

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tjaša DANEVČIČ

**VPLIV SLANOSTI NA ENERGETSKI
METABOLIZEM PRI BAKTERIJI *Vibrio* sp.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tjaša DANEVČIČ

**VPLIV SLANOSTI NA ENERGETSKI METABOLIZEM PRI
BAKTERIJI *Vibrio* sp.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

EFFECT OF SALINITY ON *Vibrio* sp. ENERGY METABOLISM

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, s področja biotehnologije. Fiziološki del je bil opravljen na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani. Analize lipidnih ekstraktov in NMR meritve so potekale na Katedri za biofizikalno kemijo Univerze v Umeji na Švedskem (Biophysical Chemistry, Department of Chemistry, Umeå University, Sweden). EPR meritve so bile izvedene v Laboratoriju za biofiziko EPR centra na Odseku za fiziko trdne snovi Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete in senat Univerze v Ljubljani sta dne 27.6.2006 za mentorja doktorske disertacije imenovala prof. dr. Davida Stoparja.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter RASPOR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Janez ŠTRANCAR

Institut Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi

Datum zagovora: 22. november 2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Danevčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dd

DK UDK 579.22+579.26:546.331'131(043)=863

KG fiziologija mikroorganizmov/ ekologija mikroorganizmov/ energetski metabolizem/ slanost/ osmotski stres/ *Vibrio* sp./ elektronska paramagnetna resonanca/ jedrska magnetna resonanca/ redukcijska sposobnost/ biološke membrane/ lipidni polimorfizem

AV DANEVČIČ, Tjaša, univ. dipl. mikrobiol.

SA STOPAR, David (mentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje: biotehnologija

LI 2006

IN VPLIV SLANOSTI NA ENERGETSKI METABOLIZEM PRI BAKTERIJI *Vibrio* sp.

TD Doktorska disertacija

OP XV, 94 str., 2 pregl., 24 sl., 9 pril. 123 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Prilagoditev bakterijskih celic na spremembe slanosti je zelo pomemben proces, posebej za bakterije v brakičnih okoljih. V doktorski nalogi smo za študij prilagoditve na osmotski stres uporabljali Gram negativno bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379, izolirano iz Škocjanskega zatoka. Izolat smo gojili aerobno v gojiščih z različnimi slanostmi (od 0.3 do 17 % (w/V) NaCl) in merili hitrost rasti, sestavo lipidov, dehidrogenazno aktivnost, hitrost respiracije, glikolitično aktivnost ter nivo ATP. Poleg tega smo določili stopnjo redukcije spinskega označevalca 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil-a (TEMPON), ki je mera za elektronski transport v celici. Najvišjo stopnjo njegove redukcije smo izmerili pri optimalnih pogojih za rast (3 % (w/V) NaCl). Ugotovili smo tudi, da se s slanostjo spreminjata sestavi polarnih glav in acilnih verig. Poleg tega smo pokazali, da so hitrost respiracije, nivo ATP in dehidrogenazna aktivnost višje v obeh ekstremih (0.5 in 10 % (w/V) NaCl) v primerjavi z optimalno slanostjo. Prav tako narašča skupni pretok snovi skozi glikolitične poti z naraščajočo slanostjo. V primeru, ko smo *Vibrio* sp. prenesli v okolje z višjo ali nižjo koncentracijo soli kot v gojišču, smo ugotovili, da je *Vibrio* sp. sposoben hitrega prilagajanja redukcijskih sposobnosti membrane na nove pogoje, medtem ko je za hitrost respiracije in dehidrogenazno aktivnost potreben daljši čas prilagajanja. Rezultati kažejo, da porabi *Vibrio* sp. v ekstremnih pogojih več energije za vzdrževalne procese kot za rast.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd

DC UDC 579.22+579.26:546.331'131(043)=863

CX microbial physiology/ microbial ecology/ energy metabolism/ salinity/ osmotic stress/ *Vibrio* sp./ electron paramagnetic resonance/ nuclear magnetic resonance/ reduction potential/ biological membranes/ lipid polymorphism

AU DANEVČIČ, Tjaša

AA STOPAR, David (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and Biochemical sciences: Biotechnology

PY 2006

TI EFFECT OF SALINITY ON *Vibrio* sp. ENERGY METABOLISM

DT Doctoral dissertation

NO XV, 94 p., 2 tab., 24 fig., 9 ann., 123 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Adaptation of bacterial cells to salinity is especially important for bacteria living in an estuarine environment. In this study, Gram-negative bacterium *Vibrio* sp. DSM14379, isolated from the estuarine waters in the Northern Adriatic Sea, was grown aerobically in media with different salinities (from 0.3 to 17 % (w/V) NaCl). Growth rate, lipid composition, dehydrogenase activity, respiration rate, glycolytic activity and ATP level were measured. We have also determined the reduction rate of the spin label 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), which is an indicator of the electron transport rate in the cell. The highest reduction rate of TEMPO was measured at an optimal salinity for growth of *Vibrio* sp. (3 % (w/V) NaCl). The polar head groups and acyl chain composition changed dramatically with salinity. The respiration rate, ATP level and dehydrogenase activity were higher at both salt extremes (i.e. 0.5 and 10 % (w/V) NaCl) in comparison to the optimal salinity. The overall flux through glycolysis increased with increasing salinity. When cells were washed and resuspended in a buffer solution with increased or decreased salt concentration, they adjusted their reduction kinetics of TEMPO to the new environmental conditions quickly. On the other hand, cell respiration rate and dehydrogenase activity were adjusted more slowly. The results suggest that bacteria spend more energy for maintenance than for growth at extreme salinities.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
1.3 CILJI DOKTORSKE NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MEHANIZMI PRILAGAJANJA BAKTERIJSKIH CELIC NA SPREMEMBE SLANOSTI OKOLJA	3
2.2 DRUGI FIZIOLOŠKI ODGOVORI BAKTERIJSKIH CELIC NA SPREMEMBE SLANOSTI OKOLJA	4
2.3 VPLIV SLANOSTI IN TEMPERATURE NA HITROST RASTI BAKTERIJSKIH CELIC.....	5
2.4 VPLIV SLANOSTI NA BAKTERIJSKO CELIČNO MEMBRANO	6
2.4.1 Vpliv slanosti na sestavo lipidov v membrani.....	6
2.4.2 Vpliv slanosti na urejenost lipidov v bakterijski membrani	7
2.5 VPLIV SLANOSTI NA MIKROBNI KATABOLIZEM	10
2.5.1 Glikoliza pri bakterijah	12
2.5.1.1 Delovanje nekaterih ključnih encimov glikolitičnih poti	16
2.5.2 Cikel citronske kisline pri bakterijah	18
2.5.3 Določanje aktivnosti bakterijske elektronske transportne verige	19
2.5.3.1 Merjenje transporta elektronov v bakterijski dihalni verigi	21
2.5.3.2 Vpliv slanosti na oksidativno aktivnost celic; delovanje in vloga bakterijskih dehidrogenaz.....	24

2.5.3.3 Nivo ATP v bakterijski celici v odvisnosti od slanosti	26
2.6 KAJ VEMO O <i>Vibrio</i> sp. DSM14379	27
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 Kemikalije	29
3.1.2 Encimi	31
3.1.3 Lipidi	31
3.1.4 Metilni estri maščobnih kislin	31
3.1.5 Nitroksidni radikali	32
3.1.6 Sestava gojišč	32
3.1.7 Bakterijska seva	33
3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR	33
3.3 BAKTERIJSKA RAST	34
3.4 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE LIPIDOV	34
3.5 DOLOČANJE POLARNIH GLAV LIPIDOV	35
3.6 DOLOČANJE PROFILA MAŠČOBNIH KISLIN	36
3.7 DOLOČANJE UREJENOSTI LIPIDOV V BAKTERIJSKI MEMBRANI Z ³¹ P-NMR SPEKTROSKOPIJO	37
3.8 MERJENJE AKTIVNOSTI GLIKOLITIČNIH ENCIMOV PRI BAKTERIJAH	38
3.9 MERJENJE SPROŠČENEGA CO ₂ BAKTERIJSKIH CELIC	40
3.10 PRIPRAVA SFEROPLASTOV	41
3.11 MERJENJE REDUKCIJSKIH SPOSOBNOSTI BAKTERIJSKIH CELIC Z EPR SPEKTROSKOPIJO	42
3.12 MERJENJE DEHIDROGENAZNE AKTIVNOSTI BAKTERIJSKIH CELIC	44
3.13 MERJENJE KONCENTRACIJE ATP V BAKTERIJSKI CELICI	46
3.14 STATISTIČNA OBDELAVA EKSPERIMENTALNIH PODATKOV	47
4 REZULTATI	48
4.1 VPLIV SLANOSTI NA HITROST BAKTERIJSKE RASTI	48
4.2 VPLIV SLANOSTI NA BAKTERIJSKO MEMBRANO	50
4.2.1 Vpliv slanosti na lipidno sestavo bakterijske membrane	50
4.2.2 Vpliv slanosti na urejenost bakterijske membrane	53
4.3 VPLIV SLANOSTI NA MIKROBNI KATABOLIZEM	54

4.3.1 Vpliv slanosti na glikolitično aktivnost.....	54
4.3.2 Vpliv slanosti na sproščanje CO₂	56
4.3.3 Vpliv slanosti in temperature na redukcijske sposobnosti bakterijskih celic.....	59
4.3.4 Vpliv slanosti na dehidrogenazno aktivnost.....	63
4.3.5 Vpliv slanosti na nivo ATP v celici.....	65
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	67
5.1 VPLIV SLANOSTI NA ENERGIJSKI METABOLIZEM PRI <i>Vibrio</i> sp.	67
5.1.1 Rast <i>Vibrio</i> sp.	67
5.1.2 Sestava, urejenost in aktivnost membrane.....	67
5.1.3 Metabolna aktivnost bakterijskih celic.....	71
5.2 RAZVOJ METODE ZA DIREKTNO MERJENJE TRANSPORTA ELEKTRONOV V DIHALNI VERIGI BAKTERIJSKIH CELIC PO INDUCIRANEM STRESU	73
5.3 SKLEPI.....	75
6 POVZETEK (SUMMARY).....	76
6.1 POVZETEK	76
6.2 SUMMARY	77
7 VIRI	80
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava acilnih verig (mol %) lipidnih ekstraktov iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE z različnimi slanostmi.	52
Preglednica 2: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a v različnih raztopinah.	61

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz tipičnih oblik ^{31}P -NMR spektrov za različne strukture lipidov v membrani (Lindblom, 1996).	9
Slika 2: Shematski prikaz razgradnje aminokislin, maščobnih kislin in ogljikovih hidratov (Lehninger in sod., 1993).	11
Slika 3: Shema Embden-Meyerhof-Parnas-ove poti (EMP) glikolize pri bakterijskih celicah (White, 2000).	13
Slika 4: Shema Entner-Doudoroff-ove poti (ED) glikolize pri bakterijskih celicah (White, 2000).	14
Slika 5: Shema poti pentoze fosfata (PP) pri bakterijskih celicah (White, 2000).	15
Slika 6: Shema cikla citronske kisline (CCK) pri bakterijah (White, 2000).	19
Slika 7: Shematski prikaz transporta elektronov pri bakterijah med aerobno rastjo (White, 2000).	20
Slika 8: Strukturna formula nitroksidnega spinskega označevalca 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPON-a) (Schreier in sod., 1978).	22
Slika 9: Shematski prikaz mehanizma redukcije nitroksidnega radikala TEMPON-a (Rapoport in sod., 1999).	23
Slika 10: Strukturna formula lipofilnega nitroksidnega označevalca 5-doksil metil palmitinske kisline (MeFASL (m=10, n=3)) (Ahlin in sod., 2003).	24
Slika 11: Shematski prikaz redukcije 2,3,5-trifeniltetrazolijevega klorida (TTC) (Tabatabai, 1994).	26
Slika 12: Vpliv koncentracije NaCl na hitrost rasti (μ) <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v kompleksnem rastnem gojišču (PKE).	49
Slika 13: Vpliv slanosti na sestavo polarnih glav v lipidnih ekstraktih iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	50
Slika 14: ^{31}P -NMR spektri lipidnih ekstraktov iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki je rasel pri različnih slanostih v gojišču PKE.	54

Slika 15:	Vpliv slanosti na specifično aktivnost glikolitičnih encimov pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	55
Slika 16:	Vpliv slanosti na skupno aktivnost preučevanih glikolitičnih encimov pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	56
Slika 17:	Vpliv koncentracije NaCl na hitrost respiracije pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	57
Slika 18:	Hitrost respiracije pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v raztopino NaCl z 0.3, 0.5, 3 in 10 % (w/V) NaCl (sivi stolpci).	58
Slika 19:	Vpliv slanosti na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	59
Slika 20:	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki je rasel pri 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v Tris-HCl pufer z 0.5, 3 in 10 % (w/V) NaCl (sivi stolpci).	60
Slika 21:	Vpliv temperature na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl pri 28 °C (beli stolpci) ter <i>E.coli</i> ESH10 K-12, ki je rasla v gojišču M9 pri 37 °C (sivi stolpci).	62
Slika 22:	Vpliv slanosti na relativno dehidrogenazno aktivnost pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	63
Slika 23:	Relativna dehidrogenazna aktivnost pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki je rasel v okolju s 3 % (w/V) NaCl, in bil prenešen v raztopino NaCl z 0.5, 3 in 10 % (w/V) NaCl (sivi stolpci).	64
Slika 24:	Vpliv slanosti na celokupno koncentracijo ATP v celicah <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	65

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Vpliv slanosti na hitrost rasti pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKE.
- Priloga B: Vpliv temperature na hitrost bakterijske rasti.
- Priloga B1: Hitrost rasti pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl v odvisnosti od temperature.
- Priloga B2: Hitrost rasti pri *Escherichia coli* ESH10 K-12 v gojišču M9 v odvisnosti od temperature.
- Priloga C: Vpliv slanosti na sestavo polarnih glav v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga C1: Vpliv slanosti na delež lizofosfatidiletanolamina (lizo-PE) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga C2: Vpliv slanosti na delež fosfatidiletanolamina (PE) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga C3: Vpliv slanosti na delež fosfatidilglicerola (PG) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga C4: Vpliv slanosti na delež difosfatidilglicerola (DPG) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga D: Vpliv slanosti na aktivnost glikolitičnih encimov pri *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga D1: Vpliv slanosti na aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) pri *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga D2: Vpliv slanosti na aktivnost fosfofruktokinaze (PFK) pri *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga D3: Vpliv slanosti na aktivnost piruvat kinaze (PK) pri *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga D4: Vpliv slanosti na skupno aktivnost preučevanih glikolitičnih encimov pri *Vibrio* sp. DSM14379.
- Priloga E: Vpliv slanosti na hitrost respiracije.
- Priloga E1: Relativna hitrost respiracije pri *Vibrio* sp. DSM14379 v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču PKE.
- Priloga E2: Relativna hitrost respiracije pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v okolja z različnimi koncentracijami soli.

- Priloga F: Vpliv slanosti na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a.
- Priloga F1: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379 v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču PKE (štirikrat redčeni vzorci koncentriranih celic).
- Priloga F2: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v okolja z različnimi koncentracijami soli (desetkrat redčeni vzorci koncentriranih celic).
- Priloga G: Vpliv temperature na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a.
- Priloga G1: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl pri 28 °C, v odvisnosti od temperature inkubacije.
- Priloga G2: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Escherichia coli* ESH10 K-12, ki je rasla v gojišču M9 pri 37 °C v odvisnosti od temperature inkubacije.
- Priloga H: Vpliv slanosti na dehidrogenazno aktivnost.
- Priloga H1: Relativna dehidrogenazna aktivnost pri *Vibrio* sp. DSM14379 v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču PKE.
- Priloga H2: Relativna dehidrogenazna aktivnost pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v okolja z različnimi koncentracijami soli.
- Priloga I: Vpliv slanosti na skupno koncentracijo ATP v celici *Vibrio* sp. DSM14379.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₃₄₀	absorbanca pri 340 nm valovne dolžine
A ₄₈₅	absorbanca pri 485 nm valovne dolžine
AMP	adenozin monofosfat (adenosine monophosphate)
ADP	adenozin difosfat (adenosine diphosphate)
ATP	adenozin trifosfat (adenosine triphosphate)
CCK	cikel citronske kisline = Krebsov cikel (citric acid cycle)
CFU	mikrobna celica ali skupek celic iz katerega se razvije posamezna kolonija (colony forming units)
CL	kardiolipin (cardiolipin)
CTC	5-ciano-2,3-ditoliltetrazolijev klorid
DCPI	diklorofenil izocianat
DPG	difosfatidilglicerol (diphosphatidylglycerol)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	ditiotreitol
ED	Entner-Doudoroff-ova pot glikolize
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-ova pot glikolize
EPR	elektronska paramagnetna resonanca (electron paramagnetic resonance)
ETV	elektronska transportna veriga (electron transport chain)
FADH ₂	reducirana oblika flavin adenin dinukleotida
FID	plamensko ionizacijski detektor (flame ionization detector)
FK	fosfoketolazna pot glikolize
FLAAB	ATP razredčevalni pufer za testno mešanico (ATP assay mix dilution buffer)
FLAAM	ATP testna mešanica (ATP assay mix)
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (glucose-6-phosphate dehydrogenase)
GLC	plinsko-tekočinska kromatografija (gas-liquid chromatography)

GTP	gvanozin trifosfat (guanosine triphosphate)
INT	iodonitrotetrazolijev klorid
LB	Luria Bertani
lizo-CL	lizokardiolipin (lysocardiolipin)
lizo-PE (lyso-PE)	lizofosfatidiletanolamin (lysophosphatidylethanolamine)
lizo-PG	lizofosfatidilglicerol (lysophosphatidylglycerol)
MeFASL	metilni ester 5-doksil palmitinske kisline
mol %	molski delež
M _w	molekulska masa (molecular weight)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	reducirana oblika nikotinamida adenin dinukleotida
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NMR	jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nm valovne dolžine
PE	fosfatidiletanolamin (phosphatidylethanolamine)
PEP	fosfoenolpiruvat (phosphoenolpyruvate)
PFK	fosfofruktokinaza (phosphofructokinase)
PG	fosfatidilglicerol (phosphatidylglycerol)
PK	piruvat kinaza (pyruvate kinase)
PKE (PYE)	pepton-kvasni ekstrakt (peptone-yeast extract)
PP	pot pentoze fosfata (pentose phosphate pathway)
PTS	fosfotransferazni sistem (phosphotransferase system)
RLU	relativne luminiscenčne enote (relative luminiscence units)
TCD	detektor za toplotno prevodnost (thermal conductivity detector)
TEMPON	4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil
TLC	tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
Tris-HCl	trishidroksimetil aminometan hidroklorid
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid
TTF	1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan
V/V %	volumsko-volumski delež

w/V %	masno-volumski delež
wt %	masni delež
14:0	miristinska kislina
16:0	palmitinska kislina
16:1	palmitoleinska kislina
18:0	stearinska kislina
18:1	oleinska kislina
18:2	linolenska kislina
³¹ P-NMR	jedrska magnetna resonanca fosforjevega jedra z atomsko maso 31

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterije se morajo v okolju nenehno prilagajati spremembam fizikalnih in kemijskih dejavnikov okolja kot so temperatura, hranila, pH in slanost. Pri tem izbirajo zanje najugodnejše poti, kjer prihaja tako do sprememb v bakterijski morfologiji, v aktivnosti fizioloških procesov kot tudi v biosintezi metabolnih intermediatov in aktivaciji genov.

Slanost je eden ključnih dejavnikov okolja, ki vpliva na delovanje bakterijskih celic. Znano je, da osmotski stres zmanjša celično produktivnost, povzroči inaktivacijo celic v industrijskih fermentacijah (npr. inhibicija rasti, tvorba toksičnih produktov) ter zavira biodegradacijske procese čiščenja odpadnih voda. Zaradi tega je vrednotenje metabolnih sprememb v celici po indukciji osmotskega stresa bistveno za razumevanje in opis obnašanja mikrobov med bioprocesom.

