

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Aleksandra GORNIK

**PROTIMIKROBNO IN MODULATORNO
DELOVANJE IZBRANIH RASTLINSKIH
EKSTRAKTOV IN ČISTIH FENOLNIH SPOJIN PRI
BAKTERIJAH *Campylobacter jejuni***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Aleksandra GORNIK

**PROTIMIKROBNO IN MODULATORNO DELOVANJE IZBRANIH
RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN ČISTIH FENOLNIH SPOJIN PRI
BAKTERIJAH *Campylobacter jejuni***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF SELECTED
PLANT EXTRACTS AND PURE PHENOLIC COMPOUNDS
AGAINST *Campylobacter jejuni***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico dr. Anjo Klančnik in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Somentorica: dr. Anja KLANČNIK

Recenzentka: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

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:	dr. Anja KLANČNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleksandra Gornik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 579.24/.26:547.9+547.56(043)=163.6
 KG protimikrobno delovanje / modulatorno delovanje / rastlinski ekstrakti / *Alpinia katsumadai* / ekstrakti rožmarina / fenolne spojine / epigalokatehin galat / minimalna inhibitorna koncentracija / *Campylobacter jejuni* / inhibitorji izlivnih črpalk / membranske izlivne črpalke
 AV GORNIK, Aleksandra
 SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / KLANČNIK, Anja (somentorica) / MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
 LI 2011
 IN PROTIMIKROBNO IN MODULATORNO DELOVANJE IZBRANIH RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN ČISTIH FENOLNIH SPOJIN PRI BAKTERIJAH *Campylobacter jejuni*
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XIV, 73 str., 20 pregl., 9 sl., 96 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Namen diplomske naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje različnih rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin na bakterije *Campylobacter jejuni*, ugotoviti vlogo membranskih izlivnih črpalk pri zagotavljanju odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem, ter preveriti potencialno modulatorno aktivnost naravnih spojin. Dokazali smo, da sta med ekstrakti najučinkovitejša VivOX 40 (V40) in VivOX 70 (V70), med fenolnimi spojinami pa karnozolna kislina. Protimikrobno delovanje smo opazili tudi za ekstrakt semen *Alpinia katsumadai* in ekstrakt listov vinske trte (ELVT), ter epigalokatehin galat (EGKG). Pri ugotavljanju vpliva izlivnih črpalk na protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin, smo dokazali vpliv mutacije v genu *cmeB* na občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter s tem vlogo izlivne črpalke CmeABC na protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin. Rezultati dokazujejo, da rastlinski ekstrakti ter čiste fenolne snovi delujejo na različne tarče pri *C. jejuni* NCTC 11168, saj smo dokazali manjši vpliv na izlivni sistem CmeDEF ter na regulatorni protein CmeR. Čeprav nismo dokazali bistvene vloge izlivne črpalke CmeDEF pri odpornosti *C. jejuni*, pa je mutacija v genu *cmeF* v nekaterih primerih povzročila prekomerno izražanje črpalke CmeABC. Pri testiranju vpliva inhibitorjev izlivnih črpalk (EPIs) na odpornost *C. jejuni* NCTC 11168 smo ugotovili, da sta bila kemijska inhibitorja 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) in fenilalanilarginin-β-naftilamid (PAβN) najučinkovitejša med testiranimi, saj sta v večini primerov znižala MIK ekstraktov in fenolnih spojin. Nekoliko slabši učinek je imel inhibitor karbonil cianid m-klorofenilhidrazon (CCCP), medtem ko verapamil in reserpin nista bila učinkovita. Test modulatornega delovanja je potrdil, da sta ekstrakt semen *A. katsumadai* in EGKG znižala odpornost sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti antibiotikom, žolčnim solem (ŽS), natrijevemu deoksiholatu (ND), etidijevemu bromidu (EtBr) in ekstraktu rožmarina V40. V tem diplomskem delu smo tako uspešno predstavili nova potencialna naravna modulatorja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24/.26:547.9+547.56(043)=163.6
 CX antimicrobial activity / modulatory activity / plant extracts / *Alpinia katsumadai* / rosemary extracts / phenolic compounds / epigallocatechin gallate / minimal inhibitory concentration / *Campylobacter jejuni* / efflux pump inhibitors / efflux pumps
 AU GORNIK, Aleksandra
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / KLANČNIK, Anja (co-advisor) / MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2011
 TY ANTIMICROBIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF SELECTED PLANT EXTRACTS AND PURE PHENOLIC COMPOUNDS AGAINST *Campylobacter jejuni*
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XIV, 73 p., 20 tab., 9 fig., 96 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The aim of our research was to evaluate the antimicrobial activity of selected plant extracts and pure phenolic compounds against *Campylobacter jejuni*, to determine the role of efflux pumps in antimicrobial resistance to different antimicrobials as well as to test the potential modulatory activity of natural plant derived compounds. We have ascertain that VivOX 40 (V40) and VivOX 70 (V70) show the highest antimicrobial activity among the extracts used, while among phenolic compounds, carnolic acid was the most effective. We have also determined the antimicrobial activity of *Alpinia katsumadai* seed extract, wine leaves extract and epigallocatechin gallate (EGCG). When investigating the role of efflux pumps in antimicrobial activity of plant extracts and pure phenolic compounds, we have managed to prove the impact of mutation in *cmeB* gene on susceptibility of *C. jejuni* NCTC 11168 strain, as well as the role of efflux pump CmeABC. Regarding the results, it is obvious that the plant extracts and phenolic compounds have different celular targets in *C. jejuni* NCTC 11168. Although the efflux pump CmeDEF is not essential for antimicrobial resistance against natural compounds, the mutation in *cmeF* gene can result in overexpression of eflux pump CmeABC. When testing the impact of efflux pumps inhibitors (EPIs) to resistance mechanisms in *C. jejuni* NCTC 11168, chemical inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) and phenyl-arginine- β -naphthylamide (PA β N) were the most effective among the tested, as they decreased the MIC of extracts and phenolic compounds. While the inhibition activity of EPI carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCC) was lower than the one for NMP and PA β N, verapamil and reserpine were not effective as EPIs. The modulation assay has confirmed our hypothesis, that *A. katsumadai* seed extract and EGCG can reduce the resistance of *C. jejuni* and *C. coli* strains against antibiotics, bile salts, sodium deoxycholate, ethidium bromide and V40 extract. In this research we have successfully introduced new potential resistance modifying agents from natural sources.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
 1 UVOD	 1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
 2 PREGLED OBJAV	 3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Campylobacter</i>	3
2.1.1 Značilnosti rodu <i>Campylobacter</i>: taksonomska razvrstitev, fiziološke in genetske značilnosti	3
2.1.2 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz	4
2.2 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM ..	5
2.2.1 Mehanizmi odpornosti pri bakterijah <i>Campylobacter jejuni</i>	6
2.2.1.1 Membranske izlivne črpalke	7
2.2.1.1.1 Izlivna črpalka CmeABC	8
2.2.1.1.2 Izlivna črpalka CmeDEF	8
2.2.1.1.3 Izlivni sistem CmeGH	9
2.2.1.2 Regulatorni protein CmeR	10
2.2.1.3 Inhibitorji izlivnih črpalk	10
2.3 PROTIMIKROBNE SNOVI	12
2.3.1 Protimikrobne snovi rastlinskega izvora	13
2.3.1.1 Pomen v živilstvu	13
2.3.1.2 Ekstrakt semen <i>Alpinia katsumadai</i>	14
2.3.1.3 Ekstrakt listov vinske trte (ELVT)	15
2.3.1.4 Ekstrakti rožmarina	15
2.3.2 Čiste fenolne spojine	16
2.3.2.1 Fenolne kisline	16
2.3.2.2 Flavonoid epigallocatehin galat (EGKG)	18
2.4 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNE IN MODULATORNE AKTIVNOSTI	
UČINKOVIN	19
2.4.1 Metode določanja protimikrobne aktivnosti	19
2.4.1.1 Difuzijske metode	20
2.4.1.2 Metode razredčevanja	20

2.4.1.3 Druge metode.....	21
2.4.2 Metode določanja modulatorne aktivnosti	21
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 POTEK DELA.....	23
3.2 MATERIAL	24
3.2.1 Mikroorganizmi	24
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	26
3.2.3 Laboratorijska oprema in material	27
3.2.4 Rastopine in dodatki	28
3.2.5 Rastlinski ekstrakti	28
3.2.5.1 Ekstrakti rožmarina.....	28
3.2.5.2 Ekstrakt semen <i>Alpinia katsumadai</i>	28
3.2.5.3 Ekstrakt listov vinske trte (ELVT).....	29
3.2.6 Fenolne spojine	29
3.2.6.1 Fenolne kisline	29
3.2.6.2 Epigallocatehin galat (EGKG).....	29
3.2.7 Antibiotiki	29
3.2.7.1 Priprava raztopine ciprofloksacina	29
3.2.7.2 Priprava raztopine eritromicina.....	30
3.2.7.3 Priprava raztopin klaritromicina (USP standard, Cat No 1134379), azitromicina (Fluka Biochemika), diritromicina (Sigma-Aldrich Co.) in tilozina (Sigma-Aldrich Co.)	30
3.2.8 Etidijev bromid	30
3.2.9 Natrijev deoksiholat (ND) in žolčne soli (ŽS)	30
3.2.10 Inhibitorji/modulatorji membranskih izlivnih črpalk	30
3.2.10.1 Kemijski inhibitorji.....	30
3.2.10.1.1 Inhibitor PAβN (Sigma-Aldrich Co.)	30
3.2.10.1.2 Inhibitor NMP (CHESS GmgH)	31
3.2.10.1.3 Inhibitor verapamil (Sigma-Aldrich Co.)	31
3.2.10.1.4 Inhibitor reserpin (Sigma-Aldrich Co.)	31
3.2.10.1.5 Inhibitor CCCP (Fluka Biochemika).....	31
3.2.10.2 Ekstrakt semen <i>Alpinia katsumadai</i> ter EGKG kot modulatorja membranskih izlivnih črpalk	31
3.3 METODE	32
3.3.1 Revitalizacija sevov	32
3.3.2 Priprava inokuluma	32
3.3.3 Določanje koncentracije bakterijskih celic v inokulumu	32
3.3.4 Mikrodilucijska metoda v bujonu	33
3.3.5 Določanje MIK z merjenjem bioluminiscence	34
3.3.6 Ugotavljanje vpliva mutacij v izlivnih črpalkah in vpliva inhibitorjev na delovanje izlivnih črpalk	36

4 REZULTATI.....	37
4.1 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN FENOLNIH SPOJIN TER VPLETENOST EFLUKSA	37
4.1.1 Protimikrobna učinkovitost rastlinskih ekstraktov (MIK)	38
4.1.2 Relativni vpliv inhibitorjev in mutacij na protimikrobno učinkovitost rastlinskih ekstraktov	39
4.1.3 Protimikrobna učinkovitost čistih fenolnih spojin (MIK)	41
4.1.4 Relativni vpliv inhibitorjev in mutacij na protimikrobno učinkovitost fenolnih spojin	43
4.2 MODULATORNA VLOGA EKSTRAKTA SEMEN <i>A. katsumadai</i> IN EGKG	44
4.2.1 Protimikrobna učinkovitost EGKG, ekstrakta semen <i>A. katsumadai</i> ter V40 proti sevom različnega izvora	45
4.2.2 Vpliv EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja izbranih antibiotikov proti sevom <i>Campylobacter</i> različnega izvora	45
4.2.3 Vpliv ekstrakta semen <i>Alpinia katsumadai</i> kot modulatorja protimikrobnega delovanja izbranih antibiotikov proti sevom <i>Campylobacter</i> različnega izvora	47
4.2.4 Vpliv EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja EtBr, ŽS in ND proti sevom <i>Campylobacter</i> različnega izvora	49
4.2.5 Vpliv ekstrakta semen <i>Alpinia katsumadai</i> kot modulatorja protimikrobnega delovanja EtBr, ŽS in ND proti sevom <i>Campylobacter</i> različnega izvora	50
4.2.6 Vpliv EGKG in ekstrakta semen <i>Alpinia katsumadai</i> kot modulatorjev protimikrobnega delovanja V40 proti sevom <i>Campylobacter</i>	51
5 RAZPRAVA.....	52
5.1 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN FENOLNIH SPOJIN TER VPLETENOST EFLUKSA	52
5.1.1 Protimikrobna učinkovitost ekstraktov rožmarina	52
5.1.2 Protimikrobna učinkovitost fenolnih kislin	54
5.1.3 Protimikrobna učinkovitost EGKG, ekstrakta semen <i>Alpinia katsumadai</i> ter ekstrakta listov vinske trte (ELVT)	55
5.1.4 Vloga izlivnih črpalk pri odpornosti <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 proti izbranim rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam	55
5.1.4.1 Vpliv mutacij v genih izlivnih črpalk	56
5.1.4.2 Vpliv kemijskih inhibitorjev izlivnih črpalk (EPIs) na njihovo delovanje pri bakterijah <i>C. jejuni</i>	57
5.2 MODULATORNA VLOGA EGKG IN EKSTRAKTA SEMEN <i>Alpinia katsumadai</i> PRI ODPORNOSTI bakterij <i>Campylobacter</i> PROTI RAZLIČNIM PROTIMIKROBNIM SNOVEM	59
5.2.1 Odpornost proti antibiotikom, EtBr, ŽS in ND	59
5.2.2 Vloga ekstrakta semen <i>Alpinia katsumadai</i> kot modulatorja protimikrobnega delovanja	61
5.2.3 Vloga EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja	61

6 SKLEPI	63
6.1 PREDLOGI NADALJNJIH RAZISKAV NA PODROČJU PROTIMIKROBNEGA IN MODULATORNEGA DELOVANJA SNOVI NARAVNEGA IZVORA PRI BAKTERIJAH <i>Campylobacter jejuni</i>	63
7 VIRI	65
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razlike v strukturi hidroksibenzojskih in hidroksicimetnih fenolnih kislin (Ayaz in sod., 2008).	18
Preglednica 2: Nekateri najpogostejši izrazi ter definicije, uporabljene za vrednotenje protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004).	20
Preglednica 3: Delovni mikroorganizmi, uporabljeni v eksperimentu.	25
Preglednica 4: Krvni agar Columbia	26
Preglednica 5: Tekoče gojišče Mueller Hinton (MHB).	26
Preglednica 6: Trdno modificirano gojišče Abeyta-Hunt- Bark (AHB) agar	26
Preglednica 7: Laboratorijska oprema, uporabljena za izvedbo eksperimentalnega dela. ...	27
Preglednica 8: Raztopine in dodatki, uporabljeni pri eksperimentalnem delu.	28
Preglednica 9: Komercialni ekstrakti rožmarina uporabljeni v eksperimentalnem delu diplomske naloge (Vitiva, 2008)	28
Preglednica 10: Začetne masne koncentracije testiranih vzorcev na mikrotitrski ploščici ob uporabi različnih sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i>	34
Preglednica 11: Zbirna preglednica vrednosti MIK seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in njegovih mutiranih različic proti izbranim rastlinskim ekstraktom v odsotnosti in prisotnosti različnih inhibitorjev izlivnih črpalk.	38
Preglednica 12: Zbirna preglednica relativnega vpliva mutacij (U) na občutljivost referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in relativnega učinka inhibitorjev izlivnih črpalk (U_i) na zmanjšano odpornost referenčnega seva proti izbranim rastlinskim ekstraktom.	39
Preglednica 13: Zbirna preglednica vrednosti MIK seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in njegovih mutiranih različic proti izbranim čistim fenolnim spojinam v odsotnosti in prisotnosti različnih inhibitorjev izlivnih črpalk.	41
Preglednica 14: Zbirna preglednica relativnega vpliva mutacij (U) na občutljivost referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in relativne učinkovitosti inhibitorjev izlivnih črpalk (U_i) na zmanjšano odpornost referenčnega seva proti izbranim čistim fenolnim spojinam.	43
Preglednica 15: Zbirna preglednica protimikrobne učinkovitosti (MIK) ekstraktov semen <i>A. katsumadai</i> , V40 in EGKG proti sevom <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i>	45
Preglednica 16: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> proti različnim antibiotikom v odsotnosti in prisotnosti EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja.	46
Preglednica 17: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> proti različnim antibiotikom v odsotnosti in prisotnosti <i>A. katsumadai</i> kot modulatorja protimikrobnega delovanja.	48

Preglednica 18: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> proti EtBr, ŽS in ND v odsotnosti in prisotnosti EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja.....	49
Preglednica 19: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> proti EtBr, ŽS in ND v odsotnosti in prisotnosti ekstrakta semen <i>A. katsumadai</i> kot modulatorja protimikrobnega delovanja.....	50
Preglednica 20: Zbirna preglednica rezultatov ugotavljanja modulatornega delovanja ekstrakta semen <i>A. katsumadai</i> in EGKG na protimikrobno delovanje ekstrakta V40.....	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Viri okužbe z bakterijami <i>Campylobacter jejuni</i> (Young in sod., 2007).....	4
Slika 2: Struktura in sestava membrane pri bakterijah <i>Campylobacter</i> spp., vključno z lipooligosaharidi, porini in 5 družinami izlivnih transporterjev (Garénaux, 2008).....	8
Slika 3: Strukturne formule inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk, uporabljenih v diplomskem delu (Pagès in sod., 2005; Sun in sod., 2009; Drugs.com, 2006).	12
Slika 4: Semena rastline <i>Alpinia katsumadai</i> , uporabljena za pripravo ekstrakta (Kovač in Bučar, 2011).	15
Slika 5: Strukturna formula epigalokatehin galata (EGKG) (Biopurify Phytochemicals, 2010).....	19
Slika 6: Shema poteka eksperimentalnega dela diplomske naloge.	23
Slika 7: Organizacija genoma in lastnosti operona <i>cmeABC</i> pri <i>C. jejuni</i> 81-176 (Lin in sod., 2002).	24
Slika 8: Organizacija genoma in lastnosti intergenske regije med genom <i>cmeR</i> in operonom <i>cmeABC</i> (Lin in sod., 2005).	25
Slika 9: Primer grafičnega določanja MIK za ekstrakt rožmarina I18.	35

KAZALO PRILOG

Priloga A: Lastnosti fenolnih kislin, uporabljenih v diplomskem delu (Buranov in Mazza, 2009; HMDB, 2009a,b,c,d; Vitiva, 2008; Qiao in sod., 2008)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC	angl. ATP binding cassette
AHB	gojišče Abeyta-Hunt Bark
<i>A. katsumadai</i>	<i>Alpinia katsumadai</i>
A40	ekstrakt AquaROX 40
ATP	adenozin trifosfat
CCCP	karbonil cianid m-klorofenilhidrazon
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
CFU	število kolonijskih enot (angl. Colony Forming Unit)
Cia	angl. <i>Campylobacter</i> invasion proteins
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
EGKG	epigalokatehin galat
ELVT	ekstrakt listov vinske trte
EPI	inhibitor izlivnih črpalk (angl. Efflux Pump Inhibitor)
EtBr	etidijev bromid
FerK	ferulna kislina
FIK	frakcijska inhibitorna koncentracija
FQ	Fluorokinoloni
GalK	galna kislina
HCl	klorovodikova kislina
I18	ekstrakt Inolens 18
KaK	karnozolna kislina
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogen fosfat
KlorK	klorogenska kislina
MAR	mnogokratna odpornost proti antibiotikom (angl. Multiple Antibiotic Resistance)
MATE	angl. multidrug and toxic compound extrusion
MDR	mnogokratna odpornost proti protimikrobnim snovem (angl. Multidrug Resistance)
MFS	angl. major facilitator superfamily
MHB	tekoče gojišče Mueller Hinton
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NaOH	natrijev hidroksid
ND	natrijev deoksiholat
NMP	1-(1-naftilmetil)-piperazin
PAβN	fenilalanilarginin- β-naftilamid
RK	rožmarinska kislina
RLU	relativne enote luminiscence (angl. Relative Luminiscence Unit)
RND	angl. resistance nodulation division
SinK	sinapinska kislina
SirK	siringična kislina
SMR	angl. small multidrug resistance
U	razmerje med MIK divjega seva in MIK mutiranega seva
U _i	učinkovitost inhibitorja

U _m	učinkovitost modulatorja
VanK	vanilinska kislina
V40	ekstrakt VivOX 40
V70	ekstrakt VivOX 70
ŽS	žolčne soli

1 UVOD

Zahteve potrošnikov po hrani s podaljšano obstojnostjo, a brez kemijskih aditivov se večajo. Posledično proizvajalci iz proizvodnje hrane umikajo sintetične konzervanse ter alternative iščejo v naravi, predvsem v rastlinskih ekstraktih ter njihovih eteričnih oljih. Rastlinski ekstrakti nudijo potencialno bogat vir novih konzervirnih snovi, ki imajo protimikrobni učinek proti številnim bakterijam, kvasovkam, plesnim in zavirajo številne kemijske procese kvarjenja, npr. oksidativne reakcije. V nekaterih primerih je protimikrobna aktivnost posledica prisotnosti fenolnih spojin, ki se kot sekundarni metaboliti sintetizirajo v rastlinah. Fenolne spojine pa hkrati prispevajo tudi k aromi, okusu, barvi ter oksidativni stabilnosti prehranskih izdelkov. Poleg antioksidativne je bilo narejenih veliko študij protimikrobne aktivnosti fenolnih spojin proti različnim mikroorganizmom, tudi proti patogenom, ki se prenašajo s hrano (King in Dykes, 2008).

Posebno pozornost je potrebno nameniti tudi primerjavi antioksidativnih in protimikrobnih aktivnosti rastlinskih ekstraktov, ki vsebujejo več različnih aktivnih sestavin, s čistimi spojinami, da bi potrdili morebitne sinergistične interakcije med aktivnimi sestavinami ekstrakta (Erkan in sod., 2008).

Po Gramu negativne, termofilne vrste rodu *Campylobacter*, predvsem *C. jejuni*, so poznane kot glavne povzročiteljice akutnega bakterijskega gastroenteritisa pri človeku že od leta 1970 (Luangtongkum in sod., 2009). Kot zoonotični patogeni imajo bakterije rodu *Campylobacter* več naravnih rezervoarjev (živali). Okužba se na človeka prenaša predvsem z uživanjem okužene hrane, vode ali mleka. Uporaba antibiotikov v medicini in veterini lahko veliko prispeva k razvoju proti antibiotikom odpornih bakterij rodu *Campylobacter*. Tveganje za zdravje ljudi predstavlja vse večja odpornost proti antibiotikom iz skupine fluorokinolonov in makrolidov, glavni problem pa je širjenje mnogokratno odpornih sevov (t.i. MDR, angl. Multi Drug Resistant) bakterij *Campylobacter*, odpornih proti več različnim antibiotikom hkrati (Quinn in sod., 2007).

Bakterije so razvile številne mehanizme povečanja odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem. Med temi so tudi izlivne črpalke, ki so sposobne iznosa strukturno zelo raznolikih spojin iz celice, tudi antibiotikov, zaradi česar so le ti neučinkoviti v boju proti klinično pomembnim bakterijam (Nikaido, 2009). Pri bakterijah rodu *Campylobacter* najdemo več mehanizmov odpornosti proti antibiotikom. Izlivni mehanizem povečane odpornosti proti številnim antibiotikom je bil prvič omenjen leta 1995 (Charvalos in sod.). Lin in sod. so leta 2002 prvič dokazali prisotnost izlivnega sistema CmeABC tipa RND pri *C. jejuni*, ki je odgovoren za iznos večjega števila antibiotikov, barvil, žolčnih soli in detergentov. Poleg tega pri sevih *C. jejuni* najdemo še izlivno črpalko CmeDEF, ki je prav tako vpletena v intrinzično odpornost *C. jejuni*, vendar deluje kot sekundarni izlivni mehanizem. Genomska analiza *C. jejuni* NCTC 11168 je razkrila tudi prisotnost številnih drugih domnevnih izlivnih sistemov pri teh bakterijah, čeprav funkcija večine ostaja še neznana (Akiba in sod., 2005).

Zaradi problema širjenja mnogokratne odpornosti proti več različnim antibiotikom pri številnih bakterijah je nujno potreben razvoj novih terapevtskih strategij ter iskanje novih protimikrobnih in modulatornih snovi (Bina in sod., 2009). Z uporabo modulatorjev

bakterijske odpornosti, kot so na primer inhibitorji izlivnih črpalk (EPIs), bi lahko ponovno vzpostavili aktivnost trenutno terapevtsko neučinkovitih antibiotikov, kot tudi preprečili širjenje mnogokratno odpornih sevov (Stavri in sod., 2007). Bistveno je iskanje potencialnih novih EPIs naravnega izvora, ki bi lahko nadomestili toksične kemijske inhibitorje in tako pripomogli k zmanjšanju števila proti protimikrobnim snovem odpornih sevov kampilobaktra.

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Cilji diplomske naloge, so bili sledeči:

- Določiti protimikrobno delovanje izbranih rastlinskih ekstraktov (listov rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), listov vinske trte (*Vitis vinifera* L.) in semen (*Alpinia katsumadai*) ter čistih fenolnih spojin (rožmarinske, karnozolne, klorogenske, vanilinske, galne, siringične, sinapinske, ferulne kisline in epigalokatehingalata (EGKG)) na sev *C. jejuni* NCTC 11168;
- Ugotoviti vpliv izlivnih črpalk CmeABC and CmeDEF na protimikrobno odpornost bakterij *C. jejuni* s primerjalno analizo referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutantov *cmeB*, *cmeR* in *cmeF*;
- Ugotoviti vpliv kemijskih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (EPIs) na protimikrobno učinkovitost rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin proti *C. jejuni*;
- Določiti modulatorno delovanje rastlinskega ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* ter čiste fenolne spojine epigalokatehin galata (EGKG) na odpornost izbranih sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti različnim protimikrobnim snovem.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Mutacija gena *cmeB* poveča občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11168, kar kaže na vpletenost črpalke CmeABC v mehanizem odpornosti proti ekstraktom oz. fenolnim spojinam kot aktivnim učinkovinam.
- Inhibitorja PAβN in NMP povečata občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11168 proti rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam, slabši učinek imajo drugi inhibitorji.
- Ekstrakt semen *Alpinia katsumadai* ter čista fenolna spojina EGKG kažeta modulatorni učinek na odpornost proti nekaterim antibiotikom, žolčnim solem, natrijevemu deoksiholatu in etidijevemu bromidu pri izbranih sevih *C. jejuni* in *C. coli*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Campylobacter*

2.1.1 Značilnosti rodu *Campylobacter*: taksonomska razvrstitev, fiziološke in genetske značilnosti

Bakterije rodu *Campylobacter* uvrščamo v družino Campylobacteriaceae. Rod *Campylobacter* so ustanovili na podlagi fenotipskih in genotipskih lastnosti (sekvenčne analize gena 16S rRNK, karakterizacije proteinov celične stene, seroloških lastnosti in biokemijske analize). Vanj so v začetku uvrščali 15 vrst, naknadno je bilo 6 vrst preimenovanih v rod *Helicobacter*, Vandamme pa je leta 1991 aerotolerantne kampilobaktrije uvrstil v rod *Arcobacter* (Uzunović-Kamberović, 2009). Taksonomija rodu *Campylobacter* se ves čas spreminja, predvsem zaradi naraščajočega zanimanja zanj in zaradi izpopolnjenih metod, ki se uporabljajo v taksonomiji (Snelling in sod., 2005).

Rod *Campylobacter* združuje majhne, spiralne, po Gramu negativne bakterije, v obliki črke S, široke od 0,2- 0,9 μm ter dolge od 0,2-5,0 μm . Danes rod obsega 16 vrst bakterij, od katerih je večina patogenih za človeka (Humphrey in sod., 2007). Termofilne vrste, med katerimi sta najpomembnejši *C. jejuni* in *C. coli*, so večkrat vzrok različnih gastrointestinalnih bolezni. Na različnih mikrobioloških gojiščih lahko kampilobaktri tvorijo različne kolonije, med temi sive, ploščate, nepravilne kolonije, ki so lahko okrogle, izbočene in lesketajoče (Snelling in sod., 2005).

