

UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej

**Rola genów *cydB* i *hydC* w procesie
tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni*.**

mgr Jakub Korkus

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej prof. UPWr
w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław 2024

*Niniejszą pracę dedykuję
Rodzicom i rodzeństwu*

Składam najserdeczniejsze podziękowania mojej Promotorce dr hab. inż. Ewie Wałeckiej-Zacharskiej za nieocenioną pomoc naukową, poświęcony czas, wsparcie merytoryczne i cierpliwość w trakcie całego procesu badawczego. Jej cenne uwagi, konstruktywna krytyka i nieustająca motywacja były dla mnie ogromnym wsparciem.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do prof. dr hab. Jacka Bani za cenne uwagi i sugestie, które przyczyniły się do ostatecznego kształtu pracy doktorskiej.

Serdeczne podziękowania dla dr hab. Grzegorza Chodaczka, dr hab. inż. Pawła Migdała oraz dr Emila Palucha za nieocenioną pomoc w prowadzonych badaniach.

Serdecznie dziękuję Rodzicom za ich nieustające wsparcie, zrozumienie i motywację oraz za ich miłość i wiarę w moje możliwości.

Pragnę również podziękować Koleżankom i Kolegom z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Konsumenta za życzliwość, pomoc i stworzenie rodzinnej atmosfery.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	6
Streszczenie	8
Abstract	10
1. Wstęp	12
1.1 Wprowadzenie	12
1.2 Epidemiologia	15
1.3 Patogeneza	17
1.4 Biofilm bakteryjny	20
1.5 Biofilm <i>C. jejuni</i>	21
1.6 Mutageneza za pośrednictwem transpozonu	24
2. Cel pracy	27
3. Materiały i metody	28
3.1 Materiały	28
3.1.1 Odczynniki chemiczne	28
3.1.2 Enzymy	29
3.1.3 Antybiotyki i chemioterapeutyki przeciwbakteryjne	29
3.1.4 Bufory i roztwory	30
3.1.5 Gotowe zestawy odczynników	30
3.1.6 Podłoża mikrobiologiczne	31
3.1.7 Oligonukleotydy	32
3.1.8 Szczepy bakteryjne i plazmidy	34
3.1.9 Oprogramowanie	35
3.1.10 Aparatura	35
3.2 Metody	36
3.2.1 Hodowla bakterii	36
3.2.2 Przygotowanie komórek elektrokompetentnych <i>C. jejuni</i>	36
3.2.3 Losowa mutageneza za pomocą transpozonu	37
3.2.4 Hodowla biofilmu <i>C. jejuni</i>	37
3.2.5 Identyfikacja genów przerwanych przez transpozon	37
3.2.6 Izolacja genomowego DNA	39
3.2.7 Konstrukcja mutantów delecyjnych	40
3.2.7.1 Otrzymanie plazmidów pJK101 i pJK102	41
3.2.7.2 Otrzymanie plazmidów pJK102 i pJK202	42

3.2.7.3 Otrzymanie plazmidów pJK103 i pJK203.....	45
3.2.7.4 Wprowadzenie zmutowanego allelu do <i>C. jejuni</i> DRH212.....	47
3.2.7.4.1 Elektroporacja I.....	47
3.2.7.4.2 Elektroporacja II.....	48
3.2.8 Komplementacja otrzymanych mutantów	49
3.2.8.1 Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i> DH5 α /pRK212.1.....	52
3.2.8.2 Koniugacja <i>Campylobacter jejuni</i> z <i>E. coli</i>	53
3.2.9 Colony PCR.....	54
3.2.10 Izolacja plazmidów	55
3.2.11 Sekwencjonowanie plazmidów	56
3.2.12 Określenie zdolności tworzenia biofilmu uzyskanych mutantów w warunkach statycznych.....	56
3.2.13 Określenie zdolności ruchu uzyskanych mutantów	56
3.2.14 Krzywa wzrostu.....	56
3.2.15 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).....	57
3.2.16 Konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (CLSM)	57
3.2.17 Analiza biofilmu za pomocą systemu mikroprzepływowego BioFlux 1000z	58
3.2.18 Analiza statystyczna	58
4. Wyniki.....	59
4.1 Losowa mutageneza za pomocą transpozonu	59
4.2 Określenie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy <i>C. jejuni</i> Δ <i>cydB</i> oraz Δ <i>hydC</i> przy pomocy barwienia fioletem krystalicznym (CV).....	61
4.3 Wizualizacja biofilmu za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	64
4.4 Wizualizacja biofilmu za pomocą konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM)	66
4.5 Badanie biofilmu w warunkach przepływu.....	68
4.6 Wpływ delecji genów <i>cydB</i> i <i>hydC</i> na ruchliwość oraz wzrost <i>C. jejuni</i>	70
5. Dyskusja.....	72
6. Wnioski	77
7. Bibliografia	78

Wykaz stosowanych skrótów

AMP – ampicylina

AMP^R – oporność na ampicylinę

AP-PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy z arbitralnym starterem (ang. arbitrarily primed polymerase chain reaction)

CM – chloramfenikol

CM^R – oporność na chloramfenikol

CM^S – wrażliwość na chloramfenikol

comp-*cydB* – Δ *cydB* po komplemntacji z dziką kopią genu Δ *cydB*

comp-*hydC* – Δ *hydC* po komplemntacji z dziką kopią genu Δ *hydC*

CV – fiolet krystaliczny (ang. crystal violet)

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – deoksynukleotydy

GuHCl – chlorowodorek guanidyny

LB – bulion lizogenniczny

MH – podłoże Mueller Hinton

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

rpsL/cat – kasetta składająca się z genów wrażliwości na streptomycynę i oporności na chloramfenikol

SDS - dodecylosiarczan sodu

STREP - streptomycyna

STREP^R – oporność na streptomycynę

STREP^S – wrażliwość na streptomycynę

TET – tetracyklina

TET^R – oporność na tetracyklinę

TMP – trimetoprim

WT – szczep dziki (ang. wild type)

$\Delta cydB$ – mutant z delecją genu *cydB*

$\Delta hydC$ – mutant z delecją genu *hydC*

Streszczenie

Campylobacter jejuni jest jednym z najważniejszych patogenów przenoszonych przez żywność. Bakteria ta występuje naturalnie w przewodzie pokarmowym zwierząt, w tym drobiu, który jest uważany za główne źródło zakażeń *Campylobacter* spp. u ludzi. Strategie przetrwania *C. jejuni* w środowisku są nadal słabo poznane. Uważa się, że tworzenie biofilmu odgrywa istotną rolę w przetrwaniu *C. jejuni* w środowisku i jest ważnym czynnikiem ułatwiającym rozprzestrzenianie się tego patogenu w łańcuchu pokarmowym. Wykazano, że biofilm chroni bakterie przed czynnikami środowiskowymi, takimi jak światło ultrafioletowe, wysuszenie, środki dezynfekujące i przeciwdrobnoustrojowe, co sprawia, że ich eliminacja jest trudna. Mechanizm molekularny leżący u podstaw tworzenia biofilmu u *C. jejuni* jest wciąż słabo poznany w porównaniu z innymi bakteriami. Do tej pory opisano jedynie około trzydzieści sześć genów zaangażowanych w regulację i dynamikę tworzenia biofilmu *C. jejuni*. W niniejszej pracy za pomocą mutagenyzy przy udziale transpozonu uzyskano 350 mutantów szczepu *C. jejuni* 81-176, z których 20 wykazywało obniżoną zdolność do produkcji biofilmu w stosunku do szczepu rodzicielskiego. Niektóre mutanty zawierały insercje w genach, których rola w procesie tworzenia biofilmu została wcześniej opisana. Większość zidentyfikowanych genów kodowała białka hipotetyczne. Zidentyfikowano również dwa geny o znanej wcześniej funkcji, tj. *cydB* i *hydC*, które nie były dotychczas wiązane z procesem tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Aby potwierdzić rolę tych genów w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni* skonstruowano mutanty delecyjne $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$. Przeprowadzono też komplementację, wprowadzając do mutantów delecyjnych kopie genów *cydB* i *hydC*, aby upewnić się, że obserwowana zmiana zdolności tworzenia biofilmu związana jest z aktywnością genów *cydB* i *hydC*. W trakcie badań oceniono zdolność tworzenia biofilmu w szczepie macierzystym *C. jejuni* i uzyskanych mutantach za pomocą barwienia fioletem krystalicznym oraz określono strukturę biofilmu i żywotność komórek w biofilmie za pomocą mikroskopii skaningowej i konfokalnej. Zdolność tworzenia biofilmu w warunkach przepływowych oceniono za pomocą systemu Bioflux. W niniejszych badaniach wykazano, że delecja genów *cydB* i *hydC* istotnie obniżyła poziom tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*, zaś komplementacja mutantów delecyjnych kopiami genów *cydB* i *hydC* przywróciła pierwotny fenotyp. Zaobserwowano, że mutant $\Delta cydB$ produkował luźny biofilm o nieregularnej strukturze,

natomiast mutant $\Delta hydC$ tworzył równomierny biofilm z przewagą komórek kokoidalnych. Stwierdzono, że mutanty delecyjne $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ charakteryzowały się obniżoną dynamiką tworzenia biofilmu w warunkach przepływowych w porównaniu ze szczepem dzikim jak i szczepami po komplementacji. Delecja genów *cydB* i *hydC* nie miała wpływu na ruchliwość, żywotność ani tempo wzrostu *C. jejuni*, co mogłoby prowadzić do obniżenia produkcji biofilmu. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły istotną rolę genów *cydB* i *hydC* w tworzeniu biofilmu u *C. jejuni*, co poszerza wiedzę na temat molekularnych mechanizmów tworzenia biofilmu przez ten ważny patogen. Wykazano też, że technologia EZ-Tn5 jest efektywnym narzędziem do badania mechanizmu tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*.

Abstract

Campylobacter jejuni is one of the most important human foodborne pathogens. The bacterium occurs naturally in the digestive tract of animals, including poultry, which is considered the main source of *Campylobacter* infections in humans. The survival strategies of *C. jejuni* in the environment are still poorly understood. It has been suggested that biofilm formation plays an important role in the survival of *C. jejuni* and is a relevant factor facilitating the spread of this pathogen in the food chain. It has been found that biofilms protect the bacteria from environmental factors such as ultraviolet light, drying, disinfectants and antimicrobials, making their elimination difficult. The molecular mechanism underlying biofilm formation in *C. jejuni* is still poorly compared to other bacteria. To date, only about thirty six genes involved in the regulation and dynamics of *C. jejuni* biofilm formation have been described. In this dissertation 350 mutants were generated using transposon mutagenesis, of which 20 produced lower biofilm compared to the parent strain. Some mutants contained insertions in the genes previously reported to play a role in the biofilm formation process. The majority of genes encoded hypothetical proteins. Also two genes with known function, i.e., *cydB* and *hydC*, not previously linked with biofilm formation in *C. jejuni*, were identified. To confirm the role of these genes in the process of biofilm formation in *C. jejuni*, two deletion mutants $\Delta cydB$ and $\Delta hydC$ were constructed. Complementation of deletion mutants with a wild-type copy of the *cydB* and the *hydC* gene was performed to ensure that the observed phenotype of the mutant strain was specific to the deleted region. During the study biofilm formation capacity of the parent strain and mutant strains was assessed using crystal violet staining, and biofilm structure and cell viability in the biofilm were analyzed using scanning and confocal microscopy. The biofilm-forming capacity under flow-through conditions was evaluated using the Bioflux system. The present study showed that deletion of the *cydB* and the *hydC* genes significantly reduced the level of biofilm formation by *C. jejuni*, while complementation of deletion mutants with the *cydB* and the *hydC* genes restored the original phenotype. The $\Delta cydB$ mutant formed a loosely organized biofilm of irregular structure, whereas $\Delta hydC$ produced a biofilm of regular structure with the prevalence of coccoidal cells. In addition, it was observed that the mutants were characterized by reduced dynamics in biofilm formation under flow-through conditions compared to the wild-type strain and

complemented strains. Deletion of the *cydB* and *hydC* genes did not affect the motility, viability, or growth rate of *C. jejuni*, which could contribute to lower biofilm production. In summary, the results of the study confirmed the important role of the *cydB* and the *hydC* genes in biofilm formation in *C. jejuni*, which broaden the knowledge on the molecular mechanisms of biofilm formation by this important pathogen. Moreover, EZ-Tn5 technology is an effective tool for studying the mechanism of biofilm formation in *C. jejuni* strain 81-176.

1. Wstęp

1.1 Wprowadzenie

We współczesnym świecie bezpieczeństwo żywności stanowi jeden z kluczowych priorytetów społecznych, zdrowotnych i gospodarczych. Rozwinięta globalizacja, zmienne warunki klimatyczne, dynamiczny przyrost populacji oraz ewoluujące wzorce konsumpcji stawiają przed światem poważne wyzwania związane z zapewnieniem dostępu do wystarczającej, zdrowej i bezpiecznej żywności. W kontekście tego priorytetu, szczególne znaczenie przywiązuje się do zapobiegania zakażeniom bakteryjnym przenoszonym przez żywność i wodę, które stanowią istotny aspekt ochrony zdrowia publicznego na globalną skalę. Obecnie za główny czynnik etiologiczny zakażeń bakteryjnych przenoszonych przez żywność i wodę u ludzi na całym świecie uważa się bakterie należące do rodzaju *Campylobacter* (Gözl i wsp., 2014). Zostały one po raz pierwszy opisane w 1913 roku przez McFadyeana i Stocmana. Początkowo bakterie te zaliczono do rodzaju *Vibrio* dopiero w latach sześćdziesiątych XX wieku, wyizolowano je z kału osób z objawami zapalenia jelit i wyodrębniono dla nich nowy rodzaj *Campylobacter*. Zgodnie z taksonomią, rodzaj *Campylobacter* należy do typu *Proteobacteria*, klasy *Epsilonproteobacteria*, rodziny *Campylobacteraceae* i rzędu *Campylobacterales* (Kreling i wsp., 2020). Według nomenklatury LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature), rodzaj *Campylobacter* obejmuje 45 ważne opublikowanych i niesynonimicznych gatunków (Tab. 1), wśród których najpowszechniejszymi gatunkami odpowiedzialnymi za większość przypadków kampylobakteriozy u ludzi są *C. jejuni* stanowiąc ponad 80% przypadków i *C. coli* odpowiadając za około 10% zakażeń (Moore i wsp., 2005; Teh i wsp., 2014). *C. jejuni* jest to smukła, zakrzywiona, ruchliwa i Gram-ujemna bakteria, która mierzy około 0,5 - 5 μm długości i 0,2 - 0,9 μm szerokości (Kist i Bereswill, 2001). Powszechnie występuje w przewodzie pokarmowym różnych zwierząt, w tym drobiu, świń, bydła, owiec, psów, kotów, ptaków, norek i królików (Humphrey i wsp., 2007; Newell i wsp., 2017). Bakteria ta jest mikroaerofilna, co oznacza, że do wzrostu wymaga niskiego poziomu tlenu (5 - 10%) (Oh i wsp., 2017). Biochemicznie bakteria ta wykazuje dodatni wynik pod względem oksydazy, katalazy, hydrolizy hipuranu i redukcji azotanów. Ponadto *C. jejuni* może wykorzystywać aminokwasy i półprodukty kwasu trikarboksylowego jako źródła energii. Nie fermentuje i nie utlenia

węglowodanów (Day i wsp., 2009; Snelling i wsp., 2005; Stahl i wsp., 2012). *C. jejuni* może rosnąć w temperaturach od 30 do 45°C, a optymalna temperatura wzrostu wynosi 41,5°C. Temperatura ta jest charakterystyczna dla temperatury ciała ptaków, u których *C. jejuni* występuje naturalnie. Wiadomo, że bakteria ta jest bardzo wrażliwa na zmiany temperatury, pH i ciśnienia osmotycznego i do swojego wzrostu wymaga złożonej bazy odżywczej (Kim i wsp., 2020; Özer, 1999; Skarp i wsp., 2016). Pomimo tego bakterie te przeżywają w środowisku produkcji i przetwórstwa żywności, co stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W związku z tym istotne jest prowadzenie badań nad procesami, które sprzyjają przeżyciu tych bakterii, w tym nad mechanizmem tworzenia biofilmu.

Tab. 1 Gatunki *Campylobacter* Źródło: na podstawie danych z LPSN styczeń 2024

Gatunek	Źródło izolacji	Referencje
<i>Campylobacter anatolicus</i>	Suseł anatolijski	Aydin i wsp., 2021
<i>Campylobacter armoricus</i>	Woda Człowiek	Boukerb i wsp., 2019
<i>Campylobacter aviculae</i>	Zeberka zwyczajna	Bryant i wsp., 2020
<i>Campylobacter avium</i>	Drób	Rossi i wsp., 2009
<i>Campylobacter bilis</i>	Kurczaki	Phung i wsp., 2022
<i>Campylobacter blaseri</i>	Foka pospolita	Gilbert i wsp., 2018
<i>Campylobacter canadensis</i>	Żuraw krzykliwy	Inglis i wsp., 2007
<i>Campylobacter coli</i>	Świnie	Véron i Chatelain 1973
<i>Campylobacter concisus</i>	Człowiek	Tanner i wsp., 1981
<i>Campylobacter corcagiensis</i>	Makak lwi	Koziel i wsp., 2014
<i>Campylobacter cuniculorum</i>	Królik	Zanoni i wsp., 2009
<i>Campylobacter curvus</i>	Człowiek	Vandamme i wsp., 1991
<i>Campylobacter estrildidarum</i>	Zeberka zwyczajna	Bryant i wsp., 2020
<i>Campylobacter fetus</i>	Owca	Sebald i Weron., 1963
<i>Campylobacter geochelonis</i>	Żółw grecki	Piccirillo i wsp., 2016
<i>Campylobacter gracilis</i>	Człowiek	Vandamme i wsp., 1995
<i>Campylobacter helveticus</i>	Zwierzęta domowe (Psy, Koty)	Stanley i wsp., 1992

Gatunek	Źródło izolacji	Referencje
<i>Campylobacter hepaticus</i>	Kurczaki	Van i wsp., 2016
<i>Campylobacter hominis</i>	Człowiek	Lawson i wsp., 2001
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Świnie	Gebhart i wsp., 1985
<i>Campylobacter iguaniorum</i>	Gady (Jaszczurki, Żółwie)	Gilbert i wsp., 2015
<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	Ssaki morskie (Foki, Morświn)	Foster i wsp., 2004
<i>Campylobacter jejuni</i>	Człowiek	Véron i Chatelain, 1973
<i>Campylobacter lanienae</i>	Człowiek	Logan i wsp., 2000
<i>Campylobacter lari</i>	Mewa srebrzysta	Benjamin i wsp., 1983
<i>Campylobacter magnus</i>	Świnia	Gruntar i wsp., 2023
<i>Campylobacter majalis</i>	Świnia	Lynch i wsp., 2022
<i>Campylobacter massiliensis</i>	Człowiek	Antezack i wsp., 2021
<i>Campylobacter mucosalis</i>	Świnie	Roop i wsp., 1985
<i>Campylobacter novaezeelandiae</i>	Ptaki Woda	Bloomfield i wsp., 2020
<i>Campylobacter ornithocola</i>	Dziki ptactwo	Cáceres i wsp., 2017
<i>Campylobacter peloridis</i>	Człowiek Skorupiaki	Debruyne i wsp., 2009
<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	Płetwonogie	Gilbert i wsp., 2017
<i>Campylobacter portucalensis</i>	Bydło	Silva i wsp., 2020
<i>Campylobacter rectus</i>	Człowiek	Vandamme i wsp., 1991
<i>Campylobacter showae</i>	Człowiek	Etoh i wsp., 1993
<i>Campylobacter sputorum</i>	Człowiek	Véron i Chatelain, 1973
<i>Campylobacter subantarcticus</i>	Ptaki	Debruyne i wsp., 2010a
<i>Campylobacter suis</i>	Świnia	Lynch i wsp., 2022
<i>Campylobacter taeniopygiae</i>	Zeberka zwyczajna	Bryant i wsp., 2020
<i>Campylobacter troglodytis</i>	Szympan	Kaur i wsp., 2011
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Pies	Sandstedt i Ursing, 1991
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	Człowiek	Vandamme i wsp., 2010
<i>Campylobacter volucris</i>	Mewa śmieszka	Debruyne i wsp., 2010b
<i>Campylobacter vulpis</i>	Lis rudy	Parisi i wsp., 2021

1.2 Epidemiologia

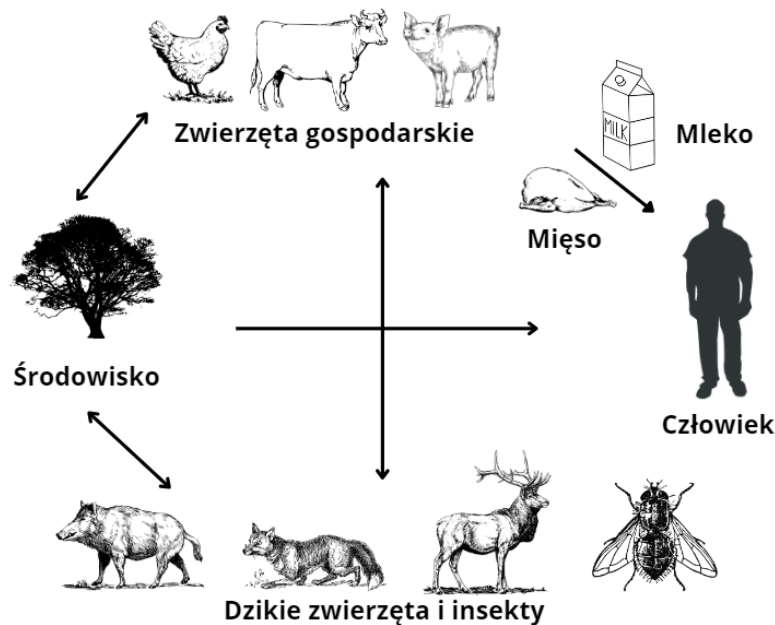
C. jejuni jest czynnikiem etiologicznym kamylobakteriozy powodującej ostre bakteryjne zapalenie żołądka i jelit. Choroba ta manifestuje się różnorodnymi objawami, obejmującymi biegunkę, bóle brzucha, gorączkę, nudności, wymioty i ogólne osłabienie (Heimesaat i wsp., 2021). Chociaż większość zakażeń ma łagodny przebieg, u niektórych osób może dojść do poważnych powikłań, takich jak zespół Guillaina-Barrégo, który jest rzadką komplikacją neurologiczną powodującą zapalenie nerwów obwodowych (Finsterer, 2022). Źródłem zakażeń *C. jejuni* często są surowe lub niedogotowane produkty mięsne, zwłaszcza drób. Inne potencjalne źródła zakażenia to niepasteryzowane mleko, skażona woda i kontakt z zarażonymi zwierzętami (Kaakoush i wsp., 2015, Hakeem i Lu, 2021) (Ryc.1). Ponadto do zakażenia *C. jejuni* może dojść w wyniku tzw. zakażeń krzyżowych, które są konsekwencją nieprawidłowych praktyk higienicznych. Takie sytuacje mają miejsce, gdy patogen przenoszony jest z surowego mięsa, zwłaszcza drobiowego na ręce osoby przygotowującej potrawę, a następnie na sprzęt kuchenny czy też żywność, która nie podlega obróbce termicznej (Luber i wsp., 2006). Warto zatem zwracać szczególną uwagę na świadome i skrupulatne praktyki higieniczne w celu minimalizacji ryzyka związane z tym rodzajem infekcji.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że każdego roku na całym świecie odnotowuje się, aż 96 milionów przypadków zakażenia bakteriami z rodzaju *Campylobacter* w tym ponad 21 000 zgonów (Thomas i wsp., 2020; Kiarie i wsp., 2023). Szacuje się, że minimalna dawka infekcyjna potrzebna do skolonizowania jelita i wywołania kamylobakteriozy wynosi 500 jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) (Wilson i wsp., 2008).

Częstość występowania zakażeń spowodowanych przez *C. jejuni* wykazuje zróżnicowanie w zależności od różnych czynników, takich jak grupa wiekowa, pora roku i charakterystyka obszarów geograficznych. Analizując dane epidemiologiczne można zauważyć, że najwyższe wskaźniki zakażeń obserwuje się wśród dzieci poniżej piątego roku życia oraz młodych ludzi (Same i Tamma, 2018). Ponadto, ryzyko zakażenia różni się w zależności od pory roku, z największymi wskaźnikami występowania w miesiącach letnich (Strachan i wsp., 2013). Interesującym aspektem jest również fakt, że zakażenia *C. jejuni* są częściej zgłaszane na obszarach wiejskich w porównaniu z obszarami miejskimi (Lévesque i wsp., 2013). To sugeruje, że istnieją

pewne czynniki środowiskowe jak i styl życia, które sprzyjają rozprzestrzenianiu się tej bakterii.

Dane z krajowych programów nadzoru wskazują, że kamylobakterioza występuje na różnych kontynentach, obejmując Azję (Japonia, Korea, Singapur), Europę (Austria, Belgia, Bułgaria, Chorwacja, Cypr, Czechy, Dania, Estonia, Finlandia, Francja, Niemcy, Grecja, Węgry, Islandia, Irlandia, Włochy, Łotwa, Litwa, Luksemburg, Malta, Holandia, Norwegia, Polska, Portugalia, Rumunia, Słowacja, Słowenia, Hiszpania, Szwecja, Szwajcaria, Wielka Brytania), Oceanie (Australia, Nowa Zelandia) i Amerykę Północną (Kanada, Stany Zjednoczone). Dodatkowo, kamylobakterioza występuje także w krajach, dla których brak dostępnych danych z krajowego nadzoru, takich jak niektóre regiony Afryki (Madagaskar, Malawi, Sudan Południowy, Etiopia, Ghana, Egipt), Azji (Bangladesz, Chiny, Indie, Iran, Irak, Liban, Nepal, Pakistan, Tajlandia, Zjednoczone Emiraty Arabskie), Europa (Macedonia Północna) i Oceania (Papua Nowa Gwinea) (Liu i wsp., 2022). W kontekście europejskim *C. jejuni* stanowi najczęstszy czynnik zoonotyczny od ponad dekady. Przed wybuchem pandemii COVID-19 w UE odnotowywano stałe wysokie poziomy zachorowalności na kamylobakteriozę oscylujące pomiędzy 59,7 a 63,0 przypadków na 100 000 ludzi, przy czym liczba potwierdzonych przypadków utrzymywała się na stałym poziomie przekraczając 220 tysięcy w skali Europy (EFSA 2019). W 2022 roku w UE zanotowano 137 107 przypadków kamylobakteriozy u ludzi. Spośród chorych, 10 551 osób (10%) zostało poddanych hospitalizacji, a liczba zgłoszonych zgonów wyniosła 34. Najwyższy poziom zachorowalności zaobserwowano w Luksemburugu (141,3/100 000), Czechach (137,0), Słowacji (87,9) i Danii (87,6) natomiast najniższy odnotowano w Polsce, Bułgarii, Rumunii i Grecji ($\leq 2,9$) (EFSA, 2022). W Polsce według Państwowego Zakładu Higieny w 2023 roku odnotowano 857 przypadków kamylobakteriozy, co oznacza wzrost o 62,3% w stosunku do roku ubiegłego (PZH 2023). Te dane podkreślają potrzebę działań monitorujących, kontrolnych i profilaktycznych zarówno na poziomie krajowym, jak i globalnym mających na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się infekcji wywołanych przez *C. jejuni*.



