

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Patricija ZAZIJAL

**VPLIV IZVLEČKA IN POSAMEZNIH UČINKOVIN
IZ PLODOV RASTLINE *Evodia rutaecarpa* NA
TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ
VRSTE *Campylobacter jejuni***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Patricija ZAZIJAL

**VPLIV IZVLEČKA IN POSAMEZNIH UČINKOVIN IZ PLODOV
RASTLINE *Evodia rutaecarpa* NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ
VRSTE *Campylobacter jejuni***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**EFFECT OF *Evodia rutaecarpa* FRUIT EXTRACT AND ITS
FRACTIONS ON BIOFILM FORMATION OF
*Campylobacter jejuni***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za recenzentko pa prof. dr. Heleno Abramovič.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Helena Abramovič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

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.

Patricija Zazijal

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 579.24/.26:547.9(043)=163.6
- KG *Campylobacter jejuni* / bakterijski biofilmi / tvorba biofilma / medcelična komunikacija / signalne molekule / AI-2 / rastlinski izvlečki / *Evodia rutaecarpa* / nerjaveče jeklo / delovne površine
- AV ZAZIJAL, Patricija, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2015
- IN VPLIV IZVLEČKA IN POSAMEZNIH UČINKOVIN IZ PLODOV RASTLINE *Evodia rutaecarpa* NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE *Campylobacter jejuni*
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
- OP X, 55 str., 4 pregl., 17 sl., 115 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Proučevali smo vpliv izvlečka *Evodia rutaecarpa* in posameznih učinkovin na tvorbo biofilma bakterij vrste *Campylobacter jejuni* in njenih mutantov na sistemu za signaliziranje (*luxS*) in izlivnih črpalk (*cmeB*) ter vpliv na produkcijo signalnih molekul. Prav tako smo proučevali vpliv različno obdelane površine nerjavečega jekla na tvorbo biofilma, hkrati pa smo primerjali metodi za kvantifikacijo biofilma na površini. Dokazali smo, da izvleček in posamezne učinkovine kažejo inhibitorni učinek na tvorbo biofilma na neobdelani površini nerjavečega jekla predvsem po 24 urah inkubacije. Najmočnejši zaviralni učinek na tvorbo biofilma je imela učinkovina kinolon A z več evokarpina. Ista učinkovina se je izkazala kot najučinkovitejša tudi pri zaviranju signalnih molekul. Kljub temu pa neposredne zveze med količino proizvedenih signalnih molekul in količino biofilma nismo mogli dokazati. Obdelava površine, ki vpliva na hrapavost, pa je pomemben dejavnik pri količini tvorjenega biofilma na diskih nerjavečega jekla. Elektropolirani površini z največjo hrapavostjo sta izkazali največjo afiniteto tvorbe biofilma. Metodi kvantifikacije biofilma na površini nerjavečega jekla na osnovi štetja kolonij kot merila živih celic v biofilmu in barvanje s kristal vijoličnim se v pogojih našega eksperimenta nista izkazala s primerljivimi rezultati.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 579.24/.26:547.9(043)=163.6
- CX *Campylobacter jejuni* / bacterial biofilms / biofilm formation / quorum sensing / signal molecules / AI-2 / plant extract / *Evodia rutaecarpa* / stainless steel / working surfaces
- AU ZAZIJAL, Patricija
- AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / ABRAMOVIČ, Helena (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2015
- TY EFFECT OF *Evodia rutaecarpa* FRUIT EXTRACT AND ITS FRACTIONS ON BIOFILM FORMATION OF *Campylobacter jejuni*
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
- NO X, 55 p., 4 tab., 17 fig., 115 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB In this thesis we studied influence of *Evodia rutaecarpa* extract and its fractions on biofilm formation of *Campylobacter jejuni* and its mutants on quorum sensing system (*luxS*) and efflux pumps (*cmeB*). The influence on production of autoinducer-2 (AI-2) signal molecules was also studied. One of the main tasks in our research was to determine what influence different surfaces of stainless steel have on biofilm formation and at the same time we compared methods for quantification of biofilm on the surface. Based on the results, the extract and its fractions have inhibitory effect on the biofilm formation on the rough stainless steel surface after 24 hours of incubation. The antiadhesive effect and QS inhibition quinolone A with higher amount of evocarpine was seen. Nonetheless we could not show direct connection between presence of AI-2 molecules and biofilm forming ability. Roughness is important factor in bacterial attachment to surfaces of discs made of stainless steel. Electro-polishing surfaces with higher roughness have maximum affinity for the biofilm formation. In the conditions of our experiment two different methods of biofilm quantification, one being counting colonies of living cells in the biofilm and the other one being coloring with crystal violet, have not shown comparable results.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO SLIK | VII |
| KAZALO PREGLEDNIC | IX |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN IN CILJI MAGISTRSKE NALOGE | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| | |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 BAKTERIJE RODU <i>Campylobacter</i> | 3 |
| 2.1.1 Zgodovinski pregled in taksonomska razporeditev | 3 |
| 2.1.2 <i>Campylobacter jejuni</i> in kampilobakterioza | 4 |
| 2.2 MEDCELIČNA KOMUNIKACIJA IN SPOSOBNOST PRITRJEVANJA NA KONTAKTNE POVRŠINE | 6 |
| 2.2.1 Signalne molekule pri bakterijah vrste <i>Campylobacter jejuni</i> | 7 |
| 2.2.2 Sistem za signaliziranje LuxS | 8 |
| 2.3 TVORBA BIOFILMA BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> | 8 |
| 2.3.1 Dejavniki pritrjevanja bakterij <i>Campylobacter</i> spp. na kontaktno površino | 10 |
| 2.3.2 Sposobnost tvorbe biofilma | 11 |
| 2.3.2.1 Nerjaveče jeklo kot kontaktna površina za tvorbo biofilma | 12 |
| 2.4 METODE DOLOČANJA TVORBE BIOFILMA | 12 |
| 2.4.1 Določanje biofilma s kristal vijoličnim | 13 |
| 2.4.2 Določanje biofilma z gojitveno metodo (CFU/mL) na diskih nerjavečega jekla | 14 |
| 2.5 METODE PREPREČEVANA TVORBE BIOFILMA | 14 |
| 2.5.1 Protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov | 15 |
| 2.5.2 <i>Evodia rutaecarpa</i> | 15 |
| 2.5.3 Odpornost na delovanje protimikrobnih sredstev | 16 |
| | |
| 3 MATERIALI IN METODE | 18 |
| 3.1 POTEK DELA | 18 |
| 3.1.1 Določanje tvorbe biofilma <i>C. jejuni</i> na različno obdelani površini nerjavečega jekla z metodo barvanja s kristal vijoličnim ter z gojitveno metodo | 18 |
| 3.1.2 Vpliv izvlečka in posameznih učinkovin <i>Evodia rutaecarpa</i> na tvorbo biofilma bakterij <i>C. jejuni</i> na površini nerjavečega jekla ter sintezo signalnih molekul | 19 |
| 3.2 MATERIALI | 20 |
| 3.2.1 Delovni mikroorganizem | 20 |
| 3.2.2 Skupni izvleček in ostale učinkovine iz plodov <i>Evodia rutaecarpa</i> | 20 |
| 3.2.3 Mikrobiološka gojišča | 20 |
| 3.2.2.1 Tekoče gojišče MHB | 20 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.2.2.2 | Selektivni krvni agar Columbia | 20 |
| 3.2.2.3 | Neselektivno tekoče gojišče BHI | 21 |
| 3.2.2.4 | Neselektivno trdno gojišče MHA | 21 |
| 3.2.3 | Raztopine, reagenti | 21 |
| 3.2.3.1 | Fiziološka raztopina | 21 |
| 3.2.3.3 | Druge kemikalije | 22 |
| 3.2.4 | Laboratorijska oprema | 22 |
| 3.3 | METODE DELA | 23 |
| 3.3.1 | Revitalizacija bakterij in priprava inokoluma | 23 |
| 3.3.2 | Določanje minimalne inhibitorne koncentracije čistih učinkovin in izvlečka <i>Evodia rutaecarpa</i> | 24 |
| 3.3.3 | Priprava kontaktne površine za tvorbo biofilma | 24 |
| 3.3.4 | Določanje tvorbe biofilma | 25 |
| 3.3.4.1 | Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z barvanjem s kristal vijoličnim | 25 |
| 3.3.4.2 | Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z gojitveno metodo | 26 |
| 3.3.4.3 | Določanje vpliva izvlečka <i>E. rutaecarpa</i> na tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla z gojitveno metodo | 27 |
| 3.3.4.3.1 | Določanje sinteze signalnih molekul | 27 |
| 3.3.5 | Statistično vrednotenje rezultatov | 27 |
| 4 | REZULTATI Z RAZPRAVO | 29 |
| 4.1 | MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) ALKALOIDOV IN IZVLEČKA PLODOV <i>Evodia rutaecarpa</i> PRI BAKTERIJI <i>C. jejuni</i> | 29 |
| 4.2 | DOLOČANJE TVORBE BIOFILMA | 29 |
| 4.2.1 | Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z barvanjem s kristal vijoličnim | 29 |
| 4.2.2 | Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z gojitveno metodo | 34 |
| 4.2.3 | Določanje vpliva izvlečkov <i>E. rutaecarpa</i> na tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla | 37 |
| 4.2.4 | Določanje signalnih molekul | 39 |
| 4.3 | SPLOŠNA RAZPRAVA O POVEZANOSTI TVORBE BIOFILMA IN CELIČNEGA SIGNALIZIRANJA | 41 |
| 5 | SKLEPI | 43 |
| 6 | POVZETEK | 44 |
| 7 | VIRI | 45 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: <i>Campylobacter jejuni</i> v procesu delitve (Humphrey in sod., 2007). | 4 |
| Slika 2: Možne poti okužbe s <i>Campylobacter</i> spp. (Young in sod., 2007). | 5 |
| Slika 3: Sistem signaliziranja pri po Gramu negativnih bakterijah (Nazzaro in sod., 2013) | 7 |
| Slika 4: Model razvoja biofilma po stopnjah (Cogan in Kenner, 2004)..... | 10 |
| Slika 5: Struktura primarnih učinkovin izvlečka <i>Evodia rutaecarpa</i> : evodiamin, rutekarpin, evokarpin (Liu in sod., 2005). | 16 |
| Slika 6: Shema poteka priprave bakterijske kulture in izvedba spremljanja tvorbe biofilma bakterij vrste <i>C. jejuni</i> na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla. | 18 |
| Slika 7: Shema poteka priprave bakterijske kulture in izvedba spremljanja tvorbe biofilma in sinteze signalnih molekul bakterij vrste <i>C. jejuni</i> pri izpostavitvi izvlečku in posameznim učinkovinam izvlečka <i>E. rutaecarpa</i> | 19 |
| Slika 8: Hrapavost (Rq) štirih različno obdelanih površin nerjavečega jekla: neobdelana površina (3C), 3D polirana površina, krtačena površina in elektropolirana površina. Rezultati so pridobljeni z AFM, s profilomerom. | 25 |
| Slika 9: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim. | 30 |
| Slika 10: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla <i>C. jejuni</i> mutanta <i>luxS</i> v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim..... | 31 |
| Slika 11: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 v aerobnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim. | 32 |
| Slika 12: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla <i>C. jejuni</i> mutanta <i>luxS</i> v aerobnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim. | 33 |
| Slika 13: Koncentracija bakterijskih celic <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo. | 34 |
| Slika 14: Koncentracija bakterijskih celic <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 v suspenziji nad različno obdelanimi diski nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo. | 35 |

Slika 15: Koncentracija bakterijskih celic *C. jejuni* mutanta *luxS* v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo. 36

Slika 16: Koncentracija bakterijskih celic *C. jejuni* mutanta *luxS* v suspenziji nad različno obdelanimi diski nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo. 37

Slika 17: Vpliv izvlečka in posameznih učinkovin *E. rutaecarpa* na tvorbo biofilma seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutantov *luxS* ter *cmeB* po 1, 24, 48 in 72 urah inkubacije pri 42 °C in mikroaerofilnih pogojih, relativno na pozitivno kontrolo (pod istimi pogoji inkubirani sevi, brez dodatka učinkovin). 38

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica 1: Laboratorijski material in njihov proizvajalec..... | 22 |
| Preglednica 2: Aparature in njihovi proizvajalci..... | 23 |
| Preglednica 3: Vrednost minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) alkaloidov in izvlečka <i>E. rutaecarpa</i> pri <i>C. jejuni</i> 11168 ter mutantih <i>luxS</i> in <i>cmeB</i> | 29 |
| Preglednica 4: Sinteza signalnih molekul pri bakterijah <i>C. jejuni</i> in mutantih <i>cmeB</i> , <i>luxS</i> v bujonu MH, v prisotnosti subinhibitornih koncentracij (0,25 MIK) čistih učinkovin in izvlečka <i>Evodia rutaecarpa</i> | 40 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|------------------------------|--|
| AFM | mikroskopija na atomsko silo (angl. atomic force microscopy) |
| AI | avtoinducerji (angl. Autoinducers) |
| a_w | termodinamska aktivnost vode |
| BHI bujon | Brain Heart Infusion bujon |
| CFU | število kolonijskih enot (ang. Colony Forming Units) |
| <i>C. coli</i> | <i>Campylobacter coli</i> |
| <i>C. fetus</i> | <i>Campylobacter fetus</i> |
| <i>C. jejuni</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> |
| <i>C. lari</i> | <i>Campylobacter lari</i> |
| <i>C. upsaliensis</i> | <i>Campylobacter upsaliensis</i> |
| <i>E. rutaecarpa</i> | <i>Evodia rutaecarpa</i> |
| EL | elektropolirana površina |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| EFSA | Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority) |
| EtOH | etanol |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| KR | krtačena površina |
| KV | barvilo kristal vijolično |
| MHA | agar Mueller Hinton |
| MHB | bujon Mueller Hinton |
| MIK | minimalna inhibitorna koncentracija (angl. Minimum Inhibitory Concentration), MIC) |
| NaCl | natrijev klorid |
| NCTC | zbirka medicinsko pomembnih bakterij, ki jih hrani Central Public Health Laboratory, London (angl. National Collection of Type Cultures) |
| PBS | raztopina fosfatnega pufra (angl. PBS phosphate buffered saline) |
| QS | medcelično komuniciranje (angl. Quorum sensing) |
| RFU | relativna enota fluorescence (angl. relative fluorescence unit) |
| RLU | relativna enote luminiscence (angl. relative luminiscence unit) |
| VBNC | živo, vendar nekultivabilno stanje celic (angl. viable but not culturable) |
| <i>V. harveyi</i> | <i>Vibrio harveyi</i> |

1 UVOD

Bakterije iz rodu *Campylobacter* spp. veljajo za enega vodilnih vzrokov za s kontaminirano hrano povezanih izbruhov enteritisa pri ljudeh. Glede na zadnje poročilo Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) je bila kampilobakterioza najpogostejša bakterijska zoonoza leta 2013, podobno pa je bilo stanje tudi v prejšnjih letih in je tudi danes (EFSA, 2015).

Okužbe so najpogosteje povezane z zaužitjem termično nezadostno obdelanega piščančjega mesa, saj perutnina predstavlja naravni habitat bakterij rodu *Campylobacter* spp., ki kolonizirajo predvsem prebavni trakt ptičev pa tudi sesalcev (Silva in sod., 2011). Vzrok za prisotnost bakterij pa je velikokrat navzkrižna kontaminacija drugih živil s surovim perutninskim mesom, kar je posledica visoke mikrobne obremenitve svežih perutninskih proizvodov (Painter in sod., 2013).

Kljub zahtevnim ravnim pogojem bakterij *Campylobacter* pa je le nekaj 100 bakterijskih celic zadostno, da povzročijo okužbo in bolezen. Prav zaradi prilagojenosti na okolje prebavnega trakta so bakterije za obstoj in preživetje zunaj gostitelja morale razviti preživetvene mehanizme. Ena izmed možnih poti zaščite je tvorba biofilma, v katerem so na površino pritrjene in z zunajceličnim matriksom obdane bakterijske celice bolj zaščitene od planktonskih. Sevi *C. jejuni* se lahko pritrjujejo in tvorijo biofilm na površinah, kot je nerjaveče jeklo, polivinilklorid, nitrocelulozna membrana ter steklo. Dinamika tvorbe in struktura biofilma je odvisna od številnih dejavnikov, kot je bakterijski sev, tip površine, temperatura, količina prisotnih hranil in delež kisika (Reeser in sod., 2007; Reuter in sod., 2010).

Pri uravnavanju preživetja in virulence *C. jejuni* igra pomembno vlogo tudi medcelično signaliziranje in s tem povezana, od celične gostote odvisna komunikacija med bakterijskimi celicami (Bassler, 1999). Zaznavanje celične gostote (ang. quorum sensing, QS) temelji na sproščanju, zaznavanju in odzivanju na prisotnost signalnih molekul, kar vpliva na izražanje genov in s tem na fenotipske lastnosti bakterij (Nadell in sod., 2008). Reeser in sod. (2007) ter Gözl in sod. (2012) so pokazali, da imajo signalne molekule-2 (AI-2) pomembno vlogo pri razvoju biofilma *C. jejuni*.

Zaradi povezave med zaznavanjem celične gostote in sposobnostjo pritrjevanja ter posledične tvorbe biofilma in drugih fizioloških aktivnosti, kot je odpornost na antibiotike in gibljivost, je vse več pozornosti usmerjeno v preprečevanje komunikacije med celicami tudi v aspektu zagotavljanja varnosti in kakovosti živil (Nazzaro in sod., 2013; Blana in Nychas, 2014; Zhang in sod., 2014).

1.1 NAMEN IN CILJI MAGISTRSKE NALOGE

Namen in cilji magistrskega dela so bili naslednji:

- Preveriti uporabnost gojitvene (CFU/mL) in spektrofotometrične metode (barvanje s kristal vijoličnim) za spremljanje tvorbe biofilma.
- Preveriti vpliv izbrane koncentracije izvlečka in posameznih učinkovin na tvorbo biofilma *C. jejuni*.
- Preveriti vpliv materiala in načina obdelave površine na tvorbo biofilma.
- Preveriti vpliv celičnega signaliziranja na tvorbo biofilma.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo:

- Uporabljeni metodi spremljanja tvorbe biofilma sta primerljivi.
- Izvleček *Evodia rutaecarpa* ima zaviralni učinek na tvorbo biofilma, z uporabo posameznih učinkovin izvlečka pa bomo ugotovili, katera ima najmočnejši zaviralni vpliv na tvorbo biofilma.
- Material in površina vplivata na tvorbo biofilma.
- Signalizacija med celicami ima zaznaven vpliv na tvorbo biofilma.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Campylobacter*

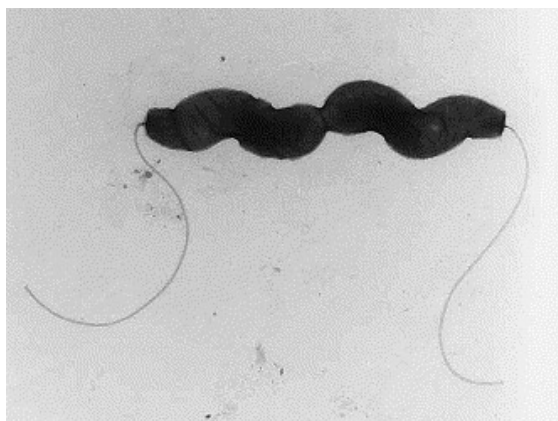
2.1.1 Zgodovinski pregled in taksonomska razporeditev

O spiralno zvitih bakterijah v fecesu pacientov z diarejo je prvič pisal že Theodor Escherich ob koncu 19. stoletja, vendar je uspešna izolacija povzročitelja uspela šele belgijskemu kliničnemu mikrobiologu skoraj stoletje kasneje (1972). Bakterije *Campylobacter* spp. so bile do leta 1973 klasificirane kot *Vibrio fetus*, povzročitelj spontanah abortusov pri ovcah in govedu (Allos, 2001).

Velik doprinos k raziskovanju kampilobaktra je predstavljal razvoj selektivnega medija z uporabo filtracijske tehnike Martina Skirrowa, kar je omogočilo selektivno izolacijo mikroorganizma (Rowe in Madden, 2000). Samo razumevanje, tako patogeneze kakor tudi metabolnih poti, genetske variabilnosti, mehanizmov prilagajanja, sistema glikolizacije proteinov, dejavnikov kolonizacije in odpornosti na antibiotike, je prinesel predvsem razvoj molekularnih metod dela.

