

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja JURADA

**MORFOLOGIJA, KULTIVABILNOST IN PREŽIVELOST CELIC
TER IZRAŽANJE GENOV *flaA* IN *groEL* BAKTERIJ *Campylobacter
jejuni* V RAZMERAH TOPLOTNEGA STRESA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MORPHOLOGY, CULTIVABILITY AND VIABILITY OF
Campylobacter jejuni CELLS AND EXPRESSION OF THE GENES *flaA*
AND *groEL* IN CONDITIONS OF HEAT STRESS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je potekalo v laboratoriju Katedre za živilsko mikrobiologijo in laboratoriju Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico dr. Anjo Klančnik in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentorica: dr. Anja Klančnik

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Jurada

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.23/.26:577.2.08(043)=163.6
KG bakterije/*Campylobacter jejuni*/toplotski stres/stradanje/morfologija/kultivabilnost celic/živost celic/izražanje genov/*flaA/groEL*
AV JURADA, Mateja
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/KLANČNIK, Anja (somentorica)/STOPAR, David (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN MORFOLOGIJA, KULTIVABILNOST IN PREŽIVELOST CELIC TER IZRAŽANJE GENOV *flaA* IN *groEL* BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* V RAZMERAH TOPLOTNEGA STRESA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 77 s., 4 pregл., 36 sl., 4 pril., 63 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Bakterije *Campylobacter jejuni* so eden izmed najpogostejevih povzročiteljev črevesnih okužb pri ljudeh, ki se prenašajo s hrano. Kljub temu ostajajo nekatere njihove fiziološke lastnosti in mehanizmi prilagajanja neugodnim okoljskim razmeram slabo raziskani. Preučevanje prilagajanja stresnim razmeram je pomembno, ker so kampilobakterji izpostavljeni podobnim razmeram v procesu proizvodnje živil. Namen naše raziskave je bil določiti vpliv toplotnega stresa in učinek predhodnega stresa (5 h stradanja) na morfologijo, kultivabilnost in preživelost celic *C. jejuni* iz eksponentne in stacionarne faze rasti. Poleg tega smo preučevali izražanje virulentnega gena *flaA* in gena za toplotni stres ter stradanje *groEL* celic *C. jejuni*, v razmerah toplotnega stresa. Celice smo gojili do zgodnjene eksponentne oz. stacionarne faze rasti. Del celic smo izpostavili predstresu stradanja. Nestradane in stradane celice smo nato izpostavili toplotnemu stresu 48 oz. 55 °C. Morfologijo in živost celic smo določali po barvanju celic s setom LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (Bac Light™) in opazovanjem pod fluorescentnim mikroskopom. Kultivabilnost smo določali s spremljanjem rasti na trdnih gojiščih Karmali in CCDA. Izražanje genov smo določili z uporabo metode RT-PCR. Ugotovili smo, da je prehod iz spiralne v kokoidno obliko hitrejši pri stradanih kulturah in nekoliko večji v primeru celic izpostavljenih temperaturi 55 °C iz eksponentne faze rasti. Živost in kultivabilnost celic nakazuje na boljo preživelost kulture iz eksponentne faze rasti. Dobljeni rezultati potrjujejo odsotnost prepoznavnega fenotipskega odgovora bakterij *Campylobacter jejuni* v stacionarni fazi rasti, zato so celice iz eksponentne faze rasti bolj odporne na toplotni stres. Ugotovili smo, da predhodno stradana kultura bolje preživi toplotni stres. Iz razmerja med živimi in kultivabilnimi celicami po izpostavitvi stresu lahko sklepamo, da preide del živih celic v nekultivabilno stanje oz. stanje VBNC ("viable but nonculturable"). Rezultati, dobljeni z metodo RT-PCR, kažejo na indukcijo izražanja stresnega gena *groEL* in flagelarnega gena *flaA* v razmerah toplotnega stresa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.23/.26:577.2.08(043)=163.6
CX	bacteria/ <i>Campylobacter jejuni</i> /heat stress/starvation/morphology/culturability/viability/gene expression/ <i>flaA/groEL</i>
AU	JURADA, Mateja
AA	SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/KLANČNIK, Anja (co-advisor)/STOPAR, David (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2008
TI	MORPHOLOGY, CULTIVABILITY AND VIABILITY OF <i>Campylobacter jejuni</i> CELLS AND EXPRESSION OF THE GENES <i>flaA</i> AND <i>groEL</i> IN CONDITIONS OF HEAT STRESS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XII, 77 p., 4 tab., 36 fig., 4 ann., 63 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p><i>Campylobacter jejuni</i> is one of the leading foodborne pathogens worldwide. Despite this fact many of its physiological characteristics and adaptation mechanisms are still unexplained. For many human pathogens the capacity to survive physical challenges during food processing is a critical step in their transmission to the host. The aim of this study was to examine the influence of heat shock and starvation (5 h starvation) to morphology, culturability and viability of <i>Campylobacter jejuni</i> cells from exponential and stationary phase of growth. We also studied the expression of the genes <i>flaA</i> and <i>groEL</i> in conditions of heat stress. The cells were cultivated until they reached early exponential and stationary phase of growth. Some samples were exposed to starvation. All the samples were exposed to heat shock at 48 or 55 °C. Morphology and viability were determined after staining the cells with LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (Bac Light™) before fluorescent microscopy. Cultivability was determined by plating the cells on Karmali and CCDA agar plates. Gene expression was examined by using RT-PCR. The transition from spiral to coccoid form occurs first in starved cells exposed to 55 °C and is more expressive in the case of cells from exponential growth phase. Viability and culturability from both phases showed that exponential growth phase cells survive stress better than stationary phase cells, which implicates the absence of phenotypic stationary phase response of <i>Campylobacter</i> culture. We found out that previously starved culture survived heat stress better than fed culture. The discrepancy between the number of dead and culturable cells shows the transformation into a viable but nonculturable state (VBNC state). The results obtained with RT-PCR showed the induction of expression of the genes <i>flaA</i> and <i>groEL</i>.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA.....	2
1.1.1 Namen in cilji diplomske naloge	2
1.1.2 Delovne hipoteze	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ZGODOVINSKA DEJSTVA IN KLASIFIKACIJA BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	4
2.2 ŽNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	4
2.3 EPIDEMIOLOGIJA IN PATOGENEZA ČREVESNIH OKUŽB Z BAKTERIJAMI RODU <i>Campylobacter</i>	6
2.3.1 Epidemiologija	6
2.3.2 Patogeneza	7
2.4 VIRULENCA BAKTERIJ VRSTE <i>Campylobacter jejuni</i>	9
2.5 ŽIVOST, KULTIVABILNOST IN STANJE VBNC BAKTERIJSKIH CELIC.....	10
2.5.1 Živost in kultivabilnost bakterijskih celic	10
2.5.2 Stanje VBNC bakterijskih celic in morfološke spremembe	11
2.6 METODE ZA DOLOČANJE ŽIVOSTI CELIC	12
2.6.1 Metode na osnovi fluorescentnih barvil	13
2.6.1.1 Princip delovanja fluorescentnih metod	13
2.6.1.2 Membranska integriteta	14
2.6.2 Molekularne metode določanja živosti	15
2.6.2.1 Metode na nivoju mRNK	15
2.6.2.2 RT-PCR	15
2.7 STRESNI POGOJI IN ODZIV MIKROORGANIZMOV	16
2.7.1 Stradanje	17
2.7.2 Toplotni stres	17
2.7.2.1 Tarčne snovi	18
2.7.2.2 Toplotna odpornost	18
2.7.2.3 Proteini toplotnega stresa	18
2.8 IZRAŽANJE GENOV PRI TOPLOTNEM STRESU	19
2.8.1 Lastnosti genoma celic <i>Campylobacter jejuni</i>	19
2.8.2 Izražanje gena <i>groEL</i>	19
2.8.3 Izražanje gena <i>flaA</i>	20

3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	21
3.1.1 Delovni mikroorganizem.....	21
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	22
3.1.3 Reagenti	23
3.1.3.1 Reagenti za izvedbo topotnega stresa in določanje preživelosti	23
3.1.3.2 Reagenti za izolacijo in čiščenje RNK, izvedbo RT-PCR in elektroforeze	23
3.1.4 Začetni oligonukleotidi.....	24
3.1.5 Laboratorijska oprema	24
3.2 METODE DELA.....	25
3.2.1 Revitalizacija seva.....	25
3.2.2 Priprava vzorcev.....	25
3.2.3 Vzorčenje.....	26
3.2.3.1 Vzorčenje za določanje morfologije, kultivabilnosti in preživelosti.....	26
3.2.3.2 Vzorčenje za določanje izražanja genov	26
3.2.4 Izpostavitev topotnemu stresu.....	26
3.2.5 Določanje živosti in morfologije celic.....	27
3.2.6 Določanje kultivabilnosti	29
3.2.7 Statistična obdelava rezultatov.....	29
3.2.8 Določanje izražanja genov z metodo RT-PCR	30
3.2.8.1 Izolacija RNK	31
3.2.8.2 Obdelava z DNazo	32
3.2.8.3 Izvedba reakcije PCR za določanje prisotnosti DNK v vzorcih RNK – 40 ciklov	32
3.2.8.4 Izvedba prve faze RT-PCR – obratno prepisovanje in sinteza cDNK	33
3.2.8.5 Izvedba druge faze RT-PCR – reakcija PCR.....	33
3.2.8.6 Priprava in izvedba elektroforeze	34
4 REZULTATI.....	36
4.1 TOPLOTNI STRES PRI 48 °C KULTURE IZ EKSPONENTNE FAZE RASTI....	36
4.1.1 Živost	36
4.1.2 Kokoidnost	37
4.1.3 Kultivabilnost.....	37
4.2 TOPLOTNI STRES PRI 48 °C KULTURE IZ STACIONARNE FAZE RASTI ...	38
4.2.1 Živost	38
4.2.2 Kokoidnost	39
4.2.3 Kultivabilnost.....	40
4.3 TOPLOTNI STRES PRI 55 °C KULTURE IZ EKSPONENTNE FAZE RASTI....	41
4.3.1 Živost	41
4.3.2 Kokoidnost	42
4.3.3 Kultivabilnost.....	43
4.4 TOPLOTNI STRES PRI 55 °C KULTURE IZ STACIONARNE FAZE RASTI ...	44
4.4.1 Živost	44
4.4.2 Kokoidnost	45
4.4.3 Kultivabilnost.....	46
4.5 PRIMERJAVA REZULTATOV IZ OBEH RASTNIH FAZ CELIC	47
4.5.1 Primerjava preživelosti	47

4.5.1.1 Primerjava preživelosti celic po toplotnem stresu pri 48 °C	47
4.5.1.2 Primerjava preživelosti celic po toplotnem stresu pri 55 °C	48
4.5.2 Primerjava kokoidnosti.....	49
4.5.2.1 Primerjava kokoidnosti celic po toplotnem stresu pri 48 °C	49
4.5.2.2 Primerjava kokoidnosti celic po toplotnem stresu pri 55 °C	50
4.5.3 Primerjava kultivabilnosti.....	51
4.5.3.1 Primerjava kultivabilnosti celic po toplotnem stresu pri 48 °C	51
4.5.3.2 Primerjava kultivabilnosti celic po toplotnem stresu pri 55 °C	52
4.6 UGOTAVLJANJE ODZIVA CELIC NA TOPLONI STRES PREKO ANALIZE TRANSKRIPTOMA – IZRAŽANJA GENOV <i>flaA</i> IN <i>groEL</i>	52
 4.6.1 Optimizacija in potek metode RT-PCR	53
4.6.1.1 Priprava izolata RNK	53
4.6.1.2 Izvedba PCR za določanje prisotnosti DNK v vzorcih RNK.....	54
4.6.1.3 Optimizacija metode PCR	54
 4.6.2 Izražanje genov 16S rRNA, <i>flaA</i> in <i>groEL</i>	55
4.6.2.1 Izražanje gena 16S rRNA	55
4.6.2.2 Izražanje gena <i>flaA</i>	56
4.6.2.3 Izražanje gena <i>groEL</i>	57
4.6.2.4 Ovrednotenje izražanja genov <i>flaA</i> in <i>groEL</i>	57
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	59
5.1 TOPLONI STRES PRI 48 °C	59
 5.1.1 Živost, kokoidnost in kultivabilnost.....	59
5.2 TOPLONI STRES PRI 55 °C	60
 5.2.1 Živost, kokoidnost in kultivabilnost.....	60
5.3 PRIMERJAVA REZULTATOV IZ OBEH RASTNIH FAZ	61
5.4 UGOTAVLJANJE ODZIVA CELIC NA TOPLONI STRES PREKO ANALIZE TRANSKRIPTOMA – IZRAŽANJA GENOV <i>flaA</i> IN <i>groEL</i>	62
 5.4.1 Optimizacija in potek metode RT-PCR	62
 5.4.2 Izražanje genov <i>flaA</i> in <i>groEL</i>.....	63
5.5 SKLEPI.....	65
6 POVZETEK.....	66
7 VIRI	67
ZAHVALA	73
PRILOGE.....	74

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Patogene vrste iz rodu <i>Campylobacter</i> in njihovi rezervoarji (Solomon in Hoover, 1999).....	7
Preglednica 2: Spekter bolezni, ki jih lahko povzročajo bakterije rodu <i>Campylobacter</i> (Crushell in sod., 2004)	9
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR in ugotavljanje izražanja genov z metodo RT-PCR	24
Preglednica 4: Optimizacija temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov pri metodi RT-PCR	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Fotografija celice <i>Campylobacter jejuni</i> , posneta z elektronskim mikroskopom (foto: Klančnik, 2004)	5
Slika 2: Fotografija koka <i>Campylobacter jejuni</i> , posneta z elektronskim mikroskopom (foto: Klančnik, 2004)	12
Slika 3: Fotografija kulture <i>Campylobacter jejuni</i> obarvane z "Live/Dead BacLight kit" pod fluorescentnim mikroskopom (foto: Klančnik, 2004)	14
Slika 4: Shematični prikaz opravljenih eksperimentov	21
Slika 5: Vstavljanje membranskega filtra v nastavek za filtriranje z injekcijsko brizgo	28
Slika 6: Filtriranje vzorca skozi membranski filter	28
Slika 7: Polaganje membranskega filtra na objektno steklo.....	28
Slika 8: Mikroskop, povezan z računalnikom in fotoaparatom, za fotografiranje filtrov ...	29
Slika 9: Shematski prikaz izvedbe RT-PCR.....	30
Slika 10: Nanašanje vzorcev v kolone za izolacijo RNK	32
Slika 11: Agarozni gel v elektroforetski posodi med potekom elektroforeze	35
Slika 12: Preživelost celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 48 °C	36
Slika 13: Delež kokov v vzorcih kultur celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti po izpostavitvi toplotnemu stresu pri 48 °C	37
Slika 14: Kultivabilnost kultur celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 48 °C	37
Slika 15: Preživelost celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 48 °C	38
Slika 16: Delež kokov v vzorcih kultur celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti po izpostavitvi toplotnemu stresu pri 48 °C	39
Slika 17: Kultivabilnost kultur celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 48 °C	40
Slika 18: Preživelost celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C	41
Slika 19: Delež kokov v vzorcih kultur celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti po izpostavitvi toplotnemu stresu pri 55 °C	42
Slika 20: Kultivabilnost kultur celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C	43
Slika 21: Preživelost celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C	44
Slika 22: Delež kokov v vzorcih kultur celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti po izpostavitvi toplotnemu stresu pri 55 °C	45
Slika 23: Kultivabilnost kultur celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C	46
Slika 24: Primerjava preživelosti celic <i>C. jejuni</i> po toplotnem stresu pri 48 °C	47
Slika 25: Primerjava preživelosti celic <i>C. jejuni</i> po toplotnem stresu pri 55 °C	48
Slika 26: Primerjava kokoidnosti celic <i>C. jejuni</i> po toplotnem stresu pri 48 °C	49
Slika 27: Primerjava kokoidnosti celic <i>C. jejuni</i> po toplotnem stresu pri 55 °C	50
Slika 28: Primerjava kultivabilnosti celic <i>C. jejuni</i> po toplotnem stresu pri 48 °C	51
Slika 29: Primerjava kultivabilnosti celic <i>C. jejuni</i> po toplotnem stresu pri 55 °C	52

Slika 30: Primer prisotnosti ali odsotnosti mRNK po elektroforezi, izpeljani pod pogoj RNK.....	53
Slika 31: Primer preverjanja učinkovitosti odstranjevanja DNA v vzorcu na primeru gena 16S rRNA	54
Slika 32: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RT-PCR gena 16S rRNA celic <i>C. jejuni</i> med inkubacijo pri različnih pogojih stresa.....	55
Slika 33: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RT-PCR gena <i>flaA</i> celic <i>C. jejuni</i> med inkubacijo pri različnih pogojih stresa.....	56
Slika 34: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RT-PCR gena <i>groEL</i> celic <i>C. jejuni</i> med inkubacijo pri različnih pogojih stresa.....	57
Slika 35: Ocena izražanja gena <i>flaA</i> stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> po topotnem stresu pri 55 °C.....	58
Slika 36: Ocena izražanja gena <i>groEL</i> stradane kulture celic <i>C. jejuni</i> po topotnem stresu pri 55 °C	58

KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 48 °C.....	74
Priloga B: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 48 °C.....	75
Priloga C: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic <i>C. jejuni</i> iz eksponentne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 55 °C.....	76
Priloga D: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic <i>C. jejuni</i> iz stacionarne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 55 °C.....	77

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
cDNK	komplementarna DNK
CFU	število mikroorganizmov, ki lahko tvorijo kolonije (angl. colony forming units)
CT	<i>Vibrio cholerae</i> toksin
DEPC	dietil pirokarbonat (angl. diethylpyrocarbonate)
ddH ₂ O	bidestilirana voda
ddH ₂ O DEPC	bidestilirana voda z dodatkom DEPC
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	etilen diaminotetraocetna kislina (angl. ethylene diaminotetraacetic acid)
GBS	Guillan-Barrèjev sindrom
HSP	proteini topotnega stresa (angl. heat shock proteins)
LPS	lipopolisaharidi
LT	topotno labilni toksin bakterij <i>E. coli</i>
mRNK	informacijska RNK (angl. messenger RNA)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RLT	pufer za lizo iz kita RNeasy
RNK	ribonukleinska kislina
rRNK	ribosomska RNK
RT-PCR	obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo
RW1	pufer za izpiranje iz kita RNeasy
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. Sodium dodecyl sulphate)
VBNC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (angl. viable but non culturable)

1 UVOD

Po njihovi uspešni izolaciji iz stolice v 70-ih letih prejšnjega stoletja so bakterije *Campylobacter jejuni* hitro postale najpogosteje prepoznani vzrok bakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh. Posebne gojivne zahteve in težave pri zgodnjih poskusih genetske modifikacije so zaustavile napredek pri razumevanju teh organizmov v primerjavi z drugimi patogeni kot npr. *Escherichia coli* in *Salmonella* spp. V splošnem pa se danes ponovno pojavlja zanimanje za bakterije rodu *Campylobacter*. Zanimanje za nadaljnje raziskave se je še povečalo po sekvenciranju 1,64 milijona nukleotidov njihovega genoma (Crushell in sod., 2004).

Bakterije rodu *Campylobacter* (grško ”ukriviljen”) so po Gramu negativne, spiralne, gibljive palčke. So mikroaerofilni, zahtevajo od 5 do 10 % kisika in ne rastejo na zraku (Crushell in sod., 2004). So termofilni organizmi z optimalno temperaturo rasti pri 42 °C. Te lastnosti odražajo njihovo prilagoditev na njihovo naravno okolje – črevesje toplokrvnih živali in ptic (Ketley, 1997). Epidemiološka evidenca kaže, da je črevesje živali, najpogosteje perutnine, goveda, divjih ptic, prašičev in hišnih ljubljenčkov, najpogostejši naravni življenjski prostor sevov, ki lahko okužijo človeka. Neobdelano mleko in voda sta bila povezana z večjimi izbruhi kampilobakterskega gastroenteritisa, vendar jih večina ni dobila mikrobiološke potrditve. Večina okužb s kampilobakterji je sporadičnih in v večini primerov vir okužbe ni določen (Sails in sod., 1998).

Bakterije pogosto živijo v hitro spremenjajočih se okoljih in zato so mnoge med njimi (tudi kampilobakterji) razvile zelo posebne načine za prilagoditev okoljskim spremembam. Ti načini najpogosteje vodijo k aktivaciji in/ali represiji določenega števila genov za prilagoditev celične fiziologije ali metabolizma novim razmeram (Pichereau in sod., 2000). Odgovor toplotnemu stresu je eden najbolje ohranjenih pojavov v bioloških sistemih in se pojavi po izpostavitvi celic in organizmov visokim temperaturam. Odgovor je izražen s povišano sintezo niza proteinov, imenovanih proteini toplotnega stresa, ki obvladujejo kopiranje odprtih ali napačno zvitih verig proteinov. Številni proteini toplotnega stresa so molekularni šaperoni ali proteaze in delujejo tako, da pomagajo pri ponovnem zvijanju poškodovanih proteinov ali pa odstranjujejo proteine, katere se ne da več popraviti (da Silva in sod., 2003).

Nekatere bakterije se odzovejo na strese s prehodom v nekultivabilno stanje oz. stanje VBNC (Park, 2002). Tak odziv na strese je prisoten pri mnogih patogenih bakterijah, vključno z bakterijami vrste *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* in *Campylobacter jejuni*. Z običajnimi kultivacijskimi metodami celic v stanju VBNC ne moremo zaznati, čeprav le-te ostanejo potencialno patogene (Tholozan in sod., 1998).

Pri staranju in izpostavitvi stresu celic rodu *Campylobacter* pride tudi do morfoloških sprememb. Med eksponentno fazo rasti prevladujeta spiralna in bacilarna oblika. S staranjem kulture in pri izpostavitvi stresu pa preidejo v kokoidno obliko. Večina bakterijskih vrst pri prehodu v stacionarno fazo in med stradanjem doživi temeljite strukturne in fiziološke spremembe, ki se odražajo predvsem v povečani odpornosti na

topltni, oksidativni, osmotski in kislinski stres. Celice *Campylobacter jejuni* kažejo največjo odpornost na strese v eksponentni fazi rasti in ne v stacionarni fazi kot večina bakterijskih vrst. To gre pripisati odsotnosti dejavnika RpoS, ki omogoča izražanje genov za večjo odpornost v stacionarni fazi (Kelly in sod., 2001; Park 2002).

Celice *Campylobacter jejuni* preidejo v stanje VBNC tudi pri stradanju. Stradanje povzroča tudi povečano odpornost na toplotni stres. Ta povečana odpornost je rezultat sinteze proteinov stradanja. Pri izpostavitvi toplotnemu stresu ob dodatku kloramfenikola, kot zaviralca sinteze zaščitnih proteinov, pa lahko ugotovimo zmanjšano odpornost (Cappelier in sod., 2000).

1.1 NAMEN, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

1.1.1 Namen in cilji diplomske naloge

V praktičnem delu naloge smo želeli določiti vpliv kratkotrajnega in dolgotrajnega toplotnega stresa na živost, kultivabilnost in morfologijo celic *Campylobacter jejuni*. Uporabili smo nestradane in predhodno stradane kulture iz eksponentne in stacionarne faze rasti in klasično kultivacijsko tehniko ter fluorescentno mikroskopijo. Z dodatkom kloramfenikola stradani kulturi, kot inhibitorja sinteze proteinov, smo lahko posredno spremljali sintezo novonastalih proteinov med stradanjem. V naslednji stopnji naloge je bil naš cilj študij izražanja virulentnega gena *flaA* in gena za toplotni stres *groEL*, pri izpostavitvi toplotnemu stresu. Pričakovali smo, da bodo stradane celice odpornejše na kratkotrajni toplotni stres in da bomo potrdili vpliv toplotnega stresa tudi na nivoju izražanja genov.

Namen dela je bil ugotoviti vpliv kratkotrajnega in dolgotrajnega toplotnega stresa na morfologijo, kultivabilnost, preživelost in izražanje stresnih genov bakterij *Campylobacter jejuni* iz eksponentne in stacionarne faze rasti. Želeli smo tudi oceniti vpliv predhodnega stradanja na povečano sposobnost preživetja po naknadni izpostavitvi toplotnemu stresu.

Cilji so bili naslednji:

- ugotoviti vpliv toplotnega stresa na morfologijo, kultivabilnost in živost bakterij *C. jejuni* iz eksponentne in stacionarne faze rasti
- ugotoviti vpliv predstresa stradanja na temperaturno odpornost bakterij *C. jejuni*
- ugotoviti vpliv predhodnega stradanja in toplotnega stresa na izražanje stresnih genov bakterij *C. jejuni*

1.1.2 Delovne hipoteze

Postavili smo naslednje hipoteze:

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

Kombinirani stres (temperaturni stres skupaj s predhodnim subletalnim stresom stradanja) ima specifičen učinek na mikrobne celice. V prvih urah stradanje sproži sintezo stresnih proteinov, ki povečajo temperaturno odpornost celic.

Stresni odziv sproži izražanje genov, vključenih v splošni in specifični obrambni mehanizem celice. Predvidevamo, da prihaja do sprememb na nivoju izražanja genov za topotni stres in stradanje (*groEL*) in virulenco (*flaA*).

2 PREGLED OBJAV

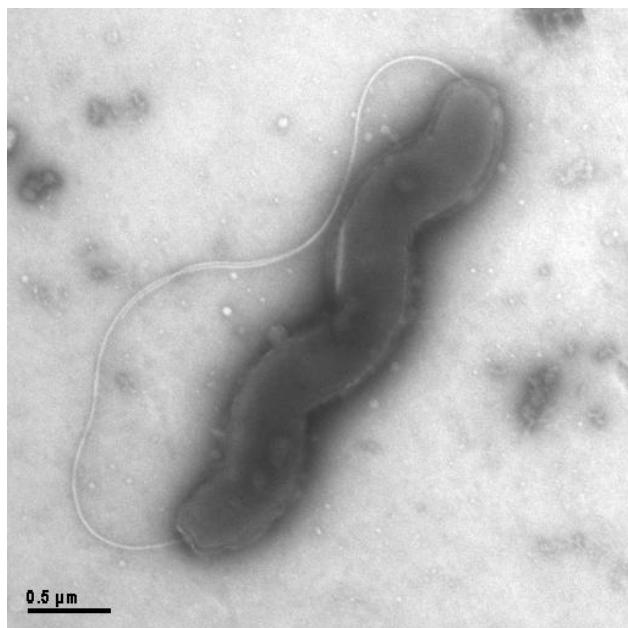
2.1 ZGODOVINSKA DEJSTVA IN KLASIFIKACIJA BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Bakterije rodu *Campylobacter* najverjetneje sodijo med najbolj edinstvene med črevesnimi patogeni, saj je minilo skoraj stoletje od prvih opisov teh organizmov do razvoja rutinskih tehnik izolacije iz stolice. Najzgodnejši zapisi o tem organizmu segajo v leto 1886, ko je Escherich opiral organizme, podobne kampilobakterjem ("vibrionen") v črevesni vsebini 16 od skupno 17 otrok, ki so umrli zaradi bolezni, povezanih z drisko. Zatem je sledilo nekaj nemških člankov, ki so opisovali nekultivabilne spiralne bakterije pri črevesnih boleznih. Prvo uspešno izolacijo kulture rodu *Campylobacter* sta napravila McFadyean in Stockman leta 1913 iz splavljenih ovčjih zarodkov. Prvi izolati so bili iz krvi in drugih običajno sterilnih vzorcev. Izolacije iz blata so bile neuspešne zaradi prehitrega razrasti koliformnih organizmov (Crushell in sod., 2003). Prve uspešne izolacije iz blata ljudi, obolelih za akutnim enterokolitisom segajo šele v 70. leta 20. stoletja. Čeprav sta imeni vrst *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* izpeljani iz prvotne povezave z živalskimi črevesnimi okužbami, sta danes najpomembnejša človeška patogena v rodu *Campylobacter*. 80 do 90% vseh okužb, ki jih povzročajo kampilobakterji, je povzročenih prav z vrstami *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* (Ketley, 1997).

Campylobacter je bil na začetku imenovan *Vibrio fetus* subsp. *jejuni*. Povezan je bil s splavi, povzročenimi zaradi infekcije pri ovcah in govedu. V zgodnjih šestdesetih letih prejšnjega stoletja so prvič razlikovali rod *Campylobacter* od rodu *Vibrio* na podlagi biokemijskih in seroloških testov. *Vibrio fetus* subsp. *jejuni* je bil reklassificiran kot *Campylobacter jejuni* leta 1963. Danes rod *Campylobacter* vključuje okoli 20 vrst in podvrst, med katerimi je osem takih, ki povzročajo črevesne bolezni pri človeku. Zadnje čase je izoliranih tudi vse več *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* in *C. hyoilealis*, predvsem zaradi uporabe zelo specifične verižne reakcije s polimerazo kot detekcijske metode. Rod *Campylobacter* spada skupaj z rodovoma *Helicobacter* in *Arcobacter* v družino *Campylobactereaceae* (Solomon in Hoover, 1999).

2.2 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Po morfologiji so kampilobakterji tanke (1,5 – 6,0 μm dolge in 0,2 – 0,5 μm široke), po Gramu negativne, spiralne bakterije. Celice imajo lahko na enemu ali obeh koncih biček, ki jim poleg spiralne oblike daje zelo dobro gibeljivost (Ketley, 1997). Na sliki 1 lahko vidimo tipično spiralno obliko kampilobakterjev, dobro viden je tudi biček.