Ryc. 1 Drogi transmisji *Campylobacter jejuni*. Źródło: opracowanie własne

1.3 Patogeneza

Na przestrzeni lat naukowcy stworzyli wiele modeli, które umożliwiły odkrycie wielu czynników zjadliwości u *C. jejuni*. Modele te można podzielić na trzy kategorie. Pierwszą kategorią są modele *in vitro*, które obejmują hodowle komórkowe, eksplantaty jelitowe oraz modele mikroprzepływowe (Alzheimer i wsp., 2020; Edwards i wsp., 2010; Friis i wsp., 2005; MacCallum i wsp., 2005; Mortensen i wsp., 2016). Do drugiej zaś kategorii należą modele *in vivo*, które wykorzystują różne gatunki zwierząt, takie jak kurczaki, fretki, myszy, świnie, króliki czy ssaki naczelne (Giallourou i wsp., 2018; Newel, 2001; Shang i wsp., 2016; Baqar i wsp., 1995; Black i wsp., 1988, 1992; Islam i wsp., 2005; Russell i wsp., 1989). Do ostatniej kategorii należą modele *in silico* bazujące na symulacjach komputerowych (Metris i wsp., 2011; Poudel i wsp., 2023). Każda z tych kategorii posiada unikalne zalety jak i ograniczenia co sprawia, że pomimo prowadzenia licznych badań nadal nie udało się stworzyć idealnego modelu, który w pełni opisywałby proces patogenezy zakażeń *C. jejuni*. Niemniej jednak, można wyróżnić cztery główne etapy tego procesu: adhezję do komórek jelitowych, kolonizację przewodu pokarmowego, inwazję docelowych komórek oraz wytwarzanie toksyn powodujących uszkodzenia nabłonka, co skutkuje objawami chorobowymi

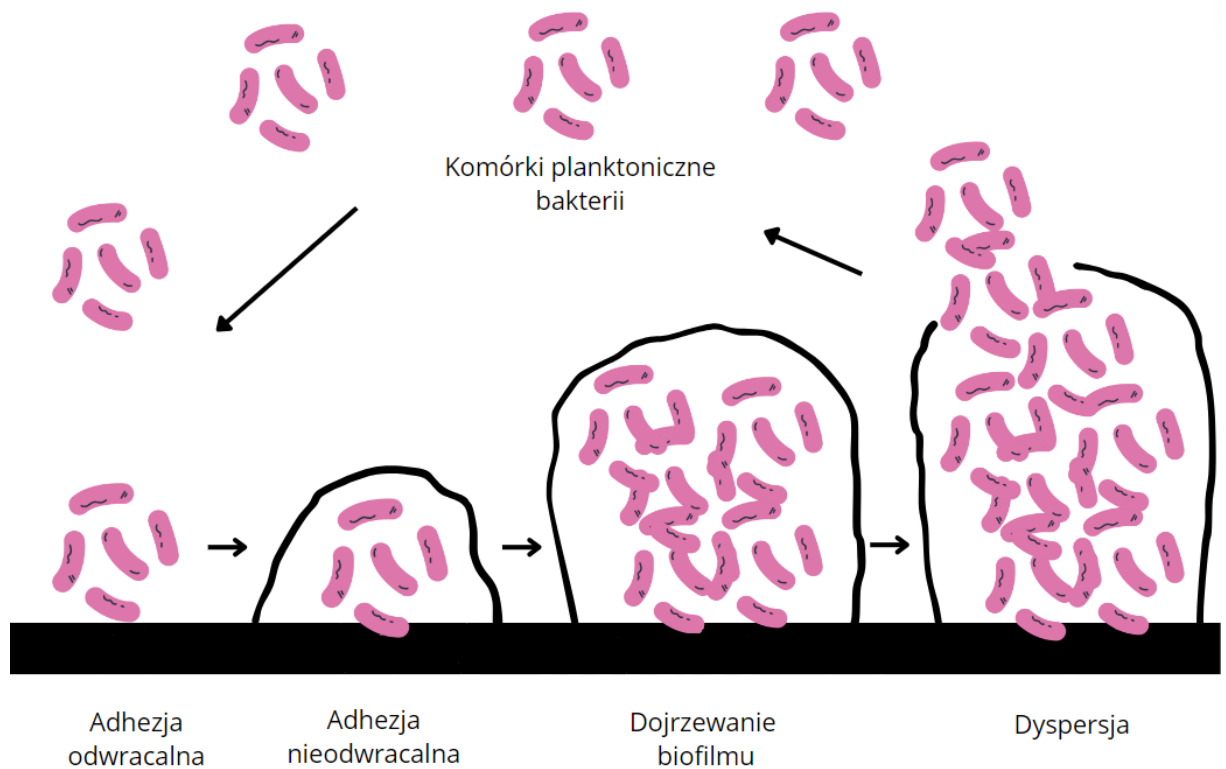
(Haddad i wsp., 2010). Adhezyny odgrywają kluczową rolę w pierwszym etapie infekcji. Po przedostaniu się *C. jejuni* do jelit umożliwiają one bakteriom przyleganie do komórek gospodarza. U *C. jejuni* można wyróżnić dwa typy adhezyn. Pierwsze z nich bezpośrednio oddziałują z receptorami znajdującymi się na powierzchni nabłonka jelitowego zaś drugie wspomagają proces adhezji. Najbardziej znanymi adhezynami *C. jejuni* są CadF, FlpA i JlpA (Rubinchik i wsp., 2012). CadF jest to białko znajdujące się na powierzchni bakterii, które posiada zdolność wiązania się z fibronektyną (Konkel i wsp., 1997). Badania wykazały, że delecja genu *cadF* prowadzi do zmniejszenia zdolności *C. jejuni* do przylegania do ludzkich komórek INT-407 pochodzących z raka szyjki macicy (Monteville i wsp., 2003; Talukdar i wsp., 2020). Ponadto zaobserwowano, że mutanty *cadF* nie są zdolne do kolonizacji jelita ślepego u kurcząt (Ziprin i i wsp., 1999). Kolejne białko, FlpA kodowane przez gen *flpA* wykazuje znaczące podobieństwo do fibronektyny, ze względu na obecność domen, które przypominają domeny typu III zawarte w fibronektynie. Te specyficzne domeny pośredniczą w oddziaływaniu pomiędzy cząsteczkami fibronektyny, co sugeruje, że odpowiednie analogi domeny FlpA mogą wykazywać podobne właściwości ułatwiając oddziaływanie z fibronektyną komórki gospodarza (Konkel i wsp., 2010). Przeprowadzone badania wykazują, że mutacje w genie *flpA* lub zakłócenia w ekspresji tego genu prowadzą do istotnego zmniejszenia zdolności bakterii do przylegania do komórek zarówno zwierzęcych LMH jak i ludzkich INT-407. Dodatkowo obserwuje się, że szczepy *C. jejuni* pozbawione białka FlpA wykazują ograniczoną zdolność do kolonizowania kurczaków (Flanagan i i wsp., 2009; Konkel i i wsp., 2020; Rubinchik i wsp., 2012). Adhezyna JlpA jest lipoproteiną kodowaną przez gen *jlpA* (Kawai i wsp., 2012). Przeprowadzone badania nad JlpA wykazały, że białko to jest uwalniane do pożywki hodowlanej, a jego stężenie wykazuje tendencję wzrostową w miarę upływu czasu. Eksperymenty dotyczące mutantów insercyjnych i delecyjnych genu *jlpA* wykazały, że adhezja tych mutantów do ludzkich komórek nabłonkowych HEp-2 jest zmniejszona w porównaniu z szczepem typu dzikiego (Jin i i wsp., 2001). W innym badaniu stwierdzono, że JlpA istotnie przyczynia się do odpowiedzi zapalnej poprzez inicjowanie szlaków sygnałowych prowadzących do aktywacji kinaz NF- κ B i p38 MAP poprzez interakcję z białkiem szoku cieplnego Hsp90 α znajdującym się na powierzchni ludzkich komórek HEp-2 (Jin i i wsp., 2003). Dodatkowo analizy wykazały, że JlpA jest antygenem glikozylowanym (Scott i wsp., 2009). Co więcej badania potwierdziły, że podawanie rekombinowanego JlpA drogą przeszłuzówkową skutecznie przeciwdziało

kolonizacji *C. jejuni* u kurcząt. (Gorain i wsp., 2020). Wśród mikroorganizmów istnieją dwa mechanizmy wnikania do komórek. Pierwszy to mechanizm „zamka błyskawicznego”, w którym adhezyny bakteryjne wiążą się z receptorem na powierzchni komórki gospodarza, a następnie dochodzi do internalizacji bakterii do wnętrza komórki. Mechanizm taki opisano u takich bakterii jak *Yersinia* spp. czy *Listeria* spp.. W przypadku drugiego mechanizmu „spustowego”, białka efektorowe wprowadzane są do komórek gospodarza za pomocą układów wydzielniczych typu III i IV, co z kolei powoduje przebudowę cytoszkieletu i powstawanie fałd umożliwiających wchłanianie i internalizację bakterii. Mechanizm taki opisano u *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. (Ribet i Cossart, 2015). Pierwsze doniesienia o możliwości wnikania *C. jejuni* do komórek eukariotycznych pochodzą z 1985 roku, kiedy to w wyniku barwienia immunohistochemicznego biopsji jelit zaobserwowano, że *Campylobacter* wnika do błony śluzowej ludzkiej okrężnicy (van Spreuwelet wsp., 1985). W kolejnych latach liczne badania potwierdziły, że *C. jejuni* jest zdolny do wnikania i przeżywania w różnych liniach komórkowych takich jak INT-407, Caco-2, HeLa, Coś-1, FAK -/-, T84, Fn -/-, HEp-2. Jednakże w przypadku *C. jejuni* do tej pory nie zostało dokładnie wyjaśnione, który ze znanych mechanizmów wnikania do komórki eukariotycznej wykorzystuje *C. jejuni*. Istnieje przekonanie, że *C. jejuni* posiada unikalny mechanizm, który wykorzystuje oba wspomniane wcześniej mechanizmy jednocześnie (Crónin i Backert, 2012). Konieczne są dalsze badania w celu dokładnego zrozumienia tego złożonego procesu oraz identyfikacji kluczowych czynników wpływających na skuteczność inwazji bakterii. Najlepiej scharakteryzowaną toksyną produkowaną przez *C. jejuni* jest cytoletalna genotoksyna (CDT). Jej rola wydaje się być kluczowym elementem patogenezy *C. jejuni*, które skutkują bardziej skomplikowanym przebiegiem infekcji u osób z osłabionym układem odpornościowym (Smith i Bayles, 2006). Ponadto CDT wpływa na modulację układu odpornościowego i trwałą kolonizację, co zostało potwierdzone w badaniach na myszach (Ge i in., 2008; Pratt i in., 2006). Nie każdy szczep *C. jejuni* wytwarza toksynę CDT (Lai i wsp., 2016; Lara-Tejero & Galan, 2001; Méndez-Olvera i wsp., 2016). Zrozumienie kompleksowego procesu patogenezy *C. jejuni* wymaga dalszych szczegółowych analiz, zwłaszcza w kontekście identyfikacji kluczowych czynników wpływających na ten proces.

1.4 Biofilm bakteryjny

Biofilm definiowany jest jako skupisko komórek jednego lub większej liczby gatunków mikroorganizmów otoczonych własną macierzą zewnątrzkomórkową. Skład tej macierzy różni się w zależności od gatunku, ale zwykle obejmuje DNA, białka i polisacharydy zewnątrzkomórkowe (EPS). Istotnym składnikiem biofilmu jest także woda, która umożliwia przepływ składników odżywczych w obrębie struktury biofilmu (Brown i wsp., 2015). Proces tworzenia biofilmu można podzielić na cztery etapy (Ryc. 2). W pierwszym z nich dochodzi do odwracalnej adhezji mikroorganizmów, w wyniku której pojedyncze komórki zaczynają przylegać do powierzchni. Następnie bakterie trwale przylegają do powierzchni, rozpoczynając fazę wzrostu i podziału. W trakcie dojrzewania biofilmu bakterie wytwarzają przestrzenną strukturę biofilmu złożoną z białka, DNA i polisacharydów. W fazie końcowej, czyli dyspersyjnej, z biofilmu uwalniane są mikroorganizmy, które mogą kolonizować nowe powierzchnie (Rabin i wsp., 2015).

Szacuje się, że w środowisku naturalnym nawet 99% bakterii występuje w formie biofilmu i są to najczęściej biofilmy mieszane. Biofilmy bakteryjne stanowią istotny problem w przemyśle spożywczym. Ich obecność może chronić bakterie przed działaniem środków dezynfekcyjnych, co z kolei może skutkować zanieczyszczeniem produktów spożywczych (Simões i wsp., 2010). Ponadto obecne w biofilmie egzopolisacharydy ograniczają dyfuzję środków przeciwdrobnoustrojowych, co zwiększa antybiotykooporność bakterii utrudniając ich eliminację (Jamal i wsp., 2015). Skuteczne monitorowanie i kontrola obecności biofilmów mają kluczowe znaczenie w branży spożywczej. Regularne kontrole higieniczne, stosowanie skutecznych środków dezynfekcyjnych oraz przestrzeganie właściwych praktyk sanitarnych są niezbędne do zminimalizowania ryzyka związanego z biofilmami.



Ryc. 2 Etapy powstawanie biofilmu bakteryjnego. Źródło: opracowanie własne

1.5 Biofilm *C. jejuni*

Biofilm *Campylobacter* spp. występuje powszechnie w przewodzie pokarmowym drobiu. Biofilm może zatem pełnić kluczową rolę w transmisji *Campylobacter* spp. w obrębie fermy drobiowej, a w ubojni drobiu w transmisji patogenu z przewodu pokarmowego na tuszki, potencjalnie przyczyniając się do zachorowań u ludzi. Badania wykazują, iż *C. jejuni* potrafi tworzyć biofilmy jednogatunkowe, gdy hoduje się go in vitro w pożywkach hodowlanych na różnych powierzchniach, takich jak stal nierdzewna, szkło, membrany nitrocelulozowe oraz różnego rodzaju powierzchnie z tworzyw sztucznych (Teh i wsp., 2014). Ponadto *C. jejuni* pozostając w formie biofilmu, posiada zdolność do przetrwania w temperaturze otoczenia i atmosferze dwa razy dłużej niż w przypadku występowania w formie planktonicznej (Joshua i wsp., 2006). Dodatkowo w odróżnieniu od innych patogenów jelitowych, *C. jejuni* jest organizmem naturalnie transformowalnym co umożliwia bakterii łatwe pobieranie obcego materiału genetycznego, w tym genów oporności na antybiotyki (Bae i wsp., 2014). Dlatego istnieje potrzeba badań, które umożliwią zrozumienie jego strategii przetrwania w środowisku, w tym zdolności do tworzenia biofilmu.

Aktualnie mechanizm tworzenia biofilmu u *C. jejuni* nie jest w pełni poznany. Dotychczas opisano około trzydzieści sześć genów biorących udział w procesie tworzenia biofilmu *C. jejuni* (Ryc. 3). Wśród nich można wyróżnić geny biorące udział w procesie ruchliwości, będącym jednym z kluczowych czynników zjadliwości *C. jejuni*. Zdolność do poruszania się jest możliwa dzięki obecności rzęsek umiejscowionych na jednym lub obu końcach komórki. Strukturę rzęsek tworzy szereg białek, w skład których wchodzi między innymi takie czynniki jak FlgH, FlgI, FliF, FliG, FliN, FliM, FlgE, CiaB, CiaC, CiaI, FlaC, FspA, FlgK, FlgL, FlaA, FlaB. Badania wykazują, że delecja genów *flgK*, *flgL* i *flgE* uniemożliwia bakteriom wytwarzanie kompletnych struktur rzęsek. Mutanty *C. jejuni*, które zostały pozbawione genów *flaA* (ang. major flagellin A) i *flaB* (ang. minor flagellin B) charakteryzowały się brakiem ruchliwości oraz obniżoną zdolnością do kolonizacji i tworzenia biofilmu (Young i wsp., 2007; Neal-McKinney i Konkel, 2012; Wassenaar i wsp., 1995; Crushell i wsp., 2003; Li i wsp., 2017). Inne geny zaangażowane w ruchliwość, których inaktywacja również upośledza tworzenie biofilmu to *flhA* (ang. flagellar biosynthesis protein), *fliA* (ang. sigma factor 28), *fliD* (ang. flagellar hook-associated protein), *flaC* (ang. secreted flagellin), *flaG* (ang. flagellar filament length control), *flgG* (ang. flagellar basal-body rod protein), *flgA* (ang. flagella basal body p-ring formation protein), *fliS* (ang. flagellar secretion chaperon), *pflA* (ang. paralyzed flagellum protein), *cj1324* (ang. flagellar glycosylation protein) (Kalmokoff i wsp., 2006; Kim i wsp., 2015; Joshua i wsp., 2006; Howard i wsp., 2009; Svensson i wsp., 2014). Kolejną grupą genów zaangażowanych w produkcję biofilmu u *C. jejuni* są geny odpowiedzialne za chemotaksję. Proces ten jest jednym ze sposobów reakcji mikroorganizmów na zmieniające się warunki środowiska. Proces ten charakteryzuje się ukierunkowanym przemieszczaniem się organizmu w stronę środowiska zawierającego wyższe stężenia substancji o korzystnym działaniu lub w stronę środowiska zawierającego mniejsze stężenie substancji toksycznych. Badania wykazują, że *C. jejuni* ma zdolność do przemieszczania się w kierunku mucyny, L-glutaminy, L-asparaginu, L-cysteiny, L-seryny oraz w kierunku kwasów organicznych, w tym kwasu pirogronowego, fumarowego, jabłkowego, cytrynowego czy ketoglutarynowego. Proces chemotaksji u *C. jejuni* jest regulowany między innymi przez receptor CheY, kinazę CheA, metyloesterazę CheB, metylotransferazę CheR, białko CheV oraz mechanizm obracający wić. Dotychczas zbadano 6 genów (*tlp3*, *tlp8*, *cheA*, *cheY*, *cheW*, *cheV*), które są powiązane z chemotaksją i odgrywają znaczącą rolę w tworzeniu biofilmu u *C. jejuni*

(Chandrashekhar i wsp., 2015 i 2017; Reuter i wsp., 2021; Tram i wsp., 2020; Rahman i wsp., 2014).

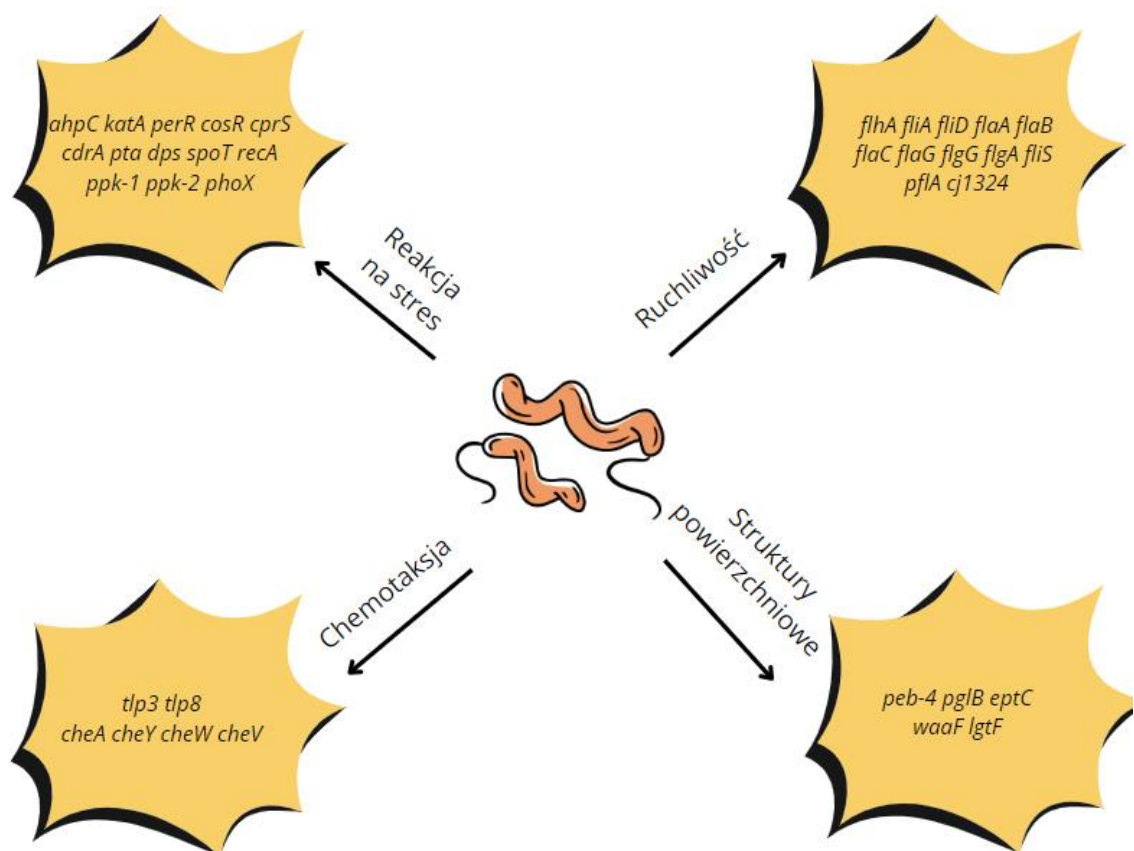
C. jejuni posiada ponad 150 białek błonowych i lipoprotein, które biorą udział w interakcji między komórką bakteryjną a środowiskiem (Parkhill i wsp., 2000). Białka te obejmują między innymi białko peryplazmatyczne PEB4 kodowane przez gen *peb-4*. PEB4 bierze udział w fałdowaniu białek błony zewnętrznej. Ponadto białko to jest niezbędne do adhezji *C. jejuni* do komórek gospodarza, dlatego obserwuje się jego podwyższony poziom w komórkach żyjących w biofilmie (Kalmokoff i wsp. 2006; Rathbun i wsp., 2009; Asakura i wsp., 2007).

Systemy odpowiedzialne za modyfikację białek, w tym N-glikozylacja także odgrywają istotną rolę w procesie tworzenia biofilmu. Badania wykazują, że delecja genu *pglB* kodującego oligosacharylotransferazę, która jest niezbędna w procesie N-glikozylacji białek zmniejsza zdolność tworzenia biofilmu przez *C. jejuni* (Cain i wsp., 2019). Ponadto *eptC*, który koduje enzym uczestniczący w modyfikacji struktur powierzchniowych komórek także odgrywa znaczącą rolę w tworzeniu biofilmu *C.jejuni* (Lim i Kim, 2017). Innym interesującym zjawiskiem jest fakt, że mutacje powodujące brak zewnętrznego rdzenia lipooligosacharydowego, spowodowane głównie przez delecje genów *waaF* lub *lgtF*, istotnie wpływają na zdolność do formowania biofilmu, zwiększając jego produkcję. (Naito i wsp., 2010).

C. jejuni posiada również unikalne mechanizmy regulujące odpowiedź na stres środowiskowy. Niektóre geny związane z odpowiedzią na stres takich jak *ahpC* (reduktaza wodoronadtlenku alkilu C), *katA* (katalaza A), *perR* (nadtlenkowy regulator stresu), *pta* (acetylotransferaza fosforanowa), *dps* (białko wiążące żelazo), *recA* (rekombinaza A), *phoX* (fosfataza alkaliczna), *csrA* (regulator głodu węglowego), *ppk1-2* (kinaza polifosforanowa 1 i 2), *spoT* (3'-pirofosfohydrolaza guanozyno-3',5'-bis(difosforanu)), *cprS* (sensor regulacji wzrostu planktonu *Campylobacter*) i *cosR* (regulator stresu oksydacyjnego *Campylobacter*) również uczestniczą w procesie tworzenia biofilmu u *C. jejuni* (Oh i Jeon, 2014; Svensson i wsp., 2009; Fields i Thompson, 2008; Joshua i wsp., 2006; Theoret i wsp., 2012; Feng i wsp., 2018; Drozd i wsp., 2014).

Badania przeprowadzone na innych bakteriach takich jak *Pseudomonas aeruginosa* i *E. coli* wykazują, że proces tworzenia biofilmu jest bardzo złożony i wieloczynnikowy. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy pozwoliły na identyfikację 2504 i 1292 genów o zmienionej ekspresji w biofilmie w porównaniu

z komórkami planktonicznymi odpowiednio dla *P. aeruginosa* (Heacock-Kang i wsp., 2017) i *E. coli* (Ranjith i wsp., 2017). Wyniki te sugerują możliwość udziału dużo większej liczby genów, biorących udział w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni* w porównaniu z liczbą obecnie znanych czynników. Zidentyfikowanie nowych genów uczestniczących w tworzeniu biofilmu *C. jejuni* może przyczynić się do kompleksowego zrozumienia mechanizmów przetrwania tego patogenu w środowisku. W rezultacie, taka identyfikacja może być krokiem w kierunku opracowania skuteczniejszych strategii kontroli i zwalczania *C. jejuni* w środowisku produkcji żywności.



