

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katarina ŠIMUNOVIĆ

DELOVANJE α -PINENA NA BAKTERIJO
Campylobacter jejuni

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katarina ŠIMUNOVIĆ

DELOVANJE α -PINENA NA BAKTERIJO *Campylobacter jejuni*

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

THE EFFECTS OF α -PINENE ON *Campylobacter jejuni*

M. Sc. THESIS
Mater Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. 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 v Laboratoriju za veterinarsko mikrobiologijo in preventivno medicino Fakultete za veterinarsko medicino Državne univerze v Iowi.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Katarina Šimunović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK UDK 579.24/.26:547.9:615.3(043)=163.6

KG *Campylobacter jejuni*/patogeni mikroorganizmi/protimikrobne snovi/odpornost proti antibiotikom/ α -pinen/modulatorno delovanje/izlivne črpalke/membranska integriteta

AV ŠIMUNOVIĆ, Katarina, dipl. mikrobiol. (UN)

SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije

LI 2016

IN DELOVANJE α -PINENA NA BAKTERIJO *Campylobacter jejuni*

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)

OP X, 67 str., 14 pregl., 15 sl., 175 vir.

IJ sl

JI sl/en

AB Kmalu po začetku uporabe prvih antibiotikov so se pojavile bakterije z odpornostjo proti antibiotikom. Bakterije lahko za razvoj odpornosti uporabljajo enega ali kombinacijo več mehanizmov, ki vključujejo spremembo tarče antibiotikov, sintezo encimov, ki spremenijo antibiotik, zmanjšanje prepustnosti celične stene in aktivno izčrpavanje antibiotikov iz celic. Ti mehanizmi so prav tako zelo pomembni pri razvoju odpornosti proti antibiotikom pri bakterijah *Campylobacter jejuni*. Število primerov gastroenteritisa, ki jih povzroča *C. jejuni* in število odpornih izolatov z vsakim letom narašča, število na novo odkritih protimikrobnih učinkovin pa temu trendu ne sledi. Zaradi tega se pojavlja potreba po spojinah, ki bi obstoječim antibiotikom povrnile učinkovitost. V naši raziskavi smo v ta namen testirali (-)- α -pinen. Preučili smo protimikrobno in odpornostno-modulatorno učinkovitost spojine proti sevom *C. jejuni* iz različnih virov in z različno odpornostjo proti antibiotikom. (-)- α -pinen je imel šibko protimikrobno delovanje, saj je minimalna inhibitorna koncentracija večine sevov znašala 1000 mg/L ali več. V subinhibitorni koncentraciji (125 mg/L) je (-)- α -pinen izkazoval pri večini testiranih sevov v kombinaciji z drugimi protimikrobnimi spojinami odpornostno-modulatorno učinkovitost. S testiranjem kopičenja etidijevega bromida v celicah smo ugotovili, da (-)- α -pinen deluje kot zaviralec izlivnih črpalk *C. jejuni* v subinhibitorni koncentraciji 62,5 mg/L. Način delovanja (-)- α -pinena smo poskušali pojasniti s testiranjem kopičenja etidijevega bromida na mutantih s prekinjenimi odprtimi bralnimi okvirji genov izlivnih črpalk *cmeABC*, *cmeDEF*, *cmeGH* in *cj1687*. (-)- α -pinen je povzročil manjše kopičenje etidijevega bromida pri sevih z okvarjenima izlivnima črpalkama *CmeABC* in *Cj1687*, kar kaže na to, da sta ti dve izlivni črpalke možni tarči (-)- α -pinena. Koncentracija, pri kateri je (-)- α -pinen povzročil učinkovito zaviranje izlivnih črpalk (62,5 mg/L), je bila nižja od koncentracije, pri kateri je imel (-)- α -pinen dober modulatorni učinek. Zaradi tega pojava smo dodatno testirali vpliv (-)- α -pinena na prepustnost celične membrane *C. jejuni*. Pri tem smo ugotovili, da (-)- α -pinen pri višji koncentraciji (125 mg/L) povzroča znatno zmanjšanje integritete celične membrane, česar pri nižji koncentraciji nismo opazili. S tem smo dokazali, da je (-)- α -pinen v *in vitro* pogojih učinkovit modulator odpornosti bakterij *C. jejuni* in, da je njegova učinkovitost vezana na vsaj 2 mehanizma delovanja, in sicer inhibicijo izlivnih črpalk in povečanjem prepustnosti celične membrane.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 579.24/.26:547.9:615.3(043)=163.6

CX *Campylobacter jejuni*/pathogens/antimicrobial agents/antibiotic resistance/ α -pinene/modulatory activity/efflux pumps/membrane integrity

AU ŠIMUNOVIĆ, Katarina

AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/SEPČIĆ, Kristina (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2016

TI THE EFFECTS OF α -PINENE ON *Campylobacter jejuni*

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO X, 67 p., 14 tab., 15 fig., 175 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Shortly after the use of the first antibiotics, antibiotic resistant bacteria appeared. To develop resistance, bacteria can use one or a combination of several mechanisms, which include the alteration of the antibiotic target, enzyme synthesis, which changes the antibiotic, the reduction of cell permeability, and active efflux of the antibiotics from the cells. These mechanisms are likewise very important in the development of the antibiotic resistance of the *Campylobacter jejuni* bacteria. The number of cases of gastroenteritis caused by *C. jejuni* and the number of resistant isolates rises every year, however the number of newly discovered antimicrobial substances does not follow this trend. This is why a need for compounds which could recover the effectiveness of existing antibiotics increases. For this purpose we have tested (-)- α -pinene in our research. We have studied the antimicrobial and modulatory effectiveness of this compound against *C. jejuni* strains from different origin and different antibiotic resistance profiles. (-)- α -pinene exhibited a weak antimicrobial activity, as the minimal inhibitory concentration of the majority of the strains was 1000 mg/L or more. In the subinhibitory concentration (125 mg/L), (-)- α -pinene showed a modulatory effect with most of the tested strains in combination with other antimicrobial compounds. By testing the accumulation of ethidium bromide in the cells, we found that (-)- α -pinene functions as an inhibitor to the *C. jejuni* efflux pumps in a subinhibitory concentration of 62.5 mg/L. We attempted to explain the mode of action of (-)- α -pinene by testing the accumulation of ethidium bromide on mutants with interrupted gene frameshifts of efflux pumps *cmeABC*, *cmeDEF*, *cmeGH* and *cj1687*. (-)- α -pinene caused a small accumulation of ethidium bromide in mutants of efflux pumps *CmeABC* and *Cj1687*, which points to these two efflux pumps being potential targets of (-)- α -pinene. The concentration in which (-)- α -pinene caused an effective inhibition of efflux pumps was lower than the concentration in which (-)- α -pinene exhibited a good modulatory effect. Due to this phenomenon we additionally tested the effect of (-)- α -pinene on the permeability of the *C. jejuni* cell membrane. We determined that at higher concentration (125 mg/L) (-)- α -pinene causes a substantial reduction of the cell membrane's integrity, which is something we did not observe at the lower concentration. With this we have proven that (-)- α -pinene in *in vitro* conditions is an effective resistance modulator to *C. jejuni* bacteria and its mode of action is linked to two mechanisms, namely the inhibition of efflux pumps and the increase of the membrane permeability.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 (-)- α -PINEN.....	3
2.1.1 α -pinen v rastlinah in njegova biološka vloga.....	4
2.1.2 Vpliv α -pinena na človeško zdravje	5
2.1.3 Protimikrobno delovanje α -pinena	5
2.2 BAKTERIJA <i>Campylobacter jejuni</i>	6
2.2.1 Zgodovina	6
2.2.2 Rod <i>Campylobacter</i>	6
2.2.3 Značilnosti <i>Campylobacter jejuni</i>	7
2.2.4 Mehanizmi odpornosti bakterije <i>Campylobacter jejuni</i>	9
2.2.4.1 Odpornost proti fluorokinolonom.....	9
2.2.4.2 Odpornost proti tetraciklinom	10
2.2.4.3 Odpornost proti makrolidom	10
2.2.4.4 Odpornost proti aminoglikozidom	11
2.2.4.5 Ostale odpornosti.....	11
2.2.4.6 Vloga izlivnih črpalk v odpornosti bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> proti antibiotikom.....	11
2.3 METODE DELO S <i>Campylobacter jejuni</i> V LABORATORIJU IN UGOTAVLJANJE VPLIVA PROTIMIKROBNIH SREDSTEV NANJ.....	12
2.3.1 Gojenje <i>Campylobacter jejuni</i> v laboratoriju	12
2.3.2 Določanje vpliva protimikrobnih sredstev na <i>C. jejuni</i>	13
2.3.3 Ugotavljanje vpliva protimikrobnih sredstev na delovanje izlivnih črpalk	14
2.3.4 Ugotavljanje vpliva protimikrobnih sredstev na celično membrano	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 SHEMA POTEKA DELO.....	17

3.2 MATERIAL	18
3.2.1 Mikroorganizmi	18
3.2.2 Gojišča	21
3.3 METODE	23
3.3.1 Revitalizacija bakterijskih kultur	23
3.3.2 Priprava seva s prekinjenim bralnim okvirjem gena <i>cmeG</i>	23
3.3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo za potrditev prisotnosti fragmenta in elektroforeza	23
3.3.2.2 Elektroforeza	24
3.3.2.3 Ligacija in transformacija	24
3.3.2.4 Izolacija DNA	25
3.3.2.5 Vstavljanje samomorilskega plazmida v <i>C. jejuni</i> 11168 s postopkom elektroporacije	25
3.3.2.5.1 Priprava bakterijske kulture za postopek elektroporacije	25
3.3.2.5.2 Izvedba elektroporacije	25
3.3.3 Določanje protimikrobne in modulatorne učinkovitosti (-)-α-pinena	26
3.3.3.1 Priprava kulture	26
3.3.3.2 Priprava protimikrobnih snovi	27
3.3.3.2.1 (-)- α -pinen	27
3.3.3.2.2 Ciprofloksacin	27
3.3.3.2.3 Eritromicin in triklosan	27
3.3.3.2.4 Etidijev bromid	28
3.3.3.3 Mikrodilucija v bujonu	28
3.3.3.4 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z resazurinom	29
3.3.3.4.1 Priprava raztopine resazurin za zaznavanje živosti celic	29
3.3.3.4.2 Določanje MIK	29
3.3.4 Test kopičenja etidijevega bromida v celicah	31
3.3.4.1 Priprava kulture	31
3.3.4.2 Priprava inhibitorjev	31
3.3.4.2.1 (-)- α -pinen	31
3.3.4.2.2 Karbonil cianid m-klorofenil hidrazon (CCCP)	31
3.3.4.2.3 Reserpin	31
3.3.4.3 Spektrofluorimetrično določanje EtBr v celicah	31
3.3.5 Test vpliva snovi na membransko integriteto bakterijskih celic	32
3.3.5.1 Priprava kulture	33
3.3.5.2 Priprava reagenta za barvanje celic	33
3.3.6 Statistična analiza	33
4 REZULTATI	34
4.1 DOLOČANJE PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA (-)- α -PINENA	34

4.2 DOLOČANJE ODPORNOSTNO-MODULATORNE AKTIVNOSTI (-)- α -PINENA	35
4.3 TEST KOPIČENJA ETIDIJEVEGA BROMIDA	39
4.3.1 Test kopičenja etidijevega bromida v <i>C. jejuni</i> NCTC11168 pod vplivom dveh različnih koncentracij (-)-α-pinena in dveh znanih inhibitorjev izlivnih črpalk, reserpina in CCCP	39
4.3.2 Test kopičenja etidijevega bromida v <i>C. jejuni</i> NCTC11168 in mutantama 11168Δ<i>cmeB</i> in 11168Δ<i>cj1687</i>.....	41
4.3.3 Test kopičenja etidijevega bromida na večjem številu sevov	42
4.4 PRIPRAVA MUTANTE Z IZBRISOM V GENU <i>cmeG</i> IN TESTIRANJE VPLIVA (-)- α -PINENA NANJO.....	44
4.4.1 Potrditev vstavljenega fragmenta s PCR reakcijo	44
4.4.2 Test kopičenja etidijevega bromida pri 11168Δ<i>cmeG</i>.....	44
4.5 PRIMERJAVA KOPIČENJA ETIDIJEVEGA BROMIDA V OSNOVNI KULTURI BREZ DODANIH INHIBITORJEV IN V KULTURI Z DODATKOM (-)- α -PINENA PRI ODPORNIH IN OBČUTLJIVIH SEVIH	45
4.6 DOLOČANJE VPLIVA (-)- α -PINENA NA CELIČNO MEMBRANO <i>C. jejuni</i> NCTC11168	46
5 RAZPRAVA.....	48
5.1 PROTIMIKROBNO IN MODULATORNO DELOVANJE (-)- α -PINENA.....	48
5.2 (-)- α -PINEN - INHIBITOR BAKTERIJSKIH IZLIVNIH ČRPALK	49
5.3 VPLIV (-)- α -PINENA NA PREPUSTNOST CELIČNE MEMBRANE.....	50
6 SKLEPI	52
7 POVZETEK.....	53
8 VIRI	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Naprave in njihovi proizvajalci	18
Preglednica 2: Laboratorijski material in raztopine	19
Preglednica 3: Seznam sevov <i>C. jejuni</i> , ki smo jih uporabljali v poskusih, njihov izvor in poreklo.	19
Preglednica 4: Mikrobiološka gojišča, njihovi proizvajalci in referenčne številke	22
Preglednica 5: Receptura za pripravo gojišča LB agar	22
Preglednica 6: Receptura za pripravo gojišča SOC	22
Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR za potrjevanje prisotnosti fragmenta DNA <i>cmeG::aphA3</i>	24
Preglednica 8: Nastavitve aparata za elektroporacijo	26
Preglednica 9: Valovne dolžine za spektrofotometrično določanje MIK	30
Preglednica 10: Razporeditev reagenta, (-)- α -pinena in bakterijske kulture za določanje integritete celične membrane v mikrotitrski ploščici	32
Preglednica 11: Minimalna inhibitorna koncentracija (-)- α -pinena (MIK _{AP}), prikazana v mg/L, določena na 74 sevih in 6 mutantih <i>C. jejuni</i>	34
Preglednica 12: Določanje MIK antibiotikov ciprofloksacin in eritromicin v prisotnosti (-)- α -pinena (125 mg/L) (CIP _{AP} in ERY _{AP}) in brez njega (CIP in ERY) na 9 sevih <i>C. jejuni</i> in 2 mutantih ter prikaz modulatornega faktorja (MF)	35
Preglednica 13: Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) protimikrobnih sredstev triklosana in etidijevega bromida v prisotnosti (-)- α -pinena (125 mg/L) (TK _{AP} in EtBr _{AP}) in brez njega (TK in EtBr) na 9 sevih <i>C. jejuni</i> in 2 mutantih ter prikaz pripadajočega modulatornega faktorja (MF)	36
Preglednica 14: Prikaz MIK (mg/L) ciprofloksacina in eritromicina (CIP in ERI) brez in z dodatkom (-)- α -pinena (125 mg/L) (CIP _{AP} in ERI _{AP}) za 56 sevov <i>C. jejuni</i> in prikaz pripadajočega modulatornega faktorja (MF)	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura α -pinena (ChEBI, 2016).....	3
Slika 2: Bakterija <i>C. jejuni</i> pod elektronskim mikroskopom (SEM) (Carr, 2016)	7
Slika 3: Rast <i>C. jejuni</i> na gojišču Karmali (BD, 2009).....	13
Slika 4: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela	17
Slika 5: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje fragmenta <i>cmeG::aphA3</i>	24
Slika 6: Priprava raztopin ciprofloksacina, eritromicina in (-)- α -pinena (AP) v mikrotitrski ploščici za preverjanje minimalne inhibitorne koncentracije (-)- α -pinena (MIK _{AP}) in modulatornega učinka (-)- α -pinena (125 mg/L) v kombinaciji s ciprofloksacinom in eritromicinom. Ploščica vsebuje kulturo <i>C. jejuni</i> brez dodatkov ali pozitivno kontrolo (P+) in čisto gojišče MHB ali negativno kontrolo (N-).....	28
Slika 7: Priprava raztopin triklosana, etidijevega bromida in (-)- α -pinena (AP) v mikrotitrski ploščici za preverjanje minimalne inhibitorne koncentracije (-)- α -pinena (MIK _{AP}) in modulatornega učinka (-)- α -pinena (125 mg/L) v kombinaciji s triklosanom in etidijevim bromidom.....	29
Slika 8: Primer določanja modulatornega faktorja (MF) in minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (-)- α -pinena.....	30
Slika 9: Kopičenje etidijevega bromida v celicah <i>C. jejuni</i> NCTC11168 brez obdelave kulture, z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L, 125 mg/L in 250 mg/L, reserpina v koncentraciji 100 mg/L in CCCP v koncentraciji 10 mg/L ter prikaz bazne fluorescence etidijevega bromida brez bakterijske kulture	40
Slika 10: Spremljanje kopičenja etidijevega bromida (EtBr), prikazano v relativnih fluorescenčnih enotah (RFU) v celicah <i>C. jejuni</i> NCTC11168 (A), 11168 Δ <i>cmeB</i> (B) in 11168 Δ <i>cj1687</i> (C) v prisotnosti (-)- α -pinena (62,5 mg/L), reserpina (100 mg/L), CCCP (10 mg/L) in brez inhibitorja.	41
Slika 11: Kopičenje etidijevega bromida (EtBr) brez inhibitorja (■) in z dodatkom (-)- α -pinena (62,5 mg/L) (○) testirano na sevih <i>C. jejuni</i> 375/06 (A), 1190/09 (B), 1518/08 (C), 573/03 (D), C2 (E), 9090 (F), 53124 (G), 57360 (H), 58429 (I), 60089 (J), 660/08 (K), C33 (L), 816 (M), K49/4 (N), 33560 (O) in 11168 Δ <i>cmeF</i> (P)	43
Slika 12: Preverjanje prisotnosti fragmenta <i>cmeG::aphA3</i> velikosti približno 2,7 kbp v klonih 1, 2, 3, 4 in 5 z gelsko elektroforezo po reakciji PCR.....	44
Slika 13: Kopičenje etidijevega bromida v <i>C. jejuni</i> 11168 Δ <i>cmeG</i> brez inhibitorja, z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L in 125 mg/L, reserpina (100 mg/L) in CCCP (10 mg/L)	45
Slika 14: Primerjava kopičenja etidijevega bromida (EtBr) brez dodatka inhibitorja in z dodatkom (-)- α -pinena (62,5 mg/L) pri sevih, občutljivih na antibiotike in sevih, odpornih proti antibiotikom.....	46
Slika 15: Test integritete celične membrane <i>C. jejuni</i> NCTC11168 pri neobdelani bakterijski kulturi, s toploto obdelani kulturi in pri kulturah z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L in 125 mg/L	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AME	aminoglikozid-modificirajoči encimi (<i>angl. Aminoglycoside modifying enzymes</i>)
ATCC	ameriška zbirka tipskih kultur (<i>angl. The American Type Culture Collection</i>)
BHI	gojišče iz možganov in src (<i>angl. Brain heart infusion</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CFU	enote, ki tvorijo kolonije (<i>angl. Colony forming units</i>)
CIP	ciprofloksacin
CmeABC	izlivna črpalka CmeABC
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPI	inhibitor efluksne črpalke (<i>angl. efflux pump inhibitor</i>)
ERY	eritromicin
EtBr	etidijev bromid
IL6 in 8	interlevkin 6 in 8
LPS	lipopolisaharid
MF	modulacijski faktor
MHA	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NCTC	nacionalna zbirka tipskih kultur (<i>angl. The National Collection of Type Cultures</i>)
OD	optična gostota (<i>angl. optic density</i>)
OmpC	zunanj membranski protein C
OmpF	zunanj membranski protein F
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RFU	relativne fluorescenčne enote (<i>angl. relative fluorescent units</i>)
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	pribosomalna ribonukleinska kislina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	vrstični ali »scanning« mikroskop
TK	triklosan
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina

1 UVOD

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* kolonizirajo mnoge živali. Zaradi svoje razširjenosti se pogosto znajdejo v živilsko/predelovalni verigi in preko kontaminiranih živil povzročajo bolezen pri ljudeh. Človek se z bakterijo lahko okuži z uživanjem nepravilno termično obdelanega mesa, mleka in vode (Noormohamed in sod., 2013; Kassenborg in sod. 2004). Med boleznimi, ki se prenašajo s hrano, so kampilobakterioze že vrsto let v Sloveniji in svetu med najpogostejšimi. Poleg velikega števila okužb s *C. jejuni* je zaskrbljujoč tudi podatek o povečanju števila odpornih izolatov. Ob tem so še posebne pozornosti potrebni podatki o mnogokratni odpornosti bakterijskih sevov proti protimikrobnim zdravilom, ki se rutinsko uporabljajo v humani in veterinarski medicini. Tudi v živilski proizvodno-oskrbovalni verigi so mnogokratno odporni izolati patogenih vrst, predvsem *C. jejuni* in *C. coli*, pogosti izolirani iz živali, predvsem iz perutnine in prašičev ter perutninskega in svinjskega in mesa (Kurinčič in sod., 2012; Smole Možina in sod., 2011). Zaradi nepravilne rabe antibiotikov v zdravstvu in živinoreji nam za zdravljenje okužb, v kolikor je to potrebno, pogosto na izbiro ne preostane veliko antibiotikov (Štrumbelj in sod., 2013; EFSA/ECDC, 2014; EFSA/ECDC, 2015).

Zaradi povečanja števila odpornih bakterij in počasnega razvoja novih učinkovitih antibiotikov so številni znanstveniki začeli preučevati protimikrobno delovanje rastlin in njihovih izvlečkov ter eteričnih olj. Mnoge rastline, ki se v tradicionalni medicini uporabljajo za zdravljenje različnih bolezni, so v *in vitro* pogojih pokazale dober protimikrobni ali odpornostno-modulatorni učinek (Polo in sod., 2012; Coelho-de-Souza in sod., 2013; Siebert in sod., 2015; Moiteiro in sod., 2013; Fraternale in sod., 2014). Izvlečki rastlin so tako lahko samostojne protimikrobne spojine, ali pa zaradi svojega odpornostno-modulatornega učinka le dodatek k zdravljenju z antibiotiki. Antibiotikom, proti katerim so bakterije že razvile odpornost, lahko spet povrnemo učinkovitost, če jih uporabimo skupaj z modulatorji odpornosti, ki povečajo vnos antibiotika v celico ali preprečijo njegovo izčrpavanje iz celice.

Mehanizmi delovanja modulatorjev bakterijske odpornosti so tako kot mehanizmi bakterijske odpornosti zelo različni. Modulatorje bakterijske odpornosti lahko iščemo v naravi med rastlinami, ki se v tradicionalni medicini uporabljajo za zdravljenje različnih bolezni. Raziskave so v *in vitro* in v *in vivo* modelih pokazale dobro odpornostno-modulatorno učinkovitost nekaterih rastlinskih izvlečkov (Choi in sod., 2011; Akrayi in Abdullarahman, 2013). Rastlinski izvlečki vsebujejo različne spojine in veliko izvlečkov s protimikrobnim delovanjem vsebuje monoterpen α -pinen, ki je pokazal dobro protimikrobno učinkovitost proti nekaterim bakterijam in glivam (Gallucci in sod., 2009; Bitu in sod., 2014; Diao in sod., 2014). V okviru magistrske naloge smo se odločili testirati učinek (-)- α -pinena na več sevov *C. jejuni* in ugotoviti na kakšen način spojina deluje na bakterijske celice.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE

V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti ali α -pinen deluje protimikrobno in v subinhibitorni koncentraciji odpornostno-modulatorno na bakterije *Campylobacter jejuni* in kakšen je mehanizem tega delovanja.

Cilji magistrske naloge:

- Določiti protimikrobno delovanje α -pinena na več sevov *C. jejuni* iz različnih virov in z različnimi profili odpornosti proti antibiotikom
- Določiti odpornostno-modulatorno delovanje α -pinena na več sevih *C. jejuni* iz različnih virov in z različnimi profili odpornosti proti antibiotikom;
- Pojasniti mehanizem modulatornega delovanja α -pinena na *C. jejuni*;
- Pripraviti mutanto *C. jejuni* s prekinjenim bralnim okvirjem gena *cj1375* (*cmeG*) in jo uporabiti za testiranje delovanja α -pinena oz. mehanizma njegovega odpornostno-modulatornega delovanja.

Hipoteze magistrske naloge:

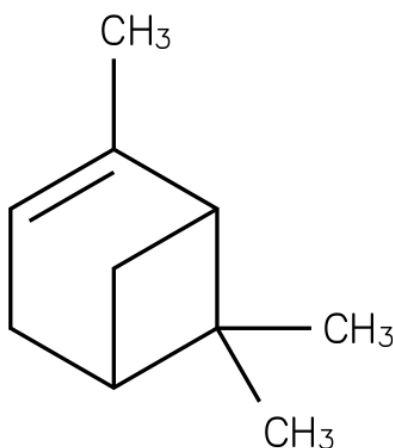
- α -pinen bo deloval protimikrobno na različne seve *C. jejuni*, vključno s tistimi, odpornimi proti antibiotikom;
- α -pinen bo v subinhibitorni koncentraciji deloval odpornostno-modulatorno v kombinaciji z izbranimi protimikrobnimi sredstvi (ciprofloksacin, eritromicin, triklosan in etidijev bromid);
- α -pinen bo na *C. jejuni* deloval odpornostno-modulatorno zaradi zaviranja izlivnih črpalk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 (-)- α -PINEN

Rastlinski izvlečki in eterična olja se uporabljajo v tradicionalni medicini za zdravljenje in lajšanje simptomov različnih bolezni. Med glavne aktivne sestavine rastlinskih eteričnih olj sodijo tudi monoterpeni. Mnoge raziskave kažejo močno biološko aktivnost monoterpenov, saj kažejo protirakavo (Yeruva in sod., 2010), protigenotoksično (Archana in sod., 2011), protiglivično (Marei in sod., 2012), protivnetno (da Rocha in sod., 2013), protimikrobno (Saddiq in Khayat, 2010), insekticidno (Lee in sod., 2010) in antioksidativno delovanje (Costa in sod., 2012).