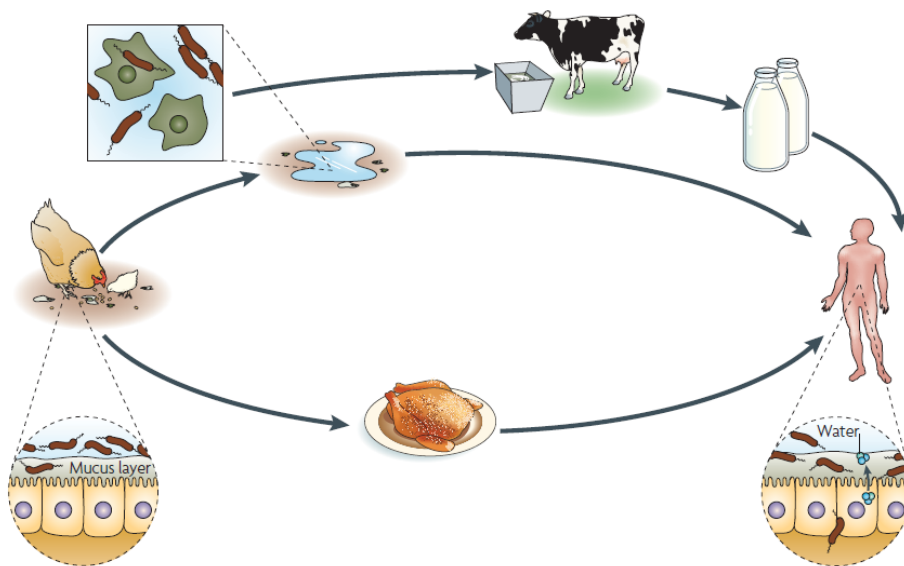
Izolacija bakterij rodu *Campylobacter*, kot povzročiteljev gastroenteritisa, je težavna prav zaradi specifičnih rastnih zahtev (Uzunović-Kamberović, 2009). Od ostalih patogenov se razlikujejo predvsem glede na njihovo potrebo po kisiku, saj so mikroorganizmi, kateri za rast zahtevajo mikroaerofilne pogoje, in sicer od 2 do 10 % CO_2 in od 3 do 5 % O_2 (FDA, 2009). Optimalna temperatura rasti *C. jejuni* je 42 °C, saj preferenčno kolonizira intestinalni trakt perutnine, medtem ko se v okolju zunaj gostitelja običajno ne razmnožuje zaradi relativno visoke minimalne temperature rasti, ki znaša 30 °C (Snelling in sod., 2005). V laboratoriju jih gojimo na specifičnih mikrobioloških gojiščih, katerim pogosto dodajamo 5 % ovčje ali konjske krvi. Rastejo v območju pH med 4,9 in 9, minimalna a_w vrednost za rast pa znaša 0,987. Preživetje v živilih je boljše v hlajenih prostorih in hladilniku kot pri sobni temperaturi. Zamrzovanje ne zagotavlja inaktivacije organizma v živilu. Zaradi zahteve po mikroaerofilnih pogojih rasti dobro preživijo tudi v modificirani atmosferi in vakuumsko pakirani hrani, medtem ko je preživetje v aerobni atmosferi bistveno slabše (Balamurugan in sod., 2011).

Pridobitev popolnega nukleotidnega zaporedja genoma *C. jejuni* NCTC 11168 leta 2000 predstavlja pomemben korak v raziskavah bakterij rodu *Campylobacter* (Dasti in sod., 2010). Genom *C. jejuni* je relativno majhen, kar je najverjetneje vzrok za zahtevo po kompleksnem rastnem mediju. Energijo za rast predstavljajo aminokisline, medtem ko kampilobakter ogljikovih hidratov ne fermentira niti ne oksidira (Snelling in sod., 2005).

2.1.2 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz

Bakterije rodu *Campylobacter* so med vodilnimi bakterijskimi patogeni, ki se prenašajo s hrano in povzročajo gastroenteritise pri ljudeh. Med temi sta *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* odgovorna za več kot 90 % vseh okužb s kampilobaktri (Dasti in sod., 2010). *C. jejuni* je po podatkih organizacije FDA (angl. Food and Drug Administration) glavni povzročitelj bakterijske diareje v Združenih državah Amerike, saj je odgovoren za več obolenj, kot jih skupaj povzročijo bakterije rodu *Salmonella* in *Shigella* (FDA, 2009).

Kampilobakterioze so zoonoze, saj kot rezervoar služijo različne živali (npr. perutnina, govedo, psi, mačke, zajci, ptice, ovce), v katerih se predstavniki rodu *Campylobacter* nahajajo kot komenzali. Bakterije *C. jejuni* v velikem številu kolonizirajo sluznico prebavil piščancev, v jati piščancev pa se prenašajo po fekalno-oralni poti. Bakterije lahko okužijo vodni rezervoar, kjer v združbi s protozoji najverjetneje tvorijo biofilme. Človek se lahko s *C. jejuni* okuži direktno preko uživanja okužene vode ali okuženih živalskih produktov, kot je na primer nepasterizirano mleko ali meso, večinoma perutnina. V človeku bakterije *C. jejuni* napadejo intestinalne epitelijske celice, česar posledica je vnetje in driska (Young in sod., 2007). Možne poti okužbe s kampilobaktri prikazuje slika 1. Pri preprečevanju širjenja kampilobakterioz je zelo pomemben nadzor v perutninski industriji ter preprečevanje horizontalnega prenosa patogena iz okolja. Velik faktor tveganja pa predstavlja navzkrižna kontaminacija med pripravo hrane, tako v posameznih gospodinjstvih, kot tudi večjih industrijskih kuhinjah (Humphrey in sod., 2007).



Slika 1: Viri okužbe z bakterijami *Campylobacter jejuni* (Young in sod., 2007).

Klasični simptomi okužbe z bakterijami rodu *Campylobacter* vključujejo drisko, ki je pogosto krvava, abdominalne bolečine, krči, vročino, slabost in redkeje bruhanje (Humphrey in sod., 2007). Infekcije s kampilobaktri so lahko povezane tudi s postinfekcijskimi zapleti, kot so artritis, Reiter sindrom in Guillian-Barre sindrom (Snelling, 2005). Infekcijska doza za kampilobaktre je razmeroma nizka, nekaj 100 mikrobnih celic, medtem ko inkubacijska doba kampilobakterioze znaša od 1 do 10 dni, v

povprečju 4 dni (Humphrey in sod., 2007). Čeprav je večina infekcij z bakterijami *Campylobacter* blagih in izzvenijo same po sebi ter zdravljenje z antibiotiki ni potrebno, pa lahko v določenih primerih prihaja tudi do resnejših oblik bolezni, kar se dogaja predvsem pri mlajših ali ostarelih osebah ter osebah z oslabljenim imunskim sistemom. V slednjih okoliščinah je zdravljenje z antibiotiki nujno potrebno. Za klinično zdravljenje kampilobakterioze se najpogosteje uporablja eritromicin, ki je makrolidni antibiotik, medtem ko so pogosto uporabljeni tudi nekateri antibiotiki iz skupine fluorokinolonov, kot je na primer ciprofloksacin (Luangtongkum in sod., 2009).

Pojavnost kampilobakterioz v razvitem svetu se je v zadnjih desetletjih izredno povečala, kampilobaktri so se povzpeli v sam vrh povzročiteljev bolezni povezanih z živili, v zadnjih letih pa je prevalenca kampilobakterioz prehitela celo salmoneloze (EFSA, 2007). Dodatno zaskrbljenost predstavlja tudi naraščajoča protimikrobna odpornost pri *C. jejuni*, ki je najpogosteje izolirana vrsta kampilobaktra (Smole Možina in sod., 2011). *C. jejuni* kaže visoko odpornost proti antibiotikom, predvsem tistim iz skupine fluorokinolonov (FQ) in makrolidov (npr. eritromicin), ki so najpogosteje uporabljeni za zdravljenje kampilobakterioze, ko je le to potrebno (Luangtongkum in sod., 2009).

2.2 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM

Rezultat široke uporabe velikih količin antibiotikov za humano terapijo, kot tudi v veterini, se kaže v selekciji patogenih bakterij, ki so odporne proti številnim protimikrobnim snovem. Mikrobna odpornost proti antibiotikom se je začela širiti takoj po začetku uporabe antibiotikov za zdravljenje infekcijskih bolezni in že od takrat predstavlja glavno oviro uspešnega zdravljenja (Gousia in sod., 2011; Nikaido, 2009).

Odpornost bakterij proti protimikrobnim snovem je lahko posledica več različnih mehanizmov. Bakterije imajo lahko na tako imenovanih R-plazmidih številne gene, ki nosijo zapis za odpornost proti protimikrobnim snovem, po drugi strani pa se odpornost lahko pojavi kot posledica povečanega izražanja genov, ki kodirajo izlivne črpalke, zaradi česar prihaja do iznosa protimikrobne snovi iz bakterijske celice. Glavni mehanizmi biokemijske odpornosti so:

- spreminjanje ali zaščita tarčnih proteinov;
- encimska inaktivacija protimikrobne snovi;
- pridobitev genov za manj dovzetne tarčne proteine od drugih vrst;
- izogibanje tarči;
- preprečevanje dostopa protimikrobni snovi do tarče.

Aktiven iznos protimikrobnih snovi iz celice ima pomembno vlogo pri odpornosti bakterij proti določenim protimikrobnim snovem oz. antibiotikom, kot je na primer tetraciklin. Izlivne črpalke uvrščamo v več različnih družin. Ena od teh je družina prenašalcev tipa RND (angl. resistance nodulation division), ki igrajo glavno vlogo pri odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem po Gramu negativnih bakterij. Izlivni sistemi RND so

ubikvitarni transportni sistemi, ki delujejo sinergistično z zunanjo membrano, z namenom inhibicije akumulacije toksičnih molekul v bakterijskih celicah, kar seveda prispeva k intrinzični odpornosti bakterij proti protimikrobnim agensom. Črpalka tipa RND je navadno del tridelnega kompleksa, ki ga poganja protonska gonilna sila. Številni individualni izlivni sistemi, med njimi tudi sistemi tipa RND, so dokazali široko substratno specifičnost, med substrati so tako tudi kemijsko in strukturno različni antibiotiki, detergenti, barvila in protimikrobni peptidi. Pri nekaterih bakterijskih patogenih prekomerno izražanje že enega samega RND sistema lahko povzroči odpornost patogena proti številnim antibiotikom (Bina in sod., 2009; Blair in Piddock, 2009; Nikaido, 2009). Omenjene črpalke na protimikrobne agense delujejo sinergistično z ostalimi zunajmemembranskimi barierami. Po Gramu negativne bakterije vsebujejo nekatere kromosomske gene, ki kodirajo omenjene črpalke, vendar se njihovo izražanje lahko poveča preko regulatornega odziva ali mutacij, zaradi česar bakterije lahko postanejo bolj odporne proti vsem protimikrobnim agensom v samo enem koraku (Nikaido, 2009).

2.2.1 Mehanizmi odpornosti pri bakterijah *Campylobacter jejuni*

Bakterije rodu *Campylobacter* se prenašajo iz živali na ljudi, zato število odpornih bakterij proti antibiotikom narašča tudi zaradi uporabe le teh v prehrani živali. Povečano število odpornih sevov *C. jejuni* otežuje zdravljenje infekcij. Največji problem predstavlja prav odpornost proti antibiotikom iz skupin fluorokinolonov in makrolidov, ki se uporabljajo za zdravljenje resnejših oblik gastroenteritisov. Z visoko hitrostjo narašča tudi odpornost proti antibiotiku ciprofloksacinu (Quinn in sod., 2007).

Pri bakterijah rodu *Campylobacter* najdemo več mehanizmov, ki prispevajo k odpornosti proti antibiotikom (Quinn in sod., 2007; Akiba in sod., 2006).

Glavni mehanizem odpornosti proti antibiotikom iz skupin fluorokinolonov, makrolidov in tetraciklinov, bakterij rodu *Campylobacter*, so točkovne mutacije v določenih kromosomskih genih. Odpornost kampilobaktrov proti fluorokinolonom (FQ) je običajno posledica točkovnih mutacij na regijah za odpornost proti FQ (QRDR), ki se nahajajo znotraj kromosomskega gena za DNA girazo A. Za pridobitev odpornosti proti FQ pri bakterijah *Campylobacter* zadostuje že točkovna mutacija v enem samem genu *gyrA*. Najpogostejše opažena mutacija v izolatih, odpornih proti FQ, je C257T sprememba gena *gyrA*, kar vodi v substitucijo T861 (Luangtongkum in sod., 2009).

Odpornost proti makrolidnim antibiotikom se pri kampilobaktrih v prvi vrsti razvije zaradi spremembe tarče. Do sprememb prihaja v ribosomskih tarčah, in sicer kot posledica encimsko vodene metilacije (v primeru *C. rectus*), ali pa točkovne mutacije v domeni 23S rRNA in/ali ribosomskih proteinih L4 in L22 v primeru *C. jejuni* in *C. coli*. Te mutacije se pojavljajo na mestih 2074 in 2075 v vseh treh kopijah 23S rRNA, ki so prisotne pri kampilobaktrih (Luangtongkum in sod., 2009). Odpornost kampilobaktrov proti tetraciklinom je pogojena z genom *tet(O)*, ki kodira zaščitni protein. Le ta prepozna odprto mesto A bakterijskega ribosoma in se nanj veže, ter s tem inducira konformacijsko spremembo, ki se odraža v sproščanju prej vezanih tetraciklinskih molekul. Pridobitev gena *tet(O)* pri kampilobaktrih je najverjetneje posledica horizontalnega prenosa gena iz mikroorganizmov *Streptomyces*, *Streptococcus* ali *Enterococcus* spp. (Luangtongkum in

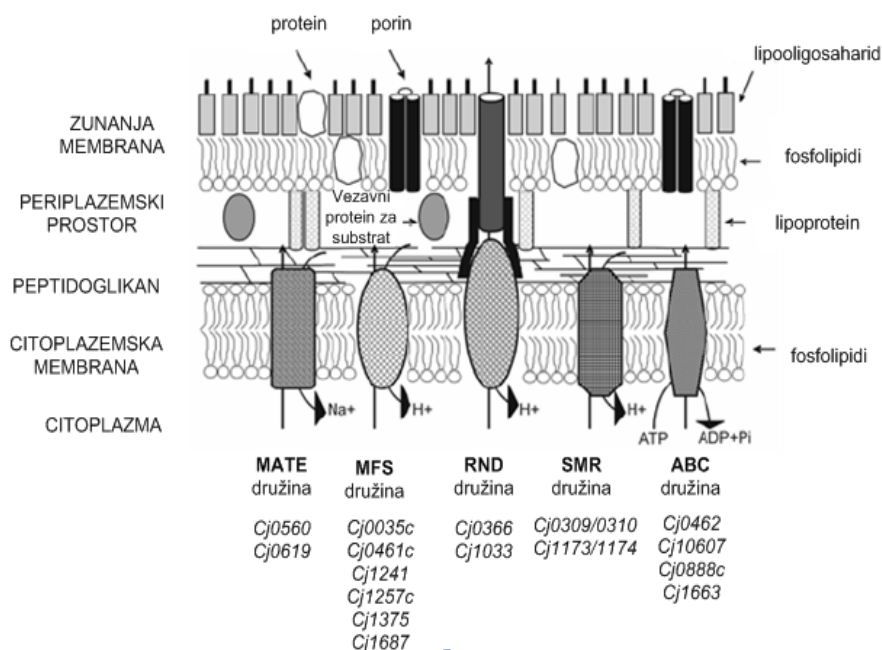
sod., 2009).

2.2.1.1 Membranske izlivne črpalke

Poleg omenjenih mehanizmov pa k odpornosti *C. jejuni* na makrolide, fluorokinolone in tetracikline prispeva tudi izlivna črpalka antibiotika CmeABC, ki je odgovorna za iznos antibiotika iz notranjosti celice (Luangtongkum in sod., 2009; Payot in sod., 2006).

V genomski sekvenci seva *C. jejuni* NCTC 11168 je bilo določenih 13 domnevnih izlivnih transporterjev antibiotikov v okviru ATP-vezavne kasete (angl. ATP- binding cassette), RDN, MATE, MF in SMR družin (Gu in sod., 2007). Izlivni črpalke Cme ABC in Cme DEF, ki pripadata družini RND, sta edini izlivni črpalke, ki sta bili do sedaj funkcijsko karakterizirani pri bakterijah rodu *Campylobacter* (Gu in sod., 2007). Izlivni mehanizem, kot mehanizem odpornosti proti številnim antibiotikom pri teh bakterijah, je bil prvič omenjen leta 1995. Črpalka CmeABC, ki je konstitutivno izražena v divjem tipu sevov *Campylobacter*, je odgovorna za iznos večjega števila antibiotikov, barvil, žolčnih soli in detergentov, ter ima glavno vlogo pri zagotavljanju intrinzične odpornosti proti antibiotikom (Akiba in sod., 2006; Lin in sod., 2002; Quinn in sod., 2007).

Mamelli in sodelavci so leta 2003 prvič pisali o domnevni vpletenosti aktivnega efluksa pri pridobljeni odpornosti proti makrolidnim antibiotikom pri sevih *Campylobacter*. Dokazali so, da so sevi kampilobaktra ob dodatku inhibitorja PAβN ponovno postali občutljivi na antibiotika klaritromicin in eritromicin, proti katerima so bili pred tem odporni. Kmalu je bila dokazana tudi pomembna vloga sistema CmeABC pri odpornosti proti makrolidom. Številne študije so potrdile, da inaktivacija gena *cmeB* in dodatek inhibitorja PAβN vzpostavita ponovno občutljivost sevov, predhodno odpornih proti eritromicinu, ki niso imeli mutacij v kopijah genov za 23s rRNA, kot tudi v tistih s tranzicijsko mutacijo A2075G. Kljub omejeni kompetitivni inhibiciji PAβN pri izolatih z visoko stopnjo odpornosti, naj bi CmeABC črpalka delovala neodvisno ali pa sinergistično z mutacijami v 23S rRNA v primeru izolatov z visoko stopnjo odpornosti proti ciprofloksacinu in eritromicinu. Kot substrat pa lahko omenjena črpalka uporabi tudi tilozin ter azitromicin in ketolid telitromicin. Vendar zaradi učinkovitosti PAβN inhibitorja pri sevih z mutacijo v genu *cmeB*, kjer se je povečala občutljivost proti eritromicinu, klaritromicinu ter telitromicinu, ne smemo izključiti možnosti, da je v sevih *Campylobacter* prisoten še kak drug izlivni mehanizem, občutljiv na delovanje inhibitorja PAβN (Quinn in sod., 2007).



Slika 2: Struktura in sestava membrane pri bakterijah *Campylobacter* spp., vključno z lipooligosaharidi, porini in 5 družinami izlivnih transporterjev (Garénaux, 2008).

***Legenda: Pod vsako družino transporterjev so navedeni homologi, najdeni v genomu referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168.

2.2.1.1.1 Izlivna črpalka CmeABC

Izlivno črpalko CmeABC sestavljajo zunajmembranski protein CmeC, transporter v notranji membrani CmeB, ter periplazemski fuzijski protein CmeA. Omenjene tri proteine kodira operon, sestavljen iz treh genov: *cmeA*, *cmeB* in *cmeC*. Proteini delujejo skupaj in tvorijo membranski kanalček, ki omogoča izločanje toksičnih substratov iz celice *C. jejuni* (Lin in sod., 2002, 2005; Gu in sod., 2007). Substrati omenjene črpalke so med drugim pogosto uporabljeni antibiotiki, kot so fluorokinoloni, makrolidi, ampicilin, tetraciklin, kloramfenikol, rifampin, kovinski ioni (Co^{2+} in Cu^{2+}) ter lipofilne sestavine SDS in številne žolčne soli. CmeABC bistveno prispeva k intrinzični in pridobljeni odpornosti bakterij *Campylobacter* proti strukturno različnim protimikrobnim snovem. Omenjeni izlivni sistem je bistvenega pomena tudi za kolonizacijo kampilobaktra v intestinalnem traktu živali, kjer zagotavlja odpornost proti žolčnim kislinam, ki so normalno prisotne in imajo protimikrobni učinek (Gu in sod., 2007).

2.2.1.1.2 Izlivna črpalka CmeDEF

CmeDEF je operon, ki kodira 3 proteine: CmeD je zunajmembranski protein kanalčka, CmeE je periplazemski fuzijski protein, CmeF pa je transporter v notranji membrani. Dokazano je bilo, da je CmeDEF črpalka vpletena v intrinzično odpornost bakterij rodu *Campylobacter* proti protimikrobnim snovem. Nivo odpornosti zaradi delovanja CmeDEF je relativno uravnavan in zasenčen s funkcijo oz. delovanjem CmeABC referenčnega seva *C. jejuni*. Konstitutivno izražena črpalka CmeABC je tako dominantna, medtem ko

CmeDEF deluje kot sekundarni izlivni mehanizem, ki pa je lahko primarno izražen v določenih pogojih oz. okolishinah. Vendar kljub razlikam v izražanju teh črpalk, naj bi le ti delovali vzajemno, saj inaktivacija CmeDEF poveča nivo transkripcije CmeABC. V primeru, da pri sevih z mutacijo v genu *cmeF* opazimo povečano odpornost oz. manjšo občutljivost v primerjavi z divjim tipom, je to najverjetneje posledica povečanega efluksa zaradi delovanja CmeB (Akiba in sod., 2006).

Prekomerno izražanje izlivnih črpalk zaradi mutacij v regulatornih genih je običajno povezana s pridobljeno odpornostjo proti številnim antibiotikom. Številne študije na bakterijah *Campylobacter*, so povezale mutacijo v genu *cmeB* z mnogokratno odpornostjo proti antibiotikom. Pumbwe (2006) je poročala, da je pojavnost mnogokratne odpornosti v večji meri povezana s prekomerno ekspresijo gena *cmeB*, kot s prekomerno ekspresijo *cmeF*. Vsi izolati s prekomerno izraženim genom *cmeB* so akumulirali manj ciprofloksacina kakor divji sev in so vsebovali mutacije v *cmeR*, ki kodira transkripcijski represor. Direktni dokaz za vpletenost črpalke CmeABC v mnogokratno odpornost proti antibiotikom so dosegli z inaktivacijo gena *cmeB* v številnih MAR (angl. multiple antibiotic resistance) izolatih, kjer so opazili 4- do 256- kratno znižanje vrednosti MIK ciprofloksacina, eritromicina in tetraciklina. Lin in sodelavci (2005) pa so opazili kar 8- kratno znižanje vrednosti MIC tetraciklina pri izolatih z mutacijo v *cmeB* in vstavljenim *tetO* genom, kar bi lahko pomenilo, da CmeABC deluje sinergistično s *tetO* pri pridobljeni odpornosti proti tetraciklinu (Quinn in sod., 2007).

2.2.1.1.3 Izlivni sistem CmeGH

Genomska sekvenca *C. jejuni* NCTC 11168 je razkrila, da *C. jejuni* vsebuje kar 14 domnevnih izlivnih transporterjev iz različnih družin, vendar večina le teh še ni bila karakterizirana. Najnovejša študija Jeon in sod. (2011) dokazuje funkcijo transporterja Cj1375 (CmeG), ki je homologen proteinu NorA pri *Staphylococcus aureus* in ga uvrščamo v družino MFS (angl. Major Facilitator Superfamily). Dokazali so, da je Cj1375 membranski izlivni transporter, ki pri *C. jejuni* prispeva k odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem, delno tudi proti delovanju antibiotikov iz skupine fluorokinolonov, poleg tega pa ima tudi pomembno vlogo pri odpornosti na oksidativni stres. Gena *cmeG* in *cmeH* sta prisotna v genomu *C. jejuni* NCTC 11168, kjer se prepisujeta skupaj in si delita isti promotor, ter najverjetneje tvorita operon. CmeG je na podlagi aminokislinskega zaporedja homologen Bmr pri *Bacillus subtilis* in NorA pri *Staphylococcus aureus*. Tako Bmr kot tudi NorA pa sta poznana izlivna transporterja vpletena v mnogokratno odpornost proti različnim antibiotikom. Mutacija v genu *cmeG* je povzročila večjo občutljivost seva na delovanje ciprofloksacina, eritromicina, tetraciklina, gentamicina, rifampicina, EtBr in holne kisline, v primerjavi z referenčnim sevom *C. jejuni* NCTC 11168. Mutacija v *cmeH* ni imela vpliva na odpornost seva *C. jejuni* proti testiranim protimikrobnim snovem, zaradi česar naj *cmeH* sam nebi imel pomembne vloge pri odpornosti proti protimikrobnim snovem. Prekomerno izražanje operona *cmeGH* v divjem sevu *C. jejuni* NCTC 11168 je povzročilo specifično spremembo v smislu povečanja odpornosti proti antibiotikom iz skupine fluorokinolonov, ne pa tudi proti drugim skupinam antibiotikov (Jeon in sod. 2011).

2.2.1.2 Regulatorni protein CmeR

Regulatorni sistemi so izrednega pomena v smislu uravnavanja izražanja genov izlivnih črpalk v bakterijah. Izražanje izlivnih črpalk je običajno kontrolirano s transkripcijskimi regulatorji, ki preprečijo ali aktivirajo transkripcijo genov izlivnih črpalk. Številni so lokalni represorji, ki delujejo direktno na promotorsko regijo MDR genov ali operonov. Mutacije v sekvenci represorja ali v vezavnem mestu represorja preprečijo represijo, kar se kaže v prekomernem izražanju črpalke, to pa posledično vodi v odpornost bakterije proti strukturno različnim protimikrobnim agensom. CmeR je transkripcijski regulator in pri *C. jejuni* deluje kot moderator, ki omogoča uravnoteženo produkcijo CmeABC membranskega kanalčka v skladu s fiziološkimi potrebami (Lin in sod., 2005). Gen *cmeR* se nahaja takoj »upstream« za operonom *cmeABC* in kodira protein iz 210 aminokislin, katerega N-terminalna domena je strukturno podobna tistim iz družine TetR transkripcijskih represorjev. Gen *cmeR* se prepisuje v isti smeri kot operon *cmeABC*. Intergenska regija med genom *cmeR* in operonom *cmeABC* sestoji iz 16 baznih parov dolgega operatorskega zaporedja operona *cmeABC*. Kot transkripcijski regulator se CmeR veže direktno na operator v intergenski regiji in prepreči transkripcijo operona *cmeABC*. Delecija v genu *cmeR* ali mutacija v zaporedju operatorja prepreči represijo, ki se odraža v prekomernem izražanju operona *cmeABC*, kar pa posledično vodi v povečano odpornost proti številnim antibiotikom (Gu in sod., 2007). CmeR deluje kot dimer: ima N-terminalno domeno za vezavo na DNA ter C-terminalno domeno, ki je pomembna za tvorbo dimera. Slednja je vpletena tudi v vezavo z inducibilno snovjo (substratom). Variacija v C-terminalni sekvenci se odraža v zmožnosti interakcije z različnimi substrati (Lin in sod., 2005).

2.2.1.3 Inhibitorji izlivnih črpalk

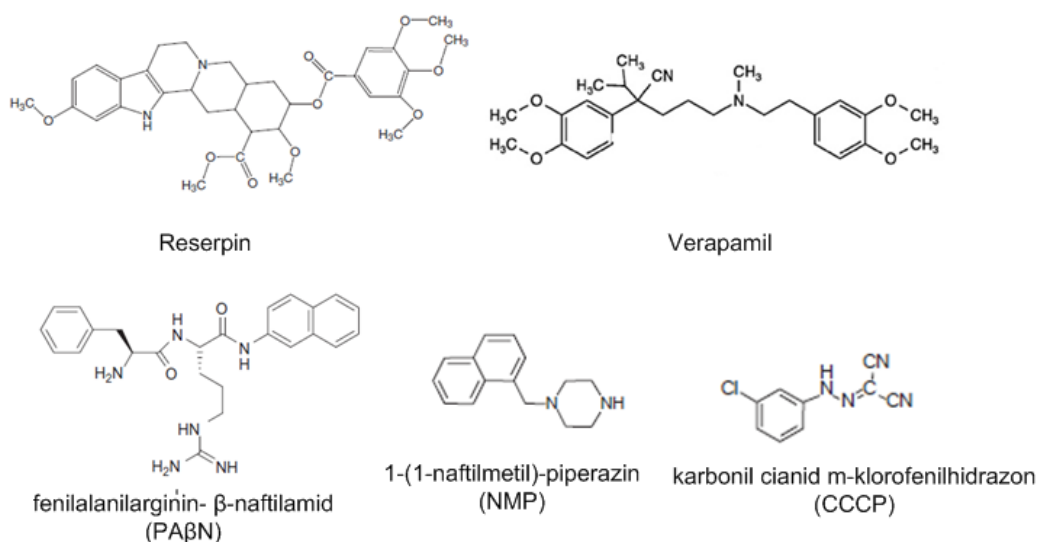
Izlivne črpalke bakterij so odgovorne za intrinzično odpornost proti širokemu spektru antibiotikov in imajo pogosto tudi širok spekter substratov. Prekomerno izražanje genov, ki kodirajo izlivno črpalko, se kaže v odpornosti bakterij proti antibiotikom, kot so fluorokinoloni, nekaterim barvilom (etidijev bromid), detergentom in dezinfekcijskim sredstvom (Garvey in Piddock, 2008). Zaradi vse večjega zavedanja o pomenu in vpletenosti izlivnih črpalk, kot mehanizmov odpornosti proti antibiotikom pri kliničnih izolatih ter počasnega razvoja novih antibiotikov, se izlivne črpalke raziskuje kot morebitne farmakološke tarče v boju proti odpornosti bakterij proti antibiotikom. V tem času so bistvenega pomena študije inhibitorjev izlivnih črpalk (EPIs) (Nikaido, 2009; Bina in sod., 2009; Pagès in Amaral, 2009).

Inhibitorji delujejo v smislu povečanja citoplazemske koncentracije toksičnih snovi, kot so antibiotiki, z blokiranjem izlivnih črpalk oz. sistemov, ki so odgovorni za iznos antibiotikov iz bakterijskih celic. Celokupni rezultat preprečenega efluksa protimikrobne snovi iz celice je znižanje vrednosti MIK. Inhibitorji črpalk naj bi v teoriji bili potencialno uporabni samostojno ali v kombinaciji z antibiotiki v smislu ponovne vzpostavitve občutljivosti seva na protimikrobne produkte (Bina in sod., 2009).

Pagès in Amaral (2009) pa v svoji objavi navajata tudi 6 možnih načinov inhibicije izlivnih črpalk pri po Gramu negativnih bakterijah, in sicer:

- z delovanjem na regulatorne stopnje, ki so odgovorne za izražanje črpalke;
- s preprečevanjem sestavljanja komponent črpalke v funkcionalno enoto;
- z blokiranjem membranskega kanalčka s t.i. »stikalom«;
- s porušenjem energije efluksa, in sicer direktno preko antiporterskega efluksa ali indirektno preko porušenja energijskega mehanizma bakterijskih transporterjev;
- z ustvarjanjem kompetitivne ali ne-kompetitivne inhibicije z ne-antibiotičnimi molekulami, ki imajo afiniteto do izlivnih črpalk;
- s spreminjanjem kemijske sestave antibiotikov z namenom zmanjšanja njihove afinitete za prepoznavanje efluksa in vezavnih mest ali pa z blokiranjem efluksnega transporta.