Ryc. 3 Geny wpływające na powstawanie biofilmu u *C. jejuni* Źródło: opracowanie własne

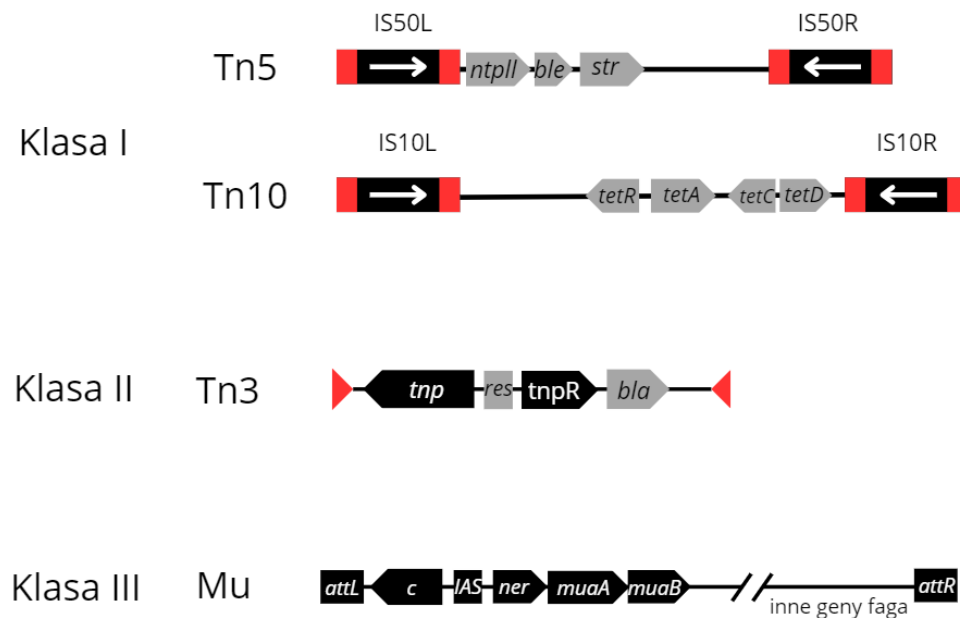
1.6 Mutageniza za pośrednictwem transpozonu

Badanie funkcji genów stanowi kluczowy obszar biologii molekularnej, mając na celu pełne zrozumienie wpływu poszczególnych genów na procesy biologiczne.

Jednym z narzędzi pozwalającym poznać funkcję genów jest metoda losowej mutagenезy. Metoda ta stanowi potężne narzędzie, które umożliwia manipulację genomem poprzez wprowadzenie losowych mutacji przy użyciu transpozonów. Transpozony zwane potocznie „skaczącymi genami” są ruchomymi odcinkami DNA, które w losowy sposób wbudowują się w różne miejsca w obrębie genomu. Włączenie transpozonu w gen albo element regulatorowy może wpływać na ekspresję genów potencjalnie prowadząc do zmian fenotypowych. Efekty tych zmian mogą obejmować zarówno całkowitą inaktywację genów, jak i subtelne modyfikacje w regulacji ekspresji genów. Po wprowadzeniu transpozonu do komórki bakterii prowadzi się analizę fenotypu komórek uzyskanych w wyniku losowej mutagenезy. U mutantów, w których obserwuje się określone zmiany fenotypu w porównaniu ze szczepem dzikim można zidentyfikować miejsca włączenia transpozonu, co pozwala na zrozumienie wpływu określonych genów na procesy biologiczne (Alberts i wsp., 2002; Choi, 2009). Wyróżnia się trzy główne klasy transpozonów prokariotycznych (Ryc. 4). Klasa I obejmuje transpozony, które wyróżniają się złożoną strukturą. Charakteryzują się one obecnością sekwencji insercyjnych zarówno na początku jak i na końcu transpozonu. Mogą one znajdować się w tej samej lub odwróconej pozycji względem siebie. Ponadto, warto zauważyć, że te konkretne sekwencje są źródłem enzymu transpozazy, który pełni kluczową rolę w procesie transpozycji. W sekwencjach tych transpozonów dodatkowo można znaleźć geny kodujące oporność na antybiotyki, metale ciężkie, czy geny determinujące patogenność. Przykładami takich transpozonów są Tn5 zawierający geny oporności na bleomycynę, kanamycynę i streptomycynę oraz Tn10 zawierający geny oporności na tetracyklinę. W przeciwieństwie do transpozonów klasy I, transpozony II klasy nie posiadają sekwencji insercyjnych, jednak posiadają elementy niezbędne do przeprowadzenia transpozycji. Przykładem transpozonu II klasy jest Tn3. Jego struktura obejmuje trzy kluczowe geny w tym gen *tnp*, który koduje transpozazę, gen *tnpR* który koduje resolwazę biorącą udział w rekombinacji oraz gen *bla* kodujący β -laktamazę, enzym nadający oporność na ampicylinę. Ostatnią grupą są transpozony należące do klasy III, które obejmują bakteriofagi transpozycyjne, takie jak fag Mu. W tej klasie transpozonów obserwuje się bardziej skomplikowane mechanizmy transpozycji, które związane są z procesem replikacji i integrowania się fagów do bakteryjnego chromosomu. W swojej strukturze transpozon Mu posiada regiony, umieszczone na końcach, które biorą udział w integracji faga. Dodatkowo, transpozon zawiera dwa geny, *muA* i *muB*, odpowiedzialne za kodowanie transpozazy i geny *c* oraz *ner*, które

kodują negatywne regulatory. Ponadto, transpozon Mu zawiera dodatkowe elementy, w tym IAS, które wzmacniają proces transpozycji (Whittle i Salyres; 2002; Choi, 2009).

W losowej mutagenizie bakterii często wykorzystuje się wektory powstałe na bazie transpozonu Tn5, które pochodzą z komórek bakteryjnych i wymagają konkretnych sekwencji A/T otoczonych parami GC w miejscu integracji (Barquist i wsp., 2013). Transpozon Tn5 został zastosowany między innymi w badaniach nad przeżywalnością, wzrostem i kolonizacją u *E. coli* (McCarthy i wsp., 2018), badaniach tolerancji żółci u *S. Typhimurium* (Khatiwarra i wsp., 2012) i *S. Typhi* (Langridge i wsp., 2009), czy też badaniach nad wzrostem *Pseudomonas nitroreducens* (Nguyen i wsp., 2016). Technologia ta odegrała również kluczową rolę w badaniach genomu *C. jejuni* (Mandal i wsp., 2017). W kontekście badań nad biofilmem, mutageniza transpozonowa została zastosowana do badania procesu biofilmu u *E. coli*, *P. putida*, *S. epidermidis* oraz *L. monocytogenes* (Wang i wsp., 2008; Puttamreddy i wsp., 2010; Chang i wsp., 2012, López-Sánchez i wsp., 2016). Prowadzono również badania z wykorzystaniem tej metody do badań przesiewowych genów związanych z biofilmem u *C. jejuni*, jednakże zidentyfikowano jedynie ok. 10 genów (Teh i wsp., 2017). Podsumowując, ta zaawansowana technika otwiera nowe perspektywy, aby poszerzyć wiedzę na temat roli genów i ich wpływu na różnorodne procesy biologiczne.



Ryc. 4 Budowa transpozonów z podziałem na trzy klasy. Źródło: opracowanie własne

2. Cel pracy

Campylobacter jejuni jest Gram-ujemną mikroaerofilną bakterią, która charakteryzuje się wysokimi wymaganiami wzrostowymi. Patogen ten jest jedną z najczęstszych przyczyn bakteryjnych zakażeń przewodu pokarmowego przenoszonych przez żywność u ludzi. Uważa się, że zdolność do tworzenia biofilmu odgrywa kluczową rolę w przetrwaniu *Campylobacter jejuni* w różnych środowiskach, co przekłada się na wysoką częstość występowania kampylobakteriozy u ludzi na całym świecie. Badania nad procesem tworzenia biofilmu przez *Campylobacter* są jednak ograniczone. Powszechnie przyjmuje się, że proces ten jest regulowany przez ekspresję genów odpowiedzialnych za białka niezbędne do tworzenia struktur powierzchniowych oraz te uczestniczące w ruchliwości, odpowiedzi na stres i oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Badania na innych bakteriach udowodniły jednak, iż proces ten jest o wiele bardziej złożony i skomplikowany. Z tego powodu głównym celem pracy doktorskiej była ocena roli genów *cydB* i *hydC*, wytypowanych przy wykorzystaniu losowej mutagenyzy za pomocą transpozonu, w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Lepsze zrozumienie procesu tworzenia biofilmu może przyczynić się do opracowania inhibitorów ograniczających lub uniemożliwiających produkcję biofilmu.

Cele szczegółowe niniejszej rozprawy:

- 1) Losowa mutagenyza za pomocą transpozonu w celu identyfikacji nowych genów uczestniczących w procesie biofilmu u *C. jejuni*.
- 2) Konstrukcja mutantów delecyjnych oraz komplementacja otrzymanych mutantów.
- 3) Ocena zdolności tworzenia biofilmu oraz architektury biofilmu uzyskanych mutantów.

3. Materiały i metody

3.1 Materiały

3.1.1 Odczynniki chemiczne

Tab. 2 Wykaz odczynników chemicznych wykorzystanych w badaniach

Nazwa	Producent
Agaroza	PRONA
Aldehyd glutarowy	Sigma
Alkohol etylowy	Stanlab
Alkohol izoamylowy	Chempur
Alkohol izopropylowy	Stanlab
Chlorek sodu	Chempur
Chloroform	Stanlab
Chlorowodorek guanidyny	Sigma-Aldrich
Deoksyrybonukleotydy (dNTP)	Thermo Scientific
DMSO	Merck
Etylodiaminotetraoctan (EDTA)	Thermo Scientific
Fenol	Sigma-Aldrich
Gliceryna	Archem
Lizozym	Thermo Scientific
SDS	Thermo Scientific
Trizma Base	Sigma-Aldrich

3.1.2 Enzymy

Tab. 3 Wykaz enzymów wykorzystanych w badaniach

Nazwa	Producent
Ligaza DNA T4	Promega
Polimeraza DNA Dream Taq	Thermo Scientific
Polimeraza DNA Phusion	Thermo Scientific
Enzym Fast Digest BamHI	Thermo Scientific
Enzym Fast Digest PstI	Thermo Scientific
Enzym AgeI	New England Biolabs
Enzym NheI	New England Biolabs
Enzym DpnI	New England Biolabs

3.1.3 Antybiotyki i chemioterapeutyki przeciwbakteryjne

Tab. 4 Wykaz antybiotyków i chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych wykorzystanych w badaniach

Nazwa	Stężenie wyjściowe	Rozpuszczalnik	Producent
Amfoterycyna B	2 mg/ml	DMSO	Pol-Aura
Ampicylina	100 mg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich
Cefoperazon	20 mg/ml	DMSO	Pol-Aura
Chloramfenikol	30 mg/ml	Etanol	Sigma-Aldrich
Kanamycyna	30 mg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich
Streptomycyna	1000 mg/ml	H ₂ O	Sigma-Aldrich
Tetracyklina	25 mg/ml	DMSO	Sigma-Aldrich
Trimetoprym	10 mg/ml	DMSO	Sigma-Aldrich
Wankomycyna	10 mg/ml	H ₂ O	Pol-Aura

3.1.4 Bufory i roztwory

Tab. 5 Wykaz buforów i roztworów użytych w badaniach

Nazwa	Skład
Bufor Tris-HCl pH 7,4	100 mM Tris-HCl
Bufor do elektroforezy agarozowej TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM kwas octowy
Bufor kakodylanowy	0,1M kakodylan sodu
Roztwór NaCl 0,9%	0,9 g/L NaCl

3.1.5 Gotowe zestawy odczynników

Tab. 6 Wykaz gotowych zestawów odczynników wykorzystanych w badaniach

Nazwa	Producent
Zestaw do oczyszczania produktu PCR GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Scientific
Zestaw do ekstrakcji produktu PCR z żelu agarozowego GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
Zestaw do losowej mutagenezy transpozonowej EZ-Tn5™ <KAN-2> Insertion Kit	Lucigen
LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays	Thermo Scientific

3.1.6 Podłoża mikrobiologiczne

Tab. 7 Skład podłoży mikrobiologicznych wykorzystywanych w badaniach

Podłoże płynne Muller-Hinton	Podłoże stałe Muller-Hinton	Medium GYT
Ekstrakt wołowy 300,0 g/L	Ekstrakt wołowy 300,0 g/L	Glicerol 10%
Hydrolizat kazeiny 17,5 g/L	Hydrolizat kazeiny 17,5 g/L	Ekstrakt drożdżowy 1,25 g/L
Skrobia 1,5 g/L	Skrobia 1,5 g/L	Trypton 2,5 g/L
Agar bakteriologiczny 20,0 g/L	Agar bakteriologiczny 20,0 g/L	
Podłoże płynne LB	Podłoże stałe LB	Medium SOC
Pepton K 10,0 g/L	Pepton K 10,0 g/L	Trypton 20,0 g/L
Chlorek sodu 10,0 g/L	Chlorek sodu 10,0 g/L	Ekstrakt drożdżowy 5,0 g/L
Ekstrakt drożdżowy 5,0 g/L	Ekstrakt drożdżowy 5,0 g/L	NaCl 0,5 g/L
	Agar bakteriologiczny 20,0 g/L	KCl 0,18 g/L
		2M MgCl ₂ 5 ml
		2M MgSO ₄ x 7H ₂ O 5 ml
		2M Glukoza 10 ml
Podłoże Columbia Agar	Podłoże do określenia ruchliwości bakterii	
Kazeina strawiona wyciągiem trzustkowym 12,0 g/L	Ekstrakt wołowy 300,0 g/L	
Tkanka zwierzęca strawiona pepsyną 5,0 g/L	Hydrolizat kazeiny 17,5 g/L	
Wyciąg z drożdży 3,0 g/L	Skrobia 1,5 g/L	
Wyciąg bydłęcy 3,0 g/L	Agar bakteriologiczny 4,0 g/L	
Skrobia kukurydziana 1,0 g/L		
Chlorek sodu 5,0 g/L		
Agar 13,5 g/L		
Krew barania, bez włókniaka 5 %		

3.1.7 Oligonukleotydy

Wszystkie startery zastosowane w tej pracy zostały zaprojektowane samodzielnie. Pogrubiona czcionka przedstawia sekwencję miejsc dla enzymów restrykcyjnych, natomiast na czerwono zaznaczono sekwencję promotora P_{cat}.

Tab. 8 Sekwencje starterów użytych w badaniach

Nazwa	Sekwencja	Cel
rpsLcat-FOR	5' ACCGGTAACGACTAAAGTTT TAAACA 3'	Amplifikacja
rpsLcat-REV	5' GCTAGCTTATTTATTCAGCAAGTCTT 3'	kasety rpsl/cat
cydB-FOR	5' GCTATGGCAAATCACAAATCC 3'	Amplifikacja
cydB-REV	5' CTAAATACACAATGACTCAGG 3'	regionu <i>cydB</i>
cydBinv-FOR	5' ACCGGTTATGCTAGCGTAAAAATCACACGCGAAG 3'	Inverse PCR
cydBinv-REV	5' ACCGGTACTTAAAATCAACCACCAAT 3'	<i>cydB</i>
cydBspr-FOR	5' GAACCTATGCAAAAATCGTATCG 3'	Sprawdzenie po
cydBspr-REV	5' GCAAAAAGCTCTGCTAAGG 3'	elektroporacji <i>cydB</i>
cydB-compFOR	5' CGCGGATCC tttatgatatagtggatagatttatgatataatgagttatcaacaaatc ggaatttacggaggataaatgTTTTTTGGTTTAGAACTTGAAGG 3'	Komplementacja <i>cydB</i>
cydB-compREV	5' CGCCTGCAGTTAATATGCGTGATCATCGTTT G 3'	

Nazwa	Sekwencja	Cel
hydC-FOR	5' AGTACTTGTGCTCCTTATGTG 3'	Amplifikacja regionu <i>hydC</i>
hydC-REV	5' CATCGCTTCAATACGCTTTGG 3'	
hydCinv-FOR	5' ACCGGTTATGCTAGCGGTAAAGATGGTGCTATGGATG CT 3'	Inverse PCR <i>hydC</i>
hydCinv-REV	5' ACCGGTAGCAATAGCTCTTACCCAGTG 3'	
hydCspr-FOR	5' GCTGCTCGTTGTATTGAA GC 3'	Sprawdzenie po elektroporacji <i>hydC</i>
hydCspr-REV	5' CCTTCC TTGCTT AAAAAG TCAAGT 3'	
hydC-compFOR	5' CGCGGATCC <i>tttatgatatagtgatagatttatgatataatgagttatcaacaatc</i> <i>ggaatttacggaggataaatg</i> TCAATTTATAAGGAGGCTTTCAT 3'	Komplementacja <i>hydC</i>
hydC-compREV	5' CGCCTGCAGTCAATGCTTTTCTTCTTTTAC 3'	
T7	5' TAATACGACTCACTATAGG 3'	Sekwencjonowanie plazmidów
T3	5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'	

3.1.8 Szczepy bakteryjne i plazmidy

Tab. 9 Wykaz szczepów bakteryjnych i plazmidów wykorzystanych w pracy

Nazwa	Opis	Źródło
<i>Campylobacter jejuni</i> 81-176	Szczep dziki (ang. <i>wild type</i> , WT)	ATCC
<i>Campylobacter jejuni</i> DRH212	Szczep <i>Campylobacter jejuni</i> 81-176 (STREP ^R)	dr David R. Hendrixson
<i>Escherichia coli</i> pRY112	Szczep zawierający plazmid pRY112 (CM ^R) do komplementacji	Department of Microbiology, University of Texas
<i>Escherichia coli</i> DH5α/pRK212.1	Zawiera plazmid koniugacyjny do koniugacji <i>Campylobacter</i> (AMP ^R , TET ^R)	Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA
Komórki kompetentne <i>E. coli</i> Nova Blue	Pochodne szczepu K-12 endA1 hsdR17 (rK12– mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F' [proA+B+ lacIqZΔM15::Tn10] (TET ^R)	Novagen
pCR-4-TOPO	Wektor służący do klonowania produktów PCR. Zawiera gen oporności na kanamycynę i ampicylinę.	Invitrogen
pKR021	Plazmid zawierający kasetę <i>rpsL/cat</i>	dr Stuart A. Thompson Augusta University USA
pJK101	pCR-4-TOPO zawierający gen <i>cydB</i>	Otrzymane w trakcie realizacji pracy doktorskiej
pJK201	pCR-4-TOPO zawierający gen <i>hydC</i>	
pJK102	pJK101 z usuniętym genem <i>cydB</i> zawierający regiony otaczające gen <i>cydB</i>	

Nazwa	Opis	Źródło
pJK202	pJK201 z usuniętym genem <i>hydC</i> zawierający regiony otaczające gen <i>hydC</i>	Otrzymane w trakcie realizacji pracy doktorskiej
pJK103	pJK102:: <i>cydBA</i> Δ <i>rpsL</i> / <i>cat</i>	
pJK203	pJK202:: <i>hydC</i> Δ <i>rpsL</i> / <i>cat</i>	
pCM-1	pRY112 zawierający gen <i>cydB</i> i promotor Pcat	
pCM-2	pRY112 gen <i>hydC</i> i promotor Pcat	

3.1.9 Oprogramowanie

Tab. 10 Wykaz użytych programów w pracy

Nazwa programu	Producent
BLAST- Basic Local Alignment Search Tool	NCBI
BioEdit Sequence Alignment Editor	Tom Hall
Geneious Prime	Stellar Data Recovery Inc.
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC
Statistica 13.1	Statsoft, USA
ImageJ	National Institutes of Health
Canva	Canva Pty Ltd.

3.1.10 Aparatura

Tab. 11 Wykaz aparatury użytej do przeprowadzenia badań

Urządzenie	Producent
Cieplarka laboratoryjna MIR-162	Sanyo
Czytnik mikropłytek Spark	Tecan
Elektroporator Gene Pulser Xcell	BioRad
Inkubator CO ₂ New Brunswick Galaxy 48 R	Eppendorf
Inkubator z wytrząsarką Excella E24	Eppendorf
Komora laminarna II klasy bezpieczeństwa A2	Euroclone
Spektrofotometr DS-11 FX	DeNovix
System do elektroforezy horyzontalnej Sub-Cell GT	BioRad
System do obrazowania żeli GelDocGo	BioRad
Termoblok HB-2	Wealtec Corp.

Termocykler SimpliAmp	Applied Biosystems
Transiluminator	Vilber Laormat
Vortex Genie 2	Scientefic Industries
Waga laboratoryjna	Axis
Waga precyzyjna	Ohaus
Wirówka Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Wirówka Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Zasilacz do elektroforezy PowerPac Basic	BioRad

3.2 Metody

3.2.1 Hodowla bakterii

Szczep *C. jejuni* 81-176 hodowano na agarze MH przez 24 godz. w temperaturze 42°C w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂). Następnie szczep *C. jejuni* 81-176 został przesiany na świeży agar MH zawierającym 20 µg/ml cefoperazonu, 10 µg/ml wankomycyny, 2 µg/ml amfoterycyny B i inkubowano go w tych samych warunkach. Otrzymane kolonie wykorzystywano w dalszych etapach badań. Płynne kultury *C. jejuni* 81-176 hodowano w bulionie MH i hodowano w środowisku mikroaerofilnym (5% O₂, 10% CO₂). Szczepy *E. coli* hodowano na agarze LB jak i bulionie LB uzupełnionymi odpowiednimi antybiotykami w zależności od procedury w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C.

3.2.2 Przygotowanie komórek elektrokompetentnych *C. jejuni*

W celu przygotowania komórek elektrokompetentnych *C. jejuni* hodowano w bulionie MH do osiągnięcia OD₆₀₀ 0,35 - 0,4. Następnie hodowlę bakteryjną inkubowano na lodzie przez 30 min, po czym wirowano przy 3000 x g przez 15 min w temperaturze 4°C. Powstały osad zawieszono w 1,5 ml sterylnej zimnej wody destylowanej i odwirowano przy 1000 x g przez 20 min w temperaturze 4°C, po czym osad ponownie zawieszono w 750 µl zimnego 10% glicerolu i wirowano w tych samych warunkach. Osad przemyto następnie dwukrotnie lodowatym 10% glicerolem i na koniec osad zawieszono w 40 µl pożywki GYT.

3.2.3 Losowa mutageneza za pomocą transpozonu

Losową mutagenezę za pomocą transpozonu przeprowadzono przy użyciu zestawu EZ-Tn5 <KAN-2> (Lucigen). Kompetentne komórki *C. jejuni* 81-176 poddano elektroporacji z 1 μ l transpozonu. Elektroporację przeprowadzono w Bio-Rad Gene Pulser Xcell (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω). Po elektroporacji komórki ponownie zawieszono w 100 μ l świeżego bulionu MH, przeniesiono na podłoże Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i pozostawiono do regeneracji na 6 godz. w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂). Transformanty następnie selekcjonowano na agarze MH z kanamycyną (30 μ g/ml).

3.2.4 Hodowla biofilmu *C. jejuni*

Pojedyncze kolonie bakterii hodowano w bulionie MH przez 2 dni. Następnie bakterie rozcieńczono do OD₆₀₀ = 0,2 i inkubowano statycznie przez 72 godz. w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂) na płytkach 96-dołkowych. Tworzenie biofilmu oceniano poprzez barwienie fioletem krystalicznym (CV). W tym celu, usuwano zawiesinę bakteryjną, a studzienki przemyto trzykrotnie wodą. Następnie do każdej studzienki dodano 150 μ l CV i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto CV, każdą studzienkę przepłukano 3 razy wodą, dodano 150 μ l 80% DMSO i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 570 nm.

3.2.5 Identyfikacja genów przerwanych przez transpozon

Miejsca insercji transpozonu określono poprzez sekwencjonowanie ampliconu otrzymanego przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy z arbitralnym starterem (AP-PCR) (Garsin i wsp., 2004). W tym celu przeprowadzono dwie rundy PCR. W pierwszej rundzie PCR wykorzystano dwa startery, starter sensowny (Tn5-1-R) specyficzny dla sekwencji transpozonu i arbitralny starter antysensowny (ARB1), który ma dwa regiony: pierwszy region (R1) działa jak dowolny starter i składa się z 10 losowych nukleotydów starterowych DNA, które przyłączają się w różnych losowych miejscach natomiast drugi region (R2) zawiera sekwencję specjalnie zaprojektowaną o długości

20 bp, która posłużyła jako cel w drugiej rundzie PCR. Po pierwszej rundzie produkt PCR został rozcieńczony pięciokrotnie i użyty w drugiej rundzie PCR ze starterem komplementarnym do sekwencji R2 startera ARB1 (ARB2) i starterem specyficznym dla transpozonu (KAN-RP). Otrzymany produkt uwidoczniano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, a pojedyncze prążki wycinano z żelu, oczyszczano i przesłano do sekwencjonowania. Po sekwencjonowaniu wyniki porównywano z genomem *C. jejuni* 81-176 (numer dostępu Genbank CP000538.1) w celu identyfikacji genów przerwanych przez transpozon.

Tab. 12 Skład mieszaniny reakcyjnej w pierwszej rundzie AP-PCR

Składnik	Objętość
Bufor DreamTaq (10x)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Starter ARB1 (10 µM)	0,5 µl
Starter Tn5-1-R (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	20 µl
Polimeraz DreamTaq	0,25 µl
Matryca DNA	1 µl

Tab. 13 Skład mieszaniny reakcyjnej w drugiej rundzie AP-PCR

Składnik	Objętość
Bufor DreamTaq (10x)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Starter ARB2 (10 µM)	0,5 µl
Starter KAN-RP (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	20 µl
Polimeraz DreamTaq	0,25 µl
Matryca produkt PCR	1 µl
z pierwszej rundy rozcieńczony 1:4	

Tab. 14 Warunki pierwszej rundy AP-PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	95°C	3 min	1
Denaturacja DNA	95°C	30 s	35
Hybrydyzacja starterów	34°C	45 s	35
Elongacja	72°C	2 min	35
Końcowa elongacja	72°C	10 min	1
Chłodzenie	4°C	∞	1

Tab. 15 Warunki drugiej rundy AP-PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja DNA	95°C	30 s	40
Hybrydyzacja starterów	45°C	30 s	40
Elongacja	72°C	1 min	40
Końcowa elongacja	72°C	5 min	1
Chłodzenie	4°C	∞	1

3.2.6 Izolacja genomowego DNA

Osady bakteryjne, uzyskane poprzez wirowanie 2 ml hodowli bakteryjnej przez 5 min przy 15000 x g, zawieszono w 100 µl 0.1M Tris-HCL pH 7.4 zawierającym 2µg/ml lizozymu. Uzyskaną zawiesinę bakteryjną inkubowano przez 20 min w 37 °C. Po tym czasie do zawiesiny dodano 10 µl 10 % roztworu SDS i kontynuowano inkubację przez kolejne 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 200 µl 5 M GuHCl i proces inkubacji przedłużono o kolejne 10 min w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dodano mieszaninę fenolu z chloroformem i alkoholem izoamylovym w stosunku 25:24:1 i wytrząsano przez 1 min. Po wytrząsaniu próbki wirowano przez 5 minut przy 15000 x g. Otrzymaną fazę wodną przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i wytrącano z niej DNA przy użyciu równej objętości alkoholu izopropylowego. Próby wirowano przez 5 min przy 15000 x g, zlewano alkohol znad osadu a osad przemywano w 1 ml 70 % alkoholu etylowego. Po kolejnym wirowaniu płyn znad osadu usuwano, a sam osad po wysuszeniu został zawieszony w 50 µl H₂O.