Slika 1: Fotografija celice *Campylobacter jejuni*, posneta z elektronskim mikroskopom (foto: Klančnik, 2004)

Campylobacter jejuni je mikroaerofilen organizem in najbolje raste pri koncentracijah 5 % O₂, 10 % CO₂ in 85 % N₂. Je termotoleranten z optimalno temperaturo rasti med 37 in 42 °C (Solomon in Hoover, 1999).

V primerjavi z ostalimi bakterijskimi patogeni, ki se prenašajo s hrano, so kampilobakterji precej nenavadni, zato se spekter zanje primernih življenjskih okolij močno zoži. Kot že rečeno so mikroaerofilni in ne rastejo na zraku. Poleg tega se lahko razmnožujejo le v ozkem temperaturnem območju med 30 in 47 °C. Ti dve lastnosti močno omejujeta njihovo sposobnost razmnoževanja zunaj gostiteljskega organizma. Za razliko od ostalih patogenih bakterij, ki se prenašajo s hrano, običajno niso sposobni razmnoževanja niti med niti po predelavi hrane in njenim shranjevanjem. Kampilobakterji so zelo občutljivi še na mnoge druge okoljske dejavnike in slabše prenašajo strese kot ostali patogeni. V primerjavi z ostalimi patogeni, ki se prenašajo s hrano (npr. *Salmonella enteritidis* in *Staphylococcus aureus*) so bolj občutljivi na sušenje in zato slabo preživijo na suhih površinah. Slabo prenašajo osmotski stres in ne rastejo pri koncentracijah natrijevega klorida višjih od 2 %. Slabo prenašajo tudi nizke vrednosti pH, izpostavitev žarkom UVB in visoke temperature – temperatura pasterizacije jih uniči (Park, 2002).

Pripadniki rodu *Campylobacter* imajo razmeroma majhen genom s približno 1,6 – 1,7 Mbp, z DNK bogato z adeninom in timinom. Delež gvanina in citozina je približno 30 %. Majhnost genoma se najbolje odraža na njihovi zahtevnosti za kompleksne rastne medije in nesposobnosti fermentacije ogljikovih hidratov in razgradnje kompleksnih snovi (Ketley, 1997).

2.3 EPIDEMIOLOGIJA IN PATOGENEZA ČREVESNIH OKUŽB Z BAKTERIJAMI RODU *Campylobacter*

2.3.1 Epidemiologija

Enteritisi, ki jih povzročajo *C. jejuni* in *C. coli*, predstavljajo resen zdravstveni problem v razvitih državah. Število črevesnih okužb, ki jih povzročajo kampilobakterji, je v nekaterih državah znatno višje od števila okužb z ostalimi patogeni, vključno s salmonelami. Obolenost se je celo zvišala. Vzroke za to lahko pripisemo spremembam naših prehrambnih navad, na primer povečani potrošnji piščančjega mesa (Ketley, 1997).

Ocenjujejo, da se v ZDA pojavi približno 2,4 milijona primerov kampilobakterijoz letno. 17 % hospitaliziranih primerov okužb, ki izvirajo iz hrane, je povzročenih s strani kampilobakterjev, približno 5 % primerov se konča s smrtno. V Veliki Britaniji so ugotovili, da ostaja velik delež okužb neprijavljenih in je število dejanskih okužb še večje (Crushell in sod., 2003).

Kampilobakter je drugi najpogosteji bakterijski povzročitelj enteritisov v Sloveniji. V letu 2006 je bilo prijavljenih 944 primerov enteritisov, katerih povzročitelj je bil kampilobakter. Pri ljudeh je najpogosteji *Campylobacter jejuni* (852 prijav oz. 90 % vseh prijav) (Epidemiološko spremljanje ... , 2007). Incidenca okužb s kampilobakterji pri otrocih je starostno odvisna. V deželah v razvoju pogosteje zbolevajo mlajši otroci, v razvitih deželah pa je obolenost večja pri starejših otrocih. V deželah v razvoju so okužbe hiperendemične. Razloge najdemo v slabici sanitaciji in tesnem stiku z domačimi živalmi (Crushell in sod., 2003). Večina prijavljenih obolelih v Sloveniji so bili otroci, in sicer je bilo 24 % obolelih mlajših od 5 let, 40 % mlajših od 14 let. Letna incidenca kampilobakterskih okužb je bila 47/100.000 prebivalcev. Hospitaliziranih je bilo 44 % obolelih. Večjih izbruuhov bolezni povzročenih s strani kampilobakterjev v zadnjih letih niso zabeležili (Epidemiološko spremljanje ... , 2007).

Pri ljudeh so okužbe s kampilobakterji v večji meri rezultat zaužitja kontaminiranih živil živalskega izvora, čeprav je možno povezati določeno število bolezni tudi s hišnimi ljubljenčki in površinskimi vodami. Večina okužb je sporadičnih, širši izbruhi bolezni so redki (Park, 2001). Potencialni viri infekcije so perutnina, krave, prašiči, glodavci, divje ptice, ovce, konji in hišni ljubljenčki. Številne študije dokazujejo, da je v ZDA surova ali premalo termično obdelana perutnina najpomembnejši vir bakterij rodu *Campylobacter* za človeka. Sporadične infekcije se pojavljajo predvsem v poletnih mesecih (Solomon in Hoover, 1999).

Večina svetovno proizvedene perutnine je kontaminirane s kampilobakterji. To se kaže v visoki stopnji izolacije teh patogenov iz perutinskih izdelkov, predvsem svežega perutninskega mesa na trgu. V ZDA so na primer ugotovili, da je bilo 69 % piščancev iz veleblagovnic kontaminiranih z bakterijami *Campylobacter jejuni* (Park, 2002). Tudi zdravstvena inšpekcija RS v rednem nadzoru živil v zadnjih letih poroča o sorazmerno velikem deležu okuženih vzorcev perutninskega mesa s kampilobaktrom. Leta 2004 je bilo v rednem nadzoru na kampilobakter pozitivnih 39 % vzorcev svežega perutninskega mesa.

34 % vzorcev je bilo pozitivnih na *Campylobacter jejuni* in 5 % na *Campylobacter coli*. Leta 2005 je delež pozitivnih vzorcev narasel na 47 % (41 % pozitivnih na *Campylobacter jejuni*, 6 % na *Campylobacter coli*). V letu 2006 je bilo okuženih 59 % odvzetih vzorcev – 39 % *Campylobacter jejuni*, 13 % *Campylobacter lari*, 6 % *Campylobacter coli* in 1 % *Campylobacter hyoilealis* (Epidemiološko spremjanje ... , 2007). Vzorci govejega mesa so najpogosteje kontaminirani s *C. jejuni*, medtem ko so vzorci prašičjega mesa pogosteje kontaminirani s *C. coli* (Nørrung in Bunčič, 2008).

Bakterije *Campylobacter jejuni* pridejo do piščancev preko različnih virov: voda, krma, divje ptice, glodavci in fekalije drugih piščancev ali živine (Solomon in Hoover, 1999). V preglednici 1 so našteti glavni patogeni predstavniki rodu *Campylobacter*, bolezni, katere lahko povzročijo ter glavni prenašalci bakterij.

Preglednica 1: Patogene vrste iz rodu *Campylobacter* in njihovi rezervoarji (Solomon in Hoover, 1999)

Organizem	Bolezen, simptomi	Rezervoar okužbe
<i>Campylobacter jejuni</i> spp. <i>jejuni</i>	enteritis, sistemske bolezni, Guillain-Barréjev sindrom	človek, domače živali, glodavci, ptice
<i>Campylobacter coli</i>	enteritis	prašiči, ptice
<i>Campylobacter lari</i>	enteritis	ptice
<i>Campylobacter hyoilealis</i>	enteritis	govedo, prašiči
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	enteritis	hišni ljubljenčki
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	enteritis, sistemske bolezni	govedo, ovce
<i>Campylobacter cinaedi</i>	enteritis	

Večina živalskih gostiteljev (perutnina, svinje, ovce, govedo, psi in mačke) prenaša kampilobakterje v svojem prebavnem traktu, brez vidnih znakov bolezni. Črevesje omenjenih toplokrvnih živali je naravno življensko okolje bakterij rodu *Campylobacter* (Park, 2002). Do kontaminacije živil, ki lahko povzročijo pojav bolezni, pride predvsem med predelavo in pripravo živil živalskega izvora. Zaradi neprimerne ravnanja z mesom med razsekom pride do prenosa bakterij iz prebavnega trakta na meso (Nørrung in Bunčič, 2008).

Če eksperimentalno inokuliramo perutnino s kampilobakterji, ti najpogosteje kolonizirajo slepo črevo, debelo črevo in kloako. Kolonije so večinoma omejene na črevesno sluzno plast in kripte črevesnega epitelija (Park, 2002). Biček in spiralna oblika celic dajeta pripadnikom rodu *Campylobacter* nenavadno visoko stopnjo gibljivosti v viskoznem okolju, zato z lakkoto kolonizirajo mukozno plast črevesnega epitelija gostiteljskega organizma (Ketley, 1997).

2.3.2 Patogeneza

Mnogo okužb s kampilobakterji je posledica zaužitja kontaminirane hrane živalskega izvora. Isti organizmi, ki neškodljivo kolonizirajo živali, lahko povzročajo pojav bolezni pri človeku. Razlike pri razvoju bolezni obstajajo tudi med različnimi osebki. Pri

raziskovanju večjih izbruhov bolezni in študijah pri prostovoljcih so ugotovili, da isti sev pri nekaterih osebkih ne povzroča simptomov ali pa le blage, pri drugih pa povzroči hude oblike bolezni. Bolezenski znaki so odvisni od interakcije med gostiteljem in bakterijo (Wassenaar in Blaser, 1999). Proteini toplotnega stresa, ki nastanejo pri odzivu celice na temperaturni stres, so pomemben virulentni dejavnik, saj mutant DnaJ ni bil sposoben kolonizacije piščancev (Konkel in sod., 1998; Snelling in sod., 2005).

Okužbe s *C. jejuni* in *C. coli* povzročajo širok spekter bolezenskih simptomov. Patogeneza odraža tako občutljivost gostitelja kot virulentnost določenega seva. Rezultat okužb s kampilobakterji v deželah v razvoju so večinoma vodene driske, v razvitih državah pa akutni vnetni enteritisi. Mehanizmi, s katerimi kampilobakterji povzročajo bolezen, še niso popolnoma pojasnjeni. Na osnovi eksperimentalnih podatkov pa sta bila določena vsaj dva mehanizma:

- črevesna adherenca in proizvajanje toksinov
- bakterijska invazija in proliferacija na črevesni sluzi (Park, 2002).

Infekcijska doza *C. jejuni* je med 500 in 10.000 celic (Snelling in sod., 2005). Prvi znak okužbe z bakterijami *C. jejuni* in *C. coli* je značilna akutna bolečina v trebuhu, ki jo običajno spremljata povišana telesna temperatura in splošno slabo počutje. Simptomi se nato razvijejo in vključujejo še obilno drisko, ki postane vodena. Inkubacijska doba pred pojavom simptomov je od 1 do 7 dni. V driski se lahko pojavi tudi kri, sluz in vnetni eksudat z levkociti. Akutna driska navadno traja 2 do 3 dni. Bolečine v trebuhu in slabo počutje običajno prenehajo z drisko, včasih lahko trajajo malo dlje. Včasih se pojavijo ponovitve bolezni, vendar v bolj blagi obliki. V razvitih deželah je driska navadno vnetnega značaja in opazni so znaki vnetja spodnjega in zgornjega dela tankega črevesa. Nevnetna driska brez sledi krvi, sluzi in levkocitov, pa je značilna v državah v razvoju in se redko pojavlja v razvitih deželah. Čeprav se okužba lahko razvije v hudo obliko bolezni in traja več kot teden dni, se običajno konča sama od sebe in brez zapletov (Ketley, 1997). Zdravljenje z antibiotiki običajno ni potrebno. Antimikrobnno zdravljenje je priporočeno pri otrocih z oslabelim imunskim sistemom in v hujših primerih, ko trajajo simptomi dlje kot teden dni. Najpogosteje se predpisujejo eritromicin, azitromicin, aminoglikozidi in fluorokinoloni (Crushell in sod., 2004).

Najpomembnejši zaplet, ki lahko sledi okužbi s kampilobakterji, je Guillan-Barréjev sindrom ali krajše GBS (Ketley, 1997). GBS je eden najpogostejših vzrokov za akutno ohlapno paralizo. GBS je avtoimuna bolezen perifernega živčnega sistema, za katero je značilna običajno simetrična mišična šibkost, ki se razvije v obdobju nekaj dni ali več. Paraliza hitro prizadene ude, dihalne mišice in vodi v izgubo refleksov. Bolezen se konča sama od sebe in mišična moč se izboljša v 2 do 3 tednih. Sledi popolno ali delno ozdravljenje v nekaj tednih ali mesecih (Nachamkin in sod., 1998). V preglednici 2 so zbrane še druge bolezni, katere lahko povzročijo kampilobakterji.

Preglednica 2: Spekter bolezni, ki jih lahko povzročajo bakterije rodu *Campylobacter* (Crushell in sod., 2004)

Črevesne bolezni
enteritis, toksično povečanje debelega črevesa in perforacija, hepatitis, pankreatitis, pretrganje vranice, vnetje potrebušnice, vnetje žolčnika, rana na želodcu
Revmatološke
reaktivni artritis, septični artritis, vnetje kostnega mozga, Henoch-Schönleinova pegavica
Nevrološke
Guillain-Barréjev sindrom, meningitis, meningoencefalitis
Kožne bolezni
celulitis, izpuščaji, ognojki
Pljučne bolezni
pljučnica, gnojenje v trebušni votlini (empiema)
Žilne bolezni
septični šok, endokarditis, anevrizma, tromboflebitis, hemolitično-uremični sindrom

2.4 VIRULENCA BAKTERIJ VRSTE *Campylobacter jejuni*

Številne študije so dokazale pomen gibljivosti, površinskih struktur in metabolnih prilagoditev pri patogenezi okužbe s *C. jejuni* (Hofreuter in sod., 2006). Med vsemi potencialnimi virulentnimi dejavniki bakterij *C. jejuni* so bički najbolje preučeni. Proizvodnja toksinov in invazivne lastnosti močno variirajo med različnimi sevi. Struktura lipopolisaharidov (krajše LPS) variira med toplotno stabilnimi serotipi. Izvenčrevesno širjenje bakterij je odvisno od njihove sposobnosti premostitve obrambnih mehanizmov, ki so lahko odvisni od bakterij samih ali od gostiteljskega organizma (Wassenaar in Blaser, 1999).

Bakterije *C. jejuni* imajo lahko enega ali dva polarna bička, ki jim omogočata tipično sunkovito gibljivost, dobro vidno pod mikroskopom in razpršen izgled kolonij na agarskih ploščah. Tako kot pri ostalih bakterijah je biček sestavljen iz multimer beljakovine flagelin, ki so pritrjene na bazalno enoto v membrani, ki služi kot motor pri rotaciji. Bički so pomemben virulentni dejavnik – bakterije morajo imeti biček, da lahko kolonizirajo črevesje gostitelja in povzročijo obolenje. Gibljivost najverjetneje pomaga bakterijskim celicam, da premagajo peristaltično gibanje črevesa in jim omogoča prehod skozi sluzno plast, ki prekriva epitelij. Biček ima pomembno vlogo tudi pri vdoru v epitelne celice. Biček je pomemben tudi pri imunskejem odzivu pri človeku (Wassenaar in Blaser, 1999). Med mnogimi virulentnimi dejavniki, kot so geni, vpleteni v izločanje (*flhA*, *flhB*, *flgB*, *flgE2*), gibanje (*flaA*, *flaB*), adhezijo (*cadF*), kolonizacijo (*docA*, *docB*), invazivnost (*ciaB*, *iamA*), tvorbo citotoksinov (*cdtA-C*), sta za patogenezo in znotrajcelično preživetje pomembna tudi gena *katA* ter *sodB* (Pesci in sod., 1994; Day in sod., 2000; Müller in sod., 2005).

LPS oz. lipopolisaharidni sloj zunanje ovojnica je pomemben virulentni dejavnik pri mnogih po Gramu negativnih bakterijah. Pripomore k odpornosti proti serumu, odpornosti proti fagocitom in citotoksičnosti (Ketley, 1997). Lipid A, ki je sestavni del lipopolisaharidnega sloja, ima značaj endotoksične aktivnosti. Sistemska infekcija lahko vodi do sepse in šoka, domnevno zaradi izločanja LPS. Med LPS bakterij *C. jejuni* lahko

najdemo enega izmed O-protiteles, ki imajo v svoji strukturi saharidno enoto. O-protitelesa lahko predstavljajo tako poli- kot oligosaharidno stransko verigo (Wassenaar in Blaser, 1999).

Bakterije rodu *Campylobacter* proizvajajo dva tipa toksinov: enterotoksine in citotoksine. Enterotoksine, katere tvorijo kampilobakterji, je leta 1982 odkrila slovenska raziskovalka prof. Gubina (Gubina in sod., 1982). Enterotoksi so beljakovine, ki se vežejo na celične receptorje, vstopijo v celico in povzročijo porast koncentracije cAMP. Ti povzročijo povečan odpust tekočin, ki se odraža kot vodena driska. Enterotoksin, ki ga izločajo kampilobakterji, je homologen toksinu, ki ga izločata *Vibrio cholerae* (*Vibrio cholerae* toksin ali CT) in *Escherichia coli* (toploto-labilni toksin bakterij *Escherichia coli* ali LT). Citotoksi pa so beljakovine, ki ubijajo tarčne celice. Vodilna sta dva mehanizma delovanja citotoksina: inhibicija sinteze celičnih beljakovin in inhibicija sestavljanja aktinskih filamentov (Solomon in Hoover, 1999).

C. jejuni ohranja adhezivnost, invazivnost in sposobnost znotrajceličnega preživetja tudi po izpostavitvi stresnim pogojem, vendar so omenjene lastnosti virulentnosti odvisne od stresnih pogojev, ki so jim bile celice *C. jejuni* izpostavljene pred infekcijo epitelnih celic (Cappelier in sod., 1999; Rubeša Mihaljević in sod., 2007). Toplotni stres (55 °C) je v prvih urah zmanjšal sposobnost prirreditve in invazije, vendar se invadirane celice *C. jejuni* začnejo znotraj celic Caco-2 pospešeno razmnoževati. Stradanje, predvsem dolgotrajno, je izrazito zmanjšalo adhezivnost in invazivnost pri celični kulturi Caco-2. Omenjeno zmanjšanje virulence je lahko posledica subletalnih poškodb in manjše aktivnosti stradanih celic, saj je del kulture preživelilo infekcijo tudi 5 dni (Rubeša Mihaljević in sod., 2007). Če povzamemo, da je znotrajcelično preživetje povezano s preživetjem v gostiteljskem imunskejem sistemu, razvojem bolezni in dolgotrajno infekcijo (Day in sod., 2000), lahko vidimo, da so raziskave stresnega odziva kampilobakterjev tudi na nivoju virulence zelo pomembne.

2.5 ŽIVOST, KULTIVABILNOST IN STANJE VBNC BAKTERIJSKIH CELIC

2.5.1 Živost in kultivabilnost bakterijskih celic

Vprašanje živosti bakterijskih celic je zelo pomembno, predvsem ko obravnavamo varnost hrane in pitne vode, sterilnost farmacevtskih izdelkov in podobne probleme. Pogosto pa je na to vprašanje težko odgovoriti. Pri običajnem opazovanju celic pod mikroskopom ne moremo določiti ali so žive ali ne. Potrebno je bilo razviti metode za določanje živosti. Za določanje živosti sta rast in delitev celic najpomembnejša parametra. Tu je živost celic enačena s kultivabilnostjo. Kultivabilnost je definirana kot sposobnost celic, da se namnožijo v populaciji, ki jo opazovalec zazna. Po navadi je to vidna kolonija na površini hranilnega agarja. Takšne metode so bile v rabi dolgo vrsto let in so relativno poceni (Bogosian in Bourneuf, 2001).

V bakteriologiji sta sposobnost reprodukcije in tvorbe kolonij na agarskih ploščah, najpogosteje uporabljeni lastnosti za določanje živosti celic. Dokazali pa so, da

nesposobnost posamezne celice, da tvori kolonijo ne pomeni, da je mrtva. Možno je, da postanejo celice začasno nekultivabilne ali da so pogoji za rast suboptimalni (Nyström, 2001). Celic, ki ne tvorijo kolonij, bodisi, ker so mrtve, v stanju VBNC, subletalno poškodovane, mirajoče ali neaktivne, pri uporabi klasičnih kultivacijskih metod ne moremo določiti. V naravnem okolju pa je število takšnih celic lahko zelo veliko (Breeuwer in Abee, 2000).

Živost mikroorganizmov je odločilna pri detekciji in določanju števila kvarljivcev v živilih, ovrednotenju inaktivacijskih postopkov, določanju kakovosti starter kultur, biodegradaciji, proizvodnji antibiotikov in mnogih drugih primerih. Osnovni pogoji, potrebni za preživetje mikroorganizma, so: nepoškodovana citoplazemska membrana, ki služi kot pregrada med citoplazmo in zunanjim okoljem; prepis DNK in prevod RNK; proizvodnja energije za vzdrževanje celičnega metabolizma, biosintezo beljakovin, nukleinskih kislin, polisaharidov in drugih celičnih komponent; in eventuelno rast in razmnoževanje (Breeuwer in Abee, 2000). Celice, pri katerih je zaznavna kakršnakoli metabolna aktivnost, imenujemo aktivne celice. Če je ohranjena neokrnjena zunanja struktura in ni zaznavna nobena metabolna aktivnost, potem imamo neaktivne celice. Takšne celice so lahko še vedno aktivne, vendar ne dovolj, da bi lahko zaznali njihovo aktivnost ali pa so umirajoče. Celice, ki imajo poškodovano oz. degradirano membrano, pa so mrtve celice (Joux in Lebaron, 2000).

2.5.2 Stanje VBNC bakterijskih celic in morfološke spremembe

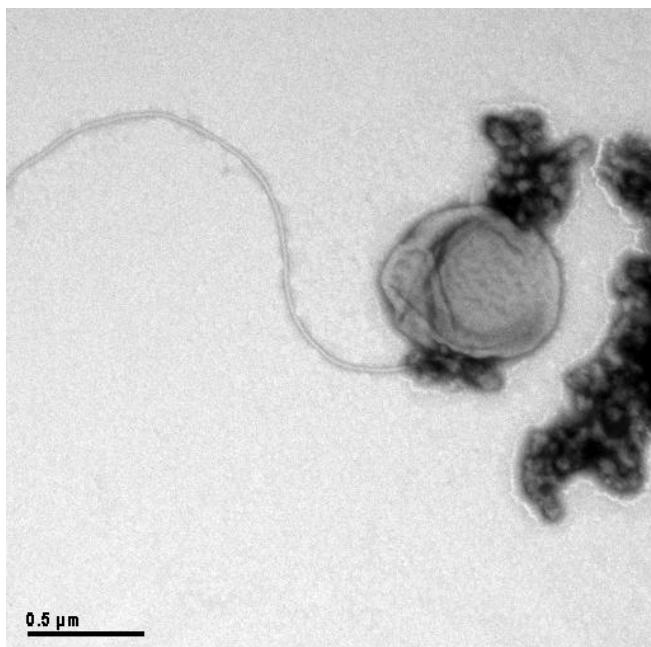
Rozsak in Colwell sta prva uporabila izraz VBNC ("viable but nonculturable") za tiste bakterijske celice, pri katerih je zaznavna metabolna aktivnost, vendar niso kultivabilne z običajnimi tehnikami (Colwell, 2000). V to stanje preidejo celice, ki so bile izpostavljene stradanju ali drugim stresom. Nizke temperature, visok tlak in spremembe pH vrednosti ali slanosti so najpogosteji dejavniki za prehod v stanje VBNC. Takšne celice so lahko sposobne za življenje in dokazano je bilo, da je stanje reverzibilno. Pod primernimi pogoji lahko ponovno postanejo kultivabilne (Nyström, 2001). Stanje VBNC je značilno tudi za nekatere patogene mikroorganizme: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* in *Campylobacter jejuni* (Tholozan in sod., 1999).

Veliko je bilo razprav o stanju VBNC celic in o tem ali so celice v tem stanju dejansko žive ali ne in še posebej o tem ali so še vedno škodljive oz. predstavljajo tveganje. Za razlogo tega pojava sta bila predlagana dva različna modela. Prvi pravi, da postanejo stradajoče celice nekultivabilne zaradi celičnega propadanja in da so umirajoče, drugi pa pravi, da je stanje VBNC prilagoditveni mehanizem organizma na stradanje (Nyström, 2001).

Prisotnost mikroorganizmov v stanju VBNC v živilih je pomembno tudi za živilsko industrijo. Ker so kampilobakterji nezmožni razmnoževanja v živilih, služijo le-ta samo kot sredstvo prenosa od živalskega gostitelja do človeka. Nesposobnost razmnoževanja v kombinaciji s subletalnimi procesnimi parametri (hlajenje živil, zniževanje vrednosti a_w) predstavljajo stres za kampilobakterje. To lahko vodi v prehod iz relativno občutljivih vegetativnih celic v bolj odporne mirajoče celice (Moore, 2001).

Spolšno znano je, da predstavniki rodu *Campylobacter* preidejo iz običajne spiralne oblike v kokoidno, ko so izpostavljeni neugodnim okoljskim vplivom. Čeprav so kampilobakterji v kokoidni obliki nekultivabilni, imajo le-ti pomembno vlogo pri preživetju ob neugodnih vplivih. Znanstveniki so tudi dokazali, da je možen ponoven prehod iz kokoidne v spiralno obliko pri prenosu bakterij med živalmi (Hazeleger in sod., 1995).

V neugodnih razmerah lahko kampilobakterji prilagodijo njihov metabolizem, da tako podaljšajo preživetje in omogočijo prenos od gostitelja do gostitelja. *C. jejuni* preidejo v stanje VBNC, katerega pogosto sprembla spremembu velikosti in morfologije celic – preidejo iz spiralne v kokoidno obliko (Harvey, 1998; Klančnik in sod., 2008). Nekateri avtorji so zanikali povezavo med izgubo kultivabilnosti in spremembu morfologije celic z dokazom prisotnosti spiralnih bacilov v populaciji celic v stanju VBNC. Tvorba kokov naj bi bila odvisna predvsem od okoljskih pogojev in morfologije seva (Hazeleger in sod., 1995). Na sliki 2 lahko vidimo celico *Campylobacter jejuni* v obliki koka.



Slika 2: Fotografija koka *Campylobacter jejuni*, posneta z elektronskim mikroskopom (foto: Klančnik, 2004)

2.6 METODE ZA DOLOČANJE ŽIVOSTI CELIC

Klasične metode za določanje živosti celic temeljijo na sposobnosti celic, da aktivno rastejo in tvorijo vidne kolonije na trdnem gojišču. Dejansko število živih celic pa je lahko mnogo večje, ker so nekatere celice subletalno poškodovane in so izgubile sposobnost tvorbe kolonij. Določene vrste mikroorganizmov pa le težko rastejo v laboratorijskih pogojih in imajo posebne zahteve glede gojišč (Keer in Birch, 2003). Klasične metode so bolj primerne za določanje kultivabilnosti organizma.

Za določitev živosti celic so razvili alternativne metode, ki temeljijo na določanju celične integritete in aktivnosti. Alternative štetju kolonij vključujejo rabo pretočne citometrije, barvanje s fluorescentnimi barvili, metode, katere izrabljajo fiziološko dovzetnost,

določanje metabolne aktivnosti in metode, ki temeljijo na določanju nukleinskih kislin (Keer in Birch, 2003).

2.6.1 Metode na osnovi fluorescentnih barvil

V zadnjem desetletju se je zelo povečala potreba po alternativnih metodah določanja živosti. To gre pripisati predvsem želji po uvedbi hitrih metod, ki dajo rezultate v realnem času in ugotovitvi, da mikroorganizmi pogosto preidejo v VBNC stanje ter da nekateri mikroorganizmi niso primerni za in vitro gojenje, zato pri njih ne moremo uporabljati metod na osnovi sposobnosti tvorbe kolonij. Napredki v razvoju tehnologije fluorescentnih barvil so pripomogli k razvoju alternativnih metod določanja živosti (Joux in Lebaron, 2000).

Metode za določanje živosti, ki temeljijo na uporabi fluorescentnih barvil, so uporabne v širokem spektru aplikacij: od živilske, farmacevtske in kozmetične industrije do vrednotenja kakovosti pitne in morske vode (Joux in Lebaron, 2000).

Najpogostejše metode detekcije celic, obarvanih s fluorokromi, sta epifluorescentna mikroskopija (EFM) in pretočna citometrija (FC). Pri EFM gre za metodo štetja pod mikroskopom. Ta metoda ima več slabosti, ker je dolgotrajna in subjektivna. Problematična pa je tudi spodnja meja detekcije, saj je zelo težavno analizirati vzorce, ki vsebujejo manj kot 10^3 celic na ml vzorca. Pretočna citometrija pa omogoča analizo na posameznih celicah. Je zelo hitra metoda in omogoča sočasno analizo različnih celičnih parametrov z veliko natančnostjo in je zato postala zelo priljubljena. Analize potekajo pri pretoku med 10 in 100 μL na minuto in analizirajo od 100 do 1000 celic na sekundo. FC ni primerna za analize vzorcev, ki vsebujejo manj kot 100 bakterij na mL vzorca (Joux in Lebaron, 2000).

