

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Živa KOROŠEC

VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA BAKTERIJE
***Campylobacter jejuni* NCTC 11168 IN IZBRANE**
MUTANTE

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Živa KOROŠEC

VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA BAKTERIJE *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 IN IZBRANE MUTANTE

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 AND SELECTED MUTANTS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Katedri za elektronsko mikroskopijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina, za somentorico dr. Anja Klančnik in za recenzentko doc. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Somentorica: dr. Anja KLANČNIK

Recenzentka: doc. dr. Polona JAMNIK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Živa Korošec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22/.26(043)=163.6
KG	<i>Campylobacter jejuni</i> / ekologija mikroorganizmov / kultivabilnost / morfologija / okoljski dejavniki / oksidativni stres / stradanje / izvleček rožmarina / izlivne črpalke / sistem za signaliziranje
AV	KOROŠEC, Živa
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / KLANČNIK, Anja (somentorica) / JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA BAKTERIJE <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168 IN IZBRANE MUTANTE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 64 str., 4 pregl., 30 sl., 63 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Preučevali smo vpliv okoljski dejavnikov- stradanja, kisika in izvlečka rožmarina na kultivabilnost in morfologijo bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> in mutantov na izlivnih črpalkah ter sistemu za signaliziranje. Izvleček rožmarina se je izkazal kot učinkovita naravna protimikrobna snov. Dokazali smo, da imajo membranske izlivne črpalke in regulatorni protein CmeR vpliv na kultivabilnost in morfologijo bakterij <i>C. jejuni</i> ob dodatku izvlečka rožmarina, kar pomeni, da sta omenjena mehanizma vpletena v odpornost proti protimikrobnim snovem. Sistem za signaliziranje nima pomembne vloge pri odpornosti na protimikrobne snovi, saj je bila rast mutanta zelo podobna divjemu tipu, bile pa so opazne določene spremembe v morfologiji. Največji vpliv je imel izvleček rožmarina na izlivni sistem CmeB, nekoliko manjšega pa na CmeF in CmeR, kar dokazuje, da ima izlivna črpalka CmeABC od naštetih najpomembnejšo vlogo pri iznosu toksičnih snovi iz celice. Ugotovili smo, da imajo predvsem višje koncentracije rožmarinovega izvlečka destruktiven vpliv na celično membrano, saj se pojavljajo številne poškodbe celične membrane in razgradni produkti, ali pa se celice na stres odzovejo s spremembo v kokoidno obliko. Ob izpostavitvi kisiku in stradanju smo pri vseh mutantih ugotovili boljšo odpornost na stres stradanja in nekoliko slabšo odpornost na kisik v primerjavi z divjim tipom <i>C. jejuni</i> NCTC 11168. Stradanje je v splošnem celice bolj prizadelo kot kisik, ki je večinoma povzročil celo boljšo rast v primerjavi s kontrolo, ki je rasla v mikroaerofilnih pogojih. Stradanje in oksidativni stres sta s časom povzročila tudi spremembo morfologije celic v kokoidno obliko. Pri mutantu LuxS smo pod vplivom oksidativnega stresa in stradanja s časom opazili več kokoidnih celic. Rast pod vplivom stradanja je bila pri LuxS mutantu boljša kot pri divjem tipu, pri izpostavitvi kisiku pa je bila rast podobna divjemu tipu. Sistem za signaliziranje ima vlogo pri prilagoditvi na stradanje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.22/.26(043)=163.6
 CX *Campylobacter jejuni* / ecology of microorganisms / culturability / morphology / environmental factors / oxidative stress / starvation / rosemary extract / efflux pumps / quorum sensing
 AU KOROŠEC, Živa
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / KLANČNIK, Anja (co-advisor) / JAMNIK, Polona (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2012
 TY INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 AND SELECTED MUTANTS
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XII, 64 p., 4 tab., 30 fig., 63 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB We studied influence of environmental stress factors- oxygen, starvation and rosemary extract on culturability and morphology of *Campylobacter jejuni* and its mutants on efflux pumps and quorum sensing system. Rosemary extract showed great potential as natural antimicrobial agent. When added rosemary extract, membrane efflux pumps and regulatory protein CmeR did have influence on culturability and morphology of *C. jejuni*. This means that these two mechanisms are involved in antimicrobial resistance of these bacteria. Quorum sensing system apparently doesn't play an important role in antimicrobial resistance because culturability of LuxS mutant was very similar to wild type strain, although certain differences in morphology were noticed. Rosemary extract showed greatest effect in mutant on efflux system CmeB, less effect was noticed on mutants CmeF and CmeR. This proves that efflux pump CmeABC plays the most important role in antimicrobial resistance. Especially higher concentrations of rosemary extract had destructive influence on cell membrane. This shows as numerous damages of cell membrane, decomposition products or changing into coccoid forms. With all mutants we noticed better resistance on starvation than on oxidative stress if compared to wild type. In general, starvation affected bacterial cells more than oxygen. Cells exposed to oxygen grew better than those in microaerophilic conditions. Long time starvation and oxidative stress caused changing of cells into coccoid form. When LuxS mutant was exposed to long term oxidative stress and starvation we noticed more coccoid cell forms. Culturability of LuxS mutant was better than culturability of wild type strain but when exposed to oxygen it was similar to wild type. Quorum sensing system plays role in adaptation to starvation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Campylobacter</i>	4
2.1.1 Fiziološke in genetske značilnosti rodu <i>Campylobacter</i>	4
2.1.2 Patogeneza kampilobakterioz	5
2.2 ODZIV BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> NA STRADANJE IN OKSIDATIVNI STRES	6
2.2.1 Spremljanje stresnega odziva pri <i>C. jejuni</i>	6
2.2.2 Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na bakterije <i>C. jejuni</i>	7
2.3 ODPORNOST BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM	8
2.3.1 Membranske izlivne črpalke	8
2.3.2 Protimikrobne snovi rastlinskega izvora	10
2.3.2.1 Učinek protimikrobnih snovi rastlinskega izvora na celico	10
2.3.2.2 Vrednotenje protimikrobnega delovanja snovi rastlinskega izvora	10
2.3.2.3 Izveček rožmarina	12

2.3.2.4 Kultivabilnost in morfologija bakterij pod vplivom rastlinskih protimikrobnih snovi	12
2.4 SISTEM ZA SIGNALIZIRANJE PRI BAKTERIJAH VRSTE <i>Campylobacter</i>	14
2.4.1 Signalne molekule pri bakterijah <i>C. jejuni</i>	14
3 MATERIAL IN METODE DELA	17
3.1 POTEK DELA	17
3.2. MATERIAL	18
3.2.1 Delovni mikroorganizem	18
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	19
3.2.2.1 Tekoče gojišče MHB	19
3.2.2.2. Krvni agar Columbia.....	19
3.2.2.3 Trdno gojišče AHB (Abeyta-Hunt-Bark)	19
3.2.3 Izvleček rožmarina	20
3.2.4 Raztopine, reagenti.....	20
3.2.5 Laboratorijska oprema in material	21
3.3 METODE	22
3.3.1 Revitalizacija sevov in priprava inokuluma.....	22
3.3.2 Priprava izvlečka rožmarina	22
3.3.3 Mikrodilucijska metoda v bujonu in kultivacija	22
3.3.4 Izpostavitve celic stradanju in kisiku	23
3.3.5 Določanje koncentracije kultivabilnih celic	23
3.3.6 Presevna elektronska mikroskopija.....	24
4 REZULTATI	25
4.1 VPLIV STRADANJA IN OKSIDATIVNEGA STRESA NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	26
4.2 VPLIV ROŽMARINOVEGA IZVLEČKA V40 NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	28

4.3 VPLIV MUTACIJ V GENIH IZLIVNIH ČRPALK NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	30
4.3.1 Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost in morfologijo mutantov CmeB, CmeF, CmeR.....	32
4.3.2 Učinek rožmarinovega izvlečka V40 na kultivabilnost in morfologijo mutantov CmeB, CmeF, CmeR.....	38
4.4. VPLIV MUTACIJ V GENU ZA SIGNALIZIRANJE NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO <i>C. jejuni</i>	44
4.4.1. Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost in morfologijo mutanta LuxS	46
4.4.2. Protimikrobni učinek rožmarinovega izvlečka V40 na mutanta LuxS.....	48
5 RAZPRAVA	50
5.1 VPLIV STRADANJA IN OKSIDATIVNEGA STRESA NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	50
5.2 VLOGA IZLIVNIH ČRPALK PRI ODPORNOSTI <i>C. jejuni</i> PROTI STRADANJU IN OKSIDATIVNEMU STRESU	50
5.3 VPLIV SISTEMA ZA SIGNALIZIRANJE LuxS NA ODPORNOST PROTI STRADANJU IN OKSIDATIVNEMU STRESU	52
5.4 VPLIV ROŽMARINOVEGA IZVLEČKA V40 NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	53
5.5 VLOGA IZLIVNIH ČRPALK PRI ODPORNOSTI <i>C. jejuni</i> PROTI IZVLEČKU ROŽMARINA V40.....	54
5.6 VPLIV SISTEMA ZA SIGNALIZIRANJE NA ODPORNOST PROTI IZVLEČKU ROŽMARINA V40.....	55
6 SKLEPI	56
6.1. PREDLOGI NADALJNIH RAZISKAV O VPLIVU OKOLJSKIH STRESOV NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO <i>C. jejuni</i>	56
7 VIRI	58
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Različni načini vrednotenja protimikrobne aktivnosti in definicije (Burt, 2004).....	11
Preglednica 2: Raztopine in reagenti, uporabljeni v eksperimentalnem delu.....	20
Preglednica 3: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu....	21
Preglednica 4: Morfološke spremembe pri posameznih sevih <i>C. jejuni</i> ob času 0h in 24h	31

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>C. jejuni</i> , posnet z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (Hu in sod., 2008).....	4
Slika 2: Najpogostejše poti okužb s kampilobaktri pri človeku (Daasti in sod., 2010).....	1
Slika 3: <i>E.coli</i> ob dodatkih različnih koncentracij izvlečka želoda (a) kontrola, (b) MIK, (c) 2MIK, (d) 4MIK (Suwalak in Voravuthikunchai, 2009).....	13
Slika 4: Shema eksperimentalnega poteka diplomske naloge.....	17
Slika 5: Organizacija genoma in lastnosti operona <i>cmeABC</i> pri <i>C. jejuni</i> 81-176 (Lin in sod., 2002).	18
Slika 6: Shema razredčevanja rožmarinovega izvlečka do zelenih koncentracij.	22
Slika 7: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost <i>C. jejuni</i> NCTC 11168.	26
Slika 8: Morfologija <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 ob stradanju in oksidativnem stresu: (a) <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, stradanje, 4 h. Vidne so izbokline na celični ovojnici. (b) <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 stradanje, 5 dni. Kokoidna oblika celice. (c, d) <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 kisik, 4 h. Spiralne oblike celic s poškodovano celično ovojnico.	27
Slika 9: Kultivabilnost bakterij <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 ob dodatkih različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40.....	28
Slika 10: Morfologija bakterij <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 ob dodatkih različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40 (a, b) kontrola <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, 24 ur. Vidne so spiralne in kokoidne oblike celic. (c) 0,625 mg/mL, 24 ur. Kokoidne oblike celic (d) 0,313 mg/mL, 24 ur. Kokoidna celica z dvema bičkoma. (e) 0,156 mg/mL, 24 ur. Spiralna celica s hrapavo membrano. (f) 0,078 mg/mL, 24 ur. Spiralna celica, temna obarvanost nakazuje poškodbe membrane. (g) 0,078 mg/mL, 5 dni. Bacil z vidnimi spremembami v strukturi celice.	29
Slika 11: Rastne krivulje mutantov na izlivnih črpalkah <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 CmeB, CmeF, CmeR.....	30
Slika 12: Morfologija bakterij <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in mutantov (a) referenčni sev <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, 0 h. Kokoidna oblika celice. (b) referenčni sev <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 0 h. Spirale z 2-3 zavoji. (c) referenčni sev <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, 24 h. Spirala s 5 zavoji. (d) CmeB, 0 h. Bacil in celica, ki se verjetno deli ali pa prehaja v bacilarno obliko. (e) CmeB, 0 h. Poškodovana kokoidna celica, viden izliv citoplazme. (f) CmeF, 0 h. Struktura, pri kateri gre verjetno za poškodovan bacil ali pa razgradni produkt. (g) CmeF, 24 h. Različno dolge spiralne celice, nekatere z nepravilnostmi v zavojih.	31
Slika 13: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutantu CmeB.....	32

Slika 14: Morfologija mutanta <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 CmeB po oksidativnem stresu in stradanju: (a) CmeB, oksidativni stres, 4 h. Spiralna oblika celice s poškodbami membrane. (b) CmeB, oksidativni stres, 4 h. Bacilarna oblika celice brez poškodb. (c) CmeB, oksidativni stres, 5 dni. Razgradni produkti. (d) CmeB, stradanje, 4 h. Bacilarna oblika celic, pri obeh celicah je vidna delitev. (e) CmeB, stradanje, 5 dni. Razgradni produkt, ob njem biček.	33
Slika 15: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutanta CmeF	34
Slika 16: Morfologija mutanta <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 CmeF po oksidativnem stresu in stradanju: (a) CmeF, oksidativni stres, 4h. Spiralna oblika celice, verjetno s poškodovano membrano, saj je le-ta zelo temno obarvana. (b) CmeF, oksidativni stres, 5 dni. Kokoidna oblika celice z nagubano membrano. (c) CmeF, stradanje, 4h. Spiralna oblika celice, verjetno s poškodovano membrano. (d) CmeF, stradanje 5 dni. Razgradni produkti in posamezni bički.	35
Slika 17: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutanta CmeR.	36
Slika 18: Morfologija mutanta CmeR po oksidativnem stresu in stradanju: (a) CmeR stradanje, 4h. Spiralna oblika celice, verjetno s poškodbami membrane, ker je temno obarvana. (b) CmeR stradanje, 5 dni. Močno skrčena spiralna oblika celice, verjetno je iz nje zaradi poškodb iztekla celična vsebina. (c) CmeR, oksidativni stres, 4h. Spiralna celica, nepravilne oblike. (d) CmeR, oksidativni stres, 5 dni. Kokoidna oblika celice z nagubano membrano.	37
Slika 19: Rast mutanta CmeB ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40	38
Slika 20: Morfologija mutanta CmeB ob dodatku različnih koncentracij izvlečka rožmarina: (a) kontrola CmeB, 0 ur. Bacilarna oblika celice, pri drugi verjetno vidna delitev, ali pa prehod iz spiralne v bacilarno obliko. (b) kontrola CmeB, 24 ur. Bacilarna oblika celice. (c) CmeB+0,039 mg/mL izvlečka rožmarina, 4h. Bacilarna oblika celic. Verjetno gre tudi za poškodbe membrane, saj je rob temno obarvan, v okolici pa so vidni tudi razgradni produkti. (d) CmeB+0.0196 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Spiralna oblika celice z enim zavojem. (e) CmeB + 0.0196 mg/mL izvlečka rožmarina, 24 ur. Bacilarna oblika celice.....	39
Slika 21: Rast mutanta CmeF ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40	40
Slika 22: Morfologija mutanta CmeF ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka: (a) kontrola CmeF, 24h. Različno dolge spiralne oblike celic. (b) CmeF + 0.625 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Poškodovane, skrčene celice, ali pa razgradni produkti. (c) CmeF + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Spiralne celice s poškodovano membrano. (d) CmeF + 0.156 mg/mL izvlečka rožmarina, 5 dni. Spiralna celica s poškodovano membrano, na kar nakazuje temna lisa okoli celice, ki lahko pomeni	

iztekanje celične vsebine. (e) CmeF + 0.078 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Spiralna celica z odebelitvijo.....	41
Slika 23: Rast mutanta CmeR ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40	42
Slika 24: Morfologija mutanta CmeR ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka: (a) CmeR + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 0h. Bacilarna oblika celic, temno obarvanje nakazuje poškodbe membrane. (b) CmeR+0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24 h. Bacilarna oblika celice, verjetno gre, poleg poškodb membrane tudi za prehod iz spiralne v bacilarno obliko. (c) CmeR + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24 h. Razgradni produkti. (d) CmeR + 0.078 mg/mL izvlečka rožmarina, 5 dni. Spiralna oblika celice s poškodbami membrane.....	43
Slika 25: Rastni krivulji referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in mutanta na sistemu za signaliziranje LuxS.....	44
Slika 26: Morfologija mutanta LuxS: (a) LuxS, 0h. Krajša spiralna celica z odebelitvijo. (b) LuxS, 0h. 2 daljša bacila z vidno delitvijo, tik pod njima pa 2 kratki spiralni, odebeljeni celici. (c) LuxS, 0h. Spiralna celica, nepravilne oblike, z odebelitvama na obeh koncih, vidno odstopanje membrane. (d) LuxS, 24h. Bacilarna oblika celice, z vidno delitvijo. V okolici vidno kristalizirano kontrastno sredstvo, ki ni povezano z rezultati. (e) LuxS, 24h. Celica v obliki črke C, v okolici kristalizirano kontrastno sredstvo.....	45
Slika 27: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutanta LuxS.....	46
Slika 28: Morfologija mutanta LuxS ob stradanju in oksidativnemu stresu: (a) LuxS stradanje, 4h. Spiralne oblike celic, vidni tudi razgradni produkti. (b) LuxS stradanje, 5 dni. Kokoidna oblika celic z bički. (c) LuxS, oksidativni stres, 5 dni. Viden prehod iz spiralne v kokoidno obliko celice. Celica se skrči in oblikuje kroglo. (d) LuxS oksidativni stres, 5 dni. Kokoidna oblika celice, ki je verjetno ravno prešla v to obliko.....	47
Slika 29: Rast mutanta LuxS ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40	48
Slika 30: Morfologija mutanta LuxS ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka: (a) kontrola LuxS, 0h. Kratka spiralna celica z odebelitvijo. (b) kontrola LuxS, 24h. Celica v obliki črke C, v okolici kristalizirano kontrastno sredstvo. (c) LuxS + 0.625 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Razgrajene celice. (d) LuxS + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Močno skrčena celica, izgleda kot, da bi iz nje iztekla celična vsebina. (e) LuxS + 0.039 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Kratka, spiralna celica, vidno odstopanje membrane in vakuolizacija.....	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC	družina ABC, ATP-aze (angl. ATP binding cassette)
AHB	gojišče Abeyta-Hunt-Bark
AI	avtoinducerji (angl. Autoinducers)
CAC	citratni cikel (angl. Citric Acid Cycle)
CFU	število kolonijskih enot (angl. Colony Forming Unit)
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
DPD	4,5- dihidroksi-2,3-pentandion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGCG	epigalokatehinalat
EMP	Emden Mayerhoff Parnassova pot
EFSA	evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
INT	p-jodotetrazolijev klorid
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MHB	tekoče gojišče Mueller Hinton (angl. Mueller-Hinton broth)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NCTC	zbirka medicinsko pomembnih bakterij, ki jih hrani Central Public Health Laboratory, London (angl. National Collection of Type Cultures)
PBS	fosfatna pufrna sol (angl. PBS phosphate buffered saline)
Pfk	encim fosfofruktokinaza
QS	medcelično komuniciranje (angl. Quorum sensing)
ROS	reaktivne kisikove spojine
SAM	s- adenzilmetionin
SAH	s-adenzilhomocistein
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	vrstični elektronski mikroskop (angl. Scanning Electron Microscope)
<i>S. Tiphymurium</i>	<i>Salmonella Tiphymurium</i>
TTC	2,3,5- trifeniltetrazolijev klorid
VBNC	živo, a nekultivabilno stanje (angl. Viable But Non-culturable)
<i>V. harvey</i>	<i>Vibrio harvey</i>
V40	izvleček rožmarina VivOX40

1 UVOD

Campylobacter jejuni je ena najpogostejših bakterij, ki povzročajo zastrupitve s hrano pri ljudeh. Prenaša se z živila živalskega izvora, saj naravno kolonizira prebavni trakt različnih živali, predvsem perutnine. V zadnjem desetletju je bil narejen velik napredek v razumevanju biologije in fiziologije tega mikroorganizma, k čemer je pripomoglo tudi razkritje genoma *C. jejuni*. Kampilobaktri imajo različne mehanizme, ki pripomorejo k temu, da lahko uspešno naseljujejo prebavni trakt različnih živali. Čeprav je *C. jejuni* občutljiva bakterija, ima veliko sposobnost prilagoditve na različne habitate, vključno s prebavnim traktom. Odgovor na visoko sposobnost prilagoditve različnim okoljem leži v genetski, metabolni in fenotipski diverziteti populacije, ki se je sposobna prilagoditi različnim pogojem. Za razliko od ostalih patogenov, ki povzročajo okužbe s hrano, kot sta npr. *E. coli* in *Salmonella*, kampilobaktri kot vir energije ne izkoriščajo eksogene glukoze, ampak kot vir ogljika izkoriščajo aminokisline. Izkazalo se je, da se kampilobaktri lahko hitro prilagodijo na antibiotike in svojo strukturo in morfologijo prilagodijo tako, da so odporni na protimikrobne snovi (Jeon in sod., 2010).

Kampilobaktri so se sposobni prilagoditi na številne okoljske dejavnike, vendar pa mehanizmi, ki bi natančno pojasnili, kako do prilagoditev pride, še niso znani. Različni mehanizmi prilagoditve na okoljske dejavnike *C. jejuni* omogočajo, da preživi tudi zunaj svojega naravnega okolja. Razumevanje teh mehanizmov bi lahko omogočilo učinkovitejše zatiranje tega mikroorganizma, ki se pogosto pojavlja v prehranjevalni verigi in je zaradi prilagoditev sposoben preživeti različne procese pri tehnologiji živil. Najpogostejši stres, s katerimi se srečuje *C. jejuni* v predelavi živil, so pomanjkanje hranil (stradanje), oksidativni stres in temperaturne spremembe (Klančnik in sod., 2008).

V zadnjem času so vedno pogostejše zahteve potrošnikov po hrani brez umetnih aditivov, zato so kot snovi, ki podaljšajo obstojnost živil vedno bolj zanimive naravne protimikrobne snovi. Rastlinski izvlečki so se izkazali kot potencialno bogat vir različnih snovi, ki imajo širok spekter protimikrobnega delovanja proti številnim bakterijam, kvasovkam in plesnim, zavirajo pa tudi številne procese kvarjenja živil, kamor spadajo tudi oksidativne reakcije. Kot dobre protimikrobne snovi so se izkazale fenolne spojine, ki se kot sekundarni metaboliti sintetizirajo v rastlinah (King in Dykes, 2008). Ena takšnih rastlin, ki vsebuje učinkovite fenolne komponente je tudi rožmarin. V Evropski uniji je komercialno dostopen za uporabo v živilski industriji kot konzervans in antioksidant (Klančnik in sod., 2009c). Izvleček rožmarina se je torej izkazal kot učinkovita snov s protimikrobnim delovanjem na patogene bakterije, ki jih najdemo v prehranjevalni verigi.

Kampilobaktri so se sposobni do neke mere prilagoditi tudi na protimikrobne snovi v okolju. Odkrit je bil sistem izlivnih črpalk, ki prispeva k odpornosti na protimikrobne snovi pri *C. jejuni*. Glavna pri iznosu za celico toksičnih snovi, kot so antibiotiki, žolčne soli in detergenti, naj bi bila membranska izlivna črpalka CmeABC, pri *C. jejuni* pa najdemo tudi membransko izlivno črpalko CmeDEF, ki ima pri odpornosti na protimikrobne snovi sekundarno vlogo. Obe črpalke sta vpleteni v intrinzično odpornost *C. jejuni* proti antibiotikom (Lin in sod., 2002; Akiba in sod., 2006). V povezavi s črpalko CmeABC je

zanimiv tudi regulatorni protein CmeR, ki uravnava delovanje črpalke CmeABC (Lin in sod., 2005). Kampilobaktri so sposobni tudi medcelične komunikacije, kar jim omogoča sistem za signaliziranje LuxS. Ta sistem omogoča tudi vrsto fizioloških prilagoditev na nivoju populacije in je zato zanimiv tudi pri preučevanju stresnih odzivov pri *C. jejuni* (Plummer, 2012).

Odpornost proti protimikrobnim snovem in sposobnost prilagoditve na okoljske dejavnike pri *C. jejuni* je precejšen problem, zato je razumevanje sistemov prilagoditve in mehanizmov njihovega delovanja ključno za razvoj novih strategij preprečevanja okužb s temi mikroorganizmi. V povezavi s tem je pomembno tudi razumevanje morfoloških sprememb kampilobaktrov, do katerih lahko pride ob izpostavljenosti določenim okoljskim stresom. Boljše razumevanje mehanizmov odpornosti pri kampilobaktirih pomeni tudi lažje obvladovanje okužb s temi bakterijami.

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

- ugotoviti vpliv izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF ter proteina CmeR na odpornost proti izvlečku rožmarina in morfologijo bakterij *C. jejuni* s primerjalno analizo referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovih mutantov *cmeB*, *cmeF*, *cmeR*
- ugotoviti vpliv sistema za signaliziranje LuxS na morfologijo in odpornost proti izvlečku rožmarina s primerjalno analizo referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta LuxS
- ugotoviti vpliv oksidativnega stresa in stradanja na kultivabilnost in morfologijo s primerjalno analizo referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutantov *cmeB*, *cmeF*, *cmeR*
- ugotoviti vpliv oksidativnega stresa in stradanja na kultivabilnost in morfologijo s primerjalno analizo referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovega mutanta *C. jejuni* NCTC 11168 LuxS.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Mutacija v genih izlivnih črpalk *cmeB*, *cmeF* in *cmeR* poveča ali zmanjša občutljivost kampilobaktrov na rastlinske protimikrobne snovi ter vpliva na morfologijo, kar kaže na to, da so črpalke CmeABC in CmeDEF ter regulatorni protein CmeR vpleteni v mehanizem odpornosti;
- Sistem za signaliziranje LuxS ni neposredno vpleten v odpornost proti izvlečku rožmarina, zato se *C. jejuni* NCTC 11168 in *C. jejuni* NCTC 11168 LuxS ne bosta bistveno razlikovala v tej odpornosti;

- Mutacije v genih izlivnih črpalk CmeB, CmeF in CmeR izboljšajo ali poslabšajo kultivabilnost *C. jejuni* ob stradanju ali oksidativnem stresu, zaradi stresov se lahko spremeni tudi morfologija;
- Oksidativni stres in stradanje vplivata na kultivabilnost in morfologijo mutantov LuxS, ker je sistem za signaliziranje vpleten v odpornost kampilobaktrov proti omenjenima stresoma.