Eden od najpogostejše zastopanih monoterpenov v eteričnih oljih je α -pinen (Slika 1). α -pinen je biciklični monoterpen, organska spojina, ki se pojavlja v smoli mnogih iglavcev in eteričnih oljih mnogih rastlin, vključno s sadjem, zelenjavo in zelišči (Loza-Tavera, 1999). V naravi se pogosto pojavlja kot mešanica dveh enantiomerov (racemat), in sicer (1S,5S)- ali (-)- α -pinen, ki se pogosteje nahaja v evropskih borovcih in (1R,5R)- ali (+)- α -pinen, ki ga pogosteje najdemo v severnoameriških borovcih (Koutsaviti in sod., 2015; Da Silva in sod., 2012; ChEBI, 2016; MetaCyc, 2010). Rastline uporabljajo α -pinen v mehanizmih obrambe proti plenilcem. α -pinen deluje kot repelent proti nekaterim insektom in ima močno larvicidno aktivnost (Huang in sod., 2013; Ali in sod., 2015).



Slika 1: Struktura α -pinena (ChEBI, 2016)

α -pinen je pomemben naravni produkt, ki se uporablja v proizvodnji arom in dišav, zdravil ter finih kemikalij (Behr in Johnen, 2009; Brown in Ranachandran, 1992; Kirby in Keasling, 2009; Yang in sod., 2013). α -pinen se prav tako uporablja v živilski industriji in je kot dodatek živilom odobren s strani Zvezne agencije za hrano in zdravila ZDA (Montanari in sod., 2012; FDA, 2011; FDA, 2015).

2.1.1 α -pinen v rastlinah in njegova biološka vloga

Monoterpen α -pinen najdemo v mnogih rastlinah. Kot sestavnemu delu eteričnih olj različnih rastlin ali samostojni spojini α -pinenu pripisujemo mnoge farmakološke lastnosti. Spojina deluje protimikrobno, bronhodilatatorno, sedativno in antioksidativno (Violante in sod., 2012; da Silva in sod., 2012; Rufino in sod., 2014).

Rastlini *Foeniculum vulgare* (janež) in *Psidium guajava* (gvajava) se v tradicionalni medicini uporabljata za lajšanje bolečin in imata pomirjevalni učinek. Biološka aktivnost teh rastlin izhaja iz delovanja različnih komponent vendar je α -pinen v raziskavah pokazal najboljšo protibolečinsko delovanje (Santos in sod., 1998; Him in sod., 2008). Raziskave so pokazale, da se α -pinen pri miših po inhalaciji dalj časa zadržuje v možganih in jetrih, s čimer se podaljša pomirjajoči učinek zdravila (Satou in sod., 2014).

Rastlina *Salvia lavandulifolia* (drobnolistni žajbelj) se v tradicionalni medicini uporablja za lajšanje težav s spominom in zdravljenje demence. Raziskave so pokazale, da eterično olje rastline vpliva na celično redoks ravnovesje v astrocitih. Med komponentami eteričnega olja je α -pinen najučinkovitejši v regulaciji redoks potenciala celic (Porres-Martinez in sod., 2015).

Nekatere rastline, ki vsebujejo α -pinen, imajo protivnetno delovanje in se zaradi tega uporabljajo v tradicionalni medicini (Podlogar in Verspohl, 2012). Kim in sod. (2015) so pokazali dobro protivnetno delovanje α -pinena na mišjih peritonealnih makrofagih. α -pinen v z lipopolisaharidi (LPS) induciranih celicah znatno zmanjša proizvodnjo interleukina - 6 (IL-6), tumor nekrotizirajočega faktorja α (TNF- α) in nitritnega oksida (NO), kar kaže na močno zmanjšanje vnetnega odziva v že induciranih mišjih celicah. α -pinen prav tako vpliva na vnetni odziv človeških bronhialnih epitelijskih celic BEAS-2B saj zmanjša izločanje vnetnega mediatorja IL-8 (Podlogar in Verspohl, 2012).

Med rastlinami, ki vsebujejo α -pinen, so zanimive tudi tiste z gastroprotektivnim učinkom, kot so *Citrus aurantium* (grenka pomaranča), *Syzygium aromaticum* (nageljnovc žbice), *Croton zehntneri* (Kroton), *Hyptis species* (ustnatice) in druge (Rozza in Pellizzon, 2013; Polo in sod., 2012; Coelho-de-Souza in sod., 2013). Te rastline se v tradicionalni medicini uporabljajo pri zdravljenju gastrointestinalnih motenj (Vera-Arzave in sod., 2012; Jesus in sod., 2013; Polo in sod., 2012). Prav α -pinen naj bi bil v teh rastlinah zaslužen za močan gastroprotektivni učinek, saj povzroča povečano izločanje zaščitne želodčne sluzi in zmanjšuje izločanje vodikovih ionov v želodcu ter na ta način preprečuje nastanek razjed (De Almeida in sod., 2015).

2.1.2 Vpliv α -pinena na človeško zdravje

α -pinen ima zaradi svojega širokega spektra delovanja potencial za razvoj v zdravilo za različne bolezni. Med drugimi α -pinen kaže pozitiven učinek v zatiranju rasti jetrnih rakastih celic (Wang in sod., 2012; Chen in sod., 2014; Chen in sod., 2015) in ima s svojim hondroprotektivnim in protivnetnim delovanjem potencial za uporabo kot zdravilo proti osteoartritisu (Rufino in sod., 2014).

Oralno zaužit α -pinen človek prebavi zelo hitro. Največja količina spojine se izloči s sečili po 1,6 urah. α -pinen se deloma razgradi v mirtenol, *cis*- in *trans*-verbenol ter mirtenično kislino. Po 24 urah se α -pinen in njegovi metaboliti izločijo iz telesa (Goen in Schmidt, 2015). Turkez in Aydin (2016) sta v *in vitro* poskusih pokazala, da α -pinen pri koncentracijah pod 200 mg/L nima citotoksičnega ali genotoksičnega vpliva na človeške krvne celice.

2.1.3 Protimikrobno delovanje α -pinena

Med najbolj raziskanimi učinki eteričnih olj rastlin in α -pinena sta protimikrobno in odpornostno-modulatorno delovanje. Zaradi porasta števila večkratno odpornih bakterij in pomanjkanja novih antibiotikov na tržišču smo primorani iskati nove rešitve in te lahko najdemo v naravi (Morais-Braga in sod., 2012). Eterična olja rastlin kot so *Callistemon viminalis* (metličnik), *Rosmarinus officinalis* (rožmarin), *Eugenia brasiliensis* (brazilska češnja), *Cryptomeria japonica* (japonska srpovka), *Angelica archangelica* (zdravilni gozdni koren), *Myrtus communis* (mirta), *Nigella sativa* (črna kumina) in druge, ki vsebujejo visok delež α -pinena v *in vitro* testih kažejo zelo dobro protimikrobno delovanje (Salem in sod. 2013; Wang in sod., 2012; Siebert in sod., 2015; Moiteiro in sod., 2013; Fraternali in sod., 2014; Sarwar in Latif, 2015; Mahboubi in Ghazian Bidgoli, 2010).

α -pinen kaže dobro protimikrobno in odpornostno-modulatorno delovanje proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bitu in sod., 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Moiteiro in sod., 2013), *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* (Fraternali in sod., 2014), *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* (Diao in sod., 2014) ter glivam *Cryptococcus neoformans* in *Candida albicans* (Cavaleiro in sod., 2015). Andrews in sod. (1980) so raziskovali vpliv α -pinena na bakterijo *Bacillus thuringiensis*, kjer so ugotovili, da α -pinen v večjih koncentracijah povzroča porušenje membranske integritete in s tem inhibicijo rasti bakterij. Po Gramu negativne bakterije so zaradi zunanje membrane odpornejše proti α -pinenu in drugim terpenom kot po Gramu pozitivne bakterije (Andrews in sod., 1980; Xie in sod., 2014; Zengin in Baysal, 2014).

Objave o α -pinenu se pogosto razlikujejo. Mnoge objave prikazujejo učinkovito protimikrobno aktivnost α -pinena, izoliranega iz rastlin, vendar pa obstajajo tudi

nasprotujoče objave (da Silva in sod., 2012). Ker se α -pinen v naravi pogosto pojavlja kot racemat (+)- α -pinena in (-)- α -pinena, je težko določiti delež posameznega enantiomera v eteričnem olju in kateri izmed teh je zaslužen za protimikrobno učinkovitost (Zengin in Baysal, 2014; ChEBI, 2016).

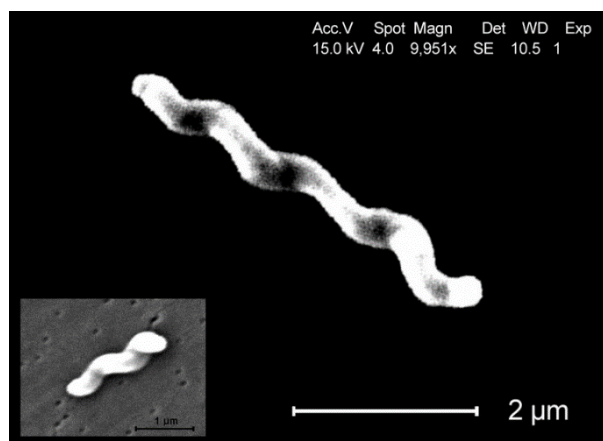
2.2 BAKTERIJA *Campylobacter jejuni*

2.2.1 Zgodovina

Čeprav je bila bakterija *Campylobacter jejuni* prvič opisana in uvrščena v rod *Campylobacter* šele leta 1963, lahko zasledimo prva poročila o spiralni bakteriji že leta 1886. Theodore Escherich je v blatu otrok s črevesnimi motnjami opisal bakterijo spiralne oblike, ki jo takrat še ni bilo možno gojiti (Snelling in sod., 2005). Šele 20 let po prvi objavi o spiralni bakteriji v blatu sta veterinarja John McFadyean in Stewart Stockman prvič izolirala in gojila spiralno mikroaerofilno bakterijo (Skirrow, 2006). Leta 1931 so znanstveniki spiralno bakterijo uvrstili v rod *Vibrio* in jo poimenovali *Vibrio jejuni*. Seabald in Vernon sta prvič detajlno opisala spiralno bakterijo *V. jejuni* in jo zaradi značilnosti kot so mikroaerofilna rast, nefermentativni metabolizem in nizke vsebnosti GC baznih parov uvrstila v nov rod, rod *Campylobacter* (Skirrow, 2006; Charlier in sod., 1974). Do leta 1972 je bila bakterija *Campylobacter* poznana kot povzročiteljica bolezni le v veterinarskih krogih. Dekyser in Butzler sta prvič izolirala bakterijo *Campylobacter* iz vzorca blata ženske z akutnim hemoragičnim enteritisom in jo tako uvrstila med človeške patogene (Snelling in sod., 2005; Skirrow, 1977; Skirrow, 2006).

2.2.2 Rod *Campylobacter*

Rod *Campylobacter* je uvrščen v razred Epsilonproteobacteria in družino Campylobacteraceae ter je sestavljen iz različnih po Gramu negativnih bakterijskih vrst, tako komenzalnih kot patogenih (Wassenaar in Newell, 2006). Bakterije rodu *Campylobacter* so spiralne oblike, dolžine od 0,5 do 5 μm in širine od 0,2 do 0,8 μm in so gibljive, saj imajo polarni biček na enem ali obeh koncih (Slika 2) (Snelling in sod., 2005; Epps in sod., 2013). Večina sevov je katalaza, oksidaza in hipurat hidrolaza pozitivnih (Wassenaar in Newell, 2006; Epps in sod., 2013). Rastejo v mikroaerofilni atmosferi s 5 do 10 % O_2 , optimalno pri temperaturi 41,2 °C in pri vodni aktivnosti (a_w) 0,997 (Silva in sod., 2011). Do danes je karakteriziranih 28 vrst *Campylobacter*. Večino kampilobakterioz pri ljudeh povzročata *C. jejuni* in *C. coli* (Wassenaar in Newell, 2006; On, 2013).

Slika 2: Bakterija *C. jejuni* pod elektronskim mikroskopom (SEM) (Carr, 2016)

2.2.3 Značilnosti *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni je termofilna mikroaerofilna bakterija. Za rast potrebuje mešanico plinov s 5 % O₂, 10 % CO₂ in 85 % N₂ in temperaturo med 37 °C in 42 °C. Ne razmnožuje se pri temperaturi, nižji od 30 °C (Bolton in Coates, 1983; Hofreuter, 2014). Pri temperaturi 4 °C pri *C. jejuni* še vedno lahko zaznamo respiracijo, katalazno aktivnost in sintezo proteinov. Celice so pri tej temperaturi še vedno aktivne in čeprav se ne razmnožujejo več, lahko pri tej temperaturi dalj časa preživijo, kar predstavlja problem v hladni živilski verigi (Hazeleger in sod., 1998).

Kot primarni vir hranil *C. jejuni* izrablja aminokisline, in sicer serin, aspartat, asparagin in glutamat. Uporablja lahko tudi prolin, vendar le v kolikor ostalih aminokislin nima na voljo. Za pridobivanje energije *C. jejuni* uporablja cikel citronske kisline, komponente tega cikla pa pridobiva iz metabolizma aminokislin. Kot vir ogljika lahko uporablja še piruvat in laktat, kar je pomembno za preživetje v črevesju gostitelja (Velayudhan in Kelly, 2002; Stahl in sod., 2011). Do nedavnega je *C. jejuni* veljal za asaharolitičen organizem, saj ne uporablja glukoze ali drugih sladkorjev. *C. jejuni* ni zmožen fosforilacije glukoze izven celic, saj nima 6-fosfofruktokinaze, ki v procesu glikolize spremeni fruktozo-6-fosfat v fruktozo-1,6-bifosfat. Nedavne raziskave so pokazale, da lahko izrablja sladkor L-fukozo, ta lastnost mu pomaga pri kolonizaciji nekaterih gostiteljev (npr. prašičev). Pri kolonizaciji piščancev zmožnost uporabe L-fukoze nima pomena (Muraoka in Zhang, 2011; Stahl in sod., 2011).

C. jejuni je del naravne mikrobiote mnogih živali kot so govedo, prašiči in piščanci, ter se zato pogosto znajde v človeški prehranski verigi. Največje število kampilobakterioz je povezanih z zaužitjem nepravilno termično obdelanega okuženega piščančjega mesa (Noormohamed in sod., 2013; Hermans in sod., 2012). Infektivna doza je relativno majhna, saj že 500 zaužitih celic lahko povzroči bolezen (Robinson, 1981; Hofreuter, 2014). Po

okužbi se *C. jejuni* znajde v sluzi tankega črevesja, kjer se tudi razmnožuje. Del celic se v posebni strukturi zadržuje znotraj epitelnih celic črevesja, vendar se tam ne razmnožujejo. Za vstop v črevesne celice se *C. jejuni* najprej veže na fibronektin s pomočjo adhezinov in z bičkom prenese proteine Cia v citosol gostiteljske celice. Zaradi tega pride do sprememb v celični signalizaciji (povečana koncentracija cAMP), prerazporeditve aktinskega citoskeleta in nagubanja celične membrane (Hofreuter, 2014; McKinney in Konkel, 2012; Bouwman in sod., 2013; Eucker in Konkel, 2013). Po vstopu v epitelno celico se *C. jejuni* izogne lizosomu in se zadržuje v *Campylobacter*-vsebujoči vakuoli (*angl. Campylobacter containing vacuole – CCV*) (Watson in Galan, 2008). Celoten proces invazije črevesnih epitelnih celic je pomemben pri razvoju črevesne bolezni.

C. jejuni povzroča gastrointestinalno bolezen kampilobakteriozo. Inkubacija traja od 2 do 5 in maksimalno 10 dni. Bolezen se lahko kaže v lažji obliki in izzveni v 24 urah. Težja oblika bolezni vključuje simptome kot so vodena driska, vročina, slabost, bruhanje, bolečine v mišicah in trebušnem predelu ter glavobol, ki lahko trajajo tudi do 10 dni. Komplikacije le redko nastopijo in lahko vključujejo endokarditis, reaktivni artritis ali hemolitični uremični sindrom. Zelo redko okužba s *C. jejuni* povzroči nastanek resnih komplikacij kot so razvoj sindroma Guillain-Barre in sindroma razdražljivega črevesja (Horn in Lake, 2013; Leedom Larson in Spickler, 2013; van Doorn in sod., 2008; NIAID, 2015). Bolezen v večini primerov izzveni sama. Zdravljenje z makrolidnimi antibiotiki kot npr. eritromicinom in azitromicinom ali fluorokinoloni (ciprofloksacin) se priporoča pri okužbi imunsko oslabljenih pacientov in v kolikor se bolezen pokaže z resnejšimi znaki in težjim potekom (Leedom Larson in Spickler, 2013).

V Evropski Uniji (EU) in Združenih Državah Amerike (ZDA) so kampilobakterioze med najpogostejše prijavljenimi boleznimi, ki se prenašajo s hrano. V EU lahko vidimo 10 % porast v številu obolelih od leta 2013 do 2014. Od vseh obolelih s kampilobakteriozo je 30 % hospitaliziranih. V EU je število smrti zaradi komplikacij bolezni 0,01 %, v ZDA pa 0,2 % (EFSA/ECDC, 2014; EFSA/ECDC, 2015; Crim in sod., 2015).

Viri okužb so goveje, prašičje in perutninsko meso ter voda. Najpogostejši vzrok okužbe je zaužitje termično nepravilno obdelanega piščančjega mesa (Kassenborg in sod., 2004). Zaskrbljujoč podatek je porast števila večkratno odpornih sevov *C. jejuni* v živilih. Iz mesa različnega izvora je največ sevov odpornih proti tetraciklinu (76,8 %) in gentamicinu (4,1 %), pojavlja se tudi odpornost proti ampicilinu, ciprofloksacinu, nalidiksični kislini in redkeje proti eritromicinu. Število odpornih izolatov iz ljudi je prav tako zelo visoko in se še povečuje. Humani izolati so pogosto odporni proti nalidiksični kislini (48,8 %), ciprofloksacinu (47,4 %), ampicilinu (36,4 %) in tetraciklinu (32,4 %). V Sloveniji je najvišje število sevov odpornih proti ciprofloksacinu (68 %), nalidiksični kislini (61,1 %) in ampicilinu (35,5 %). Zelo malo je sevov, odpornih proti eritromicinu (0,8 %) (Noormohamed in sod., 2013; EFSA/ECDC, 2014; EFSA/ECDC, 2015).

Število ljudi, okuženih z odpornimi izolati *C. jejuni*, je zaskrbljujoče in kaže na potrebo po boljšem omejevanju uporabe antibiotikov v živinoreji in omejevanju širjenja bakterije. Še posebej pomemben problem predstavljajo mnogokratno odporni izolati, ki so pogosti tudi v živilski verigi (Smole Možina in sod., 2011). Za preprečevanje širjenja okužb je potrebno ljudi ozaveščati o nevarnosti te bolezni in osnovnih higienskih pravilih pri pripravi mesa. Z dobrimi higienskimi navadami in pravilno pripravo mesa se lahko izognemo ne le kampilobakteriozam, ampak tudi mnogim drugim okužbam. A nedavna reziskava, opravljena med slovenskimi potrošniki perutninskega mesa, je pokazala zelo slabo poznavanje in zavedanje o mikrobioloških tveganjih pri pripravi mesa v kuhinji (Levstek, 2015).

2.2.4 Mehanizmi odpornosti bakterije *Campylobacter jejuni*

Bakterije uporabljajo različne mehanizme za bojevanje proti antibiotikom. Odpornost pridobijo s spontanimi mutacijami v genih, ki kodirajo tarčne proteine ali s horizontalnim prenosom genov za odpornost. Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom vključujejo razgradnjo protimikrobne spojine (proteolitična razgradnja), spremembo tarče protimikrobnega peptida in odstranjevanje protimikrobne spojine z izlivnimi črpalkami (Tavares in sod., 2013).

Kmalu po začetku uporabe prvih antibiotikov (1940. leta) so se začeli pojavljati tudi prvi mikroorganizmi z odpornostjo proti antibiotikom. Intenzivna uporaba antibiotikov v živinoreji in humani medicini je povzročila porast in hitro razširjanje mikrobne odpornosti proti antibiotikom (Tavares in sod., 2013; ECDC, 2015; Wimalarathna in sod., 2013; Nachamkin in sod., 2002).

Bakterijska odpornost proti antibiotikom predstavlja resen problem za javno zdravstvo v Evropi in svetu, saj vodi do povečanja stroškov zdravstvenih storitev in podaljšanega bivanja v bolnišnicah. Zaradi okužb z večkratno odpornimi bakterijami *C. jejuni* pride do komplikacij pri zdravljenju in smrti bolnika. Število bakterij, ki so odporne na več antibiotikov se iz leta v leto povečuje (ECDC, 2015; EFSA/ECDC, 2014).

2.2.4.1 Odpornost proti fluorokinolonom

Kinolonski antibiotiki inhibirajo sintezo bakterijske DNA in posledično izzovejo celično smrt. Tarči kinolonov sta DNA giraza in topoizomeraza IV, ki sodelujeta pri replikaciji DNA, transkripciji in rekombinaciji. Kinoloni se nekovalentno vežejo v mesto vezave encima z DNA ter s tem preprečijo nadaljnje delovanje encima (Aldred in sod., 2014; Jacoby, 2005). Pri bakterijah *Campylobacter* spp. odpornost proti fluorokinolonom primarno izhaja iz zamenjave aminokislin v DNA zaporedju za encim girazo. Lahko se pojavi nekaj različnih modifikacij v GyrA, kot so Thr86Ile, Asp90Asn, Thr86Lys,

Thr86Ala, Thr86Val in Asp90Tyr (Smith in Fratomico, 2010; Luo in sod., 2003). Sevi z mutacijo Thr86Ile imajo visoko odpornost proti ciprofloksacinu (MIK $>32 \mu\text{g/mL}$), sevi z mutacijama Asp90Asn in Thr86Lys pa so srednje odporni (z MIK od 6 do $16 \mu\text{g/mL}$) (Luo in sod., 2003; McDermott in sod., 2002; Gibreel in sod., 1998). K odpornosti proti fluorokinolonom lahko prispeva tudi povečano izražanje izlivne črpalke CmeABC (Luo in sod., 2003). Izpostavitve fluorokinolonom zelo hitro povzroči razvoj bakterijske odpornosti *C. jejuni*, in sicer s frekvenco od 10^{-6} do 10^{-8} /celico/generacijo (Luo in sod., 2003). V okolju odporne bakterije prevladajo nad občutljivimi in zelo hitro okužijo druge živali v jati. Zaradi te ugotovitve se je v državah EU in ZDA antibiotik enrofloksacin prenehal uporabljati pri zdravljenju perutnine, druge fluorokinolonske antibiotike pa lahko uporabljamo le pod nadzorom veterinarja (Nelson in sod., 2007; NOAH, 2010). Odporni sevi *C. jejuni* se ne pojavljajo le pri perutnini, ampak tudi pri prašičih, govedu in drugih živalih. Tako se odporni sevi znajdejo tudi v okolju in prehranjevalni verigi (Usui in sod., 2014; Kassenborg in sod., 2004). Zaradi tako velikega števila odpornih sevov je pri zdravljenju živali s fluorokinoloni potrebna velika previdnost.

2.2.4.2 Odpornost proti tetraciklinom

Tetraciklini v bakterijah inhibirajo sintezo proteinov tako, da preprečijo vezavo tRNA z ribosomom. Tetraciklini membrano po Gramu negativnih bakterij prehajajo skozi porina OmpC in OmpF s pomočjo vezave Mg^{2+} kationov. V periplazemskem prostoru se Mg^{2+} odstrani in antibiotik pasivno prehaja v citoplazmo ter se veže na 30S podenoto ribosoma (Chopra in Roberts, 2001). Izolati, ki so odporni proti tetraciklinom, imajo gen *tet(O)*. Le tega pogosto najdemo v izolatih *C. jejuni* (Dasti in sod., 2007). Gen *tet(O)* se nahaja na plazmidu in kodira ribosom-varovalni protein (*angl. ribosomal protection protein* – RPP) Tet(O). Protein se veže na ribosom in povzroči konformacijsko spremembo ter s tem sprostitev tetraciklinske molekule (Aminov in sod., 2001; Li in sod., 2013). Gen *tet(O)* so bakterije iz rodu *Campylobacter* najverjetneje pridobile s horizontalnim prenosom od bakterij *Streptomyces*, *Streptococcus* ali *Enterococcus* spp. Gen *tet(O)* se med sevi v piščancih prenaša s horizontalnim genskim prenosom in v kolikor se znajde v nekaj piščancih v jati, se odpornost hitro razširi na celo jato (Avrain in sod., 2004; Luangtongkum in sod., 2008; Albert in sod., 2009).

2.2.4.3 Odpornost proti makrolidom

Tarča makrolidnih antibiotikov je 50S ribosomalna podenota. S svojim delovanjem prekinejo od RNA odvisno sintezo proteinov. Vezava makrolida povzroči konformacijsko spremembo v ribosomu in s tem prekinitev podaljševanja peptidne verige (Kannan in sod., 2014; Sothiselvam in sod., 2014). Do odpornosti pride zaradi mutacije v genih tarčnih proteinov. Do zamenjave baz prihaja na pozicijah 2074 in 2075 v genih za 23S rRNA (*rrnB* operon). Mutacije A2074G, A2074C in A2075G so povezane z visoko odpornostjo

proti eritromicinu (Corcoran in sod., 2006). Do odpornosti proti makrolidom lahko pride tudi zaradi prekomernega izražanja izlivne črpalke CmeABC (MIK do 16 mg/L) ali zaradi skupnega delovanja črpalke in spremembe v genih *rplD* in *rplV*, ki kodirata proteina L4 in L22 (Cagliero in sod., 2006; Corcoran in sod., 2006).

Pri uporabi makrolidnih antibiotikov je potrebna previdnost, saj je eritromicin eden izmed antibiotikov, ki jih zdravniki priporočajo pri zdravljenju okužb z bakterijo *Campylobacter* spp. (Steel in sod., 2012).

2.2.4.4 Odpornost proti aminoglikozidom

Aminoglikozidi se vežejo na 30S podenoto ribosoma, zaradi vezave pa lahko pride do sinteze proteinov z napakami ali do prekinitve elongacije peptidne verige (Mingeot-Leclercq in sod., 1999; Shi in sod., 2013). Pri bakterijah *Campylobacter* spp. lahko najdemo plazmide z geni, ki kodirajo encime zmožne modifikacije aminoglikozidov (*angl. aminoglycoside modifying enzymes* - AME), kot so fosfotransferaze tipa I, III, IV in VII, aminoglikozid adeniltransferaza in 6-aminoglikozid adeniltransferaza, ki so odgovorni za odpornost proti aminoglikozidnim antibiotikom. Do odpornosti proti aminoglikozidom prihaja zaradi encimske modifikacije, ki zmanjša afiniteto aminoglikozidov za rRNA in s tem omogoči nemoteno sintezo proteinov (Toth in sod., 2013; Tenover in Elvrum, 1988; Shi in sod., 2013; Qin in sod., 2012).

