ROS so pri bakterijah *C. jejuni* slabo raziskani. Zagotovo pa preide del spiralnih celic v kokoidno obliko. Večina kokoidnih celic je degenerativnih, le nekatere kokoidne celice so sposobne okrevanja ali prilagoditve. Del populacije pa spiralno obliko obdrži ali jo po izpostavitvi stresu ponovno pridobi (Harvey in Leach, 1998).

Kot objavljajo Martinez-Rodriguez in sod. (2004) je 24 urna izpostavitev bakterij v stacionarni fazi rasti okoljskemu kisiku povzročila zmanjšanje kultivabilnosti za 99,9 %; 6 urna izpostavitev 5 mM H₂O₂ pa zmanjšanje kultivabilnosti za 90 %, ki je po 24 urah padla za 99 % in po 48 urah ni bila več prisotna. Znane so zaščitne funkcije signalnih molekul gojišča, v katerem so celice rasle med izpostavitvijo oksidativnemu stresu (Kelly in sod., 2003).

Dodd in sod. (1997) so razvili teorijo t. i. bakterijskega samomora, v kateri nastanejo poškobe v subletalno poškodovani celici zaradi znotrajcelične tvorbe prostih radikalov. Le-ti posledično povzročijo smrt celice, ki tako ni odvisna od tipa stresa.

2.2.9 Prilagoditev na stres in varnost živil

2.2.9.1 Živilsko predelovalna veriga

Stresu so izpostavljene bakterije v vseh členih predelovalne verige živil: proizvodnje, predelave in shranjevanja živil ter prebave hrane (preglednica 2.2). V okolju so bakterije izpostavljene fizičnim in kemičnim stresom (npr. žarki UV, visoke temperature, kislota, slanost, suh zrak, prisotnost lastnih izločkov, oz. metabolitov) ali pomanjkanju hranil. V živilih so bakterije izpostavljene toplotnemu stresu, zmrzovanju, ozmotskemu stresu, sušenju, oksidativnemu stresu, stradanju, kemičnim stresom ter stresu zaradi prisotnosti sanitacijskih sredstev ali kovin (Ravishankar in Juneja, 2003).

Preglednica 2.2: Dejavniki, ki povzročajo stresni odziv mikroorganizmov iz živil v različnih fazah živilsko predelovalne verige (Youself in Courtney, 2003)

Table 2.2: Deleterious factors likely to provoke stress response in foodborne microorganisms in food chain (Youself and Courtney, 2003)

FAZA V ŽIVILSKO PREDELOVALNI VERIGI					
DEJAVNIKI	Pridelava (okolje)	Predelava	Hranjenje in distribucija	Poraba	V gostitelju
Toplotni stres	Vreme Kompost	Milejši postopki	Nepopravnosti pri kontroli temperature	Kuhanje Ponovno segrevanje	Vročina
Hladni stres	Vreme	Hlajenje	Hlajenje	Nihanje temperature hlajenja	-
Kislinski stres	Kisli dež Namakalna voda Fermentacije (npr. silaža) Odpadki Mišični stres Rastlinski sokovi	Fermentacija živil Dodatki (npr. organske kisline, kisla sol)	Kvarjenje z izdelovalci kislin	Dodatki za kisanje živil (npr. kis, limona)	Želodec Makrofagi
Ozmotski stres	Slanost zemlje	Dodatki (npr. sol) Koncentriranje Sušenje	-	Dodatki pri pripravi hrane	-
Stradanje	Okolje brez hranil	-	-	-	Pomanjkanje železa v makrofagih
Oksidativni stres	Izpostavitev zraku Sanitacija	Izpostavitev zraku Sanitacija	Izpostavitev zraku Sanitacija	Izpostavitev zraku	Makrofagi
Kovine	Namakalna voda	Oprema	-	Oprema	-

Prilagoditev bakterij v živilih na stres je zelo pomembna pri zagotavljanju varne hrane (Youself in Courtney, 2003). Kulture, inaktivirane z ostrejšimi postopki pridelave ter predelave živil (npr. sterilizacije) ne povzročajo skrbi. Izpostavitev celice milim stresnim pogojem (npr. hlajenje, sušenje, zmerna topotna obdelava, dolgotrajno shranjevanje, stradanje) izzove postopno prilagoditev bakterij (npr. preko tvorbe spor, prehodom v stacionarno fazo, tvorbo VBNC ali biofilma) ter tako manjšo zanesljivost pri odkrivanju v živilih. Razvoj navzkrižne odpornosti bakterij odpira nove probleme pri zaščiti zdravja potrošnikov, saj je živilsko predelovalna industrija v današnjem času vedno bolj usmerjena v pripravo 'naravne' hrane z uporabo milejših postopkov obdelave (Hunt in sod., 2001; Moore, 2001).

Znani so primeri prilagoditve salmonel ali listerij na kislinski stres z izboljšano preživelostjo v sirih, jogurtu, sadnemu soku in različnih solatnih prelivih. Patogene bakterije, prilagojene na kislinski ali ozmotski stres med fermentacijo klobas lahko preživijo stopnjo segrevanja, dimljenja ali shranjevanja produkta. Bakterije v mleku so med pripravo različnih sirov izpostavljene postopni pasterizaciji, med katero se lahko ustrezeno prilagodijo. Trend alternativnih (ne-temperaturnih) tehnologij predelave živil bo omenjen problem še razširil (Youself in Courtney, 2003).

2.2.9.2 Kampilobakterji v živilih

Vzrok okužbe s kampilobakterji je velikokrat kontaminacija živil med predelavo oz. proizvodnjo živil, ki jo je težko preprečiti. Med predelavo mesa in mesnih izdelkov pride do prenosa ob klanju (stik z iztrebki, prenos s kožo in drobovino) preko opreme ali vode. Tako se kontaminacija iz gastrointestinalnega trakta gostiteljev na farmi prenaša in je vzrok pogosto kontaminiranega svežega mesa (Mehle in sod., 1982). Surovo mleko se okuži med molžo pri obolenju za subklinični mastitis ali z iztrebki živali. Ob večjih izpustih farm, fekalij ali kanalizacije pa pride do kontaminacije vode. Znana je tudi boljša preživelost in odpornost kampilobakterjev proti razkužilom zaradi prisotnosti praživali, kot so *Tetrahymena pyriformis* in *Acanthamoeba castellanii* v pitni vodi kokoši. Praživali so enocelični organizmi, ki imajo tako rastlinske kot živalske lastnosti. V neugodnih življenjskih razmerah se iz aktivne vegetativne oblike (trofozoit) pretvorijo v mirujočo cistično obliko, ki je tudi bolj odporna na delovanje razkužil (Snelling in sod., 2005b).

Živila predvsem pri nizkih temperaturah predstavljajo za kampilobakterje le vektor prenosa iz živalskega gostitelja na človeka, saj se v njih praviloma ne razmnožujejo. Relativno hitremu odmiranju sledi počasnejše odmiranje, ki je odvisno od pH in tipa živila (Roberts in sod., 1996).

Zaradi milejših postopkov med proizvodnjo živil pridobijo kampilobaterji predvsem s tvorbo VBNC ali biofilma odpornost proti okoljskim pogojem in antimikrobnim sredstvom, kar povzroča skrb v živilski industriji, saj je možnost okužbe z nekultivabilnimi, a metabolično aktivnimi kampilobakterji večja (Kumar in Anand, 1998; Alter in Scherer, 2006).

Temperature vplivajo na preživelost kampilobakterjev v živilih. Preživelost je večja v mesu kot v surovem mleku, saj po dveh tednih inkubacije pri - 20 °C kultivabilnih *C. jejuni* v mleku ni bilo več prisotnih, medtem ko so v zamrznjenem hamburgerju preživeli tudi 90 dni. Odpornost kampilobakterjev proti visokim temperaturam je najboljša v peptonskih raztopinah oz. živilih, vrednosti pH 7,0. Temperaturna obdelava hrane (blanširanje, pasterizacija, sterilizacija) se rutinsko uporablja v proizvodnji mikrobiološko varnih, kakovostnih in obstojnih živil, pri čemer moramo upoštevati število in vrsto mikroorganizmov, tip živila, pogoje in čas delovanja toplotnega postopka ter vir toplotne energije (npr. voda, para, vroč zrak, električna energija, svetloba, ultrazvok, mikrovalovi) (Roberts in sod., 1996; Abee in Wouters, 1999).

Oksidativni stres je največkrat posledica izpostavitve celic atmosferski koncentraciji kisika oz. njegovim toksičnim stranskim učinkom ali oksidantom med proizvodnjo in rokovanjem z živili. Lahko je posledica povečane aktivnosti dihalne verige, zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih obrambnih sistemov ali ostalih dejavnikov, ki povečajo tvorbo ROS (Storz in Imlay, 1999).

Prenos kampilobakterjev se lahko prepreči z nadzorom proizvodnje, vzdrževanjem higiene, ustrezнимi toplotnimi postopki, kloriranjem vode, preprečevanjem vstopa glodavcev, izobraževanjem zaposlenih ter spremeljanjem prehrambene verige živil, ki so le delno toplotno obdelana, hladno servirana, pripravljena pri nizkih temperaturah ali pouličnih ponudnikih hitre hrane. To lahko danes dosežemo z uporabo sistema HACCP, ki s pravilno izbiro kritičnih kontrolnih točk zagotavlja izdelkom mikrobiološko neoporečnost in stabilnost ter na ta način ščiti potrošnika in proizvajalca (Ketley, 1997; van Vliet in Ketley, 2001).

2.3 MERJENJE STRESNEGA ODZIVA

2.3.1 Merjenje stresnega odziva z ugotavljanjem živosti celic

Definicija živosti celic vključuje prisotnost intaktne membrane ter drugih celičnih struktur, prepisa ter prevoda, aktivnega metabolizma in rasti oz. razmnoževanja. Na omenjenih karakteristikah celic so se razvile metode ugotavljanja živosti celic (preglednica 2.3). Standardna metoda ugotavljanja živosti na osnovi tvorbe kolonij na trdnem gojišču je dolgotrajna. Molekularne metode ugotavljanja prisotnosti nepoškodovanih nukleinskih kislin omogočajo hitrost, občutljivost in specifičnost. Največ se uporablja RT-PCR in PCR v realnem času. Razvoj alternativnih metodsov pada z napredkom tehnologije fluorescentnih barvil, ki omogočajo raziskave metabolne aktivnosti (celične rasti, respiracijske aktivnosti, encimske aktivnosti in aktivnosti celičnih črpalk oz. sposobnosti izčrpavanja barvil), celične integritete (membranske integritete oz. prepustnosti specifičnih barvil, membranskega potenciala) ali nukleinskih kislin (prisotnosti RNA, DNA) (Kell in sod., 1998; Keer in Birch, 2003).

Preglednica 2.3: Kriteriji in metode določevanja živosti mikroorganizmov (Breeuwer in Abee, 2000)

Table 2.3: Assessment of viability (Breeuwer and Abee, 2000)

Kriteriji	Metode	Čas	Opombe
Razmnoževanje	Števna metoda na agarskih ploščah.	2 – 5 dni	Visoka občutljivost.
Celična rast / morfologija (podaljševanje celic)	Inhibicija celic z nalidiksično kislino ali drugimi antibiotiki.	6 h	Le za bakterije, občutljive na antibiotike, mikroskopska analiza podaljšanih celic.
Membranska integriteta	Izločanje barvil (npr. barvanje z metilen modrim, PI).	30 min	Žive celice z intaktno citoplazemsko membrano se ne obarvajo.
Membranski potencial (znotraj negativen)	Barvanje npr. z rodaminom ali karbocianom.	1 h	Akumulacija ali izločanje barvila - odvisno od potenciala.
Respiracijska aktivnost	Redukcija tetrazolium barvil v celicah z aktivno prenašalno verigo elektronov.	1 – 4 h	Akumulacija fluorescirajočih formazan produktov.
Encimska aktivnost	Metoda s fluorescin diacetatom v celicah z esterazno aktivnostjo.	30 min	Akumulacija fluorescina v intaktnih celicah.
Gradient pH	Merjenja znotrajceličnega pH z derivati fluorescina.	1 h	Žive celice ohranijo gradient pH.

2.3.1.1 Metode spremeljanja živosti z uporabo fluorescentnih barvil

Metode s fluorescentnimi barvili se uporabljajo za oceno živosti in aktivnosti celic v ekologiji ter živilskih in biotehničkih procesih. So hitre, občutljive in omogočajo analizo posameznih celic, če se uporabljajo v kombinaciji s pretočno citometrijo. V nasprotju s standardnimi števnimi metodami lahko določimo tudi nekultivabilne celice, kar je uporabno predvsem pri analizi težko kultivabilnih celic, stresnim pogojem izpostavljenih celic, ali celic v kompleksnih biofilmih. Število celic, določeno s fluorescentnimi metodami, je praviloma večje od števila, določenega s števno metodo na ploščah, kar je zahtevalo razvoj novih standardov. Razvilo se je tudi kombiniranje vsaj dveh fiziološko različnih barvil, kar zahteva validacijske metode pred uvedbo v rutinskih postopkih. Poleg že omenjenih standardnih barvil se za razlikovanje med živimi ter mrtvimi celicami vedno bolj uporabljajo seti, kot npr. LIVE/DEAD BacLight™. Metode barvanja s fluorescentnimi

barvili bi lahko nadomestile standarno tehniko določanja živosti, vendar potreba po dragi opremi omejuje njihovo uporabnost (Boulos in sod., 1999; Breeuwer in Abee, 2000).

Epifluorescentna mikroskopija (EFM) celic, ki so pobarvane s fluorescentnimi barvili, postaja ena od osnovnih metod štetja bakterij, a jo omejujejo subjektivnost, dolgotrajnost in omejena občutljivost. Določanje nizkih koncentracij celic ($> 10^3$ celic/mL) je težavno, saj bi bila pri tem v vidnem polju mikroskopa ena sama celica (Joux in Lebaron, 2000). Pretočna citometrija (angl. flow cytometry, FC) omogoča hitre in natančne sočasne analize večih parametrov na posameznih celicah z dobro občutljivostjo ($> 10 - 10^2$ celic/mL). Vključuje avtomatiziran mikroskop, ki omogoča hitro in objektivno merjenje fluorescentnih barvil po hitrem prehodu celic skozi cono, obsevano z laserskim žarkom (Ueckert in sod., 1995; Winson in Davey, 2000).

2.3.1.1.1 Membranska integriteta

Membransko integriteto lahko opišemo kot prepustnost membrane za koristne in netoksične snovi ter nepropustnost za strupene molekule. Membrana mikroorganizmov sodeluje pri respiratorni aktivnosti, transportu snovi v in iz celice ter predstavlja pregrado med zunanjim okoljem in celično vsebino. Ocena membranske integritete je zaradi zgradbe celične stene, ki je pri po Gramu negativnih bakterijah rodu *Campylobacter* sestavljena iz zunanje membrane, periplazemskega prostora s peptidoglikanskim slojem in notranje oz. citoplazemske membrane, težavna (Joux in Lebaron, 2000).

Analiza membranske integritete temelji na nepropustnosti fluorescentnih barvil skozi intaktno membrano živih celic, ki se tako ne obarvajo. Prisotnost barvila v celici nakazuje poškodbo celične membrane in s tem smrt celice (Joux in Lebaron, 2000). Na tržišču je mnogo fluorescentnih barvil, katerih molekulska masa je od 402 do 1355. Barvila metilen modro in kongo rdeče so za določevanje membranske integritete uporabljali že na začetku 20. stoletja (Roszak in Colwell, 1987). Na enakem principu temeljijo tudi DNA barvila, kot so propidijev jodid (PI), etidijev bromid (EtBr), PO-PRO-3 ter SYTO zelen. Najbolj uporaben je PI, ki skupaj z barvilm iz skupine SYTO omogoča sočasno opazovanje živih in mrtvih celic (Breeuwer in Abee, 2000).

Podjetje Molecular Probes (Eugene, Oregon, ZDA) je za ugotavljanje živosti celic razvilo proizvod, t.i. "LIVE/DEAD[®] BacLightTM" (L-7012, Molecular Probes). Sestavljen je iz dveh barvil, ki se med seboj razlikujeta v spektrih absorpcije in emisije svetlobe ter zmožnosti prodiranja skozi intaktno celično membrano. Manjša molekula zelenega fluorescentnega barvila SYTO 9 neovirano prehaja skozi membrano inobarva vse celice, večje rdeče fluorescentno barvilo PI obarva samo celice s poškodovano membrano. Prisotnost PI v poškodovanih celicah povzroči zmanjšanje fluorescence SYTO 9, zato celice z intaktno membrano fluorescirajo zeleno, celice s poškodovano membrano pa rdeče. Dober kontrast omogoča hitro in zanesljivo analizo živosti in morfologije celic (Alonso in sod., 2002).

2.3.1.1.2 Membranski potencial

V celicah nastane membranski potencial zaradi izrivanja vodikovih ionov med hidrolizo ATP ali prenosom elektronov med dihanjem. Notranjost celice je negativno nabita v primerjavi z zunanjostjo in ta naboj je sorazmeren količini barvila, ki ga celica sprejme. Barvila se v živih celicah aktivno akumulirajo, tako nam število svetlo obarvanih celic pove število živih celic. Nekatere bolj aktivne celice lahko barvilo črpajo tudi izven celice (Davey in sod., 1999). V mikrobiologiji sta najbolj pogosto uporabljeni pozitivno nabiti

barvili rodamin 123 in karbocianin kot npr. 3,3-dihexiloxakarbocianin jodid (DiOC₆(3)). Uporabljajo se tudi druga barvila ((DiOC2(3), DiSC3(5), DiBAC4(3)) (Breeuwer in Abée, 2000; Joux in Lebaron, 2000).

2.3.1.1.3 Respiracijska aktivnost

Kadar nas zanima respiracijska aktivnost lahko uporabimo test s tetrazolijevimi barvili. Celica z respiratorno aktivnostjo reducira ne-fluorescirajoče tetrazolijeve soli z encimi dehidrogenazami v močno fluorescirajoče formazanove produkte. Nekatere tetrazolijeve soli inhibirajo metabolizem bakterij (Federighi in sod., 1998; Breeuwer in Abée, 2000).

Veliko let so se za kvantifikacijo respiratorne aktivnosti uporabljale tetrazolijeve soli, kot sta 2,3,5-trifenil tetrazolium klorid (TTC) ter 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium klorid (INT) (Rodriguez in sod., 1992). Danes se pogosteje uporablja 5-ciano-2,3,-ditolyl tetrazolijev klorid (CTC), ki je direktni pokazatelj respiratorne aktivnosti in tako tudi oksidativnega metabolizma ter živosti. CTC je brezbarvna, membransko permeabilna snov, ki tvori po redukciji rdeče-fluorescirajoče barvilo. Fluorescenco so dokazali tudi pri nekultivabilnih celicah. Razvoj je usmerjen v nova barvila, kot je npr. natrijev-3'-[1-(fenilamino)-karbonil]-3,4-tetrazolium]-bis(metoksi-6-nitro)benzensulfonični kislinski hidrat (XTT) (Bhupathiraju in sod., 1999; Creach in sod., 2003).

2.3.1.1.4 Encimska aktivnost

Z metodo direktnega štetja živilih celic (angl. direct viable count, DVC) spremljamo aktivnost celic preko njihove rasti, a brez delitve celic. Ob dodatku kvasnega ekstrakta in nalidiksične kisline, ki inhibira DNA girazo, se v celicah odvija sinteza proteinov v odsotnosti replikacije DNA ali celične delitve. Celice postanejo večje, se podaljšajo in so zato lažje vidne in jih lažje identificiramo. Učinkovitost metode je odvisna od odziva kulture na dodano hranilo (Kogure in sod., 1979; McDougald in sod., 1998).

Barvilo fluorescin diacetat (FDA) je ne-fluorescentni prekurzor, ki ga aktivne celice z intaktno membrano sprejmejo in mu s substratno nespecifično esterazno encimsko aktivnostjo odcepijo acetate iz fluorescinske molekule ter fluorescirajo zeleno. Izguba barvila v zunanje okolje se zmanjša z uporabo derivatov fluorescina, kot je karboksi-fluorescin diacetat (cFDA ali cF), kalcein in BCECF. Ti so pri fiziološkem pH bolj negativno nabiti, kar jim otežuje izhod iz celic (Davey in sod., 1999).

2.3.1.1.5 Prisotnost nukleinskih kislin

Metoda direktnega štetja vseh celic (angl. acridine orange direct count, AODC) je zelo razširjena za študij živilih ter vseh celic, prisotnih v vzorcih. Tehnika AODC (Hobbie in sod., 1977) temelji na zeleni ali oranžni fluorescenci celic, pri čemer je vezava barvila odvisna od fiziološkega stanja celic: kot monomer se veže na DNA (zelena) in kot dimer na RNA (rdeče-oranžna barva). To omogoča ločevanje živilih celic od mrtvih, saj žive celice vsebujejo bistveno večji delež RNA, torej žive celice vidimo rdeče, mrtve pa zelene (Ramaih in sod., 2002).

2.3.1.1.6 Metode PCR za ugotavljanje živosti celic

S klasično metodo PCR, ki temelji na prisotnosti nepoškodovanih nukleinskih kislin, lahko pomnožujemo DNA živil celic in celic v stanju VBNC. DNA, ki je v mrtvi celici prisotna še nekaj časa, se lahko izognemo z obogatitveno kultivacijo pred izvedbo metode PCR (Herman, 1997). Možne so tudi kombinacije metode PCR s fluorescentimi barvili, kot npr. Liu in sod. (2006) so določali prisotnost genov *hipO* in *flaA* z metodo IMC-FPCR (angl. immunomagnetic capture-fluorescent PCR). Nogva in sod. (2003) so razvili metodo razlikovanja živil in mrtvih celic po obdelavi z etidijevim monozidom (EMA) pred izvedbo PCR v realnem času, vendar nekateri že opozarjajo na vpliv etidijevega monozida na živost celic rodu *Campylobacter* (Hein in sod., 2006). Nekateri predlagajo uporabo drugih barvil, kot je npr. propidijev monoazid (Nocker in sod., 2006).

Alternativne rešitve pri ločevanju živil in mrtvih celic ponuja uporaba določevanja prisotnosti RNA. Pri tem niso primerne vse tri skupine RNA (rRNA, tRNA, mRNA), saj sta rRNA in tRNA zelo stabilni. Razpolovna doba mRNA, ki je le nekaj sekund, je direktno sorazmerna z njeno stalno koncentracijo. Celica se je s sintezo proteinov, ki je programirana preko hitrih sprememb na mRNA, sposobna prilagoditi ustreznemu okolju njenega celičnega cikla. To pa uvršča mRNA med primerno za spremljanje živosti bakterij (Rauhut in Klug, 1999; Keer in Birch, 2003).

2.3.2 Merjenje stresnega odziva z oceno tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS)

Metode, s katerimi ocenimo in kvantificiramo tvorbo ROS, se uporabljajo pri določevanju obsega oksidativnega stresa ter njegovega vpliva na posamezne celične komponente ali celotno celico (Sigler in sod., 1999).

ROS lahko merimo:

- **direktno** z merjenjem superoksidov, H_2O_2 , OH^\bullet oz. splošne znotrajcelične oksidacije s spektrofotometričnimi metodami (npr. elektronsko spinsko resonanco, ESR) ali s fluorescentnimi barvili (npr. diklorofluoresceinom, dihidrorodaminom, lucigeninom);
- **indirektno** z merjenjem antioksidativnega obrambnega sistema oz. z merjenjem aktivnosti znotrajceličnih antioksidantnih encimov (katalaze, superoksid dismutaze), ne-encimskih sistemov (redukcija glutationa) oz. merjenjem produktov poškodb na celičnih komponentah (oksidacije DNA, peroksidacije lipidov, poškodb proteinov).

Poleg oteženega merjenja spojin *in vivo* sta pri direktnih metodah problem reaktivnost spojin in njihova težka kvantifikacija. Zato se pogosteje uporabljajo indirektne metode, predvsem spektrofotometrične (npr. spremljanje aktivnosti antioksidativnih sistemov), elektroforetske (npr. komet analiza oksidirane DNA) in kromatografske metode (npr. spremljanje peroksidacije lipidov, oksidacije proteinov, plinska kromatografija, HPLC) (Halliwell in Gutteridge 1999; Sigler in sod., 1999).

2.3.2.1 Ocena znotrajcelične oksidacije

Metoda merjenja fluorescentne oblike zunajceličnega 2,7-diklorofluorescein-9-laktona (DCFL) je referenčna metoda merjenja oksidativnih procesov znotraj celice (Jakubowski in Bartosz, 1997). Fluorescentne komponente diklorofluoresceina reagirajo z oksidanti v celici in prikazujejo celoten oksidativni status celice. Diklorofluorescein se uporablja

predvsem pri raziskavah oksidativnega stresa na nivoju celice preko spremljanja tvorbe ROS s citometričnimi ali spektrofotometričnimi metodami za določanje vodikovega peroksida, hidroperoksidov in dušikovih oksidov (Hempel in sod., 1999).

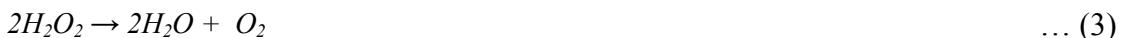
Spojino dihidro-2,7-diklorofluorescein (H_2DCF) dodamo suspenziji celic kot ne-fluorescirajoči diacetatni ester dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetat (H_2DCFDA). Po prehodu membrane s pasivnim transportom se deacetilira z ne-specifičnimi esterazami do H_2DCF , ki se zadržuje v celici. Ob prisotnosti prostih radikalov se oksidira v fluorescirajočo obliko 2,7-diklorofluorescein-9-lakton (DCFL), ki je membransko permeabilna. Intenziteta fluorescence DCFL je po transportu iz celice v supernatant osnova za določitev znotrajcelične koncentracije oksidirane oblike diklorofluoresceina ter s tem merilo znotrajceličnih oksidacijskih procesov (Keller in sod., 2004).

Oksidanti, odgovorni za oksidacijo H_2DCF v celicah, so najverjetnejše peroksilni radikal (RO_2^\bullet), aloksilni radikal (RO^\bullet), hidroksilni radikal (OH^\bullet), hipoklorna kislina ($HOCl$) ter peroksinitrit ($ONOO^-$), ne sodelujeta pa peroksidni radikal (O_2^-) in vodikov peroksid (H_2O_2) (Halliwell in Gutteridge 1999). Oksidirana oblika barvila (DCFL) pa ni vedno v sorazmerju z ROS, saj je lahko oksidacija posledica katalize Fe-proteinov ali reakcije radikalov s celičnimi antioksidanti. Nepravilna interpretacija znotrajcelične oksidacije zaradi manjše koncentracije ROS je lahko posledica tudi manjše esterazne aktivnosti ali oteženega prehoda komponent preko membrane (Myhre in sod., 2003; Wrona in sod., 2005). Keller in sod. (2004) vseeno ocenjujejo, da je H_2DCF dober indikator ocene znotrajceličnih ROS.

2.3.2.2 Merjenje encimske aktivnosti

2.3.2.2.1 Katalaza

Za določanje aktivnosti katalaze se danes uporablajo enostavne, hitre, kvantitativne spektrofotometrične metode. Metode temeljijo na merjenju reakcije razgradnje vodikovega peroksida, ki jo katalizira katalaza (Beers in Sizer, 1951).



Ena izmed pogosto uporabljenih metod za določanje aktivnosti katalaze je metoda Aebi (1984), ki temelji na merjenju razgradnje vodikovega peroksida pri temperaturi 20 °C in vrednosti pH 7,0.

2.3.2.2.2 Superoksid dismutaza

Za določanje aktivnosti encima superoksid dismutaze je danes poznanih več različnih metod. Ena izmed njih je tudi modificirana metoda Beauchamp in Fridovich (1971), kot sta jo modificirala Ravindranath in Fridovich (1975) in temelji na inhibiciji redukcije spojine NBT s superoksid dismutazo ob prisotnosti O_2^\bullet .



2.3.3 Merjenje stresnega odziva na nivoju mRNA

Hitre metode pomnoževanja nukleinskih kislin uspešno nadomeščajo klasične metode, ki so bolj kot na genotipizaciji temeljile na fenotipizaciji mikroorganizmov. Za spremljanje stresnega odziva celic na nivoju funkcijalne genomike so potrebne zelo občutljive metode izražanja genov ter kvantifikacije mRNA, od katerih se najpogosteje uporabljajo:

hibridizacija po Northernu, *in situ* hibridizacija, 'RNase protection' test ter metode na osnovi obratnega prepisa in PCR (RT-PCR, PCR v realnem času). V zadnjem času pridobiva na pomenu analiza s pomočjo mikromrež cDNA, s katero lahko spremljamo izražanje več tisoč genov (do 20 000) v zelo kratem času, vendar pa njeno rutinsko uporabo zavirajo poleg velike variabilnosti in nezadostne občutljivosti tudi visoka cena (Bustin, 2000; Giulietti in sod., 2001).

2.3.3.1 RT-PCR

Pri metodi obratnega prepisa in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je potrebno pred izvajanjem PCR izolirano RNA prepisati v komplementarno, enoverižno cDNA, ki nato služi kot izhodiščna DNA. Prednost RT-PCR je boljša občutljivost, fleksibilnost, hitrost ter enostavnost izvedbe. Omogoča merjenje izražanja mRNA, razlikovanje med sorodnimi mRNA, analizo strukture RNA ali pripravo knjižnic cDNA (Reverse Transcriptase PCR, 1995).

Poleg uporabe dobre metode izolacije RNA, ki naj bo hitra ter občutljiva, je pred obratnim prepisom nujno odstranjevanje morebitnih ostankov genomske DNA s tretiranjem RNA z DNazo. Slednjo je potrebno pred fazo obratnega prepisa odstraniti. Po izolaciji celotne RNA ali le izbranega zaporedja mRNA s poli (A)⁺ koncem lahko izvedemo sintezo cDNA z uporabo treh različnih vrst začetnih oligonukleotidov:

- z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. random hexamers), ki z nespecifičnim prileganjem preko celotnega transkripta prepišejo celotno RNA;
- z oligo dT nukleotidi, ki z bolj specifičnim vezanjem na poli(A) koncem mRNA prepišejo le mRNA;
- z gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. gene specific primer, GSP), ki prepišejo le tarčno zaporedje izbranega gena.

Faza sinteze cDNA poteka z RNA odvisno polimerazo DNA oz. t.i. reverzno transkriptazo, ki ima temperaturni optimum med 37 in 65 °C. Reakciji velikokrat dodamo tudi inhibitorje RNaz ter s tem povečamo dolžino in količino novo nastale cDNA (Reverse Transcriptase PCR, 1995; Bustin, 2002).

Sintezi cDNA sledi verižna reakcija s polimerazo (PCR), s katero lahko v kratkem času pomnožimo določen odsek molekule DNA v velikem številu identičnih kopij. Osnovni princip metode PCR zajema poznavanje nukleotidnih zaporedij, kar omogoča izbiro ustreznih specifičnih začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje le teh in sintezo komplementarnih sekundarnih verig DNA s polimerazo DNA v ponavljajočih se temperaturno-časovnih ciklih. Po končani reakciji PCR dokazujemo pomnožke na različne načine, od katerih je najpogostejsa metoda ločevanja DNA po velikosti s pomočjo elektroforeze v agaroznem gelu (Erlich in Rosen Bronson, 1993; Lantz in sod., 1994). Časovno dolgotrajne dodatne analize na produktih PCR nimajo zadostne natančnosti (>2 log stopnji), občutljivosti ter avtomatiziranosti (Bustin, 2000).

2.3.3.2 PCR v realnem času

Metoda PCR v realnem času omogoča kvantifikacijo redkih prepisov ter majhnih sprememb v izražanju genov. Podobno kot pri metodi RT-PCR, izolirano mRNA prepišemo v cDNA. Bistvena razlika je v določitvi produkta reakcije PCR, ki ga pri klasičnem PCR ali RT-PCR določimo in ovrednotimo z dodatnimi tehnikami v končni fazi pomnoževanja. Pri metodi PCR v realnem času pa nastajanje produkta PCR spremljamo v eksponentni fazi, torej ko je intenziteta fluorescence direktno sorazmerna s količino

izhodišnega materiala, kar je bistveno za natančno kvantifikacijo (Ginzinger, 2002). Reakcije so karakterizirane s točko v ciklu, v kateri je pomnoževanje tarčnega zaporedja prvič detektirano, imenovano vrednost Ct. Metoda omogoča natančno kvantifikacijo DNA ali RNA in ne zahteva dodatne manipulacije po reakciji PCR. Tako ostane količina končnega produkta maksimalna, prenos morebitne kontaminacije pa minimalen. Kinetiko metode je mogoče standardizirati in tako lažje primerjati rezultate različnih laboratorijskih (Bustin 2000; Mackay, 2004).

'On line' sledenje produktov PCR v realnem času nam omogočajo barvila, ki se vežejo na dvoverižno DNA, s fluorescentnimi barvili označene sonde (hibridizacijske in hidrolizacijske sonde) ali začetni oligonukleotidi. Količina svetlobe, ki jo odda barvilo, je v sorazmerju s količino nastalih produktov PCR. Z merjenjem fluorescence v vsakem ciklu pomnoževanja posebej nadzorujemo proces pomnoževanja. Izbira posameznega načina sledenja produktov PCR je odvisna od karakteristik eksperimenta. Z uporabo specifičnih sond se izognemo preverjanju rezultatov po končani reakciji PCR, vendar so zaradi visoke cene neprimerne pri kvantifikaciji večjega števila različnih sekvenc (Wong in Medrano, 2005).

Prednosti uporabe PCR v realnem času za merjenje izražanja genov so naslednje:

- relativno enostavna izvedba;
- občutljivost metode, saj zadostuje že majhna količina izhodišnega materiala (kot npr. ena kopija specifičnega prepisa), ki je lahko tudi 1000x manjša kot pri klasičnih tehnikah pomnoževanja;
- hitrost (30 min do 2 h), natančnost in točnost zbiranja signala fluorescence med posameznimi cikli reakcije;
- zanesljivi in ponovljivi rezultati (ob uporabi ustreznih kontrol in standardov);
- avtomatski izpis podatkov, hitrost pridobivanja rezultatov;
- manjša možnost kontaminacije;
- možnost kvantifikacije (Pfaffl, 2001; Mackay, 2004).

Slabosti oz. pomankljivosti uporabe PCR v realnem času za merjenje izražanja genov so naslednje:

- slabosti pri rokovovanju z RNA zaradi njene nestabilnosti ter večji možnosti kontaminacije z DNA;
- nujna izognitev pomnoževanju genomske DNA, variabilnosti med potekom analize ter normalizacije glede na hišni gen;
- 'odprt' spremljanje signala fluorescence v sicer zaprtem oz. homogenem sistemu;
- nezdružljivost nekaterih eksperimentov ter načinov sledenja produktov PCR,
- omejena izvedba hkratnih reakcij PCR (multipli PCR);
- visoka začetna cena nabave aparture in reagentov;
- zahtevnejša pravila normalizacije ter interpretacije podatkov (Giulietti in sod., 2001; Mackay, 2004).

2.3.3.3 Sledenje produktov PCR preko vezave barvil na DNA

Pri spremeljanju izražanja različnih genov je upravičena izbira vezavnega barvila (npr. EtBr, YO-PRO-1, Amplifluor, SYBR Green I), ki se veže na dvoverižno DNA, pri čemer sorazmerno z naraščanjem količine podvojenih tarčnih produktov PCR merimo naraščanje oddane fluorescence vezanega barvila. Z uporabo fluorescentnih barvil se izognemo nakupu dragih sond, vendar pa odpade možnost multiplega PCR. Ob prisotnosti denaturirane enoverižne DNA oddaja nevezano fluorescentno barvilo šibek fluorescentni signal (imenovan signal ozadja), ki se med podaljševanjem ter vezavo barvila na novo

nastalo dvoverižno DNA poveča. Fluorescenco med pomnoževanjem zato detektiramo po končanem podaljševanju pomnožka v vsakem ciklu PCR oz. pred denaturacijo. Ob denaturaciji se barvilo sprosti in signal fluorescence pade. Tehnika je zelo prilagodljiva, saj lahko eno fluorescentno barvilo uporabimo za več preiskovanih genov (Rasmussen in sod., 1998). Problem sekvenčno nespecifične vezave barvila na DNA so lažno pozitivni rezultati, ko zaznamo tudi nespecifične produkte pomnoževanja in medsebojno spajanje začetnih oligonukleotidov. To slabost lahko uravnotežimo z dobro optimizacijo metode in z uporabo analize talilne krivulje, ki po poteku PCR v realnem času omogoči ločevanje specifičnih od nespecifičnih produktov PCR. Na intenzitetu signala vpliva tudi velikost pomnoževanega zaporedja, saj daljši pomnožek proizvede več signala fluorescence. V primeru različnih učinkovitosti reakcij PCR bo kvantifikacija nepravilna. Natančna analiza zahteva detekcijo le specifičnih pomnožkov, kar potrdimo s prisotnostjo le enega vrha na disociacijski krivulji (Real-Time PCR Vs..., 2003).

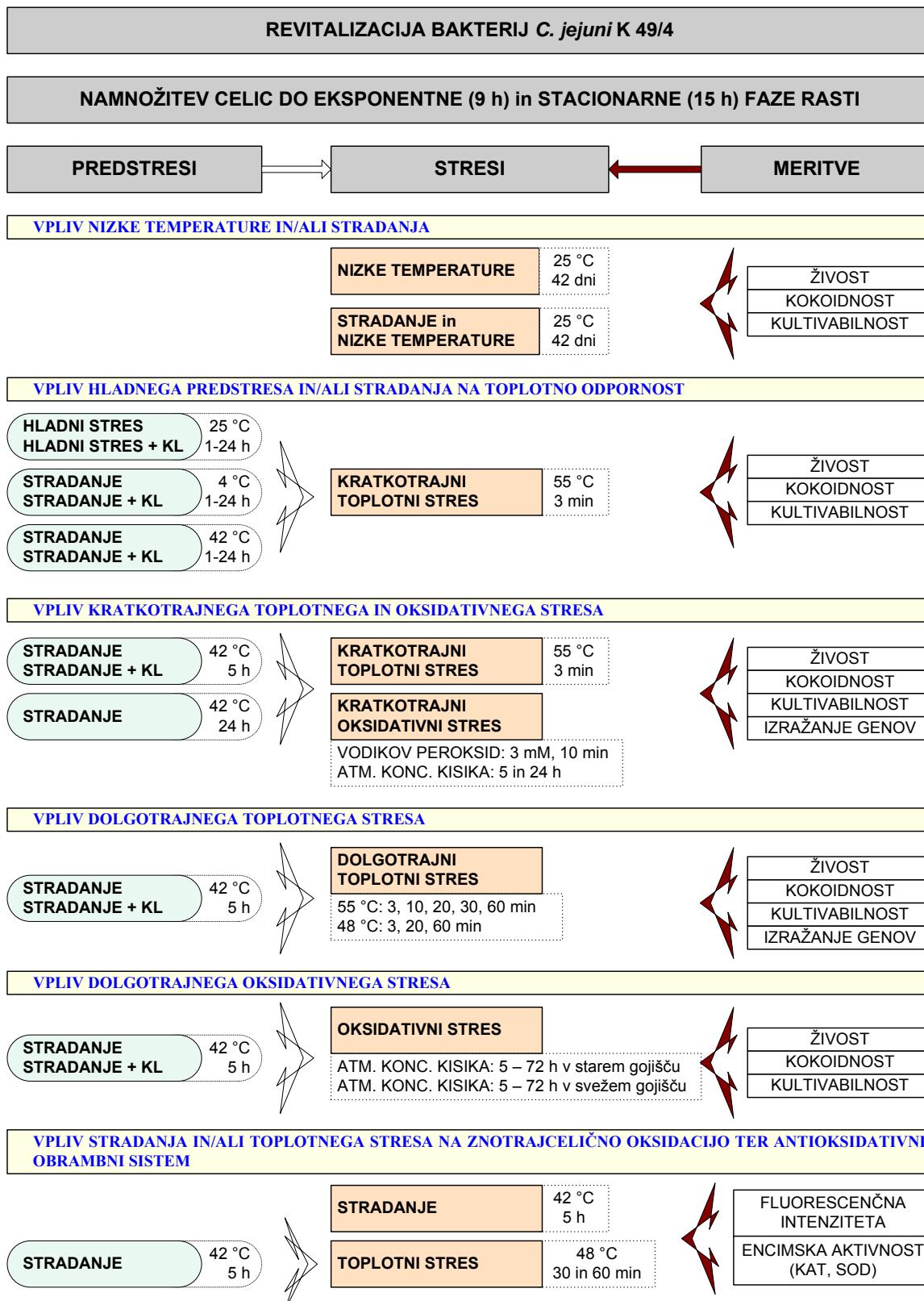
Najenostavnejša nespecifična tehnika določanja novo sintetiziranega produkta PCR je vezava barvila SYBR green I, ki omogoča ločevanje med eno in dvoverižno DNA. Pri uporabi omenjenega barvila program samodejno normalizira rezultate s podatki pasivnega internega referenčnega barvila ROX ter s tem zmanjša razlike med vzorci (Vandesompele in sod., 2002).

2.3.3.4 Geni, preučevani z metodama RT – PCR in PCR v realnem času

Mehanizmi prilagajanja na spremembe hranil ali stresne pogoje med proizvodnjo živil vključujejo vrsto genetskih preklopov, ki posledično regulirajo izražanje genov in nadzorujejo spremembe metabolizma celice. Stresni odziv kampilobakterjev na molekularnem nivoju je še precej neraziskan (Stintzi, 2003).

Preživetje kampilobakterjev je pod pogoji stradanja odvisno od 'novo nastalih' proteinov, od katerih imajo najpomembnejšo vlogo skupina proteinov Pex (DnaK, GroEL, HtpG) in proteini Cst. Slednji so inducirani ob visoki asimilaciji hranil, proteini skupine Pex pa ob pogojih topotnega ter oksidativnega stresa in so tako vključeni v povečano topotno ter oksidativno odpornost pri stradanju (Jenkins in sod., 1988). Na izpostavitev topotnemu stresu se kampilobakterji odzovejo s sintezo proteinov topotnega stresa (Lindquist, 1986; Lindquist in Craig, 1988). Le-ti so šaperoni (npr. GroEL, DnaK) oz. od ATP odvisne proteaze, ki sodelujejo pri zvijjanju, sestavljanju oz. razgradnji poškodovanih proteinov (Konkel in sod., 1998). V obrambnem mehanizmu kampilobaterjev pod pogoji oksidativnega stresa sta poleg encima superoksid dismutaze (protein SodB) pomembna še alkalna hidroperoksidna reduktaza (AhpC) in katalaza (KatA) (Purdy in sod., 1999; Baillon in sod., 1999; Day in sod., 2000). Pri bakterijah *C. jejuni* je pri izražanju flagelina najpomembnejši gen *flaA*, z vlogo pri podaljševanju bička, vendar je tudi *flaB* nujno potreben za normalno gibljivost celic (Ketley, 1997). Metabolizem hišnih genov je dinamičen sistem, sposoben prilagoditve na spremembe rastnih pogojev (Vandecasteele in sod., 2001). Hišni gen 16S rRNA je del ribosomskega kompleksa, katerega izražanje je stabilno ne glede na spremembe okolja. Prav tako so dokazali, da prepisovanje sigma dejavnika *rpoD* z vlogo v osnovnem delovanju celice pri procesih prepisa in prevoda genov ni odvisno od faze rasti ali rastnih pogojev (Rijpens in sod., 2002; Watson in Clements, 1998).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 3.1: Shematični prikaz opravljenih eksperimentov (KL – kloramfenikol; ATM. KONC.- atmosferska koncentracija).

Figure 3.1: Flow chart of the experiment (KL –chloramfenicol; ATM. KONC.- atmosphere concentration).

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Kot glavni delovni mikroorganizem smo uporabili sev *C. jejuni* K 49/4, izoliran iz piščančjega mesa. Pri metodi PCR v realnem času smo uporabili še 9 drugih sevov bakterij vrste *C. jejuni*. Vsi sevi (preglednica 3.1) so bili identificirani s klasičnimi in molekulskimi postopki in so trajno shranjeni v zbirki Katedre za živilsko mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana (Zorman in Smole Možina, 2002).

Preglednica 3.1: Bakterijski sevi *C. jejuni*, uporabljeni pri eksperimentalnem delu

Table 3.1: Bacterial *C. jejuni* isolates, used in the experiments

ZAPOREDNA ŠTEVILKA SEVA	SEV	VIR
1	<i>C. jejuni</i> K 49/4	piščanje meso, 2002
2	<i>C. jejuni</i> K43/4	piščanje meso, 2002
3	<i>C. jejuni</i> K37/4	piščanje meso, 2002
4	<i>C. jejuni</i> 32/F	bris piščanca, 2001
5	<i>C. jejuni</i> 132/P	piščanje meso, 2001
6	<i>C. jejuni</i> 03/260	humani klinični sev iz fecesa, 2001
7	<i>C. jejuni</i> 75	humani klinični sev iz fecesa, 2002
8	<i>C. jejuni</i> 406	humani klinični sev iz fecesa, 2002
9	<i>C. jejuni</i> 245	humani klinični sev iz fecesa, 2002
10	<i>C. jejuni</i> 723	humani klinični sev iz fecesa, 2002

3.1.2 Gojišča za izolacijo, namnoževanje in shranjevanje bakterij *C. jejuni*

Preglednica 3.2: Trdna in tekoča gojišča, uporabljena pri eksperimentalnem delu

Table 3.2: Solid and liquid growth media, used in the experiments

SESTAVA	PRIPRAVA
Tekoče gojišče Preston	
Osnovni medij: Nutrient Broth No.2, CM67 (Oxoid)	
Sterilna defibrinirana konjska kri - Horse laysed blood SR048C (Oxoid)	
Dodatek za rast - <i>Campylobacter</i> Growth Supplement SR232E (Oxoid)	
Dodatek za selektivnost - Preston <i>Campylobacter</i> Selective Supplement SR204 (Oxoid)	
dH ₂ O	12,5 g osnovnega medija raztopimo v 500 mL dH ₂ O. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Ko se ohladi na 45 °C, aseptično dodamo 25 mL defibrinirane konjske krvi (Oxoid, SR048C), raztopino dodatka za rast ter selektivnost. Premešamo in shranimo pri 4 °C.
Tekoče gojišče BHI	
Osnovni medij: Brain Heart Infusion CM225 (Oxoid)	39 g osnovnega medija raztopimo v 1 L dH ₂ O. Razdelimo v epruvete po 4 ml. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Shranimo pri 4 °C.
dH ₂ O	
Trdno gojišče Columbia krvni agar	
Osnovni medij: Columbia blood agar - Columbia Agar Base CM331 (Oxoid)	
Sterilna defibrinirana konjska kri - Horse laysed blood SR048C (Oxoid)	
Dodatek za rast - <i>Campylobacter</i> Growth Supplement SR232E (Oxoid)	
Dodatek za selektivnost - Columbia Selective Supplement SR069 (Oxoid)	
dH ₂ O	19,5 g osnovnega medija raztopimo v 500 mL dH ₂ O. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Ko se ohladi na 45 °C, aseptično dodamo 25 mL defibrinirane konjske krvi (Oxoid, SR048C), raztopini dodatka za rast ter selektivnost. Premešamo in vlijemo v sterilne petrijevke. Shranimo pri 4 °C.
Trdno gojišče Mueller Hinton	
Osnovni medij: Mueller Hinton 2 Medium (BioMerieux, 51075)	
Sterilna defibrinirana konjska kri SR048C (Oxoid)	
dH ₂ O	19 g osnovnega medija raztopimo v 500 mL dH ₂ O. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Ko se ohladi na 45 °C, dodamo 25 mL defibrinirane konjske krvi (Oxoid, SR048C). Premešamo in vlijemo v sterilne petrijevke. Shranimo pri 4 °C.
Trdno gojišče Karmali	
Osnovni medij: <i>Campylobacter</i> blood free medium base CM739 (Oxoid)	
Dodatek za selektivnost - <i>Campylobacter</i> Selective Supplement SR0167E (Oxoid)	
dH ₂ O	23,35 g osnovnega medija raztopimo v 500 mL dH ₂ O. Avtoklaviramo (115 °C, 15 min). Ko se ohladi na 45 °C dodamo raztopino dodatka za selektivnost. Premešamo in vlijemo v sterilne petrijevke. Shranimo pri 4 °C.
Trdno gojišče CCDA	
Osnovni medij: <i>Campylobacter</i> Blood Free Selective Agar Base (CCDA, angl. agar charcoal cefoperazone desoxycholate) CM 739 (Oxoid)	
Dodatek za selektivnost - CCDA Selective Supplement SR155E (Oxoid)	
dH ₂ O	22,75 g osnovnega medija raztopimo v 500 mL dH ₂ O. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Ko se ohladi na 45 °C, dodamo raztopino dodatka za selektivnost. Premešamo in vlijemo v sterilne petrijevke. Shranimo pri 4 °C.

