

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Peter HORVAT

ŠTUDIJ INTERAKCIJE MED BAKTERIJAMA
***Campylobacter jejuni* IN *Escherichia coli* TER**
NJUNIMA BAKTERIOFAGOMA

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Peter HORVAT

**ŠTUDIJ INTERAKCIJE MED BAKTERIJAMA *Campylobacter jejuni*
IN *Escherichia coli* TER NJUNIMA BAKTERIOFAGOMA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**STUDY OF INTERACTION BETWEEN *Campylobacter jejuni* AND
Escherichia coli AND THEIR BACTERIOPHAGES**

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa – 2. stopnja Biotehnologija. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultet in na COBIK-u v Ajdovščini.

Komisija za 1. in 2. stopnjo študija biotehnologije je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Aleša Podgornika, za somentorja prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzenta prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Aleš Podgornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Sonja Smole Možina
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Peter Horvat

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 602.3:578.347(043.2)
KG	bakteriofagi/ <i>Escherichia coli</i> / <i>Campylobacter jejuni</i> / značilnosti/ aplikacije/ življenjski cikel/adsorpcijska konstanta/latentna perioda/namnožitveno število
AV	HORVAT, Peter, dipl. bioteh. (UN)
SA	PODGORNIK, Aleš (mentor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	ŠTUDIJ INTERAKCIJE MED BAKTERIJO <i>Campylobacter jejuni</i> IN <i>Escherichia coli</i> TER NJUNIMA BAKTERIOFAGOMA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	X, 69, [4] str., 8 preg., 20 sl., 2 pril., 93 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterije vrst <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>Escherichia coli</i> O157:H7 so zdravju škodljive črevesne bakterije, ki sodijo med najpogostejše bakterijske povzročitelje črevesnih okužb ljudi. Najpogostejše se okužba prenese s kontaminirano hrano. Fagi so virusi, ki specifično okužujejo bakterije in predstavljajo alternativo uporabi antibiotikov v zdravstvu in drugih protimikrobnih sredstev, ki se v živilstvu uporabljajo za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti v živilstvu. Za uspešno množično proizvodnjo fagov in uspešno fagno terapijo pa je potrebno čim boljše poznavanje bakteriofaga, tudi rastnih parametrov, ki določajo hitrost razmnoževanja: adsorpcijska konstanta, latentna perioda in namnožitveno število. Hitrost adsorpcije smo določili z zasledovanjem upadanja titra prostih fagov v času v homogeni suspenziji bakteriofagov in bakterij. Latentno periodo in namnožitveno št. smo določili s pomočjo enostopenjskega poskusa, pri katerem smo zasledovali naraščanje titra prostih fagov v času in izdelali rastno krivuljo faga. Adsorpcijska konstanta bakteriofaga T4 je znašala $2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min, medtem ko znaša adsorpcijska konstanta bakteriofaga PC5 $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min. Latentna perioda bakteriofaga T4 je bila kratka in je znašala približno 15 min. Drugače je bilo v primeru PC5, kjer je prišlo do lize šele med 60 in 90 min. Namnožitveno število bakteriofaga T4 v naših poskusih je znašalo približno 10 bakteriofagov na bakterijo. Zelo presenetljivo je bilo namnožitveno št. bakteriofaga PC5, ki je znašalo zgolj 0,24 (približno 1 novonastali bakteriofag na 4 gostiteljske celice).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 602.3:578.347(043.2)

CX bacteriophages/*Escherichia coli*/*Campylobacter jejuni*/characteristics/aplications/
life cycle/adsorbtion constante/latent period/burst size

AU HORVAT, Peter

AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty Academic Study in Biotechnology

PY 2015

TI STUDY OF INTERACTION BETWEEN BACTERIUM *Campylobacter jejuni*
AND *Escherichia coli* AND THEIR BACTERIOPHAGES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO X, 69, [4] p., 8 tab., 20 fig., 2 ann., 93 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157:H7 are harmful intestinal bacteria that are most common cause of intestinal diseases in humans. They are translated mainly by contaminated food. Phages are viruses that specifically infect bacteria. They are widely regarded as alternative to antibiotics in health care and other commonly used antimicrobial agents used in foodprocessing industry. For mass production of phages and phage therapy it is necessary to know as much as possible about phage as well as phage growth parameters dictating rate of reproduction: adsorbtion constant, latent period and burst size. We determined adsorbtion constant by measuring decreasing titer of free bacteriophages in time within a homogenous suspension of phages and bacteria. Latent period and burst size was determined using one step growth experiment, in which we measured increasing titer of free phages and created bacteriophage one step growth curve. Adsorbtion constant of bacteriophage T4 was $2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min, while adsorbtion constant of PC5 was $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min. Latent period of phage T4 was very short, it took only around 15 min. Burst size of bacteriophage T4 was around 10 phages per cell. Latent period of PC5 was longer, it took between 60 and 90 min, but burst size was suprisingly low, only 0,24 (approx. 1 newly sythesized phage per 4 host cells).

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGRADBA IN KLASIFIKACIJA BAKTERIOFAGOV	3
2.2 ŽIVLJENJSKI CIKEL BAKTERIOFAGOV	4
2.2.1 Adsorbcijska na gostiteljsko celico	4
2.2.2 Pomnoževanje bakteriofagov znotraj gostitelja	6
2.2.3 Povezave med rastnimi parametri bakteriofagov	9
2.3 <i>Escherichia coli</i> IN NJEN BAKTERIOFAG T4	12
2.4 ZNAČILNOSTI IN PROBLEMATIKA <i>Campylobacter jejuni</i>	13
2.5 ZNAČILNOSTI BAKTERIOFAGA PC5	15
2.6 MOŽNE APLIKACIJE BAKTERIOFAGOV ZOPER <i>C. jejuni</i>	15
2.6.1 Bakteriofagna terapija	16
2.6.2 Dekontaminacija hrane z bakteriofagi	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Bakterijski sevi	18
3.1.2 Bakteriofagi	18
3.1.3 Rastna gojišča za <i>C. jejuni</i>	18
3.1.4 Rastna gojišča za namnoževanje in kvantifikacijo bakteriofaga PC5	19
3.1.5 Rastna gojišča za namnoževanje in kvantifikacijo <i>E. coli</i> ter bakteriofaga T4	20
3.1.6 Solno magnezijev (SM) pufer	20
3.2 METODE	22
3.2.1 Določanje konstante adsorbcijske (δ) bakteriofagov na gostiteljsko celico	22
3.2.2 Določanje latentne periode (L) in namnožitvenega števila (b)	23
3.2.3 Shematski prikaz poskusov določanja rastnih parametrov bakteriofagov PC5 in T4	26
3.2.4 Priprava delovne banke <i>C. jejuni</i> LBA65	28
3.2.5 Priprava delovne banke <i>E. coli</i> DSM613	28

3.2.6	Revitalizacija bakterij <i>C. jejuni</i> in <i>E. coli</i>	28
3.2.7	Priprava prekonočne kulture <i>E. coli</i>	28
3.2.8	Priprava eksponentne kulture <i>C. jejuni</i>	29
3.2.9	Priprava eksponentne kulture <i>E. coli</i>	29
3.2.10	Metoda štetja kolonij	29
3.2.11	Priprava delovne banke bakteriofaga PC5	30
3.2.12	Priprava delovne banke bakteriofaga T4	30
3.2.13	Metoda (štetja) plakov	30
4	REZULTATI	32
4.1	REZULTATI POSKUSOV Z <i>E. coli</i> IN BAKTERIOFAGOM T4	32
4.1.1	Rastna krivulja <i>E. coli</i> DSM613	32
4.1.2	Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante T4 (na <i>E. coli</i> DSM613)	33
4.1.3	Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga T4	35
4.2	REZULTATI POSKUSOV S <i>C. jejuni</i> IN BAKTERIOFAGOM PC5	38
4.2.1	Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante PC5 na <i>C. jejuni</i> LBA65	38
4.2.2	Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga PC5	40
4.2.2.1	Vpliv NaCl na stabilnost bakteriofaga PC5	45
5	RAZPRAVA	47
5.1	REZULTATI POSKUSOV Z <i>E. coli</i> IN BAKTERIOFAGOM T4	47
5.1.1	Rastna krivulja <i>E. coli</i> DSM613	47
5.1.2	Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante T4 na <i>E. coli</i> DSM613	47
5.1.3	Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga T4	49
5.2	REZULTATI POSKUSOV S <i>C. jejuni</i> IN BAKTERIOFAGOM PC5	53
5.2.1	Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante PC5 na <i>C. jejuni</i> LBA65	53
5.2.2	Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga PC5	55
5.2.2.1	Vpliv NaCl na stabilnost bakteriofaga PC5	57
6	SKLEPI	59
7	POVZETEK (SUMMARY)	60
7.1	POVZETEK	60
7.2	SUMMARY	61
8	VIRI	62
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prednosti in pomisleki uporabe bakteriofagne terapije (Courchesne, 2009)	17
Preglednica 2: Ključne količine za določanje adsorpcijske konstante sistema <i>E. coli</i> in T4	35
Preglednica 3: Masne bilance fagov poskusov A in B (sliki 12 in 13), predstavljene kot absolutno število fagov (PFU) (število fagov je pomnožek koncentracije s celotnim volumnom suspenzije v reakcijski posodi)	35
Preglednica 4: Povprečna latentna perioda in namnožitveno število sistema T4- <i>E. coli</i> v poskusih A in B	37
Preglednica 5: Ključne količine za določanje adsorpcijske konstante sistema <i>C. jejuni</i> in PC5	38
Preglednica 6: Masne bilance fagov poskusov A-D (slike 15-18), predstavljene kot absolutna števila fagov (PFU) (število fagov je pomnožek koncentracije s celotnim volumnom suspenzije v posodi), / pomeni, da ni podatka	43
Preglednica 7: Povprečna latentna perioda in namnožitveno število sistema PC5- <i>C. jejuni</i> v poskusih A-D	44
Preglednica 8: Delež preživelosti bakteriofagov v različnih molarnostih NaCl glede na kontrolo	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba arhetipskega bakteriofaga – T4 (Bacteriophage, 2008)	3
Slika 2: Klasifikacija bakteriofagov (Ackermann, 2006, Orlova, 2012).....	4
Slika 3: Shematska ponazoritev litičnega in lizogenega cikla (Examples of Viral Replication Pathways, 2009)	7
Slika 4: Odvisnost latentne periode (levo) in namnožitvenega števila (desno) od časa podvajanja gostitelja (Rabinovitch in sod., 2002)	10
Slika 5: Relativni fitnes bakteriofaga v odvisnosti od latentne periode (Shao in sod. 2008)	11
Slika 6: Odvisnost optimalne latentne periode od gostote gostiteljskih celic (Abedon in sod., 2001)	12
Slika 7: Morfologija faga PC5 (a) in adsorbcija na <i>C. jejuni</i> (b) (Janež in sod., 2014)	15
Slika 8: Osnovni princip določanja konstante adsorbcije (δ), ki temelji na spremljanju zmanjševanja števila prostih fagov v suspenziji	26
Slika 9: Princip določanja dolžine latentne periode (L) in namnožitvenega števila (b), ki temelji na spremljanju naraščanja prostih fagov in izdelavi stopničaste rastne krivulje	27
Slika 10: Rastna krivulja <i>E. coli</i> DSM613, prikazana z absorbanco (OD) pri 600 nm in CFU/ml v odvisnosti od časa; krivulje z absorbanco so bile narejene za svežo in en teden staro kulturo, CFU pa le za svežo kulturo; $\mu_{\max} = 1,4 \text{ h}^{-1}$	33
Slika 11: Grafi naravnega logaritma prostih fagov v odvisnosti od časa prikazujejo padanje prostih fagov v času 20 minut, na vsakem grafu je vidna enačba premice in R^2 , za nadaljnje izračune je najpomembnejši naklon premice	34
Slika 12: Poskus A – Titer prostih fagov in koncentracije bakterij v enostopenjskem poskusu; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov v kapljici (t.i. spot assay) in metodo štetja plakov (t.i. plaque assay), bakterije so bile določene z metodo štetja kolonij.....	36
Slika 13: Poskus B – graf Titer prostih fagov in koncentracije bakterij v enostopenjskem poskusu; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay), bakterije so bile določene z metodo štetja kolonij	36
Slika 14: Grafi naravnega logaritma prostih fagov v odvisnosti od časa prikazujejo padanje prostih fagov v času 20 minut, na vsakem grafu je vidna enačba premice in R^2 , za nadaljnje izračune je najpomembnejši naklon premice	39
Slika 15: Poskus A; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay).....	41

Slika 16: Poskus B; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay), bakterije so bile določene z metodo štetja kolonij	41
Slika 17: Poskus C; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay)	42
Slika 18: Poskus D; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay)	42
Slika 19: Spreminjanje koncentracije prostih fagov v mediju v času 4 ur glede na prisotnost različnih koncentracij soli v mediju in primerjava s kontrolo (modra črta)	45
Slika 20: shematski prikaz dogajanja med adsorbcijo (enostopenjski poskus), na levi strani je prikazan fizični prikaz poskusa, na desni je prikazano možno dogajanje na mikroskopskem nivoju (ilustracija: Peter Horvat)	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšave/simboli	Razlaga
RNA	ribonucleic acid/ribonukleinska kislina
DNA	deoxyribonucleic acid/deoksirobonukleinska kislina
ssRNA/DNA	single-stranded/enoverižna RNA/DNA
dsRNA/DNA	double-stranded/dvoverižna RNA/DNA
MOI	multiplicity of infection/multipliciteta okužbe
δ	konstanta adsorbcije
L	latentna perioda
E	ekliptična perioda
b	namnožitveno število
X	koncentracija bakterij
P	titer bakteriofagov
t	čas
D	difuzivnost
R	Stokes-ov polmer delca
T	temperatura
α	hitrost zorenja bakteriofaga
μ	specifična hitrost rasti bakterije
r	fitnes bakteriofaga
CFU	colony forming unit/kolonijska enota
PFU	plaque forming unit/plakotvorna enota
EOP	efficiency of plating
M	molarnost (mol/L)
LPS	lipo polisaharid
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
ATP	adenozin 3-fosfat
WHO	World Health Organization/Svetovna zdravstvena organizacija
AHB	Abeyta-Hunt-Bark (gojišče)
BHI	brain-heart infusion/možgansko srčni infuzijski bojon
MHB	Mueller-Hinton bojon
NZCYM	Novozelandski kazamino kvasni agar
LB	Luria-Bertani (gojišče)
SM	solno-magnezijev pufer
TTC	triphenyl tetrazolium chloride/trifenil tetrazolijev klorid

1 UVOD

Bakteriofagi so virusi, sposobni specifičnega okuževanja bakterijskih celic, ki povzročijo lizo gostiteljske celice. Bakteriofagi oz. kratko fagi naj bi bili najštevilčnejši in najbolj raznoliki organizmi na zemlji, saj je njihova populacija ocenjena na preko 10^{31} organizmov in število vrst na 10^8 (Abedon, 2008). Zápise zasledimo že v zelo starih dokumentih o rečnih vodah, ki naj bi imele zdravilne učinke zoper bakterijske okužbe. Leta 1896 je **Ernest Hanbury Hankin** poročal o antibakterijskem učinku rek Ganges in Yamuna (Indija) proti koleri. Ti protibakterijski agensi so lahko prehajali tudi skozi fin keramični filter. Največje zasluge za odkritje se pripisuje **Fredericku Twort-u** in **Felixu d'Herelle-u**. Twort se je v Angliji ukvarjal z gojenjem primitivnih oblik življenja. Poskusil je gojiti viruse na umetnih gojiščih. Leta 1915 je opazil, da ob inokulaciji cepiva proti kozam na gojišču rastejo mikrokoki, ki izgledajo nenaravno (steklena transformacija). Takrat še ni vedel, da ima opravka z bakterijskimi virusi. Njegova dela so ostala dolgo neopažena. Francoski Kanadčan Felix d'Herelle je veliko potoval in preučeval živalske bolezni (kobilice). Opazil je nenormalne in nekonstantne cone inhibicije, ko je gojil kokobacile. Dokončno se mu je posvetilo, ko je preučeval bacil griže na Pasteur-jevem inštitutu v Parizu. Svoje ugotovitve o nevidnem agensu (virusu), ki ubija bakterije, je prvič predstavil leta 1917. Ko so kasneje odkrili tudi Twort-ove raziskave, so začeli mnogi dvomiti, da d'Herelle ni poznal teh raziskav (Duckworth, 1976).

Bakteriofagi so primerni za najrazličnejše aplikacije. Zaradi naraščajočega števila bakterij, ki so odporne na mnoge antibiotike, je ponovno oživela možnost **bakteriofagne terapije**. Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization – WHO) svari, da bi se lahko zopet znašli v predantibiotični eri. Rešitev, ki se ponuja, je uporaba litičnih fagov, ki so naravni plenilci (patogenih) bakterij. Široko, vsesplošno bakteriofagno terapijo bi lahko omogočili le z velikansko proizvodnjo bakteriofagov. To bi bilo mogoče le z zelo učinkovitimi bioprocesi. K učinkovitejšim bioprosesom pripomore dobro poznavanje (okarakteriziranost) bakteriofaga oziroma interakcij med bakteriofagom in njegovim gostiteljem. Na ta način je mogoče izdelovanje uporabnih matematičnih modelov, ki napovedujejo rezultate bioprosesov, na katere se je mogoče opreti za lažje napovedovanja poteka in rezultatov bioprosesa (Parisien, 2008).

1.1 CILJI DELA

Nekaj **poglavitnih ciljev** magistrske naloge:

- postavitvev šarženga gojenja bakterije v erlenmajerici v aerobnih ali mikroaerobnih pogojih,
- postavitvev šarženga namnoževanja bakteriofagov v erlenmajerici,
- določitev **konstante adsorpcije** bakteriofaga na bakterijsko celico,
- določitev trajanja **latentne periode**,
- določitev **namnožitvenega števila**,
- postavitvev preprostega matematičnega modela za napovedovanje poteka okužbe bakterije z bakteriofagi v šaržnem procesu.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo postavili sledeče **hipoteze**:

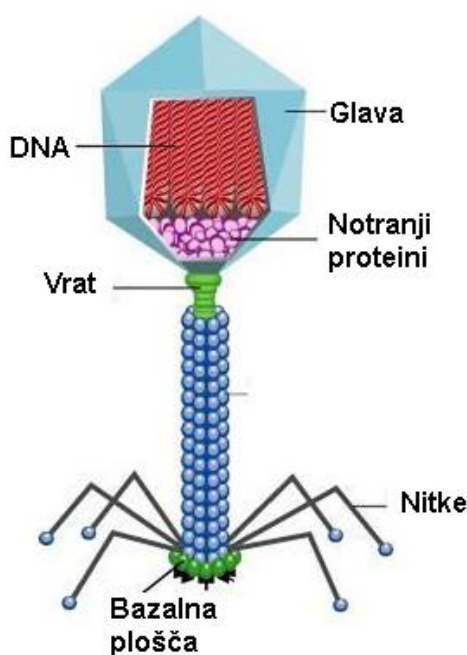
- z vzpostavitvijo ustreznih analitskih protokolov lahko natančno določimo **konstanto adsorpcije** bakteriofaga na bakterijsko celico,
- z vzpostavitvijo ustreznih analitskih protokolov lahko natančno določimo trajanje **latentne periode**,
- z vzpostavitvijo ustreznih analitskih protokolov lahko natančno določimo **namnožitveno število**,
- postavimo lahko matematični model, ki zanesljivo napoveduje koncentracijo bakterij in bakteriofagov tekom šaržnega procesa na osnovi določenih parametrov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGRADBA IN KLASIFIKACIJA BAKTERIOFAGOV

Zgradba arhetipskega bakteriofaga je prikazana na sliki 1. Okoli 96% vseh bakteriofagov ima rep in ima podobno zgradbo naslikanemu fagu (Ackermann, 2007).

Zgoraj je **proteinska glava (kapsida)**, v kateri je **dedni zapis** za podvajanje dednine in tvorbo **proteinskih plaščev** (kot pri večini virusov), in sicer v eni izmed naslednjih oblik: **ssRNA, dsRNA, ssDNA ali dsDNA**. Kapsida je lahko obdana tudi z zunanjo ovojnico, na kateri so pritrjene glikoproteinske strukture (»spikes«). Glava se nato nadaljuje v vrat, ta pa se nadaljuje v tubularni **rep** faga. Na koncu je **bazalna plošča**, s katero se pričvrsti na gostiteljsko celico preden vbrizga svoj genom. Okoli so še noge bakteriofaga ali t.i. **nitke** (Bacteriophage, 2008).

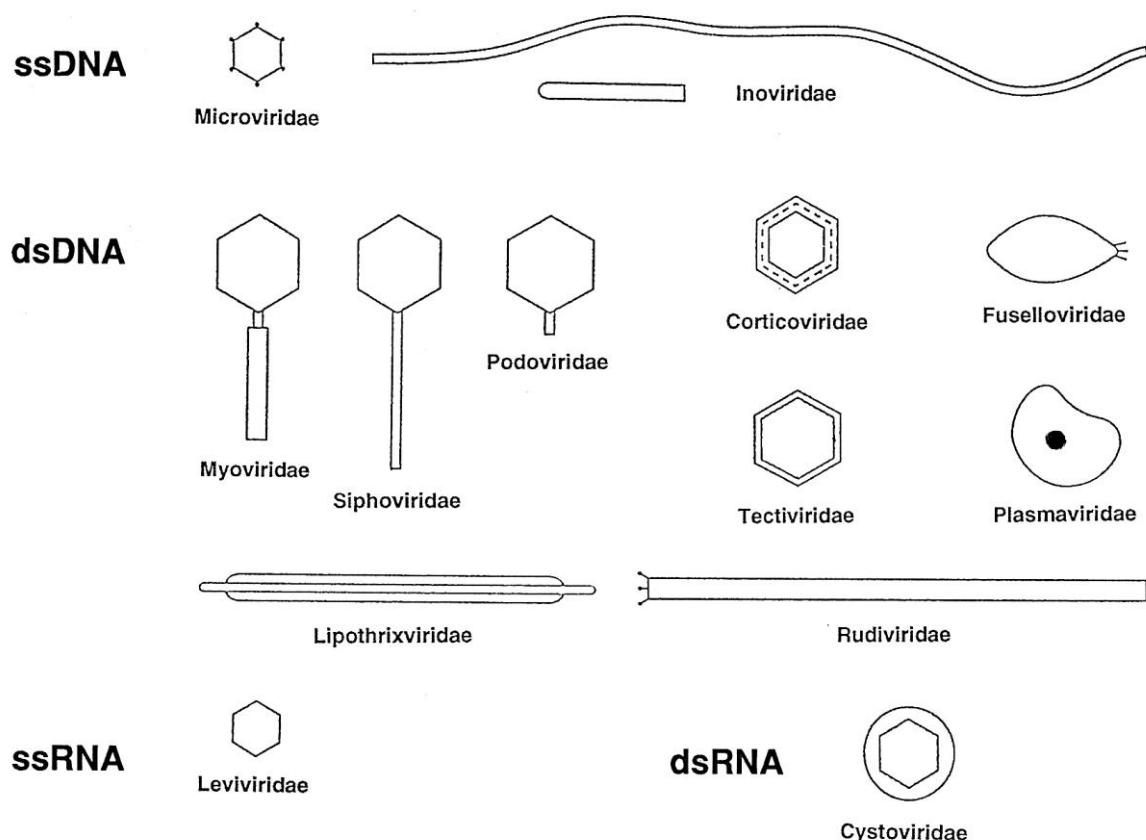


Slika 1: Zgradba arhetipskega bakteriofaga – T4 (Bacteriophage, 2008)

Klasifikacija temelji na:

- fagni morfologiji
- lastnostih nukleinskih kislin

Shematski prikaz klasifikacije bakteriofagov podaja slika 2. Prikazana je delitev bakteriofagov glede na lastnosti nukleinskih kislin. Zraven je shematsko prikazan izgled plašča in družine, za katero je ta oblika značilna (Ackermann, 2006; Orlova, 2012).



Slika 2: Klasifikacija bakteriofagov (Ackermann, 2006, Orlova, 2012)

2.2 ŽIVLJENJSKI CIKEL BAKTERIOFAGOV

2.2.1 Adsorbcija na gostiteljsko celico

Adsorbcija na ustreznega gostitelja je prvi korak življenjskega cikla bakteriofaga. Za uspešno adsorbcijo se največkrat pojmuje tisto, pri kateri bakterijske celice in nanje pritrjeni bakteriofagi sedimentirajo skupaj (npr. pri centrifugiranju). Vezava na specifične receptorje, ki so najpogostejše sestavni deli celične stene, poteče preko zaključka fagnega repa, ki prepozna receptor. Hitrost adsorbcije se najpogostejše meri s spremljanjem števila bakteriofagov (z metodo tvorjenja plakov na plošči z gostiteljem) v homogeno premešani suspenziji fagov in bakterij v času. Število fagov po centrifugiranju vzorcev lahko spremljamo v sedimentni frakciji, kjer število narašča in/ali supernatantni frakciji, kjer število pada. Pomembno se je zavedati, da je stopnja adsorbcije lahko precej različna v drugačnih pogojih (vpliv snovi v mediju) – predvsem v prvi fazi, fazi reverzibilne adsorbcije (Adams, 1959; Moldovan, 2007).

Preučevali so adsorbcijo fagov na živeče in s segrevanjem ubite stafilokoke. Ugotovili so, da adsorbcija ustreza reakciji prvega reda, a le če je število bakterij v času opazovanja

konstantno in bakteriofagov znatno manj od bakterij ($\text{MOI} < 1$) ter se površina gostitelja zaradi adsorbcije bakteriofagov ne spremeni v preveliki meri. Z enačbo lahko torej zapišemo (Krueger, 1931):

$$-\frac{dP}{dt} = \delta \cdot X \cdot P \quad \dots (1)$$

X predstavlja koncentracijo bakterijskih celic, P predstavlja koncentracijo fagov na začetku, δ predstavlja adsorpcijsko konstanto, ki je najpogostejše merilo za stopnjo adsorbcije in je enaka za kakršnokoli homogeno suspenzijo fagov in bakterij (iste vrste). Lahko se jo zapiše tudi kot:

$$\delta = \frac{2,3}{X \cdot t} \cdot \log \frac{P_z}{P} \quad \dots (2)$$

P_z je koncentracija fagov na začetku, P je koncentracija in t je časovni interval. Krueger je ugotovil tudi, da je konstanta enaka za adsorbcijo faga na žive in nežive gostiteljske celice. Schlesinger je leta 1932 koagulacijsko teorijo združil z znanjem o adsorbciji bakteriofagov in izpeljal naslednjo enačbo:

$$-\frac{dP}{dt} = 4 \cdot \pi \cdot D \cdot R \cdot X \cdot P \quad \dots (3)$$

V že poznano enačbo, ki opisuje stopnjo adsorbcije je vnesel dva nova parametra: D, ki predstavlja difuzivno konstanto bakteriofaga in R, ki je polmer adsorpcijske sfere, ki jo zavzema bakterija. Iz zgornje enačbe torej sledi:

$$\delta = 4 \cdot \pi \cdot D \cdot R \quad \dots (4)$$

Enačba ima omejitve, saj predpostavlja, da se vsak trk med bakterijo in fagom konča z uspešno adsorbcijo, izključuje gibanje tekočin in na bakteriofag gleda kot na brezdimenzijski delec. Kljub temu lahko na podlagi tega modela predvidimo najvišjo možno (teoretično) konstanto. Po omenjem modelu adsorpcijske konstante naj ne bi presegle vrednosti 10^{-8} mL/min (Schlesinger, 1932).

Kasnejše raziskave adsorbcije kolifagov so ponudile še dodatne vpoglede v naravo tega procesa. Med adsorpcijskimi poskusi se je vedno vezalo neke med 90 in 99 % bakteriofagov. Od tega se jih je večina vezala ireverzibilno. Vendar so bile vedno znova prisotne tudi manjše frakcije fagov, ki se niso vezale niti po dodatku svežega gostitelja. V daljših časovnih intervalih so zaznali tudi fage, ki so se desorbirali iz gostitelja. Sklepali so, da so vedno v vzorcih prisotne tri subpopulacije bakteriofagov: tisti, ki se vežejo **ireverzibilno**, tisti, ki se vežejo **reverzibilno** in se lahko s spremembami pufru izperejo, ter majhen delež tistih, ki se **ne vežejo** niti ob dodatku svežega gostitelja (Schlesinger, 1932).