Bakterije rodu *Campylobacter* taksonomsko umeščamo v družino Campylobacteriaceae. Rod trenutno združuje 25 znanih vrst in 8 podvrst po Gramu negativnih (Kaakoush in sod., 2015), od 0,2 do 0,9 μm širokih in od 0,2 do 0,5 μm dolgih spiralno zavitih paličic (Man, 2011). Hitro in vijačno gibanje skozi medij jim omogočata en ali dva polarna bička (Ganan in sod., 2012), ki imata pomembno vlogo tudi pri kolonizaciji bakterij v prebavnem traktu. Posebna oblika celic jim omogoča lažje premikanje skozi mukozni sloj črevesja in naseljevanje gostiteljevega prebavnega trakta (Guerry, 2007). *C. jejuni* na ustreznih gojiščih tvorijo sive, ploščate, izbočene kolonije nepravilnih oblik, pogosto z majhnim, temnejšim centrom (Snelling in sod., 2005).

Gre za mikroaerofilne mikroorganizme z respiratornim tipom metabolizma, ki temelji na Krebsovem ciklu. Čeprav jim kisik služi kot končni sprejemnik elektronov, je večja količina kisika v atmosferi zanje toksična (Skirrow, 2003), kar je deloma vplivalo tudi na poznejše odkritje tega rodu (Rowe in Madden, 2000). Najbolje rastejo v atmosferi z 10 % ogljikovega dioksida in 5 % kisika (Humphrey in sod., 2007). Kljub občutljivosti na kisik pa so katalaza, oksidaza in superoksidaza dismutaza aktivni (Rowe in Madden, 2000).



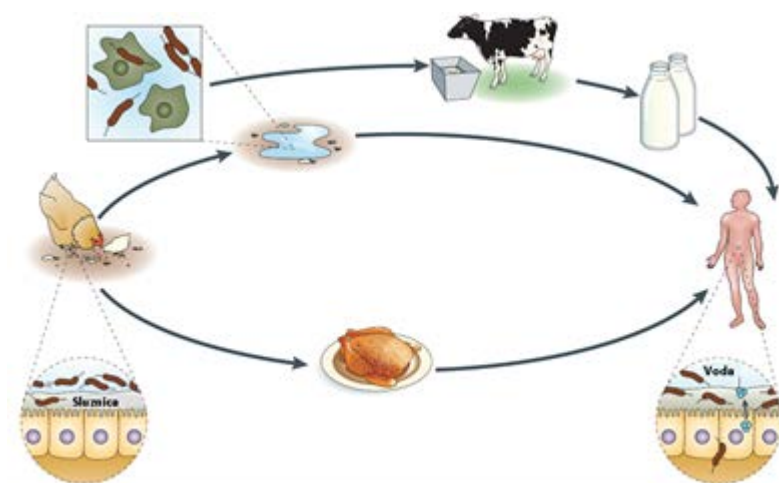
Slika 1: *Campylobacter jejuni* v procesu delitve (Humphrey in sod., 2007).

Kampilobaktri so kemoorganotrofni in ne fermentirajo ali oksidirajo ogljikovih hidratov. Energijo pridobivajo iz aminokislin aspartata in glutamata ali intermediatov cikla trikarboksilnih kislin (Rowe in Madden, 2000).

Rastejo in razmnožujejo se v precej ozkem temperaturnem območju. Najvišja temperatura je 46 °C in najnižja 30 °C, zato so opredeljeni kot termofilni mikroorganizmi. Optimalno območje rasti glede na vrednost pH je od 6,5 do 7,5, pri pH vrednostih pod 4,9 in nad 9 ne preživijo. Občutljivi so na visoke koncentracije NaCl, rast je omejena z dostopnostjo vode v okolju, vrednost vodne aktivnosti (a_w) je lahko najmanj 0,987 (Humphrey in sod., 2007; Silva in sod., 2011).

2.1.2 *Campylobacter jejuni* in kampilobakterioza

Naravni habitat *Campylobacter* spp. so prebavni trakt, reproduktivni organi ter oralna votlina toplokrvnih živali (Humphrey in sod., 2007). *C. jejuni* je množično prisoten v komercialni reji piščancev. Za glavni rezervoar velja prebavni trakt oz. črevesje perutnine, kjer je število celic med 10^4 - 10^8 CFU/g (Teh in sod., 2010). Kontaminirano in toplotno premalo obdelano piščančje meso je tako poleg okuženih domačih živali, kontaminirane vode ali mleka, še vedno najpogostejši vir okužbe (Jeon in sod., 2010).



Slika 2: Možne poti okužbe s *Campylobacter* spp. (Young in sod., 2007).

V zadnjih letih se problem kontaminacije pitanih piščancev s *C. jejuni* pogosto pojavlja tudi v Sloveniji. V letu 2011 je bila razširjenost kontaminacije na vzorcih fekalij in kož piščancev tudi do 92 %, kar je med najvišjimi v EU (EFSA, 2013).

Letno se po svetu okuži od 400 do 500 milijonov ljudi (Jeon in sod., 2010), po ocenah svetovne zdravstvene organizacije pa se vsako leto okuži okoli 1 % prebivalstva Zahodne Evrope (Humphrey in sod., 2007).

Število primerov človeških kampilobakterioz v Sloveniji ni tako visoka, kot bi bilo mogoče pričakovati glede na podatek o kontaminiranosti piščancev. Incidenca je celo nekoliko pod povprečjem EU in nižja kot v mnogih državah z nizko prevalenco kontaminiranosti piščancev na farmah (EFSA, 2013). Razlog je morda tudi v tem, da je bilo na kar 94,2 % klavnih trupov število bakterijskih celic nižje od 1000 CFU/g ali celo pod mejo detekcije (Gruntar in sod., 2015). Nato se število bakterijskih celic zniža še s hlajenjem v proizvodnem obratu ali v maloprodajnih mrežah do dejanske porabe (El-Shibiny in sod., 2009).

Infektivna doza je nizka, in sicer le nekaj 100 bakterijskih celic. Inkubacijska doba okužbe lahko traja od 1 do 10 dni. Pri večini ljudi se klinični simptomi okužbe pokažejo po 4 dneh (Humphrey in sod., 2007).

Kampilobakterioza običajno izveni sama in hospitalizacija ni potrebna. Znaki okužbe so vodena, včasih krvava driska, povišana telesna temperatura in glavobol. Infekcija s *Campylobacter* traja navadno od 2 do 11 dni. Pri obolelih z oslabiljenim imunskim sistemom ali hudo diarejo je potrebno antibiotično zdravljenje. Dolgoročni sekundarni učinki pa se lahko izrazijo šele nekaj tednov ali celo mesecev po infekciji kot reaktivni artritis, Reiterjev sindrom, Guillain-Barre sindrom (Wilson in sod., 2008; Reeser in sod., 2007).

V največjem številu primerov (92 %) so povzročitelji okužb pri človeku bakterije vrste *C. jejuni*, katerim po pogostosti sledijo *C. coli* (10 %) (Teh in sod., 2010), v razvitih državah pa beležijo tudi primere gastroenteritisa, povezanega z vrstami *C. upsaliensis*, *C. lari* ali *C. fetus* (Man, 2011).

Za razliko od nekaterih s hrano povezanih povzročiteljev okužb se *C. jejuni* pri temperaturi hladilnika ne razmnožuje (Park, 2002). Kljub temu je vrsta *C. jejuni* sposobna preživeti na surovem piščančjem mesu in koži pri 4 °C več kot 10 dni (El-Shibiny in sod., 2009). V neugodnih razmerah za rast pridejo v stanje živih, a ne gojljivih celic (angl. VBNC, viable but not culturable) (Jackson in sod., 2009).

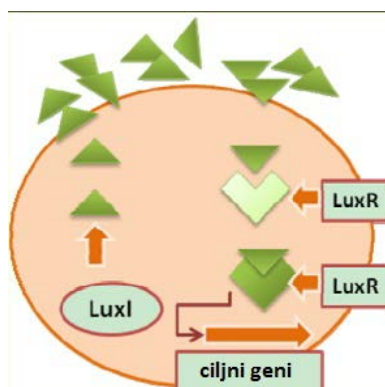
2.2 MEDCELIČNA KOMUNIKACIJA IN SPOSOBNOST PRITRJEVANJA NA KONTAKTNE POVRŠINE

Pojem medcelična komunikacija je bil prvič opisan leta 1970 pri bakteriji *Vibrio fischeri* in s tem povezano bioluminiscenco v odvisnosti od gostote bakterijskih celic v svetlobnem organu morskega mehkužca (Engebrecht in Silverman, 1984; Gobbetti in sod., 2007).

Sprožitev bioluminiscence je odvisna od koncentracije majhnih signalnih molekul, ki jih proizvajajo bakterije, in se imenujejo avtoinducerji (angl. autoinducers, AI) (Bassler, 1997). Medcelično signaliziranje vključuje produkcijo in zaznavanje zunajceličnih signalnih molekul.

Med različnimi bakterijskim vrstami obstajajo variacije v enem ali več pogledih procesa signalizacije, kot je sam kemični signal, receptorji, mehanizem za prenos signalov in fenotipske značilnosti. Sistem za medcelično komunikacijo je prilagojen različnim potrebam bakterij in omogoča komuniciranje znotraj posamezne vrste ali med različnimi vrstami bakterij. Ima pomembno vlogo pri različnih bakterijskih procesih, vključno z gibljivostjo, nastankom biofilma in kolonizacije (Plummer, 2012). Medcelično signaliziranje ima vlogo tudi pri virulenci humanih patogenih bakterij. S tem sistemom lahko zmedejo imunski sistem gostitelja tako, da začnejo proizvajati virulencne faktorje šele, ko je število celic dovolj veliko, da lahko izzovejo učinkovito infekcijo (Bassler, 1999).

Najbolj proučeni QS sistemi pri po Gramu negativnih bakterijah zajemajo N-acil homoserin laktone (AHL) oz. avtoinducerje (AI-1). Z večanjem gostote bakterijske populacije prihaja do kopičenja AHL-molekul in ko le-te dosežejo kritično koncentracijo, sledi interakcija molekul z ustreznim receptorskim proteinom LuxR ali v bližini njega in vpliva na izražen fenotip (Bassler, 1999). Podoben sistem medcelične komunikacije ima več kot 30 vrst po Gramu negativnih bakterij (Plummer, 2012).



Slika 3: Sistem signaliziranja pri po Gramu negativnih bakterijah (Nazzaro in sod., 2013)

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je medcelična signalizacija povezana predvsem s produkcijo in zaznavanjem modificiranih majhnih peptidnih molekul, ki se izločajo preko ABC-transportnega proteinskega sistema (Bassler, 1999).

Tretji sistem medcelične komunikacije je značilen tako za po Gramu pozitivne kot tudi negativne bakterije. Vlogo signalnih molekul imajo tako imenovani avtoinducerji 2 (AI-2), ki pa zaradi manjše vrstne specifičnosti igrajo pomembno vlogo predvsem pri medvrstni komunikaciji. Pri sintezi AI-2 gre za signal, posredovan z zapisom na *luxS*. Modelni organizem *Vibrio harveyi* za signalni prenos uporablja dvokomponentni kinaza sistem (LuxP/Q) fosforilacije, ki vodi do defosforilacije odzivnega regulatorja (LuxO) in njegovo inaktivacijo ter spremembo izražanja genov (Bassler in sod., 1993; Henke in Bassler, 2004).

2.2.1 Signalne molekule pri bakterijah vrste *Campylobacter jejuni*

Razkritje majhnih molekul medcelične signalizacije je privedlo do razširitve raziskav in modulacij v študiji signalnega mehanizma. Z določitvijo zaporedja genoma *C. jejuni* se je izkazalo, da je prisoten gen *luxS* zelo podoben *luxS*, ki je prisoten tudi pri drugih vrstah bakterij (Elvers in Park, 2002).

Ker zapis za acil-homoserin lakton sintetazo pri *C. jejuni* ni poznan, gre verjetno za sistem medcelične komunikacije, posredovan prek izražanja *luxS*. Ta sistem namreč proizvaja več različnih molekul, ki so sposobne vezave z AI-2 receptorji. Molekularna oblika AI-2, ki ga proizvaja *C. jejuni*, še ni znana, se je pa v poizkusih bioluminiscence z *Vibrio harveyi* v *in vitro* pogojih izkazala kot aktivna oblika luxP liganda (Elvers in Park, 2002; Jeon in sod., 2003; Quinones in sod., 2009; Plummer in sod., 2011).

Ligowska in sod. (2011) so tako pokazali, da je medcelična komunikacija, v odvisnosti od izražanja *luxS*, *C. jejuni* omogočila boljšo prilagoditev na temperaturo hladilnika.

Razvoj novih protimikrobnih sredstev z vplivom na sistem za signaliziranje predstavlja novo obliko zaviranja bakterijskih infekcij s spojinami, ki zavirajo QS, bodisi tako, da

blokirajo signal receptorjev transkripcijskega regulatorja ali aktivnost AI-2 molekul (Sybiya Vasantha Packiavathy in sod., 2012).

Rasmussen in Givskov (2006) idealne zaviralce QS definirata kot kemijsko stabilne in učinkovite molekule z nizko molekulsko maso, ki imajo visoko stopnjo specifičnosti pri medceličnem komuniciranju in so brez toksičnih učinkov. Nekatero študije so kot inhibitorje QS našle v zdravilnih in prehranskih rastlinah, kot so česen, vanilja, lucerna (*Medicago sativa*), gadnjak (*Scorzonera sandrasica*), grah, izvleček granatnega jabolka in gobe, kot je *Auricularia auricula*. Zelo učinkovito inhibitorno QS aktivnost pa je izkazal čaj iz rastline japonskega šipka (*Rosa rugosa*), ki je imel v eni izmed študij med 12 kitajskimi cvetnimi čaji in 19 različnimi začimbami največjo inhibitorno QS aktivnost (Zhang in sod., 2014)

2.2.2 Sistem za signaliziranje LuxS

LuxS encim je del metilnega cikla (AMC) in sodeluje pri metabolizmu S-adenozil-L-metionina (SAM), pomembnem členu v metilaciji RNA, DNA in beljakovin. *luxS* kodira S-Ribozilhomocisteinazo (LuxS), ki je metaloencim, in za delovanje potrebuje Fe^{2+} . Katalizira interno redoks reakcijo pri sintezi AI-2, ki so znane kot signalne molekule pri medcelični komunikaciji (Ligowska in sod., 2011; Plummer, 2012). Cepi tioestersko vez v S-ribozilhomocisteinu, ki zato razpade na homocistein in 4,5-dihidroki-2,3-pentandion (DPD). Ta reakcija služi za odstranjevanje S-adenozilhomocisteina (SAH), ki je za celico toksičen, DPD pa v spontanah cikličnih reakcijah tvori molekule AI-2 (Pei in Zhu, 2004; Plummer, 2012). Homocistein vstopa v nadaljnje reakcije in tako nastaja S-adenozilmetionin (SAM). Produkt spontane ciklizacije DPD ni le ene vrste molekula, ampak več različnih, ki imajo različne možnosti spajanja z AI-2 receptorji, zato se je izraz AI-2 uveljavil za številne molekule, ki nastajajo iz DPD in so ligandi AI-2 receptorjev (Plummer, 2012).

Medcelična komunikacija ima pomembno vlogo pri tvorbi biofilma. Mutant *luxS* ima oslabilen sistem medcelične komunikacije in tvorbe signalnih molekul AI (2), kar je tudi glavni dejavnik pri zmanjšani tvorbi biofilma (Elvers in Park, 2002).

2.3 TVORBA BIOFILMA BAKTERIJ *Campylobacter*

Bakterije se v naravnem okolju pogosto nahajajo v obliki biofilma. Ti so lahko skupek ene same vrste bakterij ali pa več različnih vrst bakterij, združenih v zunajceličnem polimernem matriksu. Ta lahko vključuje polisaharide, proteine, nukleinske kisline, fosfolipide in teihonsko kislino (Chmielewski in Frank, 2003; O'Toole in sod., 2000). Znotraj biofilma je bakterijska celica bolj odporna na stresne okoljske dejavnike, kot so aerobni pogoji, dehidracija, segrevanje, aktivnost razkužil, prisotnost kislin, hkrati pa se lahko poveča tudi možnost okužb (Reeser in sod., 2007). Bakterijske celice so v biofilmu

1000-krat bolj odporne na dezinfekcijska in protimikrobna sredstva kot bakterijske celice v planktonski obliki (Fux in sod., 2005).

Celicam v biofilmu najboljšo zaščito pred različnimi protimikrobnimi sredstvi nudi zunajcelični matriks, ki predstavlja mehansko in kemično oviro. Učinkovito oviro pred vstopom v notranjost biofilma predstavlja velikim molekulam, kot je encim lizocim, zaradi svojega negativnega naboja pa ščiti bakterijske celice proti pozitivno nabitim aminoglikozidnim antibiotikom (Taraszkievicz in sod., 2013; Ishida in sod., 1998).

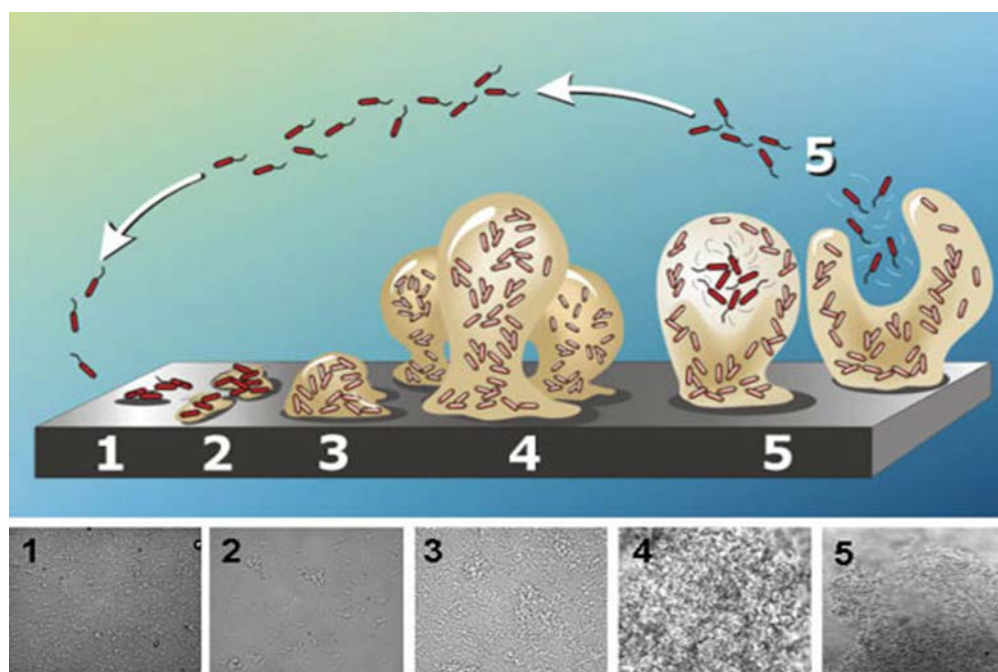
Med celicami v biofilmu se lahko pogosteje kot pri planktonskih celicah pojavi horizontalni prenos genskega materiala med bakterijami, s transdukcijo, konjugacijo in transformacijo. Posledica izmenjave genskega materiala pa je tudi stabilizacija strukture biofilma. Številni geni za odpornost proti antibiotikom so na prenosljivih plazmidih. Plazmidi z odpornostjo proti antibiotikom pogosto vsebujejo gene, ki nudijo odpornost proti več različnim antibiotikom (Louw in sod., 2009; Molin in Tolker-Nielsen, 2003).

Bakterije na površini biofilma tvorijo posebne molekule MSCRAMM (angl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), ki jim olajšajo naselitev in pritrnitev na površino, kjer so najbolj zaščitene pred škodljivimi dejavniki iz okolja, kot so vdor baktericidnih sredstev, izsušitev, osmotski šok (Davey in O'Toole, 2000).

Bakterije se v biofilmu na stresne okoljske dejavnike, kot je npr. vdor protimikrobnega sredstva, lahko prilagodijo tudi z ekspresijo stresnih genov. Sintetizirajo posebne beljakovine, ki spremenijo fenotip bakterije. (Fux in sod., 2005).

Vzrok za zmanjšano občutljivost bakterij v biofilmu na antibiotike so lahko tudi upočasnjeni presnovni procesi, ki so značilni predvsem za bakterije, ki so globlje v biofilmu in imajo manjši dostop do hranil (Smole Možina in sod., 2013). Zaradi tega preidejo v fazo upočasnjene rasti. Na počasi rastoče celice, ki se redko delijo, pa nekateri antibiotiki, kot so npr. betalaktamski, niso učinkoviti (Taraszkievicz in sod., 2013; MDR (angl. multi drug resistance)). Črpalke igrajo pomembno vlogo pri odpornosti biofilma, vendar pri nizkih koncentracijah antibiotika (Brooun in sod., 2000).