2.2.4.5 Ostale odpornosti

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* so odporne tudi proti drugim antibiotikom. Večina sevov *C. jejuni* je odpornih proti betalaktamskim antibiotikom zaradi manjših sprememb v membrani, porinih ali izlivnih črpalkah. Večina sevov prav tako proizvaja betalaktamaze in s tem prepreči delovanje betalaktamov (Zeng in sod., 2015; Griggs in sod., 2009). Lahko so odporni tudi proti amfenilokolom (zaradi pojava mutacij na 23S rRNA), vendar se ta odpornost pojavlja le redko (Ma in sod., 2014; Ghunaim in sod., 2015).

2.2.4.6 Vloga izlivnih črpalk v odpornosti bakterij *Campylobacter jejuni* proti antibiotikom

Tako kot pri drugih bakterijah odpornost bakterij *C. jejuni* pogosto ne izhaja samo iz enega, ampak iz več mehanizmov. Z združevanjem različnih odpornostnih mehanizmov, kot so razvoj mutacij v genih tarčnih proteinov, prekomernim izražanjem izlivnih črpalk in porinov, lahko bakterije izboljšajo svoje možnosti za preživetje v prisotnosti antibiotikov (Fernandez in Hancock, 2012). Izlivne črpalke, ki v veliki meri pripomorejo k odpornosti bakterij proti antibiotikom, najdemo tako pri po Gramu negativnih bakterijah, kot je *Escherichia coli*, kot tudi pri po Gramu pozitivnih bakterijah, kot je *Pseudomonas*

aeruginosa (McMurry in sod., 1980; Nagano in Nikaido, 2009; Poole in sod., 1993; Morita in sod., 2012). Bakterija *C. jejuni* ima več izlivnih črpalk, ki sodelujejo pri zagotavljanju odpornosti bakterij proti vplivom antibiotikov.

Izlivna črpalka **CmeABC** sodeluje pri razvoju odpornosti proti antibiotikom kot so fluorokinoloni in makrolidi. Geni *cmeA*, *cmeB* in *cmeC* kodirajo periplazemski protein, membranski prenašalni protein in protein zunanje membrane. Ti skupaj tvorijo izlivno črpalko, ki v veliki meri pripomore k odpornosti bakterij proti antibiotikom (Akiba in sod., 2006; Gibreel in sod., 2007). Pumbwe in sod. (2004) so pokazali, da mutacija v CmeR, zaviralcu CmeABC sistema, kjer se glicin 86 zamenja za alanin, privede do prekomernega izražanja gena *cmeB*. Zaradi prekomernega izražanja izlivnih črpalk prihaja do večje odpornosti in hitrejše adaptacije na antibiotike (Pumbwe in sod., 2004; Grinnage-Pulley in Zhang, 2015).

Izlivna črpalka **CmeDEF** sodeluje pri razvoju odpornosti proti antibiotikom, vendar igra sekundarno vlogo (Akiba in sod., 2006). Večje izražanje te črpalke se pojavlja pri večkratno odpornih sevih. Mutante s spremembo v genih *cmeDEF*, podobno kot *cmeABC* mutante, v večji meri akumulirajo etidijev bromid in so bolj občutljive na žolčno kislino (Pumbwe in sod., 2005).

Izlivna črpalka **CmeGH** sodeluje pri zagotavljanju odpornosti proti antibiotikom ciprofloksacin, eritromicin, tetraciklin in etidijevem bromidu ter sodeluje pri adaptaciji bakterije na oksidativni stres. Bakterije s spremembo v genu *cmeG* niso zmožne učinkovitega izčrpavanja antibiotikov iz celic in so zato bolj občutljive na antibiotike (Jeon in sod., 2011).

Poznavanje in karakterizacija bakterijskih odpornostnih mehanizmov je ključen dejavnik pri omejevanju večkratno odpornih bakterij. Z boljšim razumevanjem teh mehanizmov lahko razvijemo bolj učinkovita protimikrobna sredstva in napovemo možen razvoj odpornosti proti njim.

2.3 METODE DELA S *Campylobacter jejuni* V LABORATORIJU IN UGOTAVLJANJE VPLIVA PROTIMIKROBNIH SREDSTEV NANJ

2.3.1 Gojenje *Campylobacter jejuni* v laboratoriju

Za gojenje *Campylobacter* spp. uporabljamo različna gojišča, tako selektivna kot neselektivna. Neselektivni gojišči Mueller-Hinton bujon in agar spodbujata najboljšo rast kampilobaktrov. Optimalna atmosfera za rast vsebuje 85 % N₂, 10 % CO₂ in 5 % O₂ (Davis in DiRita, 2008).

Ločimo 2 skupini selektivnih gojišč za gojenje bakterije *C. jejuni*, in sicer tiste, ki vsebujejo kri in tiste, ki vsebujejo oglje. Dodatek krvi ali oglja je potreben za odstranjevanje toksičnih kisikovih spojin, na katere je *C. jejuni* zelo občutljiv. Selektivnost medija določa dodatek antibiotika. Pogosto uporabljamo cefalosporine (cefoperazon), včasih v kombinaciji z drugimi antibiotiki, kot so vankomicin in trimetoprim. Cikloheksamid (actidione) in amfotericin B se uporabljata za zaviranje rasti plesni in kvasovk (Herrera, 2001; Potturi-Venkata in sod., 2007; OIE, 2008). Gojišča, ki vsebujejo oglje so mCCDA, Karmali agar ali CSM in CAT agar, gojišča, ki vsebujejo kri pa Preston agar, Skirrow agar, Butzler agar in Campy-cefex (OIE, 2008). Večina selektivnih gojišč si je med seboj podobnih. Od vzorca je odvisno, katero bomo izbrali (Potturi-Venkata in sod., 2007). Bakterije *Campylobacter* na gojišču Karmali prepoznamo po drobnih svetlečih se kolonijah sive barve (Slika 3). Bakterije *C. jejuni* rastejo optimalno pri temperaturi med 37 °C in 42 °C, vodni aktivnosti (a_w) 0,997 in v mikroaerofilni atmosferi. Celice preživijo 1-2 dni na trdnem gojišču, 2-4 dni v tekočem gojišču in do 20 dni na poltrdnem gojišču. Preživetje časovno podaljšamo do 2 krat, če gojišča z bakterijami hranimo pri 4 °C (Davis in DiRita, 2008; OIE, 2008).



Slika 3: Rast *C. jejuni* na gojišču Karmali (BD, 2009)

2.3.2 Določanje vpliva protimikrobnih sredstev na *C. jejuni*

Občutljivost bakterij na protimikrobna sredstva lahko določamo z dilucijskimi in difuzijskimi metodami. Za določanje občutljivosti bakterij je v klinični mikrobiologiji najbolj razširjena **disk difuzijska metoda**. Pri tej metodi na agarno ploščo z razmazano bakterijsko kulturo postavimo vnaprej pripravljene diske z različnimi antibiotiki (največ

12/ploščico) določenih koncentracij in inkubiramo 24-48 ur v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C. Področje, kjer ni vidne bakterijske rasti, je cona inhibicije. Rezultat je kvalitativen in ga prikažemo kot S (občutljivo), I (srednje občutljivo) in R (odporno), glede na velikost cone inhibicije (OIE, 2012; EUCAST, 2015).

Za kvantitativno določanje občutljivosti bakterij lahko uporabimo **E-test**, komercialno dostopen trak z gradientno padajočo koncentracijo določenega antibiotika. Trak postavimo na agarno ploščo z razmazano bakterijsko kulturo. Po inkubaciji rezultat odčitamo kot minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) tako, da odčitamo vrednost, kjer se rob elipse (cone) inhibicije dotika traku (OIE, 2012; EUCAST, 2015).

Dilucijo izvajamo v agarju ali v bujonu. Pri metodi dilucije v agarju spremljamo pojav rasti bakterij na agarnih ploščah z različnimi koncentracijami protimikrobnega sredstva. MIK je koncentracija antibiotika, kjer po inkubaciji ni vidne rasti (Wiegand in sod., 2008; EUCAST, 2015). Dilucija v bujonu je makro- ali mikrodilucija, odvisno od uporabljenega delovnega volumna. Mikrodilucija v bujonu je enostavna in zanesljiva metoda za spremljanje občutljivosti bakterije *C. jejuni*. Za mikrodilucijo uporabljamo standardne mikrotitrne ploščice z 2-kratnimi serijskimi redčitvami protimikrobnih sredstev. V ploščice dodamo bakterijsko kulturo, tako da je končna koncentracija celic v eni luknjici $3-7 \times 10^5$ CFU/mL. Rezultat odčitamo kot minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) oz. najmanjšo koncentracijo protimikrobnega sredstva, ki prepreči nastanek vidne rasti bakterij v določenem časovnem obdobju (Luber in sod., 2003; Wiegand in sod., 2008; EUCAST, 2003). Pri mikrodiluciji v bujonu lahko odčitamo rast bakterij z določanjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm (OD_{600}) ali z uporabo indikatorjev živosti (EUCAST, 2003; Sarker in sod., 2007). Na trgu so dostopni kompleti za določanje živosti bakterij in mnogi uporabljajo kot indikator živosti resazurin. Resazurin je oksidacijsko-redukcijski indikator modre barve in ni citotoksičen. Žive celice resazurin reducirajo v resorufin rožnate barve. Kjer ne pride do spremembe barve, lahko odčitamo MIK. MIK je najmanjša koncentracija antibiotika v prisotnosti katere nismo zaznali živosti bakterij oz. ni prišlo do spremembe barve resazurina. Ustreznost resazurina za določanje MIK je primerljiva z drugimi novejšimi in starejšimi metodami (Sarker in sod., 2007; Martin in sod., 2003; Promega, 2015).

2.3.3 Ugotavljanje vpliva protimikrobnih sredstev na delovanje izlivnih črpalk

Bakterijske izlivne črpalke sodelujejo pri zagotavljanju odpornosti bakterij proti antibiotikom s tem, da z izčrpavanjem toksičnih snovi iz celic ščitijo bakterije pred vplivi gostiteljskih produktov, kot je žolčna kislina in pripomorejo h kolonizaciji v gostitelju (Piddock, 2006). Delovanje izlivnih črpalk zmanjšajo ali popolnoma ustavijo zaviralci izlivnih črpalk (angl. Efflux Pump Inhibitors – EPI). Poznamo več različnih zaviralcev izlivnih črpalk, na primer 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP), reserpin, fenilalanin-arginin

β -naftilamid (Pa β N) in karbonil cianid *m*-klorofenilhidrazon (CCCP). Izlivne črpalke bakterij *Campylobacter jejuni* učinkovito zavirata CCCP in reserpin, vendar je zaradi njune nevrotoksičnosti njuna uporaba v klinične namene onemogočena. CCCP zavira ustvarjanje protonske gonilne sile in tako inhibira sekundarne aktivne transporterje. Reserpin je kompetitivni inhibitor primarnih in sekundarnih aktivnih transporterjev (Bentaboulet in Kepes, 1977; Neyfakh in sod., 1991; Mamelli in sod., 2003; Klančnik in sod., 2012; Kumar in sod., 2013).

Delovanje aktivnih črpalk ali vpliv zaviralcev izlivnih črpalk na njihovo delovanje lahko določimo s spremljanjem kopičenja določene snovi v celici. Če domnevni zaviralec vpliva na delovanje črpalk, bo bakterijska celica zmanjšala ali popolnoma ustavila izčrpavanje snovi iz celice. Spremljamo lahko direktno kopičenje antibiotikov, ki sami oddajajo nekaj fluorescence, kot so fluorokinoloni ali antibiotik (primer eritromicin) radioaktivno označimo in tako spremljamo njegovo kopičenje (Mao in Putterman, 1968; Lin in sod., 2002; Jeon in sod., 2011).

Enostavnejša in varnejša je metoda spremljanja določenih fluorescenčnih barvil, ki jih bakterije izčrpavajo iz celice z izlivnimi črpalkami. Ena takih je etidijev bromid, ki se v celicah veže z dednim materialom in oddaja fluorescentni signal. Kopičenje etidijevega bromida v celicah lahko spremljamo v realnem času preko merjenja fluorescentnega signala. Fluorescentni signal narašča sorazmerno z inhibicijo izlivnih črpalk. Manj aktivne kot so črpalke, več etidijevega bromida se nakopiči v celicah in bolj intenzivno fluorescenco zaznamo (Lin in sod., 2002; Jeon in sod., 2011; Opperman in sod., 2014). Povečan fluorescenčni signal je torej indikator učinkovitosti inhibitorjev izlivnih črpalk.

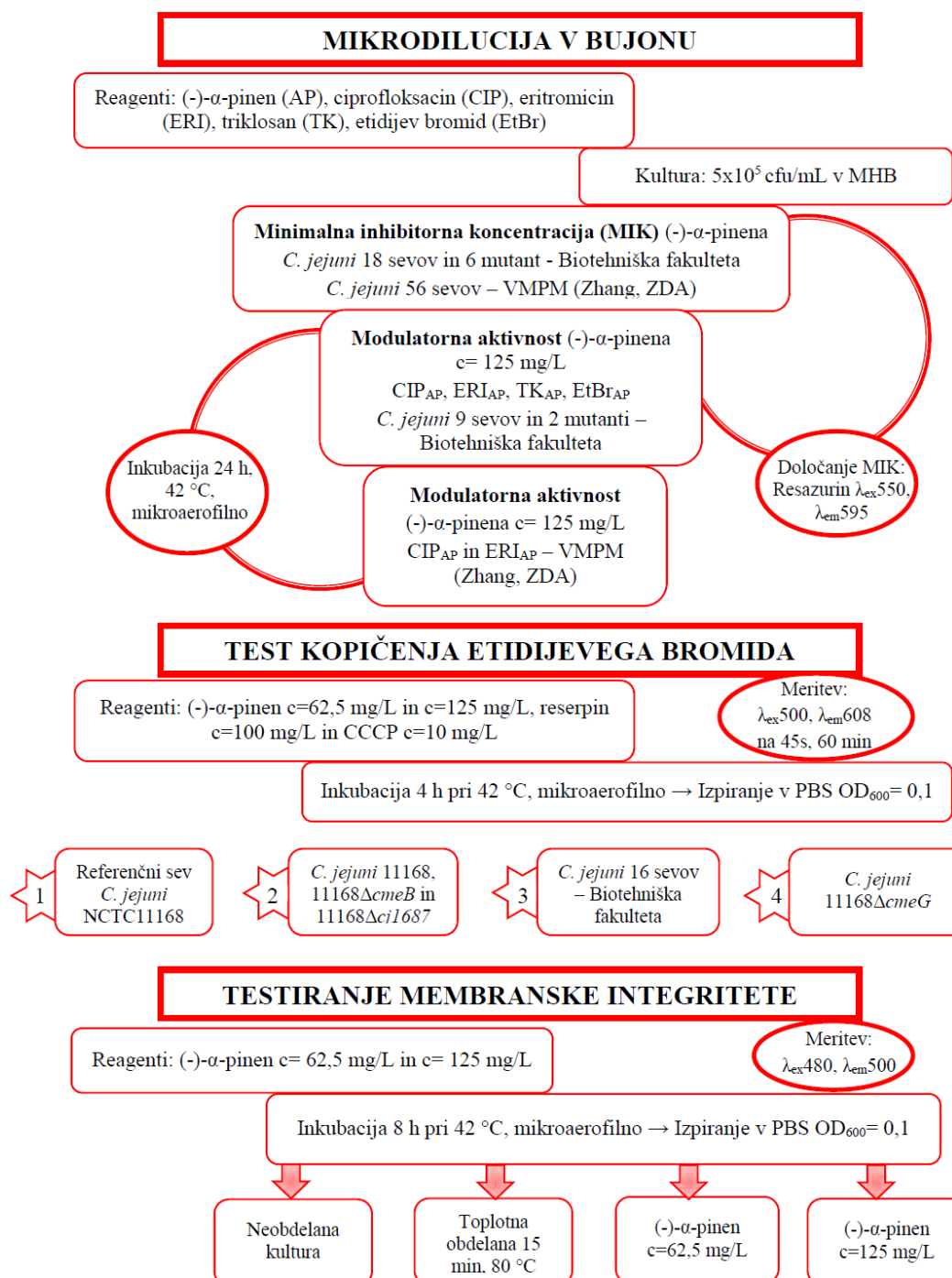
2.3.4 Ugotavljanje vpliva protimikrobnih sredstev na celično membrano

Vplive na bakterijsko celično membrano lahko določamo z različnimi komercialno dostopnimi kompleti, kot so LIVE/DEAD® Cell Viability Assays in LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher), Live/Dead Cell Double Staining Kit (Sigma-Aldrich) in drugimi na podobnem principu. K celicam dodamo snovi, ki lahko prehajajo nepoškodovano celično membrano, in snovi, ki skozi nepoškodovano membrano ne prehajajo. Odvisno od tipa reagenta lahko poškodbe v celični membrani zaznavamo bodisi pod mikroskopom (dodatek barvil), spektrofotometrično ali z drugimi metodami. Spremljamo kopičenje reagenta, ki prehaja le skozi poškodovano celično membrano v celice. Poškodbo celične membrane ocenimo z naraščanjem signala tarčne molekule (Aeschbacher in sod., 1986; Termo Fisher Scientific, 2016; Abcam®, 2016). V primeru kompleta LIVE/DEAD® BacLight™ za barvanje celic oz. njihovih nukleinskih kislin uporabimo 2 barvili, in sicer rdeče fluorescirajoče barvilo propidijev jodid (PI) in zeleno fluorescirajoče barvilo SYTO9. Vstop barvila SYTO9 v celice ni odvisen od poškodbe celične membrane, PI pa lahko vstopa samo v celice, ki imajo poškodovano citoplazemsko

membrano. Tako z merjenjem signala SYTO9 lahko zaznamo celice s poškodovano celično membrano, saj povečana znotrajcelična koncentracija PI izbija signal SYTO9. Z upadom fluorescenčnega signala ocenimo poškodbo celične membrane pod vplivom testiranih snovi (Boulos in sod., 1999; Barney in sod., 2007; Thermo Fisher Scientific, 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA POTEKA DELA



Slika 4: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela

3.2 MATERIAL

Med izvedbo poskusov smo uporabljali različne aparate, laboratorijski material in raztopine, ki jih najdemo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Vsi aparati, materiali in raztopine, ki smo jih uporabljali so prikazani v preglednicah 1 in 2.

Preglednica 1: Naprave in njihovi proizvajalci

Aparat	Proizvajalec
Analitska tehtnica	Sartorius analytic, Nemčija
Avtoklav	Sutjeska, Srbija
Čitalec mikrotitrskih plošč	Tecan Trading, AG Švica
Inkubator (tip SP190)	Kambič, Slovenija
Laminarij	Thermo Scientific, ZDA
Plinski gorilnik	USBECK, Nemčija
Spektrofotometer	Thermo Scientific, ZDA
Stresalnik mikrotitrskih plošč	Eppendorf, Nemčija
Tehtnica	Mettler toledo, Švica
Vodna kopel	HAAKE, Nemčija
Vrtinčno mešalo	IKA, Belgija

3.2.1 Mikroorganizmi

Pri preučevanju vpliva (-)- α -pinena na bakterije *C. jejuni* smo uporabili 18 sevov in 7 mutant iz zbirke bakterij Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani) ter 56 sevov iz zbirke bakterij Laboratorija za veterinarsko mikrobiologijo in preventivno medicino (VMPPM), Fakultete za veterinarsko medicino (Iowa State University, ZDA). Izbrali smo seve, izolirane iz različnih okolij in z različnimi odpornostnimi profili. Vsi sevi, ki smo jih uporabili pri poskusih, in njihov izvor so prikazani v preglednici 3.

Med postopkom priprave mutante s prekinjenim bralnim okvirom gena *cmeG* (11168 Δ *cmeG*) smo za namnoževanje plazmida uporabili bakterijo *Escherichia coli* DH5 α .

Preglednica 2: Laboratorijski material in raztopine

Laboratorijski material, raztopine in reagenti	Proizvajalec
Anaerobni lonci	Oxoid, Velika Britanija
Brisi	L&R, Nemčija
Cepilne zanke	VWR, Velika Britanija
Filtri 0,2 μ m	Sartorius, Nemčija
Infuzijske steklenice	Duran, Nemčija
Injekcijske brizge	BD Plastipak, ZDA
Kivete	STARSTEDT, Nemčija
Mikrocentrifugirke	Eppendorf, Nemčija
Mikrotitrne plošče - črne	Sigma Aldrich, Nemčija
Mikrotitrne plošče - prozorne	Sigma Aldrich, Nemčija
Nastavki za pipete	Eppendorf, Nemčija
Petrijeve plošče	STARSTEDT, Nemčija
Pipete	Eppendorf, Nemčija
Plinska jeklenka z mešanico plinov	Istragas, Slovenija
Absolutni etanol	Merck, Nemčija
Agaroza	Oxoid, Velika Britanija
Ampicilin	Roche Diagnostics, Nemčija
karbonil cianid <i>m</i> -klorofenilhidrazon (CCCP)	Sigma Aldrich, Nemčija
Ciprofloksacin	Fluka Biochemika
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Merck, Nemčija
DNA ledler	Thermo Fisher, ZDA
Nanašalno barvilo (<i>angl. DNA loading dye</i>)	Thermo Fisher, ZDA
Eritromicin	Sigma Aldrich
Etidijev bromid	Sigma Aldrich, Nemčija
Polimeraza GoTaq	Promega Corporation, ZDA
Kanamicin	Merk, Nemčija
KCl	Sigma Aldrich, Nemčija
Kloramfenikol	Merk, Nemčija
NaOH	Sigma Aldrich, Nemčija
PBS	Oxoid, Velika Britanija
Resazurin	Sigma Aldrich, Nemčija
Menadion	Sigma Aldrich, Nemčija
Reserpin	Sigma Aldrich, Nemčija
Barvilo »Syber safe«	Oxoid, Velika Britanija
Triklosan	Merk, Nemčija
(-)- α -pinen	Sigma Aldrich, Nemčija

Preglednica 3: Seznam sevov *C. jejuni*, ki smo jih uporabljali v poskusih, njihov izvor in poreklo.

Laboratorijska oznaka seva	Izvor	Država porekla
53124	Piščanje meso	Slovenija
57360	Piščanje meso	Slovenija
60089	Piščanje meso	Slovenija

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Seznam sevov *C. jejuni*, ki smo jih uporabljali v poskusih, njihov izvor in poreklo

Laboratorijska oznaka seva	Izvor	Država porekla
53196	Piščanje meso	Slovenija
9581	Humani	Slovenija
9090	Humani	Slovenija
9711	Humani	Slovenija
1190/09	Piščanec	Slovenija
375/06	Humani	Slovenija
573/03	Piščanec	Slovenija
1518/09	Piščanec	Slovenija
C2	Piščanec	Slovenija
C33	Piščanec	Slovenija
816	Voda	Slovenija
660/08	Piščanec	Slovenija
33560	Referenčni sev, ATCC	Slovenija
K49/4	Piščanec	Slovenija
11168	Referenčni sev, NCTC	Slovenija
11168 Δ hrcA	Mutant iz 11168	Slovenija
11168 Δ hspR	Mutant iz 11168	Slovenija
11168 Δ cmeB	Mutant iz 11168	Slovenija
11168 Δ cmeG	Mutant iz 11168	Slovenija
11168 Δ cj1687	Mutant iz 11168	Slovenija
11168 Δ cmeF	Mutant iz 11168	Slovenija
11168 Δ omp50	Mutant iz 11168	Slovenija
CB1:6	Piščanec	ZDA
CB1:14	Piščanec	ZDA
CB1:18	Piščanec	ZDA
CB2:6	Piščanec	ZDA
CB2:8	Piščanec	ZDA
CB2:11	Piščanec	ZDA
CB3:1	Piščanec	ZDA
CB3:5	Piščanec	ZDA
CB 4:21	Piščanec	ZDA
CB 4:22	Piščanec	ZDA
CB 6:8	Piščanec	ZDA
CB 6:9	Piščanec	ZDA
CB 6:26	Piščanec	ZDA
CB 7:15	Piščanec	ZDA
CB 7:21	Piščanec	ZDA
CB 8:14	Piščanec	ZDA
CB 8:15	Piščanec	ZDA
CT 1:1	Puran	ZDA
CT 1:9	Puran	ZDA
CT 2:2	Puran	ZDA
CT 3:5	Puran	ZDA

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Seznam sevov *C. jejuni*, ki smo jih uporabljali v poskusih, njihov izvor in poreklo

Laboratorijska oznaka seva	Izvor	Država porekla
CT3:11	Puran	ZDA
CT3:19	Puran	ZDA
CT4:4	Puran	ZDA
CT4:14	Puran	ZDA
CT5:2	Puran	ZDA
CT5:8	Puran	ZDA
CT5:10	Puran	ZDA
CT5:12	Puran	ZDA
CT5:18	Puran	ZDA
CT 6:18	Puran	ZDA
CT 6:8	Puran	ZDA
CT 6:16	Puran	ZDA
CT 7:2	Puran	ZDA
CT 8: 28	Puran	ZDA
CT 8:29	Puran	ZDA
CT 8:22	Puran	ZDA
CT 9:14	Puran	ZDA
CT 10:18	Puran	ZDA
CT 9:21	Puran	ZDA
F6501	Humani	ZDA
H2958	Humani	ZDA
M63885	Humani	ZDA
T59822	Humani	ZDA
W14861	Humani	ZDA
X60179	Humani	ZDA
F15871	Humani	ZDA
W11805	Humani	ZDA
M402	Humani	ZDA
W28752	Humani	ZDA
M33323	Humani	ZDA
W64861	Humani	ZDA
M76297	Humani	ZDA
E46972	Humani	ZDA
M36292	Humani	ZDA
X7199	Humani	ZDA

3.2.2 Gojišča

Vsa gojišča za gojenje bakterij *C. jejuni* smo pripravili po navodilih proizvajalca. Tekoča gojišča smo hranili v steklenicah, trdna pa smo razlili v petrijeve plošče (po 20 mL). Ohlajena gojišča (trdna in tekoča) smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C. Seznam vseh gojišč in njihovih proizvajalcev najdemo v preglednici 4.