Identificiranih je bilo že ogromno snovi, ki naj bi bile potencialno zmožne povrniti prvotno funkcijo antibiotikom (Quinn in sod., 2007; Bina in sod., 2009), vendar zaradi njihove toksičnosti ali slabe biološke stabilnosti v praksi še niso uporabne (Pagès in Amaral, 2009). Med temi je tudi nekaj takih, ki so substrati črpalk tipa RND (Bina in sod., 2009). Gre za naravne ali kemijsko sintetizirane spojine, ki so uporabljene kot pomožne komponente ali dodatki v kombinaciji z antibiotiki, ki so prvotno neaktivni proti MDR bakteriji, da ponovno vzpostavijo določen nivo aktivnosti antibiotika in včasih celo eliminirajo odporne bakterije (Pagès in Amaral, 2009). Mahamoud in sod. (2007) so v svoji študiji poznane inhibitorje izlivnih črpalk po Gramu negativnih bakterij razdelili v 3 skupine, glede na način njihovega delovanja: skupino peptidomimetikov, skupino arilpiperazinov in arilpiperidinov ter skupino derivatov fluorokinolonov. Skupina peptidomimetikov, v katero spada tudi inhibitor PAβN (fenilalanilarginin- β-naftilamid) in njegovi derivati, so najbolj raziskana skupina anti-efluksnih komponent, ki so trenutno v razvoju. Predstavniki peptidomimetikov so pogosto uporabljeni za eksperimentalno vrednotenje delovanja mehanizmov izlivnih črpalk, vendar zaradi njihove toksičnosti niso v klinični uporabi (Mahamoud in sod., 2007). Predstavniki skupine arilpiperazinov, kot je tudi 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP), povzročijo zmanjšanje intrinzične odpornosti izlivnih črpalk tipa RND. NMP je med najučinkovitejšimi arilpiperazini z zmožnostjo povečanja intracelularnih koncentracij substratov, kot so fluorokinoloni, kloramfenikol, fluorescentna barvila in linezolid. NMP deluje kot antagonist serotonina, zaradi česar je najverjetneje preveč toksičen za uporabo pri človeku in živalih. Inhibitorji iz skupine fluorokinolonov pa so znani po izredni strukturni podobnosti s kinoloni, glavnimi substrati izlivnih črpalk (Pagès in Amaral, 2009). Inibitor CCCP (karbonil cianid m-klorofenilhidrazon) lahko deluje na energijski nivo bakterijske membrane, *in vitro* pa se uporablja za popolno prekinitev iznosa številnih zdravil iz bakterijskih celic. Deluje na zmanjšanje živosti bakterij in povzroča smrt bakterijskih celic s trošenjem membranske protonske gonilne sile (Mahamoud in sod., 2007).



Slika 3: Strukturne formule inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk, uporabljenih v diplomskem delu (Pagès in sod., 2005; Sun in sod., 2009; Drugs.com, 2006).

2.3 PROTIMIKROBNE SNOVI

Zaradi prisotnosti mikrobnih povzročiteljev kvarjenja in bolezni se v živilih in živilski proizvodno-oskrbovalni verigi uporabljajo številne protimikrobne snovi, neposredno v/n živilih kot konzervansi, posredno pa za vzdrževanje higiene kot čistila, razkužila, za zaščito rastlin in živali kot protimikrobna zdravila oz. zaščitna sredstva itd. (Smole Možina in sod., 2009). V današnjem času je odpornost proti protimikrobnim agensom znana kot glavni globalni problem v zdravstvu, prav tako pa se tudi javnost vse bolj zaveda problematike prekomerne in nepotrebne uporabe tradicionalnih antibiotikov (Cowan, 1999). Vrednotenje biološke aktivnosti je bistvenega pomena tako za oceno občutljivosti bakterij, kot tudi za iskanje novih protimikrobnih snovi (Klančnik in sod., 2010). Protimikrobno aktivnost ponavadi izrazimo z vrednostima MIK ali MBK (minimalno inhibitorno in minimalno bakteriocidno koncentracijo testne snovi), pri čemer uporabimo različne metode. Mnoge protimikrobne snovi delujejo kompleksno na več tarčnih mest oz. organel celice in za nekatere konzervanse, ki se v živilstvu uporabljajo že mnogo let, mehanizmi delovanja niso niti povsem pojasnjeni (Smole Možina in sod., 2009).

Po Gramu negativne bakterije so običajno manj občutljive na delovanje protimikrobnih snovi zaradi njihove zunanje membrane iz lipopolisaharidov, ki zmanjša difuzijo hidrofnih spojin. Vendar to ne pomeni, da so zato po Gramu pozitivne bakterije na protimikrobne snovi vedno občutljive. Po Gramu negativne bakterije so pogosto bolj odporne proti protimikrobnim snovem rastlinskega izvora v primerjavi s po Gramu pozitivnimi bakterijami. Dokazano pa je bilo tudi, da je *C. jejuni* v splošnem bolj občutljiv na delovanje naravnih protimikrobnih snovi v primerjavi z ostalimi patogenimi mikroorganizmi (Tajkarimi in sod., 2010).

Kombinacije protimikrobnih sredstev, bodisi antibiotikov, razkužil ali pa konzervansov, so

zelo iskane. Na kliničnem področju se kombinacije antibiotikov uporabljajo pri poizkusih z namenom izogibanja odpornosti bakterij. Z iskanjem kombinacij različnih protimikrobnih sredstev, ki bi medsebojno delovala sinergistično, bi tako lahko prišli do boljših rezultatov na tem področju (Lambert in sod., 2003). Ko je učinek kombinacije različnih substanc večji kot vsota individualnih učinkov, govorimo o sinergističnem delovanju spojin. Nasprotni učinek je antagonizem, ko kombinacija učinkovin pokaže nižji učinek v primerjavi z posameznimi učinki testiranih učinkovin (Tajkarimi in sod., 2010).

2.3.1 Protimikrobne snovi rastlinskega izvora

Rastline imajo neverjetno sposobnost sinteze aromatičnih spojin, med katerimi prevladujejo fenoli in njihovi derivati. Številne so sekundarni metaboliti. V številnih primerih te substance služijo kot obrambni mehanizmi rastlin pred napadom mikroorganizmov, insektov, herbivorov (Cowan, 1999). Izredna kemijska raznolikost rastlin tako predstavlja zelo obetaven vir novih protimikrobnih učinkovin s terapevtskim potencialom, kar pa je še vedno relativno slabo raziskano področje (Cowan, 1999; McRae in sod., 2007). Obstaja namreč verjetnost, da protimikrobne sestavine rastlin lahko delujejo na bakterije s popolnoma drugačnim mehanizmom kakor znani antibiotiki in imajo zato lahko veliko medicinsko vrednost pri zdravljenju infekcij, ki jih povzročajo odporni sevi patogenih mikroorganizmov. Rastline torej služijo kot vir novih farmacevtskih učinkovin in kot poceni surovina za sintezo nekaterih novih zdravil (Cowan, 1999).

2.3.1.1 Pomen v živilstvu

Z namenom doseganja varnosti hrane v današnjem času potrošniki zahtevajo prehranske produkte z aditivi in konzervansi naravnega izvora, ki zagotavljajo večjo varnost kot tudi obstojnost teh izdelkov. Protimikrobne snovi se hrani dodajajo z namenom kontrole nad procesom kvajenja živil, kot tudi preprečevanja in kontrole rasti mikroorganizmov, tudi patogenih. Snovi s protimikrobno aktivnostjo so kemijske spojine, ki so prisotne v živilu ali so bile vanj dodane in ki znižajo ali ustavijo rast prisotnih mikroorganizmov (Klančnik in sod., 2010). Veliko pozornost je smiselno nameniti prav ekstraktom zelišč in začimb, ki so tradicionalno uporabne za izboljšanje senzoričnih lastnosti, vonja in barve kot tudi podaljšanja same obstojnosti živil (Piskernik in sod., 2010).

Snovi rastlinskega izvora lahko delujejo na mikrobne celice s številnimi mehanizmi: lahko delujejo na fosfolipidni dvosloj celične membrane, motijo delovanje encimskih sistemov, ogrožajo genetski material bakterij ali tvorijo hidroperoksidazo maščobnih kislin zaradi oksigenacije nenasičenih maščobnih kislin. Pa vendar metode in mehanizmi načina delovanja, kot tudi toksični in senzorični učinki naravnih protimikrobnih snovi, še niso popolnoma razjasnjeni (Tajkarimi in sod., 2010).

Protimikrobna učinkovitost ter spekter protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov sta odvisna od vrste in strukture prisotnih spojin in njihovih deležev ter morebitnega sinergističnega delovanja, če je prisotnih več aktivnih sestavin. Na to sestavo in s tem učinkovitost vplivajo številni dejavniki, od bioloških, kot so zrelost, sorta, rastni pogoji in geografsko poreklo rastlin, kot vsi nadaljnji postopki priprave vzorcev, od ekstrakcijskih metod, vrste topil, načina koncentriranja in doseženih koncentracij do končnega načina

uporabe. Na dobljene rezultate pa lahko močno vpliva tudi izbira mikrobiološke metode testiranja protimikrobne učinkovitosti (Klančnik in sod., 2009b).

Za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov in drugih naravnih spojin so na voljo številne metode, katere pa temeljijo na različnih principih, zaradi česar so dobljeni rezultati pogojeni z uporabljenimi metodami, kot tudi z izbranim mikroorganizmom, z ekstrakcijsko metodo za pridobivanje ekstrakta ter stopnjo topnosti vsake testirane učinkovine (Klančnik in sod., 2010). Številne študije so že pokazale, da interakcija med sestavinami živila in alternativnimi protimikrobnimi spojinami lahko povzroči znižanje protimikrobne aktivnosti v primerjavi z *in vitro* študijami protimikrobne aktivnosti (Tajkarimi in sod., 2010).

Kljub obstoju velikega števila fenolnih spojin, prisotnih v naravi in potencialno uporabnih kot protimikrobne snovi, je do sedaj relativno malo takih, ki bi bile primerne za praktično uporabo v živilskih produktih. Iz tega razloga je v tem času potreba po preverjanju njihove učinkovitosti in funkcionalnosti na modelnih sistemih živil, kot tudi v realnih pogojih znotraj živil (Klančnik in sod., 2011).

2.3.1.2 Ekstrakt semen *Alpinia katsumadai*

Alpinia katsumadai (Zingiberaceae) izvira iz otoka Hainan na vzhodu Kitajske (Ngo in Brown, 1998). Rod *Alpinia* sestavlja kar 250 različnih rastlinskih vrst, katerih predstavnike lahko najdemo predvsem na področju Kitajske, Indije in Polinezije. Rastline iz rodu *Alpinia* imajo debelo koreniko prijetnega vonja, ki je zelo podoben vonju ingverja. Številne vrste *Alpinia* so zelo cenjene zaradi njihovih zdravilnih lastnosti, saj imajo namreč zgodovinski pomen v tradicionalni kitajski medicini, kjer se že od nekdaj uporabljajo za zdravljenje različnih stanj, kot so bruhanje in želodčne težave (Nan in sod., 2004; Ngo in Brown, 1998; Lee in sod., 2003). Pa vendar je zelo malo znanega o celičnem delovanju, preko katerega rastlina uravnava terapevtski učinek (Lee in sod., 2003).

Lee in sod. (2003) so v svoji študiji dokazali antioksidativno aktivnost ekstrakta semena *A. katsumadai*. V predhodnih študijah je že bilo ugotovljeno, da rastlina vsebuje številne diarilheptanoide, kalkone in flavonoide, monoterpene, seskviterpenoide, stilbene in labdane. Yang in sod (1999) so prav tako izolirali dva nova diarilheptanoida iz semena *A. katsumadai*, njuna struktura pa je bila dokazana tudi s spektroskopskimi analizami. Čeprav je znano, da imajo omenjene sestavine antioksidativno aktivnost, pa je bilo narejenih le malo raziskav, ki bi pokazale antioksidativno ali biološko aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* *in vivo* (Lee in sod., 2003).

Bistro in rumeno eterično olje *A. katsumadai*, pripravljeno s parno destilacijo cvetov in listov rastline, vsebuje 49 različnih sestavin. Kot glavne sestavine eteričnega olja iz listov so bile z GC-MS (plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo) identificirane p-ment-1-en-ol, terpinen, 4-karen, 1,8-cineol in kamfor. Štiri sestavine eteričnega olja *A. katsumadai*, β -pinen, 1,8-cineol, p-ment-1-en-ol in ocimen, so v drugih študijah pokazale tudi močno protimikrobno aktivnost. Za sestavino 1,8-cineol pa je bil med drugim dokazan tudi kardiovaskularni efekt. Razlike v učinkih eteričnega olja pri različnih vrstah *Alpinia* so posledica razlik v sestavi olja oz. vsebnosti različnih snovi (Nan in sod., 2004).

V tradicionalni kitajski medicini je v široki uporabi tudi etanolni ekstrakt semen *A. katsumadai*, ki naj bi dokazano vseboval različne molekule, kot so diarilheptanoidi, kalkoni ter flavonoidi, monoterpeni, seskviterpenoidi, stilbeni in labdani (Nan in sod., 2004).



Slika 4: Semena rastline *Alpinia katsumadai*, uporabljena za pripravo ekstrakta (Kovač in Bučar, 2011).

2.3.1.3 Ekstrakt listov vinske trte (ELVT)

Listi vinske trte (*Vitis vinifera* L.) predstavljajo potencialen poceni in dostopen naravni vir za proizvodnjo s polifenoli bogatih ekstraktov z visoko protimikrobno in antioksidativno aktivnostjo. Ekstrakt, ki smo ga uporabili v eksperimentalnem delu te diplomske naloge, je bil pripravljen v okviru študije Katalinič in sod. (2010), v kateri so želeli oceniti potencial listov vinske trte kot naravnega vira biološko aktivnih polifenolnih ekstraktov, z namenom nadaljnje uporabe v živilski industriji za izboljšanje kvalitete in varnosti, kot tudi podaljšanja roka uporabe živilskih produktov. Ekstrakt je bil pripravljen iz listov vinske trte (*V. vinifera* L.), obranih v mesecu maju v eksperimentalnem vinogradu v Dalmaciji na Hrvaškem. Rezultati študije so dokazali visoko vsebnost flavan-3-olov in flavonolov, predvsem kvercetina in njegovih derivatov, kot tudi prisotnost resveratrola, zaradi česar so listi vinske trte obetajoč vir biološko aktivnih polifenolov. S tem je bil dokazan pomemben antioksidativni in protimikrobni učinek ekstraktov listov vinske trte proti bakterijam rodu *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Escherichia* in *Salmonella* (Katalinič in sod., 2010).

2.3.1.4 Ekstrakti rožmarina

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je mediteranska zimzelena rastlina, ki jo uvrščamo v družino ustnatic (*Lamiaceae*) (Lo in sod., 2002). Zaradi njegovega značilnega prijetnega vonja se kot začimba pogosto uporablja v prehrani, vse večji pomen pa mu daje tudi dokazano protimikrobno delovanje ter antioksidativni učinek (Lo in sod., 2002). Rožmarin je bogat vir fenolnih spojin z veliko protimikrobno aktivnostjo proti po Gramu pozitivnim ter po Gramu negativnim bakterijam (Rožman in Jeršek, 2009). Učinek rožmarina pripisujejo predvsem karnozolni kislini, karnozolu in rožmarinski kislini, ki jih vsebuje (Erkan in sod., 2008). Na tržišču so na voljo številni komercialni ekstrakti rožmarina, ki pa se med seboj razlikujejo predvsem glede na vsebnost karnozolne ali rožmarinke kisline, kot glavne aktivne sestavine (Vitiva, 2008).

2.3.2 Čiste fenolne spojine

Fenolne spojine so raznolika skupina sekundarnih metabolitov rastlin (Cueva in sod., 2010), ki so derivati metabolnih poti pentoze fosfata, šikiminske kisline in fenilpropanoida (Balasundram in sod., 2006). Predstavljajo eno najboljsežnejših skupin fitokemičnih snovi, ki imajo izredno velik fiziološki in morfološki pomen v rastlinah. Igrajo pomembno vlogo v rasti in razmnoževanju, zagotavljajo zaščito rastlin pred patogeni in predatorji ter prispevajo k barvi in senzoričnim lastnostim sadja in zelenjave. So esencialni del dietne prehrane človeka, zanimive pa so predvsem zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti (Balasundram in sod., 2006). Fenolne spojine imajo širok spekter fizioloških lastnosti, poleg antioksidativnega tudi protialergensko delovanje, protivnetno in protimikrobno delovanje, pa tudi protitumorsko. Povezujejo jih z zdravilnimi učinki ob uživanju večjih količin sadja in zelenjave in ti pozitivni učinki so najverjetneje posledica antioksidativnega delovanja (Balasundram in sod., 2006; King in Dykes, 2008).

Te sestavine v svoji strukturi vsebujejo aromatične obročje, na katere je vezanih ena ali več hidroksilnih skupin. Med strukturami teh sestavin so tako enostavne fenolne molekule, kot tudi kompleksni visoko molekularni polimeri. Kljub strukturni diverziteti skupino pogosto imenujejo tudi polifenoli. Fenolne spojine, ki se najpogosteje pojavljajo v naravi, so prisotne kot konjugati mono- ali poli-saharidov, vezanih na eno ali več fenolnih skupin, lahko pa se pojavljajo tudi kot funkcionalni derivati, kot so estri ali metilni estri. V osnovi jih lahko razdelimo v več razredov, med temi so kot sestavine v prehrani najpomembnejši flavonoidi, fenolne kisline in tanini (Balasundram in sod., 2006).

Učinkovitost fenolnih spojin kot anti-radikalov in antioksidantov je raznolika in odvisna od številnih faktorjev, predvsem od števila in pozicije hidroksilne skupine in od narave substitucij na aromatskih obročih (Sroka in Cisowski, 2003; Balasundram in sod., 2006). Rezultati predhodnih študij protimikrobne aktivnosti fenolnih spojin si pogosto nasprotujejo, glavni razlog različnih informacij pa je najverjetneje uporaba različnih eksperimentalnih metod ter domnevna slaba topnost nekaterih fenolnih spojin (Wen in sod., 2003).

2.3.2.1 Fenolne kisline

Različne fenolne kisline se med seboj razlikujejo zaradi razlik v številu in poziciji hidroksilne skupine na osnovnem aromatskem obroču. Opisujejo jih kot močne antioksidante proti prostim radikalom ter drugim reaktivnim kisikovim zvrstem (ROS) (Kim in sod., 2006), mnoge so pokazale tudi protimikrobno aktivnost proti številnim mikroorganizmom (Čitová in sod., 2006; Wen in sod., 2003; King in Dykes, 2008; Friedman in sod., 2003).

Fenolne kisline razdelimo v 2 podskupini. Ločimo hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline. Med hidroksibenzojske uvrščamo galno kislino, p-hidroksibenzojsko, protokatehuično, vanilinsko in siringično kislino, ki imajo v splošnem C6-C1 strukturo. Hidroksicimetne kisline so aromatske spojine s stransko verigo iz treh ogljikov C6-C3, med katere uvrščamo kavno, ferulno, p-kumarinsko in sinapinsko kislino (Balasundram in sod., 2006; Tarnawski in sod., 2006).

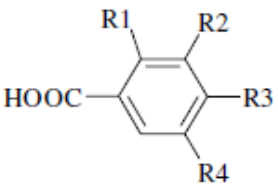
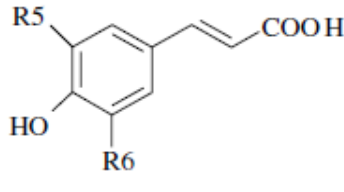
Friedman in sod. (2003) so v svoji študiji dokazali protimikrobno aktivnost številnih fenolnih benzaldehidov in benzojskih kislin, kot tudi vpliv strukturnih lastnosti omenjenih spojin na njihovo protimikrobno delovanje proti bakterijam *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella enterica*.

V primeru fenolnih kislin je antioksidativna in s tem tudi protimikrobna aktivnost odvisna od števila in pozicije hidroksilnih skupin, vezanih na karboksilno funkcionalno skupino. Antioksidativna aktivnost fenolnih kislin se namreč veča s povečano stopnjo hidroksilacije, kar dokazuje tudi galna kislina s 3 –OH skupinami in visoko antioksidativno aktivnostjo. Monohidroksilne benzojske kisline, ki imajo eno hidroksilno skupino na orto- ali para-poziciji glede na –COOH skupino, nimajo antioksidativnega učinka, čeprav to ne velja za m-hidroksibenzojsko kislino. Aktivnost pa znižuje substitucija –OH skupine z metoksilno skupino na poziciji 3 in 5 (Balasundram in sod., 2006).

Hidroksicimetne kisline kažejo večjo antioksidativno in protimikrobno aktivnost v primerjavi s prej opisanimi hidroksibenzojskimi kislinami. Večja aktivnost hidroksicimetnih kislin je namreč posledica skupine CH=CH-COOH, ki jo vsebujejo in ki omogoča večjo sposobnost za oddajanje vodika ter večjo stabilnost radikala kot sama –COOH skupina pri hidroksibenzojskih kislinah. Hidroksicimetne kisline zaradi daljše nepolarne verige lažje prodrejo v celice (Balasundram in sod., 2006; Kim in sod., 2006).

Nekatere fenolne kisline, kot so klorogenska, karnozolna in rožmarinska kislina, pa zaradi njihove drugačne strukture ne moremo razvrstiti med hidroksicimetne ali hidroksibenzojske kisline. Klorogenska kislina je ester kavne kisline in kina kisline (Sato in sod., 2011) in je že dolgo poznana kot antioksidant (Zhao in sod., 2010). Hidroksilne skupine vezane na aromatski ostanek, so odgovorne za karcinogeno, antimutageno ter antioksidativno *in vitro* aktivnost klorogenske kisline, ki je pomembna za odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti (Sato in sod., 2011). Rezultati študije Zhao in sodelavcev (2010) so pokazali dobro protimikrobno aktivnost klorogenske kisline proti *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ter *Bacillus subtilis*. Karnozolna in rožmarinska kislina sta dve glavni sestavini ekstraktov rastlin *Rosmarinus officinalis* L. in *Salvia officinalis*, ki sta odgovorni za antioksidativno aktivnost ekstraktov (Lo in sod., 2002; Başkan in sod., 2007).

Preglednica 1: Razlike v strukturi hidroksibenzojskih in hidroksicimetnih fenolnih kislin (Ayaz in sod., 2008).

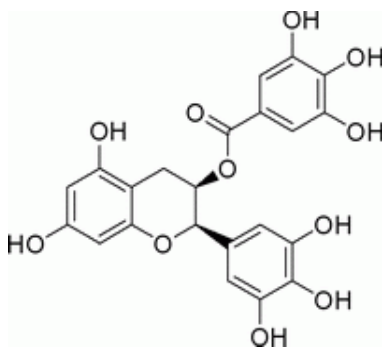
HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE					HIDROKSICIMETNE KISLINE		
							
Kislina	R1	R2	R3	R4	Kislina	R5	R6
Galna	H	OH	OH	OH	p-Kumarna	H	H
Protokatehnična	H	OH	OH	R	Kavna	H	OH
p-Hidroksibenzojska	H	H	OH	H	Ferulna	H	OCH ₃
Vanilinska	H	OCH ₃	OH	H	Sinapinska	OCH ₃	OCH ₃
Siringična	H	OCH ₃	OH	OCH ₃			

2.3.2.2 Flavonoid epigalokatehin galat (EGKG)

Flavonoidi so najobsežnejša skupina rastlinskih fenolnih spojin z nizko molekularno maso, ki jih sestavlja 15 ogljikovih atomov, urejenih v konfiguracijo C6-C3-C6. Glavna struktura je iz 2 aromatskih obročev, A in B, ki sta povezana z mostom iz 3 ogljikov, običajno v obliki heterocikličnega obroča. Variacije v vzorcih substitucije v ogljikovih obročih se kažejo v glavnih razredih flavonoidov: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli ali katehini, izoflavoni, flavanonoli in antocianidini (Balasundram in sod., 2006). Njihova aktivnost je najverjetneje posledica njihove sposobnosti vezave z zunajceličnimi in topnimi proteini ter vezavo na bakterijsko celično steno. Katehini so bolj reducirana oblika od C3 pri flavonoidih in so še posebej vredni omembe (Cowan, 1999).

Katehini so skupina polifenolov, ki predstavljajo kar 30 % suhe teže listov zelenega čaja (Feng in sod., 2010; Hatano in sod., 2008) in so znani po tem, da imajo širok spekter bioloških aktivnosti (Sun in sod., 2009). Številne od teh aktivnosti imajo učinek na membransko vezane celične procese, kot so celično signaliziranje, celični cikel, metabolizem arahidonske kisline ter delovanje mitohondrijev. Že predhodne študije so namreč dokazale, da se katehini zelenega čaja vežejo na lipidni dvosloj ter s tem povzročijo agregacijo lipidnih veziklov in izlivanje vsebine veziklov (Sun in sod., 2009). Glavna sestavina zelenega čaja iz skupine katehinov je epigalokatehin galat (EGKG), ki deluje na principu interakcije s celičnimi membranami (Sun in sod., 2009; Feng in sod. 2010). EGKG namreč predstavlja kar 50% mase vseh molekul iz skupine katehinov, prisotnih v zelenem čaju in je v večini odgovoren za potencialni zdravilni učinek pri uživanju zelenega čaja (Nagle in sod., 2006). Številne *in vitro* študije so pokazale, da EGKG v relativno visokih koncentracijah inhibira ogromno različnih biomedicinsko pomembnih tarčnih molekul ter celične procese. EGKG pa lahko inhibira tudi tarčne molekule, kot so DNA metiltransferaze, skvalen epoksidaze, antiapoptozne proteine Bcl-2. Potencialni zdravilni učinki katehinov v zelenem čaju, predvsem EGKG, so antioksidativni učinek, protitumorsko delovanje, preprečevanje nastanka raka, preprečevanje kardiovaskularnih bolezni, izguba telesne mase, zaščita kože pred poškodbami zaradi ionizirajočega sevanja, ter nekateri drugi (Nagle in sod., 2006).

Na splošno so polifenoli v oksidativnih pogojih zelo nestabilni, zato se nivo galata hitro niža tudi v raztopinah z nevtralnim pH. Čeprav imajo produkti oksidacije EGKG prav tako zaviralni učinek na odpornost proti antibiotikom, so učinki omejeni, ko te sestavine inkubiramo daljše časovno obdobje. Ker pa je zmanjšanje učinkovitosti polifenolov znak oksidativne strukturne spremembe, kot je bilo opaženo tudi pri EGKG, pa bi inhibicija oksidacije morala povečati ali podaljšati njihov protimikrobni učinek. Protimikrobni učinek EGKG se je ob dodatku askorbinske kisline povečal, saj se je askorbinska kislina pokazala kot najučinkovitejša v smislu ohranitve koncentracije stabilnega EGKG. Po drugi strani je omenjena raziskava dokazala tudi, da se je protimikrobni učinek EGKG znižal ob prisotnosti kazeina (Hatano in sod., 2008).



Slika 5: Strukturna formula epigalokatehin galata (EGKG) (Biopurify Phytochemicals, 2010).

2.4 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNE IN MODULATORNE AKTIVNOSTI UČINKOVIN

2.4.1 Metode določanja protimikrobne aktivnosti

Izbira metode določanja protimikrobne aktivnosti je odvisna od občutljivosti, enostavnosti, fleksibilnosti in možne avtomatizacije metode, ter predvsem od namena preiskave (Klančnik in sod., 2009a,b). Trenutno ni določene obstoječe standardne metode za oceno protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov ter njihovih aktivnih sestavin. Za ugotavljanje občutljivosti bakterij rodu *Campylobacter* sta trenutno mednarodno priznani metoda razredčevanja v agarju ter metoda razredčevanja v tekočem gojišču. Slednja je najpogostejše uporabljena za testiranje protimikrobne občutljivosti proti rastlinskim ekstraktom ter fenolnim snovem (King in Dykes, 2008).

Minimalna inhibitorna koncentracija je merilo odpornosti mikroorganizmov proti protimikrobnim snovem, ki se v praksi najpogostejše uporablja. Z vrednostjo MIK lahko ovrednotimo relativno stopnjo občutljivosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem, kot tudi primerjamo relativno učinkovitost snovi proti različnim vrstam mikroorganizmov. Problem pa predstavljajo različni načini interpretacije vrednosti MIK s strani različnih avtorjev, kar prikazuje spodnja preglednica 4 (Burt, 2004).

Preglednica 2: Nekateri najpogostejši izrazi ter definicije, uporabljene za vrednotenje protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004).

Izraz	Definicija
Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)	Najnižja koncentracija, ki zniža preživelost celic v inokulumu. Najnižja koncentracija protimikrobnega agensa, ki inhibira vse testirane organizme po 48 urni inkubaciji. Najnižja koncentracija, ki inhibira vidno rast testnega mikroorganizma. Najnižja koncentracija, ki se kaže v značilnem znižanju števila celic v inokulumu (>90 %).
Minimalna bakteriocidna koncentracija (MBK)	Koncentracija, ki ubije 99,9 % ali več inokuluma. Najnižja koncentracija, pri kateri ni opaziti rasti pri ponovni kultivaciji v svežem tekočem gojišču.
Bakteriostatična koncentracija	Najnižja koncentracija, pri kateri bakterije ne rastejo v bujonu, vendar zrastejo po precepitvi na sveže trdno gojišče.
Bakteriocidna koncentracija	Najnižja koncentracija, pri kateri bakterije ne rastejo v bujonu in tudi ne zrastejo po precepitvi na sveže trdno gojišče.