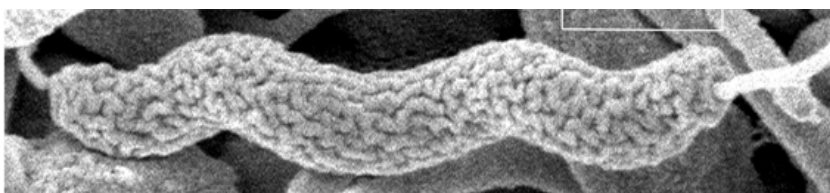
2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Campylobacter*

2.1.1 Fiziološke in genetske značilnosti rodu *Campylobacter*

Taksonomsko uvrščamo bakterije rodu *Campylobacter* v družino Campylobacteriae. Raziskovanje kampilobaktrov sega v leto 1886, ko naj bi Escherich prvič izoliral kampilobaktrom podobne organizme iz fecesa dojenčkov (Dekeyser in sod., 1972).

Bakterije vrste *Campylobacter* so gramnegativne in nesporogene bakterije. So spiralne oblike, dolge od 0,2-5 μm in široke od 0,2-0,9 μm (Humphrey in sod., 2007). Hitro, vijačno gibanje skozi medij jim omogočata dva polarna bička, ki imata pomembno vlogo ne le pri gibanju, ampak tudi pri kolonizaciji bakterij v prebavnem traktu. Zaradi posebne oblike celic in gibanja, se lažje premikajo skozi mukozni sloj črevesja in tako naselijo gostiteljev prebavni trakt (Guerry, 2007). So mikroaerofilni, kar pomeni, da rastejo v optimalni atmosferi s 5 % - 10 % kisika. Optimalne temperature za rast kampilobaktrov so med 37 °C in 45 °C, kar jih uvršča med termotolerantne mikroorganizme. Pri temperaturah, nižjih od 30 °C, se ne razmnožujejo. Ti podatki nakazujejo, da so kampilobaktri prilagojeni na pogoje, kakršni so v prebavnem traktu perutnine, v katerem se naravno nahajajo. Zunaj gostitelja se težko razmnožujejo, saj so temperature bistveno nižje od optimalnih. Zelo občutljivi so tudi na strese iz okolja, celo bolj kot nekateri drugi patogeni mikroorganizmi. V primerjavi z drugimi patogenimi mikroorganizmi so bolj občutljivi tudi na sušenje, osmotski stres in nizek pH (Park, 2002). Kljub temu, da gre za občutljive bakterije, so v prehranjevalni verigi še vedno pogoste tudi zato, ker se z določenimi mehanizmi lahko prilagodijo na številne okoljske strese (Murphy in sod., 2005).



Slika 1: *C. jejuni*, posnet z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (Hu in sod., 2008).

Čeprav so kampilobaktri izjemno občutljivi, so se sposobni prilagoditi različnim habitatom, tudi gastrointestinalnemu traktu. Visoka sposobnost prilagoditve je mogoča zaradi genetsko, metabolno in fenotipsko raznolike populacije, ki se je sposobna odzvati na mnoge spremembe v okolju. Za razliko od ostalih pogostih patogenov, kot sta npr. *E. coli* in *Salmonella*, kampilobaktri ne morejo izkoriščati eksogenih virov glukoze, saj nimajo encima 6-fosfofruktokinaze (Pfk), ki bi omogočila pretvorbo fruktoza-6-fosfata v fruktoza-1,6-bifosfat. Kot vir ogljika izkoriščajo katabolizem aminokislin, ki pri *C. jejuni* igrajo

pomembno vlogo v metabolizmu. Metabolizem sestavljata Embden-Meyerhof-Parnasova pot (EMP) (z izjemo encima Pfk) in citratni cikel (CAC). Piruvat je glavni metabolit, ki povezuje citratni cikel in EMP, ki pa ne nastaja iz glukoze, ampak endogeni vir piruvata predstavlja katabolizem glukogenih aminokislin (Jeon in sod., 2010).

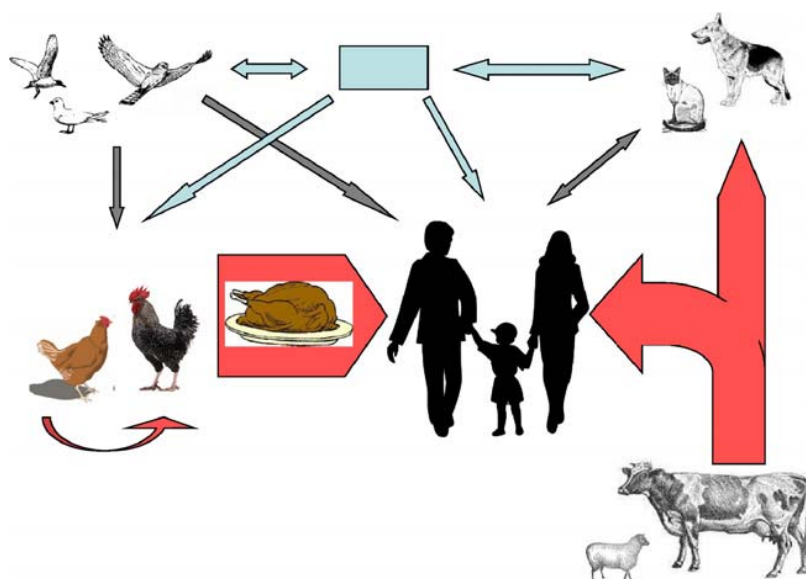
C. jejuni je zaradi razvejanega transportnega sistema elektronov sposoben aerobne in anaerobne respiracije. Uvrščamo ga med mikroaerofilne mikroorganizme, vendar se je izkazalo, da kampilobaktri lahko rastejo tudi v aerobnih pogojih. Kaakush in sod. (2007) so ugotovili, da še posebej pri večji gostoti celic te bakterije uspevajo praktično enako dobro v aerobnih kot v mikroaerofilnih pogojih. V anaerobnih pogojih rastejo slabo, pri majhni gostoti celic pa je rast dobra le v mikroaerofilnih pogojih.

Razkritje nukleotidnega zaporedja genoma *C. jejuni* NCTC 11168, je omogočilo temeljitejši vpogled v delovanje tega mikroorganizma, kar zaradi vedno številnejših raziskav omogoča boljše razumevanje teh bakterij kot povzročiteljev zoonoz. Napredek je najbolj izrazit pri razumevanju metabolnih poti, kolonizacijskih faktorjev, mehanizmov prilagoditve in odpornosti na antibiotike (Jeon in sod., 2010).

2.1.2 Patogeneza kampilobakterioz

Po podatkih EFSA (2012) so bakterije vrste *Campylobacter* vodilni povzročitelji okužb s hrano v Evropski uniji. Letno poročajo o več kot 190 000 primerih takšnih okužb, neuradno pa naj bi bilo takšnih primerov kar 9 milijonov.

C. jejuni in *C. coli* sta najpogostejša povzročitelja humanih kampilobakterioz. Naravno sta prisotna v črevesju domače perutnine in divjih ptic, kjer se lahko zaradi ugodnih pogojev nemoteno razmnožujeta. Ljudje se lahko okužimo preko kontaminiranega mesa, ki ni bilo dovolj toplotno obdelano. Do okužbe lahko pride tudi z navzkrižno kontaminacijo živil, kontaminirano vodo ali mlekom okužene živali. Posebno občutljivi za tovrstne okužbe so otroci in starejši ljudje, ki imajo slabši imunski sistem. Več primerov kampilobakterioz je v poletnem času, saj so takrat temperature višje, kar omogoča večjo preživelost in boljšo rast kampilobaktrov tudi izven njihovega idealnega okolja. Za preprečevanje okužb lahko največ naredimo z ustrezno higieno in zadostno toplotno obdelavo živil, saj kampilobaktri ne preživijo visokih temperatur (Daasti in sod., 2010). Black in sod. (1988) poročajo, da naj bi bila infektivna doza že 500 CFU, kar je izredno malo. Kampilobakterioza se kaže s simptomi kot so vročina, bruhanje, bolečine v trebuhu in vodena ali celo krvava driska. Običajno simptomi trajajo teden ali dva in minejo sami od sebe. V hujših primerih je vseeno potrebna hospitalizacija, saj bi lahko prišlo do razvoja Guillain-Barre sindroma, ki v hujših primerih lahko povzroči paralizo (Wassenaar in Blaser, 1999).



Slika 2: Najpogostejše poti okužb s kampilobaktri pri človeku (Daasti in sod., 2010).

2.2 ODZIV BAKTERIJ *Campylobacter* NA STRADANJE IN OKSIDATIVNI STRES

2.2.1 Spremljanje stresnega odziva pri *C. jejuni*

Stresni odziv pri bakterijah lahko definiramo kot vrsto reakcij v izražanju genov in aktivnosti določenih proteinov. Skupni namen teh reakcij je zaščita celice, oz. prilagoditev na ekstremne in potencialno škodljive pogoje, kar se kaže kot odstranitev stresnega faktorja iz celice (npr. pri antibiotikih), kratkotrajna prilagoditev na stres in/ali popravljanje poškodb celičnih struktur, ki so nastale zaradi stresnih pogojev (Giuliodori in sod., 2007).

Večina patogenih mikroorganizmov je precej odpornih, saj so se morali ustrezno prilagoditi, da preživijo različne pogoje, ki nastajajo pri predelavi živil, ali dodajanju različnih konzervansov. Kampilobaktri so tu posebnost, saj imajo zelo specifične zahteve za rast in so v primerjavi z drugimi patogeni precej bolj občutljivi na stresne dejavnike. Zanimivo je tudi, da imajo kljub temu manj nekaterih mehanizmov za prilagoditev stresnim pogojem, kot jih najdemo pri drugih patogenih mikroorganizmih, npr. *E. coli* ali *B. subtilis* (Park, 2002).

Pri *E. coli* je σ^s , oz. gen *rpoS*, glavni regulator stresnega odziva. Izražanje se sproži ob stresnih pogojih in aktivira več kot 70 σ^s -odvisnih genov, ki prispevajo k odpornosti na različne strese (Giuliodori in sod., 2007). Kampilobaktri gena *rpoS*, ki je ključen pri preživetju v stacionarni fazi oz. ob stradanju, nimajo. Nimajo tudi nekaterih drugih genov, ki so ključni pri stresnem odzivu, npr. *soxRS* in *oxyR*, ki sprožita stresni odziv pri

oksidativnem stresu in *otsAB*, ki je pomemben pri osmotskem stresu. Odsotni so tudi nekateri geni, ki sodelujejo pri odzivu na hladni ali toplotni šok (Park, 2002).

Kampilobaktri lahko tvorijo različne morfološke oblike. Spiralna prevladuje v mladih, aktivno rastočih kulturah, pod vplivom stresa pa preko različnih morfoloških oblik preide v kokoidno obliko. Ta prehod je pasiven proces, saj ne zahteva transkripcije genov in *de novo* sinteze proteinov. Sprememba iz spiralne v kokoidno obliko je povezana tudi z manjšo kultivabilnostjo. Če se zmanjša kultivabilnost in ohrani živost bakterij, govorimo o stanju VBNC (angl. viable but non culturable) (Nachamkin in sod., 2008). Eden od načinov, kako se nesporogene bakterije odzovejo na stresne pogoje je torej živo, a nekultivabilno stanje (VBNC). Šlo naj bi za programiran odziv, ki celicam omogoča preživetje v stresnih pogojih. Pojav naj bi bil analogen tvorbi spor pri sporogenih bakterijah. Ko celice preidejo v to stanje, se zmanjšajo, pride do kondenzacije citoplazme, nesposobnosti delitve, zmanjšana je metabolna aktivnost. Takšne celice so bolj odporne proti stresnim pogojem, dlje pa preživijo tudi v neustreznih razmerah. Pri stanju VBNC gre za metabolno aktivne, a nekultivabilne celice, vendar še ni jasno, ali lahko vse takšne celice ob vzpostavitvi ugodnih pogojev spet preidejo v normalno stanje, ali je rast prisotna le zaradi posameznih celic, ki so se uspešno vrnile v prvotno stanje in tvorile nove kolonije (McDougald in sod., 1998).

Celice se na spremembo okolja ali stresne pogoje odzivajo tudi s pomočjo medcelične komunikacije (angl. quorum sensing, QS). Medcelično komuniciranje vključuje tvorbo in detekcijo ekstracelularnih signalnih molekul, kar celicam omogoča sprejemanje signalov, na podlagi katerih lahko delujejo enotno in se lažje prilagodijo stresnim razmeram (Bassler, 1999). Raziskave so pokazale, da medcelična komunikacija, ki je pogojena z genom *luxS*, omogoča *C. jejuni* boljšo prilagoditev na zelo nizke temperature, kot je npr. temperatura hladilnika (Ligowska in sod., 2011).

Ugotovljeno je bilo tudi, da so pri stresnem odzivu *C. jejuni* na protimikrobne snovi v okolju pomembne membranske izlivne črpalke. Njihova vloga je izčrpavanje toksičnih snovi iz celice, kar omogoča bakteriji boljšo odpornost na širok spekter protimikrobnih snovi (Guo in sod., 2010).

2.2.2 Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na bakterije *C. jejuni*

Razumevanje odziva bakterij pri določenih stresih je ključnega pomena za zagotavljanje varnosti živil. Kljub temu, da bakterije vrste *C. jejuni* nimajo nekaterih genov, ki so pomembni pri stresnem odzivu, so se celice vseeno sposobne prilagoditi in preživeti okoljske pogoje. Pri stradanju in izpostavitvi kisiku so opazne spremembe v kultivabilnosti, živosti in morfologiji celic (Klančnik in sod., 2008).

O stradanju govorimo, kadar bakterijske celice izčrpajo zalogo limitirajočega substrata v okolju, v katerem se nahajajo. V laboratoriju smo takšno stanje dosegli tako, da bakterijam nismo dodali gojišča s hranili. *C. jejuni* nima gena *rpoS*, ki je ključen pri odzivu na stradanje pri nekaterih drugih gram negativnih bakterijah (Giuliodori in sod., 2007). Ob

izpostavitvi *C. jejuni* stradanju, le-ti preidejo v živo, a nekultivabilno stanje (VBNC), ki ga spremljajo fiziološke in strukturne spremembe celice. Celicam se zmanjša metabolna aktivnost, zmanjša se tudi volumen celice in s tem poveča površina, kar omogoča boljšo komunikacijo z okoljem. Ob stradanju mora celica varčevati z energijo. V pogojih stradanja celice vso metabolno energijo usmerijo v iskanje hranil, sintezo razgradnih encimov in za prehod v odpornejše stanje, kar jim pomaga preživeti v danih razmerah (Klančnik, 2006). Ob stradanju se sproži tudi sinteza določenih proteinov, ki izboljšajo asimilacijo hranil in vplivajo na boljšo toplotno odpornost *C. jejuni* (Cappelier in sod., 2000). Daljše stradanje (42 dni) pospeši prehod celic v nekultivabilno stanje. Število kokoidnih celic začne naraščati takoj, ko jih izpostavimo stradanju in po 15 dneh je 90 % populacije v kokoidni obliki. Daljša izpostavitvev stradanju povzroči tudi degeneracijo celic. Stanje VBNC in kokoidnost sta različna, a vseeno povezana pojava. Nekateri viri poročajo tudi o spiralni obliki celic, ki so v VBNC stanju. Večja živost in manjša kultivabilnost celic sta posledica stanja VBNC pri stradanju (Klančnik in sod., 2009a).

Odziv na oksidativni stres pri večini enteričnih gram negativnih bakterij je reguliran z regulatorjema *soxRS* in *oxyR*, ki pri *C. jejuni* nista prisotna, prisoten pa je regulator *perR*. Oksidativni stres vpliva na morfologijo, kultivabilnost in preživelost celic, vendar v manjši meri kot stradanje. Prav tako lahko oksidativni stres sproži prehod v VBNC stanje, vendar je tudi tega manj kot pri stradanju. Določeno število celic preide v kokoidno obliko, vendar je večina degeneriranih, le nekatere so sposobne pretvorbe nazaj v aktivno obliko. Del populacije spiralno obliko obdrži, ali jo po končani izpostavitvi stresu ponovno pridobi (Klančnik in sod., 2008). Kampilobaktri so mikroaerofilne bakterije in najbolje rastejo pri parcialnem tlaku kisika (pO_2) med 2 in 20 %. Rast *C. jejuni* NCTC 11168 ob prisotnosti kisika je odvisna tudi od gostote celic. Pri gostoti celic višji od 10^7 CFU/ml, bakterije rastejo bolje v aerobnih kot v mikroaerofilnih pogojih, ob pomanjkanju kisika pa ne rastejo. Kadar je gostota celic med 10^5 in 10^6 CFU/ml, je rast podobna v obeh pogojih, pri gostoti celic nižji od 10^5 CFU/ml, pa je rast boljša v mikroaerofilnih pogojih. Pod 10^4 CFU/ml *C. jejuni* NCTC 11168 ne raste v mikroaerofilnih pogojih. To kaže na to, da pomanjkanje kisika pri kulturah z visoko gostoto celic omejuje rast, pri kulturah z nizko gostoto celic pa je prisotnost kisika lahko tudi toksična. To bi bilo lahko povezano z medceličnim komuniciranjem, ki deluje bolje, kadar je gostota celic višja, saj bakterije lahko bolj učinkovito komunicirajo preko signalnih molekul in se tako zaščitijo pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) (Kaakoush in sod., 2007). Pri kampilobaktrih so znani encimski in neencimski antioksidativni obrambni sistemi, ki preprečijo škodljive učinke ROS in popravljajo poškodbe na celici (Klančnik, 2006).

2.3 ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter* PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM

2.3.1 Membranske izlivne črpalke

K odpornosti na protimikrobne snovi pri kampilobaktrih prispevajo tudi membranske izlivne črpalke. Pri bakterijah rodu *Campylobacter* so v membrani odkrili dve izlivni črpalci, ki pripadata družini RND. To sta črpalci CmeABC in CmeDEF. Črpalca CmeABC

je odgovorna za iznos antibiotikov, žolčnih soli in detergentov iz celice, kar prispeva k zagotavljanju intrinzične odpornosti proti protimikrobnim snovem. Črpalka CmeDEF ima sekundarno vlogo pri zagotavljanju odpornosti proti protimikrobnim snovem in sodeluje s črpalko CmeABC (Akiba in sod., 2006).

Črpalka CmeABC je sestavljena iz treh proteinov. CmeA je periplazemski fuzijski protein, CmeB je transporter v notranji membrani, protein CmeC pa leži na zunanji strani membrane. Te tri proteine kodira operon, ki je sestavljen iz genov *cmeA*, *cmeB* in *cmeC*. Omenjeni proteini delujejo skupaj kot membranska izlivna črpalka, ki tvori kanal, skozi katerega je omogočeno izločanje toksičnih snovi iz celice (Lin in sod., 2002). Gu in sod. (2007) so ugotovili, da črpalka CmeABC bistveno pripomore k intrinzični odpornosti *C. jejuni* na različne protimikrobne snovi, kot so npr. makrolidi, fluorokinoloni, kloramfenikol, rifampin, tetraciklin, ampicilin, kovinski ioni in žolčne soli, sistem izlivnih črpalk pa je tudi velikega pomena za kolonizacijo v prebavnem traktu, kjer so tudi naravno prisotne protimikrobne snovi.

Izlivna črpalka CmeDEF je prav tako sestavljena iz treh delov: CmeD je protein na zunanji strani membrane, CmeE je periplazemski fuzijski protein, CmeF pa deluje kot transporter v notranji membrani. Kodira jih operon *cmeDEF*. Tudi črpalka CmeDEF je vpletena v intrinzično odpornost *C. jejuni* proti protimikrobnim snovem, vendar ima sekundarno vlogo, saj je izlivna črpalka dominantna, CmeDEF pa je lahko primarno izražena v določenih pogojih. Kljub razlikam v izražanju obeh črpalk, naj bi obe delovali vzajemno, saj inaktivacija CmeDEF poveča izražanje črpalke CmeABC. Če pri sevih z mutacijo v genu *cmeF* opazimo povečano odpornost proti protimikrobnim snovem v primerjavi z divjim tipom, je to najverjetneje zaradi povečanega delovanja CmeB in s tem večjega iznosa protimikrobnih snovi (Akiba in sod., 2006). Raziskave so pokazale, da je mutacija v genu *cmeB* povezana z mnogokratno odpornostjo na antibiotike. Odpornost je v večji meri povezana s prekomernim izražanjem gena *cmeB*, kot pa *cmeF*. Ko so inaktivirali gen *cmeB*, so opazili večkratno znižanje vrednosti MIK v številnih izolatih z mnogokratno odpornostjo na antibiotike, kar pomeni, da je pri protimikrobni odpornosti nedvomno vpletena črpalka CmeABC (Pumbwe in sod., 2006).

Izražanje membranskih izlivnih črpalk je nadzorovano s transkripcijskimi regulatorji, ki zavirajo ali aktivirajo transkripcijo genov izlivnih črpalk. Tak regulator je tudi CmeR, ki pri *C. jejuni* nadzoruje in omogoča produkcijo črpalke CmeABC v skladu s potrebami celice (Lin in sod., 2005). CmeR se veže direktno na operator v intergenski regiji in tako prepreči transkripcijo operona *cmeABC*. Mutacija v genu *cmeR* prepreči represijo in posledica je povečano izražanje gena *cmeABC*, kar pomeni prekomerno izražanje črpalke CmeABC, to pa vodi v povečano odpornost proti mnogim antibiotikom (Gu in sod., 2007).

2.3.2 Protimikrobne snovi rastlinskega izvora

Rastline proizvajajo številne sekundarne metabolite, kot so tanini, terpenoidi, alkaloidi in flavonoidi, za katere se je *in vitro* izkazalo, da imajo protimikrobne učinke. Rastlinske snovi imajo torej velik potencial pri razvijanju novih protimikrobnih učinkovin, vendar je to področje še vedno precej slabo raziskano. Možno je, da protimikrobne sestavine rastlin delujejo na bakterije z drugačnim mehanizmom kot že znani antibiotiki, kar bi lahko služilo kot nov vir snovi s protimikrobnim delovanjem, s katerimi bi lahko zdravili infekcije, ki jih povzročajo odporni sevi patogenih mikroorganizmov (Cowan, 1999).

2.3.2.1 Učinek protimikrobnih snovi rastlinskega izvora na celico

Protimikrobni učinek določene rastlinske snovi je odvisen od številnih dejavnikov. Pomembna sta vrsta in struktura spojine ter njen delež, upoštevati pa je potrebno tudi morebitno sinergistično delovanje, če je prisotnih več vrst aktivnih sestavin. Na to vplivajo številni biološki dejavniki (zrelost, sorta, rastni pogoji, ipd.), pa tudi postopki priprave vzorcev in izbira mikrobiološke metode testiranja protimikrobne učinkovitosti (Klančnik in sod., 2009b). Rastlinske protimikrobne snovi so uporabne tudi v živilstvu. Raziskave pa so pokazale, da medsebojne interakcije med sestavinami živila in rastlinskimi protimikrobnimi snovmi lahko povzročijo zmanjšanje protimikrobne učinkovitosti v primerjavi z *in vitro* študijami (Tajkarimi in sod., 2010).

Rastlinske protimikrobne snovi lahko na celico delujejo na različne načine: z delovanjem na fosfolipidni dvosloj celične membrane, z motenjem delovanja encimskih sistemov, ogrožajo lahko genski material bakterij ali pa povzročijo tvorbo hiperoksidaze maščobnih kislin, do katere pride zaradi oksigenacije nenasičenih maščobnih kislin. Mehanizmi delovanja rastlinskih protimikrobnih učinkovin še vedno niso popolnoma jasni (Tajkarimi in sod., 2010).

2.3.2.2 Vrednotenje protimikrobnega delovanja snovi rastlinskega izvora

Za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov trenutno ni določene standardne metode. Za *kampilobakte* se najpogosteje uporabljata metodi razredčevanja v agarju in metoda razredčevanja v tekočem gojišču. Za testiranje protimikrobne učinkovitosti rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin je najpogosteje uporabljena metoda razredčevanja v tekočem gojišču (King in Dykes, 2008). Izbira metode je sicer odvisna predvsem od namena raziskave in seveda občutljivosti, enostavnosti in možne avtomatizacije (Klančnik in sod., 2009b). Za spremljanje morfoloških sprememb bakterij zaradi vpliva rastlinskih protimikrobnih učinkovin, uporabljamo preiskave s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) (Burt, 2004).

Za kvantitativno določanje protimikrobnega delovanja uporabljamo metode razredčevanja v trdnem ali tekočem gojišču. V tekočih gojiščih določamo protimikrobni učinek s klasično metodo razredčevanja v tekočih gojiščih ali pa z izvedbo v mikrotitrski ploščici, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v tekočem gojišču. Namen te metode je določiti najnižjo koncentracijo protimikrobnega sredstva (MIK), ki inhibira rast preiskovanih bakterij (Klančnik in sod., 2009b). Kadar izvajamo metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici, za dokazovanje bakterijske rasti v gojišču uporabljamo različne indikatorske snovi, npr. tetrazolijeve soli, med njimi 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC) in p-jodonitrotetrazolijev klorid (INT). Tetrazolijeve soli so indikator biološke aktivnosti. Brezbarvne spojine delujejo kot akceptor elektronov in se med bakterijsko rastjo reducirajo v barvne produkte (Eloff, 1998). Metode določanja protimikrobne učinkovitosti niso standardizirane, zato so tudi definicije protimikrobnih učinkov različne, kar pogosto predstavlja problem pri primerjavi podatkov iz literature. Za vrednotenje protimikrobnega učinka se uporablja minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) in minimalna baktericidna koncentracija (MBK) (Burt, 2004). Definicije so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Različni načini vrednotenja protimikrobne aktivnosti in definicije (Burt, 2004).