3.1.3 Reagenti, raztopine

3.1.3.1 Reagenti in raztopine za izvedbe stresov

Preglednica 3.3: Reagenti, pufri in raztopine za izvedbo stresov

Table 3.3: Chemicals, buffers and solutions used for stress conditions

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Založna raztopina fiziološke raztopine KH_2PO_4		
KH_2PO_4 (Kemika)		
dH_2O		
vodna raztopina NaOH (Kemika)	3 M	3,40 g KH_2PO_4 raztopimo v 50 mL dH_2O , uravnamo pH na 7,2 s 3 M NaOH in dopolnimo z dH_2O do 100 mL. Shranimo pri 4 °C.
Fiziološka raztopina		
Založna raztopina KH_2PO_4		1, 25 mL založne raztopine KH_2PO_4 raztopimo v 1 L dH_2O in premešamo.
dH_2O		Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Shranimo pri 4 °C.
Izhodna raztopina kloramfenikola		
Kloramfenikol SR78 (Oxoid)	50 µg / mL	0,005 g kloramfenikola raztopimo v 100 mL dd H_2O . Steriliziramo s filtracijo skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm. Pripravimo pred uporabo.
ddH_2O		
Kloramfenikol		
Založna raztopina kloramfenikola (50 µg / mL)	5 µg / mL	K 1 mL vzorca dodamo 0,1 mL založne raztopine kloramfenikola (50 µg / mL).
ddH_2O		
Založna raztopina H_2O_2		
Vodikove peroksid - H_2O_2 (30 %) (w/v) (Sigma, H1009)	100 mM	Za pripravo 20 mL raztopine H_2O_2 odpipetramo 228 µL 30 % in 19,772 dd H_2O . Steriliziramo s filtracijo skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm. Pripravimo pred uporabo.
ddH_2O		
H_2O_2		
Založna raztopina H_2O_2 (100 mM)	3 mM	K 10 mL vzorca dodamo 0,3 mL založne raztopine H_2O_2 (100 mM).
ddH_2O		

3.1.3.2 Reagenti in raztopine za ugotavljanje živosti bakterij

Preglednica 3.4: Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanje živosti celic

Table 3.4: Chemicals, buffers and solutions used for cell viability testing

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Kit Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L-7012)		
SYTO 9		Komercialno pripravljeno.
Propidijev jodid - PI		
Fiziološka raztopina		
Založna raztopina KH ₂ PO ₄ (preglednica 3.4) dH ₂ O		1, 25 mL založne raztopine KH ₂ PO ₄ raztopimo v 1 L dH ₂ O in premešamo. Filtriramo skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm ter avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Shranimo pri 4 °C.
Raztopina AO		
Barvilo akridin oranž - AO (Fluka AG.)	0,01 %	K 10 mL vzorca dodamo 0,1 mL 1 % AO.

3.1.3.3 Reagenti in raztopine za ugotavljanje morfologije s fazno kontrastnim in elektronskim mikroskopom

Preglednica 3.5: Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanje morfologije celic

Table 3.5: Chemicals, buffers and solutions used for cell morphology testing

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Barvilo karbol fuksin (Sigma)		
		Komercialno pripravljeno.
Barvila za barvanje po Gramu		
Barvilo kristal violet (Sigma)		
Barvilo lugol (Sigma)		
Barvilo alkohol (Sigma)		
Barvilo safranin (Sigma)		Vsa barvila so komercialno pripravljena.
Fosforvolframova kislina		
Fosfor volframova kislina (Merck)	3 % (w/v)	
Formvar (Agar Scientific LTD)		

3.1.3.4 Reagenti in raztopine za oceno znotrajcelične oksidacije

Preglednica 3.6: Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanje znotrajcelične oksidacije

Table 3.6: Chemicals, buffers and solutions used for intracellular oxidation

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Vodna raztopina KH₂PO₄		
KH ₂ PO ₄ (Kemika) ddH ₂ O	50 mM	6,8045 g KH ₂ PO ₄ raztopimo v 1 L ddH ₂ O.
Vodna raztopina K₂HPO₄		
K ₂ HPO ₄ (Kemika) ddH ₂ O	50 mM	8,709 g K ₂ HPO ₄ raztopimo v 1 L ddH ₂ O.
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,8		
Vodna raztopina KH ₂ PO ₄ Vodna raztopina K ₂ HPO ₄	50 mM 50 mM	Količini vodne raztopine K ₂ HPO ₄ (400-500 mL) uravnamo pH na 7,8 z dodajanjem vodne raztopine KH ₂ PO ₄ . Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Shranimo pri 4 °C.
Raztopina dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata		
Dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata (97 %) (Sigma)	1 mM	0,0048 g dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata raztopimo v 10 mL 96 % etanola. Pripravimo pred uporabo.
Absolutni etanol– EtOH (100% oz. 96%) (Merck)		

3.1.3.5 Reagenti in raztopine za pripravo celičnega ekstrakta za določanje encimske aktivnosti

Preglednica 3.7: Reagenti, pufri in raztopine za ugotavljanju encimske aktivnosti

Table 3.7: Chemicals, buffers and solutions used for enzymatic activity

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0		
Vodna raztopina KH ₂ PO ₄ (preglednica 3.7) Vodna raztopina K ₂ HPO ₄ (preglednica 3.7)	50 mM 50 mM	Z mešanjem obeh raztopin v ustreznem razmerju uravnamo pH na 7,0. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min). Shranimo pri 4 °C.
Inhibitorji proteaz		
Tableta inhibitorjev proteaz - Complete Mini Protease inhibitor (Roche, 183615300)		Komercialno pripravljen.
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0 z inhibitorji proteaz		
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0 Tableta inhibitorjev proteaz - Complete Mini Protease inhibitor (Roche, 183615300)		1 tableto inhibitorjev proteaz raztopimo v 10 mL fosfatnega pufra pH 7,0. Pripravimo pred uporabo.
Steklene kroglice		
Steklene kroglice, neoprane, premer 425 do 600 µm (Sigma) Koncentrirana HCl (Kemika) ddH ₂ O		Neoprane steklene kroglice za 4 ure namočimo v HCl. Temeljito speremo z ddH ₂ O in sušimo vsaj 4 ure pri 230 °C. Shranimo pri sobni temperaturi.

3.1.3.6 Reagenti in raztopine za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

Preglednica 3.8: Reagenti, pufri in raztopine za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

Table 3.8: Chemicals, buffers and solutions used for determining protein concentration in cell extract

SESTAVA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Bradfordov reagent		
Bradfordov reagenta (koncentrat) (Biorad) ddH ₂ O	Razredčen 5x	K 20 mL Bradfordovega reagenta dodamo 80 mL ddH ₂ O. Shranimo pri 4 °C.
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0 z inhibitorji proteaz (Priprava opisana v preglednici 3.8)		

3.1.3.7 Določanje aktivnosti antioksidativnih obrambnih encimov v celičnem ekstraktu

Preglednica 3.9: Reagenti, pufri in raztopine za določanje aktivnosti antioksidativnih obrambnih encimov v celičnem ekstraktu

Table 3.9: Chemicals, buffers and solutions used for determining activity of antioxidant enzymes in cell extract

SESTAVA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0 (50 mM) (Priprava opisana v preglednici 3.8)		
H₂O₂ (30 mM)		
H ₂ O ₂ (30 %) (Merck)	30 mM	0,34 mL 30 % H ₂ O ₂ dopolnimo do 100 mL s fosfatnim pufrom pH 7,0. Shranimo v temnem pri 4 °C.
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,0 (50 mM) (preglednica 3.8)		
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,8 (50 mM) (Priprava opisana v preglednici 3.7)		
Raztopina EDTA		
EDTA (etilen-diamin-tetraocetna kislina dinatrijeva sol-dihidrat) (Kemika)	1 mM	0,18612 g EDTA raztopimo v 50 mL kalijevega fosfatega pufera pH 7,8. Shranimo pri 4 °C.
Kalijev fosfatni pufer, pH 7,8 (50 mM) (preglednica 3.7)		
Raztopina metionina		
Metionin (Sigma) ddH ₂ O	0,1 M	0,746 g metionina raztopimo v 50 mL sterilne ddH ₂ O. Shranimo pri 4 °C.
Raztopina NBT		
NBT (nitro modro tetrazolium) (Sigma) ddH ₂ O	1 mM	0,4088 g NBT raztopimo v 50 mL sterilne ddH ₂ O. Shranimo v temnem pri 4 °C.
Raztopina riboflavina		
Riboflavin (Sigma) ddH ₂ O	0,16 mM	0,30112 g riboflavina raztopimo v 50 mL sterilne ddH ₂ O. Shranimo v temnem pri 4 °C.

3.1.3.8 Reagenti in raztopine za izolacijo DNA

Preglednica 3.10: Reagenti, pufri in raztopine za izolacijo DNA

Table 3.10: Chemicals, buffers and solutions used for DNA isolation

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Pufer SSC 1x		
8,766 g/l natrijev klorid - NaCl (Promega, H5271)	0,15 M	Sestavine raztopimo v ddH ₂ O ter dopolnimo do 1 L. Avtoklaviramo (121 °C, 15 min).
5,3574 g natrijevega citrata ddH ₂ O	0,015M	
Založna raztopina za pripravo raztopine lizocima		
Natrijev fostat - NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,01 M	1,56 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O raztopimo v raztopini saharoze (pH 7,0) in dopolnimo do 1L.
0,20 g saharoze (Sigma, S 0389)	20 % (w/v)	
Raztopina lizocima		
Lizocim (Sigma, L 7651)	4 mg/mL	Pred uporabo raztopimo 4 mg lizocim / mL založne raztopine. Ostanke zavrzemo.
Predpripravljena založna raztopina		
Pufer TE 1x (pufer za lizo)		
0,6057 g Tris baza (Promega, H 5135)	0,05 M	Sestavine raztopimo v 90 mL ddH ₂ O, uravnamo pH na 8,0 z 1 M HCl. Dopolnimo do 100 mL.
0,7445 g Na ₂ EDTA, (Sigma, E 5134)	0,02 M	Avtoklaviramo (121 °C, 15 min).
ddH ₂ O		
Raztopina sarkozila		
N-lauril sarkozil	5 % (w/v)	N-lauril sarkozil raztopimo v pufru TE.
Pufer TE		
NaOAc		
NaOAc	3 M	24,61 g NaOAc raztopimo v ddH ₂ O ter dopolnimo do 10 mL.
ddH ₂ O		
Proteinaza K		
proteinaze K (Sigma, P 2308)	2,6 mg/mL	Raztopimo 2,6 mg proteinaze K / mL pufra TE. Razdelimo v mikrocentrifugirke po 1 mL. Shranimo pri -20°C.
Pufer TE		
Absolutni EtOH		
Absolutni etanol – EtOH (100% oz. 96%) (Merck)		Shranimo pri sobni temperaturi.
EtOH 80 %		
Etanol – EtOH (100 %) (Merck)	80 %	Asolutni etanol zmešamo z ddH ₂ O v razmerju 8:2. Shranimo pri -20°C.
ddH ₂ O		
Fenol (Kemika)		
Kloroform (Sigma. C2432)		

3.1.3.9 Ugotavljanje izražanja genov z metodo RT – PCR in PCR v realnem času

3.1.3.9.1 Reagenti in raztopine za izolacijo RNA

Preglednica 3.11: Reagenti, pufri in raztopine za izolacijo RNA

Table 3.11: Chemicals, buffers and solutions used for RNA isolation

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Raztopina SDS		
natrijev dodecil sulfat – SDS (10 %) (Promega, V6511)	0,5 %	10 mL SDS dodamo v 200 mL ddH ₂ O DEPC in premešamo. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O DEPC		
ddH₂O DEPC , voda obdelana z DEPC, brez RNaz – za čiščenje		
Dietil pirokarbonat – DEPC (Sigma, D5758)	0,1 %	0,9 mL DEPC dodamo v 900 mL ddH ₂ O, močno pretresemo, inkubiramo najmanj 12 ur pri 37 °C in avtoklaviramo. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O		
Voda brez nukleaz oz. RNaz , RNase free water (Qiagen GmbH.....) – za izolacijo		
NaOCl		
Natrijev hipoklorit – NaOCl (13 % aktivnega klora) (Kemika)	8 %	NaOCl dodamo v ddH ₂ O, premešamo in shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O		
RNA protect		
RNA protect Bacteria Reagent (Qiagen)		Komercialno pripravljeno.
Založna raztopina kloramfenikola		
Kloramfenikol (Sigma, 857440)	0,01 g / mL	0,1 g kloramfenikol raztopimo v 10 mL EtOH. Steriliziramo s filtracijo skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm. Shranimo pri -20°C.
EtOH (100 %)		
Kloramfenikol		
Založna raztopina kloramfenikola	100 µg/mL	K 100 µL založne raztopine kloramfenikola dodamo 9,9 mL ddH ₂ O DEPC. Razdelimo v mikrocentrifugirke po 1 mL. Shranimo pri -20°C.
9,9 mL ddH ₂ O DEPC		
Pufer TE 10x		
1,2114 g Tris HCl (Invitrogen, 15504-020)	0,1 M	Sestavine raztopimo v 90 mL ddH ₂ O
0,3722 g Na ₂ EDTA, (Merck, 8421)	0,01 M	DEPC, uravnamo pH na 8,0 z 1 M HCl (za RNA). Dopolnimo do 100 mL. Steriliziramo s filtracijo skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm. Shranimo pri 4°C.
ddH ₂ O DEPC		
Pufer TE 1x (pufer za lizo)		
Pufer TE 10x	1x	K 10 mL pufra TE 10x dodamo 90 mL ddH ₂ O DEPC. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O DEPC		
Raztopina lizocima		
Lizocim (Roche Molecular Biochemicals, 1243004)	20 mg/mL	0,05 g lizocima raztopimo v 25 mL pufra TE 1x. Steriliziramo s filtracijo

Pufer TE 1x		skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm. Razdelimo v mikrocentrifugirke po 1 mL. Shranimo pri -20°C.
RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen GmbH, 74104)		
Pufer za lizo RLT - Lysis buffer		Komercialno pripravljeni.
Pufer za izpiranje RW1 - Wash buffer		Proizvajalec ni podal sestave pufrov.
Pufer za izpiranje RPE - Wash buffer		
β - merkaptoetanol		
β - merkaptoetanol (98%) (Sigma-Aldrich, 062K0115)	10 µL / mL	Pred uporabo pripravimo 10 µL β-merkaptoetanola / 1 mL pufra RLT.
Pufer za lizo RLT - Lysis buffer (iz kita)		
Absolutni EtOH – za delo z RNA		
Absolutni etanol– EtOH (100% oz. 96%) (Merck)		Shranimo pri sobni temperaturi.

3.1.3.9.2 Reagenti in raztopine za preverjanje prisotnosti RNA na gelu

Preglednica 3.12: Reagenti, pufri in raztopine za določanje prisotnosti RNA na gelu

Table 3.12: Chemicals, buffers and solutions used for RNA determination on gel

REAGENT	PRIPRAVA
Pufer TAE 10x	
Pufer TAE 0,5x	
Agarozni gel	
Nanašalni puffer 10x	
Raztopina etidijevega bromida (Sigma, E8751)	Priprava reagentov je opisana v preglednici 3.17, pri čemer so bili vsi reagenti pripravljeni pod pogoj dela z RNA ter uporabo ddH ₂ O DEPC .

3.1.3.9.3 Reagenti in raztopine za obdelavo RNA z DNazo

Preglednica 3.13: Reagenti, pufri in raztopine za obdelavo RNA z DNazo

Table 3.13: Chemicals, buffers and solutions used for DNase treatment

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
MgCl₂.6H₂O		
Magnezijev klorid – 6 hidrata - MgCl ₂ .6H ₂ O (Riedel-da Haen, 31413)	1 M	2,0330 g MgCl ₂ .6H ₂ O raztopimo v 10 mL ddH ₂ O. Dodamo 10 µL DEPC, pretresemo, inkubiramo najmanj 12 ur pri 37 °C in avtoklaviramo.
ddH ₂ O		
DEPC		
Tris-HCl		
Tris-HCl (Promega, H 5121)	1 M	1,2114 g Tris-HCl raztopimo v 9 mL ddH ₂ O DEPC, uravnamo pH na 7,5 in dopolnimo z ddH ₂ O DEPC do 10 mL. Steriliziramo s filtracijo skozi membranski filter s premerom por 0,22 µm. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O DEPC		
Pharmacia buffer 1x		
0,4 mL pripravljenega Tris-HCl pH 7,5	0,04 M	Sestavine odpipetiramo skupaj in dodamo 9 mL ddH ₂ O DEPC.
0,06 mL pripravljenega MgCl ₂ .6H ₂ O	0,006 M	Uravnamo pH na 7,5 in dopolnimo z ddH ₂ O DEPC do 10 mL. Razdelimo v mikrocentrifugirke po 1 mL.
ddH ₂ O DEPC		Shranimo pri -20°C.
RNazni inhibitor		
RNase inhibitor (Ribonuklease inhibitor) (20 U / µL) (Applied Biosystem, N808-0119)		Komercialno pripravljeno.
NaAc		
NaAc (Sigma, S 2889)	3M	24,61 g NaAc raztopimo v 30 mL ddH ₂ O (s segrevanjem na mešalniku do 60 °C). Dodamo 30 mL ocetne kisline. Z izmeničnim dodajanjem ddH ₂ O in ocetne kisline uravnamo pH na 4,8-4,83 ter volumen na 100 mL. Dodamo 0,1 mL DEPC, pretresemo, inkubiramo najmanj 12 ur pri 37 °C in avtoklaviramo. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O		
Ocetna kislina (Merck, 1.00063.1000)		
DEPC		
EtOH 70 %		
Etanol – EtOH (96 %) (Merck)	70 %	Asolutni etanol zmešamo z ddH ₂ O DEPC v razmerju 7:3. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O DEPC		
Mineralno olje (Sigma)		
Fenol (Kemika)		
Kloroform (Sigma, C2432)		

3.1.3.9.4 Reagenti in raztopine za sintezo cDNA

Preglednica 3.14: Reagenti, pufri in raztopine za sintezo cDNA

Table 3.14: Chemicals, buffers and solutions used for cDNA synthesis

SESTAVA	PRIPRAVA
Pufer PCR 10x (Promega, M 190A,)	
100 mL Tris HCl, pH 8,3	Komercialno pripravljeno.
500 mM KCl	
MgCl₂	
25 mM Magnezijev klorid - MgCl ₂ (Promega, A 351B)	Komercialno pripravljeno.
Mešanica dNTP (Promega, C1141)	
20 mM dATP	20 mM dGTP
20 mM dCTP	20 mM dTTP
RNazni inhibitor	
RNase inhibitor (Ribonuklease inhibitor) (20 U / μL) (Applied Biosystem, N808-0119)	Komercialno pripravljeno.
MultiScribe RT	
μL MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U / μL) (Applied Biosystem, 4311235)	Komercialno pripravljeno.
Random Hexamers	
Random Hexamers (50 μM) (Applied Biosystem, N808-0127)	Komercialno pripravljeno.

3.1.3.9.5 Reagenti in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR

Preglednica 3.15: Reagenti, pufri in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR

Table 3.15: Chemicals, buffers and solutions used for PCR reaction

SESTAVA	PRIPRAVA
Pufer PCR 10x (Promega, M 190A,)	
100 mL Tris HCl, pH 8,3	Komercialno pripravljeno.
500 mM KCl	
Mešanica dNTP (Promega, C1141)	
2 mM dATP	2 mM dGTP
2 mM dCTP	2 mM dTTP
MgCl₂	
25 mM Magnezijev klorid - MgCl ₂ (Promega, A 351B)	Komercialno pripravljeno.
Taq DNA-polimeraza	
5 U / μl (Promega, M1663)	Komercialno pripravljeno.
Voda_{PCR}	
Water, Molecular Biology Grade (Eppendorf, 0032 006.159)	Komercialno pripravljeno.

3.1.3.10 Reagenti in raztopine za določanje pomnožkov PCR

Preglednica 3.16: Reagenti, pufri in raztopine za določanje pomnožkov PCR

Table 3.16: Chemicals, buffers and solutions used for PCR products determination

SESTAVINA	KONČNA KONC.	PRIPRAVA
Pufer TAE 10x		
48,44 g Tris baza (Promega, H 5131)	0,4 M	Sestavine raztopimo v 900 mL vode, uravnamo pH na 8,1 z ocetno kislino in dopolnimo z ddH ₂ O do 1 mL.
12 mL ocetna kislina (Merck, 1.00063.1000)	100 %	Avtoklaviramo (121 °C, 15 min).
7,44 g Na ₂ EDTA (Sigma, E 5134)	0,02 M	Shranimo pri 4°C.
ddH ₂ O		
Pufer TAE 0,5x		
Pufer TAE 10x		K 50 mL pufra TAE 10x dodamo 950 mL ddH ₂ O. Shranimo pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O		
Agarozni gel		
Agaroza (Seakem ME agarose, FMC Bioproducts, 50014)	1,5 %	Agarozo raztopimo v ustreznih količinah pufra TAE 0,5x s segrevanjem v mikrovalovni pečici do vretja. Ohladimo jo na 60 °C pri sobni temperaturi, vlijemo na nosilec za gel s primernim glavnikom.
Pufer TAE 0,5x		
Molekulske označevalce dolžin pomnožkov DNA – 100 bp		
100 bp DNA Ladder (Promega, G 2101)		Komercialno pripravljeno.
Nanašalni puffer 10x (10x DNA Loading Buffer) (Products, B10E01)		
bromfenol modro	0,001 %	
ksilen cianol	0,001 %	
glycerol	50 %	Komercialno pripravljeno.
Na ₂ EDTA	0,1 M	
SDS	0,035 M	
Pripravljen nanašalni pufer		
72 µl sterilne ddH ₂ O		Sestavine odpipetiramo v skupno mikrocentrifugirko in premešamo.
80 µl nanašalnega pufra (Products, B10E01)		Shranimo pri 4°C.
8 µl molekulskega označevalca (Promega, G2101)		
EtBr		
Etidijski bromid – EtBr (Sigma, E8751)	0,5 µg / mL	EtBr (1 mg / mL) raztopimo v ustreznih količinah dH ₂ O. Hranimo pri sobni temperaturi v temnem.
ddH ₂ O		

3.1.3.10.1 Reagenti in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR v realnem času

Preglednica 3.17: Reagenti, pufri in raztopine za pripravo reakcijske mešanice PCR v realnem času

Table 3.17: Chemicals, buffers and solutions used for real-time PCR reaction

Absolute™ QPCR SYBR Green® ROX Mix 2x (ABgene, Surrey, UK 1162/a)		
Reakcijski pufer		Komercialno pripravljeno.
Thermo-Start® DNA Polymerase		Proizvajalec ni podal sestave pufra.

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

3.1.4.1 Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri reakciji PCR in spremljanju izražanja genov z metodo RT-PCR

Preglednica 3.18: Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR in ugotavljanje izražanja genov z metodo RT-PCR

Table 3.18: Oligonucleotide primers, used for PCR and RT-PCR analysis

Dostopna koda ^a	Gen	Ime	Dolžina	Nukleotidno zaporedja (5'-3')	Velikost produkta PCR (bp)	Lokacija 5' konca začetnega oligonukleotida (bp)
NC_0021663 REG.483003 -484829	<i>htpG</i>	FhtpG ₁	20	TCC GTG TGG ATT ATC AAA GT	404	847
		RhtpG ₁	20	TTC GCC TTG AAG GTC ATT TT		
NC_0021663 REG.709183 -711054	<i>dnaK</i>	FdnaK ₂	20	TCA ATG AGC CTA CTT CAG CA	268	502
		RdnaK ₂	20	TTC AAG CGT TGC AAA GCC AT		
Y13334	<i>groEL</i>	FgroEL ₂	20	TGA AAG TGC GAC TAT ACA AG	379	1579
		RgroEL ₂	20	TGC TTC ATC ACC CTG TAG AT		
XT6692	<i>sodB</i>	FsodB ₁	20	TTA AGC CAA GTA CAG GCT GT	390	418
		RsodB ₁	20	TAA CTG ATC CCA TGC CTT CT		
NC_002163, REG.302383 -3029879	<i>ahpC</i>	FahpC ₁	20	TTA CTG CTC CAG CGG TAT TA	371	28
		RahpC ₁	20	TCC ATC AGC ATC AAG CAA GA		
AF369581	<i>flaA</i>	FflaA ₁	23	GCA GCA GAT GAT GCT TCA GGG AT	220	91
		RflaA ₁	20	GCT TGA AGC ATG GTT CTT GT		
AJ002379	<i>rpoD</i>	Frpo2	20	GGA GCA AAT TAA ACG CGG TA	227	1273
		Rrpo2	20	CTT GCC TGA TCC ACC AAG TT		
L04315	16S rRNA	pA	20	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	324	9
		P16anja	21	TGT CTC AGT TCC AGT GTG ACT		

^a PUBMED / GenBank accession number

3.1.4.2 Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri spremljanju izražanja genov z metodo PCR v realnem času

Preglednica 3.19: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje izražanja genov z metodo PCR v realnem času

Table 3.19: Oligonucleotide primers, used for real-time PCR analysis

Dostopna koda ^a	Gen	Ime	Dolžina	Nukleotidno zaporedja (5'-3')	Velikost produkta PCR (bp)	Lokacija 5' konca začetnega oligonukleotida (bp)
Y13334	<i>groEL</i>	R-groELcj-Fw2	24	TTC GCG GTG TTC TTA ATA TTT CAG	95	802
		R-groELcj-R2	27	TCC ACC TGT TAA AAT CGC TAT ATC TTC		897
AJ002379	<i>rpoD</i>	R-rpoD Cj-Fw1	24	GAA CGA ATT TGA TTT AGC CAA TGA	87	424
		R-rpoD Cj-R1	28	CCC ATT TCT CTT AAA TAC ATA CGA ACAG		511
L04315	16S rRNA	R-16Scj-Fw1	24	GAC GCT TAA CTG GTC TGA GAG GAT	77	277
		R-16Scj-R1	18	CTG CTG CCT CCC GTA GGA		354

^a PUBMED / GenBank accession number

3.1.5 Laboratorijski pribor in oprema

Preglednica 3.20: Laboratorijski pribor za izvedbo eksperimentalnega dela

Table 3.20: Laboratory service needed for the experimental section

Pribor	Oznaka	Proizvajalec
Anaerobni lonci	AnaeroJar 2,5 L, Ago 25 A	Oxoid
Avtomatske pipete	P10, P100, P1000, P10F, P100F, P1000F	Gilson, Francija
	3K30	Eppendorf, Nemčija
		Sigma, ZDA
Cepilne zanke		Labortehnika Golias
centrifugirke za centrifugo	3K30	Sigma
Črni, polikarbonatni membranski filtri	Isopore membrane filters 0,22 µm, 25 mm, GTBP02500	Millipore
	Isopore disc 0,22 µm, 12 mm, GTBP01300	
Demetrijeve steklenice	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1L,	Schott Duran
Filterni papir	membrane filters 0,2 µm	Sartorius Minisart
Ohišje za filter	25 mm, CAT.10, SX0001300	Millipore
Injekcijske brizgalke	2 mL, 10 mL	PB Plastik
Krioepruvetke		Heto
Kvarčne kivete		Hellma
Magnetno mešalo	550 M	Tehnica, Železniki
Merilni valji		Plastibrand
Mešanica plina	5 % O ₂ , 10 % CO ₂ , 85 % N ₂	Istragas, Slovenija
Mikrocentrifugirke	1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Brand
	0,2 mL - MICRO Amp Reaction Tube With, N N801-0540	Applied Biosystem
Natavki za avtomatske pipete	P10, P100, P1000, P10F, P100F, P1000F	Eppendorf, Brand, Gilson
Ohišje za filter	Swinnex filter holder 13mm, SX0001300	Millipore
Florescentna žarnica	15 W	Sulvania standard
Petrijevke	FI70	Labortehnika Golias
Plastične kivete		Sarstedt
Plastični lončki	100 mL	Labortehnika Golias
Plastične Centrifugirke -	Centrifugal Tube 50 mL PP, 91051	TPP-centrifuge tubes

Steklovina		Brand
Steklene pipete	10mL, 20mL, 50 mL	Tlos, Zagreb
Steklene kroglice	G-9268	Sigma
Stojalo za mikrocetnrfugirke	43410 52	Eppendorf, Nemčija
Stojalo za mikrocetnrfugirke s hlajenjem	PCR cooler PCR Cooler 0,2 mL Starter set, 0 deg, E3881	Eppendorf, Nemčija
	MINI cooler, 1,5 mL, 0 deg, 114930	
Stresalnik za epruvete	Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Ročni števec kolonij	652 017 80	Kleinfield

Preglednica 3.21: Laboratorijska oprema za izvedbo eksperimentalnega dela

Table 3.21: Laboratory equipment needed for the experimental section

Aparatura	Oznaka	Proizvajalec
Aparatura za PCR	GeneAmp DNA Thermal Cycler 2400	Perkin Elmer, Albertville, Minnesota, ZDA
Aparatura za PCR v realnem času	v ABI Prism 7000 sekvenčni detektor	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Avtoklav	tip 250	Sutjeska, Jugoslavija
Centrifugi	Mini spin Plus, Eppendorf	Eppendorf, Nemčija
	3K30	Sigma, ZDA
Digestorij	TIP 382	Med-lab Rauh
Elektroforezna posoda	GNA 200	Pharmacia Biotech, Švedska
	COS MO BIO CO	Advance Co. Ltd
Faznokontrastni mikroskop	BX 50, Optical Co.	Olympus
Fluorescentni mikroskop	BX-60, 100 W merkurijeva žarnica, x-60 imerzijski fluorescentni objektiv	Olympus
Hladilniki		Gorenje, Slovenija
Inkubator	SP 190	Kambič, Slovenija
Ledomat		Scotsman
Komora za PCR	Holten, Lamin Air	
Mikroskop	M400-D	
Mikrovalovna pečica	Cook'grill 1300	Sanyo
pH meter	MA 5710	Iskra, Slovenija
Plinski gorilnik		
Programska oprema pri metodi PCR v realnem času	SDS 2.1 Primer Express 2.0	Applied Biosystem
Sistem za dokumentiranje gelov	GEL DOC 2000, S.N. 653/1281	Bio Rad, ZDA
Spektrofotometer	CE 2012	Cecil
Spektrofluorimeter	FP – 750	Jasco
Spektrofluorimetrični čitalci mikrotiterskih plošč	Safine 2	Tecan, Švica
Sušilnik	SO-250	Elektromedicina
	sušilnik (S-45,	Kambič
Stresalnik za epruvete	Vibromix EV 202	Tehtnica, Slovenija
Tehtnice	Exacta 1200EB	Tehtnica, Slovenija
	Sartorius, analytic	GMBH, Nemčija
	Sartorius, exellence	GMBH, Nemčija
	MonoBloc PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
	Scaltec KA BC100	GMBH, Nemčija
Usmernik za elektroforezo	E445	Consort, Belgija
Vodna kopel	serija 11757	Sutjeska, Jugoslavija
Vrtinčnik	104EV	vibromix
Zaščitna mikrobiološka komora	Yellowline	IKA
Zmrzovalnik (-20 °C)	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Revitalizacija sevov

Seve bakterij *Campylobacter jejuni*, trajno shranjene pri – 80 °C v gojišču BHI (angl. brain heart infusion) z dodatkom glicerola in krvi (Herman in sod., 2003), smo s cepilno zanko nanesli na površino selektivnega trdnega gojišča Columbia krvni agar za izolacijo posameznih kolonij. Plošče smo mikroaerofilno (5% O₂, 10% CO₂, 85 % N₂) inkubirali 24 ur pri 42 °C.

3.2.2 Namnožitev bakterijske biomase

Tipično kolonijo smo s trdnega gojišča prenesli v plastenke (Golias, 100 mL) s 55 mL obogatitvenega tekočega gojišča Preston, premešali na vrtinčniku in mikroaerofilno inkubirali pri 42 °C do eksponentne (9 h) oz. stacionarne (15 h) faze rasti. Po kultivaciji smo vsebino plastenk premešali na vrtinčniku in tako pred vsakim eksperimentom pridobili ustrezeno količino homogene osnovne kulture za nadaljnje delo.

3.2.3 Izvedba predstresov

Kot predstres smo uporabili stradanje ter hladni stres (glej sliko 3.1).

3.2.3.1 Stradanje

Namnoženi biomasi kulture iz eksponentne/stacionarne faze rasti smo s centrifugiranjem (5 min, 12000 obr./min, 4 °C) odstranili gojišče, celice sprali in resuspendirali v alikvotnem volumnu fiziološke raztopine. Suspenzije biomase smo dobro premešali ter prenesli v skupno sterilno steklenico. Pripravljeno suspenzijo stradane kulture smo razdelili po 55 mL v plastenke (Golias, 100 mL) ter mikroaerofilno inkubirali pri 42 °C 1 – 5 h. Po inkubaciji smo vsebino plastenk premešali na vrtinčniku in ponovno prenesli v skupno sterilno steklenico ter tako pridobili biomaso stradane kulture za nadaljnje delo (Klančnik in sod., 2006).

Pri delu eksperimenta smo uporabili tudi stradanje pri 4 in 42 °C za 1 – 24 h.

V del kulture smo po odstranitvi gojišča in pred inkubacijo dodali kloramfenikol - antibiotik, ki preprečuje sintezo proteinov. Tako smo pridobili stradano kulturo z dodatkom kloramfenikola (končna koncentracija 5 µg / mL).

3.2.3.2 Hladni predstres

Kot predstres smo pri delu eksperimenta uporabili hladni stres pri 25 °C za 1 – 24 h.

3.2.4 Izvedba stresov

Kot stres smo uporabili temperaturni ali oksidativni stres (glej sliko 3.1).

3.2.4.1 Hladni stres

Kulturo smo za 1 – 24 h ali 42 dni mikroaerofilno inkubirali pri temperaturi 4 ali 25 °C.

3.2.4.2 Toplotni stres

Homogenizirano biomaso kulture smo po 4 mL razdelili v sterilne epruvete (Brand, 10 mL) ter jih prenesli v vodno kopel na 48 ali 55 °C. Spremljali smo središčno temperaturo. Po 3, 10, 20, 30 ali 60 min inkubacije pri izbrani temperaturi smo jih ohladili na ledu.

3.2.4.3 Oksidativni stres

- Kisik

Biomaso kulture smo inkubirali 5, 10, 15, 24, 30, 48 in 72 dni v inkubatorju pri 42 °C v prisotnosti atmosferske koncentracije kisika.

- Vodikov peroksid (H_2O_2)

Vzorcem smo dodali raztopino H_2O_2 do končne koncentracije 3 mM, premešali na vrtinčniku ter inkubirali 10, 30 ali 60 minut v temnem prostoru.

3.2.5 Vzorčenje

Po izpostavitvi kulture stresom in homogenizaciji vzorcev v skupni sterilni steklenici smo odvzeli vzorec kulture, ga razdelili na več delov ter uporabili za: kvantifikacijo bakterijske biomase s štetjem kolonij na agarskih ploščah ($CFU \text{ mL}^{-1}$) ter s štetjem pod fluorescentnim mikroskopom, spremjanje morfologije celic, spremjanje izražanja izbranih genov z metodo RT-PCR in PCR v realnem času ter spremjanje encimskih antioksidativnih sistemov. Pri tem smo vedno vzorčili tudi kontrolno kulturo, izpostavljenou optimalnim pogojem inkubacije.

3.2.6 Ugotavljanje kultivabilnosti

Kultivabilnost smo ugotavljali pri osnovni in stradani kulturi pred in po izpostavitvi stresom. Pripravili smo serijske razredčitve po Kochu, nacepili plošče in po inkubaciji prešteli kolonije na števnih agarskih ploščah Karmali. Izračunali smo povprečno koncentracijo celic ($CFU \text{ mL}^{-1}$) po enačbi št. 5 (ISO 4833, 1991):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d} \left[\frac{CFU}{mL} \right] \quad \dots (5)$$

N	povprečna koncentracija celic
$\sum C$	vsota kolonij na vseh ploščah
n_1	število plošč prve razredčitve
n_2	število plošč druge razredčitve
d	razredčitveni faktor prve razredčitve

3.2.7 Ugotavljanje živosti in morfologije celic s fluorescentnim mikroskopom

Za štetje živih in vseh celic smo uporabili metodo direktnega štetja celic z barvilm akridin oranž (angl. acridine orange direct count, AODC) in LIVE/DEAD[®] *BacLight*TM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, ZDA) pod fluorescentnim mikroskopom.

3.2.7.1 AODC

Metoda AODC (Hobbie in sod., 1977) je razširjena za študij živih ter vseh celic prisotnih v vzorcih. Temelji na različni fluorescenci celic po uporabi kratkovalovne modre svetlobe (455 - 490 nm). Vezava akridin oranža je odvisna od fiziološkega stanja celic: kot monomer (zelen) se veže na DNA in kot dimer (oranžen) na RNA. Žive celice se torej obarvajo oranžno, mrtve pa zeleno.

Membranski črni polikarbonatni filter (premera 13 mm) z velikostjo por 0,2 µm (Millipore) smo vstavili v ohišje. Skozi injekcijsko brizgalko smo filtrirali znan volumen ustrezno razredčene kulture. Filter z vzorcem smo 3 min barvali z 0,01 % raztopino akridinoranža. Filter smo nato odstranili iz ohišja in ga položili na objektno stekelce ter opazovali pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX-60, živosrebrna žarnica 100 W, imerzijski fluorescentni objektiv x-60, Tokyo, Japonska) pri povečavi 600x.

3.2.7.2 LIVE/DEAD[®] *BacLight*TM

Za kvantifikacijo skupnega števila in števila živih celic celic smo uporabili reagent LIVE/DEAD[®] *BacLight*TM (L-7012, Molecular Probes). Z barvilm *BacLight*TM določimo membransko integriteto celic na osnovi mešanice dveh barvil, ki se med seboj razlikujeta v karakteristiki spektrov in zmožnosti prodiranja skozi bakterijsko celico. Zeleni fluorokrom (SYTO 9) lahko prehaja skozi nepoškodovano plazemsko membrano in obarva vse celice, propidijev jodid (PI), ki ima večje molekule pa obarva le celice s poškodovano membrano. Po barvanju z obema barviloma v pravem razmerju se bakterije z intaktno membrano obarvajo zeleno, bakterije s poškodovano pa rdeče. Maksimalna vzbujena svetloba barvil je 480/500 nm za SYTO 9 in 490/635 nm za PI.

Ustrezne razredčitve vzorcev smo 15 min barvali z mešanico barvil LIVE/DEAD[®] *BacLight*TM (3 µL mL⁻¹) v temnem prostoru. Sledilo je filtriranje 1 mL barvane raztopine skozi črni polikarbonatni filter (premera 13 mm) z velikostjo por 0,2 µm (Millipore). Filter smo nato odstranili iz ohišja in ga položili na objektno stekelce ter opazovali pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX-60, živosrebrna žarnica 100 W, imerzijski fluorescentni objektiv x-60, Tokyo, Japonska) pri povečavi 600x.

3.2.7.3 Kvantifikacija celic

Na vsakem filtru smo prešteli celice najmanj 20 vidnih polj. Opazovali in šteli smo po kvadratkih po diagonali mrežice v vidnem polju oz. v celi mrežici ali vidnem polju. Pri tem smo število celic pri štetju kvadratkov preračunali na povprečno vrednost za 1 kvadrat, pri štetju mrežice smo v enačbo št. 6 vstavili število, ki smo ga dobili s štetjem celic po vsej površini mrežice, prav tako tudi pri štetju celic vidnega polja.

$$N = \frac{C \times R \times FM}{V_v} \quad \dots (6)$$

N število celic v 1 mL vzorca
 C število celic
 R razredčitev
 FM faktor mikroskopa - konstanta
 V_v volumen prefiltriranega vzroca (mL)

$$FM = \frac{P_f}{\pi r^2} \quad \dots (7)$$

FM faktor mikroskopa - konstanta
 P_f površina vidnega polja
 r polmer filtrirane površine filtra

FM je konstanta, ki je odvisna od načina štetja

$$\text{Štetje kvadratkov po diagonali} \dots \quad FM = 6,04 \times 10 E 5 \quad \dots (8)$$

$$\text{Štetje celotne mrežice} \dots \quad FM = 2,42 \times 10 E 4 \quad \dots (9)$$

$$\text{Štetje vidnega polja} \dots \quad FM = 4,90 \times 10 E 3 \quad \dots (10)$$

3.2.8 Opazovanje morfologije celic s fazno kontrastnim, fluorescentnim in elektronskim mikroskopom

3.2.8.1 Fazno kontrastni mikroskop

Morfologijo celic smo opazovali s standarnim in fazno kontrastnim svetlobnim mikroskopom pri povečavi 1000x. Ocenjevali smo število kokoidnih celic po barvanju preparata s karbol fuksinom ali po Gramu (kristal violet, lugol, alkohol, safranin).

3.2.8.2 Fluorescentni mikroskop

Morfologijo celic smo opazovali pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX-60, živosrebrna žarnica 100 W, imerzijski fluorescentni objektiv x-60, Tokyo, Japonska) po barvanju celic z LIVE/DEAD® *BacLight*™ s postopkom, opisanim v poglavju 3.2.7.

Šteli smo žive in mrtve celice, spiralaste ali kokoidne oblike. Pri štetju smo se posluževali sistema štetja po enačbah 11 – 14. Na ta način smo zajeli v raziskavo tudi kokoidno obliko celic, upoštevali njihovo živost in s pomočjo kultivacijskih metod ocenili njihov vpliv na kultivabilnost celic v vzorcu oz. njihovo sposobnost za delitev.

Delež živih celic (živost)

$$Cz = 1 - \left(\frac{B}{A} \right) \quad \dots (11)$$

Delež kokoidnih celic (kokoidnost)

$$Ck = \frac{C}{A} \quad \dots (12)$$

Delež živih kokoidnih celic

$$Czk = \frac{C - D}{A} \quad \dots (13)$$

Delež živih spiralnih celic

$$Czp = \frac{A - B - C + D}{A} \quad \dots (14)$$

<i>Cž</i>	<i>delež živih celic (živost)</i>
<i>Ck</i>	<i>delež kokoidnih celic (kokoidnost)</i>
<i>Cžk</i>	<i>delež živih kokoidnih celic</i>
<i>Cžp</i>	<i>delež živih spiralnih celic</i>
<i>A</i>	<i>skupno število vseh celic</i>
<i>B</i>	<i>skupno število vseh mrtvih celic</i>
<i>C</i>	<i>skupno število kokoidnih celic</i>
<i>D</i>	<i>štевilo mrtvih kokoidnih celic</i>

3.2.8.3 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Bakreno mrežico (200 rež/mm²), naprašeno s Formvar-jem, smo držali s pinceto ter nanjo za 3 min kanili 50 µL vzorca bakterijske kulture. Nato smo mrežice 3 minute negativno barvali s 3 % fosforvolframovo kislino (w/v) in jih 1 uro sušili pri sobni temperaturi. Morfologijo celic smo opazovali s transmisijskim elektronskim (TEM) mikroskopom JEM-1200EXII (JEOL LTD., Tokijo, Japonska) pri 10.000 do 100.000 kratni povečavi.

3.2.9 Ocena znotrajcelične oksidacije preko tvorbe reaktivnih kisikovih zvrst

Za oceno znotrajcelične oksidacije preko ocene tvorbe reaktivnih kisikovih zvrst (ROS) v supernatantu kulture smo uporabili fluorescenčno barvilo dihidro-2,7-diklorofluorescein (H₂DCF) (Jakubowski in Bartosz, 1997). Do oksidacije indikatorja dihidri-2,7-diklorofluorescein diacetata (H₂DCF-DA), ki preide v celico s pasivnim transportom in se deacetilira z nespecifičnimi esterazami, pride v prisotnosti oksidantov RO₂[•], RO[•], OH[•], HOCl in ONOO[•] (Halliwell in Gutteridge, 2000; Myhre in sod., 2003). Fluorescirajoč obliko 2,7-diklorofluorescein-9-laktona (DCFL) določimo fluorimetrično s spektrofluorometrom po razbitju celic (Jakubowski in Bartosz, 1997). Ker pri oksidaciji nista ključna O₂⁻ in H₂O₂, se oksidirana oblika barvila preko merjenja fluorescence uporablja za splošno oceno znotrajceličnih procesov oksidacije (in ne za določanje posameznih reaktivnih kisikovih zvrst ter študij oksidativnega stresa na nivoju celice (Keller in sod., 2004). Hitrost oksidacije diklorofluoresceina je odvisna od aktivnosti antioksidativnih obrambnih sistemov v celici. Ti so lovilci ROS in tekmujejo z barvilm za ROS. Oksidirana oblika diklorofluorescina preide iz celice v supernatnat, kjer ga določimo kot indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997).

Priprava kulture:

- Kulturo *C. jejuni* smo kultivirali v gojišču Preston v mikraerofilni atmosferi pri 42 °C do eksponentne faze rasti in jo homogenizirali v skupni sterilni steklenici.

Dodatek fluorescenčnega indikatorja dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata:

- Dodali smo 1 mM diklorofluorescein dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata (Sigma) v raztopini etanola (96 %) (Merck) do končne koncentracije 10 µM.
- Inkubirali smo še 20 min pri istih pogojih ter tako dosegli prehod barvila preko celične membrane v celico s pasivno difuzijo in deacetilacijo do H₂DCF.

Izpostavitev stresnim pogojem:

- Polovico kulture smo po spiranju prenesli v fiziološko raztopino in jo 5 h mikraerofilno inkubirali pri 42 °C (5 h stradana kultura).
- Drugo polovico smo obdržali v gojišču Preston (osnovna kultura).
- Osnovno in stradano kulturo smo izpostavili kisikovemu, peroksidnemu in toplotnem stresu pri 48 ter 55 °C.
- Po centrifugiranju (5 min, 13 000 vrt./min, 4°C) smo sediment sprali s 50 mM fosfatnim pufrom (pH 6,0) ter zatehtali v centrifugirki (TPP, 10 mL).
- K sedimentu celic (50 mg) smo dodali sterilen, ohlajen 50 mM fosfatni pufer (pH 6,0) in sterilne, ohlajene steklene kroglice (Sigma, premer: 426 - 600 µm) v razmerju sediment : pufer : kroglice = 1 : 5 : 2; ter vzorce postavili na led.
- Celice v vzorcu smo razbili z mešanjem na vrtinčniku trikrat po 1 minuto z vmesnim 1-minutnim hlajenjem na ledu.
- Pri centrifugiranju (5 min, 13 000 vrt./min, 4°C) smo supernatant razredčili v ddH₂O, ga prenesli v novo označeno mikrocentrifugirko (Eppendorf, 2 mL) ter shranili v zamrzovalniku pri -20 °C v temi do merjenja fluorescenčne intenzitete.

Merjenje fluorescenčne intenzitete

- Pred merjenjem smo shranjene vzorce odtajali na ledu v temi.
- S spektrofluorimetričnim čitalcem mikrotiterskih plošč Safine 2 (Tecan, Švica) smo jim izmerili fluorescenco. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm in emisije 520 nm. Rezultate smo izrazili kot fluorescenčna intenziteta (Pereira in sod., 2001).

3.2.10 Spremljanje encimskih antioksidativnih obrambnih sistemov

Za pripravo celičnega ekstrakta smo uporabili metodo razbijanja celic s steklenimi kroglicami (Scopes, 1987; Jamnik in Raspor, 2003).

3.2.10.1 Priprava celičnega ekstrakta za določanje encimske aktivnosti

- Kulturo *C. jejuni* smo gojili v gojišču Preston v mikraerofilni atmosferi pri 42 °C do eksponentne faze rasti ter izvedli toplotni (48 in 55 °C) in oksidativni stres (atm. konc. kisika in H₂O₂) na osnovni in stradani kulturi.
- Po centrifugiranju (5 min, 13 000 obr./min, 4 °C) smo sediment sprali, zatehtali v centrifugirki (TPP, 10 mL) ter shranili pri -80 °C.
- Za ekstrakcijo topnih proteinov smo sediment odtajali v vodni kopeli pri 40 °C.
- K sedimentu smo dodali sterilen, ohlajen 50 mM kalijev fosfatni pufer (pH 7,0) z inhibitorjem proteaz (1 tabletka/10 mL pufra) (Complett Mini, Roche) in sterilne, ohlajene steklene kroglice (Sigma, premer: 426 - 600 µm) v razmerju sediment : pufer : kroglice = 1 : 5 : 2; ter vzorce postavili na led.
- Celice v vzorcu smo razbili z mešanjem na vrtinčniku trikrat po 1 minuto z vmesnim 1-minutnim hlajenjem na ledu.
- Pri centrifugiranju (20 minut, 20 000 g, 4 °C) smo odstranili nepoškodovane celice, ostanke celic in steklene kroglice. Doblen supernatant smo razdelili v predhodno označene mikrocentrifugirke (Eppendorf, 2 mL), shranili pri -80 °C ter uporabili kot celični ekstrakt za določanje koncentracije proteinov in aktivnosti encimov.