Poznamo več metod, s katerimi ugotavljamo občutljivost mikroorganizmov proti protimikrobnim snovem. Idealne metode in testni sistemi za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti naj bi bile enostavne, hitre, ponovljive, poceni, hkrati pa naj bi povečale pretok vzorcev (Klančnik in sod., 2010).

2.4.1.1 Difuzijske metode

Difuzijske metode se v velikem obsegu že uporabljajo za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin. Te metode so kvalitativne in temeljijo na uporabi rezervoarja, ki vsebuje preiskovano substanco, katerega postavimo v kontakt z inokuliranim trdnim gojiščem. Po inkubaciji se izmeri cona inhibicije rasti inokuliranega mikroorganizma okoli rezervoarja s substanco. V večini primerov se difuzijske metode uporabljajo v prvi stopnji določanja protimikrobne aktivnosti, in sicer pred določanjem vrednosti MIK z metodo razredčevanja (King in Dykes, 2008).

2.4.1.2 Metode razredčevanja

Metode razredčevanja v tekočem ali trdnem gojišču se uporabljajo za kvantitativno določanje protimikrobnega delovanja. Protimikrobni učinek določamo z metodo v tekočih gojiščih (klasična metoda razredčevanja v tekočem gojišču ali izvedba v mikrotitrski ploščici, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v tekočem gojišču) ali v trdnih gojiščih (metoda razredčevanja v trdnem gojišču, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v trdnem gojišču) (Klančnik in sod., 2009b). Klasična metoda razredčevanja v tekočem gojišču je kvantitativna in vključuje inokulacijo suspenzije testnega organizma v tekoče gojišče s

serijsko razredčeno testno učinkovino. Po inkubaciji sledi določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (King in Dykes, 2008).

Namen metode razredčevanja v trdnem ali tekočem gojišču je torej določiti najnižjo koncentracijo protimikrobnega sredstva, ki inhibira rast preiskovanih bakterij. Metoda razredčevanja v trdnem gojišču je dobro standardizirana, zanesljiva tehnika za testiranje občutljivosti, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje točnosti drugih sistemov, slabost pa je velika poraba materiala in časa (Klančnik in sod., 2009b). Pri izvedbi mikrodilucijske metode v tekočem gojišču je potrebno dokazovanje bakterijske rasti v tekočem gojišču. Pri kolorimetričnih metodah uporabimo različne indikatorske snovi, kot so na primer tetrazolijeve soli, med njimi tudi 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC) in *p*-jodonitrotetrazolijev klorid (INT), 3-(1-((fenil-amino)-karbonil)-3,4-tetrazolium)-bis (4-metoksil-6-nitro)benzensulfonska kislina hidrat (XTT). Te bakterije v respiracijskih procesih pretvorijo v obarvane derivate formazana, katere je moč zaznati. Tetrazolijeve soli zato niso primerne za določanje rasti mikroaerofilnih mikroorganizmov, kot so tudi bakterije rodu *Campylobacter*. Čeprav so te snovi zelo dobri indikatorji bakterijske rasti, pa težave predstavlja pojav avtofluorescence, redukcije soli in antioksidativne lastnosti snovi rastlinskega izvora, kar še posebej velja za XTT, TTC in resazurin. Rast mikrobnih celic pa lahko raznamo tudi preko merjenja optične gostote, zaznavanja fluorescence ali bioluminiscence (Klančnik in sod., 2010).

2.4.1.3 Druge metode

Medtem ko zgoraj opisane metode temeljijo na končni točki merjenja, je zelo pomembna tudi hitrost in/ali trajanje, torej kinetika bakteriostatičnega ali bakteriocidnega učinka. Rezultate pridobimo z analizami krivulj preživetja, oziroma odmiranja mikrobne kulture v odvisnosti od časa po dodatku protimikrobnega sredstva. Najpogostejše uporabljene metode za določanje teh učinkov so merjenje optične gostote in štetje živih celic z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (Klančnik in sod., 2009a,b). Možno pa je tudi spremljanje fizikalnih učinkov protibakterijske aktivnosti protimikrobnih snovi z elektronskim mikroskopom, ki nam omogoča vpogled v poškodbe bakterijske celične stene ter izgubo celičnih vsebin (Burt, 2004).

2.4.2 Metode določanja modulatorne aktivnosti

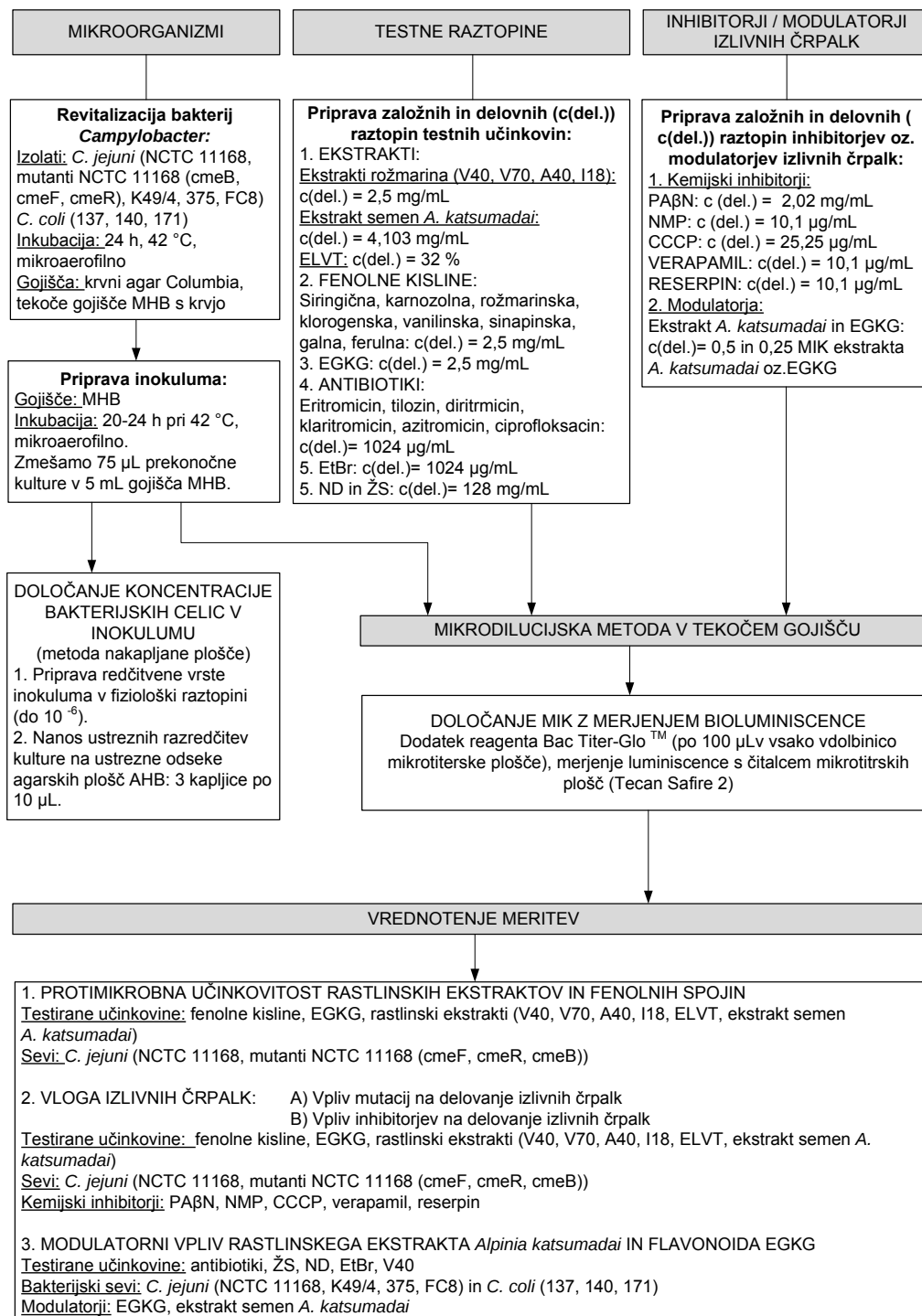
Učinek protimikrobnih snovi rastlinskega izvora proti bakterijam, odpornim proti antibiotikom, so ugotavljali že v številnih študijah. V tem času pa je aktualno predvsem testiranje sinergističnega oz. modulatornega učinka med antibiotiki in naravnimi spojinami (Stavri in sod., 2007). Nekatere snovi rastlinskega izvora imajo namreč sposobnost znižanja stopnje bakterijske odpornosti proti različnim antibiotikom. Že vrsto let je znano, da nekateri antibiotiki delujejo sinergistično, ko jih uporabimo skupaj. O sinergizmu govorimo v primeru, ko je protimikrobna učinkovitost kombinacije dveh spojin večja kakor vsota učinkovitosti posameznih protimikrobnih snovi (Palaniappan in Holley, 2010). V praksi se uporabljajo različne metode za ugotavljanje sinergističnega učinka med dvema različnima protimikrobnima snovema. Med temi je metoda šahovnice (angl. checkerboard assay) najpogostejše uporabljena metoda za določanje sinergističnega učinka med dvema protimikrobnima snovema (Rand in sod., 1993), razvite pa so bile tudi že številne variacije

le te. Metoda šahovnice je pogosto uporabljena v kombinaciji z izračunom t.i. »indeksa frakcijske inhibitorne koncentracije« (FIK), ki izraža učinek kombinacije protimikrobnih učinkovin (Stavri in sod., 2007).

Modulacijski test je hitra in enostavna metoda za odkrivanje potencialnih EPIs, tako pri po Gramu pozitivnih, kot tudi po Gramu negativnih bakterijah (Stavri in sod., 2007). Za izvedbo potrebujemo subinhibitorne koncentracije čiste snovi oz. potencialnega EPI, ki ga dodajamo po serijskem redčenju substrata izlivnega transporterja. Interpretacija rezultatov nato poteka po istem postopku kakor določanje MIK. Uporabljajo se tudi test privzema berberina (angl. berberine uptake test), test inhibicije efluksa etidijevega bromida (ang. ethidium bromide efflux inhibition assay), ter razni t.i. »akumulacijski testi« (angl. accumulation assays) (Stavri in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 6: Shema poteka eksperimentalnega dela diplomske naloge.

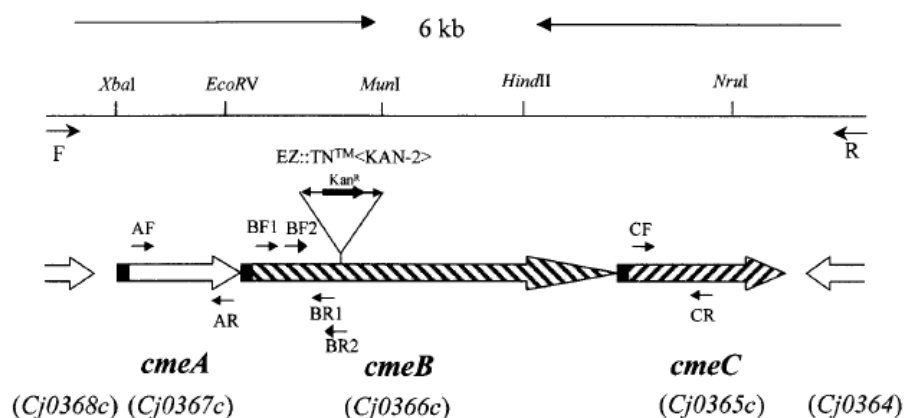
3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Uporabili smo referenčni sev *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (posredovan od prof. dr. Sophie payot, Francija), ter seve *Campylobacter jejuni* (K49/4, 375, FC8) in *Campylobacter coli* (137, 140, 171), izolirane iz živil ter shranjene v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete (Preglednica 3).

Poleg referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter sevov izoliranih iz živil, smo v nalogi uporabili tudi mutirane seve, z mutacijami v genih, odgovornih za izlivne črpalke (*cmeB*, *cmeR*, *cmeF*) seva *C. jejuni* NCTC 11168, ki jih je z uporabo naravne transformacije (Wang in Taylor, 1990) in DNK, poslano od prof. dr. Qijing Zhang (Iowa State University, College of Veterinary Medicine, Iowa, ZDA) naredila dr. Anja Klančnik. Pri mutantu *cmeB* so prof. dr. Qijing Zhang in sodelavci zavrli črpalko CmeABC (Lin in sod., 2002), pri *cmeR* so zavrli regulatorni protein CmeR (Lin in sod., 2005), pri mutantu *cmeF* pa izlivno črpalko CmeDEF (Akiba in sod., 2006).

Mutant *cmeB*, uporabljen v eksperimentalnem delu diplomske naloge, ima v gen *cmeB* vstavljen transpozona EZ::TN <KAN-2>. Lastnosti operona *cmeABC* mutantu *cmeB* prikazuje slika 7.

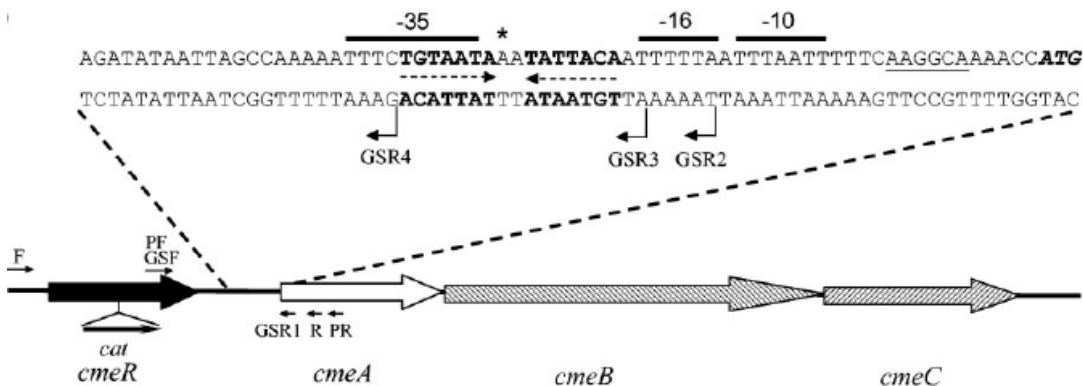


Slika 7: Organizacija genoma in lastnosti operona *cmeABC* pri *C. jejuni* 81-176 (Lin in sod., 2002).

***Legenda oznak: Linija na vrhu prikazuje 6 kb dolg fragment, ki je bil pomnožen z uporabo oligonukleotidnih začetnikov F in R. Izbrana restrikcijska mesta so označena na vrhu linije. Ugotovljeni bralni okvirji so označeni z odebeljenimi puščicami pod linijo. Črn kvadratik znotraj vsake odebeljene puščice predstavlja predvideni signalni peptid. Odprte puščice na obeh koncih prikazujejo odprta bralna okvirja poleg operona *cmeABC*. Odgovarjajoči genski odseki oz. lokusi v sevu *C. jejuni* NCTC 11168 so zapisani v oklepajih. Lokacije številnih oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih v študiji, so zabeležene s tankimi kratkimi puščicami. Lokacija in orientacija vstavljenega transpozona je označena na genu *cmeB*.

Izogena mutantu *cmeR* in *cmeF* sta bila pridobljena z insercijsko mutagenezo seva *C. jejuni* NCTC 11168. Gen *cmeR* mutantu *cmeB* je bil inaktiviran z insercijskim zaporedjem za odpornost proti antibiotiku kloramfenikolu (kaseto *cat*), in sicer v kodonu, ki kodira

127. aminokislino proteina CmeR (Lin in sod., 2005). Tudi gen *cmeF* je bil prekinjen s kaseto *cat* v procesu insercijske mutageneze (Akiba in sod., 2006). Lastnosti in lokacijo gena *cmeR* prikazuje slika 8.



Slika 8: Organizacija genoma in lastnosti intergenske regije med genom *cmeR* in operonom *cmeABC* (Lin in sod., 2005).

***Legenda oznak: Odprti bralni okvirji so prikazani z odebeljenimi puščicami. Start kodon (ATG) gena *cmeA* je zapisan posebej in odebeljeno, zaporedje ki sestavlja intergensko regijo (5'-TGTAATA-3') je poudarjeno odebeljeno in označeno s črtkanimi puščicami. Domnevno vezavno mesto ribosoma (AAGGCA) je podčrtano. Predvidene promotorske regije -10, -16 in -35 promotorja P_{cmeABC} so podčrtane. Delecija enega samega nukleotida je označena z zvezdico. Mesta ključnih oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih za izvedbo PCR so označena s tankimi puščicami. Lokacija in orientacija insercije genske kasete *cat* (označene Cm') znotraj gena *cmeR* je označena s puščico.

Kulture so bile shranjene v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi na temperaturi -80 °C. Mikroorganizmom smo za rast in razmnoževanje zagotovili mikroaerofilne pogoje (3 % O₂, 10 % CO₂ in do 85 % N₂) in jih inkubirali.

Preglednica 3: Delovni mikroorganizmi, uporabljeni v eksperimentu.

Vrsta izolata	Oznaka	Izvor
<i>C. jejuni</i>	NCTC 11168	Humani (divji tip)
	NCTC 11168 <i>cmeF</i>	Sev NCTC 11168 z mutacijo v genu <i>cmeF</i>
	NCTC 11168 <i>cmeR</i>	Sev NCTC 11168 z mutacijo v genu <i>cmeR</i>
	NCTC 11168 <i>cmeB</i>	Sev NCTC 11168 z mutacijo v genu <i>cmeB</i>
	K49/4	Perutnina
	375	Humani
<i>C. coli</i>	FC8	Perutnina
	137	Perutnina
	140	Perutnina
	171	Perutnina

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Preglednica 4: Krvni agar Columbia

Sestavine:	19,5 g osnovnega medija Columbia Agar Base (Oxoid, CM331)
	500 mL destilirane vode
	25 mL sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
	1 steklenička dodatka za rast <i>Campylobacter</i> Growth Supplement (Oxoid, SR232E)
	1 steklenička dodatka za selektivnost <i>Campylobacter</i> Selective Supplement (Oxoid, SR069E)
Priprava:	19,5 g osnovnega medija za Columbia krvni agar (Columbia Agar Base CM331, Oxoid) smo raztopili v 500 mL destilirane vode in ga sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij smo ohladili na 45 °C in mu dodali 25 mL sterilne defibrilirane konjske krvi ter raztopini dodatka za rast in dodatka za selektivnost. Gojišče smo previdno premešali in ga razlili v petrijevke. Ohlajenega smo do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

Preglednica 5: Tekoče gojišče Mueller Hinton (MHB)

Sestavine:	10, 5 g osnovnega medija Mueller Hinton (Merck, 1.10293.0500)
	500 mL destilirane vode
Priprava:	10, 5 g osnovnega gojišča smo raztopili v 500 mL destilirane vode in ga sterilizirali v avtoklavu (15 min, 121 °C, 1,1bar). Ohlajenega smo do uporabe shranili pri temperaturi 4 °C.

Preglednica 6: Trdno modificirano gojišče Abeyta-Hunt- Bark (AHB) agar

Sestavine:	20 g osnovnega medija Bacto TM Heart Infusion Agar (CM 375, Oxoid)
	1 g kvasnega ekstrakta (Yeast Extract CM 19, Oxoid)
	500 mL destilirane vode
	1 steklenička dodatka za rast <i>Campylobacter</i> Growth Supplement (Oxoid, SR 232E)
	5 mL pripravljene koncentracije (1 %) TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium-chloride, Sigma-Aldrich T8877)
Priprava 1 % raztopine TTC:	0,1 g TTC smo raztopili v 100 mL sterilne 2-krat destilirane vode. Stekleničko s tako pripravljeno 1 % izhodno raztopino TTC smo zavili v alu folijo in jo hranili v hladilniku do uporabe.
Priprava:	Natehtali smo 20 g osnovnega medija Bacto TM Heart Infusion Agar (Oxoid, CM 375) ter 1 g kvasnega ekstrakta (Yeast Extract CM 19, Oxoid). Dodali smo 500 mL destilirane vode ter vsebino raztopili v mikrovalovni pečici. Po ohlajanju na temperaturo 45 °C smo dodali 1 stekleničko dodatka za rast ter 5 mL 1 % koncentracije TTC, vsebino smo dobro premešali in vlili v petrijevke. Zaradi občutljivosti TTC na svetlobo smo pripravljene plošče položili v škatlo s pokrovom in jih do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.3 Laboratorijska oprema in material

Aparature, ki smo jih uporabljali pri raziskovalnem delu, so navedene v preglednici 7.

Preglednica 7: Laboratorijska oprema, uporabljena za izvedbo eksperimentalnega dela.

Aparat	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklavi	Tip 500x700 1-61-137 A-21	Sutjeska, Beograd Sutjeska, Beograd Kambič, Slovenija
Avtomatske pipete in nastavki	10 µL, 100 µL, 1000 µL 300 µL (12-kanalna), 10 mL	Gilson, Francija Eppendorf, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč	TECAN Safire 2	Tecan Trading AG, Švica
Digestorij	Tip 382	Med-lab Rauh, Slovenija
Hladilnik		Zanussi, Japonska
Inkubator	Kambič, tip SP 190	Kambič
Mešalec mikrotitrskih plošč	Thermomixer comfort	Eppendorf, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Cook n' grill 1300	Sanyo, Japonska
Sušilnik laboratorijske steklovine	SO-250	Elektromedicina Ljubljana, Slovenija
Plinski gorilnik		
Plinska jeklenka z mikroaerofilno atmosfero		Istragas, Slovenija
Vrtinčno mešalo	Yellowline	Ika, Belgija
Tehtnici	PB1502-S Sartorius, analytic	Mettler toledo, Švica GMBH, Nemčija
Zamrzovalna omara	-80 °C	Heto Ultra Freeze, Kanada
Zamrzovalnik	-18 °C	LTH, Slovenija

Uporabili smo naslednji laboratorijski material:

Anaerobni lonci (Anaerobar 2,5l; Oxoid Ago 25A, Anglija), injekcijske brizgalke (PB Plastik), filtri za enkratno uporabo s porami velikosti 0,2 µm (Sartorius, Nemčija), kad za tekoče gojišče (Eppendorf), laboratorijske steklenice (Duran, Nemčija), merilni valji (Plastibrand, Nemčija), mikrocentrifugirke (Eppendorf (2 mL, 1,5 mL)), bele mikrotitrsko plošče (F96 MicroWell™ Plates White; Nunc, Danska), parafilm (PM 992, American National Can), petrijeve plošče (Labortechnika Golias), plastične cepilne zanke, plastični lončki.

3.2.4 Raztopine in dodatki

Preglednica 8: Raztopine in dodatki, uporabljeni pri eksperimentalnem delu.

Fiziološka raztopina	Sestavine: 3,4 g KH_2PO_4 (Kemika) 1100 mL destilirane vode Priprava: 3,4 g KH_2PO_4 smo raztopili v 100 mL destilirane vode in uravnali pH na vrednost 7,2. 1,25 mL tako pripravljene založne raztopine smo raztopili v 1 L destilirane vode in premešali. Raztopino smo sterilizirali v avtoklavu 15 min pri temperaturi 121 °C.
Absolutni etanol	Proizvajalec: Merck
DMSO dimetilsulfoksid	Proizvajalec: Merck, 1.0295.1000
Bac Titer-Glo™ reagent	Proizvajalec: Promega, ZDA

3.2.5 Rastlinski ekstrakti

3.2.5.1 Ekstrakti rožmarina

Uporabili smo 4 različne komercialno pripravljene ekstrakte rožmarina, V40, V70, A40 in I18 (Vitiva d.d., Slovenija).

Preglednica 9: Komercialni ekstrakti rožmarina uporabljeni v eksperimentalnem delu diplomske naloge (Vitiva, 2008)

Oznaka komercialnega ekstrakta rožmarina	Aktivna sestavina in njen delež v ekstraktu	Topnost
V70	karnozolna kislina (70 %)	olje
V40	karnozolna kislina (40 %)	olje
A40	rožmarinska kislina (40 %)	voda
I18	karnozolna kislina (18 %)	olje

0,01 g ekstrakta smo raztopili v 1 mL absolutnega etanola. Tako pripravljeni 1 % raztopini ekstrakta smo dodali 3 mL gojišča MHB. Pripravljeni 0,25 % koncentracijo ekstrakta smo uporabili pri mikrodilucijski metodi.

3.2.5.2 Ekstrakt semen *Alpinia katsumadai*

Založno raztopino ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* s koncentracijo 16,384 mg/mL smo pripravili tako, da smo 21,5 mg ekstrakta raztopili v 1,31 mL DMSO. Ekstrakt semen *A. katsumadai* je pripravil prof. dr. Franz Bučar s sodelavci, z Inštituta za farmacevtske znanosti, Univerza v Gradcu. Volumen DMSO, ki smo ga uporabili za redčenje ekstrakta, smo izračunali po naslednji enačbi:

$$V_{DMSO} = \frac{m_{ekstrakt} [mg]}{c_0} = \frac{m_{ekstrakt} [mg]}{16,384 \left[\frac{mg}{mL} \right]} \quad \dots(1)$$

pri čemer oznaka V_{DMSO} predstavlja volumen topila DMSO, $m_{ekstrakt}$ maso ekstrakta v mg in c_0 začetno koncentracijo ekstrakta, ki znaša 16,384 mg/mL.

Pripravili smo 0,5 mL delovne raztopine ekstrakta s koncentracijo 4,103 mg/mL: 125 µL založne raztopine v DMSO smo dodali k 375 µL gojišča MHB ter raztopino premešali na vrtničnem mešalu.

3.2.5.3 Ekstrakt listov vinske trte (ELVT)

Ekstrakt listov vinske trte je bil pripravljen v okviru študije Katalinić in sod. (2011). Delovno raztopino ekstrakta je predstavljala 32 % raztopina ELVT v tekočem gojišču MHB.

3.2.6 Fenolne spojine

3.2.6.1 Fenolne kisline

V eksperimentu smo uporabili 8 čistih fenolnih kislin: karnozolno, rožmarinsko, klorogensko, vanilinsko, siringično, galno in ferulno kislino (Sigma – Aldrich Co., Nemčija), ter sinapinsko kislino (Fluka Biochemika).

Raztopine fenolnih kislin smo pripravili po enakem postopku kot ekstrakte rožmarina.

3.2.6.2 Epigalokatehin galat (EGKG)

Za pripravo 4 % založne raztopine EGKG (Sigma, E4143-50MG) smo natehtali 0,02 g EGKG in ga raztopili v 0,5 mL absolutnega etanola. Iz 4 % EGKG smo pripravili 1 % raztopino. 100 µL 1% EGKG smo dodali k 300 µL gojišča MHB.

3.2.7 Antibiotiki

V eksperiment smo vključili 5 makrolidnih antibiotikov (eritromicin, tilosin, diritromicin, klaritromicin in azitromicin) ter antibiotik ciprofloksacin, ki ga uvrščamo med fluorokinolone.

3.2.7.1 Priprava raztopine ciprofloksacina

Natehtali smo 0,0256 g ciprofloksacina (Fluka Biochemika) in ga raztopili v 4,5 mL sterilne ddH₂O in 0,5 mL NaOH ($c = 1$ M). Raztopino smo premešali z vrtničnim mešalom in jo z uporabo injekcijske brizgalke filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,2 µm. 0,4 mL založne koncentracije smo zmešali z 1,6 mL gojišča MHB. Koncentracija tako pripravljene raztopine antibiotika je znašala 1024 µg/mL.

3.2.7.2 Priprava raztopine eritromicina

0,0256 g eritromicina (Sigma-Aldrich Co.) smo raztopili v 5 mL absolutnega etanola. Raztopino antibiotika smo filtrirali skozi 0,2 μm filter. 0,4 mL filtrirane raztopine smo dodali k 1,6 mL gojišča MHB. Koncentracija tako pripravljene raztopine antibiotika je znašala 1024 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.7.3 Priprava raztopin klaritromicina (USP standard, Cat No 1134379), azitromicina (Fluka Biochemika), diritromicina (Sigma-Aldrich Co.) in tilozina (Sigma-Aldrich Co.)

Pri vseh antibiotikih smo postopali enako. Natehtali smo 0,0064 g posameznega antibiotika in ga raztopili v 1,25 mL absolutnega etanola. Raztopino smo premešali z vrtničnim mešalom in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. 0,4 mL prefiltrirane raztopine smo zmešali z 1,6 mL gojišča MHB. Koncentracija tako pripravljene raztopine antibiotika je znašala 1024 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.8 Etidijev bromid

Založno raztopino smo pripravili tako, da smo natehtali 0,0256 g etidijevega bromida (Sigma, E8751) in ga raztopili v 5 mL sterilne ddH₂O. Raztopino smo zmešali na vrtničnem mešalu in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. 0,4 mL založne koncentracije EtBr smo dodali k 1,6 mL gojišča MHB. Koncentracija tako pripravljene raztopine etidijevega bromida je znašala 1024 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.9 Natrijev deoksiholat (ND) in žolčne soli (ŽS)

0,5 g žolčnih soli/natrijevega deoksiholata (Sigma-Aldrich Co.) smo raztopili v 2 mL sterilne ddH₂O, raztopino smo dobro premešali in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. 512 μL prefiltrirane raztopine smo nato dodali 488 μL gojišča MHB. Delovna koncentracija ŽS/ND je tako znašala 128 mg/mL.