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

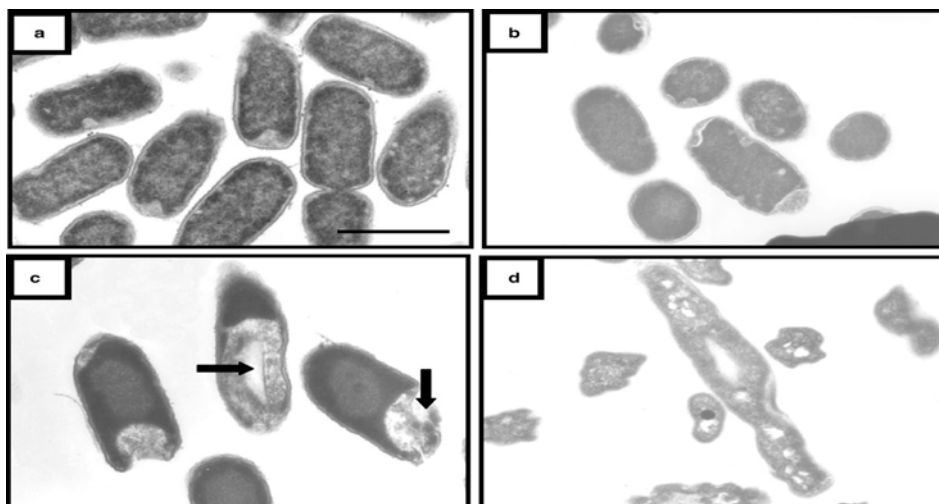
Kinetiko protimikrobnega delovanja spremljamo z analizami krivulj rasti, oziroma odmiranja bakterijske kulture v odvisnosti od časa ob dodatku protimikrobnega sredstva. Najpogosteje uporabljamo merjenje optične gostote ali pa štetje živih celic z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (Burt, 2004).

2.3.2.3 Izveček rožmarina

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je grmičasta mediteranska rastlina, ki jo uvrščamo v družino ustnatic (*Lamiaceae*). Že dolgo se uporablja kot začimba v prehrani, ugotovljeno pa je bilo tudi njegovo antioksidativno in protimikrobno delovanje (Lo in sod., 2002). Snovi s protimikrobnim delovanjem, ki jih najdemo v rožmarinu so predvsem karnozolna kislina, karnozol in rožmarinska kislina (Erkan in sod., 2008). Na tržišču obstajajo številni komercialni izvlečki rožmarina, z različnimi deleži karnozolne in rožmarinske kisline, kot aktivne komponente (Vitiva, 2008). Izveček rožmarina deluje protimikrobno tako na po Gramu pozitivne bakterije (*Bacillus*, *Staphylococcus*), kot na gramnegativne bakterije (*Campylobacter*, *Salmonella*). Grampozitivne bakterije so na v maščobi topen rožmarinov izvleček s karnozolno kislino kot glavno fenolno komponento, še bolj občutljive kot gramnegativne bakterije (Klančnik in sod., 2009c).

2.3.2.4 Kultivabilnost in morfologija bakterij pod vplivom rastlinskih protimikrobnih snovi

Rastlinske protimikrobne snovi imajo vpliv tako na grampozitivne, kot na gramnegativne bakterije. Izveček zelenega čaja se je izkazal kot zelo učinkovit proti vsem glavnim povzročiteljem okužb s hrano, npr. pri *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* in *Bacillus cereus*. Izveček je inhibiral rast naštetih bakterij za 44-100 %. Z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) so pri *S. Typhimurium* odkrili, da pod vplivom epigalokatehingalata (EGCG) iz zelenega čaja tvori nekakšne skupke celic, ki so verjetno posledica prizadete delitve celic. Fenolne spojine torej lahko zmotijo delitev celic, kar se kaže kot deformacija. Opazimo lahko dolge ali kratke bacile, ali pa kokoidne celice. Pri nižjih koncentracijah izvlečka so opazili le podaljšane celice (Si in sod., 2006). Pri *E. coli* so ob uporabi izvlečka želoda ugotovili, da se je kultivabilnost pri 4MIK zmanjšala za 2 log stopnji v 4 urah, bakterije pa so odmrle po 12 urah. Pri MIK so na membrani opazili izbokline, na nekaterih mestih je membrana puščala in iztekala je znotrajcelična vsebina. Pri 2MIK so opazili ločevanje membrane od celične stene. Pojavile so se poškodbe celične stene in membrane, ponekod pa je bila opazna tudi vakuolizacija (slika c, označeno s puščicami). Pri 4MIK so bila ob celici prisotna amorfnata telesa, celice so bile močno poškodovane, citoplazma je iztekala, kar skupaj vodi v izgubo celične integritete in celično smrt (Suwalak in Voravuthikunchai, 2009).



Slika 3: *E. coli* ob dodatkih različnih koncentracij izvlečka želoda (a) kontrola, (b) MIK, (c) 2MIK, (d) 4MIK (Suwalak in Voravuthikunchai, 2009).

Pri grampozitivnih bakterijah so prav tako opazne spremembe na celicah ob dodatku naravnih protimikrobnih snovi. Pri *Micrococcus luteus* so po dodatku klopnega defenzina opazili lizo membrane in puščanje celične vsebine. Celice se tudi niso pravilno delile. Po eni uri je bila pri vseh koncentracijah klopnega defenzina populacija bakterij pobita (Nakajima in sod., 2003). Pri *S. aureus* so ob dodatku izvlečka zelenega čaja opazili skupke kokov v procesu delitve- celice so bile le delno razdeljene, celična stena pa se je še bolj učvrstila (Hamilton-Miller in Shah, 1999).

DeMello (2002) je raziskovala morfološke spremembe *C. jejuni*, ob izpostavitvi žolčnim solem, kislini in nizki temperaturi. Različne oblike celic so lahko tudi stanje prehoda iz spiralne v kokoidno obliko. Čeprav točen mehanizem prehoda celic v kokoidno obliko ni znan, obstaja več različnih načinov. Najlažja oblika prehoda je krajšanje celic in postopno oblikovanje okrogle in nabrekle oblike (protuberanca na sredini), kar se pogosto dogaja v stresnih pogojih. Drug način tvorbe kokov je spajanje dveh spiralnih celic. Dve celici se medsebojno prepletata, dokler se njuna vsebina se spoji. Celica postane krajša in močnejša, na mestu spoja pa nastane protuberanca (angl. protuberance)- "nabrekanje", kar da celici obliko krogle. Možen je tudi prehod v obliki prstana. Celica se upogne, kot bi se delila, vendar namesto delitve celica na sredini nabrekne, konca se spojita, prstan se zapre in tvori okroglo obliko. Pri formaciji degenerativnih kokoidnih celic, se celica na enem koncu odebeli, celična stena se začne ločevati od membrane in štrli iz nje. Ko se celična stena razteguje, izgubi integriteto in celična vsebina začne uhajati iz nje. To je pogosto povezano tudi s tvorbo takoiimenovanih blebov (angl. bleb formation). Posledica tega je okrogla, prazna citoplazma z raztegnjeno membrano in nefunkcionalna celica. Kljub temu pa je oblika, vidna pod mikroskopom, lahko tudi zavajajoča, sploh pri kampilobaktrih, ki so spiralne oblike. Pod različnimi koti namreč opazimo različne oblike. Spiralna celica lahko zaradi različnih kotov postavitve izgleda tudi v obliki črke C, odebeljena na enem koncu, ali pa v obliki prstana (DeMello, 2002).

Klančnik in sod. (2009b) poročajo, da so se celice *C. jejuni* po dodatku izvlečka rožmarina V40 spremenile v bacilarne ali kokoidne oblike, preko vpliva na nepravilno deljenje in z nastankom por v celični ovojnici. Dodatek izvlečka rožmarina V40 učinkovito inhibira rast *C. jejuni*. Inhibicija rasti je odvisna od koncentracije izvlečka in začetne koncentracije celic, pa tudi medija v katerem se bakterije nahajajo (Piskernik in sod., 2011).

2.4 SISTEM ZA SIGNALIZIRANJE PRI BAKTERIJAH VRSTE *Campylobacter*

2.4.1 Signalne molekule pri bakterijah *C. jejuni*

Sistem za medcelično signaliziranje je bil prvič opisan na bakteriji *Vibrio fischeri*, ki proizvaja bioluminiscenco in je simbiot v posebnih svetlobnih organih morskega mehkužca *Euprymna scolopes* in ribe *Monocentris japonicus* (Gobbetti in sod., 2007).

Medcelično signaliziranje je znano pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah. Bakterijski populaciji omogoča, da preko medcelične komunikacije nadzoruje izražanje določenih genov in s tem regulira vrsto fizioloških funkcij. Populacija na ta način lahko uskladi obnašanje in deluje enotno. Medcelično signaliziranje vključuje produkcijo in zaznavanje ekstracelularnih signalnih molekul, ki jih imenujemo avtoinducerji (angl. autoinducers, AI). Obstajajo različne signalne molekule, oz. avtoinducerji in različni mehanizmi detekcije teh molekul. Sistem za signaliziranje je torej prilagojen različnim potrebam bakterij. Omogoča komuniciranje znotraj posamezne vrste ali med različnimi vrstami bakterij, pomembno vlogo pa ima tudi pri nastanku biofilmov. Medcelično signaliziranje ima vlogo tudi pri virulenci humanih patogenih bakterij. S tem sistemom lahko zmedejo imunski sistem gostitelja, tako, da začnejo proizvajati virulenčne faktorje šele, ko je število celic dovolj veliko, da lahko izzovejo učinkovito infekcijo (Bassler, 1999).

Celično signaliziranje nadzira predvsem takšne procese, ki niso dovolj učinkoviti, če bakterijska populacija ni dovolj velika (npr. izločanje virulenčnih dejavnikov). Proizvodnja avtoinducerjev je odvisna od gostote celic in je bolj izrazita, kadar je gostota celic večja. Večina avtoinducerjev omogoča komunikacijo znotraj posamezne vrste bakterij, avtoinducer AI-2 pa naj bi bil univerzalna signalna molekula, ki omogoča komunikacijo tudi med različnimi vrstami bakterij (Xavier in Bassler, 2003).

Pri grampozitivnih bakterijah je medcelično signaliziranje povezano predvsem s produkcijo in zaznavanjem modificiranih peptidnih molekul, avtoinducerji pri gramnegativnih bakterijah pa so pogosto acil-homoserin laktoni (Plummer in sod., 2011). Genom bakterij *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 ima gene, ki kodirajo encim LuxS, ki je potreben za sintezo AI-2 molekul, vendar ne vsebuje genov, ki bi kodirali katerokoli znano acil-homoserin lakton sintetazo (Elvers in Park, 2002).

AI-2 molekule so trenutno edini znan sistem medceličnega signaliziranja, ki je značilen tako za grampozitivne kot za gramnegativne bakterije (Williams in sod., 2007). Modelni organizem, pri katerem so proučevali sistem AI-2 je *Vibrio harvey*. Sistem AI-2 deluje

tako, da sproži bioluminiscenco. Za produkcijo AI-2 molekul je odgovoren sistem LuxS (Ryan in Dow, 2008). Pri bakterijah *C. jejuni* sta Elvers in Park (2002) odkrila, da pri medceličnem signaliziranju sodeluje molekula, ki je zelo tesno povezana z AI-2 signalnimi molekulami, čeprav genom *C. jejuni* ne vsebuje genov, ki kodirajo acil-homoserin lakton sintetazo.

Gen *luxS* ima vlogo pri gibljivosti bakterij, aglutinaciji, kolonizaciji prebavnega trakta, izločanju toksinov in virulenci (Plummer in sod., 2012). Sistem LuxS in proizvodnja AI-2, bi lahko bila tarča novih protimikrobnih snovi s širokim spektrom delovanja, saj je ta sistem razširjen pri mnogih bakterijskih vrstah (Lewis in sod., 2001).

2.4.2 Sistem za signaliziranje LuxS

Razkritje genoma *C. jejuni* (Parkhill in sod., 2000) je pokazalo, da je prisoten gen *luxS*, ki je zelo podoben *luxS*, ki ga najdemo pri drugih vrstah bakterij (Elvers in Park, 2002). LuxS kot encim sodeluje pri metabolizmu s-adenozilmetionina (SAM) in je prekursor pri sintezi AI-2, ki delujejo kot signalne molekule pri medceličnem komuniciranju (Plummer, 2012). LuxS, oz. S-Ribozilhomocisteinaza je metaloencim, ki za delovanje uporablja Fe^{2+} in katalizira interno redoks reakcijo pri sintezi AI-2. Cepi tioestrsko vez v S-ribozilhomocisteinu, ki zato razpade na homocistein in 4,5-dihidroksi-2,3-pentandion (DPD). Ta reakcija je pomembna zato, ker služi kot odstranjevanje S-adenozilhomocisteina (SAH), ki je za celico toksičen, DPD pa v spontanah cikličnih reakcijah tvori molekule AI-2 (Pei in Zhu, 2004; Plummer, 2012). Homocistein vstopa v nadaljnje reakcije in tako nastaja S-adenozilmetionin (SAM) (Plummer, 2012). Produkt spontane ciklizacije DPD ni le ene vrste molekula, ampak več različnih, ki imajo različne možnosti spajanja z AI-2 receptorji, zato se je izraz AI-2 uveljavil za številne molekule, ki nastajajo iz DPD in so ligandi AI-2 receptorjev (Plummer, 2012).

Molekularna struktura AI-2, ki jih proizvaja *C. jejuni*, zaenkrat še ni znana. Kristalna struktura LuxS pri *C. jejuni* prav tako še ni znana, vendar genomska sekvenca *C. jejuni* kaže podobnosti z nekaterimi drugimi bakterijami (Plummer, 2012). LuxS pri *C. jejuni* je v 74 % aminokislinske sestave podoben LuxS pri *V. harvey* in le v 40 % *Helicobacter pylori*, čeprav sta si s slednjim v bližji filogenetski povezavi (Elvers in Park, 2002). Strukturna analiza je pokazala, da je encim LuxS homodimer z dvema identičnima aktivnima deloma, kjer je prisoten Fe^{2+} . Na vsaki aktivni strani je prisoten žep, ki verjetno služi kovalentni vezi z molekulom homocisteina, vendar točna vloga še ni znana. Encimska aktivnost LuxS vključuje serijo protonskih reakcij, ki jih katalizirata dve Lewisovi kislini oz. bazi in divalentni železov ion (Plummer, 2012). Pri *C. jejuni* kot glavni kislini/bazi delujeta Cys-84 in Glu-57, za polno aktivnost LuxS pa so pomembni tudi Ser-6, His-11 in Arg-39 (Plummer in sod., 2011).

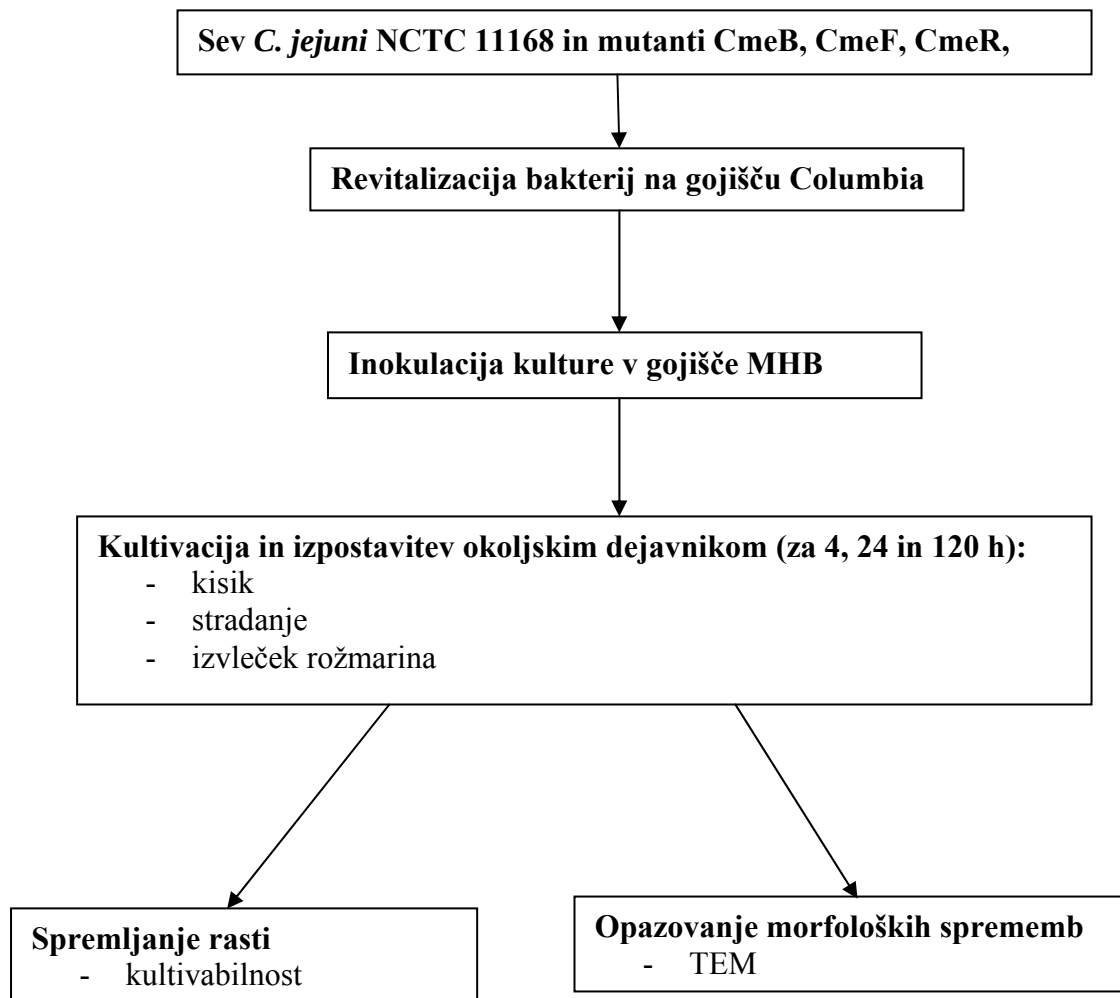
Gen *luxS* je prisoten pri 35 od 89 bakterijskih vrst, za katere je znan celoten genom. Pri vseh se je izkazalo, da inaktivacija gena *luxS* povzroči prenehanje produkcije AI-2 (Xavier in Bassler, 2003). Pri *Campylobacter jejuni* je prisoten gen *luxS*, vendar pa to ni značilno za vse kampilobakte. Pri *C. jejuni* in *C. coli* je bila ugotovljena prisotnost gena *luxS*, pri *C.*

lari pa ne (Tazumi in sod., 2011). Glavna funkcija LuxS v bakterijah je delovanje v ciklusu reciklacije SAM. Pri LuxS mutantih je moteno delovanje tega cikla, kar vpliva na celični metabolizem, saj je SAM glavni donor metilnih skupin, ki sodelujejo v metilaciji DNK, kemotaksi, gibljivosti, sintezi vitaminov in drugih metabolnih reakcijah (Plummer, 2012). Mutacija gena *luxS* zmoti tudi tvorbo biofilmov in izločanje virulenčnih faktorjev. Številne študije kažejo, da so LuxS mutanti defektni in so tudi manj patogeni (Lyon in sod., 2001). Obstajajo pa tudi raziskave, ki pravijo, da so LuxS mutanti skoraj enako virulentni kot divji tipi bakterij (Schneider in sod., 2002). Razlogi za tako nasprotujoče rezultate še niso povsem pojasnjeni, lahko pa, da so LuxS mutanti ponovno pridobili virulentnost zaradi AI-2, ki jih izločajo druge bakterije v gostitelju, kadar gre za *in vivo* pogoje (Pei in Zhu, 2004). Ugotovili so tudi, da razmere v živilu lahko zmanjšajo AI-2 aktivnost, neodvisno od LuxS (Goelz in sod., 2011).

Študije kažejo, da je rast LuxS mutantov *C. jejuni* NCTC 11168 v primerjavi z divjim tipom praktično enaka, podoben je tudi čas podvojitve in čas do vstopa v stacionarno fazo. (Plummer, 2012). Elvers in Park (2002) sta dokazala, da ima LuxS vlogo tudi pri gibljivosti *C. jejuni*. LuxS mutanti so manj gibljivi kot divji tip in imajo tudi manjšo sposobnost aglutinacije (Plummer, 2012). He in sod. (2008) so pri *C. jejuni* NCTC 81-176 dokazali, da so *C. jejuni* LuxS mutanti v primerjavi z divjim tipom bolj občutljivi tudi na oksidativni stres, čeprav kljub temu ni jasno, ali imajo tudi AI-2 vlogo pri prilagoditvi na kisikov stres. Nasprotno pa Elvers in Park (2002) z uporabo vodikovega peroksida in parakvata (angl. paraquat) pri LuxS mutantih *C. jejuni* NCTC 11168 nista opazila razlike pri občutljivosti na oksidativni stres.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 POTEK DELA



Slika 4: Shema eksperimentalnega poteka diplomske naloge

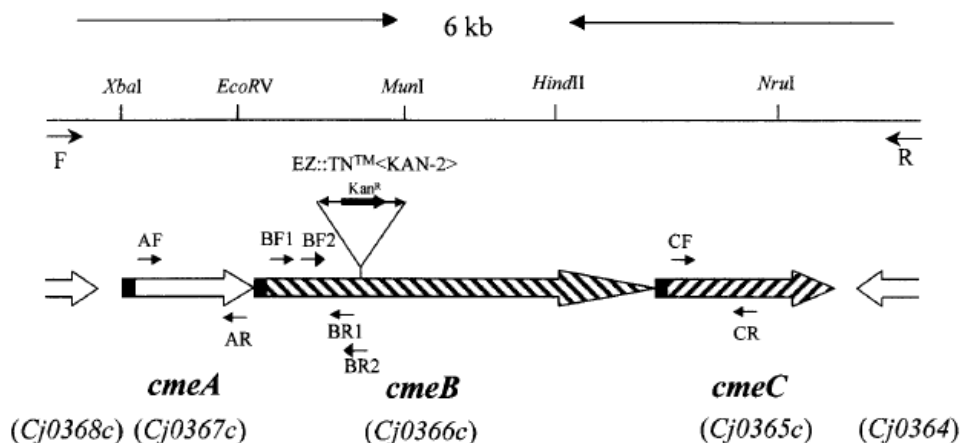
3.2. MATERIAL

3.2.1 Delovni mikroorganizem

Za eksperiment smo uporabili referenčni sev *Campylobacter jejuni* NCTC 11168, posredovan od prof. dr. Sophie Payot iz Francije.

Za preučevanje vpliva mutacij v genih za izlivne črpalke, regulatornem proteinu in sistemu za signaliziranje, smo uporabili mutante CmeB, CmeF, CmeR in LuxS. Bakterijski DNK za mutante je posredoval prof. dr. Qijing Zhang (Iowa State University, College of Veterinary Medicine, Iowa, ZDA). Mutirane seve je z uporabo naravne transformacije in DNK mutantov, ki ga je poslal dr. Zhang, naredila dr. Anja Klančnik (Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija).

Pri mutantu CmeB, je bila zavrtta izlivna črpalka CmeABC, ki sodeluje pri protimikrobni odpornosti. Mutant CmeB je bil pridobljen z insercijsko mutagenezo. V gen *cmeB* so vstavili transpozona EZ::TN in <KAN-2> (Lin in sod., 2002). Pri mutantu CmeF je bila zavrtta črpalka CmeDEF, ki ima pri protimikrobni odpornosti sekundarno vlogo. Tudi tu je bil gen inaktiviran z insercijsko mutagenezo. Gen *cmeF* je bil prekinjen s kaseto cat (Akiba in sod., 2006). Pri CmeR mutantu, je bil prav tako z insercijsko mutagenezo zavrt gen za regulatorni protein CmeR, ki regulira izražanje črpalke CmeABC (Lin in sod., 2005).



Slika 5: Organizacija genoma in lastnosti operona *cmeABC* pri *C. jejuni* 81-176 (Lin in sod., 2002).

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

Pri mutantu LuxS je bila z insercijsko mutagenozo povzročena mutacija na genu *luxS*, ki vpliva na sistem za signaliziranje. To lahko povzroči spremembe v gibljivosti, sposobnosti kolonizacije in virulenci. V gen *luxS* je bil vstavljen kan transpozon (Plummer in sod. 2011).

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Tekoče gojišče MHB

Sestavine:

- 10,5 g osnovnega medija Mueller Hinton Broth (Merck, 1.10293.0500)
- 500 mL destilirane vode

Priprava:

10,5 g osnovnega medija Mueller Hinton Broth raztopimo v 500 mL destilirane vode. Steriliziramo v avtoklavu pri 120 °C, 20 minut. Ohladimo in hranimo do uporabe pri 4 °C.

3.2.2.2. Krvni agar Columbia

Sestavine:

- 19,5 g osnovnega medija Columbia agar base (CM331, Oxoid)
- 500 mL destilirane vode
- 1 steklenička dodatka za rast (angl. *Campylobacter* Growth Supplement Liquid
- 1 steklenička dodatka za selektivnost (angl. *Campylobacter* growth supplement Skirrow)
- 100 mL defibrilirane konjske krvi (SR048C, Oxoid)

Priprava:

19,5 g osnovnega medija Columbia agar base raztopimo v 500 mL destilirane vode. Steriliziramo v avtoklavu pri 120 °C, 20 minut. Po sterilizaciji raztopino ohladimo na približno 40 °C in aseptično dodamo 1 stekleničko dodatka za selektivnost, ki smo jo predhodno raztopili v 2 mL sterilne destilirane vode. Dodamo tudi 100 mL defibrilirane konjske krvi in 1 stekleničko dodatka za rast. Še tekoče gojišče dobro premešamo in aseptično razlijemo v sterilne petrijevke, ter hranimo do uporabe pri 4 °C.

3.2.2.3 Trdno gojišče AHB (Abeyta-Hunt-Bark)

Sestavine:

- 20 g osnovnega medija Bacto TM Heart Infusion agar (CM375, Oxoid)
- 1 g kvasnega ekstrakta Yeast extract (CM19, Oxoid)
- 500 mL destilirane vode
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* growth supplement (SR232E, Oxoid)
- 5 mL 1 % raztopine trifetil-tetrazolijevega klorida (TTC)

Priprava 1 % raztopine TTC:

- 0,05 g TTC raztopimo v 5 mL sterilne, bidestilirane vode. Epruveto s pripravljeno raztopino TTC hranimo do nadaljne uporabe zaradi občutljivosti na svetlobo v temi, pri 4 °C.