Tvorba biofilma poteka v več zaporednih korakih (Slika 4) in zahteva medcelično komunikacijo: (1) približevanje bakterij površini, njihova gibljivost se upočasni; (2) bakterije se reverzibilno in/ali z drugimi, predhodno vezanimi mikrobi, pritrjujejo na površino, tako nastane enoslojni sloj bakterij; (3) začne se tvorba tridimenzionalne strukture z zunajceličnimi polisaharidi in zorenje biofilma; (4) razvoj zrelega biofilma; (5) občasno se del bakterij loči od matice biofilma. Biofilm ni negiben kup celic. Stebre zrelega biofilma prekriva enojna plast površinsko povezanih celic (Kumar in Anand, 1998; Sulaeman in sod., 2010).



Slika 4: Model razvoja biofilma po stopnjah (Cogan in Kenner, 2004).

2.3.1 Dejavniki pritrjevanja bakterij *Campylobacter* spp. na kontaktno površino

Pritrjevanje bakterijskih celic na površino lahko opišemo kot fizikalno-kemijski proces, odvisen od Van der Waalsovih, elektrostatičnih in steričnih sil med površino in bakterijsko celico.

Pritrjevanje bakterij na površino je kompleksen proces, nanj vpliva veliko dejavnikov, kot so fizikalno-kemijske lastnosti celic in podlage, fiziološko stanje celic in struktur na njihovi površini ter okoljski dejavniki (Nguyen in sod., 2012).

Posamezni sevi vrste *C. jejuni* se med seboj po sposobnosti pritrjevanja na površine razlikujejo, kar je posledica hipervariabilnosti homopolimerne regije, ki nosi zapis za površinske molekule, kot so lipooligosaharidi in polisaharidi, ter zapis za modifikacijo strukture površinskih proteinov (Sulaeman in sod., 2010).

Gibljivost je pomemben dejavnik pri tvorbi biofilma predvsem v začetni fazi, pri pritrditvi bakterijskih celic na površino. Pri *C. jejuni* ima pomembno vlogo tudi pri razvoju in zorenju biofilma (Resser in sod., 2007). Gena strukturne komponente flagelina *flaA* in *flaB* sta ključna v začetni fazi nastanka biofilma, pri pritrjevanju bakterijskih celic na podlago (Kalmokoff in sod., 2006). *flaA* mutanti so nesposobni kolonizacije 3 dni starega piščanca in niso sposobni *in vitro* invazije humanih epitelnih celic črevesnega trakta (Ketley, 1997; Carrillo in sod., 2004).

Peb4, poznan tudi kot protein CBF2, je protein, ki je vključen v celično adhezijo, vpliva tudi na izražanje migetalk, gibljivosti, kemotakso in transportni sistem, ki so ključnega pomena pri nastanku biofilma. Odsotnost tega proteina vpliva na zmanjšano zmožnost tvorbe biofilma (Asakura in sod., 2007).

Pomembno vlogo pri sintezi bičkov, gibljivosti in nastajanju biofilma ima tudi posttranskripcijski regulator CsrA (angl. Carbon storage regulator). Je majhen, regulatorni protein, ki lahko sproži ali zavre translacijo mRNA v protein in tako vpliva na izražanje z virulenco povezanega fenotipa *C. jejuni* (Fields in Thompson, 2012).

Campylobacter spp. lahko tvori eksopolimerne polisaharide, ki ostanejo vezani na celice ali pa se izločajo v okolico. Kapsulirani polisaharidi vplivajo na sposobnost pritrjevanja preko sprememb fizikalno-kemijskih lastnosti površine celic, polisaharidi v sluzi pa vplivajo na spremembe lastnosti površine (Jeon in sod., 2009)

2.3.2 Sposobnost tvorbe biofilma

Vzrok za visoko stopnjo kontaminiranosti živil z bakterijo *Campylobacter* ter posledično veliko število primerov izbruhov kampilobakterioze pri ljudeh, kljub zahtevnim pogojem rasti in občutljivosti na vsebnost kisika v okolju, bi lahko bila povezana s sposobnostjo tvorbe biofilma te bakterije (Dykes in sod., 2003).

Biofilm naj bi tako bakterijskim celicam omogočil tudi do dvakrat višjo stopnjo preživelosti v stresnem okolju, kot je prisotnosti raznih razkužil, prisotnost kisika ter nizka temperatura (Joshua in sod., 2006).

Mikroorganizmi iz rodu *Campylobacter* spp. primarno tvorijo enovrstno večcelično združbo (Joshua in sod., 2006), ali pa kolonizirajo že obstoječ biofilm (Hanning in sod., 2008). Lahko pa so tudi del večvrstnega bakterijskega biofilma z različnimi po Gramu pozitivnimi bakterijami (Reeser in sod., 2007), na različnih površinah, ki so običajne predvsem za industrijsko okolje, kot je polivinil klorid (PVC) ali nerjaveče jeklo (Sanders in sod., 2007; Sanders, 2008). Med različnimi sevi *C. jejuni* imajo izolati iz živilsko-predelovalne procesne linije in klinični izolati večjo sposobnost pritrjevanja kot sevi, izolirani neposredno iz živih živali ali njihovih trupov (Reuter in sod., 2010).

Kampilobaktri *in vitro* lahko tvorijo biofilm v treh različnih oblikah (Joshua in sod., 2006): biofilm na trdni površini, biofilm kot mrena v tekočem mediju, ali v obliki flokul, kar je podobno biofilmu v črevesnih kriptah *in vivo* (Murphy in sod., 2006).

Kampilobaktri v biofilmih pod oksidativnim stresom, ob pomankanju hranil in temperaturnih spremembah bolje preživijo v vodnih okoljih, na nerjavečem jeklu ali steklu (Trachoo in sod., 2002).

2.3.2.1 Nerjaveče jeklo kot kontaktna površina za tvorbo biofilma

Velik problem v živilski industriji predstavlja kontaminacija delovne površine s kvarljivci in patogenimi mikroorganizmi. Zato je izbira primerne materiala za proizvodno linijo in opremo v živilsko-predelovalni industriji ključnega pomena (Jullien in sod., 2003). Materiali, ki jih pogosto najdemo v živilsko-predelovalnih obratih, so plastika, guma, cement in nerjaveče jeklo (Zottola in Sasahara, 1994). Poleg mehanskih in protikoroziivnih lastnosti je postal pomemben element uporabljenega materiala »higiensko stanje« površine (nizka stopnja oprijemanja umazanije in ali visoka možnost čiščenja). Za nerjaveče jeklo, ki je kot material pogosto uporabljen v živilski industriji, je dokazano, da je higienško dobro vzdržljivo, predvsem pa je mehansko/fizično stabilno pri različnih temperaturah, z dobro možnostjo čiščenja in visoko odporno proti koroziji.

Nerjaveče jeklo se proizvaja iz več različnih vrst in oblog, ki imajo vpliv na bakterijsko adhezijo zaradi njihovih različnih topografij in fizikalno-kemijskih lastnosti. Glavna razlika med komercialno dostopnimi jekli je v relativni sestavi železa, kroma in niklja.

Avstenitna nerjaveča jekla, ki so iz kroma in niklja kot AISI 304, se pogosto uporabljajo v živilski industriji zaradi visoke korozivne odpornosti proti živilskim izdelkom in detergentom. Nerjavečim jeklom z oznako AISI 316 je dodan molibden, ki še izboljša protikorozijske lastnosti, zato se pogosto uporablja v mlekarški industriji.

Pomemben dejavnik pri nastanku biofilma so tudi lastnosti površine, na katerem bakterija tvori biofilm. Lastnosti, kot so hrapavost, možnost čiščenja, dezinfekcije, hidrofobnost ter odpornost vplivajo na zmožnost tvorbe biofilma in higieno same delovne površine.

Razpoke na površini nerjavečega jekla, ki so vidne z mikroskopijo na atomsko silo, lahko vplivajo na pritrjevanje bakterijskih celic, hkrati pa jih le-te ščitijo pred različnim dezinfekcijskim sredstvom in sili tekočine. Hrapavost površine je pomemben dejavnik pri pritrjevanju bakterijskih celic, čim večja je hrapavost, tem večja je sposobnost pritrjevanja.

Poleg hrapavosti površine nerjavečega jekla je pri pritrjevanju bakterijskih celic pomembna tudi topografija površine. Verran in sod. (2001) ter Julien in sod. (2003) so ugotovili, da ima topografija manjši vpliv na pritrjevanje in število bakterijskih celic v biofilmu, vendar jih lahko ščiti pred odstranitvijo, kar vodi do naknadne kontaminacije.

2.4 METODE DOLOČANJA TVORBE BIOFILMA

Za raziskovanje morfologije, fiziologije in genetike biofilma obstaja široka paleta mikroskopskih, mikrobioloških, molekularno-bioloških, kemijskih in fizikalnih metod (Denkhaus in sod., 2007).

Za naše delo smo glede na namen diplomske naloge izbrali dve metodi:

- metodo določanja biofilma bakterij vrste *C. jejuni* na površini nerjavečega jekla z barvanjem s kristal vijoličnim in spektrofotometričnim merjenjem absorbance barvila v raztopini;
- metodo določanja števila živih celic *C. jejuni* na površini nerjavečega jekla po odstranitvi pritrjenih bakterij s steklenimi kroglicami.

2.4.1 Določanje biofilma s kristal vijoličnim

Za študije biofilmov različnih bakterij je splošno razširjena metoda barvanja v mikrotitrskih ploščicah. Sam sistem proučevanja je podoben zaprtemu sistemu, kjer ni pritoka oziroma odtoka snovi med samim poskusom (Heersink in Goeres, 2003).

Princip metode barvanja s kristal vijoličnim (KV) temelji na obarvanju pritrjenih celic s kationskim barvilom, ki se veže na negativno nabite površinske molekule in polisaharide v zunajceličnem matriksu (Li in sod., 2003). Postopek ne omogoča vizualizacije celic, saj se obarvajo tako žive, kot tudi mrtve celice (Stepanović in sod., 2000). Količina vezanega barvila naj bi bila proporcionalna biomasi, vendar na vezavo lahko vpliva več dejavnikov, kot je struktura, zaradi katere ima barvilo različno difuzijo, morfološke in fiziološke razlike med celicami ter kemijske interakcije barvila z ostalimi snovmi (Niu in Gilberti, 2004). Čeprav velja metoda za široko uporabno, pa zaradi nizke ločljivosti ne velja za najbolj primerno pri določanju adhezivnosti celic rodu *Campylobacter* spp. (Joshua in sod., 2006).

Metoda določanja biofilma z barvanjem s kristal vijoličnim se lahko po posameznih korakih nekoliko razlikuje (Reuter in sod., 2010; Teh in sod., 2010; Reeser in sod., 2007; Siringan in sod., 2011). Razlike med objavljenimi metodami so v uporabljenih koncentracijah barvila, različne so tudi temperature in časi inkubacije ter način in valovna dolžina merjenja absorbance.

Kljub temu pa se poglavitni koraki metode določanja biofilma s KV med omenjenimi avtorji bistveno ne razlikujejo. Namnožena kultura bakterij vrste *C. jejuni* je bila razredčena z gojiščem MHB. Nekateri med njimi (Reuter in sod., 2010; Reeser in sod., 2007) so uporabili gojišče Brucella bujon kot tudi Bolton bujon (Reeser in sod., 2007). Prav tako sta se čas inkubacije in temperatura med prej naštetimi avtorji razlikovala. Tako so Teh in sod. (2010) ter Siringan in sod. (2011) namnoženo kulturo inkubirali 72 ur pri 37 °C v mikroaerobnih pogojih, Reuter in sod. (2010) prav tako pri 37 °C za 48 ur v mikroaerobnih, aerobnih pogojih ter pogojih z 10-% CO₂, Reeser in sod. (2007) pa pri 25 °C in 37 °C za 24, 48 in 72 ur v aerobnih pogojih in pogojih z 10-% CO₂.

Prav tako obstajajo razlike pri spiranju nepritrjenih mikrobnih celic. Uporabljeni so bili MRD (Maximal recovery diluent), ali PBS oziroma sterilna destilirana voda. Sledilo je do 30-minutno sušenje mikrotitrskeske ploščice pri različnih temperaturah (42 °C, 55 °C, 60 °C).

V osušene luknjice mikrotitrne ploščice so nato dodali barvilo kristal vijolično. Same koncentracije in časi učinkovanja barvila so se med avtorji očitno razlikovale. Siringan in sod. (2011) so uporabili 0,1 % raztopino barvila kristal vijolično, ki so ga pustili učinkovati 1 uro; Teh in sod. (2010) so uporabili 0,5 % raztopino kristal vijolično, ki so ga pustili učinkovati 15 min; Reuter in sod. (2010) ter Resser in sod. (2007) pa so uporabili 1 % raztopino barvila, ki so ga pustili učinkovati 30 min oziroma 5 min, nakar je sledilo spiranje nevezanega barvila.

Količino tvorjenega biofilma so Siringan in sod. (2011) ter Teh in sod. (2010) določali z dodatkom 95 % etanola ali 98 % etanola v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici, kateri so potem izmerili absorbanco pri 570 nm ali pa 595 nm. Reuter in sod. (2010) ter Resser in sod. (2007) pa so vezano barvilo raztopili v mešanici acetona in etanola (20 : 80, v/v). Resser in sod. (2007) so nato 100 µl vsebine prenesli iz stare v novo mikrotitrsko ploščico in absorbanco izmerili pri 570 nm. Iz dobljenih meritev absorbanc so nato izračunali količino tvorjenega biofilma na površini.

2.4.2 Določanje biofilma z gojitveno metodo (CFU/mL) na diskih nerjavečega jekla

Z metodo določanja biofilma s štetjem celic so Sanders in sod. (2007), Sanders in sod. (2008), Resser in sod. (2007) določali le žive celice v že formiranem biofilmu.

Določanje količine samega biofilma na nerjavečem jeklu so avtorji opisovali različno. V naši raziskavi smo za osnovo imeli metodo Resser in sod. (2007), ki so v svojem poskusu za določitev v biofilm vezanih celic uporabili epruvete s steklenimi kroglicami in puferizirano fiziološko raztopino. Biofilm s površine diskov je bil nato odstranjen z mešanjem na vrtničniku. Opisana metoda naj bi bila sodeč po rezultatih ena izmed najbolj primernih za izvedbo le-tega, saj popolna odstranitev biofilma v praksi tako ni mogoča. Sanders in sod. (2008) so za določitev količine biofilma (CFU/mL) na diskih iz nerjavečega jekla le-te spirali z 10 mL destilirane vode.

Na ta način so bile celice, vezane na nerjaveče jeklo, odstranjene in tako sproščene v suspenzijo. V suspenziji so Resser in sod. (2007) z metodo štetja na trdnem gojišču MHA določili koncentracijo aktivnih celic, vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu.

2.5 METODE PREPREČEVANA TVORBE BIOFILMA

V praksi so poznane številne metode odstranjevanja in preprečevanja tvorbe biofilma:

- fizikalne metode (super magnetni valovi, ultrazvok, visoke električne pulzacije),
- kemijske metode (razkužila, kot so: perocetna kislina, klorove spojine, jodove spojine, vodikov peroksid, elektrooksidirana voda),
- biološke metode (naravni furani, starter kulture, pridobljene iz mleka),
- encimske metode (Pintarič, 2010).

Pojav odpornosti proti različnim biocidnim sredstvom in drugim spojinam, ki se uporabljajo za preprečevanje tvorbe biofilmov, in predvsem odpornost bakterijskih celic na različne antibiotike predstavlja resen globalni problem za zdravje ljudi. Prav zaradi tega se vse več raziskav posveča iskanju novih protibakterijskih sredstev, ki bi omogočila ponovno delovanje nekoč učinkovitih antibiotikov. Zaradi trenda potrošnikov po nakupu naravnih živil, brez uporabe sintetičnih učinkovin v živilski industriji, se vse več pozornosti posveča odkrivanju naravnih protimikrobnih sredstev (Castillo in sod., 2014).

2.5.1 Protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov

V zadnjem desetletju je močno v razmahu odkrivanje protimikrobnih učinkovin rastlinskega izvora (Das in sod., 2010).

Rastline so bogat vir protimikrobnih učinkovin (Burt, 2004; Klančnik in sod., 2009a) in imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih snovi. Proizvajajo številne sekundarne metabolite, kot so tanini, terpenoidi, alkaloidi in flavonoidi, za katere se je *in vitro* izkazalo, da imajo protimikrobne učinke (Burt, 2004).

Protimikrobni učinek določene rastlinske snovi je odvisen od številnih dejavnikov. Pomembna sta vrsta in struktura spojine ter njen delež, upoštevati pa je potrebno tudi morebitno sinergistično delovanje, če je prisotnih več vrst aktivnih sestavin. Na to vplivajo številni biološki dejavniki (zrelost, sorta, rastni pogoji, ipd.) pa tudi postopki priprave vzorcev in izbira metode za testiranje protimikrobnega učinka (Klančnik in sod., 2009b).

Znano je, da so protimikrobni učinki eteričnih olj in izvlečkov odvisni od kemijske sestave, ki je posledica okolja in razvitosti obrambe rastlin. Na dobro protimikrobno učinkovitost kaže visoka vsebnost fenolnih spojin (Negi, 2012).

Učinki rastlinskih protimikrobnih snovi so lahko različni in se kažejo na fosfolipidnem dvosloju celične membrane, motenem delovanju encimskih sistemov, s poškodbami genskega materiala bakterij ali pa povzročijo peroksidacijo maščobnih kislin. Mehanizmi delovanja mnogih rastlinskih protimikrobnih učinkovin še vedno niso popolnoma znani (Tajkarimi in sod., 2010).

Azijski kontinent nudi pestro izbiro aromatičnih in medicinsko pomembnih rastlin z ustaljeno prakso v tradicionalni medicini. Nekatero azijske države so privlačni botanični vrtovi z bogato rastlinsko biodiverzitetjo, ki spodbuja preučevanje teh dragocenih virov bioloških učinkovin. Samo Kitajska ponuja nabor kar 30.000 vrst višjih rastlin (Handa, 2008).

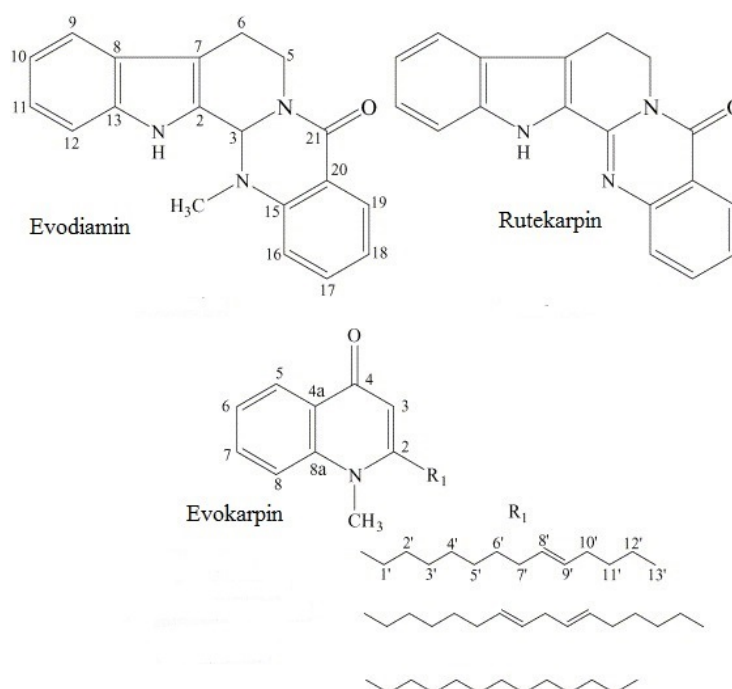
2.5.2 *Evodia rutaecarpa*

Rastline iz družine Rutaceae so bogat vir alkaloidov z antiasmatsko, protivnetno, protibakterijsko in protimalarijsko učinkovitostjo. Vrsta *E. rutaecarpa*, znana tudi pod

imenom *Tetradium ruticarpum*, je znana po vsaj 20 bioaktivnih sestavinah (Wang in sod., 2013).

Evodia rutaecarpa je majhno olesenelo drevo, katerega skoraj zreli sadeži se že vrsto let uporabljajo v tradicionalni kitajski medicini, običajno v kombinaciji z drugimi zdravilnimi rastlinami, za zdravljenje glavobolov, želodčnih razjed, razjed na dvanajstniku, bluvanja, edemov nog, napihnjenosti in diareje (Liu in sod., 2005).

Je bogat vir kinolonov in indolokinazolin alkaloidov z izrazito citotoksično aktivnostjo. Med indolkinazoloni so najpomembnejši dehidroevodiamin, evodiamin, rutekarpin in tudi evokarpin, ki je glavna kemijska komponenta (Huang in sod., 2012).



Slika 5: Struktura primarnih učinkovin izvlečka *Evodia rutaecarpa*: evodiamin, rutekarpin, evokarpin (Liu in sod., 2005).