V doktorski nalogi smo spremljali pomembnejše energijske poti v bakterijski celici, kot so glikoliza, cikel citronske kisline in dihalna veriga, kar nam je omogočilo vrednotenje vpliva slanosti na celično energetiko bakterije *Vibrio* sp. DSM14379. Ta bakterija, katere fiziologija je relativno slabo poznana, ima zanimive biotehnološke lastnosti, kot sta sinteza barvila in protimikrobnih snovi, zato lahko ta proučevanja vplivajo na nadaljno optimizacijo pridobivanja teh spojin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovni hipotezi, ki smo si ju zastavili v doktorski nalogi, sta:

- Osmotski stres (povečanje in zmanjšanje ionske jakosti) vpliva na zmanjšanje hitrosti rasti bakterijskih celic, redukcijskih sposobnosti celic in deleža nelamelarnih struktur v membrani.
- Osmotski stres (povečanje in zmanjšanje ionske jakosti) vpliva na povečanje nivoja ATP v celici, dehidrogenazne aktivnosti, mikrobne respiracije in glikolitične aktivnosti.

1.3 CILJI DOKTORSKE NALOGE

Namen raziskovalnega dela je:

- pokazati, da pri *Vibrio* sp. osmotski stres vpliva na:
 - bakterijsko rast
 - sestavo, aktivnost in urejenost bakterijske membrane
 - metabolno aktivnost
- razvoj nove metode za direktno merjenje transporta elektronov v dihalni verigi bakterijskih celic pri različnih stresnih dejavnikih (npr. slanost, temperatura).

2 PREGLED OBJAV

2.1 MEHANIZMI PRILAGAJANJA BAKTERIJSKIH CELIC NA SPREMEMBE SLANOSTI OKOLJA

Bakterijske celice imajo sposobnost prilagajanja na spremembe osmolarnosti okolja, kar je temeljnega pomena za njihovo rast in preživetje. Bakterije so zato razvile mnoge različne strategije prilagajanja, da bi obvladale nihanja v koncentraciji soli v okolju, v katerem živijo (Sleator in Hill, 2001). Glavna mehanizma prilagajanja bakterij na spremembe v slanosti okolja oziroma za vzdrževanje celičnih funkcij pri osmotskem stresu sta:

- mehanizem vnosa soli v citoplazmo, kjer gre za izenačevanje koncentracije soli v bakterijski celici in v okolju ali vzdrževanje ionskega koncentracijskega gradienta preko membrane s pomočjo Na^+/H^+ črpalke, ki je energijsko relativno nezahteven proces in je omejen na dve filogenetsko nesorodni skupini mikroorganizmov (aerobne halofilne arheje *Halobacteriaceae* in majhno skupino anaerobnih halofilnih baterij *Halanaerobiales*) (Oren, 2001)
- mehanizem sinteze organskih osmolitov, kjer gre za transport soli iz citoplazme in sintezo ali prevzemanje organskih kompatibilnih topljencev ali osmolitov, je pri bakterijah bolj razširjen in energijsko zahtevnejši proces, kar je odvisno od tipa sintetizirane organske spojine (Oren, 2001).

Te vzdrževalne procese vodijo različne kemijske reakcije v celici, ki potrebujejo energijo v obliki adenozin trifosfata (ATP) in ne prispevajo k povečanju biomase (Varela in sod., 2004). Prvi mehanizem potrebuje približno 0.5 ekvivalenta ATP na molekulo KCl, preneseno v citoplazmo. Drugi mehanizem je energijsko zahtevnejši, saj porabijo bakterije od 23 do 79 molekul ATP za sintezo ene molekule osmolita (Kunte, 2006).

V primeru, ko je koncentracija soli v okolici večja kot v celici, prihaja do tvorbe ionskega gradienta preko membrane. Vzdrževanje le-tega omogoča transport elektronov v dihalni verigi, ki je sklopljen s hidrolizo ATP ali protonsko črpalko (bakteriorodopsin ali halorodopsin), ki jo poganja svetloba (Ventosa in sod. 1998; Oren, 2001). Ta gradient omogoča energijo za transport Na^+ ionov preko Na^+/H^+ črpalke v celico, medtem ko vstopajo K^+ ioni v celico preko uniporterja s pasivnim transportom (Oren, 2001). Ko se

poveča koncentracija KCl v citoplazmi, celica prilagodi aktivnost svojih proteinov povišanim koncentracijam soli (npr. poveča se aktivnost aspartat transkarbamilaze in zmanjša se aktivnost treonin deaminaze) (Ventosa in sod., 1998). Poleg tega lahko prihaja do zamenjave aminokislinskih ostankov v proteinih s kislimi in hidrofilnimi ostanki, ki zmanjšajo hidrofobnost proteinov in preprečijo njihovo agregiranje (Lanyi, 1974). Ko je koncentracija soli v celici večja kot v okolici, prihaja do transporta soli iz citoplazme in sinteze ali prevzemanja organskih spojin oziroma osmolitov iz okolja (Oren, 2001). V tem primeru celica kopiči nabite ali nenabite vodotopne organske molekule (npr. poliol, sladkorji, aminokisline). Te spojine kot so glicin, betain, prolin, trehaloza, glutaminska kislina, glutamin so prisotne v milimolarnih koncentracijah v citoplazmi (Skjerdal in sod., 1996; Oren, 2001). Če celica sintetizira te organske spojine *de novo*, pride do porabe ATP, ki je odvisna od velikosti in kompleksnosti teh molekul (Oren, 1999; Oren, 2001). Znano je, da tvorijo osmoliti specifične interakcije s proteini, ki stabilizirajo nativno konformacijo proteinov in zaščitijo proteine pred denaturacijo in inaktivacijo v prisotnosti velike koncentracije elektrolitov (Csonka, 1989; Welsh in sod., 1996; Wolf in sod., 2003). Torej v tem primeru ni potrebno prilagajati proteinov v citoplazmi na spremembe v slanosti okolja. Poleg tega tip organske spojine, ki ga bo celica sintetizirala, ni odvisen samo od spremembe slanosti pač pa tudi od hranil. Pri bakteriji *Corynebacterium glutamicum* so pokazali, da lahko sintetizira tako prolin kot trehalozo. V primeru, ko je dušika v okolju dovolj, je glavni osmolit prolin. Ko začne dušika v okolju primanjkovati, začne sinteza prolina padati in prihaja do kopičenja trehaloze v citoplazmi (Wolf in sod., 2003).

Glavna razlika med mehanizmom prevzema ali sinteze osmolitov v primerjavi s strategijo kopičenja KCl v citoplazmi je večja fleksibilnost prvega. Organizmi, ki se poslužujejo prvega mehanizma, ne potrebujejo spremembe encimov za njihovo stabilizacijo v citoplazmi in se lahko hitreje prilagodijo na spremembe slanosti.

2.2 DRUGI FIZIOLOŠKI ODGOVORI BAKTERIJSKIH CELIC NA SPREMEMBE SLANOSTI OKOLJA

Pri prilagajanju bakterijskih celic na spremembe v osmolarnosti okolja sodelujejo tudi drugi procesi v celici. Pokazano je, da slanost vpliva na spremembe celičnega volumna

(Skjerdal in sod., 1996; Record in sod., 1998). Pri povečani osmolarnosti rastnega gojišča pride do izgube vode iz celice, medtem ko voda vdira v celico pri zmanjšani osmolarnosti. Zaradi tega celica prevzema ali sintetizira osmolite, ki ji omogočajo vzpostavitev prvotnega volumna bakterijske citoplazme (Skjerdal in sod., 1996; Record in sod., 1998) in preprečujejo transport vode iz celice (Kempf in Bremer, 1998). Pokazali so, da se volumen bakterijskih celic *Corynebacterium glutamicum* spreminja tako z osmotskim stresom kot tudi s fazo rasti in prisotnostjo betaina v gojišču (Rönsch in sod., 2003). Prav tako anorganske soli vplivajo na delovanje encimov in njihovo aktivnost (Ventosa in sod., 1998). Z večanjem koncentracije soli v okolju se zmanjša kemotaktični odgovor pri *Vibrio anguillarum*, medtem ko sta njegova gibljivost in rotacija bičkov neodvisna od slanosti med 0.8 in 3.6 % NaCl (Larsen in sod., 2004). Pokazali so tudi, da pri večini po Gramu negativnih bakterij že 100 mM koncentracija NaCl inhibira prenos snovi preko kasetnih ABC prenašalcev, medtem ko sekundarni prenašalci (npr. monokarboksilatna transportna permeaza (MctP) za vnos alanina) niso inhibirani z NaCl (Fox in sod., 2006).

2.3 VPLIV SLANOSTI IN TEMPERATURE NA HITROST RASTI BAKTERIJSKIH CELIC

Bakterijska rast je rezultat koordiniranih celičnih procesov kot so kemijska sinteza, polimerizacija, biosinteza in transport molekul. Hitrost bakterijske rasti je odvisna od dejavnikov okolja kot so temperatura, slanost, pH, hranila, vodna aktivnost (Adams in Russell, 1992; Nichols in sod., 2000). Znano je, da v ekstremnih pogojih ti dejavniki okolja zavirajo rast bakterijskih celic.

Pri *Vibrio costicola* se hitrost rasti spreminja s spreminjanjem temperature in slanosti. Pokazali so, da pri tej bakteriji sprememba slanosti od optimalne vrednosti (1 M NaCl) k nižjim ali višjim koncentracijam NaCl povzroči zmanjšanje hitrosti rasti (Kogut in Russell, 1984; Adams in Russell, 1992).

Poleg slanosti je eden pomembnejših dejavnikov okolja, ki vpliva na rast in preživetje bakterijskih celic, temperatura. Pod minimalno temperaturo rast mikroorganizma ni možna, ker je transport snovi prepočasen, membrane želirajo in je kinetika encimskih reakcij

upočasnjena. Nad maksimalno temperaturo rast ni možna, ker pride do denaturacije proteinov in propada citoplazemske membrane (Madigan in sod., 1997).

2.4 VPLIV SLANOSTI NA BAKTERIJSKO CELIČNO MEMBRANO

Membrana bakterijskih celic igra pomembno vlogo v mnogih fizioloških procesih kot so transport molekul in elektronov, sinteza ATP in signaliziranje. Mnoge fizikalne lastnosti lipidnega dvosloja kot so urejenost, dinamika, debelina in nabitost, so pomembne pri delovanju in določanju aktivnosti membranskih proteinov (Lindblom in Rilfors, 1989; Pilot in sod., 2001; Rilfors in Lindblom, 2002). Slanost lahko vpliva na vse omenjene lastnosti, poleg tega lahko tudi spremeni sestavo lipidov v membrani.

2.4.1 Vpliv slanosti na sestavo lipidov v membrani

Znano je, da večina organizmov prilagaja sestavo membranskih lipidov v odvisnosti od dejavnikov okolja (Rilfors in Lindblom, 2002). V splošnem bakterijske celice uporabljajo najmanj dva različna odgovora na stres: (i) spreminjajo sestavo acilnih verig ali (ii) spreminjajo sestavo polarnih glav (Morein in sod., 1996). Pokazali so, da se v splošnem pri povečani koncentraciji soli zmanjša delež nenabitega fosfatidiletanolamina (PE) in poveča delež negativno nabityh fosfatidilglicerola (PG) in difosfatidilglicerola (DPG) (Kogut in Russell, 1984; Ventosa in sod., 1998). Poleg tega je znano, da je *cis-trans* izomerizacija nenasičenih maščobnih kislin del splošnega stresnega odgovora pri bakterijah iz rodov *Pseudomonas* in *Vibrio* (Heipieper in sod., 2003). V nekaterih primerih (npr. povišana temperatura, dodatek strupene snovi) se bakterije prilagodijo tako, da povečajo fluidnost membrane s povečanjem stopnje nasičenosti njihovih acilnih verig, saj prihaja do spremembe konfiguracije nenasičenih acilnih verig iz *cis* v *trans*.

Membrana bakterij iz rodu *Vibrio* vsebuje štiri glavne fosfolipide: 60-80 % fosfatidiletanolamina (PE), 15-30 % fosfatidilglicerola (PG), 20 % difosfatidilglicerola (DPG) ali kardiolipina (CL) in 1-10 % lizofosfatidiletanolamina (lizo-PE) (Hanna in sod., 1984). Najpogostejše acilne verige pri teh bakterijah so palmitinska kislina (16:0),

palmitoleinska kislina (16:1) in oleinska kislina (18:1). Poleg tega je za te bakterije značilna tudi prisotnost linolenske kisline (18:2) in odsotnost ciklopropanskih kislin (Ratledge in Wilkinson, 1988). Podrobna študija narejena na *Vibrio costicola* (Hanna in sod., 1984) kaže, da so glavni fosfolipidi PG, PE in DPG, manj je lizo-PE, glikolipidov, lizokardiolipina (lizo-CL) in lizofosfatidilglicerola (lizo-PG). Ugotovili so, da se relativni molski delež PG povečuje, relativni molski delež PE zmanjšuje, medtem ko relativni molski delež lizolipidov ne kaže večjih sprememb s slanostjo. Acilne verige, ki so v tej bakteriji prisotne v večjih količinah, so 16:0, 16:1 in 18:1, medtem ko je acilnih verig miristinske kisline (14:0) in stearinske kisline (18:0) manj. Relativni molski delež vseh nenasičenih acilnih verig je najvišji pri optimalni slanosti, pri ostalih koncentracijah soli pa zavzame nižje vrednosti, medtem ko kaže relativni molski delež vseh nasičenih acilnih verig nasproten vpliv. Prav tako so podobne spremembe pokazale študije drugih po Gramu negativnih halotolerantnih bakterij *Vibrio alginolyticus* (Hanna in sod., 1984), *Pseudomonas halosaccharolytica* (Ohno in sod., 1979) in po Gramu pozitivnega halotolerantnega *Planococcus* sp. (Miler, 1985) kot rezultat večanja slanosti v rastnem gojišču.

2.4.2 Vpliv slanosti na urejenost lipidov v bakterijski membrani

Sestava lipidnih komponent je odgovorna za tvorbo biomembranskih struktur (Cullis in de Kruijff, 1979). Znano je, da se membranski lipidi lahko povezujejo oziroma urejajo v agregirane strukture, ki so odvisne od okolja v katerem se nahajajo. To urejanje imenujemo tudi lipidni polimorfizem (de Kruijff, 1997). Najbolj poznane lipidne strukture so lamelarni lipidni dvosloj, nelamelarne obrnjene heksagonalne strukture (npr. olje in voda) in vmesne strukture kot so npr. obrnjene kubične faze (slika 1). Znano je, da lahko mikroorganizmi prilagodijo kemijsko sestavo lipidov v njihovi membrani in s tem določijo njeno urejenost kot odgovor na različne dejavnike okolja (npr. temperatura, slanost, pH, interakcije s kationi) (Cullis in de Kruijff, 1979; Lindblom in Rilfors, 1992; de Kruijff, 1997).

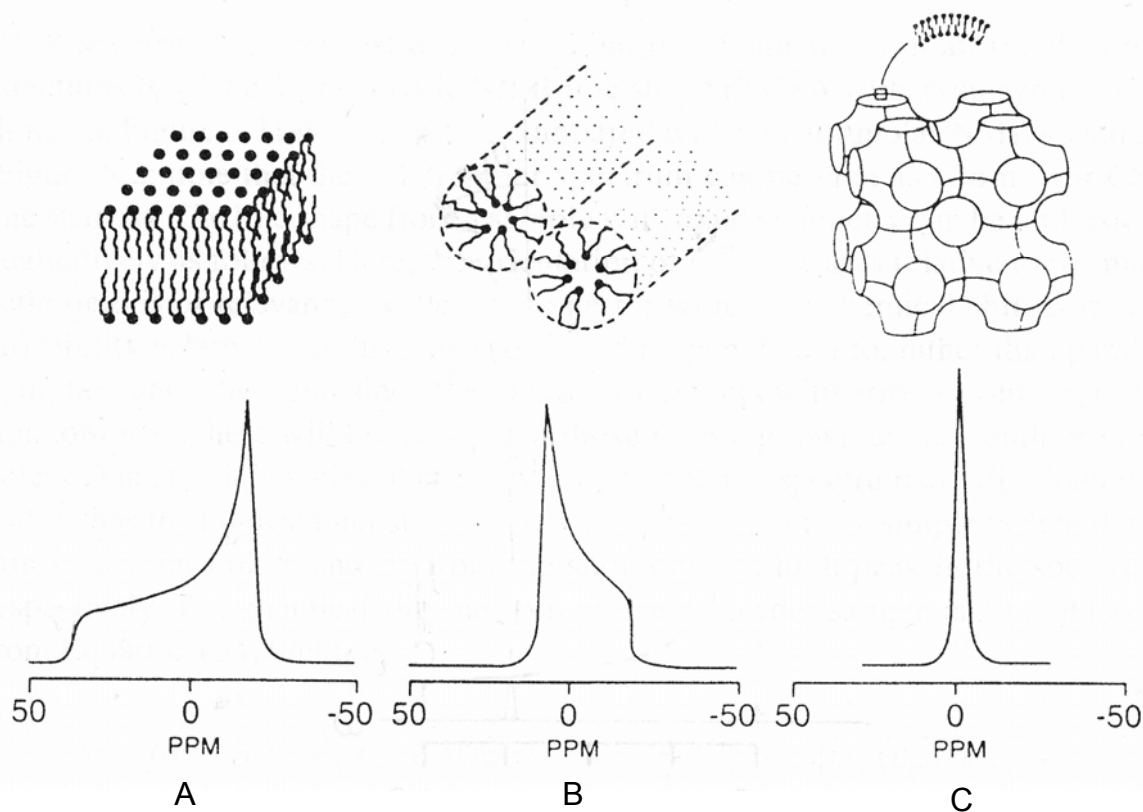
Znano je, da vsi membranski lipidi ne tvorijo dvosloja pri optimalni temperaturi za rast mikroorganizmov. Lipidi z malimi in delno hidriranimi glavami, kot so PE in

monoglukozili, težijo k tvorbi agregiranih struktur z negativno ukrivljenim enoslojem (konkavna površina) (Lindblom in Rilfors, 1992), medtem ko težijo lizolipidi k tvorbi agregiranih struktur s pozitivno ukrivljenim enoslojem (konveksna površina) (Arvidson in sod., 1985; Fuller in Rand, 2001). Lipidi, ki težijo k tvorbi nelamelarnih struktur, npr. heksagonalnih struktur, imajo stožčasto obliko, kjer je regija polarnih glav locirana v vrhu stožca (Cullis in de Kruijff, 1979). Pokazali so, da lahko tvori PE obrnjene kubične in obrnjene heksagonalne strukture (Koynova in Caffrey, 1994; Rilfors in sod., 1994), medtem ko lahko lizolipidi tvorijo tako normalne micelarne kot tudi normalne heksagonalne strukture v membrani, kar je odvisno od pogojev (Arvidson in sod., 1985; Slater in sod., 1989). Lizolipidi imajo obliko obrnjenega stožca, kjer je premer regije polarnih glav večji od regije usmerjene proti koncu acilne verige (Cullis in de Kruijff, 1979). Lipidi, ki ne tvorijo dvoslojev, vnašajo s svojim vstavljanjem v lipidni dvosloj stres (Gruner, 1989; Rilfors in Lindblom, 2002). Znano je, da imajo mnogi mikroorganizmi visok delež lipidov, ki tvorijo obrnjene nelamelarne strukture v membrani (npr. *Escherichia coli* vsebuje 70-80 % membranskih lipidov, ki tvorijo nelamelarne strukture) (Rietveld in sod., 1993). Pokazano je tudi, da mnoge bakterije regulirajo svojo lipidno sestavo membrane tako, da vzpostavijo ravnotežje med lipidi, ki tvorijo lamelarne, in lipidi, ki tvorijo obrnjene nelamelarne strukture (Goldfine in sod., 1987; Rilfors in sod., 1994; Morein in sod., 1996; Huijbregts in sod., 2000; Rilfors in Lindblom, 2002).