Kjer smo želeli zagotoviti selektivno rast mutant z vstavljenim genom za odpornost proti določenemu antibiotiku, smo gojišču Mueller-Hinton agar (MHA) dodali antibiotik kloramfenikol v koncentraciji 4 mg/L ali kanamicin v koncentraciji 30 mg/L.

Pri postopku transformacije smo za gojenje bakterije *E. coli* uporabili gojišče LB, ki smo ga pripravili tako, da smo zmešali sestavine prikazane v preglednici 5 in mešanico avtoklavirali. Zaradi zagotavljanja selektivnosti smo gojišču dodali antibiotik kanamicin do koncentracije 30 mg/L.

Po postopku elektroporacije smo za gojenje bakterije *C. jejuni* uporabili gojišče SOC, pripravljeno iz sestavin, prikazanih v preglednici 6.

Vsa gojišča smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Selektivne dodatke smo dodali v gojišča, ohlajena do 50 °C.

Preglednica 4: Mikrobiološka gojišča, njihovi proizvajalci in referenčne številke

Gojišča in dodatki	Proizvajalec	Referenčna številka
Karmali	Oxoid	CM0935
<i>Campylobacter</i> selektivni dodatek (Karmali)	Oxoid	SR0167E
Mueller Hinton agar (MHA)	Oxoid	CM0337
Mueller Hinton bujon (MHB)	Oxoid	CM0405
Brain heart infusion (BHI)	Oxoid	CM0375

Preglednica 5: Receptura za pripravo gojišča LB agar

Sestavina	Količina
NaCl	5 g
Trypton	5 g
Kvasni ekstrakt	2,5 g
Agar	10 g
dH ₂ O	500 mL
5 M NaOH	do pH=7

Preglednica 6: Receptura za pripravo gojišča SOC

Sestavina	Količina
Bacto-tripton	2 g
Bacto-kvasni ekstrakt	0,5 g
1 M NaCl	1 mL
1 M KCl	0,25 mL
dH ₂ O	97 mL
Mg ²⁺ (založna raztopina 20,33 g MgCl ₂ *6H ₂ O/100 mL dH ₂ O)*	1 mL
2 M glukoza*	1 mL

* dodati po avtoklaviranju

3.3 METODE

3.3.1 Revitalizacija bakterijskih kultur

Bakterijske kulture smo hranili v mešanici glicerola in BHI gojišča (200 μ L : 800 μ L), v zamrzovalniku pri -80 °C. Za revitalizacijo smo odvzeli polno cepilno zanko zamrznjene kulture in nacepili na selektivno gojišče Karmali. Nacepljene plošče smo inkubirali 24 h pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Specifične sive kolonije smo precepili na gojišče MHA in inkubirali v mikroaerofilni atmosferi 24 h pri 42 °C. Pri gojenju mutant smo uporabili MHA gojišče z dodatkom antibiotikov kanamicina, kloramfenikola in ampicilina. Mikroaerofilno atmosfero smo dosegli s preprihovanjem anaerobnega lonca z mešanico plinov (85 % N₂, 10 % CO₂ in 5 % O₂). Tako pripravljeno kulturo smo v nadaljevanju uporabili pri izvedbi poskusov.

3.3.2 Priprava seva s prekinjenim bralnim okvirjem gena *cmeG*

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti način delovanja (-)- α -pinena, pri čemer smo si pomagali z bakterijami, ki imajo v različnih genih vstavljene selekcijske markerje. Za ugotavljanje vpliva (-)- α -pinena na bakterijske izlivne črpalke smo uporabili mutante z izbrisom v genih, ki kodirajo izlivne črpalke CmeABC, CmeDEF in Cj1687. Te mutante smo pridobili iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. Še ena izlivna črpalka, ki prispeva k odpornosti *C. jejuni* proti antibiotikom, je CmeGH. Odločili smo se pripraviti sev s prekinjenim bralnim okvirjem gena *cmeG* oz. z izbrisom v genu *cmeG* (*cj1375*).

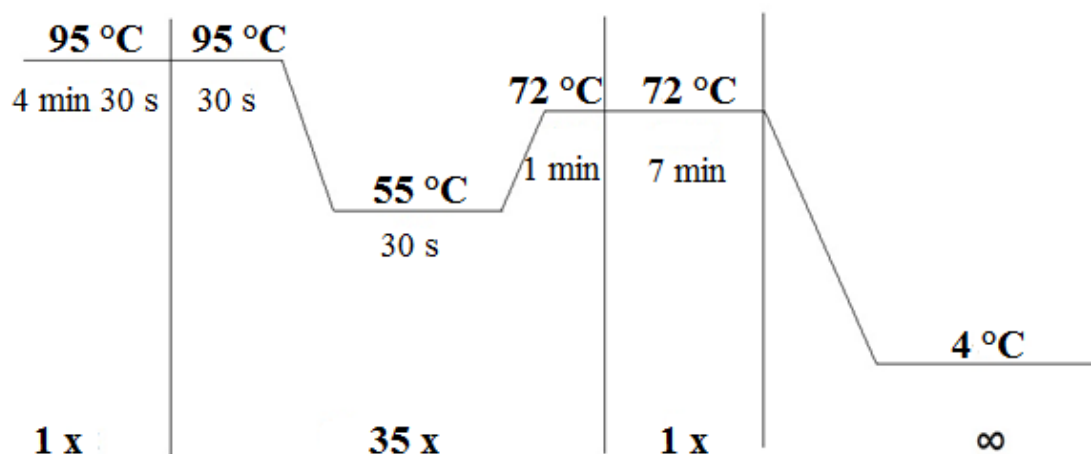
Iz laboratorija VMPPM (Zhang, ZDA) smo dobili DNA seva z izbrisom v genu *cj1375* in vstavljeno kanamicinsko kaseto (*cmeG::aphA3*). Odsek DNA, ki smo ga želeli vstaviti v naš sev, smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Pri tem smo uporabili oligonukleotidna začetnika Cj1375F (CATCTACACAAATGCCACTATCATCACTTAA) in Cj1375R (GCCACAAGCCAAATTAGAGCTAAAATTACTAA). Pomnožen produkt reakcije PCR smo očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) po navodilih proizvajalca. Tako pripravljen in očiščen produkt smo uporabili pri kloniranju.

3.3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo za potrditev prisotnosti fragmenta in elektroforeza

Verižno reakcijo s polimerazo (v nadaljevanju reakcija PCR) smo uporabili za potrditev izbranega fragmenta v plazmidu pGEM-T in po izvedeni transformaciji v genomu bakterije *C. jejuni* 11168 Δ *cmeG*. Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 7, pogoji reakcije pa so prikazani na sliki 5.

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR za potrjevanje prisotnosti fragmenta DNA *cmeG::aphA3*

	Proizvajalec	Založna koncentracija	Za 1 vzorec (μL)	Končna koncentracija
PCR pufra	Promega, ZDA	5 x	9,6	1 x
MgCl ₂	Promega, ZDA	25 mM	3,84	2 mM
dNTP	Sigma, ZDA	2,5 mM	3,84	0,2 μM
Začetnik F	MWG, Nemčija	10 μM	2,4	0,5 μM
Začetnik R	MWG, Nemčija	10 μM	2,4	0,5 μM
Bidestilirana voda			24,82	
Taq polimeraza	Promega, ZDA	5 U/ μL	0,1	0,5 U
DNA			1	

Slika 5: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje fragmenta *cmeG::aphA3*.

3.3.2.2 Elektroforeza

Za preverjanje uspešnosti reakcije PCR smo pri pomnoževanju fragmenta DNA uporabili 1,5 % agarozni gel. Gel smo pripravili tako, da smo vmešali 0,75 g agaroze v 50 mL pufra TBE (1 x). Gel smo skuhali v mikrovalovni pečici. V še tekoč gel smo dodali 5 μL barvila SYBR safe (Invitrogen) in ga vlili v manjši model za gel, kjer smo ga pustili, da se ohladi in strdi. Pripravljen gel smo vstavili v elektroforezno banjico s pufrom TBE. V prvo luknjico gela smo nanесли lestvico DNA (Thermo Scientific). V ostale luknjice smo dodali pomnožke DNA, ki so nastali v reakciji PCR, katerim smo dodali nanašalno barvilo (Thermo Scientific). Elektroforeza je potekala 30 min pri 100 V.

3.3.2.3 Ligacija in transformacija

Kloniranje pomnoženega fragmenta v plazmid pGEM smo izvedli s kompletom pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) po navodilih proizvajalca. S procesom transformacije smo

plazmid vstavili v bakterijo *E. coli* DH5 α . Uspeh transformacije smo preverili z rastjo kolonij na gojišču LB agar z dodatkom kanamicina v koncentraciji 30 mg/L (LBA+Kn), saj ima vstavljen fragment gen za odpornost proti kanamicinu. Zrasle kolonije smo precepili na selektivno gojišče LBA+Kn. Iz namnožene kulture smo izolirali plazmid s kompletom za izolacijo Genelute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma Aldrich) in preverili na prisotnost vstavljenega fragmenta z reakcijo PCR in elektroforezo (preglednica 7, slika 5).

3.3.2.4 Izolacija DNA

DNA smo iz bakterijskih celic izolirali z reagentom PrepMan (Thermo Fisher Scientific) tako, da smo manjšo količino bakterij resuspendirali v 100 μ L reagenta in dobro premešali na vrtinčnem mešalu. Resuspendirane celice smo segrevali 12 min pri 99 °C in po kratkem hlajenju centrifugirali. Petdeset μ L supernatanta smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in DNA hranili pri -20 °C.

3.3.2.5 Vstavljanje samomorilskega plazmida v *C. jejuni* 11168 s postopkom elektroporacije

Postopek priprave bakterijskih celic za elektroporacijo in postopek elektroporacije smo povzeli po Holt in sod. (2012) z manjšimi spremembami.

3.3.2.5.1 Priprava bakterijske kulture za postopek elektroporacije

Celice *C. jejuni* smo iz gojišča MHA resuspendirali v 10 mL MHB in optično gostoto (pri $\lambda=600$) umerili do 5 ($OD_{600}=5$). V nadaljevanju smo tako pripravljeno kulturo centrifugirali 20 min pri 3220 x g in 4 °C ter vsedlino resuspendirali v ledeno mrzlem pufu (272 mM saharoza in 15 % glicerol). Izpiranje s pufom smo ponovili še trikrat. Na koncu smo kulturo resuspendirali v 1 mL pufra. Kulturo, pripravljeno za elektroporacijo, smo do uporabe hranili pri -80 °C.

3.3.2.5.2 Izvedba elektroporacije

Pred izvedbo elektroporacije smo kulturo, pripravljeno za elektroporacijo, odtalili na ledu. V ohlajeni mikrocentrifugirki smo zmešali 40 μ L vnaprej pripravljenih celic in 1 – 2 μ L (do 1 μ g) plazmida ter pustili 1 min na ledu. To mešanico smo prestavili v kiveto in to vstavili v aparat za elektroporacijo. Nastavitve aparata za elektroporacijo so prikazane v preglednici 8.

Preglednica 8: Nastavitve aparata za elektroporacijo

Nastavitev na aparatu	Vrednost
Gene Pulser	25 μ F
Puls Controller	200 Ω
Gene Pulser	2,5 kV

Po elektroporaciji smo v kiveto dodali 1 mL gojišča SOC in to mešanico predstavili na gojišče MHA ter inkubirali 5 h v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C. Po 5 h smo biomaso predstavili na selektivno ploščo MHA z dodatkom kanamicina v koncentraciji 30 mg/L. Plošče smo inkubirali 3 dni pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Zrasle kolonije smo precepili na selektivno gojišče in ponovno 24 h inkubirali pri enakih pogojih. Iz kolonij, ki so uspešno rastle na selektivnem gojišču, smo izolirali DNA in z reakcijo PCR preverili prisotnost željenega fragmenta. Klone, iz katerih smo uspešno pomnožili fragment DNA pravilne velikosti, smo shranili v mešanici glicerola in MHA pri -80 °C.

3.3.3 Določanje protimikrobne in modulatorne učinkovitosti (-)- α -pinena

Za določanje protimikrobne in modulatorne učinkovitosti (-)- α -pinena smo uporabili metodo mikrodilucije v bujonu. Spremljali smo učinek same spojine in (-)- α -pinena v kombinaciji z antibiotikoma ciprofloksacinom in eritromicinom, razkužilom triklosanom ter etidijevim bromidom.

3.3.3.1 Priprava kulture

Iz gojišča MHA smo z brisom pobrali nekaj kolonij *C. jejuni*, gojenih po postopku, opisanem v poglavju »Revitalizacija bakterijskih kultur« in jih resuspendirali v tekočem gojišču MHB. Spektrofotometrično smo izmerili optično gostoto in jo umerili na $OD_{600}=0,1$, kar ustreza približno $5 \cdot 10^7$ CFU/mL. Tako pripravljeno kulturo smo 100 krat razredčili v gojišču MHB, saj smo za poskus potrebovali približno $5 \cdot 10^5$ CFU/mL.

Število celic v tekoči kulturi smo ovrednotili z metodo nanašanja kapljic na ploščo. Iz epruvete s tekočo kulturo smo odvzeli 100 μ L in prenesli v mikrocentrifugirko z 900 μ L pufra PBS. Vsebino smo dobro premešali in naprej redčili v PBS po enakem postopku, do ustrezne redčitve. Na agarso ploščo MHA smo iz vsake mikrocentrifugirke nanесли po 3 kapljice. Plošče smo inkubirali 24 h pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Po inkubaciji smo za vsak vzorec posebej s štetjem kolonij določili CFU/mL.

3.3.3.2 Priprava protimikrobnih snovi

3.3.3.2.1 (-)- α -pinen

Zaradi nizke topnosti (-)- α -pinena v vodi smo spojino pred uporabo najprej raztopili v topilu DMSO. Maso (-)- α -pinena in volumne, ki smo jih potrebovali smo izračunali s formulami 1, 2 in 3. V DMSO smo pripravili 40 krat večjo koncentracijo (-)- α -pinena od tiste, ki smo jo želeli imeti v mikrotitrski ploščici (c40). (-)- α -pinen, raztopljen v DMSO, smo 10 krat razredčili v tekočem gojišču MHB. Raztopino smo prenesli v ustrezne luknjice mikrotitrskе ploščice, v vsako po 50 μ L. Z nadaljnjim redčenjem v mikrotitrski ploščici in dodatkom kulture (50 μ L) smo dosegli željeno koncentracijo (-)- α -pinena in nismo presegli koncentracije topila 2,5 %, kar bi lahko vplivalo na rast bakterij.

$$V [\text{DMSO}] = 10 \% V[\alpha \text{ pinena}] \quad \dots(1)$$

$$c(\text{AP}) \left[\text{na ploščici, } \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] * 40 = c40 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \quad \dots(2)$$

$$c40 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] * V [\text{DMSO, mL}] = m [\alpha \text{ pinena, mg}] \quad \dots(3)$$

*V [DMSO]=volumen topila DMSO, c(AP)=koncentracija (-)- α -pinena v mikrotitrski ploščici, c40=40-kratna koncentracija (-)- α -pinena od željene, m=masa (-)- α -pinena.

3.3.3.2.2 Ciprofloksacin

Fluorokinolonski antibiotik ciprofloksacin smo raztopili v mešanici sterilne destilirane vode in 1 M NaOH (4/5 dH₂O : 1/5 NaOH). Mešanico antibiotika in topila smo filtrirali (velikost por 0,2 μ m), da bi zagotovili večjo čistost založne raztopine. Antibiotik smo razredčili do ustrezne koncentracije v gojišču MHB. Pri pripravi smo bili previdni, da končna koncentracija topila v poskusu ne bi presegala 2,5 %.

3.3.3.2.3 Eritromicin in triklosan

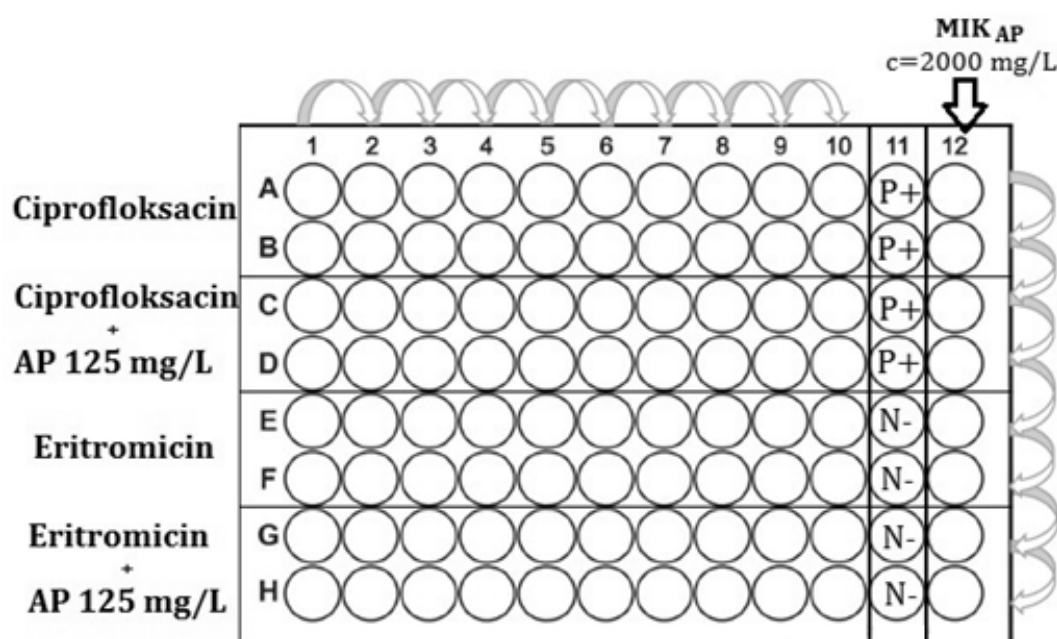
Makrolidni antibiotik eritromicin in razkužilo triklosan smo raztopili v absolutnem etanolu. Založno raztopino smo, zaradi zagotavljanja večje čistosti, filtrirali s filtrom velikosti por 0,2 μ m. Pri pripravi delovnih raztopin smo bili previdni, da v teh koncentracija topilo ne bi presegalo 10 % in posledično 2,5 % v mikrotitrski ploščici. Pri modulatornih testih smo eritromicin in triklosan razredčili v tekočem gojišču MHB.

3.3.3.2.4 Etidijev bromid

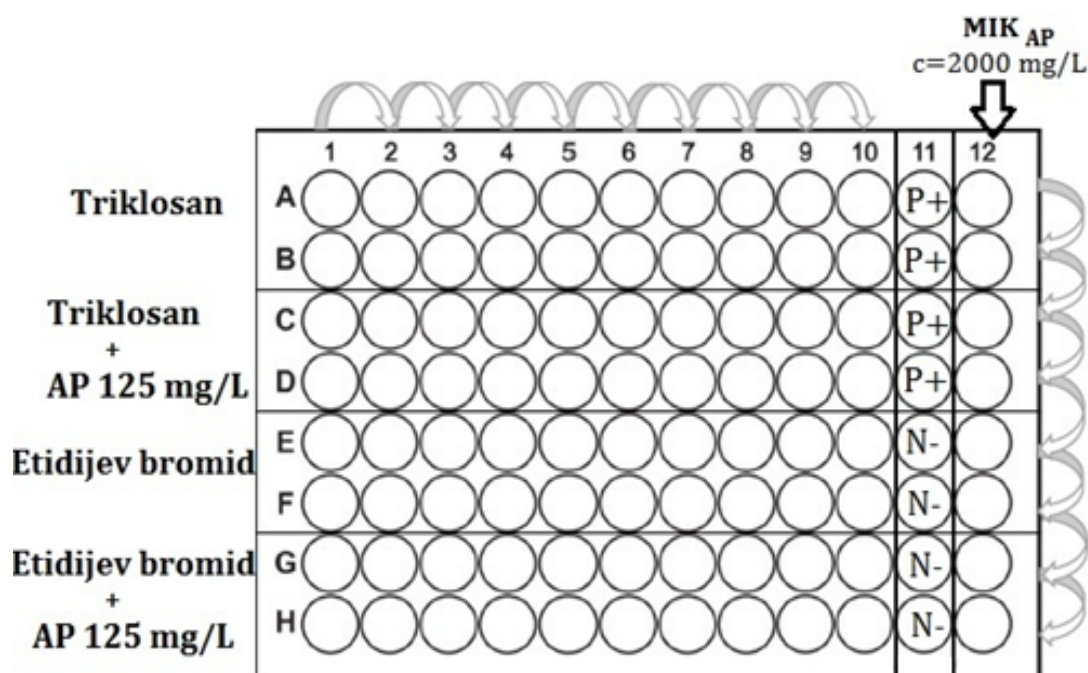
V Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo smo imeli že vnaprej pripravljeno založno raztopino etidijevega bromida (EtBr) (Sigma, E8751) s koncentracijo 5120 mg/L. Iz založne raztopine smo pripravili ustrezno delovno raztopino v gojišču MHB.

3.3.3.3 Mikrodilucija v bujonu

Za vsak sev smo pripravili po 2 mikrotitrski ploščici. Na eni ploščici smo v dveh ponovitvah preverjali delovanje (-)- α -pinena ($c=125$ mg/L) v kombinaciji s ciprofloksacinom in eritromicinom, na drugi pa s triklosanom in etidijevim bromidom. Na obeh ploščicah smo vključili 4 pozitivne in 4 negativne kontrole. MIK samega (-)- α -pinena smo preverili v dveh ponovitvah, vsako na eni ploščici. Na slikah 6 in 7 je prikazan postopek priprave ploščic.



Slika 6: Priprava raztopin ciprofloksacina, eritromicina in (-)- α -pinena (AP) v mikrotitrski ploščici za preverjanje minimalne inhibitorne koncentracije (-)- α -pinena (MIK_{AP}) in modulatornega učinka (-)- α -pinena (125 mg/L) v kombinaciji s ciprofloksacinom in eritromicinom. Ploščica vsebuje kulturo *C. jejuni* brez dodatkov ali pozitivno kontrolo (P+) in čisto gojišče MHB ali negativno kontrolo (N-).



Slika 7: Priprava raztopin triklosana, etidijevega bromida in (-)- α -pinena (AP) v mikrotitrski ploščici za preverjanje minimalne inhibitorne koncentracije (-)- α -pinena (MIK_{AP}) in modulatornega učinka (-)- α -pinena (125 mg/L) v kombinaciji s triklosanom in etidijevim bromidom. Ploščica vsebuje kulturo *C. jejuni* brez dodatkov ali pozitivno kontrolo (P+) in čisto gojišče MHB ali negativno kontrolo (N-).

3.3.3.4 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z resazurinom

3.3.3.4.1 Priprava raztopine resazurin za zaznavanje živosti celic

Za pripravo raztopine za zaznavanje živosti celic smo natehtali 0,0028 g resazurina in tega raztopili v 1 mL sterilne destilirane vode in dobro premešali. V raztopino smo dodali 9 mL gojišča MHB. Celotno vsebino smo razdelili v mikrocentrifugirke, v vsako po 900 μ L. V vsako mikrocentrifugirko z raztopino resazurina smo dodali po 100 μ L raztopine menadiona. Menadion smo pripravili tako, da smo zmešali 0,0014 g menadiona v 1 mL topila DMSO. Pripravljen reagent smo do uporabe hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

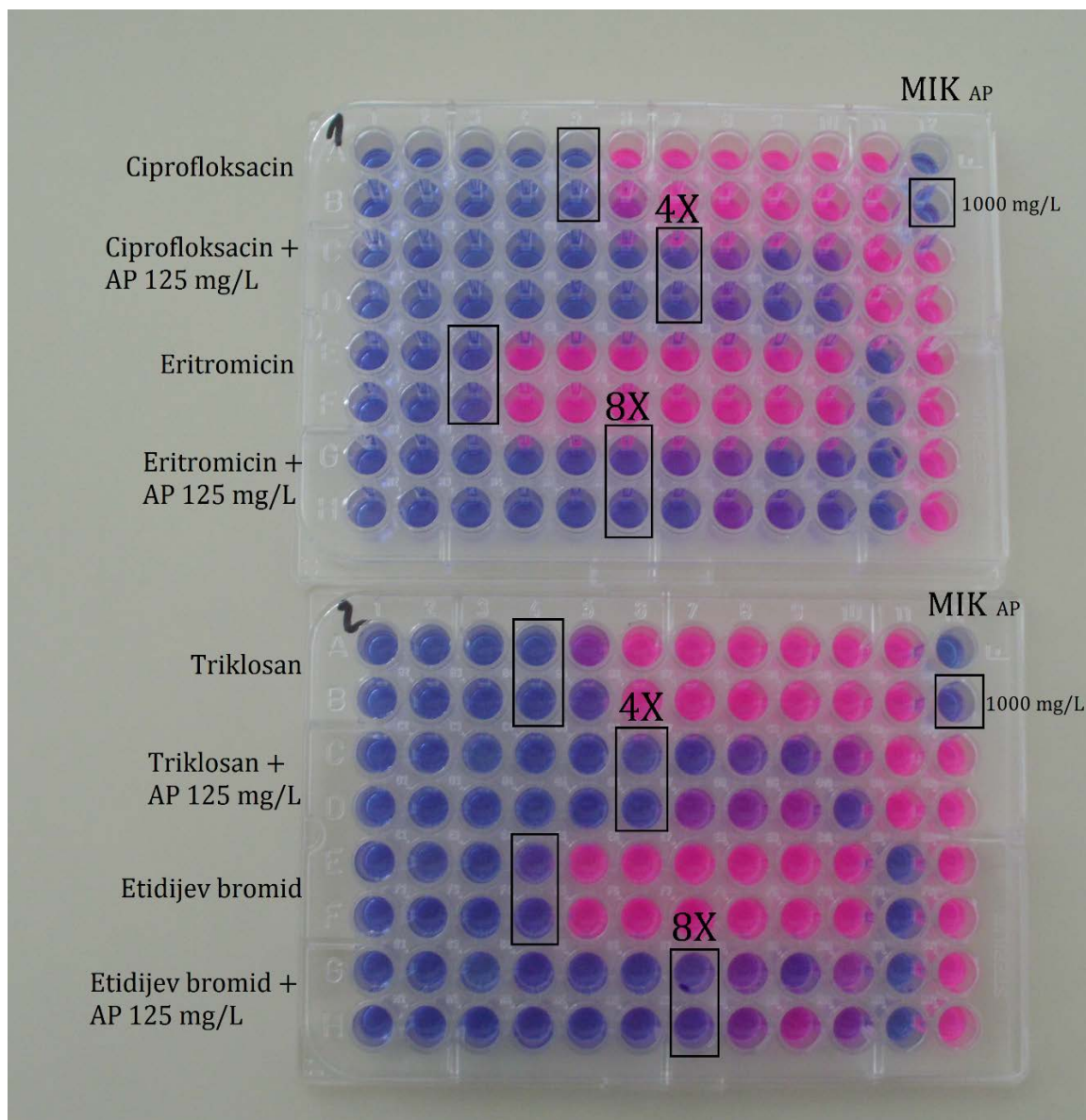
3.3.3.4.2 Določanje MIK

Po 24 h inkubacije smo v vsako luknjico mikrotitrške ploščice dodali po 10 μ L raztopine Resazurin. Ploščice smo inkubirali 2 h pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. MIK smo določili vizualno in preverili spektrofotometrično. Uporabili smo črne in prozorne mikrotitrške ploščice. Valovne dolžine za spektrofotometrično določanje MIK so

prikazane v preglednici 9. Primer določanja modulatornega faktorja (MF) (-)- α -pinena je prikazan na sliki 8.