Poleg naštetih metod se za določanje števila in oblike celic uporabljajo še številne druge metode, ki temeljijo na laserskem vzbujevanju emitirane svetlobe.

2.6.1.1 Princip delovanja fluorescentnih metod

Pri metodah, ki temeljijo na uporabi fluorescentnih barvil, ne pripisujemo živosti samo celicam, ki vršijo celično delitev, ampak lahko zaznamo tudi organizme, ki imajo določeno celično aktivnost ali pa imajo ohranjeno celično strukturo. Z različnimi fluorescentnimi barvili ocenjujemo različne fiziološke funkcije:

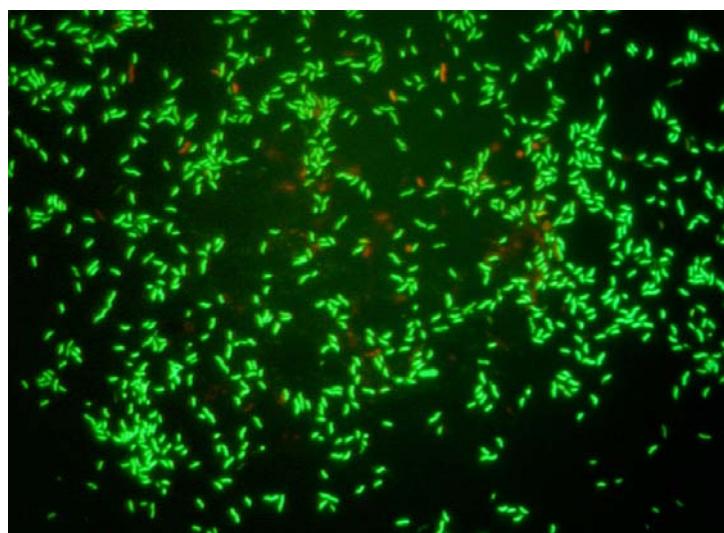
- membranski potencial – membranski potencial nastane zaradi dihanja, ki poteka na membrani ali hidrolize ATP. Notranjost celice je negativno nabita v primerjavi z zunanjostjo in ta naboj je sorazmeren količini barvila, ki ga celica sprejme
- encimska aktivnost – določa se dehidrogenazna aktivnost, esterazna aktivnost
- integriteta celične membrane – celice z intaktno membrano ne prepuščajo fluorescentnih barvil
- prisotnost nukleinskih kislin – DNK in RNK vežejo fluorescentna barvila

2.6.1.2 Membranska integriteta

Izguba membranske integritete predstavlja hudo poškodbo za celice zaradi številnih funkcij, ki so povezane s plazemsko membrano: permeabilnost, celični transport, respiratorna aktivnost ter pregrada med zunanjim okoljem in celično vsebino. Ocena membranske integritete je zelo težavna zaradi kompleksne membranske strukture in razlike v sestavi celične stene, ki se razlikuje med Gram-negativnimi in Gram-pozitivnimi bakterijami (Joux in Lebaron, 2000).

Analize ocene membranske integritete temeljijo na nepropustnosti fluorescentnih barvil skozi intaktno membrano živih celic, ki se tako ne obarvajo. Prisotnost barvila v celici nakazuje poškodbo celične membrane in s tem smrt celice. Pri večini metod se uporabljam barvila, ki se vežejo na nukleinske kisline. Zaradi visoke koncentracije nukleinskih kislin znotraj celic in zaradi velikega povečanja fluorescence po vezavi barvil lahko jasno ločimo žive in mrtve celice (Joux in Lebaron, 2000).

Na trgu je široka paleta različnih fluorescentnih barvil za nukleinske kisline. Njihove molekulske mase so od 402 do 1355, med njimi pa je najpogosteje uporabljen propidijev jodid (PI). Da bi lahko hkrati določili žive in mrtve celice, je podjetje Molecular Probes (Eugene, Oregon, ZDA) razvilo t.i. "Live/Dead BacLight kit", pri katerem je uporabljena kombinacija barvil PI in SYTO 9 (Joux in Lebaron, 2000). Barvili se razlikujeta v spektrih absorpcije in emisije svetlobe ter zmožnosti prodiranja skozi nepoškodovanou celičnu membrano. SYTO 9 je zeleno fluorescentno barvilo, PI pa rdeče fluorescentno barvilo. Pri samostojni uporabi barvila SYTO 9 se obarvajo vse bakterije v populaciji – tako tiste s poškodovano membrano kot tiste z intaktno membrano. PI pa prodira samo v poškodovane celice in povzroči zmanjšanje fluorescence barvila SYTO 9. Pri uporabi primerne mešanice obeh barvil celice z intaktno membrano fluorescijo zeleno, tiste s poškodovano membrano pa rdeče (slika 3). Valovna dolžina vzbujevalne/emitirane svetlobe za SYTO 9 je 480/500 nm za PI pa 490/635 nm (katalog št. L-7012 Molecular Probes, Eugene, Oregon, ZDA).



Slika 3: Fotografija kulture *Campylobacter jejuni* obarvane z "Live/Dead BacLight kit" pod fluorescentnim mikroskopom (foto: Klančnik, 2004)

2.6.2 Molekularne metode določanja živosti

Kot pokazatelj živosti celic je bila sprva uporabljena prisotnost nepoškodovanih sekvenc DNK pod predpostavko, da se v mrtvih celicah DNK razkroji hitreje kot druge celične komponente. Odkritje daljših sekvenc DNK naj bi bilo tesneje povezano z živostjo celic, kot pa odkritje krajših sekvenc. Kasneje se je izkazalo, da je korelacija med prisotnostjo DNK sekvenc in živostjo celic slaba, ker so odkrili DNK tudi v celicah, ki so bile aktivno uničene. Več pozornosti so nato namenili uporabi mRNA kot pokazatelja živosti. mRNA je zelo labilna molekula, z zelo kratko razpolovno dobo (nekaj sekund) v mrtvih organizmih in je potem takem mnogo boljši pokazatelj živosti kot DNK (Keer in Birch, 2003).

Preiskovali so tudi ali je prisotnost molekul rRNA pokazatelj živosti in ugotovili, da obstaja pozitivna korelacija med njeno prisotnostjo in živostjo. Zaradi daljše in variabilne obstojnosti rRNA pod določenimi stresnimi pogoji ostaja prisotnost mRNA boljši pokazatelj živosti bakterijskih celic (Keer in Birch, 2003).

V funkciji genomiki se za spremljanje izražanja genov ter kvantifikacije mRNA uporabljajo tudi hibridizacija po Northernu in PCR v realnem času. Sheridan in sod. (1998) omenjajo uporabo hibridizacijo po Northernu za dokazovanje metabolne aktivnosti mikrobnih celic iz vzorcev prsti in vode. Metoda PCR v realnem času omogoča kvantifikacijo redkih prepisov in majhnih sprememb v izražanju genov. Pri tej metodi, podobno kot pri metodi RT-PCR, izolirano mRNA prepišemo v cDNA. Bistvena razlika je v določitvi produkta reakcije PCR, ki ga pri klasičnem RT-PCR določimo in ovrednotimo z dodatnimi tehnikami v končni fazi pomnoževanja (gelsko elektroforezo). Pri metodi PCR v realnem času pa nastajanje produkta PCR spremljamo v eksponentni fazni, torej ko je intenziteta fluorescence direktno sorazmerna s količino izhodiščnega materiala, kar je bistveno za natančno kvantifikacijo (Ginzinger, 2002). V zadnjem času pridobiva na pomenu analiza s pomočjo mikromrež cDNK, s katero lahko spremljamo izražanje več tisoč genov (do 20.000) v zelo kratkem času, vendar njeno rutinsko uporabo zavirajo poleg velike variabilnosti in nezadostne občutljivosti tudi visoka cena (Bustin, 2000; Giulietti in sod., 2001).

2.6.2.1 Metode na nivoju mRNA

Pri večini molekularnih metod želimo namnožiti tarčne sekvene nukleinskih kislin do take količine, da jih lahko določimo. Najpogosteje se za namnoževanje mRNA uporablja metoda obratnega prepisa in verižna reakcija s polimerazo (ang. reverse transcriptase polymerase reaction, RT-PCR) in namnoževanje nukleinskih kislin na osnovi sekvenc (ang. nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) (Keer in Birch, 2003).

2.6.2.2 RT-PCR

Pri metodi obratnega prepisa in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je potrebno pred izvajanjem PCR izolirano RNK prepisati v komplementarno, enoverižno cDNK, ki nato služi kot izhodiščna DNK. Prednost RT-PCR je boljša občutljivost, fleksibilnost, hitrost ter

enostavnost izvedbe. Omogoča merjenje izražanja mRNK, razlikovanje med sorodnimi mRNK, analizo strukture RNK ali pripravo knjižnic cDNK (Reverse Transcriptase PCR, 1995).

Za izolacijo RNK moramo uporabiti metodo, ki naj bo hitra in občutljiva. Pred obratnim prepisom moramo nujno odstraniti morebitne ostanke genomske DNK s tretiranjem RNK z DNazo. Slednjo je potrebno pred fazo obratnega prepisa odstraniti. Po izolaciji celotne RNK ali le izbranega zaporedja mRNK s poli (A)⁺ koncem, lahko izvedemo sintezo cDNK z uporabo treh različnih vrst začetnih oligonukleotidov:

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

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

Sintezi cDNK sledi verižna reakcija s polimerazo (PCR), s katero lahko v kratkem času pomnožimo določen odsek molekule DNK v velikem številu identičnih kopij. Osnovni princip metode PCR zajema poznavanje nukleotidnih zaporedij, kar omogoča izbiro ustreznih specifičnih začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje le teh in sintezo komplementarnih sekundarnih verig DNK s polimerazo DNK v ponavljajočih se temperaturno časovnih ciklih. Po končani reakciji PCR dokazujemo pomnožke na različne načine, od katerih je najpogostejsa metoda ločevanja DNK po velikosti s pomočjo elektroforeze v agaroznem gelu (Bustin, 2000).

2.7 STRESNI POGOJI IN ODZIV MIKROORGANIZMOV

Bakterije živijo v okoljih, v katerih se pogosto spreminja življenjski pogoji, zato so oblikovale visoko razvite sisteme, kot odgovor na te spremembe, da so si tako omogočile preživetje. Odgovori na pomanjanje hranil in na ostale strese najpogosteje povzročijo spremembe na genetskem nivoju. Te vodijo v aktivacijo in/ali represijo določenih genov, ki spremenijo celično fiziologijo ali metabolizem, tako da se celice prilagodijo na nove pogoje (Pichereau in sod., 2000; Klančnik in sod., 2006).

Zaščitni mehanizmi, katere uporablja *Campylobacter* spp. za preživetje v neugodnih razmerah, so mnogo manj poznani in raziskani kot mehanizmi ostalih črevesnih bakterij (npr. *Salmonella* spp. in *Escherichia coli*). *Campylobacter jejuni* nima številnih ključnih regulatorjev stresnega odziva, katere lahko najdemo pri *Salmonella* spp. in *Escherichia coli*. Med temi so: dejavnika za zaščito pred oksidativnim stresom SoxRS in OxyR, glavni proteini hladnega stresa, regulator Lrp, RpoS dejavnik za preživetje v stacionarni fazi rasti in alternativni sigma faktor RpoH, ki regulira odgovor na topotni stres pri *E. coli*. Kljub odsotnosti običajnih zaščitnih mehanizmov ostajajo kampilobakterji sposobni preživetja v

vodi pri nizkih temperaturah, med toplotno obdelavo in v zunanjem okolju (Murphy in sod., 2006).

2.7.1 Stradanje

Pomanjkanje hraničnih celic je eden najpogostejših okoljskih stresov, katerim so mikroorganizmi izpostavljeni v naravnih ekosistemih. Bakterije so razvile različne strategije za preživetje v razmerah brez zadostne količine hraničnih celic. Nekatere bakterije, kot na primer *Bacillus* sp. ali *Clostridium* sp., preko določenih diferenciacijskih poti, preidejo v endospore. Nekatere po Gramu negativne bakterije spremenijo morfologijo in preidejo v majhno in okroglo obliko (Pichereau in sod., 2000). Pokazano je bilo, da stradanje kot subletalni stres izzove prehod celic *C. jejuni* v stanje VBNC. Poleg tega se začnejo sintetizirati proteini stradanja in poveča se odpornost na toplotni stres (Klančnik in sod., 2006).

Z uporabo dvodimenzionalne elektroforeze pa so dokazali, da tudi celice, katere ne spremenijo morfologije, kažejo spremembe na nivoju genske ekspresije. Metabolne spremembe vodijo v stanje povečane odpornosti tudi na druge oblike stresa – povišana temperatura, etanol, kisline, osmotski potencial, oksidativni potencial itd. (Pichereau in sod., 2000).

Cappelier s sodelavci je dokazal, da stradanje celic *Campylobacter jejuni* vodi do povečanja odpornosti na toplotni stres. Povečanje odpornosti je največje po dveh urah stradanja. Ob dodatku kloramfenikola kot inhibitorja sinteze proteinov ni značilnega povečanja odpornosti. Zdi se, da je povečanje odpornosti posledica sinteze proteinov, ki se sintetizirajo v odgovor na stradanje. Stradane celice *Campylobacter jejuni* kažejo večjo odpornost na toplotni stres, kot tiste celice, ki so bile predhodno izpostavljene toplotnemu stresu in zato prilagojene na višje temperature (Cappelier in sod., 2000, Klančnik in sod., 2006).

2.7.2 Toplotni stres

Konzerviranje hrane z uporabo visokih temperatur (blanširanje, pasterizacija, sterilizacija) je običajen proces v živilski industriji. Zmanjšanje števila mikroorganizmov ali njihova inaktivacija sta lahko dosežena s termičnimi procesi, ki vključujejo uporabo vroče vode, pare, vročega zraka, električne energije, svetlobe, ultrazvoka ali mikrovalov (Abey in Wouters, 1999). Odgovor na toplotni stres pri izpostavitvi organizmov visokim temperaturam je eden izmed najbolje ohranjenih pojavov v bioloških sistemih. Značilna je povečana sinteza niza proteinov, imenovanih proteini toplotnega stresa (angl. heat shock protein oz. Hsp), kateri obvladujejo kopičenje nezvitih ali nepravilno zvitih beljakovinskih molekul (da Silva in sod., 2003).

2.7.2.1 Tarčne snovi

V celicah je veliko snovi, katere so občutljive na topoto. Osnovno toplotno odpornost organizma določa odpornost celičnih makromolekul: ribosomov, nukleinskih kislin, encimov in beljakovin, ki so v celici in celični membrani. Zaradi izpostavitve povišani temperaturi ribosomalne podenote izgubijo njihovo specifično sekundarno in terciarno strukturo, beljakovine pa koagulirajo. Tudi DNK in RNK sta občutljivi na povišanje temperature, vseeno pa je DNK približno 30-krat manj občutljiva. Poškodbe membrane so prav tako značilne pri izpostavitvi povišanim temperaturam. Izpostavitev blagemu toplotnemu delovanju lahko vodi do prilagoditve celične membrane na povišano temperaturo tako, da se poveča nasičenost in dolžina maščobnih kislin, da se na ta način vzdržuje optimalna tekočnost membrane in aktivnost intrinzičnih beljakovin (Abey in Wouters, 1999).

2.7.2.2 Toplotna odpornost

Dokazali so, da na toplotno odpornost bakterij vplivajo številni dejavniki. Odpornost se poveča po izpostavitvi bakterijskih celic subletальнemu povišanju temperature, po virusni infekciji in po izpostavitvi določenim kemikalijam kot so etanol, antibiotiki (kanamicin, streptomycin) in aminokislinski restriktorji. Zaščitenost pred toploto se lahko poveča tudi s kopičenjem osmolitov, ki izboljšajo stabilnost beljakovin in zaščitijo encime pred toplotno aktivacijo (Abey in Wouters, 1999). Celice *Campylobacter jejuni* so najbolj odporne na toplotni stres v eksponentni fazi, kateri sledita zgodnja stacionarna in stacionarna faza (Kelly in sod., 2001).

2.7.2.3 Proteini toplotnega stresa

Sinteza proteinov toplotnega stresa prav tako vpliva na razvoj termotolerance. Večina proteinov toplotnega stresa se sintetizira v nizkih koncentracijah v nestresnih pogojih, vendar takoj po izpostavitvi visokim temperaturam se sproži pospešena, vendar začasna sinteza niza le teh (Abey in Wouters, 1999). Beljakovine toplotnega stresa lahko razvrstimo v skupine glede na homologijo sekvenc in tipično molekulsko maso: Hsp110, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp10 in nizkomolekularni Hsp (Feder in Hofmann, 1999).

Proteini toplotnega stresa vključujejo tako šaperone kot proteaze, ki delujejo skupaj, da vzdržujejo nadzor nad stanjem celičnih proteinov. Substrati za oba tipa encimov so delno ali nepravilno zvite beljakovine, ki so takšne zaradi počasnega zvijanja in sestavljanja beljakovin, kemijskega ali toplotnega stresa, strukturne nestabilnosti in napak v biosintezi. Primarna funkcija klasičnih šaperonov kot so DnaK (Hsp70) in njegovi ko-šaperoni, DnaJ, GrpE, GroEL (Hsp60) in njegovi ko-šaperoni ter GroES je uravnavanje procesa zvijanja beljakovin, tako da preprečujejo nepravilno zvijanje in sestavljanje beljakovin. Sintezo proteinov Hsp lahko inducira povišana temperatura, kisline, oksidativni stres in napad makrofagov, kar nakazuje, da proteini Hsp pomagajo preživeti celici tudi pri infekciji v gostitelju (Abey in Wouters, 1999). Pri nekaterih bakterijskih vrstah so določili manjšo

količino GroEL homologov tudi v zunajceličnem prostoru, kar lahko kaže na pomen le-tega pri patogenezi. Pri poskusih na zajcih so dokazali, da so GroEL in GroES proteini tarčni antigeni za serumska IgG in mukusna IgA protitelesa (Thies in sod., 1999).

2.8 IZRAŽANJE GENOV PRI TOPLITNEM STRESU

2.8.1 Lastnosti genoma celic *Campylobacter jejuni*

Uspeli so sekvencirati celoten genom *Campylobacter jejuni* in ugotovili, da je dolg 1,64 milijona baznih parov (bp). Kodirajočih sekvenc je 1.654 in od teh je vsaj 20 takih, ki kodirajo psevdogene. Povprečna dolžina gena je 948 bp in 94.3 % genoma kodira proteine, zaradi česar je ta najgostejši bakterijski genom sekvenciran do danes. Posebnost genoma *Campylobacter jejuni* je skoraj popolna odsotnost ponavljajočih DNK sekvenc. Na celiem genomu se ponovijo samo 4 sekvence in sicer tri kopije ribosomalnega RNK operona (6 kbp) in tri podvojene in potrojene kodirajoče sekvence (Parkhill in sod., 2000). Na genomu se pojavljajo tudi hipervariabilne sekvence, in sicer večinoma na delih, kjer se kodirajo beljakovine vključene v biosintezo ali spremembo površinskih ogljikohidratnih struktur, lipooligosaharidov in bičkov. *C. jejuni* lahko prevzema DNK iz okolja, kar vodi do rekombinacij med različnimi sevi in tako do velike genske raznolikosti. Do prenosa plazmidne in kromosomske DNK lahko pride tako v *in vitro* pogojih, kot v gostiteljskem organizmu. Ta lastnost je pomembna pri širjenju novih lastnosti, npr. rezistence na antibiotike (Young in sod., 2007).

Za začetek transkripcije gena ali operona mora holoencim RNK polimeraze, kateremu pomaga specifični sigma dejavnik, prepoznati in se vezati na višje ležečo promotorsko regijo na DNK. Na genomu *Campylobacter jejuni* so identificirali samo tri gene za sigma dejavnike: t.i. hišni sigma dejavnik RpoD in FliA ter RpoN, katera regulirata transkripcijo genov, povezanih s flagelarno gibeljivostjo. Kot kaže iz poskusov na genomu bakterij *Campylobacter jejuni* ni genov za sigma dejavnike topotnega stresa in stacionarne faze, kar ni podobno ostalim enterobakterijam. Tudi promotor RpoD je nenavaden in slabo ohranjen (Petersen in sod., 2003). Dokazana je bila tudi njegova topotna inducibilnost, predvsem po dolgotrajnem topotnem stresu (Klančnik in sod., 2006).

Kljub temu, da so sekvencirali celoten genom *C. jejuni*, pa lahko dobimo le omejeno količino informacij glede izražanja genov in regulacije izražanja iz sekvenc na genomu. Malo je študij o stresnemu odzivu na nivoju izražanja genov.

2.8.2 Izražanje gena *groEL*

Več vrst stresa izzove sintezo proteinov topotnega stresa, zato so le-ti dobro preučeni. Največ študij je bilo opravljenih na proteinih velikosti 60 kDa (GroEL) in 70 kDa, kateri so molekularni šaperoni. Skupaj z 10 kDa GroES proteinom, GroEL prepričuje napačno zvijanje in kopiranje denaturiranih beljakovin. Ta proces se odvija ob prisotnosti ATP. GroES-GroEL kompleks sodeluje tudi pri združevanju molekul v oligomere, morfogenezi

fagov, premeščanju beljakovin in splošni proteazni aktivnosti. Pri večini bakterij se geni, kateri kodirajo GroES in GroEL homologe, prepišejo kot bicistronski operoni. Prepisovanje se hitro poveča pri izpostavitvi celic visoki temperaturi. Regulatorni mehanizmi, ki so vključeni v odgovor na topotni stres, se lahko zelo razlikujejo med bakterijskimi vrstami. Iz dosedanjih študij kaže, da obstajajo različni načini regulacije odgovora na topotni stres pri bakterijah. Izražanje gena *groE* pri *E. coli* nadzirajo promotorji σ^{70} in σ^{32} , kateri sodelujejo tako pri osnovnem kot pri s topoto induciranim izražanju beljakovin. Domnevno sta pri *C. jejuni* pred začetnim mestom za prepis gena *groE* promotor, podoben σ^{70} promotorju iz *E. coli* in nukleotidno zaporedje, ki predstavlja vegetativni promotor. Vprašanje ali domnevna promotorja predstavlja različna sigma dejavnika in kako sta vključena v izražanje gena *groE* v stresnih in običajnih pogojih zahtevajo še dodatne raziskave (Thies in sod., 1999).

Nekatere študije so dokazale, da se je povečala sinteza gena GroEL tudi pri kultivaciji *Campylobacter jejuni* v aerobni atmosferi (Thies in sod., 1999).

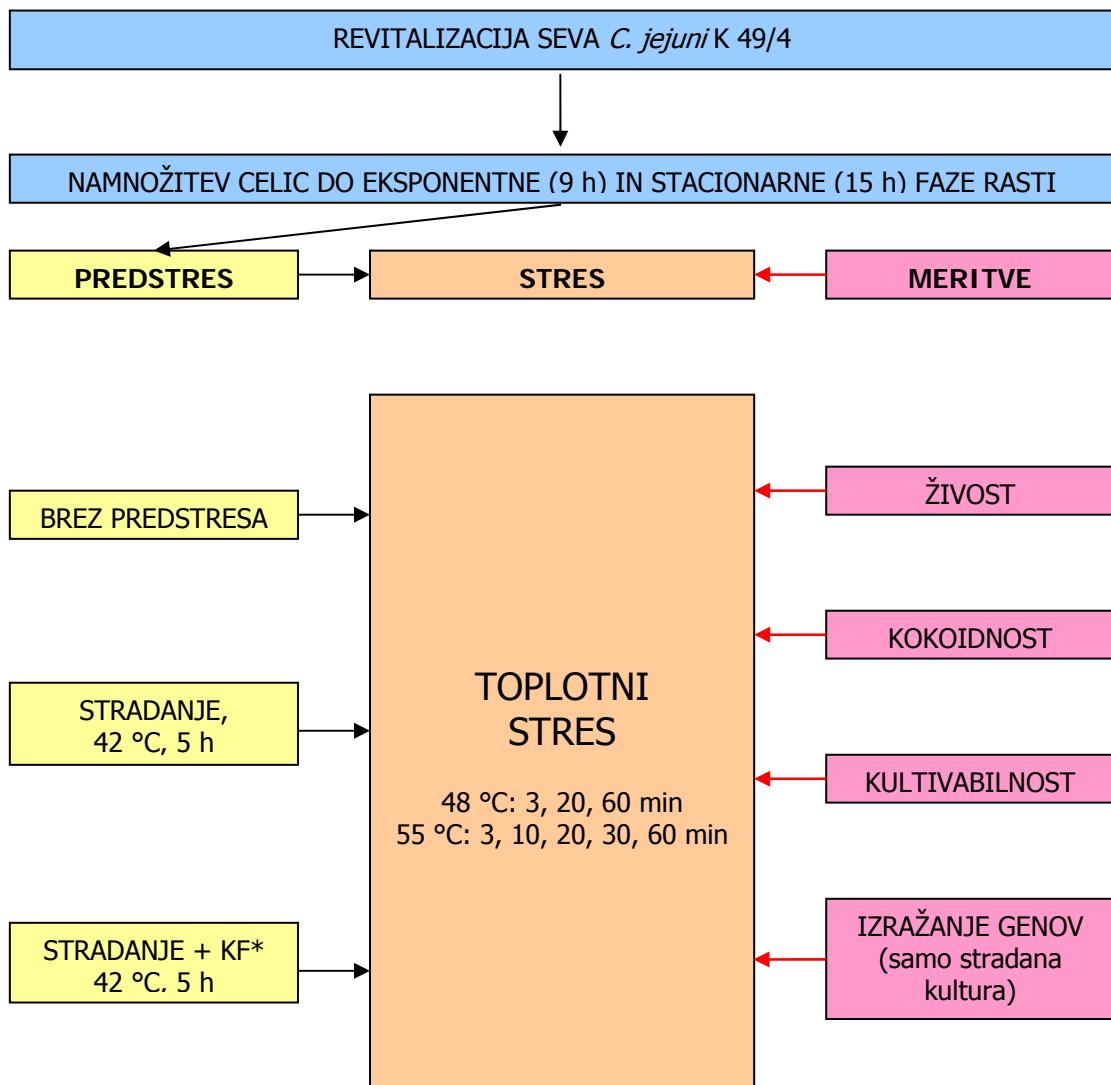
Thies in sod. (1999) so dokazali, da je indukcija GroEL operona regulirana na nivoju transkripcije. Pri izpostavitvi celic *Campylobacter jejuni* topotnemu stresu na 48 °C se je bistveno povečalo število 20 kbp dolgih mRNK sekvenc.

2.8.3 Izražanje gena *flaA*

Pri preučevanju funkcije bička *Campylobacter jejuni* so ugotovili, da je pomemben virulentni faktor. S pomočjo bička bakteriji uspe doseči celice in invadirati vanje. Biček *C. jejuni* ni obložen in je sestavljen samo iz beljakovine imenovane flagelin. Na genomu *C. jejuni* sta dva gena za flagelin in sicer *flaA* in *flaB*. Oba gena sestavlja 1731 bp in sta 95 % sekvenčno enaka. Mutanti *C. jejuni*, v katerih je bil inaktiviran gen *flaB*, gen *flaA* pa je ostal intakten, so ohranili gibeljivost. Nasprotno pa so mutanti z neaktivnim genom *flaA* negibljeni. *In vitro* študije so dokazale, da mutanti z nepremičnim bičkom izgubijo sposobnost adhezije na in vdora v človeške črevesne celice (Wassenaar in sod., 1991). Tudi študije na *Helicobacter pylori* so podale podobne rezultate: mutanti brez flagelina FlaA so imeli močno oslabljeno gibeljivost in okrnjene bičke, mutanti brez FlaB le rahlo zmanjšano gibeljivost in navidezno nespremenjene bičke (Niehus in sod., 2002).

Prepisovanje genov *flaA* in *flaB* pri *Helicobacter pylori* uravnavata dva različna promotorja. Ekspresijo gena *flaA* uravnava σ^{28} -odvisen promotor, kateri spada v skupino promotorjev, ki nadzirajo aktivacijo flagelarnih genov pri številnih bičkastih bakterijah. *flaB* in druge flagelarne gene regulira σ^{54} promotor, kateri pa je odvisen od FlgR. Ta je aktivator transkripcije za σ^{54} -odvisne gene. Odvisnost številnih flagelarnih genov od σ^{54} faktorja so odkrili tudi pri *Caulobacter crescentus*, *Vibrio cholerae* in predstavnikih rodu *Campylobacter* (Niehus in sod., 2002).

3 MATERIALI IN METODE



*kloramfenikol

Slika 4: Shematični prikaz opravljenih eksperimentov

Na sliki 4 je predstavljen enostaven shematični prikaz poteka našega poskusa od revitalizacije delovnega organizma do posameznih meritev.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Delovni mikroorganizem

Za poskuse smo uporabili sev *Campylobacter jejuni* K49/4, izoliran iz piščanče krače. Sev je bil identificiran s klasičnimi in molekulskimi postopki in je trajno shranjen v zbirki

Katedre za živilsko mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana (Zorman in Smole Možina, 2002). Kultura je bila shranjena v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi pri -70 °C.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Tekoče gojišče Preston

Osnovni medij: Nutrient Broth No. 2, CM67 (Oxoid)

Dodatki:

- dodatek za rast *Campylobacter* Growth Supplement (SR084E, Oxoid)
- dodatek za selektivnost *Campylobacter* Selective supplement (SR204E, Oxoid)
- sterilna defibrilirana konjska kri (SR048C, Oxoid)

12,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL destilirane vode in nato sterilizirali 15 min v avtoklavu pri 121 °C. Osnovni medij smo ohladili na 45 °C, mu aseptično dodali 25 mL defibrilirane konjske krvi in raztopini dodatkov za rast in selektivnost. Vse skupaj smo dobro premešali in shranili pri 4 °C do uporabe.