Priprava:

20 g osnovnega medija Bacto TM Heart Infusion agar raztopimo v 500 mL destilirane vode. Steriliziramo v avtoklavu pri 120 °C, 20 minut. Po sterilizaciji raztopino ohladimo na približno 40 °C in aseptično dodamo 5 mL raztopine TTC ter 1 stekleničko dodatka za rast. Še tekoče gojišče dobro premešamo in aseptično razlijemo v sterilne petrijevke, ter hranimo do uporabe pri 4 °C. Zaradi občutljivosti TTC na svetlobo, gojišča hranimo v temi.

3.2.3 Izvleček rožmarina

Uporabili smo komercialno pripravljen izvleček rožmarina v prahu V40 (Vitiva d.d., Slovenija), ki smo ga pred uporabo ustrezno pripravili. Aktivna sestavina v ekstraktu je karnozolna kislina (40 %). Postopek priprave je opisan v točki 3.3.2.

3.2.4 Raztopine, reagenti

Preglednica 2: Raztopine in reagenti, uporabljeni v eksperimentalnem delu.

Kemikalija	Sestava/priprava
Fosfatna pufrna sol (PBS)	<u>Sestavine:</u> - 5 tablet PBS (Phosphate buffered saline, Dulbecco A) - 500 mL destilirane vode <u>Priprava:</u> Tablete PBS dobro raztopimo v destilirani vodi in steriliziramo v avtoklavu pri 120 °C, 20 minut.
Absolutni etanol	Proizvajalec: Merck
Fosfor volframova kislina	<u>Sestavine:</u> - 1 g fosfor volframove kisline - 50 mL sterilne bidestilirane vode - 3M KOH <u>Priprava:</u> Fosfor volframovo kislino raztopimo v približno 20 mL bidestilirane vode. S pH metrom preverimo pH in ga s KOH uravnamo na vrednost med 4 in 5. Nato dopolnimo vsebino s sterilno bidestilirano vodo do 50 mL. Raztopino filtriramo skozi filter s porami 0,2 µm, da se zbistri.

3.2.5 Laboratorijska oprema in material

Preglednica 3: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu

Oprema	Oznaka	Proizvajalec
Avtomatske pipete in nastavki	10 µL, 100 µL, 1000 µL, 10 mL	Eppendorf, Nemčija Gilson, Francija
Avtoklav	Tip 500 x 700 A-21	Sutjeska, Beograd Kambič, Slovenija
Inkubator	I-115 C	Kambič, Slovenija
Hladilnik	/	Zanussi, Japonska
Plinski gorilnik	/	/
Digestorij	Tip 382	Med-lab Rauh, Slovenija
Vrtinčno mešalo	Yellowline	Ika, Belgija
Tehtnice	PB 1502-S Sartorius, analytic	Mettler toledo, Švica GMBH, Nemčija
Zamrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Plinska jeklenka z mešanico plinov	10 % CO ₂ , 3 % O ₂ , 87 % N ₂	Istragas, Slovenija
Sušilnik laboratorijske steklovine	SO-250	Elektromedicina Ljubljana, Slovenija
Mrežice za pripravo mikroskopskih vzorcev	/	/
Transmisijski elektronski mikroskop	CM 100	Philips, Philips electronics N.V. Eindhoven

Poleg naštetega smo uporabili še splošno laboratorijsko opremo:

Petrijeve plošče (Labortechnika Golias), deepwell plošče, cepilne zanke, epruvete, 1 mL plastične epruvete (Eppendorf, Nemčija), laboratorijske steklenice 1000 mL (Duran, Nemčija), parafilm (PM 992 American national Can), anaerobni lonec (Oxoid Ago), plastične cepilne zanke, pinceta za elektronski mikroskop.

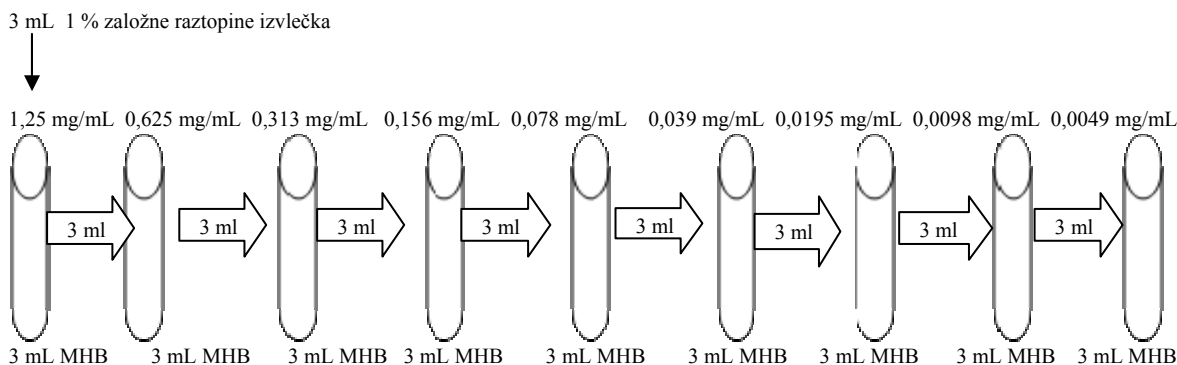
3.3 METODE

3.3.1 Revitalizacija sevov in priprava inokuluma

Sevi, ki smo jih uporabili pri eksperimentu so bili shranjeni pri temperaturi -80°C . Kulture smo prenesli na petrijeve plošče s krvnim agarjem Columbia in jih inkubirali 24 ur pri temperaturi 42°C v mikroaerofilnih pogojih. Po končani inkubaciji smo pripravili inokulum in sicer tako, da smo s cepilno zanko kolonije posameznih sevov prenesli v 5 mL tekočega gojišča MHB, ki smo mu dodali 0,2 mL defibrilirane konjske krvi. Sledila je inkubacija 24 ur, pri 42°C v mikroaerofilnih pogojih. Po inkubaciji smo prenesli 0,15 mL kulture v 10 mL gojišča MHB. Tako pripravljen inokulum smo uporabili v vseh nadaljnjih poskusih.

3.3.2 Priprava izvlečka rožmarina

V 1 mL absolutnega etanola smo raztopili 0,01 g izvlečka rožmarina v prahu in dobro premešali. Dobili smo 1 % založno raztopino, ki smo ji dodali 3 mL tekočega gojišča MHB. Tako pripravljeno 0,25 % raztopino izvlečka smo uporabili za nadaljnje razredčevanje do želenih koncentracij, kot kaže slika.



Slika 6: Shema razredčevanja rožmarinovega izvlečka do želenih koncentracij.

3.3.3 Mikrodilucijska metoda v bujonu in kultivacija

Za izvedbo mikrodilucijske metode smo uporabili sterilne mikrotitrne plošče s pokrovom, z volumnom 2 mL. Eksperiment smo izvajali v paralelkah, torej smo vsak vzorec pripravili dvakrat. V vdolbino smo odmerili 0,5 mL izvlečka eno stopnjo višje koncentracije, kot smo jo želeli v vzorcu (priprava je opisana v točki 3.3.2.) in dodali 0,5 mL inokuluma (priprava je opisana v točki 3.3.1.). Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo v vdolbino dali 0,5 mL inokuluma in 0,5 mL gojišča MHB. Ploščo smo pokrili in premešali na stresalniku mikrotitrskih plošč ter jo nato inkubirali v mikroaerofilnih pogojih pri 42°C

4, 24 in 120 ur. Po končani inkubaciji smo odvzeli vzorce za določanje koncentracije kultivabilnih celic in preiskavo na presevnem elektronskem mikroskopu.

3.3.4 Izpostavitve celic stradanju in kisiku

Izvedba poskusa z oksidativnim stresom in stradanjem je potekala v plastičnih epruvetkah Eppendorf z volumnom 1 mL. Za izvedbo poskusa s kisikom smo dali v epruvetko 1 mL inokuluma (postopek priprave opisan v točki 3.3.1.) in ga inkubirali pri 42 °C v aerobnih pogojih 4, 24 in 120 ur. Kontrolni vzorec je bil pripravljen enako, le da smo ga inkubirali v mikroaerofilnih pogojih. Za izvedbo stradanja smo dali v epruvetko 1 mL inokuluma in ga centrifugirali približno 1 minuto. Supernatant smo odlili in zavrgli, usedlini pa dodali 1 mL PBS ter dobro premešali na vrtničnem mešalu. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali na 42 °C v mikroaerofilnih pogojih 4, 24 in 120 ur. Za kontrolni vzorec smo inokulum brez centrifugiranja in dodatka PBS inkubirali na 42 °C v mikroaerofilnih pogojih. Po končani inkubaciji smo odvzeli vzorce za določanje koncentracije celic in vzorce za elektronsko mikroskopijo.

3.3.5 Določanje koncentracije kultivabilnih celic

Koncentracijo bakterijskih celic po določenem času inkubacije smo v vzorcih določali z metodo nakapljanje plošče, preko štetja bakterijskih kolonij. Uporabili smo trdno gojišče AHB z dodatkom TTC. Med rastjo bakterij na takšnem gojišču pride do redukcije TTC do formazana, kar kolonije obarva rdeče, zato jih lahko enostavno preštejemo.

Za izvedbo poskusa smo vsak vzorec po končani inkubaciji najprej ustrezno razredčili po Kochu. V vsako epruvetko smo dali po 0,9 mL PBS. Nato smo v prvo epruvetko dodali 0,1 mL vzorca in premešali. Iz te mešanice smo spet vzeli 0,1 mL in dodali k naslednjim 0,9 mL PBS ter premešali. To smo ponavljali do razredčitve 10^{-8} . Predhodno osušene plošče smo razdelili na 5 delov in na vsakega aseptično kanili 3 kapljice, vsako po 10 µL vzorca ustrezne razredčitve. Na vsak del plošče smo torej nacepili 3 paralelke določene razredčitve vzorca. Razredčitev inokuluma v epruvetki 10^{-6} je na plošči predstavljala razredčitev 10^{-8} , saj smo od 1 mL odvzeli 10 µL, kar je vzorec še dodatno razredčilo. Tako pripravljene plošče smo inkubirali v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C 24-72 ur, kolikor je bilo potrebno, da so na ploščah zrasle kolonije. Povprečno število kolonij na ploščah smo izračunali po formuli:

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

N ... CFU/mL

$\sum c$... vsota kolonij na vseh ploščah

a ... število plošč prve števnice razredčitve

b ... število plošč druge števnice razredčitve

d ... razredčitveni faktor (prve števnice razredčitve)

3.3.6 Presevna elektronska mikroskopija

Morfološke spremembe bakterijskih celic smo spremljali s presevnim elektronskim mikroskopom. Vzorce za mikroskopiranje smo pripravili tako, da smo najprej pripravili dva kosa parafilema. Na vsakega smo kanili toliko kapljic, kot je bilo vzorcev- na enega kapljice (pribl. 50 μL) fosfor wolframove kisline, na drugega pa kapljice sterilne destilirane vode. Fosfor wolframova kislina deluje kot kontraktilno sredstvo, ki se veže na površino celic in jih obarva, da jih lahko razločimo pod mikroskopom. Priprava je opisana v točki 3.2.4. V pinceto za mikroskopiranje vpnemo mrežico (200 rež/mm²), naprašeno s Formwar-jem, s filmom obrnjenim navzgor, na katero kanemo kapljico (pribl. 30 μL) vzorca. Uporabimo nerazredčen vzorec, saj želimo, da bi našli čim več celic. Pazimo, da se kapljica ne razlije in pustimo 3 minute, da se bakterije usedejo na mrežico. Nato mrežico speremo s tremi potegi skozi kapljico vode in se z njo dotaknemo papirnate brisače, ki vpije odvečno tekočino. Mrežico nato postavimo na kapljico 3 % fosfor wolframove kisline (w/v), ki mrežico negativno barva, in pustimo 3 minute. Po pretečenem času mrežico spet osušimo na papirnati brisači in jo postavimo v stojalo z nastavki za mrežice ter pred mikroskopiranjem sušimo 1 uro pri sobni temperaturi.

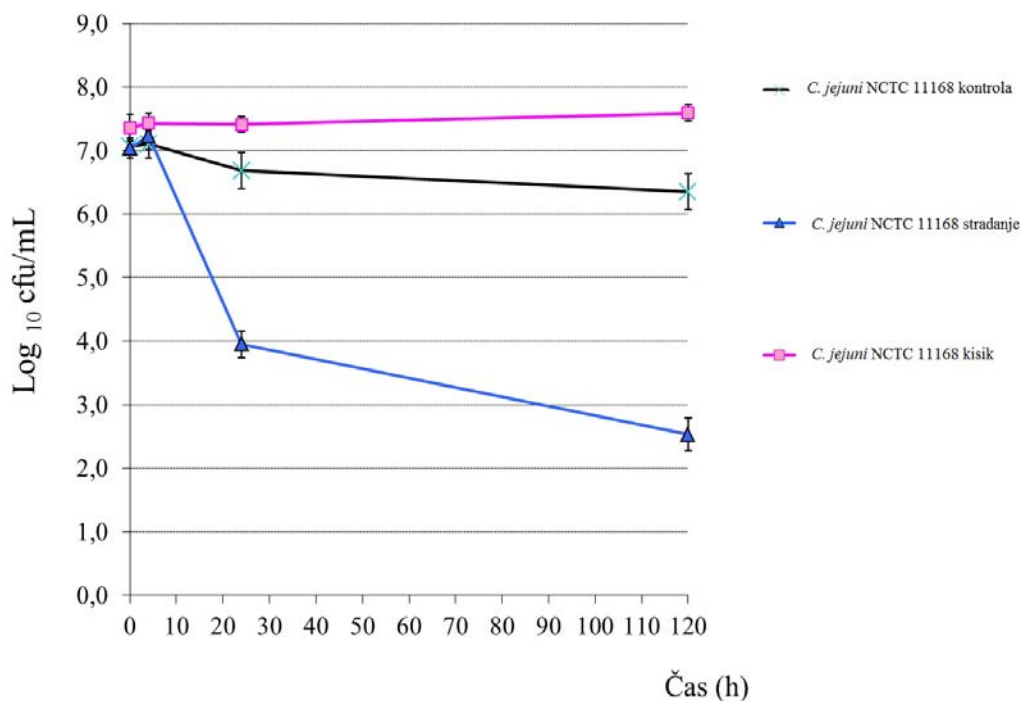
Pripravljeno mrežico z vzorcem vstavimo v mikroskop in s pomikanjem po vidnem polju poiščemo celice. Vmes tudi spreminjamo povečavo in intenziteto svetlobe. Ko najdemo celico, ki jo želimo fotografirati, nastavimo želeno povečavo in sliko izostrimo, nato pa zmanjšamo intenziteto svetlobe, da ne presvetlimo kamere. Vzorec fotografiramo in sliko shranimo na računalnik. Morfologijo celic smo opazovali pri 10 000 do 100 000- kratni povečavi.

4 REZULTATI

V eksperimente v okviru diplomskega dela smo vključili sev *C. jejuni* NCTC 11168 in njegove mutante z mutacijami v genih *cmeB*, *cmeF*, *cmeR* in *luxS*, ki so bili pripravljeni v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete. Pogoji, pri katerih smo preučevali spremembe so bili oksidativni stres, stradanje in dodatek izvlečka rožmarina. Za izbrani sev in mutante smo določili vpliv omenjenih stresov na rast in morfološke spremembe. Rast smo določali z nacepivitvijo vzorcev na trdna gojišča in štetjem kolonij. Preko tega smo dobili rastne krivulje, ki nam kažejo vpliv omenjenih stresov na rast bakterij. Morfološke spremembe smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) pri 10 000 do 100 000-kratni povečavi.

Eksperimenti so bili opravljeni v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Katedri za elektronsko mikroskopijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v času od decembra 2009 do junija 2010.

4.1 VPLIV STRADANJA IN OKSIDATIVNEGA STRESA NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO *C. jejuni* NCTC 11168



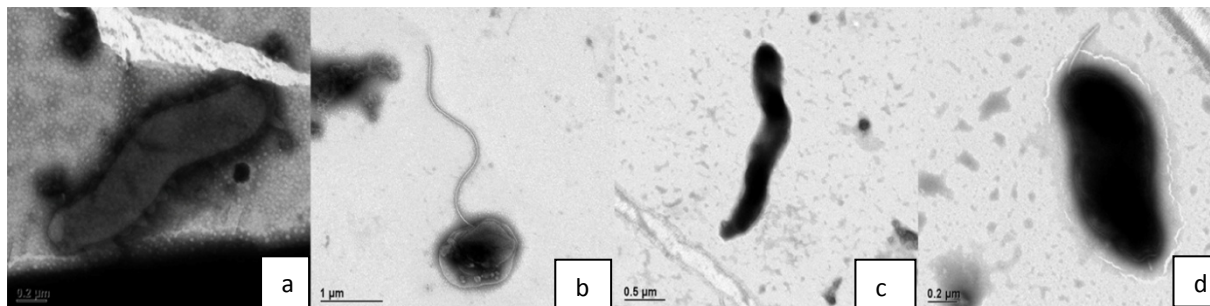
Slika 7: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost *C. jejuni* NCTC 11168

Pri referenčnem vzorcu se je koncentracija med eksperimentom rahlo zmanjševala, vendar so spremembe po 5 dneh manjše od 1 log stopnje, kar pomeni, da je koncentracija celic ves čas približno enaka začetni, oziroma so možna odstopanja v okviru napak.

Ob izpostavitvi bakterij kisiku je bila koncentracija po koncu eksperimenta približno enaka kot na začetku, sprememb v koncentraciji celic praktično ni bilo. Opazili smo, da je bila rast ob oksidativnem stresu nekoliko boljša kot pri referenčnem vzorcu. Začetna koncentracija celic je bila enaka kot pri kontroli, končna koncentracija ob izpostavitvi oksidativnemu stresu pa je bila od končne koncentracije pri kontroli višja za 1 log stopnjo.

Stradanje je bistveno bolj prizadelo bakterijsko rast kot oksidativni stres. V prvih štirih urah se je ob stradanju rast najprej rahlo povečala, po 24 urah pa padla za 3 log CFU/mL. Po 120 urah je koncentracija dosegla 2,5 log CFU/mL. Koncentracija celic ob izpostavitvi stradanju je bila po 5 dneh torej za 5 log stopenj nižja od začetne koncentracije celic.

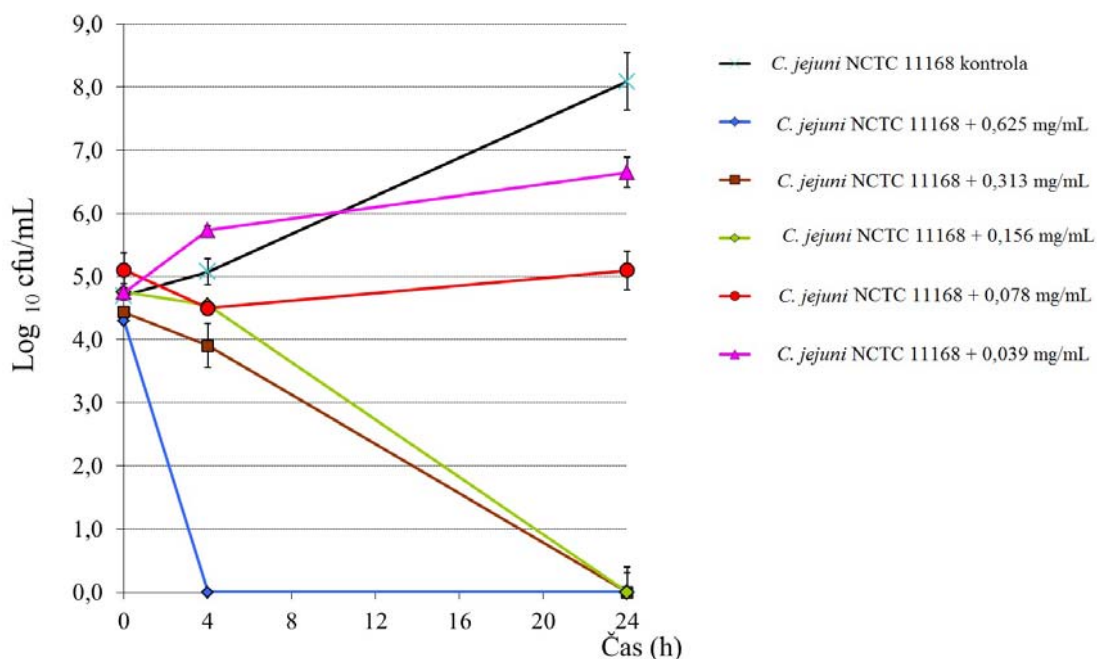
Kot je razvidno iz slike 7, sta bili rast referenčnega seva in seva, izpostavljenega oksidativnemu stresu, precej podobni. Največji upad rasti je bil po 5 dneh viden pri kulturi, ki je bila izpostavljena stradanju.



Slika 8: Morfologija *C. jejuni* NCTC 11168 ob stradanju in oksidativnem stresu: (a) *C. jejuni* NCTC 11168, stradanje, 4 h. Vidne so izbokline na celični ovojnici. (b) *C. jejuni* NCTC 11168 stradanje, 5 dni. Kokoidna oblika celice. (c, d) *C. jejuni* NCTC 11168 kisik, 4 h. Spiralne oblike celic s poškodovano celično ovojnico.

Celice so bile po 4 urah izpostavljenosti stradanju spiralne oblike. Na celični ovojnici so vidne izbokline, lahko, da gre tudi za poškodbe membrane in iztekanje celične vsebine, saj so celice tudi močno obarvane, v okolici pa lahko opazimo tudi razgradne produkte, oz. skupke znotrajcelične vsebine. Celice niso imele bičkov. Po 5 dneh (slika 8b) so bili prisotni koki. Membrana ni bila poškodovana, je gladka in normalno nagubana, iztekanja citoplazme ni videti, večinoma imajo celice tudi bičke. V okolici smo opazili amorfne strukture, ki bi lahko bili razgradni produkti, čeprav poškodb celic nismo opazili. Pri izpostavitvi oksidativnemu stresu (slika 8c, d) so bile po 4 urah prisotne spirale, membrana je ponekod poškodovana in zaradi poškodb so tudi celice temneje obarvane. Bički so pri nekaterih celicah prisotni, pri drugih pa ne, več jih je brez. Po 5 dneh izpostavljenosti kisiku v vzorcu nismo našli celic.

4.2 VPLIV ROŽMARINOVEGA IZVLEČKA V40 NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO *C. jejuni* NCTC 11168

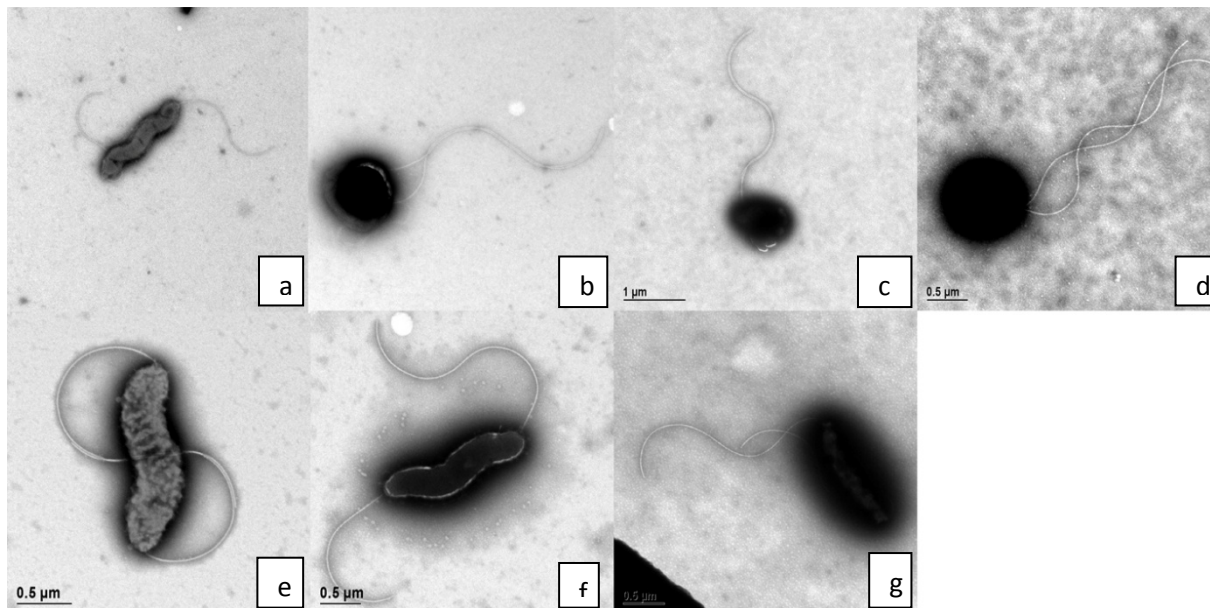


Slika 9: Kultivabilnost bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 ob dodatkih različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40

V vzorcu, kjer nismo dodali izvlečka, je koncentracija celic s časom naraščala in po 24 urah dosegla vrednost približno 8 log CFU/mL. Subinhibitorna koncentracija 0,039 mg/mL je že nekoliko inhibirala rast, po 24 urah je bila koncentracija celic od kontrolnega vzorca manjša za približno 1 log CFU/mL.

Pri koncentraciji izvlečka MİK (0,078 mg/mL) je bila koncentracija celic po 24 urah enaka kot na začetku, od kontrolnega vzorca pa nižja za 3 log stopnje. Sprva je rahlo padala, nato pa rahlo naraščala. Koncentracija 0,625 mg/mL je imela baktericidni učinek že po 4 urah, koncentracija 0,156 mg/mL in 0,313 mg/mL pa po 24 urah.