Preglednica 9: Valovne dolžine za spektrofotometrično določanje MIK

Tip mikrotitrne plošče	Ekscitacijska λ	Emisijska λ
Črna - Greiner 96 Black	550	595
Prozorna - Nunc Micro Well 96	560	590



Slika 8: Primer določanja modulatornega faktorja (MF) in minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (-)- α -pinena

3.3.4 Test kopičenja etidijevega bromida v celicah

3.3.4.1 Priprava kulture

Iz gojišča MHA smo zajeli nekaj kolonij bakterijske kulture in resuspendirali v 20 mL ogretega tekočega gojišča (35 °C) MHB ter umerili $OD_{600}=0,150-0,250$. Tekočo kulturo smo inkubirali 4 ure v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C. Po inkubaciji smo kulturo centrifugirali (6000 g, 5 min) in izprali z ogretim pufrom PBS (35 °C). Postopek smo ponovili 2 krat. V ogretem pufru PBS smo umerili optično gostoto na $OD_{600}=0,2$.

3.3.4.2 Priprava inhibitorjev

3.3.4.2.1 (-)- α -pinen

Založno raztopino (-)- α -pinena smo v topilu DMSO pripravili v 1000 krat višji koncentraciji od potrebne končne koncentracije. DMSO pri tej koncentraciji ne vpliva na izlivne črpalke *C. jejuni*. Dodali smo 1 μ L založne raztopine v 999 μ L kulture. (-)- α -pinen smo pri sevu *C. jejuni* 11168 testirali v koncentracijah 62,5 mg/L in 125 mg/L. Želeli smo preveriti delovanje (-)- α -pinena tudi na drugih sevih, pri čemer smo uporabili spojino v končni koncentraciji 62,5 mg/L.

3.3.4.2.2 Karbonil cianid m-klorofenil hidrazon (CCCP)

V poskusu kopičenja etidijevega bromida smo CCCP uporabili kot pozitivno kontrolo saj inhibira delovanje ATP sintaze in s tem zmanjšuje izčrpavanje EtBr iz celic. Založno raztopino CCCP smo pripravili v topilu DMSO v koncentraciji 40 g/L. K 1999,5 μ L pripravljene kulture smo dodali 0,5 μ L založne raztopine in premešali. Tako smo dobili kulturo, ki je vsebovala CCCP s končno koncentracijo 10 mg/L.

3.3.4.2.3 Reserpin

Reserpin smo uporabili kot drugo pozitivno kontrolo, saj deluje kot inhibitor izlivnih črpalk in tako povzroča povečano kopičenje EtBr v celicah. V topilu DMSO smo pripravili založno raztopino reserpina s koncentracijo 100 g/L. 1 μ L založne raztopine smo dodali v 999 μ L kulture in tako dobili končno koncentracijo 100 mg/L.

3.3.4.3 Spektrofluorimetrično določanje EtBr v celicah

Pripravljeni kulturi smo dodali inhibitorje v ustreznih koncentracijah. Dobro smo premešali kulturo in nanесли po 96,875 μ L v črno mikrotitrsko ploščico. Ploščico smo

inkubirali 10 – 15 min v mikroaerofilni atmosferi pri 37 °C. Neposredno pred začetkom merjenja kinetike smo v vsako luknjico dodali 3,125 μ L etidijevega bromida (založna c=16 μ g/mL). Kinetiko smo merili 1 uro. Test smo opravili v 3 ponovitvah in zadnjih 10 meritev smo uporabili pri statistični analizi.

V poskusu smo uporabili črne mikrotitrne ploščice Greiner Black 96 well. Meritve smo opravljali v intervalih 45 s pri ekscitacijski valovni dolžini (λ_{Ex}) 500 nm in emisijski (λ_{Em}) 608 nm.

Kopičenje EtBr v celicah smo zaznali kot povečanje fluorescentnega signala in zabeležili v relativnih fluorescenčnih enotah (angl. *Relative fluorescent units* – RFU).

3.3.5 Test vpliva snovi na membransko integriteto bakterijskih celic

Vpliv (-)- α -pinena na integriteto bakterijske celične membrane smo spektrofotometrično določili z uporabo kompleta LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probes). Pri poskusu smo sledili proizvajalčevim navodilom z manjšimi spremembami. Test smo izvedli v dveh ločenih poskusih.

BacLight komplet vsebuje 2 barvili, zeleno fluorescenčno barvilo SYTO9 (komponenta A) in rdeče fluorescenčno barvilo, propidijev jodid (komponenta B). Zeleno barvilo barva vse celice, s poškodovano in nepoškodovano membrano, rdeče pa samo celice s poškodovano membrano. V prisotnosti rdečega barvila se fluorescenčni signal zelenega barvila zmanjšuje in tako lahko z merjenjem fluorescence pri λ_{Ex} = 480 nm in λ_{Em} = 500 nm zaznamo stabilnost celične membrane. Razporeditev spojin in kultur za merjenje integritete celične membrane v mikrotitrski ploščici je prikazana v preglednici 10.

Preglednica 10: Razporeditev reagenta, (-)- α -pinena in bakterijske kulture za določanje integritete celične membrane v mikrotitrski ploščici

Stolpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vrstica A	AP 125 mg/L K 100 μ L R 100 μ L	AP 125 mg/L K 100 μ L R 100 μ L	AP 62,5 mg/L K 100 μ L R 100 μ L	AP 62,5 mg/L K 100 μ L R 100 μ L	K 100 μ L R 100 μ L	K 100 μ L R 100 μ L	MK 100 μ L R 100 μ L	MK 100 μ L R 100 μ L	PBS 100 μ L R 100 μ L	PBS 100 μ L R 100 μ L

*AP=(-)- α -pinen; K= "živa kultura"; MK= toplotno obdelana "mrtva" kultura; R=reagent LIVE/DEAD BacLight; PBS = fosfatni pufer.

3.3.5.1 Priprava kulture

Iz plošče MHA smo zajeli nekaj kolonij *C. jejuni*, resuspendirali v ogretem gojišču MHB (42 °C) in umerili $OD_{600} = 0,1 - 0,2$. Kulturo smo inkubirali 8 ur v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C. Po inkubaciji smo kulturo centrifugirali 10 min pri 6000 x g. Supernatant smo odstranili in kulturo resuspendirali v ogretem PBS (42 °C) ter umerili $OD_{600} = 0,1$. Od tako pripravljene »žive« kulture smo odvzeli 2 mL in iz tega pripravili »mrtvo« kulturo s segrevanjem 15 min pri 80 °C. Kjer je to bilo potrebno smo k živi kulturi dodali (-)- α -pinen, raztopljen v topilu DMSO, v končni koncentraciji 62,5 mg/L in 125 mg/L. Pri tem smo bili previdni, da količina DMSO v končni mešanici ni presegla 0,1 %, saj pri tej koncentraciji DMSO ne vpliva na celično membrano *C. jejuni*.

3.3.5.2 Priprava reagenta za barvanje celic

Za pripravo reagenta za barvanje smo uporabili stekleno epruveto ovito z aluminjsko folijo, da smo barvili zaščitili pred svetlobo. V epruveti smo zmešali 6 μ L komponente A in 6 μ L komponente B in dobro premešali. Temu smo dodali 2 mL prefiltrirane destilirane vode (pore filtra = 0,2 μ m).

V črni mikrotitrski ploščici smo zmešali ustrezno pripravljeno kulturo in reagent za barvanje celic v razmerju 1:1 (100 μ L kulture: 100 μ L reagenta). Kinetiko smo spremljali 1 uro s fluorescenčnim čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan pri $\lambda_{ex} = 480$ nm in $\lambda_{em} = 500$ nm. Rezultat smo prikazali v relativnih fluorescenčnih enotah (RFU) in iz zadnjih 10 meritev izračunali odstotek zmanjšanja ali povečanja integritete celične membrane pod vplivom (-)- α -pinena.

3.3.6 Statistična analiza

Za statistično analizo rezultatov določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), modulatornega delovanja (-)- α -pinena in kopičenje etidijevega bromida smo uporabili analizo one-way ANOVA z ustreznim post-hoc testom s statistično značilnostjo $p < 0,05$. Za analizo smo uporabili program SPSS verzijo 21 (IBM, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA (-)- α -PINENA

Določili smo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) (-)- α -pinena pri 74 sevih in 6 mutantih *C. jejuni*. Sevi so iz več različnih izvorov, in sicer iz piščancev, puranov, piščančjega mesa, humani in iz vode. MIK smo določali pri sevih z izbriso v genih *hrcA*, *hspR*, *cj1687*, *cmeF*, *cmeB* in *omp50*.

Preglednica 11: Minimalna inhibitorna koncentracija (-)- α -pinena (MIK_{AP}), prikazana v mg/L, določena na 74 sevih in 6 mutantih *C. jejuni*.

Sev	MIK _{AP} (mg/L)	Sev	MIK _{AP} (mg/L)	Sev	MIK _{AP} (mg/L)
53124	1000	CB2:6	2000	CT 6:18	2000
57360	1000	CB2:8	2000	CT 6:8	2000
60089	>2000	CB2:11	1000	CT 6:16	2000
9581	500	CB3:1	2000	CT 7:2	2000
9090	1000	CB3:5	2000	CT 8: 28	2000
9711	500	CB 4:21	1000	CT 8:29	>2000
1190/09	500	CB 4:22	2000	CT 8:22	2000
375/06	2000	CB 6:8	2000	CT 9:14	2000
573/03	2000	CB 6:9	2000	CT10:18	1000
1518/08	2000	CB 6:26	2000	CT 9:21	1000
C2	2000	CB 7:15	1000	F6501	>2000
C33	2000	CB 7:21	2000	H2958	2000
816	500	CB 8:14	2000	M63885	2000
660/08	1000	CB 8:15	1000	T59822	2000
58429	1000	CT 1:1	2000	W14861	>2000
33560	1000	CT 1:9	1000	X60179	2000
K49/4	2000	CT 2:2	2000	F15871	>2000
11168	2000	CT 3:5	2000	W11805	2000
11168 Δ <i>hrcA</i>	2000	CT3:11	500	M402	>2000
11168 Δ <i>hspR</i>	2000	CT3:19	2000	W28752	2000
11168 Δ <i>cj1687</i>	2000	CT4:4	2000	M33323	2000
11168 Δ <i>cmeF</i>	2000	CT4:14	2000	W64861	2000
11168 Δ <i>cmeB</i>	1000	CT5:2	2000	M76297	2000
11168 Δ <i>omp50</i>	2000	CT5:8	2000	E46972	>2000
CB1:6	1000	CT5:10	2000	M36292	2000
CB1:14	1000	CT5:12	2000	X7199	>2000
CB1:18	1000	CT5:18	2000		

Pri večini sevov je MIK 1000 mg/L ali več, le pri 5 sevih je 500 mg/L. Vsi sevi so odporni na protimikrobno delovanje (-)- α -pinena, saj MIK-ov, nižjih od 500 mg/L, nismo določili pri nobenem sevu. V preglednici 11 so prikazane vse vrednosti MIK za vse testirane seve.

4.2 DOLOČANJE ODPORNOSTNO-MODULATORNE AKTIVNOSTI (-)- α -PINENA

Odpornostno-modulatorno aktivnost (-)- α -pinena smo določili tako, da smo primerjali MIK antibiotika in MIK kombinacije antibiotika in (-)- α -pinena v subinhibitorni koncentraciji. Odpornostno-modulatorno delovanje (-)- α -pinena je prikazano kot modulacijski faktor (MF). MIK in MF smo določili za 2 antibiotika, ciprofloksacin in eritromicin, protimikrobni spojini triklosan in etidijev bromid pri 9 sevih in 2 mutantah. Rezultati testiranja odpornostno-modulatornega delovanja (-)- α -pinena v kombinaciji s ciprofloksacinom, eritromicinom, triklosanom in etidijevim bromidom na 9 sevih *C. jejuni* in 2 mutantah so prikazani v preglednicah 12 in 13.

Preglednica 12: Določanje MIK antibiotikov ciprofloksacina in eritromicina v prisotnosti (-)- α -pinena (125 mg/L) (CIP_{AP} in ERY_{AP}) in brez njega (CIP in ERY) na 9 sevih *C. jejuni* in 2 mutantah ter prikaz modulacijskega faktorja (MF)

Sev	MIK (mg/L)			MIK (mg/L)		
	CIP	CIP _{AP}	MF	ERI	ERI _{AP}	MF
NCTC11168*	0,063	0,031	2	0,5	0,25	2
NCTC11168	0,063	<0,002	>32	0,5	<0,002	>256
K49/4	0,063	0,002	32	0,25	<0,002	>128
53124	4	2	2	0,25	0,063	4
375/06	4	1	4	0,125	<0,008	>16
57360	4	<0,008	>512	0,25	<0,002	>128
58429	4	<0,031	>128	0,25	<0,125	>2
60089	8	2	4	0,125	0,063	2
1518/08	8	<0,031	>256	0,125	<0,002	>64
573/03	16	4	4	0,125	0,063	2
11168 <i>ΔcmeB</i>	0,016	<0,001	>16	0,063	<0,002	>32
11168 <i>Δcj1687</i>	0,063	<0,001	>63	0,125	<0,002	>64

*AP smo uporabili kot modulator v koncentraciji 62,5 mg/L

MF=CIP/CIP_{AP} ali ERI/ERI_{AP}

Preglednica 13: Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) protimikrobnih sredstev triklosana in etidijevega bromida v prisotnosti (-)- α -pinena (125 mg/L) (TK_{AP} in $EtBr_{AP}$) in brez njega (TK in EtBr) na 9 sevih *C. jejuni* in 2 mutantih ter prikaz pripadajočega modulatorijskega faktorja (MF)

Sev	MIK (mg/L)			MIK (mg/L)		
	TK	TK_{AP}	MF	EtBr	$EtBr_{AP}$	MF
NCTC11168*	8	4	2	1	1	1
NCTC11168	8	<0,125	>64	1	<0,008	>128
K49/4	4	0,250	16	2	0,016	128
53124	4	4	1	0,5	0,5	1
375/06	4	<0,125	>32	0,250	<0,008	>32
57360	8	<0,063	>128	0,250	<0,008	>32
58429	4	<0,125	>32	0,250	<0,063	>4
60089	32	32	1	8	8	1
1518/08	16	<0,031	>512	0,5	<0,008	>64
573/03	16	<0,063	>256	0,5	<0,008	>64
11168 Δ <i>cmcB</i>	8	<0,063	>128	0,063	<0,008	>8
11168 Δ <i>cj1687</i>	8	<0,063	>128	0,5	<0,008	>64

*AP smo uporabili kot modulator v koncentraciji 62,5 mg/L

MF=TK/ TK_{AP} ali EtBr/ $EtBr_{AP}$

Pri sevu NCTC11168 smo odpornostno-modulatorno delovanje (-)- α -pinena preverjali v dveh subinhibitornih koncentracijah, in sicer 62,5 mg/L (v preglednici NCTC11168*) in 125 mg/L (v preglednici NCTC11168). Pri ciprofloksacinu, eritromicinu in triklosanu v kombinaciji z (-)- α -pinenom v koncentraciji 62,5 mg/L vidimo 2-kratno zmanjšanje MIK, pri etidijevem bromidu zmanjšanja MIK nismo opazili. Ko smo k protimikrobnim spojinam dodali (-)- α -pinen v koncentraciji 125 mg/L, smo opazili znatno zmanjšanje MIK pri vseh 4 testiranih spojinah. Metoda določanja MIK, ki smo jo uporabljali, dovoljuje 2-kratno napako pri interpretaciji rezultatov, saj redčitve spojin delamo ročno in tako lahko pride do manjših napak v samem postopku. Zaradi neznatnega vpliva (-)- α -pinena pri koncentraciji 62,5 mg/L v kombinaciji s protimikrobnimi spojinami na sev NCTC11168 in tako očitnega odpornostno-modulatornega učinka pri koncentraciji 125 mg/L smo se odločili na ostalih sevih testirati (-)- α -pinen le pri koncentraciji 125 mg/L. Na mutanti 11168 Δ *cmcB* in 11168 Δ *cj1687* (-)- α -pinen v kombinaciji s protimikrobnimi spojinami deluje podobno ali enako kot na sam sev NCTC11168.

(-)- α -pinen ima v kombinaciji s ciprofloksacinom šibko delovanje pri sevih 53124, 375/06, 60089 in 573/03. V kombinaciji z eritromicinom ima (-)- α -pinen pri istih sevih prav tako šibko delovanje z izjemo seva 375/06, pri katerem se je MIK eritromicina po dodatku (-)- α -pinena zmanjšala za več kot 16-krat. Pri triklosanu in etidijevem bromidu se je MIK v prisotnosti (-)- α -pinena pri večini sevov močno zmanjšala. Pri sevih 53124 in 60089 (-)- α -pinen v kombinaciji s triklosanom in etidijevim bromidom ni pokazal odpornostno-

modulatornega učinka. Pri sevih 57360, 58429 in 1518/08 je odpornostno-modulatorni učinek (-)- α -pinena v kombinaciji s ciprofloksacinom posebej zanimiv, saj so ti sevi odporni proti ciprofloksacinu. Po dodatku (-)- α -pinena se je MIK teh sevov zmanjšala toliko, da ti sevi ne padejo več pod kriterij za seve, odporne proti ciprofloksacinu.

Modulatorno aktivnost (-)- α -pinena smo v kombinaciji z antibiotikoma ciprofloksacinom in eritromicinom v nadaljevanju testirali še na 56 sevov *C. jejuni*. Rezultati testiranja so vidni v preglednici 14.

Preglednica 14: Prikaz MIK (mg/L) ciprofloksacina in eritromicina (CIP in ERI) brez in z dodatkom (-)- α -pinena (125 mg/L) (CIP_{AP} in ERI_{AP}) za 56 sevov *C. jejuni* in prikaz pripadajočega modulatornega faktorja (MF).

Sev	MIK (mg/L)			MIK (mg/L)		
	CIP	CIP _{AP}	MF	ERI	ERI _{AP}	MF
CB1:6	16	<0,125	>128	0,5	<0,002	>256
CB1:14	16	<0,125	>128	0,5	<0,002	>256
CB1:18	16	<0,125	>128	0,5	0,125	4
CB2:6	64	16	4	0,5	0,063	8
CB2:8	64	32	2	0,5	0,250	2
CB2:11	8	4	2	0,5	0,250	2
CB3:1	0,125	0,063	2	0,250	0,063	4
CB3:5	0,250	0,063	4	0,5	0,250	2
CB 4:21	0,063	0,031	2	0,063	<0,002	>32
CB 4:22	0,125	0,001	128	0,063	0,002	32
CB 6:8	0,063	0,008	8	0,125	<0,002	>64
CB 6:9	0,063	0,031	2	0,125	0,063	2
CB 6:26	0,063	0,031	2	0,250	0,125	2
CB 7:15	8	<0,063	>128	0,250	<0,002	>128
CB 7:21	8	1	8	0,125	<0,002	>64
CB 8:14	0,063	0,001	64	0,125	0,002	64
CB 8:15	0,063	0,001	64	0,5	<0,002	>256
CT 1:1	16	1	16	0,5	0,031	16
CT 1:9	16	2	8	0,5	0,063	8
CT 2:2	16	<0,063	>256	256	<1	>256
CT 3:5	0,063	<0,001	>64	0,031	<0,002	16
CT3:11	4	<0,063	>64	-	-	-
CT3:19	16	<0,063	>256	512	<1	>512
CT4:4	16	8	2	128	64	2
CT4:14	8	8	1	128	64	2
CT5:2	16	4	4	256	256	1

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 14. Prikaz MIK (mg/L) ciprofloksacina in eritromicina (CIP in ERI) brez in z dodatkom (-)- α -pinena (125 mg/L) (CIP_{AP} in ERI_{AP}) za 56 sevov *C. jejuni* in prikaz pripadajočega modulatornega faktorja (MF).

Sev	MIK (mg/L)			MIK (mg/L)		
	CIP	CIP _{AP}	MF	ERI	ERI _{AP}	MF
CT5:8	8	2	4	256	16	16
CT5:10	16	<0,063	>256	256	<1	>256
CT5:10	16	<0,063	>256	256	<1	>256
CT5:12	16	4	4	256	32	8
CT5:18	16	4	4	256	64	4
CT 6:18	8	0,5	16	128	<1	>128
CT 6:8	16	2	8	256	<1	>256
CT 6:16	0,031	<0,001	>32	128	<1	>128
CT 7:2	0,031	<0,001	>32	0,063	0,002	32
CT 8: 28	8	1	8	0,250	<0,008	>32
CT 8:29	4	<0,063	>64	64	8	8
CT 8:22	4	0,5	8	0,5	0,5	1
CT 9:14	0,250	<0,002	>128	2	<0,008	>256
CT10:18	0,063	<0,002	>32	0,250	<0,008	>32
CT 9:21	0,125	<0,002	>64	2	<0,008	>256
F6501	0,125	0,063	2	0,250	0,125	2
H2958	0,125	0,031	4	0,5	0,250	2
M63885	0,250	<0,002	>128	0,5	<0,008	>64
T59822	0,125	0,016	8	0,25	0,063	4
W14861	0,250	0,25	1	2	2	1
X60179	8	<0,063	>128	0,250	<0,002	>128
F15871	0,125	0,063	2	1	0,5	2
W11805	0,063	0,031	2	0,250	0,063	4
M402	0,063	0,031	2	1	0,5	2
W28752	0,063	0,008	8	0,5	<0,002	>256
M33323	0,063	0,063	1	0,250	0,250	1
W64861	0,125	0,063	2	0,250	0,250	1
M76297	0,063	0,031	2	0,250	0,125	2
E46972	1	<0,002	>512	0,250	<0,008	>32
M36292	0,063	<0,002	>32	0,250	<0,008	>32
X7199	16	16	1	0,250	0,125	>32

Od 56 sevov *C. jejuni*, ki smo jih uporabili za določanje odpornostno-modulatorne aktivnosti (-)- α -pinena, je 17 izoliranih iz piščancev (oznaka v preglednici CB), 23 iz puranov (oznaka CT) in 16 iz ljudi (oznake F, H, M, T, W, X in E). Odpornih proti ciprofloksacinu je največ sevov iz puranov (74 %), za tem iz piščancev (47 %) in najmanj

iz ljudi (10 %). Število sevov, odpornih proti eritromicinu, je manjše, saj so se ti pojavili samo pri sevih, izoliranih iz puranov (56 %).

(-)- α -pinen je v kombinaciji s ciprofloksacinom zmanjšal MIK več kot polovici sevov (57 %) za faktor 8 ali več. Od 56 sevov je 27 odpornih proti ciprofloksacinu. V kombinaciji z (-)- α -pinenom se je MIK približno polovice odpornih sevov (44 %) zmanjšala toliko, da sevi po določbah EUCAST (Evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti) niso več spadali med odporne seve.

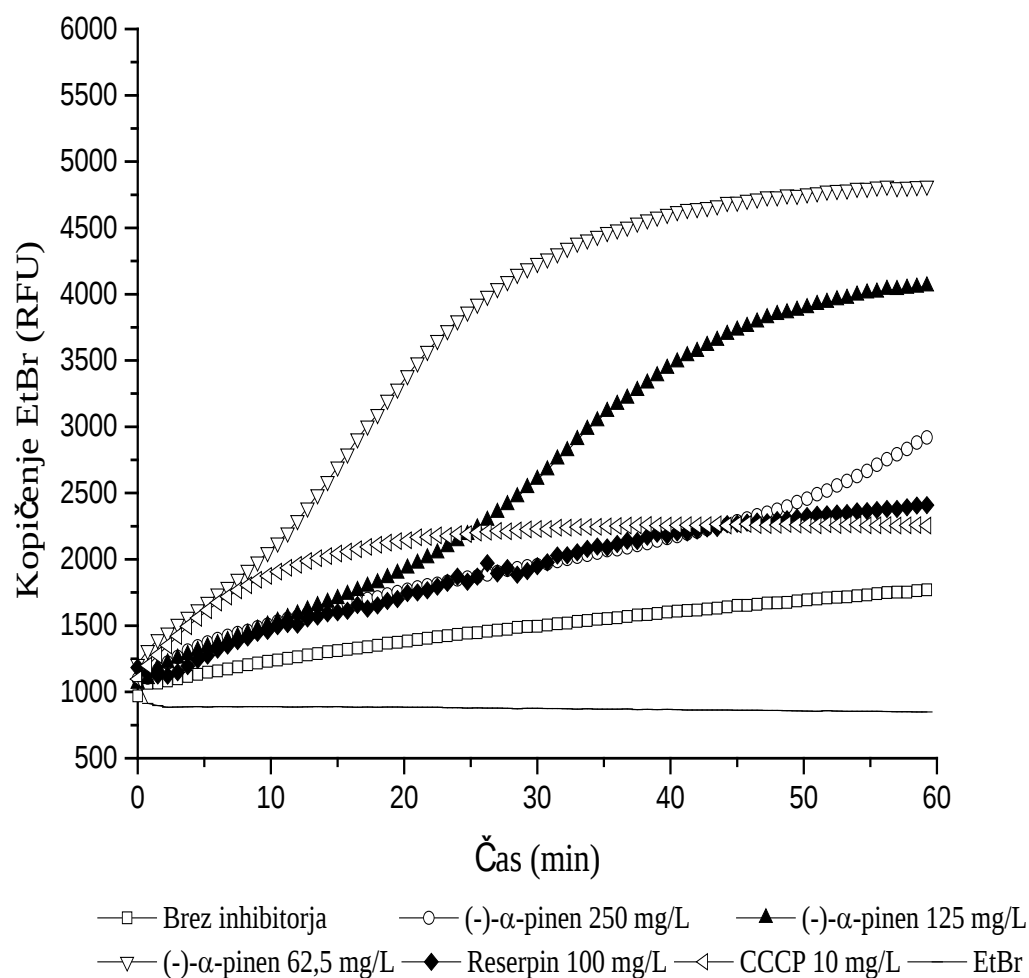
V kombinaciji eritromicina in (-)- α -pinena se je MIK antibiotika zmanjšal za faktor 8 ali več pri več kot polovici sevov (60 %). Od 55 sevov, pri katerih smo preverjali občutljivost na eritromicin z in brez (-)- α -pinena, jih je 13 odpornih proti eritromicinu. Z dodatkom (-)- α -pinena se je MIK približno polovice odpornih sevov (46 %) zmanjšal tako, da v prisotnosti (-)- α -pinena ne spadajo več med odporne seve.