Protimikrobna aktivnost ekstrakta *E. rutaecarpa* se je pokazala na primeru biofilma bakterije seva *L. monocytogenes* L4 na nerjavečem jeklu pri 37 °C. Pri 8 °C je ekstrakt protimikrobno učinkoval prvih 48 ur, po 72 urah pa v primerjavi s kontrolnim vzorcem, ki ni vseboval ekstrakta, ni bilo protimikrobne učinka (Cerkvenik, 2012).

2.5.3 Odpornost na delovanje protimikrobnih sredstev

Naraščajoče število na protimikrobna sredstva odpornih sevov *C. jejuni* v zadnjih letih predstavlja resen javno zdravstveni problem tako v razvitih državah kot tudi v državah v razvoju. Možnost za razvoj in prenos odpornosti je predvsem posledica uporabe antibiotikov v perutninarstvu in pri zdravljenju ljudi. Med sevi kampilobaktrov je poznana

odpornost na ciprofloksacin in druge fluorokinolone, makrolide in linkosamide, kloramfenikol, aminoglikozide, tetraciklin, ampicilin ter ostale β -laktame, trimetoprim/sulfametoksazol in tilozin (Moore in sod., 2006).

Zaskrbljujoč je tudi porast večkratno odpornih sevov v prehranski verigi, ki so odporni proti dvema ali več različnim antibiotikom in drugim protimikrobnim snovem, npr. žolčnim solem in biocidom (Smole Možina in sod., 2011).

Eden izmed mehanizmov odpornosti na protimikrobna sredstva so membranske izlivne črpalke. Te so sposobne iz bakterijske celice izločiti toksične snovi, kot so različni antibiotiki, dezinfekcijska sredstva, barvila, žolčne soli in težke kovine (Blair in Piddock, 2009).

Genom *C. jejuni* nosi zapis za najmanj 14 izlivnih črpalk iz različnih družin (Jeon in sod., 2011). Med najznačilnejšo izlivno črpalko spada CmeABC, ki jo sestavljajo trije deli: periplazemski povezovalni protein CmeA, transporter na notranji membrani CmeB in proteinski kanalček na zunanji membrani CmeC. Zaradi črpalke CmeABC so bakterije vrste *C. jejuni* intrinzično odporne na različne snovi, kot so žolčne soli, barvila in protimikrobna sredstva, hkrati pa je črpalka bistvena tudi *in vivo* pri kolonizaciji črevesja piščancev. Žolčne soli, ki se nahajajo v črevesju živali in ljudi, delujejo baktericidno, saj uničijo membranski lipidni dvosloj. Mutanti v genu *cmeB* niso sposobni preživeti v črevesju piščancev (Lin in sod., 2002; Lin in sod., 2003; Lin in sod., 2005). Genetski zapis izlivne črpalke je kodiran na *cmeABC* operonu. Izražanje črpalke je regulirano s transkripcijskim represorjem CmeR. Zapis za kodirajoč gen *cmeR* se nahaja navzgor od *cmeABC*. Represija transkripcije se izvaja z direktno vezavo CmeR na obrnjene ponovitve zaporedji v *cmeR* – *cmeA* območju (Lin in sod., 2002).

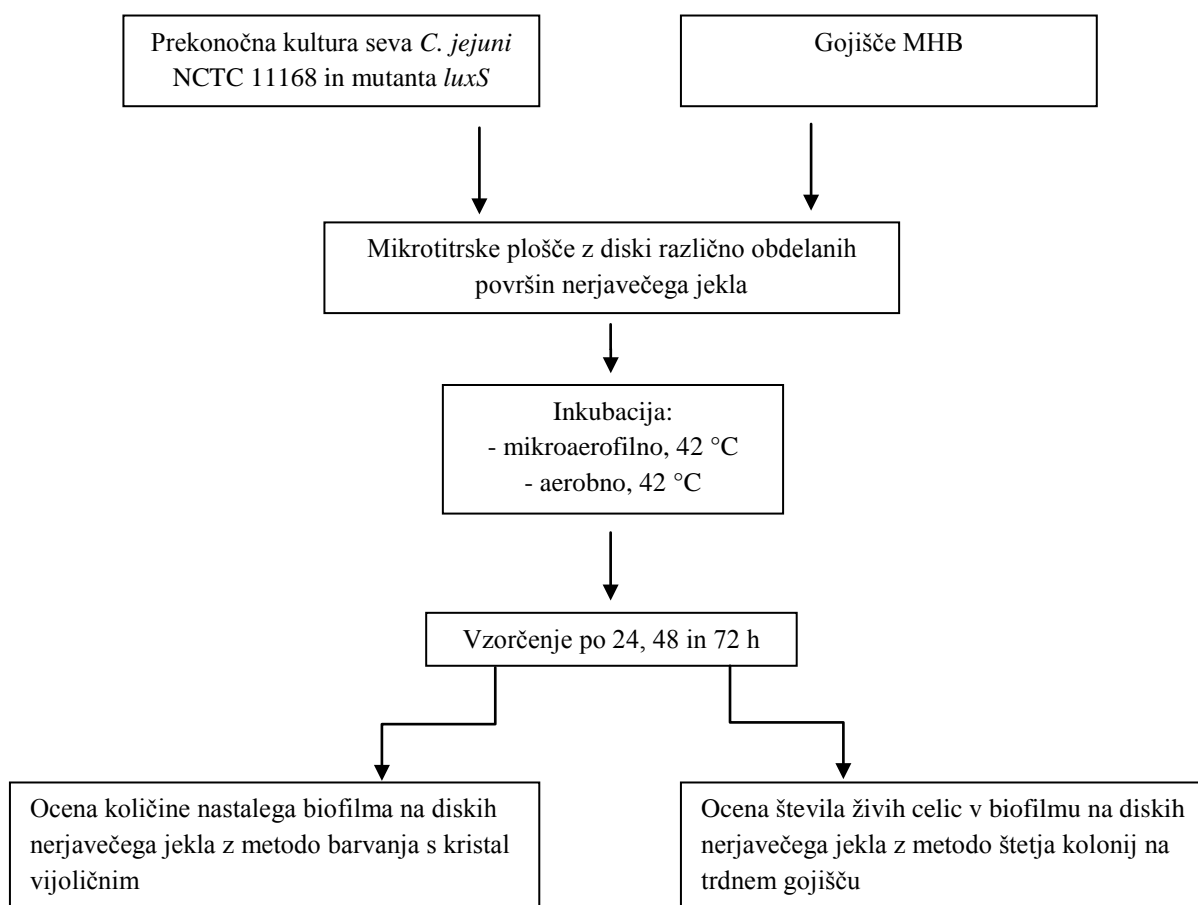
Kurinčič in sod. (2012) so v študiji dokazali, da inaktivacija *cmeB* bakterije *Campylobacter* spp. znatno zniža MIK-azitromicina in tilozina, kar nakazuje na pomembno vlogo CmeABC izlivne črpalke na rezistenco na makrolide.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

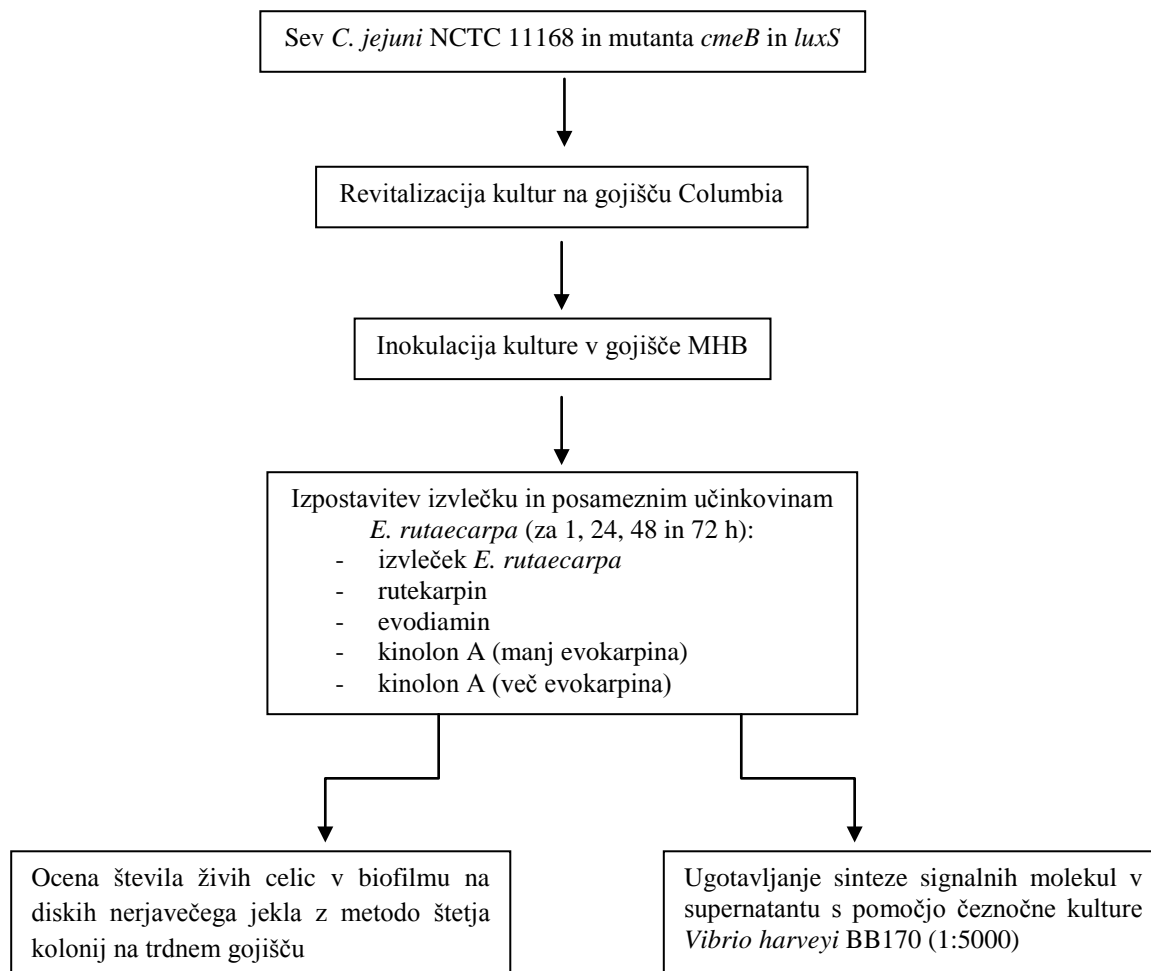
Namen našega dela je bil preveriti uporabnost dveh metod za določanja tvorbe biofilma izbranih sevov *Campylobacter jejuni* na površini nerjavečega jekla. Zaradi manjše občutljivosti bakterij v biofilmu ter pojava in širjenja odpornosti na antibiotike je iskanje alternativnih metod za preprečevanje tvorbe biofilma v porastu. V okviru raziskovalnega dela smo zato preverili učinek izvlečka ter posameznih učinkovin v izvlečku *Evodia rutaecarpa* na tvorbo biofilma *C. jejuni*. Shematski prikaz poteka dela sledi v nadaljevanju.

3.1.1 Določanje tvorbe biofilma *C. jejuni* na različno obdelani površini nerjavečega jekla z metodo barvanja s kristal vijoličnim ter z gojitveno metodo



Slika 6: Shema poteka priprave bakterijske kulture in izvedba spremljanja tvorbe biofilma bakterij *C. jejuni* na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla.

3.1.2 Vpliv izvlečka in posameznih učinkovin *Evodia rutaecarpa* na tvorbo biofilma bakterij *C. jejuni* na površini nerjavečega jekla ter sintezo signalnih molekul



Slika 7: Shema poteka priprave bakterijske kulture in izvedba spremljanja tvorbe biofilma in sinteze signalnih molekul bakterij *C. jejuni* pri izpostavitvi izvlečku in posameznim učinkovinam izvlečka *E. rutaecarpa*.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Delovni mikroorganizem

V sklopu eksperimentalnega dela smo uporabili referenčni sev *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 ter njegova mutanta *luxS* in *cmeB*.

Pri sevu z mutacijo gena *cmeB* je bil na to mesto z insercijsko mutagenozo vstavljen transpozon EZ::tn IN <KAN-2>. Z inaktivacijo tega transportnega proteina je bila zavrnjena tudi aktivnost izlivne črpalke CmeABC, ki sodeluje pri protimikrobni odpornosti (Lin in sod., 2002).

Pri mutantu *luxS* je bila mutacija prav tako povzročena z insercijsko mutagenozo. V gen *luxS* je bil vstavljen kan transpozon. LuxS je protein, ki sodeluje pri sintezi AI-2 signalnih molekul. Spremenjena signalizacija lahko vodi do razlik v gibljivosti, sposobnosti kolonizacije ter virulence (Plummer in sod., 2011).

3.2.2 Skupni izvleček in ostale učinkovine iz plodov *Evodia rutaecarpa*

V poskusih uporabljen izvleček plodu *E. rutaecarpa* ter posamezne učinkovine izvlečka, rutekarpin, evodiamin, kinolon A (manj evokarpina) in kinolon A (več evokarpina), so bile pripravljene na Oddelku za farmakognozijo, Inštituta za farmacevtske znanosti, Univerze v Gradcu, Avstrija. Ločbo učinkovin so izvedli s pomočjo tankoplastne kromatografije. Določitev posameznih učinkovin pa s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

3.2.3 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Tekoče gojišče MHB

Sestavine:

- osnovno gojišče Mueller Hinton Broth (MHB; Oxoid, CM0405),
- destilirana voda.

Priprava:

Natehtali smo 10,5 g osnovnega gojišča, mu dodali 500 mL destilirane vode ter premešali. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C 20 min. Tako pripravljen medij smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.2 Selektivni krvni agar Columbia

Sestavine:

- osnovno gojišče Columbia agar base (Oxoid, CM331),
- dodatek za rast (Oxoid, SR0232E),

- dodatek za selektivnost (Oxoid, SR0069E),
- defibrilirana konjska kri (Oxoid, SR048C),
- destilirana voda.

Priprava:

Natehtali smo 19,5 g osnovnega gojišča, mu dodali 500 mL destilirane vode ter premešali. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C 20 min. Po sterilizaciji smo raztopino ohladili na 50 °C, ter mu v brezprašni komori dodali 1 ampulo rastnega dodatka (Oxoid, SR 0232), 1 ampulo selektivnega dodatka Skirrow (Oxoid, SR0069), ter 25 mL konjske krvi (Oxoid). Tako pripravljeno gojišče smo s krožnim obračanjem premešali ter aseptično razlili v sterilne petrijeve plošče in do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.3 Neselektivno tekoče gojišče BHI

Sestavine:

- osnovno gojišče Brain Heart Broth (BHI, Merck, 110493),
- destilirana voda.

Priprava:

Natehtali smo 18,5 g osnovnega medija BHI, dodali 500 mL destilirane vode ter premešali. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C 20 min. Tako pripravljen medij smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.4 Neselektivno trdno gojišče MHA

Sestavine:

- osnovno gojišče Mueller Hinton Agar (MHA, Oxoid, CM0337),
- destilirana voda.

Priprava:

Natehtali smo 19 g osnovnega medija MHA, dodali 500 mL destilirane vode ter premešali. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C 20 min.

3.2.3 Raztopine, reagenti

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Sestavine:

- 1,25 mL osnovne raztopine KH_2PO_4 (Merck, 104873),
- destilirana voda.

Priprava:

V 1000 mL bučko smo nalili 1,25 mL fiziološke raztopine s koncentracijo 0,034 g KH_2PO_4 /mL destilirane vode in bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake. Tako pripravljeno fiziološko raztopino smo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C 20 min.

3.2.3.3 Druge kemikalije

- Kristal vijolično: (Merck, 115940),
- Etanol (Merck, 100983).

3.2.4 Laboratorijska oprema

Preglednica 1: Laboratorijski material in njihov proizvajalec

| Laboratorijski material | Oznaka | Proizvajalec |
|------------------------------------|--|--|
| Anaerobni lonci, posode | | Oxoid Ago 25 A, Anglija |
| Avtomatske pipete in nastavki | 10 μL , 100 μL , 1000 μL , 10 mL | Eppendorf, Nemčija Gilson, Francija |
| Cepilne zanke (plastične) | | Labor tehnika Golias, Slovenija |
| Diski nerjavečega jekla, kvadratni | 304, 316L | Iskra, Slovenija |
| Diski nerjavečega jekla, okrogli | brušeni | OCG d. o. o., Gadovič, Slovenija |
| Laboratorijske steklenice | 1000 mL | Duran, Nemčija |
| Merilni valji | | Plastibrand, Nemčija |
| Mikrocentrifugirke | | Eppendorf, Nemčija |
| Parafilm | | Pechiney Plastic Packaging Company, ZDA |
| Petrijeve plošče | | Labor tehnika Golias, Slovenija |
| Plastične epruvete | | Eppendorf, Nemčija |
| Pipete, nastavki za pipete | | Eppendorf (Nemčija), Gilson (ZDA) |
| Polistirenske mikrotitrne ploščice | | Nunc, Danska |
| Viale | | Waters, ZDA |
| Steklene čaše in epruvete | | Brand, Nemčija |

Poleg naštetega smo uporabili še splošno laboratorijsko opremo: stojalo za epruvete, pincete, steklene kroglice, štoparice.

Preglednica 2: Aparature in njihovi proizvajalci.

| Aparature | Oznaka | Proizvajalec |
|------------------------------------|---|--|
| Analitska tehtnica | PB 1502-S Sartorius, analytic | Mettler toledo, Švica GMBH, Nemčija |
| Avtoklav | Tip 500 x 700 A-21 | Sutjeska, Beograd Kambič, Slovenija |
| Čitalec mikrotitrskih ploščic | (Tecan Safire 2) | Tecan Trading, AG Švica |
| Digestorij | Tip 382 | Med-lab Rauh, Slovenija |
| Hladilnik | / | Zanussi, Japonska |
| Inkubator | I 150 C | Kambič, Slovenija |
| Mikrovalovna pečica | Cook n'grill 1300 | Sanyo, Japonska |
| Plinski gorilnik | / | / |
| Plinska jeklenka z mešanico plinov | 10-% CO ₂ , 3-% O ₂ , 87-% N ₂ | Istragas, Slovenija |
| Programska oprema | Microsoft office, programski paket Magellan | |
| Stresalnik mikrotitrskih ploščic | Thermomixer comfort | Eppendorf, Nemčija |
| Sušilnik laboratorijske opreme | SO-250 | Elektromedicina, Slovenija |
| Tehtnice | PB 1502-S Sartorius, analytic | Mettler toledo, Švica GMBH, Nemčija |
| Vrtinčno mešalo | Yellowline | Ika, Belgija |
| Zamrzovalna omara -80 °C | | Heto Ultra Freeze, Kanada |
| Zamrzovalnik -18 °C | / | LHT, Slovenija |

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij in priprava inokuluma

Sevi *C. jejuni*, ki smo jih uporabili pri poskusu, so bili shranjeni v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi pri temperaturi -80 °C. Posamezen sev smo nacepili na petrijeve plošče s krvnim agarjem Columbia in jih inkubirali 24 ur pri temperaturi 42 °C v mikroaerofilnih pogojih. Za pripravo inokuluma smo kolonijo posameznega seva na površini trdnega gojišča s cepilno zanko prenesli v 5 mL tekočega gojišča MHB, ki smo mu dodali 0,2 mL defibrilirane konjske krvi. Sledila je inkubacija 24 ur pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih. Po inkubaciji smo prenesli 0,15 mL kulture v 10 mL gojišča MHB. Tako pripravljen inokulum smo uporabili v vseh nadaljnjih poskusih.

Predvidevali smo, da so se bakterije namnožile do koncentracije 10⁷ CFU/mL. Točno koncentracijo smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču MHA. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili kot inokulum za nadaljnji potek eksperimentalnega dela.