Na adsorbcijo vpliva več dejavnikov. Velik vpliv imajo npr. **ioni**, natančneje **kationi** v mediju. Zgodaj so ugotovili, da se bakteriofagi v medijih brez soli ne pomnožujejo, še več,

bakterije in bakteriofage se brez težav loči s centrifugiranjem (d'Herelle, 1926; Sertic, 1937). Kationi v mediju imajo močan vpliv na faktor EOP (*»efficiency of plating«*). Odsotnost kationov lahko povzroči padec EOP tudi za 1000-krat in več (Hershey in sod., 1944). Soli vplivajo bistveno na prvi del adsorbcije bakteriofaga, ki je posledica tvorbe elektrostatske vezi med dvema telesoma (fag in bakterija) z ustreznim nabojem, ki trčita (Puck in sod., 1951). Vpliv na adsorbcijo imajo tudi **organski kofaktorji**. Primer takšnega kofaktorja je triptofan. Triptofan ima velik vpliv na stopnjo vezave kolifagov – npr. T4 in T6 (Adams, 1959). Velik vpliv na adsorbcijo ima tudi **fiziološko stanje bakterije**. Velikost celice se spreminja skozi različne faze rasti gostitelja. Večja celica omogoča lažjo adsorbcijo od manjših. Z različnimi fazami rasti so pogojene tudi gibalne strukture (npr. bički) bakterij. Večja gibljivost bakterij tudi poveča možnost trka z bakteriofagom in posledično boljšo adsorbcijo. Poleg tega se tudi vsi bakteriofagni receptorji ne izražajo ves čas, ampak le v določeni fazi rasti (Delbrück, 1940).

2.2.2 Pomnoževanje bakteriofagov znotraj gostitelja

Ko bakteriofag naleti na ustreznega gostitelja in se uspešno adsorbira nanj, so možne 3 nadaljnje strategije pomnoževanja: **litični cikel**, **lizogeni cikel** ali **psevdogenija**. Pri litičnem ciklu se pričnejo bakteriofagi graditi takoj po vstopu genoma v gostiteljsko celico in nato sledi liza celice, po kateri se novi bakteriofagi sprostijo v okolje. Drugače je pri lizogenem ciklu in psevdogeniji, kjer lahko genom bakteriofaga nekaj časa miruje, dokler ne dobi ustreznega signala za pomnoževanje. Pri lizogeniji se fagni genom vgradi v gostiteljevega in se nahaja v obliki t.i. profaga, pri psevdogeniji pa se nahaja prosto v citoplazmi. Po ustreznem signalu oba omenjena cikla preideta v litični cikel, ki je edini način nastanka novih bakteriofagov (Sauvageau, 2010).

Shematski prikaz litičnega in lizogenega cikla je prikazan na sliki 3. Slika prikazuje potek litičnega in lizogenega cikla po posameznih korakih in prehod lizogenega cikla v litičnega, ki je pogoj za nastanek novih bakteriofagov. V nadaljevanju bo podrobneje predstavljen le litični cikel, saj sta bila v raziskavah te magistrske naloge uporabljena bakteriofaga T4 in PC5, ki sta litična bakteriofaga.



Slika 3: Shematska ponazoritev litičnega in lizogenega cikla (Examples of Viral Replication Pathways, 2009)

2.2.2.1 Pomnoževanje bakteriofaga v litičnem ciklu (zgled: T4)

Uspešna adsorbcija bakteriofaga na receptor gostitelja preide v **penetracijo**, ki je prvi korak pomnoževanja bakteriofaga. Pri tem pride do spremembe površine gostitelja in bakteriofaga. Genom bakteriofaga zapusti kapsido, ki ostane na površini gostitelja in pride v citoplazmo gostitelja. Dednina DNA virusov se lahko prične prepisovati takoj, v primeru RNA virusov je potreben transport dodatnih proteinov v gostitelja. Transport DNA je pri bakteriofagih z repom posebno kompleksen proces. Konice nitk bakteriofaga T4 specifično

reagirajo s polisaharidi LPS na površini *E.coli*. Nitke se nato skrčijo in omogočijo stik bazalne plošče s celično steno gostitelja. V celični steni nastane manjša pora, ki je posledica delovanja lizocima. Skozi to poro s krčenjem kanala v vratu bakteriofag vbrizga svojo dednino. Ta proces traja nekaj minut zaradi ozmotskega tlaka v bakterijski celici (Madigan in sod., 2015).

Kmalu po vstopu DNA v citoplazmo gostitelja se prične **prepisovanje genov** in **prevajanje mRNA** bakteriofagnih genov. Že minuto po vstopu bakteriofagne DNA se preneha podvajanje gostiteljske DNA in tvorba RNA. Po približno 4 minutah se že prične genom bakteriofaga podvajati. Genom bakteriofaga ima zapise za **zgodnje, srednje** in **pozne proteine**, ki so poimenovani glede na čas, ko se pojavijo v celici gostitelja. Zgodnji proteini so encimi, ki modificirajo bakteriofagno DNA, da je restrikcijski encimi gostitelja ne prepoznajo (glej naslednji odstavek), encimi, ki sodelujejo pri podvajanju genoma bakteriofaga in regulatorji, ki usmerjajo RNA polimeraze gostitelja. Srednji in pozni proteini so vključeni v zgradbo bakteriofaga in sodelujejo pri sproščanju novih bakteriofagov po lizi celice. Bakteriofag T4 nima zapisa za lastno RNA polimerazo, ampak za **anti-sigma dejavnike**, ki onemogočijo prepisovanje gostiteljevih genov in preusmerjajo gostiteljevo RNA polimerazo na promotorje bakteriofagnih genov (Madigan in sod., 2015).

Pomemben korak je torej tudi **podvajanje genoma bakteriofaga**. Genom preprostih DNA virusov lahko podvoji DNA polimeraza gostitelja, kompleksnejši DNA virusi, kot je tudi T4, imajo zapis za lastno DNA polimerazo in druge proteine (helikaze in primaze). Osebk i iste vrste običajno vsebujejo na kromosomih iste gene na istih položajih, kar pa ne velja za nekatere bakteriofage. Drugačen vrstni red istih genov potomcev je pri bakteriofagu T4 posledica **krožne permutacije**. Genom bakteriofaga se na začetku podvaja kot samostojna enota, nato pa se iz večih genomskih enot s pomočjo rekombinacije tvorijo dolge molekule DNA, ki jim rečemo **konkatemeri**. Konkatemere se pred pakiranjem nespecifično razreže na ravno dovolj velike odseke, da gredo v kapsido. Čeprav bakterije ne poznajo imunskega sistema, kot ga premoremo sesalci, se branijo pred virusnimi okužbami s prepoznavanjem tujih dvoverižnih DNA zaporedij. Tuje zaporedja so cepljena z restrikcijskimi encimi. Primer takšnega protivirusnega sistema je CRISPR. Zato mora biti dvoverižna DNA bakteriofagov zaščitena. RNA in enoverižni DNA virusi niso prizadeti, ker restrikcijski encimi prepoznajo le dvojno verigo. To dosežejo bakteriofagi z modifikacijo nukleotidov na prepoznavnem mestu restrikcijskega encima. Primer je nastanek 5-hidroksimetil citozina pri T4, ki prepreči prepoznavanje s strani restrikcijskih encimov (Madigan in sod., 2015).

Ko so zgrajeni sestavni deli bakteriofaga, se ta lahko prične **sestavljati** in **pakirati DNA** v kapsido. DNA se prečrpa v kapsido s pomočjo od ATP odvisnega motorja, ki je zapisan v genih bakteriofaga. Vir energije so ATP molekule gostitelja. Proces se začne tako, da se oblikuje prokapsida, ki je sestavljena iz ogrodnih in strukturnih proteinov. Nanjo se pripne

omenjeni motor, ki s pomočjo ATP prečrpa DNA v kapsido. Kapsida se zaradi DNA bistveno razširi in odstranijo se ogrodni proteini ter motor. Kapsida se nato zapečati in nanjo se pripnejo tudi ostale komponente – rep, nožice, bazalna plošča... (Madigan in sod., 2015)

Predno se lahko novonastali virusi sprostijo v okolje, mora priti do **lize** bakterijske celice. Encimsko se mora razgraditi membrana in celična stena gostitelja. Zaradi por, ki jih naredijo encimi, vdre voda v celico in se razpoči zaradi osmoze (Madigan in sod., 2015).

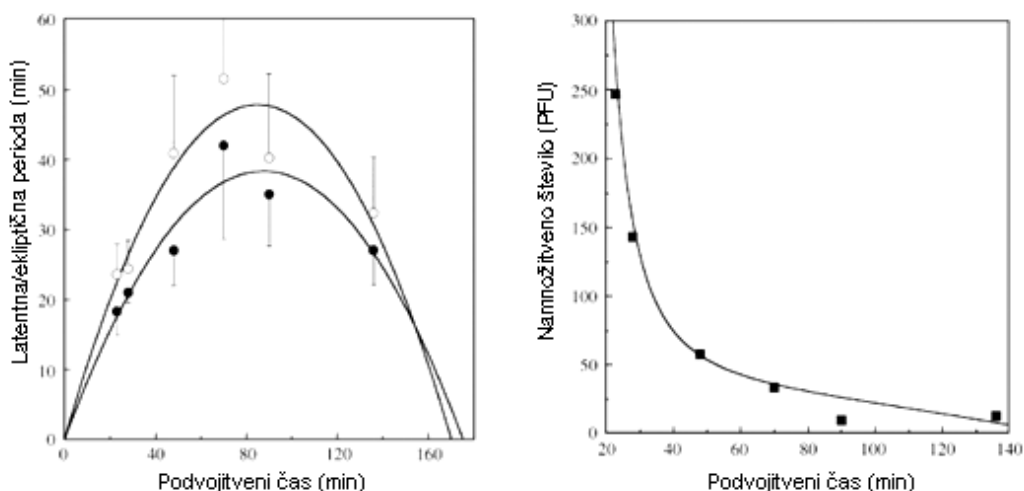
Čas, ki je potreben od adsorbcije bakteriofaga do pojava novih bakteriofagov (liza celice), se imenuje **latentna perioda**. Prvi del latentne periode, od adsorbcije do pojava popolnoma sestavljenih in infektivnih bakteriofagov znotraj celice, se imenuje ekliptična perioda. Traja od polovice do treh četrtin minimalne latentne periode. Povprečne latentne periode bakteriofagov so dolge med 10 in 70 minut (Shao in sod., 2008; Abedon in sod., 2001; Wang, 2006; Heineman in sod., 2007). Število novonastalih bakteriofagov na posamezno celico gostitelja imenujemo **namnožitveno število**. Namnožitvena števila bakteriofagov so med 10 in 1000 novih bakteriofagov na gostitelja (Delbrück, 1945; Reader in sod., 1971; Abedon in sod., 2001; Wang, 2006).

2.2.3 Povezave med ravnimi parametri bakteriofagov

Rastni parametri bakteriofagov (npr. adsorpcijska konstanta, latentna perioda in namnožitveno št.) so med seboj povezani in vplivajo eden na drugega. V naslednjem sklopu bomo predstavili nekaj modelov, ki povezujejo osnovne rastne parametre bakteriofaga. Bakteriofagi nastajajo z določeno **hitrostjo** (α), ki je konstantna med **ekliptično** (E) in **latentno periodo** (L). Hitrost zorenja faga λ npr. znaša približno 7,7 PFU/min (Wang, 2006). Od omenjenih parametrov posledično zavisi **namnožitveno število** (b), ki ga lahko torej izrazimo kot (Rabinovitch in sod., 1999):

$$b = \alpha(L - E) \quad \dots (5)$$

Vsi trije zgoraj omenjeni parametri, iz katerih izpeljemo namnožitveno št. pri bakteriofagu T4, zavisijo od **podvojitvenega časa bakterijske kulture** (μ) oz. od bakterijske stopnje rasti ($1/\mu$). Graf odvisnosti ekliptične/latentne periode od podvojitvenega časa je konkavno-parabolične oblike (slika 4, levo). To pomeni, da latentna/ekliptična perioda nekaj časa narašča s podvojitvenim časom in nato upade s podaljševanjem (Rabinovitch in sod., 2002).



Slika 4: Odvisnost latentne periode (levo) in namnožitvenega števila (desno) od časa podvajanja gostitelja (Rabinovitch in sod., 2002)

Hitrost sestavljanja/zorenja linearno narašča s stopnjo rasti bakterije. Tako so končno izpeljali povezavo med namnožitvenim številom in časom podvajanja, ki logaritmsko upada z daljšim časom podvajanja (slika 4, desno). Namnožitvena števila so lahko zelo visoka tudi pri kratkih podvojitvenih časih bakterij, kar gre pripisati visokim stopnjam zorenja (α) fagov pri kratkih podvojitvenih časih bakterij (Rabinovitch in sod., 2002).

Ko je v okolici prisotno mnogo več gostiteljskih celic kot fagov, lahko slednji rastejo **eksponentno**. Njihovo rast lahko opišemo z naslednjo funkcijo (Abedon in sod., 2001):

$$Pt = Po \cdot b^{t/tg} \quad \dots (6)$$

Pt predstavlja fage v času t, Po fage na začetku, tg je generacijski čas. Generacijski čas bakteriofaga je sestavljen iz dveh faz – časa adsorbcije/iskanja (t_a) in latentne periode (L):

$$tg = L + t_a = L + \frac{1}{\delta \cdot X} \quad \dots (7)$$

Čas adsorbcije lahko nadalje ocenimo z recipročno vrednostjo produkta adsorpcijske konstante in koncentracije bakterij. Zveza deluje zelo dobro pri visokih koncentracijah bakterij ($>10^6$ CFU/mL), pri majhnih pa nekoliko zataji, saj daje lažno dolge čase adsorbcije. Natančneje je možno izpeljati čas adsorbcije iz enačbe 1 (Abedon in sod., 2001).

Fitnes bakteriofaga je količina, ki poveže vse bistvene rastne parametre bakteriofaga. Bakteriofagi so razmeroma preprosti parazitski organizmi, zato je njihov fitnes mogoče enačiti s **stopnjo/hitrostjo rasti**. Rast bakteriofagov v času lahko opišemo na podoben način kot rast mikrobov s spodnjo enačbo (Bull in sod., 2010):

$$P_t = P_0 \cdot e^{r \cdot t} \quad \dots (8)$$

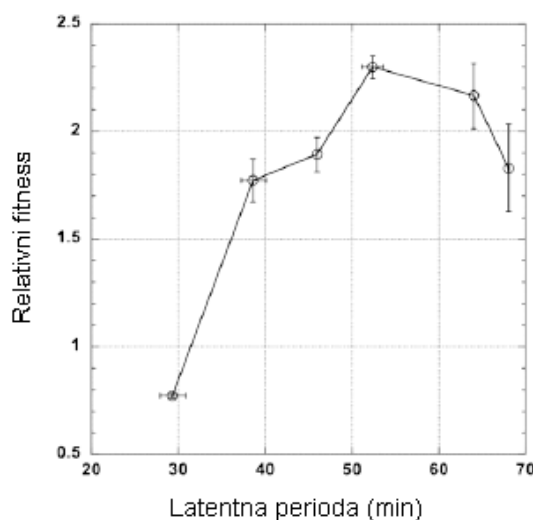
V zgornji enačbi se pojavi tudi hitrost rasti (r), ki jo lahko torej enačimo s fitnessom bakteriofaga in jo je mogoče zapisati v nekoliko drugačni obliki, ki povezuje vse bistvene parametre bakteriofaga (adsorpcijsko konstanto (δ), latentno periodo (L) in namnožitveno število (b)) in koncentracijo gostitelja (X) (Bull in sod., 2010):

$$r = \delta \cdot X \cdot (b \cdot e^{L \cdot r} - 1) \quad \dots (9)$$

V splošnem velja, da se namnožitveno število linearno povečuje z daljšanjem latentne periode (oz. natančneje časa po koncu ekliptične periode, ki običajno zavzema od polovice do treh četrtin latentne periode). Pojavi se torej problem, kako dolga naj bo latentna perioda. Vsak bakteriofag torej na nek način tehta med kratkim časom podvojevanja, ki daje manjše število potomcev in večjim številom potomcev, ki pa za nastanek potrebujejo dalj časa. Latentna perioda, ki daje največje število novih fagov v neki časovni enoti in posledično maksimira fitness bakteriofaga, se imenuje **optimalna latentna perioda** in se jo da oceniti s pomočjo ekliptične periode in fitnessa po naslednji zvezi – količine s piko predstavljajo optimalne količine (Bull, 2006):

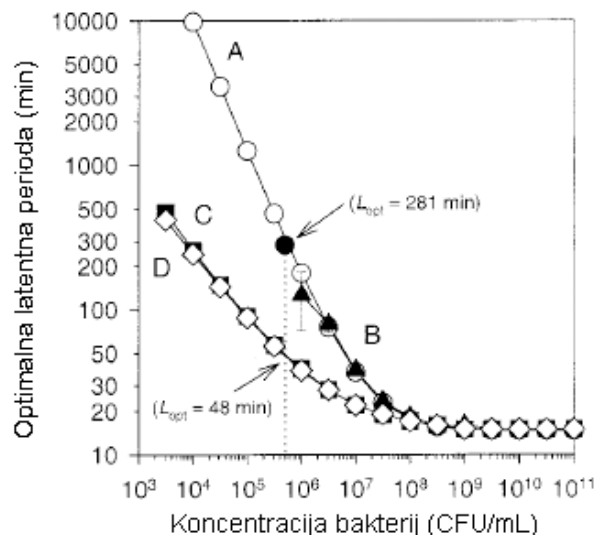
$$L = E + \frac{1}{r} \quad \dots (10)$$

Graf (relativnega) fitness-a poljubnega bakteriofaga ima torej pričakovano obliko parabole (slika 5). Kratke latentne periode imajo za posledico manjše število potomcev v enem ciklu, ogromno število potomcev pa po drugi strani terja predolge generacijske čase. Optimalno je torej nekje na sredini (Shao in sod., 2008)



Slika 5: Relativni fitness bakteriofaga v odvisnosti od latentne periode (Shao in sod. 2008)

Zanimivo je, da je optimalna latentna perioda odvisna tudi od gostote gostiteljskih celic (slika 6). Z višanjem koncentracije gostitelja se namreč dolžina latentne periode znižuje. Po dosegu minimalne latentne periode se ta več ne skrajšuje, saj ima vsak bakteriofag določeno **minimalno latentno periodo**, ki je potrebna, da se uspešno pomnoži (Abedon in sod., 2001).



Slika 6: Odvisnost optimalne latentne periode od gostote gostiteljskih celic (Abedon in sod., 2001)

2.3 *Escherichia coli* IN NJEN BAKTERIOFAG T4

Escherichia coli je široko uporabljen modelni organizem, ki se ga je oprijel naziv najbolj preučenega živečega organizma (Jay, 2000). *E. coli* je Gram-negativna, fakultativno anaerobna, paličasta bakterija iz rodu *Escherichia*, ki se zelo pogosto nahaja v debelem črevesu toplokrvnih organizmov (Singleton, 1999). Večino sevov *E. coli* je nenevarnih oz. celo koristnih, saj svojemu gostitelju koristijo s produkcijo vitamina K₂ (Bentley in sod., 1982) in zaščito pred boleznimi z zasedanjem okolja patogenim bakterijam, ki se zaradi tega težko kolonizirajo črevo (Hudault in sod., 2001). Optimalna rastna temperatura bakterije je 37 °C. Preferenčno raste v aerobnih pogojih, kot fakultativni anaerob pa ima tudi sposobnost rasti v odsotnosti kisika (anaerobno dihanje). Mnogi sevi *E. coli* so zaradi bičkov gibljivi. Določeni sevi *E. coli* so lahko tudi nevarni za zdravje ljudi. Zoper takšne seve bi se bilo možno preventivno in kurativno boriti z litičnimi bakteriofagi (npr. T4). Dobro poznan nevaren sev je npr. *E. coli* O157:H7, ki je posledica prenosa »shiga« toksina iz *Shigella* s pomočjo faga (Brüssow in sod., 2004). Sev so odkrili leta 1982, ko so mnogi zboleli zaradi uživanja hamburgerjev v verigah s hitro prehrano (Riley in sod., 1983). Podatki iz ZDA poročajo, da so bakterijski sevi, ki poizvajajo omenjeni toksin odgovorni za približno 100.000 bolezni, 3000 hospitalizacij in 90 smrti letno (CDC, 2009). V večini primerov gre prav za okužbo z *E. coli* O157:H7. Ocenjujejo, da povzroči omenjeni sev za 405 milijonov \$ škode – od tega 370 milijonov zaradi prezgodnjih smrti, 30 milijonov zaradi zdravstvene oskrbe in 5 milijonov zaradi izgube proizvodnje (Frenzen in sod.,

2005). Bakterija pri ljudeh povzroča bolezensko stanje, ki se kaže kot driska in liza eritrocitov (iz črevesja prehaja v druga tkiva). Za razvoj te trdovratne bolezni zadošča že prilično 20 organizmov (Griffin in sod., 1994). Pogosteje kot odrasle prizadene otroke. Prenaša se s hrano, predvsem govejim mesom in tudi zelenjavo in mlečnimi izdelki. Zato ni težko verjeti, da povzroča ogromne izgube predvsem živilski industriji. Kot primer, 19. maja 2014 so bili v podjetju »*Wolverine Packing Company*« prisiljeni odpoklicati skoraj 817 ton govejih izdelkov zaradi suma kontaminacije izdelkov z *E. coli* O157:H7 (CDC, 2014).

Bakteriofag T4, ki okužuje bakterijo *E. coli*, sodi v družino *Myoviridae* in je z dolžino 200 nm ter širino 100 nm eden največjih poznanih bakteriofagov. Preprost shematski prikaz bakteriofaga T4 je prikazan na sliki 1 (str. 3). Kapsida ima obliko podaljšane ikozaedra in je sestavljena iz 3 esencialnih proteinov (gp20, gp23 in gp24) in 2 neesencialnih (Hoc in Soc). Motor za pakiranje DNA v kapsido je pri bakteriofagu T4 z 2000 bp/s najhitrejši izmed vseh dosedaj poznanih (Fuller in sod, 2007). Rep je od kapside ločen s kratkim vratom in je sestavljen iz dveh plasti: notranja plast je ovita s krčljivo nožnico, ki se med procesom infekcije krči. Notranja cev je sestavljena iz zaporednih kopij proteina gp19, medtem ko je nožnica sestavljena iz zaporednih ponovitev proteina gp18. Zaključni del bakteriofaga tvori bazalna plošča, ki je kompleksna proteinska struktura in služi za pritrditev bakteriofaga na površino gostitelja ter vstop DNA v celico. Ta zaključna struktura meri približno 27 nm v višino in ima premer 56 nm. Bazalna plošča je pritrjena na zgoraj omenjeno nožnico. Na pripenjalno strukturo so vezane tudi posebne fibrilarne strukture – nožice, ki sodelujejo pri prepoznavi vezavnega receptorja (Orlova, 2012).

2.4 ZNAČILNOSTI IN PROBLEMATIKA *Campylobacter jejuni*

Okužba s *Campylobacter jejuni* predstavlja najpogostejši bakterijski razlog za razvoj **akutnega gastroenteritisa** (t.j. bolezensko stanje vnetja sluznice želodca in črevesja). Različne vrste *Campylobacter* so tudi eden glavnih krivcev za nastanek driske v razvitem in nerazvitem svetu in predstavljajo poglobljen razlog črevesnih težav popotnikov v nerazviti svet. Zgovorne so tudi raziskave iz industrijskega sveta, ki nakazujejo da so kampilobakterioze celo do 7-krat pogostejše od okužb z vrstami *Salmonella*, *Shigella* in *E. coli* O157:H7. Kljub temu, da obstaja vsaj 17 vrst *Campylobacter*, je več kot 99% bolezni povezanih prav s *C. jejuni* (Slutsker in sod., 1997; Blaser in sod., 1983; Friedman in sod., 2000; Zhou in sod., 2013).

Kljub veliki razširjenosti kampilobakterioz vse do leta 1957 bakterij iz rodu *Campylobacter* niso povezovali s pojavom driske pri človeku (King, 1957). Prve okužbe s predstavniki rodu *Campylobacter* so zabeležili v zgodnjem delu 20. stoletja. To so bile okužbe z *Vibrio fetus* (danes *Campylobacter fetus*), ki so jih opazili veterinarji kot razlog septičnih splavov pri govedu in ovcah. Leta 1947 so odkrili, da se iz istega razloga

dogajajo **septični splavi** pri ženskah. Še naslednja tri desetletja je prevladovalo mnenje, da gre za bolj redek, oportunističen, invaziven patogen, ki napada povečini imunsko oslabljene. Leta 1973 so vpeljali rod *Campylobacter*, ki ga uporabljamo tudi danes (Vernon in sod., 1973). Od takrat naprej so potekale obsežne študije izolatov iz iztrebkov in spoznanje, da gre za enega najbolj razširjenih patogenov prebavil (Allos, 2001).

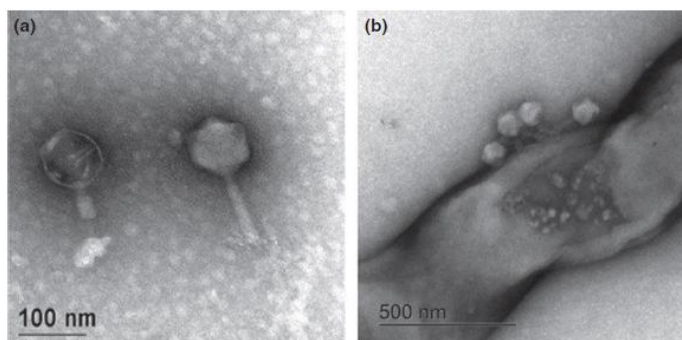
Vrste *Campylobacter* so Gram-negativni bacili, značilno krive oz. spiralne oblike. Iz tega je tudi izhajala njihova prvotna klasifikacija med vibrije. Genom *C. jejuni* je že bil sekvenciran in okarakteriziran in odkrili so posebno hipervariabilno regijo, ki je morda pomembna za preživetje organizma (Parkhill in sod., 2000). Bakterije rodu *Campylobacter* so gibljive zaradi uni- ali bipolarnega bička. Rastejo razmeroma počasi. Potrebni je prilično 72-96 ur inkubacije za primarno izolacijo iz človeška blata, iz krvi še dlje. Za *Campylobacter* je značilna odpornost na cefalotin, ki olajša izolacijo, saj je za večino črevesnih bakterij usoden (Allos, 2001). Najbolje rastejo na 42 °C in mikroaerobno (tipično 5-10 % kisik ter 5-10 % CO₂, kar pomeni manj kisika in več CO₂ kot v atmosferi). Za dobro rast so potrebni kompleksni mediji z različnimi dodatki. Za šaržne kulture je značilna sprememba morfologije iz spirilne v kokoidno obliko in nato izguba kultivabilnosti, čeprav nekateri menijo, da so celice še vedno viabilne. Zaradi omejenih kapacitet biosinteze ima *C. jejuni* izredno dobro razvite mehanizme prevzema snovi iz okolja, kar je razvidno tudi iz genoma. Slabo katabolizira zunanje sladkorje, saj nima ključnega glikolitičnega encima fosfofruktokinaza, zato gre pot v glavnem v smeri glukoneogeneze. Kljub temu, da ima *C. jejuni* mnogo poznanih mehanizmov za nadzor oksidacijskega stresa (npr. encima superoksid dismutaza in katalaza), je nadpovprečno podvržen poškodbam oksidacijskega stresa, zato raste le v mikroaerobnem okolju (Kelly, 2001).

Ugotavljanje točne prevalence kampilobakterioz je v resnici nemogoče, zato so na voljo le bolj ali manj točne ocene. Kot podlaga oceni služijo različne populacijske študije blata pacientov, npr. »*Infectious Intestinal Disease*« iz Velike Britanije (Wheeler in sod., 1999; Tam in sod., 2012) in »*Sensor*« in Nizozemske (De Wit in sod. 2001). Prevalenco kampilobakterioz se tako ocenjuje na 9,3 obolelih oseb na 1000 prebivalcev na leto v Veliki Britaniji in 5,8 obolelih oseb na 1000 prebivalcev na leto na Nizozemskem. Zanimivo je tudi, da se v povprečju le za eno od teh 9,3 oseb poroča odgovornim organom, kar posledično seveda onemogoča višje točnosti podatkov. Podobna pojavnost velja tudi za ZDA, kjer ocenjujejo približno 4,4 obolele na 1000 prebivalcev na leto (Scallan in sod., 2011). Prevalenca je vseeno manjša od virusnih črevesnih okužb. Da gre za dokaj resno bolezen, zgovorno priča podatek, da zdravniško pomoč poišče en bolnik na 3-4 obolele (Allos, 2001). V Sloveniji je bil bakterijski rod *Campylobacter* leta 2013, podobno kot v ostalih članicah EU, najpogostejši bakterijski razlog enteritisov. V tem letu so zabeležili 996 prijav, kar je za 6 % višje kot leto prej. Pri ljudeh je bila najpogostejša okužba s *C. jejuni* (87 % prijav), sledijo okužbe s *C. coli* (6 %) in s *C. consisus* (3 %), nato so sledile

še okužbe z drugimi. Najpogostejši vzrok okužbe je perutnina. Letna incidenčna stopnja kampilobakterioz je znašala 48,4 na 100.000 prebivalcev. Najvišja incidenčna stopnja je bila tega leta v novogoriški regiji (83/100.000), sledili pa sta ji mariborska (52/100.000) in celjska (61/100.000). Smrtnih primerov ni bilo. V okviru izvajanja javnega nadzora živil so odkrili prisotnost *Campylobacter* spp. v 52 % analiziranih vzorcev živil živalskega izvora, v vzorcih zelenjave ga niso zaznali. Incidenca je običajno najnižja v začetku leta v prvih mesecih, nato znatno naraste v poletnih mesecih in nato zopet upade (NIJZ, 2014).