Ugotovili so, da visoka koncentracija NaCl vpliva na tvorbo obrnjenih heksagonalnih struktur za DPG (Seddon in sod., 1983b; Sankaram in sod., 1989) in PE (Seddon in sod., 1983a; Sutton in sod., 1990). Prav tako s slanostjo inducirane spremembe v sestavi membrane spremenijo strukturno integriteto lipidnega dvosloja in posledično funkcije membrane pri *Vibrio costicola* (Sutton in sod., 1990).

Za proučevanje urejenosti lipidov v membranah se veliko uporablja jedrska magnetno resonančna (NMR – nuclear magnetic resonance) spektroskopija. To je neinvazivna in zelo občutljiva tehnika, ki se uporablja za študij fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti snovi. Pri NMR gre za interakcijo magnetnega momenta atomskega jedra (μ) z zunanjim magnetnim poljem. Atomska jedra so električno nabita in mnoga med njimi imajo spin, kar jim daje lastnosti magneta. V močnem zunanjem magnetnem polju se jedra s spinom v

vzorcu poravnajo z ali proti zunanjemu magnetnem polju. Pri tem del populacije jeder v vzorcu preide v stanje z višjo energijo in del v stanje z nižjo energijo. V skladu z Boltzmannovo porazdelitvijo je populacija jeder z nižjo energijo nekoliko večja od populacije jeder z višjo energijo. Jedra z nižjo energijo lahko absorbirajo energijo, ki je pri NMR elektromagnetno valovanje z radiovalovno frekvenco in pri tem preidejo na višji energijski nivo. Absorpcija radiovalov je mogoča samo kadar je vzpostavljen resonančni pogoj, to je, da razlika med energijskima nivojema jeder ustreza točno določeni frekvenci radijskih valov pri danem zunanjem magnetnem polju. Ob vračanju jedra nazaj na osnovni energijski nivo, prihaja do oddajanja energije pri isti frekvenci. Ta signal lahko merimo in procesiramo v obliki NMR spektrov za določeno atomsko jedro (Atkins, 1998; Macomber, 1998).



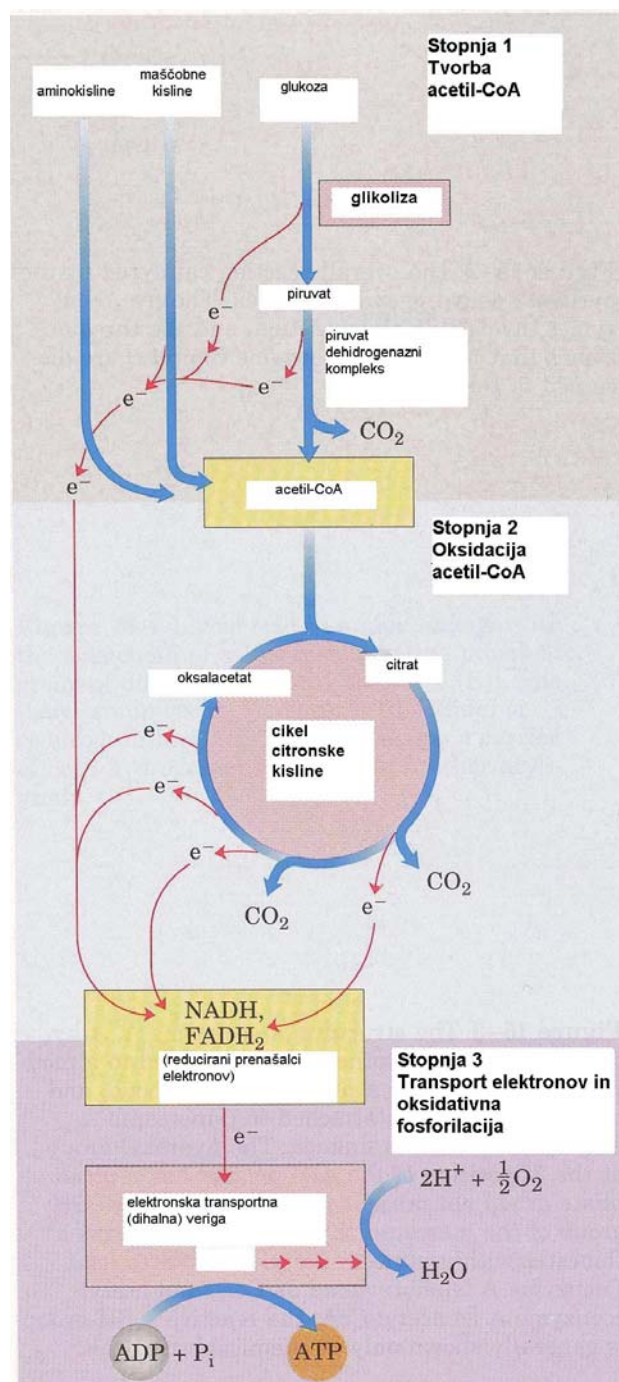
Slika 1: Shematski prikaz tipičnih oblik ^{31}P -NMR spektrov za različne strukture lipidov v membrani (Lindblom, 1996). A predstavlja lamelarne strukture (lipidni dvosloj), B obrnjene heksagonalne strukture in C kubične faze.

Figure 1: The schematic overview of typical ^{31}P -NMR line shapes for different lipid structures in the membrane (Lindblom, 1996). A lamellar phases (lipid bilayer), B reversed hexagonal phases and C cubic phases.

V splošnem je ^{31}P -NMR spekter lamelarne strukture sestavljen iz spektroskopskega vrha pri večji jakosti magnetnega polja in prevoja pri manjši jakosti magnetnega polja. Spekter obrnjenih heksagonalnih struktur je sestavljen iz spektroskopskega vrha pri manjši jakosti magnetnega polja in prevoja pri večji jakosti magnetnega polja, kar je ravno obratno kot pri spektrih lamelarnih struktur. Medtem ko kaže ozek simetričen ^{31}P -NMR signal izotropno strukturo tekočih kristalov (npr. kubična faza) (slika 1) (Lindblom, 1996).

2.5 VPLIV SLANOSTI NA MIKROBNI KATABOLIZEM

Slanost vpliva tudi na mikrobno presnovo, ki je sestavljena iz treh glavnih stopenj (Lehninger in sod., 1993). V prvi stopnji so organske molekule kot glukoza, maščobne kisline in nekatere aminokisline oksidirane do acetil-CoA. V drugi stopnji vstopijo molekule acetil-CoA v cikel citronske kisline ali Krebsov cikel (CCK), kjer se encimsko oksidirajo do CO_2 . Pri oksidaciji se sprosti energija v obliki reduciranih elektronskih prenašalcev NADH in FADH_2 . V tretji stopnji respiracije so ti reducirani kofaktorji oksidirani, pri čemer se sprostijo protoni in elektroni. Elektroni so preko elektronskih prenašalcev v dihalni verigi preneseni do molekule O_2 , ki se reducira v vodo. Med prenosom elektronov se sprosti in shrani veliko energije v obliki molekule ATP v procesu oksidativne fosforilacije.



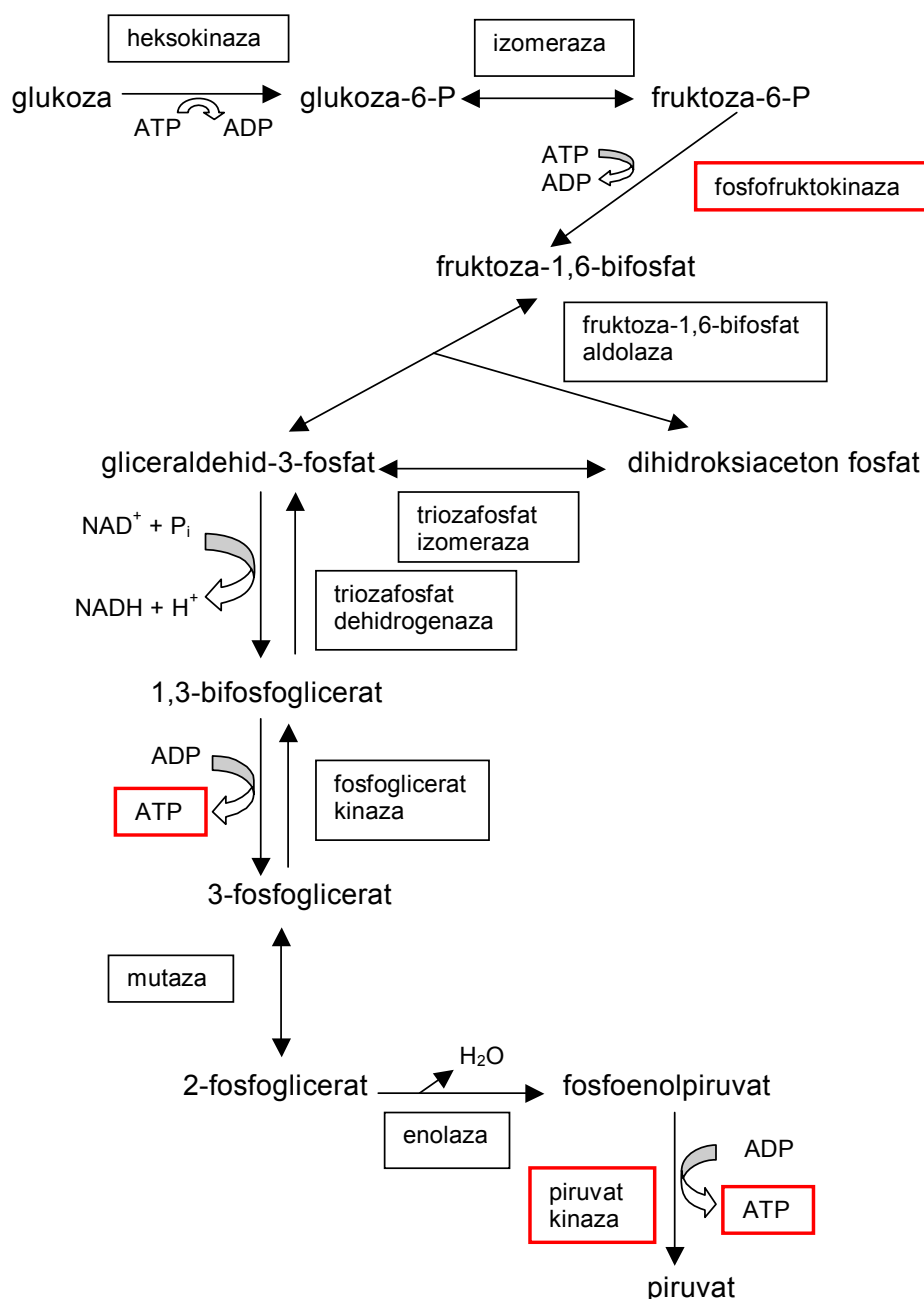
Slika 2: Shematski prikaz razgradnje aminokislin, maščobnih kislin in ogljikovih hidratov (Lehninger in sod., 1993). Ta je vezana na tri stopnje mikrobne presnove oziroma razgradnje. Prva stopnja: oksidacija maščobnih kislin, glukoze in nekaterih aminokislin do acetyl-CoA. Druga stopnja: oksidacija acetyl-CoA preko cikla citronske kisline, ki vključuje štiri korake v katerih se sprostijo elektroni. Tretja stopnja: elektroni se preko NADH in FADH₂ prenesejo do verige membranskih elektronskih prenašalcev in reducirajo O₂ do H₂O. Ta tok elektronov poganja sintezo ATP v procesu oksidativne fosforilacije.

Figure 2: **Schematic overview of catabolism of proteins, fatty acids and carbohydrates (Lehninger *et al.* 1993).** It occurs in the three stages of microbial catabolism. Stage 1: oxidation of fatty acids, glucose and some amino acids to acetyl-CoA. Stage 2: oxidation of acetyl groups via the citric acid cycle includes four steps in which electrons are abstracted. Stage 3: NADH and FADH₂ carry electrons along the respiratory chain where the electrons reduce O₂ to H₂O. This electron flow drives the synthesis of ATP in the process of oxidative phosphorylation.

2.5.1 Glikoliza pri bakterijah

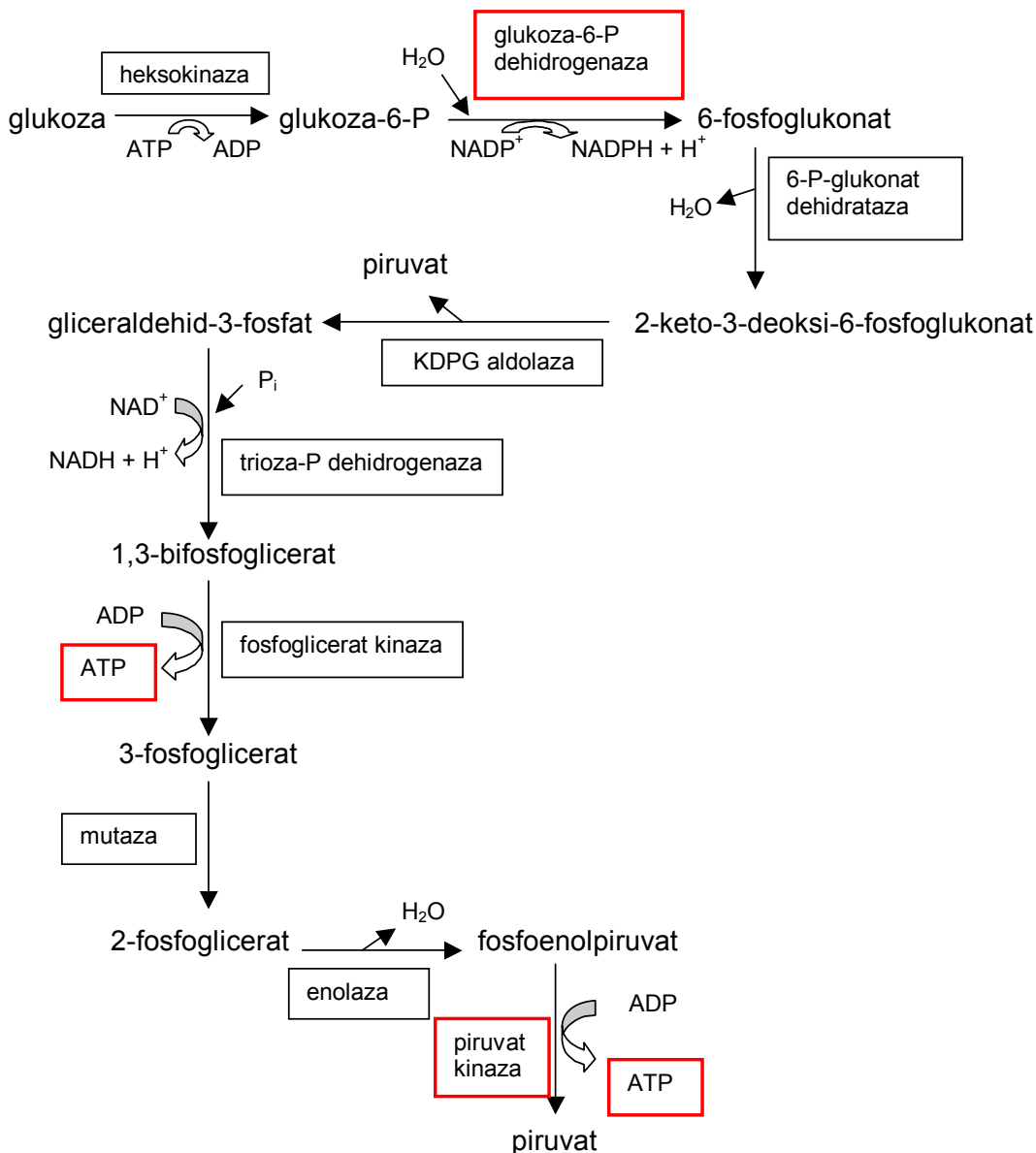
Glikoliza je visoko ohranjena biokemijska pot razgradnje glukoze do piruvata, ki je prisotna tako pri bakterijah in arhejah kot tudi pri evkariontih. V prvem delu te poti pride do preoblikovanja molekule glukoze do dveh molekul gliceraldehid-3-fosfata, kjer redoks reakcije niso vključene in ne pride do sproščanja energije temveč se v tem procesu porabita dve molekuli ATP. V drugi stopnji sodelujejo redoks reakcije, kjer nastanejo štiri molekule ATP, dve molekuli NADH in dve molekuli piruvata. Piruvat vstopa dalje v CCK ali se razgradi v anaerobnih pogojih do etanola in CO₂ ali laktata. To je Embden-Meyerhof-Parnas-ova pot (EMP) po kateri poteka glikoliza pri večini organizmov (slika 3). Poleg tega poznamo pri številnih mikroorganizmih tudi alternativne poti razgradnje glukoze kot so Entner-Doudoroff-ova pot (ED) (slika 4), pot pentoze fosfata (PP) (slika 5) in fosfoketolazna pot (FK). Pri ED poti nastanejo iz ene molekule glukoze dve molekuli piruvata, ena molekula ATP, ena molekula NADH in ena molekula NADPH. Pot PP je nekoliko bolj kompleksna in jo lahko razdelimo v tri stopnje. Prvo stopnjo predstavljajo oksidacijsko dekarboksilacijske reakcije, kjer iz glukoze-6-fosfat nastane ribuloza-5-fosfat in se sprosti ena molekula CO₂ ter dve molekuli NADPH. V drugi stopnji pride do izomerizacijskih reakcij, kjer se ribuloza-5-fosfat izomerizira do riboze-5-fosfata in ksiluloze-5-fosfata. V zadnji stopnji pride do reakcij prerazporejanja sladkorja z dvema tipoma encimov; transketolazami in transaldolazami. Na tej poti se torej tri molekule glukoze-6-fosfata oksidirajo, da nastanejo tri molekule CO₂, ena molekula gliceraldehid-3-fosfata in dve molekuli fruktoze-6-fosfata. Ti dve molekuli se potem z izomerizacijo spremenita v glukozo-6-fosfat. Zaradi tega je končni izplen te poti pretvorba oziroma oksidacija ene molekule glukoze-6-fosfata do ene molekule gliceraldehid-3-fosfata in nastanek treh molekul CO₂ ter šestih molekul NADPH.

Oksidativna pot PP je torej glavni vir redukcijske moči (NADPH) in metabolnih intermediatov za biosintetske procese v celici, saj da prekursorje za nukleinske kisline (pentoza-fosfat kot prekursor za ribozo in deoksiribozo) in aromatske aminokisline (eritroza-fosfat kot prekursor za fenilalanin, tirozin in triptofan) (Lehninger in sod., 1993; White, 2000).