3.2.7 Konstrukcja mutantów delecyjnych

Mutanty delecyjne szczepu *C. jejuni* 81-176 skonstruowano przy użyciu systemu kontrselekcji. Geny będące przedmiotem badań zostały amplifikowane za pomocą PCR (Tab. 16, 17), przy użyciu odpowiednich dla danych genów starterów FOR i REV (Tab. 8). Dla genu *cydB* powielano region o wielkości 2134 bp obejmujący gen *cydB* (1124 bp) wraz z otoczeniem: 494 bp powyżej genu *cydB* i 516 bp poniżej genu *cydB*. Dla genu *hydC* powielano region o wielkości 1434 bp obejmujący gen *hydC* (717 bp) wraz z otoczeniem: 334 bp powyżej genu *hydC* i 383 bp poniżej genu *hydC*. Każdy powstały produkt został następnie wprowadzony do wektora pCR-4-TOPO. Powstałe plazmidy (pJK101, pJK201) (Tab. 9) zostały następnie poddane Inverse-PCR (Tab. 19,20) przy użyciu odpowiednich dla danych genów starterów inv-FOR i inv-REV (Tab. 8). Powielone produkty PCR trawiono za pomocą AgeI oraz DnpI i ligowano uzyskując plazmidy pJK102 oraz pJK202. Plazmid pJK102 zawierał regiony otaczające gen *cydB* (łącznie 1010 bp) oraz 57 bp początku sekwencji i 48 bp końca sekwencji genu *cydB*. Plazmid pJK202 zawierał regiony otaczające gen *hydC* (łącznie 717 bp) oraz 66 bp początku sekwencji genu *hydC* i 114 bp końca sekwencji genu *hydC* (Tab.9). Startery rpsLcat-FOR i rpsLcat-REV (Tab. 8) zastosowano do amplifikacji kasety *rpsL/cat* (STREP^S, CM^R) z pKR021 (Rathbun i wsp., 2009). Nowo powstałe plazmidy i kasetę *rpsL/cat* strawiono enzymami restrykcyjnymi (AgeI/NheI) i ligowano, aby utworzyć nowe plazmidy (pJK103, pJK203) (Tab. 9). Utworzone plazmidy pJK103, pJK203 wprowadzono poprzez elektroporację do szczepu *C. jejuni* 81-176 (DRH212) zawierającego spontaniczną mutację nadającą oporność na streptomycynę (STREP). Transformanty selekcjonowano na agarze MH z chloramfenikolem (CM) (15 µg/ml). Transformanty odporne na chloramfenikol i wrażliwe na streptomycynę (CM^R STREP^S) natychmiast poddano elektroporacji plazmidem pJK102 lub pJK202 (Tab. 9) w celu usunięcia kasety *rpsL/cat*. Mutanty selekcjonowano na agarze MH ze streptomycyną w stężeniu 500 lub 1000 lub 2000 µg/ml. Pojedyncze kolonie pobrane z tych podłoży badano przesiewowo za pomocą starterów spr-FOR i spr-REV (Tab. 8) odpowiednich dla genu *cydB* lub *hydC*, aby potwierdzić pomyślną delecję danego genu bez markera selekcyjnego.

Tab. 16 Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Objętość
Bufor DreamTaq (10x)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Starter FOR (10 µM)	0,5 µl
Starter REV (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	20 µl
Polimeraz DreamTaq (5U)	0,25 µl
Matryca DNA	1

Tab. 17 Warunki PCR dla genów *cydB* i *hydC*

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	95 °C	3 min	1
Denaturacja DNA	95 °C	30 s	35
Hybrydyzacja starterów	<i>cydB</i> - 53 °C	30 s	35
	<i>hydC</i> - 56 °C		
Elongacja	72 °C	<i>cydB</i> - 2 min 30 s	35
		<i>hydC</i> - 1 min 30 s	
Końcowa elongacja	72 °C	10 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

3.2.7.1 Otrzymanie plazmidów pJK101 i pJK102

Przygotowano mieszaniny reakcyjne (Tab. 18) i inkubowano je przez 3 h w 22 °C. Następnie 2 µl mieszaniny reakcyjne wprowadzono do komórek Nova Blue i inkubowano na lodzie przez 40 min. Następnie komórki poddano szokowi termicznemu poprzez inkubację w 42 °C przez 40 s, po czym schłodzono je na lodzie przez 3 min. W kolejnym etapie do komórek dodano 450 µl medium SOC i inkubowano przez 1 godz. 30 min w 37 °C przy ciągłym wytrząsaniu z prędkością 230 rpm. Po tym czasie komórki zwirowano przez 3 min z prędkością 3000 x g, a otrzymany osad zawieszono w 150 µl świeżego medium SOC. Następnie 50 µl zawiesiny wysiano na

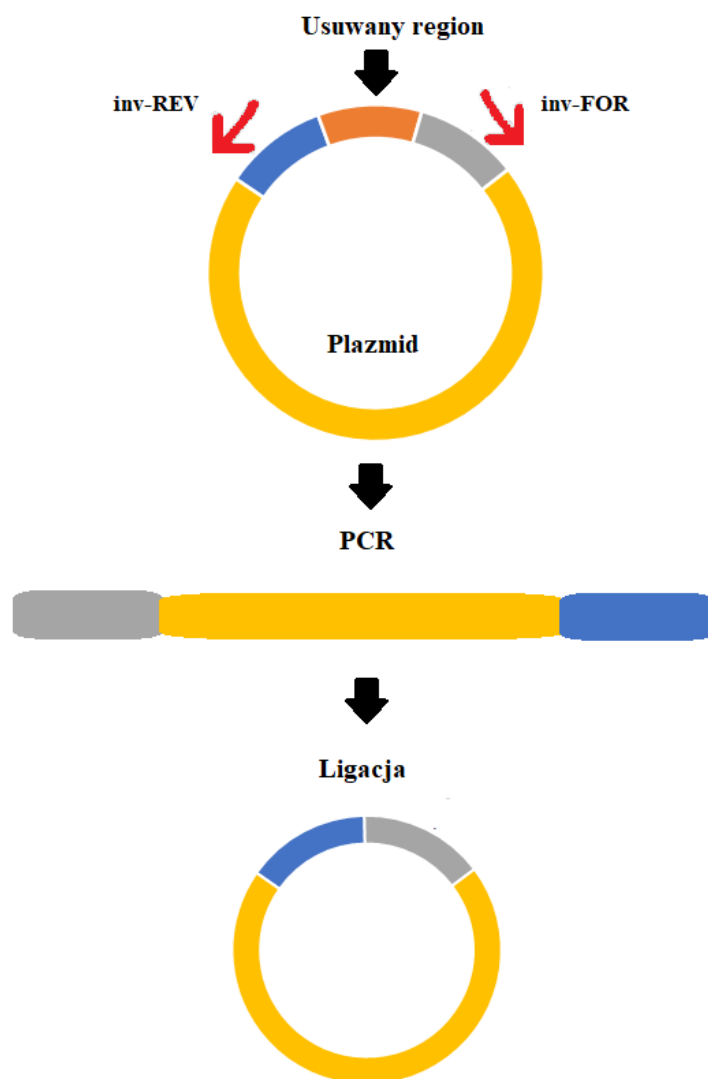
agar LB zawierający ampicyliną o stężeniu 50 µg/ml i inkubowano w 37 °C przez 24 h. Aby upewnić się czy transformanty zawierają odpowiednie plazmidy przeprowadzono colony PCR (3.2.9) oraz sekwencjonowano wyizolowane plazmidy (3.2.10 i 3.2.11).

Tab. 18 Skład mieszaniny reakcyjnej podczas klonowania z użyciem wektora pCR-4-TOPO

Składnik	Objętość
Oczyszczony produkt PCR (Tab. 17)	1 µl
Salt Solution	1 µl
H ₂ O	3 µl
TOPO Vector	1 µl

3.2.7.2 Otrzymanie plazmidów pJK102 i pJK202

Na początku przeprowadzono odwrotną reakcję PCR (z ang. Inverse PCR) wykorzystując odpowiednie startery inv-FOR i inv-REV (Tab.8) oraz plazmidy pochodzące z punktu 3.2.7.1. Inverse PCR jest to metoda, która umożliwia amplifikację regionu o nieznannej sekwencji przy użyciu starterów zorientowanych w odwrotnym kierunku. Metoda ta znalazła zastosowanie w modyfikacji wcześniej sklonowanych sekwencji. W zależności od celu modyfikacji, można przeprowadzić różne operacje mające na celu delecję, substytucję lub wstawienie pożądanej sekwencji w plazmidzie (Silva i wsp., 2017). W tym przypadku Inverse PCR wykorzystano w celu usunięcia określonej sekwencji z plazmidu (Ryc. 5).



Ryc. 5 Inverse PCR dla delecji. Źródło: opracowanie własne

Plazmidy z punktu 3.2.7.1 posłużyły jako matryce do amplifikacji (Tab. 19, 20). Następnie otrzymane produkty trawiono enzymami restrykcyjnymi AgeI i DpnI w temperaturze 37 °C, przez 60 min, a następnie inkubowano w temperaturze 65 °C przez 20 min w celu inaktywacji enzymów (Tab. 21). Po trawieniu enzymami restrykcyjnymi produkty oczyszczano za pomocą GeneJet PCR Purification Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Oczyszczone produkty poddawano autoligacji poprzez inkubację w temperaturze 22 °C przez 3 godz. (Tab. 22). Następnie przeprowadzano transformację komórek Nova Blue (zgodnie z protokołem z punktu 3.2.7.1).

Tab. 19 Skład mieszaniny reakcyjnej w Inverse PCR

Składnik	Objętość
Bufor Phusion HF (5x)	5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
Starter inv-FOR (10 μ M)	0,5 μ l
Starter inv-REV (10 μ M)	0,5 μ l
H ₂ O	17,25 μ l
Polimeraz Phusion (2U)	0,25 μ l
Matryca plazmid z punktu 3.2.7.1	1 μ l

Tab. 20 Warunki Inverse PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	98 °C	3 min	1
Denaturacja DNA	95 °C	10 s	35
Hybrydyzacja starterów	pJK101 - 55 °C pJK201 - 59 °C	30 s	35
Elongacja	72 °C	pJK101, pJK201 - 2 min 30 s	35
Końcowa elongacja	72 °C	10 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

Tab. 21 Skład mieszaniny podczas trawienia enzymami AgeI/DpnI

Składnik	Objętość
Bufor 1.1	10 μ l
AgeI (20 U)	2 μ l
DpnI (20 U)	1 μ l
Inverse PCR 1 μ g	X μ l
H ₂ O	Uzupełnione do 100 μ l

Składnik	Objętość
produkt PCR trawiony AgeI i DpnI (120ng)	x µl
2x bufor do ligacji	10 µl
3U Ligaza T4 DNA	1 µl
H ₂ O	Uzupełniona do 20 µl

Tab. 22 Skład mieszaniny ligacyjnej

3.2.7.3 Otrzymanie plazmidów pJK103 i pJK203

Otrzymanie plazmidów pJK103 i pJK203 zostało osiągnięte poprzez połączenie w procesie ligacji strawionych plazmidów pJK102 i pJK202 z kasetą *rpsL/cat* (STREP^S CM^R) pochodzącą z pKR021. W tym celu zamplifikowaną kasetę *rpsL/cat* (Tab. 23, 24) oraz plazmidy trawiono enzymami restrykcyjnymi AgeI i NheI przez 2 godz. w 37 °C (Tab. 25), a następnie inaktywowano enzymy w temperaturze 65 °C przez 20 min. Uzyskane fragmenty zostały wycięte z żelu i oczyszczone przy użyciu zestawu GeneJet Gel Extraction zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczone produkty poddano następnie ligacji (Tab. 26). Mieszaniny ligacyjne inkubowano przez 3 godz. w temperaturze 22 °C, a następnie przeprowadzano transformację komórek Nova Blue zgodnie z protokołem z punktu 3.2.7.1 i selekcjonowano je na agarze LB z dodatkiem AMP (50 µg/ml) i CM (30 µg/ml). Aby upewnić się czy transformanty zawierają kasetę *rpsL/cat* przeprowadzono colony PCR (3.2.9) oraz sekwencjonowano wyizolowane plazmidy (3.2.10 i 3.2.11).

Tab. 23 Skład mieszaniny reakcyjnej w celu amplifikacji kasety *rpsL/cat*

Składnik	Objętość
Bufor Phusion HF (5x)	5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Starter <i>rpsLcat</i> -FOR (10 µM)	0,5 µl
Starter <i>rpsLcat</i> -REV (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	17,25 µl
Polimeraz Phusion (2 U)	0,25 µl
Matryca pKR021	1 µl

Tab. 24 Warunki PCR podczas amplifikacji kasety *rpsL/cat*

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	98 °C	2 min	1
Denaturacja DNA	98 °C	10 s	35
Hybrydyzacja starterów	57 °C	30 s	35
Elongacja	72 °C	1 min 30 s	35
Elongacja kończąca	72 °C	10 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

Tab. 25 Skład mieszaniny reakcyjnej podczas trawienia enzymami AgeI i NheI

Składnik	Objętość
Plazmid lub kasetka <i>rpsL/cat</i> (1 µg)	X µl
AgeI (20 U)	2 µl
NheI (20 U)	1 µl
Bufor 1.1	10 µl
H ₂ O	Uzupełnione do 100 µl

Tab. 26 Skład mieszanin ligacyjnych

Składnik	Objętość
Plazmid pJK102 po trawieniu AgeI/NheI (50 ng)	X µl
Kasetka <i>rpsL/cat</i> po trawieniu AgeI/NheI (145 ng)	X µl
2x bufor do ligacji	10 µl
3U Ligaza T4 DNA	1 µl
H ₂ O	Uzupełniona do 25 µl

Składnik	Objętość
Plazmid pJK202 po trawieniu AgeI/NheI (50 ng)	X µl
Kasetka <i>rpsL/cat</i> po trawieniu AgeI/NheI (151 ng)	X µl
2x bufor do ligacji	10 µl
3U Ligaza T4 DNA	1 µl
H ₂ O	Uzupełniona do 25 µl

3.2.7.4 Wprowadzenie zmutowanego allelu do *C. jejuni* DRH212

Zmutowany allel został wprowadzony poprzez elektroporację z plazmidem z punktu 3.2.7.1 do szczepu DRH212, który jest pochodną szczepu *C. jejuni* 81-176 opornym na streptomycynę. Uzyskane transformanty CM^R/STREP^S zostały ponownie poddane elektroporacji z plazmidem zawierającym zmutowany gen, ale pozbawionym kasety *rpsL/cat*. W rezultacie w zmutowanym szczepie pozostały tylko regiony flankujące genu z delecją bez markera selekcyjnego. Aby potwierdzić delecję genu z uzyskanych mutantów wyizolowano z nich DNA (3.2.6) i przeprowadzono reakcję PCR przy pomocy starterów spr-FOR i spr-REV (Tab. 8). W dalszej kolejności uzyskane produkty wysłano do sekwencjonowania w celu potwierdzenia uzyskania prawidłowego mutantu delecyjnego.

3.2.7.4.1 Elektroporacja I

Do komórek elektrokompetentnych *C. jejuni* DRH212 dodano 2 µl jednego z plazmidów z punktu 3.2.7.2 i poddano elektroporacji (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Następnie komórki zawieszono w 100 µl świeżego bulionu MH i przeniesiono na podłoże Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i pozostawiono na 6 godz. w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂). Transformanty następnie selekcjonowano na agarze MH z chloramfenikolem (15 µg/ml). Wyrosłe kolonie następnie przesiewano wykorzystując odbicie lustrzane na agar MH z CM 30 µg/ml, STREP 100 µg/ml i STREP 500 µg/ml. Z transformantów CM^R /STREP^S wyizolowano DNA (3.2.6) i przeprowadzono PCR (Tab. 27, 28) w celu potwierdzenia występowania kasety *rpsL/cat*.

Tab. 27 Skład mieszaniny PCR

Składnik	Objętość
Bufor DreamTaq (10x)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Starter rpslcat-FOR (10 µM)	0,5 µl
Starter rpslcat-REV (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	20 µl
Polimeraz DreamTaq	0,25 µl
Matryca DNA	1 µl

Tab. 28 Warunki PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	95 °C	3 min	1
Denaturacja DNA	95 °C	30 s	35
Hybrydyzacja starterów	57 °C	30 s	35
Elongacja	72 °C	1 min 30 s	35
Końcowa elongacja	72 °C	7 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

3.2.7.4.2 Elektroporacja II

Do komórek elektrokompetentnych mutantów DRH212 CM^R/STREP^S dodano 2 µl odpowiedniego plazmidu z punktu 3.2.7.3 i poddano elektroporacji (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Po elektroporacji komórki zawieszono w 100 µl świeżego bulionu MH i przeniesiono na podłoże Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i pozostawiono do regeneracji na 6 godz. w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂). Transformanty następnie selekcjonowano na trzech szalkach Petriego zawierających agar MH ze STREP (1 - 500 µg/ml; 2 - 1000 µg/ml; 3 - 2000 µg/ml). Kolonie uzyskanych mutantów przesiewano równocześnie na dwie płytki: agar MH z CM 30 µg/ml i STREP 100 µg/ml. Z transformantów CMS/STREP^R wyizolowano DNA (3.2.6) i przeprowadzono PCR (Tab. 29, 30) w celu potwierdzenia usunięcia kasety *rpsL/cat*. W dalszej kolejności produkt PCR wysłano do sekwencjonowania (startery spr-FOR i spr-REV) w celu potwierdzenia poprawnej delecji genu.

Tab. 29 Skład mieszaniny PCR

Składnik	Objętość
Bufor DreamTaq (10x)	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
Starter spr-FOR (10 μ M)	0,5 μ l
Starter spr-REV (10 μ M)	0,5 μ l
H ₂ O	20 μ l
Polimeraz DreamTaq (5 U)	0,25 μ l
Matryca DNA	1 μ l

Tab. 30 Warunki PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	95 °C	3 min	1
Denaturacja DNA	95 °C	30 s	35
Przyłączenie starterów	Δ <i>cydB</i> 53 °C Δ <i>hydC</i> 56 °C	30 s	35
Elongacja	72 °C	Δ <i>cydB</i> 1 min 15 s Δ <i>hydC</i> 1 min	35
Końcowa elongacja	72 °C	7 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

3.2.8 Komplementacja otrzymanych mutantów

Aby upewnić się, że obserwowany fenotyp zmutowanego szczepu jest związany z delecją badanych genów, przeprowadzono komplementację mutantów dziką kopią genów. W tym celu odpowiedni gen amplifikowano metodą PCR (Tab. 31,32) ze starterami comp-FOR i comp-REV (Tab. 8).

Tab. 31 Skład mieszaniny PCR dla genów *cydB* i *hydC*.

Składnik	Objętość
Bufor Phusion HF (5x)	5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Starter comp-FOR (10 µM)	0,5 µl
Starter comp-REV (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	17,25 µl
Polimeraz Phusion (2 U)	0,25 µl
Matryca DNA <i>C. jejuni</i> 81-176	1 µl

Tab. 32 Warunki PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	98 °C	3 min	1
Denaturacja DNA	98 °C	10 s	35
Hybrydyzacja starterów *	<i>cydB</i> 71,9 °C <i>hydC</i> 69,6 °C	30 s	35
Elongacja	72 °C	<i>cydB</i> 45 s <i>hydC</i> 30 s	35
Elongacja kończąca	72 °C	10 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

*Temperaturę hybrydyzacji starterów określono za pomocą kalkulatora na stronie (www.thermofisher.com/tmcalculator)

Oczyszczone produkty PCR oraz wektor pRY112 (CM^R) trawiono przy użyciu enzymu BamHI (Tab. 33,34). Następnie strawione produkty oraz plazmid zostały rozdzielone poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Oczekiwane fragmenty (produkty i plazmid) zostały wycięte z żelu, a następnie oczyszczone przy użyciu zestawu do ekstrakcji żelowej GeneJet Gel Extraction.

Tab. 33 Skład mieszanin reakcyjnych podczas trawienia enzymami BamHI i PstI

Składnik	Objętość	Składnik	Objętość
pRY112 (1 µg)	X µl	PCR <i>cydB</i> lub <i>hydC</i>	X µl
bufor FastDigest	2 µl	(0,2 µg)	
FastDigest BamHI	1 µl	Bufor FastDigest	2 µl
H ₂ O	Uzupełniona do 20 µl	FastDigest BamHI	1 µl
		H ₂ O	Uzupełniona do 30 µl

Składnik	Objętość	Składnik	Objętość
PCR <i>cydB</i> lub <i>hydC</i>	X µl	pRY112 strawione BamHI	X µl
strawione BamHI (0,2 µg)		(1 µg)	
Bufor FastDigest	2 µl	Bufor FastDigest	2 µl
FastDigest PstI	1 µl	FastDigest PstI	1 µl
H ₂ O	Uzupełnio na do 30 µl	H ₂ O	Uzupełniona do 20 µl

Oczyszczone produkty PCR oraz plazmid trawiono następnie przy użyciu enzymów PstI i oczyszczano jak poprzednio.

Tab. 34 Czas trawienia enzymami restrykcyjnymi FastDigest

Enzym	Plazmid	PCR
BamHI	5 min 37 °C następnie 5 min 80 °C	5 min 37 °C następnie 5 min 80 °C
PstI	5 min 37 °C	30 min 37 °C

Następnie przeprowadzono ligację w temperaturze 22 °C przez 3 h (Tab. 35). Dwa µl każdej mieszaniny użyto do transformacji DH5α/pRK212.1 (według protokołu w punkcie 3.2.7.1). Transformanty selekcjonowano na agarze LB zawierający AMP (100 µg/ml), TET (12,5 µg/ml) i CM (30 µg/ml).

Tab. 35 Skład mieszanin ligacyjnych w celu utworzenia plazmidów do komplementacji pCM-1 i pCM-2

pCM-1	
Składnik	Objętość
Plazmid pRY112 strawiony BamHI i PstI (76 ng)	X μ l
Produkt PCR <i>cydB</i> stawiony BamHI i PstI (145 ng)	X μ l
2x Bufor do ligacji	10 μ l
3U Ligaza T4 DNA	1 μ l
H2O	Uzupełniona do 20 μ l

pCM-2	
Składnik	Objętość
Plazmid pRY112 strawiony BamHI i PstI (112) ng	X μ l
Produkt PCR <i>hydC</i> stawiony BamHI i PstI (145) ng	X μ l
2x Bufor do ligacji	10 μ l
3U Ligaza T4 DNA	1 μ l
H2O	Uzupełniona do 20 μ l

3.2.8.1 Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* DH5a/pRK212.1

Pojedynczą kolonią, uzyskaną za pomocą posiewu redukcyjnego na podłożu stałym LB z dodatkiem AMP (100 μ g/ml) i TET (12,5 μ g/ml), zaszczerpiono 5 ml bulionu LB z tymi samymi antybiotykami i inkubowano przez noc w 37°C przy 230 rpm. Następnie hodowlę rozcieńczano 1:40 i inkubowano do osiągnięcia wartości OD₆₀₀ 0,4 - 0,5. Bakterie zostały następnie odwirowane przez 10 minut w 4°C przy prędkości 6000 rpm. Po odwirowaniu osad bakteryjny zawieszono w zimnym 50 mM CaCl₂ i inkubowano na lodzie przez 20 min. Bakterie ponownie odwirowano przez 10 min w 4°C przy 6000 rpm. Po kolejnym odwirowaniu osad bakteryjny zawieszono w 2,5 ml 50 mM CaCl₂ z dodatkiem 25% glicerolu. Bakterie w objętości 80 μ l rozdzielono do probówek typu Eppendorf i zamrożono w -80°C.

3.2.8.2 Koniugacja *Campylobacter jejuni* z *E. coli*

Przenoszenie DNA do *C. jejuni* jest możliwe za pomocą koniugacji, procesu, w którym dochodzi do transferu materiału genetycznego między bakteriami poprzez bezpośredni kontakt komórek. Szczepy *E. coli*, które zawierają plazmid mobilizacyjny pRK212.1, wykazują zdolność do przeprowadzania koniugacji z *C. jejuni*.

Dzień 1

1. Wysianie mutantów *C. jejuni* na agar MH zawierający 20 µg/ml cefoperazonu, 10 µg/ml wankomycyny, 2 µg/ml amfoterycyny B i inkubowanie przez 48 godz. w temperaturze 42°C w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂).

Dzień 2

1. Wysianie *E. coli* z danym plazmidem pCM-1/pCM-2 na agar LB zawierający AMP (100 µg/ml), TET (12,5 µg/ml), CM (30 µg/ml) i inkubowanie w temperaturze 37 °C przez 24 godz.

Dzień 3

1. Przesianie mutantów *C. jejuni* na 3 płytki z agarem MH zawierającym 20 µg/ml cefoperazonu, 10 µg/ml wankomycyny, 2 µg/ml amfoterycyny B i inkubowanie przez 18 godz. w temperaturze 42°C w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂).
2. Rozpoczęcie nocnej hodowli szczepu *E. coli* z danym plazmidem pCM-1/pCM-2 w 5ml bulionu LB zawierającym AMP (100 µg/ml), TET (12,5 µg/ml), CM (30 µg/ml) i inkubowanie w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem 230 rpm.