2.5 ZNAČILNOSTI BAKTERIOFAGA PC5

PC5 je bil izoliran skupaj s skupino drugih *Campylobacter*-specifičnih fagov iz slovenskih vzorcev iztrebkov piščancev, prašičev in mesa. *Campylobacter*-specifični fagi so v splošnem predstavniki *Myoviridae* ali *Siphoviridae* in stopijo v interakcijo z gostiteljem preko kapsule ali bička. Delimo jih v tri skupine (I, II, III) glede na morfologijo in velikost genoma. PC5 in ostali izolirani bakteriofagi sodijo v skupino III. Vsi izolirani fagi (tudi PC5) imajo podobno morfologijo, sodijo v družino *Myoviridae* in imajo kapsido veliko približno 100 nm ter rep, dolg približno 90 nm. Izgled bakteriofaga PC5 pod elektronskim mikroskopom prikazuje slika 7. Velikost genoma znaša približno 150 kb (Janež in sod., 2014).



Slika 7: Morfologija faga PC5 (a) in adsorbcija na *C. jejuni* (b) (Janež in sod., 2014)

Poskusi z mutanti *C. jejuni*, ki ne tvorijo kapsule (gen *kpsM*), so pokazali, da je kapsula nujno potrebna za okužbo in namnoževanje PC5. Nekoliko drugače je bilo z mutanti, ki niso tvorili bičkov (gen *flhA*). Tu so bile opazne spremembe glede na kontrolo le pri detekciji bakteriofagov na ploščah, kjer se je število plakov zmanjšalo za eno $\log_{10}$ enoto, v tekoči kulturi razlik ni bilo mogoče zaznati. Iz tega je razvidno, da poteče interakcija preko bakterijske kapsule in ne preko bička, čeprav ima mobilnost vpliv na tvorjenje plakov (Janež in sod., 2014).

2.6 MOŽNE APLIKACIJE BAKTERIOFAGOV ZOPER *C. jejuni*

V poglavju 2.4 je bilo veliko napisanega o problematiki *C. jejuni*. Glede na visoko prevalenco kampilobakterioz, bi bilo smiselno razmisliti o različnih možnostih uporabe

bakteriofagov za zatiranje tega patogena. Zoper *C. jejuni* bi lahko delovali tako preventivno kot kurativno. Preventivna uporaba bi bila mogoča v smislu razpršilcev z bakteriofagi, s katerimi bi obdelali živila v fazi predelave. Preventivni ukrepi bi lahko bili tudi v smislu tretiranja živali z bakteriofagi v času reje. Kurativna uporaba bi lahko bilo terapevtsko zdravljenje z bakteriofagi, ki bi služili kot nadomestek konvencionalnih antibiotikov. Ker je *C. jejuni* zelo tipičen predstavnik piščančje črevesne mikrobiote, je možnost kontaminacije mesa med predelavo izredno velika. Začetne raziskave so obetavne, saj je bilo mogoče opaziti v povprečju zmanjšanje prisotnih bakterij za 2 log (Loc Carillo in sod., 2005; Wagenaar in sod., 2005; Carvalho in sod., 2010; Janež in Loc Carillo, 2013).

2.6.1 Bakteriofagna terapija

WHO svari pred porastom sevov bakterij, ki so odporni na večino poznanih antibiotikov. Multirezistentne bakterije bi nas utegnile celo ponesti nazaj v predantibiotično ero. Skrb zbujajoče dejstvo je sprožilo globalni val iskanja alternativnih rešitev. Bakteriofagi nudijo dve alternativni antibiotikom: terapijo s **celotnimi bakteriofagi**, ki morajo biti obvezno litični, saj lizogenija odpira kup vprašanj glede varnosti in uporabo fagnih litičnih encimov, ki jim pravimo tudi **virolizini** (Parisien in sod., 2008). Veliko raziskav je potekalo pred odkritjem antibiotikov, ki so zaradi svoje učinkovitosti precej zavrli razvoj bakteriofagne terapije. Čeprav je veliko raziskav potekalo na vzhodu, v nekdanji Sovjetski zvezi, je bilo na tem področju dejavnih tudi veliko zahodnih podjetij, ki so uspešno proizvajali in prodajali preparate za zdravljenje raznih ognojkov, zagnojenih ran, vaginitisa in okužb zgornjega dihalnega trakta (Kutateladze in sod., 2008). Na tem področju so delovali: francoski podjetji *Le Laboratoire du Bactériophage* in *L'Oréal*, nemški podjetji *Antipiol* in *German Bacteriophage Society* in ameriška podjetja *Eli-Lilly*, *Swan-Myers of Abbot Laboratories* ter drugi. Uspešnost zdravljenja z relativno malo zapleti, ki so jo dosegali na vzhodu in zahodu je tudi poglobitni razlog, da se v zadnjih desetletjih zopet obuja tovrstno terapijo tudi v zahodnem svetu (Sulakvelidze in sod., 2001; Courchesne, 2009). Vendar razvoj trenutno ni tako hiter, kot bi lahko bil, saj imajo večja farmacevtska podjetja še vedno odklonilen odnos, predvsem zaradi neprilagojene regulative na tem področju in zapletenega pridobivanja intelektualnih pravic (Reardon, 2014).

O ponovnem razvoju področja zgovorno priča večje število vloženih patentov – po večini na račun večje učinkovitosti in večje varnosti bakteriofagne terapije (Fischetti in sod., 2004; Rapson in sod., 2005; Jayasheela in sod., 2005; Piddock in sod., 2006; Holland in sod., 2006; Pasternack in sod., 2006; Walter, 2008; West in sod., 2007). Primer uporabe fagne terapije je uporaba litičnega faga za zdravljenje aken, ki nastanejo zaradi močne kolonizacije kože s strani *Propionibacterium acnes* (West in sod., 2007). Razvili so tudi tretma, ki cilja na rod *Bacillus*, torej tudi antraks, ki ga ameriški »Centers for Disease Control and Prevention (CDC)« uvršča med najhujše patogene (Walter, 2008). Zaradi

strahu pred prehitrim sproščanjem endotoksinov po lizi in posledičnem imunskem šoku, so izdelali tudi bakteriofage, ki niso sposobni tvoriti lizinov. Takšni bakteriofagi celico ubijejo, a je ne razgradijo. Slabost tovrstne terapije je bistveno večja doza bakteriofagov, saj se niso sposobni podvajati (Ramachandran, 2003).

Preglednica 1: Prednosti in pomisleki uporabe bakteriofagne terapije (Courchesne, 2009)

Prednosti:	Pomisleki:
• učinkuje na multi-rezistentne bakterije, saj deluje drugače kot antibiotiki, • bakteriofagi delujejo specifično, zato ne bi škodovali črevesni mikroflori kot antibiotiki, • virusi imajo dosti višjo stopnjo mutacij od bakterij, zato bi lahko na pojav rezistence hitreje odgovarjali, • razvoj terapije je občutno cenejši od razvoja novih antibiotikov, • stranski učinki so redki.	• terapija bi bila lahko neuspešna zaradi nevtralizacije fagov s strani našega imunskega sistema, • fagi lahko proizvajajo ljudem nevarne toksine, • lizogena konverzija – lizogeni bakteriofagi lahko z vgrajevanjem v genom bakterij spreminjajo virulentnost bakterij (posledice), • možnost burnega imunskega odziva, saj se z lizo bakterij sprosti velika količina endotoksinov naenkrat.

2.6.2 Dekontaminacija hrane z bakteriofagi

Uporaba bakteriofagov za bionadzor bakterij (kvarljivcev) med proizvodnjo živil bi bila zaradi specifične okužbe bakterij zelo smiselna. Zaradi specifičnega okuževanja in liziranja neželenih bakterij v proizvodnji bi tako dosegli bistveno višjo varnost živil brez strahu, da bi uničili delovno kulturo ali vplivali na črevesno mikrofloro ljudi, ki bi izdelke uživali. V prid uporabi bakteriofagnih mešanic namesto kemijskih agensov govori tudi to, da niso toksične in ne spremenijo barve, teksture ali okusa izdelka (Hagens, 2007; Greer, 2005). Slabosti uporabe bakteriofagov v živilstvu pa so: lizogena konverzija bakterij, razvoj odpornosti na bakteriofage in močna pogojenost učinkovitosti z zunanjimi pogoji, ki so posledica proizvodnje, npr. temperatura in pH (Garcia in sod., 2008). Trženje tovrstnih izdelkov bi bilo občutno lažje od izdelkov, ki so namenjeni za zdravljenje, saj npr. ameriška »Food and Drug Administration (FDA)« na področju živil nima tako stroge zakonodaje. FDA je pravzaprav celo spodbudila uporabo **mešanice bakteriofagov v obliki razpršilca** za zatiranje večih sevov *L. monocytogenes* (Macgregor, 2006). *Escherichia coli* 0157:H7 predstavlja velik zdravstveni problem. Za razvoj bolezni zadostuje že zelo majhna doza bakterij. Zoper omenjeno bakterijo so razvili in patentirali tretma v obliki mešanice kolifagov B1, B3, 146A in 119U, ki so jih izolirali iz odpadnih vod in okuženega sečevoda (Averback in Gemmell, 2008). Na primeru bakterij iz rodu *Salmonella* so dokazali, da je učinkovitost odstranjevanja patogenih bakterij s fagi lahko povsem primerljiva s širše uporabljenimi kemijskimi agensi in drugimi dezinfekcijskimi metodami in omogoča odstranitev približno 1 log CFU/cm² (Hungaro in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Za izvedbo eksperimentalnega dela določanja rastnih parametrov bakteriofagov PC5 (*Campylobacter jejuni*) in T4 (*Escherichia coli*) smo uporabili spodaj navedeni material.

3.1.1 Bakterijski sevi

Pri poskusih smo uporabili bakterijski sev *Campylobacter jejuni* LBA65 in sev *Escherichia coli* DSM613 iz zbirke mikroorganizmov Laboratorija za bioanalitiko (COBIK; Tovarniška 26, 5270 Ajdovščina).

3.1.2 Bakteriofagi

Pri poskusih smo uporabili litične fage PC5 in T4 iz zbirke mikroorganizmov Laboratorija za bioanalitiko (COBIK; Tovarniška 26, 5270 Ajdovščina).

3.1.3 Rastna gojišča za *C. jejuni*

Za revitalizacijo, kvantifikacijo in spremljanje rasti bakterij rodu *Campylobacter* smo uporabili naslednja gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca.

3.1.3.1 Columbia krvni agar

Columbia krvni agar (Ellner in sod., 1966), ki se uporablja za revitalizacijo globoko zamrznjene bakterijske kulture, smo pripravili tako, da smo zatehtali 19,5 g predpripravljenega gojišča Columbia (Oxoid: CM271), 6 g agarja, vse skupaj raztopili v 500 mL deionizirane vode in nato sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C ter tlaku 1,2 bara. Gojišče smo v vodni kopeli ohladili na 55 °C in dodali 25 mL sterilne defibrilirane konjske krvi, dodatek za rast (*Campylobacter* growth supplement, Oxoid: SR23E) in selektivnost (*Campylobacter* selective supplement, Oxoid: SR069). Gojišče smo razlili na velike petrijeve plošče (90 mm) in shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

3.1.3.2 Abeyta-Hunt-Bark (AHB) agar

Abeyta-Hunt-Bark agar (Hunt in sod., 2001) smo pripravili tako, da smo zatehtali 18,5 g možgansko-srčnega bujona (Oxoid: CM1135), 1 g kvasnega ekstrakta in 6 g agarja in vse skupaj raztopili v 500 mL deionizirane vode. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Gojišče smo v vodni kopeli ohladili na 55 °C in dodali

dodatek za rast in 5 ml 1 % raztopino TTC. Gojišče smo razlili na velike petrijeve plošče (90 mm) in shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

3.1.3.3 Možgansko srčni infuzijski bujon (BHI)

Za shranjevanje sevov v kriovialah na – 80 °C smo uporabili tekoče gojišče možgansko – srčni infuzijski bujon. Gojišče smo pripravili tako, da smo 18,5 g predpripravljenega medija (Merck: 1.10493.0500), raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Gojišče smo ohladili na 55 °C ga prelili v 50 mL falkonke in shranili v hladilniku na 4°C do uporabe.

3.1.3.4 Mueller-Hinton bujon (MHB)

Gojišče Mueller-Hinton bujon, ki se uporablja za eksponentne kulture *C. jejuni*, smo pripravili tako, da smo v 100 mL erlenmajerice zatehtali 1,05 g predpripravljenega gojišča in ga raztopili v 50 mL deionizirane vode. Erlenmajerice smo zaprli z zamaškom iz papirnate brisače in vate ter ovili z alu folijo. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Gojišče za kvantifikacijo in namnoževanje bakteriofagov (t.i. cMHB) smo obogatili z dodatkom soli: 250 µL 2 M MgSO₄ in 50 µL 1 M CaCl₂ za vsakih 50 mL gojišča.

3.1.4 Rastna gojišča za namnoževanje in kvantifikacijo bakteriofaga PC5

3.1.4.1 NZCYM osnovni agar

Novozelandski kazamino kvasni (NZCYM) osnovni agar (Blatter in sod., 1977) smo pripravili po navodilih proizvajalca – zatehtali smo 11 g NZYCM bujona (Sigma: N3643) in 6 g agarja (Sigma: A5054), kar pomeni 1,2 % w/v vsebnost agarja. Mešanico smo raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Gojišče smo razlili na majhne petrijeve plošče (70 mm), počakali, da se tekočina strdi in shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

3.1.4.2 NZCYM mehki agar

Novozelandski kazamino kvasni (NZCYM) osnovni agar (Blatter in sod., 1977) smo pripravili po navodilih proizvajalca – zatehtali smo 11 g NZYCM bujona (Sigma: N3643) in 6 g agarja (Sigma: A5054), kar pomeni 1,2 % w/v vsebnost agarja. Mešanico smo raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bar. Nekoliko ohlajeno gojišče smo s serološko pipeto razdelili po 3 mL ali 5 mL v 15 mL centrifugirke in ga shranili v vodni kopeli na 55 °C do uporabe.

3.1.5 Rastna gojišča za namnoževanje in kvantifikacijo *E. coli* ter bakteriofaga T4

3.1.5.1 LB osnovni agar

Luria-Bertani (LB) osnovni agar smo pripravili tako, da smo 17,5 g predpripravljenega gojišča raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Gojišče smo razlili na majhne (70 mm) in velike (90 mm) petrijeve plošče in shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

3.1.5.2 LB mehki agar

Luria-Bertani (LB) mehki agar (Blatter in sod., 1977) smo pripravili tako, da smo 10 g LB bujona in 3,5 g agarja (0,7 % w/v vsebnost agarja) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Gojišče smo razdelili po 3 ml oz. 5 ml v 15 ml centrifugirke in ga shranili v vodni kopeli na 55 °C do uporabe.

3.1.5.3 LB tekoči medij

Gojišče Luria-Bertani, ki se uporablja za tekoče kulture *E. coli*, smo pripravili tako, da smo v 100 mL erlenmajerice zatehtali 1 g predpripravljenega gojišča in ga raztopili v 50 mL deionizirane vode. Erlenmajerice smo zaprli z zamaškom iz papirnate brisače in vate ter ovili z alu folijo. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara.

3.1.6 Solno magnezijev (SM) pufer

Solno magnezijev pufer smo pripravili tako, da smo zatehtali 2,9 g NaCl (Merck: 1.06404.1000) in 0,5 g želatine (Sigma: 48723), dodali 2 mL 2 M založne raztopine MgSO₄ (Sigma: M2643) in 25 mL 1 M Tris s pH = 7,5 (Merck: 1.08382.1000) in dopolnili do 500 mL z deionizirano vodo. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 bara. Ohlajen pufer smo v brezprašni komori razdelili po 50 ml v velike centrifugirke in shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

3.1.7 Priprava drugih reagentov

1 % raztopino trifenil tetrazolijevega klorida (TTC) smo pripravili tako, da smo 1 g TTC raztopili v 100 mL deionizirane vode. Priprava raztopine 2 M magnezijevega sulfata (MgSO₄): zatehtali smo 24,07 g MgSO₄ in raztopili v 100 mL deionizirane vode. Priprava 1 M raztopine kalcijevega klorida (CaCl₂): zatehtali smo 11,1 g CaCl₂ in raztopili v 100 mL deionizirane vode. V brezprašni komori smo tako pripravljene raztopine filtrirali skozi 0,22 µm filter in shranili v hladilnik do uporabe na 4 °C.

3.1.8 Laboratorijski pribor in oprema

Splošni laboratorijski material:

- avtomatske pipete,
- nastavki za avtomatske pipete,
- 1,5 in 2 mL centrifugirke,
- 15 in 50 mL centrifugirke,
- krioviale,
- petrijeve plošče s premerom 70 in 90 mm,
- plastične cepilne zanke za enkratno uporabo,
- steklovina – steklenice, erlenmajerice,
- mikrotiterske plošče,
- vrečke za gojenje mikroaerofilnih mikroorganizmov
- vata,
- papirnate brisače,
- razkužilo za površine in roke – spitaderm in incidin,
- rokavice,
- laboratorijska halja.

Laboratorijska oprema:

- brezprašna komora,
- vrtinčnik,
- vodna kopel,
- centrifuga,
- tehtnica,
- čitalec,
- lonci za anaerobno gojenje mikroorganizmov,
- pH meter,
- magnetni mešalnik,
- avtoklav,
- zamrzovalnik z -80 °C,
- hladilnik s 4 °C,
- programska oprema: Windows 7, Microsoft Office 2007, Gen 5, Magellan.

3.2 METODE

Poglavitni cilj naloge je bil določiti rastne parametre bakteriofagov PC5 bakterije *C. jejuni* in T4 bakterije *E. coli*. Za to sta potrebna dva ločena poskusa: v enem določimo konstanto adsorbcije, v drugem določimo hkrati dolžino latentne periode in pomnožitveno število. Poskusi so bili osnovani s pomočjo praktičnih nasvetov za postavitev metod določanja rastnih parametrov, ki sta jih predstavila Hyman in Abedon (2009).

3.2.1 Določanje konstante adsorbcije (δ) bakteriofagov na gostiteljsko celico

Adsorbcijo, ki si jo lahko zamislimo kot tipično kemijsko reakcijo izginjanja reaktantov in nastajanja produktov, lahko zasledujemo kot izginjanje prostih fagov – reaktanti ali nastajanje kompleksov fag-bakterija – produkti (Hyman in Abedon, 2009).

Odločili smo se za prvo – merjenje padca titra prostih fagov v supernatantih centrifugiranih vzorcev. Okolje, v katerem smo spremljali adsorbcijo, je bilo popolno bakterijsko gojišče (LB za *E. coli* in cMHB za *C. jejuni*) z gositeljskimi celicami v eksponentni fazi rasti. Faza rasti je pomemben dejavnik, saj vse bakterije ne izražajo receptorjev za fage konstitutivno. Edino mešanje, prisotno med eksperimentalnim določanjem adsorbcije, je bilo rahlo premešanje z roko – torej le zagotavljanje homogenosti (brez aktivnega mešanja, ki bi pospeševalo difuzijo). Priporočljiva je uporaba bistveno nižje koncentracije fagov od koncentracije bakterij, zato smo se odločili uporabiti MOI vrednosti 0,01 in 0,001. MOI se izračuna (Hyman in Abedon, 2009):

$$MOI = \frac{\text{št. fagov}}{\text{št. celic}} \quad \dots (11)$$

Višje koncentracije celic pomenijo hitrejšo adsorbcijo in posledično krajše poskuse, zato smo se odločili uporabiti neredčene kulture celic s koncentracijo okoli 10^8 CFU/mL. 10 mL sveže eksponentne kulture smo s pipeto prenesli v 50 mL centrifugirke. Koncentracijo celic v mediju smo določili z metodo štetja kolonij. Nato smo v 10 mL kulture odpipetirali ustrezeni volumen suspenzije fagov (volumen je bil tako majhen, da je zanemarljivo spremenil končni volumen reakcijske mešanice). Poskus je trajal 20-24 minut, vzorčenje je potekalo vsake 4 minute z začetkom po 4 minutah od dodatka fagov v medij z gostiteljskimi celicami in kratkim vrtinčenjem. Vzorčili smo s pipeto po 100 μ L volumna in jih takoj prenesli v 900 μ L SM pufra, jih tako 10-krat redčili v SM pufu (upočasnjevanje nadaljnje adsorbcije za 100-krat) in centrifugirali na 9000 g, 10 minut (odstranitev bakterij in kompleksov bakteriofag-bakterija). Analizirali smo jih z metodo štetja plakov.

Dobljene vrednosti bakteriofagov smo nato logaritmirali z naravnim logaritmom in grafično prikazali odvisnosti od časa. Padajočim vrednostim smo določili ustrezno umeritveno premico in določili njen naklon. Konstanto adsorbcije (δ) smo izračunali po naslednji zvezi:

$$\delta = -\frac{k}{X} \quad \dots (12)$$

Parametri v enačbi: k predstavlja naklon premice in X predstavlja koncentracijo bakterij na začetku v reakcijski posodi/viali (Hyman in Abedon, 2009).

3.2.2 Določanje latentne periode (L) in namnožitvenega števila (b)

Dolžino latentne periode in namnožitveno število (t.j. povprečno število nastalih bakteriofagov na posamezno gostiteljsko celico) lahko določimo s t.i. enostopenjskim rastnim poskusom. Poglavitna ideja poskusa je hitra okužba bakterijskih celic in nato spremljanje titra prostih bakteriofagov v mediju in izris rastne krivulje bakteriofaga, ki je tipično v obliki črke S – torej začetnemu platoju sledi strm narast, ki nakazuje konec latentne periode in nato, ko je končana liza vseh bakterij, sledi zgornji plato. Razlika med spodnjim in zgornjim platojem je odvisna od namnožitvenega števila (Hyman in Abedon, 2009).

Za izvedbo poskusov, smo pripravljali eksponentne kulture bakterij, saj so takrat v najugodnejšem fiziološkem stanju za pomnoževanje fagov. Sledila je zelo pomembna faza interakcije bakterij z bakteriofagi, cilj katere je dobiti čim bolj sinhronizirano infekcijo za natančno določitev latentne periode. To smo dosegli s kratko adsorbcijo, ki smo jo izvedli tako, da smo bakteriofage in bakterije 2 minuti stresali na visokih obratih z vrtničnikom in nato še 2 minuti pustili mirovati v inkubatorju na optimalni fiziološki temperaturi (37 °C za *E. coli* in 42 °C za *C. jejuni*). Za uspešno kratko adsorbcijo je pomembna visoka vsebnost bakterij in bakteriofagov v suspenziji, kar je razvidno iz enačbe 1. Zato smo vedno uporabili koncentracije, ki so presegale 10^7 celic/mL oz. 10^8 fagov/mL. Želeli smo imeti tudi vse bakterije okužene z vsaj enim bakteriofagom. Zato smo se morali poslužiti visokih vrednosti MOI (> 1). Število inficiranih celic pri določenem MOI je statistična funkcija. Delež celic, ki bodo okužene z določenim številom fagov pri določenem MOI, izračunamo s pomočjo Poissonove porazdelitve. Verjetnost okužbe z n številom fagov, t.j. $P(n)$ izračunamo po naslednji zvezi (Hyman in Abedon, 2009):

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!} \quad \dots (13)$$

Parametri v enačbi: m predstavlja MOI in n predstavlja število fagov, ki inficirajo celico. Na osnovi Poissonove porazdelitve smo se odločili uporabiti ciljni MOI = 10, saj je pri tej vrednosti po Poissonov porazdelitvi verjetnost neokuženih celic zares majhna, le okoli 0,005% neokuženih celic. Da smo zagotovili ustrezne gostote celic in bakteriofagov ter

primeren MOI, smo prilagajali volumski delež bakterijske oz. bakteriofagne suspenzije v skupnem reakcijskem volumnu 1 mL. EkspONENTA kultura *C. jejuni* ima nekoliko manj celic na mL kot eksponentna kultura *E. coli*, zato smo zmešali 500 µL bakteriofaga PC5 in 500 µL bakterijske kulture, medtem ko smo zamešali le 300 µL kulture *E. coli* in 700 µL bakteriofaga T4. Uporabljenim bankam smo določili titer z metodo štetja plakov, saj smo na ta način lahko kasneje preverjali uspešnost adsorbcije in sestavljali masne bilance bakteriofagov.

Po adsorbciji je sledilo odstranjevanje nevezanih fagov, kar smo napravili s centrifugiranjem pri 9000 g, 10 minut. Po centrifugiranju je uporaben sediment, v katerem se nahajajo kompleksi bakterija-fag in ga je potrebno resuspendirati v svežem mediju. Zbirali smo tudi supernatant, saj smo v njem določili z metodo štetja plakov vsebnost nevezanih fagov, ki so dali vpogled v uspešnost adsorbcije in so predstavljali tudi komponento masne bilance.

Pred dejanskim začetkom poskusa (pridobivanje točk rastne krivulje) smo suspenzijo 10-krat redčili, da smo zagotovili dovolj svežega medija za uspešno pomnoževanje fagov in tako tudi zmanjšali nadaljnje interakcije med prostimi fagi in bakterijami za 100-krat. Preostanku suspenzije, ki je nismo uporabili, smo tudi določili titer z metodo štetja plakov in tako določili infektivne centre. Inkubacija je potekala pri optimalni temperaturi bakterij. Sledilo je pobiranje vzorcev na 30 min pri *C. jejuni* in PC5 (počasnejši sistem), 4 ure in na 10 min pri *E. coli* in T4 (hitrejši sistem), 1 uro. Vzorce, ki so bili 10-krat redčeni (upočasnjevanje nadaljnje adsorbcije) in centrifugirani (odstranitev bakterij in kompleksov bakteriofag-bakterija), smo analizirali z metodo štetja plakov.

Iz dobljenih rezultatov smo izdelali grafične prikaze, ki so služili kot pripomoček za ugotavljanje rastnih parametrov. Latentno periodo smo določili tako, da smo preverili, kdaj se pojavi najvišji narast bakteriofagov. Namnožitveno število smo določili tako, da smo izračunali porast fagov (ΔP), ki je na grafu razlika med spodnjim in zgornjim platojem in nato delili s številom razpoložljivih celic (X), saj smo predpostavili, da so vse celice okužene vsaj z enim fagom. Namnožitveno število (b) se torej izračuna po enačbi:

$$b = \frac{\Delta P}{X} \quad \dots (14)$$

Za ugotavljanje uspešnosti vezave bakteriofagov na gostiteljske celice se uporablja t.i. masne bilance bakteriofagov. Osnovna enačba masne bilance bakteriofagov izgleda tako:

$$\text{VSI FAGI} = \text{VEZANI F.} + \text{NEVEZANI F.} + \text{REVERZIBILNO VEZANI F.} \quad \dots (15)$$

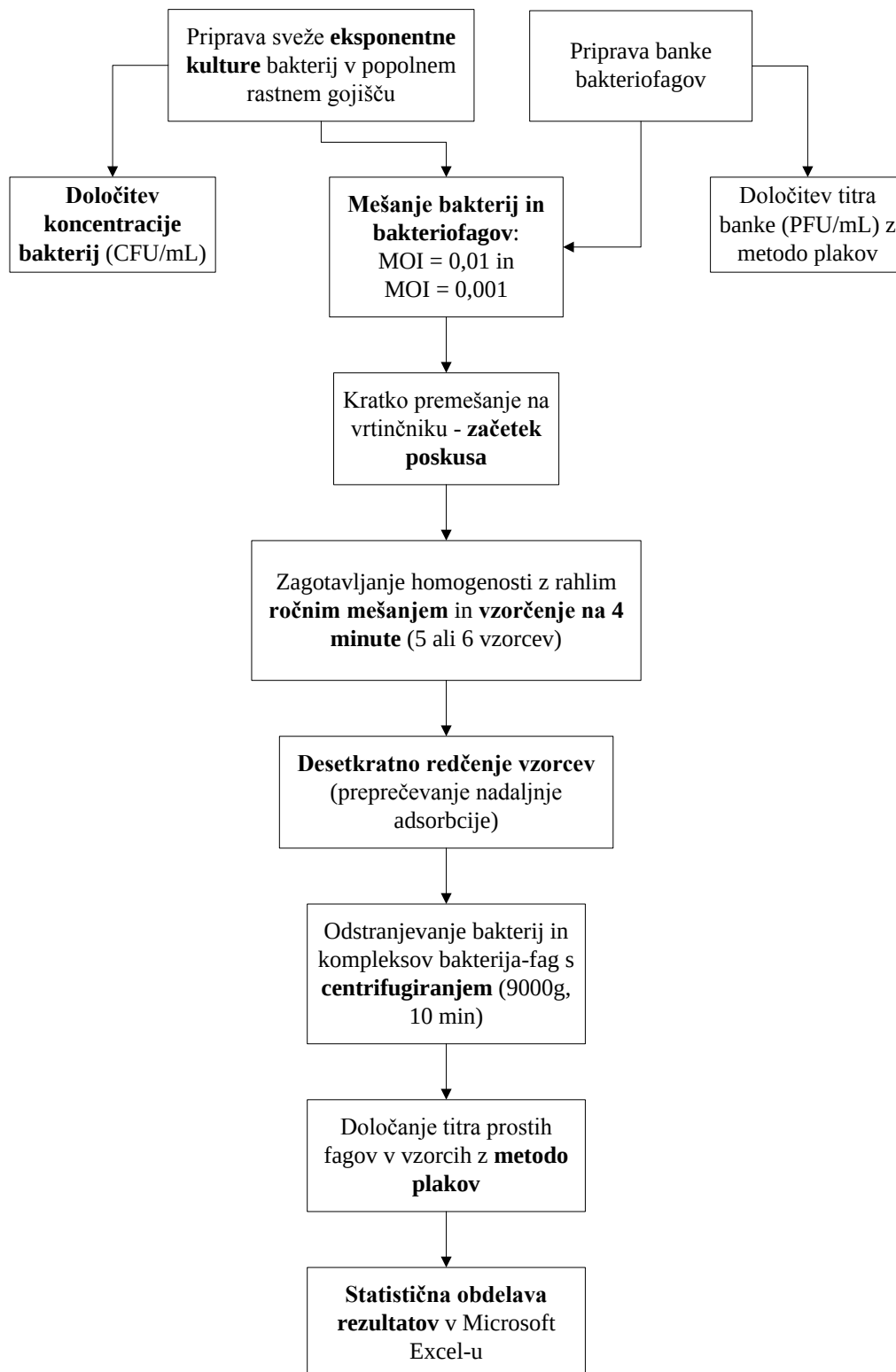
Vsi fagi so vsi razpoložljivi bakteriofagi, ki so na voljo na začetku pred fazo adsorbcije. Ti so torej odvisni od titra pripravljene banke bakteriofaga in volumna, ki ga odpipetiramo. Nevezani fagi so tisti bakteriofagi, ki se med fazo adsorbcije niso uspeli vezati na gostitelja in jih določimo v supernatantu po opravljeni adsorbciji in 10-minutnem centrifugiranju na 9000 g. Vezani fagi so torej tisti, ki so se vezali ireverzibilno (trajno) na gostitelja po fazi adsorbcije in okužijo celico. Te določimo z infektivnimi centri (sediment po centrifugiranju). Reverzibilno vezani fagi so tisti, ki se po adsorbciji sprostijo v bioprocesno brozgo in se pojavljajo kot prosti fagi v točki 0 na začetku poskusa pomnoževanja bakteriofaga.