3.2.10.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

V vzorcih celičnih ekstraktov smo določali koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu (1976). Barvilo Comassie Brilliant se veže na proteine. Pri tem rdeča barva prehaja v modro, s tem pa se spremeni absorpcijski maksimum barvila iz 465 na 595 nm. Vezava barvila na protein je zelo hitra (približno 2 min) in kompleks protein-barvilo je relativno dolgo stabilen (1 h).

- Predhodno zamrznjene (- 80 °C) celične ekstrakte smo odtajali v vodni kopeli pri 25 °C.
 - K 2,5 mL 5 krat razredčenega Bradfordovega koncentrata (Biorad), pripravljenega v centrifugirki (TPP, 10 mL), smo dodali 50 µL vzorca.
 - Suspenzijo smo premešali na vrtinčniku, počakali 5 minut ter izmerili absorbanco (A) pri valovni dolžini 595 nm.
 - Pri slepem vzorcu smo namesto vzorca uporabili 50 µL pripravljenega fosfatnega pufra (pH 7,0) z inhibitorji proteaz.
 - Za umeritveno krivuljo smo kot standard uporabili znane koncentracije BSA (goveji serumski albumin). Iz umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo proteinov v 100 µL ekstrakta celičnega ekstrakta, kar smo potrebovali za nadaljnji izračun specifične aktivnosti katalaze in superoksid dismutaze (priloga A) (Jamnik, 2002).

Enačba premice umeritvene krivulje

$$\begin{aligned} y &= 0,01059 \times x + 0,03719 \\ x &= \frac{y - 0,03719}{0,01059} \left[\frac{\mu\text{g}}{100 \mu\text{L}} \right] \end{aligned} \quad \dots (15)$$

y..... *A₅₉₅ vzorca*
x..... *koncentracija proteinov v 100 μL ekstrakta [μg/μL]*

3.2.10.3 Določanje aktivnosti antioksidativnih obrambnih encimov v celičnem ekstraktu

Za določanje aktivnosti encimov smo pri meritvah uporabili tolikšen volumen celičnega ekstrakta, da je le-ta vseboval 0,15 mg proteinov. Specifične aktivnosti encimov smo izrazili v enotah U / mg proteinov.

3.2.10.3.1 Katalaza

Za določanje aktivnosti katalaze smo uporabili metodo, kjer smo neposredno spremljali razgradnjo H_2O_2 kot zmanjšanje absorbance pri valovni dolžini 240 nm v časovnem intervalu 30 sekund (Aebi, 1984).

- Predhodno zamrznjene (- 80 °C) celične ekstrakte smo odtalili v vodni kopeli pri 25 °C za 10 min. Tudi vsi pufri in reagenti so bili pred meritvijo segreti na 25 °C.
 - Po centrifugiranju celičnih ekstraktov (3 min, 14000 obr./min) smo v mikrocentrifugirki (Eppendorf, 2 mL) pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumenom 2 mL:
 - določen volumen ekstrakta (masa proteinov je bila 0,15 mg)
 - 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH 7,0) do končnega volumena 2 mL.
 - Vsebino smo premešali na vrtinčniku in prenesli v kvarčno kiveto (Hellma).
 - Kot slepi vzorec smo uporabili vzorec brez dodatka celičnega ekstrakta.
 - Reakcijo smo začeli z dodatkom 1 mL 30 mM raztopine H_2O_2 . Padanje absorbance pri valovni dolžini 240 nm in temperaturi 25 °C smo s spektrofotometrom (Cecil, CE 2021) spremljali 3 min v 30 sekundnih intervalih.

- Aktivnost katalaze smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki razgradi 1 µmol H₂O₂ v 1 min pri 25 °C. Specifično aktivnost katalaze smo podali glede na maso proteinov.

Specifična aktivnost katalaze

$$\text{Aktivnost katalaze (U)} = \frac{\Delta A_{240}}{\Delta t} \left[\frac{1}{s} \right] \quad \dots (16)$$

$$\text{Specifična aktivnost katalaze} = \frac{\Delta A_{240}}{\Delta t \times m_{\text{proteinov}}} \left[\frac{1}{s \text{ mg}} \right] \quad \dots (17)$$

ΔA razlika absorbanc vzorca, izračunana iz meritev pri valovni dolžini 240 nm v časovnem intervalu 30 s
 Δt 30 s (časovni interval spremeljanja absorbance)
 $m_{\text{proteinov}}$ = 0,15 mg
 U encimske enote

3.2.10.3.2 Superoksid dismutaza

Za določanje aktivnosti superoksid dismutaze smo uporabili modificirano metodo Beauchamp in Fridovich (1971), kot sta jo modificirala Ravindranath in Fridovich (1975). Metoda temelji na dejstvu, da superoksid dismutaza inhibira redukcijo NBT (angl. nitro blue tetrazolium) ob prisotnosti superoksidnih anionov. Le ti se tvorijo pri obsevanju riboflavina s svetlobo in povzročijo redukcijo NBT ter s tem nastanek formazana, ki je modre barve.

- Predhodno zamrznjene (- 80 °C) celične ekstrakte smo odtalili v vodni kopeli pri 25 °C za 10 min. Tudi vsi pufri in reagenti so bili pred merjenjem segreti na 25 °C.
- Po centrifugiranju celičnih ekstraktov (3 min, 14000 obr./min) smo v centrifugirki (TPP, 10 mL) pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumenom 3 mL:
 - 900 µL 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH 7,8),
 - 100 µL 1 mM EDTA,
 - 0,15 mL 0,1 M metionina,
 - 0,1 mL 1 mM NBT,
 - 30 µL 0,16 mM riboflavina,
 - določen volumen celičnega ekstrakta (masa proteinov je bila 0,15 mg),
 - določen volumen dH₂O do 3 mL.
- Kot slepi vzorec smo uporabili vzorec brez dodatka celičnega ekstrakta.
- Reakcijsko mešanico smo pripravili v temi, jo premešali na vibracijskem mešalniku ter prenesli v kiveto (Plastibrand, 1,5 mL). Vzorcem smo na spektrofotometru (Cecil, CE 2021) izmerili absorbanco pri valovni dolžini 550 nm in jih nato za 3 min izpostavili sevanju s 15 W fluorescenčno žarnico. Po obsevanju smo ponovno izmerili absorbanco pri 550 nm.
- Aktivnost superoksid dismutaze smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki povzroči 50-odstotno inhibicijo redukcije NBT.

Specifična aktivnost superoksid dismutaze

$$U = \left(1 - \frac{\Delta A_{vzorca}}{\Delta A_{slepa}} \right) \div 0,50 \quad \dots (18)$$

$$\text{Specifična aktivnost SOD} = \frac{U}{0,15 \text{ mg}} \left[\frac{U}{\text{mg}} \right] \quad \dots (19)$$

U	število enot
ΔA_{vzorca} =	razlika absorbanc vzorca, izračunana iz meritev pri valovni dolžini 550 nm pred in po 3 minutnem sevanju
ΔA_{slepa} =	razlika absorbanc slepega vzorca, izračunana iz meritev pri valovni dolžini 550 nm pred in po 3 minutnem sevanju
SOD -	superoksid dismutaza

3.2.11 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili metodo, kot so jo opisali Flamm in sod. (1984).

- V 1,8 mL sterilne ddH₂O v mikrocentrifugirki (Eppendorf, 2 mL) smo resuspendirali celice s trdega gojišča Columbia.
- Po centrifugiranju (2 min, 14000 g) smo sediment sprali z 1 mL pufra SSC 1x.
- Po centrifugiranju (2 min, 14000 g) smo sediment raztopili v 100 µL raztopine lizocima (0,4 mg /100µL) in inkubirali 45 min v vodni kopeli pri 37 °C.
- Po prvi inkubaciji smo dodali 200 µL pufra TE, 100 µL raztopine sarkozila v pufru TE (5 %), 100 µL raztopine proteinaze K v pufru TE (0,26 mg/100µL) in inkubirali 1 uro v vodni kopeli pri 37 °C.
- Po drugi inkubaciji smo v premešano raztopino dodali 500 µL fenola ter premešali na vrtinčniku.
- Po centrifugiranju (2 min, 14000 g) smo supernatant prenesli (vodna faza DNA) v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, 2 mL), dodali 500 µL kloroform ter premešali na vrtinčniku.
- Po centrifugiranju (2 min, 14000 g) smo supernatant prenesli (vodna faza DNA) v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, 2 mL).

Sledila je etanolna precipitacija izolirane DNA:

- Dodali smo 50 µL 3 M raztopine amonijevega acetata (NaAc) in 1 mL etanola (100 %), dobro premešali na vrtinčniku ter inkubirali 30 min pri - 20 °C.
- Po centrifugiranju (10 min, 14000 g) smo sediment DNA sprali z 1 mL etanola (80 %), ohljenega na - 20 °C.
- Po centrifugiranju (10 min, 14000 g) smo sediment osušili v mikrobiološki komori (15 – 30 min).
- Sediment DNA smo resuspendirali v 200 µL ddH₂O in shranili pri -20 °C.

3.2.12 Izolacija RNA

Celokupno RNA iz bakterij smo izolirali z reagenti RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) po navodilih proizvajalca (RNeasy® Mini Handbook, 2001). Rokovanje z RNA je potekalo pod pogoji dela za RNA, ki vključuje predhodno in sprotno čiščenje s hipokloritom, 0,5 % SDS in vodo, obdelano z 0,1 % DEPC (ddH₂O DEPC), ter pripravo kemikalij z ddH₂O DEPC. Vsi koraki izolacije so potekali pri sobni temperaturi:

I. FAZA

- 1 mL osnovne ali stradane kulture bakterij *C. jejuni* iz eksponentne faze, ki smo jo izpostavili topotnemu ali oksidativni stresu, smo prenesli v mikrocentrifugirko za izolacijo RNA (Eppendorf, 2 mL).
- Po centrifugiranju (5 min, 8000 g) smo 500 µL supernatanta prenesli v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, 2 mL), ustavili sintezo proteinov z dodatkom 1 mL reagenta RNA protect (Qiagen GmbH) in 15 µL kloramfenikola (100 µg/mL), premešali na vrtinčniku ter inkubirali 10 min pri sobni temperaturi.
- Po centrifugiranju (5 min, 8000 g) smo sediment resuspendirali v 100 µL pufra TE 1x in 2 µL lizocima (20 mg/mL), z močnim 5 minutnim mešanjem na vrtinčniku zagotovili ustrezeno homogenizacijo celičnega lizata ter inkubirali 5 do 10 minut pri sobni temperaturi.
- V okolju brez prisotne RNA (RNA čisto okolje) smo nato bakterijsko suspenzijo lizirali z dodatkom 350 µL pufra RLT (Lysis buffer, Qiagen GmbH) s predhodno dodanim β-merkaptetoetanolom (Sigma-Aldrich) (10 µL β-merkaptetoetanola /1 mL pufra RLT) ter premešali na vrtinčniku.

II. FAZA – potekala je v okolju brez prisotne RNA

- Vzorcu smo dodali 250 µL etanola (100%) in s tem ustvarili pogoje za vezavo (adsorbcijo) RNA na kolono, premešali s pipeto ter prenesli na kolono RNeasy zbirni mikrocentrifugirki (2 mL).
- Pri centrifugiranju (1 min, 8000 g) se je RNA adsorbirala na površino membrane, zato smo vsebino spodnjega dela kolone previdno odlili ter kolono (adsorbirano RNA) sprali z 700 µL RW1 (Wash buffer, Qiagen GmbH).
- Po centrifugiranju (1 min, 8000 g) smo spodnji del kolone zamenjali z novim ter kolono (adsorbirano RNA) sprali z 500 µL RPE (Wash buffer, Qiagen GmbH).
- Po centrifugiranju (1 min, 8000 g) smo vsebino spodnjega dela odlili in kolono (adsorbirano RNA) ponovno sprali z 500 µL RPE (Wash buffer, Qiagen GmbH).
- Po centrifugiranju (3 min, 14000 g) (zgornji del kolone je bil popolnoma suh) smo kolono prenesli v novo silikonizirano (onemogočena odsorbcijska DNA na plastično steno) mikrocentrifugirko (Eppendorf, 1,5 mL) ter RNA iz površine membrane eluirali s 50 µL vode brez RNaz (RNase free water, Qiagen GmbH).
- Po centrifugiranju (1 min, 8000 g) smo kolono zavrgli ter eluirano RNA v mikrocentrifugirki shranili pri -20 °C.
- Prisotnost RNA smo preverili s vizualizacijo na 1,5 % LE agaroznem gelu v pufru TAE 0,5x. Elektroforeza je potekala pri 10 V/ cm. Po končani elektroforezi smo gel 10 min barvali z raztopino EtBr, opazovali na UV transluminatorju ter računalniško dokumentirali. Vsi reagenti (1,5 % agarozni gel, pufri TAE 0,5x, EtBr) so bili pripravljeni pod pogoji RNA z uporabo ddH₂O DEPC.

3.2.13 Obdelava z DNazo

Zaradi velike občutljivosti metode PCR v realnem času je bilo potrebno iz vzorcev RNA pred kvantifikacijo izražanja genov odstraniti morebitne ostanke genomske DNA, ki bi lahko vodile do lažno pozitivnih rezultatov. Zato smo vzorce RNA obdelali z DNazo I:

- Reakcijska mešanica končnega volumna 200 µL je vsebovala:
 - 20 µL 1x Pharmacia buffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM MgCl₂·6H₂O),
 - 2 µL RNase inhibitor (20 U / µL) (Applied Biosystem),
 - 10 µL DNase I (1U / µL) (Gibco BRL, USA),
 - 118 µL ddH₂O DEPC
- 50 µL RNA (k vsakem vzorcu RNA smo dodali 150 µL reakcijske mešanice).

- Da bi preprečili evaporacijo smo na vrh reakcijske mešanice odpipetirali 100 µL mineralnega olja (Sigma) ter inkubirali 2 uri v vodni kopeli pri 37 °C.

S postopkom fenolno / kloroformne ekstrakcije smo odstranili DNazo I:

- Tretirano RNA smo izpod mineralnega olja prenesli v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, 1,5 mL) in dodali 200 µL fenola (1 volumen).
- Po centrifugiranju (5 min, 12500 g) smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, 1,5 mL), dodali 200 µL kloroformata CHCl₃ (1 volumen) ter premešali na vrtinčniku.
- Po centrifugiranju (5 min, 12500 g) smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, 1,5 mL), dodali 400 µL EtOH (100%) (2 volumna) in 20 µL NaAc (3M, pH 4,8) (1/10 volumna), premešali na vrtinčniku ter inkubirali 30 min pri –20 °C.

Sledila je etanolna precipitacija RNA:

- Po centrifugiranju (10 min, 12500 g) smo supernatant zavrgli ter sediment sprali z 200 µL 70% EtOH.
- Po centrifugiranju (10 min, 12500 g) smo supernatant zavrgli ter sediment osušili pod lučjo (15 – 20 min).
- Sediment RNA smo resuspendirali v 50 µL vode brez RNaz in shranili pri –20 °C.
- Vse nadaljnje rokovanje z RNA je potekalo na ledu.

3.2.14 Preverjanje učinkovitosti tretiranja z DNazo z reakcijo PCR - 40 ciklov

Preverjanje učinkovitosti odstranjevanja vseh sledi DNA v 1 µl RNA je potekalo z reakcijo PCR volumna 25 µL in pomnoževanjem dela gena 16S rRNA po 40-ih ciklih. Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR volumna 24 µL, v katero smo pred reakcijo dodali 1 µL RNA. Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi negativno kontrolo reakcije PCR, v kateri smo RNA nadomestili z vodo PCR in pozitivno kontrolo reakcije PCR, v katero smo dodali DNA bakterij *C. jejuni*.

- Reakcijska mešanica PCR končnega volumena 25 µL je vsebovala:
 - 2,5 µL pufra 10xPCR (100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl),
 - 1,5 µL MgCl₂ (25 mM),
 - 2 µL dNTP (2 mM),
 - 0,25 µL pA (100 pmol)
 - 0,25 µL P16Sanja (100 pmol)
 - 0,15 µL U Taq DNA-polimeraze (5 U / µL) (PE Biosystems)
 - 16,85 µL ddH₂O DEPC
 - 1 µL RNA
- Mikrocentrifugirke z reakcijsko mešanicijo z uporabo začetnih oligonukleotidov pA in P16Sanja (preglednica 3.19) smo razvrstili v aparatu za PCR (GeneAmp DNA Thermal Cycler 2400, Perkin Elmer) in vzpostavili temperaturno – časovni protokol pomnoževanja:
 - 1 cikel: 95 °C, 60 sekund (denaturacija DNA),
 - 40 ciklov:
 - 95 °C za 15 sekund (denaturacija DNA),
 - 55 °C za 15 sekund (prileganje začetnih oligonukleotidov),
 - 72 °C za 30 sekund (podaljševanje začetnih oligonukleotidov);
 - 1 cikel: 72 °C za 8 minut (končno podaljševanje).

- Prisotnost pomnožkov smo dokazovali z elektroforezo na 1,5 % agaroznem gelu v pufru TAE 0,5x. Na gel smo nanesli še molekulski označevalec dolžin fragmentov (100 bp DNA ladder, Promega). Elektroforeza je potekala pri 10 V/ cm. Po končani elektroforezi smo gel 10 min barvali z raztopino EtBr, opazovali na UV transluminatorju ter računalniško dokumentirali.

3.2.15 Obratno prepisovanje in sinteza cDNA (kot I. faza RT-PCR ali predstopnja PCR v realnem času)

Prvo verigo cDNA smo z obratnim prepisom (reverzno transkripcijo) sintetizirali v reakcijski mešanici končnega volumna 20 ali 40 µL, odvisno od števila tarčnih genov. Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR volumna 38 µL, v katero smo pred reakcijo dodali 2 µL RNA. Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi negativno kontrolo sinteze cDNA, v katero nismo dodali encima reverzne transkriptaze ter negativno kontrolo reakcije PCR, pri kateri smo RNA nadomestili z vodo brez RNaz.

- Reakcijska mešanica končnega volumna 40 µL je vsebovala:
 - 8 µL MgCl₂ (25 mM),
 - 4 µL Pufer 10xPCR II (100mM Tris HCl pH 8,3; 500mM KCl),
 - 2 µL dNTP (20 mM)
 - 2 µL RNase inhibitor (20 U µl⁻¹),
 - 1 µL Multiscribe RT (50 U µl⁻¹),
 - 2 µL Random Hexamers, (50 µM),
 - 19 µL ddH₂O DEPC
- 2 µL RNA (obdelane z DNazo I).
- Dobro zaprte mikrocentrifugirke smo postavili v aparaturo za PCR (GeneAmp DNA Thermal Cycler 2400, Perkin Elmer) in vzpostavili temperaturno – časovni protokol inkubacije:
 - 10 minut pri sobni temperaturi (prileganje začetnih oligonukleotidov),
 - 15 minut pri 42 °C (sinteza prve verige cDNA),
 - 5 minut pri 99 °C (inaktivacija encima reverzne transkriptaze).
- Vzorce cDNA smo ohladili na ledu ter jih shranili pri -20 °C do uporabe z metodo RT-PCR ali PCR v realnem času.

3.2.16 Reakcija PCR (kot II. faza RT-PCR)

Pomnoževanje obratnega prepisa RNA (cDNA) z metodo RT-PCR je potekalo v reakcijski mešanici končnega volumna 25 µL. Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR volumna 20 µL, v katero smo pred reakcijo dodali 5 µL cDNA. Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi negativno kontrolo reakcije PCR, pri kateri smo cDNA nadomestili z vodo PCR in pozitivno kontrolo reakcije PCR, v katero smo dodali DNA bakterij *C. jejuni*.

Reakcijska mešanica PCR končnega volumna 25 µL je vsebovala:

- 2 µL pufra 10xPCR II (100mM Tris HCl pH 8,3; 500mM KCl),
- 1 µL MgCl₂ (25 mM),
- 0,25 µL začetnega oligonukletida 1 (100 pmol),
- 0,25 µL začetnega oligonukleotida 2 (100 pm) (preglednica 3.19),

- 0,125 µL Taq DNA-polimeraze (5 U µl⁻¹) (Applied Biosystems)
- 16,38 µL ddH₂O DEPC
- 5 µL cDNA.
- Mikrocentrifugirke z reakcijsko mešanico smo razvrstili v aparaturo za PCR (GeneAmp DNA Thermal Cycler 2400, Perkin Elmer) in vzpostavili temperaturno – časovni protokol pomnoževanja:
 - 1 cikel: 95 °C, 105 sekund (denaturacija nastalih produktov, aktivacija polimeraze);
 - 20, 25, 30, 35 ali 37 ciklov (odvisno od gena, glej poglavje 3.2.17.4):
 - 95 °C for 15 sekund (denaturacija DNA),
 - 55 ali 60 °C (odvisno od gena, glej poglavje 3.2.17.4) za 30 sekund (prileganje začetnih oligonukleotidov),
 - 72 °C za 45 sekund (podaljševanje začetnih oligonukleotidov);
 - 1 cikel: končno podaljševanje (72 °C for 7 min).
- Prisotnost pomnožkov smo dokazovali z elektroforezo na 1,5 % agaroznem gelu v pufru TAE 0,5x. Na gel smo nanesli še molekulski označevalec dolžin fragmentov (100 bp DNA ladder, Promega). Elektroforeza je potekala pri 10 V/ cm. Po končani elektroforezi smo gel 10 min barvali z raztopino EtBr, opazovali na UV transluminatorju ter računalniško dokumentirali.

3.2.16.1 Izbor genov

Z metodo RT-PCR smo ugotavljali izražanje genov: *dnaK* (*hsp70*), *groEL* (*hsp60*), *htpG*, *sodB*, *ahpC*, *flaA*, *rpoD* in 16S rRNA.

3.2.16.2 Optimizacije metode PCR

Pri optimizaciji metode PCR za spremljanje izražanja izbranih genov smo optimizirali temperaturo prileganja posameznih začetnih oligonukleotidov (55 ali 60 °C). Vidne razlike v intenziteti fragmentov pomnožkov DNA po gelski elektroforezi smo pridobili s spremjanjem števila ciklov pomnoževanja (20, 25, 30, 35 ali 37 ciklov). V primeru odsotnosti fragmentov smo število ciklov povečali, če pa se fragmenti po intenziteti niso razlikovali, smo število ciklov zmanjšali ter tako določili razlike v intenziteti fragmentov ter s tem v izražanju genov (preglednica 3.22).

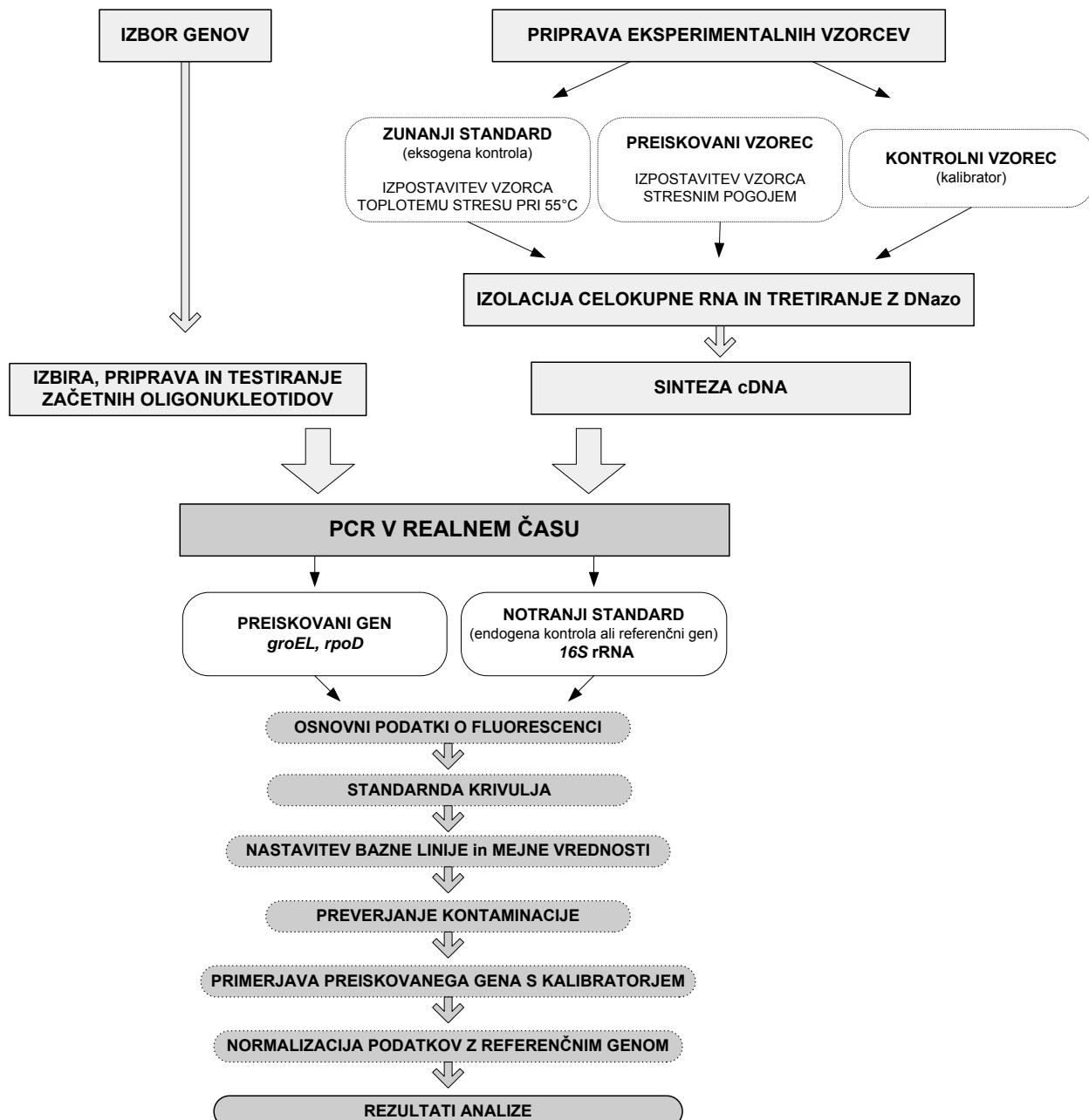
Preglednica 3.22: Optimizacija temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov pri metodi RT-PCR

Table 3.22: Optimisation of primer annealing in RT-PCR

Gen	Pari začetnih oligonukleotidov	Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov	Število ciklov pomnoževanja
<i>dnaK</i>	Fdna2, Rdna2	60 °C	25 – 35
<i>ahpC</i>	Fahp1, Rahp1	60 °C	37
<i>groEL</i>	Fgro2, Rgro2	55 °C	25 - 35
<i>sodB</i>	Fsod1, Rsod1	60 °C	25 - 30
<i>flaA</i>	Ffla1, Rfla1	60 °C	20 - 25
<i>htpG</i>	Fhtp1, Rhtp1	60 °C	35 - 37
16S rRNA	P16sAnja, PA	55 °C	25
<i>rpoD</i>	Frpo2, Rrpo2	55 °C	25

3.2.17 Metoda PCR v realnem času

Z metodo PCR v realnem času (shema 3.2) smo ugotavljali izražanje genov na nivoju mRNA, zato je bila vključena predstopnja obratne transkripcije, v kateri smo z reverzno transkriptazo prepisali izolirano mRNA v cDNA. To je bil izhodiščni material za pomnoževanje z reakcijo PCR.



Slika 3.2: Shematski potek priprave ter izvedbe metode PCR v realnem času.

Figure 3.2: Flow chart of realization steps in real-time PCR.

Pri relativni kvantifikaciji s standardno krivuljo smo izhodiščno koncentracijo tarčnega dela gena (*groEL*, *rpoD*) pri vseh vzorcih odčitali iz standardne krivulje. Vrednosti preiskovanih vzorcev smo nato delili z vrednostmi kontrolnih vzorcev (kalibratorjev). Kot kalibrator smo uporabili RNA, izolirano iz bakterij, ki niso bile izpostavljene stresnim pogojem. Količino tarčnega gena v preiskovanih vzorcih smo nato izrazili kot relativno vrednost glede na količino tarčnega gena v notranjem standardu ter tako normalizirali izražanje, prisotno pod normalnimi rastnimi pogoji (Mackay in sod., 2002). Kot notranji standard smo uporabili gen 16S rRNA.

3.2.17.1 Izbor genov

Z metodo PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje genov *groEL*, *rpoD* in 16S rRNA.

3.2.17.2 Izbira in priprava začetnih oligonukleotidov

Začetne oligonukleotide smo izbrali s programom Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). V program smo vnesli sekvence tarčnega gena iz baze podatkov PUBMED za bakterije *C. jejuni* ter predlaganim začetnim oligonukleotidom preverili sekundarno strukturo. Osnovne zahteve so bile:

- prileganje obeh začetnih oligonukleotidov pri talilni temperaturi Tm 60 °C,
- dolžina izbranih začetnih oligonukleotidov med 15 in 30 bp,
- vsebnost oligonukleotidov G in C med 20 – 80 %,
- vsebnost G/C med zadnjimi petimi nukleotidi na 3' koncu ne sme presegati števila 2 (tako zmanjšamo možnost nespecifičnega prileganja)
- velikost pomnožka PCR do 100 bp (krajši pomnožki se učinkoviteje pomnožujejo in so manj odvisni od pogojev reakcije)
- odsotnost sekundarnih struktur preko inter- ali intra-molekularnih spajanj.

Za vsak gen smo izbrali tri pare začetnih oligonukleotidov in sicer iz začetka, sredine ter konca tarčnega gena. Z izbranimi začetnimi oligonukleotidi smo pripravili relativno standardno krivuljo ter testirali morebitno spajanje začetnih oligonukleotidov v paru (tvorbo dimerov) preko analize talilne krivulje.

3.2.17.3 Priprava standardne krivulje

Kvantifikacijo izolirane RNA s PCR v realnem času smo izvedli s pomočjo relativne standardne krivulje. Za pripravo standardne krivulje smo uporabili zunanji standard, ki je bila v našem eksperimentu RNA kulture *C. jejuni* K49/4 iz stacionarne faze rasti, ki smo jo predhodno za nekaj minut izpostavili toplotnemu stresu (55 °C). S tem smo dosegli veliko koncentracijo tarčnega zaporedja in z razredčevanjem široko območje koncentracije relativne standardne krivulje, saj mora biti preiskovani vzorec v območju pripravljenе standardne krivulje.

Pred vsako analizo z metodo PCR v realnem času smo najprej pripravili osem razredčitev (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625; 0,0078125) v treh paralelkah tako, da smo določen volumen cDNA odpitetirali v novo mikrocentrifugirko ter dodali alikvoten volumen ddH₂O DEPC. Pripravljeno razredčeno cDNA smo nato dodali v reakcijo PCR v realnem času. Standardno krivuljo smo pripravili na isti mikrotiterski ploščici kot preiskovane in kontrolne vzorce, kar nam je omogočilo direkten izračun začetne količine tarčnega nukleotidnega zaporedja v vzorcih.

3.2.17.4 Reakcija PCR v realnem času

Za vsako reakcijo smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice PCR v realnem času, ki smo jo razdelili v luknjice mikrotiterske plošče s 96 jamicami po 20 µL v vsako luknjico. Pred reakcijo smo v vsako luknjico dodali še 5 µL cDNA.

- Reakcijska mešanica PCR v realnem času končnega volumna 25 µL je vsebovala:
 - 0,08 µL začetnega oligonukleotida 1 (300 nmol),
 - 0,08 µL začetnega oligonukleotida 2 (300 nmol) (preglednica 3.20),
 - 12,5 µL Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix 2X (ABgene)
 - 7,35 µL ddH₂O DEPC
 - 5 µL cDNA.
- Mikrotitersko ploščo s pripravljenou standardno krivuljo in vzorci smo zatesnili z optično prepustno folijo in jo prenesli v ABI Prism 7000 sekvenčni detektor (Applied Biosystems) in vzpostavili temperaturno – časovni protokol pomnoževanja:
 - 1 cikel: 95 °C, 15 minut (aktivacija polimeraze DNA)
 - 40 ciklov:
 - 95 °C za 15 sekund (denaturacija DNA),
 - 60 °C za 1 minuto (prileganje in podaljševanje začetnih oligonukleotidov).

3.2.17.5 Preverjanje kontaminacije vzorcev RNA z genomsko DNA

V vsako mikrotitersko ploščo smo vključili še dve kontroli. Prvo, ki smo jo imenovali negativna kontrola sinteze cDNA, smo pripravili tako, da smo vzorcu pri sintezi cDNA dodali vse reagente RT-PCR, razen reverzne transkriptaze. Drugo, ki smo jo imenovali negativna kontrola reakcije PCR, pa smo pripravili tako, da smo dodali vse reagente RT-PCR, a brez tarčnega zaporedja. Kakršenkoli produkt PCR v primeru obeh kontrol je znak kontaminacije enega ali več reagentov z genomsko DNA. Če je absolutna vrednost kontrole sinteze cDNA večja od absolutne vrednosti negativne kontrole reakcije PCR, pa je fluorescentna kontaminacija z genomsko DNA prisotna v vzorcu ali termobloku instrumenta PCR v realnem času.

3.2.17.6 Obdelava rezultatov

Podatki o intenziteti fluorescence, ki smo jih dobili po končani analizi z metodo PCR v realnem času, so bili pridobljeni iz ciklov PCR med eksponentnim pomnoževanjem reakcije PCR, torej pri optimalnih pogojih in v zanesljivem razmerju med intenziteto fluorescence ter začetno količino tarčnega gena v vzorcih (Mackay in sod., 2002). Po končani reakciji PCR smo osnovne podatke o intenziteti fluorescence obdelali s programom SDS 2.1 (Applied Biosystem). Le-ta je avtomatično beležil osnovne podatke o intenziteti fluorescence, kot kopiranje pomnožkov med vsakim ciklom reakcije PCR, ter jih prikazal v krivulji pomnoževanja (intenziteta fluorescence v razmerju s številom ciklov).

Z ročno nastavljivo bazne linije smo izboljšali natančnost analize predvsem pri genu 16S rRNA, ki je bil v začetnih vzorcih prisoten v velikih količinah. Program je samodejno nastavil mejno vrednost kot mnogokratnik 10 nad vrednostjo standardne deviacije povprečne fluorescence bazne linije. Preko metode standardne krivulja smo mejno vrednost postavili v logaritemskem prikazu krivulje pomnoževanja na najbolj linearinem

delu eksponente krivulje in s tem izboljšali tudi naklon standarne krivulje ter korelacijski koeficient.

Program SDS je samodejno normaliziral vsak signal fluorescentnega barvila tako, da je izračunal relativno vrednost glede na signal pasivnega referenčnega barvila (ROX), ki je bil komponenta uporabljene mešanice ABsoluteTM QPCR SYBR[®] Green Master Mix. Program je s pomočjo izračunane standardne krivulje za tarčne gene določil vrednost Ct vzorca ter izračunal začetno količino tarčnega zaporedja v vsakem vzorcu. Ko smo pregledali in morebiti popravili vse ustrezne nastavitev, smo dobljene rezultate prenesli v program Microsoft Excel. V prvi stopnji smo izračunano količino tarčnega zaporedja v preiskovanem vzorcu izpostavljenemu stresnim pogojem delili z izračunano količino tarčnega zaporedja v kalibratorju ter na ta način izračunali n-kratno povečanje/zmanjšanje prepisa preiskovanih genov glede na tretiran vzorec. Dobljene vrednosti tarčnih genov *groEL* in *rpoD* smo nato delili z dobljenimi vrednostmi gena 16S rRNA, ki nam je služil kot endogena kontrola. Na ta način smo izničili še razlike v količini celokupne cDNA, ki smo jo dodali v reakcije. Vzorcem, ki smo jih naredili v dveh ali več ponovitvah, smo izračunali povprečno vrednost in standardno deviacijo ter jih predstavili v grafih.

Primer izračuna:

Vzorec 1

Tarčni gen <i>groEL</i>	CT	ng	
Preiskovani vzorec (izpostavljen stresu):	23	$\frac{7,050 \text{ ng}}{0,531 \text{ ng}} = 13,28$	
Kontrolni vzorec (kalibrator):	26		
Referenčni gen 16S rRNA			
Preiskovani vzorec (izpostavljen stresu):	6,5	$\frac{0,623 \text{ ng}}{0,756 \text{ ng}} = 0,824$	INDUKCIJA
Kontrolni vzorec (kalibrator):	6		

Vzorec 2

Tarčni gen <i>groEL</i>	CT	ng	
Preiskovani vzorec (izpostavljen stresu):	26,3	$\frac{0,462 \text{ ng}}{0,531 \text{ ng}} = 0,870$	
Kontrolni vzorec (kalibrator):	26		
Referenčni gen 16S rRNA			
Preiskovani vzorec (izpostavljen stresu):	6,5	$\frac{0,623 \text{ ng}}{0,756 \text{ ng}} = 0,824$	NI INDUKCIJE
Kontrolni vzorec (kalibrator):	6		

3.2.18 Statistična obdelava rezultatov

Eksperimente smo opravili v dveh ali več neodvisnih ponovitvah. Pri spremeljanju znotracelične oksidacije in encimske aktivnosti smo posamezno meritev dodatno opravili v dveh oz. treh paralelkah. Na slikah z rezultati smo prikazali izračunane povprečne vrednosti in standardne odklone meritev, razen pri krivuljah, ki se nanašajo na inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika (zaradi boljše preglednosti). Vrednosti v slikah izražanja genov smo prikazali v relativnih vrednostih, preračunanih glede na osnovno kulturo oz. stradano kulturo kot kontrolo. Ta je bila odvzeta ob istem času kot vzorci, izpostavljeni stresu.

Enačba za izračun povprečne vrednosti (Adamič, 1989):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots (20)$$

- \bar{x} = povprečna vrednost
 x_i = posamezna meritev
 n = število meritev

Enačba za izračun standardnega odklona:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \dots (21)$$

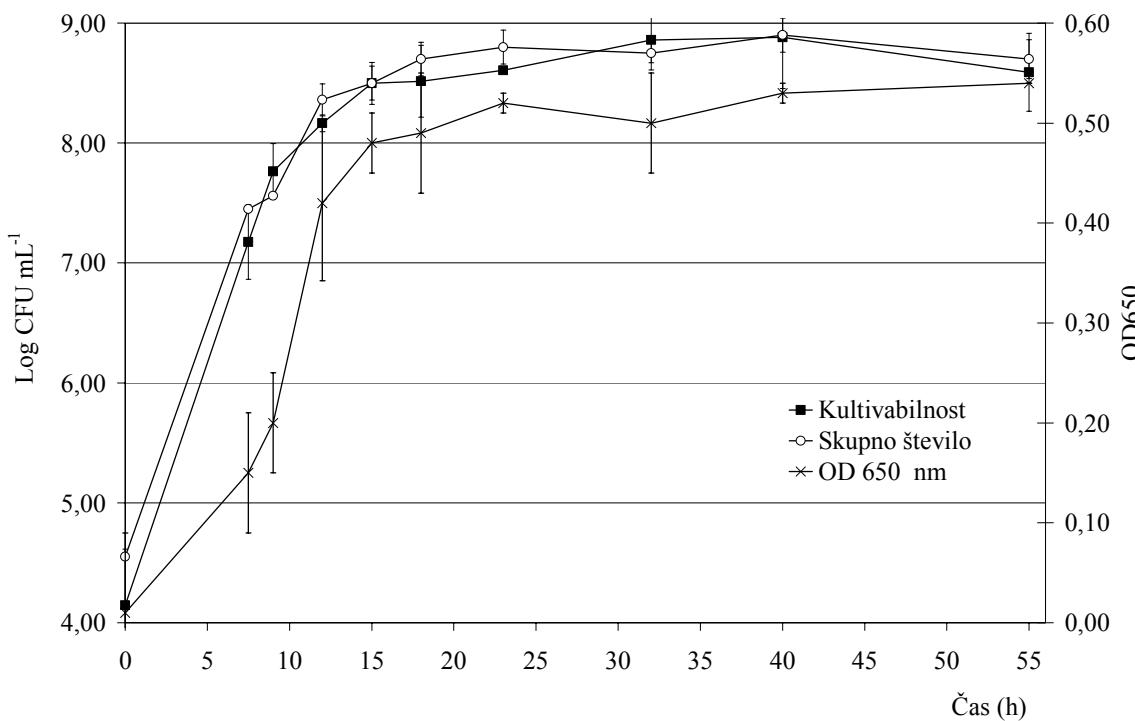
- SD = standardni odklon
 n = število meritev
 x_i = posamezna meritev
 \bar{x} = povprečna vrednost

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Izhajajoč iz 4 osnovnih delovnih hipotez, v katerih smo predpostavili vpliv temperaturnih in oksidativnih stresov na fiziologijo, izražanje genov ter metabolizem, smo ugotavljali stresni odziv bakterij *C. jejuni* na različnih nivojih. Fiziologijo bakterij smo ugotavljali preko morfologije, živosti in kultivabilnosti. Vpliv stresnih pogojev na metabolizem smo ugotavljali preko znotrajcelične oksidacije ter aktivnosti encimov katalaze in superoksid dismutaze. Na nivoju transkripcije smo z metodama obratnega prepisa in PCR (RT-PCR) ter PCR v realnem času spremljali izražanje toplotnega in oksidativnega stresa, stradanja, virunečnega gena ter hišnih genov.

4.1 RASTNA KRIVULJA

Rast *C. jejuni* K49/4 smo ugotavljali z merjenjem optične gostote pri 650 nm (OD_{650}) ter spremjanjem števila kultivabilnih celic ($\log CFU \text{ mL}^{-1}$) in števila živih celic (slika 4.1). Na podlagi tega smo določili čas inkubacije, v katerem kultura doseže eksponentno in preide v stacionarno fazo rasti. Eksponentno fazo doseže kultura po 9 h inkubacije, v stacionarno pa preide po 15 h inkubacije v optimalnih pogojih. Kultura je stabilna vsaj do 40 h inkubacije, nato začne število živih celic rahlo upadati.

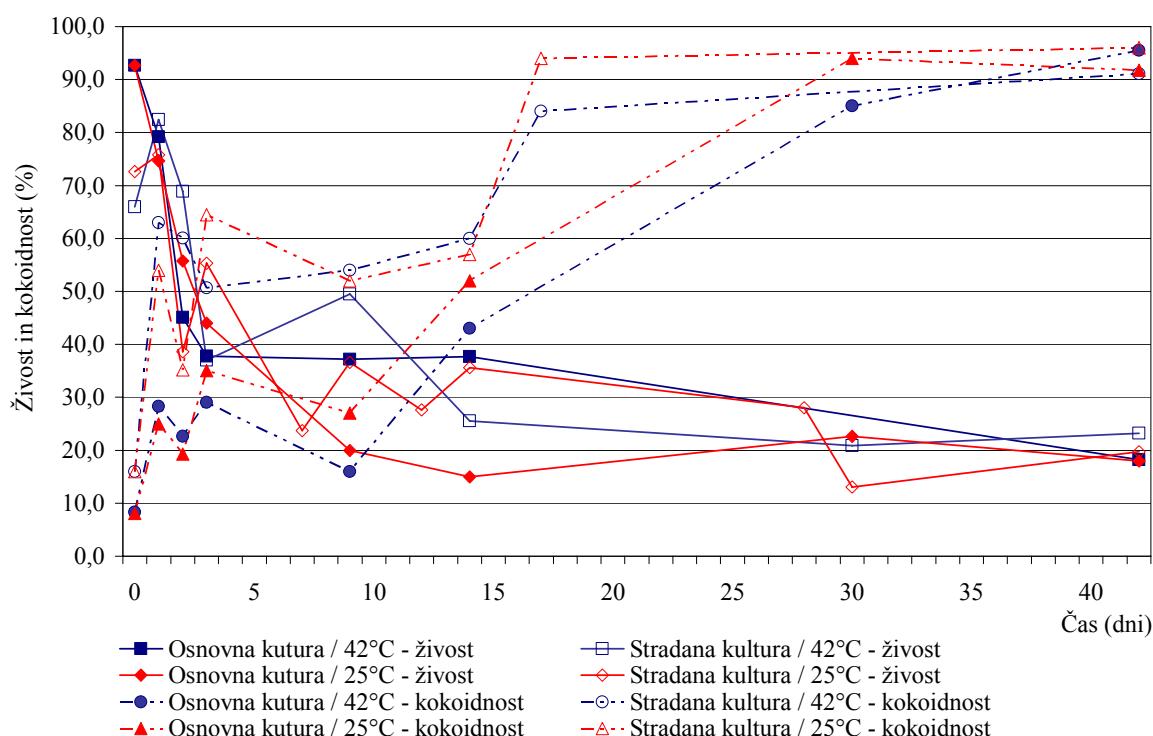


Slika 4.1: Rastna krivulja seva *C. jejuni* K49/4. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti vsaj treh neodvisnih ponovitev.

Figure 4.1: Growth curve of *C. jejuni* k49/4. Results are presented as mean values from at least three independent measurements.

4.2 VPLIV NIZKE TEMPERATURE IN/ALI STRADANJA NA BAKTERIJE *C. jejuni*

Ugotavljali smo vpliv nizke temperature hranljivega gojišča in v razmerah stradanja na živost, kultivabilnost ter spremembo morfologije celic med 42-dnevno inkubacijo. Celice *C. jejuni* iz eksponentne faze (slika 4.2) in stacionarne faze rasti (slika 4.3) smo inkubirali pri 25 °C in 42 °C, torej pri nizki in optimalni temperaturi rasti, pri čemer smo raziskovali vpliv nizkih temperatur ter kombinirani vpliv stradanja in nizkih temperatur. Pričakovali smo povečano odpornost stradanih celic. Rezultati poglavja 4.2 so zbrani in objavljeni v Zborniku referatov simpozija z mednarodno udeležbo (Klančnik in sod., 2003).

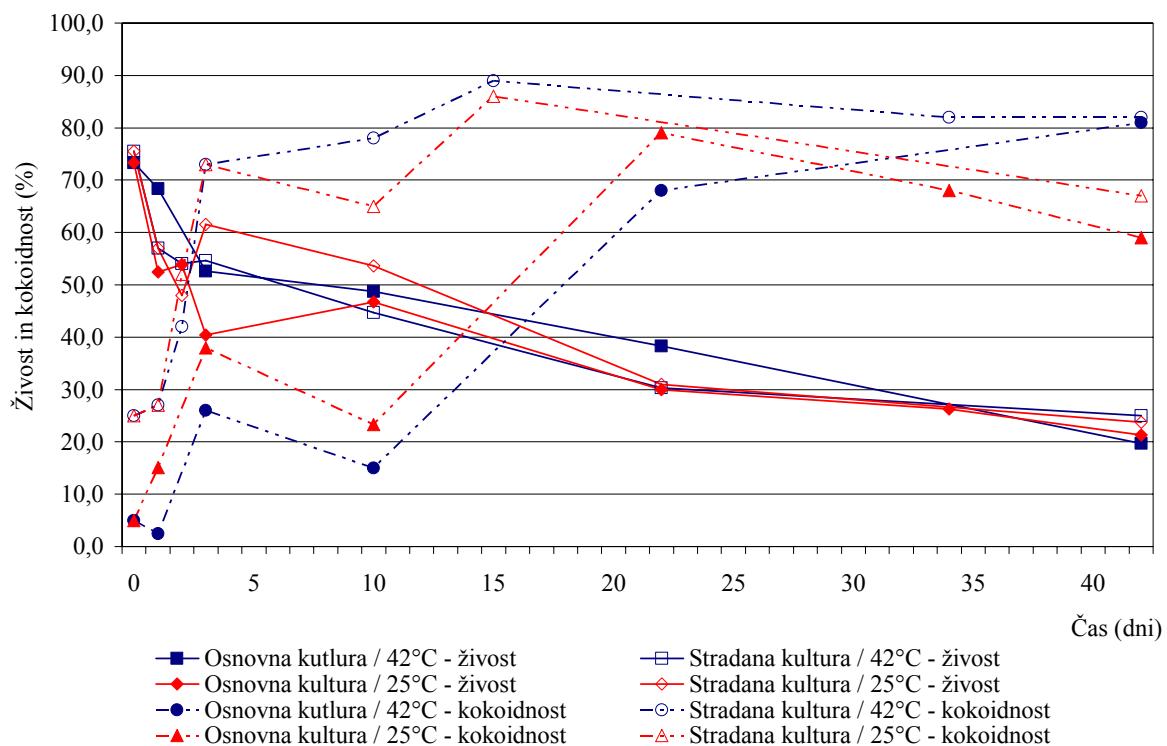


Slika 4.2: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne ter stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med 42-dnevno inkubacijo pri optimalni (42 °C) in nizki temperaturi (25 °C). Standardne deviacije niso prikazane.