3.2.10 Inhibitorji/modulatorji membranskih izlivnih črpalk

Pripravili smo založne raztopine inhibitorjev, katere smo nato uporabili za pripravo delovnih raztopin. Delovne raztopine smo pripravljali enkrat do dvakrat tedensko, glede na potrebe tekočega eksperimenta. Glede na plan dela smo v vdolbinice mikrotitrne plošče nanašali po 1 μL delovnih raztopin inhibitorja.

3.2.10.1 Kemijski inhibitorji

3.2.10.1.1 Inhibitor PA β N (Sigma-Aldrich Co.)

Natehtali smo 0,020 g PA β N in ga raztopili v 1 mL ddH₂O, dobljeno raztopino smo premešali na vrtničnem mešalu in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. Za pripravo delovne raztopine inhibitorja s koncentracijo 2,02 mg/mL smo k 50 μL gojišča MHB v

mikrocentrifugirki dodali 5,6 μL založne raztopine inhibitorja ter vsebino mikrocentrifugirke premešali na vrtničnem mešalu.

3.2.10.1.2 Inhibitor NMP (CHESS GmgH)

Natehtali smo 0,020 g NMP in ga raztopili v 1 mL absolutnega etanola, dobljeno raztopino smo nato premešali na vrtničnem mešalu in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. Za pripravo delovne raztopine NMP s koncentracijo 10,1 $\mu\text{g/mL}$ smo zmešali 50 μL MHB in 51,0 μL založne raztopine, kar smo premešali na vrtničnem mešalu.

3.2.10.1.3 Inhibitor verapamil (Sigma-Aldrich Co.)

Natehtali smo 0,02 g verapamila in ga raztopili v 1 mL DMSO, dobljeno raztopino smo premešali na vrtničnem mešalu in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. Za pripravo delovne raztopine inhibitorja verapamil s koncentracijo 10,1 $\mu\text{g/mL}$ smo k 50 μL gojišča MHB v mikrocentrifugirki dodali 51,0 μL založne raztopine inhibitorja ter vsebino mikrocentrifugirke premešali na vrtničnem mešalu.

3.2.10.1.4 Inhibitor reserpin (Sigma-Aldrich Co.)

Natehtali smo 0,02 g reserpina in ga raztopili v 1 mL DMSO, dobljeno raztopino smo premešali na vrtničnem mešalu in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. Za pripravo delovne raztopine inhibitorja reserpina s koncentracijo 10,1 $\mu\text{g/mL}$ smo k 50 μL gojišča MHB v mikrocentrifugirki dodali 51,0 μL založne raztopine inhibitorja ter vsebino mikrocentrifugirke premešali na vrtničnem mešalu.

3.2.10.1.5 Inhibitor CCCP (Fluka Biochemika)

Natehtali smo 0,002 g CCCP in ga raztopili v 1 mL DMSO, dobljeno raztopino smo premešali na vrtničnem mešalu in jo filtrirali skozi 0,2 μm filter. Za pripravo delovne raztopine CCCP s koncentracijo 25,25 $\mu\text{g/mL}$ smo k 100 μL gojišča MHB v mikrocentrifugirki dodali 1,28 μL založne raztopine inhibitorja ter vsebino mikrocentrifugirke premešali na vrtničnem mešalu.

3.2.10.2 Ekstrakt semen *Alpinia katsumadai* ter EGKG kot modulatorja membranskih izlivnih črpalk

Delovne raztopine modulatorjev smo pripravljali glede na zahteve določenega eksperimenta in predhodno določene minimalne inhibitorne koncentracije EGKG in ekstrakta semen *A. katsumadai* za posamezne bakterijske seve. Ugotavljali smo modulatorni učinek koncentracij, ki so bile polovične (0,5 MIK) ali četrtinske (0,25 MIK) vrednosti izmerjene MIK EGKG in ekstrakta za posamezne bakterijske seve. Glede na plan dela smo v vdolbinice mikrotitrne plošče nanašali po 1 μL pripravljenih delovnih raztopin modulatorjev EGKG in ekstrakta semen *A. katsumadai*.

Ponazoritev na primeru:

Vrednost MIK EGKG za sev *C. jejuni* 11168 je znašala 0,313 mg/mL. Polovica vrednosti MIK za EGKG znaša 0,156 mg/mL, četrtna vrednosti MIK pa 0,078 mg/mL. Raztopino modulatorja EGKG s koncentracijo 0,156 mg/mL smo pripravili tako, da smo k 100 μ L gojišča MHB dodali 64 μ L založne raztopine EGKG. Za pripravo raztopine EGKG s koncentracijo 0,078 mg/mL pa smo zmešali 200 μ L MHB in 49 μ L založne raztopine EGKG.

3.3 METODE

3.3.1 Revitalizacija sevov

Bakterijski sevi *C. jejuni* in *C. coli*, ki smo jih uporabili, so bili shranjeni v krioepurvetkah pri temperaturi -80 °C. Posamezne seve smo s plastično cepilno zanko prenesli na plošče s krvnim agarjem Columbia. Plošče z nacepljenimi kulturami smo 24 ur inkubirali v mikroaerofilnih pogojih pri temperaturi 42 °C.

3.3.2 Priprava inokuluma

Po 24 urah inkubacije so se na ploščah pojavile za kampilobakter značilne prosojne in majhne kolonije. Inokulum smo pripravljali v digestoriju, da smo zmanjšali tveganje kontaminacije in hkrati ob souporabi plinskega gorilnika zagotovili aseptične pogoje. Z uporabo cepilne zanke smo posamezne kolonije izbranih sevov prenesli v epruvete s 4 mL gojišča MHB, kateremu smo aseptično dodali tudi 200 μ L sterilne defibrilirane konjske krvi. Tako pripravljene kulture v tekočem gojišču smo premešali na vrtničnem mešalu in jih inkubirali v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C 24 ur. Po inkubaciji smo kulture premešali in 75 μ L suspenzije prenesli v epruvete s 5 mL gojišča MHB. Tako pripravljene kulture smo uporabili za izvedbo mikrodilucijske metode.

3.3.3 Določanje koncentracije bakterijskih celic v inokulumu

Koncentracija bakterijskih celic v inokulumu je izrednega pomena za pravilno izvedbo mikrodilucijske metode. Koncentracijo bakterijskih celic smo določali z metodo nakapljanje plošče (angl. drop plate method) preko štetja bakterijskih kolonij. Kot gojišče smo v tem primeru uporabili gojišče AHB z dodatkom TTC, ki omogoča enostavno štetje zraslih kolonij kampilobaktrov. Oksidiran TTC v gojišču je brezbarven. Rast mikroorganizmov povzroči redukcijo TTC do formazana, kar zaznamo preko rdeče obarvanih drobnih kolonij kampilobaktrov na agarških ploščah AHB. Rezultat smo izrazili kot CFU/mL vzorca (angl. colony forming units).

Z izvedbo metode nakapljanje plošče smo najprej pripravili redčitve vzorca po Kochu (do 10^{-6}). Vzorec je predstavljal inokulum, ki smo ga uporabili pri mikrodilucijski metodi. Najprej smo v mikrocentrifugirke pipetirali po 900 μ L sterilne fiziološke raztopine. Za prvo redčitev smo pipetirali 100 μ L inokuluma v prvo mikrocentrifugirko s fiziološko raztopino. Vsebinsko mikrocentrifugirke smo dobro premešali na vrtničnem mešalu in prenesli 100 μ L prve razredčine inokuluma v naslednjo mikrocentrifugirko s fiziološko

raztopino. Postopek smo ponavljali do razredčitve inokuluma 10^{-6} . Agarske plošče z gojiščem AHB smo približno pol ure odprte sušili v zatemnjenem digestoriju. Plošče smo razdelili na 5 enakih delov in jih ustrezno označili. Na 1. del plošče smo prenesli 3 kapljice znanega volumna ($10 \mu\text{L}$) najvišje razredčine inokuluma tako, da so bile med seboj maksimalno oddaljene, s čemer smo preprečili zlivanje kapljic med seboj. Razredčina inokuluma 10^{-6} v mikrocentrifugirki je na plošči predstavljala razredčino 10^{-8} . Nadaljevali smo z nanosom 3 kapljic inokuluma razredčine 10^{-5} na 2. odsek plošče, kar je na plošči predstavljalo razredčitev 10^{-5} . Nakapljane plošče smo inkubirali 24-48 ur oz. do pojava vidne rasti kampilobaktrov v mikroaerofilni atmosferi pri 42°C . Po končani inubaciji smo ob gorilniku prešteli kolonije, ki so zrastle na ploščah. Za izračun povprečnega števila kolonij na števni ploščah (5-25 kolonij) smo uporabili sledečo enačbo:

$$N = \frac{\sum c}{(a + 0,1b)d} \quad \dots (2)$$

$N \dots \text{CFU/mL}$

$\sum c$

... vsota kolonij na vseh ploščah

$a \dots$ število plošč prve števnice razredčitve

$b \dots$ število plošč druge števnice razredčitve

$d \dots$ razredčitveni faktor (prve števnice razredčitve)

3.3.4 Mikrodilucijska metoda v bujonu

Pri izvedbi mikrodilucijske metode smo uporabljali bele mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami (Nunc, Danska). Mikrotitrna plošča ima 8 vrstic vdolbinic, ki so označene s črkami A-H, ter 12 stolpcev, označenih s številkami od 1-12.

Testirane učinkovine (ekstrakte, fenolne spojine, antibiotike, žolčne soli, natrijev deoksiholat in etidijev bromid) smo serijsko redčili v gojišču MHB vzdolž mikrotitrne plošče. Na ploščico smo nanašali delovne koncentracije vzorcev. Za smiselno vrednotenje rezultatov smo na vsaki mikrotitrski plošči vključili tudi kontrole v 2 paralelkah. Vdolbinice mikrotitrne plošče, ki so predstavljale negativno kontrolo, so vsebovale $50 \mu\text{L}$ gojišča MHB in $50 \mu\text{L}$ delovne koncentracije testirane učinkovine. Vdolbinice mikrotitrne plošče, ki so predstavljale pozitivno kontrolo, pa so poleg $50 \mu\text{L}$ gojišča MHB vsebovale še $50 \mu\text{L}$ predhodno pripravljene kulture. Za slepi vzorec smo 2 vdolbinici napolnili z $100 \mu\text{L}$ gojišča MHB.

Kulturo smo pripravili po postopku, kot je opisan v točki 3.3.2. V vdolbinice mikrotitrne plošče smo nanašali po $50 \mu\text{L}$ raztopine kulture, katero smo predhodno dobro premešali na vrtničnem mešalu.

Pred začetkom dela smo na pokrov mikrotitrne plošče okvirno označili potek dela ter lokacijo vdolbinic s kontrolami. V prvo vrstico mikrotitrne plošče smo glede na predhodno pripravljen plan dela z avtomatsko pipeto prenesli po $100 \mu\text{L}$ delovne koncentracije testiranega vzorca. Nato smo v vse ostale vdolbinice mikrotitrne plošče

nanesli po 50 μ L gojišča MHB. Z multikanalno pipeto smo iz prve vrstice vzporedno prenesli po 50 μ L vzorcev v drugo vrstico, premešali vsebino z 8-kratnim potegom z avtomatsko pipeto in po 50 μ L prenesli v naslednjo vrstico. Postopek smo ponavljali do zadnje vrstice (H), iz katere smo po premešanju 50 μ L zavrgli. S tem postopkom smo dosegli redčenje testirane učinkovine navzdol vzdolž mikrotitrskeske plošče, pri čemer se je koncentracija učinkovine v vsaki naslednji vrstici razpolovila. Končni volumen v vseh vdolbinicah je bil enak (50 μ L). V vse vdolbinice smo na koncu dodali še 50 μ L bakterijske kulture v gojišču MHB (pripravljene kot je opisano zgoraj). Glede na plan dela smo v vdolbinice dodali še po 1 μ L ustrezne raztopine inhibitorja, ki smo jo predhodno pripravili, kot je opisano v točki 3.2.10. Na koncu smo mikrotitrsko ploščo prekrili s pokrovom, vsebino smo premešali na mešalcu mikrotitrskih plošč in jo inkubirali 24 ur pri temperaturi 42 °C in mikroaerofilnih pogojih.

Preglednica 10: Začetne masne koncentracije testiranih vzorcev na mikrotitrski ploščici ob uporabi različnih sevov *C. jejuni* in *C. coli*.

Testirani vzorec	Sevi <i>C. jejuni</i>							Sevi <i>C. coli</i>		
	11168	cmeB	cmeF	cmeR	K49/4	375	FC8	137	140	171
Ekstr. rožmarina.[mg/mL]: V40, V70, A40, I18	1,250	1,250	1,250	1,250		1,250	1,250			
Ekstr. <i>A. katsumadai</i> [mg/mL]	4,103	4,103	4,103	4,103	4,103	4,103	4,103			4,103
ELVT [%]	16	16	16	16		16	16			
Fenolne kisl. [mg/mL]:										
KaK, RK, KlorK, VanK, GalK, SinK, SirK, FerK	1,250	0,078	1,250	1,250						
	1,250	0,156	1,250	1,250						
EGKG [mg/mL]	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,25	1,25
Antibiotiki [μg/mL]										
Eritromicin	2,00				2,00	512	512	512	512	512
Ciprofloksacin	2,00		2,00	2,00	2,00	128	256			
Azitromicin	2,00		2,00	2,00	2,00	512	32	512	512	512
Klaritromicin	2,00				2,00	512	512	512	512	512
Doritromicin	2,00				2,00	512	256	512	512	512
Tilozin	2,00				2,00	512	512	512	512	512
Natrijev deoksiholat [mg/mL]	256		256	256	512	128	512	512	512	512
Zolčne soli [mg/mL]	256		256	256	512	128	512	512	512	512
Etidijev bromid [μg/mL]	16	2,00	16	16	16	16	16			

***Legenda: Začetne koncentracije testirane učinkovine na mikrotitrski plošči so polovične vrednosti delovnih koncentracij, saj jih na plošči razredčimo z dodatkom enake količine mikrobne kulture. Oznake: KaK (karnozolna kislina), RK (rožmarinska kislina), KlorK (klorogenska kislina), VanK (vanilinska kislina), GalK (galna kislina), SinK (sinapinska kislina), SirK (siringična kislina), FerK (ferulna kislina), Ekstr. (ekstrakt).

3.3.5 Določanje MIK z merjenjem bioluminiscent

Za določanje MIK testiranih učinkovin smo uporabili test živosti bakterijskih celic Bac Titer-GloTM proizvajalca Promega. Test nam omogoča spremljanje pojava

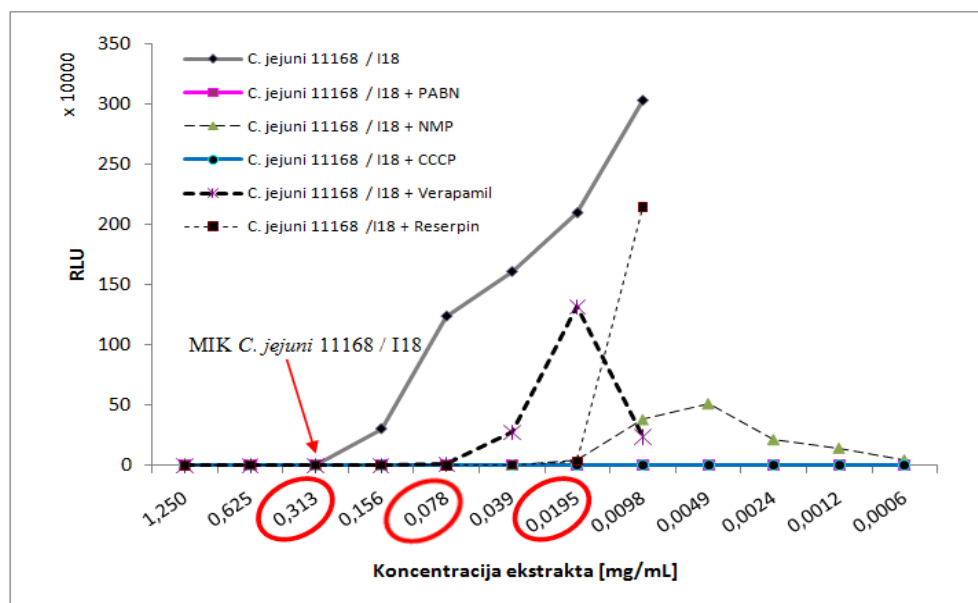
luminiscenčnega signala, ki nastaja v luciferazni reakciji. Rekombinantna luciferaza katalizira reakcijo mono- oksigenacije luciferaze v oksiluciferin ob prisotnosti prebitka Mg^{2+} ionov, ATP in molekularnega kisika. Bioluminiscenčni signal je sorazmeren količini prisotnega ATP v bakterijskih celicah, le ta pa služi kot indikator metabolne aktivnosti celic (Promega Corp., 2009).

Po končani 24 urni inkubaciji smo v vse vdolbinice mikrotitrne plošče z multikanalno pipeto dodali po 100 μ L reagenta Bac Titer-GloTM. Reagent smo po navodilu proizvajalca pripravili iz pufra (Bac Titer – GCO Buffer) ter substrata (Bac Titer – GCO Substrat). Steklenički s pufrom in substratom smo nekaj ur pred končano inkubacijo odmrznili pri sobni temperaturi, nato smo pufer prelili v stekleničko s substratom ter vsebino dobro premešali. Tako pripravljen reagent smo nanašali v vdolbinice mikrotitrne plošče. Vsebinsko mikrotitrne plošče smo premešali na mešalcu mikrotitrskih plošč in po 5-ih minutah inkubacije v temi na čitalcu mikrotitrskih plošč izmerili bioluminiscenco.

Parametri merjenja luminiscence s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire 2:

- Temperatura: 22-25 °C
- Splošni integracijski čas: 1000 ms
- Enote: RLU relativne enote luminiscence, (angl. relative luminiscence unit)

Rezultate merjenja prikažemo na grafikonu v odvisnosti izmerjene RLU od koncentracije testirane učinkovine. Na podlagi teh rezultatov nato ugotovimo minimalno inhibitorno koncentracijo testiranega vzorca. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je tista najnižja koncentracija testirane učinkovine, ki je še preprečila povečanje relativnega bioluminiscenčnega signala, kar pomeni, da je inhibirala rast mikroorganizma.



Slika 9: Primer grafičnega določanja MIK za ekstrakt rožmarina I18.

3.3.6 Ugotavljanje vpliva mutacij v izlivnih črpalkah in vpliva inhibitorjev na delovanje izlivnih črpalk

Vpliv mutacije v genih, ki kodirajo membranski izlivni črpalki CmeABC in CmeDEF, smo določali s primerjavo vrednosti MIK med mutiranim sevom in referenčnim sevom *C. jejuni* NCTC 11168 po naslednji enačbi:

$$U = \frac{MIK_{ref}}{MIK_{mut}} \quad \dots (3)$$

pri čemer je U je relativna vrednost oz. razmerje med MIK referenčnega (MIK_{ref}) seva in MIK mutiranega seva (MIK_{mut}).

Učinkovitost inhibitorja (U_i) oz. modulatorja (U_m) in s tem vlogo izlivnih črpalk pri odpornosti na protimikrobne snovi smo izračunali po naslednji relaciji:

$$U_i = \frac{MIK_{brez\ inhibitorja}}{MIK_{z\ inhibitorjem}} \quad \dots (4)$$

$$U_m = \frac{MIK_{brez\ modulatorja}}{MIK_{z\ modulatorjem}} \quad \dots (5)$$

pri čemer je U_i relativna vrednost med MIK brez inhibitorja in MIK z inhibitorjem, U_m pa relativna vrednost oz. razmerje med MIK brez modulatorja in MIK z modulatorjem.

4 REZULTATI

Eksperimentalni del diplomskega dela je bil opravljen v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, v obdobju od oktobra 2009 do februarja 2010.

V eksperimente v okviru diplomske naloge smo vključili seve *C. jejuni* (NCTC 11168, K49/4, 375, FC8) in *C. coli* (137, 140, 171), kot tudi seve z mutacijami v genih, odgovornih za izlivne črpalke, seva *C. jejuni* NCTC 11168, Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete. Za izbrane seve smo v prvi vrsti določali občutljivost proti različnim protimikrobnim snovem. Raziskavo smo nadaljevali v smeri ugotavljanja vpletenosti dveh membranskih izlivnih črpalk pri zagotavljanju odpornosti proti izbranim rastlinskim ekstraktom ter fenolnim spojinam, kar smo ugotavljali s pomočjo mutiranih sevov, kot tudi z uporabo nekaterih kemijskih inhibitorjev izlivnih črpalk (EPIs). Poleg protimikrobne aktivnosti smo za rastlinski ekstrakt semen *A. katsumadai* ter flavonoid EGKG želeli preizkusiti tudi njun modulatorni učinek na protimikrobno delovanje nekaterih učinkovin na izolate *C. jejuni* in *C. coli*. Modulatorno delovanje spojin naravnega izvora, kot sta tudi ekstrakt semen *A. katsumadai* in EGKG, je zanimivo predvsem iz aspekta možnosti povrnitve občutljivosti proti antibiotikom odpornim kampilobaktrom.

Protimikrobno aktivnost testiranih učinkovin smo vrednotili z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), ki smo jo določali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB, v mikrotitrski plošči. Vrednost MIK je v našem primeru predstavljala tisto koncentracijo testirane učinkovine, ki je inhibirala rast bakterij. Živost izolatov *C. jejuni* in *C. coli* oz. njihovo metabolno aktivnost smo spremljali s čitalcem mikrotitrskih plošč preko merjenja luminiscenčnega signala po dodatku komercialnega reagenta Bac Titer-Glo™.

4.1 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN FENOLNIH SPOJIN TER VPLETENOST EFLUKSA

V eksperiment smo vključili referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 ter mutirane različice tega seva, *C. jejuni* *cmeB* z mutacijo v genu *cmeB*, *C. jejuni* *cmeF* z mutacijo v genu *cmeF* ter *C. jejuni* *cmeR* z mutacijo v genu *cmeR*. Določali smo protimikrobni učinek 4 komercialnih ekstraktov rožmarina (V40, V70, A40, I18), ekstrakta semen *A. katsumadai* ter ELVT, kot tudi čistih fenolnih spojin. Ovrednotili smo vpliv posameznih mutacij na občutljivost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 ter učinek kemijskih inhibitorjev (NMP, PAβN, CCCP, verapamil, reserpin) na delovanje izlivnih črpalk pri *C. jejuni*. Rezultate vpliva mutacij na občutljivost referenčnega seva smo podali kot vrednost U, ki izraža razmerje med vrednostjo MIK referenčnega seva in vrednostjo MIK mutiranega seva. Rezultate vpliva inhibitorjev na občutljivost referenčnega seva pa smo podali kot vrednost U_i, ki predstavlja razmerje med vrednostjo MIK brez inhibitorja ter vrednostjo MIK z dodanim inhibitorjem izlivnih črpalk.

4.1.1 Protimikrobna učinkovitost rastlinskih ekstraktov (MIK)

Rezultate določanja vrednosti MIK izbranih rastlinskih ekstraktov rožmarina (V40, V70, A40, I18), ekstrakta semen *A. katsumadai* in ELVT za referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 in mutante referenčnega seva (cmeB, cmeF in cmeR) prikazuje preglednica 11. Le ta prikazuje tudi rezultate določanja vrednosti MIK v prisotnosti petih različnih inhibitorjev izlivnih črpalk v izbranih koncentracijah.

Preglednica 11: Zbirna preglednica vrednosti MIK seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovih mutiranih različic proti izbranim rastlinskim ekstraktom v odsotnosti in prisotnosti različnih inhibitorjev izlivnih črpalk.

EKSTRAKT	SEV <i>C. jejuni</i>	MIK ekstrakta [mg/mL]	MIK [mg/mL]				
			+ PAβN	+ NMP	+ verapamil	+ reserpin	+ CCCP
V40	NCTC 11168	0,078	0,020	0,039	0,156	0,156	0,020
	11168 cmeB	0,010	0	< 0,005	0,005	0,005	0,010
	11168 cmeF	0,156	0,010	0,078	0,156	0,156	0,078
	11168 cmeR	0,156	0,010	0,078	0,156	0,156	0,156
V70	NCTC 11168	0,078	0,020	0,039	0,078	0,078	0,039
	11168 cmeB	0,005	0,010	0,010	0,010	0,010	0,005
	11168 cmeF	0,078	< 0,001	0,020	0,078	0,078	0,039
	11168 cmeR	0,078	0,078	0,039	0,156	0,156	0,078
A40	NCTC 11168	0,156	0,039	0,078	0,156	0,156	0,039
	11168 cmeB	0,002	0	0	0,001	0,002	0,002
	11168 cmeF	0,156	0,078	0,039	0,313	0,313	0,156
	11168 cmeR	0,313	0,039	0,039	0,313	0,313	0,313
I18	NCTC 11168	0,313	< 0,001	0,020	0,039	0,020	0,005
	11168 cmeB	0,020	0,020	0,039	0,020	0,005	0,010
	11168 cmeF	0,625	0,039	0,313	0,625	0,625	0,313
	11168 cmeR	0,156	0,039	0,020	0,156	0,156	0,156
<i>Alpinia katsumadai</i>	NCTC 11168	0,256	< 0,016	0,032	0,064	0,51	0,256
	11168 cmeB	0,064	< 0,016	0,008	0,064	0,064	< 0,016
	11168 cmeF	0,256	< 0,016	0,064	0,256	0,256	0,064
	11168 cmeR	0,256	< 0,016	0,064	0,256	0,256	0,032
ELVT [%]	NCTC 11168	8	0,5	0,25	8	8	< 0,125
	11168 cmeB	4	0,25	1	2	4	< 0,125
	11168 cmeF	4	0,5	2	8	8	< 0,125
	11168 cmeR	4	0,5	2	---	---	---

***Legenda: Oznaka --- v preglednici pomeni, da ni podatka o vrednosti MIK. Inhibitorji so bili dodani v naslednjih koncentracijah: PAβN 2,02 mg/mL, NMP 10,1 µg/mL, CCCP 25,25 µg/mL, verapamil 10,1 µg/mL in reserpin 10,1 µg/mL. Koncentracija ELVT je v [%], koncentracija ostalih ekstraktov pa v mg/mL.

Rezultati določanja vrednosti MIK izbranih rastlinskih ekstraktov kažejo na to, da imata komercialna ekstrakta rožmarina V40 ter V70 največji protimikrobni učinek med testiranimi ekstrakti proti referenčnemu sevu *C. jejuni* NCTC 11168, z vrednostjo MIK 0,078 mg/mL. Po protimikrobni učinkovitosti jima sledi vodotopni ekstrakt A40, za tem pa I18. Določeno stopnjo protimikrobne aktivnosti proti referenčnemu sevu smo določili tudi za ekstrakt semen *A. katsumadai* in ELVT.

Izmerjene vrednosti MIK izbranih ekstraktov po dodatku inhibitorjev NMP, PAβN in CCCP so se v večini primerov zmanjšale v primerjavi z vrednostjo MIK teh ekstraktov v odsotnosti inhibitorjev. Padca vrednosti MIK izbranih ekstraktov po dodatku inhibitorjev reserpina in verapamila v večini primerov nismo opazili.

4.1.2 Relativni vpliv inhibitorjev in mutacij na protimikrobno učinkovitost rastlinskih ekstraktov

Relativni vpliv mutacij in inhibitorjev na odpornost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 prikazuje preglednica 12. Vpliv mutacij in kemijskih inhibitorjev na delovanje črpalk CmeABC in CmeDEF smo podali v obliki relativne vrednosti U oz. U_i . Večja relativna vrednost U oz. U_i pomeni večji vpliv mutacije oz. večjo učinkovitost inhibitorja na delovanje izlivnih črpalk.

Preglednica 12: Zbirna preglednica relativnega vpliva mutacij (U) na občutljivost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in relativnega učinka inhibitorjev izlivnih črpalk (U_i) na zmanjšano odpornost referenčnega seva proti izbranim rastlinskim ekstraktom.

EKSTRAKT	SEV <i>C. jejuni</i>	U	U_i				
			+ PAβN	+ NMP	+ verapamil	+ reserpin	+ CCCP
V40	NCTC 11168		4	2	0,5	0,5	4
	11168 cmeB	8	0	> 2	2	2	1
	11168 cmeF	0,5	16	2	1	1	2
	11168 cmeR	0,5	16	2	1	1	1
V70	NCTC 11168		4	2	1	1	2
	11168 cmeB	16	0,5	0,5	0,5	0,5	1
	11168 cmeF	1	> 78	4	1	1	2
	11168 cmeR	1	1	2	0,5	0,5	1
A40	NCTC 11168		4	2	1	1	4
	11168 cmeB	78	0	0	2	1	1
	11168 cmeF	1	2	4	0,5	0,5	1
	11168 cmeR	0,5	8	8	1	1	1
I18	NCTC 11168		> 313	16	8	16	63
	11168 cmeB	16	1	0,5	1	4	2
	11168 cmeF	0,5	16	2	1	1	2
	11168 cmeR	2	4	8	1	1	1
<i>Alpinia katsumadai</i>	NCTC 11168		> 16	8	4	0,5	1
	11168 cmeB	4	> 4	8	1	1	> 4
	11168 cmeF	1	> 16	4	1	1	4
	11168 cmeR	1	> 16	4	1	1	8
ELVT	NCTC 11168		16	32	1	1	> 64
	11168 cmeB	2	16	4	2	1	> 32
	11168 cmeF	2	8	2	0,5	0,5	> 32
	11168 cmeR	2	8	2	---	---	---

***Legenda: Oznaka --- v preglednici pomeni, da ni podatka o vrednosti MIK. Inhibitorji so bili dodani v naslednjih koncentracijah: PAβN 2,02 mg/mL, NMP 10,1 μg/mL, CCCP 25,25 μg/mL, verapamil 10,1 μg/mL in reserpin 10,1 μg/mL.