Pri *C. jejuni* in bakteriofagu PC5 so bili opravljeni tudi dodatni poskusi, zaradi rezultatov, ki so bili nenavadni in nekoliko v nasprotju s pričakovanji. Narast bakteriofagov je bil tekom poskusov zelo nizek, zato nas je zanimalo, če je morda naraščanje bakteriofagov bolj posledica kakšnega drugega (naključnega) naraščanja, ki ni povezan s pomnoževanjem ali gre morda samo za desorbcijo pretežno reverzibilno vezanih fagov. Preverjanje prve teze je temeljilo na opazovanju »pomnoževanja« z mrtvimi celicami, preverjanje druge teze pa je temeljilo na opazovanju »pomnoževanja« z mrtvimi celicami in dodatkom 1,5 M NaCl, ki s spremembo ionske jakosti medija lahko povzroči desorbcijo reverzibilno vezanih fagov. Visoke vsebnosti soli negativno vplivajo na stabilnost bakteriofagov, zato smo napravili tudi poskus ugotavljanja preživelosti PC5 v različnih molarnostih NaCl. **Dodatni poskusi so bili torej naslednji:**

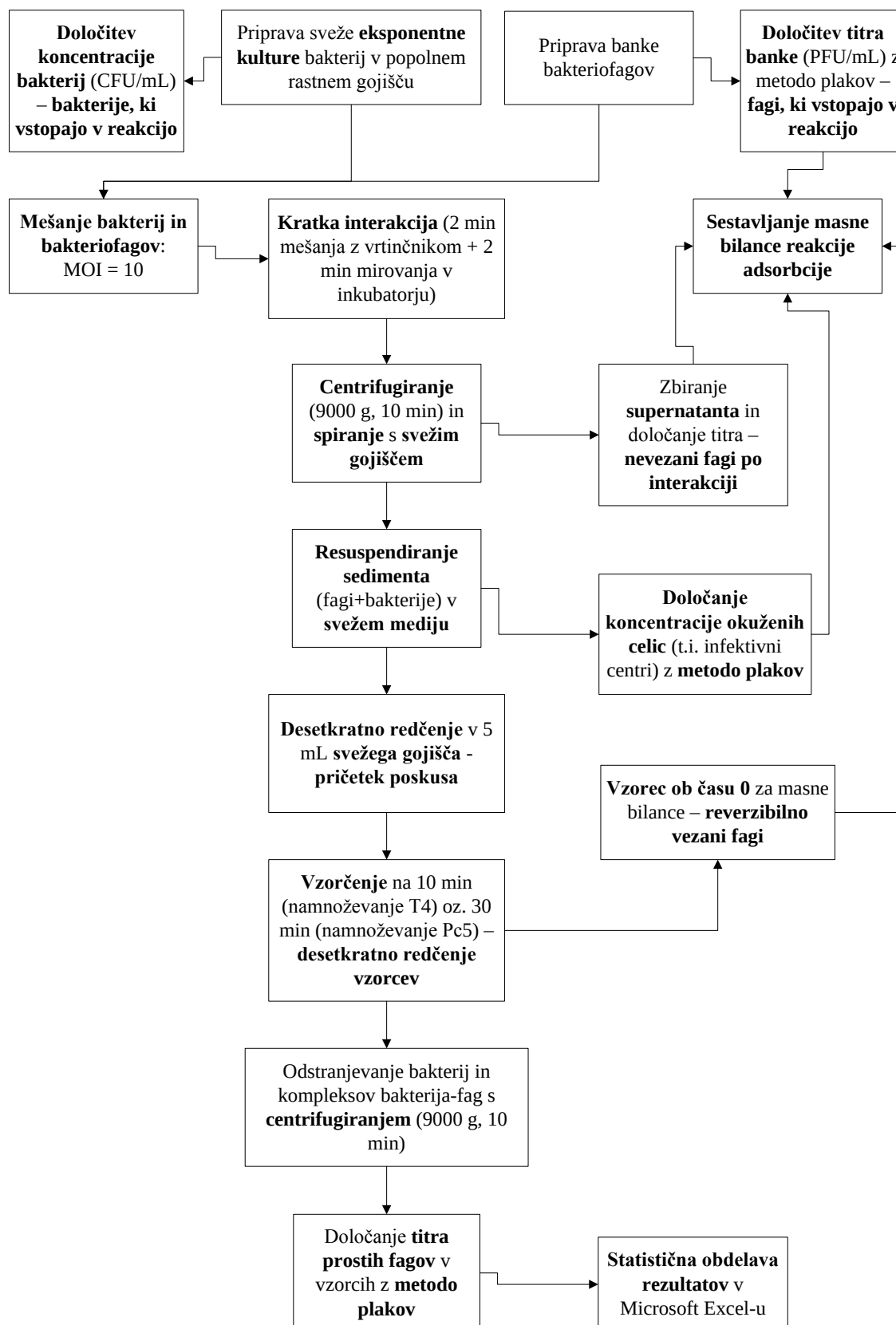
- poskus pomnoževanja fagov s celicami, ki smo jih po fazi adsorbcije, resuspendiranja in 10-kratnega redčenja ubili z 1% kloroformom,
- poskus pomnoževanja fagov s celicami, ki smo jih po fazi adsorbcije, resuspendiranja in 10-kratnega redčenja ubili z 1% kloroformom ter nato po 10 minutah še resuspendirali v medij z visoko vsebnostjo NaCl (1,5 M), ki je povzročil desorbcijo reverzibilno vezanih fagov,
- poskus preživelosti oz. ohranjanje infektivnosti bakteriofaga PC5 v različnih koncentracijah NaCl (od 1,5 M do 6 M) v časovnem obdobju 4 ur.

Poskus preživelosti oz. ohranjanja infektivnosti bakteriofaga PC5 v raztopini NaCl smo izvedli tako, da smo pripravili 4 mL ustrezne raztopine NaCl v majhne (15 mL) centrifugirke. Pripravili smo 1,5 M, 3 M, 4 M, 5 M in 6 M raztopino NaCl, imeli smo tudi kontrolo z SM pufrom, ki ni vsebovala dodatnega NaCl. V te raztopine smo odpipetirali ustrezno količino suspenzije bakteriofagov, da je bilo v vsaki raztopini na začetku $2 \cdot 10^6$ PFU/mL. Nato smo inkubirali pri 42 °C, 4 ure in pobrali 3 vzorce: po 10 minutah, po 1,5 ure in 4 urah. Vzorce smo analizirali z metodo štetja plakov in rezultate grafično ponazorili.

3.2.3 Shematski prikaz poskusov določanja rastnih parametrov bakteriofagov PC5 in T4



Slika 8: Osnovni princip določanja konstante adsorbcije (δ), ki temelji na spremljanju zmanjševanja števila prostih fagov v suspenziji



Slika 9: Princip določanja dolžine latentne periode (L) in namnožitvenega števila (b), ki temelji na spremljanju naraščanja prostih fagov in izdelavi stopničaste rastne krivulje

3.2.4 Priprava delovne banke *C. jejuni* LBA65

Bakterijski sev *C. jejuni* LBA65 je trajno shranjen v kriovialah pri -80 °C. V brezprašni komori smo s pomočjo plastične cepilne zanke prenesli zamrznjeno kulturo na plošče Columbia in jo konfluentno razmazali po celotni površini plošče. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikroaerobni atmosferi. Po končani inkubaciji smo kulturo na plošči postrgali s plastično cepilno zanko in jo resuspendirali v mešanici za zamrzovanje. Ena plošča Columbia ustreza 1 mL mešanice za zamrzovanje s sestavo: 0,2 mL 50% glicerola, 0,6 mL BHI in 0,2 mL defibrilirane konjske krvi. Mešanico smo dobro premešali na vrtinčniku in jo razdelili v brezprašni komori po 500 µL v krioviale. Kulturo smo shranili na -80°C do uporabe (revitalizacije).

3.2.5 Priprava delovne banke *E. coli* DSM613

Bakterijski sev *E. coli* DSM613 je trajno shranjen v kriovialah pri -80 °C. V brezprašni komori smo s pomočjo plastične cepilne zanke prenesli zamrznjeno kulturo na plošče LB in jo razmazali po plošči do posamezne kolonije. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37 °C in aerobnih pogojih. Naslednji dan smo eno kolonijo prenesli v 4 mL LB gojišča. Ko je kultura dosegla nekje v sredini eksponentne faze, smo jo po 0,6 mL prenesli v krioviale in dodali še 0,2 mL 50% glicerola in 0,2 mL svežega gojišča LB. Kulturo smo shranili na -80°C do uporabe (revitalizacije).

3.2.6 Revitalizacija bakterij *C. jejuni* in *E. coli*

V brezprašni komori smo s pomočjo plastične cepilne zanke prenesli zamrznjeno kulturo *C. jejuni* LBA65 iz krioviale na plošče Columbia in jo konfluentno razmazali po celotni površini plošče. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikroaerobni atmosferi.

V brezprašni komori smo s pomočjo plastične cepilne zanke prenesli zamrznjeno kulturo *E. coli* DSM613 na plošče LB in jo razmazali do posamezne kolonije. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, aerobno.

3.2.7 Priprava prekonočne kulture *E. coli*

Prekonočno kulturo *E. coli* DSM613, ki je služila kot založna suspenzija celic za pripravo eksponentnih kultur za vse poskuse, smo pripravili tako, da smo v 50 mL gojišča LB s cepilno zanko prenesli eno kolonijo iz plošče (glej Revitalizacija bakterij...). 50 mL gojišča smo pripravili v 100 mL erlenmajericah, ki smo jih zaprli z zamaškom iz papirnate brisače in vate ter zavili z alu-folijo. Kulturo smo inkubirali 16 ur pri 37 °C, aerobno. Kulturo smo nato shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe, vendar ne več kot en teden.

3.2.8 Priprava eksponentne kulture *C. jejuni*

Eksponentno kulturo *C. jejuni* LBA65 smo pripravili tako, da smo s cepilno zanko revitalizirano kulturo bakterij iz plošče Columbija prenesli v 50 mL gojišča cMHB (100 mL erlenmajerica z zamaškom iz brisače, vate in alu-folije). Pomerili smo absorbanco pri 600 nm, ki je morala biti med 0,05 in 0,09 (dovolj začetne biomase). Kulturo smo inkubirali 14-16 ur pri 42 °C, mikroaerofilno. Pred uporabo smo preverili rast z absorbanco pri 600 nm, ki je morala narasti za približno 0,05.

3.2.9 Priprava eksponentne kulture *E. coli*

Zanimalo nas je, kako hitro v danih pogojih, sev DSM613 doseže eksponentno fazo rasti. Zato smo na začetku izdelali rastno krivuljo. To smo naredili tako, da smo zajeli 5 mL prekonočne kulture in jo prenesli v 45 mL svežega, na 37 °C ogretega medija LB v 100 mL erlenmajerici z zamaškom iz vate in folije. Na ta način smo kulturo 10-krat redčili. Nato smo kulturo inkubirali na 37 °C, aerobno. Vzorce smo pobirali na 30 min, jim pomerili absorbanco pri 600 nm in jim določili koncentracijo celic, z metodo štetja kolonij. Poskus smo prenehali, ko je kultura zanesljivo prešla v stacionarno fazo in ji tako absorbanca pri 600 nm ni več naraščala. Tako smo napravili rastno krivuljo sveže prekonočne kulture in rastno krivuljo prekonočne kulture, ki je stala en teden v hladilniku, saj nas je zanimalo, če pride po enem tednu do kakšne bistvene spremembe v rasti. Na osnovi rastnih krivulj smo zasnovali protokole za pripravo eksponentne kulture.

Eksponentno kulturo *E. coli* smo pripravili tako, da smo 10-krat redčili prekonočno kulturo v svežem in predogretem mediju LB (če smo potrebovali 10 mL eksponentne kulture, smo 9 mL medija LB dodali 1 mL prekonočne kulture *E. coli*). Kulturo smo inkubirali 1,5 ure pri 37 °C, aerobno. Rast smo spremljali z absorbanco pri 600 nm. Absorbanca pri 600 nm je v tem času narasla iz okoli 0,03 na približno 0,22, kar ustreza približno $3 \cdot 10^8$ CFU/mL.

3.2.10 Metoda štetja kolonij

Koncentracijo viabilnih bakterijskih celic smo določali z metodo štetja kolonij (CFU) na petrijevih ploščah z ustreznim gojiščem. Za določanje CFU pri *C. jejuni* smo uporabili plošče AHB in za določanje CFU pri *E. coli* smo uporabili plošče LB. Za določanje smo preiskovane vzorce redčili z redčitvami po Kochu in jih po trikrat nanесли z avtomatsko pipeto na označene predele na plošči v obliki kapljic z volumnom 10 µL. Plošče s *C. jejuni* smo inkubirali 24 ur pri 42 °C, mikroaerofilno. Plošče z *E. coli* smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, aerobno. Prešteli smo kolonije, pri čemer smo upoštevali t.i. pravilo števnosti (3-30 kolonij na kapljico). Koncentracijo celic (X) smo izrazili s pomočjo enote CFU/mL, ki smo jo dobili po naslednji enačbi:

$$X = N \cdot R \cdot 100 \quad \dots (16)$$

N v enačbi predstavlja povprečno število kolonij v kapljicah pri posamezni redčitvi (triplikati), R predstavlja redčitev, množenje s 100 je posledica nanosa 10 μ L vzorca, ki predstavlja stotino mL.

3.2.11 Priprava delovne banke bakteriofaga PC5

Bakteriofag PC5 smo namnoževali s t.i. metodo »konfluentnih plošč«, prirejeno po Adamsu (1959). Bakteriofag iz banke mikroorganizmov Laboratorija za bioanalitiko smo redčili do približno 10^6 PFU/mL in ga razdelili v nekaj mikrocentrifugirk po 100 μ L. Revitalizirano kulturo *C. jejuni* smo postrgali iz plošče Columbia v 1 mL medija cMHB do optične gostote 2,5 oz. 0,25, saj smo zaradi bolj točnega branja kulturo redčili desetkrat). Tako pripravljeno kulturo bakterij smo inkubirali 90 minut pri 42 °C in aerobnih pogojih. Po končani inkubaciji smo 100 μ L bakterijske kulture dodali pripravljenim redčitvam fagov. Suspenzijo smo dobro premešali z vrtinčnikom in inkubirali 15 minut pri 42 °C in aerobnih pogojih. Po končani inkubaciji smo vseh 200 μ L mešanice fagov in bakterij prenesli v 5 mL mehkega agarja in vse skupaj razlili na 90 mm plošče NZCYM. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 42 °C, mikroaerofilno. Naslednji dan smo plošče prelili s 3 mL SM pufru in zavili s parafilmom. Plošče smo inkubirali pri 37 °C, aerobno, 4 ure. V tem času je potekla elucija bakteriofagov v SM pufer. Po 4 urah smo pobrali ves pufer iz plošč, ga centrifugirali na 9000 g, 10 min in nato supernatant filtrirali skozi 0,22 μ m filter. Tako pripravljeno suspenzijo bakteriofagov smo shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

3.2.12 Priprava delovne banke bakteriofaga T4

Bakteriofag T4 smo namnoževali z modificirano metodo priprave manjših lizatov faga λ , ki deluje tudi za bakteriofag T4 (Leder in sod., 1977). V 15 mL centrifugirko smo dodali 100 μ L razredčine bakteriofaga T4 (Laboratorij za bioanalitiko), ki je vsebovala približno 10^6 PFU in 100 μ L prekonočne kulture *E. coli*. Suspenzijo smo dobro premešali na vrtinčniku in jo inkubirali 20 min na 37 °C, aerobno. Po končani inkubaciji smo dodali 4 mL svežega na 37 °C ogretega LB medija. Nato smo inkubirali preko noči na 37 °C, aerobno. Naslednji dan smo bakteriofage očistili z dvakratnim centrifugiranjem in zbiranjem supernatanta: prvo centrifugiranje je potekalo na 4000 g, 10 min in drugo je potekalo na 9000 g, 10 min. Na koncu smo supernatant filtrirali skozi 0,22 μ m filter in spravili v hladilnik na 4 °C do uporabe.

3.2.13 Metoda (štetja) plakov

Razlikujemo dve različici metode (štetja) plakov:

- *klasična metoda (štetja) plakov* (v ang. poznana kot »plaque assay«), kjer določamo število PFU vsakega vzorca na posamezni plošči – podobno kot bakterijski razmazi

- in *metodo štetja plakov v kapljici* (v ang. poznana kot »spot assay«) in je široko uporabna za pregledovanje (ang. screening) večjega števila vzorcev in redčitev, saj se na eno ploščo nanese večje število vzorcev/redčitev v obliki kapljic (10 µL).

Klasična metoda (štetja) plakov je široko uporabljena metoda za določanje titra fagov (PFU/mL). Uporabili smo prirejen protokol po Adamsu (1959). 100 µL ustrezne redčitve bakteriofaga, ki smo ga pripravili s serijskimi redčitvami po Kochu v SM pufru, smo odpipetirali v mikrocetrifugirke. Dodali smo še 100 µL eksponentne bakterijske kulture in skupaj premešali na vrtinčniku. Vzorce smo inkubirali 15 min na 37 °C, ko smo delali z *E. coli* in T4 ter 15 min na 42 °C, ko smo delali s *C. jejuni* in PC5. Nato smo vseh 200 µL prenesli v 3 mL mehkega agarja, dobro premešali na vrtinčniku in vlili na plošče s premerom 70 mm. Za delo z *E. coli* in T4, smo uporabili LB plošče in LB mehki agar. Za delo s *C. jejuni* in PC5 smo uporabili NZCYM plošče in NZCYM mehki agar. Ko se je mehki agar strdil, smo plošče inkubirali 24 ur, pri 37 °C in aerobnih pogojih, ko smo delali z *E. coli* in T4. Plošče s *C. jejuni* in PC5 smo inkubirali 24 ur, pri 42 °C in mikroaerobno. Po končani inkubaciji smo prešteli plake na ploščah in izračunali titer bakteriofagov (P) z enoto PFU/mL po naslednji formuli:

$$P = N \cdot R \cdot 10 \quad \dots (17)$$

N v enačbi predstavlja povprečno število plakov na ploščah pri posamezni redčitvi (duplikati), R predstavlja redčitev, množenje z 10 je posledica nanosa 100 µL vzorca, ki predstavlja desetino mL. Metoda štetja plakov v kapljici je pogosta pregledovalna (ang. screening) metoda, ki se jo poslužimo, ko moramo analizirati večje število vzorcev in redčitev, da dobimo prvo informacijo o titru bakteriofagov. S to metodo prihranimo na materialu. Priporočljivo je, da vseeno nato titer določimo še z metodo plakov. Metodo štetja plakov v kapljici smo izvedli tako, da smo najprej na 90 mm ploščo nanесли 100 µL bakterijske kulture, ki smo jo zamešali v 5 mL mehkega agarja. Za delo smo uporabili prekonočno kulturo *E. coli* oz. kulturo *C. jejuni* za konfluentne plošče (glej poglavje 3.2.11). Za delo z *E. coli* in T4 smo uporabili plošče LB in LB mehki agar, za delo s *C. jejuni* in PC5 smo uporabili plošče NZCYM in NZCYM mehki agar. Ko se je mehki agar strdil, smo vzorce na ploščo nanašali v obliki kapljic (10 µL) v označene predele. Pustili smo, da so se kapljice posušile v brezprašni komori pri sobni temperaturi. Nato smo plošče inkubirali pri 37 °C, aerobno (*E. coli*) oz. pri 42 °C, mikroaerofilno (*C. jejuni*), 24 ur. Po končani inkubaciji smo prešteli plake v kapljicah in izračunali titer (P) z enoto PFU/mL po naslednji formuli:

$$P = N \cdot R \cdot 100 \quad \dots (18)$$

N v enačbi predstavlja število plakov na ploščah pri posamezni redčitvi, R predstavlja redčitev, množenje z 100 je posledica nanosa 10 µL vzorca, ki predstavlja stotino mL.

4 REZULTATI

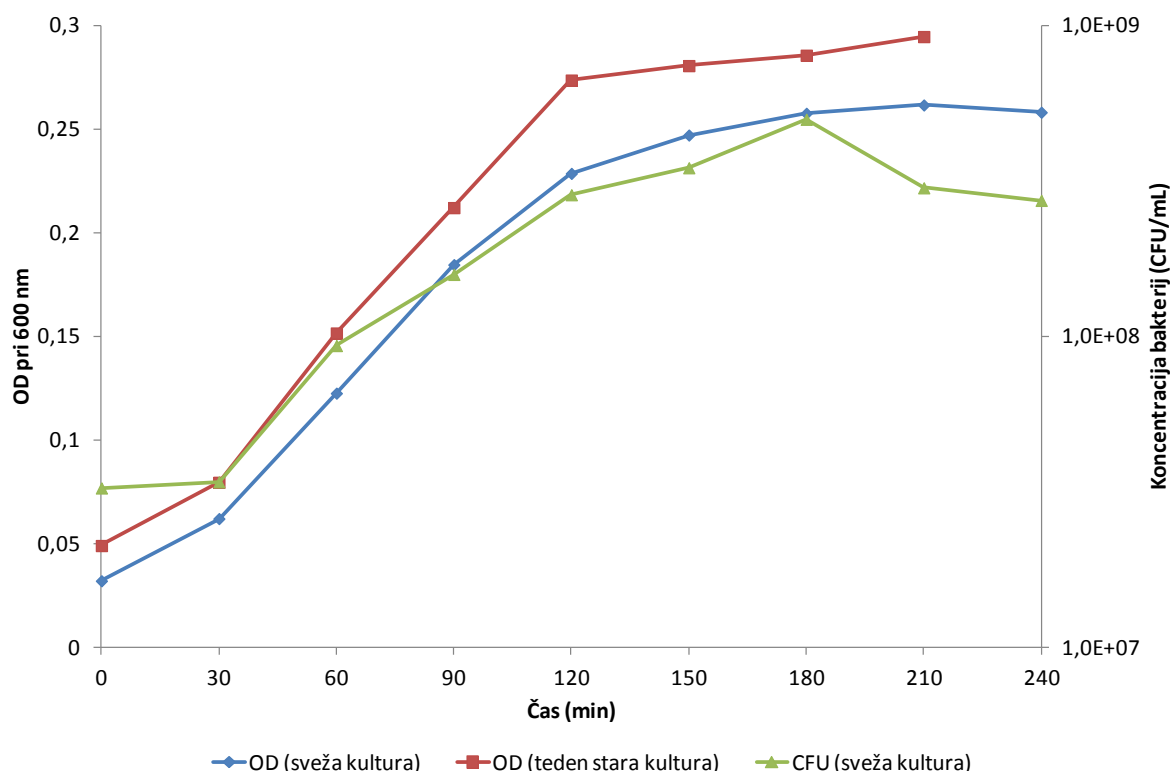
V naslednjem poglavju so zbrani rezultati poskusov, izvedenih v obdobju od junija do decembra 2014. Rezultati so prikazani v obliki preglednic, grafov in preračunanih vrednosti. Predstavljeni so rezultati določanja rastnih parametrov dveh bakteriofagov: T4, ki okužuje *E. coli* in PC5, ki okužuje *C. jejuni*. Predstavljeni so tudi različni pomožni poskusi, ki so bili narejeni z namenom ugotavljanja razlogov za probleme, ki so se tekom poskusov pojavljali in nudijo z dodatnimi informacijami boljši vpogled v dobljene rezultate. Glavnino informacij predstavljata dva ločena poskusa pri vsakem sistemu (bakteriofag-bakterija). Prvi poskus je dal informacijo o hitrosti adsorbcije, drugi pa je dal informacijo o dolžini latentne periode in številu novonastalih fagov na celico, čemur rečemo namnožitveno število. Zasledovanje gostote bakterijskih celic je potekalo z dvema metodama: z metodo štetja kolonij in spremljanjem optične gostote (absorbance) pri 600 nm. Spremembe titra bakteriofagov v mediju smo zasledovali z metodo štetja plakov.

4.1 REZULTATI POSKUSOV Z *E. coli* IN BAKTERIOFAGOM T4

4.1.1 Rastna krivulja *E. coli* DSM613

Za interakcijo s fagi so najprimernejše celice v eksponentni fazi rasti. Pred začetkom kakršnihkoli drugih poskusov je bilo torej potrebno ugotoviti, koliko časa je potrebno, da pridejo celice *E. coli* DSM613 v danih pogojih v eksponentno fazo rasti. Preverili smo tudi, če je primerno shranjevati prekonočno kulturo v hladilniku na 4 °C in delati z njo vsaj en teden. Zato smo preverili tudi rast kulture po enem tednu v hladilniku na 4 °C.

Na sliki 10 so bakterijske rastne krivulje, ki sovpadajo (imajo enake trende). Vidna je podobnost med krivuljo, ki je nastala s spremljanjem absorbance pri 600 nm in CFU teh vzorcev, ko smo pripravili eksponentno kulturo iz sveže prekonočne kulture. Grafi kažejo, da celice preidejo v rast takoj, saj s polurnim vzorčenjem ne zaznamo lag faze. Celice so v eksponentni fazi med 30 in 120 minutami od začetka inkubacije. Absorbanca pri 600 nm je pri poskusu s svežimi celicami narastla za 0,23 in za 0,25 pri poskusu s teden dni starimi celicami (iz hladilnika, 4 °C). Obakrat je mogoče najvišjo absorbanco odčitati po 210 minutah. Po 90 minutah, ki predstavlja čas priprave eksponentne kulture, absorbanca naraste za 0,15 oz. 0,16. Vrh doseže merjenje CFU pri koncentraciji $5 \cdot 10^8$ CFU/mL, kar pomeni nastanek $4,7 \cdot 10^8$ CFU/mL novih bakterij. Po 90 min nastane $1,3 \cdot 10^8$ CFU/mL novih celic (končna koncentracija je torej nekaj manj kot $2 \cdot 10^8$ CFU/mL). Izračunali smo tudi $\mu_{\max}$, ki znaša $1,4 \text{ h}^{-1}$.