Dzień 4

1. Zaszczepienie 10 ml LB zawierającego CM (15 µg/ml) 375 µl całonocnej hodowli *E. coli* z plazmidem pCM-1/pCM-2 i inkubacja do OD₆₀₀ = 0.45 - 0.5.
2. Zaszczepienie 6 ml bulionu MH mutantami *C. jejuni* (18-godzinna hodowla z płytek) i doprowadzenie do OD₆₀₀ = 1.0.
3. Przemycie jednorazowe 0,5 ml kultury bakteryjnej *E. coli* o OD₆₀₀ = 0,45 - 0,5, poprzez 5-minutowe wirowanie przy 3000 × g, w temperaturze 4 °C. Następnie usunięcie supernatantu i dodanie 10 ml bulionu MH bez antybiotyków. Po tym etapie, ponowne wirowanie przy tych samych warunkach, a następnie usunięcie supernatantu w celu eliminacji wszelkich pozostałości antybiotyków. Ostatecznie, zawieszenie osadu szczepu *E. coli* w 1 ml zawiesiny szczepu biorcy *C. jejuni*.

4. Wirowanie mieszaniny bakteryjnej przez 5 min przy $3000 \times g$, $4^\circ C$ i usunięcie supernatantu.
5. Zawieszenie komórek w 100 μl bulionu MH bez antybiotyków. Nałożenie na agar MH bez antybiotyków.
6. Inkubowanie w temperaturze $37^\circ C$ w warunkach mikroaerofilnych (5% O_2 , 10% CO_2) przez 6 godz.
7. Zawieszenie bakterii z punktu 6 w 2 ml bulionu MH i wirowanie przez 5 min przy $3000 \times g$, $4^\circ C$ a następnie usunięcie supernatantu.
8. Zawieszenie bakterii z punktu 7 w 1,8 ml bulionu MH i rozprowadzenie po 200 μl bakterii na agarze MH zawierającym 10 $\mu g/ml$ trimetoprimu, 100 $\mu g/ml$ streptomycyny i 10 $\mu g/ml$ chloramfenikolu i inkubowanie przez 4-5 dni w temperaturze $42^\circ C$ w warunkach mikroaerofilnych (5% O_2 , 10% CO_2).

3.2.9 Colony PCR

Obecność plazmidów w uzyskanych transformantach potwierdzano za pomocą metody colony PCR. Uzyskane kolonie transformantów dodawano bezpośrednio do reakcji PCR.

Tab. 36 Skład mieszaniny PCR

Składnik		Objętość
Bufor DreamTaq (10x)		2,5 μl
dNTP (10 mM)		0,5 μl
Startery: FOR (10 μM) i REV (10 μM)	pJK101, pJK201 pJK102, pJK202	Każdy po 0,5 μl
FOR (10 μM) i rpsL/cat-REV (10 μM)	pJK103, pJK203	
T7 (10 μM) i comp-REV (10 μM)	pCM-1, pCM-2	
Polimeraza DreamTaq		0,25 μl
H ₂ O		20 μl
Matryca		Pojedyncza kolonia

Tab. 37 Warunki colony PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja DNA	95 °C	3 min	1
Denaturacja DNA	95 °C	30 s	35
Hybrydyzacja starterów	pJK101, pJK102 - 53 °C pCM-2 - 55 °C pJK201, pJK202 - 56 °C pCM-1 - 57 °C	30 s	35
Elongacja	72 °C	pJK102, pJK202, pCM-2 - 1 min pCM-1 – 1 min 15 s pJK201 – 1 min 30 s pJK101 – 2 min 30 s	35
Końcowa elongacja	72 °C	10 min	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

3.2.10 Izolacja plazmidów

Izolacje plazmidów przeprowadzono za pomocą zestawu do izolacji plazmidów GeneJet Plasmid Miniprep Kit zgodnie z instrukcją producenta. W tym celu 2 ml 16-18 godzinnej hodowli bakteryjnej wirowano przez 2 min z prędkością 8000 rpm. Otrzymany osad został zawieszony w 250 µl buforu 1 w celu rozpuszczenia komórek. Następnie dodano 250 µl buforu 2 w celu lizy komórek, po czym delikatnie mieszano poprzez inwersję. W kolejnym kroku dodano 350 µl buforu 3 w celu renaturacji DNA i również mieszano poprzez inwersję. Próbkę została następnie poddana wirowaniu przez 5 min przy obrotach 12 000 rpm, a uzyskany supernatant został przeniesiony na kolumnę, gdzie ponownie go wirowano przez 1 min przy obrotach 12 000 rpm.

Kolumna następnie została dwukrotnie przemyta przy pomocy buforu 4. W końcowym etapie przeprowadzono elucję dodając 31 ul H₂O ogrzanej do 70 °C. Do oceny stężenia i czystości wyizolowanego plazmidu posłużono się spektrofotometrem DS-11 FX (DeNovix)

3.2.11 Sekwencjonowanie plazmidów

Poprawność sekwencji uzyskanych plazmidów została zweryfikowana poprzez sekwencjonowanie przy użyciu starterów T7 i T3, które przeprowadziła firma Genomed S.A.

3.2.12 Określenie zdolności tworzenia biofilmu uzyskanych mutantów w warunkach statycznych

Zdolność tworzenia biofilmu przeprowadzono zgodnie z punktem 3.2.4

3.2.13 Określenie zdolności ruchu uzyskanych mutantów

Aby ocenić ruchliwość, pojedynczą kolonię hodowano w MHB do OD₆₀₀ = 0,2. Następnie 1 µl inokulum wkłuwano za pomocą pipety w środek 9-cm szalki Petriego zawierającej 25ml 0,4 % agaru MH i inkubowano przez noc w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂).

3.2.14 Krzywa wzrostu

Dla szczepu dzikiego, zmutowanych szczepów oraz szczepów po komplementacji sporządzono krzywe wzrostu. Nocne hodowle *C. jejuni*, rozcieńczono w bulionie MH do OD₆₀₀ = 0,05 i inkubowano w temperaturze 42°C w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂). Próbkę pobierano we wskazanych odstępach czasu co 3 godz. i określano wartości OD₆₀₀.

3.2.15 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Biofilm do analizy SEM przygotowano metodą inkubacji adsorpcyjnej. W tym celu 2 ml zawiesiny bakteryjnej ($OD_{600} = 0,2$) w bulionie MH dodano do 6-studzienkowej płytki zawierającej agar MH i inkubowano przez 3 dni. Po inkubacji delikatnie usunięto supernatant, a fragmenty agaru przepłukano PBS w celu wyeliminowania luźno przylegających komórek bakteryjnych. Fragmenty agaru z dołączonymi biofilmami zawarte w probówkach typu Eppendorf zalano 0,5 mL 2,5% roztworu aldehydu glutarowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i inkubowano przez jeden dzień w temperaturze 4°C. Po procesie utrwalenia próbki krótko odwirowano i trzykrotnie przemyto w 0,1 M buforze kakodylanowym (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Później próbki przepuszczano przez rosnący gradient stężenia etanolu (30%, 50%, 70%, 90% i 99,8%). Otrzymane próbki napyłano warstwą węgla (EM ACE600, Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy) i obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Auriga 60 (Oberkochen, Niemcy) przy powiększaniu 2500 i 10000. Badania przeprowadzono w 2 powtórzeniach.

3.2.16 Konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (CLSM)

Szczepki *C. jejuni* hodowano na agarze MH przez 24 godz. w 42°C w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂). Następnie bakterie zawieszano w bulionie MH i doprowadzano do $OD_{600} = 0.5$. Następnie 1 ml zawiesiny bakteryjnej zaszczerpiono na sterylnych 96-dołkowych polisterynowych płytkach i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze 42°C w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂). Następnie zawiesinę bakteryjną na płytce ostrożnie zastąpiono 1 ml świeżego bulionu MH i inkubowano przez 3 dni w tych samych warunkach. Przed obserwacją biofilmu komórki barwiono poprzez dodanie barwników SYTO 9 i jodku propidyny (PI) według instrukcji producenta. Tak wybarwione komórki obserwowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss Cell Observer SD wyposażonym w obiektyw 10x (NA 0.3) (Zeiss, Gottingen, Niemcy) i kamerę Rolera EM-C2 (QImaging, Surrey, BC, Kanada). Żywe komórki wybarwione SYTO-9 (zielone) wykrywano przy użyciu lasera 488 nm (Zeiss/Leica) i emisji 502-538 nm. Martwe komórki wybarwione PI (czerwone) obrazowano za pomocą lasera 561 nm (Zeiss) lub 552 nm (Leica) przy emisji 575-625

nm. Pozyskane obrazy poddano obróbce i analizie w programie Fiji/ImageJ i określono procent żywych i martwych komórek. Badania przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Dla każdego powtórzenia analizowano 3 zdjęcia.

3.2.17 Analiza biofilmu za pomocą systemu mikroprzepływowego BioFlux 1000z

System przepływu mikroprzepływowego BioFlux 1000z z płytkami 48-dołkowymi (Fluxion Biosciences, Alameda, USA) wykorzystano do badania adhezji i tworzenia biofilmu w przepływie ciągłym. Szczepy bakteryjne *C. jejuni* rozcieńczono do uzyskania 10^8 CFU/ml w MHB. Na początek inokulum (1ml) inkubowano przez 1 minutę bez przepływu w celu adhezji bakterii w studzienkach. Następnie zainicjowano przepływ przy 0,2 dyn na 1 cm^2 . Płytkę inkubowano w temperaturze 42°C przez 48 godz. w komorze inkubatora (85% N_2 i 10% CO_2) (Carl Zeiss Pecon Incubator XL S1, Erbach, Niemcy). Obrazowanie prowadzono w odstępach 2-godzinnych przez 48 godz. przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axio Inverted Observer 7 (Carl Zeiss, Erbach, Niemcy) wyposażonego w kamerę Orca Flash 40 (Hamamatsu, Japonia) i obiektyw $10\times$ (tryb kontrastu różnicowo-interferencyjnego [DIC]). Obrazy następnie analizowano za pomocą oprogramowania Image J na podstawie analizy progowej tła. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych i trzech powtórzeniach technicznych.

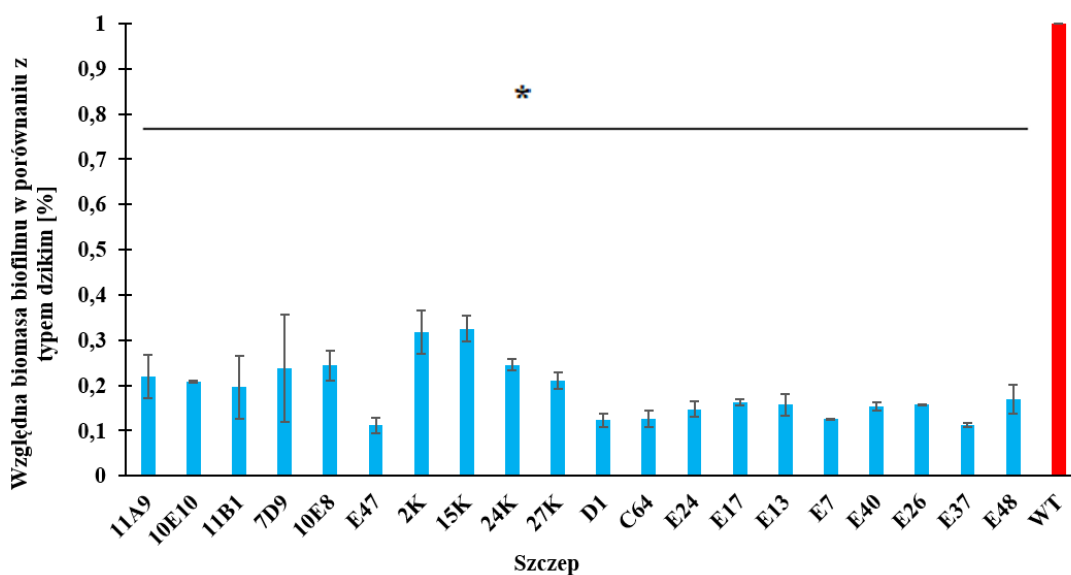
3.2.18 Analiza statystyczna

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.1. Każdy eksperyment przeprowadzono przynajmniej w 3 powtórzeniach. Do określenia istotności obserwowanych różnic w tworzeniu biofilmu między mutantami Ez-Tn5 użyto jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Tukeya. ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test Bonferroniego pozwoliły określić czy różnice w tworzeniu biofilmu między mutantami, szczepem dzikim i komplementowanymi mutantami są istotne. ANOVA jednoczynnikowa umożliwiła określenie istotności różnic w ruchliwości badanych szczepów, natomiast ANOVA wieloczynnikowa została wykorzystana do oceny istotności różnic w krzywej wzrostu, żywotności oraz dynamice tworzenia biofilmu. Wartość p równa lub mniejsza niż 0,05 uznawana była za istotnie statystyczną.

4. Wyniki

4.1 Losowa mutagenезa za pomocą transpozonu

W celu identyfikacji nowych genów zaangażowanych w tworzenie biofilmu przez *C. jejuni* przeprowadzono losową mutagenезę szczepu *C. jejuni* 81-176 za pomocą transpozonu EZ-Tn5. Procedura mutagenезy umożliwia wprowadzenie transpozonu w genom bakterii, również w regiony zawierające geny. W tych przypadkach efektem włączenia się transpozonu w genom bakterii może być przerwanie ciągłości genów i utrata ich funkcjonalności. Po utworzeniu biblioteki transpozonowej szczepu *C. jejuni* 81-176 określono zdolność uzyskanych mutantów do tworzenia biofilmu w odniesieniu ze szczepem typu dzikiego. Wśród 350 uzyskanych mutantów *C. jejuni* 81-176 dwadzieścia wykazywało znaczny spadek (3,07–8,99-krotny) produkcji biofilmu w porównaniu ze szczepem typu dzikiego (Ryc. 6). Charakterystyka otoczenia genetycznego wbudowanego w genom *C. jejuni* transpozonu wykazała, że w mutantach charakteryzujących się obniżoną zdolnością tworzenia biofilmu transpozon został włączony w geny związane takimi procesami biologicznymi jak ruchliwość, adhezja komórek, metabolizm, transport błonowy oraz oddychanie. W uzyskanej bibliotece transpozonowej znalazły się mutanty o obniżonej zdolności tworzenia biofilmu, w których transpozon został włączony w zidentyfikowane wcześniej geny związane z tworzeniem biofilmu przez *C. jejuni*. Uzyskano również mutanty o obniżonej zdolności tworzenia biofilmu w których transpozon został włączony w geny, których udział w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni* nie został dotychczas opisany. Wśród nich znalazły się takie geny jak *cydB* kodujący oksydazę cytochromowo-ubichinolową oraz *hydC* kodujący podjednostkę cytochromu b (Tab. 37). Ponieważ duża część nowych genów zidentyfikowanych dzięki bibliotece transpozonowej kodowała białka hipotetyczne dalsze badania skupiały się na potwierdzeniu roli genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu u *C. jejuni*.



Ryc. 6. Zdolność tworzenia biofilmu przez mutanty *C. jejuni* 81-176 wygenerowane z użyciem transpozonu Ez-Tn5 na podstawie barwienia CV komórek po 72 godzinach wzrostu w warunkach mikoeroofilnych (5% O₂, 10% CO₂). Wykres przedstawia średnią absorbancję (570 nm) wyrażoną w stosunku do szczepu typu dzikiego (WT). Słupki błędów ukazują odchylenia standardowe z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano za pomocą ANOVA. Wyniki uznawano za istotnie statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$ (*).

Tab. 37 Wyniki identyfikacji otoczenia genetycznego miejsc przerwanych przez transpozon w mutantach *C. jejuni* 81-176 ze zmniejszonym poziomem tworzenia biofilmu.

Mutant	Identyfikator w genomie	Opis
11A9	CJJ81176_0119	<i>cydB</i> - oksydaza ubichinolowa cytochromu d, podjednostka II
10E10	CJJ81176_1281	<i>hydC</i> - podjednostka cytochromu b
11B1	CJJ81176_1143	<i>pglB</i> - białko szlaku glikozylacji
7D9	CJJ81176_0721	<i>flgG</i> - białko pręcika podstawy ciała wiciowego
10E8	CJJ81176_1550	<i>pflA</i> – białko wici
E47	CJJ81176_1548	białko chemotakcyjne
2K	CJJ81176_1389	hipotetyczne białko I

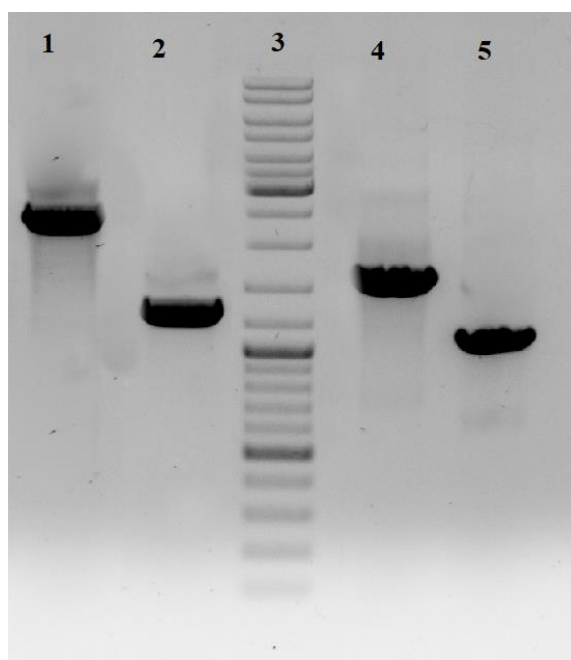
15K	CJJ81176_0128	hipotetyczne białko II
24K	CJJ81176_0439	hipotetyczna oksydoreduktaza
27K	CJJ81176_0897	transporter ABC
D1	CJJ81176_0356	przeciwutleniacz, rodzina AhpC/Tsa
C64	CJJ81176_1245	białko z rodziny wymienników sód/wodór
E24	CJJ81176_1495	hipotetyczne dwufunkcyjne białko putA
E17	CJJ81176_1363	hipotetyczne białko III
E13	CJJ81176_0034	hipotetyczne białko IV
E7	CJJ81176_0250	acetylotransferaza, rodzina GNAT
E40	CJJ81176_1309	hipotetyczna deaminaza trifosforanu deoksycytydyny
E26	CJJ81176_1296	syntaza pseudourydyny dużej podjednostki rybosomalnej z rodziny RluA
E37	CJJ81176_0728	hipotetyczne białko konserwatywne TIGR00486
E48	CJJ81176_1340	czynnik pomocniczy ruchliwości

4.2 Określenie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *C. jejuni* Δ *cydB* oraz Δ *hydC* przy pomocy barwienia fioletem krystalicznym (CV)

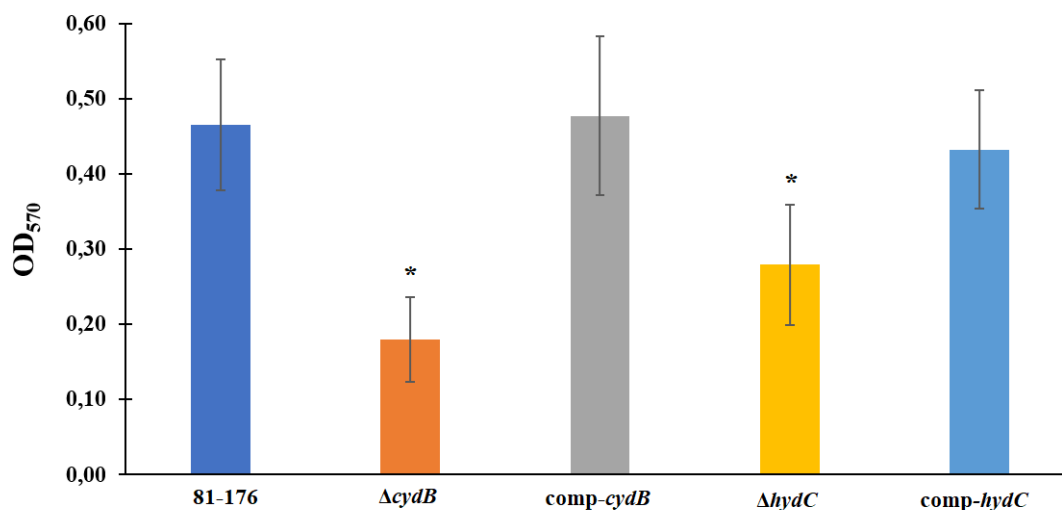
W celu określenia wkładu wytypowanych w procesie mutagenyzy za pomocą transpozonu genów *cydB* oraz *hydC* w proces tworzenia biofilmu przez *C. jejuni* uzyskano mutanty delecyjne tych genów oznaczone odpowiednio jako Δ *cydB* oraz Δ *hydC* (Ryc. 7). Następnie uzyskano mutanty Δ *cydB* oraz Δ *hydC*, do których ponownie wprowadzono kopie genów *cydB* oraz *hydC* w procesie komplementacji. Mutanty te nazwano *comp-cydB* oraz *comp-hydC*. Celem komplementacji było wykluczenie możliwych efektów polarnych wprowadzonych delecji genów *cydB* oraz *hydC* na proces tworzenia biofilmu, poprzez próbę przywrócenia wyjściowego fenotypu *C. jejuni* po ponownym wprowadzeniu kopii tych genów do mutantów delecyjnych.

Zdolność tworzenia biofilmu przez wyjściowy szczep *C. jejuni* 81-176 oraz mutanty Δ *cydB* i Δ *hydC* oraz mutanty *comp-cydB* i *comp-hydC* określono za pomocą barwienia fioletem krystalicznym (CV). Mutanty Δ *cydB* i Δ *hydC* wykazywały istotnie ($p < 0,05$) niższą zdolność produkcji biofilmu w porównaniu z typem dzikim oraz danym szczepem po komplementacji (Ryc. 8). Wartości OD₅₇₀ w teście CV dla szczepu

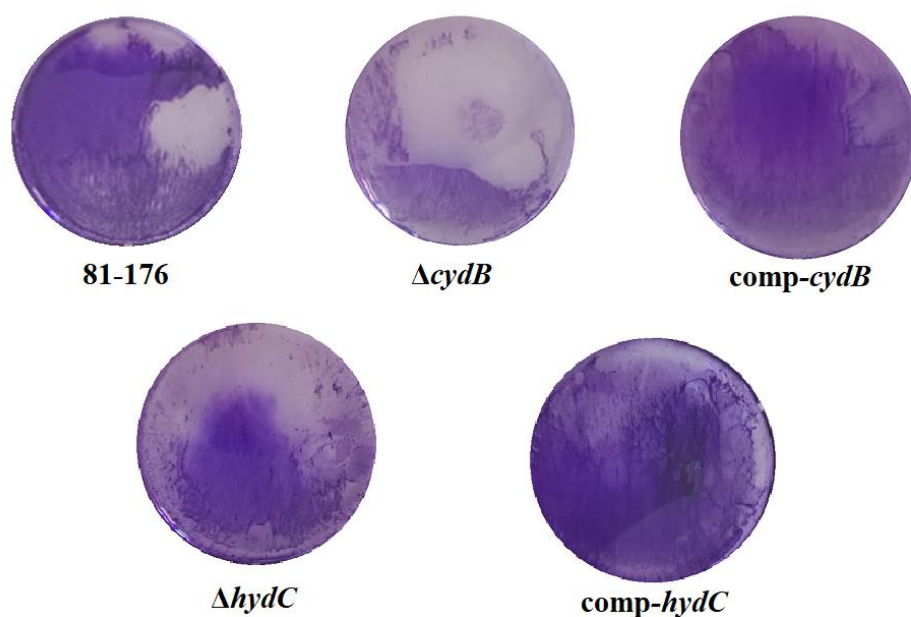
rodzicielskiego, mutantu $\Delta cydB$, szczepu po komplementacji *comp-cydB* wynosiły odpowiednio $0,46 \pm 0,09$, $0,18 \pm 0,06$ i $0,48 \pm 0,11$. Dla mutantu $\Delta hydC$ i szczepu po komplementacji *comp-hydC* wartości te wyniosły $0,28 \pm 0,08$ i $0,43 \pm 0,08$. Biofilm szczepu dzikiego, mutantu $\Delta hydC$ oraz szczepów komplementowanych *comp-cydB* jak i *comp-hydC* był obserwowany zarówno jako pierścienie na granicy faz powietrze-ciecz jak i na dnie mikropłytki. Z kolei biofilm mutantu $\Delta cydB$ był wykrywalny wyłącznie na obrzeżach dna płytki. Natomiast mutant $\Delta hydC$ tworzył biofilm na brzegach i w środkowej części dna dołka. W przypadku szczepu typu dzikiego, jak i szczepów po komplementacji *comp-cydB* i *comp-hydC* obserwowany był gęsty biofilm na całej powierzchni dna dołka (Ryc. 9).



Ryc. 7. Elektroforeza w 0,8 % żelu agarozowym przedstawiająca rozdział produktów PCR po amplifikacji genów *cydB* i *hydC* oraz ich otoczenia za pomocą starterów spr-FOR i spr-REV w szczepie dzikim *C. jejuni* 81-176 i w mutantach $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ mająca na celu potwierdzenie delekcji genów *cydB* i *hydC*. Ścieżka 1 – produkt PCR uzyskany ze szczepu dzikiego *C. jejuni* 81-176 odpowiadający regionowi zawierającym gen *cydB* wraz z otoczeniem (2286 bp) Ścieżka 2 – produkt PCR uzyskany z mutantu $\Delta cydB$ odpowiadający regionowi otaczającym gen *cydB* (1278 bp). Ścieżka 3 – Standard GeneRuler DNA Ladder Mix Ścieżka 4 - produkt PCR uzyskany ze szczepu dzikiego *C. jejuni* 81-176 odpowiadający regionowi zawierającym gen *hydC* wraz z otoczeniem (1601 bp) Ścieżka 5 – produkt PCR uzyskany z mutantu $\Delta hydC$ odpowiadający regionowi otaczającym gen *hydC* (1079 bp).



Ryc. 8. Tworzenie biofilmu przez szczep dziki oraz mutanty *C. jejuni*. Słupki błędów ukazują odchylenia standardowe z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano za pomocą ANOVA Kruskala-Wallisa. Istotność ustalono na poziomie $p < 0,05$ i oznaczono (*).