Figure 4.2: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed and starved *C. jejuni* cells from the exponential growth phase, during 42 days exposure to optimal (42 °C) and low temperature (25°C). Standard deviations are not presented.

4.2.1 Živost celic

Rezultati ugotavljanja živosti stradane kulture so skladni z objavami o ohranitvi živosti celic od nekaj dni do nekaj mesecev (Rollins in Colwell, 1986; Buswell in sod., 1998; Talibart in sod., 2000; Baffone in sod., 2006). Vzporedno ugotavljanje števila kultivabilnih in živih celic je pokazalo, da so celice dlje ohranile živost kot kultivabilnost. Stopnja preživelosti je pri kulturah v vseh omenjenih stresnih pogojih s časom inkubacije padala, najhitreje v prvih dneh. Žive celice smo odkrili tudi po 42 dneh poskusa (15 - 25 % začetne populacije), tako v gojišču, kot okolju stradanja. Preživelost kulture iz stacionarne faze je bila rahlo boljša (sliki 4.2 in 4.3), prav tako preživelost stradane kulture. Nekoliko hitrejše odmiranje celic smo opazili pri kulturah, izpostavljenih nizkim temperaturam (25°C), ne glede na medij inkubacije. Najpočasneje je odmirala stradana kultura pri 42°C , najhitreje pa kultura v gojišču Preston pri 25°C (sliki 4.2 in 4.3).



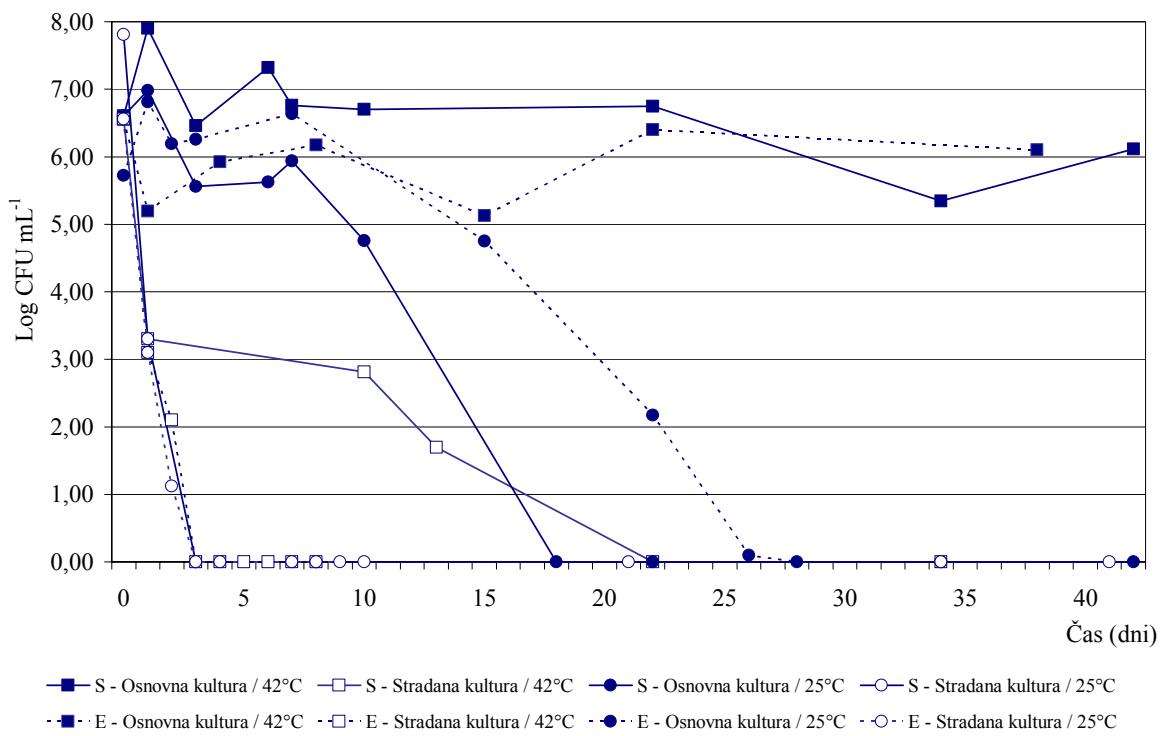
Slika 4.3: Živost (%) in kokoidnost (%) celic osnovne ter stradane kulture *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti med 42-dnevno inkubacijo pri optimalni (42°C) in nizki temperaturi (25°C). Standardne deviacije niso prikazane.

Figure 4.3: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed and starved *C. jejuni* cells from the stationary growth phase, during 42 days exposure to optimal (42°C) and low temperature (25°C). Standard deviations are not presented.

Med podaljšano inkubacijo *C. jejuni* smo, tako kot Kelly in sod. (2001) opazili nihanje števila živih in kultivabilnih celic v prvih dneh (slike 4.2 - 4.4). Naraščanju kultivabilnosti in vstopu celic v stacionarno fazo je sledilo nenadno zmanjšanje kultivabilnosti za 3 log stopnje. Po 3 – 4 dneh je kultivabilnost ponovno narasla (Martinez-Rodriguez in sod., 2004). Avtorji (Martinez-Rodriguez in sod., 2004; Martinez-Rodriguez in Mackey, 2005) so to pojasnili s pojavom novega seva bakterij. Le-tega so izolirali in s karakterizacijo pokazali razlike glede na starševski sev: boljšo odpornost proti oksidativnemu in temperaturnemu stresu ter izgubo bička in s tem gibljivosti. Slednje lahko predstavlja enega od načinov varčevanja z energijo in samo začasno prilagoditev na stresne razmere. Druga možnost je, da novo nastali sev nastane s spontanimi mutacijami. Le-ta se na signale okolje ne odziva in bolje raste v izrabljenem mediju ter tako preraste starševski sev. Zambrano in sod. (1993) so pojav takih mutantov pri bakterijah *E. coli* prvič opazili in ga poimenovali s kratico GASP (ang. growth advantage in stationary phase). Kelly in sod. (2003) pa so ob podobnem pojavu sklepali na do danes nepojasnjeno prisotnost mutiranih celic že v začetni populaciji. Celice *C. jejuni* so ob odsotnosti popravljalnih mehanizmov zelo dovzetne za genetske spremembe, ki jim s stalnim selekcioniranjem in izrivanjem prvotne populacije izboljšajo preživetje v neugodnih pogojih (Martinez-Rodriguez in sod., 2004).

4.2.2 Kultivabilnost in kokoidnost celic

Celice so ostale v gojišču pri 42 °C kultivabilne vseh 42 dni, čeprav je v tem času prešlo v kokoidno obliko že 90 % celic (slike 4.2 - 4.4). Stresni pogoji so prehod v nekultivabilno stanje pospešili, še posebno pri celicah iz eksponentne faze rasti. Te so po izpostavitvi stresnim razmeram obdržale kultivabilnost le nekaj dni (slika 4.4). Podobne rezultate so objavili Rollins in Colwell (1986) ter Medema in sod. (1992), ki so opazovali izgubo kultivabilnosti pri celicah *C. jejuni*, inkubiranih pri 37 °C in 25 °C. Dlje so ostale kultivabilne celice iz stacionarne faze rasti, če so bile izpostavljene le enemu od stresov (slika 4.4). Iz slike 4.4 je tudi razvidno, da je na izgubo kultivabilnosti bolj vplivalo stradanje kot nizka temperatura (25 °C). Stradane celice pri 25 °C so postale nekultivabilne že pri 40 % kokoidnosti.



Slika 4.4: Kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne ter stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) in stacionarne (S) faze rasti med 42-dnevno inkubacijo pri optimalni (42°C) in nizki temperaturi (25°C). Standardne deviacije niso prikazane.

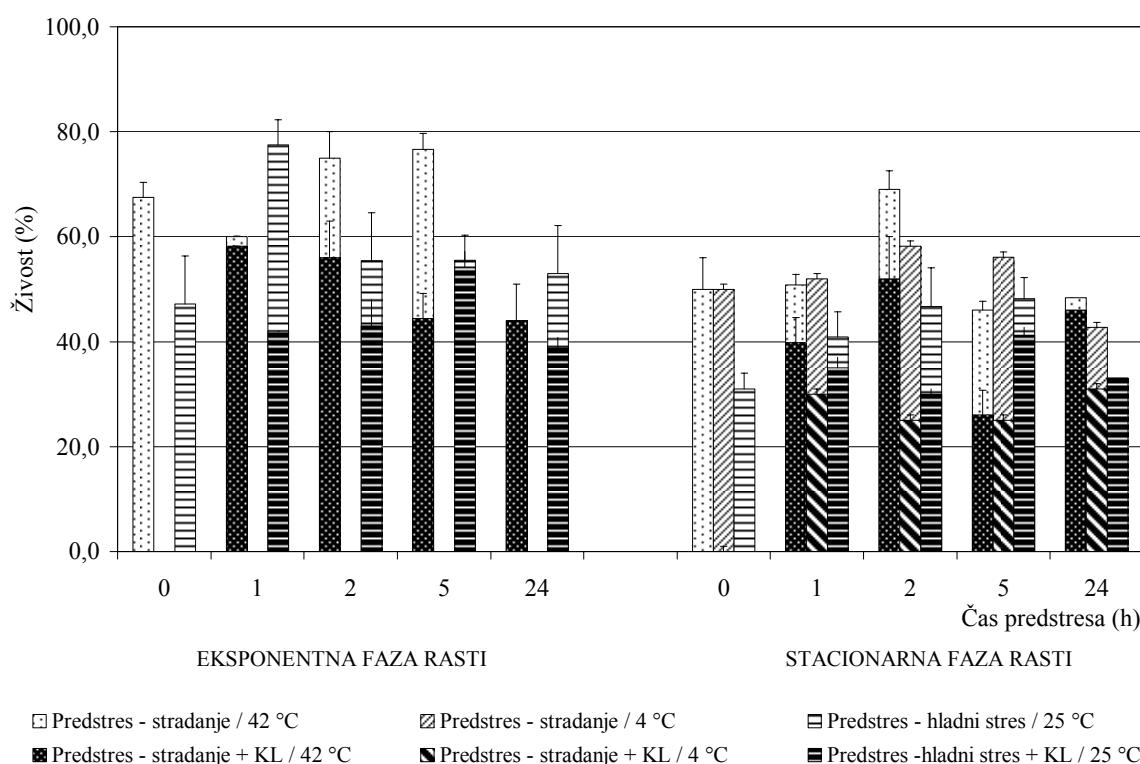
Figure 4.4: Culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) of fed and starved *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase, during 42 days exposure to optimal (42°C) and low temperature (25°C). Standard deviations are not presented.

Po izpostavitvi kampilobakterjev hladnemu stresu in/ali stradanju pride do zmanjšanja števila živih celic in kultivabilnosti, kar se odrazi tudi v spremenjeni celični morfologiji (sliki 4.2 in 4.3). V začetni fazi inkubacije so imeli kampilobakterji značilno spiralno obliko, ki pa je postopoma prehajala v kokoidno. Prehod iz spiralne v kokoidno obliko je bil ne glede na rastno fazo hitrejši pri stradani kulturi in ne glede na stres pri celicah iz stacionarne faze rasti. Podobno kot pri kultivabilnosti ima torej večji vpliv na morfologijo celic stradanje, kot pa nizka temperatura.

V nasprotju z dokazi o povezanosti nekultivabilnosti celic s morfološkimi spremembami Lazaro in sod. (1999) ugotavljajo, da prehod v kokoidno obliko ni vedno povezan z izgubo kultivabilnosti. Mnogi avtorji tudi dokazujejo, da je zveza med morfologijo, izgubo živosti in kultivabilnostjo sevno specifična (Chan in sod., 2001; Lazaro in sod., 1999; Federighi in sod., 1998). Kusters in sod. (1997) so pri bakterijah *Helicobacter pylori* ugotovili, da so celice izgubile kultivabilnost, čeprav je bilo v spiralni obliki še 50 % celic in predlagali, da sta izguba kultivabilnosti in morfološka transformacija sicer povezana, a ločena procesa. Podobno lahko iz rezultatov našega poskusa sklepamo, da prehod v kokoidno obliko ni strogo povezan z izgubo kultivabilnosti.

4.3 VPLIV HLADNEGA PREDSTRESA IN/ALI STRADANJA NA TOPLITNO ODPORNOST BAKTERIJ C. JEJUNI

V začetni stopnji eksperimentalnega dela smo preizkušali stresni odziv, osnovne in/ali stradane kulture s hladnim predstresom ali brez njega po 3 minutni izpostavitvi celic temperaturi 55 °C. Kot predstres smo torej uporabili stradanje pri 4 in 42 °C za 1 – 24 h ter hladni stres pri 25 °C, prav tako za 1 – 24 h (slika 4.5). Pri tem smo pričakovali največjo toplotno odpornost pri predhodno stradanih celicah, izpostavljenih dodatnemu toplotnemu stresu.



Slika 4.5: Vpliv stradanje pri 4 ali 42 °C ter hladnega predstresa z ali brez dodatka kloramfenikola (KL) na živost (%) celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti po toplotnemu stresu (55 °C, 3 min). Napake predstavljajo standardne deviacije

Figure 4.5: Effects of starvation at 4 or 42 °C and cold prestress with or without chloramphenicol added (KL) on the viability (%) of *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase before heat shock (55 °C, 3 min). Error bars indicate standard deviations

V okolju so celice pogosto izpostavljene stradanju in različnim temperaturam. Njihova sposobnost zaznavanja in odgovora na spremembe pa jim omogoča večjo odpornost in preživetje (McDougald in sod., 1998). Čas stradanja, ki je potreben za sintezo zaščitnih proteinov celice za najboljše preživetje v stresnih pogojih, se med bakterijami razlikuje. Za bakterije *E. coli* navaja Matin (1992) 4 h, za sev *Vibrio* sp. S14 pa je potrebno 10 h stradanja, da se razvije maksimalna odpornost (Nyström in sod., 1992). Kampilobakterji naj bi že po prvih nekaj urah stradanja sintetizirali proteine, ki ščitijo celice pred neugodnimi razmerami (Cappelier in sod., 2000).

Celice iz stacionarne faze rasti, stradane pri 42 °C, so se obnašale podobno kot celice, stradane pri 4 °C. Toplotna odpornost je bila največja po 2 in 5 urnem stradanju, in se je z daljšanjem časa stradanja zmanjševala. Dodatek antibiotika kloramfenikola, ki naj bi zaviral sintezo zaščitnih proteinov, zmanjša odpornost celicam na visoko temperaturo, saj ob dodatku kloramfenikola preživi manj celic. Ta razlika je po 24-ih urah stradanja že zelo majhna. 24 urno stradanje (ne glede na temperaturo inkubacije) se je izkazalo kot zelo letalen stres, predvsem za celice stacionarne faze rasti. Pri stradani kulturi celic iz stacionarne faze rasti z dodatkom kloramfenikola ter inkubirani pri 4 °C, preživi manj celic kot pri kulturi s kloramfenikolom ter inkubirani pri 42 °C. Tu se kaže kombiniran vpliv nizke temperature in dodanega antibiotika, kar lahko negativno vpliva na preživetje celic (slika 4.5).

Odpornost na topotni stres je bila pri celicah iz eksponentne faze rasti večja kot pri celicah iz stacionarne faze rasti (slika 4.5), kar se ujema tudi z objavami, ki nakazujejo, da so celice v tej fazi bolj aktivne in tvorijo več zaščitnih dejavnikov (Kelly in sod., 2001). Kultura iz eksponentne faze, stradana pri 42 °C, ima največjo stopnjo preživetja pri 5 urnem stradanju in šele potem stopnja preživelosti pada. Po 24-urnem stradanju ima že zelo zmanjšano stopnjo preživelosti, torej le kratkotrajno stradanje celicam poveča odpornost.

Večji delež mrtvih celic iz stacionarne faze po izpostavitvi stresu je lahko povezan tudi s poškodbami membrane. Kelly in sod. (2001) so dokazali, da so bile subletalno poškodovane celice iz stacionarne faze nezmožne rasti v prisotnosti 1 % NaCl, medtem ko so se celice iz eksponentne faze lahko razmnoževale. Razložili so, da je izguba živosti povezana s poškodbami membrane v stacionarni fazi. Podobno bi lahko komentirali slabše preživetje topotne izpostavitve celic iz stacionarne faze, razvidne iz slike 4.5. Predhodna izpostavitev celic hladnemu stresu pri 25 °C ni bistveno povečala topotne odpornosti kampilobakterjev (slika 4.5). Kultura iz eksponentne faze, predvsem po 1-urni izpostavitvi hladnemu predstresu, je bila bolj odporna na topotni stres kot kultura iz stacionarne faze rasti. Pri slednji je bila topotna odpornost najbolj povečana med 2 in 5 uro predhodnega hladnega stresa.

Povečanje topotne odpornosti je bilo pri stradanih celicah večje kot pri celicah, izpostavljenih hladnemu predstresu. Povzamemo lahko, da je sinteza proteinov ob kratkotrajnem stradanju (2 – 5 h) verjetno razlog za povečano topotno odpornost, zato smo kot optimalni predstres izbrali 5-urno stradanje pri temperaturi 42 °C in ga uporabljali v nadaljnji eksperimentih. Pri tem smo se zanašali predvsem na povečano odpornost celic iz eksponentne faze rasti, saj so te pokazale večjo odpornost (ne glede na vrsto predstresa) kot celice iz stacionarne faze rasti.

4.4 VPLIV KRATKOTRAJNEGA TOPLITNEGA IN OKSIDATIVNEGA STRESA NA BAKTERIJE *C. JEJUNI*

Preučevali smo vpliv kratkotrajnega topotnega in oksidativnega stresa na spremembe morfologije, živosti, kultivabilnosti ter izražanja genov pri bakterijah *C. jejuni*. Tvorbo zaščitnih proteinov smo zavrli z dodatkom inhibitorja sinteze proteinov (kloramfenikol) ter ugotavliali odziv 5 h stradane kulture na dodatne stresne pogoje. Spremembe smo ugotavliali pri osnovni in 5 h stradani, ter v primerih izražanja genov tudi na 24 h stradani kulti iz eksponentne ter stacionarne faze rasti. Topotni stres smo izvedli s 3-minutno inkubacijo celic pri 55 °C, oksidativni stres pa na dva načina: a) z 10-minutno inkubacijo v 3mM vodikovem peroksidu in b) s 5 h ter 24 h inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika.

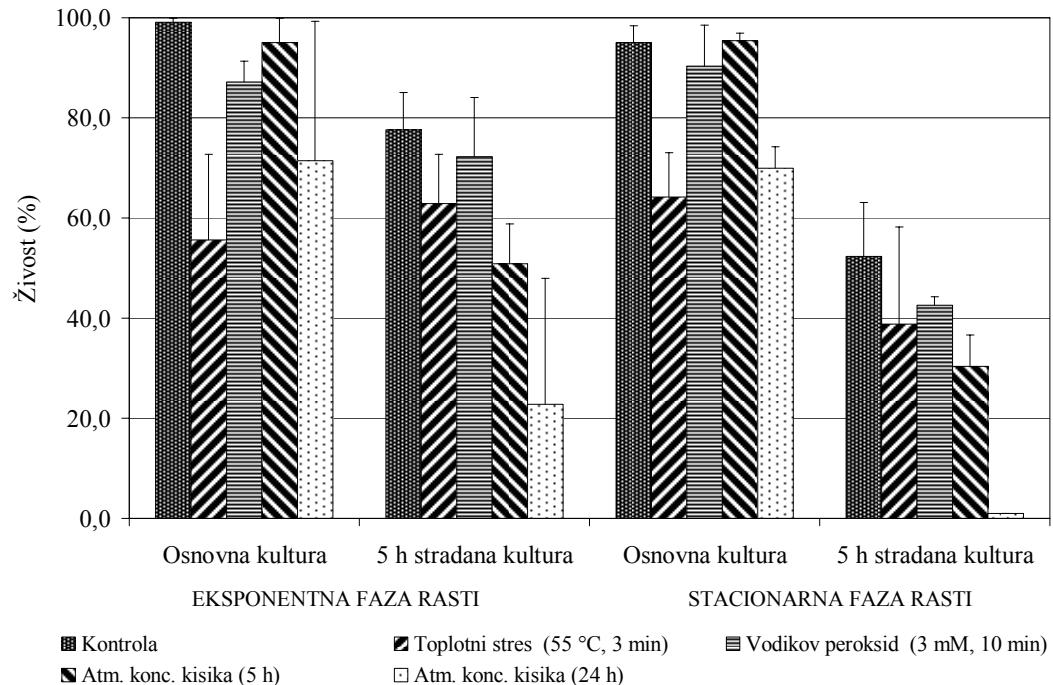
Pod omenjenimi stresnimi pogoji smo celicam *C. jejuni* iz obeh rastnih faz določili živost, kokoidnost, kultivabilnost ter spremembe izražanja izbranih genov stresnega odziva z metodama RT-PCR in PCR v realnem času. Pričakovali smo, da bomo potrdili vpliv različnih stresov tudi na nivoju izražanja genov. Rezultati poglavja 4.4 so zbrani in objavljeni v publikaciji (Klančnik in sod., 2006)

4.4.1 Živost, kokoidnost in kultivabilnost celic

Glede na začetno število celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti je vidno značilno zmanjšanje števila živih celic pri vseh uporabljenih stresih. Topotni stres osnovne kulture je bil za celice *C. jejuni* iz obeh faz bolj uničujoč kot peroksidni ter kisikov stres. Najbolj letalen je bil za celice topotni stres pri 55 °C, saj je živost padla za 30 % pri celicah iz eksponentne faze in za 40 % pri celicah iz stacionarne faze (slika 4.6). To smo potrdili tudi z največjim padcem kultivabilnosti po topotnem stresu pri 55 °C, medtem ko pri ostalih stresih osnovne kulture padec kultivabilnosti ni bil značilno izražen (slika 4.8). Murphy in sod. (2003) so poročali, da ima topotni stres (3 min, 55 °C) manjši učinek na kultivabilnost celic iz eksponentne faze rasti, kar smo pokazali tudi z našimi rezultati. S tem smo potrdili že opisano fiziološko posebnost, da so celice rodu *Campylobacter* v stacionarni fazi rasti bolj občutljive na stres od celic iz eksponentne faze rasti (Park, 2002).

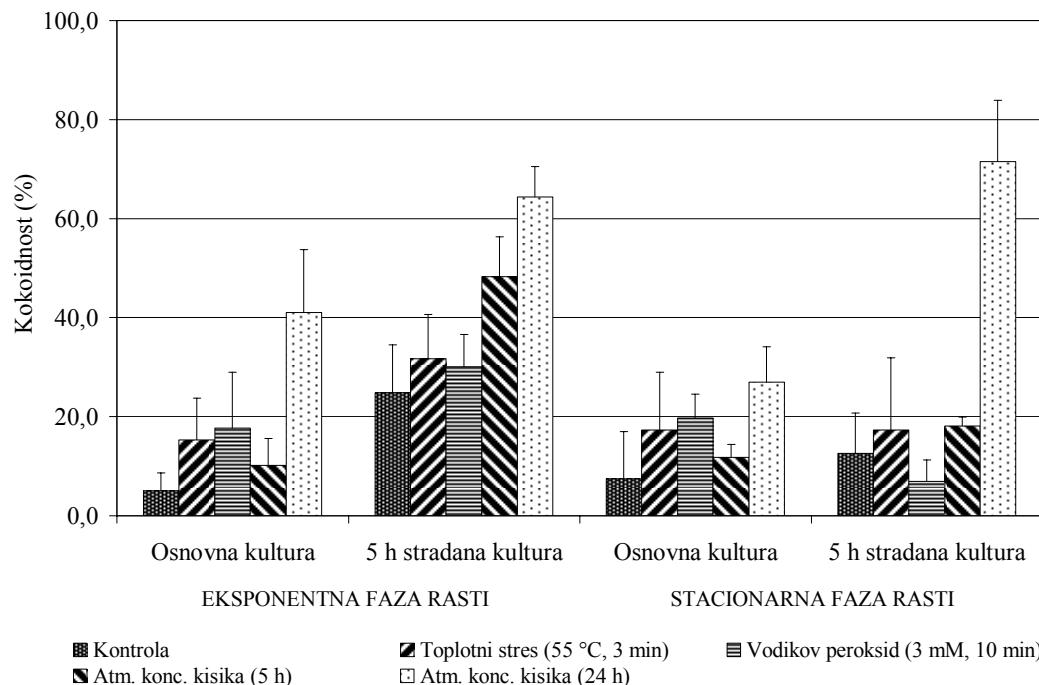
Če primerjamo podatke o zmanjšanju kultivabilnosti kot merilu stresnega učinka na celice, se naši podatki bolje ujemajo z literurnimi citati kot v primeru primerjave živosti. Zanimivo je, da večina avtorjev kot merilo živosti uporablja določanje števila kolonij na ploščah, torej kultivabilnost.

Izpostavitev celic osnovne kulture topotnemu, peroksidnemu in kisikovemu stresu je sprožilo transformacijo celic iz spiralne v kokoidno obliko. Med celicami iz eksponentne in stacionarne faze ni bilo opaznih bistvenih razlik, razen večjega deleža kokoidnih celic pri kulti iz eksponentne faze, izpostavljene 24 h atm. konc. kisika (40 % kokoidnost) (slika 4.7).



Slika 4.6: Živost (%) osnovne in 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti pred in po izpostavitvi topotnemu ali oksidativnemu stresu. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.6: Viability (%) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase, before and after heat or oxidative stress. Error bars indicate deviations.

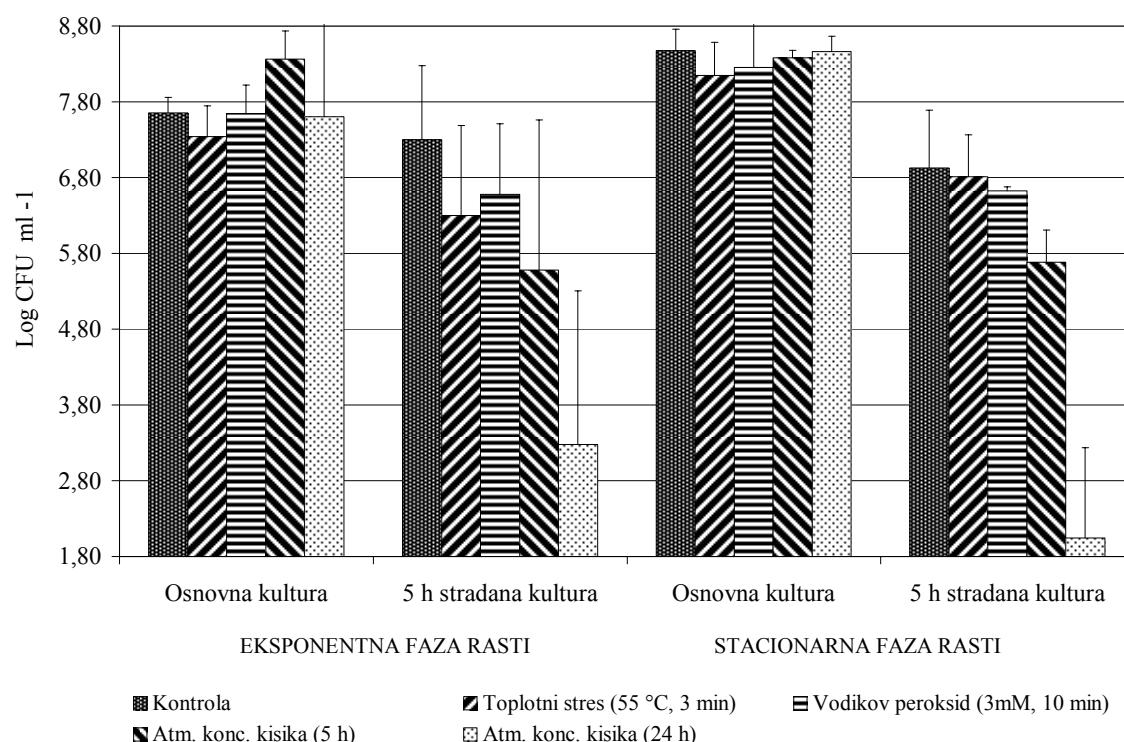


Slika 4.7: Kokoidnost (%) osnovne in 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti pred in po izpostavitvi topotnemu ali oksidativnemu stresu. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.7: Coccoid cell formation (%) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase, before and after heat or oxidative stress. Error bars indicate standard deviations.

Predhodno 5-urno stradanje je po izpostavitvi nadaljnjam stresom, predvsem pri celicah iz stacionarne faze povzročilo velik padec števila živih celic (za približno 50 %) (slika 4.6). Preživelost celic 5 h stradane kulture po topotnem, peroksidnem in kisikovem stresu je bila spet najvišja pri celicah iz eksponentne faze rasti. V povprečju je bilo med topotnim stresom uničenih le 10 – 15 % stradanih celic in 30 – 40 % celic, preskrbljenih s hranili. Peroksidni stres je bil manj uničajoč od topotnega in 24-urnega kisikovega stresa. Podobna razmerja so se pokazala tudi pri oceni števila kultivabilnih celic. Kultivabilnost se je značilno bolj zmanjšala pri celicah 5 h stradane kulture kot pri celicah osnovne kulture (slika 4.8).

Sprememba morfologije iz spiralne v kokoidno obliko je bolj očitna pri celicah iz eksponentne faze rasti (slika 4.7). Višja kokoidnost in živost 5 h stradane kulture iz eksponentne faze rasti po topotnem in kisikovem stresu (za 20 % ali več) kaže na možnost, da so celice kokoidne oblike nastale kot odgovor na stres in da so zaradi tega na stres tudi odpornnejše.



Slika 4.8: Kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne in 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti pred in po izpostavitvi topotnemu ali oksidativnemu stresu. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.8: Culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase, before and after heat or oxidative stress. Error bars indicate standard deviations.

Različni literaturni viri navajajo vpliv predhodnega stradanja ter navzkrižno zaščito proti nadaljnji izpostavitvi stresnim pogojem. Vendar je omenjen pojav najverjetneje odvisen od vrste in seva bakterija ter različnih pogojev, kot so tipi omejitve hranil, celična gostota, itd. Povečanje odpornosti proti topotnemu stresu predhodno stradane kulture je v literaturi znano za mnoge po Gramu negativne bakterije, kot so *E. coli*, *Pseudomonas* spp. in sev

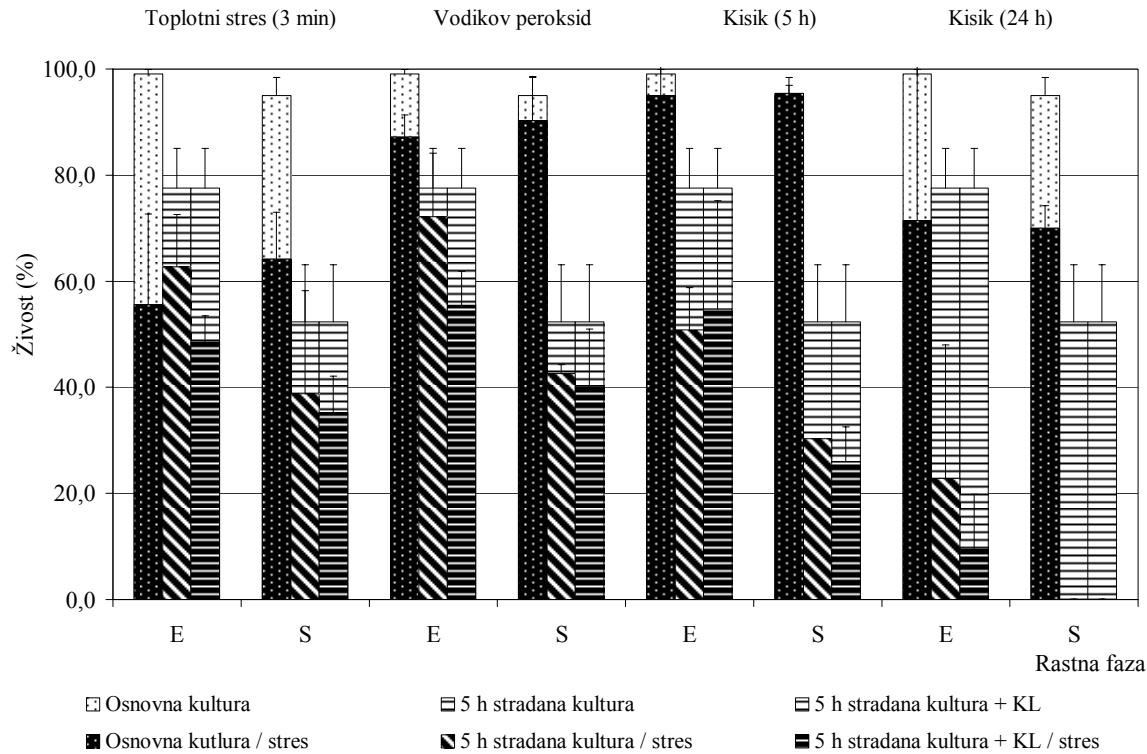
Vibrio sp. S14 (Jenkins in sod., 1988; Matin, 1992; Nyström in sod., 1992). Pri nekaterih bakterijah, npr. *Vibrio vulnificus* in *Aeromonas hydrophila* (Weichart in Kjelleberg, 1996) pa ga niso dokazali. Pri slednjem, ki je soroden našemu preiskovanemu organizmu rodu *Campylobacter*, niso dokazali zaščitne vloge stradanja proti topotnemu stresu ali pri zamrzovanju in tajanju. Podobno tudi naši eksperimenti niso pokazali pozitivne vloge stradanja pri odpornosti stradane kulture proti kisikovem stresu (sliki 4.6 in 4.8). Zaščitni učinek stradanja pred peroksidnim stresom je bil opazen le pri celicah iz eksponentne faze rasti.

Cappelier in sod. (2000) navajajo prehod celic v stanje VBNC kot odziv na pogoje stradanja. Pri našem eksperimentu je bil omenjen prehod najboljše viden pri celicah 5 h stradane kulture iz eksponentne faze rasti po izpostavitvi 24 h kisikovem stresu, kjer je preživel 24 % celic, kultivabilnost pa se je zmanjšala za 4 log stopnje (sliki 4.6 in 4.8). Dejstvo, da se živost 5 h stradane kulture iz eksponentne faze rasti po topotnem stresu in peroksidnem stresu le neznatno zmanjša (za približno 10 %), kultivabilnost pa pade za celo log stopnjo, nakazuje tudi na delež celic v stanju VBNC. Ker vsebuje kultura visok delež spiralnih celic (nad 60 %), lahko pričakujemo tudi visok delež spiralnih celic v stanju VBNC. Podobno velja za stradano kulturo iz stacionarne faze, kjer prav tako ocenjujemo, da je delež celic po topotnem in peroksidnem stresu v stanju VBNC.

4.4.2 Vpliv stradanja na pridobljeno navzkrižno odpornost

Stradanje sproži v celici tvorbo proteinov, ki celici omogočijo boljšo odpornost proti ostalim stresom npr. osmotskim, topotnim in oksidativnim stresom (Nyström in sod., 1992; Cappelier in sod., 2000). Sintezo stresnih proteinov lahko preprečimo z dodatkom antibiotikov. Cappelier in sod. (2000) navajajo, da stradanje poveča odpornost na topotni stres, ki pa se znatno zmanjša, kadar je kultura inkubirana v prisotnosti kloramfenikola, ki zavre sintezo stresnih proteinov. Celice med stradanjem spremenijo tudi celično obliko, saj se spiralne celice preoblikujejo v kokoidne celice. Literatura navaja, da dodatek kloramfenikola ne vpliva na večjo tvorbo kokoidne kulture *C. jejuni* (Hazeleger in sod., 1995).

Kot je razvidno iz slike 4.9, je bila preživelost 5 h stradane kulture izpostavljene 3 min 55 °C boljša (v povprečju 62 %) kot preživelost osnovne kulture, izpostavljene istemu stresu. Preživelost celic stradane kulture je bila ob dodatku kloramfenikola zmanjšana (povprečno pod 50 %), iz česar lahko sklepamo, da je dodatek kloramfenikola zavrl sintezo proteinov v stradani kulturi iz eksponentne in stacionarne faze rasti ter tako zmanjšal celično odpornost proti topotnemu stresu (slika 4.9). Do podobnih rezultatov so prišli Cappelier in sod. (2000), ki so ugotovili, da je bilo v 2 in 4 h stradanih vzorcih, katerim so dodali antibiotik kloramfenikol, za polovico manj preživelih bakterij, kot v vzorcih brez kloramfenikola. Tudi Matin (1992) navaja, da kloramfenikol prepreči sintezo proteinov, ki celico obvarujejo pred stresom. Zanimivo je, da ima stradana kultura iz eksponentne in stacionarne faze rasti, kateri so pri topotnem stresu dodali kloramfenikol, boljšo preživelost od osnovne kulture po topotnem stresu. Iz tega bi lahko sklepali, da stradanje kljub dodatku kloramfenikola še vedno poveča možnosti za preživetje. Celicam 5 h stradane kulture iz stacionarne faze rasti se preživetje s stradanjem manj poveča, kot celicam iz eksponentne faze, vendar tega ne gre zanemariti.



Slika 4.9: Vpliv stradanja z ali brez dodatka kloramfenikola (KL) na živost (%) celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.9: Effects of starvation with or without chloramphenicol (KL) added on the viability (%) of *C. jejuni* cells from the exponential (E) and stationary (S) growth phase. Error bars indicate standard deviations.

Tudi pri peroksidnem stresu kažejo 5 h stradane celice v povprečju manjši padec v živosti, od celic osnovne kulture (slika 4.9), kar pomeni, da stradanje poveča odpornost proti peroksidnemu stresu. Ob dodatku kloramfenikola se preživetje poslabša, padec živosti pa pri stradani kulturi, kateri smo dodali antibiotik, ni manjši od padca pri osnovni kulturi, kot je bilo v primeru topotnega stresa. Torej stradanje pri peroksidnemu stresu zviša preživelost, celic pa ne obvaruje ob dodatku kloramfenikola.

Stradana kultura se med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika ni izkazala za odpornejšo (slika 4.9), zato vpliva kloramfenikola kot inhibitorja sinteze stresnih proteinov med stradanjem nismo mogli proučevati.

Iz opisanega eksperimenta lahko zaključimo, da kratkotrajna (5 h) predhodna izpostavitev celic pogojem stradanja omogoči sintezo novih proteinov, ki so pomembni pri navzkrižni odpornosti proti topotnemu in peroksidnemu, a ne proti kisikovemu stresu. Omenjeno trditev smo zato hoteli potrditi tudi na nivoju indukcije izražanja izbranih genov stresnega odziva celic.

4.4.3 Ugotavljanje stresnega odziva celic na različne strese na nivoju transkriptoma

Prvemu opisu stresnega odziva celic na topotni stres so sledile objave o vplivu širokega spektra okoljskih dejavnikov na indukcijo izražanja genov stresnega odziva. Najbolje raziskan ostaja topotni stres pri bakterijah *E. coli* (Lindquist, 1986).

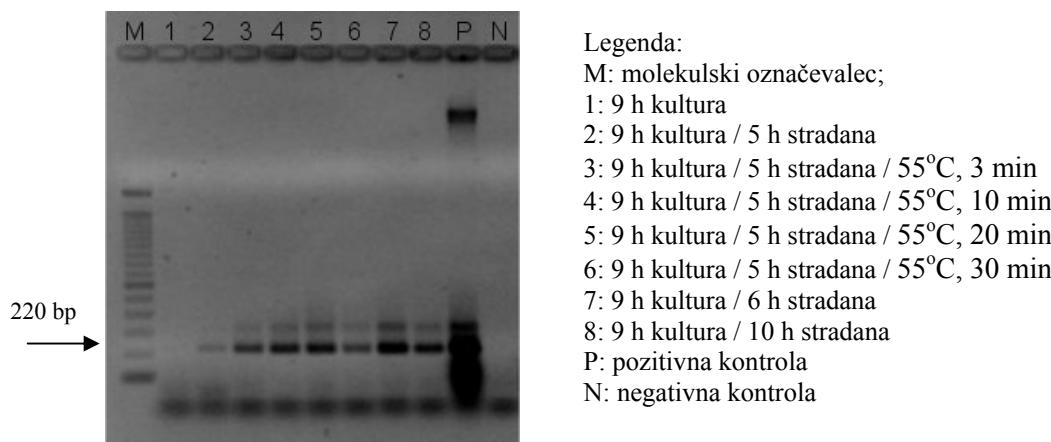
Za pomnoževanje z metodo PCR naj bi bila zadostna že majhna količina specifične mRNA. Vendar pa ostajajo glavne omejitve: izolacija zadostne količine nepoškodovane mRNA iz manjšega števila bakterij, pomanjkanje informacij glede pomembnosti kvantitativnega določevanja mRNA iz celic, izpostavljenih stresu (Sheridan in sod., 1998) ter dovolj natančna kvantifikacija. Pri bakterijah rodu *Campylobacter* je bilo do danes opravljenih le nekaj eksperimentov za jasnejše razumevanje regulacije izražanja genov v stresnih razmerah.

4.4.3.1 Izražanje genov z metodo RT-PCR

Preiskovali smo izražanje izbranih genov (*groEL*, *htpG*, *dnaK*, *sodB*, *ahpC*, *flaA*) ter genov *rpoD* in 16S rRNA v osnovni in stradani (5 h in 24 h) kulturi bakterij *C. jejuni*. Pri tem smo pri topotnem (55 °C, 3 min), peroksidnem (3 mM H₂O₂, 10 min) ter kisikovem stresu (5 h atm. konc. kisika) pri celicah iz eksponentne in stacionarne faze rasti uporabili kombinacijo metod obratnega prepisa ter verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR). Pri vsakem izbranem genu je bila potrebna optimizacija metode PCR, predvsem časovni in temperaturni potek reakcij PCR.

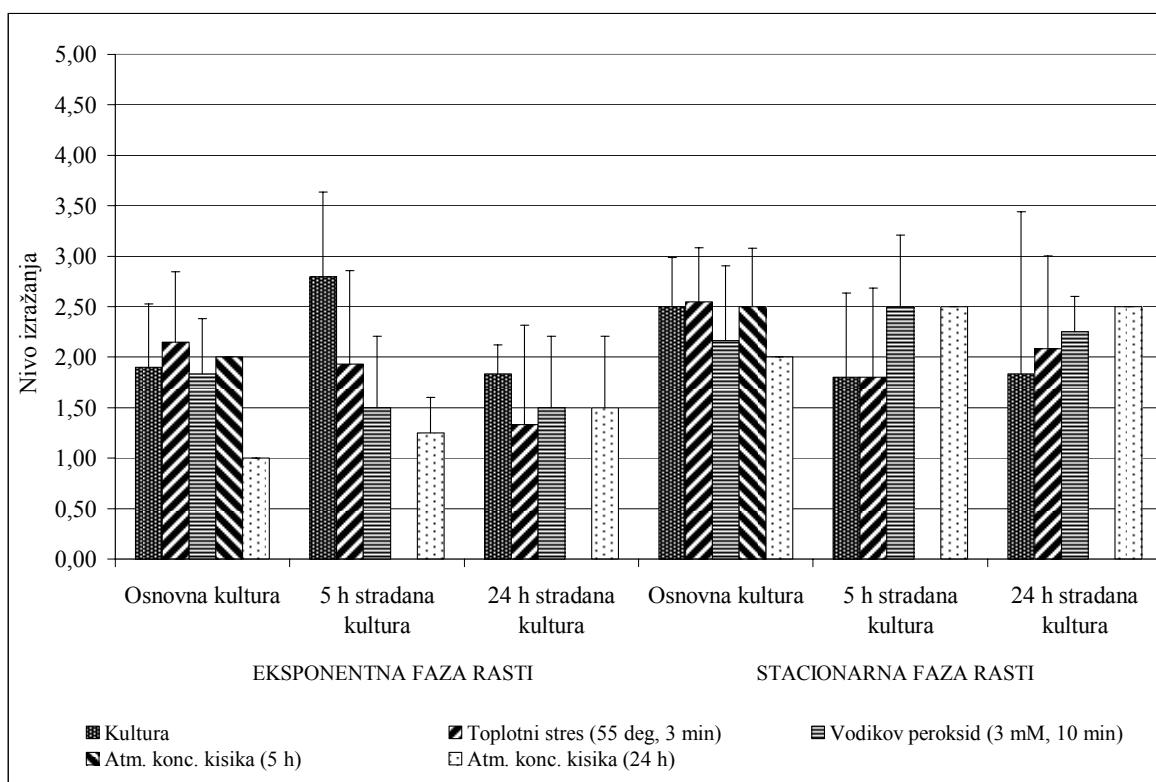
Pri vseh celicah, izpostavljenim stresnim pogojem, smo uspeli dobiti mRNA. Vidne so bile razlike med različnimi pogoji stresa, vendar pa so bile razlike zelo majhne. Primer izražanja osnovne in stradane kulture *C. jejuni* iz obeh rastnih faz med različnimi pogoji je za gen *flaA* prikazan na slikah 4.10 in 4.11. Nivoja izražanja ostalih genov (*groEL*, *htpG*, *dnaK*, *sodB*, *ahpC*) zaradi neznačilnih razlik nismo prikazali.

Tako lahko zaključimo, da vpliv izpostavitve stresnim pogojem na transkripcijo izbranih genov z metodo RT-PCR ni bil viden. Med ne-tretiranimi in tretiranimi celicami kampilobakterjev iz eksponentne ter stacionarne faze rasti ni bilo vidnih značilnih razlik. Prav tako tudi dodatek kloramfenikola stradani kulturi ni vplival na izražanje RNA.



Slika 4.10: Primer agarozne gelske elektroforeze pomnožkov RT - PCR gena *flaA* celic *C. jejuni* med inkubacijo pri različnih pogojih stresa.

Figure 4.10: Example of agarose gel electrophoresis of RT - PCR amplification of *flaA* of *C. jejuni* cells after exposure to different stresses.



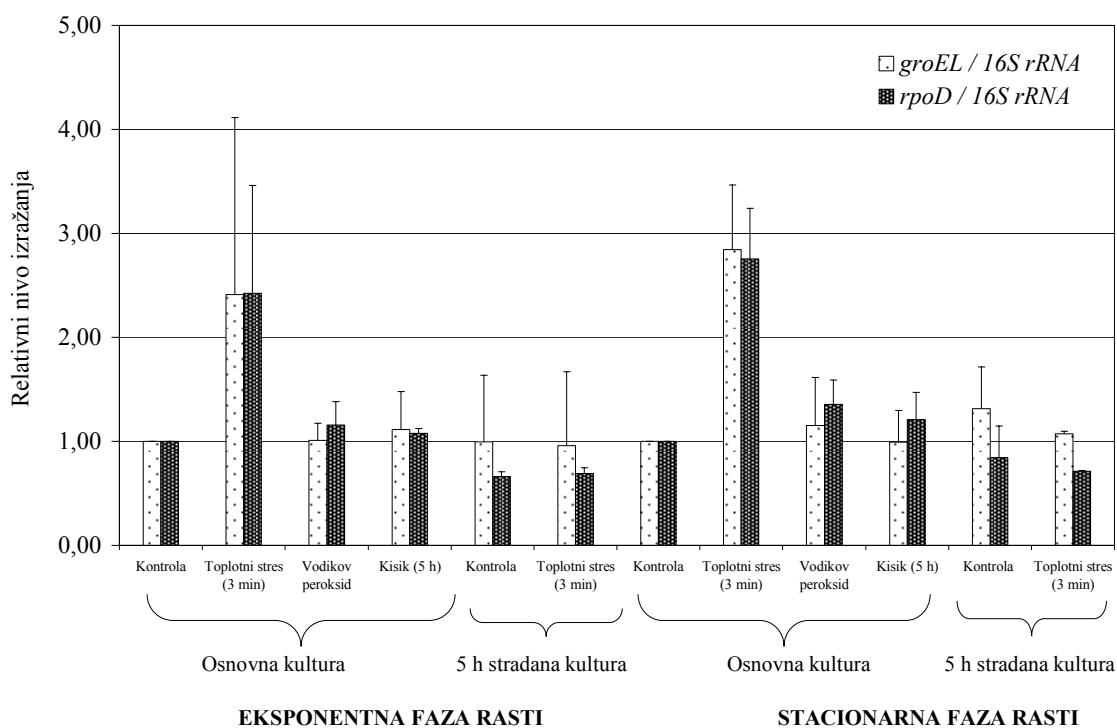
Slika 4.11: Primer izražanja gena *flaA* osnovne in stradane (5 h in 24 h) kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti med inkubacijo v stresnih razmerah z metodo RT - PCR, (kontrola: kultura, ki ni izpostavljena pogojem stresa). Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.11: Level of *flaA* gene transcription of fed and starved (5 h and 24 h) *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase in stress conditions as assessed by RT – PCR, (control: non-stressed conditions). Error bars indicate standard deviations.