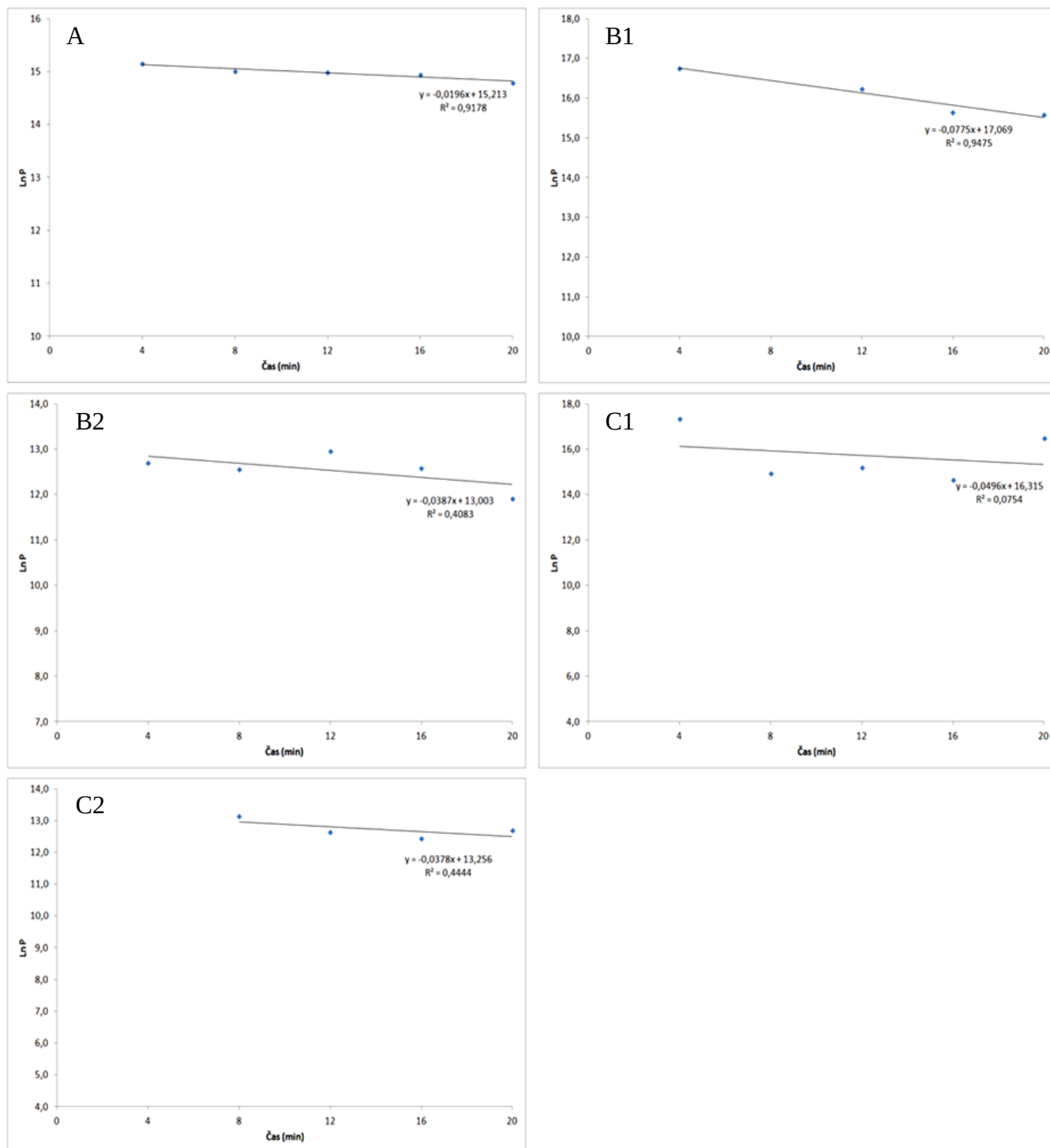


Slika 10: Rastna krivulja *E. coli* DSM613, prikazana z absorbanco (OD) pri 600 nm in CFU/ml v odvisnosti od časa; krivulje z absorbanco so bile narejene za svežo in en teden staro kulturo, CFU pa le za svežo kulturo; $\mu_{\max} = 1,4 \text{ h}^{-1}$

4.1.2 Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante T4 (na *E. coli* DSM613)

Rezultati poskusa določanja adsorbcije so točke na grafu, ki predstavljajo titer prostih fagov v času. Titer bakteriofagov smo določali z metodo plakov. Ta mora skozi čas upadati, saj se znižuje število prostih fagov na račun adsorbcije na gostitelja. Obdelani rezultati so grafično prikazani na sliki 11. Črke A, B in C predstavljajo tri ponovitve poskusov, oznaki 1 in 2 predstavljata sočasni paralelki znotraj poskusa (torej narejeno isti dan). Iz petih padajočih (trendnih) premic smo odčitali naklon, ki je poleg koncentracije razpoložljivih celic bistven za izračun adsorpcijske konstante (enačba 14, str. 24). V Preglednici 2 so povzeti rezultati vseh petih premic (nakloni premic, vrednost R^2 za vsako premico, koncentracija celic (razpoložljivih za adsorbcijo) in adsorpcijska konstanta ter končno povprečna adsorpcijska konstanta sistema, ki je glavni rezultat adsorpcijskih poskusov.

Prikazanim grafom (slika 11) je bilo mogoče določiti padajoče trendne črte, zato je bilo mogoče iz negativnih naklonov in koncentracije gostiteljski celic izračunati adsorpcijsko konstanto bakteriofaga T4. Končni rezultat adsorpcijskih poskusov je torej povprečna adsorpcijska konstanta, ki znaša $2,3 \cdot 10^{-10} \text{ mL/min}$.



Slika 11: Grafi naravnega logaritma prostih fagov v odvisnosti od časa prikazujejo padanje prostih fagov v času 20 minut, na vsakem grafu je vidna enačba premice in R^2 , za nadaljnje izračune je najpomembnejši naklon premice

Preglednica 2: Ključne količine za določanje adsorpcijske konstante sistema *E. coli* in T4

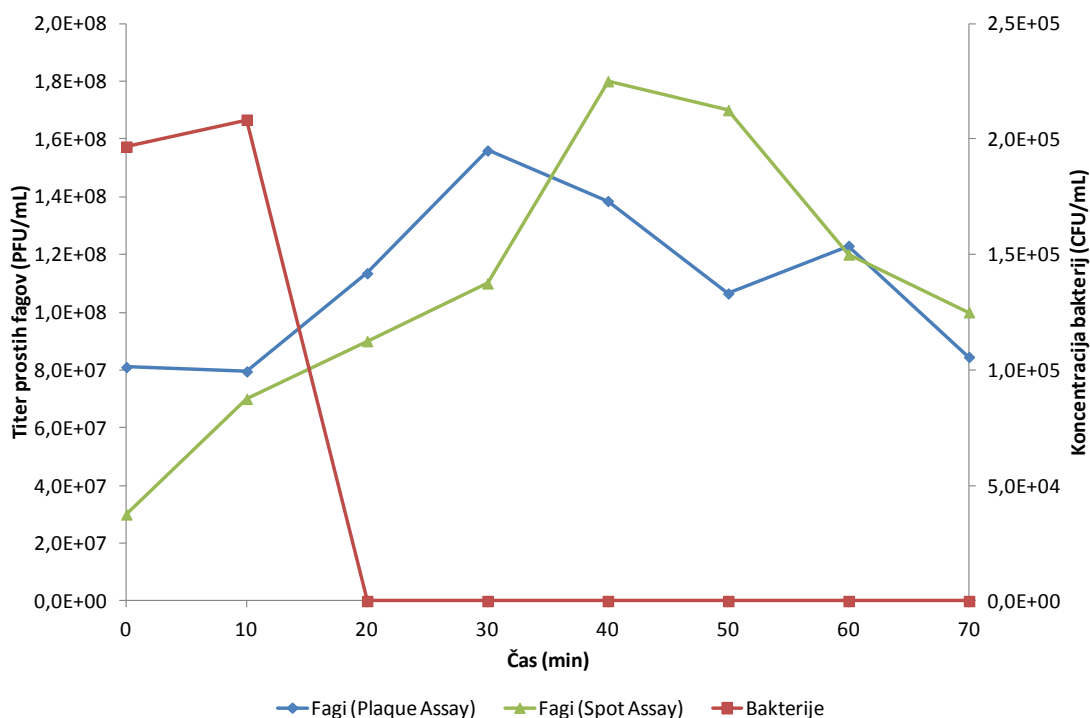
Oznaka poskusa	Naklon premice	R ² izrisane premice	Koncentracija celic (CFU/mL)	Adsorpcijska konstanta (mL/min)
A	-0,020	0,92	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^{-10}$
B1	-0,078	0,95	$1,8 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^{-10}$
B2	-0,039	0,41	$1,8 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^{-10}$
C1	-0,050	0,075	$2,2 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^{-10}$
C2	-0,038	0,44	$2,2 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^{-10}$
Povprečna adsorpcijska konstanta		$2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min		

4.1.3 Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga T4

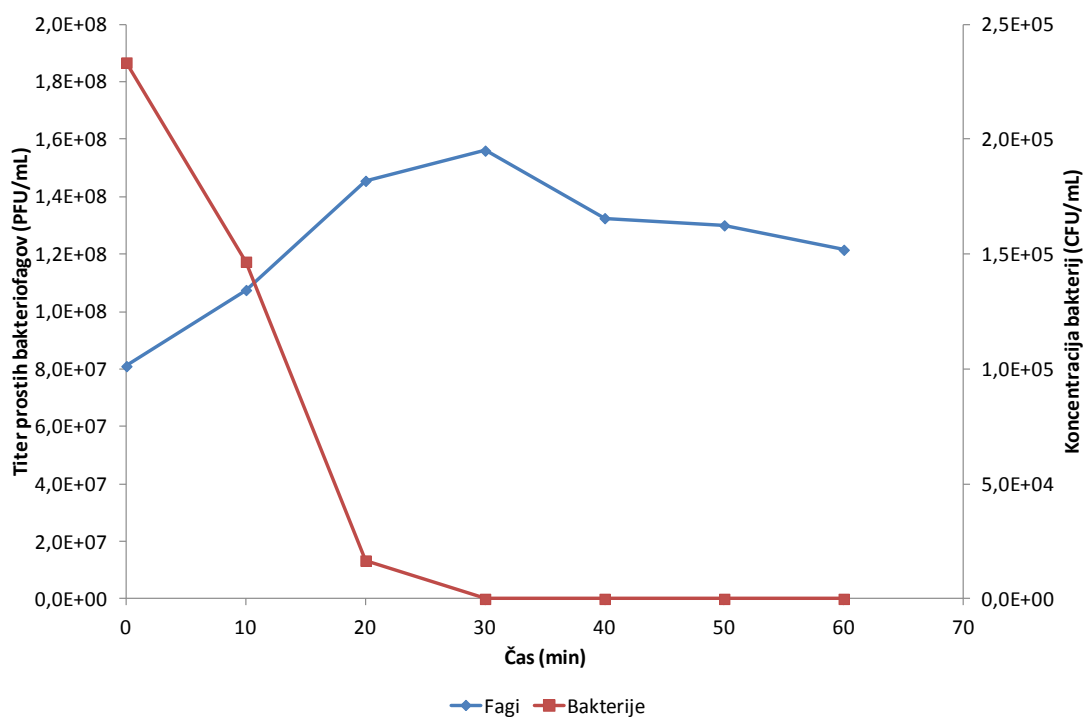
Rezultati so prikazani v obliki grafov (sliki 12 in 13), pridobljenih z dvema eksperimentalnima ponovitvama. Na vsakem grafu je prikazano naraščanje titra prostih fagov v času in nasprotno upadanje koncentracije bakterij zaradi učinka bakteriofagov. Iz omenjenega grafa je mogoče odčitati latentno periodo, ki se konča z nenadnim intenzivnim skokom prostih bakteriofagov. Iz tega porasta bakteriofagov lahko določimo tudi namnožitveno število (povprečno število fagov na gostiteljsko celico), za kar smo morali določiti tudi koncentracijo razpoložljivih gostiteljskih celic. Predstavili bomo tudi spremljujoče analize, ki govorijo o uspešnosti vezave bakteriofagov na celice znotraj posameznega poskusa in izhajajoče masne bilance bakteriofagov. Z omenjenimi analizami lahko ugotovimo, ali so vse celice okužene z vsaj enim fagom. To je osnova zastavljene metode določanja namnožitvenega števila, saj število novonastalih fagov delimo z razpoložljivimi bakterijami, ki naj bi bile torej okužene z vsaj enim fagom.

Preglednica 3: Masne bilance fagov poskusov A in B (sliki 12 in 13), predstavljene kot absolutno število fagov (PFU) (število fagov je pomnožek koncentracije s celotnim volumnom suspenzije v reakcijski posodi)

Vzorec	Skupno število fagov (PFU)	
	Poskus A	Poskus B
Vsi (razpoložljivi) fagi	$4,7 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$
Po centrifugiranju (supernatant)	$7,4 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8$
Infektivni centri	$3,9 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
V brozgi (začetek rastne krivulje, čas 0)	$4,1 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$
Vse (razpoložljive) bakterije (CFU)	$7,5 \cdot 10^7$	$8,9 \cdot 10^7$
MOI	6,3	4,4



Slika 12: Poskus A – Titer prostih fagov in koncentracije bakterij v enostopenjskem poskusu; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov v kapljici (t.i. spot assay) in metodo štetja plakov (t.i. plaque assay), bakterije so bile določene z metodo štetja kolonij



Slika 13: Poskus B – graf Titer prostih fagov in koncentracije bakterij v enostopenjskem poskusu; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay), bakterije so bile določene z metodo štetja kolonij

Pri obeh ponovitvah poskusa je viden izrazit porast bakteriofagov glede na začetno vrednost. V obeh poskusih je prisotna popolna liza bakterij (krivulja pade na nič po najkasneje pol ure). Titer bakteriofagov je pri obeh paralelkah narasel za $7,7 \cdot 10^7$ PFU/mL. Naraščanje bakteriofagov se je začelo pri prvi izvedbi poskusa po 10 minutah, medtem ko je pri drugi ponovitvi naraščanje praktično takojšnje. Nato krivulja ne preide v izrazit plato, kot je značilno za tipične rastne krivulje bakteriofaga, ampak začne upadati. Pri drugi ponovitvi se krivulja nekoliko izravna za kakšnih 10-20 minut, nato tudi ta izrazito pade. Zato je odčitavanje latentne periode in namnožitvenega števila nekoliko oteženo. Ker se največji porast bakteriofagov pri obeh poskusih zgodi v času dveh časovnih intervalov (vzorčenj), smo se odločili latentno periodo postaviti točno na sredino. To pomeni 20 minut pri poskusu A in 10 minut pri poskusu B. Končno **latentno periodo** sistema predstavlja povprečna vrednost, ki je v našem primeru **15 minut**. Porast bakteriofagov je bil odčitán med najnižjo in najvišjo točko na grafu. Porast fagov smo nato delili s koncentracijo vseh razpoložljivih bakterij v mediju in tako dobili pomnožitveno število. Pomnožitveno število iz prvega poskusa je 10, iz drugega pa 9 PFU/CFU. Povprečno torej nastane **9,5 bakteriofaga T4 na eno gostiteljsko celico** pod danimi pogoji. Povzetek določanja latentne periode in pomnožitvenega števila je prikazan v preglednici 4.

Preglednica 4: Povprečna latentna perioda in namnožitveno število sistema T4-*E. coli* v poskusih A in B

Oznaka poskusa	Latentna perioda (min)	Narast bakteriofagov (PFU/mL)	Razpoložljive bakterije (CFU/mL)	Namnožitveno število (PFU/bakterija)
A	20	$7,7 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^6$	10
B	10	$7,7 \cdot 10^7$	$8,9 \cdot 10^6$	9
Povprečna latentna perioda		15 min		
Povprečno namnožitveno število		9,5 PFU/CFU		

Oglejmo si še masne bilance bakteriofagov iz poskusa A. Iz podatka o vseh razpoložljivih bakteriofagih in bakteriofagih, ki so ostali v supernatantu (torej se niso vezali na gostitelja) po centrifugiranju lahko določimo delež adsorbiranih fagov. Izračunamo lahko, da se je vezalo nekaj več kot 84% vseh razpoložljivih fagov. Če preračunamo odstotke v številke je to skoraj $4 \cdot 10^8$ PFU. V 1 mL medija je bilo poleg navedenega števila fagov tudi $7,5 \cdot 10^7$ CFU gostiteljskih celic. Vrednost MOI v tem poskusu je bila torej 6,3 oz. drugače povedano dobrih 6 bakteriofagov na vsako celico gostitelja. Vsi fagi se sicer niso vezali na gostitelje (ostali v supernatantu), a kljub temu je še vedno bilo več kot 5 vezanih bakteriofagov na eno celico gostitelja. V poskusu B se je vezalo okoli 71% fagov, kar pomeni v absolutnem številu $2,8 \cdot 10^8$ PFU. V 1 mL medija je bilo poleg navedenega števila fagov tudi $8,9 \cdot 10^7$ CFU gostiteljskih celic. Vrednost MOI v tem poskusu je bila torej 4,4 (se pravi več kot 4 fagi na gostiteljsko celico). Tudi število vezanih fagov presega število celic gostitelja (v povprečju dobri 3 fagi na eno bakterijsko celico). Poleg tega so

pomembni tudi podatki o infektivnih centrih. Pri določanju infektivnih centrov damo na plošče z agarjem sediment, kjer so bakterije z adsorbiranimi fagi. Pri poskusu A je bilo teh infektivnih centrov $7,8 \cdot 10^8$ PFU/mL (če upoštevamo volumen 0,5 mL je to $3,9 \cdot 10^8$ PFU). Pri poskusu B je bilo infektivnih centrov $3,1 \cdot 10^8$ PFU/mL (oz. $1,5 \cdot 10^8$ PFU). Tudi število infektivnih centrov presega razpoložljive bakterije. V brozgi je bilo na začetku poskusa prisotnih $4,1 \cdot 10^8$ PFU prostih fagov, ki očitno niso bili ireverzibilno vezani. Povzetek masnih bilanc je prikazan zgoraj v Preglednici 3, prva dva vzorca (vsi razpoložljivi fagi in fagi po centrifugiranju) služita za izračun uspešnosti vezave bakteriofagov, ki smo jo predstavili v tem odstavku. MOI v Preglednici 3 je bil izračunan kot količnik vseh razpoložljivih fagov na začetku in vseh razpoložljivih bakterij.

4.2 REZULTATI POSKUSOV S *C. jejuni* IN BAKTERIOFAGOM PC5

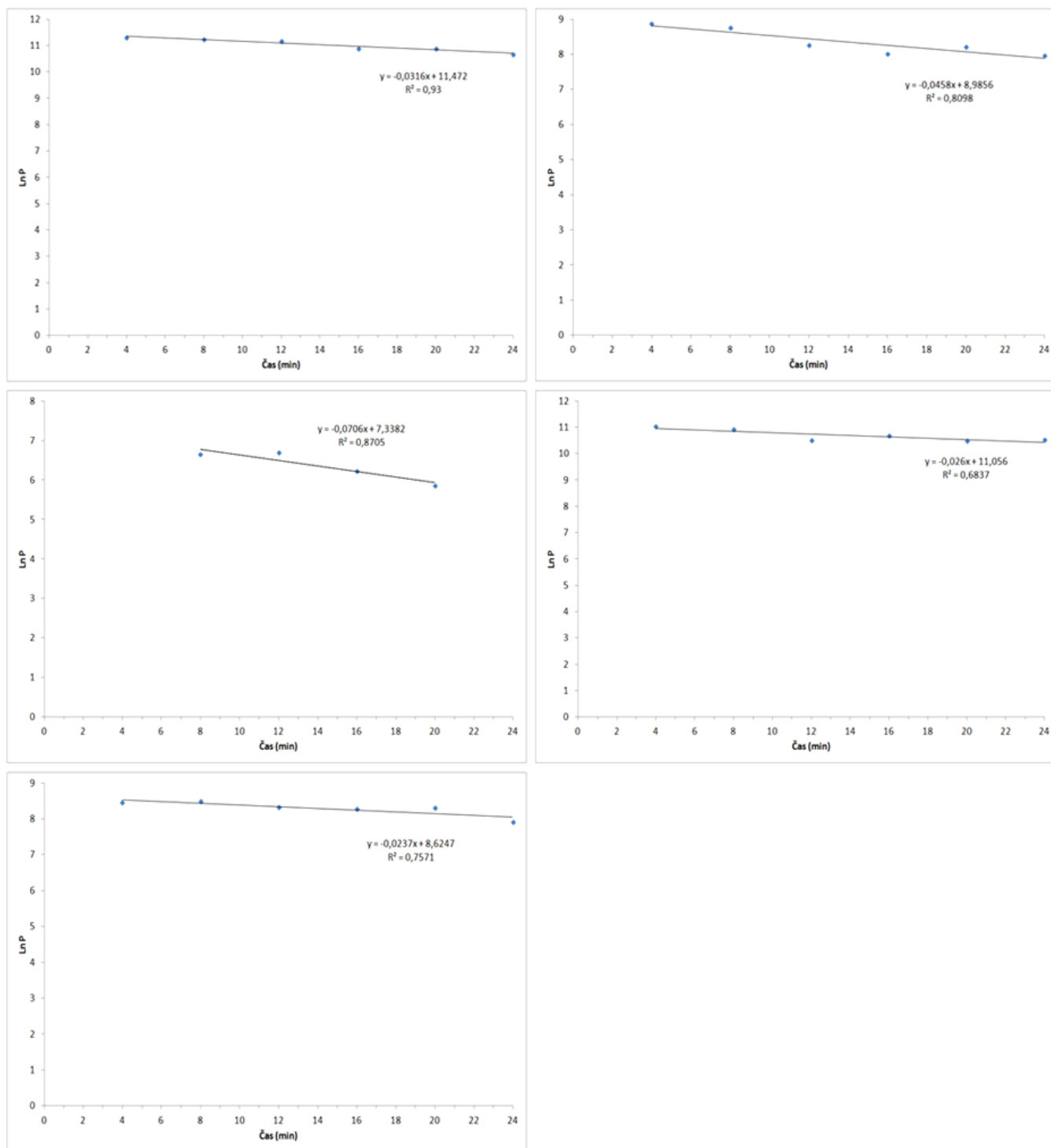
4.2.1 Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante PC5 na *C. jejuni* LBA65

Na enak način kot smo določili adsorpcijsko konstanto fagu T4, smo jo določili tudi PC5. Rezultati so prikazani na sliki 14. Črki A in B predstavljata dve ponovitvi poskusov, oznaki 1, 2 in 3 predstavljajo sočasne paralelke znotraj poskusa (torej narejeno isti dan). Iz petih padajočih premic smo odčitali naklon, ki je poleg koncentracije razpoložljivih celic bistven za izračun adsorpcijske konstante (enačba 14, str. 24). V preglednici 3 so povzeti rezultati vseh petih premic (nakloni premic, vrednost R^2 za vsako premico, koncentracija celic (razpoložljivih za adsorbcijo) in adsorpcijska konstanta in končno povprečna adsorpcijska konstanta sistema, ki je glavni rezultat adsorpcijskih poskusov.

Prikazanim grafom je bilo mogoče določiti padajoče trendne črte, zato je bilo mogoče iz negativnih naklonov in koncentracije gostiteljskih celic izračunati adsorpcijsko konstanto bakteriofaga T4. Končni rezultat adsorpcijskih poskusov je torej povprečna adsorpcijska konstanta, ki znaša $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min.

Preglednica 5: Ključne količine za določanje adsorpcijske konstante sistema *C. jejuni* in PC5

Oznaka poskusa	Naklon premice	R^2 izrisane premice	Koncentracija celic (CFU/mL)	Adsorpcijska konstanta (mL/min)
A1	-0,032	0,93	$8,5 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^{-10}$
A2	-0,046	0,81	$9,2 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^{-10}$
A3	-0,071	0,87	$9,2 \cdot 10^7$	$7,7 \cdot 10^{-10}$
B1	-0,026	0,68	$9,9 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^{-10}$
B2	-0,024	0,75	$9,9 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^{-10}$
Povprečna adsorpcijska konstanta		$4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min		

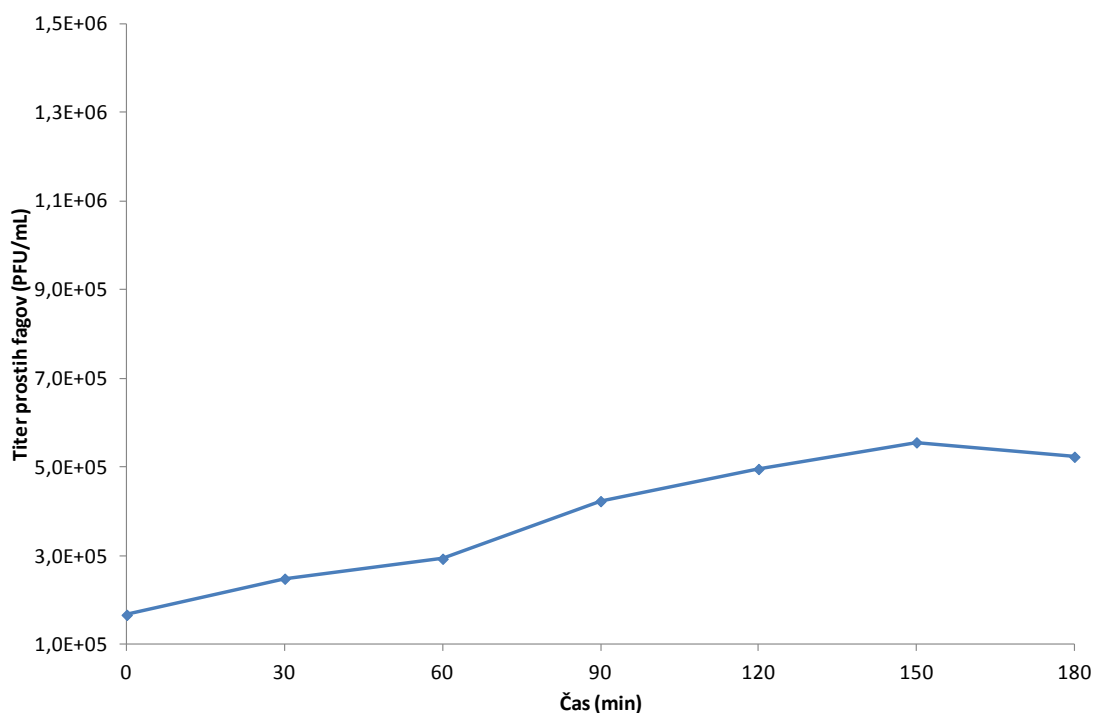


Slika 14: Grafi naravnega logaritma prostih fagov v odvisnosti od časa prikazujejo padanje prostih fagov v času 20 minut, na vsakem grafu je vidna enačba premice in R^2 , za nadaljnje izračune je najpomembnejši naklon premice

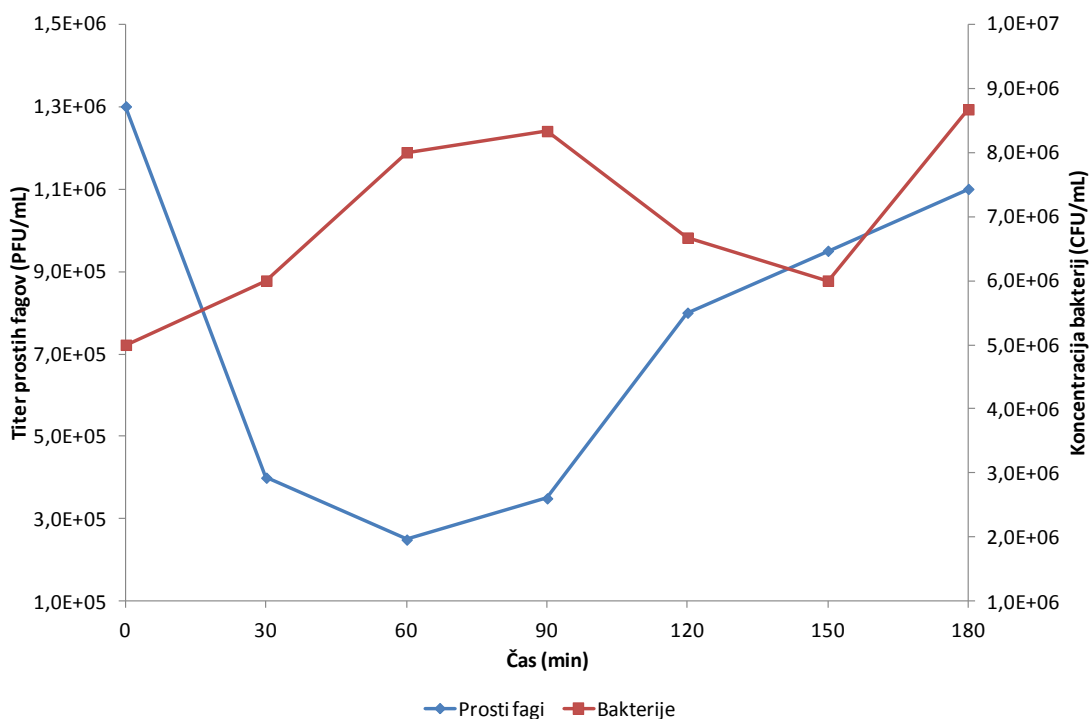
4.2.2 Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga PC5

Po zgledu rezultatov T4 in *E. coli* so v tem poglavju predstavljeni tudi rezultati sistema PC5 in *C. jejuni*. Rezultati so grafično prikazani na slikah 15-18. Tudi tokrat gre za prikaz titra prostih bakteriofagov v času in ponekod tudi koncentracije bakterij. Tokrat so potekale meritve v bistveno daljšem časovnem obdobju, saj so bili procesi bistveno počasnejši. Posledično je bilo tudi pobiranje vzorcev redkejše. Poskusa A in B (sliki 15 in 16) sta preprosti rastni krivulji bakteriofaga PC5. Poskusa C in D (sliki 17 in 18) vsebujeta tudi dva dodatna vzorca, in sicer vzorec, tretiran z 1% kloroformom (ubije bakterije) ter vzorec tretiran s kloroformom in 1,5 M NaCl (povzroči desorbcijo reverzibilno vezanih fagov). Namen omenjenih vzorcev je bil ugotoviti, ali gre morda pri naraščanju bakteriofagov zgolj za nekakšne naključne dogodke in desorbcijo reverzibilno vezanih fagov ali dejansko za pomnoževanje znotraj gostitelja.