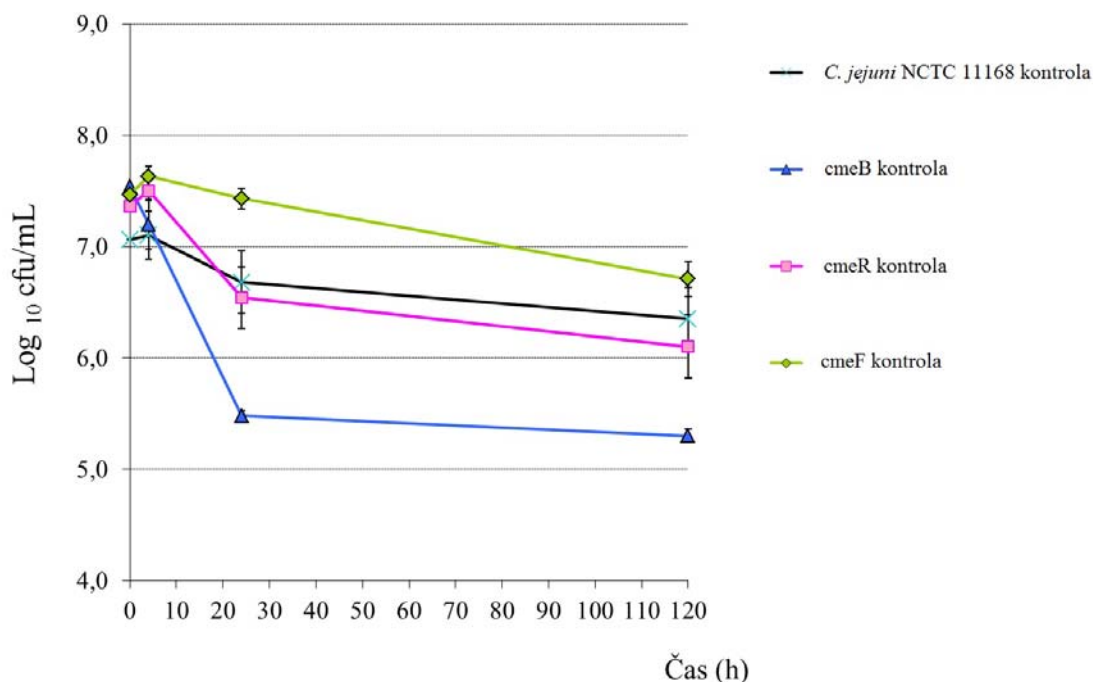
Kot je razvidno iz slike 9, je dodatek izvlečka inhibiral rast bakterij. To je vidno že pri subinhibitorni koncentraciji, višje koncentracije 0,625 mg/mL, 0,313 mg/mL in 0,156 mg/mL pa so imele baktericidni učinek.



Slika 10: Morfologija bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 ob dodatkih različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40 (a, b) kontrola *C. jejuni* NCTC 11168, 24 ur. Vidne so spiralne in kokoidne oblike celic. (c) 0,625 mg/mL, 24 ur. Kokoidne oblike celic (d) 0,313 mg/mL, 24 ur. Kokoidna celica z dvema bičkoma. (e) 0,156 mg/mL, 24 ur. Spiralna celica s hrapavo membrano. (f) 0,078 mg/mL, 24 ur. Spiralna celica, temna obarvanost nakazuje poškodbe membrane. (g) 0,078 mg/mL, 5 dni. Bacil z vidnimi spremembami v strukturi celice.

Pri kontrolnem vzorcu so bile prisotne spiralne oblike celic, našli smo tudi daljše z 5 ali 6 zavoji. Prisotni so bili tudi posamezni koki. Membrana je povsod nagubana, brez vidnih poškodb. Pri koncentraciji 0,625 mg/mL smo opazili večinoma razgradne produkte celic in celice kokoidne oblike. Bički so bili ponekod prisotni, druge pa ne. Podobno je bilo pri koncentraciji 0,313 mg/mL, vendar smo tu poleg razgradnih produktov in kokov opazili tudi krajše spirale, včasih odebeljene celice. Pri koncentraciji izvlečka 0,156 mg/mL smo opazili najbolj raznolike oblike celic- od običajnih in odebeljenih spiral (slednjih je bilo več), do bacilov, kokov pa nismo opazili. Čim daljši je bil čas izpostavljenosti tej koncentraciji izvlečka, tem več je bilo tudi poškodb membrane in razgradnih produktov, ne pa tudi več kokov. Pri MIK (0,078 mg/mL) smo po 24 urah opazili krajše spirale in bacile, pojavljali pa so se tudi razgradni produkti, ponekod so tudi že vidne poškodbe membrane. Zanimivo je, da smo po 5 dneh v vzorcu opazili izključno bacile, nekateri so imeli poškodovano membrano, pojavljale pa so se tudi luknje oz. pike na površini, kar daje vtis, kot da je celica razžrta. Zagotovo gre tudi za poškodbe, saj so celice močno obarvane, kar kaže na iztekanje celične vsebine in poškodovano membrano.

4.3 VPLIV MUTACIJ V GENIH IZLIVNIH ČRPALK NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO *C. jejuni* NCTC 11168



Slika 11: Rastne krivulje mutantov na izlivnih črpalkah *C. jejuni* NCTC 11168 *CmeB*, *CmeF*, *CmeR*

Pri referenčnem sevu se je koncentracija celic ves čas rahlo zmanjševala in je bila po 5 dneh nižja za približno 1 log stopnjo glede na začetno koncentracijo.

Mutacija v genu *cmeB* je bistveno vplivala na preživelost mutanta *CmeB*. Njegova kultivabilnost je bila po 24 h zmanjšana za 2 log CFU/mL, nato pa se do konca poskusa ni več zmanjševala. Kultivabilnost mutanta *CmeB* je bila najslabša med vsemi, kar pomeni, da ima *CmeB* vlogo pri preživelosti oz. rasti *C. jejuni* v normalnih pogojih rasti.

Kultivabilnost mutanta *CmeR* je bila najbolj podobna kultivabilnosti referenčnega seva, kar nakazuje, da gen *CmeR* nima bistvene vloge pri preživetju v normalnih – oz. optimalnih razmerah za bakterije *C. jejuni*.

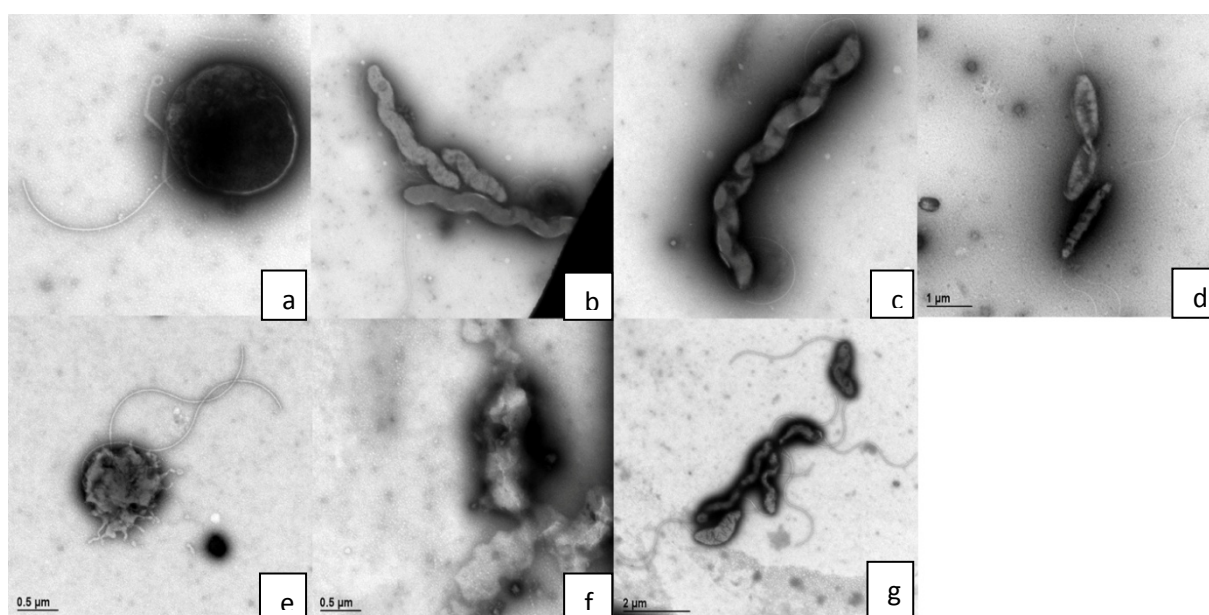
Kot je razvidno iz slike 11, je mutacija v genu *cmeF* kultivabilnost celo izboljšala v primerjavi z referenčnim sevom *C. jejuni* NCTC 11168, saj je bila skoraj vseh 5 dni eksperimenta višja za 1 log CFU/mL.

Glede na podane rezultate lahko sklepamo, da imajo geni za izlivne črpalke vlogo tudi v preživelosti bakterij, saj le to povečajo ali zmanjšajo v optimalnih razmerah.

Preglednica 4: Morfološke spremembe pri posameznih sevih *C. jejuni* ob času 0 h in 24 h

Sev	0 h	24 h
11168	Dolge spirale, koki	Dolge spirale, koki
CmeB	Bacili, posamezni koki	Bacili, posamezne spirale
CmeF	Bacili	Odebeljene spirale
CmeR	*	*

* za sev ni podatka, ker v mikroskopskem vzorcu ni bilo prisotnih celic



Slika 12: Morfologija bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 in mutantov (a) referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168, 0 h. Kokoidna oblika celice. (b) referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 0 h. Spirale z 2-3 zavoji. (c) referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168, 24 h. Spirala s 5 zavoji. (d) CmeB, 0 h. Bacil in celica, ki se verjetno deli ali pa prehaja v bacilarno obliko. (e) CmeB, 0 h. Poškodovana kokoidna celica, viden izliv citoplazme. (f) CmeF, 0 h. Struktura, pri kateri gre verjetno za poškodovan bacil ali pa razgradni produkt. (g) CmeF, 24 h. Različno dolge spiralne celice, nekatere z nepravilnostmi v zavojih.

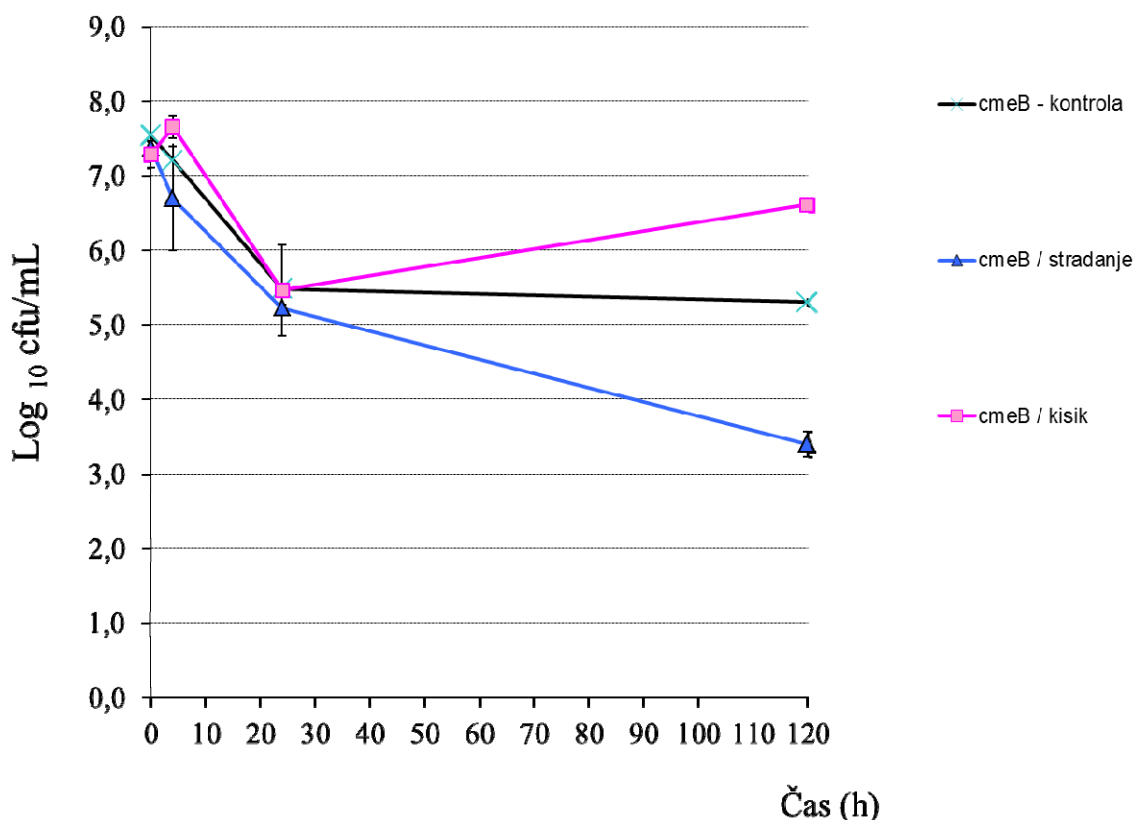
Za divji tip referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 so bile ves čas značile spiralne celice z 2-5 zavoji, prisotni so bili tudi koki, čeprav so spirale prevladovali. Pri CmeB so bili ob času 0 h prisotni bacili in koki, spiralnih celic nismo opazili, opazili pa smo nakazane zavoje, kot je vidno na sliki 12d. Membrana je bila pri večini normalna in brez poškodb, pri nekaterih pa je izgledalo, kot da odstopa. Na sliki 12e bi lahko šlo za poškodbe membrane, morda pri pretvorbi celice v kokoidno obliko. Po 24 urah smo v vzorcu našli le posamezne koke in večinoma bacilarne oblike celic ter posamezne običajne spirale z 2-3

zavoji, česar ob začetnem času nismo opazili. Večina celic je bila dolgih bacilov, membrana ni nikjer poškodovana, bički pa niso prisotni.

Pri mutantu CmeF so bili ob času 0 h prisotni le razgradni produkti in strukture, ki bi lahko bili delno poškodovani bacili (slika 12f). Normalnih celic kakršnekoli oblike nismo opazili. Po 24 urah so v vzorcu prisotne odebeljene spirale, ali pa celice v obliki črke C. Večina spiral je bila odebeljena na enem koncu. Zavoji so bili precej nepravilnih oblik, bički pa so bili povsod prisotni. Nenavadno je, da so bili ob času 0 h prisotni razgradni produkti, po 24 urah pa jih ni bilo. Verjetno je bil ob času 0 h vzorec slab in gre za nečistoče, ne nujno za razgradne produkte, čeprav tega z gotovostjo ne moremo trditi. Našli pa smo več celic, sicer poškodovanih, ki so bile bacilarne oblike. Za sev CmeF so bili značilni bacili, po 24 urah pa tudi odebeljene spirale.

Pri mutantu CmeR v vzorcu nismo našli celic, niti česarkoli, kar bi lahko nakazovalo na razgradne produkte, zato za tega mutanta nimamo podatkov o morfologiji.

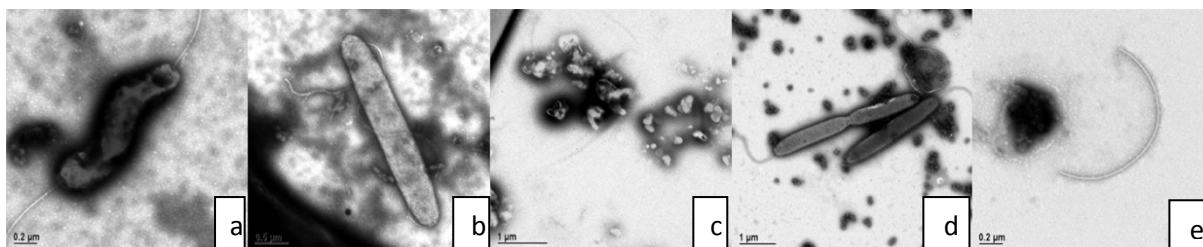
4.3.1 Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost in morfologijo mutantov CmeB, CmeF, CmeR



Slika 13: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutantu CmeB

Pri kontrolnem vzorcu v normalnih pogojih se je rast po 24 urah zmanjšala za 2 log enoti in do konca poskusa ostala približno enaka. Ob izpostavitvi stradanju se je rast po 120 urah zmanjšala za 4 logaritemske stopnje glede na začetno koncentracijo. Od kontrolnega vzorca je bila rast po 120 dneh nižja za 2 logaritmski stopnji. Mutant CmeB je ob izpostavitvi kisiku skoraj ves čas bolje rasel od kontrolnega vzorca, po 24 urah je bila koncentracija celic pri obeh enaka. Po 120 urah je bila koncentracija celic za 1 log stopnjo višja od koncentracije celic v kontrolnem vzorcu, torej so bakterije po 120 urah na kisiku uspevale celo bolje kot v mikroaerofilnih pogojih (slika 13).

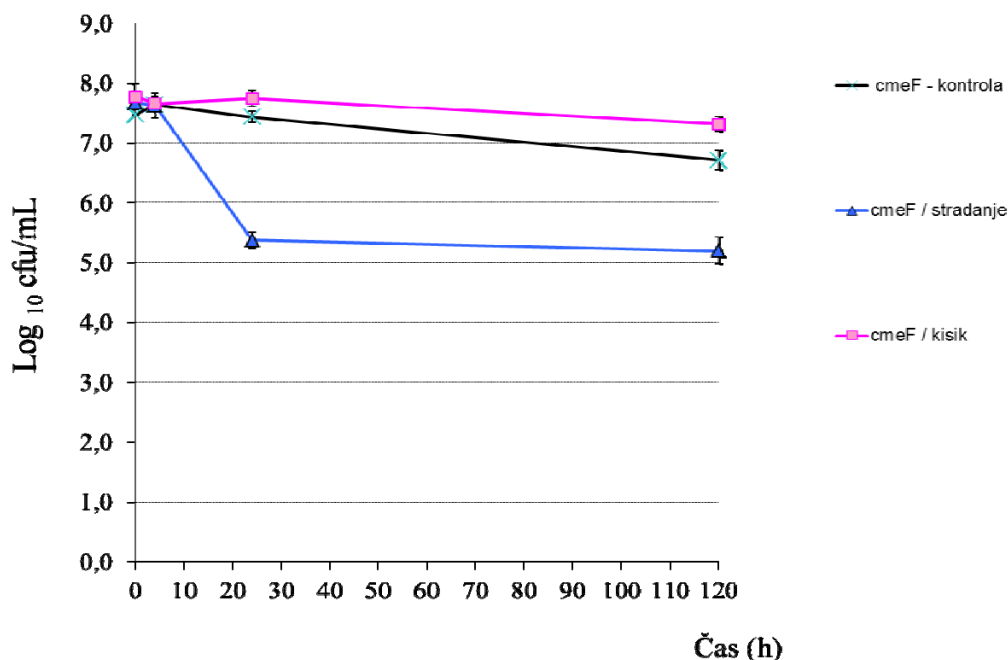
Stradanje je na rast mutanta CmeB vplivalo bistveno bolj negativno kot pa izpostavitvev oksidativnemu stresu. Iz slike 13 je razvidno, da je bila rast prvih 24 ur pri vseh približno enaka, po 24 urah pa so bile opazne bistvene spremembe.



Slika 14: Morfologija mutanta *C. jejuni* NCTC 11168 CmeB po oksidativnem stresu in stradanju: (a) CmeB, oksidativni stres, 4 h. Spiralna oblika celice s poškodbami membrane. (b) CmeB, oksidativni stres, 4 h. Bacilarna oblika celice brez poškodb. (c) CmeB, oksidativni stres, 5 dni. Razgradni produkti. (d) CmeB, stradanje, 4 h. Bacilarna oblika celic, pri obeh celicah je vidna delitev. (e) CmeB, stradanje, 5 dni. Razgradni produkt, ob njem biček.

Ob izpostavitvi stradanju so po 4 urah v vzorcu prevladovali bacili, spiral nismo opazili, bili pa so prisotni posamezni koki. Po 5 dneh smo v vzorcu opazili le razgradne produkte in posamezne bičke, celic ni bilo videti. Možno je, da gre v nekaterih primerih za poškodovane koke, kot je vidno na sliki 14e. Stradanje je močno prizadelo rast, kar je vidno tudi iz krivulje rasti oz. odmiranja na sliki 13. Tudi morfologija je bila po 5 dneh očitno zelo prizadeta, saj celic sploh ni videti, čeprav je koncentracija v vzorcu 10^3 CFU/mL in bi celice še morali opaziti. Ob izpostavitvi oksidativnemu stresu smo po 4 urah opazili spiralne in bacilarne oblike celic. Sploh pri spiralah so ponekod vidne spremembe na celicah, bacili pa sicer izgledajo normalno, vendar so večinoma brez bičkov (slika 14). Po 5 dneh smo v vzorcu našli le razgradne produkte, kar je zanimivo, saj kultivabilnost ni bila prizadeta, v oksidativnih pogojih je mutant CmeB rasel celo bolje od kontrole, koncentracija celic pa je bila približno 10^7 CFU/mL, zato je nenavadno, da v vzorcu nismo našli celic.

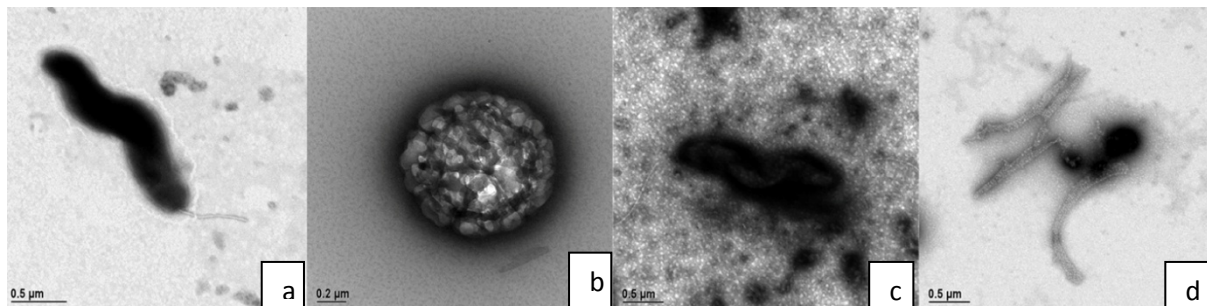
Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost in morfologijo mutanta CmeF



Slika 15: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutanta CmeF

Pri kontrolnem vzorcu se je koncentracija celic po 120 urah zmanjšala za 1 logaritemsko stopnjo. Ob stradanju se je koncentracija že po 24 urah zmanjšala za 3 logaritemske stopnje in do konca poskusa ostala približno enaka. Kultivabilnost kontrole in vzorca, izpostavljenega oksidativnemu stresu, se po 24 urah ni znižala, ampak je ostala na približno enaki vrednosti kot na začetku. Rast ob izpostavitvi oksidativnemu stresu je bila boljša od kontrolnega vzorca, ob koncu je bila koncentracija celic skoraj za 1 log enoto višja.

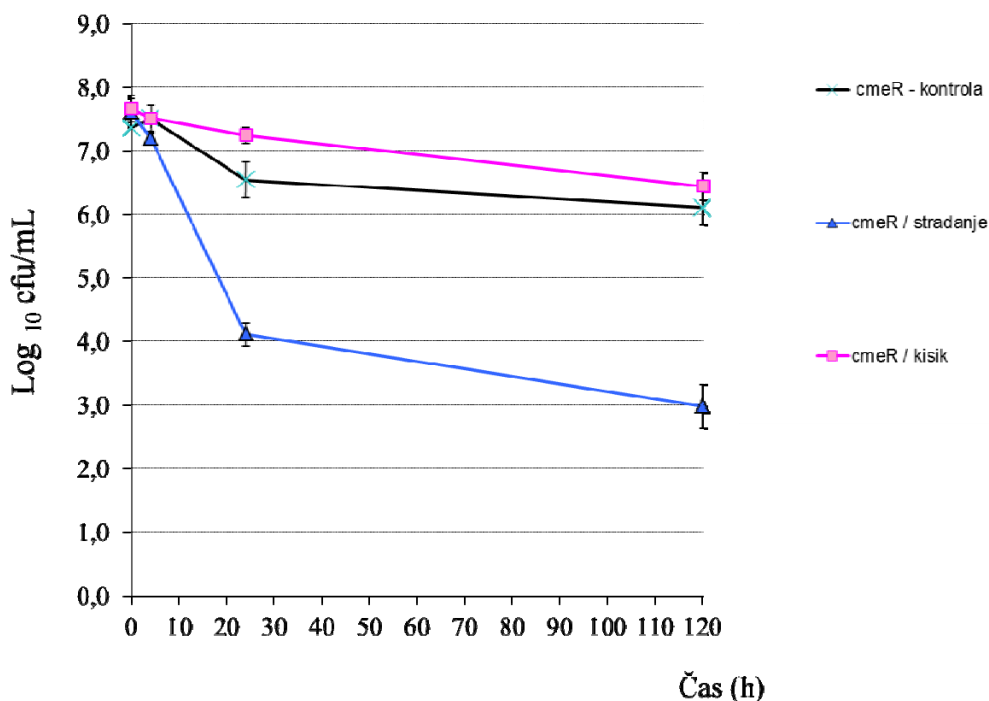
Stradanje je na rast mutanta CmeF vplivalo slabše kot pa izpostavitve oksidativnemu stresu, kar se opazi tako po 24, kot po 120 urah (slika 15).



Slika 16: Morfologija mutanta *C. jejuni* NCTC 11168 CmeF po oksidativnem stresu in stradanju: (a) CmeF, oksidativni stres, 4h. Spiralna oblika celice, verjetno s poškodovano membrano, saj je le-ta zelo temno obarvana. (b) CmeF, oksidativni stres, 5 dni. Kokoidna oblika celice z nagubano membrano. (c) CmeF, stradanje, 4h. Spiralna oblika celice, verjetno s poškodovano membrano. (d) CmeF, stradanje 5 dni. Razgradni produkti in posamezni bički.

Ob izpostavitvi kisiku so bile po 4 urah v vzorcu prisotne le spiralne oblike celic (slika 16a). Celice so večinoma temneje obarvane, kar bi lahko pomenilo poškodbe membrane, saj se zato na površini celic nabere več kontrastnega sredstva, ki smo ga uporabili pri mikroskopiranju. Po 5 dneh izpostavitve kisiku (slika 16b), je bilo vidnih zelo malo celic- verjetno gre za koke, saj imajo značilno obliko. Nagubana struktura, vidna na sliki 16b, je verjetno normalno nagubana membrana, vendar je še bolj neravna zato, ker se je celica pri spremembi v kokoidno obliko tudi skrčila. Ob izpostavitvi stradanju smo po 4 urah opazili le spiralne oblike celic (slika 16c). Membrana sicer ni videti poškodovana, vendar verjetno je, saj so tudi tu celice temneje obarvane. Pri nekaterih izgleda, kot bi membrana rahlo odstopala. Po 5 dneh smo opazili le razgradne produkte in posamezne bičke. Pri sliki 16d bi lahko šlo tudi za kokoidno celico, vendar jasno prepoznavnih kokov nismo opazili, zato gre verjetno za razgradne produkte.

Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost in morfologijo mutanta CmeR



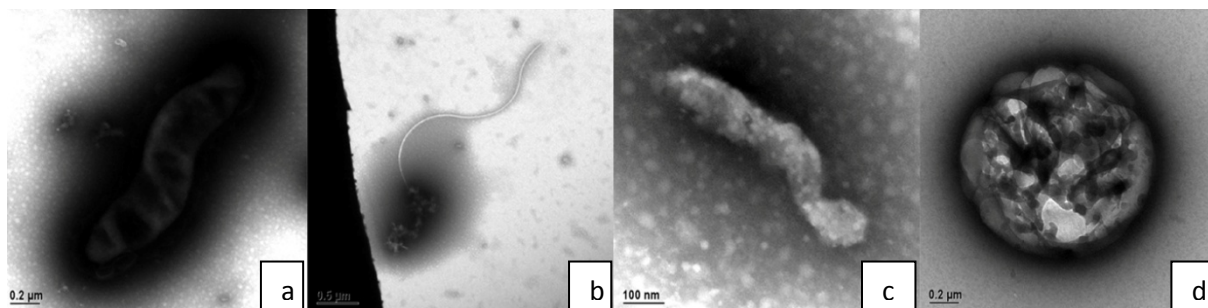
Slika 17: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutanta CmeR.

Pri kontrolnem vzorcu opazimo upad rasti za približno 2 logaritemski stopnji po 24 urah. Rast je nato ostala enaka do konca poskusa. Kultura, ki je bila izpostavljena stradanju je rastla najslabše izmed vseh. Po 24 urah je rast upadla za 4 log stopnje, po 120 pa še za 1 log stopnjo. Rast je bila najboljša pri kulturi, ki je bila izpostavljena oksidativnemu stresu. Po 24 urah je bila do konca poskusa od kontrolnega vzorca višja za približno 1 logaritemsko stopnjo. Kultivabilnost pod vplivom oksidativnega stresa je sicer ves čas rahlo upadala, vendar je vseeno višja od kontrole.

Najslabše je na sev CmeR vplivalo stradanje, ob izpostavitvi oksidativnemu stresu pa je po 24 urah kultura rastla bolje od vzorca v normalnih pogojih.

Glede na rezultate lahko sklepamo, da imajo mutacije v izlivnih črpalkah vlogo pri preživetju bakterij ob izpostavitvi stradanju. V vseh primerih je bila preživelost po 120 urah višja kot pri referenčnem sevu *C. jejuni* NCTC 11168, izpostavljenemu stradanju.

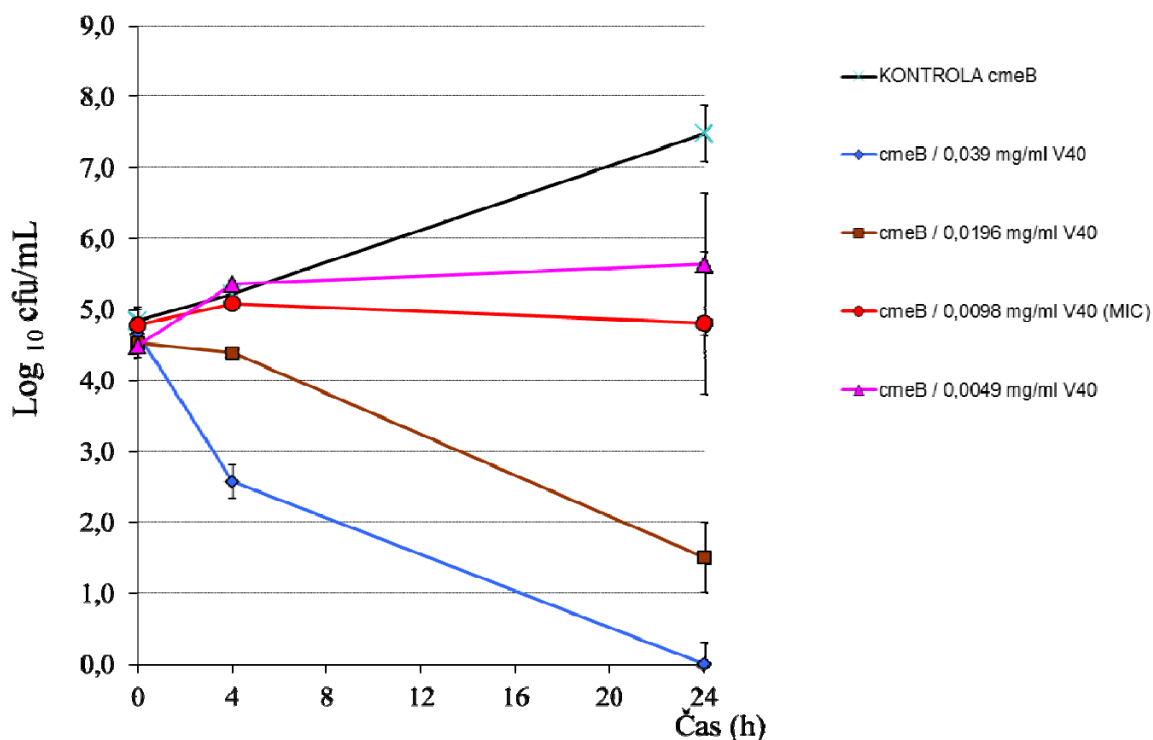
Ob izpostavitvi oksidativnemu stresu, je bila preživelost vseh mutantov slabša od referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168, kar kaže na to, da mutacije povzročijo slabšo odpornost na oksidativni stres.



Slika 18: Morfologija mutanta CmeR po oksidativnem stresu in stradanju: (a) CmeR stradanje, 4h. Spiralna oblika celice, verjetno s poškodbami membrane, ker je temno obarvana. (b) CmeR stradanje, 5 dni. Močno skrčena spiralna oblika celice, verjetno je iz nje zaradi poškodb iztekla celična vsebina. (c) CmeR, oksidativni stres, 4h. Spiralna celica, nepravilne oblike. (d) CmeR, oksidativni stres, 5 dni. Kokoidna oblika celice z nagubano membrano.

Ob izpostavitvi kisiku smo po 4 urah opazili le spiralne oblike celic. Nekatere spirale so bile tudi nepravilne, kot je vidno na sliki 18c. Lahko, da gre tu tudi za prehod v bacilarno obliko. Možen je tudi začetek poškodb, saj smo pri nekaterih opazili poškodbe membrane, ali pa njeno odstopanje. Po 5 dneh izpostavitve oksidativnemu stresu smo opazili posamezne strukture, ki so verjetno koki (slika 18d), v vzorcu pa je bilo tudi veliko razgradnih produktov. Ob izpostavitvi stradanju smo po 4 urah opazili le kratke spirale, nekatere imajo temnejše lise na površini. Membrana odstopa in se ne prilega tesno k celici. Po 5 dneh stradanja so prisotni koki, spirale in razgradni produkti. Spirale so poškodovane, kot je vidno na sliki 18b. Videti je kot, da bi se celica popolnoma skrčila, oz. kot, da bi iz nje iztekla vsa vsebina, ostal bi le ovoj. Da se je to verjetno res zgodilo, kaže tudi temna lisa okoli celice na sliki b, saj se je zato okolica močnejše obarvala s kontrastnim sredstvom.

4.3.2 Učinek rožmarinovega izvlečka V40 na kultivabilnost in morfologijo mutantov CmeB, CmeF, CmeR

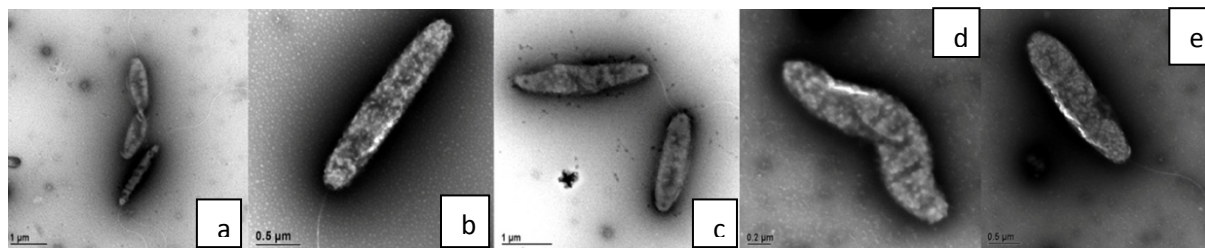


Slika 19: Rast mutanta CmeB ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40

Rast v kontrolnem vzorcu brez dodatka izvlečka je naraščala in je bila po 24 urah za približno 3 logaritemske stopnje višja kot na začetku.

Inhibicija rasti je vidna že pri subinhibitorni koncentraciji 0,0049 mg/mL, saj je po 24 urah za 2 log stopnji nižja od kontrolnega vzorca. Pri MIK je koncentracija celic približno enaka kot na začetku. Koncentracija 0,0196 mg/mL je močno inhibirala rast, po 24 urah se je rast od začetne koncentracije celic zmanjšala za 3 logaritemske enote. Baktericiden učinek je imel dodatek 0,039 mg/mL, ki je bil dosežen po 24 urah, ko v vzorcu ni bilo več rasti.

Dodatek izvlečka rožmarina je vplival inhibitorno na kultivabilnost mutanta CmeB. Baktericidni učinek je bil dosežen s koncentracijo 0,039 mg/mL po 24 urah. Po 4 urah nobena koncentracija ni imela baktericidnega učinka, je pa baktericidna tudi koncentracija 0,0196 mg/mL.

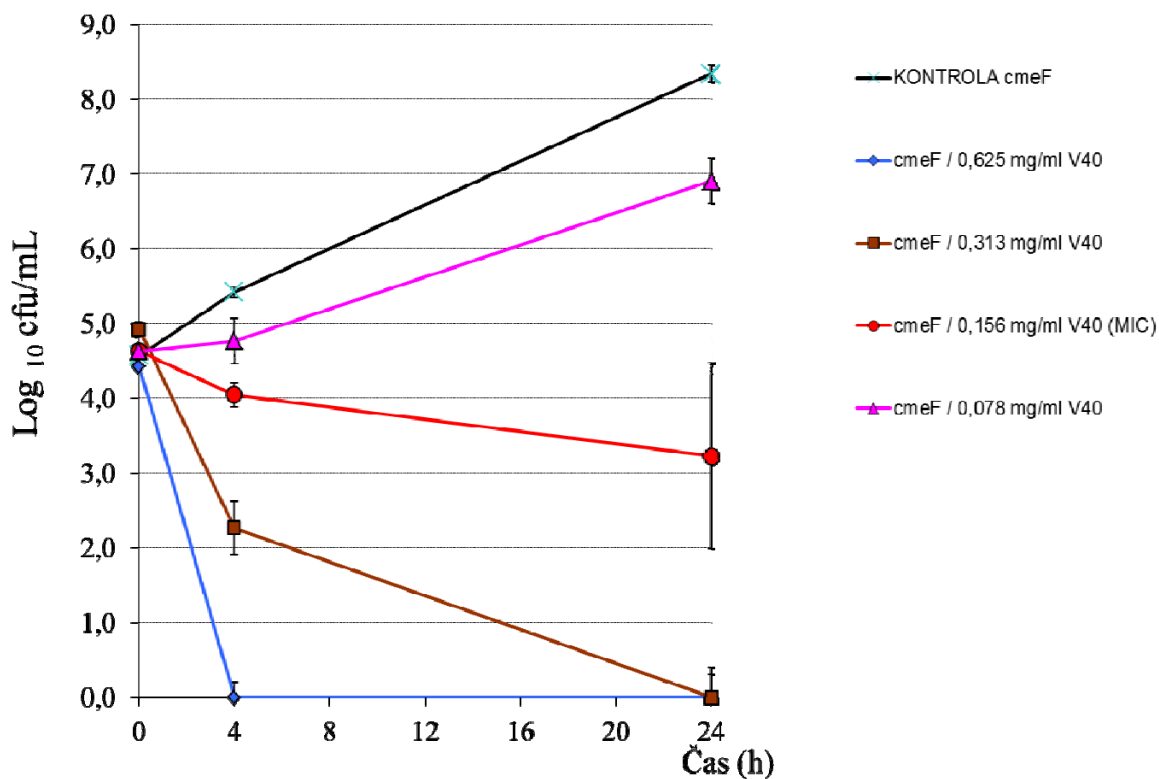


Slika 20: Morfologija mutanta CmeB ob dodatku različnih koncentracij izvlečka rožmarina: (a) kontrola CmeB, 0 ur. Bacilarna oblika celice, pri drugi verjetno vidna delitev, ali pa prehod iz spiralne v bacilarno obliko. (b) kontrola CmeB, 24 ur. Bacilarna oblika celice. (c) CmeB+0,039 mg/mL izvlečka rožmarina, 4h. Bacilarna oblika celic. Verjetno gre tudi za poškodbe membrane, saj je rob temno obarvan, v okolici pa so vidni tudi razgradni produkti. (d) CmeB+0.0196 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Spiralna oblika celice z enim zavojem. (e) CmeB + 0.0196 mg/mL izvlečka rožmarina, 24 ur. Bacilarna oblika celice.

V kontrolnem vzorcu so bili prisotni koki, dolgi bacili in krajše spiralne celice. Koncentraciji 0,039 mg/mL in 0,0196 mg/mL sta bili obe baktericidni. Pri dodatku 0,0196 mg/mL izvlečka so bili ob časih 0h in 4h prisotni izključno bacili. Lahko, da gre tudi za poškodbe membrane, saj je rob celic precej temno obarvan. Površina izgleda precej hrapava, vendar to ni nujno nenavadno, saj imajo kampilobaktri že po naravi nagubano površino celic. Ob času 24h smo našli tudi posamezne kratke spirale, ki niso imele več kot enega zavoja (slika 20d, e). Pri koncentraciji 0,039 mg/mL so poškodbe celic bolj izrazite. Ob času 0h smo opazili spirale, koke in bacile, čeprav so bacili prevladovali. Po 4 urah so bili v vzorcu le bacili (slika 20c). Membrana je ponekod udrta ali poškodovana, na sliki 20c je dobro viden tudi temno obarvan rob celic in razgradni produkti v okolici.

Pri mutantu CmeB smo je bila ob dodatku izvlečka rožmarina bacilarna oblika celic prevladujoča, pri baktericidnih koncentracijah so bile prisotne tudi poškodbe membrane in razgradni produkti.

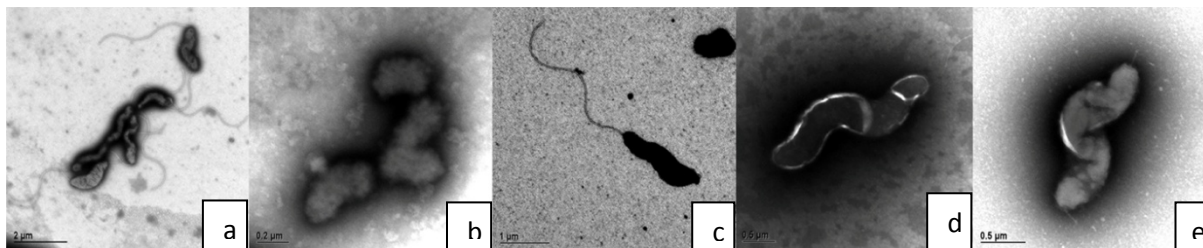
Rast mutanta CmeF ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40



Slika 21: Rast mutanta CmeF ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40

Pri kontrolnem vzorcu je rast naraščala in je bila po 24 urah od začetne višja za približno 4 log CFU/mL. Subinhibitorna koncentracija je rast po 24 urah inhibirala za 1 log stopnjo v primerjavi s kontrolo. Pri MIK se je rast ves čas rahlo zmanjševala in se po 24 urah zmanjšala za 2 log CFU/mL. Baktericiden učinek sta imeli koncentraciji 0,625 mg/mL in 0,313 mg/mL, prva že po 4 urah, druga pa po 24 urah.

Dodatek izvlečka pri vseh koncentracijah vpliva inhibitorno na rast. Tudi subinhibitorna koncentracija 0,078 mg/mL ekstrakta ima po 24 urah že inhibitoren učinek.

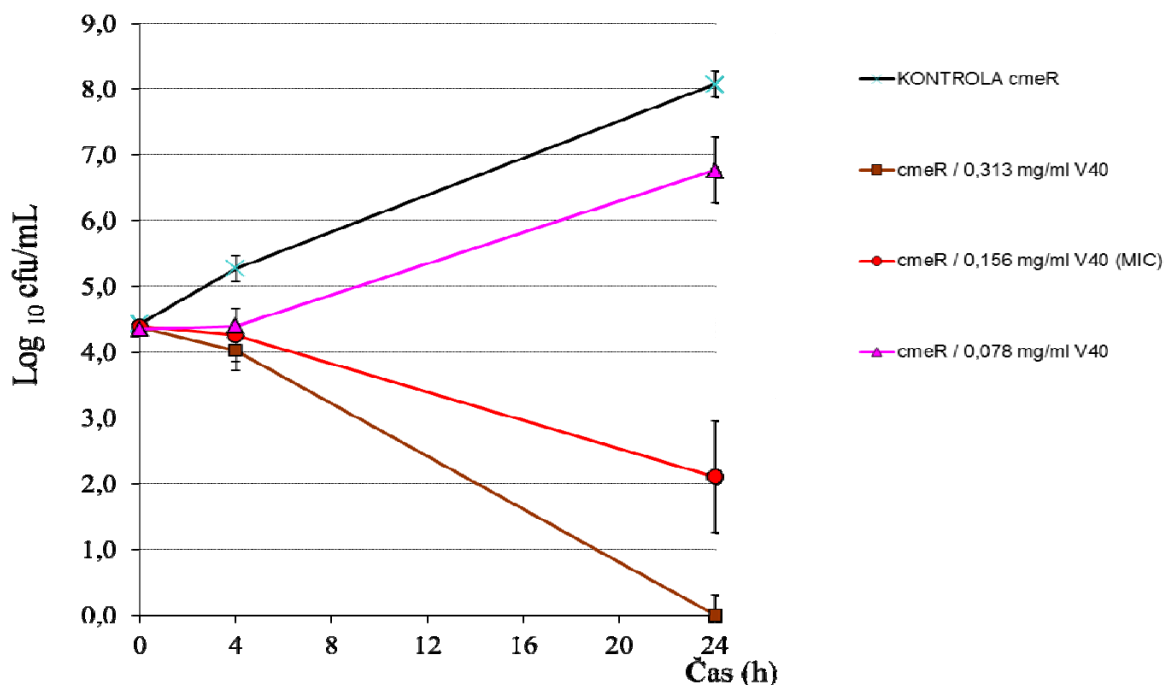


Slika 22: Morfologija mutanta CmeF ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka: (a) kontrola CmeF, 24h. Različno dolge spiralne oblike celic. (b) CmeF + 0.625 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Poškodovane, skrčene celice, ali pa razgradni produkti. (c) CmeF + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Spiralne celice s poškodovano membrano. (d) CmeF + 0.156 mg/mL izvlečka rožmarina, 5 dni. Spiralna celica s poškodovano membrano, na kar nakazuje temna lisa okoli celice, ki lahko pomeni iztekanje celične vsebine. (e) CmeF + 0.078 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Spiralna celica z odebelitvijo.

Pri kontroli (slika 22a) so prisotne spiralne celice, nekatere tudi nepravilnih oblik-odebeljene. Takšne celice so v še večjem številu prisotne pri MIK in pri baktericidnih koncentracijah rožmarinovega izvlečka, kjer so prisotne so tudi poškodovane celice. Koncentraciji 0,625 mg/mL izvlečka in 0.313 mg/mL izvlečka sta baktericidni. Pri dodatku 0,625 mg/mL izvlečka rožmarina, smo opazili kokoidne celice in nepravilne oblike (vidno na sliki 22b), ki so verjetno močno skrčene celice, lahko pa bi bili tudi razgradni produkti, saj je velikost zelo majhna- od 0,2 μm do 0,4 μm . Tudi po 24 h in 5 dneh smo v vzorcu opazili celice s poškodovano membrano in veliko razgradnih produktov. Pri dodatku 0,313 mg/mL izvlečka (slika 22c) celice niso bile tako močno prizadete že na začetku, saj smo ob času 0 h in 24 h opazili predvsem spirale, odebeljene na enem koncu, razgradni produkti pa so prevladovali po 5 dneh. Pri MIK smo ob času 0h opazili večinoma spirale, odebeljene na enem koncu in tudi posamezne bacile. Po 5 dneh so bile prav tako prisotne odebeljene spirale, zelo verjetno gre tudi za poškodbe membrane, saj so celice zelo temno obarvane (slika 22d). Ob dodatku 0,078 mg/mL izvlečka smo poleg odebeljenih spiral opazili tudi posamezne koke, kar pri višjih koncentracijah ni bilo značilno.

Pri vseh dodanih koncentracijah prevladujejo spiralne oblike celic, precej je bilo tudi odebeljenih spiral. Višja kot je bila koncentracija dodanega izvlečka rožmarina, več je bilo tudi poškodb membrane in razgradnih produktov.

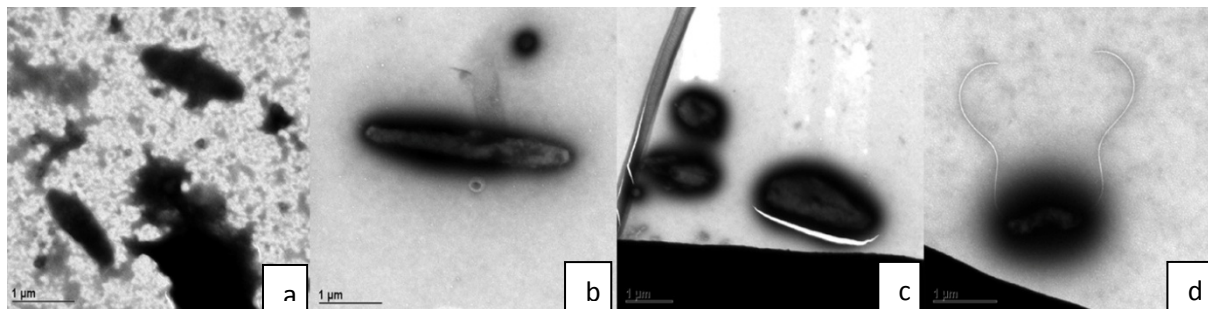
Rast mutanta CmeR ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40



Slika 23: Rast mutanta CmeR ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40

Pri kontrolnem vzorcu je rast naraščala, po 24 urah je bila višja od začetne za 4 log CFU/ml. Že subinhibitorna koncentracija 0,078 mg/mL izvlečka rožmarina je imela inhibitoren učinek, po 24 urah je bila koncentracija celic za 1 log stopnjo nižja kot pri kontrolnem vzorcu. Pri MIK se je po 24 urah rast zmanjša za 2 log stopnji. Koncentracija 0,313 mg/mL je imela baktericiden učinek po 24 urah.

Vidimo, da so imele tudi pri mutantu CmeR vse koncentracije inhibitoren učinek na rast. 0,313 mg/mL ima šele po 24 urah baktericidni učinek, po 4 urah pa nobena uporabljena koncentracija rožmarinovega izvlečka ni bila baktericidna.

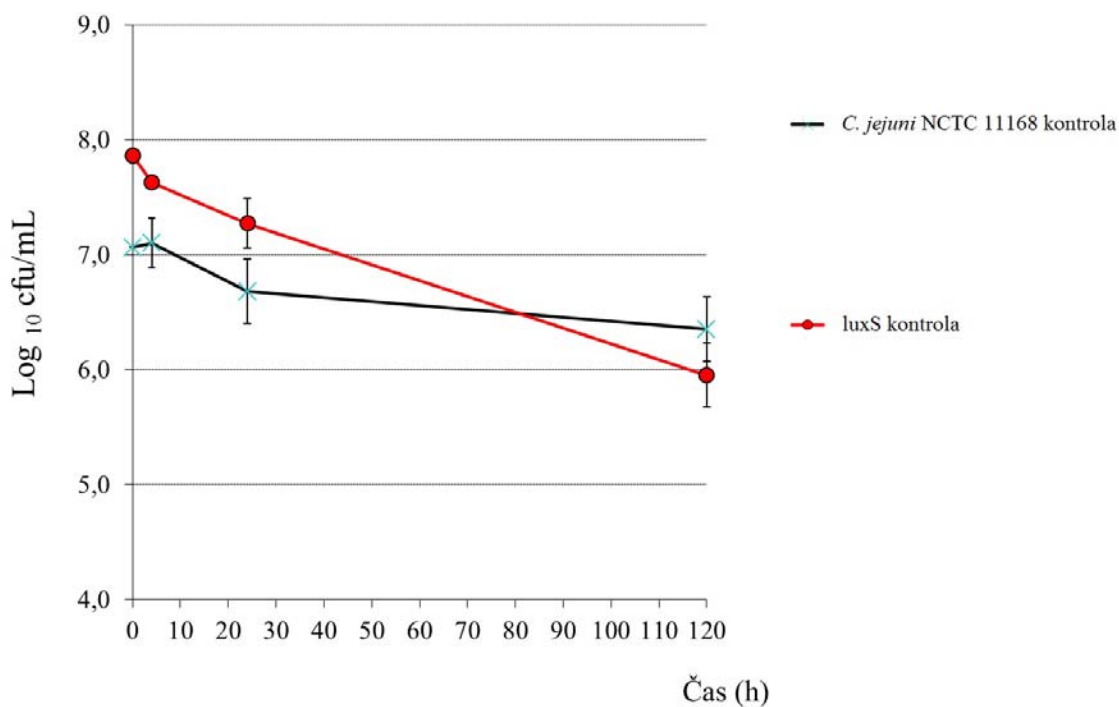


Slika 24: Morfologija mutanta CmeR ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka: (a) CmeR + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 0h. Bacilarna oblika celic, temno obarvanje nakazuje poškodbe membrane. (b) CmeR+0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24 h. Bacilarna oblika celice, verjetno gre, poleg poškodb membrane tudi za prehod iz spiralne v bacilarno obliko. (c) CmeR + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24 h. Razgradni produkti. (d) CmeR + 0.078 mg/mL izvlečka rožmarina, 5 dni. Spiralna oblika celice s poškodbami membrane.