4.4.3.2 Kvantifikacija izražanja izbranih genov z metodo PCR v realnem času

Z metodo RT - PCR ni bilo vidnega vpliva topotnega ali oksidativnega stresa na izražanje izbranih genov v osnovni in 5 h ter 24 h stradani kulturi, zato smo se z metodo PCR v realnem času omejili na izbrani stresni gen (*groEL*) ter hišni gen na nivoju mRNA, *rpoD*, in hišni gen na nivoju rRNA 16S rRNA. Dodatek kloramfenikola 5 h stradani kulturi ni vplival na izražanje RNA, zato smo omenjeni pogoj izpustili ter se usmerili na osnovno in 5 h stradano kulturo pod pogoji topotnega (55 °C, 3 min), peroksidnega (3 mM vodikov peroksid, 10 min) ter kisikovega stresa (5 h pri atm. konc. kisika) pri kulturah iz eksponentne in stacionarne faze rasti.

Analiza izražanja genov z metodo PCR v realnem času je v nasprotju z metodo RT-PCR pokazala razlike v nivoju indukcije gena *groEL* iz eksponentne in stacionarne faze rasti, vendar le pri osnovni kulturi, izpostavljeni topotnemu stresu (55 °C, 3 min) (slika 4.12). Vpliv izpostavitve pogojem stresa je bil opazen tudi pri izražanju gena *rpoD*, zaradi česar ga ne moremo upoštevati kot hišni gen (slika 4.12). Zato smo kot hišni gen izbrali tudi gen 16S rRNA, ki ni kazal sprememb v izražanju genov v stresnih razmerah.



Slika 4.12: Relativno izražanje genov *groEL* / 16S rRNA in *rpoD* /16S rRNA osnovne in 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne ter stacionarne faze rasti med inkubacijo pri različnih pogojih stresa z metodo PCR v realnem času, (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena pogojem stresa).

Figure 4.12: Relative level of *groEL* / 16S rRNA and *rpoD* /16S rRNA gene transcription of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase, after exposure to different stresses, as assessed by real-time PCR, (control: non-stressed conditions).

Znano je, da bakterije uporabljajo več načinov regulacije izražanja genov ter s tem odgovor na spremembe temperature: superzvijanje DNA v promotorjih genov reguliranih s temperaturo, vpliva na transkripcijo (Hurme in Rhen, 1998), posttranskripcijski temperaturni mehanizmi (Hoe in Goguen, 1993) in dvo-komponentni signalni transdukcijski sistemi, ki zaznavajo in odgovarjajo na spremembe temperature (Aguilar in sod., 2001).

Gen *rpoD* kodira polimerazo RNA, σ^{70} , odgovorno za prepisovanje večine genov, izraženih med rastjo v eksponentni fazì rasti. Stalnost izražanja gena *rpoD* med prilagoditvijo na visoke temperature domnevno zagotavlja prepis genov, ki so splošno pomembni za rast bakerijske kulture, kot je *E. coli*. Vendar pa spremembe v izražanju gena *rpoD* med ostalimi rastnimi fazami ali neugodnimi pogoji niso izključene, saj so že dokazali toplotno inducibilnost omenjenega gena po dvigu temperature iz 37 na 41 °C (Riehle in sod., 2003).

Watson in Clements (1998) sta objavila gen *rpoD* kot gen sigma dejavnika pri bakterijah *C. jejuni* z nenavadnim ter slabo ohranjenim promotorjem. Tudi drugi avtorji (Petersen in sod., 2003) so potrdili značilne razlike v genomu bakterij *C. jejuni*. Osnovni metabolizem je pri bakterijah rodu *Campylobacter* zelo dinamični proces, zmožen prilagoditve na različne rastne pogoje (Vandecasteele in sod., 2001). Regulacija topotnega stresa je pri bakterijah vrste *C. jejuni* slabo raziskana, dobro pa je znana vloga regulacije pri kolonizaciji črevesnega trakta ter preživelosti pri višjih temperaturah (Konkel in sod., 1998). Pri bakterijah *C. jejuni* je gen *groEL* vključen v mehanizme zvijanja proteinov in je inducirán s topotnim ali pH stresom (Wu in sod., 1994) ter med rastjo v aerobnih razmerah (Takata in sod., 1995).

Analiza z metodo PCR v realnem času je pokazala manjše razlike v izražanju gena *groEL* in *rpoD* le v osnovni kulturi in ne tudi v 5 h stradani kulturi iz eksponentne in stacionarne faze rasti za 3 min izpostavljeni temperaturi 55 °C. Ker smo pri genu *groEL* potrdili spremembe izražanja na nivoju transkriptoma le pri topotnem stresu, smo se v nadaljevanju omejili na spremembe izražanja gena topotnega stresa *groEL* pod pogoji temperaturnega stresa iz obeh rastnih faz celic.

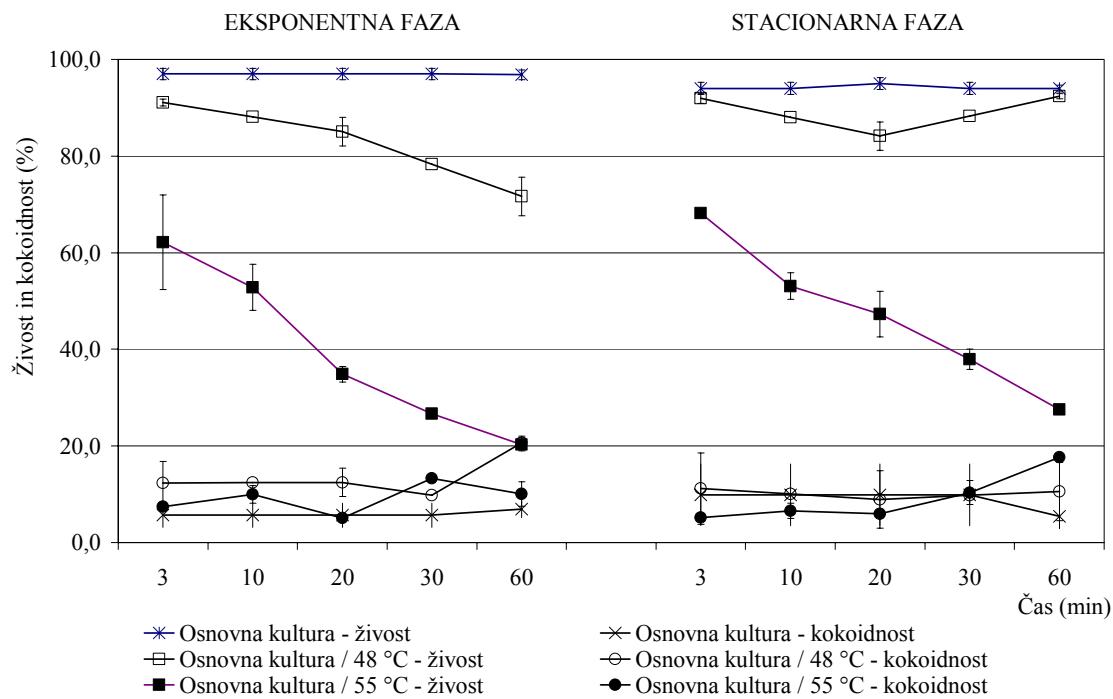
4.5 VPLIV DOLGOTRAJNEGA TOPLITNEGA STRESA NA BAKTERIJE *C. jejuni*

V prejšnjem poglavju smo po izpostavitev celic rodu *Campylobacter* topotnemu in oksidativnemu stresu preizkušali fenotipski odziv celic ter njihovo regulacijo izražanja genov. Ker z metodo RT - PCR nismo zaznali vpliva stresnih razmer na regulacijo transkripcije, smo se z metodo PCR v realnem času omejili na en izbrani stresni gen (*groEL*) ter gen *rpoD*. Pri genu *groEL* smo potrdili indukcijo izražanja na nivoju transkriptoma le po topotnem stresu. Relativno povečanje izražanja gena topotnega stresa *groEL* je bilo, kljub značilnim fenotipskim spremembam po inkubaciji celic pri 55 °C za 3 min, le enkratno glede na kontrolo. Ker je bil odziv celic na nivoju izražanja genov manjši kot smo pričakovali, smo se v nadaljevanju eksperimenta usmerili na dolgotrajnejši topotni stres ter tako izpostavili celice temperaturi 55 °C za 3, 10, 20, 30, 60 min in tudi pri 48 °C za 3, 20 in 60 min. Slednjo temperaturo smo dodatno izbrali, saj smo domnevali, da bi bila izpostavitev celic temperaturi 55 °C za več kot 30 min letalni stres (glede na oceno fenotipskih lastnosti). Pod omenjenimi stresnimi pogoji smo kulturi *C. jejuni* iz obeh rastnih faz določili živost, kokoidnost in kultivabilnost. Po inkubaciji pri 48 °C ter 55 °C za 3, 10, 20 in 30 min smo ugotavljali izražanje izbranega gena topotnega stresa *groEL*. Glede na literaturo smo dodali še hišni gen *rpoD*, ki pa se je izkazal kot topotno inducibilen, ter hišni gen 16S rRNA. Pričakovali smo, da bomo potrdili vpliv topotnega stresa na nivoju izražanja genov ter dokazali topotno inducibilnost tudi pri genu *rpoD*. V nadaljevanju smo hoteli potrditi rezultate, dobljene pri sevu *C. jejuni* K49/4, tudi pri 9 dodatnih sevih rodu *Campylobacter*, pridobljenih iz humanega kliničnega materiala, brisov živali in iz piščančjega mesa (Zorman in sod., 2006).

4.5.1 Živost, kokoidnost ter kultivabilnost celic

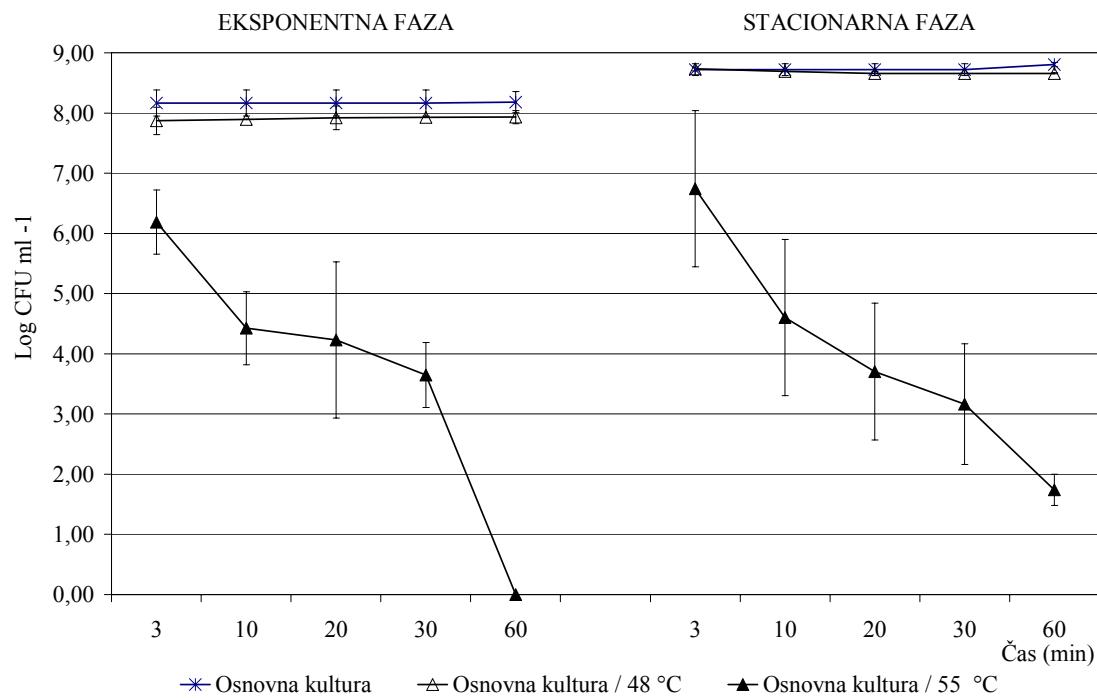
Cools in sod. (2003) so dokazali razlike v preživelosti sevov bakterij rodu *Campylobacter* po izpostavitev celic nižjim temperaturam glede na izvir sevov. Zato smo dolgotrajno izpostavitev topotnemu stresu izvedli tudi na sevu *C. jejuni* 406, ki je bil humanega izvora, vendar meritve fenotipskih lastnosti niso pokazale nobenih razlik glede na sev živalskega izvora K49/4. Zato so rezultati prikazani samo za slednji sev.

Bakterije *C. jejuni* rastejo v relativno zelo omejenem temperaturnem območju. Optimalna temperatura rasti je med 37 °C in 42 °C, minimalna med 32 °C in 36 °C, pod 30 °C pa celice niso več sposobne rasti (Doyle in Roman, 1981; Hazeleger in sod., 1998).



Slika 4.13: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po toplotnem stresu pri 48 in 55 °C.

Figure 4.13: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed *C. jejuni* cells from the exponential (E) and stationary (S) growth phase, after exposure to thermal treatment at 48 and 55 °C. Error bars indicate standard deviations.



Slika 4.14: Kultivabilnost (log CFU mL⁻¹) osnovne kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po toplotnem stresu pri 48 in 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.14: Culturability (log CFU mL⁻¹) of fed *C. jejuni* cells from the (E) and stationary (S) growth phase, after exposure to thermal treatment at 48 and 55 °C. Error bars indicate standard deviations.

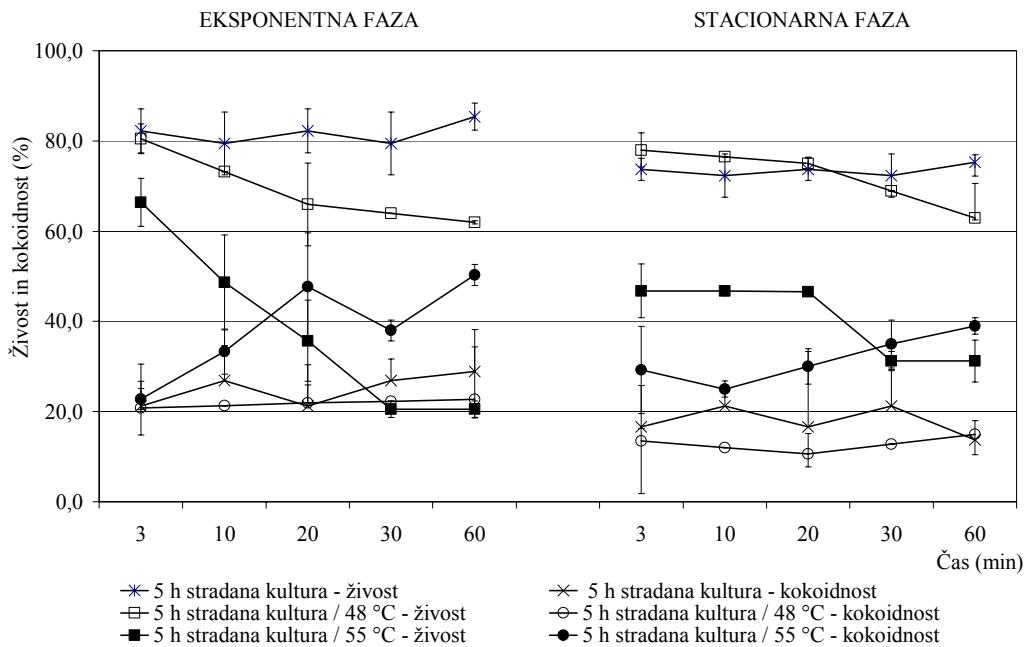
Kot smo dokazali že v prejšnjem poglavju je 3 min stres povzročil zmanjšanje števila živih in kultivabilnih celic. Podaljšana izpostavitev celic je pričakovano povzročila večje spremembe. Vidno je bilo zmanjšanje števila živih celic po toplotnem stresu pri 48 °C, ki je znašalo 5-20 %. Že po 10-ih min inkubacije pri temperaturi 55 °C se je živost zmanjšala za 50 %. Presenetljivo so bile žive celice (20 %), določene s fluorescentnim mikroskopom, še vedno prisotne po 60 min inkubaciji pri 55 °C (slika 4.13).

Znižanje kultivabilnosti, ki je bilo v eksponentni fazи nadano in v stacionarni fazи postopno, je po 60 min na 48 °C znašalo približno 0,3 log stopnje. Izrazitejše so bile spremembe med toplotnim stresom pri 55 °C, saj se je kultivabilnost že po 10 min zmanjšala pod 5 log stopenj (slika 4. 14).

Morfološke spremembe v osnovni kulturi, izpostavljeni toplotnim stresom niso bile izrazite, saj delež kokoidnih celic narastel za približno 5-10 %, ne glede na rastno fazо (slika 4.13).

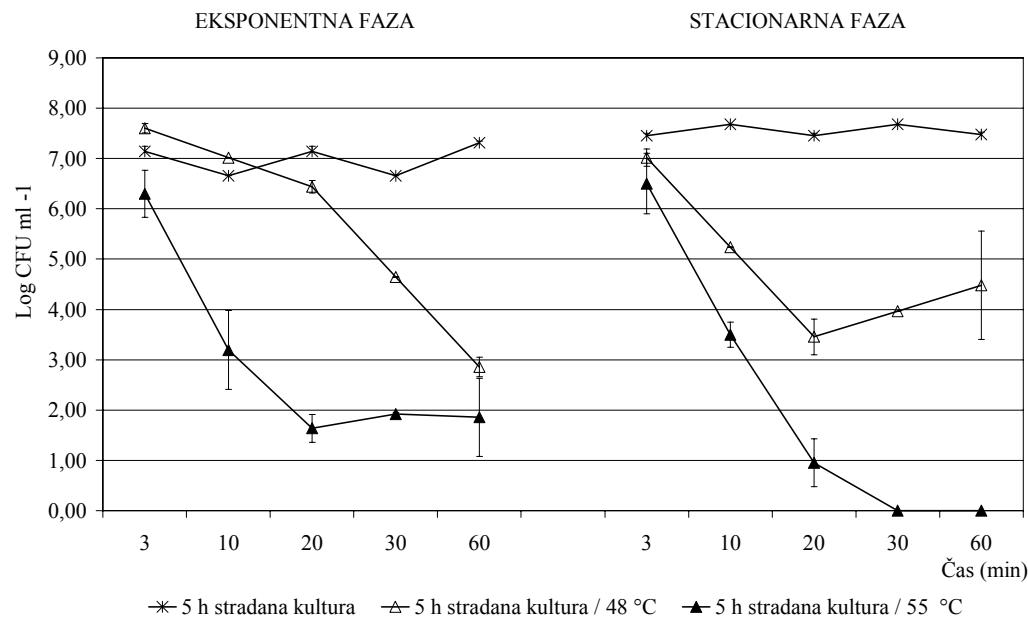
Za varno proizvodnjo hrane je izrednega pomena poznavanje toplotne odpornosti bakterij *Campylobacter* spp. Nekateri sevi *C. jejuni* so preživeli segrevanje pri 55 °C le 1 – 3 min oz. segrevanje pri 52 °C približno 10 min (Moore in Madden, 2000). Kot sta objavila Moore in Madden (2000) je vrednost D bakterij *C. coli* pri temperaturi 55,4 °C 89 s. Vendar so omenjeni avtorji kot merilo živosti uporabili določanje števila kolonij na ploščah, torej kultivabilnost. Eden od razlogov prisotnosti živih celic po 60 minutni inkubaciji pri 55 °C v našem eksperimentu je zaščitna vloga razgradnih produktov celic ter sestavin gojišča, ki so posledica visoke temperature in lahko obdajo celice ter tako preprečijo prehod toplove. Nedavno so Murphy in sod. (2006) objavili zaščitni vpliv gojišč na preživelost bakterij *C. jejuni* in zaključili, da so eksperimenti izvedeni v različnih gojiščih oz. medijih težko primerljivi.

Temperature vplivajo na zmanjšano kultivabilnost celic (Medema in sod., 1992). To so potrdili tudi pri bakterijah *Campylobacter* spp. (Rollins in Colwell, 1986; Medema in sod., 1992). V našem eksperimentu je bil iz razlike med deležem živih in kultivabilnih celic osnovne kulture prehod v stanje VBNC najbolj izrazit pri populaciji, inkubirani pri 55 °C. Pri temperaturi 55 °C je bil delež živih celic iz eksponentne faze po 10 min inkubacije 50 %, kultivabilnost pa se je pri tem zmanjšala za več kot 3 log stopnje. Podobno je bilo razmerje tudi pri celicah iz stacionarne faze rasti. Iz deleža kokoidnih celic sklepamo, da sestavljajo populacijo VBNC celice v spiralni in kokoidni oblikи (sliki 4.13 in 4.14).



Slika 4.15: Živost (%) in kokoidnost (%) 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po toplotnem stresu pri 48 in 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.15: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential (E) and stationary (S) growth phase, after exposure to thermal treatment at 48 and 55 °C. Error bars indicate standard deviations.



Slika 4.16: Kultivabilnost (log CFU mL⁻¹) 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po toplotnem stresu pri 48 in 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.16: Culturability (log CFU mL⁻¹) of 5 h starved *C. jejuni* cells from the (E) and stationary (S) growth phase, after exposure to thermal treatment at 48 and 55 °C. Error bars indicate standard deviations.

Podobno kot pri osnovni kulturi je bilo v povprečju med izpostavitvijo temperaturi 48 °C uničenih približno 20 % celic in temperaturi 55 °C več kot 50 % živih celic (slika 4.15). Uničenje slednjih je bilo celo manjše kot pri osnovni kulturi, v kateri je znašalo 80 %. Že kratkotrajni 3 min stres pri 55 °C je pričakovano zmanjšal kultivabilnost, kar je bilo izrazitejše po dolgotrajni izpostavitvi (slika 4.16).

Dejstvo, da se živost 5 h stradane kulture izpostavljene topotnim stresom pri 48 °C iz obeh rastnih faz zmanjša za približno 20 %, kultivabilnost pa pada za 4 log stopnje (sliki 4.15 in 4.16), nakazuje na delež celic v stanju VBNC. Prehod v stanje VBNC smo, kot je že opisano v poglavju 4.4, opazili že po 3 min inkubacije na 55 °C. Podobno je bilo vidno tudi po dolgotrajnejši topotni inkubaciji, saj je bil po 20-ih min na 55 °C prisotnih manj kot 40 % živih ter le 2 log stopnji kultivabilnih celic. Sprememba morfologije je bila pri 5 h stradani kulturi vidna v povečani kokoidnosti pri temperaturi 48 °C za 10 in 55 °C za 30 % glede na kontrolno stradano kulturo brez topotnega stresa.

Iz podanih rezultatov lahko ocenimo večjo začetno kultivabilnost ter sočasno manjšo začetno živost kontrolne kulture brez dodatnega topotnega stresa iz stacionarne faze glede na kulturo iz eksponentne faze rasti. Ne glede na rastno fazo je bila značilno vidna tudi manjša živost in kultivabilnost 5 h stradane kulture glede na osnovno kulturo.

Preživelost celic je bila značilno odvisna od časovne izpostavitve celic topotnemu stresu. Sprememba morfologije iz spiralne v kokoidno obliko je bila očitnejša pri 5 h stradani kulturi in ne glede na rastno fazo pri 55 °C. Prehod v stanje VBNC smo, kot je že opisano v poglavju 4.4, dokazali že po 3 min inkubaciji na 55 °C. Tudi višja kokoidnost stradane kulture po dolgotrajnejši inkubaciji nakazuje prehod v odpornejše stanje, kar potrjujejo tudi podobne spremembe v živosti pri 5 h stradani kulturi, izpostavljeni topotnim stresom v primerjavi z osnovno kulturo, izpostavljeni stresom. Pričakovali smo namreč večjo izgubo živosti stradane kulture po dodatnih stresih.

Prisotnost nekultivabilnih celic ter nizek delež živih celic (20 %), inkubiranih 60 min pri 55 °C, nakazuje, da je uporabljeni stres za celice letalen in zato teh pogojev ne moremo vključiti v študijo prehoda celic v stanje VBNC.

4.5.2 Vpliv kloramfenikola

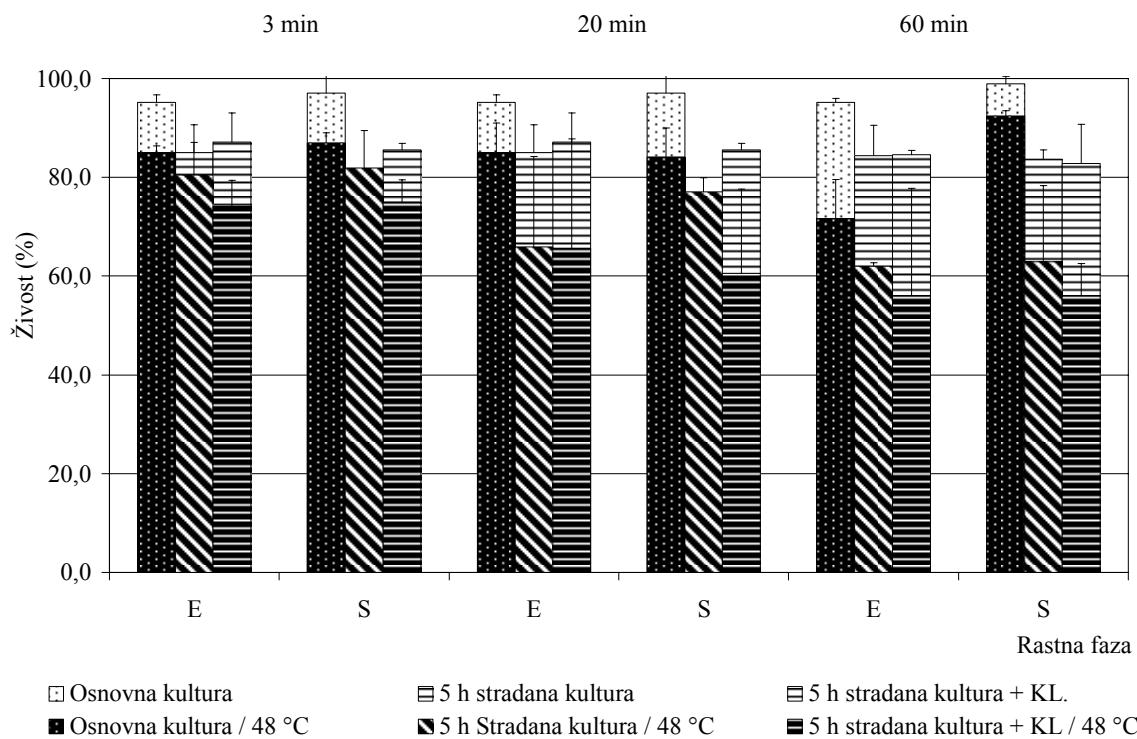
Predhodno 5 h stradanje omogoči navzkrižno odpornost proti kratkotrajnemu topotnemu in peroksidnemu stresu. Zanimalo nas je ali je sinteza proteinov med stradanjem pomembna tudi za pridobitev odpornosti stradane kulture na dolgotrajnejšo izpostavitev (3, 10, 20, 30, 60 min) temperaturi 48 ali 55 °C.

Vidna je bila razlika v preživelosti 5 h stradane kulture z dodatkom kloramfenikola brez ali po izpostavitvi za 3 min pri 48 °C, ki je bila večja od razlike v preživelosti osnovne kulture pred in po dodatnemu topotnemu stresu ter še očitnejša od razlike v preživelosti stradane kulture pred ali po topotnem stresu (slika 4.17).

Predhodno 5 h stradanje je po 3 min izpostavitvi celic topotnem stresu pri 55 °C povzročilo večje razlike med celicami osnovne kulture ter 5 h stradane kulture z in brez dodatka kloramfenikola. Kot je razvidno s slike 4.18, se je ob dodatku kloramfenikola preživetje celic, izpostavljenih 55 °C za 10 – 60 min, poslabšalo, vendar je bil padec živosti po izpostavitvi stresu podoben kot pri stradani kulturi brez dodatka kloramfenikola ter osnovni kulturi.

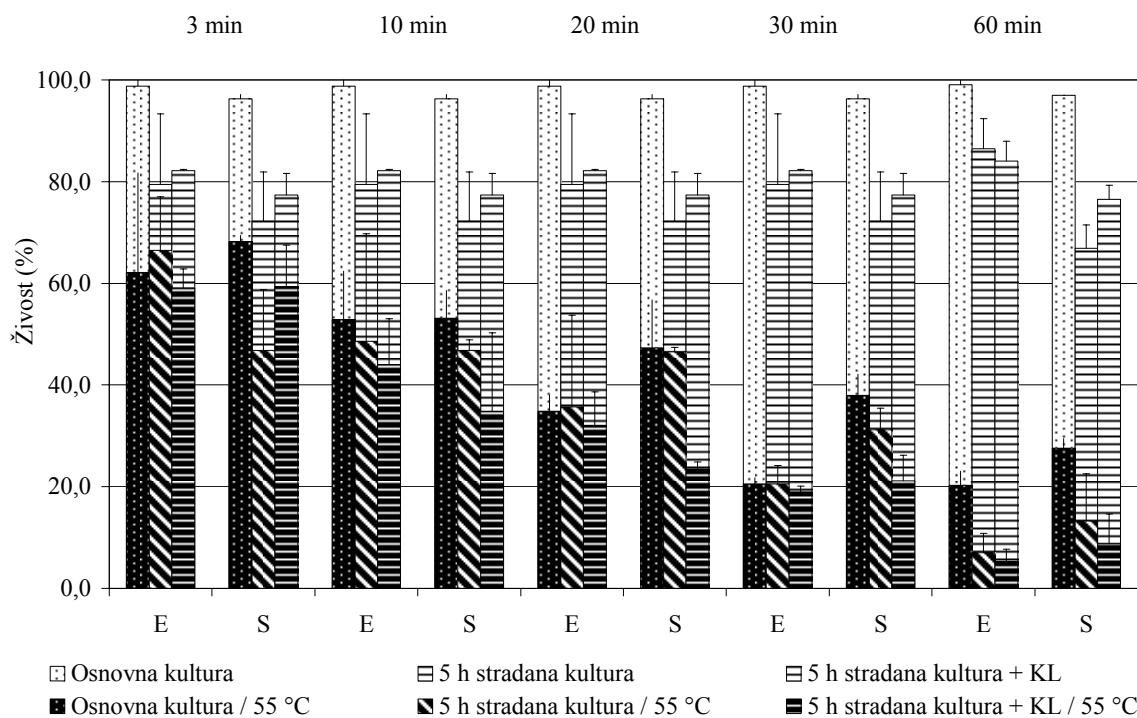
Torej 5 h stradanje ne omogoča dodatne zaščite celic pred dolgotrajnim topotnim stresom pri 48 °C in še bolj vidno pri temperaturi 55 °C, saj so bile zgoraj opisane razlike v preživelosti velike in so nakazovale odsotnost topotne odpornosti stradane kulture.

Ker se stradana kultura med inkubacijo pri dolgotrajnejšem toplotnem stresu (48 in 55 °C) ni izkazala za odpornejšo, vpliva predhodnega stradanja pri dolgotrajnjem toplotnem stresu na izražanje izbranih genov stresnega odgovora nismo proučevali. Usmerili smo se na vpliv omenjenih stresov na celice osnovne kulture iz eksponentne in stacionarne faze rasti.



Slika 4.17: Vpliv stradanja z ali brez dodatka kloramfenikola na živost (%) celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti po toplotnem stresu pri 48 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.17: Effects of starvation with or without chloramphenicol added on the viability (%) of *C. jejuni* cells from the exponential (E) and stationary (S) growth phase, after exposure to thermal treatment at 48 °C. Error bars indicate standard deviations.



Slika 4.18: Vpliv stradanja z ali brez dodatka kloramfenikola (KL) na živost (%) celic *C. jejuni* iz eksponentne (E) ter stacionarne (S) faze rasti med topotnim stresom pri 55 °C. Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.18: Effects of starvation with or without chloramphenicol (KL) added on the viability (%) of *C. jejuni* cells from the exponential (E) and stationary (S) growth phase, after exposure to thermal treatment at 55 °C. Error bars indicate standard deviations.

4.5.3 Ugotavljanje stresnega odziva celic na dolgotrajni topotni stres z metodo PCR v realnem času na nivoju transkriptoma

Z metodo PCR v realnem času je bil viden le vpliv kratkotrajnega topotnega stresa pri 55 °C in ne ostalih stresnih pogojev na izražanje izbranih genov (poglavlje 4.4). Zato smo se v tem poglavju omejili na ugotavljanje izražanja genov *groEL*, *rpoD* in 16S rRNA po dolgotrajnejšem topotnem stresu pri temperaturi 48 °C ali 55 °C za 3, 10, 20 in 30 min pri izbranem sevu *C. jejuni* K49/4 ter dodatnih humanih, živilskih ter živalskih sevih.

4.5.3.1 Kvantifikacija izražanja genov *groEL* in *rpoD* pri *C. jejuni* K49/4

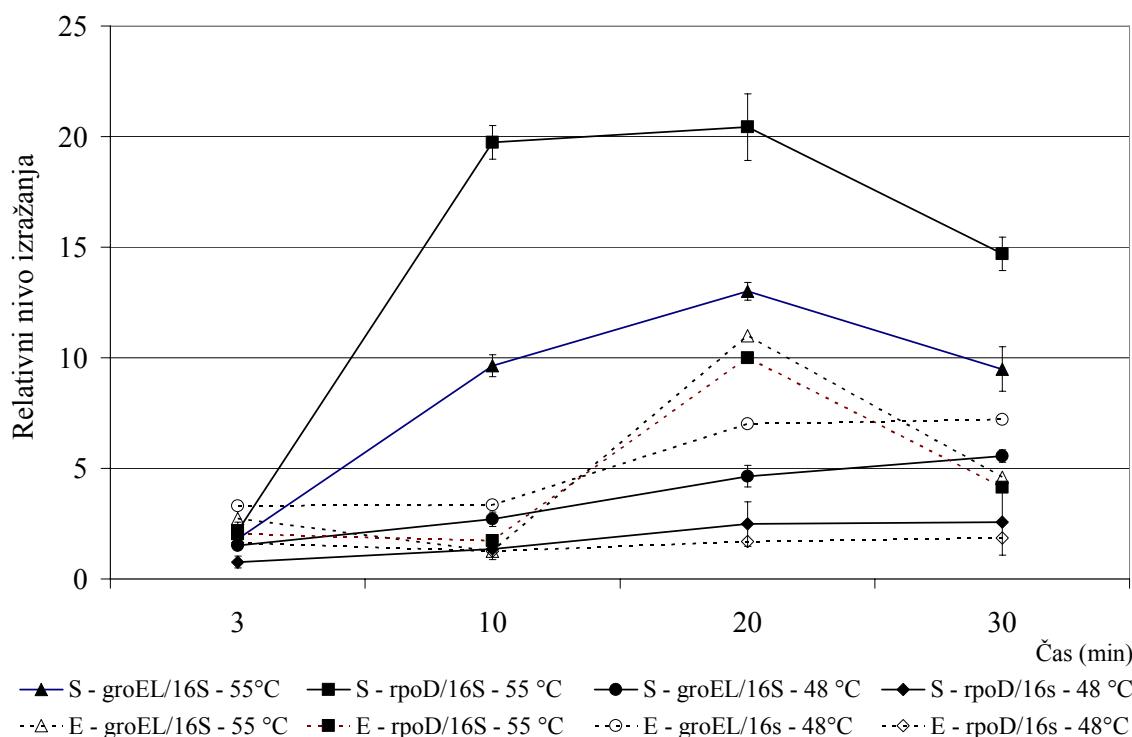
Z razvozljano genomsko sekvenco bakterij *C. jejuni* je danes mogoče določiti prisotnost oz. odsotnost določenih genov. Čeprav so geni, ki kodirajo stresne proteine, zelo ohranjeni, so znane precejšnje razlike pri regulaciji odziva, saj homologije in podobnosti sekvenc le nakazujejo in ne potrjujejo funkcionalnosti genov. Genom vrste *C. jejuni* je nenavaden in vsebuje vsaj 25 homopolimernih delov (angl. homopolymeric tract) (Parkhill in sod., 2000). Subpopulacija celic, izpostavljenih določenim stresnim razmeram, lahko kot stresni odgovor poveča število mutacij (Foster, 2005).

Univerzalen mehanizem evkarionskih in prokarionskih organizmov sproži kot odziv na topotni in tudi druge strese sintezo specifičnega seta genov. Ti kodirajo proteine za

toplotski stres (proteini HSP) in omogočajo prilagajanje na spremembe okolja in metabolizem za preživetje v stresnih razmerah (Lindquist, 1986; Lindquist in Craing, 1988; Abeel in Wouters, 1999; Santorno, 2000). Konkel in sod. (1998) so po dvigu temperature z analizo 2D elektroforeze pokazali povečano izražanje vsaj 24-ih proteinov toplotnega stresa. Genom bakterij *C. jejuni* vsebuje 30 % genov, ki jih ne moremo povezati z do danes znanimi geni (Parkhill in sod., 2000). *C. jejuni* lahko uporabi več strategij pri sočasni regulaciji različnih genov za toplotni stres. Ta kompleksna regulatorna mreža omogoča boljše usklajevanje pri izražanju genov za toplotni stres kot odziv na dvig temperaturne ali druge stresne (npr. oksidativni, kislinski in osmotski stres) in s tem boljše preživetje celic v spreminjajočih se okoljskih razmerah (Hurme in Rhen, 1998; Murphy in sod., 2003; Stintzi, 2003).

Transkripcijo izbranega gena stresnega odziva *groEL* ter genov *rpoD* in 16S rRNA smo kvantitativno določevali z metodo PCR v realnem času. Pri tem smo izhajali iz celokupne RNA kulture, izpostavljene toplotnemu stresu pri 55 in 48 °C za 3, 10, 20 in 30 min iz obeh rastnih faz.

V poglavju št. 4.4. smo predstavili vpliv kratkotrajnega toplotnega stresa pri 55 °C. Dolgotrajnejša izpostavitev celic toplotnemu stresu pri 55 °C je povzročila povečanje transkripcije izbranih genov *groEL* in *rpoD*, ki je bilo najizrazitejše po 20 minutah stresa. (slika 4.19).



Slika 4.19: Relativno izražanje gena *groEL* / 16S rRNA in *rpoD* /16S rRNA celic *C. jejuni* po toplotnem stresu (48 ali 55 °C) z metodo PCR v realnem času (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena pogojem stresa). Napake predstavljajo standardne deviacije.

Figure 4.19: Relative level of *groEL* / 16S rRNA and *rpoD* /16S rRNA gene transcription of *C. jejuni* cells from the exponential and stationary growth phase, after exposure to thermal treatment at 48 and 55 °C, as assessed by real-time PCR, (control: non-stressed conditions). Error bars indicate standard deviations.

Na sliki 4.19 vidimo povečano izražanje genov *groEL* in *rpoD*, ki je bilo v primeru toplotnega stresa pri 48 °C manj intenzivno ter vidno predvsem po 20 min inkubacije. Vpliv toplotnega stresa pri 48 °C je viden predvsem pri izražanju izbranih genov v kulturi iz stacionarne faze rasti. Pri slednji sta bila oba gena izrazito izražena po toplotnem stresu pri 55 °C, pri katerem je bilo povečanje izražanja večje pri genu *rpoD*. Potrdili smo toplotno inducibilnost gena *rpoD* (slika 4.19).

4.5.3.1.1 Kvantifikacija izražanja genov pri drugih sevih *C. jejuni*

Najizrazitejše izražanje genov *groEL* in *rpoD* je bilo vidno po 20 minutah toplotnega stresa pri 48 in 55 °C, zato smo v nadaljevanju hoteli potrditi omenjene rezultate za sev *C. jejuni* K49/4 tudi pri drugih sevih rodu *Campylobacter*. Izbrani sevi so bili humani (03/260, 75, 406, 245, 723) ali izolirani iz piščančjega mesa (K49/4, K43/4, K37/4, 132/P) in iz piščancev na farmi (32/F) (glej poglavje Materiali in metode). Izhajali smo iz celokupne RNA kulture, izpostavljene toplotnemu stresu pri 55 in 48 °C za 0 in 20 min iz obeh rastnih faz.

Toplotna inkubacija sevov pri 48 °C je inducirala manjšo indukcijo (do 3,3 kratno relativno indukcijo) genov *groEL* in *rpoD*. Nivo izražanja je bil bolj izrazit po toplotni inkubaciji pri 55 °C pri genu *groEL* (do 7,1 kratno relativno indukcijo) in predvsem pri genu *rpoD* (do 24,2 kratno relativno indukcijo), vendar ni bilo večjih razlik med obema rastnima fazama (preglednica 4.1).

Preglednica 4.1: Relativno izražanje genov *groEL* / 16S rRNA in *rpoD* /16S rRNA 10-ih različnih sevov kulture *C. jejuni* po 20 min toplotnem stresu pri 48 °C in 55 °C z metodo PCR v realnem času, (kontrola: kultura, ki ni bila izpostavljena stresu)

Table 4.1: Relative level of *groEL* / 16S rRNA and *rpoD* /16S rRNA gene transcription of 10 different *C. jejuni* isolates at 48 °C and 55 °C for 20 min as assessed by real-time PCR, (control: non-stressed conditions)

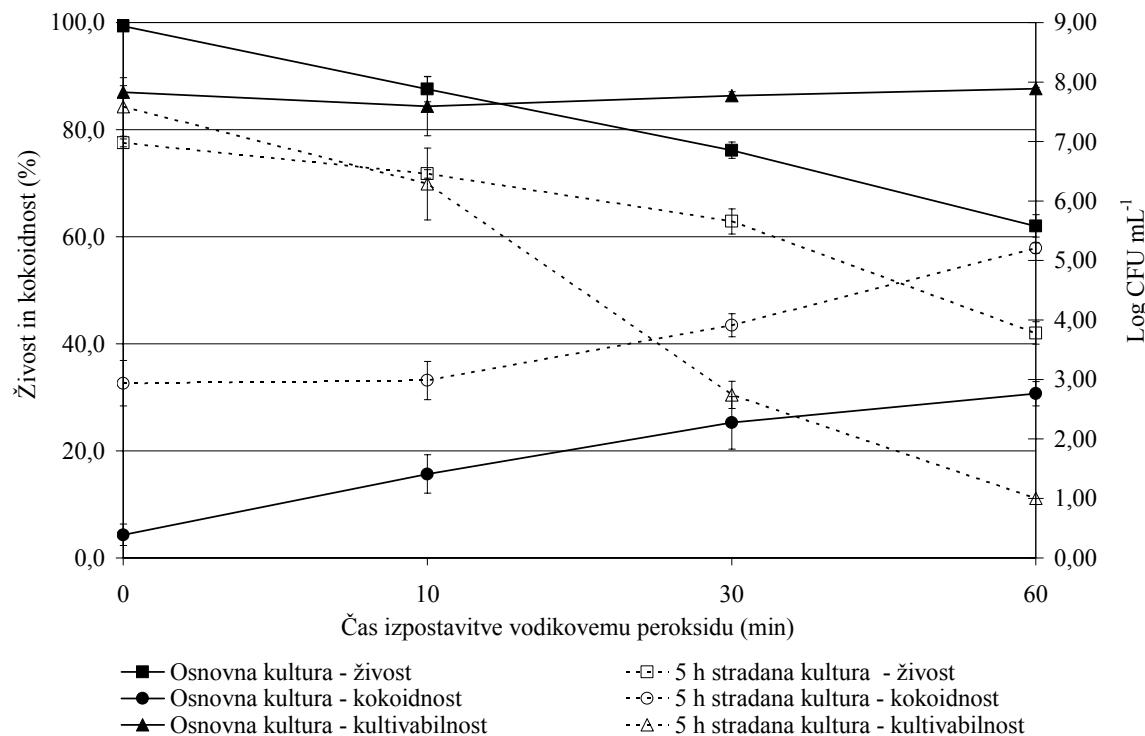
Št. sevov = 10	Eksponentna faza		Stacionarna faza	
	Relativna indukcija <i>groEL</i> /16S	Relativna indukcija <i>rpoD</i> /16S	Relativna indukcija <i>groEL</i> /16S	Relativna indukcija <i>rpoD</i> /16S
0 min	0,39±0,16	0,39±0,16	0,35±0,27	0,35±0,27
20 min pri 48 °C	3,06±1,05	2,28±1,89	3,34±1,96	3,20±1,79
20 min pri 55 °C	7,15±3,94	24,19±5,83	5,87±1,36	18,87±4,90

4.6 VPLIV DOLGOTRAJNEGA OKSIDATIVNEGA STRESA NA BAKTERIJE *C. JEJUNI*

Bakterije rodu *Campylobacter* so mikroaerofilne. Končni sprejemnik elektronov v dihalni verigi je kisik, a celice najbolje uspevajo v atmosferi s 4 - 5 % kisika (Sellars in sod., 2002). Že atmosferska koncentracija kisika pa zanje predstavlja stres (Park, 2002). Proučili smo vpliv atmosferske koncentracije kisika, poleg tega pa še prisotnost vodikovega peroksidu na preživelost in morfološke spremembe tega organizma. Na ta način smo ugotavljali kako in v kolikšni meri lahko te bakterije preživijo izbrane razmere pogostega oksidativnega stresa v proizvodni verigi živil. Zanimal nas je tudi vpliv medija na fiziološke spremembe med oksidativnim stresom. Rezultati poglavja 4.6 so zbrani v dveh v celoti objavljenih kongresnih prispevkih (Klančnik in sod., 2005; Rubeša in sod., 2005).

4.6.1 Izpostavitev celic vodikovem peroksidu

Dolgotrajnemu peroksidnemu (za 10, 30 in 60 min) stresu smo izpostavili celice osnovne ter 5 h stradane kulture iz eksponentne faze, zato ni možna primerjava s stacionarno fazo. Kratkotrajnemu peroksidnemu stresu pa so bile izpostavljene tudi celice iz stacionarne faze rasti (poglavlje 4.4).



Slika 4.20: Živost, kokoidnost (%) in kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) osnovne ter 5 h stradane kulture *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti po inkubaciji s 3 mM vodikovim peroksidom.

Figure 4.20: Viability, coccoid cell formation (%) and culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential growth phase, during exposure to 3 mM hydrogen peroxide.

Delež živih celic *C. jejuni* med inkubacijo pri vodikovem peroksidu pada, kokoidnost pa s časom inkubacije narašča (slika 4.20). Kokoidne celice predstavljajo za približno 15 – 25 % manjši delež v ne-stradani kulturi, pri obeh pa linearno narašča s časom inkubacije. Podobno pada delež živih celic, ki je v osnovni kulturi višji za približno 15 %.