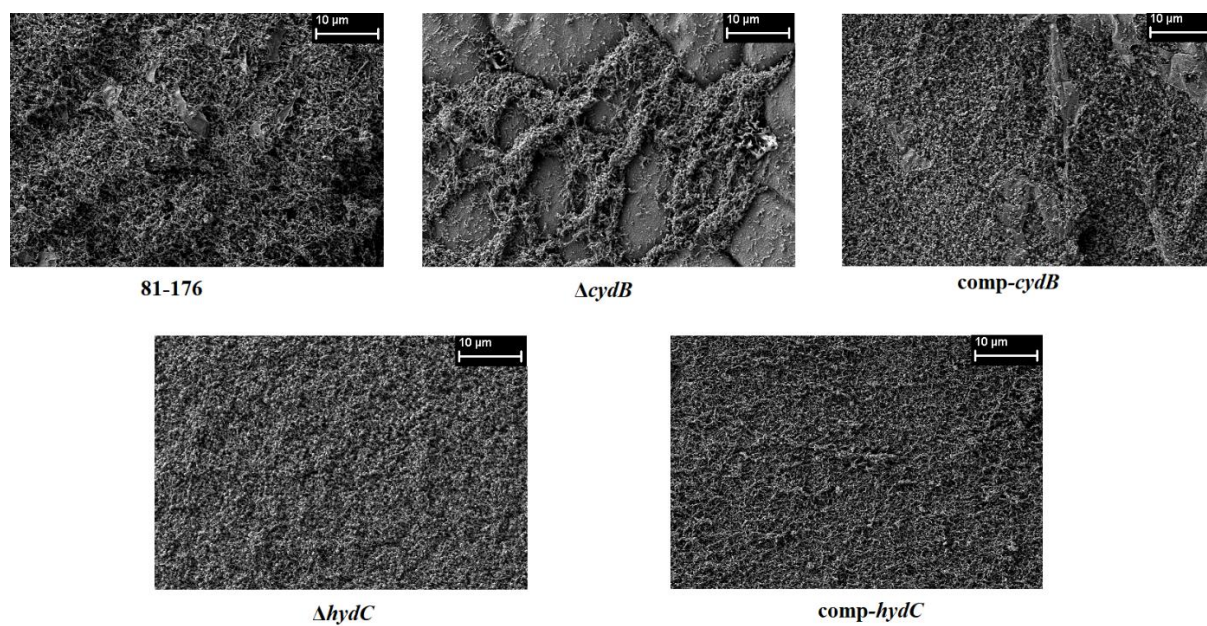


Ryc. 9. Tworzenie biofilmu przez szczep dziki oraz mutanty *C. jejuni* na płytce po 72 godzinnej inkubacji na podstawie barwienia CV.

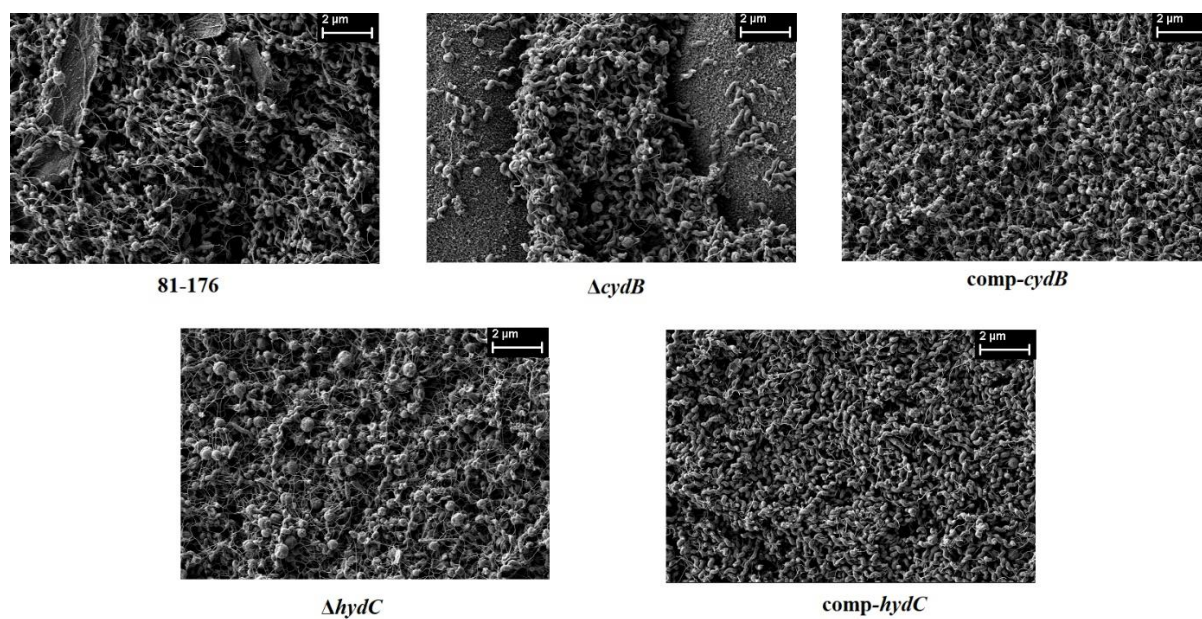
4.3 Wizualizacja biofilmu za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Analiza wyników skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) (Ryc. 10), ujawniła znaczną różnorodność architektury biofilmu *C. jejuni*. Wszystkie badane biofilmy wykazywały obecność dwóch typów morfologii komórek: normalny spiralny kształt oraz kształt kokoidalny, który wskazuje na stan VBNC (ang. viable but nonculturable). Dodatkowo, wyraźnie zauważalne były rurkowate struktury krzyżujące się i tworzące sieć, co prawdopodobnie odpowiada wiciom bakteryjnym. Biofilm zarówno szczepu dzikiego *C. jejuni* 81-176, jak i szczepu *comp-cydB* był dojrzały i dobrze rozwinięty, składał się głównie z dużych skupisk komórek tworzących agregaty połączone ze sobą. Dodatkowo, zauważono obecność licznych struktur, które prawdopodobnie były utworzone z agregatów białkowo-polisacharydowych. Z kolei mutant $\Delta cydB$ wytworzył słabszy, niejednorodny biofilm o nieregularnej strukturze. Jedynie w niektórych obszarach zaobserwowano skupiska komórek połączonych ze sobą, podczas gdy w pozostałych obszarach pojawiały się puste przestrzenie z pojedynczymi komórkami. W przypadku szczepu komplementowanego *comp-hydC* zaobserwowano równomierne rozmieszczenie biofilmu bez wyraźnych obszarów zawierających agregaty z dużymi skupiskami komórek. Dodatkowo zauważono, że komórki w biofilmie szczepu *comp-hydC* były bardziej zwarte niż w przypadku szczepu dzikiego. Mutant $\Delta hydC$ tworzył równomierny biofilm pozbawiony wyraźnych obszarów o zwiększonej koncentracji lecz z przewagą komórek kokoidalnych. Występowały także większe przerwy między poszczególnymi skupiskami komórek.

A



B

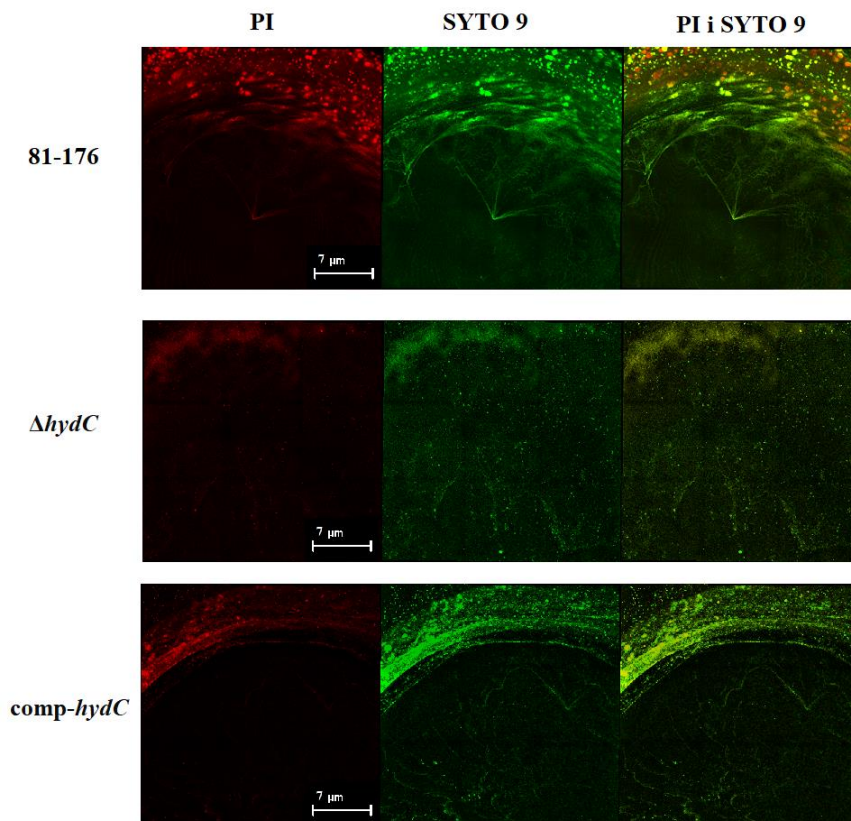
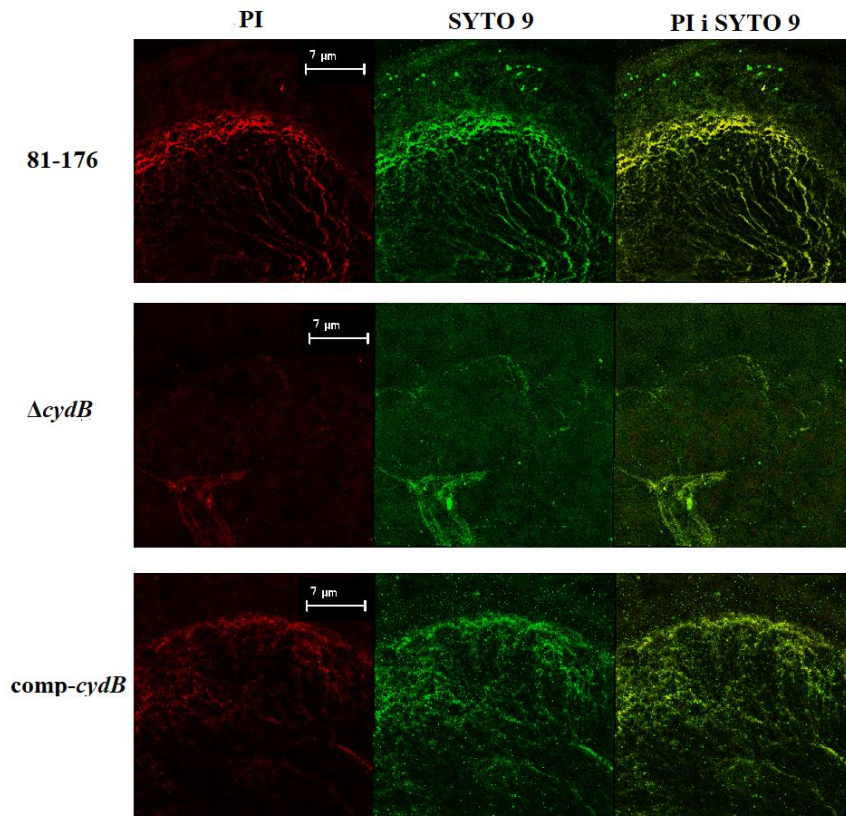


Ryc. 10. Struktura biofilmu wytworzonego przez szczep dziki oraz mutanty *C. jejuni* w obrazowaniu za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) po 72 godz. Powiększenie A ($\times 2\,500$) i B ($\times 10\,000$)

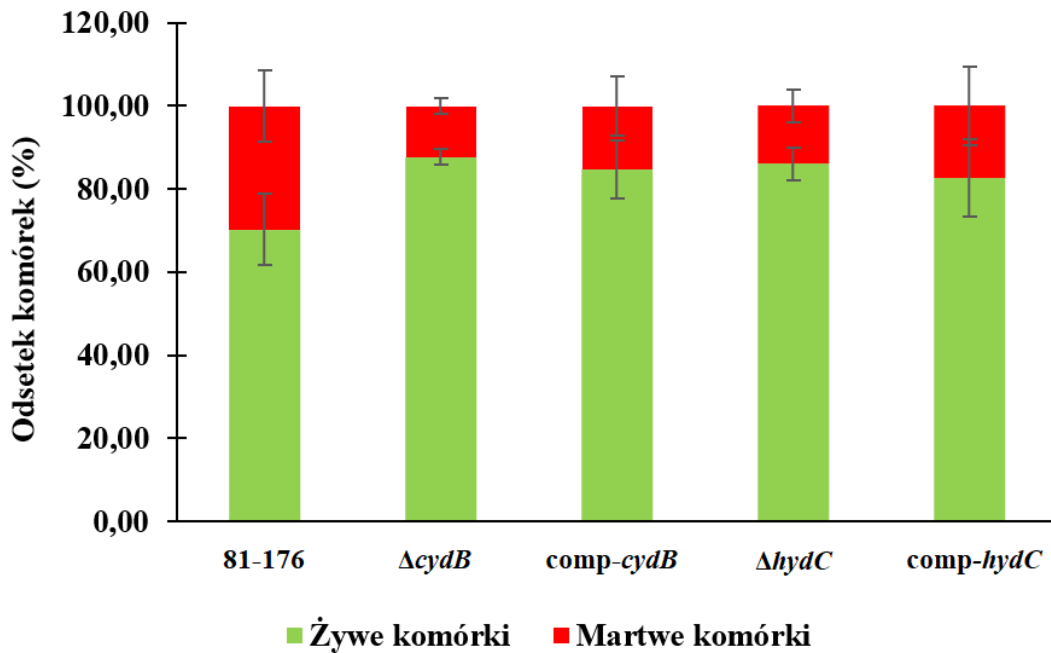
4.4 Wizualizacja biofilmu za pomocą konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM)

Na podstawie analizy obrazów uzyskanych w CLSM (Ryc. 11) dokonano oceny procentowego udziału żywych i martwych komórek w biofilmie. Komórki żywe barwiono się na kolor zielony, podczas, gdy komórki martwe na czerwono. Dla dzikiego szczepu *C. jejuni* 81-176 stwierdzono, że odsetek żywych komórek wynosił $70,3\% \pm 8,58$ natomiast komórek martwych było $29,7\% \pm 8,58$. Mutant $\Delta cydB$ charakteryzował się wysokim odsetkiem żywych komórek, który wyniósł $87,77\% \pm 1,81$ w porównaniu do martwych komórek, które stanowiły $12,23\% \pm 1,81$. W przypadku szczepu komplementowanego *comp-cydB* zaobserwowano, że udział żywych komórek wynosił $84,75\% \pm 7,05$, natomiast martwych komórek było $15,25\% \pm 7,05$. Dla mutantu $\Delta hydC$ odsetek żywych komórek kształtował się na poziomie $86,17\% \pm 3,92$, a martwych $13,83\% \pm 3,92$. Natomiast w przypadku szczepu komplementowanego *comp-hydC* żywe komórki stanowiły $82,6\% \pm 9,32$ a martwe $17,4\% \pm 9,32$. Nie zauważono istotnych różnic w żywotności pomiędzy badanymi szczepami $p > 0,05$. Dodatkowo oceniono procent powierzchni zajętej przez biofilm. Szczep *C. jejuni* typu dzikiego wykazywał umiarkowaną, ale istotną zdolność tworzenia biofilmu zajmując $58,20\% \pm 2,32$ obserwowanej powierzchni. Delecje genów *cydB* i *hydC* znacząco obniżyły tę zdolność, sprawiając, że biofilm zajmował odpowiednio $6,88\% \pm 1,56$ i $14,89\% \pm 1,78$ powierzchni dołka. Po komplementacji zaobserwowano przywrócenie zdolności do tworzenia biofilmu do poziomu zbliżonego do szczepu typu dzikiego, który zajmował odpowiednio dla szczepu *comp-cydB* $65,36\% \pm 7,71$ i *comp-hydC* $43,87\% \pm 1,24$ powierzchni dołka.

A



B

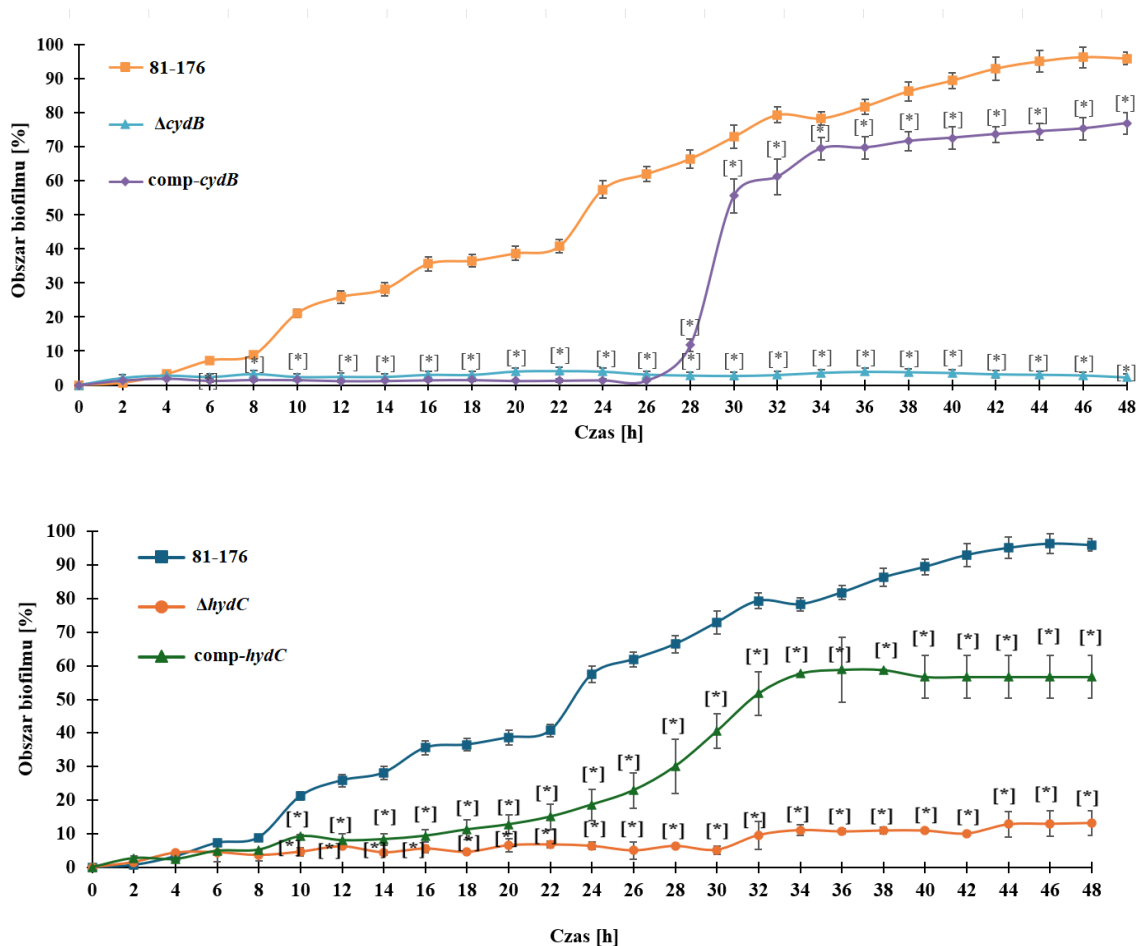


Ryc. 11 Reprezentatywny obraz CLSM żywych (barwienie Syto9) i martwych komórek (barwienie PI) bakteryjnych w biofilmach *C. jejuni* oraz obrazy połączone (Syto9 + PI) (A). Żywe komórki barwiły się na zielono za pomocą SYTO 9, podczas gdy martwe komórki barwiły się na czerwono przy pomocy jodku propidyny (PI). (B) Procent żywych i martwych komórek, obliczony na podstawie trzech losowo wybranych obrazów. Dane przedstawiono jako średnią \pm SD. Wyniki analizowano wieloczynnikową ANOVA $p > 0,05$.

4.5 Badanie biofilmu w warunkach przepływu

Dynamikę tworzenia biofilmu przez szczep *C. jejuni* 81-176 oraz uzyskane mutanty badano za pomocą systemu Bioflux (Ryc. 12). W przypadku dzikiego szczepu *C. jejuni* 81-176 obserwowano stopniowy i systematyczny przyrost powierzchni biofilmu. Po 8 godzinach zauważono zwiększenie powierzchni biofilmu. Kolejny przyrost powierzchni biofilmu miał miejsce po 22 godzinach trwania eksperymentu osiągając ponad 50% powierzchni kanału przepływowego. Po tym czasie obserwowano dalszy systematyczny wzrost biofilmu, który po 48 godzinach zajmował ponad 90% całkowitej powierzchni kanału. W przypadku mutanta $\Delta cydB$ zaobserwowano ograniczony przyrost biofilmu przez cały czas trwania eksperymentu. Biofilm wytwarzany przez mutanta $\Delta cydB$ zajmował od 2 do 4 % powierzchni kanału. W

przypadku szczepu *comp-cydB* przyrost biofilmu zaobserwowano dopiero po 26 godzinach. Między 28 a 30 godziną eksperymentu odnotowano około pięciokrotny przyrost powierzchni biofilmu w szczepie *comp-cydB*. Po tym czasie zaobserwowano dalszy systematyczny wzrost powierzchni biofilmu, który po 48 godzinach stanowił ponad 75% całkowitej powierzchni kanału. W przypadku mutantu $\Delta hydC$ przyrost biofilmu także był ograniczony. Między 2 a 30 godziną trwania eksperymentu powierzchnia zajmowana przez biofilm wahała się między 3,5 % a 7 %. Po tym czasie zaobserwowano przyrost powierzchni biofilmu do 10 % - 13 %. W szczepie *comp-hydC* od godziny 14 obserwowano systematyczny wzrost powierzchni biofilmu aż do 34 godziny, w której poziom zajmowanego biofilmu w kanale wynosił ponad 50 %. Poziom ten utrzymywał się aż do 48 godziny trwania eksperymentu.

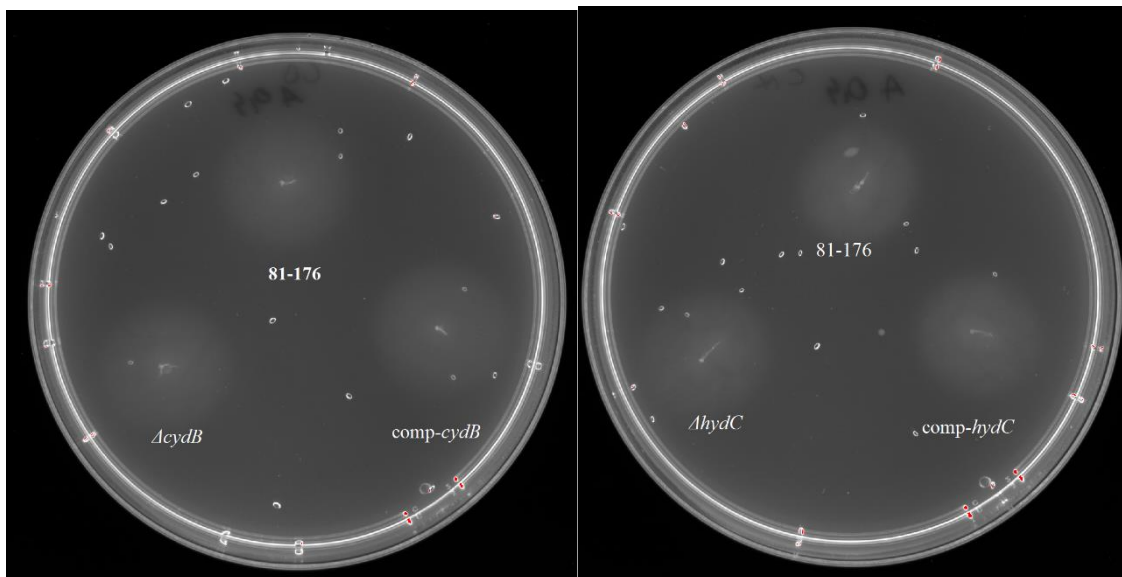


Ryc. 12 Dynamika tworzenia się biofilmu w kanale układu mikroprzepływowego (BioFlux 1000z) przez szczep *C. jejuni* 81-176 oraz wytworzone mutanty podczas 48 godzinnej inkubacji w warunkach przepływowych (0,2 dyn/cm²); punkty

przedstawiają średnie wartości pomiarów \pm SD, $n = 3$; * istotnie statystyczne różnice w porównaniu do kontroli $p < 0,05$.