Trdno gojišče Karmali

Osnovni medij: *Campylobacter* blood free medium base (CM739, Oxoid)

Dodatki:

- Cefoperazone supplement 421840014

23,35 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL destilirane vode in sterilizirali 15 min v avtoklavu pri 121 °C. Ohladili smo na 47 °C in dodali dodatek. Gojišče smo razlili v petrijevke in pustili, da se je strdilo. Pripravljene petrijevke smo hranili v hladilniku do uporabe.

Trdno gojišče CCDA

Osnovni medij: *Campylobacter* blood free selective agar base (CM739, Oxoid)

Dodatki:

- CCDA selective supplement (SR 155, Oxoid)

22,75 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL destilirane vode in ga sterilizirali 15 min v avtoklavu pri 121 °C. Ohladili smo na 47 °C in dodali eno stekleničko dodatka. Gojišče smo razlili v petrijevke in pustili, da se je strdilo. Pripravljene petrijevke smo hranili v hladilniku do uporabe.

Trdno gojišče Columbia krvni agar

Osnovni medij: Columbia agar base (CM331, Oxoid)

Dodatki:

- sterilna defibrilirana konjska kri (SR048C, Oxoid)
- dodatek za rast *Campylobacter* Growth Supplement (SR084E, Oxoid)
- dodatek za selektivnost *Campylobacter* Selective supplement (SR069E, Oxoid)

19,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 mL destilirane vode in ga sterilizirali 15 min v avtoklavu pri 121 °C. Ohladili smo na 47 °C, dodali 25 mL defibrilirane konjske krvi in raztopljena dodatka. Gojišče smo razlili v petrijevke in pustili, da se je strdilo. Pripravljene petrijevke smo hranili v hladilniku do uporabe.

3.1.3 Reagenti

3.1.3.1 Reagenti za izvedbo toplotnega stresa in določanje preživelosti

- založna raztopina fiziološke raztopine KH₂PO₄ (pH=7,2) (Kemika, Hrvaška)
- kloramfenikol (5 µg/mL vzorca) (Oxoid, SR78)
- barvilo LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, ZDA)

3.1.3.2 Reagenti za izolacijo in čiščenje RNK, izvedbo RT-PCR in elektroforeze

- agarozni gel (Seakem ME agarose)
- 0,5 × pufer TAE (Tris baza, H 5135, Promega; Ocetna kislina, 1.0063.1000, Chemicals; 0,5 M Na₂ EDTA, E5134, Sigma)
- 10 × pufer TAE (Tris baza, H 5135, Promega; Ocetna kislina, 1.0063.1000, Chemicals; 0,5 M EDTA, E5134, Sigma)
- nanašalni pufer (10 × DNA Loading Buffer, B101E01, Products)
- molekulski označevalec dolžin fragmentov DNK (100 bp DNA ladder, G2101, Promega)
- raztopina etidijevega bromida (100 mL vode + 10 µL EtBr, E8751, Sigma)
- natrijev hipoklorit – NaOCl (Kemika)
- mix za prvo fazo RT-PCR (8 µL MgCl₂; 4 µL 10 x PCR buffer II (100 mM, Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl); 19 µL DEPC vode; 2 µL dNTP (20 mM); 2 µL RNase inhibitor (20 U/µL); 1 µL Multiscribe RT (50 U/µL); 2 µL Random Hexamers (50 µM))
- mix za drugo fazo RT-PCR (2,5 µL 10 x buffer (100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl); 1,5 µL MgCl₂; 2,5 µL dNTP; 0,25 µL F začetnikov; 0,25 µL R začetnikov; 16,85 µL PCR H₂O; 0,15 Taq Polimeraza)
- raztopina SDS (0,5 %) (Promega, V 6511)
- ddH₂O DEPC (0,1 %) – DEPC (Sigma, D5758)
- absolutni etanol – EtOH (100 oz. 96 %) (Merck)
- etanol 70 % - EtOH 100 % (Merck) zmešamo z ddH₂O v razmerju 7:3
- RNeasy Mini Kit (RNA protect, kloramfenikol, lysis buffer-kit, lizocim, pufer 1 x TE, β-merkaptoetanol, wash buffer-kit, RNase free water) (Qiagen, 74104)
- mix za odstranjevanje DNK iz vzorcev RNK (20 µL Pharmacia buffer (40 mM Tris HCl, 6 mM MgCl₂ × 6H₂O); 2 µL RNase inhibitor (20 U/µL); 10 µL DNase I (1 U/µL); 118 µL DEPC vode)
- mineralno olje

- fenol (Kemika)
- kloroform (CHCl₃) (Sigma C2432)
- NaOAc (3 M, pH 4,8)

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

V preglednici 3 so zbrani začetni oligonukleotidi, katere smo uporabili pri reakciji PCR in spremljanju izražanja genov z metodo RT-PCR.

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR in ugotavljanje izražanja genov z metodo RT-PCR

Dostopna koda*	Gen	Ime	Dolžina	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Velikost produkta PCR (bp)
AF369581	<i>flaA</i>	FflaA ₁	23	GCA GCA GAT GAT GCT TCA GGG AT	220
		RflaA ₁	20	GCT TGA AGC ATG GTT CTT GT	
Y13334	<i>groEL</i>	FgroEL ₂	20	TGA AAG TGC GAC TAT ACA AG	379
		RgroEL ₂	20	TGC TTC ATC ACC CTG TAG AT	
L04315	16SrRNA	pA	20	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	324
		P16anja	21	TGT CTC AGT TCC AGT GTG ACT	

*PUB MED/GenBank accession number

3.1.5 Laboratorijska oprema

- splošna mikrobiološka oprema: petrijeve plošče, cepilne zanke, avtomatske pipete in nastavki za pipete (Eppendorf, Gilson), erlenmajerice, merilni valji, steklenice, epruvete, velike centrifugirke, majhne centrifugirke, mikrocentrifugirke, gorilniki, lončki za urin, filtri, objektna stekla, krovna stekla, steklene palčke, ...
- termometer
- tehtnica (Exacta 1200EB, Tehtnica)
- avtoklav (tip 250, Sutjeska)
- anaerobni lonci (AnaeroJar 2,5 L, Ago 25 A, Oxoid)
- mešanica plina (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) (Istragas)
- inkubator (SP 190, Kambič)
- zaščitna mikrobiološka komora (Yellowline, IKA in PIO SMBC 122AV, Iskra)
- komora za PCR (Holten, Lamin Air)
- vodna kopel (serija 11757, Sutjeska)
- komplet za elektroforezo (GNA 200, Pharmacia Biotech)
- aparatura za PCR (Gene Amp DNA Thermal Cycler 2400, Perkin Elmer)
- centrifuga (Mini spin Plus, Eppendorf)
- centrifuga (5415C, Eppendorf Centrifuge)
- svetlobni mikroskop (M400-D, Swift)
- sistem za dokumentiranje gelov (GEL DOC 2000, S.N. 653/1281, BIO RAD, ZDA)

- fluorescentni mikroskop (BX-60, Olympus)
- faznokontrastni mikroskop (BX 50, Olympus Optical Co.)
- transmisijski elektronski mikroskop (JEM-1200EXII, JEOL LTD, Tokijo, Japonska)
- membranski filtri (ISOPORE™ membrane filters 0,2 µm GTBP, Millipore)
- ohišje za filtre (CAT. 10, SX0001300, Millipore)
- vrtinčnik (Vibromix 104EV, Tehnica)
- zamrzovalnik (LTH)
- hladilnik (Gorenje)
- mikrovalovna pečica (Cook'grill 1300, Sanyo)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Revitalizacija seva

Izolat *Campylobacter jejuni* K49/4, shranjen v krioepruvetah pri -70 °C, smo s cepilno zanko prenesli na trdno gojišče Columbia krvni agar. Nacepljene plošče smo inkubirali v mikraerofilni atmosferi v loncih pri 42 °C za približno 24 ur, oz. dokler se niso na gojišču pojavile tipične kolonije celic *Campylobacter jejuni*.

3.2.2 Priprava vzorcev

V 4 sterilne plastične lončke smo aseptično dodali 50 ml tekočega gojišča Preston in vanje nacepili kulturo K49/4 iz gojišča Columbia. Vsebino lončkov smo premešali na vrtinčniku in jih inkubirali v mikraerofilnih pogojih (5 % O₂, 10 % CO₂ in 85 % N₂) pri 42 °C. Mikraerofilne pogoje v loncih smo ustvarili tako, da smo vanje vpihovali ustrezno mešanico plinov. Čas inkubacije za namnožitev do eksponentne faze rasti je bil 9 h, do stacionarne faze pa 15 h.

Po 9 oz. 15 h smo vsebino vseh lončkov zmešali skupaj, da smo dobili homogene in volumsko enake vzorce. Mešanico smo ponovno razdelili: 70 ml mešanice smo uporabili za nestradane vzorce, 2 × po 50 ml mešanice pa smo pripravili na stradanje. Stradane vzorce smo pripravili tako, da smo suspenzijo celic in gojišča aseptično prelili v sterilne centrifugirke, centrifugirali 5 min na 13000 × g, odlili supernatant, aseptično dolili enako količino fiziološke raztopine, ponovno centrifugirali 5 min na 13000 × g, odlili supernatant in ponovno dolili alikvoten volumen fiziološke raztopine. Vzorec za stradanje smo ponovno razdelili na dva dela po 50 ml: v en lonček smo dodali kloramfenikol do koncentracije 5 µg/mL vzorca, v drugega pa nismo nič dodali. Vse lončke smo ponovno inkubirali v mikraerofilni atmosferi na 42 °C.

3.2.3 Vzorčenje

3.2.3.1 Vzorčenje za določanje morfologije, kultivabilnosti in preživelosti

Prvo vzorčenje pri osnovni kulturi smo izvedli, ko je kultura dosegla eksponentno oz. stacionarno fazo rasti. Ta vzorec nam je predstavljal kulturo. Vzeli smo vzorce za določanje cfu/mL in živosti. Istočasno smo pripravili vzorce za izvedbo toplotnega stresa. Pri izvedbi toplotnega stresa na 48 °C smo dobili vzorce kulture, ki je bila izpostavljena povišani temperaturi za 3, 20 in 60 min. Pri toplotnemu stresu na 55 °C smo dobili vzorce, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi za 3, 10, 20, 30 in 60 min.

Osnovno kulturo smo dalje inkubirali pri optimalnih pogojih, do trajanja skupne inkubacije 10, 14, 15 in 24 h. Te vzorce smo vzeli zaradi kontrole kulture in tudi pri teh smo določali živost in CFU/mL (pri kulturi, ki je bila inkubirana za 24 h, smo določali samo CFU/mL).

Pri stradani kulturi (z dodanim kloramfenikolom in brez) smo prvič vzorčili takoj po odstranitvi gojišča. Naslednje vzorčenje smo opravili po 5 h inkubacije. Ta vzorec nam je predstavljal osnovno kulturo. Istočasno smo pripravili vzorce za izpostavitev toplotnemu stresu in v nadaljevanju postopali enako kot pri nestradani kulturi.

Kontrolno kulturo stradanih celic (z dodanim kloramfenikolom in brez) smo inkubirali do skupnega časa inkubacije 6 h in takrat spet vzorčili za določanje živosti in CFU/mL.

Odvzete vzorce smo do izvedbe barvanja in štetja pod fluorescentnim mikroskopom in nacepljanja na plošče za določanje kultivabilnosti hranili v hladilniku.

3.2.3.2 Vzorčenje za določanje izražanja genov

Postopali smo enako kot pri vzorcih za določanje morfologije, kultivabilnosti in živosti z razliko, da smo pri tem poskusu vzeli manj vzorcev, ker nismo potrebovali vzorcev za določanje živosti.

3.2.4 Izpostavitev toplotnemu stresu

4 mL vzorca (nestradane kulture, 5 h stradane kulture in 5 h stradane kulture z dodanim kloramfenikolom) smo aseptično prenesli v sterilne epruvete. Epruvete smo dali v vodno kopel, ogreto na 48 oz. 55 °C. Ko je središčna temperatura v epruveti dosegla želeno temperaturo, smo pričeli z merjenjem časa izpostavitve stresu (3, 20 in 60 min za stres pri 48 °C in 3, 10, 20, 30 in 60 min za stres pri 55 °C). Po določenem času smo vzeli epruvete iz kopeli in jih ohladili v hladilniku.

Pri vzorcih za določanje izražanja genov smo izvedli samo poskus z izpostavljivo temperaturi 55 °C za 3, 10, 20, 30 in 60 min. Sama izvedba poskusa je bila enaka kot za določanje ostalih parametrov.

3.2.5 Določanje živosti in morfologije celic

Za določanje živosti in morfologije celic smo uporabili metodo direktnega štetja celic obarvanih z barvilom LIVE/DEAD® BacLight™ pod fluorescentnim mikroskopom.

Najprej smo pripravili ustrezeno razredčitev vzorca (-1) in pripravili zadostno količino mešanice barvil za določeno število vzorcev ($0,4 \mu\text{L}$ barvila A + $0,4 \mu\text{L}$ barvila B + $0,7 \mu\text{L}$ filtrirane destilirane vode za vsak vzorec). Nato smo dodali $1,5 \mu\text{L}$ mešanice barvil v razredčen vzorec in inkubirali 15 min v temi pri sobni temperaturi. Medtem smo vstavili membranski filter v ohišje za filter in nanj pripeli injekcijsko brizgo z odstranjениm batom. Po inkubaciji smo skozi filter prefiltrirali $0,4 \text{ mL}$ obarvane razredčitve kulture. Filter smo odstranili iz ohišja in ga položili na kapljico fiziološke raztopine na objektuem steklu, dodali še eno kapljico fiziološke raztopine na filter in pokrili s krovnim stekлом. Na slikah od 5 do 7 lahko vidimo posamezne stopnje priprave filtra za opazovanje pod mikroskopom. Filter smo opazovali pod fluorescentnim mikroskopom z imerzijskim objektivom pod 600-kratno povečavo. Uporabljeni sistem mikroskopa, povezanega s fotoaparatom in računalnikom, lahko vidimo na sliki 8. Na filtru smo šteli zelene (žive) in rdeče (mrtve) celice *C. jejuni* ter spiralaste in kokoidne celice. Na vsakem filtru smo šteli celice najmanj 20 vidnih polj. Opazovali in šteli smo po kvadratkih po diagonali mrežice v vidnem polju. Pri tem smo število celic pri štetju kvadratkov preračunali na povprečno vrednost za 1 kvadrat. Pri štetju mrežice smo v enačbo št. 1 vstavili število, ki smo ga dobili s štetjem celic po vsej površini mrežice, prav tako tudi pri štetju celic vidnega polja.

Za izračun števila celic v 1 mL vzorca smo se posluževali naslednje formule:

$$N = \frac{\text{št.} \times R \times FM}{V_{vz.}} \quad \dots(1)$$

št. število preštetih celic

R razredčitev

$V_{vz.}$ volumen filtriranega vzorca

FM je konstanta, ki je odvisna od načina štetja:

- pri štetju v kvadratkih po diagonali: $FM = 6,04 \times 10^5$
- pri štetju na celi mrežici: $FM = 2,42 \times 10^4$
- pri štetju na celem vidnem polju: $FM = 4,9 \times 10^3$

Ker smo za en vzorec prešteli celice na več (10) vidnih poljih, smo upoštevali povprečno število vseh štetij.



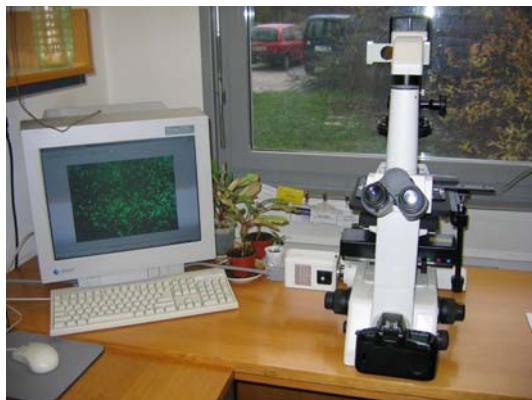
Slika 5: Vstavljanje membranskega filtra v nastavek za filtriranje z injekcijsko brizgo



Slika 6: Filtriranje vzorca skozi membranski filter



Slika 7: Polaganje membranskega filtra na objektno steklo



Slika 8: Mikroskop, povezan z računalnikom in fotoaparatom, za fotografiranje filtrov

3.2.6 Določanje kultivabilnosti

Merilo za kultivabilnost je število CFU/mL vzorca in je odvisno od faze rasti, števila celic in stanja celic. Na gojišču zrastejo samo nepoškodovane celice, ki so sposobne za delitev. Poškodovane celice ne zrastejo.

Pripravili smo serijske razredčitve po Kochu, nacepili plošče in po inkubaciji prešteli kolonije na števnih agarskih ploščah Karmali. Izračunali smo povprečno koncentracijo celic (CFU/mL) po enačbi št. 2 (ISO 4833, 1991):

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d} \left[\frac{CFU}{mL} \right] \quad ... (2)$$

N povprečna koncentracija celic

ΣC vsota kolonij na vseh ploščah

n_1 število plošč prve razredčitve

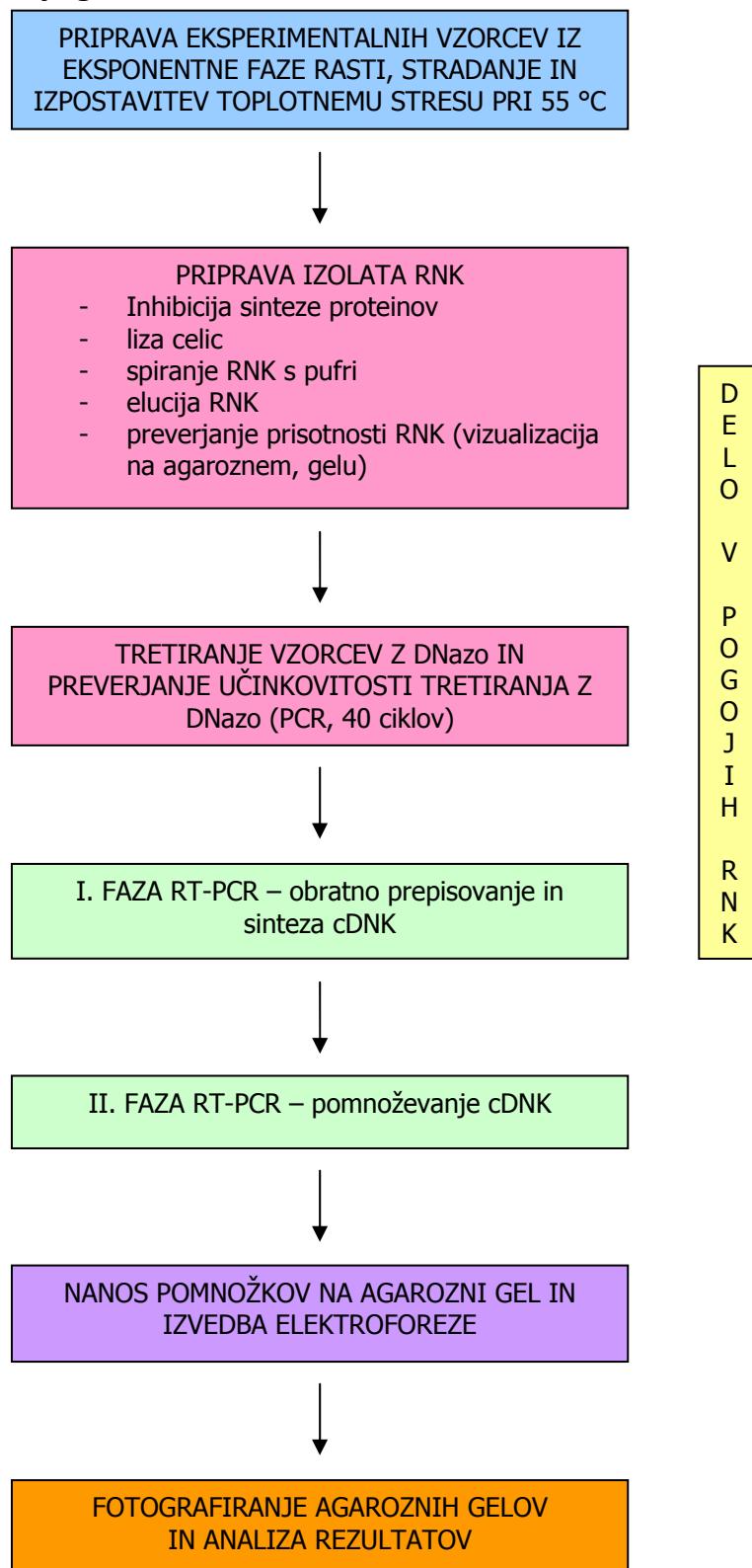
n_2 število plošč druge razredčitve

d razredčitveni faktor druge razredčitve

3.2.7 Statistična obdelava rezultatov

Vsi poskusi so bili opravljeni v dveh ponovitvah. Kot rezultat so prikazane povprečne vrednosti dobljenih rezultatov. Na slikah z rezultati je prikazan standardni odklon, razen na krivuljah za prikaz kultivabilnosti.

3.2.8 Določanje izražanja genov z metodo RT-PCR



Slika 9: Shematski prikaz izvedbe RT-PCR

Na sliki 9 je predstavljen enostaven shematski prikaz poteka poskusa za določanje izražanja genov, ki je natančneje opisan v nadaljevanju.

3.2.8.1 Izolacija RNK

Osnovno kulturo in 5 h stradano kulturo iz eksponentne faze rasti smo izpostavili temperaturi 55 °C za 3, 10, 20, 30 in 60 min, tako kot je opisano v postopku za toplotni stres. Takoj po stresu smo izvedli izolacijo RNK z reagenti iz seta RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH). Večina dela je potekala v pogojih RNK – v okolju brez prisotne RNK (površine, rokavice in vse pripomočke smo očistili najprej s hipokloritom in nato z SDS, da smo uničili RNaze). Vso steklovino smo oprali in sterilizirali na 180 °C vsaj 12 h.

I. FAZA

1 mL vzorca smo prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko za izolacijo RNK in centrifugirali 5 min na $8000 \times g$. Odpipetirali smo 500 mL supernatanta in dodali 1 mL reagenta RNA protect (Qiagen GmbH) in 15 µL kloramfenikola s koncentracijo 100 µg/mL, s katerima smo ustavili sintezo proteinov. Premešali smo z vrtinčnikom in inkubirali 10 min na sobni temperaturi. Nato smo vzorce ponovno centrifugirali 5 min na $8000 \times g$ in odpipetirali supernatant. Pelet smo resuspendirali v 100 µL pufra 1 × TE (premešali s pipeto) in dodali 2 µL lizocima (20 mg/mL). Na vrtinčniku smo mešali 5 min in nato inkubirali 5 – 10 min na sobni temperaturi. V nadaljevanju smo delali v pogojih RNK. Bakterijsko suspenzijo smo lizirali z dodatkom 350 µL pufra RLT (lysis buffer kit; Qiagen GmbH) s predhodno dodanim β-merkaptoetanolom. Ponovno smo premešali na vrtinčniku in postopali z naslednjo fazo.

II. FAZA – potekala je v okolju brez prisotne RNK

V drugi fazi smo še dalje očistili RNK. V vzorce smo dodali 250 µL 100 % etanola, premešali in vse skupaj prenesli na kolone RNeasy (Qiagen GmbH). Na sliki 10 lahko vidimo kolone za izolacijo RNK. Te smo centrifugirali 1 min na $8000 \times g$ in odlili vsebino spodnjega dela kolone, ker se je RNK adsorbirala na površino membrane v koloni. Kolone smo sprali s 700 µL reagenta RW1 (wash buffer-kit, Qiagen GmbH), ponovno centrifugirali 1 min na $8000 \times g$. Spodnji del kolone smo nato zavrgli in ga zamenjali z novim. Kolone smo sprali s 500 µL RPE (wash buffer-kit; Qiagen), spet centrifugirali 1 min na $8000 \times g$ in odlili vsebino spodnjega dela kolone. Kolono smo ponovno sprali s 500 µL reagenta RPE in centrifugirali 3 min na $14000 \times g$ (dokler ni bil zgornji del kolone suh). Kolone smo prenesli v 1,5 mL sterilne (silikonizirane centrifugirke). RNK smo eluirali s 50 µL vode DEPC, centrifugirali 1 min na $8000 \times g$, kolone zavrgli in shranili eluirano RNK v zamrzovalniku na -20 °C. Prisotnost RNK smo preverili z vizualizacijo na agaroznem gelu v pufru TAE. Elektroforeza je potekala pri 10 V/cm. Po končani elektroforezi smo gel 10 min barvali z raztopino EtBr, opazovali na UV transluminatorju in računalniško dokumentirali. Vsi reagenti (agarozni gel, pufer TAE, EtBr) so bili pripravljeni pod pogoji RNK z uporabo ddH₂O DEPC.



Slika 10: Nanašanje vzorcev v kolone za izolacijo RNK

3.2.8.2 Obdelava z DNazo

V naslednji fazi smo tretirali RNK z DNazami, da smo odstranili vse ostanke DNK. Najprej smo pripravili mešanico za tretiranje vzorcev. Mešanica za en vzorec je vsebovala: 20 µL pufra (Pharmacia buffer, Qiagen GmbH) + 2 µL inhibitorja (RNase inhibitor, Qiagen GmbH) (20 U/µL) + 10 µL encima DNase I (1 U/µL) + 118 µL reagenta DEPC. 50 µL vzorca RNK smo dodali 150 µL mešanice in premešali na vrtinčniku. Na vrh smo dodali 100 µL mineralnega olja, pokrili s parafilmom in inkubirali 2 h v vodni kopeli na 37 °C. Po pretečenem času smo odpipetirali tretirano RNK izpod mineralnega olja v sveže centrifugirke, dodali 200 µL fenola, premešali na vrtinčniku in centrifugirali 5 min na 12500 × g. Supernatant smo prenesli v svežo centrifugirko, dodali 200 µL kloroforma CHCl₃, premešali na vrtinčniku in ponovno centrifugirali 5 min na 12500 × g. Supernatant smo spet prenesli v sveže centrifugirke, dodali 400 µL 100 % etanola in 20 µL NaAc, premešali z vrtinčnikom in inkubirali vsaj 30 min na -20 °C.

V naslednji fazi smo najprej centrifugirali vzorce 10 min na 12500 × g, nato smo zavrgli supernatant in dobili bele pelete. Te smo sprali z 200 µL 70 % etanola. To smo spet centrifugirali 10 min na 12500 × g in odpipetirali ves supernatant. Pelete smo posušili pod lučjo (pribl. 20 min) in nato dodali 50 µL vode DEPC. Tako očiščeno RNK smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C ali za krajši čas na ledu.

3.2.8.3 Izvedba reakcije PCR za določanje prisotnosti DNK v vzorcih RNK – 40 ciklov

Za določanje prisotnosti DNK smo uporabili začetnike za gena, ki sta prisotna v celicah v velikih količinah – hišnega gena *16 S rRNA* in *flaA*.

PCR mešanica za en vzorec:

2,5 µL 10 × buffer (100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl)

1,5 µL MgCl₂ (25 mM)

2,5 µL dNTP (2mM)

0,25 µL oligonukleotidnih začetnikov F (100 pmol)

0,25 µL oligonukleotidnih začetnikov R (100 pmol)

16,85 µL vode DEPC

0,15 µL Taq polimeraze

V mikrocentrifugirke smo dali 24 µL mešanice + 1 µL vzorca RNK in jih nato razvrstili v aparatu za reakcijo PCR. Nato smo nastavili temperaturno-časovni program pomnoževanja:

- 1 cikel: 95 °C, 60 s (denaturacija DNK)
- 40 ciklov:
 - 95 °C za 15 s (denaturacija DNK)
 - 55 °C za 15 s (prileganje začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C za 30 s (podaljševanje začetnih oligonukleotidov)
- 1 cikel: 72 °C za 8 min (končno podaljševanje)

Naslednji dan smo izvedli elektroforezo (80 V, 30 min) s pomnožki in slikali gel,obarvan z EtBr. Ker so bili vzorci negativni na prisotnost DNK, smo nadaljevali s poskusom.

3.2.8.4 Izvedba prve faze RT-PCR – obratno prepisovanje in sinteza cDNAK

To fazo RT-PCR smo izvedli v pogojih RNK. Prvo verigo cDNAK smo z obratnim prepisom (reverzno transkripcijo) sintetizirali v reakcijski mešanici končnega volumna 40 µL.