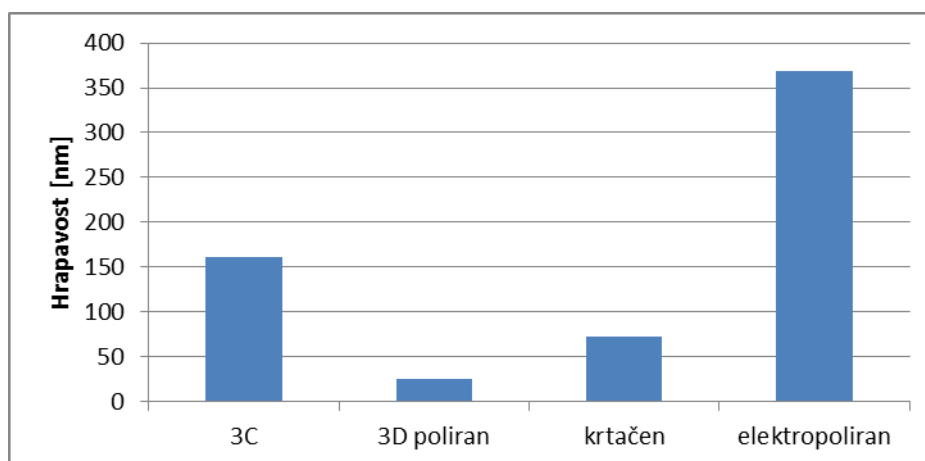
3.3.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije čistih učinkovin in izvlečka *Evodia rutaecarpa*

Za določitev MIK (minimalne inhibitorne koncentracije) čistih učinkovin in izvlečka *Evodia rutaecarpa* smo uporabili mikrodilucijsko metodo oz. metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici. Vse testne učinkovine so bile raztopljene v dimetilsulfoksidu (DMSO). Koncentracija osnovnih raztopin v DMSO pri rutekarpinu, evodiaminu, kinolonu A z več ali manj evokarpina in izvlečku je bila 20,48 mg/mL. Nato smo 50 μ L osnovne raztopine razredčili v 450 μ L MHB in jo uporabili kot najvišjo koncentracijo učinkovine za določanje MIK, ki je potrebna za inhibicijo rasti mikroorganizma. 100 μ L delovne raztopine smo odpipetirali v prvo luknjico na 96-mikrotitrski ploščici (NuncTM, Brand Product, Roskilde, Denmark) in pripravili dvakratne razredčitve učinkovine v MHB. V vse vdolbine mikrotitrskе plošče s pripravljenimi dvakratnimi razredčitvami protimikrobne učinkovine v bujonu smo dodali po 50 μ L premešane standardizirane čiste kulture *C. jejuni*. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili s pokrovom in inkubirali 24 ur v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C. Po inkubaciji smo za določanje MIK uporabili reagent CellTiter-Glo Luminescence Viability assay (Promega). Luminiscenco smo izmerili s čitalcem mikrotitrskih ploščic (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland). Vrednost MIK je najmanjša koncentracija protimikrobnega sredstva, ki po 24 urni inkubaciji zniža metabolno aktivnost testnega organizma. Vse meritve MIK so bile izvedene v dveh ali treh ponovitvah. Kontrolo smo pripravili v gojitvenem mediju samo z bakterijsko raztopino ali kot alternativo samo s protimikrobnim sredstvom in etanolom, z najvišjo koncentracijo v pripravkih. Prisotnost etanola ni izkazala nobene zaviralne učinkovitosti na rast testnega seva.

3.3.3 Priprava kontaktne površine za tvorbo biofilma

Za določitev biofilma na površinah nerjavečega jekla smo uporabili diske (1x1 cm, 2 mm debeline) tipa 304 in 316L. Oba tipa nerjavečega jekla sta zlitini kroma in niklja. Razlikujeta se po kemični sestavi. Diski tipa 316L imajo dodatek 2 % molibdena, ki s kromom tvori molibden karbid, ki je bolj odporen kot samo jeklo s kromom. Zagotavlja tudi večjo odpornost na korozijo klora in oksidacijo. Robovi diskov so polirani, s tem se zmanjša napaka meritev, zaradi zmanjšanje adhezije mikroorganizmov na stranskih površinah. V raziskovalnem delu smo uporabljali štiri različne površine nerjavečega jekla, označenih z 3C kot neobdelana površina, 3D kot polirana površina, diski, ki so bili krtačeni, in elektropolirani diski. Čiste diske smo pred uporabo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

V nadaljnjih eksperimentih preverjanja vpliva izvlečka in posameznih učinkovin *E. rutaecarpa* je bila uporabljena samo neobdelana površina (3C) tipa 304.



Slika 8: Hrapavost (Rq) štirih različno obdelanih površin nerjavečega jekla: neobdelana površina (3C), 3D polirana površina, krtačena površina in elektropolirana površina. Rezultati so pridobljeni z AFM, s profilmerom.

3.3.4 Določanje tvorbe biofilma

3.3.4.1 Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z barvanjem s kristal vijoličnim

Uporabili smo referenčni sev *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 in njegov *luxS* mutant.

Za pripravo inokuluma smo posamezen sev *C. jejuni* nacepili v 20 mL MHB z dodatkom 1 mL krvi in 20 ur inkubirali pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih. Nato smo kulturo bakterij razredčili tako, da smo 10 mL kulture prenesli v 100 mL gojišča MHB (1:10) in vse skupaj premešali. Uporabili smo 24x mikrotitrsko ploščo (6x4). Najprej smo v vsako luknjo aseptično dodali disk nerjavečega jekla (4 paralelke z diski enako obdelane površine). Nato smo v vsako luknjo dodali 4 mL razredčene kulture določenega seva. Kot negativno kontrolo smo uporabili diske določeno obdelane površine z dodatkom gojišča brez bakterijske kulture.

Ta postopek smo ponovili trikrat in tako dobili 3 enake mikrotitrsko plošče; prvo smo inkubirali 24 ur, drugo 48 ur in tretjo 72 ur pri temperaturi 42 °C in mikroaerofilnih pogojih.

Po inkubaciji smo suspenzijo bakterij v mikrotitrski plošči najprej odstranili. Sledilo je spiranje z raztopino fosfatnega pufru (PBS) tako, da smo v vsako luknjo dodali 3 mL te raztopine in nato vsebino zavrgli. Ta postopek smo ponovili trikrat. Za tem je sledila še 10-minutna fiksacija s sušilnikom za lase (~60 °C; 2 stopnja).

V luknjice mikrotitrsko ploščice z osušenimi diski smo dodali po 2 mL 1 % raztopine barvila kristal vijolično. Sledila je 15 minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Barvilo smo nato odstranili in trikrat sprali s 3 mL PBS, ki smo ga po vsakem izpiranju zavrgli.

Sledilo je sušenje diskov, ko so bili ti suhi, smo diske prenesli v 24x mikrotitrsko ploščico, ki smo jo predhodno ustrezno označili.

Nato smo v vsako luknjico na mikrotitrski plošči dodali 300 μ L 96 %-etanola in 2 minuti stresali v stresalniku. Iz vsake luknjice smo prenesli 200 μ L vsebine v novo mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami.

Sledilo je določanje intenzitete raztopljenega barvila s spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri 620 nm. Za vrednotenje količine biofilma smo od izmerjene absorbance za posamezen vzorec odšteli povprečno absorbanco slepega vzorca in nato izračunali povprečje med štirimi paralelkami (Harvey in sod., 2007).

3.3.4.2 Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z gojitveno metodo

Za določanje števila živih celic v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Uporabili smo referenčni sev *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 in njegov *luxS* mutant.

Mikrotitrne plošče z diski nerjavečega jekla različno obdelane površine so bile pripravljene enako kot za postopek določanja tvorbe biofilma s kristal violičnim (3.3.4.1).

Po inkubaciji smo nato supernatant odstranili, diske smo sprali z fosfatno puferno raztopino (PBS, Merck), da smo odstranili nevezane ali slabo vezane celice. Nato smo diske posamično prenesli v sterilne plastične epruvete z 2 mL PBS in s steklenimi kroglicami (~15 kom). Vsebino smo premešali na vrtinčniku 1 min pri 2300 obratih/s. Na ta način smo odstranili celice, vezane na nerjaveče jeklo, in jih tako sprostil v suspenzijo. Razredčitve kultur smo pripravili v fiziološki raztopini in z nacepljanjem razredčitev na ploščah določali CFU/mL.

Zaradi omejene količine različno obdelanih diskov nerjavečega jekla smo lahko gojitveno metodo spremljali le v mikroaerofilnih pogojih in samo v dveh časovnih točkah, to je po inkubaciji 24 in 48 ur. Ker nas je zanimalo, ali je količina biofilma premosorazmerna s številom bakterijskih celic v suspenziji, smo določali tudi število bakterijskih celic v suspenziji.

3.3.4.3 Določanje vpliva izvlečka *E. rutaecarpa* na tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla z gojitveno metodo

Za določanje vpliva izvlečka *E. rutaecarpa* na tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla so bili uporabljeni okrogli diski nerjavečega jekla (okrogli, 12 mm x 1,2 mm) tipa 304.

Uporabili smo mikrotitrne plošče s 24 luknjicami. Najprej smo v vsako aseptično dodali disk nerjavečega jekla. Nato smo v vsako luknjico dodali 2 mL razredčene kulture določenega seva in raztopino izvlečka ali posamezne učinkovine v končni koncentraciji 0,25 MIK, ki smo jo določili tako, kot je opisano v poglavju 3.3.2. Ker smo želeli preveriti antiadheziven učinek posamezne učinkovine, le ta ni bila v bakteriocidini vrednosti, saj nismo želeli, da uniči seve. Kot negativno kontrolo smo diske inkubirali pod istimi pogoji, samo z dodanim sterilnim gojiščem. Mikrotitrne ploščice z diski smo inkubirali pri 42 °C in mikroaerofilni atmosferi 1 uro, 24 ur, 48 ur in 72 ur. CFU/mL kampilobaktrov na kupončkih smo vzorčili po 1 uri, 24, 48 in 72 urah. Najprej smo kupončke sprali s fiziološko raztopino (PBS, Merck), da smo odstranili nevezane ali slabo vezane celice. Nato smo kupončke aseptično prenesli v sterilne plastične epruvete z 2 mL PBS in s steklenimi kroglicami (~15 kom). Vsebinsko smo dobro premešali na vrtinčniku (1 min). Razredčitve kultur smo pripravili v fiziološki raztopini in nacepili na površino trdnega gojišča MHA. Po 48-urni inkubaciji pri 42 °C in mikroaerofilni atmosferi smo prešteli porasle kolonijske enote ter izračunali CFU/mL.

3.3.4.3.1 Določanje sinteze signalnih molekul

Vzporedno z določanjem vpliva izvlečkov *E. rutaecarpa* na tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla smo določili tudi vpliv slednjih na sintezo signalnih molekul AI-2. Sintezo signalnih molekul smo ugotavljali po protokolu Taga (2005) in Vilchez in sod. (2007). Supernatant kultur smo zbirali po 24, 48 in 72 urah inkubacije. Supernatant smo centrifugirali 5 minut pri 9500 g, ga sterilizirali s filtracijo (0,2 µm) in shranili pri -20 °C do uporabe. Za ugotavljanje sinteze signalnih molekul smo razredčeno čeznočno kulturo *Vibrio harveyi* BB170 (1:5000) inokulirali na mikrotitrsko ploščico (90 µL) in dodali 10 µL filtriranega supernatanta. Ploščico smo inkubirali pri 30 °C in merili luminiscenco vsakih 30 minut s čitalcem mikrotitrskih ploščic Tecan-spektrofotometrom za merjenje RFU, dokler supernatant brez *V. harveyi* BB170 ni kazal najnižje luminiscence (240 minut).

3.3.5 Statistično vrednotenje rezultatov

Glede na število ponovitev smo kot najbolj ustrezen test za statistično vrednotenje rezultatov izbrali Mann-Whitneyev test. Tega uporabljamo za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostma za neodvisna vzorca, ko proučevana številka

spremenljivka ni normalno porazdeljena, ali za opisne spremenljivke, merjene na ordinalni skali.

Mann-Whitneyev test in Wilcoxon rank-sum test uporabljamo za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostma za neodvisna vzorca, ko proučevana številska spremenljivka ni normalno porazdeljena, ali za opisne spremenljivke, merjene na ordinalni skali. Testa predstavljata neparametrična ekvivalenta parametričnemu t-testu. Pri obeh testih se vrednosti številske spremenljivke pretvorijo v range, tako da se najmanjši vrednosti pripiše rang 1, naslednji najmanjši rang 2 itd. Za izračun testne statistike se uporabijo vrednosti rangov (Fay in Proschan, 2010).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) ALKALOIDOV IN IZVLEČKA PLODOV *Evodia rutaecarpa* PRI BAKTERIJI *C. jejuni*

Preglednica 3: Vrednost minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) alkaloidov in izvlečka *E. rutaecarpa* pri *C. jejuni* 11168 ter mutantih *luxS* in *cmeB*.

| učinkovina sev | MIK ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|--------------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | rutekarpin | evodiamin | kinolon A (manj evokarpina) | kinolon A (več evokarpina) | izvleček <i>E. rutaecarpa</i> |
| <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 |
| mutant <i>cmeB</i> | 256 | 64 | 16 | 256 | 64 |
| mutant <i>luxS</i> | 1024 | 1024 | 128 | 1024 | 512 |

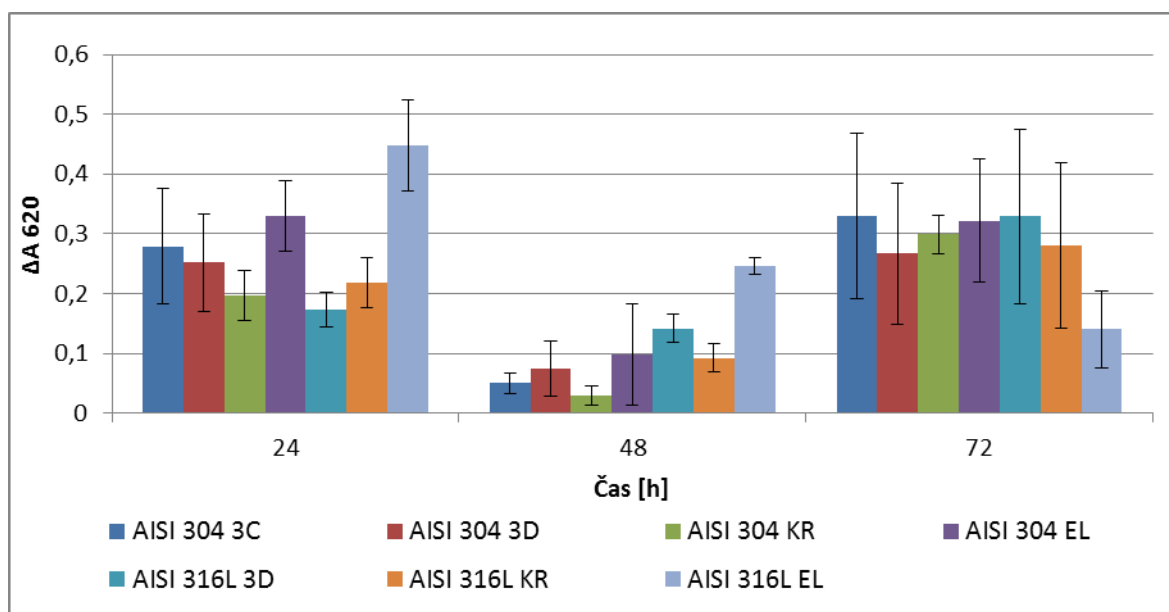
Minimalne inhibitorne koncentracije izbranih alkaloidov in izvlečka *Evodia rutaecarpa* za *C. jejuni* 11168 ter mutanta *luxS* in *cmeB* so prikazane v preglednici 3. Med posameznimi učinkovinami je izkazal najvišjo protibakterijsko učinkovitost kinolon A z manjšo vsebnostjo evokarpina in sicer za *cmeB* mutant MIK = 0,16 $\mu\text{g/mL}$ in za *luxS* mutant MIK = 128 $\mu\text{g/mL}$, nato ji je sledil izvleček *E. rutaecarpa*, ki je imel za *cmeB* mutant MIK = 0,64 $\mu\text{g/mL}$ in za *luxS* mutant MIK = 512 $\mu\text{g/mL}$, kinolon A z višjo vsebnostjo evokarpina ter tudi rutekarpin sta imela za *cmeB* mutant MIK = 256 $\mu\text{g/mL}$ in za *luxS* mutant MIK = 1024 $\mu\text{g/mL}$. Vrednost MIK za divji sev *C. jejuni* je bila enaka za vse testne učinkovine in hkrati najvišja med sevi.

Že predhodno so pokazali, da je sev *C. jejuni* z insercijsko inaktivacijo *cmeB* bolj občutljiv na naravne fenolne spojine od gensko nespremenjenega seva (Klančnik in sod., 2012). Pri določanju vrednosti MIK za vse testirane učinkovine se je prav tako pokazala povečana občutljivost mutanta *cmeB*, kar pa bi lahko pomenilo, da so uporabljene učinkovine substrat izlivne črpalke CmeABC.

4.2 DOLOČANJE TVORBE BIOFILMA

4.2.1 Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z barvanjem s kristal vijoličnim

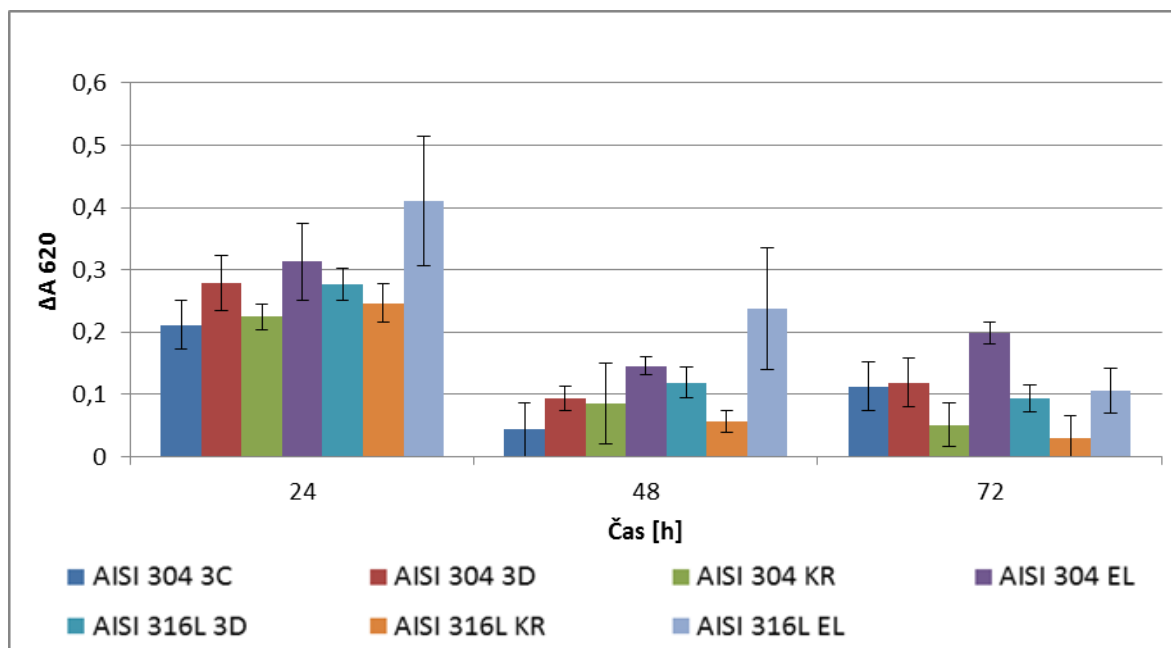
Količino biofilma *C. jejuni* (divji sev NCTC 11168 in *luxS*) na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla smo ugotavljali z metodo barvanja z 1 % raztopino kristal vijoličnega s katerim smo relativno določili količino biofilma, preko nastalih zunanjih polisaharidov na katere se veže barvilo kristal vijolično. Več kot se veže barvila, večja je tvorba biofilma. Tvorbo biofilma smo določali po 24, 48 in 72 urah inkubacije. Rezultati so predstavljeni z vrednostjo ΔA_{620} , kar predstavlja vrednost, ko je negativna kontrola (diski inkubirani samo z medijem) odšteta od vrednosti testnih sevov (Slika 9).



Slika 9: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla *C. jejuni* NCTC 11168 v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim.

Med količino tvorjenega biofilma seva *C. jejuni* NCTC 11168 po 24 urah inkubacije na različno obdelanih površinah nerjavnega jekla ni bilo statistično značilnih razlik. Po 48 urah inkubacije je bila količina nastalega biofilma statistično značilno višja na površini AISI 316L 3D, kot na površini AISI 304 3C in AISI 316L krtačeni. Po 72 urah inkubacije se tvorba biofilma med površinami ni statistično značilno razlikovala.

Arnold in Bailey (2000) poročata, da elektropolirano jeklo znatno zmanjša pritrjevanje bakterijskih celic, prav tako poročata, da je nastanek biofilma na elektropolirani površini počasnejši v primerjavi z neobdelanim jeklom. Tudi Parker in sod. (2003) poročajo o neenakomernem in manj zgoščenem biofilmu termofilnih bacilov na elektropolirani površini nerjavečega jekla. Glede na pridobljene rezultate je bila tvorba biofilma na elektropolirani površini AISI 304 in AISI 316L pri obeh sevih večja. Glede na sliko 8 smo lahko predvidevali, da je elektropolirana površina zaradi največje hrapavosti (370 nm) med vsemi uporabljenimi diski tista površina, na kateri bo prišlo do tvorbe največje količine biofilma.