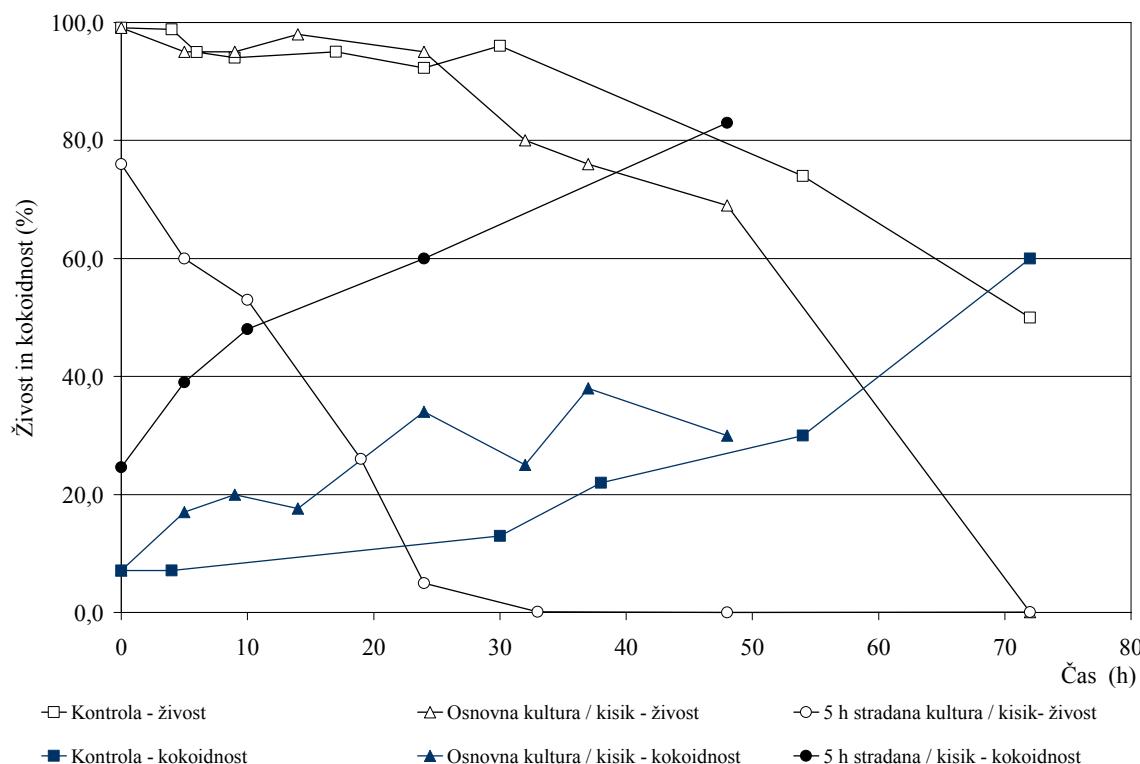
Kultivabilnost celic osnovne kulture se med izpostavljivjo vodikovem peroksidu bistveno ne spreminja (slika 4.20). Padec kultivabilnosti pa je očiten po daljem peroksidnem stresu stradanih celic.

4.6.2 Inkubacija celic *C. jejuni* pri atmosferski koncentraciji kisika

4.6.2.1 Vpliv predstradanja na celice med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika

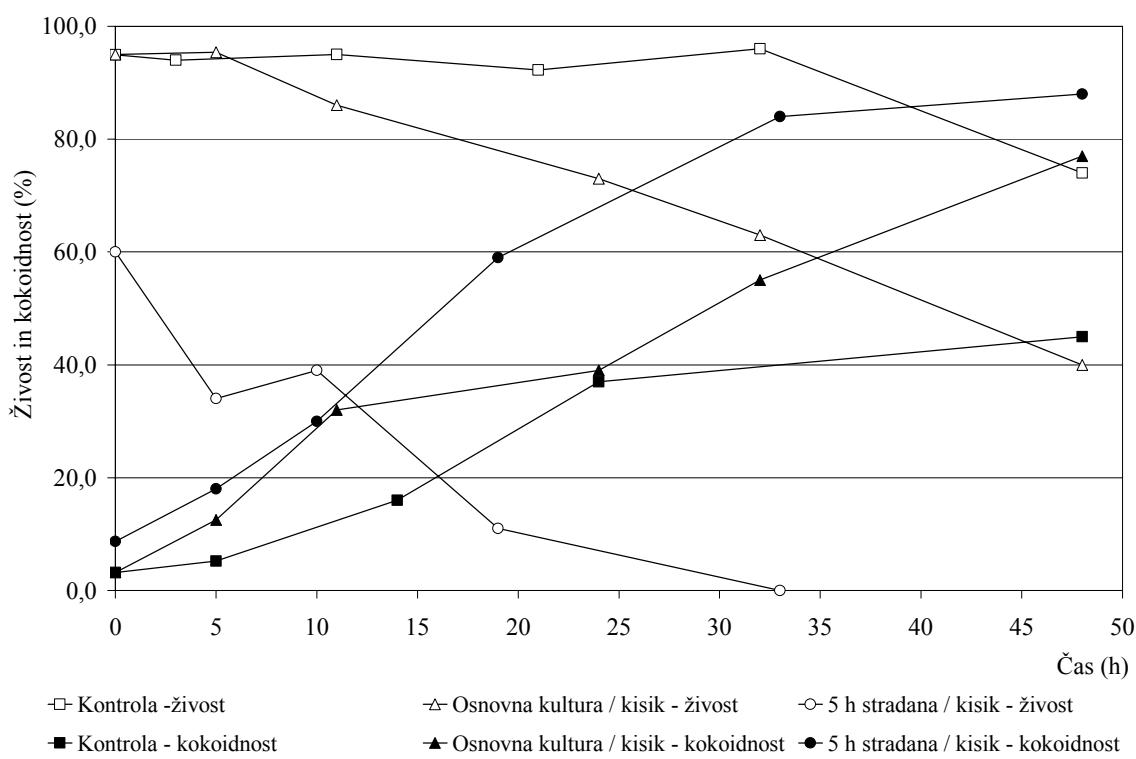
Vpliv predstradanja na preživelost in morfološke spremembe smo ugotovljali po dolgotrajni (50 do 70 ur) izpostavljivosti osnovne in 5 h stradane kulture iz obeh rastnih faz atmosferski koncentraciji kisika. Vzorce smo vzorčili po 5, 10, 14, 24, 32, 37, 48 in 72 h inkubacije na atmosferskem kisiku. Osnovno kulturo, ki smo jo uporabili kot kontrolno kulturo smo inkubirali tudi pri mikraerofilnih, optimalnih pogojih in vzorčili po 10, 24, 37 in 72 h.

Živost in kultivabilnost celic *C. jejuni* med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika padata, kokoidnost pa s časom inkubacije narašča. Število kokoidnih celic predstavlja manjši del v ne-stradani (< 10 %) kulturi in začne naraščati po 30 h kultivacije. Istočasno število živih celic pada. Podobna, le večja tendenca naraščanja kokoidnih celic je bila opazna pri celicah, izpostavljenih kisiku. Predhodno 5 h stradanje pred izpostavljivijo kisiku pa je povzročilo hitrejše morfološke spremembe ter padec števila živih celic (slika 4.21). Podobne, a hitrejše spremembe so bile prisotne tudi pri celicah iz stacionarne faze rasti (slika 4.22). Razvidno je, da se živost celic iz eksponentne faze ohranja bolje kot živost celic iz stacionarne faze, ki pada hitreje.



Slika 4.21: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.

Figure 4.21: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the exponential growth phase, during exposure to atm. conc. of oxygen.



Slika 4.22: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.

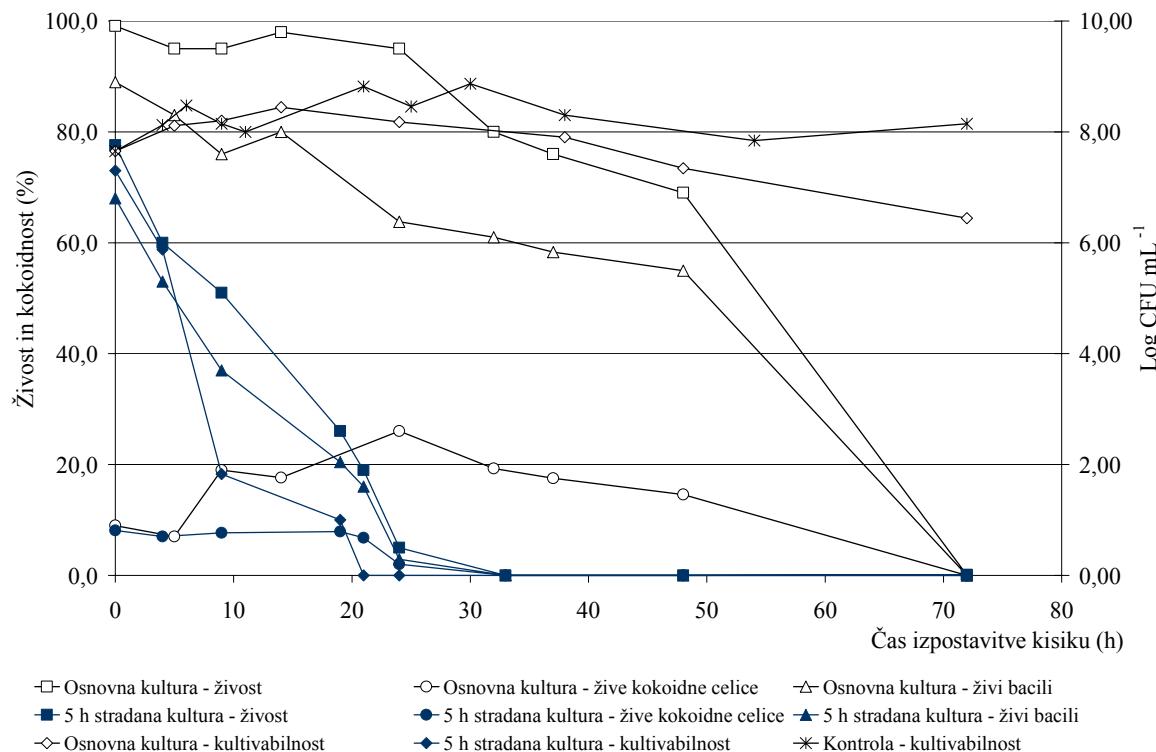
Figure 4.22: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from the stationary growth phase, during exposure to atm. conc. of oxygen.

Iz primerjave ne-stradane ter 5 ur stradane kulture bakterij rodu *Campylobacter* je razviden večji vpliv atmosferske koncentracije kisika na stradano kulturo. Po 45 dneh inkubacije na kisiku je razlika v živosti osnovne ter 5 h stradane kulture znašala približno 40 %. Torej predstavlja inkubacija na kisiku za stradano kulturo mnogo večji stres kot za osnovno, to pa pomeni, da celice med stradanjem niso razvile dodatne odpornosti na stres. Možno je tudi, da je trajanje stresa predolgo, da bi celice kljub pomanjkanju hranil lahko popravile vse poškodbe, ki jih inkubacija pri atmosferski koncentraciji kisika povzroči.

Vidno je bilo nižje začetno število živih celic ter višje število kokoidnih celic (za približno 20 %) pri stradani kulturi. Zmanjševanje živih celic je bilo pri stradani kulturi hitrejše kot pri osnovni kulturi, prav tako formacija kokoidnih celic. Slednje lahko povežemo z odgovorom celice na pogoje stradanja ter ločevanjem zunanje od notranje membrane s sočasnim porušenjem notranje citoplazme in napihovanjem zunanje membrane. Celice se tako prilagodijo stradanju z zmanjšanjem celičnega volumna, da bi se povečala celična površina (Harvey in Leach, 1998). Razvidno je tudi, da predhodno stradanje ne pripomore k povečani odpornosti celic proti atmosferski koncentraciji kisika, kot je bilo to razvidno pri topotnem in peroksidnem stresu (poglavlje 4.4). Med eksponentno in stacionarno fazo 5 h stradane kulture je razlika le v začetni živosti celic, ki je najvišja v eksponentni fazi, živost pa med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika pada zelo podobno. Podobno velja za kokoidnost, saj ima višjo začetno kokoidnost pred inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika 5 h stradana kultura v eksponentni fazi, rast deleža kokoidnih celic pa je med inkubacijo zelo podobna. Celice stradane kulture iz eksponentne faze rasti imajo

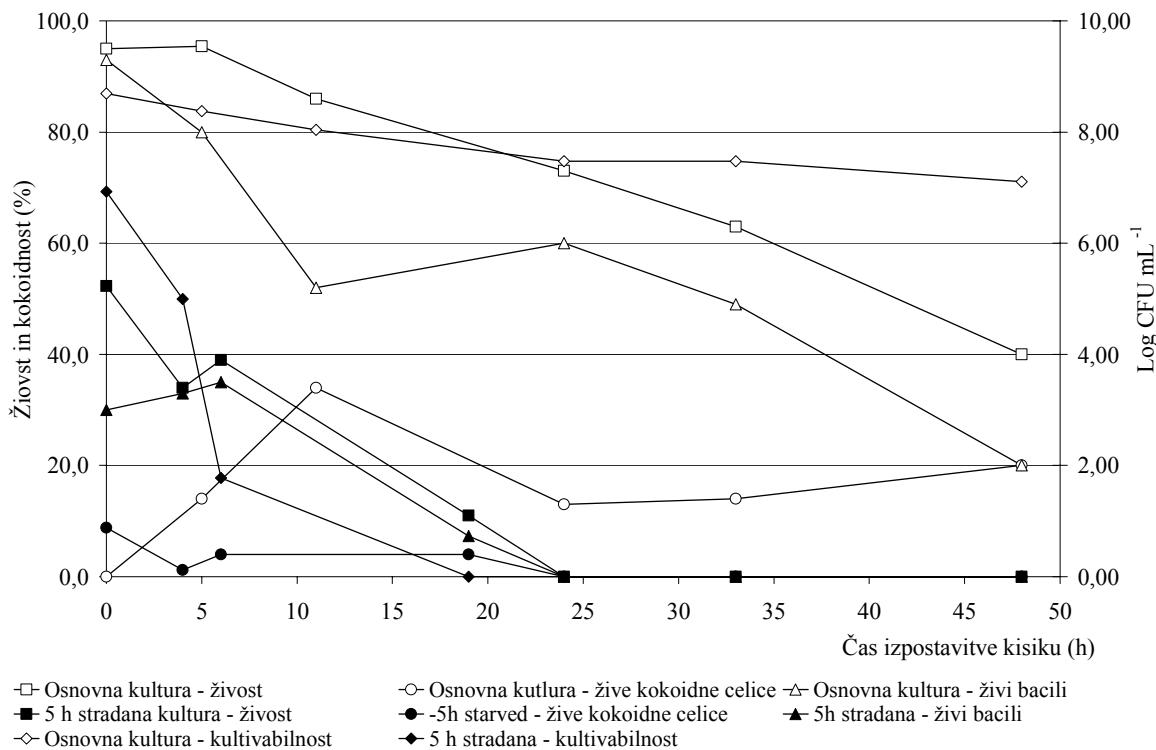
višjo začetno kokoidnost, verjetno zaradi boljšega odgovora na stradanje in zato večjo tvorbo kokoidnih celic. Harvey in Leach (1998) navajata, da visoke koncentracije kisika in istočasno zmanjšanje hranil povzroči spremembo morfologije iz spiralne v kokoidno obliko z začetnih 5-10 % do 50-60 %. Z elektronsko mikroskopijo sta ugotovila, da so takšne kokoidne celice lahko degenerirani in imajo porušeno strukturo membrane.

Številni avtorji povezujejo stanje VBNC s spremembami velikosti ter prehodom celic iz spiralne v kokoidno obliko (Ng in sod., 1985; Rollins in Colwell, 1986; Moran in Upton, 1987; Buck in sod., 1983; Federighi in sod., 1998), nekateri pa to teorijo zavračajo (Hazeleger in sod., 1995). V populaciji nekultivabilnih celic, izpostavljenih kisikovem stresu smo tukaj eksperimenta dokazali kokoidne in tudi nekultivabilne spiralne celice (slika 4.23) ter tako potrdili prisotnost obeh oblik v stanju VBNC. Podobno navajajo tudi Federighi in sod. (1998), ki pravijo, da je sprememba v morfologiji odvisna od seva in da so v stanju VBNC lahko spiralne celice, pri nekaterih sevih pa so v stanju VBNC kokoidne celice. Rezultati nakazujejo, da kokoidne celice ne rastejo na agarskih ploščah. Tako kot pri osnovni kulturi lahko tudi pri stradani kulturi trdimo, da na gojišču rastejo spiralne celice, kokoidne celice pa ne vplivajo na kultivabilnost.



Slika 4.23: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.

Figure 4.23: Viability (%), culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), viable spiral cells (%) and viable coccoid cells (%) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from exponential growth phase, during exposure to atm. conc. of oxygen.



Slika 4.24: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) osnovne ter 5 h stradane kulture celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti med inkubacijo na atm. konc. kisika.

Figure 4.24: Viability (%), culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), viable spiral cells (%) and viable coccoid cells (%) of fed and 5 h starved *C. jejuni* cells from stationary growth phase, during exposure to atm. conc. of oxygen.

Kultivabilnost se med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika spreminja, saj se celice v prvih urah stresa še razmnožujejo (do 8,4 log stopnje), po 15 h inkubacije na atmosferski koncentraciji kisika pa začne padati (po 70 urah inkubacije znaša 6,4 log stopnje). Podatki nakazujejo, da ni velike razlike med kultivabilnostjo celic eksponentne (slika 4.23) in stacionarne (slika 4.24) faze med inkubacijo na atmosferskem kisiku, saj je poleg nižje kultivabilnosti tudi živost kulture iz stacionarne faze, ki je osnovni pogoj za kultivabilnost, nižja.

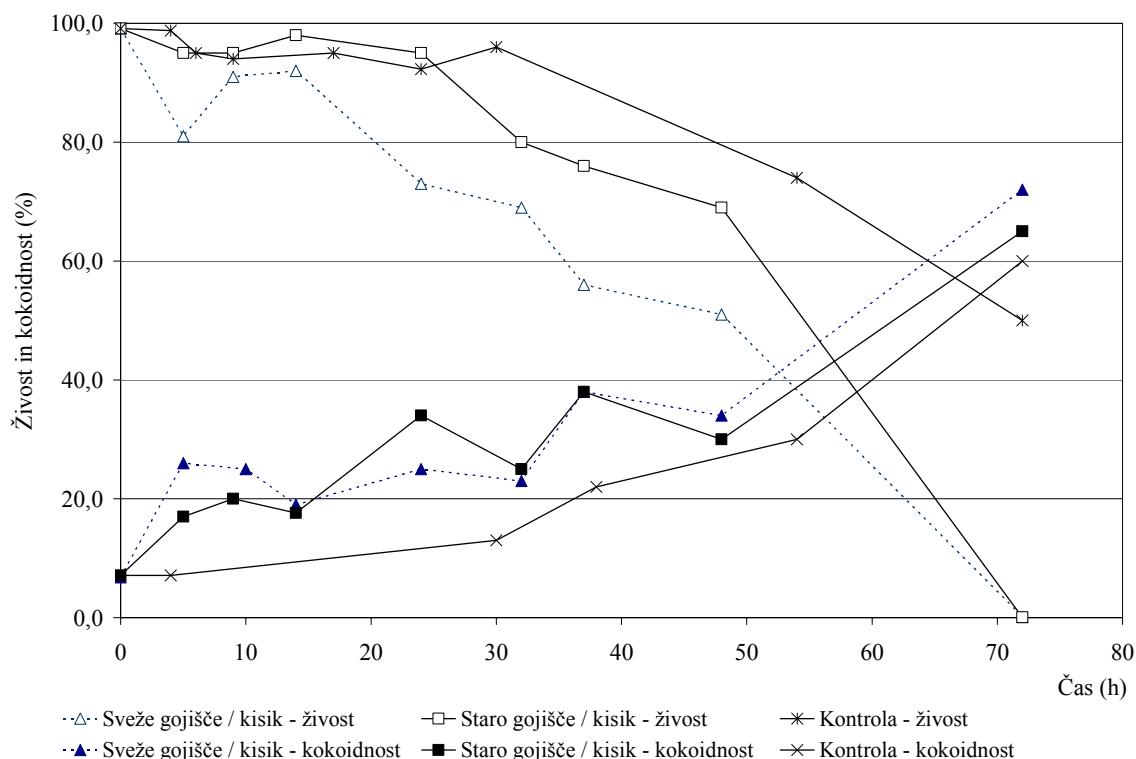
Število živih celic je bilo v razmerju s številom kultivabilnih ter živih celic spiralne oblike. Njihovo število se je pod vplivom kisikovega stresa zmanjšalo pri celicah iz obeh rastnih faz. Razmerje živih celic spiralne oblike je bilo pri tem približno 90 % v ne-stresni ter 70 – 80 % v kulturi, izpostavljeni kisikovem stresu (slika 4.21). Število kokoidnih celic je pri tem naraslo ter doseglo maksimum (< 30 %) po 25 urah inkubacije na kisiku; vendar nismo potrdili vpliva živih kokoidnih celic na kultivabilnost kulture (slika 4.23). Ponovno lahko sklepamo, da so žive celice spiralne oblike edine sposobne rasti na ploščah.

Podoben fenomen je bil opazen tudi v stradani kulturi. Inkubacija pri atmosferski koncentraciji kisika je močno vplivala na kultivabilnost celic 5 h stradane kulture. Stradane celice niso kazale povišane odpornosti na oksidativen stres, temveč so bile na stres bistveno bolj občutljive. Kultivabilnost je močno padla že po 10 h inkubacije pri 5 h stradani kulturi (pod 2 log stopnji) iz obeh rastnih faz, živost pa se je bolje ohranila (sliki

4.23 in 4.24). To pomeni, da je bila večina še živih celic v stanju VBNC. Prehod celic v odpornejše stanje celic VBNC večinomasovpa s spremembom velikosti celic ter prehodom iz spiralne v kokoidno obliko (Ng in sod., 1985; Rollins in Colwell, 1986; Moran in Upton, 1987). Po 10 h inkubacije na kisiku so žive celice stradane kulture iz obeh rastnih faz večinoma predstavljale žive bacile (približno 30 %), manjši delež pa kokoidne celice (približno 5 %). Harvey in Leach (1998) navajata, da oksidativni stres (inkubacija pri atmosferski koncentraciji kisika) in pomanjkanje hranil povzročita spremembu tudi v kultivabilnosti. Jasno je, da degenerirane kokoidne celice, ki imajo porušeno strukturo membrane, ne morejo biti kultivabilne. Kljub temu so bile celice zmožne preživeti ob trajnejši prisotnosti kisika s prehodom v novo obliko oz. stanje (Harvey in Leach, 1998).

4.6.2.2 Vpliv gojišča na celice pri atmosferski koncentraciji kisika

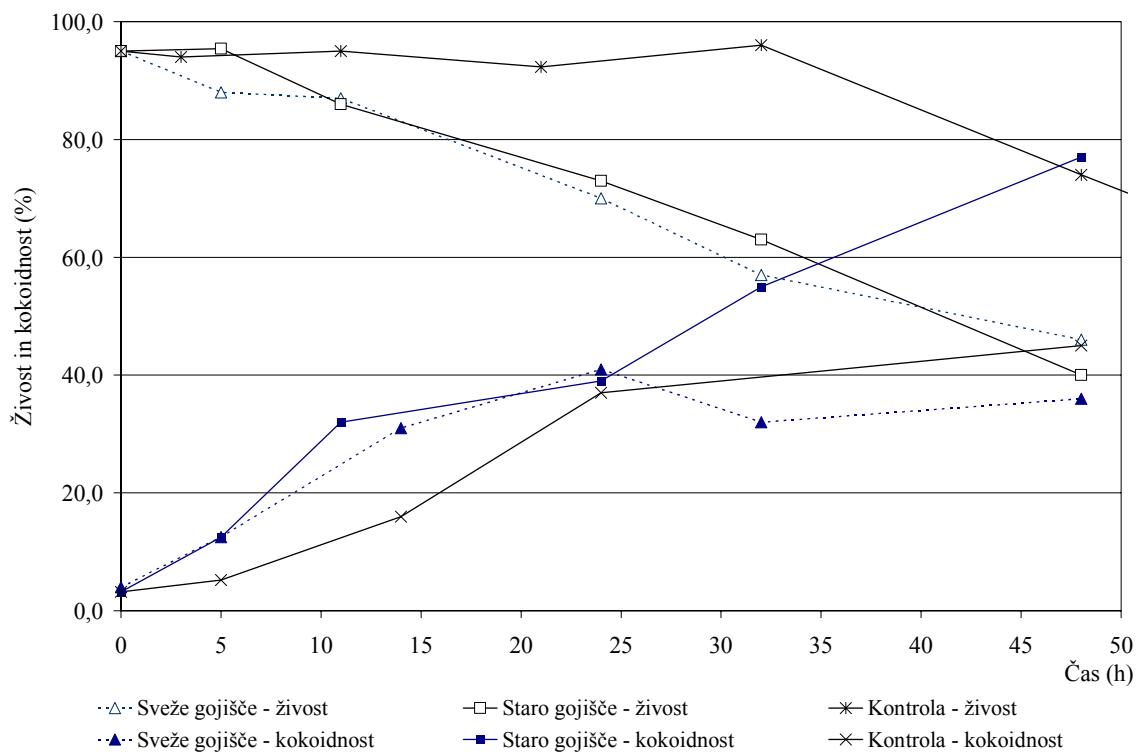
Z namenom ugotoviti vpliv starega in svežega gojišča na celično odpornost proti stresu, smo del kulture, ki je dosegla eksponentno oz. stacionarno fazo rasti, prenesli v novo (sveže) gojišče in jo inkubirali na atmosferski koncentraciji kisika. Ostalo kulturo smo naprej inkubirali v istem (starem) gojišču ter jo tudi inkubirali na atmosferski koncentraciji kisika. Vzorce smo vzorčili po 5, 10, 14, 24, 32, 37, 48 in 72 h inkubacije na atmosferskem kisiku. Kulturo, ki smo jo uporabili kot kontrolno kulturo, smo inkubirali pri mikraerofilnih pogojih in vzorčili po 10, 24, 37, in 72 h.



Slika 4.25: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne kulture celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.

Figure 4.25: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed *C. jejuni* cells from exponential growth phase, during exposure to atmosphere oxygen concentration in spent or fresh medium.

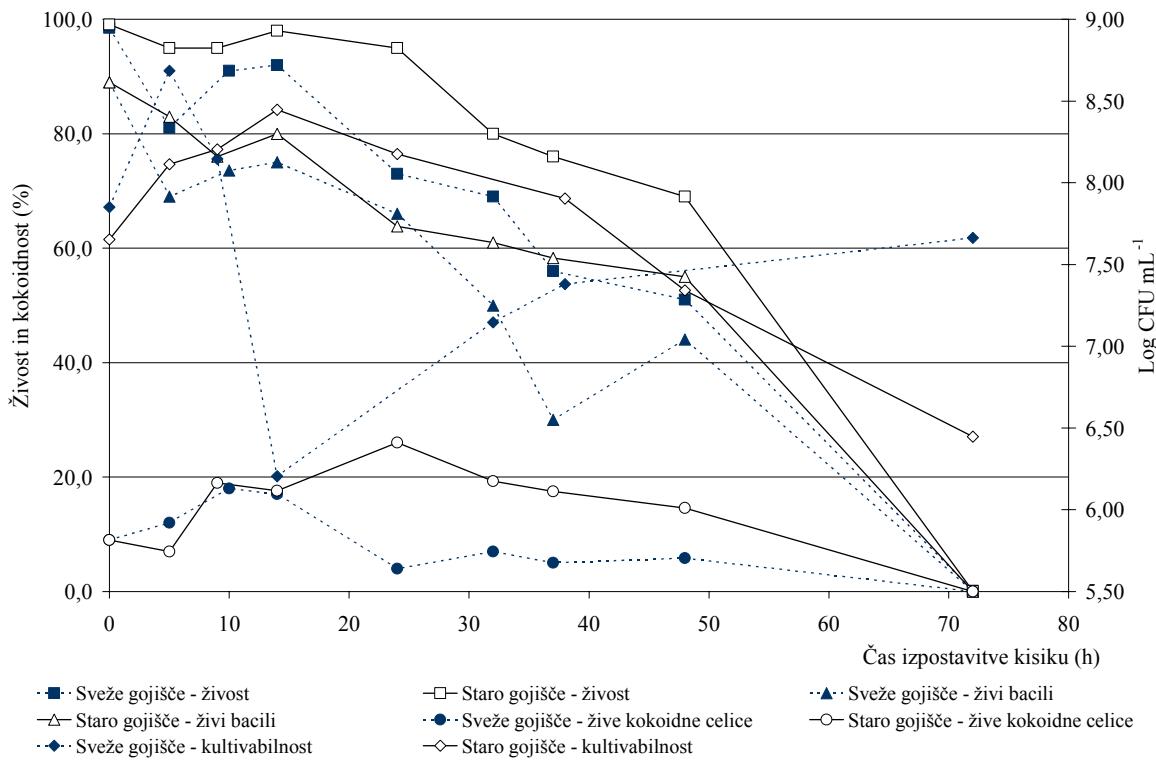
Iz primerjave števila živih celic iz eksponentne faze rasti med inkubacijo na atmosferski konc. kisika v različnih gojiščih bakterij rodu *Campylobacter* je razviden večji vpliv atmosferske koncentracije kisika na kulturo, inkubirano v svežem gojišču (slika 4.25). Delež živih celic, inkubiranih na kisiku v starem gojišču, je večji (približno za 20 %) od deleža živih celic, inkubiranih v svežem gojišču. V živosti kulture iz stacionarne faze (slika 4.26) ni bilo vidne razlike med inkubacijo v svežem oz. starem gojišču in tudi vpliva starega gojišča na celice iz stacionarne faze rasti.



Slika 4.26: Živost (%) in kokoidnost (%) osnovne kulture celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.

Figure 4.26: Viability (%) and coccoid cell formation (%) of fed *C. jejuni* cells from stationary growth phase, during exposure to atmosphere oxygen concentration in spent or fresh medium.

Izpostavitev celic atm. konc. kisika v svežem gojišču je privedla do hitrega padca kultivabilnosti celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti (>2 log stopnji) glede na osnovno kulturo (slika 4.27). Padec kultivabilnosti je bil pri celicah iz stacionarne faze rasti postopejši (slika 4.28). Kultivabilnost celic iz eksponentne faze rastu (slika 4.27) je med inkubacijo v svežem gojišču pri atmosferski koncentraciji kisika v prvih 14 h močno padla (za več kot 2 log stopnji), živost pa je ostala visoka (približno 90 %). Po 14 h inkubacije v svežem gojišču pri atmosferski koncentraciji kisika si celice najverjetneje opomorejo in se začnejo tudi deliti, saj začne število CFU/mL naraščati, pa tudi živost kulture je takrat najvišja. Nasprotno so pri inkubaciji celic na atm. konc kisika v starem gojišču vidni zaščitni vplivi gojišča na kultivabilnost. Le ta se pri kulturi, inkubirani na kisiku v starem gojišču do 50 ur ni bistveno razlikovala od kultivabilnosti osnovne kulture brez stresa in je po 15 h inkubaciji na kisiku znašala 8,5 log stopnje (slika 4.23).

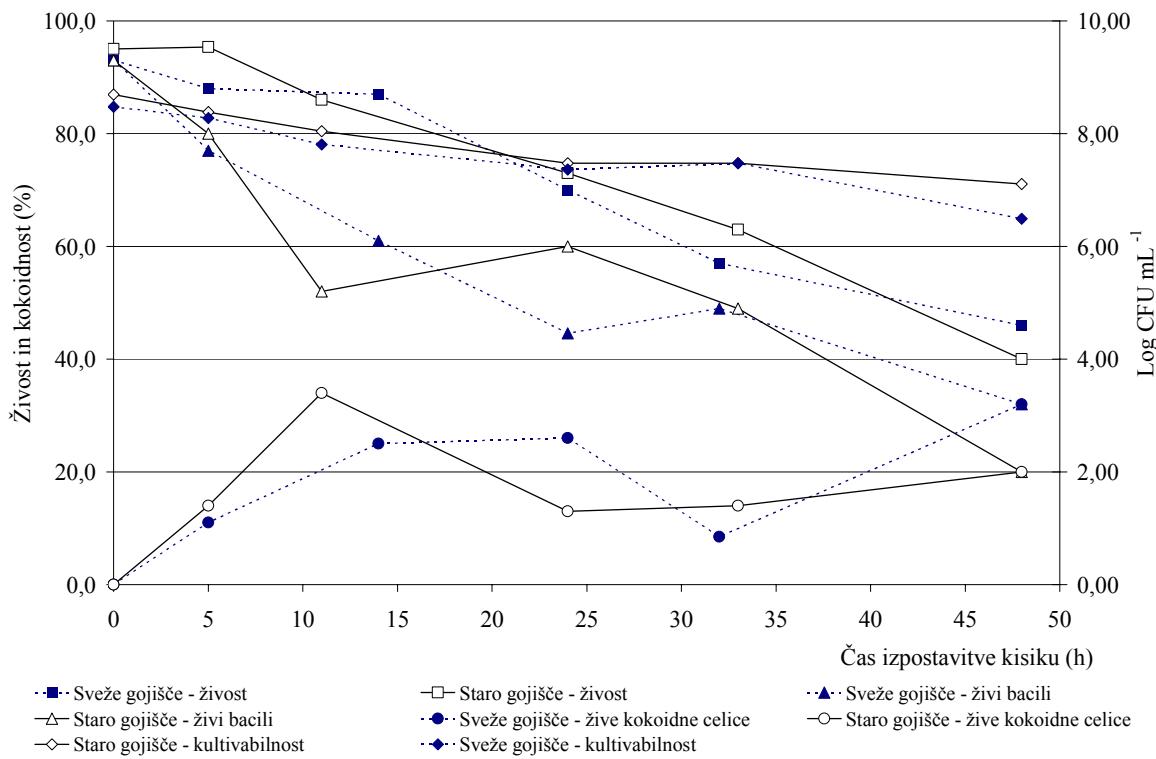


Slika 4.27: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.

Figure 4.27: Viability (%), culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), viable spiral cells (%) and viable coccoid cells (%) of *C. jejuni* cells from exponential growth phase, during exposure to atmosphere oxygen concentration in spent or fresh medium.

Rezultati nakazujejo na signalne molekule v starem gojišču, o katerih najdemo le nekaj poročil v literaturi. Te molekule celice med eksponentno fazo rasti izločajo v gojišče ter tako povečajo odpornost proti stresu tudi, kadar so v supernatantu starega gojišča naknadno dodane v sveže gojišče (Kaprelyants in sod., 1994; McDougald in sod., 1998). Maloštevilni literaturni podatki glede vpliva zunajceličnih molekul na kasnejšo odpornost proti stresu navajajo, da je le ta tudi sevno in vrstno specifičen.

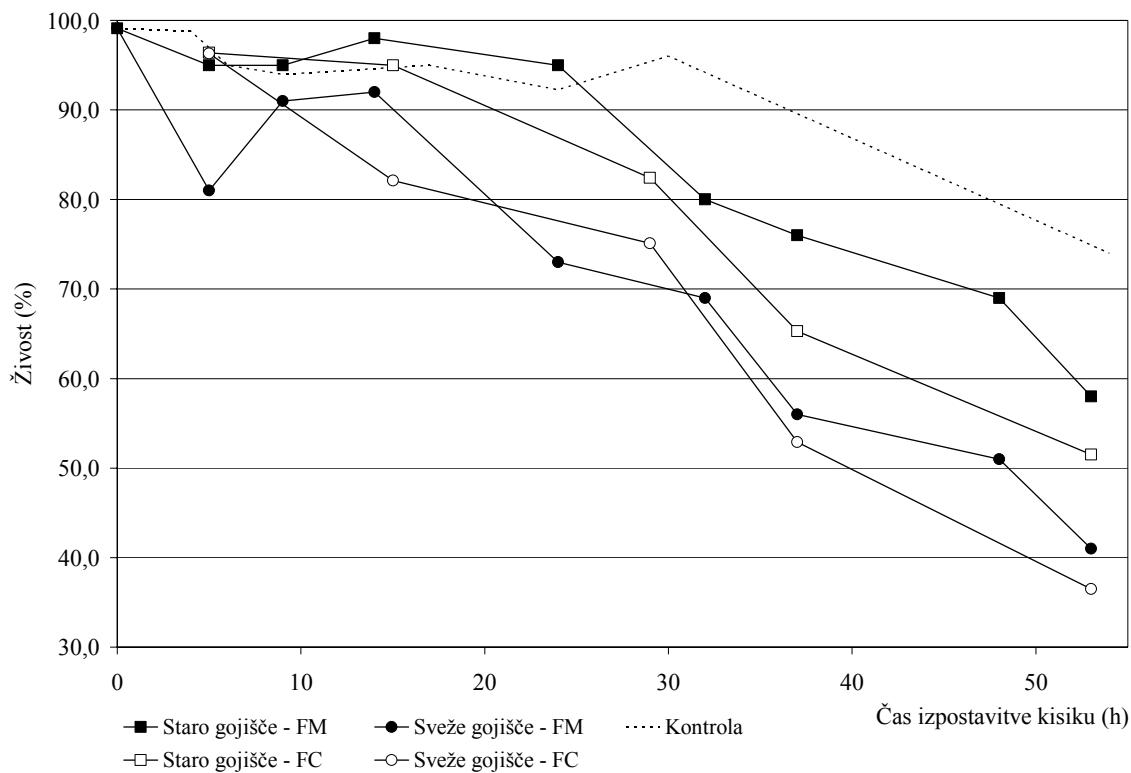
Kelly in sod. (2003) povezujejo zaščitno vlogo starega gojišča z oksidativnim stresom. Enak učinek na preživelost celic kot staro (zaščitno) gojišče so dosegli, če so sveže gojišče prepihalo s plinom, ki je vseboval le 0,5 % kisika. Če so celice *C. jejuni* kultivirali v svežem gojišču, prepahanem s plinom, ki je vseboval 5 % kisika, so kazale na stresne pogoje. Podobno so opazili tudi Murphy in sod. (2003), ki so proučevali vpliv gojišča na kultivabilnost kampilobakterjev iz eksponentne in stacionarne faze rasti pri kislinskem stresu. Ugotovili so, da so celice, inkubirane v starem gojišču, bolj odporne na kislinski stres od celic v svežem gojišču. Celice iz eksponentne faze v obeh primerih kažejo večjo odpornost, ki pa se jim po 3 h inkubacije zmanjša. Tudi pri našem eksperimentu je kultivabilnost kulture iz eksponentne faze, inkubirane v svežem gojišču močno upadla v prvih urah inkubacije na kisiku (na 6,2 log stopnje), a se je nato postopno zvišala (na 7,9 log stopnje) (slika 4.27). Murphy in sod. (2003) pa takih podatkov nimajo, saj so prekinili inkubacijo že po 6 h. Verjetno gre vzroke za ponoven dvig kultivabilnosti iskati drugje.



Slika 4.28: Živost (%), kultivabilnost ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), ter delež živih kokoidnih celic (%) in živih spiralnih celic (%) celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika.

Figure 4.28: Viability (%), culturability ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), viable spiral cells (%) and viable coccoid cells (%) of *C. jejuni* cells from stationary growth phase, during exposure to atmosphere oxygen concentration in spent or fresh medium.

Kelly in sod. (2003) razlagajo t.i. "Phoenix" fenomen celic *C. jejuni*, inkubiranih v svežem gojišču pod pogoji oksidativnega stresa (5 % konc. kisika), kot pojav mutantov, ki se razmnožijo ter prerastejo neprilagojeno populacijo. Druga možnost je prehod celic v stanje VBNC (Rollins in Colwell, 1986; Roszak in Colwell, 1987), v katerem so celice sposobne premagati toksičnost kisikovih radikalov. Iz primerjave števila živih ter kultivabilnih celic iz eksponentne faze rasti med inkubacijo na atmosferski konc. kisika v svežem gojišču bakterij *C. jejuni* je razviden prehod celic v stanje VBNC. Delež živih celic je tudi po 15 h izpostavite stresnim pogojem kisika ostal 90 %, kultivabilnost pa se je zmanjšala za 2,5 log stopnje. Živost in kultivabilnost celic, izpostavljenih kisikovemu stresu v svežem gojišču, sta bila nižja v primerjavi z inkubacijo v starem gojišču. V kulti bakterij iz stacionarne faze podobna razmerja niso bila dokazana (slika 4.28).

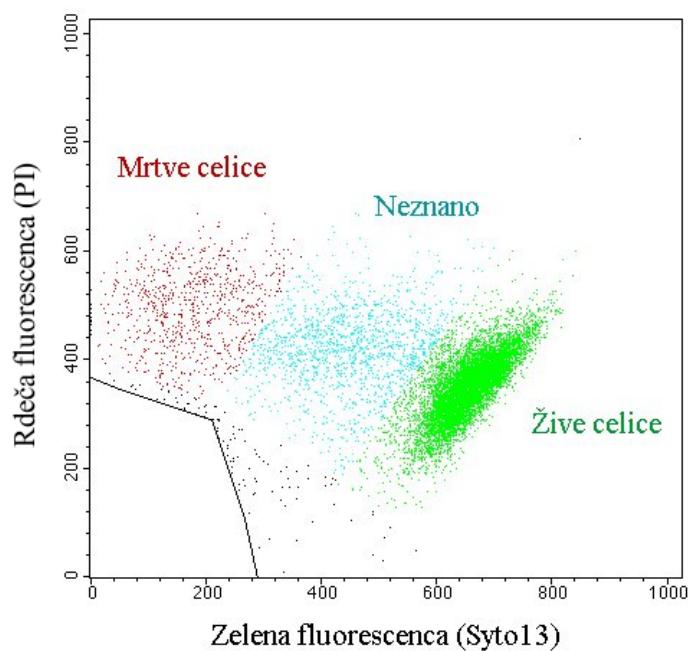


Slika 4.29: Živost (%) celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v starem oz. svežem gojišču po izpostavitvi atm. konc. kisika – primerjava rezultatov fluorescenčne mikroskopije (FM) ter pretočne citometrije (FC).

Figure 4.29: Viability (%) of *C. jejuni* cells from exponential growth phase, during exposure to atmosphere oxygen concentration in spent or fresh medium, evaluated by fluorescent microscopy (FM) and flow cytometry (FC).

Pri določanju živosti kulture iz eksponentne faze, inkubirane na atm. konc. kisika v različnih gojiščih smo poleg fluorescentnega mikroskopa uporabili tudi tehniko pretočne citometrije. V splošnem so se rezultati, dobljeni z obema tehnikama, ujemali (slika 4.29).

Pretočna citometrija ponuja alternativno metodo določanja količine fluorescentnih barvil, ki jih celice akumulirajo (Davey in Kell, 1996). Metoda omogoča analize na posameznih celicah in z manjšo koncentracijo celic. Metoda je tudi hitra in dopušča sočasne meritve večjega števila celičnih parametrov z zelo dobro natančnostjo (Joux in Lebaron, 2000; Ueckert in sod., 1995), zato postaja vse bolj popularna. S pretočno citometrijo smo po barvanju z barvili SYTO 13 ter PI pri našem eksperimentu jasno razlikovali med živimi in mrtvimi celicami. Tudi s pretočno citometrijo (podobno kot s fluorescentnim mikroskopom) smo dokazali zaščitni vpliv molekul, prisotnih v starem gojišču na celice, izpostavljeni kisiku. Zanimiv pa je bil pojav nove oz. neznane populacije, viden samo pri spremljanju celic z metodo pretočne citometrije (slika 4.30). Po 15 h inkubaciji celic v pogojih kisikovega stresa v svežem gojišču je bila nova oz. neznana populacija celic umeščena med žive in mrtve celice. Sklepamo lahko, da omenjene celice ustrezajo populaciji VBNC.



Slika 4.30: Primer rezultatov pretočne citometrije celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti med inkubacijo v svežem gojišču po 15 h izpostavitvi atm. konc. kisika.

Figure 4.30: Results of flow cytometry analysis of *C. jejuni* cells from exponential growth phase, during exposure to atmosphere oxygen concentration for 15 h in fresh medium.

4.7 VPLIV STRADANJA IN/ALI TOPLITNEGA STRESA NA ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO TER ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM BAKTERIJ *C. JEJUNI*

Oksidativni stres nastane po izpostavitvi celice prostim kisikovim radikalom, kot so superoksidni anion ($O_2\bullet^-$), vodikov peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal ($HO\bullet$), ki lahko letalno poškodujejo proteine, lipide, nukleinske kislne in celične membrane. Poškodbe lahko povzročijo tudi spojine kisika z vodikom, klorom ali dušikom v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih (Storz in Imlay, 1999). Omenjene ROS lahko nastanejo med normalnim (mikro)aerobnim metabolizmom bakterij *C. jejuni*, med prenosom, ko so celice izpostavljene atmosferski koncentraciji kisika, ali med kontaktom s humanim imunskim odzivom (Storz in Imlay, 1999). Povečana količina ROS privede v celici do stresnih odzivov, ki sprožijo že prisotne antioksidativne obrambne sisteme ali vključujejo dodatno sintezo teh sistemov. Kampilobakterji so sposobni rasti v prisotnosti kisika. Za eliminacijo (nevtralizacijo) toksičnih kisikovih produktov in s tem preživetje ob prisotnosti kisika potrebujejo celični obrambni mehanizem.

Za oceno znotrajcelične tvorbe ROS smo uporabili fluorescenčno metodo z barvilm dihidro-2,7-diklorofluorescein, ki je sposobno reakcije z oksidanti (Martin in sod., 1998). Diacetat barvila preide v citosol celice s pasivnim transportom, kjer se deacetilira z nespecifičnimi esterazami, zadrži ter ob prisotnosti prostih radikalov oksidira do fluorescentne oblike. Le ta preide v supernatant, v katerem z merjenjem fluorescence ocenimo znotrajcelično oksidacijo (Singler in sod., 1999; Jakubowski in Bartosz, 1997).

Pri obrambi celic na oksidativni stres in za inaktivacijo ROS pride v celicah do izražanja encimov, kot so superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza, glutation sintetaza, glutation reduktaza. Ti so vključeni v primarni mehanizem zaščite celice in sodelujejo pri detoksifikaciji reaktivnih kisikovih radikalov ter popravilu povzročenih poškodb s toksičnimi kisikovimi radikali (Storz in Imlay, 1999; Purdy in sod., 1999).

V obrambnem mehanizmu kampilobakterjev imajo vlogo predvsem encimi, kot so:

- superoksid dismutaza (SodB) za preprečevanje škodljivega vpliva izpostavitve superoksidnim radikalom (Purdy in sod., 1999; Pesci in sod., 1994; Purdy in Park, 1994),
- alkalna hidroperoksidna reduktaza (AhpC) za obrambo proti peroxydalu stresu (Baillon in sod., 1999),
- katalaza (KatA) za obrambo proti peroxydalu stresu (Day in sod., 2000; Grant in Park, 1995).

Zanimal nas je vpliv stradanja in dodatnega topotnega stresa na indukcijo oksidativnega stresa pri celicah *C. jejuni*. Kot smo opisali v poglavju 4.3, je bila največja topotna odpornosti dokazana v 5 ur stradani kulturi pri 42 °C. Zato smo kulturo iz eksponentne faze 5 h inkubirali v fiziološki raztopini ter ugotavliali vpliv stradanja na znotrajcelično oksidacijo ter aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema. Vpliv dodatnega topotnega stresa v predhodno stradani kulturi na indukcijo oksidativnega stresa smo ugotavliali po izpostavitvi 5 h stradane kulture pri temperaturi 48 °C za 30 in 60 min. Rezultati poglavja 4.7 so zbrani tudi v znanstveno raziskovalnem članku z naslovom 'The effect of starvation on physiology, morphology and stress response of *Campylobacter jejuni* cells' in poslani v objavo v revijo International Journal of Food Microbiology.

4.7.1 Vpliv stradanja na raven oksidantov v celici ter indukcijo antioksidativnega obrambnega sistema

Pet urno stradanje povzroči zmanjšanje tvorbe ROS glede na osnovno kulturo. Znotrajcelična oksidacije je bila v stradani kulti manjša za 6,7 krat, medtem ko je bilo v osnovni kulti vidno 1,5 kratno povečanje (preglednica 4.2). Posledično se aktivnost katalaze in superoksid dismutaze med 5-urnim stradanjem ni spremenila glede na osnovno kulturo. V slednji je bil vidno manjše povečanje katalaze in superoksid dismutaze (preglednica 4.3). Zmanjšanje tvorbe ROS je v stradanih celicah lahko posledica manjše metabolne aktivnosti. Le-to lahko razložimo tudi s pojavom krajših spiralnih celic v 5 h stradani kulti.