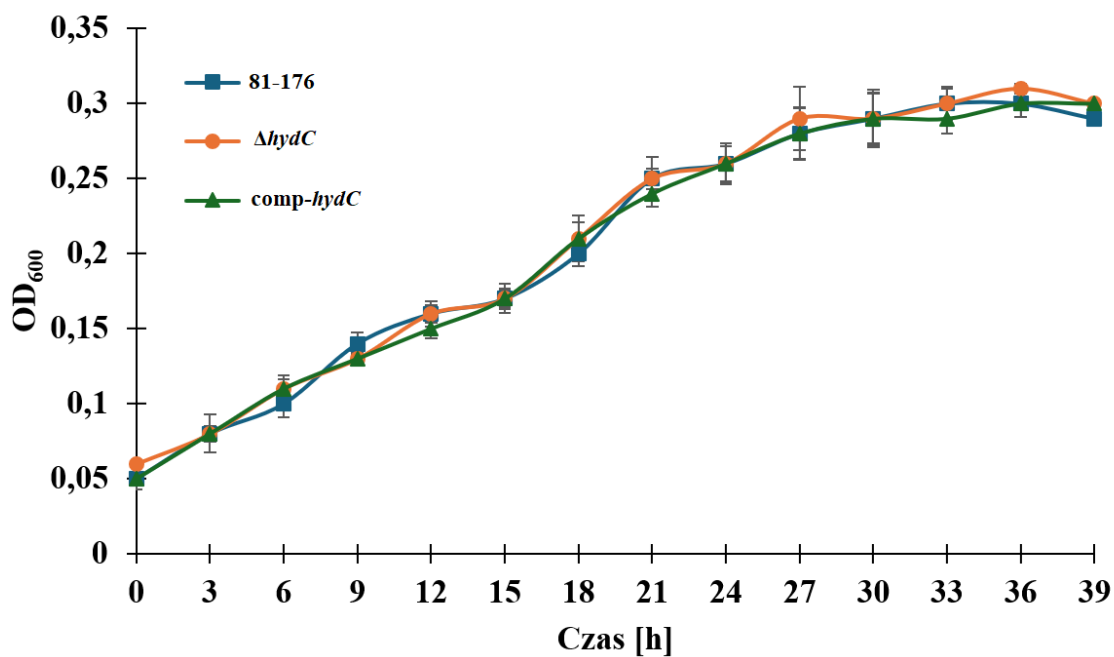
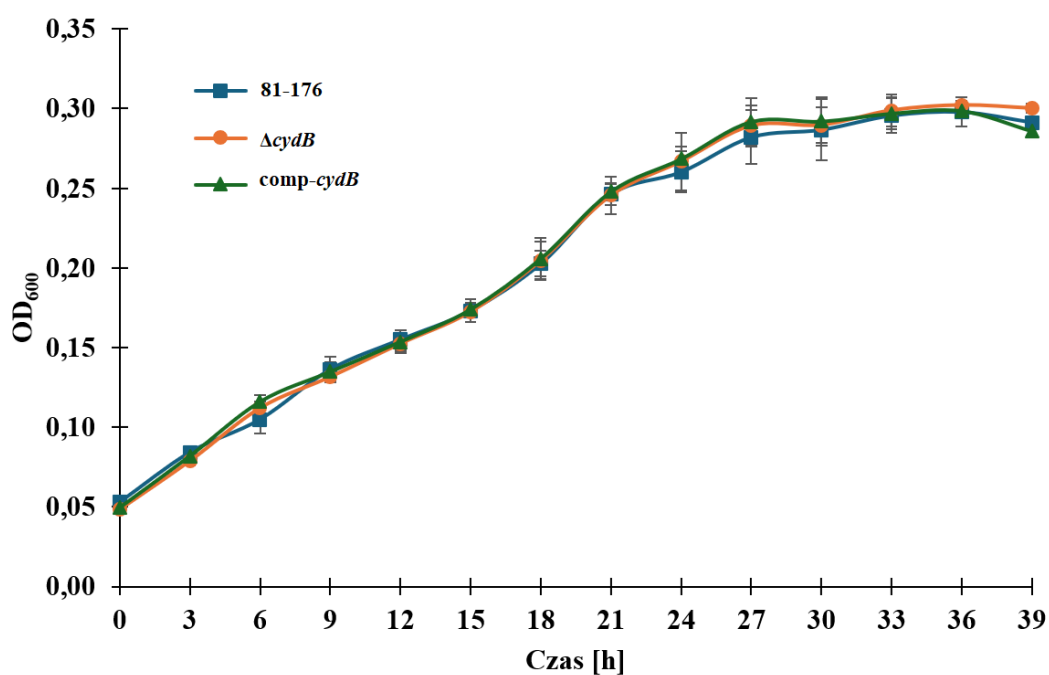
4.6 Wpływ delecji genów *cydB* i *hydC* na ruchliwość oraz wzrost *C. jejuni*.

Ruchliwość badanych szczepów *C. jejuni* określono po 24 godzinnej inkubacji w podłożu Mueller-Hinton (MH) z dodatkiem 0,4% agaru. Strefy wzrostu dla dzikiego szczepu *C. jejuni*, mutantów $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ oraz szczepów *comp-cydB* i *comp-hydC* wynosiły odpowiednio $21,92 \text{ mm} \pm 1,44$; $20,5 \text{ mm} \pm 1,38$; $20,75 \text{ mm} \pm 1,6$; $21,33 \text{ mm} \pm 1,3$ oraz $21,42 \text{ mm} \pm 1,38$ (Ryc. 13). Różnice pomiędzy szczepami nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$), co dowodzi, że delacja genów *cydB* i *hydC* nie wpływa na ruchliwość *C. jejuni*.



Ryc. 13 Ruchliwość szczepu typu dzikiego oraz uzyskanych mutantów *C. jejuni* po 24 godzinach inkubacji w podłożu Mueller-Hinton (MH) z dodatkiem 0,4% agaru.

Aby określić czy delecja genów *cydB* oraz *hydC* wpływa na wzrost *C. jejuni* 81-176 wyznaczono krzywą zależności OD_{600} od czasu (Ryc. 14). Wskaźniki OD_{600} dla szczepu dzikiego *C. jejuni* 81-176, $\Delta cydB$ i *comp-cydB* oraz $\Delta hydC$ i *comp-hydC* były zbliżone we wszystkich punktach czasowych. Nie zaobserwowano znaczących różnic ($p > 0,05$), co dowodzi, że szczepy te mają podobne tempo wzrostu.



Ryc. 14 Krzywe wzrostu typu dzikiego oraz uzyskanych mutantów *C. jejuni*. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. $p > 0,05$

5. Dyskusja

Campylobacter jejuni to najczęstsza przyczyna bakteryjnej, wodnistej biegunki u ludzi na całym świecie. Bakterie te są trudne w hodowli i mają specyficzne wymagania pokarmowe, co powoduje że liczba rzeczywistych przypadków wywołanych przez *C. jejuni* może być niedoszacowana (Turonova i wsp., 2015). Bakterie te w odróżnieniu od innych patogenów jelitowych są naturalnie kompetentne do przyjęcia DNA na drodze transformacji, co powoduje, że z łatwością mogą przyjmować obce DNA, w tym geny oporności na antybiotyki (Bae i wsp., 2014). Uważa się, iż kluczową rolę w przetrwaniu *C. jejuni* w środowisku odgrywa proces tworzenia biofilmu. *Campylobacter* spp. zdolne są do formowania biofilmu na różnego rodzaju powierzchniach abiotycznych (Teh i wsp., 2017). Produkowana przez bakterie macierz zewnątrzkomórkowa zapewnia im ochronę przed działaniem środków dezynfekcyjnych czyniąc bakterie istotnym problemem w przemyśle spożywczym (Rossi i wsp., 2021). W środowisku produkcji żywności obecność biofilmów bakteryjnych może prowadzić do kontaminacji produktów spożywczych, co z kolei może skutkować obniżeniem jakości oraz zmniejszeniem trwałości tych produktów. Takie zjawisko zwiększa też ryzyko wystąpienia chorób przenoszonych drogą pokarmową, co stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia konsumentów (Bridier i wsp., 2014).

W biofilmie mikroorganizmy przenoszą i nabywają geny oporności na antybiotyki częściej niż komórki wolnożyjące, co stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego (Haddock i wsp., 2010). W przypadku niektórych bakterii patogennych tworzenie biofilmu może być przyczyną zakażeń wewnątrzszpitalnych oraz infekcji związanych z implantami czy urządzeniami medycznym stanowiąc istotne wyzwanie kliniczne, gdyż takie zakażenia są trudniejsze do leczenia i prowadzą do poważnych komplikacji zdrowotnych u pacjentów (Lebeaux i wsp., 2014). Z tego powodu niezwykle istotne jest prowadzenie badań nad mechanizmem powstawania biofilmów oraz metodami ich kontroli i eliminacji, które mogą przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa żywności oraz zmniejszenia ryzyka zakażeń w kontekście opieki zdrowotnej.

Do tej pory opisano około 36 genów zaangażowanych w regulację i dynamikę tworzenia biofilmu u *C. jejuni* (Püning i wsp., 2021). Badania nad mechanizmem tworzenia biofilmu u innych bakterii takich jak *Pseudomonas aeruginosa* czy

Escherichia coli wykazały, że proces ten jest skomplikowany i angażuje wiele genów należących do różnych szlaków metabolicznych. W przypadku *P. aeruginosa* analiza metabolomu przy pomocy modelu kinetycznego doprowadziła do identyfikacji 239 szlaków metabolicznych, których zahamowanie wywołało zmiany w produkcji biofilmu w postaci zmniejszenia lub zwiększenia jego poziomu (Vital-Lopez i wsp., 2015). Natomiast w badaniach nad *E. coli* przeprowadzonych przez Niba i wsp. zidentyfikowano 110 genów, których delecja hamowała tworzenie biofilmu (Niba i wsp., 2008). Ponadto, analiza z wykorzystaniem mikromacierzy wykazała obecność 2504 genów o zróżnicowanym poziomie ekspresji w dojrzałym biofilmie w porównaniu z komórkami planktonicznymi w przypadku *P. aeruginosa* oraz 1292 genów w przypadku *E. coli* (Ranjith i wsp., 2017; Heacock-Kang i wsp., 2018). Niedawne badanie przeprowadzone przez Tram i wsp. (2020) wykorzystujące porównawcze podejście omiczne, ujawniło istotne różnice między biofilmem a komórkami planktonicznymi *C. jejuni*. Analiza transkryptomu wykazała zróżnicowaną ekspresję 620 genów w biofilmie w stosunku do komórek planktonicznych, potwierdzając złożoność procesu tworzenia biofilmu u *C. jejuni* (Tram i wsp., 2020).

Aby zidentyfikować nowe geny związane z tworzeniem biofilmu w szczepie *C. jejuni* 81-176 wykorzystano system do mutagenyzy przy użyciu transpozonu EZ-Tn5. Transpozon Tn5 wywodzi się z transpozonów bakteryjnych i nie ma wymagań dotyczących docelowej sekwencji dla insercji potencjalnie umożliwiając większą częstość insercji niż inne systemy transpozycji (Barquist i wsp., 2013). Lin i wsp. (2009) udowodnili, że transpozon Tn5 stanowi efektywne narzędzie do systematycznej charakterystyki istotnych funkcjonalnie genów u *C. jejuni*. Mandal i wsp. (2017) wykorzystali technologię Tn5 do analizy genomu *C. jejuni*. Z kolei Teh i wsp. (2017), stosując tę samą metodologię, badali geny związane z tworzeniem biofilmu przez *C. jejuni*. Autorzy ci uzyskali jedynie 22 mutanty na jednym z siedmiu badanych szczepów *C. jejuni*, co sugeruje, że wydajność transpozycji może zależeć od szczepu (Teh i wsp., 2017).

W niniejszej pracy za pomocą losowej mutagenyzy wygenerowano 350 mutantów szczepu *C. jejuni* 81-176, które zostały ocenione pod kątem zdolności tworzenia biofilmu w porównaniu ze szczepem dzikim. Dwadzieścia mutantów wykazywało 3,07 do 8,99-krotny spadek w zdolności tworzenia biofilmu w porównaniu z typem rodzicielskim. Niektóre z uzyskanych mutantów zawierały insercje w genach, których udział w procesie tworzenia biofilmu został już potwierdzony przez innych

badaczy. Były to między innymi geny związane z ruchliwością *flgG*, *pflA* (Svensson i wsp., 2014; Kalmokoff i wsp., 2006) oraz gen *pglB* zaangażowany w glikozylację (Cain i wsp., 2019), co potwierdza wiarygodność mutagenyzy za pomocą transpozonu EZ-Tn5. Analizując bibliotekę transpozonową uzyskaną w ramach tej pracy zidentyfikowano geny związane z adhezją, metabolizmem, transportem błonowym i oddychaniem, które nie były wcześniej wiązane z tworzeniem biofilmu u *Campylobacter*. Dalsza analiza wykazała, że znacząca część zidentyfikowanych genów koduje białka hipotetyczne, których rola w *C. jejuni* nie jest w pełni poznana lub nie była w ogóle badana. Wśród zidentyfikowanych genów za pomocą mutagenyzy przy udziale transpozonu znalazły się także geny o znanej roli, które jednak nie były dotąd wiązane z wytwarzaniem biofilmu przez *C. jejuni*. Dlatego też w kolejnych etapach badań skupiono się na roli genów *cydB* i *hydC* w tworzeniu biofilmu przez *C. jejuni*. Gen *cydB* związany jest z łańcuchem oddechowym i metabolizmem, natomiast gen *hydC* z transportem elektronów i metabolizmem energetycznym. Gen *cydB* u *C. jejuni* jest zlokalizowany w operonie *cydAB*. U *E. coli*, zestaw genów *cydABX* koduje cytochrom bd oraz oksydazę chinolową o wysokim powinowactwie. Enzym ten odpowiedzialny jest za oddychanie tlenowe w środowisku o niskiej zawartości tlenu. Wykazano, że utrata cytochromu bd ma wpływ na strukturę biofilmu *E. coli*. Usunięcie genów *cydAB* u *E. coli* spowodowało zmniejszenie ilości macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zwiększyło podatność bakterii na stres nitrozacyjny i oksydacyjny (Beebout i wsp., 2019). Co więcej, Beebout i wsp. odkryli, że brak cytochromu bd prowadzi także do zmniejszenia oporności biofilmu na antybiotyki, co sugeruje, że może on stanowić potencjalny cel terapeutyczny przy zwalczaniu biofilmu (Beebout i wsp., 2018). W przypadku *C. jejuni*, geny *cydAB* kodują oksydazę o niskim powinowactwie, która jest odporna na cyjanek. Oksydaza ta poprawia zdolność przetrwania *C. jejuni* w warunkach mikroaerobowych. Jackson i wsp. (2007) udowodnili, że oksydaza ta nie jest niezbędna dla wzrostu *C. jejuni*, ale ma istotny wpływ na żywotność komórek w atmosferze mikroaerofilnej. Badacze zaproponowali też zmianę nazwy oksydazy CydAB na CioAB (oksydaza niewrażliwa na cyjanek), ponieważ nie wykazuje charakterystycznych cech cytochromu bd (Jackson i wsp., 2007).

Gen *hydC* wchodzi w skład kompleksu genów kodujących hydrogenazę Ni/Fe u *C. jejuni* (*hydABCD*), której aktywność i transkrypcja zwiększa się w warunkach ograniczających dostępność tlenu (van der Stel i wsp., 2017). Gen *hydA* jest

odpowiedzialny za kodowanie małej podjednostki białka, która pełni rolę liganda klastra Fe-S. Gen *hydB* koduje miejsce aktywne hydrogenazy Ni/Fe. Z kolei gen *hydC* jest genem, który koduje podjednostkę cytochromu typu b hydrogenazy Ni/Fe zakotwiczoną w błonie. Gen *hydD* koduje proteazę, której zadaniem jest uczestniczenie w procesie dojrzewania hydrogenazy (Parkhill i wsp., 2000). Obecność podjednostki cytochromu b kodowanej przez *hydC* w genomie *C. jejuni* sugeruje, że hydrogenaza jest enzymem, który wychwytuje wodór i prawdopodobnie umożliwia bakterii oszczędzanie energii (Weerakoon i wsp., 2009). Wykazano, że poziom ekspresji genu *hydC* zwiększa się w trakcie wzrostu bakterii w temperaturze 42 °C w porównaniu z 37 °C, a także w obecności żelaza lub izotiocyjanianu benzylu w środowisku oraz w odpowiedzi na stres kwasowy (Stintzi, 2003; Palyada i wsp., 2004; Reid i wsp., 2008; Dufour i wsp., 2013). Udział genów *hyd* w procesie tworzenia biofilmu u *C. jejuni* nie został jednak dotąd zbadany.

Aby określić rolę genów *cydB* i *hydC* w produkcji biofilmu uzyskano mutanty delecyjne $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ *C. jejuni* oraz mutanty, w których dokonano komplementacji genów *cydB* i *hydC* do mutantów delecyjnych. Wykazano, że mutacje genów *cydB* i *hydC* nie wpłynęły na ruchliwość, wzrost ani żywotność bakterii, co mogłyby wpływać na tworzenie biofilmu. Stwierdzono, że delecja genów *cydB* i *hydC* znacząco obniżyła zdolność do produkcji biofilmu badanego szczepu *C. jejuni*. Mutant $\Delta cydB$ wytwarzał biofilm charakteryzujący się luźno zorganizowaną, nieregularną strukturą oraz znacznie mniejszą objętością niż szczep rodzicielski. Z kolei mutant $\Delta hydC$ produkował biofilm równomierny z przewagą komórek kokoidalnych, co może świadczyć o przejściu komórek w stan VBNC. Komplementacja przywróciła fenotyp dziki w obu mutantach, udowadniając, że obserwowany efekt związany jest wyłącznie z delecją tych genów. Wykorzystanie mikroprzepływowego systemu Bioflux umożliwiło zbadanie dynamiki tworzenia biofilmu. W przypadku szczepu rodzicielskiego i szczepów komplementowanych *comp-cydB* i *comp-hydC* zaobserwowano systematyczny i stopniowy wzrost powierzchni zajmowanej przez biofilm. Jednakże w szczepie komplementowanym *comp-cydB* stwierdzono późniejsze uruchomienie produkcji biofilmu w stosunku do szczepu rodzicielskiego, co można wytłumaczyć dostosowaniem do warunków środowiskowych i opóźnioną ekspresją genu *cydB* zlokalizowanego na plazmidzie. W przeciwieństwie do tego, tworzenie biofilmu przez mutanty $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ było bardzo ograniczone podczas całego eksperymentu. Biofilm mutantu $\Delta cydB$ zajmował jedynie 2-4% powierzchni kanału

mikroprzepływowego. Natomiast w przypadku mutantu $\Delta hydC$ w pierwszych godzinach eksperymentu biofilm stanowił 3-7% powierzchni kanału, a następnie 10-13% powierzchni kanału. Może to sugerować, iż geny *cydB* oraz *hydC* wpływają pośrednio lub bezpośrednio na produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej.

Niniejsze badania udowodniły rolę genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu u *C. jejuni* 81-176, co stanowi uzupełnienie wiedzy na temat molekularnych podstaw tworzenia biofilmu przez ten istotny patogen. Jednocześnie wykazano, iż technologia EZ-Tn5 jest wiarygodnym i skutecznym narzędziem do badania mechanizmu tworzenia biofilmu u *C. jejuni*. Lepsze zrozumienie procesu tworzenia biofilmu może przyczynić się do opracowania inhibitorów ograniczających lub uniemożliwiających produkcję biofilmu.

6. Wnioski

1. Delecja genów *cydB* oraz *hydC* istotnie obniżyła poziom biofilmu w szczepie *C. jejuni* 81-176.
2. Wprowadzenie plazmidu z kopią genu *cydB* lub *hydC* do mutantów delecyjnych *cydB* oraz *hydC* przywróciło zdolność tworzenia biofilmu w tych szczepach, dowodząc że obserwowane obniżenie zdolności do wytwarzania biofilmu związane jest z aktywnością genów *cydB* i *hydC*.
3. Delecja genów *cydB* i *hydC* nie wpłynęła na ruchliwość, żywotność ani tempo wzrostu *C. jejuni*, co wskazuje na rzeczywisty udział tych genów w proces tworzenia biofilmu przez tę bakterię.
4. System EZ-Tn5 jest skutecznym narzędziem do identyfikacji nowych genów potencjalnie biorących udział w mechanizmie tworzenia biofilmu u *C. jejuni* 81-176.

7. Bibliografia

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Studying gene expression and function in Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science
2. Alzheimer, M., Svensson, S. L., König, F., Schweinlin, M., Metzger, M., Walles, H., Sharma, C. M. (2020). A three-dimensional intestinal tissue model reveals factors and small regulatory RNAs important for colonization with *Campylobacter jejuni*. PLOS Pathogens, 16(2), e1008304.
3. Antezack, A., Boxberger, M., Rolland, C., Ben Khedher, M., Monnet-Corti, V., La Scola, B. (2021). Isolation and characterization of *Campylobacter massiliensis* sp. nov., a novel *Campylobacter* species detected in a gingivitis subject. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(10).
4. 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(2), 278–285.
5. Aydin, F., Abay, S., Kayman, T., Karakaya, E., Mustak, H. K., Mustak, I. B., Bilgen, N., Goncuoglu, M., Duzler, A., Guran, O., Sahin, O., Saticioglu, I. B. (2021). *Campylobacter anatolicus* sp. nov., a novel member of the genus *Campylobacter* isolated from feces of Anatolian Ground Squirrel (*Spermophilus xanthopyrmnus*) in Turkey. Systematic and Applied Microbiology, 44(6), 126265.
6. Bae, J., Oh, E., Jeon, B. (2014). Enhanced Transmission of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Biofilms by Natural Transformation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(12), 7573–7575.
7. Baqar, S., Bourgeois, A. L., Schultheiss, P. J., Walker, R. I., Rollins, D. M., Haberberger, R. L., Pavlovskis, O. R. (1995). Safety and immunogenicity of a prototype oral whole-cell killed *Campylobacter* vaccine administered with a mucosal adjuvant in non-human primates. Vaccine, 13(1), 22–28.
8. Barquist, L., Boinett, C. J., Cain, A. K. (2013). Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. RNA Biology, 10(7), 1161–1169.

9. Beebout, C. J., Eberly, A. R., Werby, S. H., Reasoner, S. A., Brannon, J. R., De, S., Fitzgerald, M. J., Huggins, M. M., Clayton, D. B., Cegelski, L., Hadjifrangiskou, M. (2019). Respiratory Heterogeneity Shapes Biofilm Formation and Host Colonization in Uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio*, 10(2):e02400-18.
10. Beebout, C. J., Sominsky, L. A., Eberly, A. R., Van Horn, G. T., Hadjifrangiskou, M. (2021). Cytochrome bd promotes *Escherichia coli* biofilm antibiotic tolerance by regulating accumulation of noxious chemicals. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 35.
11. Benjamin, J., Leaper, S., Owen, R. J., Skirrow, M. B. (1983). Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Current Microbiology*, 8(4), 231–238.
12. Black, R. E., Perlman, D. M., Clements, M. L., Levine, M. M., Blaser, M. J. (1992). Human volunteer studies with *Campylobacter jejuni*, pp. 207-215. In I. Nachamkin, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. ASM Press, Washington, DC.
13. Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in Humans. *Journal of Infectious Diseases*, 157(3), 472–479.
14. Bloomfield, S., Wilkinson, D., Rogers, L., Biggs, P., French, N., Mohan, V., Savoian, M., Venter, P., Midwinter, A. (2020). *Campylobacter novaezeelandiae* sp. nov., isolated from birds and water in New Zealand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(6), 3775–3784.
15. Boukerb, A. M., Penny, C., Serghine, J., Walczak, C., Cauchie, H.-M., Miller, W. G., Losch, S., Ragimbeau, C., Mossong, J., Mégraud, F., Lehours, P., Bénéjat, L., Gourmelon, M. (2019). *Campylobacter armoricus* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from surface water and stools from humans with enteric infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3969–3979.
16. Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167–178.

17. Brown, H. L., Hanman, K., Reuter, M., Betts, R. P., van Vliet, A. H. M. (2015). *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 699.
18. Bryant, E., Shen, Z., Mannion, A., Patterson, M., Buczek, J., Fox, J. G. (2020). *Campylobacter taeniopygiae* sp. nov., *Campylobacter aviculae* sp. nov., and *Campylobacter estrildidarum* sp. nov., Novel Species Isolated from Laboratory-Maintained Zebra Finches. *Avian Diseases*, 64(4), 457–466.
19. Cáceres, A., Muñoz, I., Iraola, G., Díaz-Viraqué, F., Collado, L. (2017). *Campylobacter ornithocola* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from wild bird faecal samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1643–1649.
20. Cain, J. A., Dale, A. L., Niewold, P., Klare, W. P., Man, L., White, M. Y., Scott, N. E., Cordwell, S. J. (2019). Proteomics Reveals Multiple Phenotypes Associated with N-linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Molecular , Cellular Proteomics : MCP*, 18(4), 715–734.
21. Chandrashekar, K., Kassem, I. I., Rajashekar, G. (2017). *Campylobacter jejuni* transducer like proteins: Chemotaxis and beyond. *Gut Microbes*, 8(4), 323–334.
22. Chang, Y., Gu, W., Fischer, N., McLandsborough, L. (2012). Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), 2051–2062.
23. Choi, K.-H. (2009). Applications of Transposon-Based Gene Delivery System in Bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 217-228.
24. Cróinín, T., Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 25.
25. Crushell, E., Harty, S., Sharif, F., Bourke, B. (2004). Enteric *Campylobacter*: Purging Its Secrets? *Pediatric Research*, 55(1), 3–12.
26. Day, C. J., Tiralongo, J., Hartnell, R. D., Logue, C.-A., Wilson, J. C., von Itzstein, M., Korolik, V. (2009). Differential carbohydrate recognition by

Campylobacter jejuni strain 11168: influences of temperature and growth conditions. *PloS One*, 4(3), e4927.

27. Debruyne, L., Broman, T., Bergström, S., Olsen, B., On, S. L. W., Vandamme, P. (2010a). *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 815–819.

28. Debruyne, L., Broman, T., Bergström, S., Olsen, B., On, S. L. W., Vandamme, P. (2010b). *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(8), 1870–1875.

29. Debruyne, L., On, S. L. W., De Brandt, E., Vandamme, P. (2009). Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 5), 1126–1132.

30. Drozd, M., Chandrashekhar, K., Rajashekara, G. (2014). Polyphosphate-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* biofilm growth and stability. *Virulence*, 5(6), 680–690.

31. Dufour, V., Stahl, M., Rosenfeld, E., Stintzi, A., Baysse, C. (2013). Insights into the Mode of Action of Benzyl Isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6958–6968.

32. Edwards, L. A., Nistala, K., Mills, D. C., Stephenson, H. N., Zilbauer, M., Wren, B. W., Dorrell, N., Lindley, K. J., Wedderburn, L. R., Bajaj-Elliott, M. (2010). Delineation of the Innate and Adaptive T-Cell Immune Outcome in the Human Host in Response to *Campylobacter jejuni* Infection. *PLoS ONE*, 5(11), e15398.

33. Etoh, Y., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Yamamoto, A., Goto, N. (1993). *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(4), 631–639.

34. Feng, J., Ma, L., Nie, J., Konkel, M. E., Lu, X. (2018). Environmental Stress-Induced Bacterial Lysis and Extracellular DNA Release Contribute to *Campylobacter jejuni* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5).

35. Fields, J. A., Thompson, S. A. (2008). *Campylobacter jejuni* CsrA Mediates Oxidative Stress Responses, Biofilm Formation, and Host Cell Invasion. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3411–3416.
36. Finsterer, J. (2022). Triggers of Guillain-Barré Syndrome: *Campylobacter jejuni* Predominates. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22).
37. Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G., Konkel, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and Immunity*, 77(6), 2399–2407.
38. Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Lawson, P. A., Thorne, P., Byrer, D. E., Ross, H. M., Xerry, J., Thompson, P. M., Collins, M. D. (2004). *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2369–2373.
39. Friis, L. M., Pin, C., Pearson, B. M., Wells, J. M. (2005). In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 145–160.
40. Garsin, D. A., Urbach, J., Huguet-Tapia, J. C., Peters, J. E., Ausubel, F. M. (2004). Construction of an *Enterococcus faecalis* Tn 917 -Mediated-Gene-Disruption Library Offers Insight into Tn 917 Insertion Patterns. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7280–7289.
41. Ge, Z., Schauer, D. B., Fox, J. G. (2008). In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1599–1607.
42. Gebhart, C. J., Edmonds, P., Ward, G. E., Kurtz, H. J., Brenner, D. J. (1985). ‘*Campylobacter hyointestinalis*’ sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(5), 715–720.
43. Giallourou, N., Medlock, G. L., Bolick, D. T., Medeiros, P. H., Ledwaba, S. E., Kolling, G. L., Tung, K., Guerry, P., Swann, J. R., Guerrant, R. L. (2018). A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* enteropathy and diarrhea. *PLoS Pathogens*, 14(3), e1007083.