4.3 TEST KOPIČENJA ETIDIJEVEGA BROMIDA

S testom kopičenja etidijevega bromida v bakterijskih celicah smo spremljali vpliv (-)- α -pinena in inhibitorjev izlivnih črpalk na bakterijske izlivne črpalke. *C. jejuni* etidijev bromid aktivno izčrpa iz celic z različnimi izlivnimi črpalkami. Čim manjša je aktivnost izlivnih črpalk, tem več etidijevega bromida se bo nabiralo v celici. V celicah vezan etidijev bromid smo spremljali z merjenjem fluorescence.

4.3.1 Test kopičenja etidijevega bromida v *C. jejuni* NCTC11168 pod vplivom dveh različnih koncentracij (-)- α -pinena in dveh znanih inhibitorjev izlivnih črpalk, reserpina in CCCP

S testom kopičenja etidijevega bromida smo spremljali vpliv (-)- α -pinena v treh različnih subinhibitornih koncentracijah (62,5 mg/L, 125 mg/L in 250 mg/L) ter dveh znanih inhibitorjev izlivnih črpalk, reserpina in CCCP. Rezultati testa so prikazani na sliki 9.

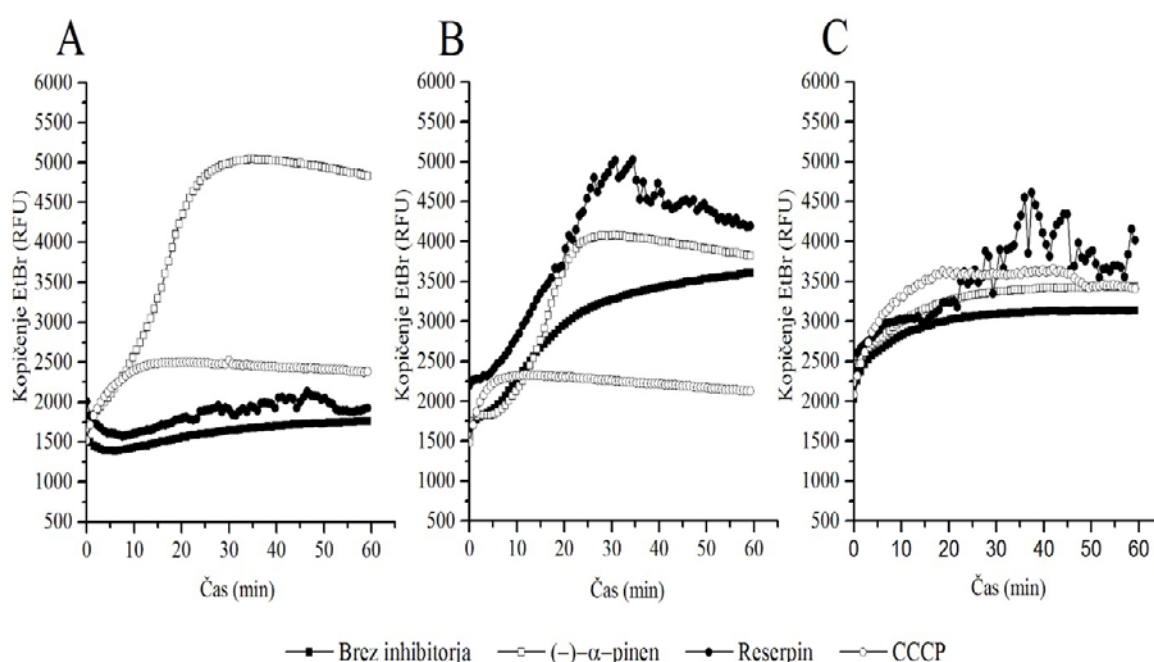


Slika 9: Kopičenje etidijevega bromida v celicah *C. jejuni* NCTC11168 brez obdelave kulture, z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L, 125 mg/L in 250 mg/L, reserpina v koncentraciji 100 mg/L in CCCP v koncentraciji 10 mg/L ter prikaz bazne fluorescence etidijevega bromida brez bakterijske kulture

Etidijev bromid v gojišču oddaja nekaj lastne fluorescence, vendar je ta v primerjavi z vezanim barvilom zanemarljiva. Fluorescenčni signal se s časom le malo spreminja. Pri kulturi, ki ji nismo dodali inhibitorjev, vidimo enakomerno rast signala oz. kopičenje barvila. Reserpin in CCCP sta povzročila povečano kopičenje barvila, vendar ne v tolikšni meri kot (-)- α -pinen. (-)- α -pinen je pri nižji koncentraciji povzročil večje kopičenje etidijevega bromida in je pri vseh treh koncentracijah pokazal večji vpliv na bakterijske izlivne črpalke kot znana inhibitorja reserpin in CCCP.

4.3.2 Test kopičenja etidijevega bromida v *C. jejuni* NCTC11168 in mutantama 11168 Δ *cmeB* in 11168 Δ *cj1687*

Delovanje (-)- α -pinena v koncentraciji 62,5 mg/L smo testirali na *C. jejuni* NCTC11168, mutanti z izbrisom v genu *cmeB* in mutanti z izbrisom v genu *cj1687*. Gen *cmeB* kodira protein CmeB, ki je potreben za pravilno sestavljanje izlivne črpalke CmeABC, gen *cj1687* pa domnevno izlivno črpalko. Bakterije s svojimi izlivnimi črpalkami izčrpavajo etidijev bromid, saj je prevelika količina te snovi v celici toksična. Rezultati testa so prikazani na sliki 10.



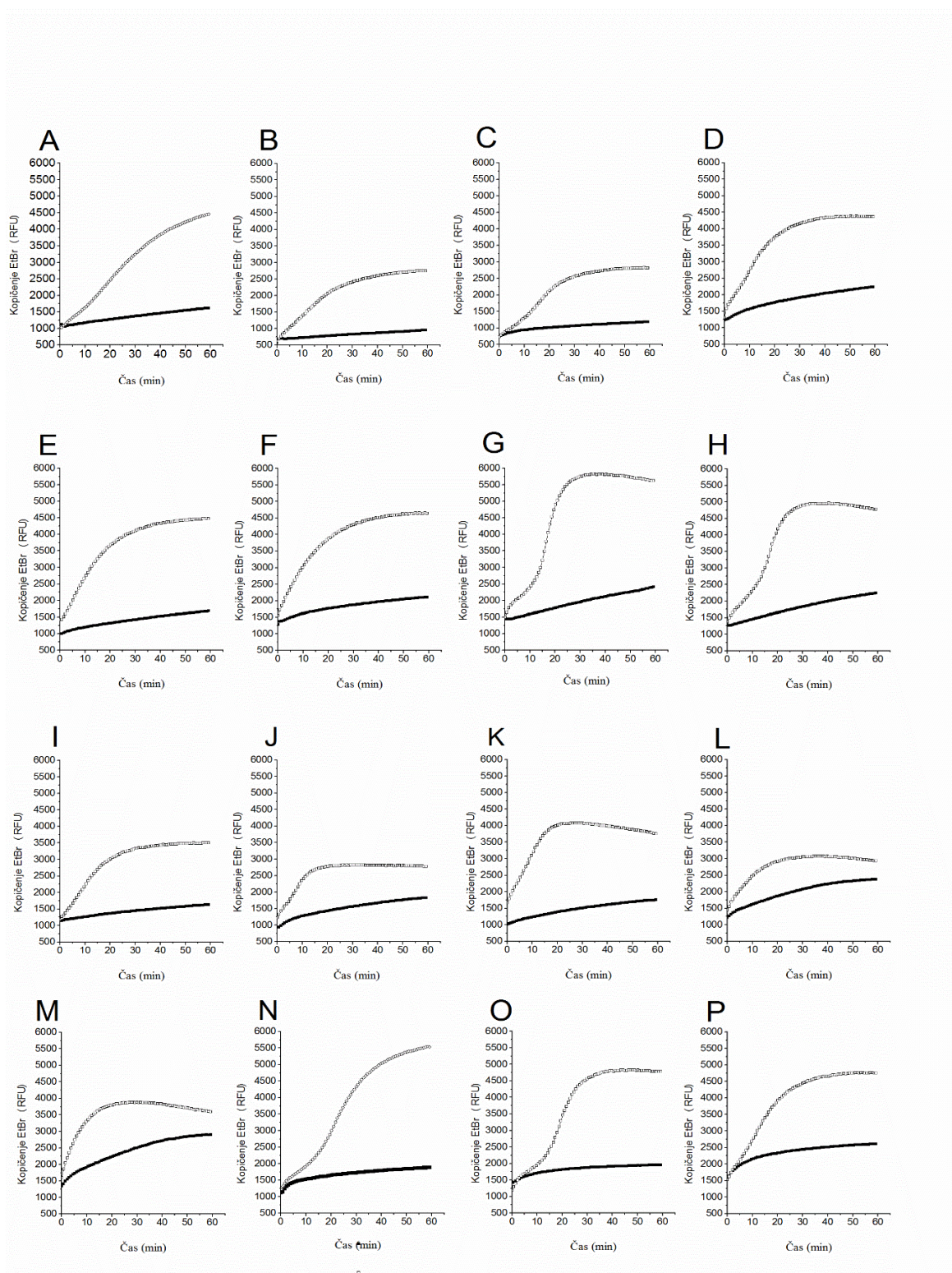
Slika 10: Spremljanje kopičenja etidijevega bromida (EtBr), prikazano v relativnih fluorescenčnih enotah (RFU) v celicah *C. jejuni* NCTC11168 (A), 11168 Δ *cmeB* (B) in 11168 Δ *cj1687* (C) v prisotnosti (-)- α -pinena (62,5 mg/L), reserpina (100 mg/L), CCCP (10 mg/L) in brez inhibitorja.

Pri sevu NCTC11168 vidimo znatno povečanje kopičenja etidijevega bromida v primerjavi s celicami, h katerim ni bil dodan inhibitor izlivnih črpalk. (-)- α -pinen je povzročil večje kopičenje etidijevega bromida kot znana zaviralca reserpin in CCCP. Pri mutanti 11168 Δ *cmeB* vidimo znatno povečanje akumulacije etidijevega bromida po 1 uri v celicah, h katerim ni bil dodan zaviralec izlivnih črpalk. V primerjavi z osnovno kulturo (brez zaviralcev) (-)- α -pinen ne povzroča znatno večjega kopičenja etidijevega bromida. Najboljše delovanje je imel reserpin, ki je povzročil največje kopičenje barvila v celicah. Povečano kopičenje barvila v celicah osnovne kulture kaže na zelo šibko izčrpavanje etidijevega bromida iz celic oz. na šibko delovanje ostalih izlivnih črpalk pri izčrpavanju barvila. Pri mutanti 11168 Δ *cj1687* imata reserpin, CCCP in (-)- α -pinen zelo podobno

delovanje. Noben izmed zaviralcev izlivnih črpalk ni povzročil znatnega kopičenja barvila v celicah. Najboljše je deloval reserpin. V osnovni kulturi 11168 Δ *cj1687* se je v primerjavi z divjim sevom NCTC11168 nakopičilo več etidijevega bromida.

4.3.3 Test kopičenja etidijevega bromida na večjem številu sevov

Na 16 sevih smo preverili ali ima (-)- α -pinen enako vpliva na različne seve. Spremljali smo kopičenje etidijevega bromida v prisotnosti (-)- α -pinena (62,5 mg/L) in brez dodanega inhibitorja. S testiranjem večjega števila sevov lahko vidimo, da (-)- α -pinen ne vpliva le na en sev *C. jejuni*, ampak na različne seve. Med testiranimi sevi je tudi mutanta z izbrisom v genu *cmeF*. S testiranjem te mutante smo želeli ugotoviti ali (-)- α -pinen vpliva tudi na črpalko CmeDEF. Rezultati testiranja so vidni na sliki 11. Na sliki lahko vidimo, da je (-)- α -pinen pri koncentraciji 62,5 mg/L povzročil znatno kopičenje etidijevega bromida v celicah vseh testiranih sevov *C. jejuni*. Kopičenje etidijevega bromida se pri mutanti 11168 Δ *cmeF* v primerjavi z ostalimi sevi ni znatno razlikovalo.



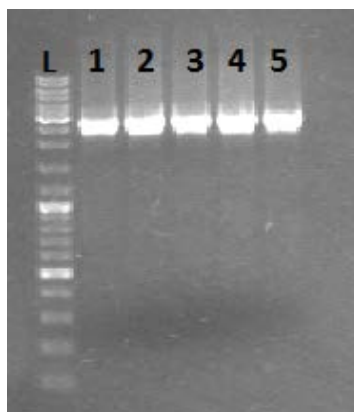
Slika 11: Kopičenje etidijevega bromida (EtBr) brez inhibitorja (■) in z dodatkom (–) α -pinena (62,5 mg/L) (○) testirano na sevih *C. jejuni* 375/06 (A), 1190/09 (B), 1518/08 (C), 573/03 (D), C2 (E), 9090 (F), 53124 (G), 57360 (H), 58429 (I), 60089 (J), 660/08 (K), C33 (L), 816 (M), K49/4 (N), 33560 (O) in 11168 Δ cmeF (P)

4.4 PRIPRAVA MUTANTE Z IZBRISOM V GENU *cmeG* IN TESTIRANJE VPLIVA (-)- α -PINENA NANJO

Preverjali smo vpliv (-)- α -pinena na sev z izbrisom v genu *cmeG*. Gen *cmeG* kodira protein CmeG, ki je sestavni del izlivne črpalke CmeGH, in vpliva na odpornost bakterij proti fluorokinolonom in drugim antibiotikom. Da bi preverili, ali (-)- α -pinen vpliva na delovanje črpalke CmeGH, smo ustvarili mutiran sev z izbrisom v genu *cmeG* in vstavljenim selekcijskim markerjem, kanamicinsko kaseto *aphA3*.

4.4.1 Potrditev vstavljenega fragmenta s PCR reakcijo

Po naravni transformaciji bakterij *C. jejuni* NCTC11168 s plazmidom, ki vsebuje fragment z genom *cmeG* z vstavljeno kanamicinsko kaseto, je na selekcijskem gojišču zrastle nekaj klonov. Te klone smo naprej precepili na selektivno gojišče in iz njih izolirali DNA, ter s PCR reakcijo preverili ali so prisotni fragmenti prave velikosti.



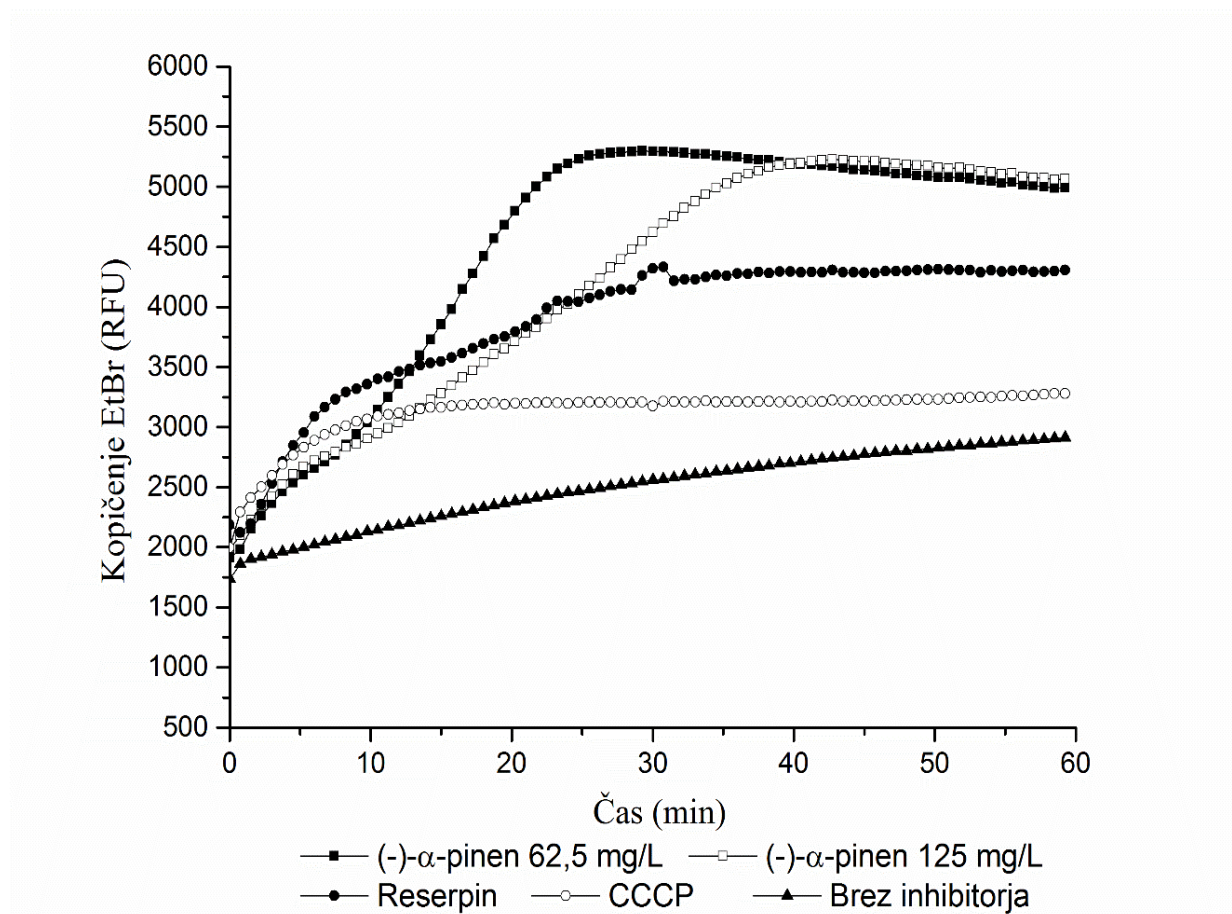
Slika 12: Preverjanje prisotnosti fragmenta *cmeG::aphA3* velikosti približno 2,7 kbp v klonih 1, 2, 3, 4 in 5 z gelsko elektroforezo po reakciji PCR.

Na selekcijskem gojišču (30 mg/L kanamicina) je zrastle 5 klonov, iz katerih smo izolirali DNK. Velikost pomnoženih fragmentov smo primerjali z DNA lestvico (L) in potrdili vstavev fragmentov velikosti 2,7 kbp v DNA izoliranih klonov. Vstavljen fragment smo potrdili pri vseh klonih, kar je razvidno iz slike 12.

4.4.2 Test kopičenja etidijevega bromida pri 11168 Δ *cmeG*

Vpliv (-)- α -pinena na izlivne črpalke CmeGH smo preverili s spremljanjem kopičenja etidijevega bromida pri sevu z izbrisom v genu *cmeG*. Test kopičenja barvila smo izvedli z in brez dodatka inhibitorjev, z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L in 125 mg/L, reserpina in CCCP. Kopičenje smo spremljali 60 minut in rezultat izrazili v

relativnih fluorescenčnih enotah (*angl. relative fluorescence units - RFU*). Rezultati so prikazani na sliki 13.



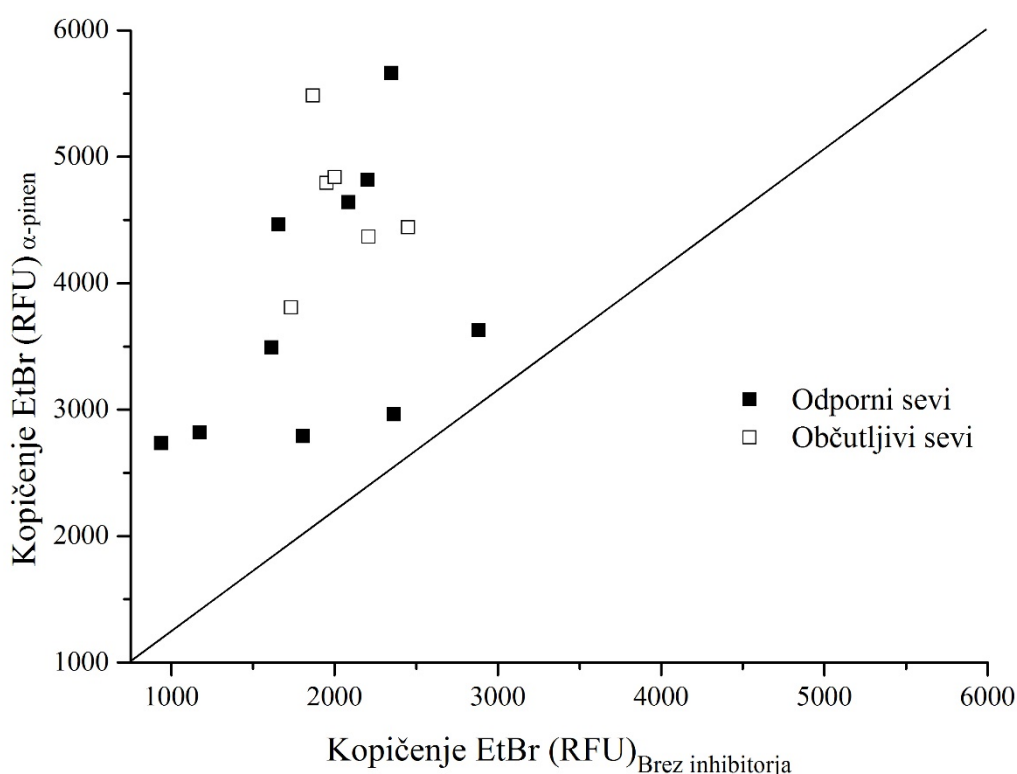
Slika 13: Kopičenje etidijevega bromida v *C. jejuni* 11168 Δ cmeG brez inhibitorja, z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L in 125 mg/L, reserpina (100 mg/L) in CCCP (10 mg/L)

Pri osnovni kulturi brez inhibitorjev vidimo povečanje kopičenja barvila po času, vendar je manjše od kopičenja barvila pri celicah pod vplivom inhibitorjev. Reserpin povzroča večje kopičenje barvila kot CCCP, (-)- α -pinen pa deluje boljše od obeh. Pri nižji koncentraciji (-)- α -pinena vidimo hitrejšo kopičenje barvila kot pri nižji koncentraciji, ampak se po 60 minutah količina nakopičenega etidijevega bromida v celicah izenači.

4.5 PRIMERJAVA KOPIČENJA ETIDIJEVEGA BROMIDA V OSNOVNI KULTURI BREZ DODANIH INHIBITORJEV IN V KULTURI Z DODATKOM (-)- α -PINENA PRI ODPORNIH IN OBČUTLJIVIH SEVIH

Pred vplivi antibiotikov se bakterije *C. jejuni* pogosto zavarujejo s kombinacijo več mehanizmov odpornosti. Eden izmed teh mehanizmov je prekomerno izražanje izlivnih črpalk. Inhibitorji izlivnih črpalk omejujejo delovanje teh črpalk in tako onemogočijo

izčrpavanje protimikrobnih sredstev iz celic. Da bi preverili, ali (-)- α -pinen deluje na izlivne črpalke odpornih sevov tako kot na črpalke občutljivih sevov, smo primerjali stopnjo kopičenja etidijevega bromida pri obeh tipih sevov. Rezultati so prikazani na sliki 14.

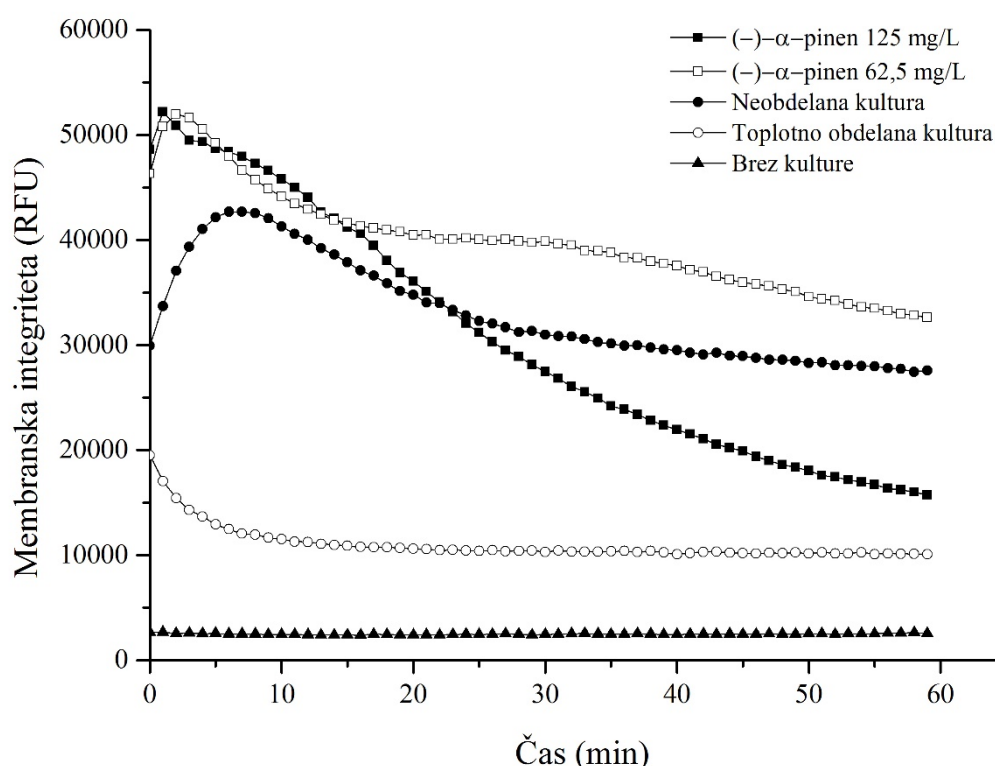


Slika 14: Primerjava kopičenja etidijevega bromida (EtBr) brez dodatka inhibitorja in z dodatkom (-)- α -pinena (62,5 mg/L) pri sevih, občutljivih na antibiotike in sevih, odpornih proti antibiotikom

(-)- α -pinen tako pri občutljivih sevih kot tudi pri odpornih sevih povzroči znatno povečanje kopičenja etidijevega bromida v celicah. Nekaj več je odpornih sevov, pri katerih se vidi manjše razlike v kopičenju barvila v celicah z in brez (-)- α -pinena, vendar je rezultat pri večini sevov, odpornih in občutljivih, podoben.