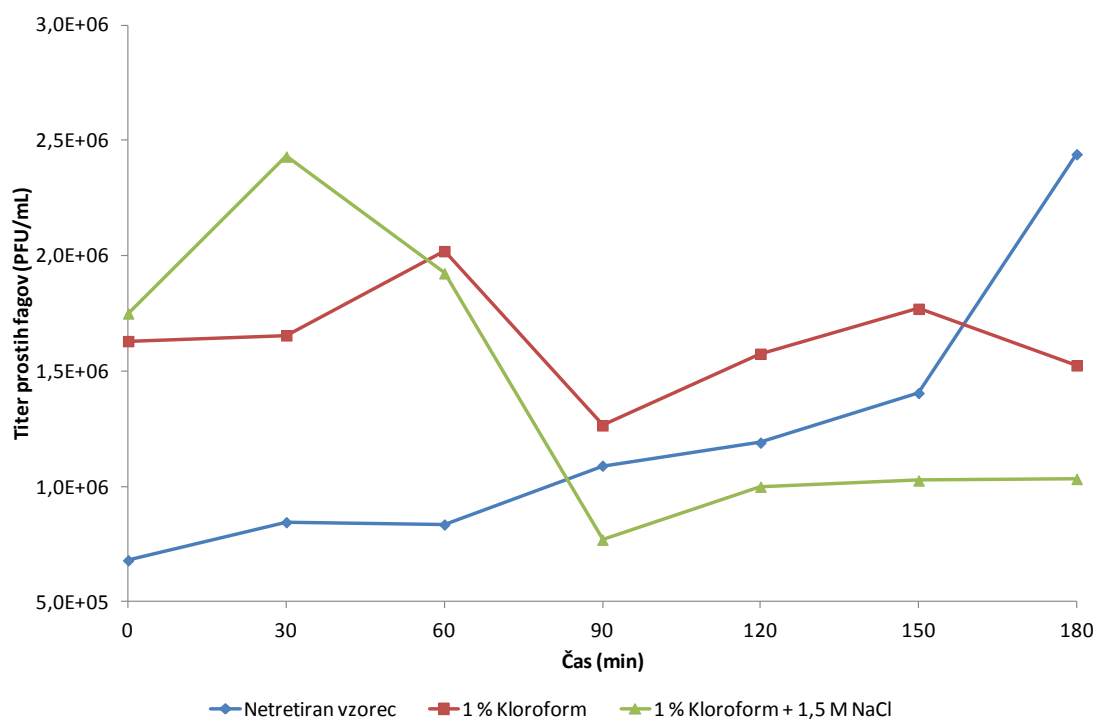
Na sliki 15 so prikazani rezultati poskusa A. Na grafu, ki prikazuje spreminjanje titra prostih fagov v mediju v času 180 minut, lahko vidimo počasno naraščanje. Graf nima oblike tipične bakteriofagne rastne krivulje, saj nista razvidna spodnji in zgornji plato ter izrazit skok med njima. Še najizrazitejši skok lahko vidimo med 60. in 90. minuto. Latentna perioda bi lahko torej znašala približno 60 minut. Pomnožitev bakteriofagov v tem poskusu je bila zelo nizka. Nastalo je vsega $3,9 \cdot 10^5$ PFU/mL novih bakteriofagov. Namnožitveno število znaša 0,18, kar pomeni manj kot 1 bakteriofag na 5 bakterijskih celic. Podoben poskus (B) je prikazan na sliki 16. Tokrat je na grafu poleg titra prostih fagov prikazana tudi koncentracija bakterij. Če odmislimo prvo točko na grafu, izgleda graf titra prostih fagov nekoliko bolj podoben stereotipni rastni krivulji bakteriofaga. Začetni del spominja na spodnji plato, nato sledi dokaj visok porast v vrednosti $8,5 \cdot 10^5$ PFU/mL. Tudi zgornji del grafa izgleda kot bi prehajal v plato (če bi bilo morda pobranih več vzorcev). Krivulja bakterij kaže obratne trende glede na krivuljo prostih bakteriofagov. Z izjemo zadnje točke krivulja bakterij raste, ko bakteriofagi upadajo in obratno. Največji porast bakteriofagov se zgodi med 90. in 120. minuto, zato je latentna perioda v tem poskusu trajala okoli 90 minut. Čeprav je porast bakteriofagov veliko izrazitejši od prvega poskusa, je namnožitveno število še manjše (okoli 0,11), saj je bilo v mediju prisotnih več bakterij.



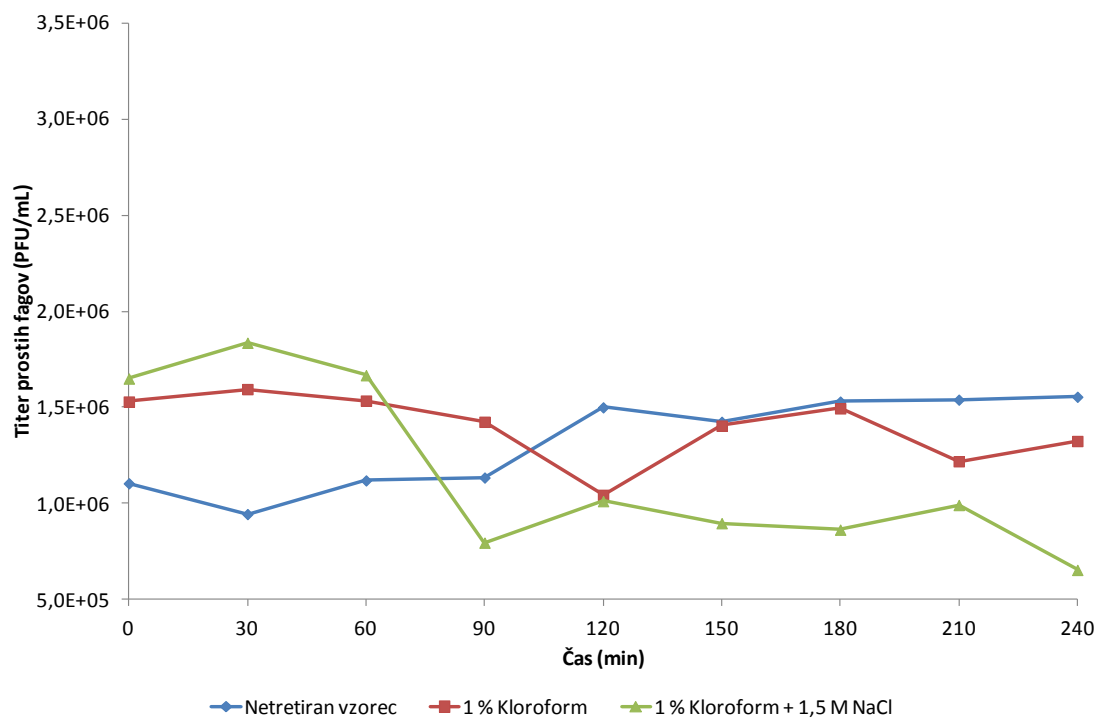
Slika 15: Poskus A; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay)



Slika 16: Poskus B; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay), bakterije so bile določene z metodo štetja kolonij



Slika 17: Poskus C; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay)



Slika 18: Poskus D; titer prostih fagov v mediju v času; titer prostih fagov je bil določen z metodo štetja plakov (t.i. plaque assay)

Preglednica 6: Masne bilance fagov poskusov A-D (slike 15-18), predstavljene kot absolutna števila fagov (PFU) (število fagov je pomnožek koncentracije s celotnim volumnom suspenzije v posodi), / pomeni, da ni podatka

Vzorec	Skupno število fagov (PFU)			
	Poskus A	Poskus B	Poskus C	Poskus D
Vsi (razpoložljivi) fagi	$3,5 \cdot 10^7$	$9,2 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$
Po 1. centrifugiranju (supernatant)	$1,0 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^7$	$6,9 \cdot 10^7$
Po 2. centrifugiranju (supernatant)	$1,8 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^6$
Infektivni centri	/	/	/	$7,0 \cdot 10^7$
V brozgi (začetek rastne krivulje, čas 0)	$8,3 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$
Vse (razpoložljive) bakterije (CFU)	$2,2 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$
MOI	1,6	0,5	12,5	10,4

Na sliki 17 in 18 so prikazani rezultati poskusa C in poskusa D. Poskusa, sta vsebovala še dodatna vzorca, kjer so bile še celice tretirane s kloroformom in celice tretirane s kloroformom ter NaCl. Na grafu poskusa C (slika 17) ni povsem konvencionalne rastne krivulje. Sicer je viden spodnji in delno tudi zgornji plato, ima tudi dokaj izrazit porast med 60. in 90. minuto, a je na koncu prisoten še zelo močan skok titra bakteriofagov, ki izgleda kot drugi cikel pomnoževanja. Posledično je bil naslednji poskus D daljši, da bi lahko videli, ali je zares prisoten drugi cikel. Vidimo, da se pri poskusu D omenjen porast prostih fagov ni zgodil in lahko vidimo dokaj običajno rastno krivuljo bakteriofaga, ki ima spodnji in zgornji plato ter nenaden skok. Skok se je zgodil med 90. in 120. minuto. Latentna perioda znotraj poskusa C in D je torej 60 oziroma 90 minut. Namnožitveno število pri poskusih C in D je glede na poskusa A in B višje za skoraj 2,5-krat, pri poskusu C nastane $7,3 \cdot 10^5$ PFU/mL, pri poskusu D pa $6,1 \cdot 10^5$ PFU/mL novih bakteriofagov (namnožitveno število 0,44 oz. 0,24). Zanimivi in dobro ponovljivi so tudi trendi krivulj, ki prikazujejo titre prostih fagov, ki smo jim takoj po adsorpciji ubili s 1% kloroformom. Obe krivulji (poskus C in D) imata podobno obliko, ki spominja na plosko črko M ali oddaljeno ptico v letu. Začetne vrednosti so višje od prostih fagov so višje od netretiranega vzorca. Tudi obe krivulji, ki sta bili poleg kloroforma vsebovali še 1,5 M NaCl, imata podobne trende. Za obe je značilen narast prostih fagov v prve pol ure in nato drastičen upadeč, čeprav je porast in nato padec precej bolj izrazit pri poskusu C kot D.

Preglednica 7: Povprečna latentna perioda in namnožitveno število sistema PC5-*C. jejuni* v poskusih A-D

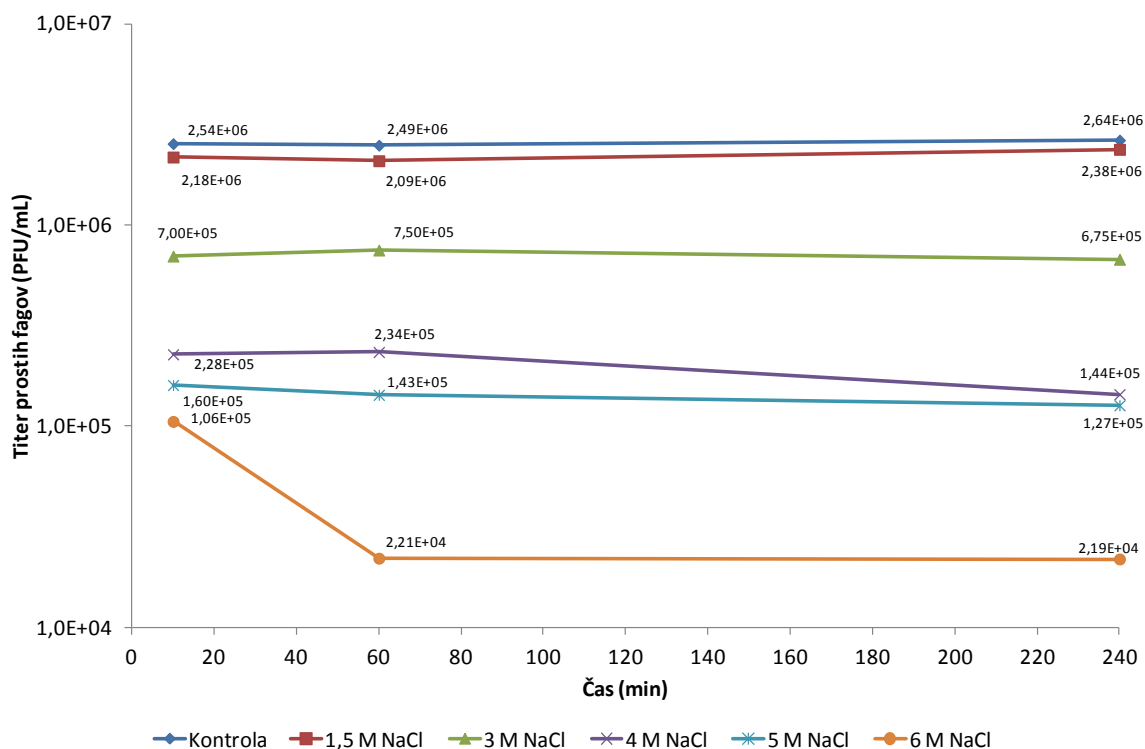
Oznaka poskusa	Latentna perioda (min)	Narast bakteriofagov (PFU/mL)	Razpoložljive bakterije (CFU/mL)	Namnožitveno število (PFU/bakterija)
A	60	$3,9 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^6$	0,18
B	90	$8,5 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^6$	0,11
C	60	$7,3 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^6$	0,44
D	90	$6,1 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^6$	0,24
Povprečna latentna perioda		60-90 min		
Povprečno namnožitveno število		0,24 PFU/CFU		

Oglejmo si še masne bilance bakteriofagov v poskusih A, B, C in D. V poskusu A je bilo na voljo $3,5 \cdot 10^7$ PFU. V reakciji adsorbcije se je na bakterije vezalo okoli 71% bakteriofagov, kar pomeni približno $2,5 \cdot 10^7$ PFU, ostali so ostali v supernatantu 1. centrifugiranja. Opravljeno je bilo tudi 2. centrifugiranje (spiranje), ki je odstranilo reverzibilno vezane bakteriofage. Skupno število vezanih bakteriofagov je torej okoli $2,3 \cdot 10^7$ PFU. V 1 mL medija je bilo na začetku prisotnih tudi $2,2 \cdot 10^7$ CFU (MOI = 1,6). Glede na število vezanih in desorbiranih fagov je bil na vsako celico gostitelja vezan povprečno 1 bakteriofag. V poskusu B je bilo na voljo $9,2 \cdot 10^7$ PFU bakteriofagov. V reakciji adsorbcije se je na bakterije vezalo okoli 81% bakteriofagov, kar pomeni približno $7,5 \cdot 10^7$ PFU. Po 1. in 2. centrifugiranju (spiranju), kjer se je del bakteriofagov (nevezani in reverzibilno vezani) odstranil, je ostalo torej $7,3 \cdot 10^7$ PFU vezanih fagov. V mediju je bilo prisotnih tudi $1,8 \cdot 10^8$ CFU gostiteljskih celic (MOI = 0,5), kar glede na število vezanih fagov pomeni le okoli 0,4 bakteriofaga na celico. Ker je bilo tokrat bakteriofagov manj kot celic, smo za osnovo izračuna namnožitvenega števila uporabili vezane fage. V poskusu C je bilo na voljo $2,1 \cdot 10^8$ PFU bakteriofagov. V reakciji adsorbcije se je na gostitelja vezalo okoli 70% bakteriofagov, kar pomeni približno $1,5 \cdot 10^8$ PFU. Po 1. in 2. centrifugiranju (spiranju), kjer se je del bakteriofagov (nevezani in reverzibilno vezani) odstranil, je ostalo okoli $1,4 \cdot 10^8$ PFU vezanih fagov. V mediju je bilo prisotnih tudi $1,7 \cdot 10^7$ CFU gostiteljskih celic (MOI = 12,5). Če gledamo število vezanih fagov, to pomeni približno 8,1 bakteriofaga na celico. V poskusu D je bilo na voljo $2,8 \cdot 10^8$ PFU bakteriofagov. V reakciji adsorbcije se je na gostitelja vezalo okoli 75% bakteriofagov, kar pomeni približno $2,1 \cdot 10^8$ PFU. Po 1. in 2. centrifugiranju (spiranju), kjer se je del bakteriofagov (nevezani in reverzibilno vezani) odstranil, je ostalo okoli $2 \cdot 10^8$ PFU vezanih fagov. V mediju je bilo prisotnih tudi $2,7 \cdot 10^7$ CFU gostiteljskih celic (MOI = 10,4). Če gledamo število vezanih fagov, to pomeni približno 8 bakteriofaga na celico. Podatki o infektivnih centrih so na voljo le za poskus D, saj v prejšnjih paralelkah niso bili vidni plaki na ploščah (torej ni bilo mogoče kvantificirati fagov v vzorcih. Prikazani pa so podatki o reverzibilno vezanih bakteriofagih, ki so se pojavili v brozgi bioprocesa ob času 0. Več jih je bilo v vzorcih, kjer je bilo prisotnih na začetku več razpoložljivih fagov (poskusa C in D). Povzetek masnih bilanc vseh štirih poskusov prikazuje preglednica 6. Prva dva vzorca (vsi razpoložljivi fagi

in fagi po centrifugiranju) tudi tokrat služita za izračun uspešnosti vezave bakteriofagov, ki smo jo predstavili v tem odstavku. MOI v preglednici 6 je bil izračunan kot količnik vseh razpoložljivih fagov na začetku in vseh razpoložljivih bakterij.

4.2.2.1 Vpliv NaCl na stabilnost bakteriofaga PC5

V poskusih s *C. jejuni* in fagom PC5, kjer smo uporabili mrtve celice in NaCl (sredstvo desorbcije), smo zaznali skokovit narast prostih fagov v mediju in nato močan padec titra. Padec bi lahko bil tudi posledica prisotnosti soli v mediju, saj soli zmanjšujejo stabilnost/viabilnost bakteriofagov in posledično znižujejo titer (Whitman in sod., 1971; Lark in sod., 1953; Yamamoto, 1968). Na sliki 19 so prikazani rezultati testiranja vpliva različnih slanosti (molarnosti) na stabilnost bakteriofaga PC5.



Slika 19: Spreminjanje koncentracije prostih fagov v mediju v času 4 ur glede na prisotnost različnih koncentracij soli v mediju in primerjava s kontrolo (modra črta)

Na vrhu slike 19 vidimo z modro obarvano črto, ki predstavlja kontrolo. Vrednosti so pričakovano konstantne v času, saj kontrola ni vsebovala dodatnih soli. Pri vzorcih, ki so vsebovali dodane višje molarnosti soli, je opazen trend, ki je precej konsistenten. Opazen je takojšen učinek, saj je mogoče opaziti večje padce titrov že po 10 minutah glede na kontrolo. Te vrednosti se kasneje ne spreminjajo. Izjema je le krivulja 6 M NaCl. 6 M raztopina NaCl ima morda takojšen in še zapoznel učinek na stabilnost bakteriofagov.

zaradi zelo velike vsebnosti soli. Poskus je potekal 4 ure, saj je toliko časa potekal tudi poskus določanje latentne periode in pomnožitvenega števila. Vzorec, ki nas pravzaprav najbolj zanima, je 1,5 M NaCl. Ta ne pokaže izrazitega upada glede na kontrolo, saj se vrednost zniža le za okrog 15% (morda je razlika tudi posledica eksperimentalne napake).

Preglednica 8: Delež preživelosti bakteriofagov v različnih molarnostih NaCl glede na kontrolo

	Kontrola	1,5 M	3 M	4 M	5 M	6 M
Povprečen titer fagov (PFU/mL)	$2,6 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^4$
Preživelost (%)	100	87	22	8	6	2

5 RAZPRAVA

5.1 REZULTATI POSKUSOV Z *E. coli* IN BAKTERIOFAGOM T4

5.1.1 Rastna krivulja *E. coli* DSM613

Cilj poskusa je bil določiti, kako hitro po 10-kratnem redčenju s svežim gojiščem preidejo celice iz shranjene kulture v eksponentno fazo rasti, saj so za ponovljivo delo z bakteriofagi potrebni standardni protokoli z bakterijami v eksponentni fazi rasti. Želeli smo tudi ugotoviti, ali je mogoče hraniti prekonočno kulturo v hladilniku na 4 °C vsaj en teden in potem iz nje pripravljati sveže eksponentne kulture brez bistvenih sprememb v rasti bakterij.

S poskusom, ki je prikazan na sliki 10 (str. 33) smo pokazali, da je metoda pripravljanja prekonočne kulture *E. coli*, ki jo hranimo en teden v hladilniku in nato iz nje dnevno pripravljamo sveže eksponentne kulture, uporabna in zelo praktična. Metoda daje dobre in ponovljive rezultate za delo z bakteriofagi (T4). Prekonočno kulturo redčimo le minimalno (10-kratna redčitev) v svežem in predhodno ogretem mediju na 37 °C. Rast celic je posledično zelo hitra in takojšnja, saj s polurnim vzorčenjem ne zaznamo nikakršne lag faze. Vse krivulje na sliki 10 imajo tipično obliko, ki je značilna za eksponentno rastoče organizme. Glede na hitro dinamiko podvajanja celic smo določili, da bomo redčene kulture inkubirali 90 minut, saj se celice med 30. in 120. minuto zagotovo nahajajo v eksponentni fazi rasti. V tem času doseže kultura gostoto $2 \cdot 10^8$ CFU/mL, kar povsem zadošča za nadaljnje delo z bakteriofagi. Na grafu lahko vidimo, da spremljanje rasti z absorbanco pri 600 nm daje zanesljive informacije o uspešnosti rasti kulture. Absorbanca pri 600 nm v času je bila pomerjena tudi kulturi, ki je bila hranjena en teden v hladilniku na 4 °C. Bistvene razlike v rasti sveže pripravljene in teden stare kulture ni moč zaznati. Teden stara kultura ima celo nekoliko več celic na začetku, saj so se verjetno celice podvajale kljub nizki temperaturi. Krivulja se zaradi rahlo višjih vrednosti nahaja nad krivuljo rasti sveže kulture. Kultura torej lahko brez težav stoji na 4 °C do uporabe vsaj en teden. Omenjen način priprave eksponentne kulture je hkrati tudi zelo prikladen, saj omogoča kontinuirno vsakodnevno delo, saj je lahko založna kultura vedno na voljo, hitra priprava eksponentne kulture (le 90 minut inkubacije) pa omogoča možnost večje količine dela v času običajnega delavnika.

5.1.2 Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante T4 na *E. coli* DSM613

Običajno se afiniteto bakteriofaga do svojega gostitelja (stopnja adsorbcije) predstavi s posebno količino – adsorpcijsko konstanto. Ta naj bi bila enaka za poljubno izbrano homogeno suspenzijo bakterij in njihovih bakteriofagov iste vrste v nespremenjenih pogojih adsorbcije. Adsorpcijsko konstanto se izračuna kot količnik koeficienta padajoče

premice prostih fagov in koncentracije razpoložljivih gostiteljskih celic (enačba 12, str. 23).

Za namen določanja adsorpcijske konstante T4 je bilo opravljenih 5 poskusov. Padajočim točkam (prosti fagi v času) na grafu smo s pomočjo metode linearne regresije (Microsoft Excel 2007) določili trendno premico, ji določili enačbo in R^2 kot merilo kakovosti premice. Rezultati adsorpcijskih poskusov so prikazani na sliki 11 (str. 34). Titer prostih bakteriofagov je tekom vseh 5 poskusov upadal in posledično ima vseh 5 premic padajoče trende (negativni koeficienti premic). Če se osredotočimo na R^2 premic, vidimo zelo različne stopnje sipanja točk okoli določene trendne premice. V primeru poskusov A in B1 imamo zelo kakovostni premici z visokim R^2 ($> 0,9$). Premici iz poskusov B2 in C2 sta nekoliko slabši, saj imata R^2 le okoli 0,4. Največje sipanje pa lahko opazimo pri premici poskusa C1, kjer izrazito odstopata dve točki in posledično R^2 znaša bistveno manj, le okrog 0,08. Sipanje je najverjetneje posledica metode. Določanje titra je potekalo z metodo štetja plakov, in sicer v duplikatih (t.j. 2 plošči/ponovitvi za vsak vzorec). Metoda štetja plakov daje precej variabilne rezultate. Kakršnakoli hotena ali nehotena sprememba eksperimentalnih pogojev lahko privede do bistvenih odstopanj. Zelo pomembni so standardizirani postopki in izvedba poskusa. Posebno občutljiva je faza adsorpcije bakteriofagov na gostitelja, saj v tem koraku lahko vsaka sprememba medija bistveno vpliva na število fagov, ki bodo uspešno našli gostitelja, se pomnožili in tako postali vidni na plošči v obliki cone lize. Pomembna je tudi faza opazovanja in štetja plošč, ki je naslednji poznan vir napak (dostikrat raziskovalci preštejejo različno število plakov na isti plošči). Variabilnost metode štetja plakov je torej lahko od 5 do celo 40% in več (Shurtleff, 2012; Bae, 2003). Posledica omenjenega je po drugi strani tudi relativno velika variabilnost naklonov premic, ki variirajo od -0,02 do 0,08. Iz dobljenih naklonov in koncentracij gostiteljskih celic je bilo mogoče izračunati adsorpcijske konstante sistema.

Končni rezultat predstavlja povprečna adsorpcijska konstanta, ki smo jo pridobili iz adsorpcijskih konstant petih poskusov. Ta znaša $2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min. Adsorpcijske konstante na intervalu $2 \cdot 10^{-9}$ ml/min štejemo med visoke adsorpcijske konstante, 10-krat ali večkrat manjšim pravimo nizke adsorpcijske konstante (Bull in sod., 2010). Glede na omenjeno je določena adsorpcijska konstanta razmeroma nizka in priča o dokaj počasni adsorpciji pri danih pogojih. Pogoji, v katerih poteka adsorpcija, bistveno vplivajo na to, kako hitro se bo bakteriofag pritrdil na bakterijo. Da bi ugotovili, zakaj je adsorpcijska konstanta nizka, moramo preučiti pogoje, v katerih smo izvedli adsorpcijo. Možnih razlogov za razmeroma nizko stopnjo adsorpcije je več. En razlog za majhno adsorpcijsko konstanto bi lahko bila odsotnost konkretnejšega mešanja oz. stresanja medija. Naši poskusi so temeljili na zelo rahlem občasnem premešanju z roko (obračanje centrifugirke z adsorpcijsko suspenzijo na glavo in nazaj), z namenom zagotavljanja homogenosti medija skozi celoten poskus. Torej je gibanje delcev znotraj suspenzije potekalo skoraj izključno z difuzijo. Intuitivno bi lahko predvidevali, da bi bila adsorpcijska konstanta v primeru

mešanja/stresanja višja, saj se z gibanjem tekočin povečuje verjetnost trka dveh delcev – bakteriofaga in bakterije. Mešanje ali stresanje med adsorpcijskim poskusom ni redka praksa. Kot primer si lahko ogledamo študijo adsorpcije faga λ na *E. coli*, ki sta jo izvedla Shao in Wang (2008). Nizka stopnja adsorpcije bi lahko bila tudi posledica ionske sestave medija. Medij za adsorpcijo je bil običajen LB medij brez kakršnihkoli dodatkov. Dodatek optimalne koncentracije soli, ki ob disociaciji prispevajo dvovalentne katione, dostikrat pozitivno vpliva na adsorpcijo. Adsorpcijska konstanta je posledično višja. Posebej dodanih dvovalentnih kationov v adsorpcijskem mediju naših poskusov ni bilo, zato bi lahko bila adsorpcijska konstanta nižja tudi zaradi tega razloga. Naslednji dejavnik, ki bi lahko vpliv na adsorpcijo, je temperatura, pri kateri so bili izvedeni poskusi. Zaradi primerljivosti med obema sistemoma, ki sta bila preučevana in zaradi želje po čim manjšem spreminjanju števila bakterijskih celic (delitev) so bili poskusi adsorpcije izvedeni pri sobni temperaturi. Veliko adsorpcijskih poskusov je zaradi omenjene težave z rastjo bakterij izvedenih pri nižji temperaturi ali mrtvih celicah (Delbrück, 1940). A vendar so na primeru bakteriofaga λ in *E. coli* pokazali, da ima lahko temperatura nezanemarljiv vpliv na hitrost adsorpcije. Ugotovili so, da je adsorpcija pri 4 °C 30-krat počasnejša, kot če poskus izvedejo pri 40 °C (Moldovan in sod., 2007).