Pri koncentraciji izvlečka 0,313 mg/mL so bili prisotni bacili. Na sliki 24b je verjetno viden prehod iz spiralne v bacilarno obliko celice. Pri tej koncentraciji je bilo prisotnih tudi nekaj odebeljenih spiral, vendar vseeno prevladujejo bacili. Opazili smo tudi razgradne produkte (slika 24a). Membrane celic so pogosto poškodovane, v okolici pa produkti razgradnje. Pri dodatku najnižje koncentracije izvlečka 0,078 mg/mL smo opazili večinoma celice spiralne oblike. Verjetno je šlo tudi za poškodbe, saj so močno temno obarvane, imajo pa tudi pike na površini, kar vse skupaj kaže na poškodbe membrane (slika 24d).

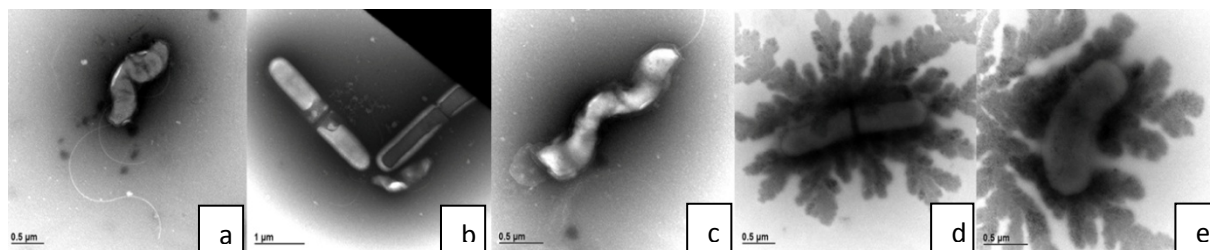
Predvsem pri višjih koncentracijah izvlečka smo opazili večinoma bacilarne oblike celic, pri nižjih pa so bile bolj značilne spirale. Pri vseh koncentracijah so vidne tudi poškodbe membrane, kar se kaže kot temno obarvanje celic.

4.4. VPLIV MUTACIJ V GENU ZA SIGNALIZIRANJE NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO *C. jejuni*



Slika 25: Rastni krivulji referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutanta na sistemu za signaliziranje LuxS

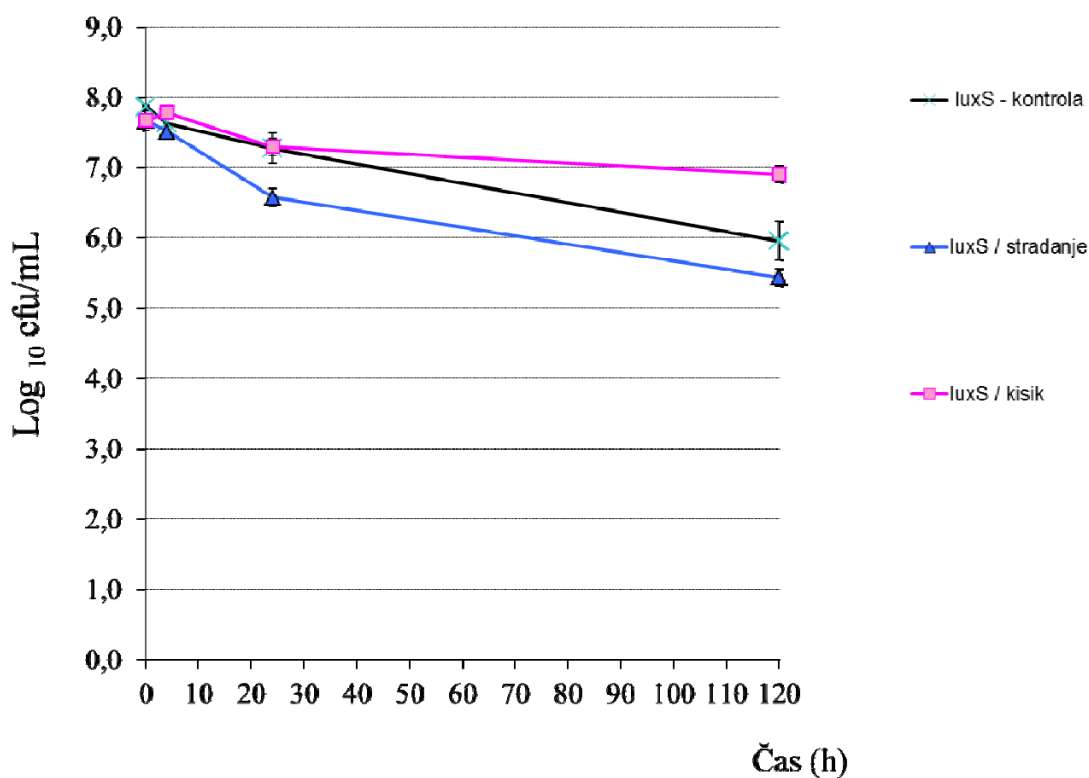
Mutacija v genu *luxS* je izboljšala kultivabilnost v prvih 80 urah, na koncu pa je bila nekoliko slabša od divjega tipa. V primerjavi z referenčnim sevom, je bila prvih 48 h večja za 1 log enoto, saj je bila tudi začetna koncentracija celic višja za približno 1 logaritemsko stopnjo. Po 120 h se je zmanjšala iz 8 na 6 log CFU/mL, kar znaša 2 log stopnji, pri referenčnem sevu pa se je kultivabilnost zmanjšala za približno 1 logaritemsko stopnjo.



Slika 26: Morfologija mutanta LuxS: (a) LuxS, 0h. Krajša spiralna celica z odebelitvijo. (b) LuxS, 0h. 2 daljša bacila z vidno delitvijo, tik pod njima pa 2 kratki spiralni, odebeljeni celici. (c) LuxS, 0h. Spiralna celica, nepravilne oblike, z odebelitvama na obeh koncih, vidno odstopanje membrane. (d) LuxS, 24h. Bacilarna oblika celice, z vidno delitvijo. V okolici vidno kristalizirano kontrastno sredstvo, ki ni povezano z rezultati. (e) LuxS, 24h. Celica v obliki črke C, v okolici kristalizirano kontrastno sredstvo.

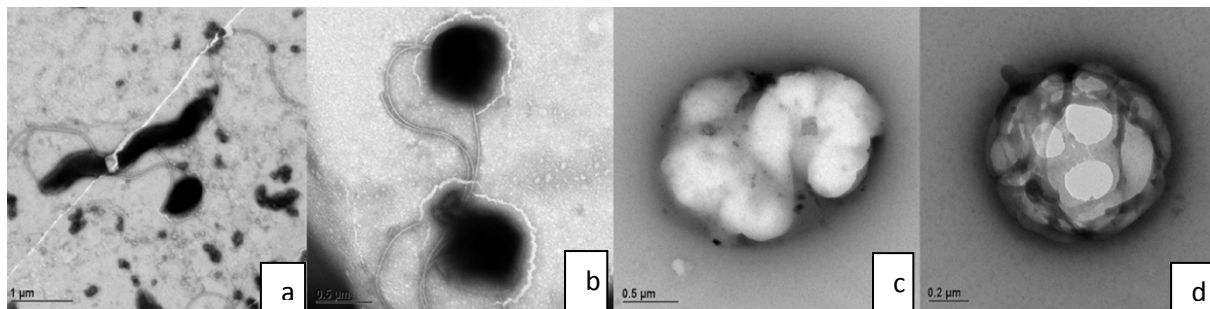
V vzorcu so bili ob vseh časih prisotni bacili (ponekod je bila vidna delitev) in kratke spirale nepravilnih oblik, ki so bile pogosto odebeljene na enem koncu. Na sliki 26b vidimo tudi krčenje membrane. Pri nekaterih celicah smo opazili tudi odstopanje membrane. Po 24 urah so prisotni le bacili in posamezne celice v obliki črke C (slika 26d, e). Lise okoli celic na slikah 26d in e so posledica kristalizacije kontrastnega sredstva in niso povezane s strukturnimi spremembami celic. Pri nekaterih bacilih po 24 urah opazimo lise na površini celic, verjetno gre za ločevanje membrane od celične stene (slika 26d).

4.4.1. Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost in morfologijo mutanta LuxS



Slika 27: Vpliv stradanja in oksidativnega stresa na kultivabilnost mutanta LuxS

Kultivabilnost pri kontrolnem vzorcu se je ves čas zmanjševala, na koncu je bila za 2 logaritemski enoti nižja od začetne. Stradanje je kulturo prizadelo bolj kot izpostavitve oksidativnemu stresu, kultivabilnost je ves čas nižja za 1 logaritemsko enoto v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Rast kulture, izpostavljene oksidativnemu stresu je bila še boljša kot pri kontrolnem vzorcu. Prvih 24 ur je bila podobna rasti kontrolnega vzorca, na koncu pa je bila višja za 1 log CFU/mL

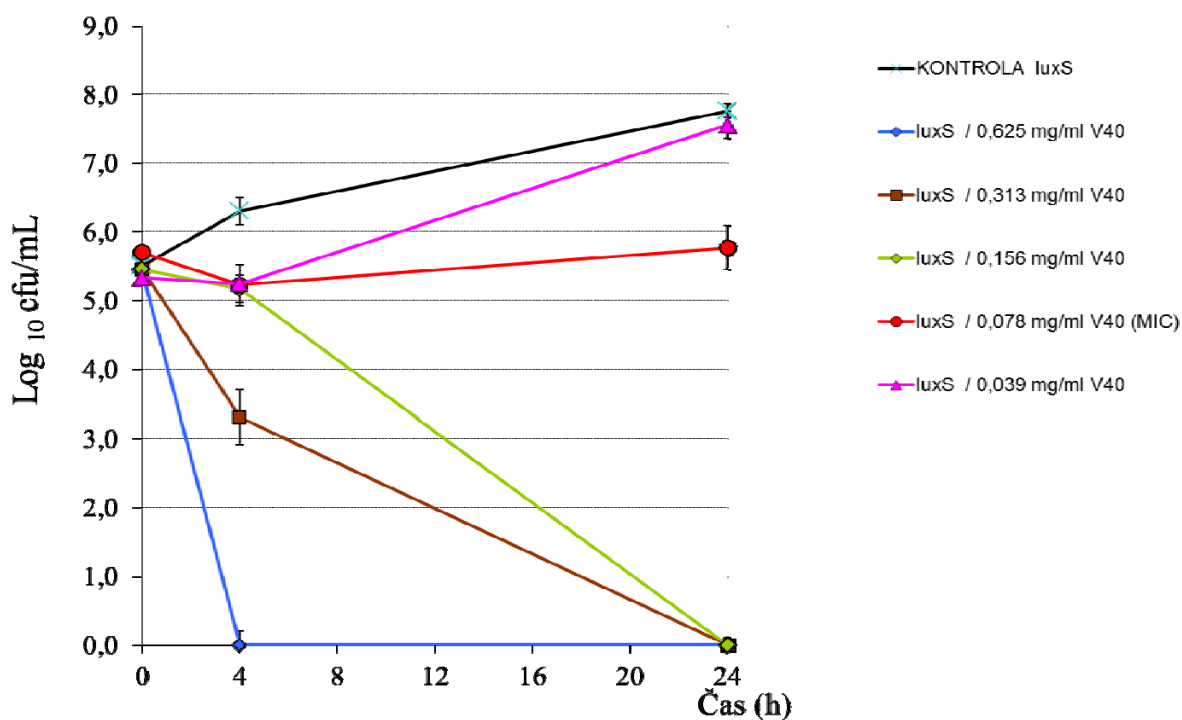


Slika 28: Morfologija mutanta LuxS ob stradanju in oksidativnemu stresu: (a) LuxS stradanje, 4h. Spiralne oblike celic, vidni tudi razgradni produkti. (b) LuxS stradanje, 5 dni. Kokoidna oblika celic z bički. (c) LuxS, oksidativni stres, 5 dni. Viden prehod iz spiralne v kokoidno obliko celice. Celica se skrči in oblikuje kroglo. (d) LuxS oksidativni stres, 5 dni. Kokoidna oblika celice, ki je verjetno ravno prešla v to obliko.

Pri izpostavitvi celic stradanju smo po 4 urah v vzorcu opazili samo spiralne celice (slika 28a). Vse so temno obarvane, kar bi lahko pomenilo poškodbe membrane. Pri vseh smo opazili tudi prisotnost bičkov. Po 5 dneh so v vzorcu prisotni koki in razgradni produkti (slika 28b). Tudi tu so celice zelo temno obarvane in gre verjetno za strukturne poškodbe membrane. Pri oksidativnem stresu je bilo že po 4 urah v vzorcu prisotnih zelo veliko razgradnih produktov in posameznih bičkov, celic pa nismo opazili. Po 5 dneh so bile prisotne celice kokoidne oblike (sliki 28c in d). Na sliki 28c se lepo vidi prehod spiralne celice v kokoidno. Celica se skrči in oblikuje kroglo, kot je vidno na sliki 28d.

Za oksidativni stres in stradanje je značilno, da se celice po daljšem času spremenijo v kokoidno obliko.

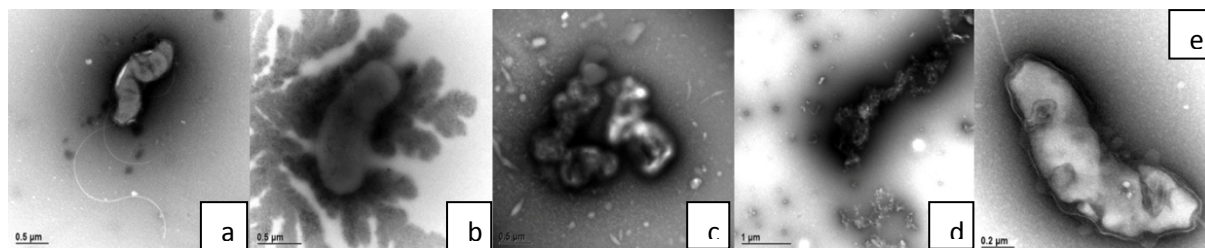
4.4.2. Protimikrobni učinek rožmarinovega izvlečka V40 na mutanta LuxS



Slika 29: Rast mutanta LuxS ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka V40

Rast v kontrolnem vzorcu se je po 24 urah povečala za 3 log CFU/mL. Koncentracija celic pri subinhibitorni koncentraciji izvlečka 0,039 mg/mL po 24 urah skoraj da ni nižja kot v kontrolnem vzorcu, vendar je rast vseeno inhibirana, kar je vidno že po 4 urah. Pri MIK je koncentracija celic po 24 urah enaka kot na začetku, vendar je po 24 urah od kontrolne nižja za 2 log stopnji.

0,625 mg/mL, 0,313 mg/mL in 0,156 mg/mL izvlečka rožmarina V40 imajo vse baktericiden učinek. Z dodatkom 0,625 mg/mL izvlečka rožmarina je rast zaustavljena že po 4 urah, z ostalima dvema koncentracijama pa po 24 urah.



Slika 30: Morfologija mutanta LuxS ob dodatku različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka: (a) kontrola LuxS, 0h. Kratka spiralna celica z odebelitvijo. (b) kontrola LuxS, 24h. Celica v obliki črke C, v okolici kristalizirano kontrastno sredstvo. (c) LuxS + 0.625 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Razgrajene celice. (d) LuxS + 0.313 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Močno skrčena celica, izgleda kot, da bi iz nje iztekla celična vsebina. (e) LuxS + 0.039 mg/mL izvlečka rožmarina, 24h. Kratka, spiralna celica, vidno odstopanje membrane in vakuolizacija.

V kontrolnem vzorcu so bile prisotne kratke, spiralne celice, odebeljene na enem koncu in odebeljeni bacili, nekateri so bili rahlo ukrivljeni, v obliki črke C, kot je vidno na sliki 30b. Kristali na sliki 30b so posledica kristalizacije kontrastnega sredstva in niso posledica morfoloških sprememb. Pri baktericidnih koncentracijah pa so bile v vzorcu poškodovane celice in razgradni produkti. Razgradnih produktov smo opazili celo več kot celic. Na slikah 30c in 30d je vidno, kako so se celice skrčile in tvorile zelo nepravilne oblike. Lahko tudi, da gre za skupke razgrajenih celic. Edino pri koncentraciji izvlečka 0,039 mg/mL smo opazili spet več celic. Bile so kratke spirale, nekatere so rahlo odebeljene na enem koncu, ali pa spominjajo na črko C. Na sliki 30e je lepo vidno, kako zunanja membrana odstopa od celice, notranja pa se krči. Vidna je tudi vakuolizacija, to ponazarjajo nekakšne vdrtine oz. lise na celici. Bički pri dodatku katerekoli koncentracije večinoma niso bili prisotni, opazili smo jih le pri dodatku 0,039 mg/mL izvlečka.

Dodatek izvlečka rožmarina je imel na mutanta v genu *luxS* precejšen učinek na celice, večina je zelo kratkih, opazne pa so tudi poškodbe membrane.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV STRADANJA IN OKSIDATIVNEGA STRESA NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO BAKTERIJ *C. jejuni* NCTC 11168

Čeprav je *C. jejuni* mikroaerofilni mikroorganizem, so naši rezultati pokazali, da je v prisotnosti kisika rasel celo bolje kot v mikroaerofilnih pogojih. Verjetno je to pogojeno z gostoto celic, saj naj bi *C. jejuni* pri gostoti celic, kot je bila naša (10^7 CFU/mL) rastli bolje v aerobnih kot v mikroaerofilnih pogojih. To naj bi bilo povezano z medceličnim komuniciranjem, ki je bolj učinkovito pri višjih gostotah celic, saj takrat celice bolj učinkovito komunicirajo s signalnimi molekulami in se tudi lažje prilagodijo na oksidativni stres (Kaakoush in sod., 2007). Čeprav je rast *C. jejuni* ob izpostavitvi oksidativnemu stresu boljša, se pri morfologiji vidi, da celice niso popolnoma normalne. Že po 4 urah so opazne poškodbe membrane, saj so celice zelo temno obarvane. Prisotne so sicer le spirale, vendar je uporaben le mikroskopski vzorec, posnet po 4 urah, po 5 dneh pa v vzorcu ni bilo celic, zato ne moremo vedeti, kakšne so bile morebitne nadaljnje spremembe v morfologiji. Klančnik in sod. (2008) poročajo, da ob oksidativnem stresu nekatere celice preidejo v kokoidno obliko. Po 4 urah kokov nismo opazili, morda bi lahko bili prisotni po 5 dneh, čeprav bi bilo nenavadno, saj je rast zelo dobra, če pa bi bilo v vzorcu zelo veliko kokov, pa verjetno ne bi tako dobro rastli.

Stradanje je močno zavrlo rast, po 5 dneh se je koncentracija celic občutno zmanjšala. Očitno pomanjkanje hranil veliko bolj ogroža rast *C. jejuni*, kot pa izpostavitve kisiku. To so ugotovili tudi Klančnik in sod. (2008). Po morfologiji so bile po 4 urah še prisotne spirale, vendar so vidne poškodbe membrane in izbokline, ki bi lahko bile iztekanje celične vsebine, ali pa so povezane z nastankom blebov, ki so pogosti pri prehodu celice v kokoidno obliko, ko se membrana razteguje in popoka (DeMello, 2002). Klančnik in sod. (2009a) poročajo, da število kokoidnih celic začne naraščati takoj, ko celice izpostavimo stradanju. Po 4 urah tega sicer še nismo opazili, po 5 dneh pa je bila velika večina celic v kokoidni obliki. Verjetno je to povezano tudi s stanjem VBNC, kot poročajo tudi Klančnik in sod. (2008), kjer je več celic živih kot kultivabilnih, kar se vidi tudi iz krivulje rasti na sliki 7. Rast je namreč po 5 dneh močno upadla, saj koki niso več kultivabilna oblika celic.

5.2 VLOGA IZLIVNIH ČRPALK PRI ODPORNOSTI *C. jejuni* PROTI STRADANJU IN OKSIDATIVNEMU STRESU

Ugotovili smo, da imajo mutacije v izlivnih črpalkah in regulatornem proteinu CmeR vlogo tudi pri kultivabilnosti in morfologiji v pogojih oksidativnega stresa in stradanja. Vsi mutanti so se izkazali kot bolj odporni na stradanje v primerjavi s stradanjem pri *C. jejuni* NCTC 11168, saj je bila po 5 dneh preživelost vseh mutantov boljša od referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168, izpostavljenega stradanju. Pri izpostavitvi oksidativnemu stresu, je bila kultivabilnost *C. jejuni* NCTC 11168 višja kot pri mutantih. Mutacije so torej v vseh primerih povzročile boljšo odpornost na stradanje in slabšo odpornost na oksidativni stres.

Mutant CmeB je rasel bolje v pogojih oksidativnega stresa kot stradanja. Ob izpostavitvi mutanta CmeB stradanju smo opazili bistveno slabšo rast od kontrole CmeB. Že na začetku so bili prisotni bacili, ki so očitno slabše kultivabilna morfološka oblika, zato je bila tudi rast slabša. Rast do konca poskusa še pada, na koncu so prisotni le še razgradni produkti. Pri izpostavitvi oksidativnemu stresu so bile na začetku prisotne tudi spirale, na koncu pa le razgradni produkti. Zanimivo je, da smo na koncu opazili le razgradne produkte, čeprav je bila kultivabilnost višja kot pri stradanju in bi pričakovali normalne, nepoškodovane celice. Pri tem mutantu so že na začetku prevladovali bacili, s časom pa so se pri obeh stresih začeli pojavljati tudi koki in razgradni produkti, kar je sicer značilno tudi za divji tip (Klančnik in sod., 2008).

Pri mutantu CmeF je bila kultivabilnost pri vseh izvedenih pogojih izpostavitve stresom boljše od CmeB in CmeR. Boljša odpornost pri stradanju se je pokazala tudi v primerjavi s *C. jejuni* NCTC 11168, ki smo ga izpostavili stradanju. Na začetku so bile pri obeh stresih prisotne spirale, morda je kultivabilnost tudi zato višja od ostalih mutantov. Očitno imata stradanje in oksidativni stres določen vpliv tudi na membrano, ki je pogosto temneje obarvana, pri sicer morfološko normalnih celicah. Kljub temu, da je po koncu eksperimenta koncentracija celic pri obeh stresih relativno visoka, smo po tem času opazili večinoma razgradne produkte, kar je nekoliko nenavadno, saj bi glede na krivuljo rasti pričakovali vsaj nekaj normalnih celic, po katerih bi sklepali, da kultura raste. Možno je, da so nekatere strukture od teh, ki smo jih imeli za razgradne produkte, koki, vendar je to zelo težko z gotovostjo trditi, saj so strukture zelo temno obarvane in ne jasne. Za mutanta CmeF so bile značilne spiralne oblike celic, s časom pa je naraščalo število kokov in razgradnih produktov, kar lahko razumemo kot stresni odziv.

Mutanta CmeR je stradanje najbolj prizadelo med vsemi testiranimi mutanti, saj je koncentracija celic po 5 dneh le 10^3 CFU/mL, kar je najnižje med vsemi mutanti, a vseeno približno za 1 log enoto višje kot pri *C. jejuni* NCTC 11168, izpostavljenemu stradanju. Pri obeh dejavnikih so bile na začetku prisotne spirale, po 5 dneh pa po večini koki in razgradni produkti, torej izbrana stresa vplivata tudi na morfologijo tega mutanta.

Pri vseh mutantih je kultura bolje uspevala v aerobnih pogojih kot pa v mikroaerofilnih, čemur je verjetno vzrok tudi gostota celic, saj pri tej gostoti celic kampilobaktri bolje uspevajo v aerobnih pogojih, kar so ugotovili tudi Kaakoush in sod. (2007). Pri obeh stresih, stradanju in izpostavitvi kisiku, je najbolj odporen mutant CmeF, najmanj pa CmeR. Kultivabilnost CmeB je tudi zelo podobna kultivabilnosti mutanta CmeR. Stradanje je najbolj prizadelo mutanta CmeR, najmanj pa CmeF. Oksidativni stres je najbolj prizadel CmeR in CmeB. Pri CmeB smo opazili celice bacilarne oblike, ki za CmeR in CmeF niso bile tako značilne. Zanimivo je, da pri CmeF, izpostavljenemu stresom, nismo opazili nobenih bacilov, ki so bili sicer prisotni pri kontroli CmeF. Po daljšem času stradanja (5 dni) pri vseh mutantih opazimo večinoma razgradne produkte in posamezne koke. Pri izpostavitvi stradanju, smo opazili več kokoidnih celic kot pri izpostavitvi kisiku, kar so pri divjem tipu opazili tudi Klančnik in sod. (2008).

Kaže, da mutacija v genu CmeR nima posebne vloge pri preživetju bakterij, izpostavljenim omenjenima stresoma, saj je rast zelo podobna mutantu CmeB. Večjo vlogo igra črpalka CmeF, saj je preživelost teh mutantov bistveno boljša kot pri drugih dveh. Rast CmeB in CmeR je najbolj podobna divjemu tipu, CmeF pa izstopa po tem, da je od divjega tipa bistveno bolj odporen proti stradanju, ob oksidativnem stresu pa raste praktično enako kot divji tip. Dokazali smo, da ima črpalka CmeDEF pomembno vlogo pri prilagoditvi na stres stradanja. Kadar z mutacijo zavremo črpalko CmeF, naj bi bila zato bolj aktivna črpalka CmeABC (Akiba in sod., 2006), vendar to pri teh dveh stresih očitno nima vpliva, ker z mutacijo CmeB ne dosežemo posebnega učinka v primerjavi z divjim tipom. Prav tako zato tudi verjetno CmeR nima posebne vloge, saj je rast obeh podobna divjemu tipu.