4.6 DOLOČANJE VPLIVA (-)- α -PINENA NA CELIČNO MEMBRANO *C. jejuni* NCTC11168

Delovanje antibiotikov je lahko zmanjšano zaradi slabšega prenosa protimikrobne snovi skozi celično membrano. Bakterijska celična membrana je tarča mnogih sintetičnih in naravnih spojin. Vpliv (-)- α -pinena na celično membrano *C. jejuni* NCTC11168 smo preverili z uporabo kita LIVR/DEAD BacLight kompleta. Merili smo fluorescenco, ki jo oddajata barvila iz kompleta in rezultate prikazali na sliki 15.



Slika 15: Test integritete celične membrane *C. jejuni* NCTC11168 pri neobdelani bakterijski kulturi, s toplotno obdelani kulturi in pri kulturah z dodatkom (-)- α -pinena v koncentracijah 62,5 mg/L in 125 mg/L

Mešanica barvil iz kompleta sama oddaja nekaj fluorescence, vendar je ta konstantna in ni moteča za ostale meritve. Toplotna obdelava bakterijske kulture nam je služila kot kontrola, saj smo s toplotno obdelavo razbili celično membrano. Fluorescenčni signal je pri toplotno obdelani kulturi nizek. Pri neobdelani kulturi signal na začetku narašča, po 10 minutah malo upade in se po tem ustali. Ostale signale smo primerjali s signalom neobdelane kulture z nepoškodovano celično steno. Po dodatku (-)- α -pinena v koncentraciji 125 mg/L vidimo upad signala. Končni signal je nižji od signala neobdelane kulture za 39 %. Ti rezultati kažejo na to, da (-)- α -pinen pri tej koncentraciji vpliva na integriteto celične membrane, saj povzroči boljšo penetracijo barvila, ki sicer ne prehaja skozi nepoškodovano membrano. Delovanje (-)- α -pinena na celično membrano se, pri koncentraciji 125 mg/L, močno razlikuje od delovanja (-)- α -pinena pri koncentraciji 62,5 mg/L. Pri nižji koncentraciji (-)- α -pinena se signal ustali nad signalom neobdelane kulture.

5 RAZPRAVA

5.1 PROTIMIKROBNO IN MODULATORNO DELOVANJE (-)- α -PINENA

V tradicionalni medicini se rastline pogosto uporabljajo za zdravljenje ali lajšanje simptomov različnih bolezni in vnetij (Rozza in Pellizzon, 2013; Yeruva in sod., 2010; Violante in sod., 2012; da Silva in sod., 2012). Mnogi rastlinski izvlečki in eterična olja, katerih sestavni del je med drugimi tudi α -pinen, kažejo protimikrobno in, v kombinaciji z drugimi protimikrobnimi spojinami, odpornostno-modulatorno delovanje. Učinkovitost rastlin se pogosto pripisuje delovanju monoterpenov in fenolnih spojin v njihovih ekstraktih (Archana in sod., 2011; Saddiq in Khayat, 2010; Kovač in sod., 2014). Sestavine rastlinskih ekstraktov so v *in vitro* pogojih pokazale dobro protimikrobno delovanje proti bakterijam *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* ter glivi *Candida albicans* (Gupta in sod., 2011). Eterično olje rastline *Alpinia katsumadai*, katerega sestavni del je α -pinen, je pokazal protimikrobno delovanje proti *C. jejuni*, *S. aureus* in *Mycobacterium smegmatis* (Kovač in sod., 2014; Groblacher in sod., 2014). Pri preučevanju učinkovitosti α -pinena so da Silva in sod. (2012) pokazali protimikrobno in modulatorno delovanje (+)- α -pinena proti *S. aureus* in *C. albicans* vendar tega niso uspeli dokazati pri (-)- α -pinenu (da Silva in sod., 2012). Objave o delovanju α -pinena, izoliranega iz rastlinskih ekstraktov, se pogosto razlikujejo. Ker se α -pinen v naravi nahaja kot mešanica (-)- α -pinena in (+)- α -pinena, lahko razmerje teh dveh enantiomer vpliva na učinkovitost protimikrobnega delovanja rastline.

V naši raziskavi smo ugotovili zelo šibko protimikrobno delovanje (-)- α -pinena na bakterije *C. jejuni*, saj je MIK pri večini sevov znašal 1000 mg/L ali več. Pri nekaterih sevih nismo dokazali šibkega protimikrobnega učinka, saj je MIK znašala več kot 2000 mg/L. Le pri nekaj sevih (7 od 74) je MIK znašal 500 mg/L, vendar je tudi to zelo visoka koncentracija za domnevno protimikrobno spojino.

MIK (-)- α -pinena smo preverjali na nekaj mutantih *C. jejuni*. Prejšnje raziskave so pokazale spremembo v izražanju določenih genov *C. jejuni* v prisotnosti (-)- α -pinena, med katerimi so tudi tisti, ki kodirajo izlivni črpalki CmeABC in Cj1687, ki prispevata k odpornosti *C. jejuni*, porin Omp50, ki vpliva na prepustnost zunanje membrane in geni, ki sodelujejo pri odzivu na toplotni šok (Kovač in sod., 2015; Corcionvoschi in sod., 2013; Gibreel in sod., 2007). Testirali smo seve z izbrisom v genih za izlivni črpalki CmeABC in Cj1687 (11168 Δ cmeB in 11168 Δ cj1687), seve z izbrisom v genih regulatorjev stresnega odziva na toplotni šok (11168 Δ hspR in 11168 Δ hrcA) in sev z izbrisom v genu za porin celične membrane Omp50 (11168 Δ omp50). Izražanje slednjega je prav tako odvisno od temperature spremembe (Dedieu in sod., 2008; Holmes in sod., 2010; Corcionvoschi in

sod., 2013). Pri testiranju mutant smo ugotovili, da se MIK le teh ne razlikuje od MIK divjega seva.

Za razliko od protimikrobnega delovanja smo pri (-)- α -pinenu opazili dobro odpornostno-modulatorno delovanje v kombinaciji z antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin ter protimikrobnima spojinama triklosan in etidijev bromid. (-)- α -pinen smo v kombinaciji z vsemi 4 spojinami testirali pri 9 sevih in 2 mutantah. Rezultat smo podali kot modulatorski faktor (MF) oz. sposobnost (-)- α -pinena, da zmanjša MIK v kombinaciji s protimikrobnimi spojinami. Pri sevu NCTC11168 je imel (-)- α -pinen v koncentraciji 62,5 mg/L zelo šibek učinek. V kombinaciji s ciprofloksacinom, eritromicinom in triklosanom se je MIK zmanjšala le za faktor 2, v kombinaciji z etidijevim bromidom pa se MIK ni spremenil. Pri višji koncentraciji (-)- α -pinena (125 mg/L) smo v kombinaciji s protimikrobnimi spojinami pri sevu NCTC11168 videli večje spremembe v MIK (MF>32). Odločili smo se, da bomo odpornostno-modulatorno delovanje (-)- α -pinena testirali na več sevih pri višji koncentraciji, saj ta še ne inhibira bakterijske rasti. Od 9 testiranih sevov je imel (-)- α -pinen dober odpornostno-modulatorni učinek pri večini. Le pri 3 sevih smo videli šibko odpornostno-modulatorno delovanje. Delovanje (-)- α -pinena na mutanto *C. jejuni* 11168 Δ cmeB in 11168 Δ cj1687 se ni znatno razlikovalo od delovanja spojine na divji sev. Na večjem številu sevov (56) smo (-)- α -pinen testirali le v kombinaciji z antibiotikoma ciprofloksacinom in eritromicinom, saj sta prav ta dva antibiotika najpomembnejša pri zdravljenju kampilobakterioz. (-)- α -pinen je v kombinaciji z antibiotikoma pri več kot polovici testiranih sevov znatno zmanjšal MIK (MF>8). Pri teh je povzročil zmanjšanje MIK pri več kot polovici odpornih sevov, do te mere, da ti po navodilih EUCAST niso več spadali med odporne seve. (-)- α -pinen v koncentraciji 125 mg/L od 56 sevov ni vplival na MIK le pri 5 sevih. V *in vitro* pogojih se je (-)- α -pinen pokazal kot učinkovit modulator odpornosti pri *C. jejuni*.

5.2 (-)- α -PINEN - INHIBITOR BAKTERIJSKIH IZLIVNIH ČRPALK

Bakterije uporabljajo različne mehanizme za zmanjševanje občutljivosti na delovanje antibiotikov in eden izmed teh je izčrpavanje protimikrobnih spojin iz celice z izlivnimi črpalkami (Tavares in sod., 2013). Bakterijske izlivne črpalke so tarča rastlinskih izvlečkov rastlin *Alpinia katsumadai*, *Aframomum melegueta* in drugih (Gallucci in sod., 2009; Kovač in sod., 2014; Shiu in sod., 2013; Groblacher in sod., 2013). Pri bakteriji *Mycobacterium smegmatis* rastlinski izvlečki, ki vsebujejo α -pinen, delujejo kot potencialni zaviralci izlivnih črpalk in tako povzročajo povečano kopičenje etidijevega bromida v celicah (Groblacher in sod., 2012). Pri bakteriji *S. aureus* rastlinski izvlečki povzročajo povečano izražanje gena za izlivno črpalko NorA in inhibicijo efluksa barvil iz celic (Shiu in sod., 2013). Tudi pri bakteriji *C. jejuni* so rastlinski izvlečki, ki vsebujejo α -pinen, povzročili povečano kopičenje etidijevega bromida v celicah (Kovač in sod., 2014).

C. jejuni ima več različnih izlivnih črpalk, ki vplivajo na odpornost bakterije proti antibiotikom in škodljivim vplivom drugih snovi. Največji vpliv na odpornost ima črpalka CmeABC, vendar tudi druge izlivne črpalke, kot so CmeDEF, CmeGH in Cj1687, v manjši meri prispevajo k odpornosti bakterije.

S testom kopičenja etidijevega bromida smo v naši raziskavi ugotovili, da (-)- α -pinen vpliva na izlivne črpalke *C. jejuni*, saj v primerjavi z znanimi zaviralci izlivnih črpalk (reserpinom in CCCP-jem), povzroči večje kopičenje etidijevega bromida v celicah. V subinhibitorni koncentraciji povzroči (-)- α -pinen kopičenje etidijevega bromida pri občutljivih in odpornih sevih. Zelo učinkovito kopičenje etidijevega bromida v celicah povzroči (-)- α -pinen že v koncentraciji 62,5 mg/L. Večje koncentracije (-)- α -pinena (125 mg/L in 250 mg/L) povzročijo manjše kopičenje etidijevega bromida v celicah, kar kaže na prisotnost drugih mehanizmov (-)- α -pinena, ki vplivajo na kopičenje barvila znotraj bakterijskih celic.

S testiranjem kopičenja etidijevega bromida pri sevih z izbrisom v genih, ki kodirajo izlivne črpalke smo ugotovili, da ima (-)- α -pinen največji vpliv na črpalke CmeABC in Cj1687. (-)- α -pinen je povzročil manjše povečanje koncentracije etidijevega bromida v sevih 11168 Δ cmeB in 11168 Δ cj1687, kar kaže na to, da sta ti dve izlivni črpalke tarči (-)- α -pinena. Pri mutanti 11168 Δ cmeB ima reserpin največji vpliv na kopičenje etidijevega bromida v celicah, kar kaže na povečano izražanje drugih izlivnih črpalk, ki so tarče reserpina, v odsotnosti črpalke CmeABC. Kopičenje etidijevega bromida v mutantah z izbrisom v genih *cmeF* in *cmeG* se ni znatno razlikovalo od kopičenja etidijevega bromida v divjem sevu.

5.3 VPLIV (-)- α -PINENA NA PREPUSTNOST CELIČNE MEMBRANE

Protimikrobno delovanje monoterpenov je pogosto povezano z njihovo lipofilno naravo. Njihov vpliv na bakterije je lahko odvisen od lipidne sestave in naboja bakterijske celične membrane, vendar pa je vsem skupno povečanje prepustnosti celične membrane (Trombetta in sod., 2005). Tako kot drugi monoterpeni, tudi (-)- α -pinen vpliva na integriteto celične membrane. V naši raziskavi smo videli znatno poslabšanje integritete celične membrane pri *C. jejuni* NCTC11168 po dodatku (-)- α -pinena v koncentraciji 125 mg/L. Pri nižji koncentraciji (62,5 mg/L) je imel (-)- α -pinen obraten učinek na celično membrano *C. jejuni*. Takšen vpliv (-)- α -pinena je najverjetnejši razlog za slabše odpornostno-modulatorno delovanje spojine pri tej koncentraciji v primerjavi z višjo koncentracijo.

Monoterpeni imajo lahko citotoksično delovanje, zato je njihova uporaba v medicini omejena. α -pinen kaže citotoksičen učinek (IC₅₀) na HeLa celični liniji v koncentraciji

337,5 mg/L in Cos7 v koncentraciji 357,9 mg/L (Herrmann in Wink, 2011). Citotoksične koncentracije α -pinena so višje od učinkovite odpornostno-modulatorne koncentracije, ki smo jo uporabili pri naših testih. Pri študiju učinka α -pinena na človeško zdravje sta Turkez in Aydin (2016) pokazala, da α -pinen v koncentracijah, manjših od 200 mg/L ne kaže citotoksičnega učinka na človeške krvne celice, Schmidt in Goen (2015) pa sta pokazala, da človek lahko zaužije vsaj 10 mg α -pinena brez vidnega vpliva na njegovo zdravje (Turkez in Aydin, 2016; Schmidt in Goen, 2015).

V naši raziskavi smo potrdili učinkovito odpornostno-modulatorno delovanje (-)- α -pinena na odpornost bakterije *C. jejuni* proti antibiotikom. Mehanizmi delovanja (-)- α -pinena zajemajo 2 različna mehanizma, in sicer zaviranje delovanja izlivnih črpalk in porušenje membranske integritete. (-)- α -pinen pri nižji koncentraciji učinkovito zavira delovanje izlivnih črpalk, glavni tarči pa sta izlivna črpalka CmeABC in domnevna izlivna črpalka Cj1687. Tarča delovanja (-)- α -pinena je poleg izlivnih črpalk tudi bakterijska celična membrana. Pri višji koncentraciji, kjer smo opazili odpornostno-modulatorni učinek, (-)- α -pinen povzroča porušenje integritete celične membrane.

Zaradi učinkovitega odpornostno-modulatornega delovanja in relativne varnosti ter mogočega pozitivnega učinka na človeško zdravje ima (-)- α -pinen dober potencial za nadaljnje raziskave in razvoj v zdravilo s širokim spektrom delovanja. (-)- α -pinen je poleg zdravstva lahko uporaben za omejevanje večkratno odpornih bakterij tudi v živilski industriji, pri obdelavi in konzerviranju živil ter živinoreji s potencialno pozitivnim učinkom na zdravje živali. Spekter uporabnosti (-)- α -pinena je potencialno zelo širok in je zato nadaljnja raziskava te spojine zelo pomembna.

6 SKLEPI

- Z našo raziskavo smo pokazali, da ima (-)- α -pinen zelo šibko protimikrobno delovanje na *C. jejuni* z minimalnimi inhibitornimi koncentracijami več kot 1000 mg/L pri večini testiranih sevov. Rezultate smo potrdili na 74 sevih in 6 mutantah.
- Za razliko od protimikrobnega delovanja ima (-)- α -pinen odpornostno modulatorni učinek na sev *C. jejuni* NCTC11168 pri koncentraciji 125 mg/L. Pri nižji koncentraciji ima (-)- α -pinen zelo šibek odpornostno-modulatorni učinek. Rezultate smo potrdili na 64 sevih iz različnih izvorov in z različnimi odpornostnimi profili.
- S testiranjem kopičenja etidijevega bromida v bakterijskih celicah v prisotnosti (-)- α -pinena in dveh znanih inhibitorjev izlivnih črpalk, reserpina in CCCP, smo pokazali, da (-)- α -pinen deluje kot zaviralec bakterijskih izlivnih črpalk. Pri vseh testiranih sevih ima (-)- α -pinen večji vpliv na kopičenje etidijevega bromida v celicah kot znana zaviralca izlivnih črpalk reserpin in CCCP.
- (-)- α -pinen povzroča kopičenje etidijevega bromida pri sevih, odpornih proti antibiotikom in pri sevih, občutljivih na antibiotike.
- Tarči (-)- α -pinena sta izlivna črpalka CmeABC in domnevna izlivna črpalka Cj1687, kar smo ugotovili s testiranjem kopičenja etidijevega bromida v celicah mutant 11168 Δ cmeB in 11168 Δ cj1687. (-)- α -pinen je pri teh mutantih povzročil neznatno kopičenje etidijevega bromida v celicah. Vpliv (-)- α -pinena je pri teh mutantih slabši od vpliva reserpina in CCCP.
- Čeprav smo ugotovili, da so tarče (-)- α -pinena izlivne črpalke *C. jejuni*, pa tega nismo potrdili pri mutantih 11168 Δ cmeF in 11168 Δ cmeG, saj se kopičenje pri teh ni razlikovalo od kopičenja etidijevega bromida pri divjem sevu. (-)- α -pinen ne vpliva na delovanje izlivnih črpalk CmeDEF in CmeGH.
- (-)- α -pinen v subinhibitorni koncentraciji, pri kateri kaže odpornostno-modulatorno delovanje, vpliva tudi na integriteto bakterijske celične membrane. Pri koncentraciji 125 mg/L (-)- α -pinen povzroči povečano prepustnost celične membrane, vendar pa tega nismo opazili pri nižji koncentraciji. Delovanje (-)- α -pinena na celično membrano je pri nižji koncentraciji obratno od tistega pri višji koncentraciji, kar je lahko razlog za šibko odpornostno-modulatorno učinkovitost (-)- α -pinena, kljub zaviranju izlivnih črpalk pri nižji koncentraciji.

7 POVZETEK

Odpornost bakterij *C. jejuni* z vsakim letom narašča, kar je posledica zelo pogoste in nepravilne rabe antibiotikov v zdravstvu in živiloreji. Ukrepi za omejevanje okužb in širjenja odpornih sevov so številni, vendar pogosto ne kažejo takšne učinkovitosti kot bi si želeli. Zato smo se odločili preiskati učinek naravne spojine, ki jo lahko najdemo v mnogih rastlinah, to je (-)- α -pinen. Nahaja se v mnogih zdravilnih rastlinah in je s strani FDA odobren za človeško rabo. V naši raziskavi smo ugotovili šibek protimikrobni učinek (-)- α -pinena. MIK pri večini testiranih sevov je bila 1000 mg/L ali več. Za razliko od slabega protimikrobnega učinka pa smo dokazali, da ima (-)- α -pinen odpornostno-modulatorni učinek. Pri koncentraciji 125 mg/L je (-)- α -pinen povzročil znatno zmanjšanje MIK v kombinaciji s protimikrobnimi spojinami ciprofloksacinom, eritromicinom, triklosanom in etidijevim bromidom pri večini testiranih sevov. Na večjem številu sevov smo se odločili testirati (-)- α -pinen le v kombinaciji s ciprofloksacinom in eritromicinom, saj sta ta dva antibiotika pomembna pri zdravljenju okužb s *C. jejuni*. Prav tako je imel (-)- α -pinen dober odpornostno-modulatorni učinek pri večini testiranih sevov. S testiranjem kopičenja etidijevega bromida v celicah *C. jejuni* smo ugotovili, da (-)- α -pinen deluje kot zaviralec bakterijskih izlivnih črpalk. S testiranjem kopičenja etidijevega bromida pri mutantih 11168 Δ cmeB in 11168 Δ cj1687 smo ugotovili, da sta tarči (-)- α -pinena črpalka CmeABC in domnevna črpalka Cj1687, ki prispevata k odpornosti *C. jejuni* proti antibiotikom. (-)- α -pinen je povzročil kopičenje etidijevega bromida v vseh testiranih sevih pri koncentraciji 62,5 mg/L, kjer ima (-)- α -pinen šibek odpornostno-modulatorni učinek. Pri višji koncentraciji je (-)- α -pinen povzročil zmanjšanje integritete celične stene *C. jejuni* NCTC11168. Naše ugotovitve kažejo na to, da (-)- α -pinen deluje na odpornost bakterij z vsaj dvema mehanizmoma, in sicer z inhibicijo izlivnih črpalk in posledično zmanjšanjem izčrpavanja protimikrobnih spojin iz celic in s povečanjem prepustnosti celične stene in s tem olajšanjem vstopa protimikrobnih spojin v celico.

8 VIRI

- Abcam[®]. 2015. Live and dead dell Assay (ab115347). Cambridge, Abcam[®]: 1 str.
<http://www.abcam.com/live-and-dead-cell-assay-ab115347.html> (20. dec. 2015)
- Aeschbacher M., Reinhardt C.A., Zbinden G. 1986. A rapid membrane permeability test fluorescent dyes and flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 2, 2: 247-255
- 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, 1: 52-60
- Akray H.F.S., Abdullrahman Z.F.A. 2013. Screening *in vitro* and *in vivo* the antibacterial activity of *Rhus coriaria* extract against *S. aureus*. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 15, 3: 390-397
- Albert M.J., Udo E., Jose B.T., Haridas S., Rotimi V.O. 2009. Tetracycline resistance is frequent among *Campylobacter jejuni* isolates from Kuwait. *Microbial Drug Resistance*, 15, 2: 115-120
- Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53: 1565-1574
- Ali A., Tabanca N., Kurkcuglu M., Duran A., Blythe E.K., Khan I.A., Baser H.C. 2015. Chemical composition, larvicidal, and biting deterrent activity of essential oils of two subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales: Asteraceae) and individual constituents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 51, 4: 824-830
- Aminov R.I., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R.I. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1: 22-32
- Andrews R.E., Parks L.W., Spence K.D. 1980. Some effects of douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 2: 301-304
- Archana P.R., Nageshwar R.B., Satish R.B.S. 2011. Modulation of gamma ray-induced genotoxic effect by thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Integrative Cancer Therapies*, 10: 374-383
- Avrain L., Vernozy-Rozand C., Kempf I. 2004. Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1: 134-140
- Barney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H.U., Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 10: 3282-3290
- Behr A., Johnen L. 2009. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. *ChemSusChem*, 2, 12: 1072-1095

- Bentaboulet M., Kepes A. 1977. Counter-transport mediated by the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 471, 1: 125-134
- Bitu V.C., Fecundo H.D., da Costa J.G., Countinho H.D., Rodrigues F.F., de Santana N.M., Botelho M.A., Menezes I.R. 2014. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. *Natural Product Research*, 28, 6: 399-402
- Bolton F.J., Coates D. 1983. A study of the oxygen and carbon dioxide requirements of thermophilic campylobacters. *Journal of Clinical Pathology*, 36, 7: 829-834
- Boulos L., Prevost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD®BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 1: 77-86
- Bouwman L.I., Niewold P., van Putten J.P.M. 2013. Basolateral invasion and trafficking of *Campylobacter jejuni* in polarized epithelial cells. *PLoS One*, 8, 1: e54759, doi:10.1371/journal.pone.0054759: 11 str.
- Brown H.C., Ramachandran P.V. 1992. Asymmetric reduction with chiral organoboranes based on α -pinene. *Accounts of Chemical Research*, 25, 1: 16-24
- Cagliero C., Mouline C., Cloeckert A., Payot S. 2006. Synergy between efflux pump *cmeABC* and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 11: 3893-3896
- Carr J. 2016. Bacteria in photos: *Campylobacter jejuni*. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1 str.
<http://www.bacteriainphotos.com/Campylobacter%20jejuni%20electron%20microscopy.html> (7. Jan. 2016)
- Cavaleiro C., Salgueiro L., Goncalves M.J., Hrimpeng K., Pinto J., Pinto E. 2015. Antifungal activity of the essential oil of *Angelica major* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species. *Journal of Natural Medicines*, 62, 2: 241-248
- Charlier G., Dekeyser P., Florent A., Strobbe R., De Ley J. 1974. DNA base composition and biochemical characters of *Campylobacter* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 1: 145-151
- ChEBI. 2015. α -pinene. Cambridge, The European Bioinformatics Institute: 1 str.
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do;jsessionid=1116151DF4EBBF2915FB3A5A3F966951?chebiId=CHEBI%3A36740> (6. jan. 2016)
- Chen W., Liu Y., Li M., Mao J., Zhang L., Huang R., Jin X., Ye L. 2015. Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 15, 7: 3293-3297