5.1.3 Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga T4

Poleg adsorpcijske konstante za karakterizacijo rasti bakteriofaga potrebujemo še dva druga parametra – dolžino latentne periode (čas od adsorpcije do pojava novega zaroda bakteriofagov) in namnožitveno število. Oba omenjena parametra odčitamo oz. izračunamo iz rastne krivulje, ki je rezultat t.i. enostopenjskega poskusa. Konec latentne periode prepoznamo po strmem porastu titra prostih fagov, namnožitveno število pa izračunamo iz omenjenega porasta bakteriofagov, ki ga delimo s koncentracijo razpoložljivih celic (enačba 14, str. 24). Poleg omenjenih parametrov smo posebno pozornost namenili tudi masnim bilancam bakteriofagov, ki govorijo o uspešnosti in naravi adsorpcije.

Za določanje latentne periode in namnožitvenega števila smo izvedli dva poskusa. Rezultati so grafično prikazani na sliki 12 in 13 (str. 36). Na obeh grafih je na primarni osi prikazan titer prostih fagov in na sekundarni osi koncentracija bakterij. Pri prvem poskusu je titer prostih fagov prikazan dvakrat, saj je bil titer določen s klasično metodo štetja plakov in metodo štetja plakov v kapljici. Krivulji je kljub manjši zanesljivosti slednje metode mogoče primerjati, zato smo prikazali na istem grafu rezultate obeh metod. Čeprav se vrednosti (titri) med obema krivuljama razlikujejo, vseeno lahko vidimo določeno podobnost obeh krivulj. Obe krivulji imata enake trende, saj obe začneta hitro naraščati, nato obe brez pravega platoja preideta v fazo upadanja titra. Z obema poskusoma smo pridobili rastni krivulji bakteriofaga T4, ki nimata povsem stereotipne oblike. Če si namreč ogledamo obe krivulji, vidimo, da se ne pričeneta z zelo izrazitim spodnjim platojem, saj

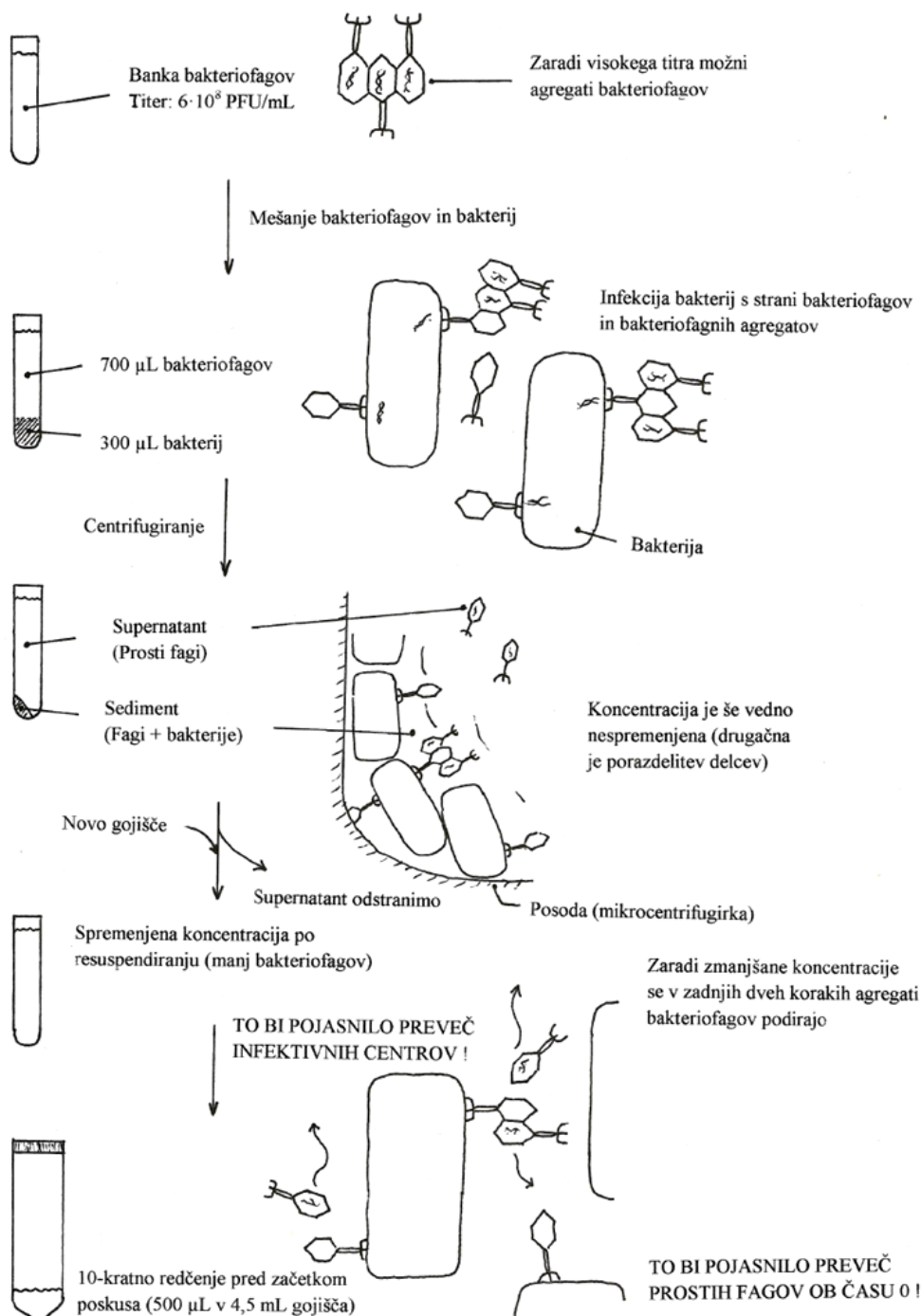
pride do izrazitega naraščanja bakteriofagov zelo kmalu. Latentna perioda sistema se torej zdi izredno kratka. Največji skok bakteriofagov se je pri obeh poskusih zgodil skozi dva intervala vzorčenja, zato smo latentno periodo postavili na sredino vzpenjajočega se dela grafa. Tako se latentna perioda poskusa A konča po 10 minutah. Latentne periode drugega poskusa je konec po 20 minutah. Povprečna latentna perioda obeh poskusov je torej 15 minut. Prav tako nobena od obeh krivulj nima izrazitega gornjega platoja, saj prične v obeh primerih titer bakteriofagov po doseženem vrhu (konec lize bakterijskih celic) upadati.

Razlog za upadanje titra prostih fagov po sprostitvi iz celic bi lahko bila adsorbcija na ostanke bakterijskih celic, saj liza celice ne poteče tako, da bi povsem »izbrisala« bakterijske celice. Novonastali bakteriofagi se zato lahko vežejo na preostanke gostiteljskih celic, saj bakteriofagi ne razlikujejo med »živim in neživim« prepoznavnim mestom. Tovrstna adsorbcija je toliko pogostejša in bolj izrazita, kadar delamo z visoko koncentriranimi suspenzijami fagov in bakterij. V našem primeru je bila suspenzija razmeroma koncentrirana. Adsorpcijska mešanica bakterij in fagov je vsebovala približno $8 \cdot 10^7$ CFU/mL bakterij in približno $4 \cdot 10^8$ PFU/mL bakteriofagov. Po 10-kratnem redčenju, se je sicer koncentracija bakterij 10-krat znižala. Vendar je tudi ta koncentracija razmeroma visoka, poleg tega je nastalo po lizi še dosti novih bakteriofagov in tako je bilo v vrhnji točki grafa prisotnih okrog $1,3 \cdot 10^8$ PFU/mL prostih bakteriofagov, ki so pričeli iskati novega gostitelja. Novih gostiteljev v mediju sicer ni bilo na voljo, kar je lepo razvidno iz rastne krivulje bakterij (rdeča črta na grafu), a so bili v mediju prisotni ostanki liziranih celic. Padca sicer ne moremo pojasniti s konstanto adsorbcije, ki smo jo določili v naših poskusih, saj bi morala biti za tak padec, kot ga vidimo na grafu, adsorpcijska konstanta 2-krat (poskus B) oz. celo 5-krat višja. Morda so ostanki celic po lizi celo bolj dostopni za vezavo bakteriofagov, saj bi se utegnili površina liziranih celic povečati.

Po končani lizi je titer prostih fagov narastel za nekaj manj kot $8 \cdot 10^7$ PFU/mL. Glede na to, da je bilo v suspenziji prisotnih približno $8 \cdot 10^6$ CFU/mL bakterij, pomeni, da znaša namnožitveno število 10. To pomeni, da je na vsako celico gostitelja v povprečju nastalo 10 novih bakteriofagov. Namnožitveno število 10 je za bakteriofage dokaj nizko. Vendar tako nizko namnožitveno ni v neskladju z dosedanjimi znanji o bakteriofagih in matematičnimi modeli, ki napovedujejo rast. Kot smo že pisali v pregledu objav, je najbolj običajno namnožitveno število povezano z dolžino latentne periode. V primeru konstantne kakovosti bakterij, konstantne stopnje adsorbcije, konstantne ekliptične periode in konstantne stopnje zorenja (maturacije) fagov je namnožitveno število funkcija latentne periode. S podaljšanjem latentne periode oz. natančneje časa po ekliptični periodi se namnožitveno število povečuje linearno. Opisano medsebojno odvisnost latentne periode in namnožitvenega števila podaja enačba 5 (str. 9). Kot se je izkazalo v naših poskusih je latentna perioda izredno kratka – le okrog 15 minut. Zdi se torej smiselno zaključiti, da je nizko namnožitveno število posledica izredno kratke latentne periode, znotraj katere se preprosto ni uspelo namnožiti in sestaviti več kot 10 fagov na celico.

Zanimiv segment za razpravo predstavljajo tudi masne bilance (uspeh adsorbcije). Bistvo spremljanja masnih bilanc je pravzaprav preveriti uspešnost adsorbcije. To pomeni, kakšen delež bakteriofagov se je sploh vezal na gostitelja in kolikšen delež se je desorbiral z gostitelja ob redčenju (dodatku svežega gojišča), ker je bil vezan le reverzibilno. V poglavju 3.2.2, kjer smo med drugim predstavili metodologijo določanja masnih bilanc, smo zapisali, da seštevek vseh ostalih frakcij bakteriofagov (fagi po centrifugiranju, infektivni centri in prosti fagi ob času 0) znaša točno toliko, kot je bilo razpoložljivih fagov na začetku. Tako je sicer v teoriji, a v praksi se vedno spopadamo z merilno negotovostjo povezano z metodami detekcije. Vseeno se običajno odstopanja za več kot 20% ne pričakuje. Masne bilance naših poskusov se ne izidejo niti približno, saj seštevek vseh bakteriofagnih frakcij bistveno presega število fagov, ki smo jih dali na začetku v reakcijo (pregl. 3, str. 35). Seštevek ostalih frakcij je pravzaprav skoraj 2-krat višji od razpoložljivih fagov. Masna bilanca je ponovljiva, podobna v obeh poskusih, zato omenjena anomalija verjetno ni posledica metode detekcije. Razlog za nenavadne masne bilance bi lahko predstavljal pojav bakteriofagnih agregatov. Problem fagnih agregatov je v tem, da ne moremo vedeti ali je plak na plošči zares posledica enega bakteriofaga ali celotnega agregata, ki se vede kot ena plakotvorna enota (PFU). Visoke koncentracije bakteriofagov (npr. $> 10^6$ PFU/mL), ki se rutinsko uporabljajo v eksperimentalnem delu, niso značilne za naravne ekosisteme. Bakteriofagi pri tako visokih koncentracijah (podobno kot proteini) pričnejo tvoriti skupke/agregate (Langlet in sod., 2007). Proces je reverzibilen in bistveno pogojen s pH, ionsko sestavo medija in temperaturo. Proces tvorbe agregatov in odvisnost od pH medija so npr. uspešno preučili na primeru kolifaga MS2. Visoke koncentracije bakteriofagov so bile prisotne tudi ves čas znotraj naših poskusov, zato se zdi prisotnost agregatov mogoča oz. celo zelo verjetna. Pri poskusih je bilo v nekaterih korakih prisotno redčenje, ki bi lahko podiralo agregate. Iz teh agregatov, ki so se prej obnašali kot ena plakotvorna enota, bi potemakem nastali posamezni bakteriofagi. Posledica tega bi bil višji titer bakteriofagov glede na predhodno stanje, saj bi se namesto ene agregatne plakotvorne enote pojavila npr. dve ali tri plakotvorne enote posameznih fagov. Shematski potek izvedbe adsorbcije enostopenjskega poskusa (določanje latentne periode in namnožitvenega števila) in možno dogajanje na mikroskopskem nivoju je prikazano na sliki 20 (str. 52). Iz slike je razvidno, da je bilo redčenje prisotno v dveh korakih. Prvič smo dejansko redčili že po centrifugiranju, s katerim smo odstranili proste fage, ki se niso adsorbirali in dodali svež medij. Tako smo koncentracijo fagov zmanjšali za frakcijo prostih fagov. Drugič smo redčili tik pred začetkom enostopenjskega poskusa, saj smo adsorpcijsko mešanico desetkrat redčili v svežem gojišču. Ob predpostavki, da se z vsakim redčenjem, ki zniža koncentracijo fagov, posledično podirajo agregati fagov, bi bilo mogoče pojasniti dobljene masne bilance poskusov. Največjo napako masnih bilanc namreč predstavljajo infektivni centri in bakteriofagi v brozgi ob času 0. Obe omenjeni vrednosti sta bili pomerjeni po redčenju adsorpcijske mešanice, ko so se agregati bakteriofagov lahko podirali. Infektivni centri so bili namreč izmerjeni po odstranitvi

prostih fagov po centrifugiranju. Prosti fagi ob času 0 pa so bili pomerjeni takoj po 10-kratni redčitvi adsorpcijske mešanice v svežem mediju. Glede na napisano torej predlagamo možno interpretacijo masnih bilanc s pomočjo bakteriofagnih agregatov, ki se tvorijo pri višjih koncentracijah in podirajo pri nižjih.



Slika 20: shematski prikaz dogajanja med adsorbcijo (enostopenjski poskus), na levi strani je prikazan fizični prikaz poskusa, na desni je prikazano možno dogajanje na mikroskopskem nivoju (ilustracija: Peter Horvat)

Možna bi bila tudi nekoliko enostavnejša interpretacija masnih bilanc. Iz grafov je razvidno, da se procesi namnoževanja T4 v danih pogojih odvijajajo zelo hitro. Latentna perioda tega bakteriofaga je v danih pogojih zelo kratka. Preden smo dejansko začeli pobirati vzorce za izris rastne krivulje faga je preteklo kar nekaj časa. Najprej smo izvedli adsorbcijo (2 minuti vorteksiranja in 2 minuti inkubacije), nato smo še adsorpcijsko mešanico 10 minut centrifugirali, odstranili supernatant in ga zamenjali s svežim gojiščem. Nato smo pobrali tudi vzorce za določitev infektivnih centrov in šele nato redčili adsorpcijsko mešanico v svežem gojišču ter začeli pobirati vzorce, ki smo jim določili titer prostih fagov. Torej bi lahko med začetkom adsorbcije in začetkom prvega vzorčenja preteklo tudi do 15 minut. Glede na to, da je namnoževanje izredno hitro, bi se lahko življenjski cikel bakteriofagov, ki so se vezali prvi, že zaključil. Na ta način se je del bakteriofagov namnožil, še preden smo začeli vzorčiti. Omenjeno teorijo na nek način podpirajo masne bilance, saj s seštevkom frakcije fagov v supernatantu po centrifugiranju in frakcije infektivnih centrov dobimo vrednost, ki je zelo blizu vrednosti vseh razpoložljivih fagov, ki smo jih na začetku namenili za adsorbcijo. Na ta način pojasnimo tudi nepričakovano visoko vrednost prostih bakteriofagov ob času 0. Potrebno pa je tudi opozoriti, da je potemtakem tudi namnožitveno število bakteriofaga T4 višje, saj smo namnožitveno število izračunali iz porasta na grafu med točko 0 in najvišjo vrednostjo. Ta porast bi bil seveda ustrezno višji, če bi bila točka 0 nižje (oziroma zanemarljivo nizka, kot se tudi pričakuje).

5.2 REZULTATI POSKUSOV S *C. jejuni* IN BAKTERIOFAGOM PC5

5.2.1 Hitrost adsorbcije – določitev adsorpcijske konstante PC5 na *C. jejuni* LBA65

Afiniteto bakteriofaga PC5 do svojega gostitelja smo preverili na enak način kot smo to naredili pri bakteriofagu T4. Merili smo padec titra prostih fagov v homogeno premešani mešanici fagov in bakterij. Iz naklona padajoče premice in koncentracije gostiteljskih celic smo tudi tokrat izračunali adsorpcijsko konstanto.

Adsorpcijsko konstanto PC5 smo določili s pomočjo 5 poskusov. Obdelava rezultatov je potekala na enak način kot pri prejšnjem sistemu. Padajočemu titru prostih fagov smo s pomočjo metode linearne regresije (Microsoft Excel 2007) določili trendno premico, ji določili enačbo in R^2 kot merilo kakovosti premice. Rezultati adsorpcijskih poskusov so prikazani na sliki 14 (str. 39). Titer prostih bakteriofagov je pri vseh 5 poskusih upadal in posledično ima vseh 5 premic padajoče trende (negativni koeficienti premic). R^2 premic je tokrat dosti manj variabilen, kot v poskusih z T4 in *E. coli*. Premice so tokrat dosti bolj kakovostne, točke so manj razpršene okrog trendne črte (R^2 ni padel pod 0,68). Zanimivo je, da smo dobili dosti bolj kakovostne premice kljub uporabi identičnih metod detekcije in delu v duplikatih. Nekoliko bolj so variabilni nakloni premic, ki so prisotni na intervalu od -0,02 do -0,07.

Glede na prisotne padajoče trende premic je bilo mogoče izračunati adsorpcijske konstante posameznih poskusov. Končni rezultat tudi tokrat predstavlja povprečna adsorpcijska konstanta, ki smo jo pridobili iz adsorpcijskih konstant petih poskusov. Ta znaša $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min. Adsorpcijska konstanta je tudi tokrat razmeroma nizka. O možnih razlogih smo govorili že pri adsorpcijski konstanti sistema T4 in *E. coli*. Glede na to, da sta bili obe konstanti adsorpcije določeni na enak način in pod enakimi pogoji, bi lahko obe konstanti primerjali. Konstanta adsorpcije bakteriofaga PC5 je skoraj dvakrat višja od adsorpcijske konstante T4. Iz dobljenih rezultatov bi torej lahko sklepali, da ima bakteriofag PC5 nekoliko višjo afiniteto do svojega gostitelja kot T4. Zakaj je adsorpcijska konstanta oz. afiniteta PC5 do *C. jejuni* višja kot T4 do *E. coli*, ni lahko razložiti. Hitrost adsorpcije je namreč pogojena z mnogimi fiziološkimi in drugimi dejavniki. Dejavniki, ki bi lahko prispevali k razliki med konstantama adsorpcije, so: difuzivnost bakteriofaga, velikost in gibljivost bakterijske celice ter sestava rastnega gojišča. Boljša adsorpcija PC5 bi lahko bila posledica morda tudi velikosti celice, saj je *C. jejuni* s 5 μ m relativno velika bakterija v primerjavi z *E. coli*, ki je velika do nekje 3 μ m (Reshes in sod., 2008). Možno je, da se bakteriji razlikujeta tudi po številu bakteriofagnih receptorjev. Poleg tega se po velikosti razlikujeta tudi bakteriofaga. Adsorpcija bi bila lahko tudi manjša zaradi velikosti T4, ki je večji od PC5, zaradi posledično večjega medsebojnega oviranja. Adsorpcijska konstanta se lahko razlikuje tudi zaradi uporabe dveh različnih rastnih medijev za gostiteljske celice (medija LB in cMHB se razlikujeta v sestavi).

Razliko med adsorpcijskima konstantama obeh bakteriofagov bi lahko razložili tudi z uvedbo dodatnega parametra, ki bi istočasno upošteval vpliv temperature in velikosti bakteriofaga na adsorpcijo. S spremembo temperature in različno velikimi delci (bakteriofagi) se spreminja difuzivnost (D). To je razvidno iz naslednje zveze (Einstein, 1905):

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R} \quad \dots (19)$$

Parametri v enačbi: k je Boltzmanova konstanta, T je temperatura, η je viskoznost medija in R je polmer delca. Da je difuzivnost pomemben sestavni del adsorpcije bakteriofaga na celico je razvidno iz enačbe 4 (str. 5). Iz Stokes-Einsteinove enačbe (enačba 19) je razvidno, da se difuzivnost povečuje z večanjem temperature. Na ta način bi morda lahko pojasnili razmeroma nizke vrednosti adsorpcijske konstante. Pri sobni temperaturi je difuzivnost manjša, kot bi bila pri fizioloških temperaturah obeh sistemov (t.j. 37 oz. 42 °C). Nasprotni učinek ima večanje polmera delca, ki je udeležen v proces difuzije, saj z večanjem delca difuzivnost pada. Bakteriofag T4 je v povprečju večji za vsaj 10 nm (t.j. 5%) od bakteriofaga PC5. Na primeru bakteriofagov T (T2 in T4) so pokazali, da ima večji bakteriofag, s posledično večjim (Stokesovim) polmerom, bistveno nižjo difuzivnost od manjšega (De La Torre in sod., 1977). Iz enačbe 4 (str. 5) je torej razvidno, da je adsorpcijska konstanta višja v primeru višje difuzivnosti faga. Bakteriofag PC5 je nekoliko

manjši od bakteriofaga T4, zato bi lahko bila njegova večja difuzivnost pojasnilo za višjo adsorpcijsko konstanto.

5.2.2 Rastna krivulja fagov – latentna perioda in namnožitveno število faga PC5

Po enakem principu smo z enostopenjskim poskusom pridobili tudi rastne krivulje bakteriofaga PC5. Grafi (slike 15-18) prikazujejo titer prostih fagov PC5 v odvisnosti od časa. Rezultati so tokrat zbrani na štirih grafih, ki so povzetek štirih poskusov (z bakteriofagom PC5 smo naredili tudi dodatne poskuse, ki so dali boljši vpogled, predvsem v naravo adsorpcije). Prva dva grafa (slike 15 in 16) prikazujeta titer bakteriofagov v času za le en vzorec (ena rastna krivulja), druga dva grafa (slike 17 in 18) vsebujeta rezultate (titre prostih fagov) treh vzorcev (str. 41 in 42).

Na sliki 15 (str. 41) vidimo precej neizrazito rastno krivuljo bakteriofaga, ki ima slabo izražene platoje in rahel porast titra prostih fagov. V suspenziji prvega poskusa je bilo prisotnih $2,2 \cdot 10^6$ CFU/mL gostiteljskih celic. Po eni uri je bilo konec latentne periode, ko je nastopil še najbolj izrazit skok prostih fagov na intervalu, in sicer v vrednosti $3,9 \cdot 10^5$ PFU/mL. To ustreza namnožitvenemu številu 0,18 oz. če se izrazimo nekoliko drugače, je nastal le en bakteriofag na približno 5 gostiteljskih celic. Na sliki 16 (str. 41) je prikazana povsem drugačna rastna krivulja bakteriofaga z na videz precej bolj intenzivnim porastom bakteriofagov v vrednosti $8,5 \cdot 10^5$ PFU/mL. Glede na prisotnost $7,5 \cdot 10^6$ CFU/mL gostiteljskih celic, to ustreza namnožitvenemu številu 0,11. Namnožitveno število je torej kljub bolj izrazitemu skoku zaradi višje vsebnosti gostiteljskih celic še nižje od prejšnjega poskusa, saj se je bakteriofag sprostil le na vsako deseto celico. Čeprav je bil ob času 0 titer bakteriofagov nepričakovano visok, krivulja izgleda precej bolj stereotipno od krivulje prejšnjega poskusa, saj lahko vidimo bolj izrazit spodnji in zgornji plato. Visoko vrednost titra fagov ob času 0 gre verjetno pripisati eksperimentalni napaki, saj je nato tudi takojšen padec nemogoče pojasniti (adsorpcija pri danih pogojih namreč ni tako hitra). Latentna perioda je bila tokrat nekoliko daljša, saj smo največji skok zaznali šele po uri in pol. Zopet nekoliko drugačno obliko ima krivulja na sliki 17 (str. 42). Zaenkrat se osredotočimo le na netretiran vzorec (krivulja modre barve). Krivulja kljub razmeroma šibkemu porastu bakteriofagov ($7,3 \cdot 10^5$ PFU/mL) spominja na tipično rastno krivuljo bakteriofaga. A vendar se je pojavil dosti kasneje po koncu latentne periode (60 minut) še en razmeroma močan porast na koncu, kar spominja na novi cikel pomnoževanja. Glede na to, da se omenjen fenomen ni pojavil pri nobenem drugem poskusu in večkratni cikli niti niso mogoči v primeru 100% okuženih celic (vse celice lizirajo in pomnoževanje se konča), gre verjetno za eksperimentalno napako. Glede na vsebnost bakterij ($1,7 \cdot 10^6$ CFU/mL) je bilo namnožitveno število znotraj tega poskusa 0,44. To je pravzaprav še najvišje namnožitveno število PC5, ki smo ga določili in pomeni, da je na približno dve celici nastal en bakteriofag. Na sliki 18 (str. 42) lahko vidimo krivuljo, ki najbolj ponazarja stereotipno rastno krivuljo faga v obliki črke S. Krivulja ima izrazita platoja in razmeroma

šibek narast bakteriofagov ($6,1 \cdot 10^5$ PFU/mL) po končani latentni periodi, ki je tokrat trajala 90 minut. Pri $2,5 \cdot 10^6$ CFU/ml razpoložljivih bakterij v suspenziji to pomeni namnožitveno število 0,24 (en bakteriofag na vsako četrto celico gostitelja).

S poskusi smo torej določili, da traja latentna perioda bakteriofaga PC5 med 60 in 90 minut. V tem času v povprečju nastane le en bakteriofag na 4 bakterije, kar ustreza povprečnemu namnožitvenemu številu 0,24. Namnožitveno število je torej, sploh glede na izredno dolgo latentno periodo, nepričakovano nizko. Pri razmeroma dolgi latentni periodi ne nastane niti en bakteriofag na celico. Dobljeni rezultati so v nasprotju z dosedaj znanem o medsebojni odvisnosti rastnih parametrov bakteriofaga in matematičnimi modeli, ki ta znanja povezujejo. Enačba 5 (str. 9) podaja odvisnost namnožitvenega števila od trajanja latentne periode. Glede na omenjeno enačbo je možno intuitivno sklepati, da bi morale biti namnožitveno število bistveno višje, verjetno tudi višje od namnožitvenega števila bakteriofaga T4. Morda ima bakteriofag PC5 izredno nizko hitrost zorenja (α) in zaradi tega kljub dolgi latentni periodi ne proizvede veliko potomcev. Takšen bakteriofag ima zelo nizek fitnes (enačba 9, str. 11), saj potrebuje zelo dolgo časa, da zaključi svoj življenjski cikel in tudi takrat se v okolje sprostijo zelo malo potomcev. Sposobnost bakteriofaga za preživetje v okolju je torej zelo vprašljiva. A vendar ta bakteriofag živi v naravi in uspešno okužuje gostitelja, ki prebiva v črevesju perutnine. Kje se torej stvar zalomi?

Morda bi se zgoraj opisano dalo razložiti z izrazitim pojavom reverzibilne adsorbcije. Zdi se, da na nek način reverzibilno adsorbcijo nakazujejo tudi infektivni centri (poskus D), katerih koncentracija presega razpoložljive bakterije. Infektivni centri namreč ne bi smeli presegati razpoložljivih bakterij, saj naj bi v teoriji ena okužena celica proizvedla en infektiven center na plošči. Ob predpostavki, da je dosti fagov vezanih reverzibilno, bi bila mogoča desorbcija fagov iz celic in posledično pojav plakov na plošči, ki niso nastali iz infektivnega centra. Dodatne informacije za lažje sklepanje bi lahko potegnili iz dodatnih dveh vzorcev, ki smo jih naredili pri poskusih C in D (slika 17 in 18, str. 42). Spomnimo se, da smo naredili vzorec, kateremu smo po adsorbciji dodali kloroform in s tem ubili bakterije (fagi ostali intaktni). S tem smo želeli preveriti, da ne gre pri naraščanju tekom naših poskusov za kaj naključnega in ne pomnoževanje. Drugemu vzorcu smo poleg kloroforma dodali še NaCl, ki zaradi spremembe ionske jakosti lahko povzroči desorbcijo bakteriofagov, ki so bili vezani le elektrostatsko (reverzibilno). Rezultati, ki smo jih pridobili z zadnjima dvema poskusoma potrjujeta, da se bakteriofag pomnožuje (čeprav šibko) in da je prisotna razmeroma močna frakcija bakteriofagov, ki so očitno vezani le reverzibilno. Sklepamo, da se bakteriofag pomnožuje, saj pridobljene rastne krivulje spominjajo na stereotipne rastne krivulje, ki pa žal niso tako izrazite, ker je prirast novih bakteriofagov po koncu latentne periode zelo majhen. Po drugi strani vidimo, da grafi vzorcev, ki so bili tretirani s kloroformom nimajo jasnega trenda, le oscilacije. Druga stvar, ki jo lahko zaključimo iz vzorca s kloroformom, je, da kloroform precej verjetno povzroči

delno desorbcijo bakteriofagov. To se lepo vidi iz razlike v titru prostih fagov v času 0 med tretiranim in netretiranim vzorcem. Prisotnost reverzibilno vezanih bakteriofagov lahko vidimo tudi, če pogledamo graf vzorca, ki je bil poleg kloroforma tretiran še z NaCl. NaCl lahko s spremembo ionske jakosti podre le elektrostatske interakcije, ki so značilne za reverzibilno vezane fage. Titer bakteriofagov se je takoj po dodatku soli močno dvignil. Zanimivo je tudi to, da je titer bakteriofagov pri vzorcih s soljo, začel takoj, ko je dosegel vrh, močno upadati. Ta padec titra je bil bistveno hitrejši od stopnje adsorbcije, ki smo jo določili v naših poskusih. Omenjen padec bi bilo mogoče razložiti z 10-krat večjo adsorpcijsko konstanto. Glede na to, da je medij vseboval 1,5 M NaCl, so pogoji za adsorbcijo seveda povsem drugačni. Dokončne razlage za ta pojav nismo našli.