Slika 10: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla *C. jejuni* mutanta *luxS* v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim.

Količina nastalega biofilma se med sevoma ne razlikuje bistveno. Elvers in Park (2002) navajata, da ima mutant *luxS* podoben čas podvojevanja kot divji sev (103 min mutant *luxS* in 110 minut divji sev). Poleg tega oba seva za prehod v stacionarno fazo potrebujeta približno 20 ur.

Količina nastalega biofilma mutanta *luxS* na različno obdelanih površinah po 24 urah inkubacije prav tako ni bila statistično značilno različna. Po 48 urah inkubacije je bila tvorba biofilma različna med površinama AISI 316L 3D in AISI 316L krtačeni. Po 72-urni inkubaciji je tvorba biofilma različna med površinama AISI 304 3D in AISI 304 KR.

Mutant *luxS* je po 72 urah inkubacije tvoril primerljivo količino biofilma kot po 48 urah, vendar znatno manj kot divji sev. Površini, ki najbolj zavirata nastanek biofilma, sta krtačena 304 in 316L diska. Razlog v manjši količini biofilma v primerjavi z divjim sevom je lahko v mutaciji na genu *luxS*, ki vpliva na sistem za signaliziranje, kar povzroči spremembe v gibljivosti, sposobnosti kolonizacije in posledično na tvorbo manjše količine biofilma (Plummer in sod., 2011).

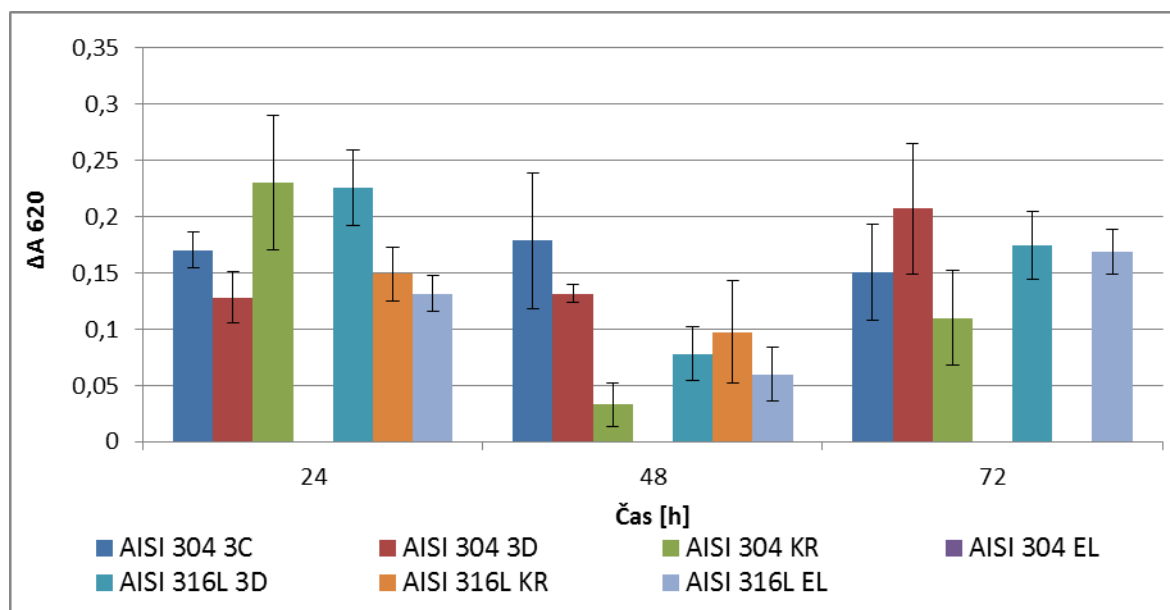
Ugotovili smo, da po 24 urah vzorčenja ni bilo bistvenih razlik v količini tvorjenega biofilma na različnih površinah nerjavečega jekla, nekoliko izstopata le količina biofilma na elektropoliranih površinah AISI 304 in AISI 316L pri obeh sevih, kar smo lahko predvidevali zaradi največje hrapavosti elektropolirane površine (370 nm) med vsemi uporabljenimi diski. Hrapavost površine je pomemben dejavnik pri pritrjevanju bakterijskih celic na nerjaveče jeklo. Površina z jamicami in vdolbinicami, ki imajo enako

velikost kot bakterijska celica, tako zadrži več bakterijskih celic (Verran in Whitehead, 2006) in jih na ta način ščiti pred različnimi detergenti in kemijskimi sredstvi (Palmer in sod., 2007). Prav tako ni bistvene razlike v količini biofilma med sevoma.

Po 48 urah inkubacije pri 42 °C in mikroaerofilnih pogojih se je količina tvorjenega biofilma močno zmanjšala pri obeh sevih. Še vedno pa je bila količina biofilma največja na elektropoliranem disku 316L, sledila sta mu 316L 3D pri divjem sevu ter elektropoliran 304 disk.

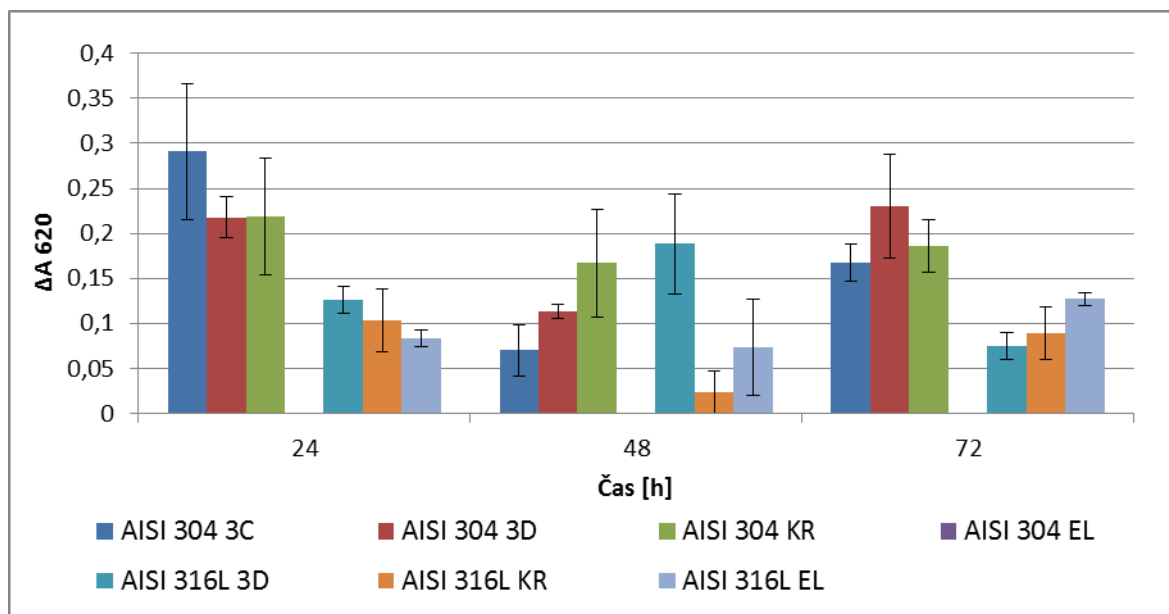
Po 72 urah je bila količina tvorjenega biofilma divjega seva primerljiva tisti po 24 urah oz. celo nekoliko višja. Znatno se je zmanjšala količina biofilma na površini, ki je po 24 in 48 urah veljala za površino, na kateri je divji sev tvoril največ biofilma.

Mutant *luxS* je po 72 urah inkubacije tvoril primerljivo količino biofilma kot po 48 urah, vendar znatno manj kot divji sev. Površini, ki sta najbolj zavirali nastanek biofilma, sta bili krtačena 304 in 316L.



Slika 11: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla *C. jejuni* NCTC 11168 v aerobnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim.

Tvorba biofilma seva *C. jejuni* NCTC 11168 na različno obdelanih površinah ob prisotnosti kisika se je statistično značilno razlikovala le po 24 h inkubacije. Količina nastalega biofilma je bila na površini AISI 304 3D manjša kot na AISI 304 KR (Slika 11).



Slika 12: Količina biofilma na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla *C. jejuni* mutanta *luxS* v aerobnih pogojih pri 42 °C po 24, 48 in 72 urah inkubacije, določena z metodo barvanja s kristal vijoličnim.

Največ statistično značilnih razlik v tvorbi biofilma na različno obdelanih površinah smo lahko odčitali po aerobni inkubaciji mutanta *luxS*. Tako se je po 24-urni inkubaciji tvorba biofilma na površini AISI 304 3D statistično značilno razlikovala od količine biofilma na AISI 316L 3D in AISI 316L krtačeni.

Po 48 urah inkubacije je bila količina nastalega biofilma na AISI 316L krtačeni statistično značilno nižja kot na AISI 304 krtačeni in AISI 316L 3D. Tvorba biofilma je bila na površini AISI 316L 3D statistično značilno višja kot na AISI 304 3C in AISI 316L krtačeni. Tvorba biofilma je bila na površini AISI 304 krtačeni statistično značilno višja kot na površinah AISI 304 3C in AISI 316L krtačeni.

Po 72 urah inkubacije je bila tvorba biofilma na površinah AISI 304 3C in AISI 304 krtačeni statistično značilno višja kot na površinah AISI 316L 3D in AISI 316L krtačeni. Prav tako je bila tvorba biofilma na AISI 316L krtačeni statistično različno nižja kot na površinah AISI 304 3C in AISI 304.

Iz rezultatov je razvidno, da je bila tvorba biofilma obeh sevov na površini nerjavečega jekla v aerobnih pogojih nižja kot v mikroaerofilnih pogojih.

Bakterija *C. jejuni* spada med mikroaerofilne bakterije, vendar Reuter in sod. (2010) beležijo boljšo rast in tvorbo biofilma bakterije *C. jejuni* ravno v aerobnih pogojih. Kot razlog navajajo dobro prilagoditev te bakterijske vrste na okoljske dejavnike v biofilmu, ki je tvorjen pri aerobnih pogojih skozi celotno živilsko proizvodno verigo. Prav tako Rubeša Mihaljević in sod. (2007) ne poročajo o razliki v številu celic, ko so bile 5 in 15 ur

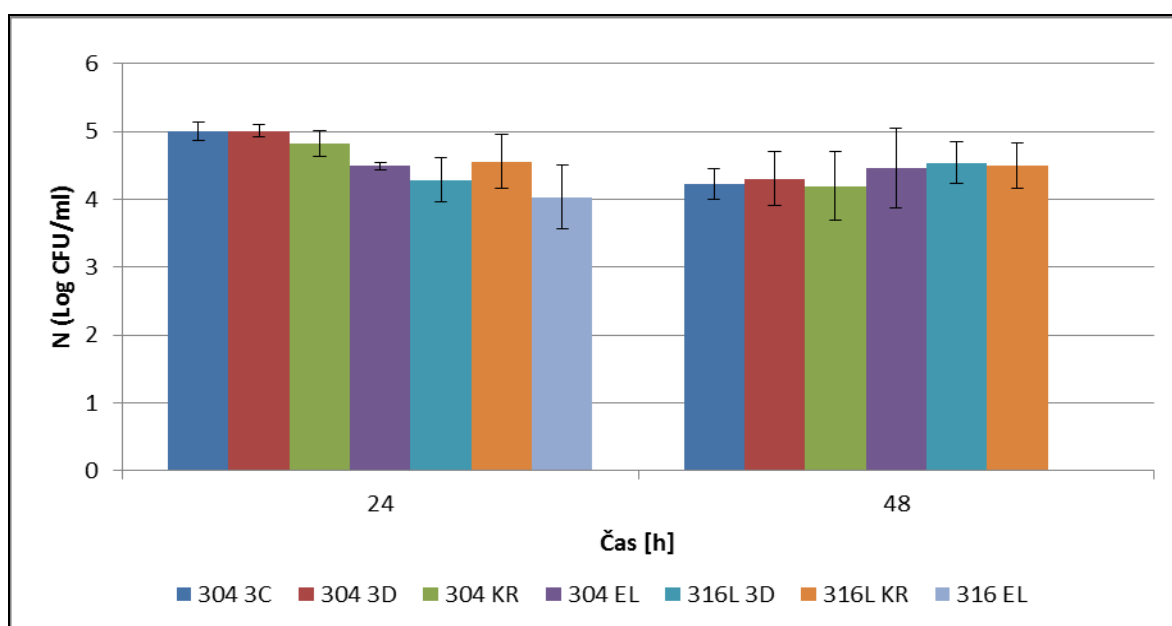
izpostavljenе atmosferškemu kisiku v primerjavi s kontrolno skupino pod mikroaerofilnimi pogoji, kar je v skladu z ugotovitvami, da se lahko *C. jejuni* dolgoročno prilagodi na aerobne pogoje.

Rast *C. jejuni* NCTC 11168 v aerobnih pogojih je odvisna tudi od gostote celic. Kaakoush in sod. (2007) navajajo, da je rast *C. jejuni* pri gostoti celic nad 10^7 CFU/mL celo boljša v aerobnih kot mikroaerofilnih pogojih. Pri gostoti celic med 10^5 in 10^6 CFU/mL je rast podobna v obeh pogojih, pri gostoti pod 10^5 CFU/mL pa je bila rast boljša v mikroaerofilnih pogojih. Pri nizki gostoti celic je prisotnost kisika lahko celo toksična. To lahko povezujemo z medceličnim komuniciranjem, ki deluje bolje, kadar je gostota celic višja, saj komunicirajo preko signalnih molekul in se na ta način zaščitijo pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi.

Tudi pri aerobnih pogojih rasti se je krtačena izvedba diskov 304 in 316 izkazala za površino, ki najbolj inhibira nastanek biofilma. Zanimivo je, da se površina 3D poliranih diskov z najnižjo hrapavostjo ni izkazala kot površina z najmanj tvorjenega biofilma.

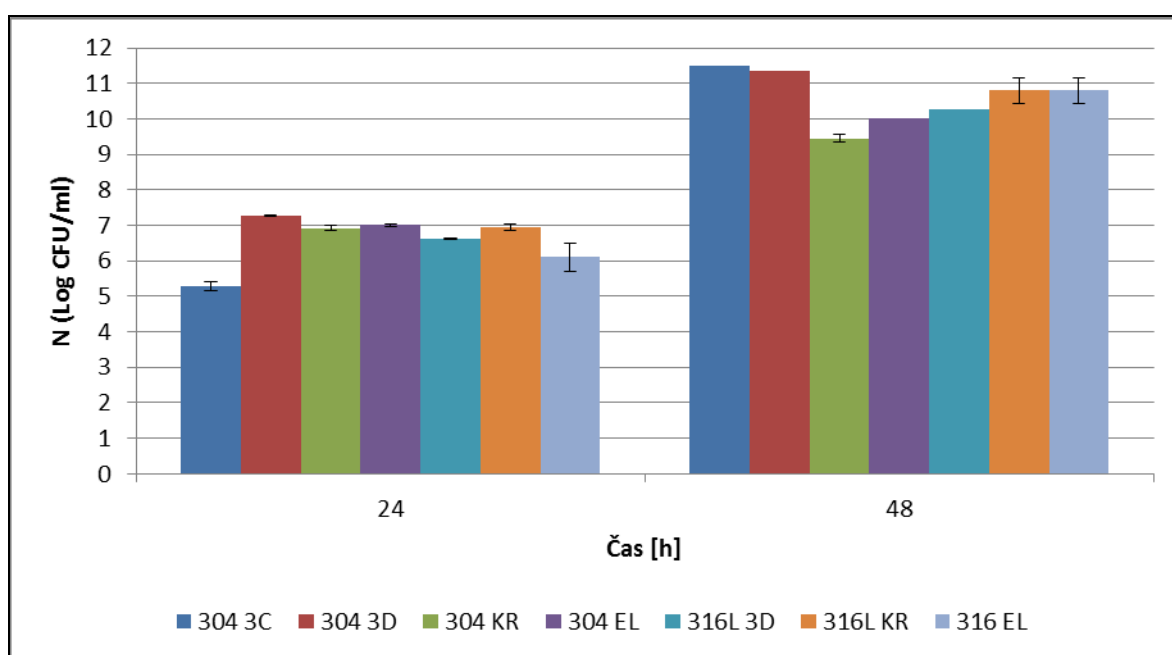
4.2.2 Določanje biofilma na različno obdelanih površinah diskov nerjavečega jekla z gojitveno metodo

V nadaljevanju poskusa smo želeli ugotoviti primerljivost metode barvanja s kristal vijoličnim z gojitveno metodo za določanje količine biofilma. Zanimalo nas je tudi, ali je število bakterijskih celic v suspenziji premosorazmerno s količino tvorjenega biofilma.



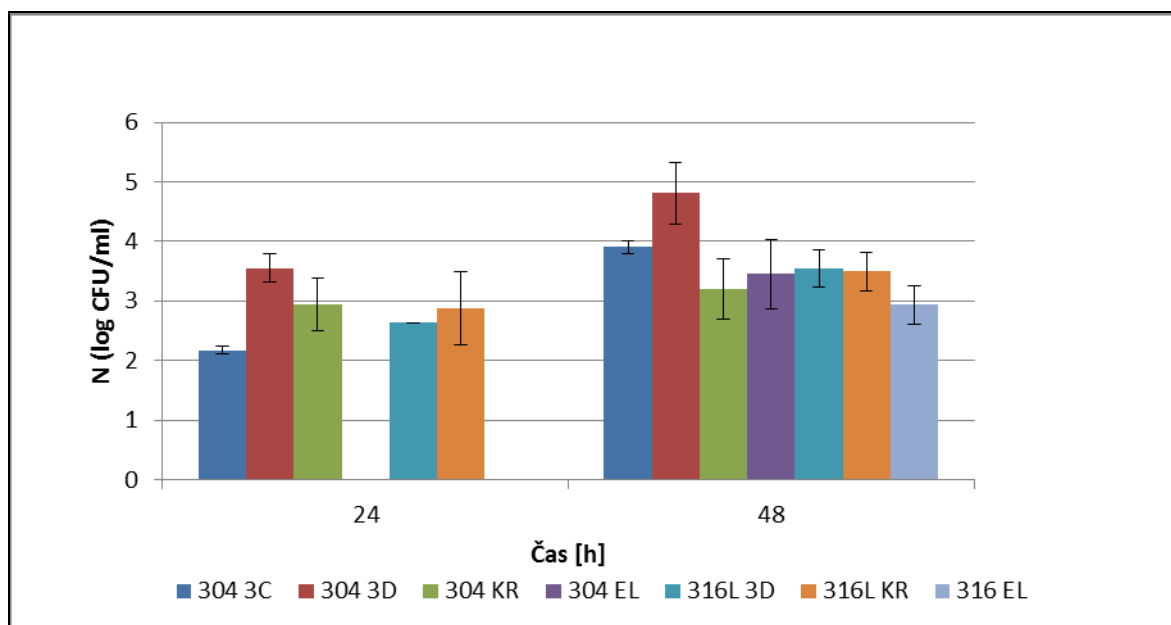
Slika 13: Koncentracija bakterijskih celic *C. jejuni* NCTC 11168 v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo.

Na sliki 13 in 14 so prikazane povprečne koncentracije celic v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla in povprečne koncentracije planktonskih celic *C. jejuni* NCTC 11168. Razvidno je, da je bila koncentracija bakterijskih celic v suspenziji pri obeh časih meritve višja kakor koncentracija celic v biofilmu. Po 48 urah inkubacije se je število bakterijskih celic v suspenziji iz povprečnega števila 6 log CFU/mL povečalo na 10 log CFU/mL, število bakterijskih celic, vezanih v biofilmu, pa se ni spremenilo. Iz slednjega lahko sklepamo, da tvorba biofilma *C. jejuni* NCTC 11168 na površini nerjavečega jekla ni premosorazmerna z gostoto celic v suspenziji.



Slika 14: Koncentracija bakterijskih celic *C. jejuni* NCTC 11168 v suspenziji nad različno obdelanimi diski nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo.