- Chen W.Q., Xu B., Mao J.W., Wei F.X., Li M., Liu T., Jin X.B., Zhang L.R. 2014. Inhibitory effects of α -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 7: 3293-3297
- Choi J.G., Kang O.H., Lee Y.S., Chae H.S., Oh Y.C., Brice O.O., Kim M.S., Sohn D.H., Kim H.S., Park H., Shin D.W., Rho J.R., Kwon D.Y. 2011. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: ID 690518, doi:10.1093/ecam/nep105: 8 str.
- Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232-260
- Coelho-de-Souza A.N., Lahlou S., Barreto J.E., Yum M.E., Oliveira A.C., Oliveira H.D., Caledonio N.R., Feitosa R.G., Duarte G.P., Santos C.F., de Albuquerque A.A., Leal-Cardoso J.H. 2013. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. *Fundamental Clinical Pharmacology*, 27, 3: 288–298
- Corcionvoschi N., Alvarez L.A., Sharp T.H., Strengert M., Alemka A., Manterll J., verkade P., Knaus U.G., Buorke B. 2012. Mucosal reactive oxygen species decrease virulence by disrupting *Campylobacter jejuni* phosphotyrosine signaling. *Cell Host and Microbe*, 12, 1: 47-59
- Corcoran D., Quinn T., Cotter L., Fanning S. 2006. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 40-45
- Costa D.A., de Oliveira G.A., Lima T.C., dos Santos P.S., de Sousa D.P., de Freitas R.M. 2012. Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32: 633–640
- Crim S.M., Griffin P.M., Tauxe R., Marder E.P., Gilliss D., Cronquist A.B., Cartter M., Tobin-D'Angelo M., Blythe D., Smith K., Lathrop S., Zansky S., Cieslak P.R., Dunn J., Holt K.G., Wolpert B., Henao O.L. 2015. Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2006-2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64, 18: 495-499
- Da Rocha M.L., Oliveira L.E., Santos P.C.C., de Sousa D.P., de Almeida R.N., Araujo D.A. 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the monoterpene α , β -epoxy-carvone in mice. *Journal of Natural Medicines*, 67, 4: 743-749
- Da Silva A.C., Lopes P.M., de Azevedo M.M., Costa D.C., Alviano C.S., Alviano D.S. 2012. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17: 6305–6316

- Dasti J.I., Gros U., Pohl S., Lugert R., Weig M., Schmidt-Ott. 2007. Role of the plasmid-encoded *tet(O)* gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 833-837
- Davis L., DiRita V. 2008. Growth and laboratory maintenance of *Campylobacter jejuni*. *Current Protocols in Microbiology*, 10, Unit 8A.1: 8A.1.1-8A.1.7
- De Almeida P.M., Magalhaes R.M., Torres D.M., Cavalcante R.C., Moreira H.P., Lima G.C., da Costa Araujo P.C., Cardoso J.H.L., de Souza A.N.C., Diniz L.R.L. 2015. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. *Pharmacognosy Magazine*, 11, 41: 123-133
- Dedieu L., Pages J.M., Bolla J.M. 2008. The *omp50* gene in transcriptionally controlled by a temperature-dependent mechanisms conserved among thermophilic *Campylobacter* species. *Research in Microbiology*, 159, 4: 270-278
- Diao W.R., Zhang L.L., Feng S.S., Xu J.G. 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Amomum kravanh*. *Journal of Food Protection*, 77, 10: 1740-1746
- BD. 2009. *Campylobacter* agars. V: Difco™ and BBL™ Manual. 2nd ed. Zimbro J.M., Power D.A., Miller S.M., Wilson G.E., Johnson J.A. (eds.). Sparks, Becton, Dickinson and Company: 120-123.
http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcoblmanual_2nded_lowres.pdf
(10. jan. 2016)
- Drawt S.M., Bonomo R.A. 2010. Three Decades of β -Lactame Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 1: 160-201
- ECDC. 2015. Summary of the 2014 data on antibiotic resistance in the European Union - EARS-Net surveillance data. Solna, European Centre for Disease Control: 5 str.
http://www.szu.cz/uploads/EAAD/2015/Resistance_EARS_Net_Summary.pdf
(10. jan. 2016)
- EFSA/ECDC. 2014. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal* 12, 3:3590, doi:10.2903/j.efsa.2014.3590: 336 str.
- EFSA/ECDC. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13, 12: 4329, doi:10.2903/j.efsa.2015.4329: 165 str.
- Epps S.V.R., Harvey R.B., Hume M.E., Phillips T.D., Anderson R.C., Nisbet D.J. 2013. Foodborne *Campylobacter*: Infection, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 6292-6304
- EUCAST. 2015. Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method, Version 5.0. Basel, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 21 str.
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf (6. jan. 2016)

- Eucker T.P., Konkel M.E. 2013. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiology*, 14, 2: 226-238
- EUCAST/ESCMID. 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 8: 9-15
- Fanela T.L., Baldin E.L., Pannuti L.E., Cruz P.L., Crotti A.E., Takeara R., Kato M.J. 2016. Lethal and inhibitory activities of plant-derived essential oil against *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype B in tomato. *Neotropical Entomology*, 45, 2: 201-210
- FDA. 2011. List of indirect additives used in food contact substances. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration: 15 str.
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=ialisting&displayAll=false&page=21> (2. jan. 2016)
- FDA. 2015. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Flavoring agents and related substances. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration: 18 str.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.515> (9. jan. 2016)
- Fernandez L., Hancock R.E.W. 2012. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 4: 661-681
- Fraternali D., Flamini G., Ricci D. 2014. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Angelica archangelica* L. (Apiaceae) roots. *Journal of Medicinal Food*, 17, 9: 1043-1047
- Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygodlo J., Demo M. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavor and Fragrance Journal*, 24, 6: 348-354
- Ghunaim H., Behnke J.M., Aigha I., Sharma A., Doiphode S.H., Deshmukh A., Abu-Madi M.M. 2015. Analysis of resistance to antimicrobials and presence of virulence/stress response genes in *Campylobacter* isolates from patients with severe diarrhea. *PLoS One*, 10, 3: e0119268, doi:10.1371/journal.pone.0119268: 16 str.
- Gibreel A., Sjorgen E., Kaijser B., Wretling B., Skold O. 1998. Rapid emergence of high-level resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* associated with mutational changes in *gyrA* and *parC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 12: 3276-3278
- Gibreel A., Wetsch N.M., Taylor D.E. 2007. Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 9: 3212-3216
- Griggs D.J., Peake L., Johnson M.M., Ghori S., Mott A., Piddock L.J. 2009. B-lactamase-mediated β -lactam resistance in *Campylobacter* species: Prevalence of Cj0233 (*bla*_{OXA}-

- 61) and evidence for a novel β -Lactamase in *C. jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53, 8: 3357-3364
- Grinnage-Pulley T., Zhang Qijing. 2015. Genetic basis and functional consequences of differential expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni* isolates. PLoS One, 10, 7: e0131534, doi:10.1371/journal.pone.0131534: 26 str.
- Groblacher B., Kunert O., Bucar F. 2012. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. Bioorganic and Medical Chemistry, 20, 8: 2701-2706
- Gupta N., Saxena G., Kalra S.S. 2011. Antimicrobial activity pattern of certain terpenoids. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2, 1: 87-91
- Hazeleger W.C., Wouters J.A., Rombouts F.M., Abee T. 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. Applied and Environmental Microbiology, 64, 10: 3917-3922
- Hermans D., Pasmans F., Messens W., Martel A., van Immerseel F., Rasschaert G., Heyndrickx M., Van Deun K., Haesebrouck F. 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 12, 2: 89-98
- Herrera A.G. 2001. *Campylobacter*. V: Food microbiology protocols. Vol. 14. Spencer J.F.T., Ragout de Spencer A.L. (eds.). New Jersey, Human Press: 119-124
- Herrmann F., Wink M. 2011. Synergistic interaction of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. Phytomedicine, 18, 13: 1191-1196
- Him A., Ozbek H., Turel I., Oner A.C. 2008. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. Pharmacology Online, 3: 363-369
- Hofreuter D. 2014. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4:137, doi:10.3389/fcimb.2014.00137: 19 str.
- Holmes C.W., Penn C.W., Lund P.A. 2010. The *hrcA* and *hspR* regulons of *Campylobacter jejuni*. Microbiology, 156: 158-166
- Horn B.J. in Lake R.J. 2013. Incubation period for campylobacteriosis and its importance in the estimation of incidence related to travel. Eurosurveillance, 18, 40: 2062, doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.40.20602: 6 str.
- Huang X., Xiao Y., Köllner T.G., Zhang W., Wu J., Wu J., Wu J., Guo Y., Zhang Y. 2013. Identification and characterization of (E)- β -caryophyllene synthase and α/β -pinene synthase potentially involved in constitutive and herbivore-induced terpene formation in cotton. Plant Physiology and Biochemistry, 73: 302-308
- Jacoby G.A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clinical Infectious Diseases, 41, 2: 120-126
- Jeon B., Wang Y., Hao H., Barton Y.W., Zhang Q. 2011. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66: 79-85
- Jesus N.Z., Falcão H.S., Lima G.R., Caldas Filho M.R., Sales I.R., Gomes I.F., Santos S.G., Tavares J.F., Barbosa.Filho J.M., Batista L.M. 2013. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

- (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 3: 982–988
- Kannan K., Kanabar P., Schyer D., Florin T., Oh E., Bahroos N., Tension T., Weissman J.S., Mankin A.S. 2014. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 111, 45: 15958-15963
- Kassenborg H.D., Smith K.E., Vugia D.J., Rabatsky-Ehr T., Bates M.R., Carter K.E., Dumas N.B., Cassidy M.P., Maranco N., Tauxe R.V., Angulo F.J. 2004. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* infections: eating poultry outside of the home and foreign travel are risk factors. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 3: 279-284
- Kim D.S., Lee H.J., Jeon Y.D., Han Y.H., Kee J.Y., Kim H.J., Shin H.J., Kang J., Lee B.S., Kim S.H., Kim S.J., Park S.H., Choi B.M., Park S.H., Choi B.M., Park S.J., Um J.Y., Hong S.H. 2015. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *American Journal of Chinese Medicine*, 43, 4: 731-742
- Kirby J. in Keasling J.D. 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 335–355
- Klančnik A., Groblacher B., Kovač J., Bucar F., Smole Možina S. 2012. Anti-*Campylobacter* and resistance modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extract. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1249-1262
- Koutsaviti K., Giatropoulos A., Pitarokili D., Parachristos D., Michaelakis A., Tzakou O. 2015. Greek pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114, 2: 583-592
- Kovač J., Gavarić N., Bucar F., Smole Možina S. 2014. Antimicrobial and resistance modulatory activity of *Alpinia katsumadai* seed phenolic extract, essential oil and post-distillation extract. *Food Technology and Biotechnology*, 52, 2: 248-254
- Kovač J., Šimunović K., Wu Z., Klančnik A., Bucar F., Zhang Q., Smole Možina S. 2015. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)- α -pinen in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 10, 4: e0122871, doi: 10.1371/journal.pone.0122871: 14 str.
- Kurinčič M., Klančnik A., Smole Možina S. 2012. Effects of efflux pump inhibitors on erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline resistance in *Campylobacter* spp. isolates. *Microbial Drug Resistance*, 18, 5: 492-501
- Lee C., Lee S., Lee H. 2010. Acaricidal effects of *Thymus vulgaris* leaf-derived materials and monoterpene alcohols against *Dermatophagoides* spp. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53: 170–174
- Leedom Larson K.R., Spickler A.R. 2013. Factsheet: Campylobacteriosis. Ames, The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University, College of Veterinary Medicine: 8 str.
- <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/campylobacteriosis.pdf> (5. jan. 2016)

- Levstek S. 2015. Zavedanje in znanje slovenskih potrošnikov in delavcev v perutninski industriji o mikrobiološkem tveganju pri pripravi piščančjega mesa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 55 str.
- Li W., Atkinson G.C., Thakor N.S., Allas U., Lu C.C., Chan K.Y., Tenson T., Schulten K., Wilson K.S., Hauryliuk V., Frank J. 2013. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications*, 4: 1477, doi:10.1038/ncomms2470: 8 str.
- Lin J., Michel L.O., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 7: 2124-2131
- Loza-Tavera H. 1999. Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 464: 49–62
- Luangtongkum T., Morishita T.Y., Martin L., Choi I., Sahin O., Zhang Q. 2008. Prevalence of tetracycline-resistant *Campylobacter* in organic broilers during a production cycle. *Avian Diseases*, 52, 3: 487-490
- Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, E test and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3: 1062-1068
- Luo N., Sahin O., Lin J., Michel L.O., Zhang Q. 2003. *In vivo* selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1: 390-394
- Ma L., Shen Z., Naren G., Li H., Wu C., Shen J., Zhang Q., Wang Y. 2014. Identification of a Novel G2073A mutation in 23S rRNA in amphenicol selected mutants of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 9, 4: e94503, doi:10.1371/journal.pone.0094503: 7 str.
- Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F. 2010. *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 17, 10: 771-774
- Mamelli L., Amoros J.P., Pages J.M., Bolla J.M. 2003. A phenylalanine-arginine beta-naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Campylobacter* to macrolides. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 3: 237-241
- Mao J.C-H. in Putterman M. 1968. Accumulation in Gram-positive and Gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. *Journal of Bacteriology*, 95, 3: 1111-1117
- Marei G.I., Rasoul M.A.A., Abdelgaleil S.A.M. 2012. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 56–61
- Martin A., Camacho M., Portaels F., Palomino J.C. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid,

- simple and inexpensive methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 11: 3616-3619
- McDermott P.F., Bodies S.M., English L.L., White D.G., Walker R.D., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D. 2002. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 6: 837-844
- McKinney J.M.N., Konkel M.E. 2012. The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 31, doi:10.3389/fcimb.2012.00031: 15 str.
- McMurry L., Petrucci R.E.Jr., Levy S.B. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 7: 3974-3977
- MetaCyc. 2010. MetaCyc compound class: an α -pinene. Menlo Park, SRI International: baza podatkov
<http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=NIL&object=Alpha-pinene&redirect=T>
(9. jan. 2016)
- Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. 1999. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 4: 727-737
- Moiteiro C., Esteves T., Ramalho L., Rojas R., Alvarez S., Zacchino S., Braganca H. 2013. Essential oil characterization of two Azorean *Cryptomeria japonica* populations and their biological evaluations. *Natural Product Communications*, 8, 12: 1785-1790
- Morais-Braga M.F.B., Souza T.M., Santos K.K.A., Andrade J.C., Guedes G.M.M., Tintino S.R., Sobral-Souza C.E., Costa J.G.M., Menezes I.R.A., Saraiva A.A.F., Coutinho H.D.M. 2012. Antimicrobial and modulatory activity of ethanol extract of the leaves from *Lygodium venustum* SW. *American Fern Journal*, 102, 2: 154-160
- Morita Y., Tomida J., Kawamura Y. 2012. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 3: 408, doi: 10.3389/fmicb.2012.00408: 13 str.
- Muraoka W.T., Zhang Q. 2011. Phenotypic and fenotypic evidence for l-fucose utilization by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 193, 5: 1065-1075
- Nachamkin I., Ung H., Li M. 2002. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8, 12: 1501-1503
- Nagano K., Nikaido H. 2009. Kinetic behavior of the major multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 14: 5854-5858
- NIAID. 2015. Health and research topics: Campylobacteriosis. Bethesda, National Institute of Alergy and Infectious Diseases: 1 str.
<https://www.niaid.nih.gov/topics/campylobacteriosis/Pages/default.aspx> (5. jan. 2016)

- NOAH. 2010. The use of fluoroquinolones in animal health. Briefing document No. 18. Enfield, National Office of Animal Health: 1 str.
<http://www.noah.co.uk/issues/briefingdoc/18-fluoroquinolones.htm> (6. jan. 2016)
- Nelson J.M., Chiller T.M., Powers J.H., Angulo F.J. 2007. Fluoroquinolone –resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: A public health success story. *Clinical Infectious Diseases*, 44: 977-980
- Neyfakh A.A., Bidenko V.E., Chen L.B. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 11: 4781-4785
- Noormohamed A., Fakhr M.K. 2013. A higher prevalence rate of *Campylobacter* in retail beef livers compared to other beef and pork meat cuts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 5: 2058-2068
- OIE. 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees): *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. 6th ed. Paris, World Organisation for Animal Health: 1185-1191
<http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> (6. jan. 2016)
- OIE. 2012. Guideline 3.1: Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. 7th ed. Paris, World Organization for Animal Health: 1309-1322
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/GUIDE_3.1_ANTIMICROBIAL.pdf (10. jan. 2016)
- On S. L. W. 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here?. *Journal of Microbiological Methods*, 15, 1: 3-7
- Opperman T.J., Kwasny S.M., Kim H.S., Nguyen S.T., Houseweart C., D'Souza S., Walker G.C., Peet N.P., Nikaido H., Bowlin T.L. 2014. Characterization of a novel pyranoyridine inhibitor of the AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 2: 722-733
- Piddock L.J.V. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 629-636
- Podlogar J.A. in Verspohl E.J. 2012. Antiinflammatory effects of ginger and some of its components in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Phytotherapy Research*, 26, 3: 333-336
- Polo C.M., Moraes T.M., Pellizzon C.H., Marques M.O., Rocha L.R., Hiruma-Lima C.A. 2012. Gastric ulcers in middle-aged rats: The healing effect of essential oil from *Citrus aurantium* L.(Rutaceae) Evidence Based Complementary Alternative Medicine, 2012: ID 509451, doi:10.1155/2012/509451: 3 str.
- Poole K., Krebs K., McNally C., Nashat S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology*, 175, 22: 7363-7372

- Porres-Martinez M., Gonzalez-Burgos E., Carretero M.E., Gomez.Serranillos M.P. 2015. Major selected monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. *Pharmaceutical Biology*, 53, 6: 921-929
- Portner D.C., Leuschner R.G., Murray B.S. 2007. Optimizing the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*, 54, 3: 265-270
- Potturi-Venkata L.P., Backert S., Lastovica A.J., Vieira S.L., Norton R.A., Miller R.S., Pierce S., Oyarzabal O.A. 2007. Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers. *Poultry Science*, 86: 1304-1311
- Promega. 2015. Protocols and application guide: Cell viability. Madison, Promega: 23 str. <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/paguide/letter/chap4.pdf?la=en> (20. dec. 2015)
- Pumbwe L., Randall L.P., Woodward M.J., Piddock L.J. 2004. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 2: 341-347
- Pumbwe L., Randall L.P., Woodward M.J., Piddock L.J.V. 2005. Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4: 1289-1293
- Robinson D.A. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282: 1584-1584
- Rozza A.L., Pellizzon C.H. 2013. Essential oils from medicinal and aromatic plants: A review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 27: 51-63
- Rufino A.T., Ribeiro M., Judas F., Salgueiro L., Lopes M.C., Cavaleiro C., Mendes A.F. 2014. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: structural and enantiomeric selectivity. *Journal of Natural Products*, 77, 2: 264-269
- Saddiq A.A. in Khayat S.A. 2010. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 89-93
- Salem M.Z., Ali H.M., El-Shanhorey N.A., Abdel-Megeed A. 2013. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6, 10: 785-791
- Santos F.A., Raolw V.S.N., Silveira E.R. 1998. Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents. *Phytotherapy Research*, 12: 24-27
- Sarker S.D., Nahar L., Kumarasamy Y. 2007. Microtiter late-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 4: 321-324

- Sarwar A., Latif Z. 2015. GC-MS characterization and antibacterial activity evaluation of *Nigella sativa* oil against diverse strains of *Salmonella*. *Natural Product Research*, 29, 5: 447-451
- Satou T., Kasuya H., Maeda K., Koike K. 2014. Daily inhalation of α -pinene in mice: effects on behavior and organ accumulation. *Phototherapy Research*, 28, 9: 1284-1287
- Schmidt L., Göen T. 2015. Human metabolism of α -pinene and metabolite kinetics after oral administration. *Archives of Toxicology*, doi:10.1007/s00204-015-1656-9: 11 str. (v tisku)
- Shi K., Caldwell S.J., Fong D.H., Berghuis A.M. 2013. Prospect for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 22:1-17
- Shiu W.K.P., malkinson J.P., Rahman M.M., Curry J., Stapleton P., Gunaratnam M., Neidle S., Mushtaq S., Warner M., Livermore D.M., Evangelopoulos D., Basavannacharya C., Bhakta S., Schnidles B.D., Seo S.M., Coleman D., Kaatz G.W., Gibbons S. 2013. A new-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 6: 513-518
- Siebert D.A., Tenfen A., Yamanaka C.N., de Cordova C.M., Scharf D.R., Simionatto E.L., Alberton M.D. 2015. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil form *Eugenia brasiliensis* Lam. *Natural Product Research*, 29, 3: 289-292
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2:200, doi:10.3389/fmicb.2011.00200: 12 str.
- Skirrow M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a »new« disease. *British Medical Journal*, 2, 6078: 9-11
- Skirrow M.B. 2006. John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* Species. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 9: 1213-1217
- Smith J.L., Fratamico P.M. 2010. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*, 73, 6: 1141-1152
- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 91-98
- Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G. 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297-302
- SothiSelvam S., Liu B., Han W., Ramu H., Klepacki D., Atkinson G.C., Brauer A., Remm M., Tenson T., Schulten K., Vazquez-Laslop N., Mankin A.S. 2014. Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 111, 27: 9804-9809
- Stahl M., Butcher J., Stintzi A. 2012. Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 5, doi:10.3389/fcimb.2012.00005: 10 str.

- Stahl M., Friis L.M., Nothaft H., Liu X., Li J., Szymanski C.M., Stintzi A. 2011. L-Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17: 7194-7199
- Steel H.C., Theron A.J., Cockeran R., Anderson R., Feldman C. 2012. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. *Mediators of Inflammation*, 2012: ID 584262, doi:10.1155/2012/584262: 17 str.
- Štrumbelj I., Berce I., Čretnik-Žohar T., Harlander T., Jeverica S., Kavčič M., Kolman J., Lorenčič-Robnik S., Mueller.Premru M., Paragi M., Piltaver Vajdec I., Pirš M., Ribič H., Seme K., Tomič V., Zdolšek B., Žolnir-Dovč M. 2013. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2012. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ): 34 str.
- Tavares L.S., Silva C.S.F., de Souza V.C., da Silva V.L., Siniz C.G., Santos M.O. 2013. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4, 412, doi: 10.3389/fmicb.2013.00412: 2 str.
- Tenover F.C. in Elvrum P.M. 1988. Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 8: 1170-1173
- Thermo Fisher Scientific. 2016. Fluorescence tutorials. Waltham, Thermo Fisher Scientific: 1 str.
<https://www.thermofisher.com/si/en/home/support/tutorials.html> (10. jan. 2016)
- Thermo Fisher Scientific. 2004. Manuals and protocols: LIVE/DEAD®BacLight™ Bacterial Viability Kits. Waltham, Thermo Fisher Scientific: 8 str.
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07007.pdf> (20. nov. 2015)
- Toth M., Frase H., Antunes N.T., Vakulenko S.B. 2013. Novel aminoglycoside 2"-phosphotransferase identified in a gram-negative pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 1: 452-457
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 6: 2474-2478
- Turkez H. in Aydın E. 2016. *In vitro* assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. *Toxicology and Industrial Health*, 32, 1: 168-176
- Usui M., Sakemi Y., Uchida I., Tamura Y. 2014. Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*, 170, 3-4: 438-441
- van Doorn P.A., Ruts L., Jacobs B.C. Clinical features, pathogenesis and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurology*, 7, 10: 939-950
- Velayudhan J in Kelly D.J. 2002. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*, 148, 3: 685-694

- Vera-Arzave C., Antonio L.C., Arrieta J., Cruz-Hernández G., Velasquez-Mendez A.M., Reyes-Ramírez A., Sanchez-Mendoza M.E. 2012. Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol-induced gastric lesions in Wistar rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. *Molecules*, 17: 8917–8927
- Violante I.M., Garcez W.S., Barbosa C.S., Garcez F.R. 2012. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Hyptis crenata* growing in the Brazilian cerrado. *Natural Product Communications*, 7: 1387–1389
- Wang W., Li N., Luo M., Zu Y., Efferth T. 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17, 3: 2704-2713
- Wassenaar T.M., Newell D.G. 2006. The genus *Campylobacter*. V: Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria. Vol. 7. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (eds.). 3rd ed. New York, Springer: 119-139
- Watson R.O., Galan J.E. 2008. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS One*, 4, 1: e14, doi:10.1371/journal.ppat.0040014: 15 str.
- Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3: 163-175
- Wimalarathna H.M.L., Richardson J.F., Lawson A.J., Elson R., Meldrum R., Little C.L., Maiden M.C.J., McCarthy N.D., Sheppard S.K. 2013. Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expression of resistant lineages. *BMC Microbiology*, 13: 160, doi:10.1186/1471-2180-13-160: 9 str.
- Xie X.F., Wang J.W., Zhang H.P., Li Q.X., Chen B.Y. 2014. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Ampelopsis megalophylla*. *Natural Product Research*, 28, 12: 853-860
- Xu D.H., Huang Y.S., Jiang D.Q., Yuan K. 2013. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharmaceutical Biology*, 51: 1125–1130
- Yang J., Nie Q., Ren M., feng H., Jiang X., Zheng Y., Liu M., Zhang H. Xian M. 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of alpha-pinene. *Biotechnology for Biofuels*, 6: 60, doi:10.1186/1754-6834-6-60: 10 str.
- Yeruva L., Hall C., Elegbede J.A., Carper S.W. 2010. Perillyl alcohol and methyl jasmonate sensitize cancer cells to cisplatin. *Anticancer Drugs*, 21: 1–9
- Zeng X., Gillespie B., Lin J. 2015. Important role of a putative lytic transglycosylase cj0843 in β -lactam resistance in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, 6:1292, doi: 10.3389/fmicb.2015.01292: 10 str.
- Zengin H., Baysal A.H. 2014. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure. Activity relationship evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19, 11: 17773-17798

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za vodenje, spodbudo in vse prijazne besede. Hvala za vse priložnosti in zaupanje, ki ste mi jih dali v času izvajanja magistrskega dela.

Hvala dr. Jasni Kovač za strokovno vodenje in nasvete pri eksperimentalnem delu naloge in spodbudo pri izdelavi pisnega dela. Vesela sem, da sem dobila priložnost delati s teboj.

Hvala recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za dober in hiter pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil za vso pomoč, nasvete in zabavne pogovore. Olajšali in polepšali ste mi delo.

Prav tako bi se zahvalila vsem prijateljem, ki so bili ob meni in mi polepšali dneve skozi celoten čas študija.

Največja zahvala je namenjena moji družini. Hvala za vso podporo, ki ste mi jo dajali skozi vsa ta leta. Posebej bi se zahvalila mami Luci, saj je moja največja podpora, vedno polna razumevanja. Hvala Mama.

Tudi tebi, Čudni, hvala. S teboj je vse lažje in bolj zabavno.

Nekaj spodbudnih besed...

“Ko hodiš, pojdi zmeraj do konca. Spomladi do rožne cvetice, poleti do zrele pšenice, jeseni do polne police, pozimi do snežne kraljice, v knjigi do zadnje vrstice, v življenju do prave resnice, v sebi do rdečice čez eno in drugo lice. A če ne prideš ne prvič, ne drugič do krova in pravega kova poskusi: vnovič in zopet in znova.”

Tone Pavček