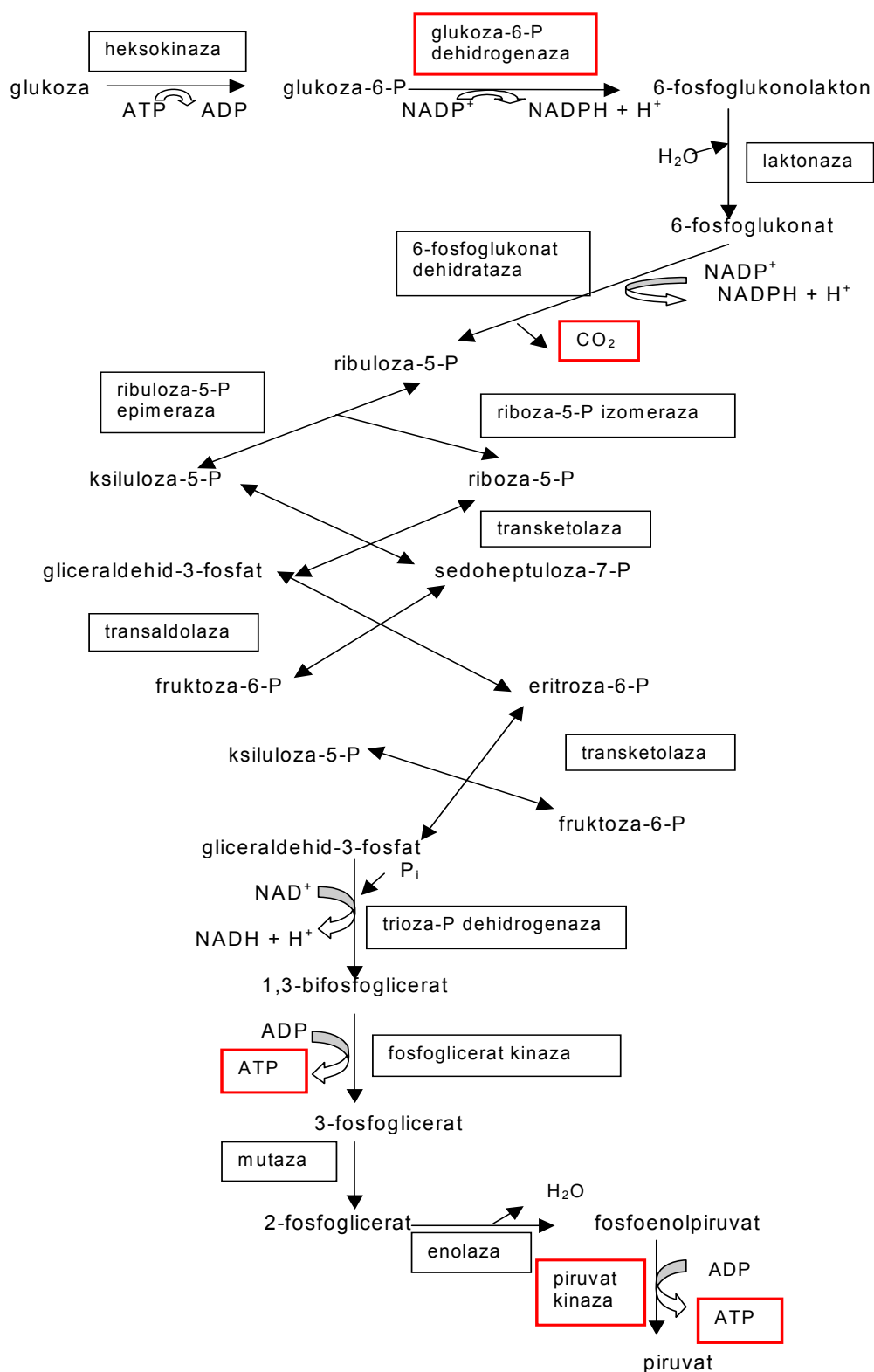
Slika 3: Shema Embden-Meyerhof-Parnas-ove poti (EMP) glikolize pri bakterijskih celicah (White, 2000). Z rdečo barvo so označeni glikolitični encimi in metabolni intermediati, katerih aktivnost oziroma koncentracijo smo spremljali pri bakteriji *Vibrio* sp.

Figure 3: Scheme of Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway (EMP) in bacteria (White, 2000). Red color marks glycolytic enzymes and metabolic intermediates, the activities or concentrations of which were measured in *Vibrio* sp. cells.



Slika 4: Shema Entner-Doudoroff-ove poti (ED) glikolize pri bakterijskih celicah (White, 2000). Z rdečo barvo so označeni glikolitični encimi in metabolni intermediati, katerih aktivnost oziroma koncentracijo smo spremljali pri bakteriji *Vibrio* sp.

Figure 4: Scheme of Entner-Doudoroff glycolytic pathway (ED) in bacteria (White, 2000). Red color marks glycolytic enzymes and metabolic intermediates, the activities or concentrations of which were measured in *Vibrio* sp. cells.



Slika 5: Shema poti pentoze fosfata (PP) pri bakterijskih celicah (White, 2000). Z rdečo barvo so označeni glikolitični encimi in metabolni intermediati, katerih aktivnost oziroma koncentracijo smo spremljali pri bakteriji *Vibrio* sp.

Figure 5: **Scheme of pentose phosphate pathway (PP) in bacteria (White, 2000).** Red color marks glycolytic enzymes and metabolic intermediates, the activities or concentrations of which were measured in *Vibrio* sp. cells.

Glikoliza je torej ena od osrednjih metabolnih poti bakterijskih celic, ki generira energijo in ključne metabolne intermediate. Zaradi tega mora biti ta pot zelo natančno regulirana preko njenih ključnih encimov in koncentracije ATP (Koebsmann in sod., 2002). Pokazali so, da je pri *Escherichia coli* pretok snovi skozi glikolitične poti večinoma kontroliran s procesi, ki porabljajo ATP (Koebsmann in sod., 2002). Znano je, da vnašajo bakterije iz rodu *Vibrio* sp. glukozo v celico preko fosfoenolpiruvat fosfotransferaznega (PTS) sistema in jo dalje katalizirajo po konstitutivni EMP poti (Bauman in Schubert, 1984). Slanost lahko spremeni regulacijo glikolitičnih poti v bakterijski celici. Pokazali so, da se pri višjih slanostih transport glukoze v celico poveča pri *Corynebacterium glutamicum* in zmanjša pri *Escherichia coli* (Varela in sod., 2003). Poleg tega se glikolitična aktivnost poveča z večanjem osmolarnosti (Varela in sod., 2003) in pri nizkih temperaturah (Wouters in sod., 2000).

2.5.1.1 Delovanje nekaterih ključnih encimov glikolitičnih poti

Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) je splošno razširjen encim, saj ga najdemo tako pri bakterijah, arhejah kot tudi evkariontih. To je ključni encim oksidativne poti PP in pri bakterijah tudi ED poti. Encim katalizira oksidacijo glukoze-6-fosfata do glukonolakton-6-fosfata z NADP^+ ali NAD^+ kot prejemnikom elektronov (Moritz in sod., 2000). Pri bakterijah obstajajo bodisi NADP^+ in/ali NAD^+ specifične G6PD (Hansen in sod., 2002). S pomočjo kontrole aktivnosti tega encima lahko spremembe v znotrajcelični koncentraciji glukoze-6-fosfata močno vplivajo na prerazporeditev toka ogljika med ED potjo in potjo PP (Moritz in sod., 2000). Nizka znotrajcelična koncentracija glukoze-6-fosfat zelo šibko vpliva na aktivnost G6PD in oksidativno pot PP. V primeru visoke znotrajcelične koncentracije glukoze-6-fosfata pa le-ta ne vpliva na aktivnost G6PD. Znano je, da je aktivnost tega encima regulirana tudi z razmerjem med koncentracijama NADP^+ in NADPH (Moritz in sod., 2000). Pokazali so, da ima ta encim pri *Brevibacterium flavum* pH optimum pri 7.5 in je stabiliziran s K^+ in Mg^{2+} ioni, majhen

vpliv na stabilizacijo imajo še glukoza-6-fosfat, NADP in DTT (Sugimoto in Shiio, 1987). Encim je inhibiran s sulfhidrilnim reagentom, fosforibozil pirofosfatom, oksalacetatom, fruktozo-1,6-fosfatom, ribuloza-5-fosfatom, ksiluloza-5-fosfatom, diamidom, acetil-CoA in NADPH (Sugimoto in Shiio, 1987). Poleg tega je G6PD inhibirana še z ATP, saj le-ta zmanjša afiniteto encima za glukoza-6-fosfat (Lessie in Neidhardt, 1967). Vpliva slanosti na aktivnost G6PD v literaturi nismo zasledili.

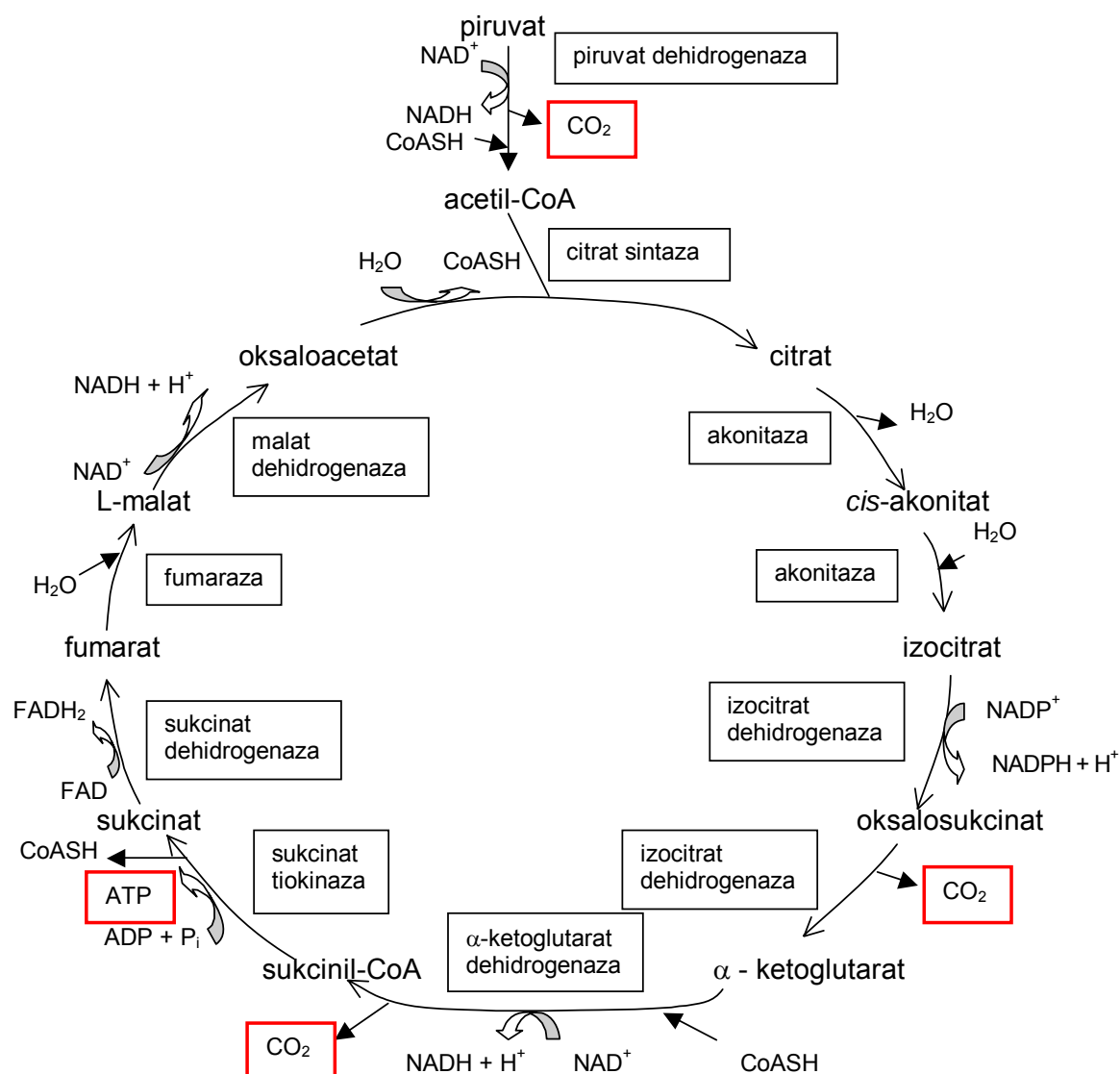
Fosfofruktokinaza (PFK) je ključni encim EMP poti glikolize, ki ga najdemo pri bakterijah, arhejah in evkariontih. Ta encim ireverzibilno prenaša fosfatno skupino iz molekule ATP na fruktozo-6-fosfat, da nastane fruktoza-1,6-fosfat in ADP, za njegovo optimalno delovanje so potrebni tudi Mg^{2+} ioni. Pri nekaterih bakterijah in mnogih rastlinah se uporablja kot donor fosfatne skupine pirofosfat namesto molekule ATP. To je drugi encim v EMP poti, ki regulira celoten potek glikolize. V primeru, da je njegova aktivnost povečana, je povečana tudi celokupna glikolitična aktivnost (Lehninger in sod., 1993). Znano je tudi, da je PFK aktivnost inhibirana z Cu^{2+} ioni (Gebhard in sod., 2001) in zmanjšana z naraščanjem pH (Even in sod., 2003). Zmanjšanje njene aktivnosti pri *Lactococcus lactis* vpliva na zmanjšanje hitrosti rasti kot tudi na glikolizo samo (Andersen in sod., 2001). Poleg tega je PFK aktivnost inhibirana z molekulami ATP in citratom, saj le-ti zmanjšata afiniteto encima za fruktozo-6-fosfat, in aktivirana z adenozin-monofosfatom (AMP) (Junica in sod., 1998). Vpliva slanosti na aktivnost PFK v literaturi nismo zasledili.

Piruvat kinaza (PK) je skupaj s fosfofruktokinazo in heksokinazo eden regulatornih encimov glikolitične poti in metabolizma ogljika v večini celic (Muñoz in Ponce, 2003). Regulacija PK je pomembna za kontroliranje nivojev ATP, GTP in glikolitičnih intermediatov v celici (Junica in sod., 1998). PK deluje tudi kot stikalo med glikolitično potjo in glukoneogenezo v nekaterih celicah (Junica in sod., 1998). Ta encim katalizira ireverzibilni prenos fosforilne skupine iz fosfoenolpiruvata (PEP) na ADP pri čemer nastane piruvat in ATP (Ramos in sod., 2004). Piruvat je udeležen v mnogih nadaljnjih metabolnih poteh, zato pojmujeemo ta encim kot primarno »metabolno križišče«. Večina bakterij ima dva izoencima PK, ki sta sposobna vezave PEP in rabita za svoje delovanje K^{+} in Mn^{2+} ali Mg^{2+} ione (Muñoz in Ponce, 2003). Njuno delovanje aktivira fruktoza-1,6-fosfat (Junica in sod., 1998). Znano je, da se aktivnost piruvat kinaze zmanjša

z naraščanjem pH (Even in sod., 2003) ali s povečano hitrostjo rasti (Cocaign-Bousquet in sod., 1996). Njena aktivnost se tudi zmanjša s povečano koncentracijo ATP, saj le-ta zmanjša afiniteto encima za PEP (Lehninger in sod., 1993). Poleg tega delovanje PK inhibirajo dolgoveržne maščobne kisline in acetil-CoA (Lehninger in sod., 1993). Prekomerno izražanje PFK in PK ne poveča tvorbe citronske kisline, ne vpliva na aktivnost drugih encimov glikolitičnih poti, niti ne spremeni nivoja intermediarnih metabolitov v celici *Aspergillus niger* (Ruijter in sod., 1997). Vpliva slanosti na aktivnost PK v literaturi nismo zasledili.

2.5.2 Cikel citronske kisline pri bakterijah

Cikel citronske kisline (CCK) ali Krebsov cikel je osrednja pot oksidativnega metabolizma bakterijskih celic, saj je rezervoar za ključne metabolne intermediate vključene v sintezo aminokislin, maščobnih kislin in sladkorjev (Hamel in Appanna, 2001). Poleg tega nastajajo v tem ciklu kot končni produkt tri molekule CO₂, ki so rezultat delovanja oziroma aktivnosti treh encimov cikla CCK kot so izocitrat dehidrogenaza, α -ketoglutarat dehidrogenaza in piruvat dehidrogenaza (Roy in Packard, 2001). Ta cikel je vključen v proces aerobne respiracije, zato je lahko sproščanje CO₂ merilo za hitrost respiracije bakterijskih celic. Pokazano je, da je respiracija zmanjšana pri povečani osmolarnosti (Wood, 1999). Nižja hitrost respiracije je bila izmerjena že 30 minut po spremembi osmolarnosti. Pri *Bacillus cereus* endogena respiracija narašča do 0.2 M NaCl v ravnem gojišču, nad to koncentracijo soli v gojišču pa endogena respiracija pada (Ingram, 1940). S povečevanjem osmolarnosti se tudi zmanjšuje koncentracija intermediatov cikla CCK v celici (npr. α -ketoglutarata in oksalacetata) ter poveča njegova celokupna aktivnost (Varela in sod., 2003). Znano je, da pride pri višjih osmotskih tlakih do zmanjšanja hitrosti rasti, hkrati se povečata vnos substrata v celico in tvorba CO₂ (Varela in sod., 2004). Eden ključnih encimov regulacije CCK je izocitrat dehidrogenaza, ki igra ključno vlogo pri sintezi glutamata (Cvitkovitch in sod., 1997). Preko aktivnosti tega encima lahko napovemo delež nastalega CO₂ (Roy in Packard, 2001). Znano je, da se aktivnost izocitrat dehidrogenaze zmanjša pri *Pseudomonas fluorescens* ob dodatku aluminijevih ionov (Hamel in Appanna, 2001).



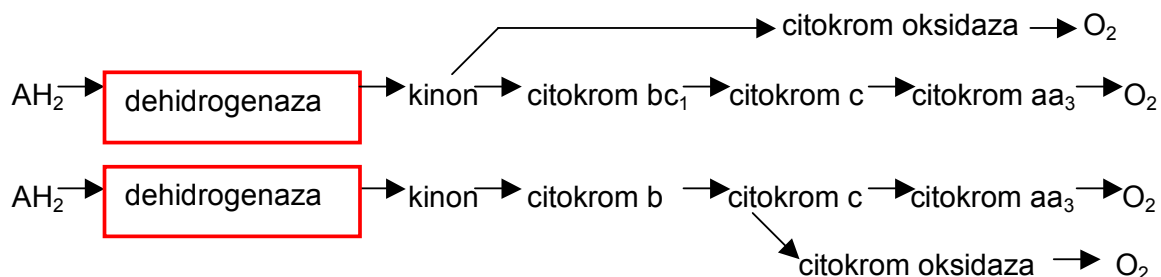
Slika 6: Shema cikla citronske kisline (CCK) pri bakterijah (White, 2000). Z rdečo barvo so označeni metabolni intermedie, katerih koncentracijo smo spremljali pri bakteriji *Vibrio* sp.

Figure 6: Scheme of citric acid cycle in bacteria (White, 2000). Red color marks metabolic intermediates, the concentrations of which were measured in *Vibrio* sp. cells.

2.5.3 Določanje aktivnosti bakterijske elektronske transportne verige

Pri bakterijah je respiracija fleksibilen modularno sestavljen proces, ki se spreminja glede na spremembe dejavnikov okolja. Elektronska transportna veriga (ETV) je sestavljena iz dehidrogenaze in oksidaznih kompleksov, sklopljenih s kinoni. Njihova fleksibilnost je odvisna predvsem od fizioloških reducentov in oksidantov, ki jih uporabljajo bakterije v

ETV (npr. dehidrogenaze in terminalne reduktaze oziroma oksidaze). To omogoča bakterijam sposobnost koloniziranja različnih ekoloških niš in hitrega prilagajanja na spremembe dejavnikov okolja znotraj posamezne niše (Richardson, 2000).



Slika 7: Shematski prikaz transporta elektronov pri bakterijah med aerobno rastjo (White, 2000).

Dehidrogenazni kompleks sprejme elektrone od donorja elektronov (AH_2) in jih prenese na kinone. Elektroni se nato prenesejo na oksidazni kompleks po različnih poteh. Poti so lahko razvejane na kinonih ali citokromih, odvisno od bakterijskih celic. Mnoge bakterije imajo bc_1 kompleks, citokrom c in citokrom aa_3 v eni izmed vej, kar je podobno transportu elektronov v mitohondriju. Druge bakterije nimajo bc_1 kompleksa in lahko imajo ali nimajo citokroma aa_3 . Rdeče so označeni encimi, katerih aktivnost smo spremljali pri *Vibrio* sp.

Figure 7: Scheme of electron transport pathways in bacteria during aerobic growth (White, 2000). A

dehydrogenase complex removes electrons from an electron donor (AH_2) and transfers these to a quinone. The electrons are transferred to an oxidase complex via a branched pathway. Depending upon the bacterium, the pathway may branch at the quinone or at the cytochrome. Many bacteria have a bc_1 complex, cytochrome c, and cytochrome aa_3 in one of the branches and in this way resemble mitochondria. Other bacteria do not have a bc_1 complex, and may or may not have cytochrome aa_3 . Red color marks enzymes, the activities of which were measured in *Vibrio* sp. cells.