Najprej smo pripravili mešanico za reakcijo PCR:

- 8 µL MgCl₂
- µL 10 × PCR buffer II (100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl)
- 19 µL DEPC vode
- 2 µL dNTP (20 mM) – nerazredčen (1 U/ µL)
- 2 µL RNase inhibitor (20 U/µL)
- 1 µL Multiscribe RT (50 U/µL)
- 2 µL Random Hexamers

V mikrocentrifugirke z 2 µL RNK smo dodali 38 µL mešanice in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi (prileganje začetnih oligonukleotidov). Vzorce smo nato dali v aparat za PCR in nastavili naslednji temperaturno-časovni program:

- 15 minut pri 42 °C (sinteza prve verige cDNAK)
- 5 minut pri 99 °C (inaktivacija encima reverzne transkriptaze)

Po končanem programu smo dobili v centrifugirkah cDNAK, ki je komplementarna preiskovanim molekulam RNK. Vzorce cDNAK smo ohladili na ledu ter jih shranili pri -20 °C do uporabe z metodo RT-PCR.

3.2.8.5 Izvedba druge faze RT-PCR – reakcija PCR

Za drugo fazo RT-PCR smo uporabili pomnožke iz prve faze in novo mešanico reagentov:

- 0,25 µL F začetnikov (100 pm)

- 0,25 µL R začetnikov (100 pm)
- 1 µL MgCl₂ (25 mM)
- 2 µL 10 × PCR buffer II (100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl)
- 16,38 µL DEPC vode
- 0,125 µL AmpliTaq DNA Polymerase (5 U/µL)

V mikrocentrifugirke smo dali po 20 µL mešanice in 5 µL pomnožkov. Mešanico smo pripravili v PCR prostoru. Vzorce in mešanico smo ves čas priprave hranili na ledu. Pripravljeni vzorce smo nato dali v aparaturo za reakcijo PCR in nastavili program.

Program za drugo fazo RT-PCR z naslednjimi stopnjami:

- 1 cikel: 95 °C, 105 s (denaturacija nastalih produktov, aktivacija polimeraze)
- od 25 do 35 ciklov (odvisno od gena)
 - 95 °C, 15 s (denaturacija DNK)
 - 55 ali 60 °C, 30 s (odvisno od gena) (prileganje začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 45 s (podaljševanje začetnih oligonukleotidov)
- 1 cikel: 72 °C, 7 min (končno podaljševanje)

Zaradi slabega izražanja gena *groEL* smo za določanje njegovega izražanja uporabili zaporedno RT-PCR. Pomnožke iz druge faze RT-PCR smo ponovno izpostavili PCR.

Program za drugi del zaporedne RT-PCR za gen *groEL*:

- 1 cikel: 95 °C, 105 s (denaturacija nastalih produktov, aktivacija polimeraze)
- 30 ciklov
 - 95 °C, 15 s (denaturacija DNK)
 - 55 °C, 30 s (prileganje začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 45 s (podaljševanje začetnih oligonukleotidov)
- 1 cikel: 72 °C, 7 min (končno podaljševanje)

Prisotnost pomnožkov smo dokazovali z elektroforezo na agaroznem gelu.

3.2.8.6 Priprava in izvedba elektroforeze

Priprava gela za elektroforezo

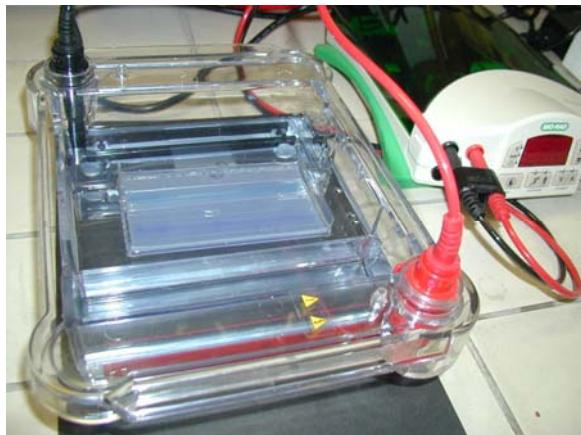
V erlenmajerico smo zatehtali 1 g agarognega gela in dodali 60 mL pufra 0,5 × TAE. Agarozo smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je raztopila in zbistrla. Ohladili smo jo na 60 °C, vlili v model in pustili, da se je strdil. Gel smo nato dali posodo za elektroforezo s pufrom 0,5 × TAE.

Priprava pomnožkov za elektroforezo

2 µL nanašnega pufra smo dodali 8 µL pomnožkov, dobljenih z RT-PCR in premešali. Pomnožke smo nato nanesli na gel za elektroforezo. Poleg vzorcev smo na gel nanesli še molekulski označevalec dolžin fragmentov DNK, negativno kontrolo (samo mešanico za reagentov za RT-PCR) in pozitivno kontrolo (izolat DNK K49/4).

Potek elektroforeze

Elektroforezo smo pustili teči 40 min pri napetosti 120 V. Na sliki 11 lahko vidimo agarozni gel s pomnožki med potekom elektroforeze.



Slika 11: Agarozni gel v elektroforetski posodi med potekom elektroforeze

Fotografinanje gelov po elektroforezi

Po končani elektroforezi smo gel 10 min barvali z raztopino EtBr, opazovali na UV transluminatorju ter računalniško dokumentirali s sistemom za dokumentiranje gelov (GEL DOC 2000, S.N. 653/1281, BIO RAD, ZDA).

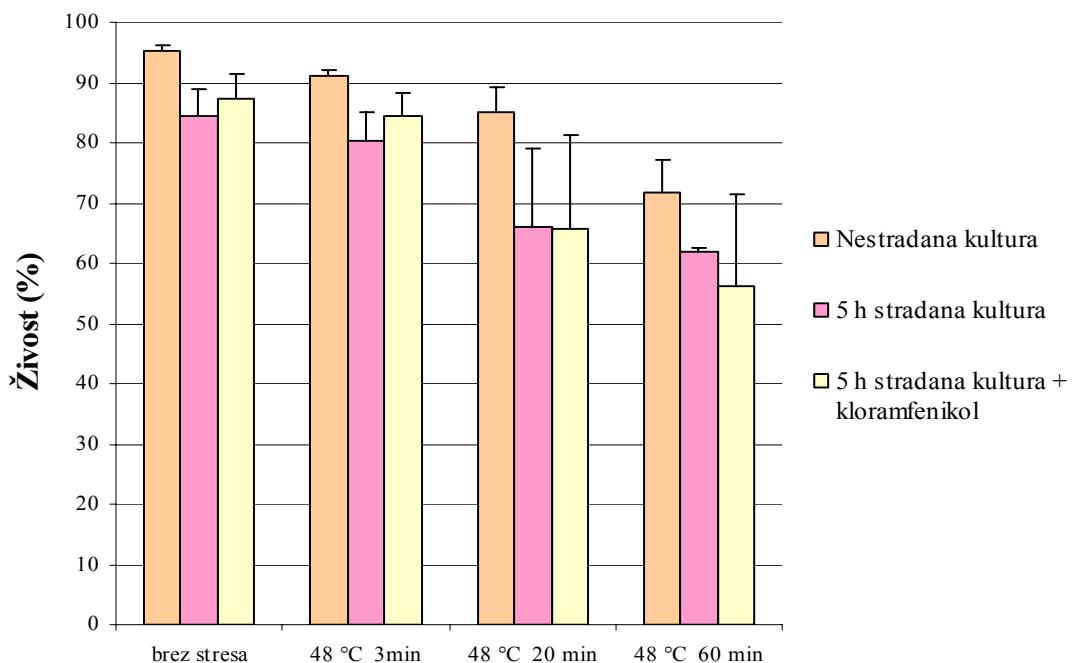
4 REZULTATI

4.1 TOPLITNI STRES PRI 48 °C KULTURE IZ EKSPONENTNE FAZE RASTI

Kulturo celic *Campylobacter jejuni* smo inkubirali 9 h, da je dosegla eksponentno fazo rasti. Vzorce smo izpostavili topotnemu stresu 48 °C in spremljali živost, morfologijo in preživelost celic. Na slikah od 12 do 14 so zbrani rezultati meritev, ki smo jih dobili s štetjem živih celic in kokov pod fluorescentnim mikroskopom ter s štetjem kolonij na ploščah.

Celice *Campylobacter jejuni* so večinoma v obliki spiralno zavitih palčk. Domnevamo pa, da pri izpostavitvi stresu preidejo v obliko kokov, zato je v rezultatih prikazan samo delež kokov v vzorcih.

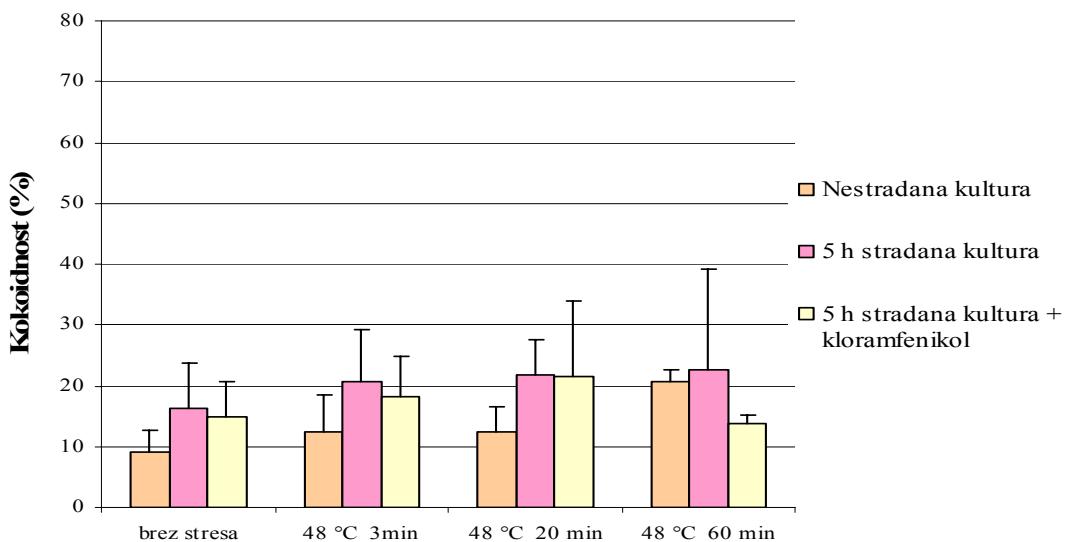
4.1.1 Živost



Slika 12: Preživelost celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih topotnemu stresu pri 48 °C

Tudi po dolgotrajni izpostavitvi stresu je ostal delež živih celic v preiskovanih vzorcih razmeroma velik. Na sliki 12 vidimo, da je bil tudi po 60 min izpostavitve stresu delež živih celic v vseh vzorcih višji od 50 %. Po 3 minutah stresa je padec živosti med 3 in 4 %. Največji padec živosti je po 20 min izpostavitve stresu in sicer je med 10 in 31 %.

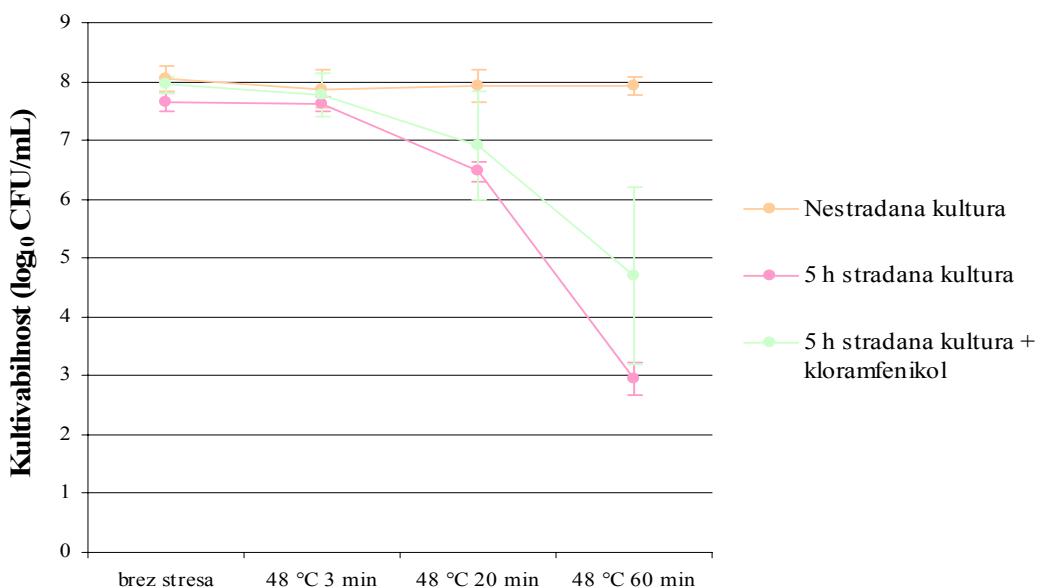
4.1.2 Kokoidnost



Slika 13: Delež kokov v vzorcih kultur celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti po izpostavitvi toplotnemu stresu pri 48 °C

Delež kokov je večji v primeru stradanih kultur in, kot je vidno na sliki 13, se njihov delež ni izrazito povečal z daljšim časom izpostavitev stresu, razen v primeru osnovne kulture.

4.1.3 Kultivabilnost



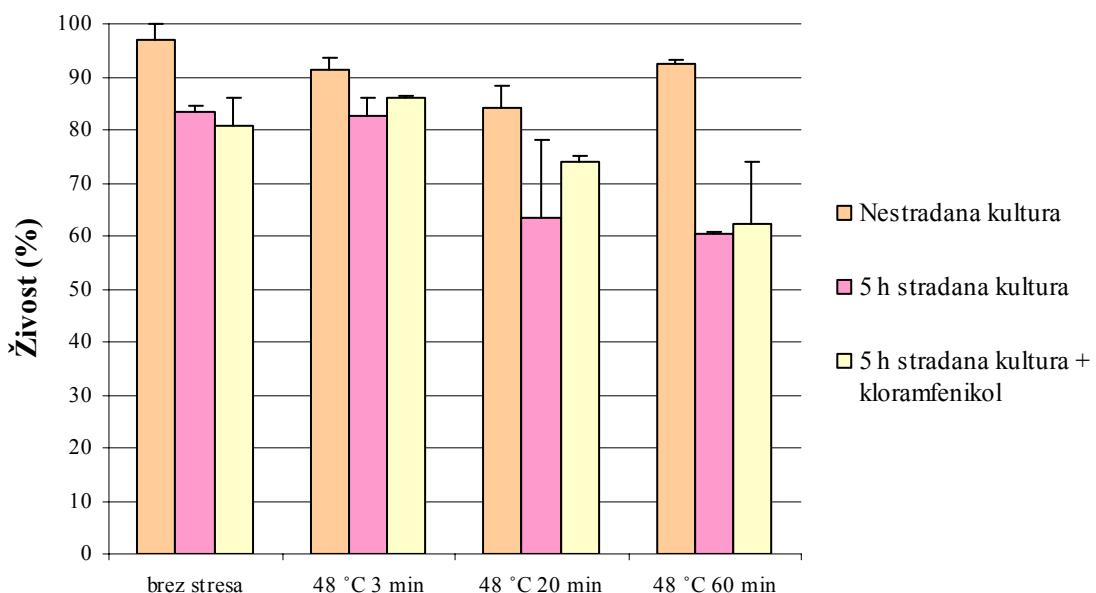
Slika 14: Kultivabilnost kultur celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 48 °C

Pri spremeljanju kultivabilnosti celic iz eksponentne faze rasti po izpostavitvi stresu pri 48 °C smo opazili, da je ostala kultivabilnost osnovne kulture praktično nespremenjena pri vseh časih izpostavitve stresu. Na sliki 14 pa je viden izrazit padec kultivabilnosti (za 4,7 oz. 3,2 log stopnje) stradanih kultur po dolgotrajni izpostavitvi stresu. Kratkotrajni topotni stres (3 min) praktično nima vpliva na kultivabilnost *C. jejuni*.

4.2 TOPLOTNI STRES PRI 48 °C KULTURE IZ STACIONARNE FAZE RASTI

Kulturo celic *Campylobacter jejuni* smo inkubirali 15 h, da je dosegla stacionarno fazo rasti. Vzorce smo izpostavili topotnemu stresu 48 °C in spremljali živost, morfologijo in preživelost celic. Na slikah od 15 do 17 so zbrani rezultati, ki smo jih dobili za določitev živosti, deleža kokov in kultivabilnosti celic.

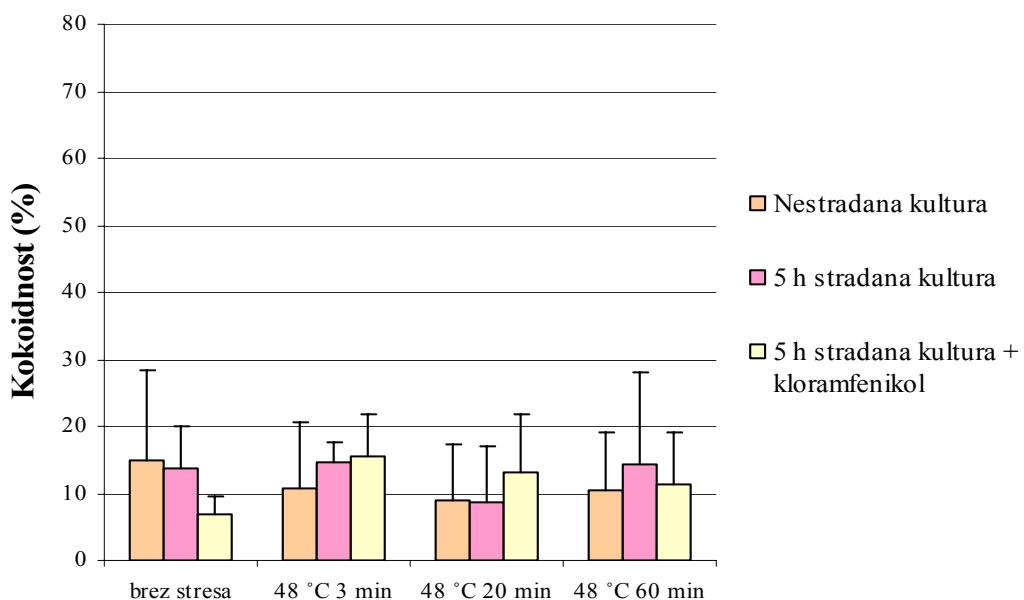
4.2.1 Živost



Slika 15: Preživelost celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih topotnemu stresu pri 48 °C

Izpostavitev temperaturi 48 °C predstavlja blag stres za kampilobakterje, kajti njihova optimalna temperatura rasti je pri 42 °C. To se odraža tudi na preživelosti pri tem stresu, ki se ne zmanjša niti po 60 min izpostavitve temperaturi 48 °C. Ne glede na predstres je ostal delež živilih celic višji oz. enak 60 %.

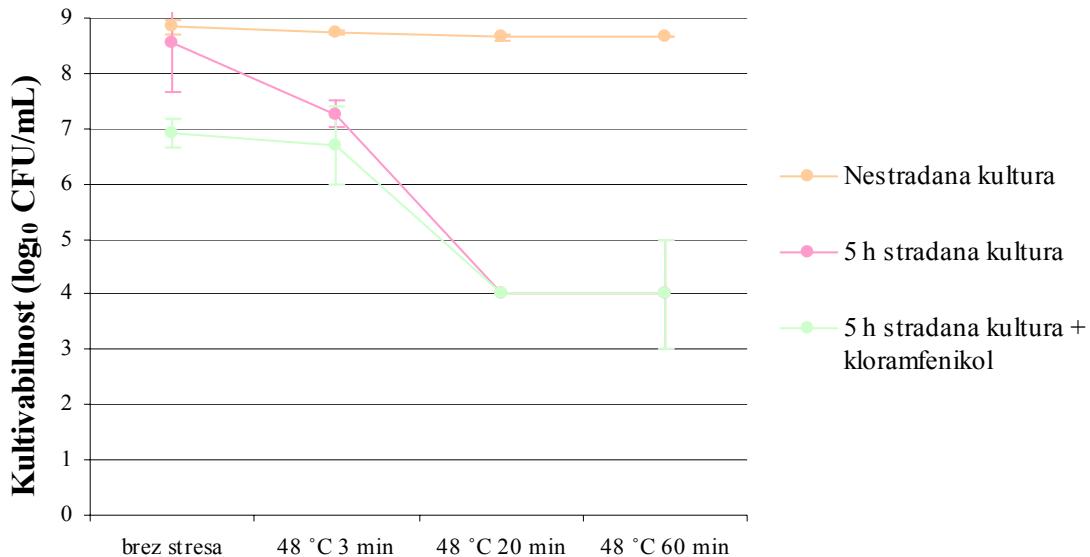
4.2.2 Kokoidnost



Slika 16: Delež kokov v vzorcih kultur celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti po izpostavitvi topotnemu stresu pri 48 °C

Delež kokov je bil v vseh vzorcih iz stacionarne faze sorazmerno nizek in ni presegel 15 %. Največ kokov je bilo v primeru stradanih kultur. Tudi z daljšim časom izpostavitev stresu se delež kokov v vseh vzorcih ni bistveno spremenil (slika 16).

4.2.3 Kultivabilnost



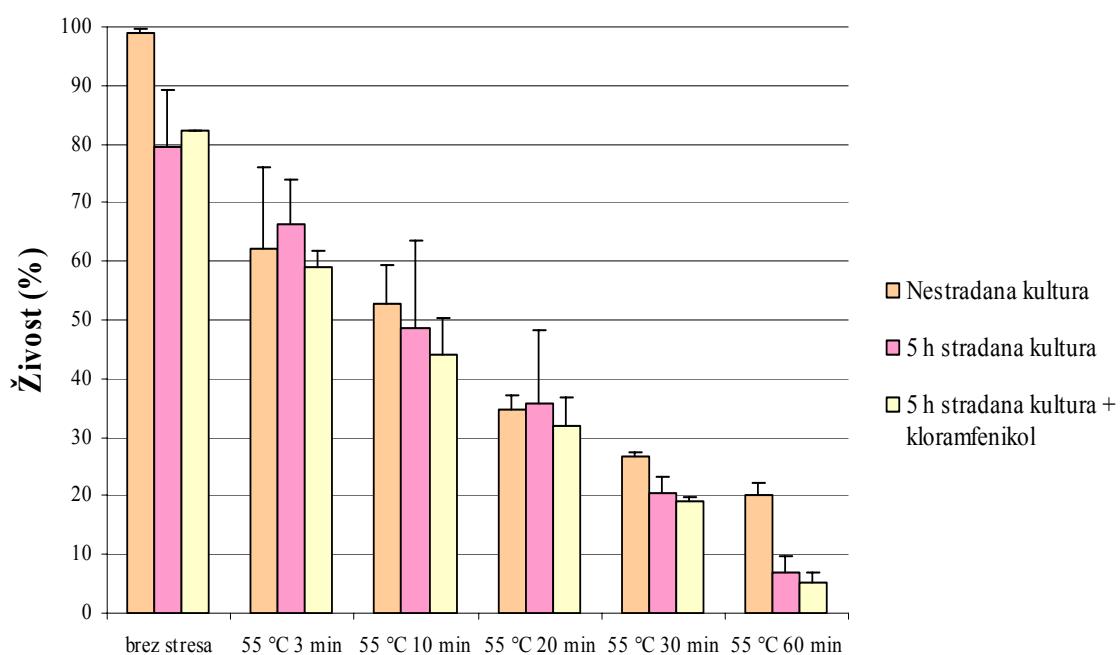
Slika 17: Kultivabilnost kultur celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih topotnemu stresu pri 48 °C

Tudi v primeru osnovne kulture celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti izpostavitev topotnemu stresu pri 48 °C ni vplivala na njihovo kultivabilnost. Na sliki 17 pa lahko vidimo, da je izpostavitev stresu vplivala na kultivabilnost stradane kulture. Že po 3 minutah trajanja stresa pada kultivabilnost za 1,2 log stopnje, po 60 min trajanja stresa pa za več kot 4 log stopnje.

4.3 TOPLITNI STRES PRI 55 °C KULTURE IZ EKSPONENTNE FAZE RASTI

Kulturo celic *Campylobacter jejuni* smo inkubirali 9 h, da je dosegla eksponentno fazo rasti. Vzorce smo izpostavili toplotnemu stresu 55 °C in spremljali živost, morfologijo in kultivabilnost celic. Tudi pri spremljanju odziva celic *C. jejuni* na toplotni stres pri 55 °C smo zbrali rezultate štetja pod fluorescentnim mikroskopom in na ploščah ter jih prikazali na slikah 18, 19 in 20.

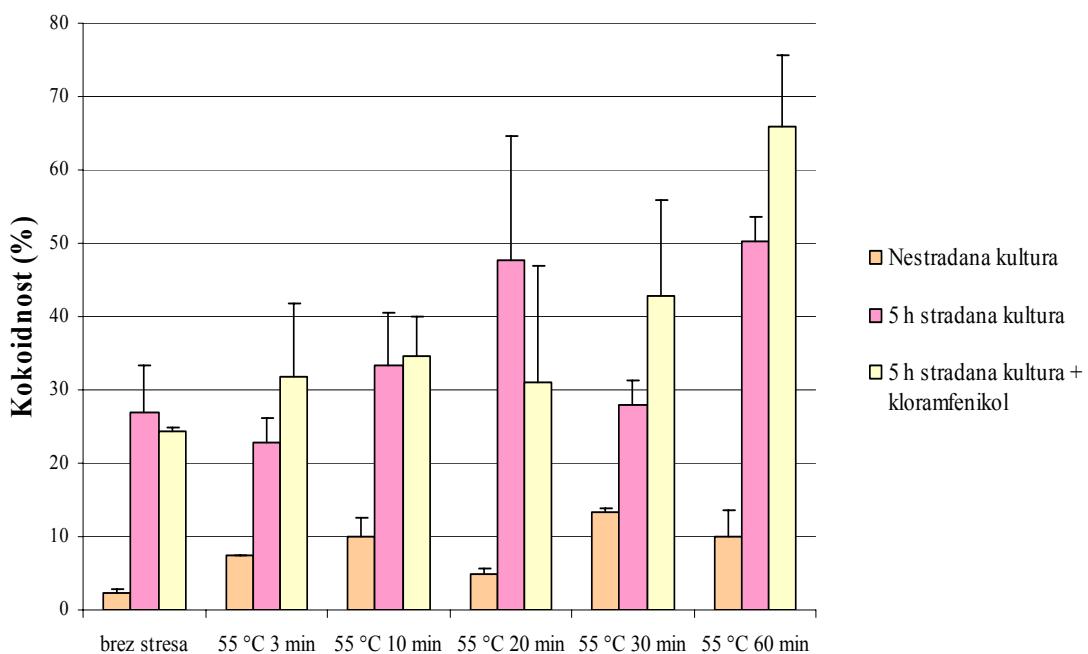
4.3.1 Živost



Slika 18: Preživelost celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C

Kratkotrajno izpostavitev toplotnemu stresu bolje prenašajo stradane celice iz eksponentne faze rasti. Na sliki 18 vidimo, da kljub visokemu deležu živih celic osnovne kulture pred stresom, je bil po 3 min stresa, večji delež živih celic v vzorcu stradane kulture. Živost je v primeru osnovne kulture padla za 36 %, stradane kulture pa za 13 %. Tudi po 20 min trajanja stresa je bil delež živih celic večji v primeru stradane kulture. Določen delež celic je preživel enourno izpostavitev stresu pri 55 °C. V osnovni kulturi je bilo 20 % živih celic, v vzorcu stradane kulture pa 7 %.

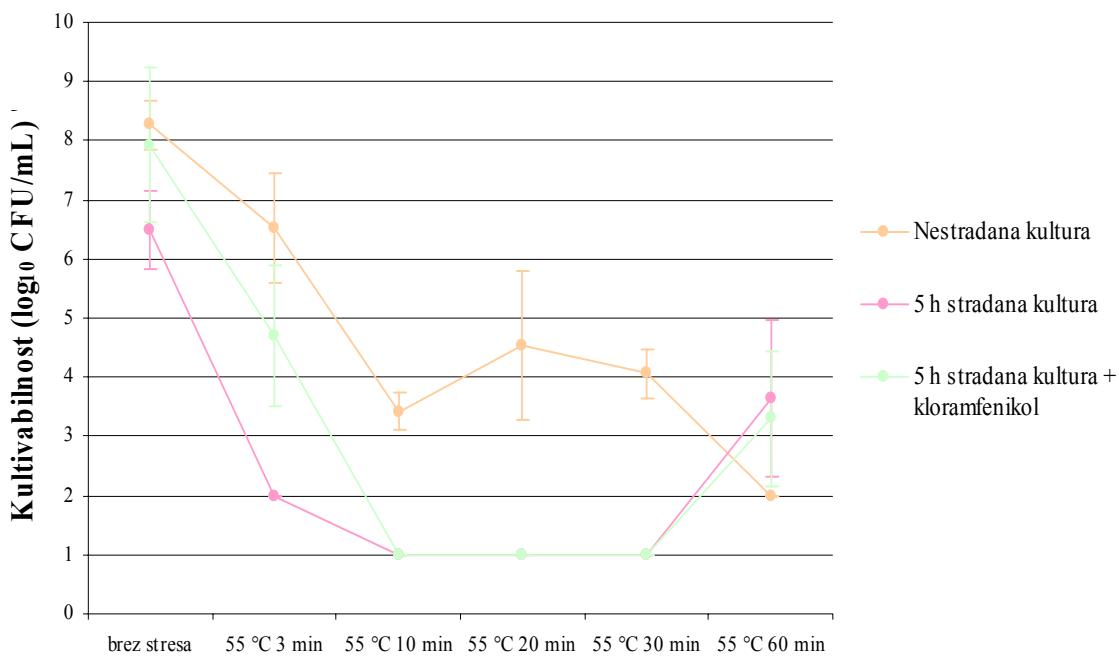
4.3.2 Kokoidnost



Slika 19: Delež kokov v vzorcih kultur celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti po izpostavitvi topotnemu stresu pri 55 °C

Pri določanju deleža kokoidnih celic v vzorcih iz eksponentne faze rasti smo opazili, da je bil ta izrazito večji v primeru stradane kulture in je narasel z daljšim časom izpostavitev topotnemu stresu. V vzorcu stradane kulture pred izpostavitvijo stresu smo določili 26 % kokov, po 60 min trajanja stresa pa je njihov delež narasel na 50 %. V vzorcih osnovne kulture je bilo pred stresom komaj 2 % kokov in tudi po daljšem času izpostavitev stresu njihov delež ni presegel 13 %.