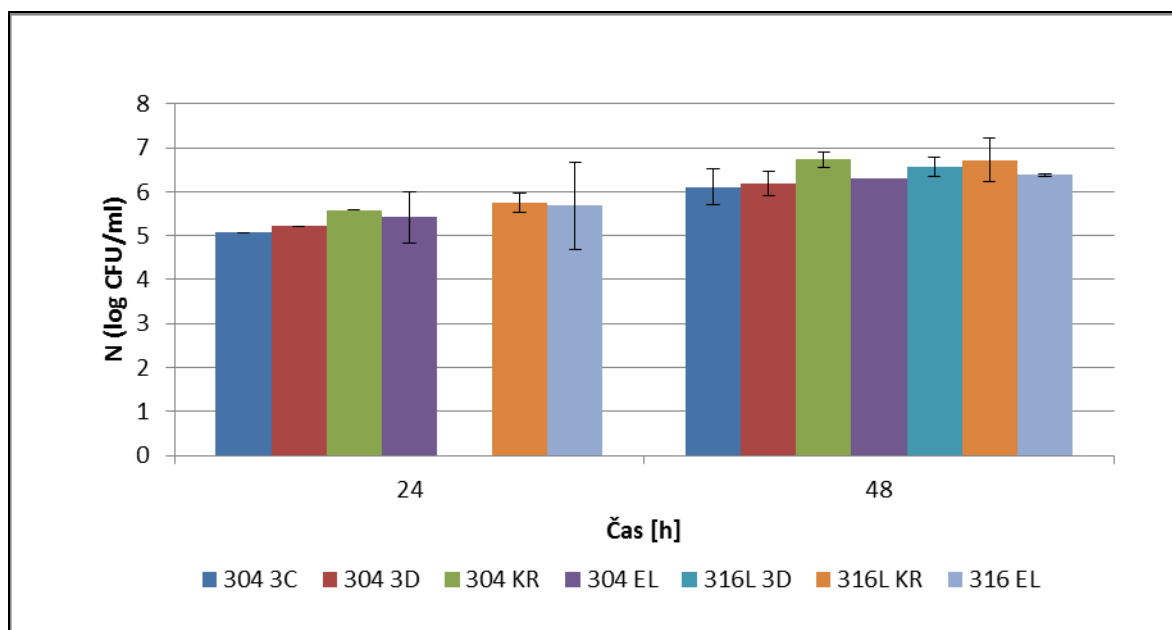
Če primerjamo količino biofilma, določenega z metodo barvanja s kristal vijoličnim, in količino biofilma, določenega z gojitveno metodo, opazimo razliko med metodama. Po 24 urah je sicer določitev biofilma pri obeh metodah podobna. Pri gojitveni metodi ni bistvene razlike v količini tvorjenega biofilma *C. jejuni* NCTC 11168 na različno obdelanih površinah. Najmanjša količina biofilma je bila po 24 urah inkubacije določena prav na 316 elektropoliranem disku, ki je pri metodi z barvanjem s kristal vijoličnim veljala za površino z največjo anfineteto do tvorbe biofilma ravno po 24 urah. Prav tako pri gojitveni metodi ni opaziti zmanjšanja tvorbe biofilma po 48-urni inkubaciji, kot je to vidno pri metodi barvanja s kristal vijoličnim.



Slika 15: Koncentracija bakterijskih celic *C. jejuni* mutanta *luxS* v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo.

Na sliki 15 in 16 so prikazane povprečne koncentracije celic v biofilmu na različno obdelanih diskih nerjavečega jekla in povprečne koncentracije planktonskih celic *C. jejuni* mutanta *luxS*. S slike 16 je razvidno, da je bila koncentracija planktonskih celic v primerjavi s celicami v biofilmu višja za 2 log CFU/mL pri obeh časih. Količina določenega biofilma se je povečevala premosorazmerno s količino bakterijskih celic v suspenziji.

Pri primerjavi količine biofilma mutanta *luxS* ponovno opazimo neprimerljivost metod. Pri metodi določanja biofilma z barvanjem s kristal vijoličnim je mutant *luxS* po 48 urah tvoril manj biofilma kot po 24 urah, pri gojitveni metodi pa se je količina biofilma nekoliko povečala. Prav tako ni bilo očitne razlike v količini biofilma na različnih površinah. Slednje bi bilo lahko posledica nezadostne občutljivosti metode določanja števila živih celic na površini nerjavečega jekla. Čeprav so bile površine različno obdelane, je bila razlika še vedno premajhna, da bi določili statistično značilno različno število kampilobaktra. Dejavnik vpliva je verjetno tudi velikost bakterij, saj so se morebiti zadržale na področjih, kjer steklene kroglice uporabljenih dimenzij celic niso mogle odstraniti s površine.

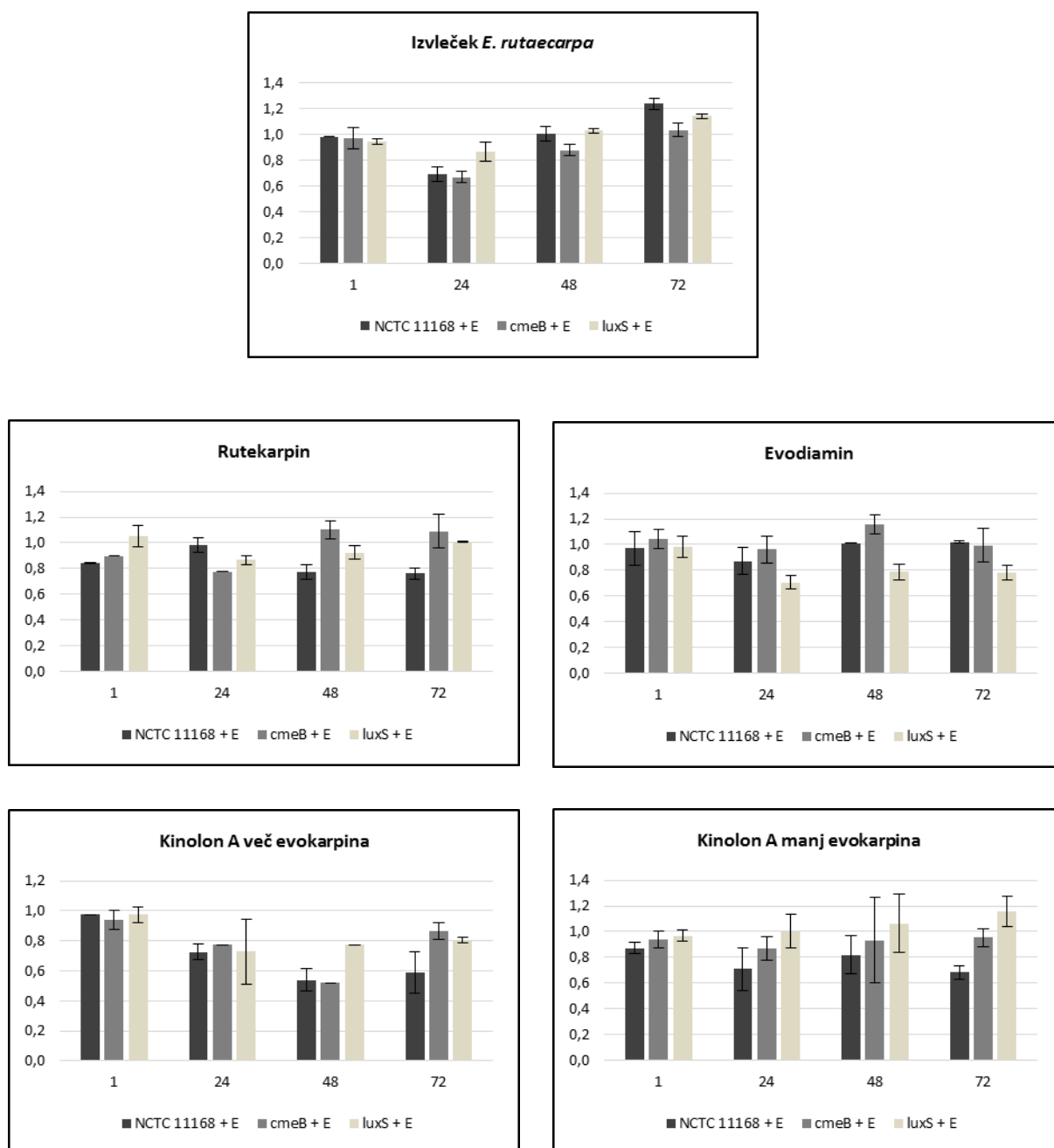


Slika 16: Koncentracija bakterijskih celic *C. jejuni* mutanta *luxS* v suspenziji nad različno obdelanimi diski nerjavečega jekla v mikroaerofilnih pogojih pri 42 °C po 24 in 48 urah inkubacije, določena z gojitveno metodo.

4.2.3 Določanje vpliva izvlečkov *E. rutaecarpa* na tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla

Želeli smo določiti vpliv izvlečka plodu rastline *Evodia rutaecarpa* in izoliranih učinkovin izvlečka na adhezijo bakterijskih celic *C. jejuni* NCTC 11168 (divji sev, mutant *cmeB* in mutant *luxS*) na neobdelano površino nerjavečega jekla tipa 304. Želeli smo preveriti tudi vpliv mutanta na tvorbo biofilma v primerjavi z divjim sevom *C. jejuni* ob dodatku izvlečka *E. rutaecarpa*. Vsi pripravki so bili uporabljeni v koncentraciji 0,25 MIK, ki smo jo določili tako, kot je opisano v poglavju 3.3.2.

Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo živih celic v biofilmu na nerjavečem jeklu bakterij *C. jejuni* (NCTC 11168, mutant *luxS* in *cmeB*).



Slika 17: Vpliv izvlečka in posameznih učinkovin *E. rutaecarpa* na tvorbo biofilma seva *C. jejuni* NCTC 11168 in mutantov *luxS* ter *cmeB* po 1, 24, 48 in 72 urah inkubacije pri 42 °C in mikroaerofilnih pogojih, relativno na pozitivno kontrolo (pod istimi pogoji inkubirani sevi, brez dodatka učinkovin).

Iz rezultatov na sliki 17 je razvidno, da se kažejo inhibitorni učinki tvorbe biofilma izvlečka *E. rutaecarpa* ali posameznih učinkovin pri vseh treh sevih. Najizrazitejše znižanje bakterijskih celic pri vseh petih uporabljenih učinkovinah se je pojavilo po 24 urah delovanja, medtem ko je število celic po 48 urah inkubacije ponovno naraslo. Le v primeru delovanja kinolona A z več evokarpina se je število celic, vezanih v biofilmu, še dodatno zmanjšalo po 48 urah inkubacije.

Kinolon A z več in manj evokarpina je imel najmočnejši inhibitorni vpliv na tvorbo biofilma na sev *C. jejuni* NCTC 11168.

Glede na študije drugih avtorjev smo predvidevali, da bodo uporabljene učinkovine *E. rutaecarpa* imele največji učinek na mutante *cmeB*, saj je inaktivacija proteina CmeB povezana z odpornostjo na protimikrobne snovi. Prav tako pa je imel mutant *cmeB* najnižje vrednosti MIK, tudi 16-krat nižjo vrednost MIK učinkovine evodiamina v primerjavi z referenčnim sevom in mutantom *luxS*. Naša predvidevanja se v eksperimentalnih pogojih niso potrdila.

Dodatki posameznih učinkovin in izvlečka *E. rutaecarpa* so imeli najmanjši učinek na znižanje koncentracije celic v biofilmu na mutanta *luxS*. Glede na podatke o MIK in navedbi Plummerja (2012) o podobni rasti z divjim sevom NCTC 11168 pa smo pričakovali podobne rezultate na odpornost. Na mutanta *luxS* je najbolj vplivala učinkovina evodiamina tudi po 72 urah inkubacije. Prav tako Korošec (2012) ne ugotavlja posebnega vpliva rožmarinskega izvlečka na oslabiljeno rast bakterijskih celic in je le-ta primerljiva z referenčnim sevom. Znano je, da je sistem LuxS vpleten predvsem v mehanizem odpornosti proti stradanju, saj tako omogoči boljše zaznavanje stresnih pogojev in ustrežno prilagoditev (Elvers in Park, 2002).

Glede na rezultate, prikazane na sliki 17, lahko zaključimo, da je dodatek izvlečka in posameznih učinkovin imel inhibitorni učinek na tvorbo biofilma po 24 urah. Najvišji inhibitorni učinek na tvorbo biofilma in hkrati na tvorbo signalnih molekul je imel kinolon A z več evokarpina.

4.2.4 Določanje signalnih molekul

Proizvedeno količino zunajceličnih signalnih molekul AI-2 bakterij *C. jejuni* 11168 ter mutantov *cmeB* in *luxS* smo določili v supernatanu z merjenjem indukcije luminiscence s pomočjo poročevalskega seva bakterije *Vibrio harveyi* BB170. Kot kontrola nam je služil vzorec, kjer smo dodali zgolj gojišče in poročevalski sev.

Preglednica 4: Sinteza signalnih molekul pri bakterijah *C. jejuni* in mutantih *cmeB*, *luxS* v bujonu MH, v prisotnosti subinhibitornih koncentracij (0,25 MIK) čistih učinkovin in izvlečka *Evodia rutaecarpa*.

| | | TESTIRANI SEVI oz. MUTANTI | | |
|--|--------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| | čas inkubacije (h) | NCTC 11168 | mutant <i>luxS</i> | mutant <i>cmeB</i> |
| | | enote luminescence (RLU) | | |
| Kontrola | 24 | 1739±332 | 32±8 | 3723±679 |
| | 48 | 4548±620 | 52±8 | 4812±551 |
| | 72 | 2736±229 | 72±12 | 3495±337 |
| Izvleček <i>Evodia rutaecarpa</i> | 24 | 15±3 | 16±2 | 41±5 |
| | 48 | 82±7 | 18±4 | 3258±571 |
| | 72 | 276±27 | 25±5 | 2137±80 |
| Kinolon-A (manj evokarpina) | 24 | 89±9 | 57±8 | 124±26 |
| | 48 | 194±27 | 86±20 | 6245±919 |
| | 72 | 1215±131 | 88±17 | 5078±471 |
| Evodiamin | 24 | 536±299 | 40±6 | 4622±464 |
| | 48 | 1680±248 | 52±10 | 3072±81 |
| | 72 | 3287±233 | 53±16 | 2801±166 |
| Kontrola | 24 | 348±41 | 19±4 | 98±19 |
| | 48 | 7754±740 | 30±5 | 6622±1498 |
| Kinolon-A (več evokarpina) | 24 | 3839±985 | 31±7 | 28±5 |
| | 48 | 54±10 | 32±6 | 23±9 |
| Kontrola | 24 | 538±40 | 16±4 | 129±38 |
| | 48 | 11262±359 | 32±5 | 9714±1677 |
| Rutekarpin | 24 | 24±7 | 34±11 | 16±6 |
| | 48 | 5253±936 | 30±6 | 6534±286 |

Vseh pet testiranih učinkovin *E. rutaecarpa* je imelo vpliv na medcelično signaliziranje, in sicer tako, da so zmanjšale bioluminiscenco v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Najmočnejši vpliv na zmanjšanje tvorbe signalnih molekul AI-2 je imel izvleček *E. rutaecarpa* pri divjem sevu kot tudi pri mutantu *luxS*. Od posameznih učinkovin je na zaviranje tvorbe signalnih molekul najbolj deloval kinolon A z več evokarpina, ki je po 48 urah inkubacije drastično znižal bioluminiscenco pri *C. jejuni* 11168, hkrati pa je znižal bioluminiscenco tudi pri *cmeB* mutantu. Najmanjši učinek na zaviranje tvorbe signalnih molekul pa je imel evodiamin.

Kot je razvidno iz preglednice 4, je mutant *luxS* tvoril manjšo količino AI-2 signalnih molekul pri vseh testiranih učinkovinah izvlečka *E. rutaecarpa* in vseh časih inkubacije. V primeru *luxS* mutantu je luminescenca najmanjša tudi v kontrolnem vzorcu in je relativno glede na kontrolo v večini testiranih učinkovin in časih inkubacij večja kot pri *C. jejuni*

11168 in *cmeB* mutantu. To je zaradi tega, ker je bil signal moten s prisotnostjo ekstrakta, ki je fluoresciral.

Elvers in Park (2002) pri bakteriji *C. jejuni* opažata nižjo bioluminiscenco AI-2 molekul pri bakteriji z insercijo mutacije na genu *luxS* v primerjavi z divjim sevom, čeprav se mutant *luxS* od divjega seva bakterije ni razlikoval v stopnji rasti bakterije, odpornosti na oksidativni stres ali na *in vitro* teste na invazijo. Opazna je bila le razlika v zmanjšani gibljivosti v primerjavi z divjim sevom.

Naravne protimikrobne snovi so se že v mnogih študijah izkazale kot zaviralci QS-signaliziranja, predvsem pri patogenih bakterijah. Naši rezultati so v skladu s tistimi iz drugih študij, kjer so se naravni izvlečki izkazali kot zaviralci aktivnosti molekul AI-2 pri patogenih bakterijah, prenosljivih s hrano, kot so *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bai in Vittal, 2014). Cinamaldehyd in njegovi derivati vplivajo na širok spekter QS-signaliziranja v povezavi s tvorbo biofilma pri bakterijah *Pseudomonas aeruginosa* in tvorbo signalnih molekul AI-2 pri bakterijah *Vibrio* spp (Brackman in sod., 2008). Prav tako furo-kumarini v grenivki vplivajo na zaviranje aktivnosti AI-1 in A-2 molekul pri bakteriji *V. harveyi* in posledično na nastanek biofilma patogenih bakterij kot so *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* in *Pseudomonas aeruginosa* (Girenavar in sod., 2008). Flavonoidi v citrusih motijo QS-sistem in vplivajo na povezane fiziološke procese (Truchado in sod., 2012)

4.3 SPLOŠNA RAZPRAVA O POVEZANOSTI TVORBE BIOFILMA IN CELIČNEGA SIGNALIZIRANJA

Eden izmed ciljev opravljene raziskave je bil tudi ta, da smo podrobneje raziskali morebitno povezavo med tvorbo biofilma na površini nerjavečega jekla in celičnim signaliziranjem oz. količino izmerjenih AI-2 molekul pri bakterijah *C. jejuni*. Nekatere študije namreč poročajo, da bi lahko ciljanje na sistem signaliziranja bila nova strategija proti okužbam z biofilmom (Nazzaro in sod., 2013). Glede na rezultate (slika 17 in preglednica 4) naše študije sinteze signalnih molekul ob prisotnosti subinhibitornih koncentracij čistih učinkovin in izvlečka *E. rutaecarpa* ter količino tvorbe biofilma na površini nerjavečih diskov ne moremo povsem sklepati, da gre za neposredno povezavo med tema dvema dejavnikoma. Vendar na primeru kinolona A z več evokarpina, kot sredstvu, ki je imelo največji inhibitorni učinek, lahko pri divjemu tipu po 48 urah opazimo padec enot luminiscence s 3839 na 54, hkrati pa se tudi količina biofilma zniža za 0,2. Prav tako lahko pri divjemu sevu opazimo v prisotnosti izvlečka *E. rutaecarpa* premosorazmerno povezavo med količino izmerjenih enot luminiscence, ki od 24 ur do 72 ur po inkubaciji naraste s 15 na 276 enot, s tem pa se zviša količina biofilma za 0,5. Zvišanje sinteze signalnih molekul v času inkubacije hkrati pa tudi zvišanje količine biofilma opazimo tudi pri *luxS* mutantu v primeru izvlečka *E. rutaecarpa* kot inhibitorne

učinkovine. V primeru rutekarpina pri divjemu sevu pa se enote luminiscence zvišajo s 24 na 5253, medtem ko se količina biofilma zmanjša za nekoliko več kot 0,2. Podobno je tudi pri učinkovini evodiamina. Raziskave sicer kažejo, da vpliv na QS-sistem posledično vpliva na zaviranje virulence in tvorbo biofilma predvsem s hrano prenosljivih bakterij, kot je *C. jejuni* (Castillo in sod., 2014), kar bi lahko znatno izboljšalo varnost na področju hrane. Prav tako Duarte in sod. (2015) v študiji vpliva resveratrola na tvorbo biofilma in sistema signaliziranja opažajo, da se prav zaradi vpliva na sistem signaliziranja opazi znaten vpliv pri samem oblikovanju in vzdrževanju biofilma bakterij rodu *Campylobacter*.

Možnosti zavrtja tvorbe biofilma in QS-mehanizma z uporabo naravnih protimikrobnih učinkovin bi potencialno lahko izboljšale varnost z zaščito živil pred patogenimi bakterijami, s tem pa se zmanjša tveganje za zdravje ljudi. V naši študiji smo potrdili učinkovitost protimikrobnega delovanja naravnih rastlinskih izvlečkov iz plodov rastline *E. rutaecarpa* v obliki zaviranja adhezije in filmotvornosti, kot so to dokazali že različni avtorji za nekatere druge rastlinske materiale. Izvleček *E. rutaecarpa* in posamezne učinkovine so vplivale tudi na sintezo signalnih molekul, ki so jo inhibirale. Vendar pa nismo mogli povsem dokazati neposredne povezave med tema dvema dejavnikoma. Sklepamo lahko, da so vzroki lahko v slabi občutljivosti metod, ki smo jih uporabljali, in bi jih bilo potrebno v nadaljevanju dela optimizirati. To velja tako za kvantifikacijo tvorbe biofilma pri kampilobaktrih kot tudi za merjenje signalnih molekul. Tako filmotvornost kot sinteza signalnih molekul, ki smo ju spremljali s posrednimi metodami, pa sta odvisni tudi od številnih drugih dejavnikov, ki so bili najverjetneje razlog, da izmerjenih rezultatov inhibicije obeh pojavov nismo mogli neposredno povezati. Kljub vsemu pa rezultati določeno povezanost potrjujejo, saj se je tako pri zaviranju filmotvornosti kot celičnega signaliziranja najbolje izkazala učinkovina z večjo koncentracijo evokarpina, v obeh primerih inhibicije pa je bil uspešen tudi izvleček plodu *E. rutaecarpa*.