Preglednica 4.2: Spremembe nivoja znotrajcelične oksidacije, ocenjene kot fluorescenčna intenziteta, med 5-urno inkubacijo *C. jejuni* K49/4 v gojišču Preston (osnovna kultura) ali fiziološki raztopini (stradana kultura)

Table 4.2: Change in intracellular oxidant level measured as fluorescence intensity during 5-hour incubation of *C. jejuni* K49/4 in Preston medium (fed culture) or Ringer solution (starved culture)

	Osnovna kultura	Stradana kultura
n-kratna sprememba	↑ 1.5	↓ 6.7

Preglednica 4.3: Aktivnost katalaze in superoksid dismutaze (SOD) pri *C. jejuni* K49/4 iz eksponentne faze rasti (0 h) ter po 5-urni inkubaciji (5 h) v gojišču (osnovna kultura) ali fiziološki raztopini (stradana kultura). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti ± standardna deviacija

Table 4.3: Catalase and superoxide dismutase activity (SOD) in *C. jejuni* K49/4 in the exponential growth phase (0 h) and after 5-hour incubation (5 h) in medium (fed culture) or Ringer solution (starved culture). Results are expressed as mean values ± SD

Čas (h)	Osnovna kultura		Stradana kultura	
	Specifična aktivnost katalaze (A/s mg proteina) ± SD	Specifična aktivnost SOD (enote/mg proteina) ± SD	Specifična aktivnost katalaze (A/s mg proteina) ± SD	Specifična aktivnost SOD (enote/mg proteina) ± SD
0 h	0.0014 ± 0.009	11.98 ± 0.36	0.0014 ± 0.009	11.98 ± 0.36
5 h	0.0024 ± 0.005	12.32 ± 0.31	0.0016 ± 0.004	11.68 ± 0.35

4.7.2 Vpliv dodatnega toplotnega stresa na raven oksidantov v celici ter indukcijo antioksidativnega obrambnega sistema

Dodatni toplotni stres je v celicah stradane kulture povzročil dvig fluorescenčne intenzitete, ter s tem ROS za 2,4 krat po 30 min ter 2,9 krat po 60 min v primerjavi z osnovno kulturo (preglednica 4.4), medtem ko ni bilo vidne večje indukcije antioksidativnega obrambnega sistema (preglednica 4.5). Prosti radikali lahko povzročijo poškodbe makromolekul v celici, zato so mehanizmi antioksidativnega obrambnega sistema pomembni za preprečitev tvorbe ROS ter njihovo detoksifikacijo (Storz in Imlay, 1999; Purdy in sod., 1999). Kljub povečani znotrajcelični oksidaciji stradane kulture po toplotnemu stresu ni bilo induciranega odziva na oksidativni stres. Vzroke lahko, podobno kot Moore (2001), dobimo pri manjši metabolni energiji stradane kulture, saj je le-ta usmerjena v iskanje hrani, prehod v odpornejša stanja ter druge celične procese, pomembne za preživetje celic.

Preglednica 4.4: Spremembe nivoja znotrajcelične oksidacije, ocenjene kot fluorescenčna intenziteta, po izpostavitvi stradane kulture toplotnemu stresu glede na osnovno kulturo *C. jejuni* K49/4

Table 4.4: Change in intracellular oxidant level after heat stress exposure in starved culture compared to fed culture of *C. jejuni* K49/4

Čas izpostavitve 48 °C (min)	Stradana kultura (n-krat)
30 min	↑ 2.4
60 min	↑ 2.9

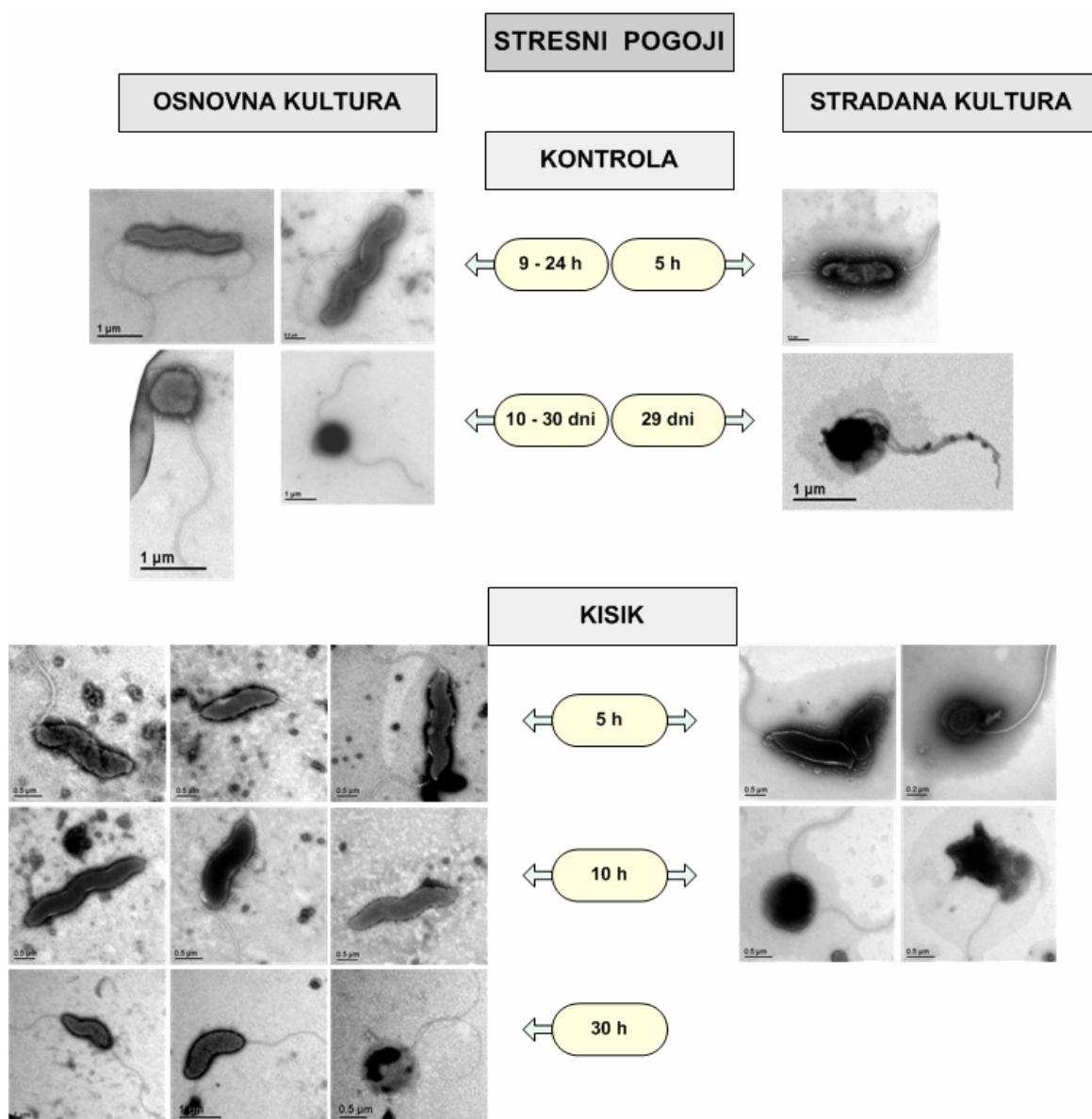
Preglednica 4.5: Aktivnost katalaze in superoksid dismutaze (SOD) pri *C. jejuni* K49/4 pred (0 h) in po toplotnemu stresu v osnovni in stradani kulturi. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti ± standardna deviacija

Table 4.5: Catalase and superoxide dismutase acivity (SOD) in *C. jejuni* K49/4 before (0 h) and after heat stress exposure in starved and fed culture. Results are expressed as mean values ± SD

Čas izpostavitvi 48 °C	Osnovna kultura		Stradana kultura	
	Specifična aktivnost katalaze (A/s mg proteina) ± SD	Specifična aktivnost SOD (enote/mg proteina) ± SD	Specifična aktivnost katalaze (A/s mg proteina) ± SD	Specifična aktivnost SOD (enote/mg proteina) ± SD
0 h	0.0014 ± 0.009	11.98 ± 0.36	0.0016 ± 0.004	11.68 ± 0.35
48 °C, 30 min	0.0026 ± 0.002	11.35 ± 0.21	0.0011 ± 0.006	11.96 ± 0.44
48 °C, 60 min	0.0018 ± 0.006	12.15 ± 0.35	0.0009 ± 0.002	11.85 ± 0.63

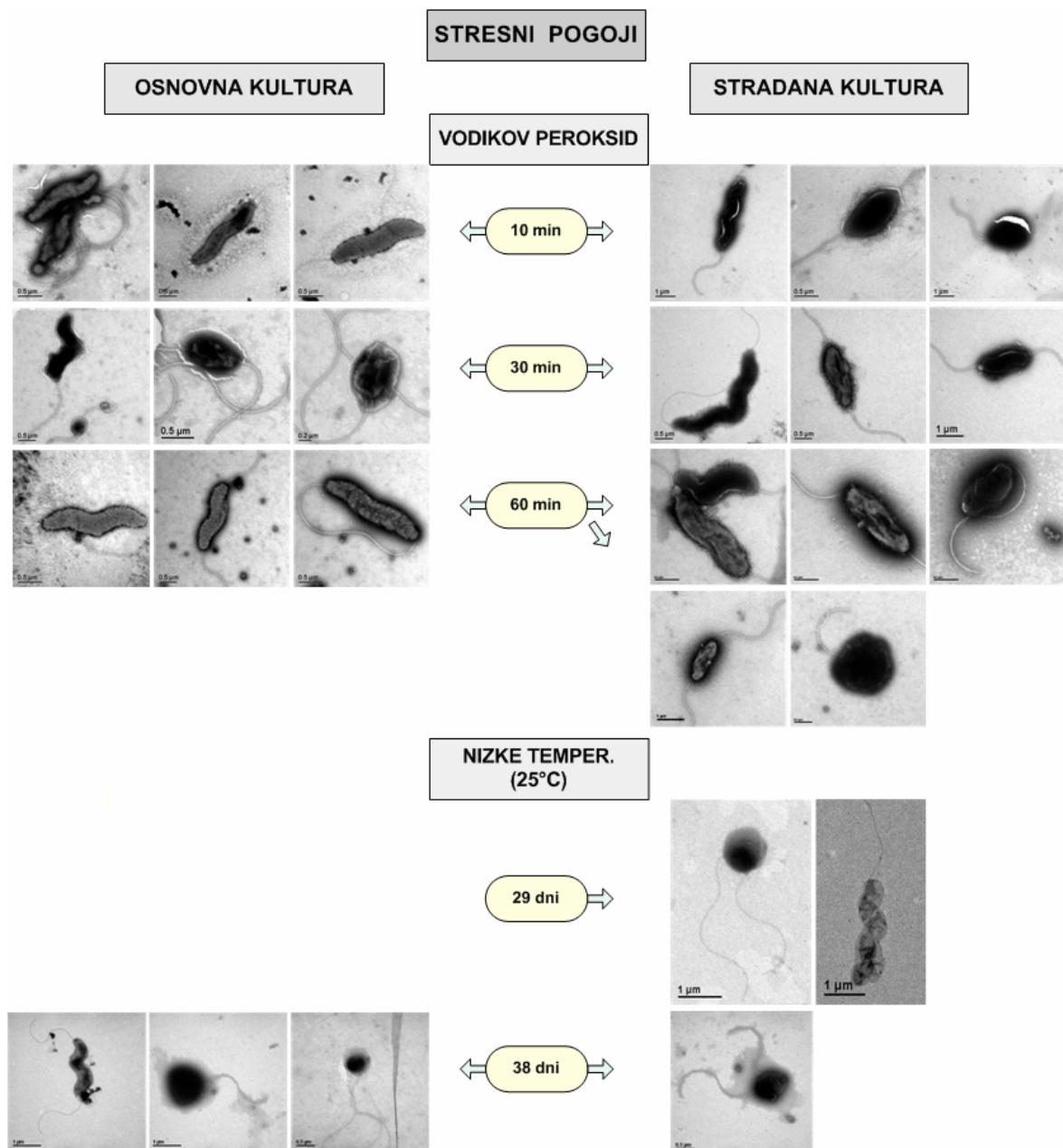
4.8 VPLIV RAZLIČNIH STRESOV NA MORFOLOGIJO BAKTERIJ *C. JEJUNI*

Celice osnovne in 5 h stradane kulture smo izpostavili temperaturnemu in oksidativnemu stresu ter jih analizirali pod elektronskim mikroskopom. Pri tem smo kot oksidativni stres uporabili atm. konc. kisika (5, 10 in 30 h) ter 3 mM konc. vodikovega peroksida (10, 30 in 60 min). Pogoje hladnega stresa smo dosegli z podaljšano izpostavitvijo celic temperaturi 25 °C (do 38 dni), kratkotrajnejši toplotni stres pa z izpostavitvijo celic temperaturi 48 °C (3 ter 60 min) in 55 °C (3, 20 in 60 min). Pri ostalih pogojih slikanje mikroskopskega preparata z elektronskim mikroskopom zaradi neustreznosti elektronske mrežice ni bilo izvedljivo.



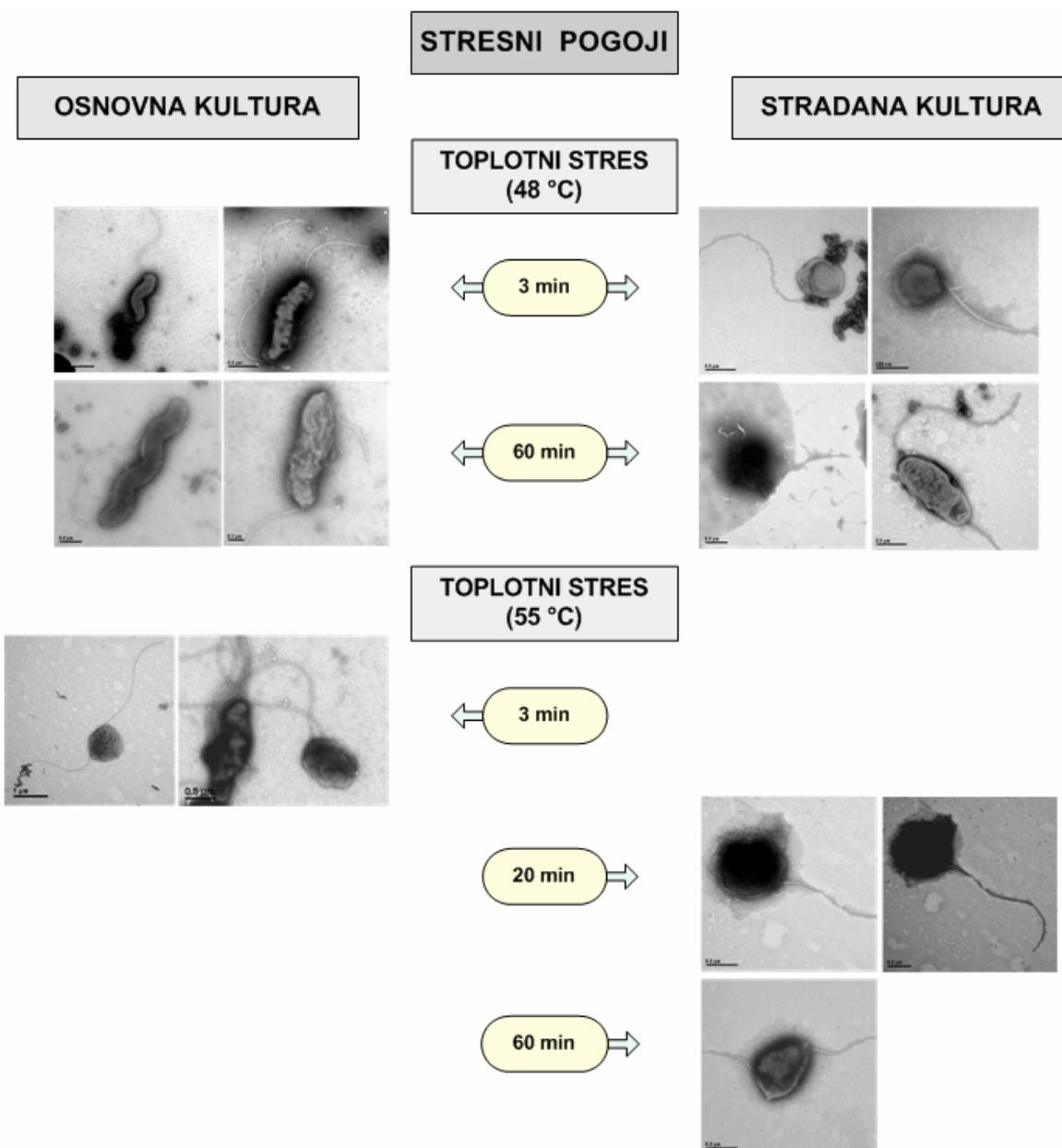
Slika 4.31: Morfologija bakterij *C. jejuni* pod elektronskim mikroskopom kontrolne kulture in po izpostavitvi atmosferski koncentraciji kisika (foto: Klančnik, 2005).

Figure 4.31: Transmission electron micrographs of *C. jejuni*, showing morphology changes of the control culture and after exposure to atmospheric concentration of oxygen.



Slika 4.32: Morfologija bakterij *C. jejuni* pod elektronskim mikroskopom po izpostavitvi 3 mM vodikovemu peroksidu in nizkim temperaturam (25 °C) (foto: Klančnik, 2005).

Figure 4.32: Transmission electron micrographs of *C. jejuni*, showing morphology changes after exposure to 3 mM hydrogen peroxide and low temperature (25 °C).



Slika 4.33: Morfologija bakterij *C. jejuni* pod elektronskim mikroskopom po izpostavitevi topotnemu stresu pri 48 in 55 °C (foto: Klančnik, 2005).

Figure 4.33: Transmission electron micrographs of *C. jejuni*, showing morphology changes after exposure high temperature at 48 and 55 °C.

Morfologija celic se je med poskusom spreminja (slike 4.31 – 4.33). V začetni fazи inkubacije so imeli kampilobakterji značilno spiralno obliko. Z elektronsko mikroskopijo so bili dobro vidni bički pri spiralnih in kokoidnih celicah. Vendar pa avtorji navajajo, da kokoidne oblike kampilobakterjev kljub dokazani prisotnosti bičkov niso gibljive, ker celice z minimalno metabolno aktivnostjo niso zmožne zagotavljati dovolj energije za gibanje (Moore, 2001; Lazaro in sod., 1999). Spremembe verjetno vplivajo tudi na virulentnost sevov.

Opazovanja so vzpodbudila razmišljanja, da je kokoidna oblika tudi speče oz. mirujoče stanje bakterij *C. jejuni*. Številne študije so dokazale kokoidno obliko kot degenerativno obliko z manjšo vsebnostjo nukleinskih kislin, peptidov in tudi zmanjšano celično integriteto (Moran in Upton, 1987; Beumer in sod., 1992; Park, 2002). Kelly in sod. (2001) so dokazali mutante, ki v manjši meri prehajajo v kokoidno obliko in ne kažejo bistvenih razlik v preživetju, kar podpira mnenje, da kokoidna oblika ni živa. Vendar pa so taki zaključki prehitri, saj prihaja do tvorbe kokoidne oblike kot odziv na različne temperature (Hazeleger in sod., 1995). Nastanek in vloga kokoidne oblike ni ovirana z inhibicijo sinteze proteinov ali replikacije DNA, zato domnevajo, da poteka proces pasivno in ne aktivno v povezavi s sintezo novih proteinov (Hazeleger in sod., 1995).

Iz literature je znano, da je zmanjšanje živosti in izguba kultivabilnosti po izpostavitvi kampilobakterjev neugodnim pogojem povezano s spremembami, kot so: zmanjšanje celic, prehod iz spiralne v kokoidno obliko, padec nivoja RNA in včasih tudi DNA, manjša zmožnost reprodukcije, zmanjšana metabolna aktivnost ter povečana odpornost proti nekaterim drugim okoljskim stresom (Turpin in sod., 1993).

Stradanju se bakterije poleg ostalih fizioloških prilagoditev skušajo prilagoditi tudi tako, da se jim zmanjša celični volumen, zaradi česar se jim relativno poveča površina, s katero komunicirajo z okoljem. Na ta način celica preusmeri energijo v iskanje hrani (Moore, 2001). Poleg prehoda iz tipične spiralne v krajšo spiralno in kokoidno obliko smo po dolgotrajnem stradanju opazili tudi prehod v degenerativnejše oblike (slika 4.31). Prehoda v kokoidno obliko naj bi bile sposobne le mlajše celice, v starejših pa prihaja do degenerativnih sprememb (Moore, 2001; Lazaro in sod., 1999). Dolgotrajnejše stradanje je povzročilo ločevanje zunanje in notranje celične membrane ter sesedanje citoplazme.

V celici je veliko topotno občutljivih snovi, med katerimi so najpomembnejši citoplazemski in membranski proteini, nukleinske kisline, ostale makromolekule in strukturne beljakovine. Ribosomi lahko pri povišani temperaturi izgubijo sekundarno in terciarno strukturo zaradi koagulacije beljakovinskih podenot (Abee in Wouters, 1999). Na nivoju morfologije topotni stres pri 48 °C ni povzročil izrazitejših sprememb. Višje temperature (55 °C) so spodbudile hitrejši prehod v krajše spiralne in kokoidne celice, tudi nepravilnih oblik z vidnim odstopanjem in napihovanjem zunanje membrane.

C. jejuni je mikroaerofilna bakterija, zato že nizke koncentracije kisika vplivajo na celično strukturo in metabolizem. Še bolj so bakterije rodu *Campylobacter* občutljive zaradi dejstva, da ne poznajo nekaterih odzivov na oksidativni stres, ki jih srečamo pri drugih mikroorganizmih, npr. dejavnika SoxRS (Park, 2002). Osnovna kultura, izpostavljena vodikovemu peroksidu je, ne glede na čas izpostavitve, ohranila spiralno obliko, ki pa se je po izpostavitvi omenjenemu stresu stradane kulture skrajšala. Celice krajše oblike so bile vidne tudi po izpostavitvi celic kisiku, vendar pa je dolgotrajnejša izpostavitev povzročila prehod v kokoidno obliko. Slednje so bile v večjem številu prisotne v stradani kulturi, izpostavljeni kisiku.

Omenjeni rezultati potrjujejo predhodne študije o vplivu stresnih pogojev, predvsem stradanja, na morfologijo kampilobakterjev. Prehod iz spiralne v kokoidno obliko je bil ne glede na rastno fazo in stresne pogoje hitrejši pri stradanih kulturah. Dolgotrajna izpostavitev stresom pa je povzročila tudi prehod v degenerativnejše oblike.

5 SPLOŠNA RAZPRAVA

Bakterije rodu *Campylobacter jejuni* so med vodilnimi povzročitelji črevesnih obolenj pri človeku. Kljub pomembnosti je njihova fiziologija slabo raziskana. Kampilobakterji ne vsebujejo nekaterih mehanizmov prilagoditve na okoljske strese, sicer znanih v drugih patogenih bakterijah iz živil, kot so npr. RpoS, SoxRS, proteini hladnega stresa (Park, 2002). V okolju so kampilobakterji pogosto izpostavljeni stradanju, temperaturnim in oksidativnim stresom, katere zaznajo in nanje odgovorijo tako, da se fiziološko, morfološko ter genetsko prilagodijo in celo povečajo odpornost (McDougald in sod., 1998).

Razumevanje celičnega odziva na nivoju populacije in tudi posamezne celice je pomembno pri študijah patogeneze in preživelosti teh mikrobov v okolju, s tem pa tudi pri določanju kontrolnih točk, preprečevanju okužb in nasploh v proizvodnji varne hrane. Preučevali smo vpliv posameznih ali kombiniranih stresov na preživetje kampilobakterjev ter pridobitev navzkrižne odpornosti. Mehanizem stresnega odziva smo ugotavljali preko izražanja stresnih genov ter delno na biokemijskem nivoju preko znotrajcelične oksidacije ter indukcije dveh encimov antioksidativnega obrambnega sistema. Pri tem smo žeeli oceniti vpliv fiziološkega stanja celic, t.j. faze rasti kampilobakterjev in razmer, ki so jim bile celice izpostavljene pred stresom.

Klasično odkrivanje kampilobakterjev v vzorcih, ki vključuje različne načine kultivacije ter identifikacije tipičnih kolonij z biokemijskimi in serološkimi testi, je dolgotrajno, drago in nezanesljivo. Raziskave so usmerjene v iskanje hitrejših in zanesljivejših metod, ki bi omogočile pravočasno odkrivanje kontaminiranih živil. Molekularne metode ugotavljanja prisotnosti nepoškodovanih nukleinskih kislin (npr. RT-PCR in PCR v realnem času) omogočajo hitrost, občutljivost in specifičnost. Razvoj alternativnih metod sovpada z napredkom tehnologije fluorescentnih barvil, ki omogočajo raziskave metabolne aktivnosti, celične integritete ali nukleinskih kislin (Kell in sod., 1998; Keer in Birch, 2003). Pri slednjih lahko v nasprotju s standardnimi števnimi metodami določimo tudi nekultivabilne celice, kar je uporabno predvsem pri analizi težko kultivabilnih organizmov, stresnim pogojem izpostavljenih celic, ali celic v kompleksnih biofilmih.

5.1 ODZIV BAKTERIJ KULTURE *C. JEJUNI* NA TEMPERATURNI IN OKSIDATIVNI STRES

5.1.1 Odziv osnovne kulture

Začetna kultivabilnost celic kontrolne (ne-stresne) osnovne kulture iz eksponentne in stacionarne faze rasti je bila v povprečju $1\text{-}5 \times 10^8$ z deležem živih celic 95 – 98 %. Ne glede na rastno fazo je bil značilno viden večji delež živih in kultivabilnih celic osnovne kulture glede na 5 h stradano kulturo.

Toplotni stres pri 55 °C ima največji vpliv na živost osnovne in stradane kulture. Sledi mu peroksidni stres, nizke temperature ter kisikov in topotni stres pri 48 °C. Preživelost celic je bila odvisna od časovne izpostavitve celic stresom in se je z podaljšano izpostavitvijo značilno zmanjševala. Celice iz eksponentne faze rasti ohranjajo med stresom bistveno višjo preživelost kot celice iz stacionarne faze rasti, katerim živost pada hitreje. To potrjuje

dejstvo, da so celice rodu *Campylobacter* v stacionarni fazi rasti bolj občutljive na stres od celic iz eksponentne faze rasti.

Kljub kokoidnosti so celice inkubirane v gojišču pri 42 °C ostale kultivabilne vseh 42 dni. Nasprotno so postale stradane celice pri 25 °C nekultivabilne že pri 40 % kokoidnosti. Stresni pogoji so prehod v nekultivabilno stanje pospešili, še posebno pri celicah iz eksponentne faze rasti, ki so obdržale kultivabilnost le nekaj dni. V nasprotju z dokazi o povezanosti nekultivabilnosti celic s morfološkimi spremembami Lazaro in sod. (1999) dokazujejo, da prehod v kokoidno obliko ni vedno povezan z izgubo kultivabilnosti in je sevno specifičen.

Izpostavitevi kampilobakterjev nizkim temperaturam, oksidativnemu stresu in predvsem stradanju povzroči zmanjšanje števila živih celic in kultivabilnosti, kar se odrazi tudi v spremenjeni celični morfologiji. V začetni fazi inkubacije so imeli kampilobakterji značilno spiralno obliko, ki pa je postopoma prehajala v kokoidno. Prehod iz spiralne v kokoidno obliko je bil ne glede na rastno fazo hitrejši pri stradani kulturi in ne glede na stres pri celicah iz stacionarne faze rasti. Opazovanja so vzpodbudila razmišljanja, da so kokoidne celice v mirujočem stanju, druge študije pa jo opisujejo kot degenerativno obliko in domnevajo, da proces transformacije poteka pasivno in ne v povezavi s sintezo novih proteinov (Park, 2002; Hazeleger in sod., 1998). Torej obstajata dve oblici nekultivabilnih celic bakterij *C. jejuni*: žive in ne-žive, ki pa se nujno ne ujemajo s spiralno in kokoidno obliko celic, kar kažejo tudi naši rezultati. Kusters in sod. (1997) so predlagali, da sta izguba kultivabilnosti in morfološka transformacija sicer povezana, a ločena procesa. Podobno lahko iz rezultatov našega poskusa sklepamo, da prehod v kokoidno obliko ni strogo povezan z izgubo kultivabilnosti.

Pri celicah iz eksponentne faze rasti se tvori tudi več kokoidnih celic kot pri celicah iz stacionarne faze rasti, kar je tudi lahko vzrok, da so celice iz eksponentne faze rasti bolj odporne na stres kot celice iz stacionarne faze rasti. Rezultati, podobno kot pri Kelly in sod. (2001) kažejo odsotnost klasičnega fenotipskega odziva celic *C. jejuni* v stacionarni fazi rasti, ki je poznan za druge črevesne bakterije in reguliran preko dejavnika RpoS.

5.1.2 Odziv stradane kulture

Vpliv stradanja in dodatnih temperaturnih in oksidativnih stresov se je odrazil na podoben način kot je zgoraj opisan odziv osnovne kulture. Preživelost celic stradane kulture po temperaturnem, peroksidnem in oksidativnem stresu pri celicah iz eksponentne faze rasti višja kot pri celicah iz stacionarne faze rasti. Peroksidni stres je bil pri izbranih pogojih manj uničujoč od toplotnega stresa (slika 4.6). Podobno je bila sprememba morfologije iz spiralne v kokoidno obliko bolj očitna pri celicah iz eksponentne faze rasti, najbolj pri toplotnem stresu in ne glede na rastno fazo pri temperaturi 55 °C. Do velike razlike med deležem kultivabilnih in živih celic je prišlo že po 3 min inkubacije pri 55 °C. Tudi višja kokoidnost stradane kulture po dolgotrajnejši inkubaciji nakazuje prehod v odpornejše stanje, kar potrjujejo tudi podobne spremembe v živosti pri 5 h stradani kulturi, izpostavljeni toplotnim stresom, v primerjavi z osnovno kulturo, izpostavljeni stresom. Visoka kokoidnost in živost stradane kulture iz eksponentne faze rasti po toplotnem stresu kaže na možnost, da so celice kokoidne oblike nastale kot odgovor na stres in da so zaradi tega na stres tudi odpornejše. Rast deleža kokoidnih celic je med inkubacijo na kisiku ne glede na rastno fazo podobna.

Kultivabilnost celic stradane kulture se najbolj zmanjša po toplotnem in kisikovem stresu. Dejstvo, da se živost stradane kulture iz eksponentne faze rasti po toplotnem stresu le

delno zmanjša, kultivabilnost pa pade za celo log stopnjo, nakazuje na velik delež celic v stanju VBNC. Ker vsebuje kultura visok delež živih spiralnih celic, lahko pričakujemo tudi visok delež spiralnih celic v stanju VBNC. Podobno je kultivabilnost pri izpostavitvi kisiku padla pod mejo detekcije, živih pa je ostalo nad 50 % celic (slike 4.6 – 4.8). V populaciji nekultivabilnih celic, izpostavljenih kisikovem stresu smo dokazali kokoidne in tudi spiralne celice ter tako potrdili prisotnost obeh oblik v stanju VBNC. Tako kot pri osnovni kulturi lahko tudi pri stradani kulturi trdimo, da na gojišču rastejo spiralne celice, kokoidne celice pa niso kultivabilne.

Inkubacija na kisiku predstavlja za stradano kulturo mnogo večji stres, kot za osnovno, to pa pomeni, da celice med stradanjem niso razvile dodatne odpornosti proti tej obliki stresa. Možno je tudi, da je trajanje stresa predolgo, da bi celice kljub pomanjkanju hranil lahko popravile vse poškodbe, ki jih inkubacija pri atmosferski koncentraciji kisika povzroči. Pri celicah stradane kulture kokoidnost narašča hitreje kot pri celicah osnovne kulture, saj se celice prilagodijo stradanju tudi z zmanjšanjem celičnega volumna, da bi se povečala celična površina. Celice stradane kulture iz eksponentne faze rasti imajo višji začetni delež kokoidnih celic, verjetno zaradi boljšega odgovora na stradanje in zato večje tvorbe kokoidnih celic (sliki 4.21 in 4.22). Harvey in Leach (1998) navajata, da visoke koncentracije kisika in istočasno zmanjšanje hranil povzroči spremembo morfologije iz spiralne v kokoidno obliko z začetnih 5 - 10 % do 50 - 60 %. Z elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da so takšne kokoidne celice lahko degenerirane (slika 4.31). V taki obliki pa celice ne morejo biti kultivabilne, kar smo potrdili z močnim padcem kultivabilnost že po 10 h inkubacije. Pri tem se živost bolje ohranja, kar pomeni, da je večina še živih celic v stanju VBNC (slika 4.23). Torej ta odpornejša oblika omogoča preživetje ob trajnejši prisotnosti kisika kljub vidnim fiziološkim in morfološkim spremembam. Ni pa še dokazano, ali so pri tem celice možne regulacije, ali so le predstopnja degenerativne oblike.

5.2 VPLIV MEDIJA NA BAKTERIJE *C. JEJUNI*

5.2.1 Vpliv gojišča na bakterije *C. jejuni* med inkubacijo pri atmosferski koncentraciji kisika

Kultivabilnost celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti, med inkubacijo v svežem gojišču pri atmosferski koncentraciji kisika niha. Hitremu prvotnemu padcu sledi postopejša rast. Pri tem ostaja delež živosti visok. Celice si morda opomorejo in se začnejo deliti, kar je vidno v povečanju števila kultivabilnih celic. Kelly in sod. (2003) omenjen 'phoenix' fenomen celic *C. jejuni* inkubiranih v svežem gojišču povezujejo z razmnožitvijo mutantov ali prehodom v odpornejšo VBNC obliko. Slednjega smo dokazali z nespremenjeno živostjo (približno 90 %) ter zmanjšano kultivabilnostjo (za 2,5 log stopnji) po 15 urah inkubacije na kisiku (slika 4.27). Stabilnejša je bila kultivabilnost pri celicah v starem gojišču, ki se ni bistveno razlikovala od kultivabilnosti osnovne kulture brez stresa, kar nakazuje zaščitno vlogo starega gojišča med izpostavitvijo kisiku. Živost in kultivabilnost celic, izpostavljenih kisikovemu stresu v svežem gojišču sta bili nižji v primerjavi z inkubacijo v starem gojišču. V kulturi bakterij iz stacionarne faze podobna razmerja niso bila dokazana (slika 4.28).

Rezultati nakazujejo na signalne molekule v starem gojišču, ki jih izločajo celice med eksponentno fazo rasti v gojišče. Literatura navaja, da le-te povečajo odpornost proti stresu tudi, kadar so v supernatantu gojišča naknadno dodane v sveže gojišče (Kaprelyants in sod., 1994; McDougald in sod., 1998). V živilski mikrobiologiji se omenjene molekule uporabljam tudi pri razvoju novih gojišč, saj je tako omogočena revitalizacija vseh celic (tudi celic v stanju VBNC) (Reissbrodt in sod., 2002). Vpliv zunajceličnih molekul na navzkrižno odpornost proti stresom je sevno in vrstno specifičen.

Primernejša bi bila uporaba pretočne citometrije za spremljanje fizioloških sprememb celic (slika 4.29) saj poleg večje avtomatiziranosti merjenja dopušča tudi sočasno ugotavljanje prisotnosti drugačne populacije celic, ki jih na sliki 4.30 razlikujemo od mrtvih in živih celic. Te meritve bi bile vredne nadaljnjih raziskav, ki bi pojasnile posebnosti novo nastale populacije za katere predvidevamo da ustrezajo populaciji VBNC.

5.2.2 Vpliv stradanja na bakterije *C. jejuni*

Nihanje števila živih in kultivabilnih celic osnovne in stradane kulture v prvih dneh podaljšane inkubacije je lahko posledica dinamične prilagoditve bakterij, nastanka spontanih mutacij ali pojava novega seva bakterij, ki z izrivanjem prvotne populacije izboljšajo preživetje v neugodnih pogojih (Martinez-Rodriguez in sod., 2004).

Kljub nenadnemu zmanjšanju živosti v prvih dneh so bile celice prisotne tudi po 42 dneh stradanja pri 42 °C (sliki 4.2 in 4.3). Rastna faza pred stradanjem celic vpliva na fiziologijo odziva (Thorne in Williams, 1999), kar je bilo v našem eksperimentu vidno v počasnem padcu živosti v stacionarni fazi in že opisanem nenadnem zmanjšanju števila živih celic. Ne glede na rastno fazo pa je bila preživelost stradane kulture primerljiva z osnovno kulturo, kar nakazuje vlogo nove dinamične populacije celic v preživelosti (Martinez-Rodriguez in sod., 2003). Stradane celice se borijo za preživetje in nimajo dovolj hranil za razmnoževanje. Manjša gibljivost, aktivnost ali genetske variacije predstavljajo alternativne načine preživetja in povečano odpornost stradane kulture (Kelly in sod., 2001; Park, 2002).

Delež kokoidnih celic, ki so v osnovni kulturi predstavljale le manjši del, se je po izpostavitvi stradanju povečal (za povprečno 20 %), z istočasnim zmanjšanjem števila živih celic (sliki 4.2 in 4.3). Odziv stradane kulture, viden v zmanjšani živosti in kultivabilnosti se je odrazil tudi v sprememb morfologije. Krajsa spiralna oblika celic je bila vidna že po 5 urnem stradanju, dolgotrajnejše stradanje pa je povzročilo degeneracijo celic, vidno v zmanjšanju celičnega volumna (slika 4.31). Na kultivabilnost bolj vpliva stradanje kot ostali stresi.

Odziv celic s prehodom v stanje VBNC je med bakterijami splošno razširjen (*Vibrio cholerae*, *Salmonella Enteriditis*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp.) in predstavlja fiziološko stanje, v katerem prihaja do sprememb na nivoju celice (citoplazme, membrane, metabolizma) (Beumer in sod., 1992; McDougald in sod., 1998). Bakterije *C. jejuni* so sposobne preživetja v vodnih okoljih tudi do 130 dni (Baffone in sod., 2006). Iz razlike med številom kultivabilnih in živih celic smo tudi tu dokazali prehod celic v stanje VBNC. Najbolj značilne in najbolj zanimive so bile fiziološke in morfološke spremembe pri kratkotrajanem stradanju, zato smo se usmerili na stradanje v prvih 24 urah.

5.2.3 Vpliv predstradanja ter pridobljena navzkrižna odpornost *C. jejuni*

Stradanje sproži tvorbo proteinov, ki celici omogočijo boljšo odpornost proti topotnemu, oksidativnemu in osmotskemu stresu, obsevanju z UV žarki in na prisotnost topil (Nyström in sod., 1992). Zato smo pričakovali povečano odpornost stradanih celic. Tvorbo zaščitnih proteinov smo podobno kot Cappelier in sod. (2000) zavrli z dodatkom inhibitorja proteinov kloramfenikolom. Ker je bila preživelost celic stradane kulture ob dodatku kloramfenikola zmanjšana, smo sklepali, da je dodatek kloramfenikola zavrl sintezo proteinov v stradani kulturi ter tako zmanjšal navzkrižno celično odpornost.

Trajanje predstresa, potrebnega za sintezo zaščitnih proteinov, ki celici omogočijo najboljše preživetje v stresnih pogojih, se med bakterijami razlikuje. Bakterije razvijejo odpornost proti okoljskim stresom preko sinteze proteinov stradanja v prvih urah stradanja. Razlike so morda dokaz vrstne variabilnosti, stresnih pogojev, metodologije spremljanja preživelosti, a niso odvisne od izvora bakterij (Chan in sod., 2001).

Povečanje topotne odpornosti *C. jejuni* je bilo pri stradanih celicah večje kot pri celicah, izpostavljenih hladnemu predstresu. Celice iz stacionarne faze rasti, stradane pri 42 °C so se obnašale podobno kot celice, stradane pri 4 °C. Po 1 ali 2 h stradanja je bila vidna manjša razlika v preživelosti celic, ki pa se je z daljšanjem časa stradanja (24 ur) zmanjševala (slika 4.5). Odpornost na topotni stres je bila pri celicah iz eksponentne faze rasti večja kot pri celicah iz stacionarne faze rasti, kar se ujema tudi z objavami, ki nakazujejo, da so celice v tej fazi bolj aktivne in tvorijo več zaščitnih dejavnikov (Kelly in sod., 2001). Topotna odpornost je bila največja po 5 urnem stradanju, in se je s podaljšanjem stradanja zmanjševala (slika 4.5). Viden je bil negativen vpliv nizkih temperatur pri kulturi z dodanim kloramfenikolom na preživetje celic. Stradanje je v manjši meri povečalo preživelost celic pri peroksidnem stresu, pri izpostavitvi kisiku pa so stradane celice postale še bolj občutljive (slika 4.9). 5 h stradanje tudi ni omogočalo dodatne zaščite celic pred dolgotrajnim topotnim stresom pri 48 °C in 55 °C, saj so bile zgoraj opisane razlike v preživelosti velike in so nakazovale odsotnost topotne odpornosti stradane kulture.

Povzamemo lahko, da stradanje pri 42 °C izboljša preživelost kulture iz eksponentne faze pri peroksidnem in še bolj očitno pri kratkotrajanem topotnem stresu. Sinteza proteinov ob kratkotrajanem stradanju (2 – 5 h) je verjetno razlog za povečano odpornost proti stresu,

zato smo kot optimalni predstres izbrali 5-urno stradanje pri temperaturi 42 °C in ga uporabljali v nadalnjih eksperimentih. Pri tem smo se zanašali predvsem na povečano odpornost celic iz eksponentne faze rasti, saj so te pokazale večjo odpornost (ne glede na vrsto predstresa) kot celice iz stacionarne faze rasti. Kloramfenikol, ki prepreči sintezo proteinov, pa ni pokazal vpliva na tvorbo kokoidne oblike celic in izražanje genov.

5.3 MOLEKULARNO-GENETSKI IN CELIČNI NIVO ODZIVA BAKTERIJ C. JEJUNI NA STRESE

5.3.1 Izražanje genov

Vpliv stresnih pogojev na indukcijo stresnih genov z metodo RT-PCR ni bil dokazan. Med ne-tretiranimi in tretiranimi celicami kampilobakterjev iz eksponentne ter stacionarne faze rasti ni bilo vidnih značilnih razlik. Prav tako tudi dodatek kloramfenikola stradani kulturi ni vplival na izražanje RNA (slika 4.11).

Analiza z metodo PCR v realnem času je pokazala indukcijo izražanja genov *groEL* in *rpoD* v osnovni kulturi in ne tudi v 5 h stradani kulturi iz eksponentne in stacionarne faze rasti izpostavljeni temperaturi 48 °C ali 55 °C za 3, 10, 20 in 30 min. Večja je bila indukcija izražaja genov pri temperaturi 55 °C in ne glede na temperaturo pri genu *rpoD* (preglednica 4.1). Slednjega zaradi ohranjenega promotorja nekateri avtorji upoštevajo kot hišni gen pri obdelavi podatkov (Watson in Clements, 1998), vendar smo mu dokazali toplotno inducibilnost in ga obravnavali kot stresni gen.

5.3.2 Znotrajcelična oksidacija ter antioksidativni obrambni sistem

Van Vliet in sod. (1998) so pri bakterijah *C. jejuni* odkrili regulator PerR. Ta kot odgovor na oksidativni stres regulira delovanje encimov, ki sodelujejo pri detoksifikaciji ROS. Objavili so, da je osnovna kultura v prvih 10 h sposobna obrambe z lastnimi znotrajceličnimi encimi, ki so dovolj učinkoviti za vzdrževanje nivoja ROS na osnovni ravni. Nato pa se količina oksidantov v celici poveča do takšne mere, da jih celica zazna ter nanje odgovori preko oksidativnega stresnega odgovora z indukcijo endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Superoksid dismutaza naj bi bila prvi encim pri obrambi proti toksičnim ROS, saj katalizira pretvorbo superoksidnega aniona v kisik in vodikov peroksid. Nato nastopi katalaza z razgradnjo vodikovega peroksidu do kisika in vode (Grant in Park, 1995; Fridovich, 1995).

Ker smo pri 5 ur stradani kulturi dokazali toplotno in peroksidno odpornost celic smo se usmerili še na vpliv stradanja na znotrajcelično oksidacijo ter aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema. Ob intenzivnem celičnem metabolizmu je prišlo v osnovni kulturi do povečanja nivoja ROS. Sklepamo, da so celice osnovne kulture odgovorila z rahlo povečano aktivnostjo katalaze in superoksid dismutaze. Nasprotno pa je stradana kultura močno zmanjšala nivo ROS na neškodljivo raven (preglednica 4.2). Zmanjšanje tvorbe ROS je v stradanih celicah lahko posledica manjše metabolne aktivnosti. Le-to lahko razložimo tudi s pojavom krajsih spiralnih celic v 5 h stradani kulturi. Različni avtorji navajajo, da se med stradanjem tvorijo tudi proteini, ki imajo vlogo pri obrambi pred oksidativnim stresom, iz česar lahko sklepamo, da tudi stradanje deluje na celico kot oksidativen stres (Jenkins in sod., 1988; Hengge-Aronis, 1999).

Ker se aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema med stradanjem ni povečala (preglednica 4.3), lahko predvidevamo, da se stradana kultura brani pred ROS tudi s pomočjo proteinov stradanja, ki se inducirajo v celicah kot odgovor na stradanje ter izboljšajo asimilacijo hranil in sodelujejo pri obrambi pred stradanjem ali ostalim stresom (Jenkins in sod., 1988; Cappelier in sod., 2000).

Toplotni stres pri 48 °C ima vpliv na nastanek ROS v stradani kulturi, saj je dodatni toplotni stres v stradani kulturi povzročil dvig nivoja ROS (preglednica 4.4). Kljub temu indukcija antioksidativnega obrambnega sistema ni bila vidna (preglednica 4.5). Vzroke lahko, podobno kot Moore (2001) iščemo pri manjši metabolni energiji stradane kulture, ki je usmerjena v iskanje hranil, prehod v odpornejša stanja ter druge celične procese, pomembne za preživetje celic. Med dodatnim stresom nastajajo večje količine ROS, povečane koncentracije drugih spojin z oksidacijskimi lastnostmi, inaktivacija ROS pa je zaradi pomanjkanja reducirajočih spojin manjša (Matin, 1992; Dukan in sod., 2000). Zakaj sistemi niso dovolj učinkoviti pri inaktivaciji oksidativnih spojin in s tem premagovanju stresa še ni pojasnjeno. Glede na rahlo povečanje aktivnosti katalaze in superoksid dismutaze v osnovni kulturi sklepamo na njuno vlogo pri vzdrževanju homeostatskega ravnotežja ter preživetja v neugodnih pogojih.

V splošnem raziskave, ki se ukvarjajo z izgubo živosti med stradanjem ne vključujejo študija encimske aktivnosti. Iz našega eksperimenta pa lahko zaključimo, da se *C. jejuni* prilagodi na odsotnost hranil z zmanjšanim metabolizmom, vidnim v zmanjšani aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema.

5.4 PREDLOGI ZA NADALJNJE DELO

Uporaba tehnik barvanja s fluorescentnimi barvili, ki omogočajo takojšnje spremljanje odziva celic, postaja ena pomembnejših metod ugotavljanje stresnega odziva (Rodriguez-Romo in Youself, 2005). V nadaljevanju eksperimenta bomo za ugotavljanje živosti, aktivnosti ter fiziološkega stanja celic uporabili pretočno citometrijo ter čitalec mikrotiterskih plošč. Poleg ugotavljanja živosti (merjenje membranske integritete s fluorescenčnim barvilkom LIVE/DEAD® *BacLight™*) se bomo usmerili tudi na ugotavljanje encimske aktivnosti (merjenje ATP v celici preko merjenja luminescence) ter sprememb na nivoju znotrajcelične oksidacije, kot posledice poškodb zaradi neučinkovitosti stresnega odgovora (merjenje fluorescenčne intenzitete barvila diklorofluoresceina).

Hitrejše in kvantitativne analize stresnega odziva na nivoju celice nam ponujajo odgovore pri kombiniranju stresnih pogojev ter pridobljeni navzkrižni odpornosti celotne populacije celic. Pri tem prispevajo bistven del analize genoma in proteinov ter izražanje stresnih genov. Nadaljnje raziskave bodo tako usmerjene v študij proteinov med stradanjem in/ali toplotnim stresom s pomočjo 2-D gelske elektroforeze.