4.3.3 Kultivabilnost



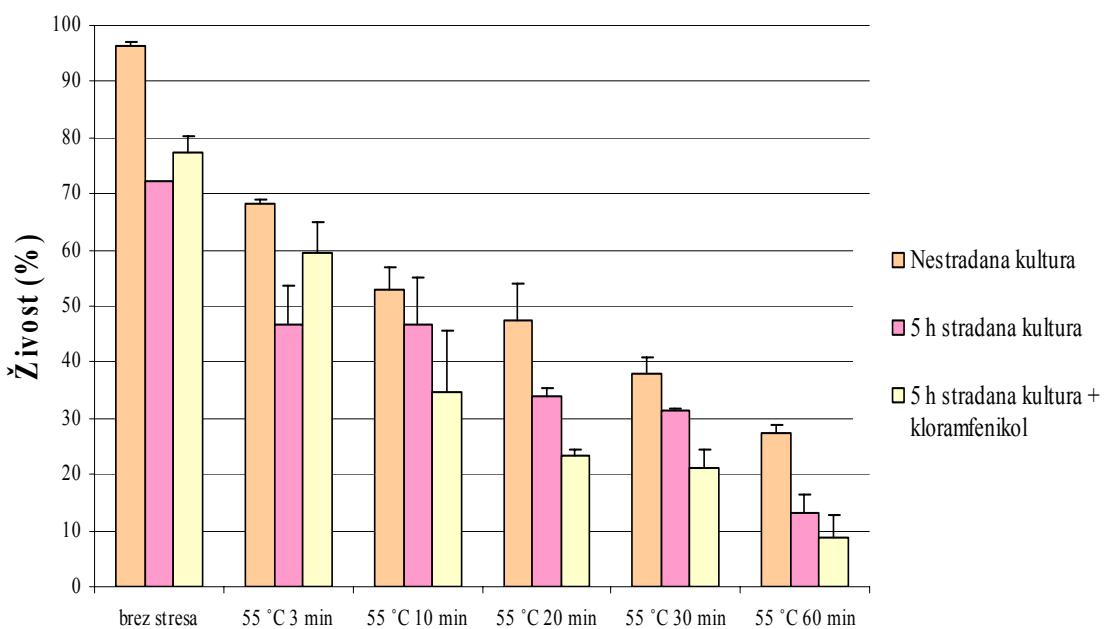
Slika 20: Kultivabilnost kultur celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C

Pri spremljanju kultivabilnosti smo opazili, da je bila boljša v primeru celic iz osnovne kulture po vseh časih izpostavitve stresu, razen po 60 min, kjer je bila boljša kultivabilnost obeh stradanih kultur. Temperatura 55 °C močno vpliva na celice, ker že po 3 minutah izpostavitve stresu kultivabilnost vseh vzorcev izrazito pada. Na sliki 20 vidimo, da je bil največji padec (4,5 log stopnje) v primeru stradane kulture in je po 10 min stresa padel na 1 log stopnjo.

4.4 TOPLITNI STRES PRI 55 °C KULTURE IZ STACIONARNE FAZE RASTI

Kulturo celic *Campylobacter jejuni* smo inkubirali 15 h, da je dosegla stacionarno fazo rasti. Vzorce smo izpostavili toplotnemu stresu 55 °C in spremljali živost, morfologijo in preživelost celic.

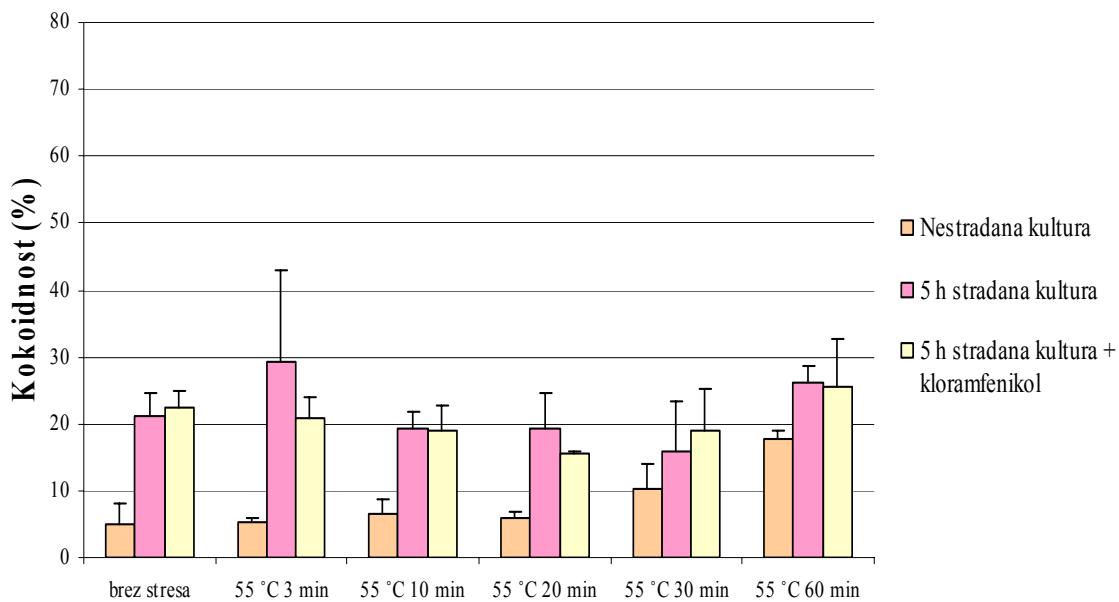
4.4.1 Živost



Slika 21: Preživelost celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih toplotnemu stresu pri 55 °C

Na sliki 21 je grafični prikaz rezultatov štetja živih celic iz stacionarne faze rasti pod fluorescentnim mikroskopom. Delež živih celic je bil sicer višji v primeru osnovne kulture, vendar je padec živosti po izpostavitvi stresu manjši v primeru stradane kulture. Po 3 min toplotnega stresa je bil padec živosti v obeh primerih približno izenačen (28 % za osnovno kulturo in 25 % za stradano kulturo). Do večjih razlik je prišlo po 10 min stresa, ko je bil padec živosti nestradane kulture 43 %, padec živosti stradanih celic pa je ostal pri 25 %. Tudi po 60 min trajanja toplotnega stresa smo v vzorcih določili žive celice, sicer pa je bil padec živosti spet manjši v primeru stradane kulture, v kateri se je zmanjšalo število živih celic za 59 %, živost celic osnovne kulture pa je padla za 69 %.

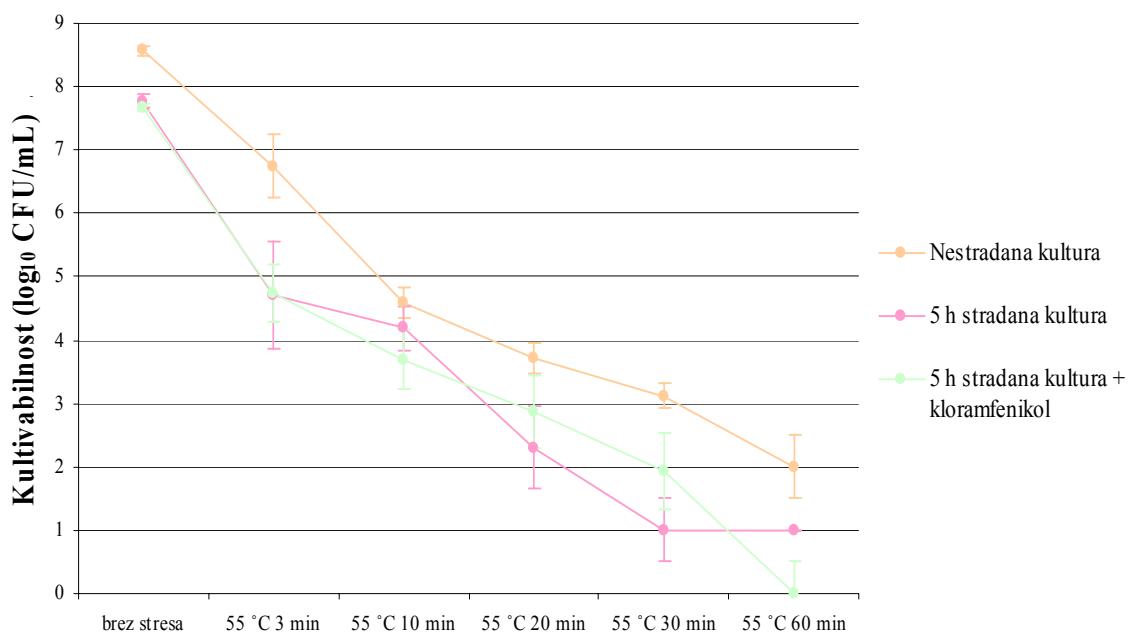
4.4.2 Kokoidnost



Slika 22: Delež kokov v vzorcih kultur celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti po izpostavitvi toplotnemu stresu pri 55 °C

Na sliki 22 vidimo, da je bil delež kokov tudi pri izvedbi poskusa s celicami iz stacionarne faze rasti večji v primeru stradanih kultur. V vzorcu nestrudane kulture se delež kokov ni izrazito povečal do trajanja stresa 30 min. Po 60 min izpostavitve temperaturi 55 °C pa je delež kokov narasel za skoraj 13 %. V vzorcih stradanih kultur se delež kokov ni izrazito povečal, niti z daljšim časom izpostavitve toplotnemu stresu.

4.4.3 Kultivabilnost



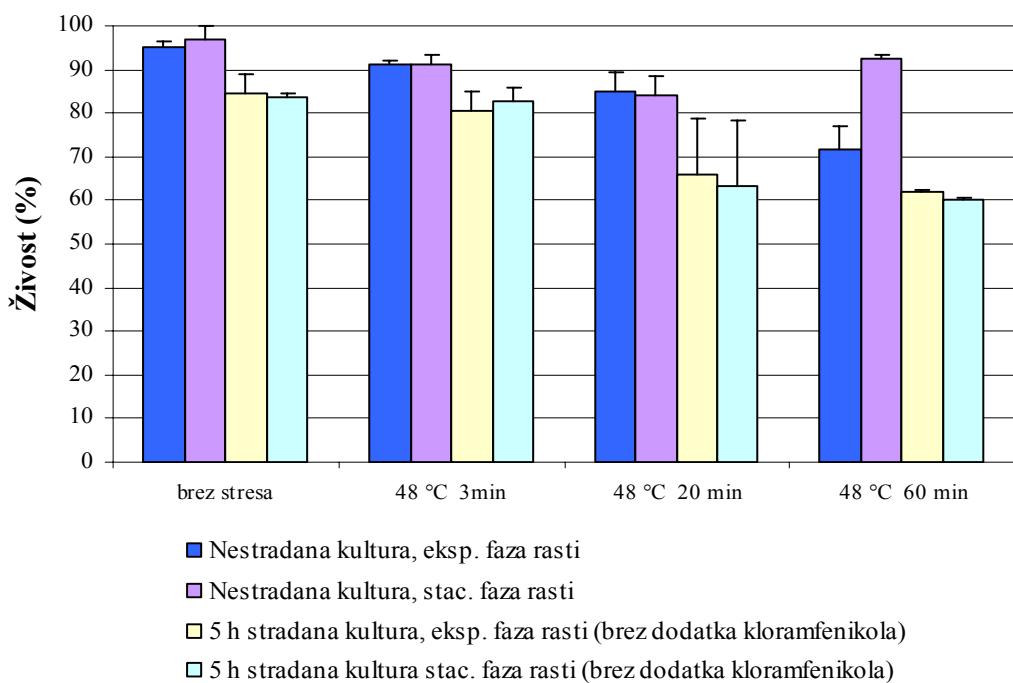
Slika 23: Kultivabilnost kultur celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti, izpostavljenih topotnemu stresu pri 55 °C

Temperaturni stres pri 55 °C močno vpliva na kultivabilnost celic, tako iz osnovne kot iz stradanih kultur. Iz slike 23 vidimo, da se je kultivabilnost vseh vzorcev močno zmanjšala že po 3 min izpostavitve stresu. Boljša kultivabilnost po vseh časih trajanja stresa je bila v primeru nestradane kulture. Tudi padec kultivabilnosti je bil manjši v primeru osnovne kulture.

4.5 PRIMERJAVA REZULTATOV IZ OBEH RASTNIH FAZ CELIC

4.5.1 Primerjava preživelosti

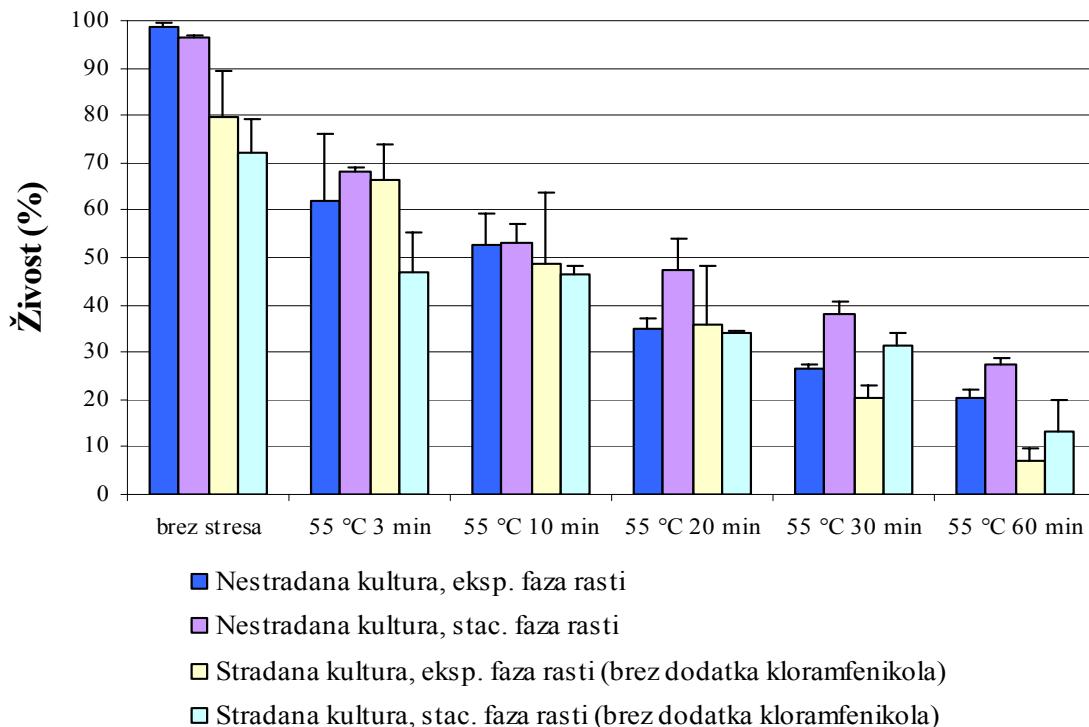
4.5.1.1 Primerjava preživelosti celic po toplotnem stresu pri 48 °C



Slika 24: Primerjava preživelosti celic *C. jejuni* po toplotnem stresu pri 48 °C

Pri primerjavi preživelosti po izpostavitvi stresu pri 48 °C nestrudanih kultur v obeh fazah rasti ni velikih razlik, razen v primeru 60 minutne izpostavite stresu. Razlog za to je lahko v tem, da temperatura 48 °C ne predstavlja tako velikega stresa za kampilobakterje. Po 3 min izpostavite stresu ostane delež živih celic stradane kulture skoraj nespremenjen. Po daljšem času izpostavite stresu delež živih celic nekoliko bolj izrazito pade, vendar tudi po 60 min ostaja visok.

4.5.1.2 Primerjava preživelosti celic po topotnem stresu pri 55 °C

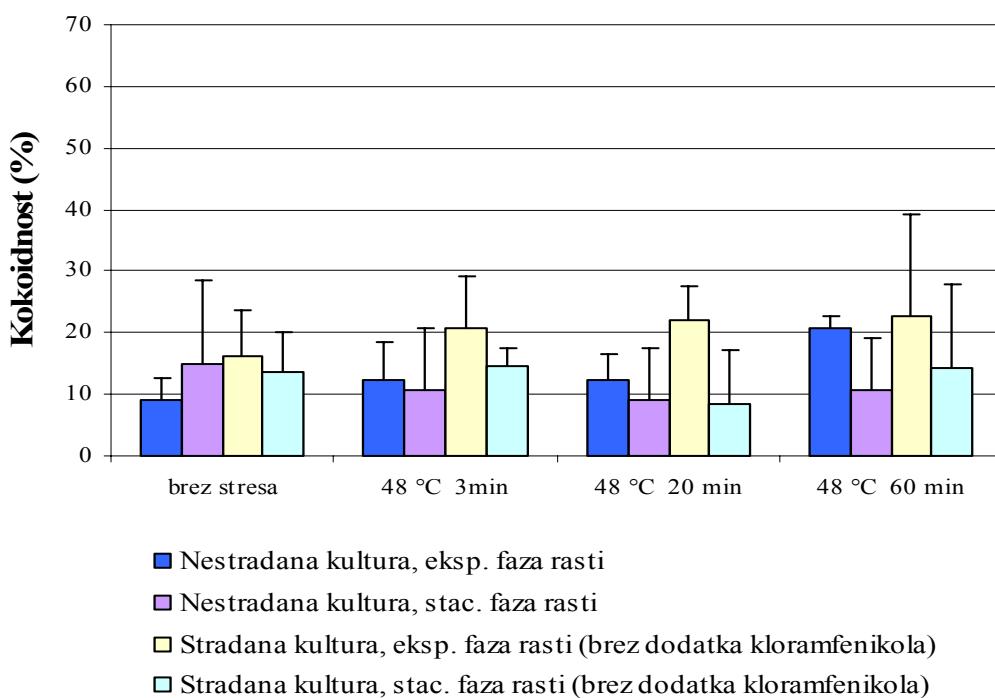


Slika 25: Primerjava preživelosti celic *C. jejuni* po topotnem stresu pri 55 °C

Na sliki 25 je predstavljena primerjava deleža živih celic osnovnih in stradanih kultur iz obeh faz rasti po izpostavitvi topotnemu stresu. V primeru nestradih kultur je bila boljša preživelost celic iz stacionarne faze rasti. V primeru stradanih kultur pa je bila boljša preživelost celic iz eksponentne faze rasti. Pri primerjavi med stradano in nestradi kulturo pa je večja ali približno enaka preživelost stradane kulture.

4.5.2 Primerjava kokoidnosti

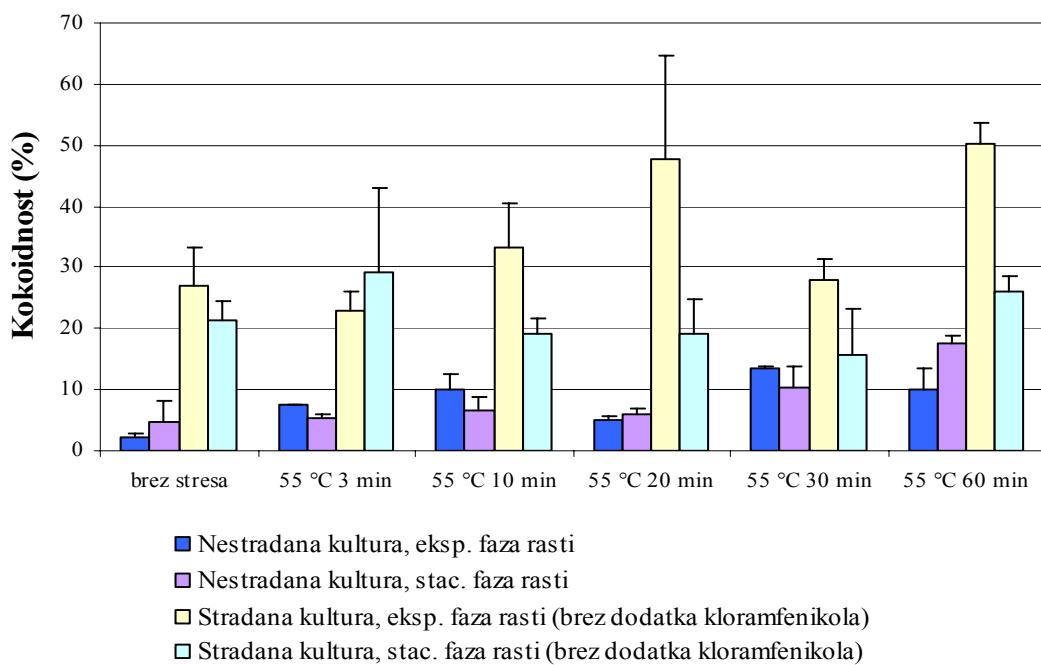
4.5.2.1 Primerjava kokoidnosti celic po toplotnem stresu pri 48 °C



Slika 26: Primerjava kokoidnosti celic *C. jejuni* po toplotnem stresu pri 48 °C

V primeru nestradanih kultur iz obeh rastnih faz je bil delež kokov po izpostavitvi stresu pri 48 °C približno izenačen po vseh časih trajanja stresa, razen po 60 min, ko je nekoliko narasel delež kokov v vzorcu iz eksponentne faze rasti. V primeru stradanih kultur pa je bil delež kokov po izpostavitvi stresu le nekoliko večji v vzorcu celic iz eksponentne faze rasti.

4.5.2.2 Primerjava kokoidnosti celic po toplotnem stresu pri 55 °C

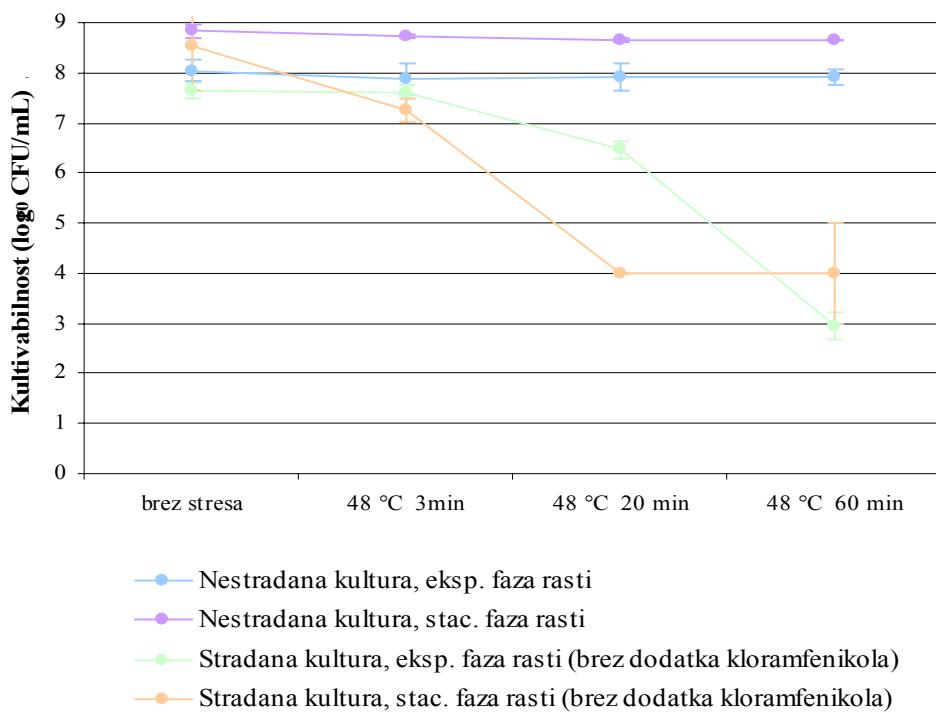


Slika 27: Primerjava kokoidnosti celic *C. jejuni* po toplotnem stresu pri 55 °C

Pri primerjavi števila kokoidnih celic po izpostavitevi toplotnemu stresu med rastnima fazama vidimo, da je bil delež kokov nekoliko večji v primeru stradane kulture iz eksponentne faze rasti. S podaljšanjem časa izpostaviteve visoki temperaturi se je delež kokov povečal samo v vzorcu stradane kulture iz eksponentne faze rasti.

4.5.3 Primerjava kultivabilnosti

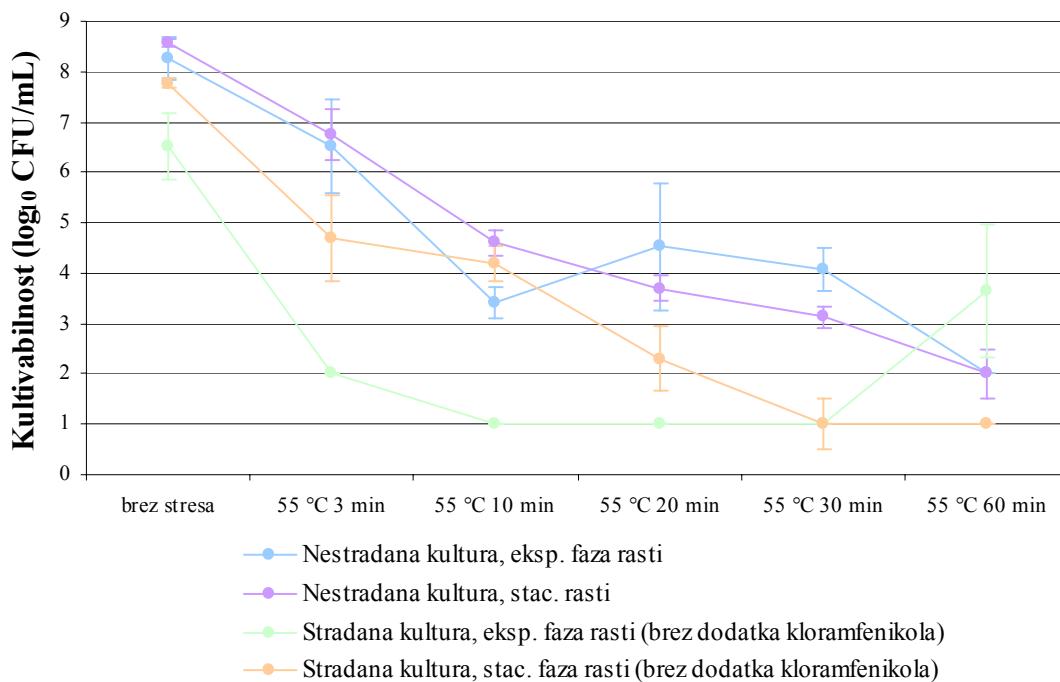
4.5.3.1 Primerjava kultivabilnosti celic po toplotnem stresu pri 48 °C



Slika 28: Primerjava kultivabilnosti celic *C. jejuni* po toplotnem stresu pri 48 °C

Kultivabilnost vzorcev nestrudanih kultur iz obeh rastnih faz se po izpostavitvi stresu pri 48 °C ni bistveno spremenila. Drugače je bilo v primeru strudanih kultur. Na sliki 28 vidimo, da je kultivabilnost strudanih kultur iz obeh faz rasti padla po izpostavljavi stresu. Po 3 min trajanja stresa je bil padec kultivabilnosti v vzorcu iz stacionarne faze za 1,2 log stopnje, kultivabilnost v vzorcu iz eksponentne faze rasti se ni spremenila. Tudi po 20 min trajanja stresa je bil večji padec kultivabilnosti v vzorcu iz stacionarne faze rasti. Po 60 minutnem stresu pa je bila boljša kultivabilnost celic iz stacionarne faze.

4.5.3.2 Primerjava kultivabilnosti celic po topotnem stresu pri 55 °C



Slika 29: Primerjava kultivabilnosti celic *C. jejuni* po topotnem stresu pri 55 °C

Stres pri 55 °C ima večji vpliv na kultivabilnost celic kot stres pri 48 °C. Že po 3 min izpostavitve stresu je bil padec kultivabilnosti v vseh vzorcih več kot 1 log stopnjo, v primeru stradanih celic iz eksponentne faze rasti pa kar 4,5 log stopnje.

4.6 UGOTAVLJANJE ODZIVA CELIC NA TOPLOTNI STRES PREKO ANALIZE TRANSKRIPTOMA – IZRAŽANJA GENOV *flaA* IN *groEL*

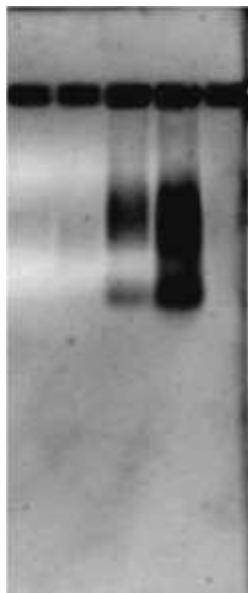
Z metodo obratnega prepisa ter verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) smo preiskovali izražanje izbranih genov *groEL*, *flaA* in 16S rRNA v osnovni kulturi bakterij *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti brez stresa ali dodatno izpostavljeni topotnemu stresu pri 55 °C za 3, 10, 20, 30 in 60 min. Gen *flaA* predstavlja virulentni gen, saj kodira zapis za biček, gen *groEL* pa smo izbrali kot stresni gen, saj sodeluje pri odgovoru kampilobakterjev na topotni stres in pod pogoji stradanja. Dodali smo še hišni gen 16S rRNA, katerega izražanje je, glede na literaturo, stabilno ne glede na okoljske pogoje. Pri vsakem izbranem genu je bila potrebna optimizacija metode PCR, predvsem časovni in temperaturni potek II. faze RT-PCR, torej pomnoževanja cDNA v reakciji PCR.