Mikrobna oksidacija organske snovi je pri aerobnih pogojih odvisna od ETV, kjer je O_2 končni prejemnik elektronov. Elektronski transportni sistem je povezan s sintezo ATP.

Pri bakterijah iz rodu *Vibrio* sp. poznamo nekatere gradnike dihalne verige. Pri mnogih vrstah *Vibrio* sp. sta v dihalni verigi prisotna tako citokrom b kot tudi citokrom c, univerzalni prejemnik elektronov iz dihalne verige je molekula O_2 (Baumann in Schubert, 1984). Poleg tega je znano, da imajo morske bakterije iz rodu *Vibrio* sp. od Na^+ odvisno dihalno verigo (Fujiwara-Nagata in sod., 2003). Pri *Vibrio alginolyticus* je primarna Na^+

črpalka sklopljena z dihalno verigo. Prav tako potrebuje NADH oksidaza pri tej bakteriji Na^+ ione za svojo maksimalno aktivnost (Oh in sod., 1991). Pokazali so tudi, da aktivnost NADH oksidaze narašča s slanostjo (Oh in sod., 1991).

2.5.3.1 Merjenje transporta elektronov v bakterijski dihalni verigi

Merjenje transporta elektronov v dihalni verigi *in vivo* je zahteven proces. Metode vključujejo predvsem določanje aktivnosti posameznih proteinov v dihalni verigi z uporabo sintetičnih prejemnikov elektronov kot so diklorofenil izocianat (DCPI) in tetrazolijeve soli. V večini primerov te metode ne merijo elektronskega transporta direktno, temveč so odvisne od transporta protonov. Za direktno merjenje transporta elektronov v dihalni verigi bi lahko uporabili stabilne radikale ali spinske označevalce.

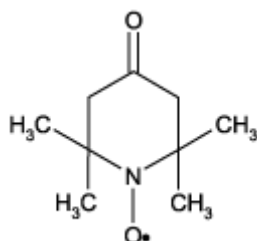
Metoda, ki bi lahko merila direkten transport elektronov v ETV, je elektronska paramagnetna resonanca (EPR – electron paramagnetic resonance). To je spektroskopska tehnika za določanje strukture, dinamike in prostorske porazdelitve paramagnetnih delcev, ki vsebujejo najmanj en nesparjen elektron. V osnovi je EPR spektroskopija zelo podobna NMR, le da z EPR preučujemo spin elektrona in ne jedra kot pri NMR. Običajno spremljamo absorpcijo mikrovalov s konstantno frekvenco, spreminjamo pa jakost zunanega magnetnega polja. Ko nastopi resonančni pogoj, se spin elektrona obrne, pri tem absorbirano mikrovalovanje pa spremljamo kot EPR spekter. Resonančni pogoj pa ni le funkcija zunanega magnetnega polja in frekvence mikrovalov, ampak tudi lokalnega magnetnega polja. Atomska jedra v bližini nesparjenega elektrona, polarnost in protičnost okolja vplivajo na absorpcijo mikrovalov. Zato lahko z EPR poleg merjenja intenzitete EPR signala, ki je sorazmeren s koncentracijo paramagnetnih delcev, spremljamo tudi lokalne interakcije (Atkins, 1998; Macomber, 1998). V primeru, da vzorec teh delcev ne vsebuje, mu dodamo spinski označevalec. Običajno gre za stabilne radikale. Če spinski označevalec sprejme elektron oziroma se reducira, se intenziteta EPR signala zmanjša.

V EPR spektroskopiji se uporabljajo nitroksidni radikali za pridobivanje informacij o strukturi bioloških membran (Chan in sod., 1973) in za študij odnosov med strukturo in funkcijo v bioloških sistemih (Baldassare in sod., 1974). Bakterijske celice so znane po

tem, da spremenijo EPR-aktivne paramagnetne označevalce v EPR-neaktivne neparamagnetne spojine, kot so hidroksilamini (Rapoport in sod., 1999).

Znano je, da se redukcija nitroksidnih radikalov uporablja kot indikator redoks metabolizma celice. Na njihovo redukcijo vplivajo tip tkiva, vrsta celic, njihova topnost v lipidih, struktura nitroksidnega obroča in dejavniki okolja (predvsem O_2 in pH) (Chen in sod., 1988). Poleg tega je njihova kinetika redukcije odvisna od lokacije označevalca v membrani, predvsem njegove globine (Chen in sod., 1988). Pokazali so, da označevalec nameščen bliže površini membrane kaže kinetiko redukcije prvega reda, medtem ko kažejo označevalci globoko v membrani kinetiko redukcije ničtega reda. Pri označevalcih nameščenih globoko v membrani je omejujoč dejavnik redukcije difuzija označevalca na površino membrane ali difuzija redukcijskih centrov v membrano, saj so le-ti večinoma nameščeni bliže površini membrane. V primeru, ko je redukcijska kinetika označevalca odvisna od hitrosti transporta le-tega preko zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij, jo lahko uporabljamo za spremljanje transporta molekul preko membrane (Rapoport in sod., 1999). Na redukcijo nitroksidnih radikalov vpliva tudi temperatura, ki vpliva tako na hitrost difuzije radikalov v membrano kot tudi na kinetiko njihove redukcije (Jung in sod., 1998). Ključno vlogo lahko igra pri redukciji nitroksidnih radikalov, ki difundirajo preko bakterijske membrane ali so v njej raztopljeni, citokrom-c-reduktaza (Jung in sod., 1998).

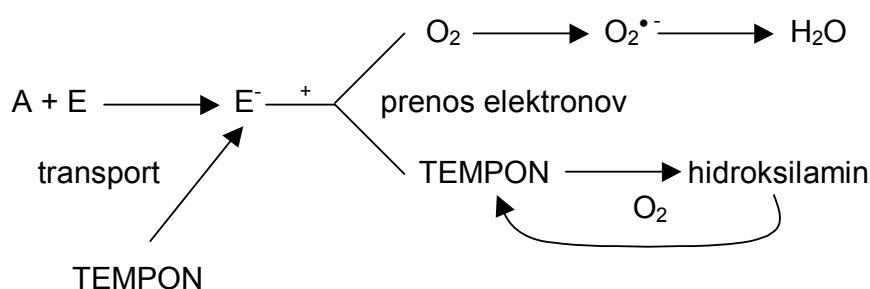
Zelo pogosto se za študije uporablja nitroksidni spinski označevalec 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) (slika 8). Ta je v celični suspenziji prisoten v vodni fazi, kjer je stabilen.



Slika 8: Strukturna formula nitroksidnega spinskega označevalca 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO-a) (Schreier in sod., 1978).

Figure 8: The structural formula of nitroxide spin label 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPON) (Schreier *et al.* 1978).

Postopna redukcija TEMPON-a v prisotnosti bakterijskih celic kaže, da le-ta zaradi svoje majhnosti preide zunanjno membrano in periplazemski prostor do citoplazemske membrane, kjer je reduciran z elektroni iz ETV (Rapoport in sod., 1999). Na citoplazemski membrani se nahajajo proteini iz ETV in proteini za druge metabolne aktivnosti po Gramu negativnih bakterij. Pokazali so, da se ob prisotnosti živih celic *Escherichia coli* reducira 70 %, v njihovem celičnem lizatu pa le 21 % TEMPON-a v dveh urah (Rapoport in sod., 1999). Iz tega lahko zaključimo, da ETV ni edina pot redukcije TEMPON-a, je pa večinska. Znano je tudi, da je redukcija TEMPON-a dvakrat počasnejša ob prisotnosti čistega O₂ kot zraka ali N₂, saj se TEMPON ob dodatku O₂ ponovno oksidira (Rapoport in sod., 1999).

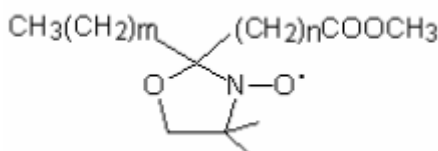


Slika 9: Shematski prikaz mehanizma redukcije nitroksidnega radikala TEMPON-a (Rapoport in sod., 1999). Reduktent A reagira s komponento E v elektronski transportni verigi in nastane reducirana oblika E, ki potem reagira bodisi z nitroksidnim radikalom (TEMPON) da nastane hidroksilamin ali prenese elektron po elektronski transportni verigi do O₂. Hidroksilamin je oksidiran nazaj do nitroksida s kisikom.

Figure 9: Schematic overview of TEMPON reduction mechanism (Rapoport *et al.* 1999). Reductant A interacts with the component E of the electron transport chain to form a reduced form of E which then either reacts with nitroxide radical (TEMPON) to form hydroxylamine or transfers electron further along the electron transport chain, all the way to oxygen. Hydroxylamine is oxidised by oxygen back to nitroxide.

Kljub temu je regeneracija TEMPON-a bistveno počasnejša od njegove redukcije. TEMPON torej predstavlja alternativni končni prejemnik elektronov iz ETV (Chapman in sod., 1985). Stopnja njegove redukcije je odvisna od dostopnosti O₂, ki služi kot končni prejemnik elektronov iz ETV, kot tudi od dostopnosti donorjev elektronov za ETV (Chapman in sod., 1985).

Poleg TEMPON-a se za študij kinetike in lokacije redukcijskih procesov v celici veliko uporabljajo lipofilni nitroksidni spinski označevalci (npr. n-doksil stearati ali metilni estri 5-doksil palmitinske kisline (MeFASL)) (Chen in sod., 1988; Ahlin in sod., 2003). Ti označevalci so lokalizirani v nepolarnem okolju celice in so hitreje reducirani kot vodotopni označevalci (Jung in sod., 1998).



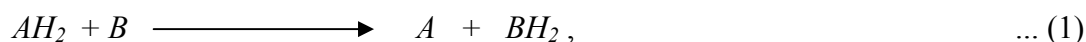
Slika 10: Strukturna formula lipofilnega nitroksidnega označevalca 5-doksil metil palmitinske kisline (MeFASL ($m=10$, $n=3$)) (Ahlin in sod., 2003).

Figure 10: The structural formula of lipophilic nitroxide spin probe 5-doxyl methyl palmitic acid (MeFASL ($m=10$, $n=3$))(Ahlin *et al.* 2003).

Zaradi vseh teh spoznanj bi lahko bila redukcija radikalov lastnost, ki bi EPR spektroskopijo uvrščala med direktne tehnike merjenja oziroma spremljanja transporta elektronov v dihalni verigi bakterijskih celic.

2.5.3.2 Vpliv slanosti na oksidativno aktivnost celic; delovanje in vloga bakterijskih dehidrogenaz

Dehidrogenaze so encimi, ki katalizirajo biološko oksidacijo organske snovi. Proces dehidrogenacije lahko ponazorimo z naslednjo formulo:



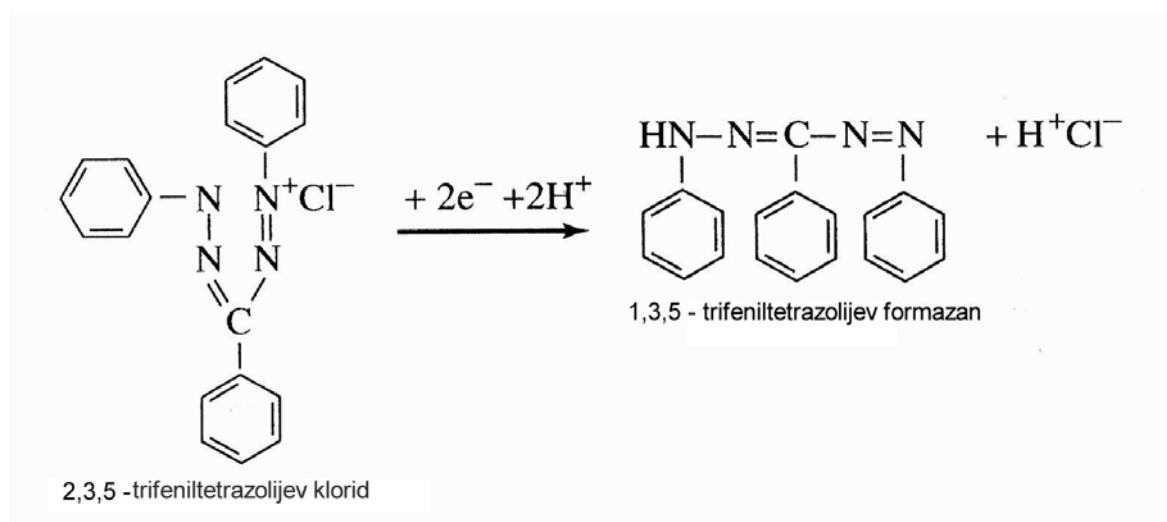
kjer je AH_2 organska spojina kot vir vodika in B kot prejemnik vodika.

Zaradi raznolikosti substratov in prejemnikov poznamo mnogo različnih specifičnih dehidrogenaznih sistemov (npr. sukcinat, fumarat, format, laktat, NADH dehidrogenaza), ki so udeleženi v metabolno aktivnost mikroorganizmov.

Ker so dehidrogenaze prisotne v dihalni verigi, CCK in glikolizi, kaže merjenje njihove aktivnosti na celokupno oksidativno aktivnost celic (Alef in Nannipieri, 1995). V mnogih fizioloških in ekoloških študijah so za meritve oksidativne aktivnosti uporabljali tetrazolijeve soli (npr. INT, CTC, TTC, XTT), ki jih reducirajo dehidrogenazni encimi prisotni v aerobnih, fakultativnih in anaerobnih mikroorganizmih (Hatzinger in sod., 2003). V dosedanjih študijah so uporabljali tetrazolijeve soli za določanje respiratorne oziroma metabolne aktivnosti mikroorganizmov v naravnih okoljih kot so oceani, tla, sedimenti in rečni biofilmi (Tabatabai, 1994; Hatzinger in sod., 2003). Poleg tega so jih uporabljali tudi kot indikator aktivnosti ETV pri bakterijah, algah in kvasovkah (Trevors, 1984). Znano je, da se dehidrogenazna aktivnost zmanjša ob dodatku kloroforma ali toluena (Tabatabai, 1994) in ob prisotnosti pesticidov ter pri nizkih pH vrednostih (Smith in Pugh, 1979). Dehidrogenazno aktivnost v tleh stimulirajo Fe_2O_3 in MnO_2 ter SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl^- ioni in inhibirajo NO_3^- , NO_2^- , Fe^{3+} ioni (Tabatabai, 1994). Povečana koncentracija soli vpliva na zmanjšanje hidrogenazne aktivnosti in povečanje aktivnosti alkoholne dehidrogenaze celic *Halobacteroides acetoethylicus* (Rengpipat in sod., 1988). Pretekle študije membranskih veziklov *Escherichia coli* K12 so pokazale, da se iodonitrotetrazolijev klorid (INT) reducira s sukcinat dehidrogenazo na ubikinonu ali menakinonu in citokromu b_{556} , medtem ko se 5-ciano-2,3-ditoliltetrazolijev klorid (CTC) reducira z NADH dehidrogenazo pred ubikinonom (Smith in McFeters, 1997). Tetrazolijeve soli (npr. INT in CTC) se uporabljajo tudi v mikroskopiji za določanje števila živih celic v okoljskem vzorcu (Hatzinger in sod., 2003) ali za določanje metabolno aktivnih bakterijskih celic v čisti kulturi (Maness in sod., 1999), saj kopičijo aktivni mikroorganizmi kristale formazana v celici.

V doktorski nalogi smo za spremljanje dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic uporabljali redoks indikator 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC), ki omogoča poenostavljeno merjenje dehidrogenazne ali oksidativne aktivnosti bakterijskih celic. TTC je lahko prejemnik elektronov za mnoge dehidrogenaze kot tudi flavin vsebujoče encime, ki ga reducirajo v netopni 1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan TTF (Alef in Nannipieri, 1995; Hatzinger in sod., 2003). Kristali slednjega se kopičijo v aktivnih celicah, zato ga je potrebno ekstrahirati iz bakterijskih celic z organskimi topili (npr. aceton, metanol) in meriti spektrofotometrično. Pri redukciji TTC v TTF namreč pride do spremembe barve iz

rumene v vijolično (Cook in Garland, 1997; Maness in sod., 1999; Hatzinger in sod., 2003). Količina nastalega formazana je mera za celokupno respiratorno oziroma metabolno aktivnost mikroorganizmov (Hatzinger in sod., 2003).



Slika 11: Shematski prikaz redukcije 2,3,5-trifeniltetrazolijevega klorida (TTC) (Tabatabai, 1994).

Figure 11: Schematic overview of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction (Tabatabai, 1994).

2.5.3.3 Nivo ATP v bakterijski celici v odvisnosti od slanosti

Mikrobni metabolizem je odvisen od katabolnih poti, kjer pride do pretvorbe energije substrata v visoko energetska molekulo ATP, ki se nato porablja v anabolnih poteh (Mignone in Donati, 2004). ATP nastaja v celici (i) s fosforilacijo na nivoju substrata in (ii) oksidativno fosforilacijo ali fotofosforilacijo, kjer je sinteza ATP sklopljena s transportom elektronov v ETV (Haddock in Jones, 1977). Adenozin fosfati so zelo pomembne spojine v mnogih bioloških procesih in igrajo ključno vlogo v bioenergetiki, saj lahko količino ATP v celici uporabljamo kot indeks energetskega statusa bakterijske celice (Stanley, 1986). Znano je, da ostaja nivo ATP v celici konstanten pri definiranih dejavnikih okolja in znaša pri bakterijskih celicah okoli 10^{-15} g ATP na celico (Stanley, 1986). Pokazali so tudi, da vsebuje *Vibrio* sp. $0.5 - 4.1 \cdot 10^{-15}$ g ATP na celico (Hamilton in Holm-Hansen, 1967).

Spremembe v deležu ATP v celici so vezane na spremembe dejavnikov okolja kot so anaerobioza, pomanjkanje hranil, temperaturni stres, pH stres, sprememba tlaka, hitrost rasti ter prisotnost toksinov, antibiotikov, virusov in radiacije (Hakeda in Fukunaga, 1983; Stanley, 1986). Znano je, da delež ATP narašča v stresnih pogojih (Varela in sod., 2004). Koncentracija ATP v celici naraste pri osmotskem stresu in pri izpostavljanju celic polietilenglikolu, diamidom, rifampicinu ali streptomycinu in ultravijolični svetlobi (Tuovila in sod., 1987; Ohwada in sod., 1994), medtem ko se delež ATP v celici zniža ob dodatku SDS ali etanola (Ohwada in sod., 1994) ter z naraščanjem pH (Even in sod. 2003) kot tudi staranjem celic in pomanjkanjem hranil (Tuovila in sod., 1987). S povečanjem osmolarnosti se poveča tvorba energije v obliki neto produkcije ATP (Varela in sod., 2003). Poleg tega se njegova hidroliza zmanjša ali celo ustavi pri povečani koncentraciji NaCl (36 % (w/V)) (Tuovila in sod., 1987). Povečana stopnja tvorbe ATP je posledica visokih energetskih potreb mikroorganizmov za njihovo preživetje v okolju z visoko osmolarnostjo. V te potrebe je vključena tudi energija za vzdrževanje ionskega koncentracijskega gradienta preko membrane in sintezo kompatibilnih topljencev. Pokazano je tudi, da vplivajo s stresom inducirane spremembe oziroma povečana koncentracija ATP v celici na osmoregulacijo pri *Escherichia coli* (Ohwada in sod., 1994). Do vseh teh sprememb v koncentraciji ATP v celici pride zaradi neravnovesja med sintezo in porabo ATP, ki je rezultat sprememb v aktivnosti fizioloških procesov bakterijske celice kot posledice delovanja različnih fizikalnih in kemijskih dejavnikov (Ohwada in sod., 1994).