44. Gilbert, M. J., Kik, M., Miller, W. G., Duim, B., Wagenaar, J. A. (2015). *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 3), 975–982.
45. Gilbert, M. J., Miller, W. G., Leger, J. S., Chapman, M. H., Timmerman, A. J., Duim, B., Foster, G., Wagenaar, J. A. (2017). *Campylobacter pinnipediorum* sp. nov., isolated from pinnipeds, comprising *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum* subsp. nov. and *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *caledonicus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1961–1968.
46. Gilbert, M. J., Zomer, A. L., Timmerman, A. J., Spaninks, M. P., Rubio-García, A., Rossen, J. W., Duim, B., Wagenaar, J. A. (2018). *Campylobacter blaseri* sp. nov., isolated from common seals (*Phoca vitulina*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5), 1787–1794.
47. Gölz, G., Rosner, B., Hofreuter, D., Josenhans, C., Kreienbrock, L., Löwenstein, A., Schielke, A., Stark, K., Suerbaum, S., Wieler, L. H., Alter, T. (2014). Relevance of *Campylobacter* to public health—The need for a One Health approach. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 817–823.
48. Gorain, C., Singh, A., Bhattacharyya, S., Kundu, A., Lahiri, A., Gupta, S., Mallick, A. I. (2020). Mucosal delivery of live *Lactococcus lactis* expressing functionally active JlpA antigen induces potent local immune response and prevent enteric colonization of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Vaccine*, 38(7), 1630–1642.
49. Gruntar, I., Kostanjšek, R., Pirš, T., Papić, B. (2023). *Campylobacter magnus* sp. nov., isolated from caecal contents of domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006108>
50. Haddad, N., Marce, C., Magras, C., Cappelier, J.-M. (2010). An overview of methods used to clarify pathogenesis mechanisms of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection*, 73(4), 786–802.
51. Haddock, G., Mullin, M., MacCallum, A., Sherry, A., Tetley, L., Watson, E., Dagleish, M., Smith, D. G. E., Everest, P. (2010). *Campylobacter jejuni* 81-176 forms

distinct microcolonies on in vitro-infected human small intestinal tissue prior to biofilm formation. *Microbiology*, 156(10), 3079–3084.

52. Hakeem, M. J., Lu, X. (2020). Survival and Control of *Campylobacter* in Poultry Production Environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 615049.

53. Heacock-Kang, Y., Sun, Z., Zarzycki-Siek, J., McMillan, I. A., Norris, M. H., Bluhm, A. P., Cabanas, D., Fogen, D., Vo, H., Donachie, S. P., Borlee, B. R., Sibley, C. D., Lewenza, S., Schurr, M. J., Schweizer, H. P., Hoang, T. T. (2017). Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, 106(6), 976–985.

54. Heacock-Kang, Y., Zarzycki-Siek, J., Sun, Z., Poonsuk, K., Bluhm, A. P., Cabanas, D., Fogen, D., McMillan, I. A., Chuanchuen, R., Hoang, T. T. (2018). Novel dual regulators of *Pseudomonas aeruginosa* essential for productive biofilms and virulence. *Molecular Microbiology*, 109(3), 401–414.

55. Heimesaat, M. M., Backert, S., Alter, T., Bereswill, S. (2021). Human *Campylobacteriosis*-A Serious Infectious Threat in a One Health Perspective. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 431, 1–23.

56. Howard, S. L., Jagannathan, A., Soo, E. C., Hui, J. P. M., Aubry, A. J., Ahmed, I., Karlyshev, A., Kelly, J. F., Jones, M. A., Stevens, M. P., Logan, S. M., Wren, B. W. (2009). *Campylobacter jejuni* Glycosylation Island Important in Cell Charge, Legionaminic Acid Biosynthesis, and Colonization of Chickens. *Infection and Immunity*, 77(6), 2544–2556.

57. Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 237–257.

58. Inglis, G. D., Hoar, B. M., Whiteside, D. P., Morck, D. W. (2007). *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 11), 2636–2644.

59. Islam, D., Lewis, M. D., Srijan, A., Bodhidatta, L., Aksomboon, A., Gettayacamin, M., Baqar, S., Scott, D., Mason, C. J. (2006). Establishment of a non-

human primate *Campylobacter* disease model for the pre-clinical evaluation of *Campylobacter* vaccine formulations. *Vaccine*, 24(18), 3762–3771.

60. Jackson, R. J., Elvers, K. T., Lee, L. J., Gidley, M. D., Wainwright, L. M., Lightfoot, J., Park, S. F., Poole, R. K. (2007). Oxygen Reactivity of Both Respiratory Oxidases in *Campylobacter jejuni*: the *cydAB* Genes Encode a Cyanide-Resistant, Low-Affinity Oxidase That Is Not of the Cytochrome *bd* Type. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1604–1615.

61. Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T., Andleeb, S. (2015). Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4.

62. Jin, S, Joe, A., Lynett, J., Hani, E. K., Sherman, P., Chan, V. L. (2001). JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1225–1236.

63. Jin, Songmu, Song, Y. C., Emili, A., Sherman, P. M., Chan, V. L. (2003). JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 5(3), 165–174.

64. Joshua, G. W. P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V , Wren, B. W. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 2), 387–396.

65. Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., Man, S. M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720.

66. 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(12), 4312–4320.

67. Kaur, T., Singh, J., Huffman, M. A., Petrzalková, K. J., Taylor, N. S., Xu, S., Dewhurst, F. E., Paster, B. J., Debruyne, L., Vandamme, P., Fox, J. G. (2011). *Campylobacter troglodytis* sp. nov., isolated from feces of human-habituated wild

chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2366–2373.

68. Kawai, F., Paek, S., Choi, K.-J., Prouty, M., Kanipes, M. I., Guerry, P., Yeo, H.-J. (2012). Crystal structure of JlpA, a surface-exposed lipoprotein adhesin of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Structural Biology*, 177(2), 583–588.

69. Khatiwara, A., Jiang, T., Sung, S.-S., Dawoud, T., Kim, J. N., Bhattacharya, D., Kim, H.-B., Ricke, S. C., Kwon, Y. M. (2012). Genome Scanning for Conditionally Essential Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3098–3107.

70. Kiarie, A., Bebora, L., Gitao, G., Ochien’g, L., Okumu, N., Mutisya, C., Wasonga, J., Masudi, S. P., Moodley, A., Amon-Tanoh, M. A., Watson, J., Cumming, O., Cook, E. A. J. (2023). Prevalence and risk factors associated with the occurrence of *Campylobacter* sp. in children aged 6-24 months in peri-urban Nairobi, Kenya. *Frontiers in Public Health*, 11, 1147180.

71. Kim, S.-H., Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Perumal, A. S., Bang, W.-S., Rubab, M., Daliri, E. B.-M., Barathikannan, K., Elahi, F., Park, E., Jo, H. Y., Hwang, S.-B., Oh, D. H. (2020). Review on Stress Tolerance in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 596570.

72. Kist, M., Bereswill, S. (2001). *Campylobacter jejuni*. *Contributions to Microbiology*, 8, 150–165. <https://doi.org/10.1159/000060405>

73. Konkel, M E, Garvis, S. G., Tipton, S. L., Anderson, D. E., Cieplak, W. (1997). Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 24(5), 953–963.

74. Konkel, Michael E, Larson, C. L., Flanagan, R. C. (2010). *Campylobacter jejuni* FlpA binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 68–76.

75. Konkel, Michael E, Talukdar, P. K., Negretti, N. M., Klappenbach, C. M. (2020). Taking Control: *Campylobacter jejuni* Binding to Fibronectin Sets the Stage for Cellular Adherence and Invasion. *Frontiers in Microbiology*, 11, 564.

76. Koziel, M., O'Doherty, P., Vandamme, P., Corcoran, G. D., Sleator, R. D., Lucey, B. (2014). *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 8), 2878–2883.
77. Kreling, V., Falcone, F. H., Kehrenberg, C., Hensel, A. (2020). *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10409–10436.
78. Lai, C.-K., Chen, Y.-A., Lin, C.-J., Lin, H.-J., Kao, M.-C., Huang, M.-Z., Lin, Y.-H., Chiang-Ni, C., Chen, C.-J., Lo, U.-G., Lin, L.-C., Lin, H., Hsieh, J.-T., Lai, C.-H. (2016). Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 9.
79. Langridge, G. C., Phan, M.-D., Turner, D. J., Perkins, T. T., Parts, L., Haase, J., Charles, I., Maskell, D. J., Peters, S. E., Dougan, G., Wain, J., Parkhill, J., Turner, A. K. (2009). Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. *Genome Research*, 19(12), 2308–2316.
80. Lara-Tejero, M., Galán, J. E. (2001). CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infection and Immunity*, 69(7), 4358–4365.
81. Lawson, A. J., On, S. L., Logan, J. M., Stanley, J. (2001). *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 2), 651–660.
82. Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 510–543.
83. Lévesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., Arbeit, R. D., Michaud, S. (2013). *Campylobacteriosis* in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PloS One*, 8(12), e83731.

84. Li, J., Feng, J., Ma, L., de la Fuente Núñez, C., Gözl, G., Lu, X. (2017). Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 253, 20–28.
85. Lim, E. S., Kim, J.-S. (2017). Role of *eptC* in Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* NCTC11168 on Polystyrene and Glass Surfaces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 1609–1616.
86. Lin, J., Wang, Y., Van Hoang, K. (2009). Systematic Identification of Genetic Loci Required for Polymyxin Resistance in *Campylobacter jejuni* Using an Efficient In Vivo Transposon Mutagenesis System. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(2), 173–185.
87. Liu, F., Lee, S. A., Xue, J., Riordan, S. M., Zhang, L. (2022). Global epidemiology of campylobacteriosis and the impact of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 979055.
88. Logan, J. M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A. J., Stanley, J. (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 2, 865–872.
89. López-Sánchez, A., Leal-Morales, A., Jiménez-Díaz, L., Platero, A. I., Bardallo-Pérez, J., Díaz-Romero, A., Acemel, R. D., Illán, J. M., Jiménez-López, J., Govantes, F. (2016). Biofilm formation-defective mutants in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, 363(13), fnw127.
90. Luber, P., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K., Bartelt, E. (2006). Quantification of *Campylobacter* Species Cross-Contamination during Handling of Contaminated Fresh Chicken Parts in Kitchens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 66–70.
91. Lynch, C., Peeters, C., Walsh, N., McCarthy, C., Coffey, A., Lucey, B., Vandamme, P. (2022). *Campylobacter majalis* sp. nov. and *Campylobacter suis* sp. nov., novel *Campylobacter* species isolated from porcine gastrointestinal mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(12).
92. MacCallum, A., Haddock, G., Everest, P. H. (2005). *Campylobacter jejuni* activates mitogen-activated protein kinases in Caco-2 cell monolayers and in vitro

infected primary human colonic tissue. *Microbiology* (Reading, England), 151(Pt 8), 2765–2772.

93. Mandal, R. K., Jiang, T., Kwon, Y. M. (2017). Essential genome of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics*, 18(1), 616.

94. McCarthy, A. J., Stabler, R. A., Taylor, P. W. (2018). Genome-Wide Identification by Transposon Insertion Sequencing of *Escherichia coli* K1 Genes Essential for In Vitro Growth, Gastrointestinal Colonizing Capacity, and Survival in Serum. *Journal of Bacteriology*, 200(7), e00698-17.

95. Méndez-Olvera, E. T., Bustos-Martínez, J. A., López-Vidal, Y., Verdugo-Rodríguez, A., Martínez-Gómez, D. (2016). Cytolethal Distending Toxin From *Campylobacter jejuni* Requires the Cytoskeleton for Toxic Activity. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(10), e35591.

96. Metris, A., Reuter, M., Gaskin, D. J. H., Baranyi, J., van Vliet, A. H. M. (2011). In vivo and in silico determination of essential genes of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics*, 12, 535.

97. Monteville, M. R., Yoon, J. E., Konkel, M. E. (2003). Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* (Reading, England), 149(Pt 1), 153–165.

98. Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S. G., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D. A., Mégraud, F., Millar, B. C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J. R., Rooney, P. J., Sails, A., Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 36(3), 351–382.

99. Mortensen, N. P., Mercier, K. A., McRitchie, S., Cavallo, T. B., Pathmasiri, W., Stewart, D., Sumner, S. J. (2016). Microfluidics meets metabolomics to reveal the impact of *Campylobacter jejuni* infection on biochemical pathways. *Biomedical Microdevices*, 18(3), 51.

100. Naito, M., Fridrich, E., Fields, J. A., Pryjma, M., Li, J., Cameron, A., Gilbert, M., Thompson, S. A., Gaynor, E. C. (2010). Effects of Sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 Lipooligosaccharide Core Truncations on Biofilm Formation, Stress Survival, and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 192(8), 2182–2192.

101. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. Państwowy Zakład Higieny. (NIZP-PZH): Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce w 2023 r.
102. Neal-McKinney, J. M., Konkel, M. E. (2012). The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.
103. Newell, D G. (2001). Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons to be learned from similar *Helicobacter pylori* models. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, 30, 57S-67S.
104. Newell, Diane G., Mughini-Gras, L., Kalupahana, R. S., Wagenaar, J. A. (2017). *Campylobacter* epidemiology—sources and routes of transmission for human infection. In *Campylobacter* (pp. 85–110). Elsevier.
105. Nguyen, T. N., Yeh, C.-W., Tsai, P.-C., Lee, K., Huang, S.-L. (2016). Transposon Mutagenesis Identifies Genes Critical for Growth of *Pseudomonas nitroreducens* TX1 on Octylphenol Polyethoxylates. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6584–6592.
106. Niba, E. T. E., Naka, Y., Nagase, M., Mori, H., Kitakawa, M. (2008). A Genome-wide Approach to Identify the Genes Involved in Biofilm Formation in *E. coli*. *DNA Research*, 14(6), 237–246.
107. Oh, E., Jeon, B. (2014). Role of Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) in the Biofilm Formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 9(1), e87312.
108. Oh, E., McMullen, L. M., Chui, L., Jeon, B. (2017). Differential Survival of Hyper-Aerotolerant *Campylobacter jejuni* under Different Gas Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 8, 954.
109. Özer, B. H. (1999). MILK AND MILK PRODUCTS | Microbiology of Liquid Milk. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 1436–1441). Elsevier.
110. Palyada, K., Threadgill, D., Stintzi, A. (2004). Iron Acquisition and Regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4714–4729.
111. Parisi, A., Chiara, M., Caffara, M., Mion, D., Miller, W. G., Caruso, M., Manzari, C., Florio, D., Capozzi, L., D’Erchia, A. M., Manzulli, V., Zanoni, R. G.

(2021). *Campylobacter vulpis* sp. nov. isolated from wild red foxes. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(3), 126204.

112. Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V, Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., ... Barrell, B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), 665–668.

113. Phung, C., Scott, P. C., Dekiwadia, C., Moore, R. J., Van, T. T. H. (2022). *Campylobacter bilis* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(4), 10.1099/ijsem.0.005314

114. Piccirillo, A., Niero, G., Calleros, L., Pérez, R., Naya, H., Iraola, G. (2016). *Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3468–3476.

115. Poudel, S., Jia, L., Arick, M. A., Hsu, C.-Y., Thrash, A., Sukumaran, A. T., Adhikari, P., Kiess, A. S., Zhang, L. (2023). In silico prediction and expression analysis of vaccine candidate genes of *Campylobacter jejuni*. *Poultry Science*, 102(5), 102592.

116. Pratt, J. S., Sachen, K. L., Wood, H. D., Eaton, K. A., Young, V. B. (2006). Modulation of host immune responses by the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Infection and Immunity*, 74(8), 4496–4504.

117. Püning, C., Su, Y., Lu, X., Götz, G. (2021). Molecular Mechanisms of *Campylobacter* Biofilm Formation and Quorum Sensing (pp. 293–319).

118. Puttamreddy, S., Cornick, N. A., Minion, F. C. (2010). Genome-Wide Transposon Mutagenesis Reveals a Role for pO157 Genes in Biofilm Development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infection and Immunity*, 78(6), 2377-2384.

119. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512.

120. Rahman, H., King, R. M., Shewell, L. K., Semchenko, E. A., Hartley-Tassell, L. E., Wilson, J. C., Day, C. J., Korolik, V. (2014). Characterisation of a multi-ligand binding chemoreceptor CcmL (Tlp3) of *Campylobacter jejuni*. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003822.
121. Ranjith, K., Arunasri, K., Reddy, G. S., Adicherla, H., Sharma, S., Shivaji, S. (2017). Global gene expression in *Escherichia coli*, isolated from the diseased ocular surface of the human eye with a potential to form biofilm. *Gut Pathogens*, 9, 15.
122. Rathbun, K. M., Hall, J. E., Thompson, S. A. (2009). Cj0596 is a periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerase involved in *Campylobacter jejuni* motility, invasion, and colonization. *BMC Microbiology*, 9, 160.
123. Reid, A. N., Pandey, R., Palyada, K., Naikare, H., Stintzi, A. (2008). Identification of *Campylobacter jejuni* Genes Involved in the Response to Acidic pH and Stomach Transit. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1583–1597.
124. Reuter, M., Ultee, E., Toseafa, Y., Tan, A., van Vliet, A. H. M. (2021). Inactivation of the core cheVAWY chemotaxis genes disrupts chemotactic motility and organised biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(24), fnaa198.
125. Ribet, D., Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17(3), 173–183.
126. Roop, R. M., Smibert, R. M., Johnson, J. L., Krieg, N. R. (1985). *Campylobacter mucosalis* (Lawson, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb. nov.: Emended Description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(2), 189–192.
127. Rossi, M., Debruyne, L., Zanoni, R. G., Manfreda, G., Revez, J., Vandamme, P. (2009). *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 9), 2364–2369.
128. Rubinchik, S., Seddon, A., Karlyshev, A. V. (2012). Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells. *European Journal of Microbiology , Immunology*, 2(1), 32–40.

129. Russell, R. G., Blaser, M. J., Sarmiento, J. I., Fox, J. (1989). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in *Macaca nemestrina*. *Infection and Immunity*, 57(5), 1438–1444.
130. Same, R. G., Tamma, P. D. (2018). *Campylobacter* Infections in Children. *Pediatrics in Review*, 39(11), 533–541.
131. Sandstedt, K., Ursing, J. (1991). Description of *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. Previously Known as the CNW Group. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(1), 39–45.
132. Scott, N. E., Bogema, D. R., Connolly, A. M., Falconer, L., Djordjevic, S. P., Cordwell, S. J. (2009). Mass Spectrometric Characterization of the Surface-Associated 42 kDa Lipoprotein JlpA as a Glycosylated Antigen in Strains of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Proteome Research*, 8(10), 4654–4664.
133. Sebald, M., Veron, M. (1963). Base DNA content and classification of *Vibrios*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 105, 897–910.
134. Shang, Y., Ren, F., Song, Z., Li, Q., Zhou, X., Wang, X., Xu, Z., Bao, G., Wan, T., Lei, T., Wang, N., Jiao, X.-A., Huang, J. (2016). Insights into *Campylobacter jejuni* colonization and enteritis using a novel infant rabbit model. *Scientific Reports*, 6, 28737.
135. Silva, D., Santos, G., Barroca, M., Collins, T. (2017). Inverse PCR for Point Mutation Introduction. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1620, 87–100.
136. Silva, M. F., Pereira, G., Carneiro, C., Hemphill, A., Mateus, L., Lopes-da-Costa, L., Silva, E. (2020). *Campylobacter portucalensis* sp. nov., a new species of *Campylobacter* isolated from the preputial mucosa of bulls. *PloS One*, 15(1), e0227500.
137. Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
138. Skarp, C. P. A., Hänninen, M.-L., Rautelin, H. I. K. (2016). *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(2), 103–109.

139. Smith, J. L., Bayles, D. O. (2006). The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(4), 227–248.
140. Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., Dooley, J. S. G. (2005). *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41(4), 297–302.
141. Stahl, M., Butcher, J., Stintzi, A. (2012). Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 5.
142. Stanley, J., Burnens, A. P., Linton, D., On, S. L., Costas, M., Owen, R. J. (1992). *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *Journal of General Microbiology*, 138(11), 2293–2303.
143. Stintzi, A. (2003). Gene Expression Profile of *Campylobacter jejuni* in Response to Growth Temperature Variation. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 2009–2016.
144. Strachan, N. J. C., Rotariu, O., Smith-Palmer, A., Cowden, J., Sheppard, S. K., O'Brien, S. J., Maiden, M. C. J., Macrae, M., Bessell, P. R., Matthews, L., Reid, S. W. J., Innocent, G. T., Ogden, I. D., Forbes, K. J. (2013). Identifying the seasonal origins of human campylobacteriosis. *Epidemiology and Infection*, 141(6), 1267–1275.
145. Svensson, S. L., Davis, L. M., MacKichan, J. K., Allan, B. J., Pajaniappan, M., Thompson, S. A., Gaynor, E. C. (2009). The CprS sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Molecular Microbiology*, 71(1), 253–272.
146. Svensson, S. L., Pryjma, M., Gaynor, E. C. (2014a). Flagella-Mediated Adhesion and Extracellular DNA Release Contribute to Biofilm Formation and Stress Tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 9(8), e106063.
147. Svensson, S. L., Pryjma, M., Gaynor, E. C. (2014b). Flagella-Mediated Adhesion and Extracellular DNA Release Contribute to Biofilm Formation and Stress Tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 9(8), e106063.
148. Talukdar, P. K., Negretti, N. M., Turner, K. L., Konkell, M. E. (2020). Molecular Dissection of the *Campylobacter jejuni* CadF and FlpA Virulence Proteins in Binding to Host Cell Fibronectin. *Microorganisms*, 8(3), 389.

149. Tanner, A. C. R., Badger, S., Lai, C.-H., Listgarten, M. A., Visconti, R. A., Socransky, S. S. (1981). *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and Description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from Humans with Periodontal Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31(4), 432–445.
150. Teh, A. H. T., Lee, S. M., Dykes, G. A. (2014). Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5154–5160.
151. Teh, A. H. T., Lee, S. M., Dykes, G. A. (2017). Identification of potential *Campylobacter jejuni* genes involved in biofilm formation by EZ-Tn5 Transposome mutagenesis. *BMC Research Notes*, 10(1), 182.
152. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. (2021). *EFSA Journal*, 19(2).
153. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. (2023). *EFSA Journal*, 21(12).
154. Theoret, J. R., Cooper, K. K., Zekarias, B., Roland, K. L., Law, B. F., Curtiss, R., Joens, L. A. (2012). The *Campylobacter jejuni* Dps Homologue Is Important for In Vitro Biofilm Formation and Cecal Colonization of Poultry and May Serve as a Protective Antigen for Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(9), 1426–1431.
155. Thomas, K. M., de Glanville, W. A., Barker, G. C., Benschop, J., Buza, J. J., Cleaveland, S., Davis, M. A., French, N. P., Mmbaga, B. T., Prinsen, G., Swai, E. S., Zadoks, R. N., Crump, J. A. (2020). Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in African food animals and meat: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 315, 108382.
156. Tram, G., Klare, W. P., Cain, J. A., Mourad, B., Cordwell, S. J., Day, C. J., Korolik, V. (2020). Assigning a role for chemosensory signal transduction in *Campylobacter jejuni* biofilms using a combined omics approach. *Scientific Reports*, 10(1), 6829.
157. Turonova, H., Briandet, R., Rodrigues, R., Hernould, M., Hayek, N., Stintzi, A., Pazlarova, J., Tresse, O. (2015). Biofilm spatial organization by the emerging pathogen

Campylobacter jejuni: comparison between NCTC 11168 and 81-176 strains under microaerobic and oxygen-enriched conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6,709.

158. van der Stel, A., Boogerd, F. C., Huynh, S., Parker, C. T., van Dijk, L., van Putten, J. P. M., Wösten, M. M. S. M. (2017). Generation of the membrane potential and its impact on the motility, ATP production and growth in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 105(4), 637–651.

159. van Spreuwel, J. P., Duursma, G. C., Meijer, C. J., Bax, R., Rosekrans, P. C., Lindeman, J. (1985). *Campylobacter colitis*: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut*, 26(9), 945–951.

160. Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Scott, P. C., Moore, R. J. (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4518–4524.

161. Vandamme, P., Daneshver, M. I., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Kersters, K., Goossens, H., Moss, C. W. (1995). Chemotaxonomic Analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and Reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 145–152.

162. Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., Falsen, E. (2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 9), 2016–2022.

163. Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 88–103.

164. Veron, M., Chatelain, R. (1973). Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Veron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(2), 122–134.

165. Vital-Lopez, F. G., Reifman, J., Wallqvist, A. (2015). Biofilm Formation Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial Metabolism. *PLOS Computational Biology*, 11(10), e1004452.

166. Wang, L., Li, M., Dong, D., Bach, T.-H. L., Sturdevant, D. E., Vuong, C., Otto, M., Gao, Q. (2008). SarZ is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(9), 1254–1262.
167. Wassenaar, T. M., Fry, B. N., van der Zeijst, B. A. M. (1995). Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Microbiology*, 141(1), 95–101.
168. Weerakoon, D. R., Borden, N. J., Goodson, C. M., Grimes, J., Olson, J. W. (2009). The role of respiratory donor enzymes in *Campylobacter jejuni* host colonization and physiology. *Microbial Pathogenesis*, 47(1), 8–15.
169. Whittle, G., Salyers, A. A. (2002). Bacterial Transposons—An Increasingly Diverse Group of Elements. In *Modern Microbial Genetics* (pp. 385–427). Wiley.
170. Wilson, D. J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A. J. H., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Fearnhead, P., Hart, C. A., Diggle, P. J. (2008). Tracing the Source of *Campylobacteriosis*. *PLoS Genetics*, 4(9), e1000203.
171. Young, K. T., Davis, L. M., Dirita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(9), 665–679.
172. Zanoni, R. G., Debruyne, L., Rossi, M., Revez, J., Vandamme, P. (2009). *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 7), 1666–1671.
173. Ziprin, R. L., Young, C. R., Stanker, L. H., Hume, M. E., Konkel, M. E. (1999). The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Diseases*, 43(3), 586–589.