4.6.1 Optimizacija in potek metode RT-PCR

4.6.1.1 Priprava izolata RNK

Pri vseh celicah, izpostavljenim stradanju in naknadnemu topotnemu stresu, smo uspeli dobiti mRNK (slika 30). Pri osnovni kulturi, dodatno izpostavljeni topotnemu stresu pri 55 °C, mRNK na gelu nismo uspeli dobiti. RNK je izredno občutljiva molekula in je obstojna zelo kratek čas po uničenju celic, zato je zelo pomembno, da so reagenti za zaščito in denaturacijo v takojšnjem stiku z molekulom. Točnega razloga, zakaj mRNK nismo uspeli dobiti iz vzorcev osnovne kulture, ne poznamo. V literaturi se možne razlage lažno negativnih rezultatov nanašajo predvsem na inhibicijo reakcije PCR zaradi nečistoč in inhibitorjev, ki so lahko prisotni v vzorcih. Prisotnost krvi sesalcev v vzorcih je pogost vzrok inhibicije RT-PCR (Bustin in Nolan, 2004). Največji problem predstavljajo nestabilnosti RNK in morebitna prisotnost encima RNaze pri izolaciji RNK. V našem eksperimentu smo celotno izolacijo ter obdelavo RNK izvajali istočasno in enako za netretirano in stradano kulturo, izpostavljeno topotnemu stresu. Možna razlaga ostaja le v prisotnosti gojišča v netretirani kulturi, ki upočasni delovanje reagentov. Proizvajalci navajajo možne vzroke za neuspeh izolacije in poudarjajo, da morajo priti reagenti v stik s celično vsebino v trenutku lize celic (The Basics: RNA Isolation, 2008).

Da bi odkrili razlog za neuspeh izolacije mRNK in odpravili vzroke, bi lahko ponovili postopek izolacije, vendar smo se zaradi visokih cen reagentov v nadaljevanju usmerili le na rezultate stradane kulture.

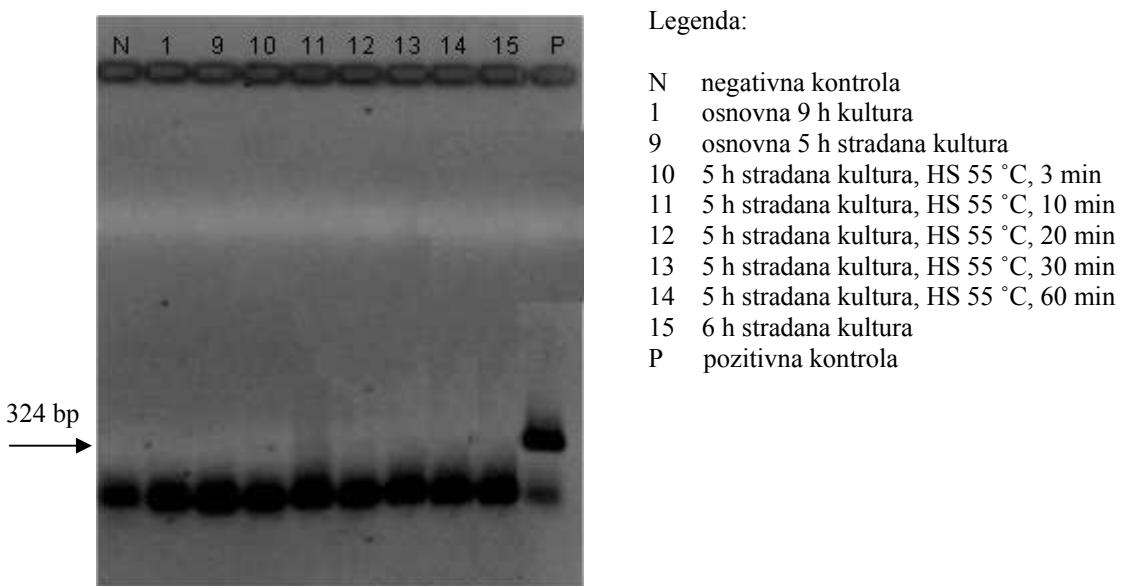


Slika 30: Primer prisotnosti ali odsotnosti mRNK po elektroforezi, izpeljani pod pogoji RNK

4.6.1.2 Izvedba PCR za določanje prisotnosti DNK v vzorcih RNK

Preverjanje učinkovitosti odstranjevanja vseh sledi DNK v 1 µL RNK je potekalo z reakcijo PCR volumna 25 µL in pomnoževanjem dela gena 16S rRNA po 40-ih ciklih.

Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi negativno kontrolo reakcije PCR, v kateri smo RNK nadomestili z vodo PCR in pozitivno kontrolo reakcije PCR, v katero smo dodali DNK bakterij *C. jejuni*.



Slika 31: Primer preverjanja učinkovitosti odstranjevanja DNA v vzorcu na primeru gena 16S rRNA

Na sliki 31 vidimo rezultat agarozne gelske elektroforeze pomnožkov dela 16S rRNA po reakciji PCR. Temne sledi pod oznakami od N do 15 so ostanki vzorca na gelu. Negativni rezultati za vse vzorce po 40-ih ciklih, razen za pozitivno kontrolo, potrjujejo, da smo uspešno odstranili vse ostanke DNA iz naših vzorcev. Na enak način smo preverjali prisotnost DNA tudi za ostale gene.

4.6.1.3 Optimizacija metode PCR

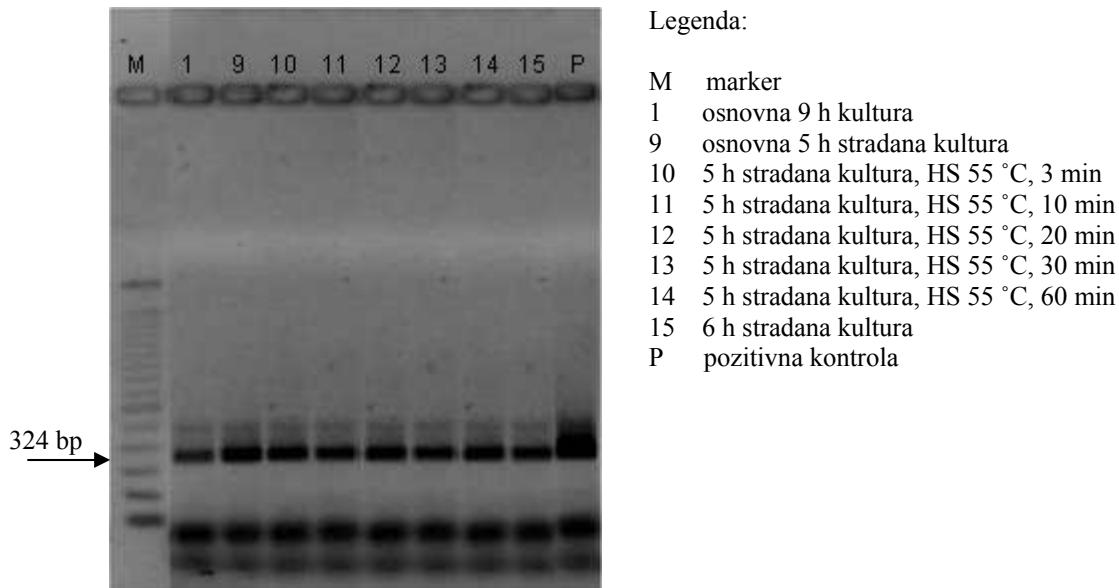
Pri optimizaciji metode PCR za spremljanje izražanja izbranih genov smo optimizirali temperaturo prileganja posameznih začetnih oligonukleotidov (55 ali 60 °C). Vidne razlike v intenziteti fragmentov pomnožkov DNK po gelski elektroforezi smo pridobili s spremnjanjem števila ciklov pomnoževanja (od 25 do 35 ciklov). V primeru odsotnosti fragmentov smo število ciklov povečali, če pa se fragmenti po intenziteti niso razlikovali, smo število ciklov zmanjšali in tako določili razlike v intenziteti fragmentov ter s tem v izražanju genov (preglednica 4).

Preglednica 4: Optimizacija temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov pri metodi RT-PCR

Gen	Pari začetnih oligonukleotidov	Izbrana temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov	Izbrano število ciklov pomnoževanja
<i>flaA</i>	Ffla1, Rfla1	60 °C	25
<i>groEL</i>	Fgro2, Rgro2	55 °C	35
16S rRNA	P16sAnja, PA	55 °C	25

4.6.2 Izražanje genov 16S rRNA, *flaA* in *groEL*

4.6.2.1 Izražanje gena 16S rRNA

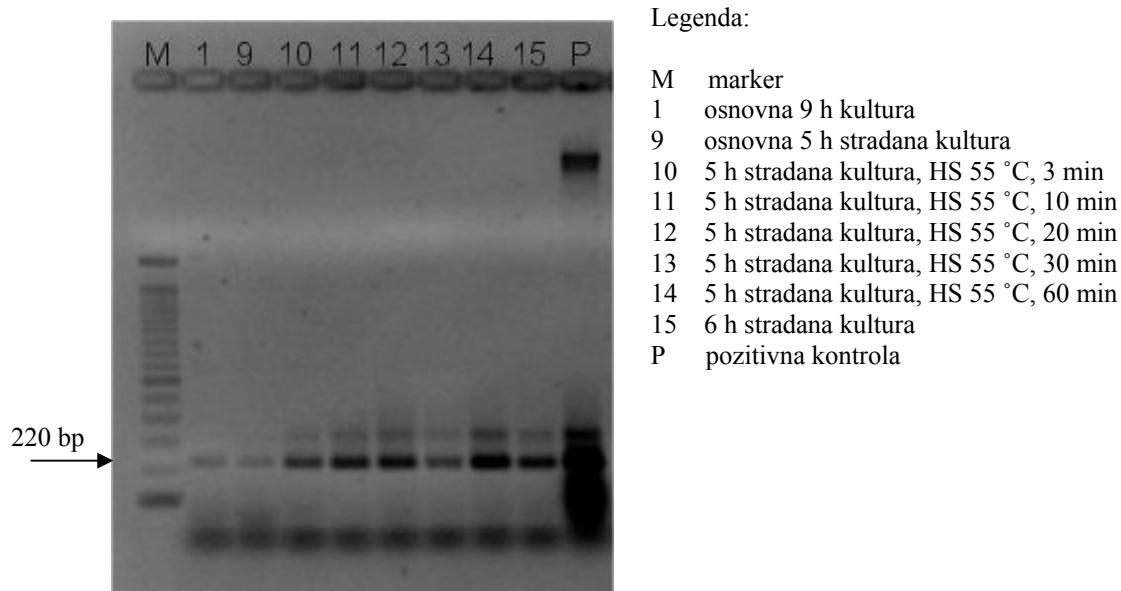


Slika 32: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RT-PCR gena 16S rRNA celic *C. jejuni* med inkubacijo pri različnih pogojih stresa

Pri genu 16S rRNA, ki je bil izbran kot hišni gen, se intenziteta fragmenta ni bistveno spremenjala (slika 32), zato ni bila potrebna normalizacija podatkov metode RT-PCR. Iz tega lahko zaključimo, da toplotni stres ni vplival na izražanje hišnega gena 16S rRNA.

4.6.2.2 Izražanje gena *flaA*

Po izvedbi celotnega postopka za določanje izražanja gena *flaA* smo dobili naslednjo sliko.

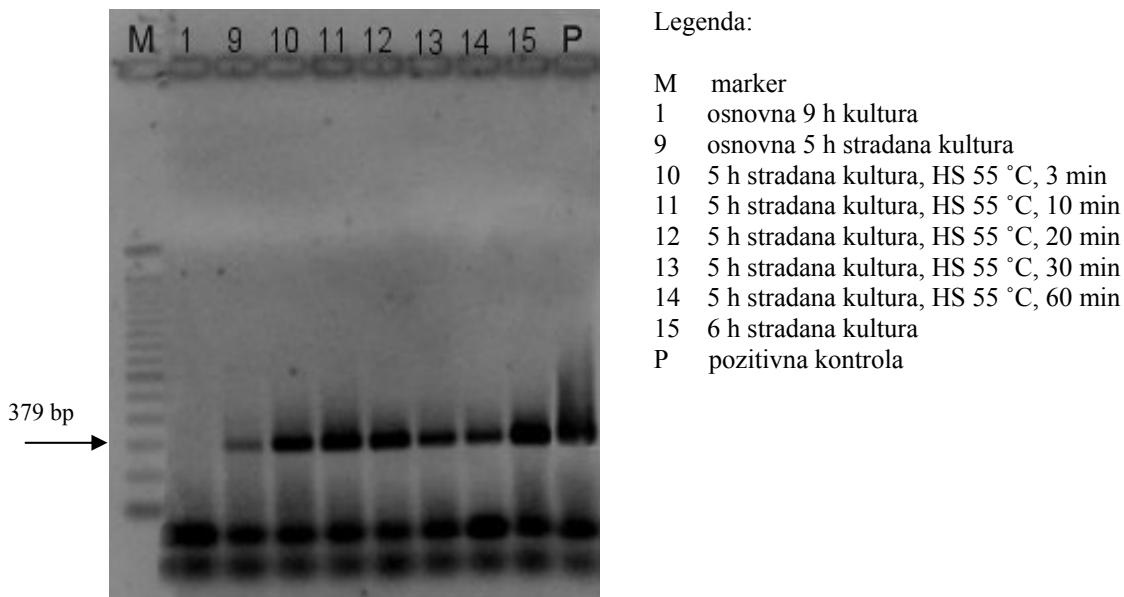


Slika 33: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RT-PCR gena *flaA* celic *C. jejuni* med inkubacijo pri različnih pogojih stresa

Na sliki 33 vidimo razlike v intenziteti fragmentov gena *flaA* pri različnih časih izpostavitve stresu. Rezultate smo ovrednotili in jih predstavili na grafu (glej sliko 35).

4.5.4.3 Izražanje gena *groEL*

Po celotnem postopku za določanje izražanja gena *groEL* smo dobili naslednjo sliko:



Slika 34: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RT-PCR gena *groEL* celic *C. jejuni* med inkubacijo pri različnih pogojih stresa.

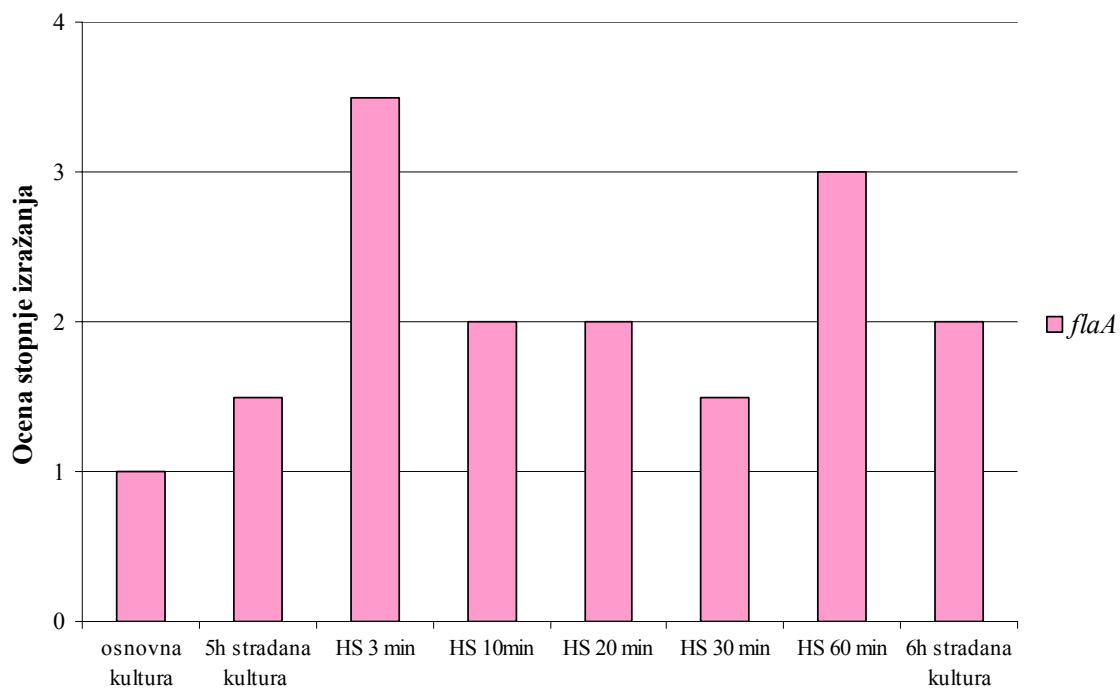
Pri izvedbi druge faze RT-PCR za gen *groEL* po 35 ciklih pomnoževanja intenziteta fragmentov še ni bila zadostna, zato smo uporabili zaporedni PCR (še dodatnih 30 ciklov pomnoževanja). Na sliki 34 vidimo razlike v intenziteti fragmentov po izvedbi zaporedne RT-PCR. Rezultate smo ovrednotili in predstavili na grafu (slika 36).

4.5.4.4 Ovrednotenje izražanja genov *flaA* in *groEL*

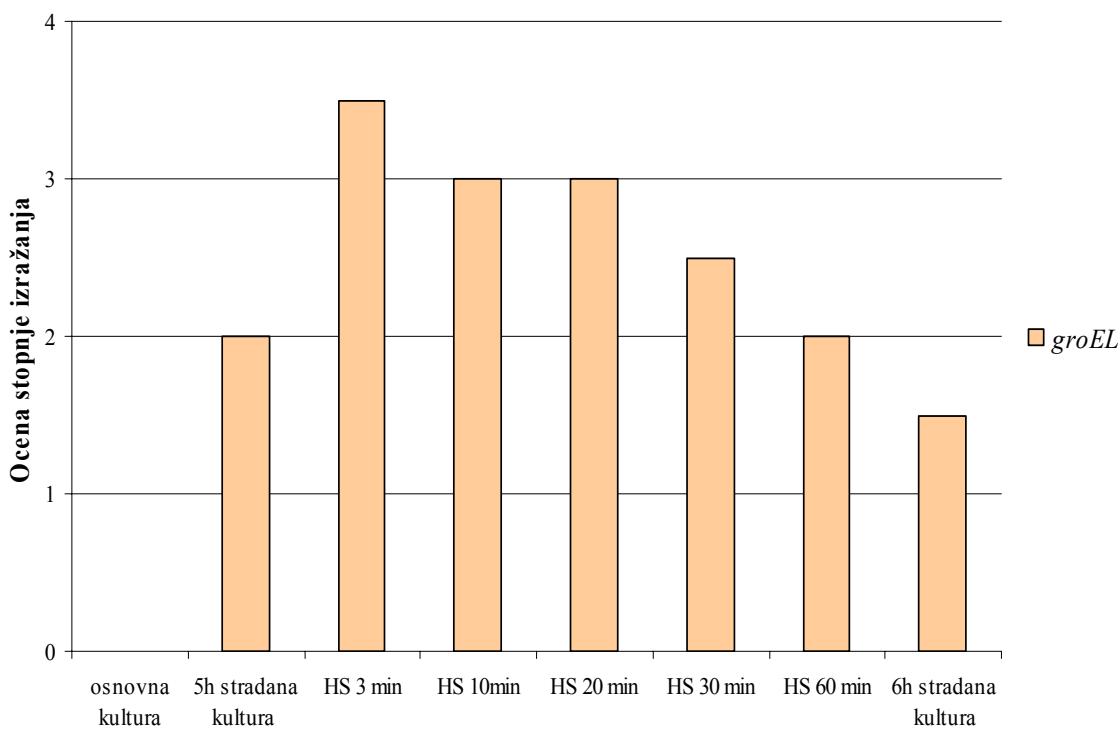
Po celotnem postopku izolacije RNK iz celic, izvedbi RT-PCR in elektroforezi dobljenih pomnožkov smo te fotografirali z aparaturo za dokumentiranje elektroforetskih gelov. Dobljene slike pomnožkov smo numerično ovrednotili, glede na intenzivnost sledi na gelu. Te vrednosti smo prenesli na grafa za lažje ovrednotenje izražanja genov.

Na slikah 35 in 36 so prikazane numerične vrednosti, katere smo dodelili pomnožkom genov *flaA* in *groEL*. Opaziti je razlike v izražanju obeh izbranih genov pri različnih časih izpostavitve stresu. V primeru gena *flaA* je bila po 3 in 60 min trajanja stresa stopnja izražanja najvišja. Pri ostalih časih trajanja stresa je bila stopnja izražanja dokaj izenačena vendar višja kot v vzorcu osnovne kulture.

Tudi v primeru gena *groEL* je bila stopnja izražanja najvišja po 3 min trajanja topotnega stresa. Tudi po 10 in 20 min trajanja stresa je opaziti večje izražanje izbranega gena.



Slika 35: Ocena izražanja gena *flaA* stradane kulture celic *C. jejuni* po toplotnem stresu pri 55 °C



Slika 36: Ocena izražanja gena *groEL* stradane kulture celic *C. jejuni* po toplotnem stresu pri 55 °C

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 TOPLITNI STRES PRI 48 °C

5.1.1 Živost, kokoidnost in kultivabilnost

Fiziologija po Gramu negativnih, nesporogenih bakterij *Campylobacter jejuni* je slabo poznana. Ti organizmi rastejo sorazmerno počasi tudi v optimalnih pogojih. Rastejo v temperaturnem območju med 30 °C in 45 °C in jih uvrščamo med organizme občutljive na visoke temperature. Različni sevi *C. jejuni* so različno občutljivi na topoto (Klančnik in sod., 2006; 2008). Ugotovili smo, da temperatura 48 °C ne predstavlja velikega šoka zanje. Sicer pa že 3 min stresa povzročijo zmanjšanje števila živih in kultivabilnih celic. Podaljšana izpostavitev stresu je pričakovano povzročila večje spremembe, vendar tudi po 60 minutah izpostavitve stresu je bilo v vseh vzorcih več kot 60 % živih celic.

V neugodnih razmerah lahko kampilobakterji prilagodijo njihov metabolism, da podaljšajo preživetje in omogočijo prenos od gostitelja do gostitelja. *C. jejuni* preidejo v stanje VBNC, katerega pogosto spremembu velikosti in morfologije celic – preidejo iz spiralne v kokoidno obliko (Harvey, 1998). Drugi avtorji pa so to teorijo zanikalni z dokazom prisotnosti spiralnih bacilov v populaciji celic v stanju VBNC. Na tvorbo kokov naj bi vplivali pogoji v okolju in morfologija seva (Hazeleger in sod., 1995). V našem poskusu sta bili za celice neugodni razmeri stradanje in izpostavljenost povišani temperaturi. Z daljšim časom izpostavitve osnovne kulture topotnemu stresu ni prišlo do bistvenih sprememb. Delež kokoidnih celic v preiskovanih vzorcih je z daljšo izpostavitvijo stresu le rahlo narasel (sliki 13 in 16).

Številni mikrobiologi, ki so delali raziskave na vzorcih vode, so poročali o razlikah v številu mikroorganizmov pri določanju le-tega s štetjem kultur na ploščah in z mikroskopskimi metodami. Njihovi rezultati so vodili do dokaza obstoja t.i. VBNC stanja. V splošnem velja, da v to stanje preidejo organizmi, ki so izpostavljeni neugodnim okoljskim razmeram. *Campylobacter jejuni* vstopi v stanje VBNC kot odgovor na stradanje (Cappelier in sod., 2000). Pri izpostavitvi nestradanih kultur stresu pri 48 °C je ostala kultivabilnost tudi po 60 min trajanja stresa skoraj nespremenjena. Drugače pa je bilo s kultivabilnostjo stradanih kultur, ki je po izpostavitvi topotnemu stresu močno padla (sliki 14 in 17). Visok delež živih celic v vzorcih stradanih kultur tudi po 60 min stresa in hkrati velik padec kultivabilnosti, nakazujejo na velik delež celic v stanju VBNC. Nizek delež kokov in majhen porast njihovega števila tudi po daljši izpostavitvi stresu pa dokazujejo, da so v stanju VBNC tako spiralne kot kokoidne celice in da prehod v to stanje ni povezan s spremembijo morfologije.

5.2 TOPLITNI STRES PRI 55 °C

5.2.1 Živost, kokoidnost in kultivabilnost

Za varno proizvodnjo hrane je izrednega pomena poznavanje toplotne odpornosti bakterij *Campylobacter* spp. Nekateri sevi *C. jejuni* so preživeli segrevanje pri 55 °C le 1 do 3 min oz. segrevanje pri 52 °C približno 10 min (Moore in Madden, 2000). Kot sta objavila Moore in Madden (2000) je vrednost D bakterij *C. coli* pri temperaturi 55,4 °C 89 s. Vendar so avtorji kot merilo živosti uporabili določanje števila kolonij na ploščah, torej kultivabilnost. V našem poskusu smo z metodo štetja celic, obarvanih z barvilkom LIVE/DEAD® BacLight™ pod fluorescentnim mikroskopom, določili žive celice tudi po 60 min inkubacije pri 55 °C. Eden od razlogov prisotnosti živih celic tudi po tako dolgi izpostavitvi visoki temperaturi je zaščitna vloga razgradnih produktov celic ter sestavin gojišča, ki so posledica visoke temperature in lahko obdajo celice ter tako preprečijo prehod topote. Nedavno so Murphy in sodelavci (2006) objavili zaščitni vpliv gojišč na preživelost bakterij *C. jejuni* in zaključili, da so eksperimenti, izvedeni v različnih gojiščih oz. medijih, težko primerljivi.

V našem poskusu je bil toplotni stres pri 55 °C za celice *Campylobacter jejuni* mnogo bolj letalen od stresa pri 48 °C. Že po 3 min izpostavitve stresu smo opazili izrazit padec živosti, ki je bil večji v primeru osnovnih kultur (sliki 18 in 21). Pri primerjavi padca živosti med osnovno in stradano kulturo smo ugotovili, da je bil padec manjši v primeru stradane kulture. Tudi po 60 min inkubacije je manjši padec živosti v primeru stradanih kultur.

Bakterije so izpostavljene stradanju, kadar izčrpajo zalogo limitirajočega hranila v danem okolju. *In vitro* stradanje sprožimo z odstranitvijo hranljivega gojišča. Med stradanjem preidejo bakterije v stanje nizke metabolne aktivnosti in razpoložljivo metabolno energijo usmerijo v iskanje hranil, sintezo razgradnih encimov, ki delujejo kot lovilci substrata, in v genetsko usmerjen prehod v odpornejša stanja. Prehod v stacionarno fazo rasti ali stanje VBNC spremljajo temeljite strukturne in fiziološke spremembe, predvsem na nivoju membranskih struktur. To prispeva k povečani odpornosti bakterij proti stradanju in temperaturnemu, oksidativnemu, ozmotskemu in kislinskemu stresu. Preživelost celic stradane kulture se ob dodatku kloramfenikola ni izrazito zmanjšala. Naši rezultati nasprotujejo rezultatom, do katerih so prišli Cappelier in sodelavci (2000), ki so ugotovili, da je bilo v 2 in 4 h stradanih vzorcih, katerim so dodali antibiotik kloramfenikol, za polovico manj preživelih bakterij, kot v vzorcih brez kloramfenikola. Tudi Matin (1992) navaja, da kloramfenikol prepreči sintezo proteinov, ki celico obvarujejo pred stresom.

Stradanje povzroči tudi spremembo morfologije celic – iz spiralaste oblike preidejo v obliko koka. Med stradanjem se zmanjša volumen celic in poveča njihova površina. Na ta način povečajo površino, preko katere komunicirajo z okoljem (Matin, 1992). Hazeleger in sod. (1995) navajajo, da dodatek kloramfenikola ne vpliva na večjo tvorbo kokov. To potrjujejo tudi naši rezultati. Na slikah 19 in 22 so prikazani deleži kokov v vzorcih kultur po izpostavitvi stresu. Na njih vidimo, da je delež kokov približno enak v vzorcih z dodanim kloramfenikolom in brez njega. Delež kokov v vzorcih osnovnih kultur ne preseže 20 % niti po daljši izpostavitvi toplotnemu stresu. Ti rezultati potrjujejo

predpostavko, da stradanje povzroči spremembe morfologije celic. Daljši čas izpostavitve toplotnemu stresu pa ne izzove izrazitega porasta prehoda celic v kokoidno obliko, razen v primeru stradane kulture iz eksponentne faze rasti (slika 19).