2.6 KAJ VEMO O *Vibrio* sp. DSM14379

V doktorski nalogi bo kot glavni bakterijski sev uporabljena rdeče pigmentirana bakterija *Vibrio* sp. DSM14379, ki je bila izolirana iz brakičnega okolja Škocjanskega zatoka v Tržaškem zalivu (Stopar in sod., 2004). Ta bakterija vsebuje v svojem genomu zapis za enega ali več inducibilnih profagov, ki jih lahko induciramo z mitomicinom C. Po indukciji se iz bakterije sprostijo morfološko različni bakteriofagom podobni delci, katerih razmerja se spreminjajo s temperaturo, virom ogljika in slanostjo (Gnezda Meijer in sod., 2006). Pokazali so, da se pri tej bakteriji latentna doba bakteriofagov podaljšuje z naraščajočo slanostjo. Poleg tega so pokazali tudi, da strukturiranost izvenceličnega

polisaharida pri *Vibrio* sp. vpliva na difuzijske procese molekul skozi ta sloj (Stopar in sod., 2002). Prav tako z naraščajočo slanostjo pada vsebnost makroelementov C, N, P in S v celici (Odić in sod., 2006). Ugotovili so, da se C:N razmerje ne spreminja, medtem ko razmerji C:P in C:S naraščata z naraščajočo slanostjo. Opazili so tudi spremembe v kopičenju mikroelementov kot so Na, K, Ca, Mg, Zn in Fe v celici. Na, Mg, Ca in Zn je največ, medtem ko je K in Fe najmanj pri 3 % (w/V) NaCl v gojišču PKE (Odić in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- 1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan (TTF) $M_w = 303.37$ (Fluka, Švica)
- 1,4-ditio-DL-treitol $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT) $M_w = 154.25$ (Fluka, Švica)
- 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC) $C_{19}H_{15}ClN_4$ $M_w = 334.81$ (Merck, Nemčija)
- 2-propanol C_3H_8O $M_w = 60.1$ (Merck, Nemčija)
- 70 % (V/V) perklorna kislina $HClO_4$ $M_w = 100.5$ (Merck, Nemčija)
- 95-97 % (V/V) žveplova (VI) kislina H_2SO_4 $M_w = 98.08$ (Merck, Nemčija)
- 96 % (V/V) etanol C_2H_5OH $M_w = 46.07$ (Merck, Nemčija)
- aceton C_3H_6O $M_w = 58.08$ (Merck, Nemčija)
- adenzin-5'-difosfat dinatrijeva sol (ADP) $C_{10}H_{13}N_5Na_2O_{10}P_2$ $M_w = 471.17$ (Fluka, Švica)
- adenzin-5'-trifosfat (ATP) razredčevalni pufer (FLAAB) za testno mešanico (Sigma, ZDA)
- adenzin-5'-trifosfat (ATP) testna mešanica (FLAAM) (Sigma, ZDA)
- adenzin-5'-trifosfat dinatrijeva sol hidrat (ATP) $C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot H_2O$ $M_w = 569.15$ (Fluka, Švica)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- amonijev klorid NH_4Cl $M_w = 53.49$ (Merck, Nemčija)
- amonijev molibdat tetrahidrat $H_{24}Mo_7N_6O_{24} \cdot 4H_2O$ $M_w = 1235.86$ (Fluka, Švica)
- brezvodni metanol CH_3OH $M_w = 32.04$ (Merck, Nemčija)
- D_2O (Aldrich Chemical Company, ZDA)
- destilirana voda
- D-fruktoza-6-fosfat dinatrijeva sol dihidrat $C_6H_{11}Na_2O_9P \cdot 2H_2O$ $M_w = 340.1$ (Fluka, Švica)
- D-glukoza $C_6H_{12}O_6$ $M_w = 180.16$ (Kemika, Hrvaška)
- D-glukoza-6-fosfat natrijeva sol $C_6H_{12}O_9PNa$ $M_w = 282.12$ (Fluka, Švica)
- dinatrijev hidrogen fosfat Na_2HPO_4 $M_w = 141.96$ (Merck, Nemčija)

- dušik N₂ (AXA, Švedska)
- etilendiaminotetraoetna kislina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA) C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O M_w = 372.2 (Sigma, ZDA)
- fosfoenolpiruvična kislina kalijevega sol (PEP-K) C₃H₄KO₆P M_w = 206.13 (Fluka, Švica)
- kalcijev klorid dihidrat CaCl₂·2H₂O M_w = 147.02 (Zorka Šabac, Srbija in Črna Gora)
- kalijev dihidrogen fosfat KH₂PO₄ M_w = 136.09 (Merck, Nemčija)
- kalijev klorid KCl M_w = 74.55 (Merck, Nemčija)
- klorovodikova kislina HCl M_w = 36.5 (Merck, Nemčija)
- kloroform CHCl₃ M_w = 119.38 (Fisher chemicals, ZDA)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- L-askorbinska kislina C₆H₈O₆ M_w = 176.13 (Merck, Nemčija)
- magnezijev klorid heksahidrat MgCl₂·6H₂O M_w = 203.3 (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat MgSO₄·7H₂O M_w = 246.48 (Merck, Nemčija)
- manganov sulfat hidrat MnSO₄·H₂O M_w = 169.01 (Kemika, Hrvaška)
- metanol CH₃OH M_w = 32.04 (Merck, Nemčija)
- miliQ voda (deionizirana voda)
- natrijev hidroksid NaOH M_w = 40 (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid NaCl M_w = 58.5 (Merck, Nemčija)
- n-heptan C₇H₁₆ M_w = 100.21 (Merck, Nemčija)
- oetna kislina CH₃COOH M_w = 60.05 (Riedel-de Haën, Švedska)
- ogljikov dioksid CO₂ 1 % (V/V) v N₂ (Messer, Slovenija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- reduciran β-nikotinamid adenin dinukleotid dinatrijeva sol hidrat (NADH) C₂₁H₂₇N₇Na₂O₁₄P₂·H₂O M_w = 727.46 (Fluka, Švica)
- rodamin 6G C₂₈H₃₁ClN₂O₃ M_w = 479.02 (Merck, Nemčija)
- saharoza C₁₂H₂₂O₁₁ M_w = 342.3 (Kemika, Hrvaška)
- sephadex gel G-25 (Pharmacia Biotech AB)
- TLC aluminijske plošče, 20x20 cm Silikagel 60 (Merck, Nemčija)
- tripton (Biolife, Italija)
- trishidroksimetil-aminometan H₂NC(CH₂OH)₃ M_w = 121.14 (Merck, Nemčija)

- trishidroksimetil-aminometan hidroklorid (Tris-HCl) $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ $M_w = 157.6$ (Sigma, ZDA)
- β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat dinatrijeva sol (NADP) $C_{21}H_{26}N_7Na_2O_{17}P_3$ $M_w = 787.38$ (Fluka, Švica)

3.1.2 Encimi

- aldolaza iz zajčje mišice $M \sim 161000$ (Fluka, Švica)
- glicerol-3-fosfat dehidrogenaza iz zajčje mišice $M \sim 78000$ (Fluka, Švica)
- L-laktat dehidrogenaza iz zajčje mišice $M \sim 140000$ (Fluka, Švica)
- lizocim iz kokošjega jajčnega beljaka $M \sim 14600$ (Sigma, ZDA)
- triozafosfat izomeraza iz *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, ZDA)

3.1.3 Lipidi

- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol (AVANTI POLAR Lipids, Birmingham, AL, ZDA)
- 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin $C_{21}H_{44}NO_7P$ (Alexis, Švica)
- 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serin $C_{22}H_{43}NNaO_9P$ (Alexis, Švica)
- 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfo-sn-1-glicerol $C_{22}H_{44}NaO_9P$ (Alexis, Švica)
- kardiolipin (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)
- L- α -dioleil fosfatidiletanolamin (AVANTI POLAR Lipids, Birmingham, AL, ZDA)

3.1.4 Metilni estri maščobnih kislin

- metil-3-hidroksidodekanoat (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)
- metil-3-hidroksidekanoat (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)
- metil miristoleat (9c) (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)
- metil-2-hidroksidodekanoat (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)
- mešanica metilnih estrov ME 12 (C11:0-C15:0) (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)

- mešanica metilnih estrov ME 13 (C16:0-C20:0) (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)
- mešanica metilnih estrov ME 34 (C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4) (Larodan-Fine Chemicals AB, Malmö, Švedska)

3.1.5 Nitroksidni radikali

- 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) $C_9H_{16}NO_2$ $M_w = 170$ (sintetiziral prof. dr. Slavko Pečar, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- 5-doksil metil palmitinska kislina (MeFASL (10,3)) $M_w = 340$ (sintetiziral prof. dr. Slavko Pečar, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)

3.1.6 Sestava gojišč

- gojišče PKE (pepton-kvasni ekstrakt): 5 g peptokompleks
1 g kvasni ekstrakt
2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
1000 mL destilirane vode
za 0.3 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 3 g NaCl
za 0.5 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 5 g NaCl
za 1.76 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 17.6 g NaCl
za 3 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 30 g NaCl
za 5 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 50 g NaCl
za 10 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 100 g NaCl
- gojišče LB (Luria Bertani): 10 g tripton
5 g kvasni ekstrakt
10 g NaCl
1000 mL destilirane vode

- gojišče M9: 200 mL 5xM9 soli (64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 2.5 g NaCl in 1000 mL destilirane vode)
 - 2 mL 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0.1 mL 1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 20 mL 20 % (w/V) glukoza
 - 750 mL destilirane vode

Za trdna gojišča dodamo 15 g agar-agar na 1 liter tekočega gojišča.

3.1.7 Bakterijska seva

- *Vibrio* sp. DSM14379 (*Vibrio* sp.)
- *Escherichia coli* ESH10 K-12 (*E. coli*)

3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

Za študij vpliva soli na energijski metabolizem bakterijskih celic in vpliva temperature na redukcijske sposobnosti celic smo uporabljali bakterijski sev *Vibrio* sp. DSM14379. To je morski izolat iz Škocjanskega zatoka, ki za rast potrebuje NaCl. Bakterijski sev smo gojili aerobno v tekočem gojišču PKE z različnimi koncentracijami NaCl (0.3, 0.5, 1.76, 3, 5, 10 % (w/V) NaCl). Kulture smo gojili do pozne eksponentne faze na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C v temi.

Za študij vpliva temperature na redukcijske sposobnosti bakterijskih celic smo poleg *Vibrio* sp. uporabljali tudi bakterijski sev *Escherichia coli* ESH10 K-12, ki je laboratorijski izolat. *E. coli* smo gojili v tekočem gojišču M9 do pozne eksponentne faze na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 37 °C v temi.

Kulturo *Vibrio* sp. smo ohranjali v viabilnem stanju tako, da smo jo enkrat tedensko precepili na sveže trdno gojišče PKE, jo inkubirali pri 28 °C 24 ur in hranili pri 4 °C en teden. Kulturo *E. coli* smo enkrat tedensko precepili na sveže trdno gojišče LB, jo inkubirali pri 37 °C 24 ur in hranili pri 4 °C en teden.

3.3 BAKTERIJSKA RAST

Pri spremljanju bakterijske rasti smo sveže gojišče PKE nacepili z 1 % (V/V) prekonočne kulture *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasla v gojišču PKE z ustrezno koncentracijo soli. Vpliv slanosti na bakterijsko rast oziroma njeno hitrost smo določali z merjenjem optične gostote pri 650 nm (OD_{650}) bakterijske kulture na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija). Kulturo smo gojili na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C. Hitrost rasti bakterijskih celic smo izračunali iz rastnih krivulj s prileganjem logistične enačbe eksperimentalnim podatkom

$$OD_{650}(t) = \frac{K \cdot OD_{650,t_0}}{OD_{650,t_0} + e^{-\mu t} \cdot (K - OD_{650,t_0})} \quad , \quad \dots (2)$$

kjer je K nosilnost okolja, μ hitrost rasti (h^{-1}) in OD_{650,t_0} optična gostota pri 650 nm v času $t = 0$. Rast oziroma število celic smo spremljali tudi s štetjem zraslih kolonij na ploščah (CFU - colony forming units).

Na enak način smo spremljali vpliv temperature na hitrost rasti pri *E. coli* in *Vibrio* sp. *E. coli* smo gojili v tekočem gojišču M9, *Vibrio* sp. pa v tekočem gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in ju inkubirali v stresalni vodni kopeli (Julabo Shake Temp SW22, Julabo Labtechnik GmbH, Nemčija) pri 130 vrtljajih na minuto in razponu temperatur od 15 - 44 °C.

3.4 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE LIPIDOV

Lipidno ekstrakcijo smo izvedli po modificirani Bligh in Dyer-jevi metodi (Bligh in Dyer, 1959). *Vibrio* sp. smo gojili do pozne eksponentne faze, centrifugirali 15 minut pri 10000 g pri 4 °C (BECKMAN COULTER Avanti™ J-25, ZDA) in sprali z 20 mM Tris-HCl pufrom (pH 7.4) z ustrezno koncentracijo soli. Usedlino smo po spiranju resuspendirali v 0.8 volumna raztopine NaCl z enako koncentracijo NaCl, kot smo jo imeli v rastnem gojišču. Dodali smo 2 volumna metanola in 1 volumen kloroforma. Suspenzijo smo

premešali in inkubirali pri sobni temperaturi 3 ure, med tem časom smo celično suspenzijo razbijali v ultrazvočni vodni kopeli pol ure in jo vmes večkrat premešali. Po inkubaciji smo suspenzijo centrifugirali 10 min pri 10000 g pri 4 °C, supernatant smo prenesli v novo centrifugirko in usedlino ponovno resuspendirali v enakih deležih raztopine NaCl, kloroforma in metanola kot prej. To suspenzijo smo nato premešali in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi, med tem časom smo suspenzijo ponovno razbijali z ultrazvokom pol ure in jo vmes večkrat premešali. Po inkubaciji smo suspenzijo centrifugirali in zbrali supernatant. Zbrani supernatant smo nato iz enofaznega spremenili v dvofazni sistem, tako da smo mu dodali enako količino kloroforma in raztopine NaCl, da so bili končni volumski deleži kloroform:metanol:raztopina NaCl = 1:1:0.9. Tako pripravljeno mešanico smo centrifugirali 5 min pri 2000 g pri 4 °C, da so se faze ločile med seboj. Po centrifugiranju smo zbrali spodnjo kloroformno fazo, medtem ko smo zgornjo fazo metanol-voda še enkrat sprali s kloroformom, premešali in ponovno centrifugirali, da so se faze ločile med seboj. Tudi tukaj smo zbrali spodnjo kloroformno fazo. Zbrane kloroformne faze smo sušili v rotavaporju (30-35 °C) z dodatkom 1 Pasteurjeve pipete 2-propanola, da smo se znebili ostankov vode. Posušene lipide smo resuspendirali v 5 mL mešanice kloroform:metanol:voda = 60:30:4.5 (V/V) in jih nanесли na gelsko kromatografijo Sephadex G-25 Fine, da bi se znebili nelipidnih ostankov (Wells in Dittmer, 1963). Kolono smo najprej sprali s 5 mL vzorca, nato s 5 mL mešanice kloroform:metanol:voda = 60:30:4.5 (V/V). Nazadnje smo vse lipide sprali s kolone s 5 mL mešanice kloroform:metanol = 2:1 (V/V). Dobljeno lipidno frakcijo smo sušili v rotavaporju (30-35 °C) z dodatkom 1 Pasteurjeve pipete 2-propanola, da smo se znebili ostankov vode. Posušene lipide smo shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.5 DOLOČANJE POLARNIH GLAV LIPIDOV

Identifikacijo polarnih glav lipidnih ekstraktov smo izvedli z ločevanjem lipidov na TLC aluminijevih ploščah Silikagel 60 s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC – thin layer chromatography). Kromatograme smo razvijali z mešanico kloroform: acetoni: metanol: očetna kislina: voda = 6:8:2:2:1 (V/V) (Kates, 1986). Ločene fragmente smo na TLC plošči opazovali tako, da smo Rhodamin 6G razpršili po plošči in jo potem pogledali pod UV lučjo. Identifikacija fosfolipidov je potekala s pomočjo znanih referenčnih lipidov

(poglavje 3.1.3) in njihove dolžine potovanja na TLC plošči. Količino lipidov v posameznih fragmentih smo določali z metodo določanja fosforja v teh fragmentih (Chen in sod., 1956; Morein in sod., 1996). To smo izvedli tako, da smo ločene fragmente izrezali iz TLC plošče in iz gela z mešanico kloroform:metanol = 2:1 (V/V) ekstrahirali lipide. Tem ekstraktom smo odparili topilo z N_2 in jim nato določili količino fosforja. Raztopine KH_2PO_4 z znanimi koncentracijami fosforja in naše ekstrakte smo postavili v termobloke in jih segreli do $180\text{ }^{\circ}C$, da smo se znebili ostankov vode. Suhim vzorcem smo dodali 3 kapljice koncentrirane H_2SO_4 in jih inkubirali 2-3 minute, nato smo dodali 4 kapljice koncentrirane $HClO_4$ in inkubirali 5 minut. Po inkubaciji smo vzorce odstranili iz termobloka in jih pustili, da so se ohladili na sobno temperaturo. Ohlajenim vzorcem smo dodali 4 mL reagenta (10 mL 10 % askorbinske kisline, 10 mL 10 % H_2SO_4 , 10 mL 2.5 % amonijevega molibdata in 70 mL miliQ vode), jih premešali in inkubirali 6 minut v vodni kopeli na $65\text{ }^{\circ}C$. Vzorce smo po inkubaciji ohladili na sobno temperaturo in merili absorbanco pri 830 nm (GBC UV/VIS 920 spektrometer), pred merjenjem smo vsak vzorec premešali na vibracijskem mešalniku. S 7.35 mM raztopino KH_2PO_4 smo izdelali umeritveno krivuljo vzorcev z različnimi koncentracijami fosforja in iz nje iz izmerjene absorbance odčitati količino fosforja v naših ekstraktih.

3.6 DOLOČANJE PROFILA MAŠČOBNIH KISLIN

Najprej smo lipidne ekstrakte spremenili v metilne estre maščobnih kislin. Lipidnim ekstraktom smo odparili topilo z N_2 in jih dali za 1-2 uri v vakuum. Posušenim ekstraktom smo nato dodali 4 mL 5 % (V/V) H_2SO_4 v brezvodnem metanolu, jih dobro premešali in epruvete tesno zaprli z zamaškom. Ekstrakte smo inkubirali v vodni kopeli dve uri na $70\text{ }^{\circ}C$. Po inkubaciji smo vzorce ohladili na sobno temperaturo, jim dodali 2 mL deionizirane vode in jih premešali na vibracijskem mešalniku. Potem smo dodali še 1 mL n-heptana, dobro premešali ter počakali toliko časa, da so se faze med seboj popolnoma ločile. Zgornjo n-heptan fazo smo prenesli s Pasteurjevo pipeto v novo epruveto in spodnjo fazo še trikrat sprali z n-heptanom. Zbranim heptanskim fazam smo dodali 2 mL 0.85 % (w/V) raztopine NaCl, da smo se znebili ostankov H_2SO_4 , dobro premešali ter ločeno heptansko fazo prenesli v novo epruveto. Vzorcem smo nato odparili n-heptan z N_2 ,

dobljene metilne estre stehali in jih raztopili v n-heptanu, da je bila končna koncentracija metilnih estrov 2 mg mL^{-1} .

Tako pripravljene vzorce smo uporabili za določanje profila maščobnih kislin s pomočjo plinske kromatografije na plinskem kromatografu Varian MODEL 3700 s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID - flame ionization detector), ki je bil povezan z integratorjem 3390A Integrator Hewlett Packard (Pennsylvania, ZDA). Ločevanje metilnih estrov je potekalo na koloni dolgi 1.8 m z notranjim premerom 0.13 cm. Kolona je bila polnjena z 10 % SP-2330 na Chromosorb W/Aw 100/120 mesh (Supelco, ZDA) in pretok nosilnega plina N_2 v koloni je bil 20 mL min^{-1} . Pogoji za ločevanje na kromatografu so bili: začetna temperatura 140°C 5 min, segrevanje $10^\circ\text{C min}^{-1}$ in končna temperatura 180°C 20 min. Metilne estre maščobnih kislin naših ekstraktov smo določili s pomočjo zadrževalnih časov referenčnih metilnih estrov maščobnih kislin (poglavje 3.1.4).