Pri preverjanju vpliva mutacij v genih, ki kodirajo izlivne črpalke, na občutljivost referenčnega seva *C. jejuni* smo ugotovili, da ima izlivna črpalka CmeABC pomembno funkcijo pri zagotavljanju odpornosti seva *C. jejuni* proti vsem testiranim rastlinskim ekstraktom. Izlivni sistem CmeDEF nima bistvenega učinka pri zagotavljanju odpornosti referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 proti testiranim rastlinskim ekstraktom. Regulatorni protein CmeR v večini primerov ni povzročil povečanja izražanja izlivne črpalke CmeABC.

Mutacija v genu *cmeB* je v primeru ekstrakta A40 povzročila padec vrednosti MIK za faktor 78, v primeru ekstraktov V70 in I18 pa za faktor 16. Nekoliko slabši vpliv mutacije

v genu *cmeB* smo zaznali pri ekstraktih V40, *A. katsumadai* in ELVT. Mutacija v genu *cmeF* je povzročila rahlo povečanje odpornosti mutiranega seva proti ekstraktoma V40 in I18, medtem ko v primeru večine ostalih ekstraktov spremembe v občutljivosti mutiranega seva nismo opazili. Pri sevu z mutacijo v regulatornem genu *cmeR* smo opazili povečano odpornost mutiranega seva proti ekstraktoma V40 in A40.

Kot najučinkovitejša inhibitorja izlivnih črpalk pri referenčnem sevu *C. jejuni* NCTC 11168 sta se izkazala inhibitorja NMP in PAβN, nekoliko slabši učinek smo zaznali pri inhibitorju CCCP. Inhibitorja verapamil in reserpin sta bila učinkovita v smislu povečanja občutljivosti referenčnega seva *C. jejuni* proti ekstraktu I18, ne pa tudi proti protimikrobnemu delovanju ostalih testiranih rastlinskih ekstraktov.

4.1.3 Protimikrobna učinkovitost čistih fenolnih spojin (MIK)

Rezultate določanja protimikrobnega delovanja odpornosti čistih fenolnih spojin v odsotnosti in prisotnosti izbranih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na referenčni sev *C. jejuni* (NCTC 11168) in mutirane seve (cmeB, cmeF, cmeR) prikazuje preglednica 13.

Preglednica 13: Zbirna preglednica vrednosti MIK seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovih mutiranih različic proti izbranim čistim fenolnim spojinam v odsotnosti in prisotnosti različnih inhibitorjev izlivnih črpalk.

EKSTRAKT	SEV <i>C. jejuni</i>	MIK ekstrakta [mg/mL]	MIK [mg/mL]				
			+ PAβN	+ NMP	+ verapamil	+ reserpin	+ CCCP
EGKG	NCTC 11168	0,313	0,010	0,078	0,078	0,078	0,020
	11168 cmeB	0,078	0,020	0,020	0,078	0,078	0,156
	11168 cmeF	0,078	0,020	0,020	0,078	0,078	0,010
	11168 cmeR	0,313	0,010	0,001	0,078	0,078	0,020
Rožmarinska k.	NCTC 11168	0,156	0,039	0,039	0,156	0,156	0,020
	11168 cmeB	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,001
	11168 cmeF	0,313	0,156	0,078	0,156	0,078	0,039
	11168 cmeR	0,313	0,078	0,156	0,313	0,313	0,156
Karnozolna k.	NCTC 11168	0,020	< 0,001	0,005	0,010	0,010	0,005
	11168 cmeB	0,020	0	0,002	0,010	0,020	0,020
	11168 cmeF	0,039	0,002	0,039	0,039	0,039	0,039
	11168 cmeR	0,078	< 0,001	0,039	0,078	0,078	0,078
Klorogenska k.	NCTC 11168	0,313	0,002	0,625	0,625	0,625	0,078
	11168 cmeB	0,005	0	0,002	0,010	0,005	0,001
	11168 cmeF	0,313	0,313	0,625	0,313	0,625	0,156
	11168 cmeR	0,313	0,039	0,078	0,313	0,625	0,156
Vanilinska k.	NCTC 11168	0,313	< 0,001	0,005	0,078	0,156	0,156
	11168 cmeB	0,039	0,010	0,002	0,039	0,020	0,020
	11168 cmeF	0,313	0,156	0,156	0,313	0,313	0,313
	11168 cmeR	0,156	0,010	0,078	0,156	0,156	0,156
Galna k.	NCTC 11168	0,313	< 0,010	0,020	0,078	0,156	0,078
	11168 cmeB	0,005	0	0	0,005	0,005	0
	11168 cmeF	0,078	0,020	0,039	0,039	0,039	0,078
	11168 cmeR	0,078	< 0,010	0,039	0,078	0,078	0,078
Siringična k.	NCTC 11168	0,313	0,156	0,156	0,313	0,313	0,020
	11168 cmeB	0,078	< 0,001	< 0,001	0,039	0,078	< 0,001
	11168 cmeF	0,156	0,020	0,039	0,078	0,078	0,010
	11168 cmeR	0,156	< 0,010	0,039	0,156	0,156	0,156
Sinapinska k.	NCTC 11168	0,313	< 0,0098	< 0,010	0,039	0,020	0,078
	11168 cmeB	0,078	< 0,0012	< 0,001	0,156	0,078	< 0,001
	11168 cmeF	0,156	0,039	0,078	0,078	0,078	0,156
	11168 cmeR	0,156	< 0,010	0,156	0,156	0,156	0,156
Ferulna k.	NCTC 11168	0,313	0,010	0,078	0,156	0,313	0,313
	11168 cmeB	0,078	< 0,001	0,002	0,078	0,039	< 0,001
	11168 cmeF	0,156	0,039	0,039	0,313	0,313	< 0,010
	11168 cmeR	0,156	< 0,010	0,039	0,156	0,156	0,156

***Legenda: Inhibitorji so bili dodani v naslednjih koncentracijah: PAβN 2,02 mg/mL, NMP 10,1 µg/mL, CCCP 25,25 µg/mL, verapamil 10,1 µg/mL in reserpin 10,1 µg/mL.

Med fenolnimi kislinami smo največjo protimikrobno aktivnost proti referenčnemu sevu *C. jejuni* določili za karnozolno kislino. Vrednost MIK za karnozolno kislino je znašala 0,020 mg/mL, kar je bistveno nižja vrednost v primerjavi z ostalimi fenolnimi kislinami, kjer so bile izmerjene vrednosti MIK tudi do 16-krat višje. Po protimikrobni učinkovitosti je karnozolna kislina sledila rožmarinska kislina. Med ostalimi fenolnimi kislinami nismo opazili razlik v protimikrobni učinkovitosti, saj je vrednost MIK v vseh primerih znašala 0,313 mg fenolne kisline na mL gojišča. Karnozolna kislina je bila protimikrobno učinkovitejša tudi v primerjavi s flavonoidom EGKG, za katerega je izmerjena vrednost MIK znašala 0,313 mg/mL gojišča.

Vrednosti MIK večine fenolnih spojin po dodatku inhibitorjev NMP in PAβN so se v večini primerov zmanjšale v primerjavi z vrednostimi MIK fenolnih spojin brez dodanega inhibitorja.

4.1.4 Relativni vpliv inhibitorjev in mutacij na protimikrobno učinkovitost fenolnih spojin

Za referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 smo izračunali relativni vpliv mutacij v genih, odgovornih za izlivne črpalke, ter relativno učinkovitost petih različnih inhibitorjev pri zmanjšanju učinkovitosti fenolnih spojin proti referenčnemu sevu. Rezultate prikazuje preglednica 14.

Preglednica 14: Zbirna preglednica relativnega vpliva mutacij (U) na občutljivost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in relativne učinkovitosti inhibitorjev izlivnih črpalk (U_i) na zmanjšano odpornost referenčnega seva proti izbranim čistim fenolnim spojinam.

EKSTRAKT	SEV <i>C. jejuni</i>	U	U _i				
			+ PAβN	+ NMP	+ verapamil	+ reserpin	+ CCCP
EGKG	NCTC 11168		31	4	4	4	16
	11168 cmeB	4	4	4	1	1	1
	11168 cmeF	4	4	4	1	1	8
	11168 cmeR	1	31	313	4	4	16
Rožmarinska k.	NCTC 11168		4	4	1	1	8
	11168 cmeB	156	0	1	1	1	1
	11168 cmeF	0,5	2	4	2	4	8
	11168 cmeR	0,5	4	2	1	1	2
Karnozolna k.	NCTC 11168		>20	4	2	2	4
	11168 cmeB	1	0	10	2	1	1
	11168 cmeF	1	20	1	1	1	1
	11168 cmeR	0,3	>78	2	1	1	1
Klorogenska k.	NCTC 11168		157	1	1	1	4
	11168 cmeB	63	0	3	1	1	5
	11168 cmeF	1	1	1	1	1	2
	11168 cmeR	1	8	4	1	1	2
Vanilinska k.	NCTC 11168		>313	63	4	2	2
	11168 cmeB	8	4	20	1	2	2
	11168 cmeF	1	2	2	1	1	1
	11168 cmeR	2	16	2	1	1	1
Galna k.	NCTC 11168		>31	16	4	2	4
	11168 cmeB	63	0	0	1	1	0
	11168 cmeF	4	4	2	2	2	1
	11168 cmeR	4	>8	2	1	1	1
Siringična k.	NCTC 11168		2	2	1	1	16
	11168 cmeB	4	>78	>78	2	1	>78
	11168 cmeF	2	8	4	2	2	16
	11168 cmeR	2	>16	4	1	1	1
Sinapinska k.	NCTC 11168		>31	>31	8	16	4
	11168 cmeB	4	>78	>78	1	1	>78
	11168 cmeF	2	4	2	2	2	1
	11168 cmeR	2	>16	1	1	1	1
Ferulna k.	NCTC 11168		31	4	2	1	1
	11168 cmeB	4	>78	39	1	2	>78
	11168 cmeF	2	4	4	0,5	0,5	>16
	11168 cmeR	2	>16	4	1	1	1

***Legenda: Inhibitorji so bili dodani v naslednjih koncentracijah: PAβN 2,02 mg/mL, NMP 10,1 µg/mL, CCCP 25,25 µg/mL, verapamil 10,1 µg/mL in reserpin 10,1 µg/mL.

Rezultati ugotavljanja vpliva mutacije v genu *cmeB* na protimikrobni učinek fenolnih spojin proti referenčnemu sevu *C. jejuni* NCTC 11168 potrjujejo vpletenost izlivne črpalke CmeABC pri zagotavljanju odpornosti proti večini testiranih fenolnih spojin. Mutacija v genu *cmeF* je v nekaterih primerih povzročila zmanjšanja vrednosti MIK testiranih fenolnih spojin, v nekaterih pa povečanje MIK v primerjavi z vrednostmi MIK referenčnega seva. Mutiran regulatorni protein CmeR je v mutiranem sevu povzročil povečanje vrednosti MIK rožmarinske kisline, karnozolne kisline in EGKG v primerjavi z MIK referenčnega seva, v ostalih primerih pa so se vrednosti MIK ostalih fenolnih spojin znižale ali ostale nespremenjene v primerjavi z referenčnim sevom *C. jejuni* NCTC 11168.

Rezultati so pokazali, da je inhibitor izlivnih črpalk PA β N najučinkovitejši med testiranimi inhibitorji, saj se je v vseh primerih povečal protimikrobni učinek izbranih fenolnih snovi proti referenčnemu sevu. Po učinkovitosti je inhibitorju PA β N sledil inhibitor NMP, v nekaterih primerih je bil učinkovit tudi CCCP.

4.2 MODULATORNA VLOGA EKSTRAKTA SEMEN *A. katsumadai* IN EGKG

V eksperiment smo vključili 4 izolate *C. jejuni* (NCTC 11168, K49/4, 375, FC8), pridobljene iz različnih virov (humani, perutnina, svinjina), ter 3 izolate *C. coli* (137, 140, 171), izolirane iz perutnine. Spremljali smo občutljivost izbranih sevov proti 6 različnim antibiotikom (eritromicin, ciprofloksacin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin, tilozin), žolčnim solem, natrijevemu deoksiholatu ter etidijevemu bromidu. Modulatorni učinek na protimikrobno delovanje antibiotikov smo preverili za flavonoid EGKG ter ekstrakt semen *A. katsumadai* in sicer tako, da smo določili tudi vrednosti MIK z dodanimi subinhibitornimi koncentracijami MIK epigalokatehin galata in ekstrakta semen *A. katsumadai*. Na podlagi rezultatov predhodnih študij smo se odločili, da preverimo modulatorni učinek dveh koncentracij izbranih modulatorjev, in sicer polovično (0,5 MIK) in četrtinsko (0,25 MIK) vrednost MIK za EGKG in ekstrakt semen *A. katsumadai*. Rezultate smo ovrednotili kot vrednost U_m , ki predstavlja relativno vrednost oz. razmerje med izmerjeno MIK testirane učinkovine z dodanim modulatorjem.

4.2.1 Protimikrobna učinkovitost EGKG, ekstrakta semen *A. katsumadai* ter V40 proti sevom različnega izvora

Preglednica 15 prikazuje protimikrobni učinek (MIK) ekstrakta semen *A. katsumadai*, V40 in EGKG za izbrane seve *C. jejuni* in *C. coli*. Vse 3 testirane učinkovine kažejo protimikrobno aktivnost proti izbranim sevom *C. jejuni* in *C. coli*.

Preglednica 15: Zbirna preglednica protimikrobne učinkovitosti (MIK) ekstraktov semen *A. katsumadai*, V40 in EGKG proti sevom *C. jejuni* in *C. coli*.

SEV		MIK [mg/mL]		
		<i>A. katsumadai</i>	EGKG	V40
<i>C. jejuni</i>	K49/4	0,064	0,078	0,078
	NCTC 11168	0,258	0,313	0,078
	375	0,064	0,078	1,250
	FC8	1,025	0,625	0,313
<i>C. coli</i>	137	0,513	0,625	---
	140	1,025	0,625	---
	171	1,025	0,078	---

***Legenda: Oznaka --- pomeni, da nismo uspeli pridobiti podatka o vrednosti MIK.

4.2.2 Vpliv EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja izbranih antibiotikov proti sevom *Campylobacter* različnega izvora

Spremljali smo odpornost izbranih sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti 5 antibiotikom iz skupine makrolidov (eritromicin, tilozin, diritromicin, klaritromicin, azitromicin) in antibiotiku ciprofloksacinu iz skupine fluorokinolonov. Modulatorni učinek na protimikrobno delovanje antibiotikov smo preverjali za 2 različni subinhibitorni koncentraciji EGKG (označene kot $+0,5\text{MIK}_{\text{EGKG}}$ in $+0,25\text{MIK}_{\text{EGKG}}$) za določen bakterijski sev. Rezultati so prikazani v preglednici 16.

Preglednica 16: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti različnim antibiotikom v odsotnosti in prisotnosti EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja.

ANTI-BIOTIK	SEV	MIK _{Ant.} [μg/mL]	MIK [μg/mL]			
			+0,5MIK _{GKG}	U _m	+0,25MIK _{EGKG}	U _m
Eritromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	0,5	0,13	4	1
		NCTC 11168	0,25	0,06	4	8
		375	512	>512	>1	>1
		FC8	128	8	16	8
	<i>C. coli</i>	137	512	31	17	16
		140	512	64	8	8
		171	512	128	4	4
Ciprofloksacin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	1	0,13	8	16
		NCTC 11168	0,25	0,06	4	8
		375	512	>512	>1	>1
		FC8	128	8	16	8
	<i>C. coli</i>	137	---	---	---	---
		140	---	---	---	---
		171	---	---	---	---
Azitromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	0,125	0,06	2	2
		NCTC 11168	1	0,03	32	32
		375	512	256	2	2
		FC8	4	<0,25	>16	<0,25
	<i>C. coli</i>	137	512	32	16	16
		140	512	64	8	32
		171	512	128	4	4
Klaritromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	1	1	0,5	0,5
		NCTC 11168	0,5	0,13	4	4
		375	512	32	16	16
		FC8	256	64	4	8
	<i>C. coli</i>	137	128	32	4	4
		140	256	64	4	4
		171	512	64	8	32
Diritromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	2	0,5	4	4
		NCTC 11168	0,25	0,03	8	4
		375	512	32	16	16
		FC8	256	>2	>128	8
	<i>C. coli</i>	137	512	64	8	8
		140	512	128	4	4
		171	128	64	2	4
Tilozin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	1	<0,016	>62	0,03
		NCTC 11168	1	0,06	16	2
		375	512	64	8	8
		FC8	16	4	4	1
	<i>C. coli</i>	137	512	128	4	8
		140	512	8	64	64
		171	512	8	64	64

***Legenda: Vpliv EGKG smo preverili za 2 subinhibitorni koncentraciji, za 0,5 MIK_{EGKG} in 0,25 MIK_{EGKG}. Oznaka U_m predstavlja učinkovitost modulatorne snovi, oznaka --- pomeni manjkajoč podatek.

Vsi sevi *C. coli*, uporabljeni v eksperimentu, so se izkazali kot zelo odporni proti testiranim antibiotikom, saj so vrednosti MIK uporabljenih antibiotikov pri skoraj vseh sevih *C. jejuni* znašale kar 512 μg/mL antibiotika. Med sevi *C. jejuni* se je kot najbolj odporen proti več različnim antibiotikom izkazal sev 375. Največ sevov *C. jejuni* in *C. coli*

je bilo odpornih proti antibiotiku eritromicinu.

Največji modulatorni učinek EGKG smo zaznali pri sevih *C. coli* 140 in 171 odpornih proti antibiotiku tilozinu, kjer smo po dodatku obeh subinhibitornih koncentracij EGKG opazili padec vrednosti MIK za faktor 64. Višja subinhibitorna koncentracija EGKG je zelo učinkovito delovala modulatorno tudi na protimikrobno delovanje diritromicina, azitromicina, ciprofloksacina in eritromicina proti sevu *C. jejuni* FC8, kjer so se vrednosti MIK znižale za faktor 16 do 128. V nekaterih primerih pa se je kot bolj učinkovita v smislu modulatornega učinka izkazala še nižja koncentracija EGKG, to je $0,25 \text{ MIK}_{\text{EGKG}}$.

4.2.3 Vpliv ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* kot modulatorja protimikrobnega delovanja izbranih antibiotikov proti sevom *Campylobacter* različnega izvora

Modulatorni učinek na protimikrobno delovanje izbranih antibiotikov smo preverjali za 2 različni subinhibitorni koncentraciji ekstrakta semen *A. katsumadai*, in sicer za koncentraciji, ki sta polovični ($0,5 \text{ MIK}_{\text{Alp}}$) in četrtinski ($0,25 \text{ MIK}_{\text{Alp}}$) vrednosti MIK za posamezen sev. Rezultati so prikazani v preglednici 17.

Preglednica 17: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti različnim antibiotikom v odsotnosti in prisotnosti *A. katsumadai* kot modulatorja protimikrobnega delovanja.

ANTIBIOTIK	SEV	MIK		MIK [$\mu\text{g/mL}$]			
		Ant. [$\mu\text{g/mL}$]		+ 0,5MIK _{Alp}	U _m	+ 0,25MIK _{Alp}	U _m
Eritromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	0,5	0,06	8	0,13	4
		NCTC 11168	0,25	0,03	8	0,03	8
		375	512	>512	>1	>512	>1
		FC8	128	64	2	32	4
	<i>C. coli</i>	137	512	16	32	32	16
		140	512	64	8	64	8
		171	512	32	16	128	4
Ciprofloksacin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	1	0,13	8	0,26	4
		NCTC 11168	0,25	0,03	8	0,03	8
		375	512	>512	>1	>512	>1
		FC8	128	64	2	32	4
	<i>C. coli</i>	137	---	---	---	---	---
		140	---	---	---	---	---
		171	---	---	---	---	---
Azitromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	0,125	0,06	2	0,06	2
		NCTC 11168	1	0,25	4	0,25	4
		375	512	256	2	256	2
		FC8	4	1	4	2	2
	<i>C. coli</i>	137	512	64	8	64	8
		140	512	32	16	16	32
		171	512	256	2	128	4
Klaritromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	0,5	0,5	1	0,5	1
		NCTC 11168	0,5	0,25	2	0,25	2
		375	512	128	4	128	4
		FC8	256	128	2	128	2
	<i>C. coli</i>	137	128	32	4	32	4
		140	256	64	4	64	4
		171	512	8	64	32	16
Diritromicin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	2	1	2	0,50	4
		NCTC 11168	0,25	0,06	4	0,06	4
		375	512	128	4	64	8
		FC8	256	32	8	32	8
	<i>C. coli</i>	137	512	32	16	32	16
		140	512	128	4	128	4
		171	128	16	8	8	16
Tilosin	<i>C. jejuni</i>	K49/4	1	0,25	4	0,25	4
		NCTC 11168	1	0,5	2	0,5	2
		375	512	128	4	128	4
		FC8	16	8	2	8	2
	<i>C. coli</i>	137	512	64	8	128	4
		140	512	16	32	32	16
		171	512	16	32	16	32

***Legenda: Vpliv ekstrakta *A. katsumadai* smo preverili za 0,5 MIK *A. katsumadai* (označeni kot +0,5 MIK_{Alp}) in 0,25 MIK *A. katsumadai* (označeni kot +0,25 MIK_{Alp}). Oznaka U_m predstavlja učinkovitost modulatorne snovi, oznaka --- pomeni manjkajoče podatke.

Iz rezultatov je razvidna določena stopnja modulatornega delovanja ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* na učinkovitost izbranih antibiotikov. Največji modulatorni učinek smo opazili pri sevih *C. coli*, ki so bili proti testiranim antibiotikom tudi najbolj odporni. Kot nekoliko bolj učinkovita se je izkazala višja subinhibitorna koncentracija ekstrakta. 0,5 MIK ekstrakta semen *A. katsumadai* je kar 64-krat zmanjšala MIK klaritromicina pri sevu *C. coli* 171 (U_m v preglednici 17), medtem ko je bil EGKG kot modulator v tem primeru nekoliko manj učinkovit (U_m v preglednici 16). Prav tako smo za *A. katsumadai* dokazali boljšo modulatorno učinkovitost na protimikrobno delovanje eritromicina proti *C. coli* 137 in 171 ter na delovanje azitromicina proti *C. coli* 140, v primerjavi z modulatornim učinkom EGKG.

4.2.4 Vpliv EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja EtBr, ŽS in ND proti sevom *Campylobacter* različnega izvora

Določili smo protimikrobno delovanje EtBr, ŽS in ND na izbrane seve *C. jejuni* in *C. coli* ter modulatorni učinek EGKG na protimikrobno delovanje teh snovi. Dobljeni rezultati v obliki vrednosti MIK brez in z dodanim modulatorjem EGKG v dveh različnih subinhibitornih koncentracijah so predstavljeni v preglednici 18.

Preglednica 18: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti EtBr, ŽS in ND v odsotnosti in prisotnosti EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja.

PROTIMIKRO- BNA SNOV	SEV	MIK	MIK			
			+0,5MIK _{EGKG}	U_m	+0,25MIK _{EGKG}	U_m
EtBR [μg/mL]	<i>C. jejuni</i>	K49/4	16	2	4	8
		NCTC 11168	0,5	4	0,5	4
		375	16	4	8	8
		FC8	0,5	128	0,25	256
	<i>C. coli</i>	137	---	---	---	---
		140	---	---	---	---
		171	---	---	---	---
ŽS [mg/mL]	<i>C. jejuni</i>	K49/4	8	8	32	2
		NCTC 11168	8	8	<4	> 16
		375	1	16	<1	> 16
		FC8	16	4	<4	> 16
	<i>C. coli</i>	137	32	1	16	2
		140	16	2	32	1
		171	4	8	2	16
ND [mg/mL]	<i>C. jejuni</i>	K49/4	< 4	> 16	32	2
		NCTC 11168	< 2	> 16	< 2	> 16
		375	< 1	> 8	< 1	> 8
		FC8	32	2	32	2
	<i>C. coli</i>	137	64	32	1	64
		140	16	---	---	---
		171	16	1	8	2

***Legenda: Vpliv EGKG smo preverili za 2 subinhibitorni koncentraciji, za 0,5 MIK_{EGKG} in 0,25 MIC_{EGKG}. Oznaka U_m predstavlja učinkovitost modulatorne snovi, oznaka --- pomeni manjkajoč podatek. Vrednosti MIK za EtBr so v μg/mL, vrednosti MIK za ŽS in ND pa v mg/mL.

Odpornost proti barvilu etidijevemu bromidu smo preverjali le pri sevih *C. jejuni*. Največjo občutljivost proti EtBr smo določili za referenčni sev NCTC 11168, medtem ko so bili ostali sevi *C. jejuni* bistveno manj občutljivi na protimikrobno delovanje EtBr. Pri vseh testiranih sevih *C. jejuni* in *C. coli* smo opazili določeno stopnjo odpornosti proti ŽS in ND.

Rezultati kažejo, da sta bili obe uporabljeni subinhibitorni koncentraciji EGKG izredno učinkoviti kot modulatorja protimikrobnega delovanja EtBr, ŽS in ND pri večini testiranih sevov *C. jejuni* in *C. coli*. Dodatek EGKG v subinhibitornih koncentracijah je povzročil znižanje vrednosti MIK testiranih učinkovin za faktor 2 do 256 (U_m v preglednici 18) v primerjavi z vrednostmi MIK brez dodanega modulatorja.

4.2.5 Vpliv ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* kot modulatorja protimikrobnega delovanja EtBr, ŽS in ND proti sevom *Campylobacter* različnega izvora

Primerjali smo vrednosti MIK EtBr, ND in ŽS za izbrane seve *C. jejuni* in *C. coli* ob odsotnosti in prisotnosti dveh subinhibitornih koncentracij ekstrakta semen *A. katsumadai*, da bi ugotovili modulatorni učinek tega ekstrakta na protimikrobno delovanje EtBr ND in ŽS. Rezultate prikazuje preglednica 19.

Preglednica 19: Zbirna preglednica vrednosti MIK kot merila odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti EtBr, ŽS in ND v odsotnosti in prisotnosti ekstrakta semen *A. katsumadai* kot modulatorja protimikrobnega delovanja.

PROTIMIKRO- BNA SNOV	SEV	MIK	MIK			
			+0,5 MIK _{Alp}	U_m	+0,25 MIK _{Alp}	U_m
EtBr [μg/mL]	<i>C. jejuni</i>	K49/4	32	8	4	4
		NCTC 11168	2	1	2	0,5
		375	64	8	8	8
		FC8	64	1	64	1
	<i>C. coli</i>	137	---	---	---	---
		140	---	---	---	---
		171	---	---	---	---
ŽS [mg/mL]	<i>C. jejuni</i>	K49/4	64	128	1	64
		NCTC 11168	64	16	4	8
		375	16	4	4	4
		FC8	64	32	2	32
	<i>C. coli</i>	137	32	16	2	32
		140	32	8	4	32
		171	32	2	16	2
ND [mg/mL]	<i>C. jejuni</i>	K49/4	64	16	4	16
		NCTC 11168	32	16-32	1	32
		375	8	16	1	16
		FC8	64	32	2	16
	<i>C. coli</i>	137	64	2	32	2
		140	16	---	---	---
		171	16	1	16	2

***Legenda: Vpliv ekstrakta *A. katsumadai* smo preverili za 0,5 MIK_{Alp} in 0,25 MIC_{Alp}. Oznaka U_m predstavlja učinkovitost modulatorne snovi. Vrednosti MIK za EtBr so v μg/mL, vrednosti MIK za ŽS in ND pa v mg/mL. Oznaka --- pomeni manjkajoč podatek.

Ekstrakt semen *Alpinia katsumadai* je pokazal določeno stopnjo modulatornega učinka na protimikrobno delovanje EtBr, ND in ŽS pri večini sevov *C. jejuni* in *C. coli*. Vrednosti MIK po dodatku obeh subinhibitornih koncentracij *Alpinia katsumadai* se v nekaterih primerih niso spremenile, v ostalih primerih pa so se zvišale za faktor 2 do 64 v primerjavi z vrednostimi MIK brez dodanega modulatorja (vrednosti U_m v preglednici 19).

4.2.6 Vpliv EGKG in ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* kot modulatorjev protimikrobnega delovanja V40 proti sevom *Campylobacter*

Preverili smo modulatorni učinek EGKG in ekstrakta semen *A. katsumadai* na protimikrobno delovanje ekstrakta V40 pri izbranih sevih *C. jejuni*, kar prikazuje preglednica 20.

Preglednica 20: Zbirna preglednica rezultatov ugotavljanja modulatornega delovanja ekstrakta semen *A. katsumadai* in EGKG na protimikrobno delovanje ekstrakta V40.