Naslednja teorija, ki bi morda lahko pojasnila izredno nizko namnožitveno število PC5, predpostavlja neuspešno okužbo s strani bakteriofaga. Teorije, ki jo podajamo kot možno za razložitev pojava, predpostavlja, da je površina za vezavo bakteriofagov na gostitelja zelo omejena. Zaradi uporabe visokih MOI vrednosti je bilo na vsako celico gostitelja prisotnih več bakteriofagov. Zaradi omejenega prostora za adsorbcijo, bi se utegnili bakteriofagi medsebojno ovirati. Zaradi tega bi bilo teoretično mogoče, da se na mnogo celic bakteriofagi ne bi pravilno adsorbirali oz. našli receptorja za vezavo. Tako bi bilo moč pojasniti dober odstotek vezave fagov na gostitelja in hkrati nizko pomnožitveno število, saj bi na ta način bilo v populaciji prisotnih mnogo celic, ki ne bi pomnoževale bakteriofagov (fagi se niso uspeli vezati na receptor zaradi medsebojnega oviranja).

Tokrat imamo povsem drugačno sliko masnih bilanc bakteriofaga. Pri masnih bilancah bakteriofaga PC5 vidimo nasprotno sliko, saj je tokrat skoraj dvakrat več fagov na začetku (vsi razpoložljivi fagi), kot jih uspemo sešteti z vsemi frakcijami (po 1. in 2. centrifugiranju, infektivni centri in prosti fagi ob času 0). Tokrat seveda dobljenih bilanc ne moremo pojasniti s tvorbo agregatov. Glede na to, da imamo pravzaprav le eno popolno masno bilanco, in sicer zadnjega poskusa (pri ostalih so bile težave z vzorci infektivnih centrov), težko trdimo, da so masne bilance sistema zares takšne. Za lažje sklepanje bi potrebovali rezultate večih poskusov (paralelk). Do tedaj pa lahko z enako gotovostjo trdimo, da je dobljena masna bilanca poskusa posledica bodisi eksperimentalne napake bodisi specifične sistema.

5.2.2.1 Vpliv NaCl na stabilnost bakteriofaga PC5

Čeprav je bila osnovna motivacija poskusa preveriti, ali je za močan padec titra kriva prisotnost NaCl (znan faktor znižanja titra fagov v višjih koncentracijah), je poskus tudi zanimiv kot samostojna celota. Do tega trenutka namreč še ni nihče preveril stabilnosti bakteriofaga PC5 v vodnih raztopinah NaCl.

Iz grafa na sliki 19 (str. 45) je razvidno, da ima prisotnost NaCl močan vpliv na stabilnost bakteriofaga PC5. To velja še posebej za višje molarnosti soli (> 3 M). Učinek je zelo hiter, saj smo zaznali močan upad titra fagov že ob prvem vzorčenju po 10 minutah. Titer se je na tej vrednosti tudi ustalil in se kasneje v večini primerov ni spreminjal. Pri vzorcu, ki je kot v poskusih C in D (slika 17 in 18, str. 42) vseboval 1,5 M NaCl, ni prišlo do bistvenega upada titra bakteriofagov. Poskusi stabilnosti bakteriofaga v soli so pokazali, da se titer v času trajanja poskusa zmanjša le za 13 % na račun NaCl. Pri poskusih C in D je titer upadel precej močneje, in sicer za 76 % (slika 17) oz. za 56 % (slika 18). Poleg tega se zdi, da je vpliv NaCl na stabilnost bakteriofaga takojšen, saj titer upade takoj in se nato ustali pri določeni vrednosti. Po drugi strani je padec, ki ga vidimo na grafih na sliki 17 in 18, postopen. Drastičnega upada titra pri vzorcih, ki smo jih tretirali s kloroformom in NaCl torej ne moremo pojasniti s škodljivim vplivom visokih koncentracij NaCl v mediju.

6 SKLEPI

Na osnovi dobljenih rezultatov smo zaključili naslednje:

- zastavljena metodologija za določanje hitrosti adsorbcije bakteriofaga na gostitelja je primerna, saj smo uspešno določili **konstanto adsorbcije** v danih pogojih za dva bakteriofaga: pri **T4** je ta znašala $2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min, pri **PC5** pa $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min;
- z zastavljeno metodologijo smo uspeli tudi določiti povprečno **latentno periodo** v danih fizioloških pogojih za oba omenjena bakteriofaga, ki znaša **15 min pri T4** in **60-90 min pri PC5**, a smo imeli z določanjem težave, saj smo predvsem pri PC5 imeli zelo neizrazite rastne krivulje, ki niso imele tako izrazitega porasta zaradi lize in sproščanja novonastalih fagov iz celic gostitelja, kot je običajno;
- z zastavljeno metodologijo smo tudi uspeli določiti **namnožitveno število** obeh bakteriofagov, pri bakteriofagu **PC5** je bilo to število precej nizko, in sicer **0,24** (približno 1 novonastali bakteriofag na 4 bakterije), medtem ko je bilo namnožitveno število bakteriofaga **T4** višje, in sicer **9,5** (kar pomeni približno 10 bakteriofagov na 1 celico gostitelja);
- za zaključek bi dejali, da je zastavljena metoda za določanje adsorbcije dobra in ponovljiva, nekoliko slabše pa se je izkazala zastavljena metoda oz. izvedba določanja latentne periode in namnožitvenega števila (t.i. enostopenjski poskus), ki bi bila potrebna optimizacije na posameznih korakih (npr. pri prvem koraku adsorbcije, ki je izrednega pomena, bi bila verjetno potrebna optimizacija MOI in optimizacija samega postopka adsorbcije, saj se je po našem postopku verjetno vezalo veliko bakteriofagov reverzibilno, kar otežuje interpretacijo rezultatov).

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

C. jejuni je Gram-negativna bakterija spiralne oblike, ki povzroča akutni gastroenteritis pri ljudeh. Okužba poteka preko kontaminirane hrane. Večino sevov *E. coli* je povsem nenevarnih (celo koristnih) in se najpogosteje nahajajo v črevesju sesalcev. Kljub temu poznamo tudi nevarne seve, kot je npr. O157:H7. Bakteriofagi (fagi) so virusi, ki specifično okužujejo bakterije in predstavljajo možno alternativo uporabi antibiotikov za zatiranje patogenov. Preventivno bi bila mogoča uporaba razpršilcev z bakteriofagi, s katerimi bi zagotavljali neoporečnost hrane tekom proizvodnje. Kurativni ukrepi pa predstavljajo uporabo bakteriofagov za zdravljenje (fagna terapija). Za uspešno množično proizvodnjo fagov in uspešno fagno terapijo je potrebno čim boljše poznavanje (okarakteriziranost) bakteriofaga. Hitrost razmnoževanja zavisi od treh ključnih, med seboj povezanih parametrov: hitrosti adsorbcije (adsorpcijska konstanta), dolžine latentne periode in namnožitvenega števila (povprečno število novonastalih fagov na posamezno celico gostitelja). Hitrost adsorbcije smo določili z zasledovanje upadanja titra prostih fagov v času v homogeni suspenziji bakteriofagov in bakterij. Dolžino latentne periode in namnožitveno število smo določili s pomočjo enostopenjskega poskusa, pri katerem smo zasledovali naraščanje titra prostih fagov v času in izdelali rastno krivuljo faga (tipično s spodnjim in zgornjim platojem, ki ju loči nenaden in intenziven porast titra). Adsorpcijska konstanta bakteriofaga T4 v pogojih naših poskusov je znašala $2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min, medtem ko je znašala adsorpcijska konstanta bakteriofaga PC5 $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min. Dobljene vrednosti adsorpcijske konstante so razmeroma nizke in bi lahko bile posledica odsotnosti aktivnega mešanja medija, ionske sestave gojišča in temperature (poskusi izvedeni pri sobni temperaturi). Latentna perioda bakteriofaga T4 je bila zelo kratka in je znašala približno 15 min. Povsem drugače pa je bilo v primeru PC5, kjer prišlo do lize šele med 60 in 90 min. Namnožitveno število bakteriofaga T4 v naših poskusih je znašalo približno 10 bakteriofagov na bakterijo. Razmeroma nizko namnožitveno število je verjetno posledica izredno kratke latentne periode in možnega pomnoževanja pred začetkom izrisovanja rastne krivulje (med centrifugiranje in menjavanjem medija). Dosti bolj presenetljivo pa je namnožitveno število bakteriofaga PC5, ki znaša zgolj 0,24 (le vsaka 4. celica proizvede nov bakteriofag). Nizko namnožitveno število je verjetno posledica močno zastopane reverzibilne vezave, pri kateri se bakteriofagi ne vežejo na receptor in okužba bakterijske celice ne poteče.

7.2 SUMMARY

C. jejuni is a Gram-negative spiral-shaped bacterium and is one of the most common cause of human gastroenteritis. *C. jejuni* is mainly transmitted by contaminated food. Most *E. coli* strains are completely harmless (even beneficial) and are usually part of mammalian gut microbiota nevertheless dangerous strains, like O157:H7 also exist. Bacteriophages (phages) are viruses that specifically infect bacteria. They are widely regarded as possible alternatives to antibiotics for fighting against pathogenic bacteria. Bacteriophages could be used in the form of sprays that could be easily applied during food processing and thus prevent food contamination. Phages could also be used to cure bacterial diseases (so called phage therapy). For successful mass production of bacteriophages and phage therapy it is necessary to know as much as possible about phage growth/reproduction rate. The rate of reproduction depends on 3 connected parameters: rate of adsorption to host cell (adsorption constant), length of latent period and burst size (average number of newly synthesized phages per host cell). We determined the adsorption constant by measuring decreasing titer of free bacteriophages in time within a homogenous suspension of phages and bacteria. The latent period and burst size was determined using the so called one step growth experiment, in which we measured an increase in titer of free phages and drew bacteriophage one step growth curve. The adsorption constant of bacteriophage T4 under our experimental conditions was $2,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min, while the adsorption constant of PC5 was $4,3 \cdot 10^{-10}$ mL/min. Adsorption constants were considerably low, possibly due to the absence of active agitation, ionic properties of growth media and temperature (room temperature in our case). The latent period of phage T4 was very short, only around 15 min. The burst size of bacteriophage T4 was approximately 10 phages per cell. Burst size was relatively low probably due to the very short latent period. The latent period of PC5 was much longer, between 60 and 90 min, however the burst size was surprisingly low, only 0,24 (which is approximately 1 newly synthesized phage per 4 host cells). The reason behind a very low burst size might be dominant reversible adsorption onto the host under our experimental conditions and inability of phages to actually infect the majority of host cells.

8 VIRI

- Abedon S. T., Herschler T. D., Stopar D. 2001. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4233–4241
- Abedon S.T. 2008. Phages, ecology, evolution. V: *Bacteriophage ecology: Population growth, evolution and impact of bacterial viruses*. Abedon S.T. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 1-30
- Ackermann H.W. 2006. Classification of bacteriophages: Schematic representation of major phage groups. Oxford, Oxford University Press: 1. str.
http://www.thebacteriophages.org/frames_0020.htm (februar 2012)
- Ackermann H.W. 2007. 5500 phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152: 227–243
- Adams M.H. 1959. *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers: 620 str.
- Allos B.M. 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1201-1206
- Averback P., Gemmell J. 2008. Bacteriophage composition useful in treating food products to prevent bacterial contamination. European patent EP1930417: 26 str.
- Bae H.G. 2003. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of Virological Methods*, 110: 185-191
- Bacteriophage. 2008. Science Learning Hub, Waikato, The University of Waikato: 1 str.
<http://www.sciencelearn.org.nz/ScienceStories/Microorganisms/SciMedia/Images/Bacteriophage> (februar 2015)
- Bentley R., Meganathan R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, 46: 241-280
- Blaser M.J., Wells J.G., Feldman R.A., Pollard R.A., Allen J.R. 1983. The Collaborative Diarrheal Disease Study Group. *Campylobacter* enteritis in the United States: a multicenter study. *Annals of Internal Medicine*, 98: 360-365
- Blatter F. R., Williams B.G., Blechl A.E., Denniston-Thompson K., Faber H.E., Furlong L.A., Grunwald D.J., Moore D.D., Schumm J.W., Sheldon E.L., Smithies O. 1977. Charon phages: Safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science*, 196: 161-169

- Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 560-602
- Bull J.J. 2006. Optimality models of phage life history and parallels in disease evolution. *Journal of Theoretical Biology*, 241: 928-938
- Bull J.J., Wang I.N. 2010. Optimality models in the age of experimental evolution and genomics. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 1820-1838
- Carvalho C.M., Gannon B.W., Halfhide D.E., Santos S.B., Hayes C.M., Roe J.M., Azeredo J. 2010. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, 10: 232
- CDC. 2009. Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories, Morbidity and mortality weekly review: 20 str. <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5812.pdf> (april, 2015)
- CDC. 2014. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ground Beef (Final Update): 5 str. <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/index.html> (april, 2015)
- Courchesne N.M.D., Parisien A., Lan C.Q. 2009. Production and application of bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins. *Recent Patents on Biotechnology*, 3: 37-45
- De La Torre J.G., Bloomfield L.A. 1977. Hydrodynamics of macromolecular complexes. III. Bacterial viruses. *Biopolymers*, 16: 1779-1793
- Delbrück. M. 1940. Adsorption of bacteriophage under various physiological conditions of the host. *Journal of General Physiology*, 23: 631-642
- Delbrück M. 1945. The burst size distribution in the growth of bacterial viruses. *Journal of Bacteriology*, 50: 131
- De Wit M.A., Koopmans M.P., Kortbeek L.M., Wannet W.J., Vinje J., Van Leusden F. 2001. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *American Journal of Epidemiology*, 154: 666-674
- Duckworth D.H. 1976. Who discovered bacteriophage. *Bacteriological Reviews*, 40: 793-802
- Einstein A. 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322: 549-560

- Ellner P. D., Stoessel C. J., Drakeford E., Vasi F. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 502-504
- Examples of Viral Replication Pathways. 2009. Access Excellence, The National Health Museum: 3. str.
- http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/examples_of_viral.php (avgust 2014)
- Fischetti V.A., Loeffler J. 2004. Use of synergistic bacteriophage lytic enzymes for prevention and treatment of bacterial infections. United States patent WO2004058182: 43 str.
- Frenzen P.D., Drake A., Angulo F.J. 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 Infections in the United States. *Journal of Food Protection*, 68: 2623-2630
- Friedman C.R., Neimann J., Wegener H.C., Tauxe R.V. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. V: *Campylobacter*, 2nd ed. Nachamkin I., Blaser M.J., (eds.). Washington, DC, ASM Press: 121-138
- Fuller D.N., Raymer D.M., Kottadiel V.I., Rao V.B., Smith D. E. 2007. Single phage T4 DNA packaging motors exhibit large force generation, high velocity, and dynamic variability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 43:16868-16873
- García P., Martínez B., Obeso J. M., Rodríguez A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 479-485
- Greer G.G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 68: 1102-1111
- Griffin P.M., Bell B.P., Cieslak P.R., J. Tuttle, Barrett T.J., Doyle M.P., McNamara A.M., Shefer A.M., Wells J.G. 1994. Large Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections in the Western United States: The Big Picture. V: Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Karmali M.A., Goglio A.G. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 7-12
- Hagens S., Loessner M.J. 2007 Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 3: 513-519
- Hayman P., Abedon S.T. 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods in Molecular Biology*, 501: 175-202
- Heineman R.H., Bull J.J. 2007. Testing optimality with experimental evolution: lysis time in a bacteriophage. *Evolution*, 61: 1695-1709

- d'Herelle F. 1926. The Bacteriophage and its Behaviour. Baltimore, The Williams and Wilkins Company: 654 str.
- Hershey A. D., Kalmanson G., Bronfenbrenner J. 1944. Coordinate effects of electrolyte and antibody on infectivity of bacteriophage. *Journal of Immunology*, 48: 221-239
- Holland M.A., Lenihan N. 2006. Bacteriophage for lysis of methylobacterium and compositions and uses thereof. European patent EP161772: 33 str.
- Hudault S., Guignot J., Servin A.L. 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, 49: 47-55
- Hungaro H.M., Mendonça R.C.S., Gouvea D.M., Vanetti M.C.D., Pinto C.L.O. 2013. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with a chemical agents. *Food Research International*, 52: 75-81
- Hunt M., Abeyta C., Tran T. 2001. *Campylobacter*. V: Bacteriological analytical manual. Jackson G.J., Merker R.I., Bandler R. (eds.). Silver spring, U.S. Food and Drug Administration: 1-21
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>
(november 2014)
- Jayasheela M., Sriram B., Padmanabhan S. 2005. Defined dose therapeutic phage. United States patent WO2005046579: 69 str.
- Janež N., Loc-Carrillo C. 2013. Use of phages to control *Campylobacter spp.* *Journal of Microbiological Methods*, 95: 68-75
- Janež N., Kokošin A., Zaletel E., Vranac T., Kovač J., Vučković D., Smole Možina S., Čurin Šerbec V., Zhang Q., Acceto T., Podgornik A., Peterka M. 2014. Identification and characterisation of new *Campylobacter* group III phages of animal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 359: 64-71
- Jay J.M. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Gaithersburg, Aspen Publishers: 625 str.
- Kelly D.J. 2001. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 16S-24S
- King E.O. 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *The Journal of Infectious Diseases*, 101: 119-128.
- Kruger A.P. 1931. The sorption of bacteriophage by living and dead susceptible bacteria. *The Journal of General Physiology*, 14: 493-516

- Kutateladze M., Adamia R. 2008. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38: 426-430
- Langlet J. Gaboriaud F., Gantzer C. 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1632–1638
- Lark K.G., Adams M.H. 1953. The stability of phages as a function of the ionic environment. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18: 171-183
- Loc Carrillo C., Atterbury R.J., el-Shibiny A., Connerton P.L., Dillon E., Scott A., Connerton I.F. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6554-6563
- Macgregor H.E. 2006. Latest food additive: Viruses. *Los Angeles Times*, 8: 3 str.
<http://articles.latimes.com/2006/aug/28/health/he-closer28> (april 2012)
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. *Brock biology of microorganisms*. 14th ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall: 1041 str.
- Moldovan R., Chapman-McQuiston E., Wu X. L. 2007. On Kinetics of Phage Adsorption. *Biophysical Journal*, 93: 303-315
- NIJZ. 2014. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2013. Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 118 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2013.pdf (julij, 2015)
- Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C.Q. 2008. Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1: 1-13
- Orlova E.V. 2012. Bacteriophages and their structural organisation. V: Bacteriophages. Kurtboke I. (ed.). Rijeka, InTech Europe: 3-30
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K. 2000. The genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 66–68
- Pasternack G.R., Sulakvelidze A., Brown, T. 2006. Method for vaccination of poultry by bacteriophage lysate. European patent EP1663302: 20 str.
- Piddock L.J.V., Woodward M.J. 2006. Use of bacteriophage in medicaments. International patent WO2006129092: 49 str.

- Puck T.T., Garen A., Cline J. 1951. The mechanism of virus attachment to host cell, The role of ions in primary reaction. *The Journal of Experimental Medicine*, 93: 65-88
- Rabinovitch A., Hadas H., Einav M., Melamed Z., Zaritsky A. 1999. A model for bacteriophage T4 developement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181: 1677-1683
- Rabinovitch A., Fishov I., Hadas H., Einav M., Zaritsky A. 2002. Bacteriophage T4 developement in *Escherichia coli* is growth rate dependent. *Journal of Theoretical Biology*, 216: 1-4
- Ramachandran J., Padmanabhan S., Sriram, B. 2003. Bacteriophages deficient in lysine an immunogenicity reduced. United States patent WO03026767: 23 str.
- Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M., Swerdlow D.L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging infectious diseases*, 11: 603-609
- Rapson M.E., Burden F.A., Glancey L.P., Hodgson D.A., Mann N.H. 2005. Bacteriophages useful for therapy and prophylaxis of bacterial infections. European patent EP1504088: 19 str.
- Reader R.W., Siminovitch L. 1971. Lysis defective mutants of bacteriophage lambda: genetics and physiology of S cistron mutants. *Virology*, 43: 607-622
- Reardon S. 2014. Phage therapy gets revitalized. *Nature*, 510: 15-16
- Reshes G., Vanounov S., Fishov I., Feingold M. 2008. Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 94: 251-264
- Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308: 681-685
- Sauvageau D. 2010. Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. Doctor dissertation. Montreal, McGill University, Department of chemical engineering: 175 str.
- Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L. 2011. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 7-15
- Schlesinger M. 1932. Über die Bindung des Bakteriophagen an haemolysierende Bakterien. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 114: 136-160

- Sertic V. 1937. Sur le difference d'action des electrolytes sur le developpemnt des diverses races de bacteriophages. *Comptes Rendus Biologies*, 124: 98-108
- Shao Y., Wang I.N. 2008. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, 180: 471-482
- Shurtleff A. 2012. Standardization of the filovirus plaque assay for use in preclinical studies. *Viruses*, 4: 3511-3530
- Singleton P. 1999. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 5th ed. Wiley: 444-454
- Slutsker L.A., Ries A.A., Greene K.D., Wells J.G., Hutwagner L., Griffin P.M. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiological features. *Annals of Internal Medicine*, 126: 505-13
- Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobe Agents Chemotherapy*, 45: 649-659
- Tam C.C., Rodrigues L.C., Viviani L., Dodds J.P., Evans M.R., Hunter P.R. 2012. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*, 61: 69-77
- Walter M.H. 2008. Bacteriophages that infect *Bacillus* bacteria (anthrax). United States Patent US7374874 B2: 37 str.
- Wang I.N. 2006. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics*, 172: 17-26
- West D., Holland K., Bojar K. 2007. Bacteriophage and their uses. International patent WO2007007055: 119 str.
- Wheeler J.G., Sethi D., Cowden J.M., Wall P.G., Rodrigues L.C., Tompkins D.S. 1999. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *BMJ*, 318: 1046-1050
- Whitman P.A., Marshall R.T. 1971. Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef. *Applied Microbiology*, 22: 463-468
- Wagenaar J.A., Van Bergen M.A.P., Mueller M.A., Wassenaar T.M., Carlton R.M. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology*, 109: 275-283
- Vernon M., Chatlain 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 and Evolutionary Microbiology, 23: 122-134

Yamamoto N., Fraser D., Mahler H.R. 1968. Chelating agent shock of bacteriophage T5. Journal of Virology, 2: 944-950

Zhou Y., Bu L., Guo M., Zhou C., Wang Y., Che, L., Liu, J. 2013. Comprehensive genomic characterization of campylobacter genus reveals some underlying mechanisms for its genomic diversification. PLoS ONE, 8, 8: e70241, doi:10.1371/journal.pone.0070241

ZAHVALA

Za začetek bi se rad iskreno zahvalil svojemu mentorju, prof. dr. Alešu Podgorniku. Njegova pomoč na poti skozi celotno delo, ki je pripeljalo do tega izdelka, je bila neprecenljiva. Zahvalil bi se mu rad za vse strokovne nasvete, usmeritve tekom dela in konstruktivne debate, ki so mi venomer širila obzorja in posledično omogočila lažje reševanje problematike. Rad bi se mu zahvalil tudi, da mi je omogočil strokovno uvajanja za delo na COBIK-u v Ajdovščini, kjer so me naučili delati z bakteriofagi.

Zadnje me napelje na naslednjo skupino ljudi, ki sem jim zelo hvaležen. Rad bi se zahvalil celotni ekipi ljudi, ki delajo in so povezani z Laboratorijem za bioanalitiko (COBIK), ki so me prijazno sprejeli medse in me naučili marsičesa. Posebno sem hvaležen Evi Zaletel in Niki Janež, prvi za vsa znanja o praktičnem delu z bakteriofagi in dobri laboratorijski praksi nasploh, slednji pa predvsem za vse strokovne nasvete in pogovore. Vsem se zahvaljujem za prijaznost, potrpežljivost in prenos vašega znanja name.

Zahvalil se bi rad tudi svoji somentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za resnično podroben in temeljit pregled pisnega izdelka in nasvete v zvezi z njim.

Pri zahvali tudi ne morem mimo svojih najbližjih. Najlepše se zahvaljujem staršem in starim staršem, ki so mi vedno pomagali in mi stali ob strani. Brez njihove podpore in usmerjanja na pravo pot ne bi bilo pred vami tega izdelka. Iskrena hvala vsem.

PRILOGA A

PODATKI ZA IZRAČUN MASNIH BILANC VEZAVE T4 NA *E. coli*

Poskus A:

Ime vzorca	Titer (PFU/mL)	Volumen (mL)	Št. fagov (vsi PFU)
Vsi razpoložljivi fagi iz banke (pred adsorbcijo)	6,70E+08	0,7	4,69E+08
Preostali fagi po interakciji in 10 min centrifugiranju	7,40E+07	1	7,40E+07
Prosti fagi ob času t0	8,10E+07	5	4,05E+08
Infektivni centri	7,80E+08	0,5	3,90E+08

Poskus B:

Ime vzorca	Titer (PFU/mL)	Volumen (mL)	Št. fagov (vsi PFU)
Vsi razpoložljivi fagi iz banke (pred adsorbcijo)	5,55E+08	0,7	3,89E+08
Preostali fagi po interakciji in 10 min centrifugiranju	1,12E+08	1	1,12E+08
Prosti fagi ob času t0	8,10E+07	5	4,05E+08
Infektivni centri	3,07E+08	0,5	1,54E+08

PRILOGA B

PODATKI ZA IZRAČUN MASNIH BILANC VEZAVE PC5 NA *C.jejuni*

Poskus A:

Ime vzorca	Titer (PFU/mL)	Volumen (mL)	Št. fagov (vsi PFU)
Vsi razpoložljivi fagi iz banke (pred adsorbicijo)	3,85E+07	0,9	3,47E+07
Preostali fagi po interakciji in 10 min centrifugiranju	1,00E+07	1	1,00E+07
Preostali fagi po 2. 10 min centrifugiranju (spiranju)	1,76E+06	1	1,76E+06
Prosti fagi ob času t0	1,66E+05	5	8,30E+05
Infektivni centri	/	/	/

Poskus B:

Ime vzorca	Titer (PFU/mL)	Volumen (mL)	Št. fagov (vsi PFU)
Vsi razpoložljivi fagi iz banke (pred adsorbicijo)	1,83E+08	0,5	9,15E+07
Preostali fagi po interakciji in 10 min centrifugiranju	1,70E+07	1	1,70E+07
Preostali fagi po 2. 10 min centrifugiranju (spiranju)	1,20E+06	1	1,20E+06
Prosti fagi ob času t0	1,30E+06	5	6,50E+06
Infektivni centri	/	/	/

Poskus C:

Ime vzorca	Titer (PFU/mL)	Volumen (mL)	Št. fagov (vsi PFU)
Vsi razpoložljivi fagi iz banke (pred adsorbicijo)	4,15E+08	0,5	2,08E+08
Preostali fagi po interakciji in 10 min centrifugiranju	6,25E+07	1	6,25E+07
Preostali fagi po 2. 10 min centrifugiranju (spiranju)	5,50E+06	1	5,50E+06
Prosti fagi ob času t0	6,80E+05	5	3,40E+06
Infektivni centri	/	/	/

Poskus D:

Ime vzorca	Titer (PFU/mL)	Volumen (mL)	Št. fagov (vsi PFU)
Vsi razpoložljivi fagi iz banke (pred adsorbcijo)	5,05E+08	0,55	2,78E+08
Preostali fagi po interakciji in 10 min centrifugiranju	6,60E+07	1,05	6,93E+07
Preostali fagi po 2. 10 min centrifugiranju (spiranju)	4,25E+06	1,05	4,46E+06
Prosti fagi ob času t0	1,11E+06	5	5,53E+06
Infektivni centri	1,40E+08	0,5	7,00E+07