Če povzamemo, so naravni rastlinski izvlečki zagotovo ena izmed prihodnjih usmeritev v preprečevanju kontaminacije in hkrati nastanka biofilma. Seveda pa v živilski industriji ne smemo pozabiti na primerno izbiro delovne površine, ki je lahko glavni dejavnik pri naknadni kontaminiranosti živil. To smo dokazali tudi v naši študiji, saj se je površina nerjavečega jekla z najmanjšo hrapavostjo izkazala za pomemben dejavnik pri zaviranju nastanka in tvorbe biofilma.

5 SKLEPI

- Pri pogojih izvedbe našega eksperimenta rezultati med uporabljenima metodama določanja tvorbe biofilma, to sta bili gojitvena (CFU/mL) in spektrofotometrična metoda (barvanje s kristal vijoličnim), niso bili neposredno primerljivi.
- Izvleček iz plodov rastline *Evodia rutaecarpa*, kot tudi vse testirane učinkovine izvlečka, so imele zaviralni učinek na tvorbo biofilma bakterij *C. jejuni*, tako divjega tipa kot obeh testiranih mutantov. Najmočnejši zaviralni učinek je imela učinkovina kinolon A z več evokarpina, relativno dobro učinkovit pa je bil tudi skupni izvleček.
- Material in površina vplivata na tvorbo biofilma. Največji vpliv na tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu ima hrapavost površine. Elektropolirani površini z največjo hrapavostjo med izbranimi površinami sta se izkazali kot površini z največjo afiniteto za tvorbo biofilma.
- Izvleček iz plodov rastline *Evodia rutaecarpa*, kakor tudi vse testirane učinkovine izvlečka, so imele tudi zaviralni učinek na tvorbo signalnih molekul bakterij *C. jejuni*. Enako kot pri zaviranju tvorbe biofilma je imela najmočnejši zaviralni učinek učinkovina kinolon A z več evokarpina, učinkovit pa je bil tudi izvleček *E. rutaecarpa*.

6 POVZETEK

Mikrobiološka varnost živil je izjemno pomembna, saj vpliva na kakovost živila, če ni zagotovljena v vseh stopnjah živilske verige, lahko ogrozi zdravje potošnikov. Današnja živilska industrija in njena tehnologija na trgu ponuja na tisoče različnih artiklov, med katerimi potrošnik izbira. Med najbolj tvegane in najpogostejše okužbe s hrano sodijo tiste, ki jih povzročajo črevesne bakterije.

Zaradi visokega pojavnosti odpornosti mikroorganizmov proti antibiotikom in različnim razkužilom ter razvoja odpornih fizioloških oblik mikrobnih celic, hkrati pa vse večje ozaveščenosti potrošnikov o pomenu uporabe naravnih snovi skozi celotno živilsko verigo, se vse več pozornosti posveča novim protimikrobnim snovem iz različnih rastlinskih materialov.

Biofilmi, ki nudijo zaščito bakterijam pred neugodnimi okoljskimi dejavniki, predstavljajo velik problem v živilski industriji. Nastajanje biofilmov predstavlja posebne razmere, ki omogočajo mikroorganizmom, da so obstojni ob običajnih postopkih sanitacije na različnih površinah. Zato je material za izbiro delovne površine v živilski industriji ključnega pomena za varno in kakovostno živilo. Površine morajo biti čim bolj odporne na korozijo, gladke in brez razpok, da se zmanjšuje možnost mikrobne adhezije.

V naši raziskavi smo analizirali vpliv izvlečka plodov rastline *Evodia rutaecarpa* v koncentraciji 0,25 MIK na tvorbo biofilma bakterije vrste *C. jejuni* NCTC 11168 in mutantov *luxS* in *cmeB* na diskah nerjavečega jekla. Zanimalo nas je tudi, katera posamezna učinkovina izvlečka ima najmočnejši zaviralni učinek na tvorbo biofilma ter hkrati na sintezo signalnih molekul. Ugotovili smo, da so skupni izvleček iz plodov rastline *Evodia rutaecarpa* kot tudi vse testirane učinkovine izvlečka imele zaviralni učinek, tako na tvorbo bakterijskega biofilma kakor tudi na tvorbo signalnih molekul bakterij *C. jejuni*. Med posameznimi učinkovinami, ki smo jih testirali, je največjo inhibitorno učinkovitost na tvorbo biofilma in tudi na sintezo signalnih molekul izkazala učinkovina kinolon A z več evokarpina. Relativno dobro učinkovit je bil tudi skupni izvleček. Z opravljenimi poskusi nismo mogli dokazati neposredne povezave med količino sinteze signalnih molekul in tvorbo biofilma.

Preizkusili smo tudi vpliv različno obdelane površine nerjavečega jekla na inhibicijo tvorbe biofilma ter preverili primerljivost dveh metod za kvantifikacijo tvorbe biofilma. Ugotovili smo, da ima hrapavost površine oz. obdelava nerjavečega jekla pomemben vpliv na tvorbo biofilma. Gojitvena metoda in metoda barvanja s kristal vijoličnim pa pod pogoji izvedbe našega eksperimenta nista izkazali primerljivih rezultatov tvorbe biofilma.

7 VIRI

- Allos B. M. 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1201–1206.
- Arnold J. W., Bailey G. W. 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Pollution Science*, 79: 1839–1845.
- Asakura H., Yamasaki M., Yamamoto S., Igimi S. 2007. Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters*, 275: 278–285.
- Bai A. J., Vittal R. R. 2014. Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their *in vivo* efficacy in food systems. *Food Biotechnology*, 28: 269–292.
- Bassler B. L., Wright M., Showalter R. E., Silverman M. R. 1993. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology*, 9: 773–786.
- Bassler B. L., Greenberg E. P., Stevens A. M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 179: 4043–4045.
- Bassler B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 6: 582–587.
- Blair J. M., Piddock L. J. 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 5: 512–519.
- Blana V. A., Nychas G. J. 2014. Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 173: 1–8.
- Brackman G., Defoirdt T., Miyamoto C., Bossier P., van Calenbergh S., Nelis H., Coenye T. 2008. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiology*, 8: 149, doi:10.1186/1471-2180-8-149: 14 str.

- Brooun A., Liu S., Lewis K. 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 640–646.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253.
- Carrillo C. D., Taboada E., Nash J. H. E., Lanthier P., Kelly J., Lau P. C., Verhulp R., Mykytczuk O., Sy J., Findlay W. A., Amoako K., Gomis S., Willson P., Austin J. W., Potter A., Babiuk L., Allan B., Szymanski C. M. 2004. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 20327–20338.
- Castillo S., Heredia N., Arechiga-Carvajal E., García S. 2014. Citrus extracts as inhibitors of quorum sensing, biofilm formation and motility of *Campylobacter jejuni*. *Food Biotechnology*, 28, 2: 106–122.
- Cerkvenik M. 2012. Vpliv okoljskih dejavnikov in seva bakterij vrste *Listeria monocytogenes* na tvorbo biofilma. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 50 str.
- Chmielewski, R. A. N., Frank J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety*, 2: 22–32.
- Cogan N. G., Keener J. P. 2004. The role of the biofilm matrix in structural development. *Mathematical Medicine and Biology*, 21, 2: 147–166.
- Das K., Tiwari R. K. S., Shrivastava D. K. 2010. Techniques for the evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plant Research*, 4, 2: 104–111.
- Davey M. E., O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847–867.
- Denkhaus E., Meisen S., Telgheder U., Wingender J. 2007. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchimica Acta*, 158, 1-2: 1–27.
- Duarte A., Alves A. C., Ferreira S., Silva F., Domingues F. C. 2015. Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2015.05.047: 7 str. (v tisku)

- Dykes G. A., Sampathkumar B., Korber D. R. 2003. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 1: 1–10.
- EFSA. 2013. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. *EFSA Journal* 11, 4: 3129, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3129: 250 str.
- EFSA. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 *EFSA Journal*, 13, 1: 3991, doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991: 165 str.
- Elvers K. T., Park S. F. 2002. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a luxS encoded signalling molecule. *Microbiology*, 148: 1475–1481.
- El-Shibiny A., Connerton P., Connerton I. 2009. Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 2-3: 197–202.
- Engbrecht J., Silverman M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81, 13: 4154–4158.
- Fields J. A., Thompson S. A. 2012. *Campylobacter jejuni* CsrA complements an *Escherichia coli* *csrA* mutation for the regulation of biofilm formation, motility and cellular morphology but not glycogen accumulation. *BMC Microbiology*, 12: 233, doi:10.1186/1471-2180-12-233: 10 str.
- Fay P. M., Proschan A. M. 2010. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics Surveys*, 4: 1–39.
- Fux C. A., Costerton J. W., Stewart P. S., Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13: 34–40.
- Ganan M., Silván J. M., Carrascosa A. V., Martínez-Rodríguez A. J. 2012. Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. *Food Control*, 24: 6–14.
- Girenavar B., Cepeda M. L., Soni K. A., Vikram A., Jesudhasan P., Jayaprakasha G. K., Pillai S. D., Patil B. S. 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits

- autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 204–208.
- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Minervini F., Limitone A. 2007. Cell-cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 1-2: 34–35.
- Gözl G., Sharbati S., Backert S., Alter T. 2012. Quorum sensing dependent phenotypes and their molecular mechanisms in *Campylobacteriales*. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2, 1: 50–60.
- Gruntar I., Biasizzo M., Kušar D., Pate M., Ocepek M. 2015. *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. *Food Microbiology*, 50: 97–101.
- Guerry P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15: 456–461.
- Handa S. S. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. V: *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Handa S. S., Singh Khanuja S. P., Longo G., Rakesh D. D. (eds.). Trieste, International Centre for Science and High Technology: 21–54.
- Huang X., Li W., Yang X. 2012. New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Fitoterapia*, 83: 709–714.
- Hanning I., Jarquin R., Slavik M. 2008. *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal Applied of Microbiology*, 105: 1199–1208.
- Henke J. M., Bassler B. L. 2004. Three parallel quorum sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 186: 6902–6914.
- Heersink J., Goeres D. 2003. Reactor design considerations. V: *The biofilm laboratory: Step-by-step protocols for experimental design, analysis, and data interpretation*. Hamilton M., Heersink J., Buckingham-Meyer K., Goeres D. (eds.). Bozeman, Cytergy Publishing: 13–15.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 237–257.

- Ishida H., Ishida Y., Kurosaka Y., Otani T., Sato K., Kobayashi H. 1998. *In vitro* and *in vivo* activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 1641–1645.
- Jackson D. N., Davis B., Tirado S. M., Duggal M., Frankenhuyzen J. K., Deaville D., Wijesinghe M. A. K., Tessaro M, Trevors J. T. 2009. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 377–394.
- Jeon B., Itoh K., Misawa N., Ryu S. 2003. Effects of quorum sensing on *flaA* transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology*, 47: 833–839.
- Jeon B., Muraoka W., Scupham A., Zhang Q. 2009. Roles of lipooligosaccharide and capsular polysaccharide in antimicrobial resistance and natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 3: 462–468.
- Jeon B., Muraoka T. W., Zhang Q. 2010. Advances in *Campylobacter* biology and implications for biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 3: 242–258.
- 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.
- Jullien C., Bénézecha T., Carpentier B., Lebret V., Faille C. 2003. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56, 1: 77–87.
- Joshua G. W., Guthrie-Irons C., Karlyshev A. V., Wren B. W. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152: 387–396.
- Kaakoush N. O., Miller W. G., De Reuse H., Mendz G. L. 2007. Oxygen requirement and tolerance of *Campylobacter jejuni*. *Research in Microbiology*, 158: 644–650.
- Kaakoush N. O., Hazel M. Mitchell H. M., Man M. 2015. *Campylobacter*. V: Molecular medical microbiology. 2nd ed. Tang Y., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. (eds.). San Diego, Academic press: 1187–1236.
- Kalmokoff M., Lanthier P., Tremblay T. L., Foss M., Lau P. C., Sanders G., Austin J., Kelly J., Szymanski C. M. 2006. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168

- biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 188: 4312–4320.
- Ketley J. M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143: 5–21.
- Klančnik A., Guzej B., Hadolin Kolar M., Abramovič H., Smole Možina S. 2009a. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8:1744–1752.
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009b. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petkovič H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-157.
- Klančnik A., Smole Možina S., Zhang Q. 2012. Anti-*Campylobacter* activities and resistance mechanisms of natural phenolic compounds in *Campylobacter*. *PloS One*, 7, 12: e51800, doi: 10.1371/journal.pone.0051800: 10 str.
- Kumar C. G., Anand S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9–27.
- Kurinčič M., Klančnik A., Smole Možina S. S. 2012. Epigallocatechin gallate as a modulator of *Campylobacter* resistance to macrolide antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 5: 467–471.
- Li X., Yan Z., Xu J. 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149: 353–362.
- Ligowska M., Cohn M. T., Stabler R. A., Wren B. W., Brondsted L. 2011. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. *International Journal of Food Microbiology*, 145, Suppl. 1: S111–S115.
- Lin J., Michel L. O., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2124–2131.
- Lin J., Sahin O., Michel L. O., Zhang Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 71: 4250–4259.

- Lin J., Cagliero C., Guo B., Barton Y. W., Maurel M. C., Payot S., Zhang Q. 2005. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 187, 21: 7417–7424.
- Liu R., Chu X., Sun A., Kong L. 2005. Preparative isolation and purification of alkaloids from the Chinese medicinal herb *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1074, 1–2: 139–144.
- Louw G. E., Warren R. M., Gey van Pittius N. C., McEvoy C. R. E., Van Helden P. D., Victor T. C. 2009. A balancing act: Efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 8: 3181–3189.
- Man S. M. 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8: 669–685.
- Molin S., Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 13: 255–261.
- Moore J. E., Barton M. D., Blair I. S., Corcoran D., Dooley J. S., Fanning S. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes and Infection*, 8: 1955–1966.
- Murphy C., Carroll C., Jordan K. N. 2006. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 623–632.
- Nadell C. D., Xavier J. B., Levin S. A., Foster K. R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 6, 1: e14, doi: 10.1371/journal.pbio.0060014: 9 str.
- Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R. 2013. Quorum sensing and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6: 12607–12619.
- Negi P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156: 7–17.
- Nguyen V. T., Fegan N., Turner M. S., Dykes G. A. 2012. Role of attachment to surfaces on the prevalence and survival of *Campylobacter* through food systems. *Journal of Food Protection*, 75, 1: 195–206.

- Niu C., Gilberti E. S. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12: 6951–6956.
- O'Toole G., Kaplan H., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54: 49–79.
- Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34: 577–588.
- Painter J. A., Hoekstra R. M., Ayers T., Tauxe R. V., Braden C. R., Angulo F. J. 2013. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 3: 407–415.
- Park S. F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177–188.
- Parker S. G., Flint S. H., Brooks J. D. 2003. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli– potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30: 553–560.
- Pei D., Zhu J. 2004. Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 5: 492–497.
- Pintarič Š. 2010. Obstočnost biofilmov. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 4, 2: 31–38.
- Plummer P., Zhu J., Akiba M., Pei D., Zhang Q. 2011. Identification of a key amino acid of LuxS involved in AI-2 production in *Campylobacter jejuni*. *PloS One*, 6, 1: e15876, doi: 10.1371/journal.pone.0015876: 9 str.
- Plummer P. J. 2012. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 22, doi: 10.3389/fcimb.2012.00022: 9 str.
- Quinones B., Miller W. G., Bates A. H., Mandrell R. E. 2009. Autoinducer-2 production in *Campylobacter jejuni* contributes to chicken colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 281–285.
- Rasmussen T. B., Givskov M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 2-3: 149–161.

- Reeser J. R., Medler T. R., Billington J. S., Jost H. B., Joens A. L. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1908–1913.
- Reuter M., Mallett A., Pearson B. M., van Vliet A. H. M. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2122–2128.
- Rowe M. T., Madden R. H. 2000. *Campylobacter*: Introduction. V: *Encyclopedia of food microbiology*. Vol. 1. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D. (eds.). London, Academic press: 335–357.
- Rubesa Mihaljevic R., Sikic M., Klančnik A., Brumini G., Smole Mozina S., Abram M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43, 2–3: 120–125.
- Sanders, S. Q., Boothe D. H., Frank J. F., Arnold J. W. 2007. Culture and Detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 70: 1379–1385.
- Sanders S. Q., Frank J. F., Arnold J. W. 2008. Temperature and nutrient effects on *Campylobacter jejuni* attachment on multispecies biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 71: 271–278.
- 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.
- Siringan P., Connerton P. L., Payne R. J. H., Connerton I. F. 2011. Bacteriophage-mediated mispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 3320–3326.
- Skirrow M. B. 2003. *Campylobacteriosis*. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Finglas M. P. (eds.). London, Academic press: 790 – 799.
- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 91–98.

- Smole Možina, S., Klančnik, A., Raspor, P. 2013. Mechanisms of microbial resistance in biofilms. V: Biofilms in bioengineering. Simões M., Mergulhão F. (eds.). New York, Nova Science Publishers: 311-332.
- 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.
- Stepanović S., Irkovi I., Mija V., Vabi-Vlahovi M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. Food Microbiology, 20: 339–343.
- Sulaeman S., Le Bihan G., Rossero A., Federighi M., De E., Tresse O. 2010. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test. Journal of Applied Microbiology, 108, 4: 1303–1312.
- Sybiya Vasantha Packiavathy I. A., Agilandeswari P., Musthafa K. S., Karutha Pandian S., Veera Ravi A. 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. Food Research International, 45, 1: 85–92.
- Taga M. E. 2005. Methods for analysis of acerial autoinducer-2 production. Current Protocols in Microbiology, 00, Unit 1C.1: 1C.1.1-1C.1.8, doi: 10.1002/9780471729259.mc01c01s23: 8 str.
- Taraszkiewicz A., Fila G., Grinholc M., Nakonieczna J. 2013. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. BioMed Research International, 2013: ID 150653, doi.org/10.1155/2013/150653: 13 str.
- Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21: 1199–1218.
- Teh K. T., Flint S., French N. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. International Journal of Food Microbiology, 143: 118–124.
- Trachoo N., Frank J. F., Stern N. J. 2002. Survival od *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. Journal of Food Protection, 65: 1110–1116.
- Truchado P., Giménez-Bastida J. A., Larrosa M., Castro-Ibáñez I.,

- (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 8885–8894.
- Verran J., Whitehead K. A. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84, C4: 253–259.
- Vilchez R., Lemme A., Thiel V., Schulz S., Sztajer H., Wagner-Döbler I. 2007. Analysing tracers of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 489–496.
- Wang X., Zang K., Shic S., Zeng K., Jiang Y., Guand Y., Xiaod C., Gao H., Wu L., Tu P. 2013. Quinolone alkaloids with antibacterial and cytotoxic activities from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Fitoterapia*, 89: 1–7.
- Wilson D. J., Gabriel E., Leatherbarrow A. J., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E. 2008. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genetics*, 4, 9: 1000203, doi: 10.1371/journal.pgen.1000203: 9 str.
- Winzer K., Hardie K. R., Williams P. 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now — gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology*, 5: 216–222.
- Young K. T., Davis L. M., Dirita V. J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 9: 665–79.
- Zhang J., Rui X., Wang L., Guan Y., Sun X., Dong M. 2014. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Food Control*, 42: 125–131.
- Zottola E. A., Sasahara K. C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry—should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23, 2:125–48

ZAHVALA

*»Skoraj nikogar ni, ki bi bil povsem brez nadarjenosti.
Izobrazba jo odkrije,
Pridnost jo nadgradi,
Značaj jo ohrani.«*

(Curt Goetz)

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in delovni mentorici Katji Bezek za strokovno vodenje, nasvete, pomoč in motivacijo pri opravljanju magistrske naloge.

Hvala tudi recenzentki prof. dr. Heleni Abramovič za natančen in strokoven pregled magistrske naloge.

Hvala Tini in Alenki, ki ste me v času študija in ob pisanju magistrske naloge spodbujali in podpirali, ter za vse prijetne trenutke, ki smo jih preživele za študijskimi klopmi.

Mami in ati, od srca se vama zahvaljujem, ker sta me med študijem finančno in moralno podpirala. Hvala za vse spodbudne besede, potrpežljivost in čustveno podporo.