5.3 VPLIV SISTEMA ZA SIGNALIZIRANJE LuxS NA ODPORNOST PROTI STRADANJU IN OKSIDATIVNEMU STRESU

Ob izpostavitvi mutantu LuxS stradanju in oksidativnemu stresu, smo ves čas opazili rahlo zmanjševanje rasti. Koncentracije celic pri obeh stresih po 5 dneh so bile zelo podobne mutantu CmeF, ki se je med vsemi testiranimi mutanti izkazal kot najbolj odporen. Rast ob prisotnosti kisika pri LuxS je po 5 dneh približno enaka divjemu tipu, pri stradanju pa se je mutant LuxS izkazal kot bolj odporen od divjega tipa. Plummer (2012) je sicer ugotovil, da je rast mutantov LuxS praktično enaka v primerjavi z divjim tipom. Pričakovali smo, da bo mutant LuxS manj odporen proti stradanju in kisiku, saj ima z mutacijo zavrt gen *luxS*, ki naj bi imel vlogo tudi pri medcelični komunikaciji kampilobaktrov, čeprav še ni popolnoma jasno, ali je ta mehanizem res vpleten v to ali ne. Ni še tudi jasno, ali imajo AI-2 molekule, katerih sinteza je odvisna od gena *luxS* vlogo pri prilagoditvi na kisikov stres ali ne. Pri *C. jejuni* NCTC 81-176 so opazili nekoliko manjšo odpornost proti oksidativnemu stresu v primerjavi z divjim tipom (He in sod., 2008). Rahlo manjšo odpornost ob izpostavitvi oksidativnemu stresu smo opazili tudi pri našem eksperimentu, vendar se ni bistveno razlikovala od divjega tipa. Stradanje je sicer nekoliko zavrlo rast, vendar je bila le-ta po 5 dneh vseeno kar za 3 log stopnje višja od divjega tipa, izpostavljenega stradanju. Očitno ima LuxS določeno vlogo tudi pri izpostavitvi stradanju, vendar prisotnost LuxS povzroči boljšo odpornost pri izpostavitvi stradanju v primerjavi s stradanjem divjega tipa, kar je zanimivo, saj bi pričakovali ravno nasprotno, ker smo predvidevali, da je LuxS vpleten v tvorbo AI-2, ki bi *C. jejuni* omogočili boljše zaznavanje stresnih pogojev in s tem ustrezno prilagoditev (Elvers in Park, 2002)

Pri stradanju so celice po koncu eksperimenta prešle iz spiralne v kokoidno obliko, prisotni so bili tudi razgradni produkti. Na stradanje se LuxS mutanti torej ravno tako odzovejo s spremembo v kokoidno obliko, verjetno gre tudi za stanje VBNC. Pri izpostavitvi oksidativnemu stresu za čas 4 oz. 24 ur nimamo podatkov, saj vzorec ni bil primeren za uporabo. Verjetno je šlo tudi tu s časom za spremembo iz spiralne v kokoidno obliko, saj smo po 5 dneh opazili kokoidne celice in tudi takšne, ki nakazujejo prehod iz spiralne v kokoidno obliko. Pokazali smo torej, da se na stres stradanja in oksidativni stres LuxS mutanti odzovejo s spremembo v kokoidno obliko.

5.4 VPLIV ROŽMARINOVEGA IZVLEČKA V40 NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO BAKTERIJ *C. jejuni* NCTC 11168

Že subinhibitorna koncentracija izvlečka (0,039 mg/mL) je inhibirala rast po približno 10 urah, dodatek MIK (0,078 mg/mL) in višjih koncentracij pa je že imel baktericiden učinek. Najhitreje, že po 4 urah je bakterije uničila koncentracija 0,625 mg/mL, kar smo tudi pričakovali, saj je bila to najvišja koncentracija izvlečka. Po 24 urah sta popolnoma zaustavili rast tudi koncentraciji 0,313 mg/mL in 0,156 mg/mL. *C. jejuni* je očitno zelo občutljiv na izvleček rožmarina, kjer prevladuje karnozolna kislina, kar so dokazali tudi Klančnik in sod. (2009b). Z MIK smo preprečili nadaljnje naraščanje števila celic v vzorcu in tako uspešno omejili rast. Pričakovali smo sicer, da najnižja koncentracija 0,039 mg/mL izvlečka rožmarina ne bo inhibirala rasti, vendar se je izkazalo, da ima že tudi ta koncentracija inhibitorni učinek.

Čim večja je bila koncentracija izvlečka rožmarina, tem več kokov smo opazili in več razgradnih produktov. Podobno so pri *E. coli* opazili tudi Suwalak in Voravuthikunchai (2009). Pri najvišji dodani koncentraciji v začetnih urah prevladujejo razgradni produkti, po 24 urah pa v vzorcu najdemo tudi celice kokoidne oblike, torej so se bakterije očitno s časom prilagodile na stres s prehodom v kokoidno obliko, ki bi lahko bilo tudi stanje VBNC (Klančnik, 2006). Celice sicer že po 4 urah niso več rastle, vendar je možno, da so nekatere še ostale žive, na kar nakazuje prisotnost kokov, ki bi se morda v ugodnih pogojih lahko razvili v funkcionalne celice. To je sicer verjetno, ampak je malo možnosti, saj je tako visoka koncentracija močno prizadela tudi membrano in verjetno takšne celice tudi v ugodnih pogojih ne bi bile več kultivabilne. Pri koncentraciji 0,313 mg/mL izvlečka rožmarina so prav tako celice s časom prešle v kokoidno obliko, po 5 dneh so koki močno prevladovali. Celic sicer izvleček rožmarina pri tej koncentraciji ni tako močno prizadel že na začetku, saj takrat v vzorcu najdemo tudi spirale. Nekatere so odebeljene, kar bi lahko kazalo na začetek prehoda v kokoidno obliko (DeMello, 2002). Kljub temu, da so celice prešle v kokoidno obliko, so še vedno močno prisotne poškodbe celic in razgradni produkti. Pri dodatku 0,156 mg/mL izvlečka in MIK je zanimivo to, da so prisotni tudi bacili, ki jih pri višjih koncentracijah nismo opazili. Celice se niti po daljšem času niso spremenile v kokoidno obliko, kot je bilo to vidno pri baktericidnih koncentracijah. Na celicah so bile vidne poškodbe membrane, verjetno je šlo tudi za pojav vakuolizacije, membrana pa je ponekod tudi odstopala. Podobne pojave so opisali na *E. coli* z uporabo ekstrakta želoda, vendar se je tam to dogajalo pri vrednostih, višjih od MIK (Suwalak in Voravuthikunchai, 2009). Pri MIK smo po 5 dneh opazili izključno bacile, kar je očitno še kultivabilna oblika, saj so celice še rasle, čeprav omejeno. Pri vseh koncentracijah so opazne tudi poškodbe celic, torej rožmarinov izvleček vpliva na membrano tako, da jo poškoduje, kar lahko vodi do izgube celične integritete. Višja kot je bila koncentracija izvlečka, več kokov pa tudi razgradnih produktov smo opazili. Pri MIK so bili prisotni bacili, čeprav bi morda tudi tu lahko pričakovali kokoidno obliko kot odziv na prisoten stres.

5.5 VLOGA IZLIVNIH ČRPALK PRI ODPORNOSTI *C. jejuni* PROTI IZVLEČKU ROŽMARINA V40

Glede na raziskave drugih avtorjev smo predvidevali, da bo mutacija v genu *cmeB* povečala občutljivost *C. jejuni* proti izvlečku rožmarina. Inaktivacija proteina CmeB je povezana z odpornostjo na protimikrobne snovi, posledična deaktivacija črpalke CmeABC pa povzroči tudi znižanje MIK (Pumbwe, 2006). To smo potrdili tudi pri našem eksperimentu. Pri referenčnem sevu *C. jejuni* NCTC 11168 je MIK 0,078 mg/mL, pri mutantu CmeB pa 0,0098 mg/mL, kar pomeni trikrat nižjo MIK. Zaradi mutacije v genu *cmeB* je verjetno prišlo tudi do spremembe celic v bacilarno obliko, kar smo opazili tudi, ko nismo dodali izvlečka. Dodatek izvlečka rožmarina je povzročil še poškodbe membrane. Za mutanta CmeB so bili torej ves čas najbolj značilna oblika bacili, s časom pa je bilo več tudi poškodb membrane. Akiba in sod. (2006) so ugotovili, da je črpalka CmeABC vpletena v odpornost proti protimikrobnim snovem, mi pa smo potrdili, da je črpalka CmeABC vpletena tudi v protimikrobno odpornost *C. jejuni* NCTC 11168 proti izvlečku rožmarina, saj njena deaktivacija povzroči večjo občutljivost bakterij proti omenjenemu izvlečku.

Inhibicija črpalke CmeDEF lahko povzroči večjo odpornost *C. jejuni*, saj lahko vpliva na povečano izražanje črpalke CmeABC, kar pomeni tudi boljšo odpornost proti protimikrobnim snovem v primerjavi z divjim tipom (Akiba in sod., 2006). Naši rezultati so potrdili, da je mutant CmeF bolj odporen od divjega tipa, saj ima enkrat višjo MIK. Očitno inaktivacija CmeDEF res vpliva na večje izražanje črpalke CmeB in s tem boljši iznos protimikrobnih snovi iz celice, saj se je odpornost povečala. Vseeno pa CmeDEF nima tako pomembne vloge pri iznosu rožmarinovega izvlečka iz celice, saj odpornost ni toliko višja kot pri divjem tipu. Ko smo inaktivirali CmeB, je bila odpornost bistveno nižja, zato vidimo, da ima črpalka CmeDEF pri odstranjevanju testiranega izvlečka iz celice sekundarno vlogo. Nekoliko sicer poveča izražanje CmeABC, vendar, če inaktiviramo CmeABC, CmeDEF ni sposobna v celoti prevzeti njene vloge in enako učinkovito opravljati funkcije iznosa za celico toksičnih snovi. Zanimivo je, da smo pri morfologiji mutanta CmeF pri edinemu od testiranih mutantov ob vseh časih opazili prevladujoče spiralne oblike celic, pogosto z odebelitvijo na enem koncu. Pri ostalih dveh mutantih so bile bolj značilne bacilarne oblike celic. Odebeljene celice so bile sploh značilne za višje koncentracije izvlečka, prav tako tudi poškodbe membrane.

Kadar je regulator CmeR aktiven, se veže na operatorsko mesto operona CmeABC in prepreči njegovo transkripcijo ter s tem tudi zavre izražanje črpalke CmeABC. Če CmeR inaktiviramo, je posledica povečano izražanje črpalke CmeABC, kar bi pomenilo tudi večjo odpornost proti protimikrobnim snovem (Gu in sod., 2007; Lin in sod., 2005). Študije tudi kažejo, da regulator CmeR ni vedno vpleten v izražanje CmeABC, ampak je možno, da sodeluje tudi pri regulaciji drugih genov, katerih funkcije še ne poznamo (Lin in sod., 2005). Če bi imel CmeR velik vpliv na izražanje CmeABC, bi pričakovali tudi močno zvišanje MIK, saj bi bilo izražanje CmeABC nenadzorovano in iznos toksičnih snovi iz celice močno povečan. Vseeno pa se to ni zgodilo, saj je bila MIK od referenčnega seva le nekoliko višja (0,156 mg/mL). To sicer kaže na večjo odpornost mutanta CmeR, vendar se

vseeno ni drastično povečala. Kljub temu lahko rečemo, da je odpornost mutanta CmeR proti protimikrobnim snovem boljša od referenčnega seva, kar je vidno tudi iz rezultatov. Da je bil mutant CmeR nekoliko bolj odporen od referenčnega seva, so dokazali tudi Lin in sod. (2005). Odpornost je zelo podobna mutantu CmeF, kar kaže na to, da imata črpalka CmeDEF in regulator CmeR sekundarno vlogo pri iznosu protimikrobnih snovi, glavna pa je črpalka CmeABC. Po morfologiji je bil mutant CmeR bolj podoben mutantu CmeB, kar je zanimivo, saj je po kultivabilnosti bolj podoben CmeF. Pri CmeR smo prav tako kot pri CmeB opazili večinoma bacilarne oblike celic, kar verjetno kaže na to, da ta mutacija v CmeB in CmeR vseeno povezani, vendar glede na kultivabilnost lahko sklepamo, da ne v takšni meri, kot bi morda pričakovali. Tudi pri mutantu CmeR je dodatek izvlečka rožmarina povzročil poškodbe membrane, vendar so poškodbe membrane bolj izrazite pri mutantu CmeB.

5.6 VPLIV SISTEMA ZA SIGNALIZIRANJE NA ODPORNOST PROTI IZVLEČKU ROŽMARINA V40

Pri mutantih LuxS smo pričakovali podobno odpornost na protimikrobne snovi kot pri referenčnem sevu, saj imata tudi enako MIK. Raziskave drugih avtorjev so pokazale, da je tudi rast mutantov LuxS zelo podobna rasti divjega tipa *C. jejuni* NCTC 11168 (Plummer, 2012). Tudi naši rezultati so potrdili, da je rast obeh sevov praktično enaka, kar pokažejo tudi rastne krivulje ob dodatkih različnih koncentracij rožmarinovega izvlečka. Razlika je predvsem v morfologiji. Pri referenčnem sevu smo v vzorcu opazili pravilne spiralne celice, ob dodatku višjih koncentracij izvlečka pa koke. Pri LuxS so bile že na začetku prisotne odebeljene spirale, kasneje pa razgradni produkti in prav tako odebeljene spirale. Kokov nismo nikoli opazili. Pričakovali smo, da se bodo LuxS mutanti slabše prilagodili in slabše preživeli dodatke rožmarinovega izvlečka, saj naj bi LuxS imel vlogo pri medceličnem komuniciranju in bi se pri inaktivaciji tega gena zato slabše prilagodile kot celota (Plummer in sod., 2012). Temu ni bilo tako, saj LuxS očitno nima pomembne vloge pri odpornosti na izvleček rožmarina. LuxS pa je pomemben očitno za morfologijo celic in njihovo gibljivost. Pri teh mutantih so bile celice iznakažene- nepravilno zvite ali odebeljene, kar ni značilno za divji tip. Prav tako niso bili prisotni bički, ki omogočajo celicam gibanje. Kljub morfološkim spremembam je kultivabilnost še vedno podobna referenčnemu sevu, kar kaže na to, da spremembe v morfologiji, ki so nastale nimajo bistvene vloge pri rasti bakterij, tudi ob dodatku izvlečka rožmarina. Zanimivo je tudi, da LuxS mutanti niso prešli v kokoidno obliko, ko smo vzorcu dodali izvleček. Inaktivacija LuxS torej vpliva tudi na nesposobnost prehoda v kokoidno obliko, vsaj ob dodatku izvlečka rožmarina. Odebeljene celice so očitno predvsem posledica mutacije, saj smo jih opazili tudi pri vzorcih, kjer nismo dodali izvlečka. Zanimivo je, da sta rast LuxS in divjega tipa tako podobni, čeprav pri divjem tipu celice preidejo v kokoidno obliko in bi zato lahko pričakovali slabšo kultivabilnost. Pri LuxS je opaznih tudi veliko razgradnih produktov, zaradi česar bi pričakovali več poškodb celic in posledično slabšo kultivabilnost, vendar rastne krivulje kažejo, da temu ni tako.

6 SKLEPI

Rezultati eksperimentalnega dela, ki smo ga opravili, potrjujejo delovne hipoteze, ki smo jih postavili na začetku. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Mutacije v genih izlivnih črpalk in regulatornem proteinu CmeR vplivajo na odpornost proti izvlečka rožmarina, kar pomeni, da so izlivne črpalke vpletene v mehanizem odpornosti proti testirani protimikrobni snovi. Največjo vlogo ima črpalka CmeB, saj je njena inaktivacija povzročila največjo občutljivost proti izbranemu izvlečku. Mutanta CmeF in CmeR sta bila odpornejša od divjega tipa, kar še potrjuje pomembnost črpalke CmeB pri odpornosti. Za celice mutantov CmeB in CmeR so bili značilni bacili, za mutanta CmeF pa spirale in odebeljene spirale. Dodatek izvlečka je povzročil poškodbe celične ovojnice.
- Sistem za signaliziranje LuxS nima posebne vloge pri odpornosti proti izvlečku rožmarina, saj je bila rast mutanta zelo podobna rasti referenčnega seva. Mutacija je vplivala na morfološke spremembe, saj so bile ves čas prisotne odebeljene spiralne oblike celic, ki sicer za divji tip niso značilne.
- Vsi mutanti na izlivnih črpalkah in regulatornem proteinu CmeR so bili bolj odporni proti stradanju in manj odporni proti oksidativnemu stresu kot referenčni sev. Po daljši izpostavitvi omenjenima stresoma so pri mutantih CmeF in CmeR celice prešle iz spiralne v kokoidno obliko, pri CmeB pa iz bacilarne v kokoidno, oz. razgradne produkte.
- Sistem LuxS je vpleten predvsem v mehanizem odpornosti proti stradanju.

6.1. PREDLOGI NADALJNIH RAZISKAV O VPLIVU OKOLJSKIH STRESOV NA KULTIVABILNOST IN MORFOLOGIJO *C. jejuni*

Zanimive bi bile nadaljnje študije o vplivu okoljskih stresov na virulenco bakterij *C. jejuni*, kot so že poročali Mihaljevič in sod. (2007) ter Šikić Pogačar in sod. (2009, 2010). Ker kampilobaktri naseljujejo tudi živila, so podvrženi različnim okoljskim stresom, zato bi bile raziskave prilagoditev na določene strese in s tem virulentnost, zelo koristne. Raziskovali bi lahko tudi, kako izlivne črpalke in sistem za signaliziranje vplivajo na virulentnost kampilobaktrov. Kar se tiče virulence, je zanimiv predvsem sistem za signaliziranje, saj so z njegovo pomočjo bakterije sposobne tudi medcelične komunikacije, za kar je bilo že dokazano, da lahko vpliva tudi na virulentnost teh bakterij (Elvers in Park, 2002).

Ker se je rožmarinov izvleček izkazal kot učinkovito naravno protimikrobno sredstvo, so zanimive tudi raziskave v smeri proučevanja rožmarinovega izvlečka kot naravnega

konzervansa živil (Piskernik in sod., 2011; Klančnik in sod., 2011). Nova spoznanja bi omogočilo povezovanje bazičnih študij stresnega odziva in praktična uporaba rastlinskih izvlečkov v živilih.

Ugotovili smo, da okoljski stresi pri kampilobaktrih povzročijo tudi morfološke spremembe. Ker s podatki s presevnega elektronskega mikroskopa nismo dobili podatkov o živosti bakterij, bi bilo smiselno nadaljevati raziskavo v smeri ugotavljanja živosti določenih morfoloških oblik celic, ki nastanejo zaradi podvrženosti stresom. Tako bi ugotovili, ali so določene morfološke oblike tudi žive in na ta način pomemben dejavnik tveganja za varnost živil in zdravje gostitelja.

7 VIRI

- Akiba M., Lin J., Barton Y.W., Zhang Q. 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 52-60.
- Bassler B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 6: 582-587.
- Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughes T.P., Blaser M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Disease*, 157: 472–479.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Cappelletti 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.
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564-582.
- Daasti J.I., Tareen M.A., Lugert R., Zautner A.E., Gross U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity- associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 205-211.
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J., 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Disease*, 125: 390– 392.
- DeMello I.I.G. 2002. Factors affecting growth and culturing of *Campylobacter jejuni*. Doctoral dissertation. Gainesville, University of Florida: 272 str.
- EFSA. 2012. *Campylobacter*. Parma, European Food Safety Authority: 2 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/campylobacter.html> (oktober 2011)
- Elvers K.T., Park S.F. 2002. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a luxS encoded signalling molecule. *Microbiology*, 148: 1475-1481.
- Eloff J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711-713.

- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76-82.
- Giuliodori A.M., Gualerzi C.O., Soto S., Vila J., Tavio M.M. 2007. Review on bacterial stress topics. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1113: 95-104.
- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Minervini F., Limitone A. 2007. Cell-cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 1-2: 34-45.
- Goelz G., Adler L., Huehn S., Alter T. 2011. LuxS distribution and AI-2 activity of *Campylobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 571-578.
- Gu R., Su C., Shi F., Li M., McDermott G., Zhang Q., Yu E. 2007. Chrystal structure of the transcriptional regulator CmeR from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Molecular Microbiology*, 372: 583-593.
- Guerry P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15: 456-461.
- Guo B., Lin J., Reynolds D.L., Zhang Q. 2010. Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1: 77-83.
- Hamilton-Miller J.M.T., Shah S. 1999. Disorganization of cell division of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a component of tea (*Camellia sinensis*): a study by electron microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 176: 463-469.
- He Y., Frye J.G., Strobaugh T.P., Chen C.Y. 2008. Analysis of AI-2/LuxS-dependent transcription in *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 4: 399-415.
- Hu L., Tall B. D., Curtis S. K., Kopecko D. J. 2008. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. *Infection and Immunity*, 76: 5294-5304.
- Humphrey T., O' Brien S., Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 466-471.
- Jeon B., Muraoka W.T., Zhang Q. 2010. Advances in *Campylobacter* biology and implications for biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 3: 242-258.

- Kaakoush N.O., Miller W.G., De Reuse H., Mendz G.L. 2007. Oxygen requirement and tolerance of *Campylobacter jejuni*. *Research in Microbiology*, 158: 644-650.
- King T., Dykes G. 2008. Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, 91: 1423-1429.
- Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 136 str.
- 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, 1: 41-46.
- Klančnik A., Guzej B., Jamnik P., Vučković D., Abram M., Smole Možina S. 2009a. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Research in Microbiology*, 160, 5: 345-352.
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009b. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-157.
- Klančnik A., Guzej B., Hadolin Kolar M., Abramovič H., Smole Možina S. 2009c. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8:1744-1752.
- Klančnik A., Piskernik S., Smole Možina S., Gašperlin L., Jeršek B. 2011. Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food microdilution method. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 413-420.
- Lewis H.A., Bric Furlong E., Laubert B., Eroshkina G.A., Batiyenko Y., Adams J.M., Bergseid M.G., Marsh C., Peat T.S., Sanderson W.E., Sauder J.M., Buchanan S.G. 2001. A structural genomic approach to the study of quorum sensing: crystal structures of three LuxS orthologs. *Structure*, 9: 527-537.
- Ligowska M., Cohn M.T., Stabler R.A., Wren B.W., Brondsted L. 2011. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 111-115.

- Lin J., Overbye Michel L., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2124-2131.
- Lin J., Akiba M., Sahin O., Zhang Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1067-1075.
- Lo A.H., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23: 983-991.
- Lyon W.R., Madden J.C., Levin J.C., Stein J.L., Caparon M.G. 2001. Mutation of luxS affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 42: 145-157.
- McDougald D., Rice S.A., Weichert D., Kjelleberg S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 25:1-9.
- Mihaljevič R.R., Šikič M., Klančnik A., Brumini G., Možina S.S., Abram M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43: 120-125.
- Murphy C., Carroll C., Jordan N.K. 2005. The effect of different media on the survival and induction of stress responses by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*, 62: 161-166.
- Nachamkin I., Szymanski M., Blaser M. J. 2008. *Campylobacter*. 3rd ed. Washington, ASM Press: 716 str.
- Nakajima Y., Ishibashi J., Yukuhiro F., Asaoka A., Taylor D., Yamakawa M. 2003. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1624: 125– 130.
- Park S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177-188.
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665-668.
- Pei D., Zhu J. 2004. Mechanism of action of S- ribosylhomocysteinase (LuxS). *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 5: 492-497.

- Piskernik S., Klančnik A., Riedel C. T., Brøndsted L., Smole Možina S. 2011. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control*, 22: 718-724.
- Plummer P.J. 2012. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 22: 1-9.
- Plummer P., Zhu J., Akiba M., Pei D., Zhang Q. 2011 Identification of a key amino acid of LuxS involved in AI-2 production in *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 6, 1: e15876, doi: 10.1371/journal.pone.0015876: 8 str.
- Plummer P., Sahin O., Burrough E., Sippy R., Mou K., Rabenold J., Yaeger M., Zhang Q. 2012. Critical role of LuxS in the virulence of *Campylobacter jejuni* in a guinea pig model of abortion. *Infection and Immunity*, 80, 2: 585-593.
- Pumbwe L., Glass D., Wexler H.M. 2006. Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 9: 3150-3153.
- Ryan R.P., Dow J.M. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, 154: 1845-1858.
- Schneider R., Lockatell C.V., Johnson D., Belas R. 2002. Detection and mutation of a LuxS-encoded autoinducer in *Proteus mirabilis*. *Microbiology*, 148:773-782.
- Si W., Gong W., Tsao R., Kalab M., Yang R., Yin Y. 2006. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125: 204-210.
- Suwalak S., Voravuthikunchai S.P. 2009. Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. *Journal of Electron Microscopy*, 58, 5: 315-320.
- Šikić Pogačar M., Rubeša Mihaljević R., Klančnik A., Brumini G., Abram M., Smole Možina S. 2009. Survival of stress exposed *Campylobacter jejuni* in the murine macrophage J774 cell line. *International Journal of Food Microbiology*, 129,1: 68-73.
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Smole Možina S., Cenčič A. 2010. Attachment, invasion, and translocation of *Campylobacter jejuni* in pig small-intestinal epithelial cells. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 7: 589-595.
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199-1218.

Tazumi A., Negoro M., Tomiyama Y., Misawa N., Itoh K., Moore J.E., Millar B.C., Matsuda M. 2011. Uneven distribution of the LuxS gene within the genus *Campylobacter*. British Journal of Biomedical Science, 68, 1: 19-22.

Vitiva. 2008. VivOX Descriptive sheet. Markovci, Vitiva d.d.: 7 str.
<http://www.vitiva.eu/> (december 2010)

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

Williams P., Winzer K., Chan W.C., Camara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 362: 1119-1134.

Xavier B. K., Bassler B. L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Current Opinion in Microbiology, 6: 191-197.

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in somentorici dr. Anji Klančnik za strokovno vodenje, nasvete, pomoč in motivacijo pri opravljanju diplomskega dela.

Iskrena hvala tudi dr. Magdi Tušek Žnidarič za pomoč in vodenje na elektronskem mikroskopu ter za vse koristne nasvete in pomoč pri tolmačenju rezultatov.

Recenzentki doc. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Hvala tudi Saši Piskernik in vsem kolegicam v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo za pomoč in dobro vzdušje pri delu.

Nenazadnje gre zahvala tudi mojima staršema, ki sta mi s svojo vzgojo in trdom omogočila vse to in mi vedno stala ob strani.

Hvala Miku za pomoč pri slikah, Renati za pomoč pri urejanju in vsem prijateljem, ki ste tako in drugače pomagali pri nastanku tega dela.