Temperature pomembno vplivajo na zmanjšano kultivabilnost celic (Medema in sod., 1992). Kultivabilnost je definirana kot sposobnost celic, da se namnožijo v populaciji, ki jo opazovalec zazna (Bogosian in Bourneuf, 2001). Kultivabilnost smo določali z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču po inkubaciji pri optimalnih pogojih rasti. Rezultati so zbrani v preglednicah 6 in 7 ter na slikah 20 in 23. Kultivabilnost celic je močno padla že po kratkotrajni izpostavitvi stresu. Opazna je boljša kultivabilnost nestradanih celic. Razlog za to je lahko zaščitni vpliv razgradnih produktov sestavin gojišča in celic pri izpostavitvi visoki temperaturi. V vzorcih stradanih kultur je gojišče odstranjeno, zato omenjeni razgradni produkti ne morejo nastati.

Kot že omenjeno, ostanejo celice *C. jejuni* žive tudi po daljši izpostavitvi temperaturi 55 °C. Nekoliko drugače pa je s stopnjo kultivabilnosti celic. Kultivabilnost se že po 3 min inkubacije naglo zmanjša in se po 10 min še dodatno zmanjša. Razlika me deležem živih in kultivabilnih celic kaže na prehod v stanje VBNC. V primeru osnovne kulture so celice v stanju VBNC, tako kokoidne kot spiralne oblike. To potrjuje nizek delež kokov. V primeru stradane kulture pa je delež kokov izrazito višji. Manjši padec živosti stradane kulture in hkrati visok delež kokov nakazuje, da je oblika koka odpornejša.

5.3 PRIMERJAVA REZULTATOV IZ OBEH RASTNIH FAZ

Parkhill s sod. (2000), Kelly s sod. (2001) in Park (2002) navajajo, da so celice *C. jejuni* iz eksponentne faze bolj odporne proti stresu kot celice iz stacionarne faze rasti. Splošen stresni odziv je v številnih po Gramu negativnih bakterijah (npr. *E. coli*) reguliran z alternativnimi sigma dejavniki (σ^S oz. σ^E , σ^N in σ^B). Kampilobakterji nimajo sigma dejavnika σ^S , ki je ključnega pomena za preživetje celic v stacionarni fazi rasti in pri izpostavljenosti različnim stresom (Parkhill in sod., 2000). Po izpostavitvi stresu pri 48 °C so bili deleži preživelih celic po izpostavitvi toplotnemu stresu iz obeh rastnih faz zelo izenačeni in le rahlo višji v primeru celic iz eksponentne faze rasti (slika 24). Rezultatov za 60 minutno izpostavitev stresu ne moremo primerjati zaradi napake pri vzorčenju osnovne kulture iz stacionarne faze rasti. Naši rezultati samo nakazujejo na boljšo odpornost celic iz eksponentne faze rasti.

Pri izvedbi poskusa pri 55 °C smo opazili, da je bila v primeru nestradanih kultur odpornejša kultura iz stacionarne faze rasti in tudi padec živosti je bil manjši (slika 25). V primeru stradanih kultur pa je bila boljša preživelost celic iz eksponentne faze rasti do trajanja stresa 30 min. Pri daljšem času izpostavitve stresu pa je delež živih celic višji v vzorcu celic iz stacionarne faze rasti.

Z daljšim časom izpostavitve osnovne kulture stresu pri 48 °C ni prišlo do bistvenih sprememb morfologije ne glede na rastno fazo. Opazili smo značilno večji delež kokov v vzorcih stradane kulture iz eksponentne faze rasti. Tudi pri poskusu pri 55 °C je bil delež kokov izrazito večji v primeru stradane kulture iz eksponentne faze rasti (slika 27). Delež

kokov nestradih kultur iz obeh faz je bil manjši in se je nekoliko povečal po dolgotrajni izpostavitvi toplotnemu stresu. Večji delež kokoidnih celic iz eksponentne faze rasti je lahko vzrok za boljšo odpornost na stres v primerjavi s celicami iz stacionarne faze. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami Kelly in sod. (2001), da je pri *C. jejuni* odsoten klasični fenotipski odziv v stacionarni fazi rasti, ki je značilen za ostale črevesne bakterije.

Kultivabilnosti celic iz obeh rastnih faz, izpostavljenih stresu pri 48°C, je ostala v primeru osnovnih kultur skoraj nespremenjena tudi po 1 uri trajanja stresa. Nestradiane celice pa so bile slabše kultivabilne, vendar je stradana kultura iz eksponentne faze rasti ohranila boljšo kultivabilnost (slika 28). Dejstvo, da je bil delež živih celic v vzorcih 5 h stradanih kultur iz obeh rastnih tudi po 60 min stresa višji od 60 % (slika 24), kultivabilnost pa je padla za kar 4 log stopnje (slika 28), nakazuje na velik delež celic v stanju VBNC.

Rezultati, zbrani po izpostavitvi celic stresu pri 55 °C, so bili nekoliko drugačni. Temperatura 55 °C ima bolj uničujoč učinek na celice, zato se je kultivabilnost vseh vzorcev zmanjšala že po 3 min trajanja stresa. Po 10 min trajanja stresa so ohranile boljšo kultivabilnost nestradiane celice iz stacionarne faze rasti, pri daljšem času trajanja stresa pa so bile bolje kultivabilne nestradiane celice iz eksponentne faze rasti. V primeru stradanih kultur pa je bila boljša kultivabilnost celic iz stacionarne faze rasti.

5.4 UGOTAVLJANJE ODZIVA CELIC NA TOPLOTNI STRES PREKO ANALIZE TRANSKRIPTOMA – IZRAŽANJA GENOV *flaA* IN *groEL*

Celice se prilagodijo na stresne pogoje preko izražanja genov, kateri so lahko vključeni v obrambne mehanizme, sintezo novih proteinov in spremembo encimske aktivnosti. Te spremembe se lahko odrazijo na različne načine. Lahko se prilagodi celični metabolizem, vzdržuje se homeostaza, zmanjša se reprodukcija, zmanjša se nivo nukleinskih kislin, spremeni se velikost celic in prehajajo v odpornejše fiziološke oblike (Youslef in Courtney, 2003). Prokariontski organizmi imajo skupen regulatorni mehanizem, ki vključuje modifikacijo centralnega regulatorja izražanja genov in se imenuje sigma dejavnik (σ). Ta z vezavo spremeni specifično promotorsko prepoznavnost polimeraze RNK in tako omogoči prepis DNK v RNK in izražanje genov (Madigan in sod., 2000).

5.4.1 Optimizacija in potek metode RT-PCR

Za pomnoževanje z metodo PCR naj bi bila zadostna že majhna količina specifične mRNK, vendar obstaja nekaj glavnih omejitvev: izolacija zadostne količine nepoškodovane mRNK iz manjšega števila bakterij, pomanjkanje informacij glede pomembnosti kvantitativnega določanja mRNK iz celic, izpostavljenih stresu (Sheridan in sod., 1998) in dovolj natančna kvantifikacija. Za naš poskus je bila potrebna optimizacija metode RT-PCR, da so bile vidne razlike v intenziteti fragmentov pomnožkov DNA po elektroforezi. Optimizirali smo temperaturo prileganja posameznih začetnih oligonukleotidov in število ciklov pomnoževanja za posamezne gene. Kot pričakovano je bil hišni gen 16S rRNA prisoten že v kulturi brez stresov in njegovo izražanje ni bilo odvisno od toplotnega stresa. Tudi za gen *flaA* smo dobili zadostno količino fragmentov po 25 ciklih pomnoževanja in smo lahko

določili vpliv toplotnega stresa na njegovo izražanje. V primeru gena *groEL* pa po prvih 35 ciklih pomnoževanja nismo dobili zadostne količine fragmentov, zato smo nadaljevali z zaporednim PCR in nato dobili dovolj intenzivne fragmente za preučevanje vpliva stresa na izražanje.

5.4.2 Izražanje genov *flaA* in *groEL*

Gen *flaA* kodira beljakovino flagelin, ki je glavni sestavni del bičkov, kateri omogočajo gibljivost *C. jejuni* (Niehus in sod., 2002). GroEL pa je poleg GroES, DnaJ, DnaK in Lon eden izmed proteinov toplotnega stresa, ki so jih dokazali pri *C. jejuni* po izpostavitvi toplotnemu stresu (Konkel in sod., 1998). Skupaj z GroES delujeta kot molekularni šaperon, kateri preprečuje napačno zvijanje in kopiranje razgrajenih beljakovin (Thies in sod., 1999).

V našem poskusu smo raziskovali izražanje genov *flaA* in *groEL* v osnovni kulturi, 5 h stradani kulturi in 5 h stradani kulturi pri različnih časih inkubacije pri 55 °C. Za vsak gen je bilo potrebno optimizirati časovni in temperaturni potek metode PCR. Rezultati za osnovno kulturo niso prikazani, ker v vzorcih osnovne kulture nismo uspeli dobiti mRNK. Največji problem pri izolaciji RNK predstavlja nestabilnost molekule RNK in morebitna prisotnost encima RNaze med samim postopkom. Ker smo v našem poskusu celotno izolacijo in obdelavo RNK izvajali istočasno in po enakem postopku, tako za osnovno kot za stradano kulturo, ostaja edina možna razloga za neuspeh prisotnosti gojišča v osnovni kulturi. Bustin in Nolan (2004) navajata kot možne razloge za inhibicijo reakcije PCR razne inhibitorje in nečistoče, ki so lahko v preiskovanih vzorcih. Kot znan vir inhibitorjev navajata kri sesalcev. Ta je bila dodana tekočemu gojišču Preston v našem poskusu. V nadaljevanju smo se usmerili le na rezultate stradane kulture.

Rezultate agarozne gelske elektroforeze pomnožkov RT-PCR gena *flaA* vidimo na sliki 33, pomnožke gena *groEL* pa na sliki 34. Dobljene slike pomnožkov smo numerično ovrednotili in dobljene vrednosti prenesli na grafa (sliki 35 in 36). Opazili smo razlike v nivoju izražanja genov pri različnih pogojih stresa. Za gen *flaA* je nivo izražanja zelo izenačen pri različnih časih inkubacije pri 55 °C. Nekoliko višja stopnja izražanja je bila vidna pri trajanju stresa 3 min. Za gen *flaA* lahko rečemo, da so vidne razlike na nivoju izražanja gena. Izražanje virulentnega gena *flaA* je lahko problem pri virulenci *C. jejuni*. Ker smo opazili razlike v izražanju gena, to lahko pomeni, da se po izpostavitvi toplotnemu stresu spremeni tudi virulence bakterij in bi te lahko pridobile boljše adhezivne in invazivne lastnosti. To bi lahko predstavljalo večjo nevarnost za uporabnike, ki zaužijejo hrano kontaminirano s *C. jejuni*, katera je bila predhodno toplotno obdelana, saj se srečajo z bolj virulentnimi bakterijami. Te predpostavke bi bilo potrebno potrditi z znanstvenimi dokazi in iskanje le-teh je lahko predmet novih raziskav.

V primeru stresnega gena *groEL* smo prav tako opazili razlike v stopnji izražanja pri različnih pogojih stresa. V tem primeru je bila intenziteta fragmentov večja, vendar moramo upoštevati, da je bilo število ciklov pomnoževanja večje kot za *flaA*. V vzorcu osnovne kulture brez stresa ni prišlo do transkripcije gena. Tako kot za gen *flaA* je bil nivo izražanja izenačen po 10 in 20 min trajanja toplotnega stresa. Največji je bil po 3 minutah

trajanja stresa. Tudi v tem primeru lahko rečemo, da so vidne razlike na nivoju izražanja gena. Razlike v izražanju stresnega gena so lahko pomembne tudi v živilski industriji, saj se pri proizvodnji hrane pogosto uporablja termična obdelava. Če je ta neustrezna, lahko dobimo v izdelkih bolj odporne organizme, ki predstavljajo večjo nevarnost za potrošnike.

Razlike pri različnih pogojih stresa so bile vidne, vendar niso bile zelo izrazite. Kot boljšo metodo za spremljanje izražanja genov na nivoju mRNK bi lahko izbrali metodo PCR v realnem času.

5.5 SKLEPI

- Toplotni stres vpliva na spremembo morfologije, kultivabilnosti in živosti celic *Campylobacter jejuni*. Rezultati kažejo, da je prehod v kokoidno obliko večji v primeru stradanih kultur izpostavljenih temperaturi 55 °C. Kultivabilnost se zmanjša z daljšim časom izpostavitve temperaturi 48 °C v primeru stradanih kultur iz obeh rastnih faz. Pri izpostavitvi temperaturi 55 °C pade kultivabilnost vseh kultur. Delež živih celic se zmanjuje z daljšim časom izpostavljenosti stresu pri 55 °C. Iz rezultatov spremeljanja kultivabilnosti in živosti je razvidno, da se med izpostavljanjem toplotnemu stresu pojavi skupina celic, ki so žive, vendar nekultivabilne.
- Predstres stradanja ugodno vpliva na povečanje odpornosti celic *C. jejuni* proti toplotnemu stresu. Stradane kulture so bolje prenesle izpostavitev toplotnemu stresu. Pri krajšema času izpostavitve celic stresu pri 55 °C je bil padec živosti nekoliko manjši v vzorcih predhodno stradanih celic.
- Odpornost na toplotni stres in morfologija celic je odvisna od faze rasti celic *C. jejuni*. Naši rezultati kažejo, da je boljša odpornost celic iz eksponentne faze rasti. Predhodna izpostavitev stradanju še poveča odpornost celic na toplotni stres. Prehod celic v kokoidno obliko se je nekoliko povečal pri stradanih celicah iz eksponentne faze rasti pri izpostavitvi stresu pri 55 °C.
- Izrazito zmanjšanje kultivabilnosti in večji padec deleža živih celic po izpostavitvi stresu pri 55 °C dokazuje, da ima ta temperatura bolj uničujoč učinek na celice *C. jejuni* kot toplotni stres pri 48 °C.
- Razlike na nivoju izražanja genov nakazujejo vpliv toplotnega stresa na izražanje virulentnega gena *flaA* in stresnega gena *groEL* pri različnih pogojih toplotnega stresa.

6 POVZETEK

Bakterije *Campylobacter jejuni* so ene izmed najpogostejevih povzročiteljev mikrobnih okužb s hrano pri človeku. Največkrat pride do njihovega vnosa v gostiteljevo telo z uživanjem kontaminirane hrane, predvsem neustreznih obdelan perutnine. Čeprav *C. jejuni* ni sposoben razmnoževanja v živilu, lahko preživi v zadostnem številu, da povzroči obolenja pri ljudeh. Pride lahko tudi do navzkrižne kontaminacije živil oz. do prenosa bakterij iz topotno neobdelanih surovin na druga živila med pripravo hrane.

Med tehnološko obdelavo hrane, skladiščenjem, hranjenjem in distribucijo živil so bakterije pogosto izpostavljene neugodnim pogojem, predvsem pomanjkanju hranil, nizkim in visokim temperaturam in oksidativnemu stresu. Preživetje in prilagoditev bakterijskih celic na pomanjkanje hranil lahko pomembno vpliva na povečanje odpornosti proti visokim temperaturam.

Kampilobakterji v razmerah topotnega stresa sintetizirajo niz proteinov topotnega stresa, ki delujejo kot šaperoni ali proteaze in omogočajo prilagoditev celice in njeno preživetje. Ob pomanjkanju zadostne količine hranil preidejo celice v odpornejša stanja in sintetizirajo proteine stradanja, kateri prav tako omogočajo prilagoditev celic in povečajo odpornost proti drugim stresom.

Namen našega dela je bil ugotoviti vpliv topotnega stresa pri 48 in 55 °C na spremembe morfologije, kultivabilnosti in živosti celic *Campylobacter jejuni* iz različnih faz rasti. Ugotovili smo, da pod neugodnimi pogoji celice *C. jejuni* preidejo iz spiralne v kokoidno obliko in izgubijo kultivabilnost. Celice, izpostavljene topotnemu stresu, so dlje ohranile živost kot kultivabilnost. Iz razlik med deleži kultivabilnih in živilih celic lahko sklepamo, da preidejo v stanje VBNC. Naši rezultati kažejo tudi, da izguba kultivabilnosti ni nujno povezana s prehodom v kokoidno obliko. Predhodna izpostavitev stradanju izzove sintezo proteinov stradanja, ki omogočajo prilagoditev in preživetje celic in boljšo odpornost proti topotnemu stresu. Stradanie izzove tudi prehod iz spiralne v kokoidno obliko. Ugotovili smo tudi, da zaradi odsotnosti homologa RpoS, ki omogoča celicam boljše preživetje celic v stacionarni fazi pri izpostavitvi stresom, so celice *C. jejuni* bolj odporne na topotni stres v eksponentni fazni rasti.

Poleg ugotavljanja spremembe morfologije, kultivabilnosti in preživelosti celic *C. jejuni*, smo raziskovali tudi vpliv topotnega stresa na izražanje genov *groEL* in *flaA*. Z izbrano metodo obratnega prepisa in verižne reakcije s polimerazo smo potrditi pričakovani vpliv topotnega stresa na izražanje izbranih genov.

Izpostavitev topotnemu stresu vpliva na spremembo morfologije, kultivabilnosti in preživelosti celic *C. jejuni* v razmerah topotnega stresa. Pomembno je tudi, da se predhodno stradana kultura prilagodi na dodatne strese s prehodom v bolj odporno stanje. Navzkrižna odpornost, ki se razvije zaradi pomanjkanja hranil, je zelo pomembna v živilski industriji, ker so mikroorganizmi v tehnološkem procesu priprave hrane pogosto izpostavljeni podobnim razmeram.

7 VIRI

Abee T., Wouters J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. International Journal of Food Microbiology, 50: 65-91

Bogosian G., Bourneuf E. V. 2001. A matter of bacterial life and death. European Molecular Biology Organization Reports, 21, 91: 770-774

Breeuwer P., Abee T. 2000. Assessemnt of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. International Journal of Food Microbiology, 55: 193-200

Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25: 169-193

Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29: 23-39

Bustin S. A., Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Journal of Biomolecular Techniques, 15: 155-166

Cappelier J.M., Minet J., Magras C., Colwell R.R., Federighi M. 1999. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5154–5157.

Cappelier J.M., Rossero A., Federighi M. 2000. Demonstration of a protein synthesis in starved *Campylobacter jejuni* cells. International Journal of Food Microbiology, 55: 63-67

Colwell R.R. 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. Journal of Infection and Chemotherapy, 6: 121-125

Crushell E., Harty S., Sharif F., Bourke B. 2004. Enteric *Campylobacter*: Puring its secrets? Pediatric Research, 55, 1: 3-12

da Silva A.C.A., Simão R.C.G., Susin M.F., Baldini R.L., Avedissian M., Gomes S.L. 2003. Downregulation of the heat shock response is independent of DnaK and σ^{32} levels in *Caulobacter crescentus*. Molecular Microbiology, 49, 2: 541-553

Day W.A., Sajecki J.L., Pitts T.M., Joens L.A. 2000. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. Infection Immunology, 68: 6337-6345

Epidemiološko spremeljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2006. 2007. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije.

http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko_spremljanje_NB_2006.pdf (30.1.2008): 89 str.

Feder M.E., Hofmann G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, 61: 243-282

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology, 30: 503-512

Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods, 25: 386-401

Gubina M., Železnik Z., Mehle J., Zajc-Satler J., Dragaš A.Z. 1982. Enterotoxin activity of *Campylobacter* species. V: *Campylobacter-epidemiology, pathogenesis and biochemistry*. Newell D.G. (ed.). Lancher, Boston, The Hague, MTP Press Limited, International Medical Publisher: 188-195

Harvey P., Leach S. 1998. Analysis of coccal cell formation by *Campylobacter jejuni* using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress. Journal of Applied Microbiology, 85: 398-404

Hazeleger W.C., Janse J.D., Koenraad P. M. F. J., Beumer R.R., Rombouts F.M., Abbe T. 1995. Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 7: 2713-2719

Hofreuter D., Tsai J., Watson R.O., Novik V., Altman B., Benitez M., Clark C., Perbost C., Jarvie T., Du L., Galán J.E. 2006. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. Infection and Immunity, 74: 4694-4707

ISO 4833. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms - colony count technique at 30 °C. 1991: 5 str.

Joux F., Lebaron P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microbes and Infection, 2: 1523-1535

Keer J.T., Birch L. 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability.

Journal of Microbiological Methods, 53: 175-183

Kelly A.F., Park S.F., Bovill R., Mackey B.M. May 2001. Survival of *C. jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. Applied and Environmental Microbiology, 2248-2254

Ketley J. M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. Microbiology, 143: 5-21

Klančnik A. 2004. *Campylobacter jejuni*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: camp HS 48 deg 60min 10 25000x aa.jpg, camp 5h strad HS 48 deg 3min 4.jpg, kultura 20 15 ur 100x.jpg

Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 135 str.

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

Klančnik A., Zorman T., Smole Možina S. 2008. Effects of low temperature, starvation and oxidative stress on the physiology of *Campylobacter jejuni* cells. Croatica Chemica Acta, 81: 41-46

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

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

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

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

Molecular Probes. 2003. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. Product information: Leiden, Molecular Probes: 8 str.

Moore J.E. 2001. Bacterial dormancy in *Campylobacter*: abstract theory or cause for concern? International Journal of Food Science and Technology, 36, 6: 593-600

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

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

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

Nachamkin I., Allons B.M., Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. Clinical Microbiology Reviews, 11, 3: 555-567

Niehus E., Ye F., Suerbaum S., Josenhans C. 2002. Growth phase-dependent and differential transcriptional control of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. Microbiology, 148: 3827-3837

Nørrung B., Bunčič S. 2008. Microbial safety of meat in the European Union. Meat Science, 78: 14-24

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

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

Park S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 74: 177-188

Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallens M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M-A., Rutherford K.M., van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature, 403: 665-668

Pesci E.C., Cottle D.L., Pickett C.L. 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity, 62: 2687-2694

Petersen L., Larsen T.S., Ussery D.W., On S.L., Krogh A. 2003. *RpoD* promoters in *Campylobacter jejuni* exhibit a strong periodic signal instead of a -35 box. *Journal of Molecular Biology*, 326: 1361-1372

Pichereau V., Hartke A., Auffray Y. 2000. Starvation and osmotic stress induced multiresistances influence and extracellular compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 19-25

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

Rubeša Mihaljević R., Sikic M., Klančnik A., Brumini G., Smole Možina S., Abram M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43: 120-125

Sails A.D., Bolton F.J., Fox A.J., Wareing D.R.A., Greenway D.L.A. 1998. A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. *Molecular and Cellular Probes*, 12: 317-322

Sheridan G.E.C., Masters C.I., Shallcross J.A., Mackey B.M., 1998. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4: 1313-1318

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

Smole Možina S., Zorman T., Uzunović-Kamberović S., 2004. The prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in retail poultry meat. V: 2nd Central European Congress on Food, 26-28 April 2004. Budapest, Hungary. CEFood Congress. Programme and book of abstracts: safety, nutrition, technology, consumers. Budapest, Central Food Research Institute: Complex Committee on Food Sciences of the Hungarian Academy of Sciences: 61, O-35

Solomon E.B., Hoover D.G. 1999. *Campylobacter jejuni*: A bacterial paradox. *Journal of Food Safety*, 19: 121-136

The Basics: RNA Isolation. 2008. Foster City, Applied Biosystems.
<http://www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html> (13. mar. 2008): 9 strani

Thies F.L., Weishaupt A., Karch H., Hartung H-P., Giegerich G. 1999. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *Campylobacter jejuni* *groESL* bicistronic

operon. *Microbiology*, 145: 89-98

Tholozan J.L., Cappelier J.M., Tissier J.P., Delattre G., Federighi M. 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3: 1110-1116

Uzunović-Kamberović S., Zorman T., Heyndrickx M., Smole Možina S. 2004. Epidemiological relatedness among *C. jejuni* and *C. coli* PFGE genotypes from different sources. *International Journal of Infectious Diseases*, 8, Suppl. 1: S188-S188, 59.003

Wassenaar T.M., Blaser M.J. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, 1: 1023-1033

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

Youself, A.E., Courtney, P.D. 2003. Basic of stress adaptation and implications in new-generation foods. V: *Microbial stress adaptation and food safety*. Youself A.E., Juneja V.K. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 1-30

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

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za strokovne nasvete, kritične pripombe, napotke, vzpodbudo in potrpežljivost pri izdelavi diplomskega dela.

Posebej hvala somentorici dr. Anji Klančnik za vso pomoč, strokovno vodenje, pripombe in napotke tako pri eksperimentalnem delu kot pri izdelavi diplomskega dela. Hvala tudi za čas, ki ga je z mano delila pri izdelavi te naloge in za vso moralno podporo ter vzpodbudne besede.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Davidu Stoparju za strokovne nasvete in kritične pripombe pri pregledovanju diplomskega dela.

Za pomoč in sodelovanje pri eksperimentalnem delu se zahvaljujem sodelavcem Katedre za živilsko mikrobiologijo, še posebej Mariji Kurinčič in Jani Avbelj.

Za lektoriranje naloge se lepo zahvaljujem Zali Ožbolt.

Zahvaljujem se tudi mojim sodelavcem in nadrejenim v družbi AstraZeneca za potrpežljivost in proste dni, ki sem jih potrebovala za izdelavo diplomskega dela.

Posebna zahvala gre mojim staršem in sestri za vso podporo in vzpodbudo skozi vsa leta študija. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so me vedno vzpodbjali in podpirali.

Hvala tudi vsem neimenovanim, ki ste mi kakorkoli pomagali.

PRILOGE

Priloga A: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 48 °C

Pogoji inkubacije in stresa	Živost (%)	Kokoidnost (%)	Kultivabilnost (log CFU/mL)
osnovna kultura	95,2	9,0	8,0
toplotni stres 3 min	91,1	12,4	7,9
toplotni stres 20 min	85,0	12,4	7,9
toplotni stres 60 min	71,6	20,6	7,9
5 h stradana kultura	84,4	16,3	7,6
toplotni stres 3 min	80,4	20,8	7,6
toplotni stres 20 min	65,9	21,9	6,5
toplotni stres 60 min	62,0	22,7	2,9
5 h stradana kultura + KF	87,1	15,0	7,9
toplotni stres 3 min	84,3	18,2	7,8
toplotni stres 20 min	65,6	21,5	6,9
toplotni stres 60 min	56,0	13,8	4,7

Legenda: KF: kloramfenikol

Priloga B: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 48 °C

Pogoji inkubacije in stresa	Živost (%)	Kokoidnost (%)	Kultivabilnost (log CFU/mL)
osnovna kultura	97,1	14,9	8,8
toplotni stres 3 min	91,3	10,7	8,7
toplotni stres 20 min	84,1	8,9	8,7
toplotni stres 60 min	92,5	10,5	8,7
5 h stradana kultura	83,4	13,7	8,5
toplotni stres 3 min	82,6	14,5	7,3
toplotni stres 20 min	63,3	8,5	4,0
toplotni stres 60 min	60,3	14,4	4,0
5 h stradana kultura + KF	80,7	6,9	6,9
toplotni stres 3 min	86,0	15,5	6,7
toplotni stres 20 min	73,8	13,0	4,0
toplotni stres 60 min	62,4	11,4	4,0

Priloga C: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic *C. jejuni* iz eksponentne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 55 °C

Pogoji inkubacije in stresa	Živost (%)	Kokoidnost (%)	Kultivabilnost (log CFU/mL)
osnovna kultura	98,8	2,2	8,3
toplotni stres 3 min	62,1	7,4	6,5
toplotni stres 10 min	52,8	9,9	3,4
toplotni stres 20 min	34,8	5,0	4,5
toplotni stres 30 min	26,6	13,3	4,1
toplotni stres 60 min	20,3	10,0	2,0
5 h stradana kultura	79,4	26,8	6,5
toplotni stres 3 min	66,4	22,8	2,0
toplotni stres 10 min	48,6	33,3	1,0
toplotni stres 20 min	35,7	47,7	1,0
toplotni stres 30 min	20,5	28,0	1,0
toplotni stres 60 min	7,0	50,3	3,6
5 h stradana kultura + KF	82,1	24,3	7,9
toplotni stres 3 min	59,1	31,7	4,7
toplotni stres 10 min	44,0	34,7	1,0
toplotni stres 20 min	32,0	31,0	1,0
toplotni stres 30 min	18,9	42,7	1,0
toplotni stres 60 min	5,2	65,9	3,3

Priloga D: Povprečne vrednosti živosti (%), kokoidnosti (%) in kultivabilnosti (log CFU/mL) celic *C. jejuni* iz stacionarne faze rasti pri različnih pogojih inkubacije in različnih časih trajanja stresa pri temperaturi 55 °C

Pogoji inkubacije in stresa	Živost (%)	Kokoidnost (%)	Kultivabilnost (log CFU/mL)
osnovna kultura	96,3	4,8	8,6
toplotni stres 3 min	68,2	5,2	6,7
toplotni stres 10 min	53,1	6,5	4,6
toplotni stres 20 min	47,3	5,9	3,7
toplotni stres 30 min	37,9	10,3	3,1
toplotni stres 60 min	27,5	17,6	2,0
5 h stradana kultura	72,3	21,2	7,8
toplotni stres 3 min	46,7	29,2	4,7
toplotni stres 10 min	46,6	19,2	4,2
toplotni stres 20 min	33,9	19,2	2,3
toplotni stres 30 min	31,2	15,7	1,0
toplotni stres 60 min	13,3	26,1	1,0
5 h stradana kultura + KF	70,3	22,3	7,7
toplotni stres 3 min	59,3	21,0	4,7
toplotni stres 10 min	34,8	18,9	3,7
toplotni stres 20 min	23,5	15,5	2,9
toplotni stres 30 min	21,1	18,8	1,9
toplotni stres 60 min	8,8	25,6	0,0