Rezultate smo podali v molskih odstotkih (mol %), ki smo jih dobili s pomočjo izračunanega korelacijskega faktorja med utežnimi odstotki (wt %) in molskimi odstotki (mol %) za različno dolge acilne verige. Ta faktor smo izračunali tako, da smo izbrali različno dolge acilne verige in zanje pripadajoče wt % ter molekulske mase. S pomočjo teh podatkov smo izračunali množino posamezne acilne verige ter mol % za posamezno acilno verigo. Tako smo lahko izračunali korelacijski faktor, ki predstavlja razmerje med mol % in wt %, ter narisali graf njegove odvisnosti od dolžine acilne verige. Daljša kot je acilna veriga, manjši je korelacijski faktor med mol % in wt %.

3.7 DOLOČANJE UREJENOSTI LIPIDOV V BAKTERIJSKI MEMBRANI Z ^{31}P -NMR SPEKTROSKOPIJO

Lipidne ekstrakte, ki smo jim določili sestavo polarnih glav in acilnih verig, smo posušili z N_2 v tanek film na stekleni epruveti in jih nato sušili do konstantne teže v vakuumu. Posušeni ekstraktom smo dodali 20 % (w/V) D_2O in vzorce uravnovežili s petimi cikli izmeničnega zamrzovanja in odtajanja. Tako pripravljene vzorce smo shranili na -20°C do NMR analize. ^{31}P -NMR poskuse smo izvajali pri frekvenci 162.1 MHz na Varian CMX Infinity-400 spektrometru z uporabo 4-mm MAS probe (Chemagetics, Fort Collins, CO).

Za ^{31}P -NMR meritve trdne snovi smo uporabljali Hahn echo ciklično pulzno sekvenco s 50 μs zamikom med pulzi. NMR spektre smo beležili pri različnih temperaturah (od $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$), zato smo vzorce pred merjenjem inkubirali 15 minut pri vsaki temperaturi. Za vsak ^{31}P -NMR spekter smo zabeležili med 500 in 10000 meritev z razmikom 4 s. Spektre lipidnih ekstraktov bakterijskih celic smo primerjali med seboj in pokazali, kako se urejenost lipidov v membrani spreminja s slanostjo in temperaturo.

3.8 MERJENJE AKTIVNOSTI GLIKOLITIČNIH ENCIMOV PRI BAKTERIJAH

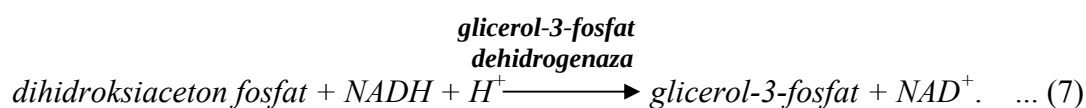
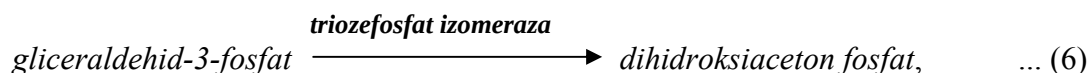
Kulturo *Vibrio* sp. smo gojili do pozne eksponentne faze, jo centrifugirali 15 minut pri 18516 g (13000 vrtljajev na minuto) pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija) in sprali z raztopino NaCl z enako koncentracijo soli kot je bila v gojišču. Potem smo celice 300 krat koncentrirali v isti raztopini NaCl in jih razbili z ultrazvokom, da bi iz njih sprostili encime. Suspenzijo celic smo obdelali z ultrazvočno napravo šestkrat po 30 sekund z amplitudo ultrazvoka 6 μm (MSE 150W ULTRASONIC DISINTEGRATOR Mk2, Velika Britanija). Po razbijanju celic smo večje celične komponente odstranili s centrifugiranjem pri 8944 g (10000 vrtljajev na minuto) 10 minut (Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, Slovenija). Tako pripravljenemu celičnemu ekstraktu smo nato z uporabo specifičnih encimskih testov izmerili aktivnost izbranih glikolitičnih encimov, in sicer glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, fosfofruktokinaze in piruvat kinaze.

Za določanje aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze smo uporabili naslednje spojine: 100 mM Tris-HCl pufer (pH 7.5), 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 1 mM NADP, 2 mM D-glukoza-6-fosfat in celični ekstrakt (Padilla in sod., 2004). Reakcija je stekla po dodatku D-glukoze-6-fosfata. Princip reakcije je naslednji (Bergmeyer, 1974):

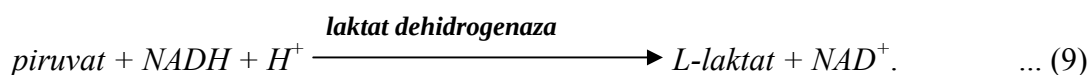


Za določanje aktivnosti fosfofruktokinaze smo uporabili: 87 mM Tris-HCl pufer (pH 8.0), 1 mM ATP, 1 mM fruktozo-6-fosfat, 10 mM MgCl_2 , 10 mM NH_4Cl , 0.2 mM NADH, 0.3 U triocefosfat izomeraze, 1 U glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, 0.3 U aldolaze, 1 mM

ATP in celični ekstrakt (Andersen in sod., 2001). Reakcija je stekla po dodatku triocefosfat izomeraze, glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, aldolaze in ATP. Princip reakcije je naslednji (Bergmeyer, 1974):



Za določanje aktivnosti piruvat kinaze smo uporabili: 100 mM Tris-HCl pufer (pH 7.5), 1 mM DTT, 5 mM MnSO₄, 100 mM KCl, 10 mM ADP, 3 mM NADH, 5 mM fruktozo-6-fosfat, 40 U laktat dehidrogenaze, 2 mM fosfoenolpiruvat in celični ekstrakt (Padilla in sod., 2004). Reakcija je stekla po dodatku fosfoenolpiruvata. Princip reakcije je naslednji (Bergmeyer, 1974):



Aktivnost encimov smo spremljali spektrofotometrično pri 340 nm (Philips PU8630 UV/VIS/NIR kinetics, Velika Britanija) preko nastanka NADPH pri glukoza-6-fosfat dehidrogenazi ali porabe NADH pri fosfofruktokinazi in piruvat kinazi pri sobni temperaturi. Takoj po dodatku spojin, ki začnejo reakcijo, smo začeli spremljati kinetiko encimske reakcije, oziroma spremembo absorbance pri 340 nm (A_{340}) s časom. Iz linearnega dela krivulje smo nato dobili naklon, ki nam pove, za koliko se je A_{340} spremenila v določeni časovni enoti. S pomočjo tega podatka in števila celic smo izračunali specifično encimsko aktivnost za vsak merjeni glikolitični encim po naslednji enačbi:

$$\text{Specifična encimska aktivnost} = \frac{k}{\varepsilon_{\text{NADH}} \cdot l \cdot V_{\text{kulture}} \cdot \text{CFU}} \left[\frac{M}{\text{min} \cdot \text{celica}} \right], \dots (10)$$

kjer je k naklon linearnega dela krivulje A_{340} v odvisnosti od časa, izračunan iz dobljenih eksperimentalnih podatkov (min^{-1}), ε ekstinkcijski koeficient NADH in NADPH ($6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l dolžina poti žarka v kiveti (1 cm), V volumen bakterijske kulture, potrebne za reakcijo (mL) in CFU število bakterijskih celic v 1 mL kulture.

Specifična aktivnost glukoza-6-P dehidrogenaze nam pove, koliko NADP se reducira na minuto na celico, medtem ko specifični aktivnosti fosfofruktokinaze in piruvat kinaze povesta, koliko NADH se oksidira na minuto na celico pri sobni temperaturi.

3.9 MERJENJE SPROŠČENEGA CO_2 BAKTERIJSKIH CELIC

5 mL kulture *Vibrio* sp. smo v pozni eksponentni fazi centrifugirali 15 minut pri 18516 g (13000 vrtljajev na minuto) pri 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Celice smo nato sprali v raztopini NaCl z enako koncentracijo soli kot je bila v gojišču in jih resuspendirali v 5 mL enake raztopine. Suspenzijo bakterijskih celic smo prenesli v 15 mL-serumsko stekleničko in jo tik pred merjenjem plinotesno zaprli z zamaškom. Razmerje med plinasto in tekočo fazo v serumski steklenički je bilo 2:1 (V/V). Na plinskem kromatografu z detektorjem za termalno prevodnost (TCD - thermal conductivity detector) (Hewlett Packard 5890A Gas Chromatograph, ZDA) smo izmerili delež CO_2 v plinski fazi takoj po zaprtju stekleničke, in delež CO_2 , ki je nastal po enourni inkubaciji na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 150 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C. Kontrolo je predstavljalo 5 mL raztopine NaCl v serumski steklenički, ki smo jo inkubirali na enak način kot vzorce z bakterijskimi celicami. Od deleža CO_2 , nastalega v eni uri inkubacije, smo odšteli delež CO_2 v kontroli in izračunali, koliko CO_2 sprosti bakterijska celica v eni uri pri določenih okoljskih pogojih.

Hitrost mikrobne respiracije smo izračunali kot:

$$\text{Hitrost mikrobne respiracije} = \frac{\Delta CO_2 \cdot (V_g + V_l \cdot \alpha)}{CFU \cdot V_{kulture} \cdot t} \left[\frac{mL}{h \cdot celica} \right], \dots (11)$$

kjer so $\Delta CO_2 = [C_{CO_2,1h} - C_{CO_2,0h}]$ – razlika v izmerjenih deležih CO_2 v plinasti fazi na začetku in koncu inkubacije, V_g – volumen plinaste faze (mL), V_l – volumen tekoče faze (mL), α – koeficient topnosti CO_2 v raztopini NaCl (0.295), t čas inkubacije bakterijske kulture med merjenjem (h), $V_{kulture}$ – volumen bakterijske kulture uporabljene za izvajanje poskusa (mL) in CFU število bakterijskih celic v 1 mL kulture.

Pogoji, pri katerih je deloval plinski kromatograf med merjenjem, so bili naslednji: temperatura injektorja 100 °C, temperatura pečice in kolone 50 °C, temperatura TCD detektorja 100 °C, pretok nosilnega plina He preko kolone 180 mL min⁻¹. Uporabili smo 180 cm dolgo kolono s premerom 1/8" in polnilom Porapak R mesh 100/120 (Millipore Corporation, Miliford, ZDA).

V primeru, ko nas je zanimal trenutni odziv bakterijskih celic, gojenih pri izbrani slanosti na spremembe slanosti okolja na nivoju mikrobne respiracije, smo celice, ki so rasle v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl, po spiranju prenesli v 0.3, 0.5 in 10 % (w/V) raztopine NaCl in jih pripravili ter merili na enak način kot ostale vzorce.

3.10 PRIPRAVA SFEROPLASTOV

Sferoplaste smo pripravili tako, da smo bakterijskim celicam *Escherichia coli* ESH10 K-12 odstranili celično steno. Uporabili smo modificirano metodo priprave sferoplastov (McEwan in sod., 1984). 100 mL kulture *E. coli* smo gojili do pozne eksponentne faze v gojišču M9 pri 37 °C in jo centrifugirali 10 minut pri 18516 g (13000 vrtljajev na minuto) pri 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Po centrifugiranju smo supernatant odlili in usedlino resuspendirali v 1 mL ohlajenega pufru za spiranje (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)) ter dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Vzorec smo ponovno centrifugirali, odlili supernatant in postopek spiranja še enkrat ponovili. Po končanem spiranju smo supernatant odlili, usedlino stehali in jo resuspendirali v pufru SET (0.5 M

saharoza, 1.3 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)). Upoštevali smo, da 20 mL pufru SET zadostuje za en gram usedline bakterijskih celic. Suspenzijo bakterijskih celic smo premešali na vibracijskem mešalniku in ji dodali toliko lizocima, da je bila končna koncentracija 0.6 mg mL^{-1} . Suspenzijo smo inkubirali z lizocimom 3 ure v vodni kopeli na 30°C . Vzorec smo vsakih 20 minut ročno premešali, da smo preprečili posedanje bakterijskih celic. Po končani inkubaciji smo vzorec centrifugirali 30 minut pri $18516 g$ (13000 vrtljajev na minuto) pri 4°C , supernatant smo odlili in usedlino resuspendirali v 32-kratnem volumnu pufru SET (približno 4 mL). Tako pripravljene sferoplaste smo hranili na ledu do merjenja.

3.11 MERJENJE REDUKCIJSKIH SPOSOBNOSTI BAKTERIJSKIH CELIC Z EPR SPEKTROSKOPIJO

Kulturo *Vibrio* sp. smo gojili do pozne eksponentne faze in jo nato centrifugirali 15 minut pri $18516 g$ (13000 vrtljajev na minuto) pri 4°C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Po centrifugiranju smo celice sprali z 20 mM Tris-HCl pufrom (pH 7.4) z ustrešno koncentracijo soli in jih ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Celice smo nato 50 krat koncentrirali v enakem pufru. Tako pripravljenim celicam smo dodali $1.18 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ raztopino spinskega označevalca 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPON). TEMPON smo raztopili v fosfatnem pufru (24.5 mM Na_2HPO_4 , 5.5 mM KH_2PO_4 , 110 mM NaCl, 1 mM EDTA in 1000 mL destilirane vode, pH 7.4). 100 μL štirikrat redčenemu koncentratu celic smo dodali 1 μL raztopine TEMPON-a in dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Označen vzorec smo prenesli v stekleno kvarčno kapilaro z 1 mm notranjega premera in posneli EPR spekter na Bruker ESP 300 E spektrometru (Karlsruhe, Nemčija) s frekvenco mikrovalov 9.59 GHz, močjo 20 mW, frekvenco modulacije 100 kHz in amplitudo 0.5 G. Enkratno merjenje vzorca je trajalo 20 s, integracijska časovna konstanta je bila 20 ms in središče magnetnega polja 0.3415 T. EPR spektre smo beležili pri 20°C toliko časa, dokler nismo izgubili EPR signala zaradi popolne redukcije TEMPON-a. S pomočjo spremljanja kinetike redukcije spinskega označevalca smo lahko izračunali stopnjo oziroma hitrost njegove redukcije. Ta predstavlja obratno vrednost časa, v katerem izgubimo 90 % EPR signala. Vse dobljene vrednosti smo normalizirali na enako število celic. Tako smo lahko primerjali redukcijski potencial bakterijskih celic, ki so rasle

pri različnih koncentracijah soli. Na enak način smo izvedli tudi eksperimente v katerih smo po gojenju *Vibrio* sp. pri izbrani slanosti bakterijskim celicam spremenili slanost okolja. V tem primeru smo TEMPON dodali desetkrat redčenemu koncentratu celic 5 minut ali 60 minut po tem, ko smo celice resuspendirali v 20 mM Tris-HCl pufru (pH 7.4) z nižjo ali višjo koncentracijo soli kot je bila v gojišču. Bakterijske celice smo v tem primeru inkubirali brez stresanja na sobni temperaturi do merjenja.

Poleg tega nas je zanimalo, kako temperatura inkubacije vpliva na redukcijske sposobnosti bakterijskih celic. V ta namen smo kulturo *Vibrio* sp. gojili v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl do pozne eksponentne faze pri 28 °C in jo potem pripravili na enak način kot je opisano pri poskusu s slanostjo. Kulturo *E. coli* smo gojili v gojišču M9 do pozne eksponentne faze pri 37 °C in jo centrifugirali pri istih pogojih kot kulturo *Vibrio* sp. Po centrifugiranju smo celice sprali s 50 mM Tris-HCl pufrom (pH 7.6) in jih ponovno centrifugirali. Celice smo nato 50 krat koncentrirali v enakem pufru. Koncentrirane celice smo hranili na ledu do merjenja. Pred merjenjem smo pripravili 100 µL desetkrat redčenega koncentrata celic *Vibrio* sp. in 100 µL dvakrat redčenega koncentrata celic *E. coli* v ustreznem pufru ter ju inkubirali v vodni kopeli na željeni temperaturi (0-50 °C) 15 minut. Po inkubaciji smo termostatisiranemu vzorcu dodali 1 µL raztopine TEMPON-a, vzorec premešali na vibracijskem mešalniku, ga prenesli v termostatisirano kapilaro in posneli EPR spekter pri dani temperaturi. EPR spektre smo posneli na Bruker ELEXSYS E500 spektrometru (Karlsruhe, Nemčija) s frekvenco mikrovalov 9.32 GHz, močjo mikrovalov 20 mW, frekvenco modulacije 100 kHz in amplitudo modulacije 0.5 G. Enkratno merjenje vzorca je trajalo 20 s, integracijska časovna konstanta je bila 20 ms in središče magnetnega polja 0.3315 T. Po končanem merjenju smo EPR spektre obdelali na enak način kot pri vplivu slanosti na redukcijske sposobnosti pri *Vibrio* sp., kjer smo izračunali stopnjo redukcije spinskega označevalca pri danih pogojih.

Preverili smo tudi delovanje ultrazvoka na redukcijske sposobnosti bakterijskih celic. V ta namen smo koncentrirane celice *E. coli* pripravili na enak način kot pri eksperimentu s temperaturo. Koncentrirane celice smo obdelali z ultrazvočno napravo šestkrat po 30 sekund z amplitudo ultrazvoka 6 µm (MSE 150W ULTRASONIC DISINTEGRATOR

Mk2, Velika Britanija). Po razbijanju celic smo večje celične komponente odstranili s centrifugiranjem 10 minut pri 8944 g (10000 vrtljajev na minuto) (Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, Slovenija). 100 µL štirikrat redčenega koncentrata celic smo dodali 1 µL raztopine TEMPON-a, vzorec premešali na vibracijskem mešalniku, ga prenesli v stekleno kapilaro in izmerili redukcijske sposobnosti vzorca na enak način kot je opisano pri temperaturnem ekspreminentu.

Redukcijske sposobnosti sferoplastov smo preverili tako, da smo 100 µL dvakrat redčene suspenzije sferoplastov *E. coli* dodali 1 µL TEMPON-a, vzorec premešali na vibracijskem mešalniku, ga prenesli v stekleno kapilaro in izmerili njegovo redukcijo na enak način kot je opisano pri temperaturnem eksperimentu. Poleg tega smo pri sferoplastih in intaktnih celicah preverili še redukcijo lipofilnega spinskega označevalca 5-doksil metil palmitinske kisline (MeFASL (10,3)). V tem primeru smo 100 µL suspenzije sferoplastov dodali 1 µL $5 \cdot 10^{-3}$ M MeFASL-a v 96 % (V/V) etanolu, vzorec premešali na vibracijskem mešalniku in spremljali redukcijo MeFASL-a. Označen vzorec smo prenesli v kapilaro in posneli EPR spektre pri 20 °C. EPR spektre smo posneli na Bruker ELEXSYS E500 spektrometru (Karlsruhe, Nemčija) s frekvenco mikrovalov 9.32 GHz, močjo mikrovalov 20.05 mW, frekvenco modulacije 100 kHz in amplitudo modulacije 3 G. Enkratno merjenje vzorca je trajalo 40 s, integracijska časovna konstanta je bila 5.12 ms in središče magnetnega polja 0.3315 T. Po končanem merjenju smo EPR spektre obdelali na enak način kot pri vplivu slanosti na redukcijske sposobnosti pri *Vibrio* sp., kjer smo izračunali stopnjo redukcije spinskega označevalca in rezultate primerjali s stopnjo redukcije pri intaktnih celicah.