EKSTRAKT	SEV <i>C. jejuni</i>	MIK [mg/mL]		EGKG kot modulator			
		V40	EGKG	+0,5MIK _{EGKG}	U_m	+0,25 MIK _{EGKG}	U_m
V40	K49/4	0,078	0,078	0,020	4	0,039	2
	NCTC 11168	0,078	0,313	< 0,010	> 8	0,020	4
	375	1,250	0,078	0,313	4	0,313	4
	FC8	0,313	0,625	0,039	8	0,020	16
EKSTRAKT	SEV <i>C. jejuni</i>	MIK [mg/mL]		<i>Alpinia katsumadai</i> kot modulator			
		V40	Alp.	+0,5 MIK _{Alp.}	U_m	+0,25 MIK _{Alp.}	U_m
V40	K49/4	0,078	0,064	0,020	4	0,039	2
	NCTC 11168	0,078	0,516	0,020	4	0,020	4
	375	1,250	0,258	0,625	2	0,313	4
	FC8	0,313	1,025	0,078	4	0,156	2

***Legenda: Oznaka U_m predstavlja učinkovitost modulatorne snovi.

Na protimikrobno delovanje ekstrakta rožmarina V40 proti izbranim sevom *C. jejuni* smo največji modulatorni učinek zaznali pri dodatku EGKG. V splošnem je bila učinkovitejša višja subinhibitorna koncentracija EGKG, z izjemo pri sevu FC8, kjer je bila učinkovitejša nižja subinhibitorna koncentracija. Bistvenih razlih v modulatornem učinku med obema subinhibitornima koncentracijama ekstrakta semen *A. katsumadai* pri različnih sevih *C. jejuni* nismo opazili.

5 RAZPRAVA

Že pred uporabo antibiotikov in sintetičnih protimikrobnih snovi so bile rastline pomemben vir protimikrobnih učinkovin, naravnih snovi z dokazano protimikrobno učinkovitostjo (Gibbons, 2008). Uporaba protimikrobnih sredstev v veterinarski in humani medicini je doprinesla k povečani odpornosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem. Trend naraščanja odpornosti proti protimikrobnim snovem, predvsem proti antibiotikom iz skupine fluorokinolonov in makrolidov, je v zadnjem času opazen tudi pri bakterijah rodu *Campylobacter* (Quinn in sod., 2007). V boju proti širjenju odpornih sevov lahko rešitev predstavljajo snovi rastlinskega izvora, ki so obsežen, še neizkoriščen vir zdravih učinkovin z ogromnim terapevtskim potencialom. Nekatere aktivne sestavine rastlin, med temi tudi fenolne spojine, lahko s svojim delovanjem zmanjšajo stopnjo odpornosti bakterij proti različnim antibiotikom (Palaniappan in Holley, 2010).

Značilnost bakterij rodu *Campylobacter* je, da so netipične v njihovih ekoloških značilnostih, so občutljive na različne okoljske razmere ter da imajo neznane in predvsem drugačne mehanizme in regulacijske poti. Zaradi teh značilnosti so bakterije rodu *Campylobacter* bolj občutljive na različne protimikrobne snovi od drugih po Gramu negativnih bakterij (Klančnik in sod., 2010).

Odpornost bakterij *Campylobacter* na protimikrobne snovi je v določeni meri tudi posledica delovanja membranskih izlivnih črpalk, ki preprečijo dostop protimikrobne snovi do tarče v celici, kar dosežejo z iznosom le teh iz celice.

Namen diplomske naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje različnih rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin na bakterije *Campylobacter* ter ugotoviti vlogo membranskih izlivnih črpalk pri zagotavljanju odpornosti proti rastlinskim ekstraktom in fenolnim snovem. Vpliv membranskih izlivnih črpalk smo ugotavljali preko mutacij v genih, odgovornih za delovanje črpalk, kot tudi z uporabo nekaterih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk. Poleg tega je bil naš namen tudi testirati naravne spojine s potencialnim modulatornim delovanjem na mehanizme odpornosti pri bakterijah *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli*. Pri tem smo spremljali učinek EGKG in ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* na znižanje odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti različnim antibiotikom, ŽS, ND in EtBr.

5.1 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IN FENOLNIH SPOJIN TER VPLETENOST EFLUKSA

Protimikrobno delovanje proti referenčnemu sevu *C. jejuni* NCTC 11168 smo določali za 4 različne komercialne ekstrakte rožmarina (V40, V70, A40 in I18), za ekstrakt semen *A. katsumadai* ter ekstrakt listov vinske trte, kot tudi za različne fenolne kisline (karnozolna, rožmarinska, klorogenska, vanilinska, galna, siringična, sinapinska, ferulna) in EGKG.

5.1.1 Protimikrobna učinkovitost ekstraktov rožmarina

Fenolne spojine so po raziskavah številnih avtorjev odgovorne za protimikrobni učinek, ki ga pripisujejo rožmarinu. Za protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina so tako v

največji meri odgovorne tri sestavine, in sicer karnozolna kislina, rožmarinska kislina in karnozol (Moreno in sod., 2006). Komercialni ekstrakti rožmarina, ki smo jih uporabili v tem eksperimentu, se med seboj razlikujejo prav glede na vsebnost glavne aktivne sestavine, ki je v primeru V40, V70 in I18 karnozolna kislina, v primeru A40 pa rožmarinska kislina. Vsebnost glavne aktivne sestavine ekstrakta ima tako neposreden vpliv na protimikrobni učinek, dodatno pa lahko vplivajo tudi ostale fenolne spojine, prisotne v ekstraktih, kar navajajo tudi Klančnik in sod. (2009a). Poleg sestave ekstrakta lahko na protimikrobno učinkovitost ekstrakta proti bakterijam vpliva tudi topnost ekstrakta. Vpliv glavne aktivne sestavine na protimikrobno delovanje ekstrakta smo ovrednotili tudi na podlagi primerjave s protimikrobnim delovanjem čistih fenolnih kislin.

Klančnik in sod. (2009a) so v študiji *in vitro* protimikrobne in antioksidativne aktivnosti komercialnih ekstraktov rožmarina ugotavljali povezavo med protimikrobno aktivnostjo in kemijsko sestavo komercialnih ekstraktov rožmarina. Protimikrobni učinek ekstrakta V40 je bil zelo podoben učinku čiste karnozolne kisline proti vsem testiranim bakterijam, medtem ko izmerjene vrednosti MIK za vodotopni ekstrakt A40 in čisto rožmarinsko kislino niso sovpadale. Dokazali so tudi boljšo protimikrobno učinkovitost oljetopnih ekstraktov kljub nižji vsebnosti skupnih fenolnih spojin v primerjavi z vodotopnim ekstraktom A40.

Na podlagi rezultatov predhodnih študij smo torej predpostavili, da bodo imeli vsi testirani komercialni ekstrakti rožmarina inhibitorni učinek na referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168. Predvidevali smo, da bo imel V70, ki vsebuje 70 % karnozolne kisline, večji protimikrobni učinek na bakterije *C. jejuni*, kot V40 s 40 % karnozolne kisline. A40 je vodotopen ekstrakt rožmarina, ki vsebuje 40 % rožmarinske kisline kot glavne aktivne sestavine. Na podlagi rezultatov predhodnih študij smo sklepali, da bo imel ekstrakt A40 nekoliko slabši protimikrobni učinek kot V40. Najslabšo protimikrobno aktivnost smo pričakovali za ekstrakt I18, saj vsebuje le 18 % karnozolne kisline kot glavne aktivne sestavine.

Rezultate določanja protimikrobne učinkovitosti izbranih rastlinskih ekstraktov proti sevu *C. jejuni* NCTC 11168 prikazuje preglednica 11. Rezultati določanja protimikrobnega učinka ekstraktov rožmarina na referenčni sev *C. jejuni* 11168 so deloma potrdili naša pričakovanja, da sta bila v smislu protimikrobnega delovanja najučinkovitejša ekstrakta V40 in V70. Čeprav smo pričakovali, da bo ekstrakt V70 nekoliko učinkovitejši, smo za oba ekstrakta izmerili isto vrednost MIK, ki je znašala 0,078 mg/mL. Nekoliko slabši učinek smo zaznali pri ekstraktu A40, kot najmanj učinkovit pa se je izkazal I18 z vrednostjo MIK 0,313 mg/mL. Iz rezultatov lahko sklepamo, da ima karnozolna kislina boljši protimikrobni učinek na *C. jejuni* kot rožmarinska kislina. Sestava rastlinskih ekstraktov ter razmerje med sestavinami rastlinskih ekstraktov je torej bistveno za njihovo protimikrobno delovanje. Ena od možnih razlag, zakaj smo pri ekstraktih V40 in V70 zaznali enake vrednosti MIK, je nepoznavanje natančnega razmerja in vsebnosti ostalih sestavin ekstraktov, pa tudi same metode (natančnost metode bi lahko povečali s testiranjem vmesnih koncentracij). Posamezne sestavine ekstraktov med seboj lahko različno reagirajo, kar se kaže v različnih protimikrobnih učinkih ekstraktov.

5.1.2 Protimikrobna učinkovitost fenolnih kislin

Preverili smo tudi protimikrobno delovanje 8 različnih fenolnih kislin proti referenčnemu sevu *C. jejuni* NCTC 11168. Galna kislina, vanilinsko kislino ter siringično kislino uvrščamo med hidroksibenzojske kisline, sinapinsko in ferulno kislino pa med hidroksicimetne kisline (Balasundram in sod., 2006; Tarnawski in sod., 2006). Klorogenska kislina je ester kavne in kina kisline. Hidroksicimetne kisline kažejo večjo antioksidativno ter protimikrobno aktivnost v primerjavi s hidroksibenzojskimi kislinami, kar je posledica skupine $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, ki jo vsebujejo, zaradi daljše nepolarne verige pa tudi lažje prodrejo v celice. Na protimikrobno učinkovitost fenolnih kislin vpliva tudi prisotnost in število $-\text{OCH}_3$ skupin, prisotnost $-\text{OH}$ skupin ter $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ skupin. Čim večje kot je število metoksi skupin, tem večji je protimikrobni učinek fenolne kisline. (Balasundram in sod., 2006; Kim in sod., 2006). Tako naj bi bila sinapinska kislina z dvema $-\text{OCH}_3$ skupinama najučinkovitejša, sledila naj bi ji ferulna z 1 $-\text{OCH}_3$ skupino, tej pa *p*-kumarna kislina brez metoksi skupine. Med hidroksibenzojskimi kislinami naj bi bili glede na vsebnost metoksi skupine najučinkovitejši siringična in vanilinska kislina (Balasundram in sod., 2006). Večja stopnja hidroksilacije pa po drugi strani zmanjša učinkovitost kislin. Na podlagi prisotnosti $-\text{OH}$ skupine je tako med hidroksicimetnimi kislinami najmanj učinkovita kavna kislina, med hidroksibenzojskimi kislinami pa galna kislina. Relativno slabšo učinkovitost zaradi visoke stopnje hidroksilacije naj bi imeli tudi klorogenska in rožmarinska kislina (Balasundram in sod., 2006).

Rezultate določanja protimikrobne aktivnosti fenolnih spojin proti referenčnemu sevu *C. jejuni* NCTC 11168 prikazuje preglednica 13. Med izbranimi fenolnimi kislinami v okviru te diplomske naloge smo največjo protimikrobno učinkovitost proti *C. jejuni* NCTC 11168 dokazali za karnozolno kislino, kar v literaturi navajajo tudi Moreno in sod. (2006). Ker rožmarinska kislina v svoji strukturi vsebuje kar 4 hidroksilne skupine, smo sklepali, da bo njena protimikrobna učinkovitost nekoliko slabša. Razlik v protimikrobnem delovanju med hidroksicimetnimi in hidroksibenzojskimi kislinami nismo opazili, saj se izmerjene vrednosti MIK za posamezne fenolne kisline niso razlikovale (preglednica 13). Nismo uspeli potrditi naših pričakovanj, da so hidroksicimetne kisline protimikrobno učinkovitejše kakor hidroksibenzojske kisline.

Če primerjamo učinkovitost komercialnih ekstraktov rožmarina s protimikrobno učinkovitostjo čistih fenolnih kislin ugotovimo, da sta ekstrakta V40 in V70 protimikrobno slabše učinkovita kakor čista karnozolna kislina. Glede na to, da je glavna aktivna sestavina V40 in V70 prav karnozolna kislina, smo seveda pričakovali, da bodo vrednosti MIK za ekstrakt in čisto kislino približno enake. Vrednost MIK za čisto karnozolno kislino je za faktor 4 nižja kakor izmerjeni vrednosti MIK za V40 in V70. Glavna aktivna sestavina ekstrakta A40 je rožmarinska kislina. Rezultati so potrdili vlogo rožmarinske kisline v ekstraktu A40, saj izmerjena vrednost MIK za A40 sovпада z vrednostjo MIK rožmarinske kisline. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je razmerje fenolnih kislin v ekstraktih rožmarina ugodno za protimikrobno delovanje ekstrakta proti *C. jejuni* in da k protimikrobnemu učinku poleg karnozolne kisline prispevajo tudi druge fenolne kisline, ki so sicer prisotne v manjših količinah.

5.1.3 Protimikrobna učinkovitost EGKG, ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* ter ekstrakta listov vinske trte (ELVT)

Fenolne spojine, med temi tudi katehin EGKG, zavirajo rast številnih bakterij, njihova aktivnost pa je najverjetneje posledica njihove sposobnosti vezave z zunajceličnimi in topnimi proteini ter vezavo na bakterijsko celično steno (Cowan, 1999). Zaradi delovanja na celično steno, so po Gramu pozitivne bakterije na njegovo delovanje bolj občutljive v primerjavi s po Gramu negativni bakterijami, pri katerih peptidoglikan zakriva zunanjo membrano iz LPS. Protimikrobni učinek EGKG je najverjetneje posledica galoilne molekule v strukturi EGKG (Shimamura in sod., 2007).

Yang in sod. (1999) v svoji študiji poročajo o antioksidativnem in protimikrobnem delovanju ekstrakta semen *A. katsumadai*. Ekstrakt listov vinske trte, ki smo ga uporabili v tem diplomskem delu, je bil pripravljen iz listov obranih v mesecu maju, torej v zgodnjem fenofaznem obdobju, v okviru študije Katalinić in sod. (2010). Vsebuje fenole, flavonoide, flavonole in stilbene, ki so odgovorni za protimikrobno aktivnost proti bakterijam *Campylobacter jejuni* (Katalinić in sod., 2010).

Rezultati so pokazali, da je bil protimikrobni učinek flavonoida EGKG nekoliko slabši v primerjavi s karnozolno kislino, njegov protimikrobni učinek proti bakterijam *C. jejuni* NCTC 11168 je bil enak kot pri večini testiranih fenolnih kislin, z vrednostjo MIK 0,313 (preglednica 13). Če njegov učinek primerjamo z učinkom ekstrakta semen *A. katsumadai* ugotovimo, da je EGKG nekoliko bolj učinkovit kot protimikrobni agens proti *C. jejuni* NCTC 11168. Tudi za ekstrakt semen *A. katsumadai* smo zaznali protimikrobno aktivnost proti referenčnemu sevu *C. jejuni*, vendar je bila za inhibicijo rasti potrebna višja koncentracija ekstrakta v primerjavi z ekstrakti rožmarina. Vrednost MIK je znašala 0,256mg/mL, kar je v primerjavi z ekstraktom A40, skoraj dva-kratna vrednost MIK. Še višjo vrednost MIK kakor za ekstrakt semen *A. katsumadai* pa smo določili za ELVT.

5.1.4 Vloga izlivnih črpalk pri odpornosti *C. jejuni* NCTC 11168 proti izbranim rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam

Odpornost bakterij *Campylobacter* proti protimikrobnim snovem je v določeni meri tudi posledica delovanja membranskih izlivnih črpalk, ki preprečijo dostop protimikrobne snovi do tarče v celici, kar dosežejo z iznosom le teh iz celice. Referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 je tako imenovani divji tip humanega izvora, pri katerem so dokazali prisotnost 2 membranskih izlivnih sistemov iz družine RND, to sta izlivni črpalki CmeABC in CmeDEF, kot tudi prisotnost regulatornega proteina CmeR. Delujoče izlivne črpalke omenjenemu sevu omogočajo iznos protimikrobnih snovi iz celice, zaradi česar je proti tem snovem odporen (Lin in sod., 2002; Lin in sod., 2005; Akiba in sod., 2006).

Preverili smo vpliv mutacij v genih, odgovornih za delovanje membranskih izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF, ki sta dokazano prisotni v sevu *C. jejuni* NCTC 11168. Uporabili smo mutante referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168. Mutant cmeB ima mutacijo v genu *cmeB*, ki je pomemben za delovanje izlivne črpalke CmeABC. Mutant cmeF vsebuje mutiran gen *cmeF* v operonu *cmeDEF*, ki kodira izlivno črpalko CmeDEF. Mutant cmeR pa ima okvarjen gen *cmeR*, ki kodira regulatorni protein CmeR.

Prisotnost in vpletenost izlivnih črpalk pri sevu *C. jejuni* NCTC 11168 v mehanizme odpornosti proti testiranim rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam izlivnih črpalk smo ugotavljali tudi z dodatkom inhibitorjev izlivnih črpalk.

5.1.4.1 Vpliv mutacij v genih izlivnih črpalk

Predvidevali smo, da bo mutacija v genu *cmeB* povečala občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11186 proti testiranim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam. Prav tako smo pričakovali, da bo mutacija v genu, ki kodira regulatorni protein CmeR, povečala odpornost izbranega seva, saj bo zaradi neaktivnega proteina CmeR prišlo do transkripcije operona *cmeABC* in posledično do prekomernega izražanja črpalke CmeABC. Študija pomena interakcije med CmeABC in CmeDEF pri odpornosti bakterij *C. jejuni* je dokazala, da je nivo odpornosti zaradi delovanja črpalke CmeDEF relativno uravnavan in zasenčen s funkcijo CmeABC. Izlivna sistema naj bi delovala vzajemno, saj inaktivacija CmeDEF poveča nivo izražanja CmeABC. Če pri sevu z mutacijo v genu *cmeF* opazimo povečanje odpornosti v primerjavi z referenčnim sevom, je to najverjetneje posledica povečanega iznosa snovi zaradi delovanja izlivnega sistema CmeABC (Akiba in sod., 2006).

Rezultate vpliva mutacij v genih, pomembnih za izlivne črpalke, na protimikrobno delovanje izbranih rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin prikazujejo preglednice 11-14. Dokazali smo, da je izlivna črpalka CmeABC odgovorna za iznos vseh testiranih rastlinskih ekstraktov in večine fenolnih spojin iz celice referenčnega seva *C. jejuni*. Mutacija gena *cmeB* je namreč povzročila znižanje vrednosti MIK ekstraktov in fenolnih spojin in s tem povečala občutljivost seva *C. jejuni*. Vrednosti MIK rastlinskih ekstraktov so se pri mutantu *cmeB* znižale za faktor 2-78, vrednosti MIK fenolnih spojin pa za faktor 4-156, v primerjavi z referenčnim sevom. Mutacija v genu *cmeB* ni imela učinka na spremembo občutljivosti referenčnega seva proti karnozolni kislini, saj padca vrednosti MIK v tem primeru nismo opazili. Glede na to bi lahko sklepali, da karnozolna kislina ni substrat izlivne črpalke CmeABC.

Glede na rezultate ugotavljanja vpliva mutacije v genu *cmeF* na protimikrobno delovanje izbranih rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin proti sevu *C. jejuni* NCTC 11168 lahko sklepamo, da izlivna črpalka CmeDEF nima pomembne vloge pri iznosu testiranih protimikrobnih snovi iz celic *C. jejuni*. Kljub temu pa inhibicija črpalke CmeDEF lahko vpliva na povečano izražanje črpalke CmeABC, kar potrjujejo tudi dobljeni rezultati. Zaradi povečanega izražanja črpalke CmeABC pri mutantu *cmeF*, so se povečale vrednosti MIK V40, I18 in rožmarinske kisline. Vrednost MIK karnozolne kisline pri mutantu *cmeF* pa se je najverjetneje povečala zaradi delovanja kakšnega drugega izlivnega transporterja, saj tudi mutacija v *cmeB* ni povečala občutljivosti *C. jejuni*. Izlivna črpalka CmeDEF ne sodeluje pri iznosu ekstraktov V70, A40 in ekstraktu semen *A. katsumadai*, klorogenske ter vanilinske kisline iz celic *C. jejuni* NCTC 11168. Rezultati nakazujejo, da so ELVT, EGKG, galna, sirinjična, sinapinska in ferulna kislina substrati črpalke CmeDEF, saj se je vrednost MIK omenjenih snovi v sevu z mutacijo v genu *cmeF* znižala za faktor 2-4.

Aktiven transkripcijski regulator CmeR se veže na operatorsko mesto operona CmeABC in prepreči njegovo transkripcijo. Rezultati študije vpliva mutacije v genu *cmeR* kažejo na to, da regulator CmeR ni vedno vpleten v izražanje izlivne črpalke CmeABC. Pričakovali

smo, da bo mutacija v genu *cmeR* povzročila večjo aktivnost črpalke CmeABC pri iznosu ekstraktov in fenolnih spojin, kar zaznamo kot povečanje vrednosti MIK, torej kot zmanjšan protimikrobni učinek teh spojin proti sevu *C. jejuni* NCTC 11168. Mutacija v genu *cmeR* je zmanjšala protimikrobni učinek V40, A40, rožmarinske in karnozolne kisline proti protimikrobnemu mutantu *cmeR*. Vpliva mutacije v genu *cmeR* na protimikrobno delovanje V70, ekstrakta semen *A. katsumadai*, EGKG in klorogenske kisline proti sevu *C. jejuni* nismo zaznali, vrednost MIK je v primerjavi z referenčnim sevom ostala nespremenjena. V določenih primerih pa smo pri mutantu *cmeR* zaznali prav nasproten učinek, kot smo sprva pričakovali, in sicer povečanje občutljivosti mutanta proti galni, vanilinski, siringinčni, sinapinski in ferulni kislini ter ELVT, v primerjavi z referenčnim sevom, vendar so bile relativne vrednosti vse zelo majhne (U v večini primerov 2).

5.1.4.2 Vpliv kemijskih inhibitorjev izlivnih črpalk (EPIs) na njihovo delovanje pri bakterijah *C. jejuni*

Študije izlivnih črpalk kot tudi inhibicija njihovega delovanja z EPIs so v medicini zelo pomembne. Identificiranih je bilo že ogromno snovi, ki naj bi bile zmožne povrniti prvotno funkcijo antibiotikom. Prvi inhibitor, za katerega je bila dokazana inhibitorna aktivnost na delovanje izlivnih črpalk, je PAβN, ki pa se je v številnih študijah že izkazal kot učinkovit inhibitor za znižanje odpornosti sevov *Campylobacter* proti makrolidnim antibiotikom in fluorokinolonom (Payot in sod., 2004). Pagès in sod. (2005) v svoji študiji kot najbolj učinkovite inhibitorje membranskih izlivnih črpalk navajajo PAβN, CCCP, NMP in različne derivate kinolonov.

Reserpin je inhibitor od ATP odvisnih izlivnih črpalk (PharmGKB, 2011), verapamil pa inhibira P- glikoprotein in v splošnem vse izlivne črpalke (Mahamoud in sod. 2007). Omenjena inhibitorja so za oceno inhibicije iznosa protimikrobnih snovi iz celic *Mycobacterium smegmatis* v svoji študiji uporabili tudi Lechner in sod. (2008). Alkaloid rastlinskega izvora, reserpin, se je že izkazal tudi kot učinkovit inhibitor izlivne črpalke Bmr pri *Bacillus subtilis*, testiran pa je bil tudi v *in vitro* študijah aktivnosti novih protimikrobnih snovi, predvsem fluorokinolonov, proti bakterijam *Streptococcus pneumoniae* (Garvey in Piddock, 2008). Inhibitor CCCP deluje kot močan razklopljevalec protonske gonilne sile in tako inhibira delovanje izlivnih črpalk, medtem ko inhibitor PAβN na izlivne črpalke deluje preko kompeticije z antibiotiki za iznos iz celice. Inhibitor NMP pa deluje kot antagonist serotonina (Pagès in sod., 2009). PAβN in NMP naj bi dokazano inhibirala delovanje izlivnih transporterjev iz družine RND (Bina in sod., 2009).

Na podlagi objav smo pričakovali, da bosta inhibitorja NMP in PAβN zmanjšala delovanje izlivnih črpalk pri *C. jejuni* NCTC 11168 in tako povečala njegovo občutljivost proti izbranim rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam. Rezultati ugotavljanja učinkovitosti petih različnih inhibitorjev izlivnih črpalk (NMP, PAβN, CCCP, verapamila in reserpina) so potrdili naša pričakovanja, kar prikazujejo rezultati v preglednicah 11-14, ki podajajo absolutne vrednosti (preglednici 11 in 13) in relativne učinkovitosti inhibitorjev U_i (preglednici 12 in 14) na delovanje izlivnih črpalk. Večja učinkovitost inhibitorja pomeni večjo vlogo membranske izlivne črpalke pri odpornosti bakterij na testirane protimikrobne učinkovine.

Dodatek inhibitorja PAβN je za 2 do 313-krat povečal občutljivost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 proti uporabljenim rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam. Največji padec MIK in tako največjo spremembo občutljivosti seva smo opazili za ekstrakt I18 (preglednica 12) in vanilinsko kislino (preglednica 14). Inhibitorja NMP in CCCP sta občutljivost seva proti uporabljenim ekstraktom in fenolnim spojinam povečala največ za faktor 64. Verapamil v večini primerov sicer ni pokazal učinka na delovanje izlivnih črpalk, je pa 8-krat povečal občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11168 proti sinapinski kislini (preglednica 14) in 8-krat proti I18 (preglednica 12). Tudi reserpin ni imel bistvenega učinka na izlivne črpalke pri *C. jejuni*, razen v primeru ekstrakta I18 in sinapinske kisline, kjer je povzročil padec vrednosti MIK za faktor 16 in tako povečal občutljivost referenčnega seva (preglednici 12 in 14).

PAβN je uspešno inhibiral delovanje obeh dokazanih izlivnih sistemov pri *C. jejuni*, črpalk CmeABC in CmeDEF, saj je v večini primerov povečal tudi občutljivost mutiranih sevov cmeB in cmeF proti ekstraktom in fenolnim spojinam. Kot smo že ugotovili, je bila karnozolna kislina protimikrobno najučinkovitejša proti *C. jejuni* NCTC 11168 med vsemi testiranimi fenolnimi spojinami. Kljub temu, da rezultati vpliva mutacij v izlivnih črpalkah na protimikrobno delovanje karnozolne kisline nakazujejo, da ta ni substrat izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF, se je občutljivost referenčnega seva proti karnozolni kislini bistveno povečala po dodatku inhibitorja PAβN (preglednici 13 in 14). Zato lahko sklepamo na morebitno prisotnost nekaterih drugih, še neodkritih izlivnih mehanizmov pri *C. jejuni* NCTC 11168, na katere je inhibitor PAβN v tem primeru deloval. Podoben, le nekoliko slabši učinek inhibitorja na občutljivost seva *C. jejuni* proti karnozolni kislini smo opazili tudi ob dodatku inhibitorja NMP (preglednici 13 in 14).

Učinek CCCP na delovanje izlivnih sistemov pri *C. jejuni* NCTC 11168 je bil nekoliko manjši kot učinek NMP in PAβN. CCCP pa je bil na primer zelo učinkovit pri povečanju občutljivosti seva *C. jejuni* proti ELVT. Samo protimikrobno delovanje ELVT je bilo sicer nekoliko slabše v primerjavi s protimikrobnim učinkom ostalih testiranih ekstraktov, vendar smo z dodatkom inhibitorjev NMP, PAβN ali CCCP uspeli bistveno povečati občutljivost seva *C. jejuni* proti omenjenemu ekstraktu. Zanimivo pa je dejstvo, da je bil v tem primeru najučinkovitejši pri znižanju vrednosti MIK prav inhibitor CCCP (preglednici 11 in 12). Boljši učinek inhibitorja CCCP v primerjavi z NMP in PAβN na delovanje izlivnih črpalk smo opazili tudi v primeru rožmarinske kisline (preglednici 13 in 14).

Dodatek inhibitorja NMP je pri mutantu cmeR bistveno povečal občutljivost mutiranega seva proti EGKG, saj smo opazili kar 313-kratni padec vrednosti MIK. Na tem primeru smo tako lahko potrdili pomembno funkcijo transkripcijskega regulatorja CmeR pri delovanju izlivnih črpalk, saj je njegova inaktivacija vodila v očitno prekomerno izražanje črpalke CmeABC, katere aktivnost je naknadno znižal dodani inhibitor NMP (preglednica 14).

5.2 MODULATORNA VLOGA EGKG IN EKSTRAKTA SEMEN *Alpinia katsumadai* PRI ODPORNOSTI bakterij *Campylobacter* PROTI RAZLIČNIM PROTIMIKROBNIM SNOVEM

Naš namen je bil ugotoviti, kakšen je nivo odpornosti izbranih sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti različnim antibiotikom, ŽS, ND in EtBr in v kakšni meri dodatek subinhibitornih koncentracij ekstrakta semen *A. katsumadai* ali EGKG kot modulatorjev protimikrobnega delovanja vpliva na zmanjšanje odpornosti testiranih sevov. V eksperiment smo vključili 4 izolate *C. jejuni* (NCTC 11168, K49/4, 375, FC8) pridobljene iz različnih virov (humani klinični vzorci in vzorci živil (mesa) in živali), ter 3 izolate *C. coli* (137, 140, 171), izolirane iz perutnine.

5.2.1 Odpornost proti antibiotikom, EtBr, ŽS in ND

Danes obstaja veliko podatkov o naraščajoči odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* proti različnim protimikrobno aktivnim snovem, vključno z antibiotiki, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini. Za zdravljenje kampilobakterioz se uporabljajo makrolidni antibiotiki, fluorokinoloni in tetraciklini, medtem ko se ampicilin in ostali β -laktamski antibiotiki za zdravljenje te vrste okužb ne priporočajo (Kurinčič in sod., 2007). Seve odporne proti določenemu antibiotiku, lahko razdelimo v različne skupine: občutljivi sevi z MIK do 4 $\mu\text{g/mL}$, nizko odporni sevi z MIK od 8 do 16 in zelo odporni sevi z MIK večjo ali enako 64 $\mu\text{g/mL}$ (Kurinčič in sod., 2007).