6 SKLEPI

- Nizke temperature, topotni, peroksidni in oksidativni stres vplivajo na bakterije *C. jejuni*, kar se odraža v spremembi celične morfologije, izgubi kultivabilnosti in zmanjšanju števila živih celic kampilobakterjev. Stresni odziv celic je odvisen od vrste stresa in fiziološkega stanja celic, predvsem faze rasti. Zmanjšanje kultivabilnosti ter prehod iz spiralne v kokoidno obliko je bil ne glede na rastno fazo in stresne pogoje hitrejši pri stradanih kulturah.
- Izpostavitev celic hladnemu predstresu ni vplivala na večjo odpornost celic proti kasnejšim stresom. Kratkotrajna (5 h) predhodna izpostavitev celic pogojem stradanja pri 42 °C pa je omogočila sintezo novih proteinov, ki so povečali odpornost proti topotnemu in peroksidnemu, a ne proti kisikovemu stresu. Pridobitev odpornosti po predhodni izpostavitvi stradanju predstavlja tveganje tudi v živilsko predelovalni verigi. To dejstvo je potrebno upoštevati pri načrtovanju postopkov kontrole in obvladovanju tveganj v proizvodnji varnih živil.
- Metoda PCR v realnem času se je izkazala za primerjavo pri ugotavljanju izražanja genov kot metoda RT-PCR. Topotna inducibilnost gena *groEL* je bila vidna po 3 minutah, a največja po 10 - 20 minutah izpostavitve celic temperaturi 55 °C, predvsem v osnovni kulturi. Podobne rezultate smo potrdili s preiskavo 10 sevov, izoliranih iz živil, živali in vzorcev humanega in kliničnega izvora. Pri genu *rpoD*, ki je bil prvotno izbran kot hišni gen, smo opazili še večji vpliv topotnega stresa na izražanje. Dodatek kloramfenikola stradani kulturi ni vplival na izražanje genov. Pričakovanega vpliva kratkotrajnega topotnega, kisikovega in peroksidnega stresa na izražanje ostalih genov (*htpG*, *dnaK*, *sodB*, *ahpC*, *flaA*) z metodo RT-PCR nismo uspeli dokazati.
- Potrdili smo zmanjšano metabolno aktivnost stradane kulture, saj 5-urno stradanje, kljub znižanju znotrajcelične oksidacije ni vplivalo na aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema, katalaze in superoksid dismutaze. Dodatni topotni stres je sicer vplival na povečanje ROS v 5-urni stradani kulturi, vendar ni bil zadosten za aktivacijo encimskega antioksidativnega obrambnega sistema.
- Rezultati potrjujejo odsotnost prepoznavnega fenotipskega odgovora bakterij *C. jejuni* v stacionarni fazi rasti, kar pomeni, da so celice iz eksponentne faze rasti odpornejše na različne oblike stresov.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

C. jejuni je za človeka patogena črevesna bakterija, ki se predvsem s kontaminiranim perutninskim mesom prenaša v prehransko verigo človeka. Čeprav je nesposobna razmnoževanja v živilu, lahko preživi v tolikšnem številu, da povzroča obolenja pri ljudeh, ki so zaužili kontaminirano živilo. Med živilsko obdelavo in skladiščenjem/hranjenjem ter distribucijo živil so pogosto izpostavljeni neugodnim pogojem, predvsem pomanjkanju hrani, temperaturnim nihanjem in oksidativnemu stresu. Preživetje in prilagoditev bakterijskih celic na te neugodne pogoje je lahko pomembno za prenos okužbe na človeka. Namen našega dela je bil študij stresnega odziva bakterij *C. jejuni* iz eksponentne in stacionarne faze rasti po izpostavitvi celic nizkim temperaturam, topotnemu, peroksidnemu ter oksidativnemu stresu ter vpliv predhodnega stradanja na hitrost odziva in pridobljeno navzkrižno odpornost.

Vzporedno ugotavljanje števila kultivabilnih in živih celic je pokazalo, da so celice v stresnih razmerah dlje ohranile živost kot kultivabilnost. Stopnja preživelosti je pri kulturah v vseh stresnih pogojih s časom inkubacije padala, najhitreje v prvih dneh. Iz razlike med številom kultivabilnih in živih celic lahko sklepamo na prehod celic v stanje VBNC. Pod neugodnimi pogoji *C. jejuni* izgubi kultivabilnost in se iz spiralne oblike pretvori v kokoidno obliko ali pa preide v stanje VBNC, kar je bilo najbolje vidno pri 5 ur stradani kulti iz eksponentne faze rasti, izpostavljeni topotnemu ali kisikovemu stresu. Iz rezultatov eksperimenta lahko sklepamo, da prehod v kokoidno obliko ni strogo povezan z izgubo kultivabilnosti. Pri prehodu v odpornejša stanja sintetizirajo kampilobakterji proteine stradanja, s katerimi se prilagodijo na nove pogoje in postanejo odpornejši tudi na druge strese. Prav tako se na topotni stres odzovejo s sintezo proteinov topotnega stresa in preprečujejo nepravilno zvijanje in združevanje ostalih molekul ter omogočajo pravilno delovanje termolabilnih proteinov. Oksidativni stres povzročijo reaktivne kisikove zvrsti, ki lahko poškodujejo proteine, nukleinske kisline ali celične membrane. Če je učinkovitost endogenih obrambnih sistemov presežena, nastopi oksidativni stres. V ta namen celice sintetizirajo številne encime, ki zvišajo reduksijski potencial v celici in s tem zvišajo možnosti za preživetje. Stresni odgovori imajo za posledico spremembe v fiziologiji in morfologiji celic, v izražanju genov ter encimski aktivnosti in tako vodijo do prilagoditve metabolizma in drugih celičnih procesov na novo nastalo situacijo. Celice rodu *Campylobacter jejuni* so najbolj odporne v eksponentni fazi, kateri sledi zgodna stacionarna in stacionarna faza.

Povečanje topotne odpornosti je bilo pri kratkotrajno stradanih celicah večje kot pri celicah, izpostavljenih hladnemu predstresu, zato smo kot optimalni predstres izbrali 5-urno stradanie pri temperaturi 42 °C. Ne glede na predstres so celice iz eksponentne faze rasti pokazale večjo odpornost kot celice iz stacionarne faze rasti. Kratkotrajna (5 h) predhodna izpostavitev celic pogojem stradanja je omogočila sintezo novih proteinov, ki so pomembni pri navzkrižni odpornosti proti topotnemu in peroksidnemu, a ne proti kisikovemu stresu.

Z metodo RT-PCR nismo potrdili pričakovanega vpliva kratkotrajnega topotnega, kisikovega ali peroksidnega stresa na izražanje izbranih genov (*groEL*, *htpG*, *dnaK*, *sodB*, *ahpC*, *flaA*) v osnovni in stradani kulti iz obeh rastnih faz, zato smo se z metodo PCR v realnem času omejili na izražanje gena *groEL*. Potrdili smo le vpliv topotnega stresa na

spremembe izražanja gena *groEL*. Tudi pri genu *rpoD*, ki je bil prvotno izbran kot hišni gen, smo opazili vpliv toplotnega stresa na izražanje, zato smo pri normalizaciji podatkov metode PCR v realnem času upoštevali le gen *16S rRNA*. Toplotna inducibilnost genov *groEL* in *rpoD* je bila vidna že po 3 min, a največja po 10 - 20 minutah pri 55 °C, kar smo potrdili tudi na 9 dodatnih sevih perutninskega ali humanega izvora.

Proučili smo vpliv atmosferske koncentracije kisika, poleg tega pa še prisotnost vodikovega peroksida, na preživelost in morfološke spremembe tega organizma. Razvidno je, da se živost celic iz eksponentne faze ohranja bolje kot živost celic iz stacionarne faze, ki pada hitreje. Dokazan je bil prehod celic v nekultivabilno obliko. Rezultati nakazujejo, da kokoidne celice ne rastejo na agarskih ploščah. Tako kot pri osnovni kulturi lahko tudi pri stradani kulturi trdimo, da na gojišču rastejo spiralne celice, kokoidne celice pa ne vplivajo na kultivabilnost. Dokazali smo tudi vpliv zaščitnih snovi starega gojišča na odpornost proti kisikovemu stresu.

Stradanje se je odrazilo tudi v močnem znižanju intenzitete fluorescence DCFL kot splošne ocene oksidacijskih procesov, vendar ni vplivalo na aktivnosti encimov katalaze in superoksid dismutaze kot elementov antioksidativnega obrambnega sistema celic. Dodatni toplotni stres je vplival na povečanje ROS v stradani kulturi, vendar ni bil zadosten za aktivacijo encimskega antiksidativnega obrambnega sistema. S tem smo potrdili zmanjšano metabolno aktivnost stradane kulture. Prehod iz spiralne v kokoidno obliko je bil ne glede na rastno fazo in stresne pogoje hitrejši pri stradanih kulturah. Dolgotrajna izpostavitev stresom pa je povzročila tudi prehod v degenerativnejše oblike.

Povzamemo lahko, da izpostavitev *C. jejuni* stradanju, temperaturnemu ali oksidativnemu stresu vpliva na fiziološke in morfološke spremembe celic. Predhodno stradana kultura se na dodatne strese prilagodi s prehodom v stanje VBNC ter zmanjšanim metabolizmom. Vendar pa slednja ne predstavlja spečega stanja celic, kar smo dokazali s povečano odpornostjo stradanih celic na toplotni in peroksidni stres. Pridobitev navzkrižne odpornosti predstavlja tveganje tudi v živilsko predelovalni verigi.

7.2 SUMMARY

Campylobacter jejuni is currently recognized as a leading cause of foodborne illness worldwide, which is usually transmitted by eating and/or handling undercooked poultry meat or contaminated drinking water or non-pasteurized milk. Unlike most other bacterial foodborne pathogens, campylobacters are not normally capable of multiplication in food during processing or storage, but they are capable to survive and cause human infection. During food chain they are exposed to variety of stresses, such as starvation, temperature and oxidative stress. Often they are able to tolerate these stresses, survive in extra-intestinal environment. The aim of our work was to investigate stress response of *C. jejuni* from exponential and stationary growth phase exposed to low temperature, heat, peroxide and oxygen stress and to find out if starvation leads to cross protection.

Declines in log units of cells were more significant comparing to viability counting. Survival rates were reduced under all stress conditions already in the first days (or minutes in case of heat or peroxide stress). Differences between cell culturability and viability indicate a proportion of VBNC cell formation in population exposed to stress. *C. jejuni* enter viable, but non-culturable (VBNC) state in response to stress conditions. This was most obvious at 5 h starved cells originated from the exponential growth phase, followed by heat or oxygen stress. Conversion to VBNC form and the transition to coccoid form are two different but related phenomena. The protein synthesis during early stages of starvation was reported to be involved in the transformation of cells into more resistant physiological state. Whereas the rate of total protein synthesis decreases under nutrient limitation conditions, the synthesis of specific starvation-induced proteins could be important for the cell cross-protection. The synthesis of a group of highly conserved heat shock proteins is induced also under thermal stress, which assist in folding and assembly or degradation of damaged proteins. Oxidative stress is imposed on cells as a result of the increase in oxidant generation, the decrease in antioxidant protection, or the failure to repair oxidative damage. Aerobic respiration and different stress conditions increase reactive oxygen species (ROS) level leading to induction of antioxidant defence systems. Under normal condition ROS are cleared from the cell by the action of superoxide dismutase, catalase, or glutation (GSH) peroxidase. Stress response visible in culturability and viability decline reflected also in changes of morphology, gene expression and enzymatic activity, which led to metabolism and others cell function adaptation. Stationary phase cells seemed to be less resistant to stress, which implicates the absence of phenotypic stationary phase response of *Campylobacter* culture.

Because of the higher heat resistance of short starved cells compared to cells exposed to cold stress as pre-stress, we focused on cross-protection effect in 5 hours starved culture at 42 °C. Short period (5 h) of starvation of *Campylobacter* cells induced the protein synthesis that may be important for the acquisition of resistance against heat but not against oxidative stress.

In RT-PCR analyses, the effect of heat, oxygen or peroxide stress on transcription of the selected (*groEL*, *htpG*, *dnaK*, *sodB*, *ahpC*, *flaA*) genes was not evident. There were no significant differences between the untreated and treated *Campylobacter* cells from stationary and exponential growth phase. So we focused on the transcription of heat shock gene *groEL* during thermal treatment using real-time PCR. Results indicate that the level of *groEL* and *rpoD* gene transcription increased and reached maximum at 10 - 20 min of thermal challenge at 55 °C. We confirmed this with nine additional *C. jejuni* strains

isolated from poultry meat, chicken, human and clinical samples. The *rpoD* gene showed even stronger stress-dependent induction of transcription as *groEL* gene.

We tested the effect of peroxide and oxygen stress on physiological changes of *C. jejuni*. We showed that exponential growth phase cells survived oxidative stress better than stationary phase cells. Oxidative stress stimulated transformation from spiral to coccoid cells that were not an adaptation form of campylobacters. No influence of viable coccoid cells on log units was confirmed. From this we concluded that only viable spiral cells could grow on agar plates. We demonstrated the effect of protective components of old media on resistance to oxidative stress compared to culture transferred to the new medium.

Starvation reflected also in modification of fluorescence intensity of DCFL as general estimation for oxidation process and catalase and superoxide dismutase activity as part of antioxidative stress response. Starvation led to decreased ROS production compared to fed cells. Consequently, activity of enzymes was not changed compared to fed culture, where values slightly increased. Additional stress increased ROS in starved culture related to fed culture, while starvation did not significantly influence the activity of enzymes, indicating lower metabolic activity also after stress. Formation of coccoid cells was regardless of growth phase more significant in starved culture. Prolonged stress exposure led to degeneration of cells.

Our results suggest that *C. jejuni* undergoes physiology and morphology changes when exposed to starvation, temperature or oxidative stress. Survival strategy and adaptive response of starved cells include reduced metabolic activity, visible in lower enzymatic antioxidant activity. The experiment indicated that lower metabolic activity not necessarily mean dormant state in the cell level, what was significantly visible in starvation induced stress response and tolerance. Cross-protection starvation resistance may also be of concern to the food-processing industry from the public health perspective.

8 VIRI

- Abee T., Wouters J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. International Journal of Food Microbiology, 50: 65-91
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 27 - 85
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121 – 126
- Aguilar P.S., Hernandez-Arriaga A.M., Cybulski L.E., Erazo A.C., de Mendoza D. 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. EMBO Journal, 20: 1681–1691
- Alonso J.L., Mascellaro S., Moreno Y., Ferrús M. A., Hernández J. 2002. Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells. Applied and Environmental Microbiology, 68: 5151-5154
- Altekruze S.F., Stern N.J., Fields P.I., Swerdlow D.L. 1999. *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases, 5: 28–35
- Alter T., Scherer K. Stress response of *Campylobacter* spp. and its role in food processing. Journal of Veterinary Medicine B., 53: 351-357
- Andersen M.T., Brøndsted L., Pearson B.M., Mulholland F., Parker M., Pin C., Wells J.M., Ingmer H. 2005. Diverse roles for HspR in *jejuni* revealed by the proteome, transcriptome and phenotypic characterization of an *hspR* mutant. Microbiology, 151: 905-915
- Arana I., Pocino M., Muela A., Fernandez-Astorga A., Barcina I. 1997. Detection and enumeration of viable but non-culturable transconjugants of *Escherichia coli* during the survival of recipient cells in river water. Journal of Applied Microbiology, 83: 340-346
- Baffone W., Casaroli A., Citterio B., Pierfelici L., Campana R., Vittoria E., Guaglianone E., Donelli, G. 2006. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. International Journal of Food Microbiology, 107: 83- 91
- Baillon M.L.A., van Vliet A.H.M., Ketley J.M., Constantidou C., Penn C.W. 1999. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology, 181: 4798-4804
- Bassler B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology, 2: 582-587
- Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44: 276-287
- Beers R.F., Sizer I. W. 1951. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, 95: 133-140
- Berndtson E., Danielsson Tham M.L., Engvall A. 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. International Journal of Food Microbiology, 32: 35-47
- Besnard V., Federighi M., Cappelier J.M. 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 31: 77-81
- Beumer R.R., de Vries J., Rombouts F.M. 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. International Journal of Food Microbiology, 15: 153-163
- Bhupathiraju V.K., Hernandez M., Landfear D., Alvarez Cohem L. 1999. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. Journal of Microbiological Methods, 37: 231-243
- Boucher S.N., Slater E.R., Chamberlain A.H., Adams M.R. 1994. Production and viability of coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Bacteriology, 77: 303-307
- Boulos L., Prevost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Journal of Microbiological Methods, 37: 77-86

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Bras A.M., Chatterjee S., Wren B.W., Newell D.G., Ketley J.M. 1999. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *Journal of Bacteriology*, 181: 3298-3302
- Breeuwer P., Abbe T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 193-200
- Brøndsted L., Andersen M.T., Parker M., Jorgensen K., Ingmer H. 2005. The HtrA protease of *Campylobacter jejuni* is required for heat and oxygen tolerance and for optimal interaction with human epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3205-3212
- Buck G.E., Parshall K.A., Davis C.P. 1983. Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 18: 420-421
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23-39
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193
- Buswell C.M., Herlihy Y.M., Lawrence L.M., Mcguiggan J.T.M., Marsh O.D., Keevil C.W., Leach S.A. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent antibody and -rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 733-741
- Butzler J.P. 2000. Campylobacteriosis in humans – a historical overview. V: The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 21–25 November 2000. Geneva, WHO: 38-41
- Cappelier J.M., Magras C., Jouve J.L., Federighi M. 1999a. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiology*, 16: 375-383
- Cappelier J.M., Minet J., Magras C., Colwell R.R., Federighi M. 1999b. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5154-5157
- Cappelier J.M., Rossero A., Federighi M., 2000. Demonstration of a protein synthesis in starved *Campylobacter jejuni* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 63-67
- Carrillo C.D., Taboada E., Nash J.H.E., Lanthier P., Kelly J., Lau P.C., Verhulp R., Mykytczuk O., Sy J., Findlay W.A., Amoako K., Gomis S., Willson P., Austin A., Babiuk L., Allan B., Szymanski C.M. 2004. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *fliA*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 20327-20338
- Chan K.F., Le Tran H., Kanenaka R.Y., Kathariou S. 2001. Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4 °C). *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4186-4191
- Chaveerach P., Huurne A.A.H.M., Lipman L.J.A., van Knapen F. 2003. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 711-714
- Cho, J. C., Kim S. J. 1999. Green fluorescent protein-based direct viable count to verify viable but non-culturable state of *Salmonella* Typhi in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 36: 227-235
- Colwell R.R. 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6: 121-125
- Cools I., Uyttendaele M., Caro C., D'Haese E., Nelis H.J., Debevere J. 2003. Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 886-892
- Corry J.E.L., Post D.E., Colin P., Laisney M.J. 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 43-76
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*:

- insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22:217-46
- Creach V., Baudoux A.C., Bertru G., Le Rouzic B. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52:19-28
- Crushell E., Harty S., Sharif F., Bourke B. 2004. Enteric *Campylobacter*: Purgings its secrets. *International Pediatric Research Foundation*, 55: 3-12
- Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 265: 49-72
- Davey H., Kell D. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*, 60: 641-696
- Davey H.M., Weichert D.H., Kell D.B., Kaprelyants A. S. 1999. Estimation of microbial viability using flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 11: 1-20
- Day W.A., Sajecki J.L., Pitts T.M., Joens L.A. 2000. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. *Infection Immunology*, 68: 6337 – 6345
- Dekeyser P., Gossuin-Detrain M., Butzler J.P., Sternon J. 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *Journal of Infection Disease*, 125: 390-392
- Dodd C.E.R., Sharman R.L., Bloomfield S.F., Booth I.R., Stewart G.S.A. 1997. Inimical processes: bacterial self-destruction and sub-lethal injury. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 238 -241
- Doyle M.P., Roman D.J. 1981. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 561-565
- Dukan S., Farewell A., Ballesteros M., Taddei F., Radman, M., Nystrom T. 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translation errors. *Proceeding of the National Academy of Science of USA (PNAS)*, 97: 5746-5749
- Ellis E. 2003. Molecular genetics. Glasgow, University of Strathclyde
<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/Lect13/lect13.html#s32> (avgust 2006): 3 str.
- Ellis R.J., Hartl F.U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 102-110
- Elvers K.T., Park S.F. 2002. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a luxS encoded signalling molecule. *Microbiology*, 148: 1475-1481
- Epidemiološko spremištanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2004. 2005. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 57-58
- Erlich H., Rosen Bronson S. 1993. How to optimize, modify, and/or troubleshoot PCR reactions. *Clinical Immunology Newsletter*, 13: 163-166
- Evans M.R., Ribeiro C.D., Salmon R.L. 2003. Hazards of healthy living: Bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 1219-1225
- Federighi M., Tholozan J.L., Cappelier J.M., Tissier J.P., Jouve J.L. 1998. Evidence of non-coccoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. *Food Microbiology*, 15: 539-550
- Flamm R.K., Hinrichs D.J., Thomashow M.F. 1984. Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infection and Immunology*, 44: 157-161
- Foster P.L. 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569: 3-11
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201: 1203-1209
- Gaynor E.C., Weels D.H., MacKichan J.K., Falkow S., 2005. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Molecular Microbiology*, 56: 8-27
- Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits

- the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 386-401
- Grant K.A., Park S.F. 1995. Molecular characterization of katA from *Campylobacter jejuni* and generation of a catalase-deficient mutant of *Campylobacter coli* by interspecific allelic exchange. *Microbiology*, 141: 1369-1376.
- Gubina M., Zajc-Satler J., Mehle J., Drinovec B., Pikelj F., Radšel-Medvešček A., Suhač M. 1976. Septicaemia and meningitis with *Campylobacter fetus* subspecies *intestinalis*. *Infection*, 4: 115-118
- Gubina M., Železnik Z., Mehle J., Zajc-Satler J., Dragaš A.Z. 1982. Enterotoxin activity of *Campylobacter* species. V: *Campylobacter-Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Newell D.G. (ed.). Lancher, Boston, MTP Press Limited, International Medical Publisher: 188-195
- Hadden R.D.M., Gregson N.A. 2001. Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 145-154
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Hardman A.M., Stewart G.S. Williams P. 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74: 199-210
- Harvey P., Leach S. 1998. Analysis of coccal cell formation by *Campylobacter jejuni* using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 398-404
- Hazeleger W. C., Janse J. D., Koenraad P. M. F. J., Beumer R. R., Rombouts F. M., Abbe T. 1995. Temperature – dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2713-2719.
- Hazeleger W.C., Wouters J.A., Rombouts F.M., Abbe, T. 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3917-3922
- Hein I., Flekna, G., Štefanič, P. Wagner, M., Smulders, F. J. M., Smole Možina, S. 2006. Influence of ethidium monoazide (EMA) on viable and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells. V: *Food Micro 2006, The 20th International ICFMH Symposium, Bologna, Italy, August 29 - September 2, 2006. Food safety and food biotechnology : diversity and global impact : Food Micro 2006*. Bologna: International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH) [etc.], str. 430.
- Hellingwerf K.J., Crielaard W.C., Joost Teixeira de Mattos M., Hoff W.D., Kort R., Verhamme D.T., Avignone-Rossa C. 1998. Current topics in signal transduction in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74: 211-227.
- Hempel L., Garry, R.B., O'Malley Y., Q., Wessels D.A., Flaherty D.M. 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 146-159
- Hengge-Aronis R. 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 148-152
- Herman C., Gross C.A. 2000. Heat stress. V: *Encyclopedia of Microbiology*. 2nd ed. Lederberg J. (ed.). New York (etc.), Academic press, Volume 2: 598-606
- Herman L. 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology*, 14: 103-110
- Herman L., Heyndrickx M., Grijspeerdt K., Vandekerchove D., Rollier I., De Zutter L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, 131: 1169-1180
- Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescent microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 1225-1228
- Hoe N.P., Goguen J.D. 1993. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *Journal of Bacteriology*, 175: 7901-7909

- Hohnson, E.A. 2003. Microbial adaptation and survival in foods. V: Microbial stress adaptation and food safety. Youself, A.E., Juneja, V.K. (eds.) Boca Ration (etc.), CRC Press, 75-103
- Hunt M.J., Abeya C., Trant T. 2001. Bacteriological analytical manual online. Isolation of *Campylobacter* species from food and water. College Park, MD USA, U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html> (junij 2005): 24 str.
- Hurme R., Rhen, M. 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation — what it all boils down to. *Molecular Microbiology*, 30: 1-6
- ISO 4833. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms – Colony count technique at 30 °C. 1991: 5 str.
- Jakubowski W., Bartosz G., 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29: 1297-1301
- Jamnik P. 2002. Odziv kvasovke *Candida intermedia* na Cr(VI) kot stresni dejavnik. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 7 – 39
- Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17: 316 - 323
- Jenkins D.E., Chaisson S.A., Matin A. 1988. Starvation induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170: 3910-3914
- Jeon B., Itoh K., Ryu S. 2005. Promoter analysis of cytolethal distending toxin genes (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) and effect of a *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology*, 49: 599-603
- Jones D.M., Sutcliffe E.M., Curry A. 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Journal of General Microbiology*, 137: 2477-2482
- Jones D.M., Sutcliffe E.M., Rios R., Fox A.J., Curry A., 1993. *Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism in the environment. *Jouran of Medical Microbiology*, 38: 145-150
- Joux F., Lebaron P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, 2: 1523-1535
- Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Kell D.B. 1994. Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent medium at high dilution. *FEMS Microbiology Letters*, 155: 347-352
- Kärenlampi R., Hänninen M.L. 2004. Survival of *Campylobacter jejuni* on various fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 187-195
- Keer J.T., Birch L. 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 175-183
- Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichert D.H., Harwood C.R., Barer M.R. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 169-187
- Keller A., Mohamed A., Dröse S., Brandt U., Fleming I., Brandes R.P. 2004. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radical Research*, 38: 1257-1267
- Kelly A.F., Martinez-Rodriguez A., Bovill R.A., Mackey B.M. 2003. Description of a "Phoenix" phenomenon in the growth of *Campylobacter jejuni* at temperatures close to the minimum for growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4975-4978
- Kelly A.F., Park S.F., Bovill R., Mackey B.M. 2001. Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2248–2254
- Ketley J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143: 5–21
- Klančnik A., Skočir P., Smole Možina S. 2003. Hladni šok ter stradanje vplivajo na morfologijo, kultivabilnost in preživelost bakterij *Campylobacter jejuni* = Cold shock and starvation influence viability, culturability and morphology of *Campylobacter jejuni* cells. V: Dobeic M., Vudrag M., Berger T. (ur.). 1. Interdisciplinarni simpozij "DDD, zdravje in okolje" z mednarodno udeležbo = 1st Interdisciplinary

Symposium "DDD, Health and Environment" with international participation, Ljubljana, 17. in 18. oktober 2003. *Zbornik referatov*. Ljubljana: Slovenska veterinarska zveza, Sekcija za DDD in higieno okolja: Zavod za zdravstveno varstvo, 2003, str. 195-202

Klančnik, A., Botteldoorn, N., Herman, L., Smole Možina, S. 2006. Survival and stress induced expression of *groEL* and *rpoD* of *Campylobacter jejuni* from different growth phases. International Journal of Food Microbiology, 112: 200-207

Klančnik, A., Štefanič, P., Smole Možina, S., 2005. Oxidative stress response in *Campylobacter jejuni*. V: Karlović, D. (ed.). Proceedings of the 2nd Central European Meeting [and] 5th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists: [17th-20th October 2004, Opatija, Croatia]. Zagreb: Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists Society, 408-415.

Kogure K., Simidu U., Taga N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 25: 415-420

Konkel M.E., Kim B.J., Klena J.D., Young C.R., Ziprin R. 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. Infections and Immunology, 66: 3666 – 3672

Kumar C.G., Anand S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology, 42: 9-27

Kusters J.G., Gerrits M.M., Van Strijp J.A.G., Vanderbroucke-Grauls C.M.J.E. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infection and Immunity, 65: 3672-3679

Lantz P.G., Hahn-Hägerdal B., Rådström P. 1994. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. Trends in Food Science and Technology, 5: 384-389

Lazaro B., Carcamo J., Audicana A., Perales I., Fernandez Astorga A. 1999. Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4677-4681

Lazazzera B.A. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. Current Opinion in Microbiology, 3: 177-182

Lindquist S. 1986. The heat-shock response. Annual Review of Biochemistry, 55: 1151-1191

Lindquist S., Craig E.A. 1988. The heat-shock proteins. Annual Review of Genetics, 22: 631-677

Liu G., Han Y., Song S. 2006. Applicability of a rapid method based on immunomagnetic capture-fluorescent PCR assay for *Campylobacter jejuni*. Food Control, 17: 527-532

Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic acids research, 30: 1292-1305

Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10: 190-212

Mackey M.B. 2000. Injured bacteria. V: The microbiological safety and quality of food. Vol. 1. Lund B. M., Baird-Parker T. C., Gould G. W. (eds.). Gaithersburg, Maryland, Aspen Publishers, Inc., 15: 321 – 327

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed.. Upper Saddle River, Prentice Hall International: 33-40; 172-177

Martin B.D., Schoenhard J.A., Sudgen K.D. 1998. Hypervalent chromium mimics reactive oxygen species as measured by the oxidant – sensitive dyes 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine. Chemical Research in Toxicology, 11: 1402-1410

Martinez-Rodriguez A., Kelly A.F., Park S.F., Mackey B.M. 2003. Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. International Journal of Food Microbiology, 90: 321-329

Martinez-Rodriguez A., Kelly A.F., Park S.F., Mackey B.M. 2004. Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. International Journal of Food Microbiology, 90: 321-329

Martinez-Rodriguez A., Mackey B.M. 2005. Physiological changes in *Campylobacter jejuni* on entry into stationary phase. International Journal of Food Microbiology, 101: 1-8

Matin A. 1990. Molecular analysis of the starvation stress in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Ecology

74: 185-196

Matin A. 1992. Genetics of bacterial stress response and its applications. Annals of the New York Academy of Sciences, 665: 1-15

McDougald D., Rice S. A., Weichert D., Kjelleberg S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? FEMS Microbiology Ecology, 25: 1-9

Medema G.J., Schets F.M., van de Giessen A.W., Havelaar A.H. 1992. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Bacteriology, 72: 512-516

Mehle J., Gubina M., Gliha B. 1982. Contamination of chicken meat with *Campylobacter jejuni* during the process of industrial slaughter. V: *Campylobacter-Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Newell D.G. (ed.). Lancher, Boston, The Hague, MTP Press Limited, International Medical Publisher: 267-269

Meng J., Doyle M.P. 1998. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. Bulletin de l' Institut Pasteur, 96: 151-164

Moen B., Oust A., Langsrød O., Dorrel N., Madsen G.L., Hinds J., Kohler A., Wren B.W., Rudi K. 2005. Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. Applied and Environmental Microbiology, 71: 2086-2094

Moore J.E. 2001. Bacterial dormancy in *Campylobacter*. Abstract theory or cause of concern? International Journal of Food Science and Technology, 36: 593-600

Moore J.E., Corcoran D., Dooley J. S. G., 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: 351-382

Moore J.E., Madden R.H. 2000. The effect of thermal stress on *Campylobacter coli*. Journal of Applied Microbiology, 89: 892-899

Moran A.P., Upton M.E. 1986. A comparative study of the rod and coccoid form of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428. Journal of Applied Bacteriology, 60: 103-110

Moran A.P., Upton M.E. 1987. Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. Journal of Applied Bacteriology, 62: 527-537

Müller J., Schulze F., Müller W., Hänel I. 2005. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. Veterinary Microbiology, 113: 123-129

Murphy C., Carroll C., Jordan K.N. 2003. Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Microbiology, 95: 704-708

Murphy C., Carroll C., Jordan K.N., 2006. Environmental survival mechanisms pathogen *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Microbiology, 100: 623-632

Myhre O., Andersen J.M., Aarnes H., Fonnum F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, luminal and lucigenin as indicators of reactive species formation. Biochemical Pharmacology, 65: 1575-1582

Nachamkin I., Allos B.M., Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. Clinical Microbiology Reviews, 11: 555-567

Ng L.K., Sherburne R., Taylor D.E., Stiles M.E. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. Journal of Bacteriology, 164: 338-343

Nocker A., Camper A.K. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. Applied and Environmental Microbiology, 72: 1997-2004

Nogva, H.K., Drømtørp S.M., Nissen H., Rudi K. 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. BioTechnology, 34: 804-813

Nyström T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. Archives of Microbiology, 176: 159-164

Nyström T., Olsson R.M., Kjelleberg S. 1992. Survival, stress resistance and alteration in protein expression in the marine *Vibrio* sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients. Applied and Environmental Microbiology, 58: 55-65

- Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43: 93-100
- Oliver J.D., Hite F., MacDougald D., Andon N.L., Simpson L.M. 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2624-2630
- Oliver J.R., Nilsson L., Kjelleberg S. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2640-2644
- Park S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177-188
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G., 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665-668
- Pearson A.D., Greenwood M.H., Feltham R.K., Healing T.D., Donaldson J., Jones D.M., Colwell R.R. 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: Intermittent common source, vertical transmission and amplification by flock propagation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4614-4620
- Pearson A.D., Greenwood M.H., Healing T.D., Rollins D., Shahamat M., Donaldson J., Colwell R.R. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 987-996
- Pereira M.D., Eleutherio E.C.A., Panek A.D. 2001. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiology*, 1: 11.
- Pesci E.C., Cottle D.L., Pickett C.L. 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 62: 2687-2694
- Petersen L., Larsen T.S., Ussery D.W., On S.L.W., Krogh A. 2003. RpoD Promoters in *Campylobacter jejuni* exhibit a strong periodic signal instead of a -35 Box. *Journal of Molecular Biology*, 326: 1361-1372
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2003-2007
- Potter L., Millington P., Griffiths L., Cole J. 2000. Survival of bacteria during oxygen limitation. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 11-18
- Purdy D., Cathraw S., Dickinson J.H., Newell D.G., Park S.F. 1999. Generation of a superoxide dismutase (SOD)-deficient mutant of *Campylobacter coli*: evidence for the significance of SOD in campylobacter survival and colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2540-2546
- Purdy D., Park S. F. 1994. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of a gene encoding superoxide dismutase from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbiology*, 140: 1203-1208
- Ramaih N., Kenkre V.D., Verlecar X.N. 2002. Marine environmental pollution stress detection through direct viable count of bacteria. *Water Research*, 36: 2383-2393
- Rasmussen, R., Morrison, T., Herrmann M., Wittwer C. 1998. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 2: 8-11
- Rauhut R., Klug G. 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 353-370
- Ravindranath S.D., Fridovich I. 1975. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 6107-6112
- Ravishankar S., Juneja V.K. 2003. Adaptation or resistance response of microorganisms to stresses in the food-processing environment. V: Microbial stress adaptation and food safety. Youself, A.E., Juneja, V.K. (eds.). Boca Raton (etc.), CRC Press: 105-158.
- Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. 2003. Foster City, California; Applied Biosystems.
http://water.rutgers.edu/Source_Tracking/qPCR/Real-TimeVs.TraditionalPCR.pdf (marec 2006): 15 str.
- Rees C.E.D., Dodd C.E.D., Gibson P.T., Booth I.R., Stewart G.S.A.B. 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 263-275

Reissbrodt R., Rienaecker I., Romanova J.M., Freestone P.P.E., Haigh R.D., Lyte M., Tschape H., Williams P.H. 2002. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4788-4794

Reverse transcriptase PCR. 1995. Larric J. W., Sieebert P.D. (eds.). Hertfordshire, Ellis Horwood: 2-20

Rice S.A., McDougald D., Kjelleberg S. 2000. *Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6: 115-120

Riehle M.M., Bennett A.F., Lenski R.E., Long A.D. 2003. Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Physiol Genomics*, 14: 47-58

Rijpens N., Jannes G., Herman L. 2002. Messenger RNA-based RT-PCR detection of viable *Salmonella*. *International Dairy Journal*, 12: 133-238

RNeasy® Mini Handbook. 2001. Hilden, Quiagen

<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/RNeasyMini.aspx> (marec 2006) : 114 str.

Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. 1996. *Campylobacter*. V: *Microorganisms in foods* 5.

Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B (eds.). London, ICMSF, Blackie Academic and Professional: 45-65

Robinson D.A. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282: 1584

Rodriguez G.G., Phipps D., Ishiguro K., Ridgway H.F. 1992. Use of fluorescent redox probe for direct visualizatization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1801-1808

Rodriguez-Romo L., Youself A. 2005. Cross-protective effects of bacterial stress. V: *Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance*. Griffiths M. (ed.). Boca Ration (etc.), CRC Press: 128 - 152

Rollins D., Colwell R. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 531-538

Roszak D.B., Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*, 51: 365-379

Roszak D.B., Grimes D.J., Colwell R. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 334-338

Rubeša-Mihaljevič R., Klančnik A., Lipoglavšek L., Abram M., Smole Možina, S., 2005. Assessment of viability of stressed *Campylobacter jejuni* cells by plate count and fluorescence techniques. V: Karlović, D. (ed.). Proceedings of the 2nd Central European Meeting [and] 5th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists: [17th-20th October 2004, Opatija, Croatia]. Zagreb: Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists Society, 402-407.

Saha S.K., Saha S., Sanyal S.C. 1991. Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells after animal passage. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3388-3389

Santorno M.G. 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biocemical Pharmacology*, 59: 55-63

Schäuder S., Bassler B.L. 2001. The languages of bacteria. *Genes & development*, 15: 1468-1480

Scopes R.K. 1987. Protein purification: principles and practise. 2nd ed. New York, Springer Verlag: 328 str.

Sellars M.J., Hall S.J., Kelly D.J. 2002. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *Journal of Bacteriology*, 184: 4187-4196

Sheridan G.E.C., Masters C.I., Shallcross J.A., Mackey B.M. 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1313-1318

Sigler K., Chaloupka, J., Brozmanova, J., Stadler, N., Hofer, M. 1999. Oxidative stress in microorganisms-microbial vs. higher cells- damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44: 587-624

Skirrow M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *British Medical Journal*, 2: 9-11

- Smole Možina S., Zorman T., Uzunović-Kamberović S. 2004. The prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in retail poultry meat. V: 2nd Central European Congress on Food, 26-28 April 2004, Budapest, Hungary. CEFood Congress. Programme and book of abstracts: safety, nutrition, technology, consumers. Budapest: Central Food Research Institute: Complex Committee on Food Science of the Hungarian Academy of Sciences, str. 61, O-35.
- Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G. 2005a. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. Letters in Applied Microbiology, 41: 297-302
- Snelling W.J., McKenna J.P., Lecky D.M., Dooley J.S.G. 2005b Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. Applied and Environmental Microbiology, 71: 5560-5571
- Solomon E.B., Hoover D.G. 1999. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. Journal of Food Safety, 19: 121-136
- Stantič-Pavlinič, M., Ščuka R., Dovečar D., Oražem T.; Logar J. 2000. Črevesne okužbe na območju Ljubljane. Zdravstveno varstvo, 69: 593-597
- Stintzi A. 2003. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. Journal of Bacteriology, 185: 2009-2016
- Stintzi A., Whitworth, L. 2003. Investigation of the *Campylobacter jejuni* cold-shock response by global transcript profiling. Genome Letters, 2: 18-27
- Storz G., Imlay J.A. 1999. Oxidative stress. Current Opinion in Microbiology, 2: 188-194
- Szymanski C.M., King M., Haardt M., Armstrong G.D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. Infection and Immunity, 63: 4295-4300
- Takata T., Wai S. N., Takade A., Sawae Y., Ono J., Amako K. 1995. The purification of a GroEL-like stress protein from aerobic adapted *Campylobacter jejuni*. Microbiology and Immunology, 39: 639-645
- Talibart R., Denis M., Castillo A., Cappelier J. M., Ermel G. 2000. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm. International Journal of Food Microbiology, 55: 263-267
- Tauxe R.V. 2000. Incidence, trends and sources of campylobacteriosis in developed countries: An overview. In: The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 21-25. November 2000. Geneva, WHO: 42-43
- Tauxe R.V. 2002. Emerging foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 78: 31-41
- Thies F., Weishaupt A., Karch H., Hartung H.P., Giegerich G. 1999. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *Campylobacter jejuni* groESL bicistronic operon. Microbiology, 145: 89-98
- Tholozan J.L., Cappelier J.M., Tissier J.P., Delattre G., Federighi M. 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1110-1116
- Thomas C., Hill D., Mabey M. 2002. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. Journal of Applied Microbiology, 92: 433-442
- Thorne S.H., Williams H.D. 1999. Cell density-dependent starvation survival of rhizobium leguminosarum bv. phaseoli: identification of the role of an N-Acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. Journal of Bacteriology, 181: 981-990
- Trachoo N., Frank J.F., Stern N.J. 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. Journal of Food Protection, 65: 1110-1116
- Turpin P.E., Maycroft K.A., Rowlands C.L. Wellington E.M.H. 1993. Viable but non-culturable salmonellas in soil. Journal of Applied Bacteriology, 74: 421-427
- Ueckert J., Breeuwer P., Abbe T., Stephens P., von Caron G.N., Steeg P.F. 1995. Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. International Journal of Food Microbiology, 28: 317-326
- Uzunović-Kamberović S., Zorman T., Heyndrickx M., Smole Možina S. 2006. Epidemiological relatedness among *C. jejuni* and *C. coli* PFGE genotypes from different sources. Journal of Clinical Microbiology (Submitted)

- van Vliet A.H.M., Ketley J.M. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 45-56
- van Vliet A.H.M., Wooldridge K.G., Ketley J.M. 1998. Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni* fur mutant. *Journal of Bacteriology*, 180: 5291-5298
- Vandecasteele S.J., Peetermans W.E., Merckx R., van Eldere J., 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *Journal of Bacteriology*, 183: 7094-7101
- Vandesompele J., De Paepe A., Speleman F. 2002. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, 303: 95-98
- Viable but nonculturable cells. 2000. V: The microbiological safety and quality of food 1. Lund B. M., Baird-Parker T.C., Gould G.W. (eds.). Maryland, Aspen Publishers: 321-327
- Vorob'eva L.I. 2004. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40: 217-224
- Wai S.N., Moriya T., Kondo K., Misumi H., Amako K. 1996. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microbiology Letters*, 136: 187-191
- Walker R.I., Caldwell B.M., Lee E.E., Guerry P., Trust T.J., Ruiz-Palacios G.M. 1986. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiological Reviews*, 50: 81-94
- Wassenaar T.M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 466-476
- Wassenaar, T., Newell, D.G. 2000. Minireview: genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1-9
- Watson S.P., Clements M.O. 1998. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180: 1750-1758
- Weichert D., Kjelleberg, S. 1996. Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology*, 142: 845-53
- Weichert D., Oliver J.D., Kjelleberg S. 1992. Low temperature induced non-culturability and killing of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*, 100: 205-210
- Weichert D.H. 1999. Stability and survival of VBNC cells – conceptual and practical implications. V: Microbial biosystems: New frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifax, 9 – 14 avgust 1998. Bell C. R., Brylinsky M., Johnson-Green P. (eds.). Halifax, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology
<http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium23/weichert.PDF> (oktober 2004): 6 str.
- Winson M.K., Davey H.M. 2000. Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods*, 21: 231-240
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR form RNA quantitation. *BioTechniques*, 39: 1-11
- Wooldridge K.G., Ketley M. 1997. *Campylobacter*-host cell interactions (Reviews). *Trends in Microbiology*, 5: 96-102
- Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abbe T. 2000. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 165-173
- Wrona M., Patel K., Wardman P., 2005. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidize forms towards carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 38: 262-270
- Wu Y.L., Lee L.H., Rollins D.M., Ching W.A. 1994. Heat shock-and alkaline pH-induced proteins of *Campylobacter jejuni*: characterization and immunological properties. *Infection and Immunity*, 62: 4256-4260
- Yamamoto H. 2000. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6: 112 – 114
- Youself, A.E., Courtney, P.D. 2003. Basic of stress adaptation and implications in new-generation foods. V: Microbial stress adaptation and food safety. Youself A.E., Juneja V.K. (eds.). Boca Ration (etc.), CRC Press: 1-30.

Zambrano M.M., Siegele D.A. Almiron M., Tormo A., Kolter R. 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science*, 259: 1757-1760

Zorman T., Heyndrickx M., Uzunović-Kamberović S., Smole Možina, S. 2006. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 24-33

Zorman T., Smole Možina S., 2002. Classical and molecular identification of thermotolerant *Campylobacters* from poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 177-184

ZAHVALA

V času nastajanja mojega doktorskega dela sem raziskovala in razmišljala ter se ob tem veliko naučila in spoznala. Pri tem mi je pomagalo in me podpiralo veliko ljudi. Vsem bi se rada iskreno zahvalila, čeprav tu najverjetneje ne bom uspela zajeti vseh.

Hvala moji mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za strokovno vodenje, kritične pripombe, napotke in vzpodbude med študijem, pri eksperimentalnem delu ter pri izdelavi doktorske disertacije. Hvala za možnosti predstavitev mojega dela na mednarodnih kongresih ter konstruktivno sodelovanje pri pripravi publikacij.

Hvala predsedniku komisiji prof. dr. Petru Rasporju za koristne nasvete v času podiplomskega študija ter pri pregledu naloge. Članici komisije prof. dr. Mariji Gubina hvala za strokovne popravke doktorske disertacije.

Del raziskav sem opravila v laboratorijih Techology & Food Unit, The Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO) (Melle, Belgija). Hvala dr. Lieve Herman, dr. Nadin Botteldoorn, Veroniek De Paepe ter ostalim sodelavcem za uvajanje v delo na področju RNA ter vso pomoč v času mojega dela in bivanja v Belgiji.

Del rezultatov je nastalo s sodelovanjem Roberte Rubeša iz Medicinske fakultete Reka, Hrvaška.

V okviru raziskovalnega dela sem sodelovala z mnogimi raziskovalci. Za možnost uporabe fluorescentnega mikroskopa ter prijetno delovno vzdušje se zahvaljujem prof. dr. Ines Mandič Mulec, dr. Janezu Hacinu, gospe Simoni Leskovšek ter ostalim raziskovalcem iz Katedre za mikrobiologijo.

Za možnost fotografiranja s fazno kontrastnim in fluorescentnim mikroskopom hvala Tini Eleršek iz Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalnega inštituta za biologijo.

Pri delu s pretočno citometrijo hvala za sodelovanje mag. Luku Lipoglavšku iz Katedre za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo, Oddelka za zootehniko.

Za uvajanje in pomoč pri delu z elektronskim mikroskopom hvala mag. Magdi Tušek Žnidarič iz Katedre za zoologijo - laboratorijsa za elektronsko mikroskopijo, Oddelka za biologijo.

Brez sodelavcev iz Katedre za tehnologijo rastlinskih živil bi vse šlo težje, zato hvala mag. Tomažu Požrlu za uspešno reševanje tehničnih problemov.

Hvala diplomantkam Petri Skočir, Polonci Štefanič, Mateji Jurada ter Bernardi Brumec za prispevek k nastanku tega dela.

Za pomoč, konstruktivno sodelovanje, neštete diskusije ter nenehne spodbude se zahvaljujem sodelavcem Katedre za živilsko mikrobiologijo: gospe Jani Avbelj, doc. dr. Barbari Jeršek, Mariji Kurinčič, Ani Kramar ter bivši sodelavki dr. Tini Zorman.

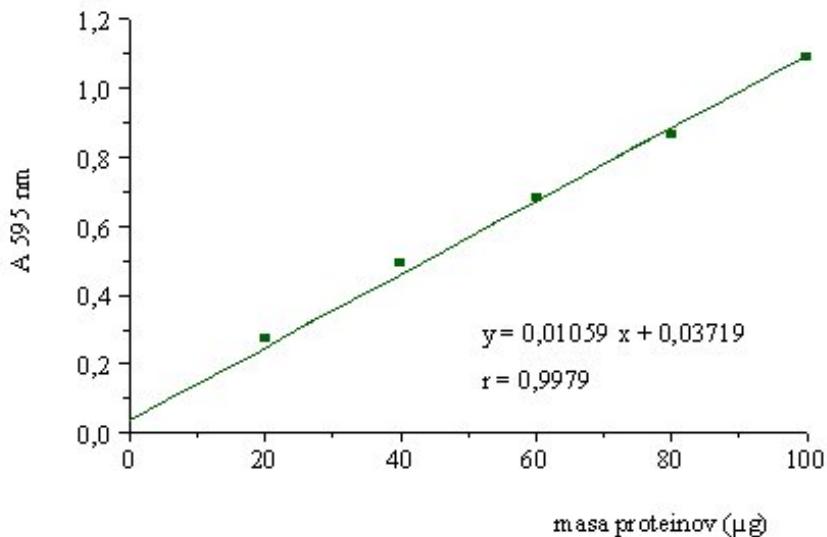
Hvala vsem sodelavcem iz Katedre za biotehnologijo, še posebno dr. Neži Čadež ter dr. Poloni Jamnik. Slednja mi je s svojimi bogatimi izkušnjami nesebično pomagala pri praktičnemu delu, razjasnila marsikatero stvar preko diskusij in nasvetov ter mi s sodelovanjem in podporo pomagala prebroditi zaplete pri eksperimentalnem delu.

Hvala Barbari Slemenik in Ivici Hočavar za pomoč in svetovanje pri zbiranju in urejanju literature ter za odgovore na nešteta vprašanja.

Hvala tudi vsem neimenovanim, ki ste mi kakorkoli pomagali.

Hvala mojim staršem ter sestram in bratu za stalno podporo, spodbujanje, vso pomoč v času odločitev in med podiplomskim študijem.

Prav posebna hvala pa Tomiju in moji Emi za zaupanje vame, razumevanje in spodbude v pogosto predolgih delovnih popoldnevih in večerih.

PRILOGE

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje mase proteinov v celičnem ekstraktu bakterije *C. jejuni* K49/4 (metoda po Bradfordu, 1976).

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja KLANČNIK

**ODZIV BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* NA
TEMPERATURNI IN OKSIDATIVNI STRES**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2006