Pri po Gramu negativnih bakterijah zunanja membrana predstavlja odlično hidrofobno oviro za membransko aktivne snovi, kot so žolčne soli (Begley in sod., 2005; Gunn, 2000). K odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* proti žolčnim solem v največji meri prispevajo izlivne črpalke, kar potrjujejo tudi objave Lin in sod. (2002, 2003). Odpornost enteričnih patogenov proti žolčnim solem je poznana že več desetletij. Pomen izlivnih sistemov pri povečani odpornosti proti žolčnim solem in detergentu natrijevemu deoksiholatu je v svojem diplomskem delu potrdila že Kosmač (2008). Pri vseh uporabljenih izolatih kampilobaktrov je potrdila prisotnost MDR fenotipa. Na podlagi predhodnih objav smo pričakovali, da so bakterije rodu *Campylobacter* relativno dobro odporne proti žolčnim solem in natrijevemu deoksiholatu. Veliko avtorjev namreč trdi, da so kampilobaktiri in druge po Gramu negativne bakterije dobro prilagojene na žolčne soli (Begley in sod., 2005; Lin in sod., 2002).

EtBr se pogosto uporablja kot fluorescirajoče barvilo pri identifikaciji DNK, kot tudi v različnih metodah določanja modulatornega oz. sinergističnega delovanja med spojinami.

Zaradi toksičnosti nekaterih kemijskih inhibitorjev izlivnih črpalk je trenutno zelo atraktivno področje raziskav iskanje in/ali razvoj naravnih substratov kot inhibitorjev razvoja odpornosti bakterij zaradi delovanja membranskih izlivnih črpalk. Prav s tem namenom smo se v tem diplomskem delu osredotočili tudi na testiranje 2 naravnih spojin (EGKG in ekstrakta semen *A. katsumadai*) s potencialnim modulatornim delovanjem na nekatere seve kampilobaktra, ki so odporni proti antibiotikom, ŽS, EtBr in ND.

Modulatorno delovanje naravnih spojin pa ni nujno povezano s protimikrobnim delovanjem teh spojin, kar so dokazali tudi Lechner in sod.(2008). Luteolin se je izkazal kot učinkovit modulator protimikrobnega delovanja EtBr proti bakterijam *Mycobacterium smegmatis*, medtem ko protimikrobno ni bil najbolj učinkovit. Številne vrste rastlinskih polifenolov imajo direkten protimikrobni učinek ali pa delujejo sinergistično z antibiotiki proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, odpornim proti meticilinu (MRSA) (Hatano in sod., 2008).

Rezultate delovanja ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG kot modulatorjev protimikrobnega delovanja različnih antibiotikov, ŽS, ND, EtBr in V40 smo podali kot modulatorni učinek U_m , ki predstavlja razmerje med vrednostjo MIK brez dodanega modulatorja ter vrednostjo MIK z dodanim modulatorjem (preglednice 16-20).

Rezultate vrednotenja odpornosti izbranih sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti antibiotikom predstavljata preglednici 16 in 17. V eksperiment smo vključili 5 makrolidnih antibiotikov (eritromicin, tilozin, diritromicin, klaritromicin in azitromicin) ter antibiotik ciprofloksacin, ki ga uvrščamo med fluorokinolone. Vsi sevi *C. coli* (137, 140, 171), uporabljeni v eksperimentu, so se izkazali kot zelo odporni proti vsem testiranim antibiotikom. Med uporabljenimi sevi *C. jejuni* (NCTC 11168, K49/4, 375, FC8) se je kot najbolj odporen proti več antibiotikom hkrati izkazal sev 375. V splošnem smo najvišjo stopnjo odpornosti testiranih sevov *C. jejuni* in *C. coli* zaznali proti antibiotiku eritromicinu, saj so vrednosti MIK eritromicina za vse seve razen *C. jejuni* (K49/4 in NCTC 11168) znašale kar 512 $\mu\text{g/mL}$. Najbolj občutljiva seva *C. jejuni* proti vsem testiranim antibiotikom sta bila seva K49/4 in NCTC 11168. Izmerjene vrednosti MIK za občutljive seve so bile v območju med 0,25 in 4 $\mu\text{g/mL}$.

Rezultate vrednotenja odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti EtBr, ND in ŽS prikazujeta preglednici 18 in 19. Vrednosti MIK EtBr so podane v $\mu\text{g/mL}$, vrednosti MIK natrijevega deoksiholata in žolčnih soli pa v mg/mL . Bakterijsko odpornost proti EtBr smo preverjali le pri sevih *C. jejuni* (NCTC 11168, K49/4, FC8, 375). Najobčutljivejši na protimikrobno delovanje EtBr je bil sev NCTC 11168, ostali sevi so se izkazali kot bolj odporni z vrednostmi MIK EtBr v območju med 32 in 64 $\mu\text{g/mL}$. Vsi uporabljeni sevi *C. jejuni* (NCTC 11168, K49/4, FC8, 375) in *C. coli* (137, 140, 171) so pokazali določeno stopnjo odpornosti proti protimikrobnemu učinku ŽS in ND. Izmerjene vrednosti MIK ŽS in ND so za večino sevov znašale 32 ali 64 mg/mL . Rezultati so potrdili naša pričakovanja, saj je večina izolatov *C. jejuni* in *C. coli* dobro odpornih proti ŽS in ND. Bakterije rodu *Campylobacter* so zelo dobro prilagojene na razmere v prebavilih, zato je odpornost proti žolčnim solem in ND bistvenega pomena za njihovo preživetje.

Rezultate vrednotenja protimikrobnega delovanja V40, ekstrakta semen *A. katsumadai* in EGKG proti sevom različnega izvora prikazuje preglednica 15. Izmerjene vrednosti MIK ekstrakta *A. katsumadai* kot merila protimikrobne aktivnosti so bile med 0,064 do 1,025 mg/mL , MIK EGKG med 0,078 do 0,625 mg/mL , vrednosti MIK V40 pa med 0,039 in 1,250 mg/mL . Kot najbolj protimikrobno učinkovit proti testiranim sevom kampilobaktra se je izkazal EGKG.

5.2.2 Vloga ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* kot modulatorja protimikrobnega delovanja

Rezultati določanja modulatornega delovanja ekstrakta semen *A. katsumadai* na protimikrobno delovanje različnih antibiotikov so prikazani v preglednici 17. Štiri ali večkratno znižanje vrednosti MIK pomeni, da ima uporabljeni ekstrakt semen *A. katsumadai* potencial kot modulator protimikrobne aktivnosti testiranih spojin, saj je znižal odpornost izbranih izolatov v povprečju 8-krat. Bistvenih razlik v modulatornem učinku med obema uporabljenima subinhibitornima koncentracijama 0,5 MIK in 0,25 MIK nismo opazili. Dodatek subinhibitornih koncentracij ekstrakta *A. katsumadai* je pri sevih *C. jejuni*, ki so se izkazali kot najbolj odporni proti vsem testiranim antibiotikom (137, 140 in 171), uspešno znižal vrednosti MIK za faktor 4 do 64 (preglednica 19). Nekoliko slabši modulatorni učinek se je izkazal proti sevom *C. jejuni*. Povzamemo lahko, da je ekstrakt *A. katsumadai* v subinhibitornih koncentracijah potencialno uporaben kot modulator, ki znižuje stopnjo odpornosti sevov *C. coli* in večine sevov *C. jejuni* proti različnim antibiotikom. Glede na to, da so že številne študije potrdile pomembno vlogo membranskih izlivnih črpalk pri zagotavljanju odpornosti testiranih sevov proti različnim antibiotikom, lahko na podlagi naših rezultatov sklepamo, da ekstrakt *A. katsumadai* lahko deluje kot naravni inhibitor izlivnih črpalk pri bakterijah *C. jejuni* in *C. coli*.

V preglednici 19 so predstavljeni rezultati modulatornega delovanja ekstrakta semen *A. katsumadai* na mehanizme protimikrobnega delovanja EtBr, ND in ŽS. Tudi v tem primeru nismo opazili bistvenih razlik med uporabljenima subinhibitornima koncentracijama ekstrakta *A. katsumadai* v smislu modulatornega delovanja. Rezultati dokazujejo modulatorni učinek na protimikrobno delovanje EtBr, saj so se vrednosti MIK po dodatku ekstrakta v povprečju znižale za 20-krat. Odpornost sevov proti ŽS se je po dodatku ekstrakta v povprečju znižala 5-krat, odpornost proti ND pa v povprečju 9-krat.

Preglednica 20 prikazuje rezultate modulatornega delovanja subinhibitornih koncentracij ekstrakta semen *A. katsumadai* na protimikrobno učinkovitost ekstrakta rožmarina V40 pri različnih sevih *C. jejuni*. Vrednosti MIK ekstrakta V40 so se po dodatku modulatorja znižale za 2 do 4-krat, kar kaže na določeno stopnjo modulatornega delovanja ekstrakta semen *A. katsumadai*.

5.2.3 Vloga EGKG kot modulatorja protimikrobnega delovanja

Modulatorni učinek EGKG na odpornost izbranih sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti različnim antibiotikom prikazuje preglednica 16. Dodatek EGKG je v povprečju za faktor 17 znižal odpornost testiranih sevov proti izbranim antibiotikom. Obe subinhibitorni koncentraciji EGKG sta bili zelo učinkoviti pri znižanju odpornosti sevov *C. coli* 170 in 140 proti tilozinu, saj sta povzročili kar 64-kratno znižanje vrednosti MIK. Rezultati potrjujejo naša pričakovanja, da je EGKG uporaben kot modulator protimikrobnega delovanja antibiotikov in da učinkuje na membranske izlivne črpalke, ki imajo pomembno vlogo pri zagotavljanju odpornosti sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti antibiotikom.

Preglednica 18 prikazuje rezultate ugotavljanja modulatornega delovanja EGKG na mehanizme protimikrobnega delovanja EtBr, ŽS in ND. Dodatek subinhibitornih koncentracij EGKG je v povprečju povzročil 20-kratno znižanje vrednosti MIK EtBr, ŽS

in ND pri izbranih sevih *C. jejuni* in *C. coli*. Bistvenih razlik v modulatornem učinku med obema subinhibitornima koncentracijama EGKG nismo opazili. Glede na razmeroma visoko stopnjo odpornosti izbranih sevov proti EtBr, ND in ŽŠ se je EGKG izkazal kot učinkovit modulator membranskih izlivnih črpalk naravnega izvora, ki je v veliki meri uspel znižati odpornost sevov proti tem snovem.

Modulatorni učinek EGKG na protimikrobno delovanje ekstrakta rožmarina V40 prikazuje preglednica 20. Dodatek subinhibitornih koncentracij EGKG je povzročil 2 do 16-kratno znižanje vrednosti MIK ekstrakta V40 pri izbranih sevih *C. jejuni*.

6 SKLEPI

Rezultati eksperimentalnega dela v okviru diplomske naloge potrjujejo delovne hipoteze, katere smo postavili pred začetkom dela. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko povzamemo nasledne sklepe:

- Protimikrobno aktivnost proti *C. jejuni* NCTC 11168 smo določili za vse testirane rastlinske ekstrakte in fenolne spojine. Med ekstrakti sta bila najučinkovitejša oljetopna ekstrakta rožmarina V40 in V70 s karnozolno kislino, kot glavno aktivno sestavino, med fenolnimi kislinami pa karnozolna kislina.
- Z mutacijo v genu *cmeB* smo potrdili pomembno vlogo izlivne črpalke CmeABC pri mehanizmu protimikrobnega delovanja rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin pri sevu *C. jejuni* NCTC 11168. Testirani rastlinski ekstrakti, kot tudi čiste fenolne snovi, delujejo na različne tarče pri *C. jejuni* NCTC 11168.
- Inhibitorja PAβN in NMP sta bila najučinkovitejša med testiranimi inhibitorji, saj sta v večini primerov bistveno povečala občutljivost referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 proti rastlinskim ekstraktom in čistim fenolnim spojinam. V določenih primerih je bil učinkovit tudi inhibitor CCCP, medtem ko inhibitorja verapamil in reserpin na delovanje izlivnih sistemov pri *C. jejuni* nista imela bistvenega učinka.
- Ekstrakt semen *A. katsumadai* in flavonoid EGKG sta potencialno uporabna kot modulatorja protimikrobnega delovanja večine antibiotikov, ŽS, ND in EtBr proti bakterijam *Campylobacter*, saj sta v subinhibitornih koncentracijah v večini primerov znižala odpornost sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti tem snovem.

6.1 PREDLOGI NADALJNIH RAZISKAV NA PODROČJU PROTIMIKROBNEGA IN MODULATORNEGA DELOVANJA SNOVI NARAVNEGA IZVORA PRI BAKTERIJAH *Campylobacter jejuni*

Zanimive bi bile nadaljnje študije, ki bi razkrile tudi vpletenost izlivnega sistema CmeGH, o katerem so pred kratkim v svoji študiji poročali Jeon in sod. (2011), pri odpornosti proti protimikrobnim snovem naravnega izvora (različnim rastlinskim ekstraktom in fenolnim spojinam), kot smo v tej diplomski nalogi ugotavljali za izlivna sistema CmeABC ter CmeDEF.

Za boljši vpogled v samo modulatorno delovanje EGKG in ekstrakta semen *Alpinia katsumadai* bi bilo potrebno uporabiti še kakšno drugo metodo za ugotavljanje modulatornega delovanja. Z metodo šahovnice bi lahko našli tiste kombinacije koncentracij med različnimi učinkovinami in ekstraktom semen *A. katsumadai* ali EGKG, ki bi zagotovile najboljši sinergistični učinek in bi tako učinkovito znižale odpornost bakterij rodu *Campylobacter* proti različnim protimikrobnim snovem.

K boljšemu razumevanju omenjenih mehanizmov protimikrobnega ter modulatornega delovanja ekstrakta semen *A. katsumadai* bi doprinesla molekularna karakterizacija mehanizma protimikrobnega delovanja ekstrakta na bakterije *C. jejuni* in *C. coli*. To bi dosegli s testiranjem vpliva čistih aktivnih sestavin ekstrakta na seve z mutacijami v genih, pomembnih za delovanje izlivnih črpalk, na podlagi česar bi ugotovili, če aktivne sestavine ekstrakta delujejo na specifične izlivne transporterje pri kampilobaktrijah. Z uporabo različnih molekularnih metod je moč ugotoviti tudi, če imajo sestavine ekstrakta modulatorno učinkovitost na izražanje izlivnih transporterjev.

7 VIRI

- Akiba M., Lin J., Barton Y.W., Zhang Q. 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 52-60.
- Andrews J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, Suppl. S1: 5-16.
- Ayaz F.A., Hayirhogu-Ayaz S., Alpaya-Karaoglu S., Grúz J., Valentinová K., Ulrichová J., Strnad M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *Acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107: 19-25.
- Balamurugan S., Nattress F.M., Baker L.P., Dilts B.D. 2011. Survival of *Campylobacter jejuni* on beef and pork under vacuum packaged and retail storage conditions: Examination of the role of natural meat microflora on *C. jejuni* survival. *Food Microbiology*, 28: 1003-1010.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Başkan S., Öztekin N., Erim B. 2007. Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 101: 1748-1752.
- Begley M., Gahan C.G.M., Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 625-651.
- Bina X. R., Philippart J. A., Bina J. E. 2009. Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholerae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 103-108.
- Biopurify Phytochemicals. 2010. Epigallocatechin gallate (EGCG). Chengdu, Biopurify Phytochemicals Ltd.: 1 str.
<http://www.biopurify.com/details.asp?id=157> (15.2.2011)
- Blair J.M.A., Piddock L.J.V. 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 512-519.
- Buranov A.U., Mazza G. 2009. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry*, 115: 1542-1548.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. Food Chemistry, 100: 1044-1048.

Charvalos E., Tselensis Y., Hamzehpour M.M., Kohler T., Pechere J.C. 1995. Evidence for an efflux pump in multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 9: 2019-2022.

Citová I., Sladkovsky R., Solich P. 2006. Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography. Analytica Chimica Acta, 573-574: 231-241.

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 4: 564-582.

Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martín - Alvarez P.J., Billis G., Vicente M.F., Basilio A., Lo'pez Rivas C., Requena T., Rodríguez J.M., Bartolomé B. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acid against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. Research in Microbiology, 161: 372-382.

Dasti J.I., Tareen M.A., Lugert R., Zautner A.E., Gross U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. International Journal of Medical Microbiology, 300: 205-211.

Drugs.com. 2006. Reserpine: Official FDA information, side effects and uses. Auckland, Drugs.com - Drugs Information on Line: 1 str.
<http://www.drugs.com/pro/reserpine.html> (3.1.2011)

EFSA. 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2006. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 2575 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/130r.pdf> (20.2.2011)

Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry, 110: 76-82.

FDA. 2009. BBB-*Campylobacter jejuni*. 2009. Silver Spring, FDA- U.S. Food And Drug Administration: 1 str.
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm> (20.12.2010)

Feng W., Cherednichenko G., Ward C.W., Padilla I.T., Cabrales E., Lopez J.R., Eltit J.M., Allen P.D., Pessah I.N. 2010. Green tea catechins are potent sensitizers of ryanodine receptor type 1 (RyR1). Biochemical Pharmacology, 80: 512-521.

Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 66, 10: 1811-1821.

Garenaux A., Luchetti-Miganeh C., Ermel G. 2008. Membrane and antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. V: Better understanding of the *Campylobacter* conundrum. Garenaux A., Luchetti-Miganeh C., Ermel G., Barloy-Hubler F., De Jounge R., Newell D., Payot S., Federighi M., Tresse O., Guillou S., Ritz M. (eds.). New York, Nova Science Publishers, Inc.: 67-91.

Garvey M.I., Piddock L.J. 2008. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 1677-1685.

Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance: Strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74: 594-602.

Gibreel A., Taylor D.E. 2006. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 243-255.

Gousia P., Economou V., Sakkas H., Leveidiotou S., Papadopoulos C. 2011. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, 1: 27-38.

Gunn J.S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, 2: 907-913.

Gu R., Su C., Shi F., Li M., McDermott G., Zhang Q., Yu E. 2007. Crystal structure of the transcriptional regulator CmeR from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Molecular Microbiology*, 372: 583-593.

Haddad N., Marce C., Magras C., Cappellet J.M. 2010. An overview of methods used to clarify pathogenesis mechanisms of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection*, 73, 4: 786-802.

Hatano T., Tsugawa M., Kusuda M., Taniguchi S., Yoshida T., Shiota S., Tsuchiya T. 2008. Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. *Phytochemistry*, 69: 3111-3116.

HMDB. 2009a. Chlorogenic acid (HMDB03164). Calgary, HMDB - Human metabolome database: 1 str.

<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB03164> (3.3.2011)

HMDB. 2009b. Gallic acid (HMDB05807). Calgary, HMDB - Human metabolome database: 1 str.

<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB05807> (3.3.2011)

HMDB. 2009c. Syringic acid (HMDB02085). Calgary, HMDB - Human metabolome database: 1 str.

<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB02085> (3.3.2011)

HMDB. 2009d. Vanillic acid (HMDB00484). Calgary, HMDB - Human metabolome database: 1 str.

<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00484> (3.3.2011)

Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 237-257.

Itagaki S., Kurokawa T., Nakata C., Saito Y., Oikawa S., Kobayashi M., Hirano T., Iseki K. 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*, 114: 466-471.

Jeon B., Wang Y., Hao H., Barton Y., Zhang Q. 2011. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 79-85.

Katalinić V., Smole Možina S., Generalić I., Skroza D., Ljubenković I., Klančnik A. 2011. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, doi: 10.1080/10942912.2010.526274 : 10 str. [v tisku]

Kim K., Tsao R., Yang R., Cui S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95: 466-473.

King T., Dykes G. 2008. Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, 91: 1423-1429.

Klančnik A., Guzej B., Hadolin Kolar M., Abramovič H., Smole Možina S. 2009a. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8: 1744-1752.

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009b. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petkovič H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo:145-157.

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121-126.

- Klančnik A., Piskernik S., Smole Možina S., Gašperlin L., Jeršek B. 2011. Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food microdilution method. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 413-420.
- Kosmač J. 2008. Vpliv inhibitorjev izlivnih črpalk na aktivnost žolčnih soli proti bakterijam rodu *Campylobacter*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.
- Kovač J., Bučar F. 2011. Semena *Alpinia katsumadai*. Gradec, Inštitut za farmacevtske znanosti, Univerza v Gradcu: 1 str.
- Kurinčič M., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2007. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 186-190.
- Lambert R.J.W., Johnston M.D., Hanlon G.W., Denyer S.P. 2003. Theory of antimicrobial combinations: Biocide mixtures – synergy or addition? *Journal of Applied Microbiology*, 94: 747-759.
- Lechner D., Gibbons S., Bucar F. 2008. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 345-348.
- Lee S.E., Shin H., Hwang H.J., Kim J.H. 2003. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research*, 17: 1041-1047.
- Lin J., Akiba M., Sahin O., Zhang Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1067-1075.
- Lin J., Overbye Michel L., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2124-2131.
- Lin J., Sahin O., Michel L.O., Zhang Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 71, 8: 4250-4259.
- Lo A.H., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23: 983-991.
- Luangtongkum T., Jeon B., Han J., Plummer P., Logue C.M., Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: Emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4,2: 189-200.

Mahamoud A., Chevalier J., Alibert-Franco S., Kern W.V., Pagès J-M. 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1223-1229.

McRae J., Yang Q., Crawford R., Palombo E. 2007. Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. *Environmentalist*, 27: 165-174.

Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40: 223-231.

Nagle D.G., Ferreira D., Zhou Y. 2006. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*, 67: 1849-1855.

Nan P., Hu Y., Zhao J., Feng Y., Zhong Y. 2004. Chemical composition of the essential oils of two *Alpinia* species from Hainan island, China. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 157-160.

Nikaido H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 8.1-8.28.

Ngo K.S., Brown G.D. 1998. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai*. *Phytochemistry*, 6: 1117-1123.

Pagès J.M., Amaral L. 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794: 826-833.

Pagès J.M., Masi M., Barbe J. 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, 11, 8: 382-389.

Palaniappan K., Holley R.A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 2-3: 164-168.

Payot S., Dridi S., Laroche M., Federighi M., Magras C. 2004. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Veterinary Microbiology*, 101, 2: 91-99.

Piskernik S., Klančnik A., Tandrup Riedel C., Brøndsted L., Smole Možina S. 2010. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control*, 22: 718-724.

Promega Corp. 2009. Bac Titer-Glo™ microbial cell viability assay: Instructions for use of products G8230, G8231, G8232 and G8233. Technical bulletin. Madison, Promega Corporation: 16 str.

<http://www.promega.com/tbs/tb337/tb337.pdf> (3.3.2011)

Pumbwe L., Glass D., Wexler H.M. 2006. Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 9: 3150-3153.

Rand K.H., Houck H.J., Brown P., Bennett D. 1993. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 3: 613-615.

Qiao H.Y., Dahiya J.P., Classen H.L. 2008. Nutritional and physiological effects of dietary sinapic acid (4-Hydroxy-3,5-Dimethoxy-Cinnamic Acid) in broiler chickens and its metabolism in the digestive tract. *Poultry Science*, 87: 719-726.

Quinn T., Bolla J., Pagès J., Fanning S. 2007. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1230-1236.

Rožman T., Jeršek B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 93: 51-58.

Sato Y., Igataki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403: 136-138.

Shimamura T., Zhao W.H., Hu Z.Q. 2007. Mechanism of action and potential use of tea catechin as an anti-infective agent. *Anti Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 6: 57-62.

Smole Možina S., Klančnik A., Raspor P. 2009. Protimikrobne snovi v živilih in živilstvu. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petkovič H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74-86.

Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 91-98.

Snelling W. J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G. 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297-302

Sroka Z., Cisowski W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 753-758.

Stavri M., Piddock L.J.V., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1247-1260.

Sun Y., Hung W.C., Chen F.Y., Lee C.C., Huang H.W. 2009. Interaction of tea catechin – epigallocatechin gallate with lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 96: 1026-1035.

Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199-1218.

Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin B. 2006. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract – a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 182-188.

Thermo Scientific. 2011. Sodium Deoxycholate. Rockford, Thermo Fisher Scientific Inc.: 1 str.
<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=5aea3ff6-a1ed-4054-841d-42ff0097191b> (29.12.2010)

Uzunović-Kamberović S. 2009. *Campylobacter* i *arcobacter*. V: Medicinska mikrobiologija. Uzunović-Kamberović S. (ur.). Zenica, Štamparija Fojnica: 477-481.

Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., De Ley J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 88-103.

Vitiva. 2008. VivOX Descriptive sheet. Markovci, Vitiva d.d.: 7 str.
<http://www.vitiva.eu/> (23.12.2010)

Wang Y., Taylor D. 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 2: 949-955.

Wen A., Delaquis P., Stanich K., Toivonen P., 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 20: 305-311.

Young K.T. Davis L.M., DiRita V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews*, 5: 665-679.

Zhao M., Wang H., Yang B., Tao H. 2010. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 120: 1138-1142.

ZAHVALA

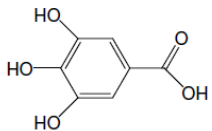
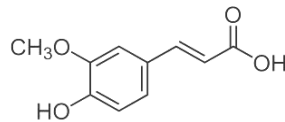
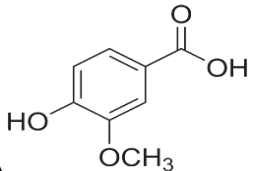
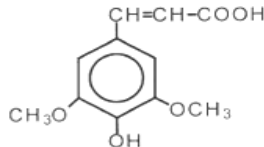
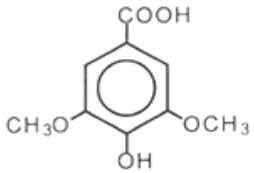
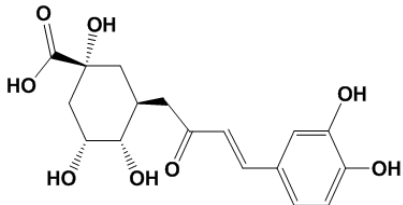
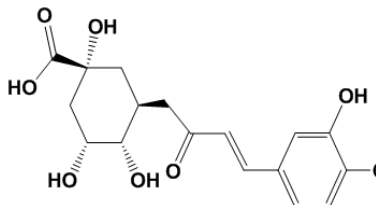
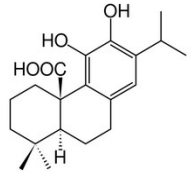
Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina ter somentorici dr. Anji Klančnik se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje, pomoč, motivacijo, iskren odnos, ter za vse priložnosti ter izkušnje, ki sem jih pridobila med pripravo tega diplomskega dela.

Recenzentki prof. dr. Romani Marinšek Logar se zahvaljujem za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre vsem domačim, Gregorju ter prijateljem, ki ste mi vedno stali ob strani ter verjeli vame.

Zahvala Kinči, Daši, Jasni in Inči za pomoč in pregled diplomske naloge. Zahvala tudi vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge.

Priloga A: Lastnosti fenolnih kislin, uporabljenih v diplomskem delu (Buranov in Mazza, 2009; HMDB, 2009a,b,c,d; Vitiva, 2008; Qiao in sod., 2008)

Fenolne kisline	Lastnosti	Fenolne kisline	Lastnosti
GALNA KISLINA 	IUPAC ime: 3,4,5-trihidroksibenzojska kislina Kemijska formula: $C_7H_6O_5$ $C_6H_2(OH)_3COOH \cdot H_2O$ Topnost: 11,9 mg/mL vode pri 20 °C	FERULNA KISLINA 	IUPAC ime: 4-Hidroksi-3-metoksicimetna kislina Kemijska formula: $C_{10}H_{10}O_4$ Topnost: voda
VANILINSKA KISLINA 	IUPAC ime: 4-hidroksil-3-metoksil-benzojska kislina Kemijska formula: $C_8H_8O_4$ Topnost: 1,5 mg/mL vode pri 14 °C	SINAPINSKA KISLINA 	IUPAC ime: 4-Hidroksi-3,5-dimetoksicimetna kislina Kemijska formula: $C_{11}H_{12}O_5$ Topnost: etanol, metanol
SIRINGIČNA KISLINA 	IUPAC ime: 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzojska kislina Kemijska formula: $C_9H_{10}O_5$ Topnost: 5780 mg/L vode pri 25 °C	ROŽMARINSKA KISLINA 	IUPAC ime: (2R)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksil-propanojska kislina Kemijska formula: $C_{18}H_{16}O_8$ Topnost: Organska topila
KLOROGENSKA KISLINA 	IUPAC ime: (1R,3R,4S,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksil-1,4,5-trihidroksi-cikloheksan-1-karboksilna kislina Kemijska formula: $C_{16}H_{18}O_9$ Topnost: DMSO (25 mg/mL); etanol (25 mg/mL); dimetil formamid (25 mg/mL)	KARNOZOLNA KISLINA 	IUPAC ime: (4aR,10aS)-5,6-dihidroksi-1,1-dimetil-7-propan-2-ksil-2,3,4,9,10,10a-heksahidrofenantren-4a-karboksilna kislina Kemijska formula: $C_{20}H_{28}O_4$ Topnost: etanol, metanol, aceton, voda (delno)

|