3.12 MERJENJE DEHIDROGENAZNE AKTIVNOSTI BAKTERIJSKIH CELIC

10 mL kulture *Vibrio* sp. v pozni eksponentni fazi smo centrifugirali 15 minut pri 18516 g (13000 vrtljajev na minuto) pri 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Po centrifugiranju smo celice sprali z 20 mM Tris-HCl pufrom (pH 7.4) z ustrezno koncentracijo soli in jih ponovno centrifugirali. Celice smo nato resuspendirali v 1 mL enakega pufru in jih dobro premešali na vibracijskem mešalniku (Vibromix 104EV, Tehtnica, Slovenija). Suspenziji celic smo dodali 1mL 1 % (w/V) TTC v 0.1 M Tris-HCl pufru (pH 7.7), 50 µL 0.5 M KH_2PO_4 in 50 µL 1 M glukoze ter dobro premešali. Poleg

vzorcev smo imeli tudi ustrezno kontrolo, kjer smo suspenziji celic dodali 1 mL 0.1 M Tris-HCl pufer (pH 7.7) brez TTC, 50 µL 0.5 M KH₂PO₄ in 50 µL 1 M glukoze ter dobro premešali. Vzorce in ustrezne kontrole smo inkubirali v temi na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 100 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 5724 g (8000 vrtljajev na minuto) (Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, Slovenija) in odstranili supernatant. Iz celic smo nato ekstrahirali nastali TTF, tako da smo usedlini dodali 3 mL metanola. Ekstrakte smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in nato občasno ročno mešali še 15 minut. Po končanem mešanju smo metanolne ekstrakte centrifugirali 15 minut pri 5724 g (8000 vrtljajev na minuto) in jim izmerili absorbanco pri 485 nm (A_{485}) na spektrofotometru (Philips PU8630 UV/VIS/NIR kinetics, Velika Britanija) (Maness in sod., 1999). Za izračun količine nastalega TTF smo naredili umeritveno krivuljo, kjer smo merili A_{485} znanim koncentracijam TTF raztopljenega v metanolu.

Dehidrogenazno aktivnost smo podali kot količino nastalega TTF na celico:

$$\text{Dehidrogenazna aktivnost} = \frac{c_{TPF} \cdot V_{\text{metanola}}}{CFU \cdot V_{\text{kulture}}} = \frac{A_{485} \cdot V_{\text{metanola}}}{k \cdot l \cdot CFU \cdot V_{\text{kulture}}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{celica}} \right], \dots (12)$$

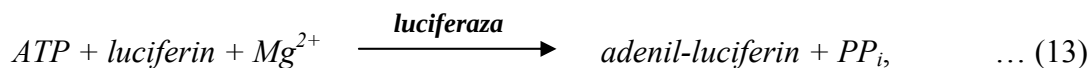
kjer je A_{485} absorbanca vzorca pri 485 nm, V_{metanola} volumen metanola potreben za ekstrakcijo (3 mL), k naklon premice izračunan iz umeritvene krivulje (0.0403 mL µg⁻¹ cm⁻¹), l dolžina poti žarka v kivetu (1 cm), CFU število celic v 1 mL kulture in V_{kulture} volumen kulture uporabljene za izvajanje poskusa (10 mL).

V primeru, ko nas je zanimal trenutni odziv bakterijskih celic gojenih pri izbrani slanosti na spremembe slanosti na nivoju dehidrogenazne aktivnosti, smo celice *Vibrio* sp., ki so rasle v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl, po centrifugiranju prenesli v 1 mL 0.5 ali 10 % (w/V) raztopine NaCl. Te vzorce smo potem pripravili in merili po enakem postopku kot vzorce bakterijskih celic, ki so rasle pri različnih slanostih.

3.13 MERJENJE KONCENTRACIJE ATP V BATERIJSKI CELICI

Celični ATP smo ekstrahirali iz bakterijskih celic *Vibrio* sp. z ekstrakcijskim pufrom (0.1 M Tris-HCl in 2 mM EDTA (pH 7.8)) (Lundin in Thore, 1975). 900 μ L ekstrakcijskega pufru smo predhodno segrevali v vodni kopeli (100 °C) 3 minute. Vrelemu pufru smo nato dodali 100 μ L bakterijske kulture v pozni eksponentni fazi. Mešanico smo segrevali še 3 minute v vodni kopeli, da se je ATP sprostil iz celic in je prišlo do inaktivacije bakterijskih encimov (npr. ATPaz), ki bi lahko vplivali na meritve v bioluminiscenčnem testu. Po končani ekstrakciji smo vzorce inkubirali na ledu do merjenja.

Količino ATP v bakterijski celici smo izmerili z zelo občutljivim in specifičnim bioluminiscenčnim testom, ki uporablja od ATP odvisen luciferin-luciferazni sistem. V reakciji pride do sproščanja svetlobe, katere količina je sorazmerna količini ATP (Cheer in sod., 1974). Reakcija, ki poteče pri bioluminiscenčnem testu, je naslednja:



Optimalni čas za delovanje luciferazne reakcije je 20 sekund pri 20 °C.

Pred merjenjem količine ATP v bakterijskih ekstraktih smo vzorce in reagente inkubirali na sobni temperaturi 3 minute. Potem smo v 5-mL epruvetkah za luminometer (Sarstedt, Nemčija) zmešali 100 μ L reagenta (40 krat redčen FLAAM v FLAAB) s 100 μ L celičnega ekstrakta. Po 20 sekundah poteka reakcije smo izmerili količino sproščene svetlobe (Relative Luminiscent Units – RLU) z luminometrom (Junior EG&G Berthold Technologies GmbH&Co.KG, Nemčija). Na enak način smo izmerili tudi RLU standardov z znano koncentracijo ATP v razponu od $2 \cdot 10^{-7}$ do $2 \cdot 10^{-9}$ M, da smo lahko narisali umeritveno krivuljo (dvojni logaritemski graf koncentracije ATP v odvisnosti od RLU) iz

katere smo določili količino ATP v celičnih ekstraktih. Rezultat smo podali kot koncentracijo nastalega ATP na celico.

3.14 STATISTIČNA OBDELAVA EKSPERIMENTALNIH PODATKOV

Vsi prikazani rezultati so povprečne vrednosti določenega števila neodvisnih meritev (n), ki so jim dodani standardni odkloni. Za primerjavo rezultatov med seboj smo izračunali interval zaupanja (p-vrednost), kjer smo uporabljali metodo enosmerne analize varianc (One-Way ANOVA) in izvedli preizkus mnogokratnih primerjav (Post-Hoc) s pristopom Bonferroni (Hsu, 1996). Na ta način smo lahko pokazali katere meritve so statistično različne od vrednosti izmerjene pri optimalnih pogojih za rast bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 (3 % (w/V) NaCl). Meritve so bile statistično različne, ko je bila p-vrednost manjša od 0.05 ($p < 0.05$). Vse statistične analize smo izvajali s programom SPSS for Windows 10.1.0.

4 REZULTATI

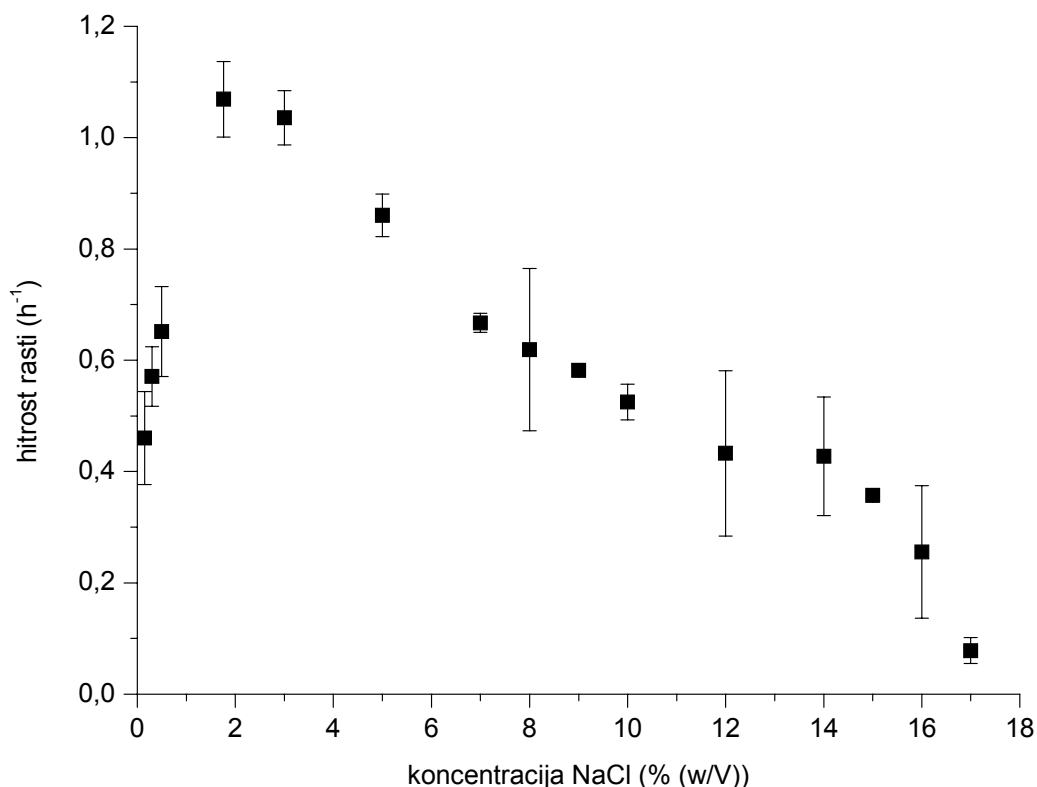
Na podlagi delovne hipoteze, da osmotski stres vpliva na rast, aktivnost in urejenost membrane ter metabolno aktivnost, smo skušali ugotoviti kakšen vpliv ima le-ta na energijski metabolizem bakterijskih celic.

V ta namen smo bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 gojili pri različnih koncentracijah soli v gojišču PKE in določili hitrost rasti, urejenost ter aktivnost membrane, glikolitično aktivnost, hitrost respiracije, dehidrogenazno aktivnost in nivo ATP v celici pri različnih slanostih. Poleg tega smo dodatno določili lipidno sestavo membrane in razvili metodo za direktno merjenje transporta elektronov v dihalni verigi bakterijskih celic. Za vse poskuse smo opravili najmanj dve meritvi pri dveh do sedmih neodvisnih gojenjih bakterije *Vibrio* sp.

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati pridobljeni v obdobju od marca 2003 do aprila 2006.

4.1 VPLIV SLANOSTI NA HITROST BAKTERIJSKE RASTI

Kot je razvidno iz slike 12, je hitrost rasti *Vibrio* sp. odvisna od koncentracije soli v gojišču PKE. Največjo hitrost rasti smo izmerili v rastnem gojišču z 1.76 % (w/V) NaCl. Poleg tega smo ugotovili, da bakterija ne raste v odsotnosti NaCl, saj po 25 dneh nismo zaznali spremembe v optični gostoti (OD_{650}). V gojišču PKE lahko raste *Vibrio* sp. do 17 % (w/V) NaCl. Iz slike 12 tudi vidimo, da je porazdelitev hitrosti rasti asimetrična in je pomaknjena v desno k višjim slanostim.



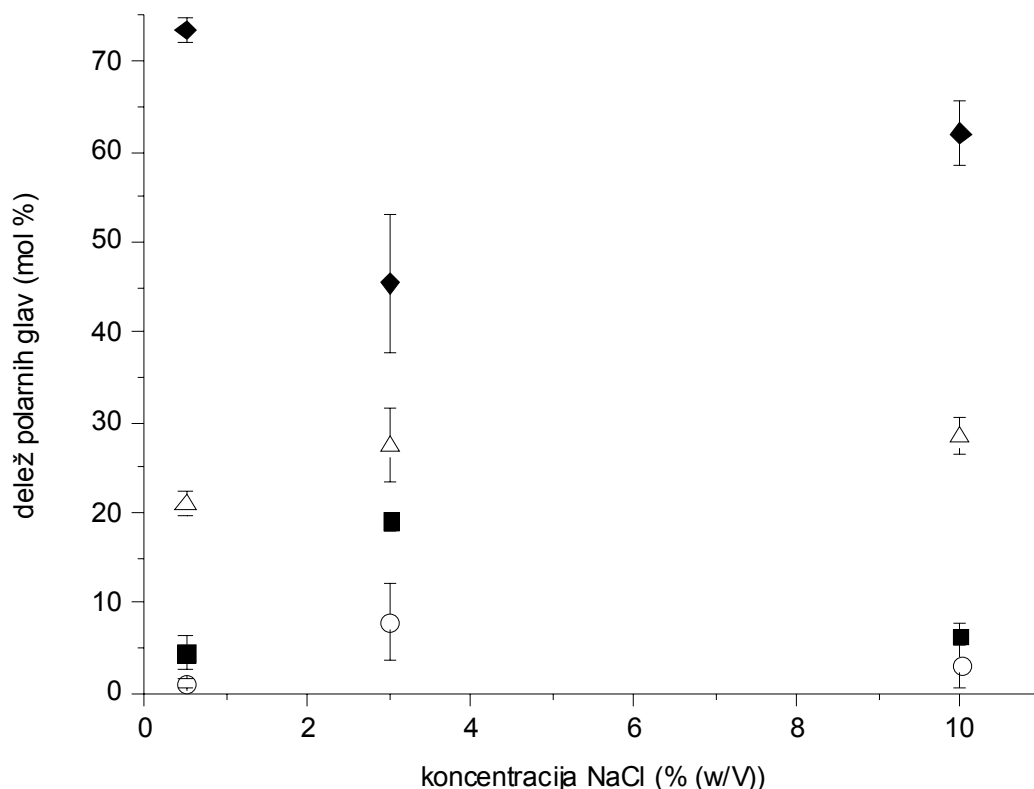
Slika 12: Vpliv koncentracije NaCl na hitrost rasti (μ) *Vibrio* sp. DSM14379 v kompleksnem rastnem gojišču (PKE). Povprečne vrednosti in standardni odkloni hitrosti rasti so izračunani iz treh do petih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp.

Figure 12: The effect of NaCl concentration on the growth rate of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown in PYE medium. The mean values and standard deviations of the growth rates were calculated from three to five independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells.

Na podlagi teh rezultatov (slika 12) smo določili tri koncentracije soli za podrobnejše fiziološke raziskave na nivoju energijskega metabolizma pri *Vibrio* sp. Glede na hitrost rasti oziroma donos biomase smo izbrali optimalno koncentracijo soli (3 % (w/V) NaCl) za rast *Vibrio* sp. in dva ekstrema (0.5 in 10 % (w/V) NaCl). Omenjene koncentracije NaCl smo izbrali zato, ker smo pričakovali, da se bodo v takšnih pogojih pokazale razlike na nivoju energijskega metabolizma bakterijske celice.

4.2 VPLIV SLANOSTI NA BAKTERIJSKO MEMBRANO

4.2.1 Vpliv slanosti na lipidno sestavo bakterijske membrane



Slika 13: Vpliv slanosti na sestavo polarnih glav v lipidnih ekstraktih iz *Vibrio* sp. DSM14379. Lizofosfatidiletanolamin (lyso-PE) predstavljajo (■), fosfatidiletanolamin (PE) (◆), fosfatidilglicerol (PG) (△) in difosfatidilglicerol (DPG) (○). Rezultati so prikazani v molskih % in so bili izračunani iz celotnega deleža fosforja v lipidnih ekstraktih; za DPG smo upoštevali dve fosfatni skupini na molekulo fosfolipida, pri ostalih fosfolipidih pa eno samo fosfatno skupino na molekulo fosfolipida. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz dveh neodvisnih gojenj *Vibrio* sp. (tri ponovitve analiz fosforja na vsakem lipidnem ekstraktu).

Figure 13: The influence of salt concentration on the polar head group composition in the total lipid extracts from *Vibrio* sp. DSM14379 cells; lysophosphatidylethanolamine (lyso-PE) (■), phosphatidylethanolamine (PE) (◆), phosphatidylglycerol (PG) (△) and diphosphatidylglycerol (DPG) (○). Results are shown in mol % and were calculated from total amount of phosphorus in lipid extracts; assuming two phosphate groups per molecule of DPG and one phosphate group per molecule for the other phospholipids. The mean values and standard deviations were calculated from two independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells (three replicate phosphorus analyses of each lipid extract).

Z analizo lipidnih ekstraktov smo ugotovili, da ima *Vibrio* sp. štiri različne polarne glave in da se njihov delež spreminja s koncentracijo soli v rastnem gojišču (slika 13). Najbolj zastopana lipidna polarna glava je PE, najmanj pa DPG pri vseh lipidnih ekstraktih. Pri optimalni koncentraciji soli za rast *Vibrio* sp. (3 % (w/V) NaCl) ima le-ta 45.4 ± 7.7 mol % PE, 27.5 ± 4.1 mol % PG, 19.1 ± 1.0 mol % lizo-PE in 8.0 ± 4.3 mol % DPG (priloga C). Deleža PG in DPG naraščata med 0.5 in 3 % (w/V) NaCl in se ne spremenita pri višjih slanostih. Ta dva podatka nakazujeta, da je delež anionskih lipidov (PG+DPG) največji pri 3 % (w/V) NaCl. Delež PE je najmanjši pri optimalnih pogojih za rast *Vibrio* sp., medtem ko je delež lizo-PE pri teh pogojih največji.

Poleg sestave polarnih glav smo določili tudi sestavo acilnih verig pri *Vibrio* sp. v odvisnosti od koncentracije soli v rastnem gojišču. Iz preglednice 2 je razvidno, da se sestava acilnih verig spreminja s slanostjo. Določili smo okrog 90 % vseh prisotnih acilnih verig in ugotovili, da je v vseh lipidnih ekstraktih glavna acilna veriga 18:1. Deleža 18:1 in 14:1 padata z naraščajočo slanostjo, medtem ko deleža acilnih verig 16:1 in 18:0 naraščata. Deleža acilnih verig 16:0 in 17:0 sta najmanjša pri optimalnih pogojih za rast *Vibrio* sp. (3 % (w/V) NaCl). Edina acilna veriga, katere delež se ne spreminja s slanostjo, je 13:0 in je v vseh lipidnih ekstraktih prisotna v najnižjem deležu. Poleg tega se celokupni delež nenasičenih acilnih verig zmanjšuje s slanostjo, celokupni delež nasičenih acilnih verig pa povečuje s slanostjo. Opazili smo tudi, da se povprečna dolžina acilnih verig zelo malo spreminja s koncentracijo soli v rastnem gojišču in znaša v povprečju 17.6 ogljikovih atomov.

Preglednica 1: Sestava acilnih verig (mol %) lipidnih ekstraktov iz *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE z različnimi slanostmi.

Table 1: The acyl chain composition (mol %) of total lipid extracts from *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown in PYE medium containing different salt concentrations.

Koncentracija NaCl v rastnem gojišču (% (w/V))			
Vrsta acilne verige	0.5	3	10
C13:0 ^a	0.43	0.43	0.46
C14:1	1.16	1.11	0.56
C16:0	4.85	3.65	13.37
C16:1	2.54	3.67	6.07
C17:0	4.31	2.37	3.7
C18:0	7.87	10.5	14.64
C18:1	71.11	64.57	52.75
Nedoločene	7.74	13.71	8.73
Nenasičene acilne verige ^b	81.09	80.36	64.86
Nasičene acilne verige ^c	18.91	19.64	35.14
Povprečna dolžina acilnih verig ^d	17.72	17.73	17.48

Povprečne vrednosti so bile izračunane iz dveh neodvisnih gojenj *Vibrio* sp. DSM14379 celic (dve do štiri ponovitve analiz acilnih verig s plinsko tekočinsko kromatografijo (GLC) na vsakem lipidnem ekstraktu). Molski % je izračunan s pomočjo korelacijskega faktorja med wt % in mol %, ki je odvisen od dolžine acilnih verig.

^a Acilne verige so označene kot n:k, kjer je n število ogljikovih atomov in k število *cis* dvojnih vezi v verigi.

^{b-d} Nedoločene acilne verige niso bile vključene v te izračune.

^d Povprečno število ogljikovih atomov v acilnih verigah, ki je uravnoteženo z deleži posameznih acilnih verig.

The mean values were calculated from two independent batches of *Vibrio* sp. DSM14379 cells (two to four replicate GLC analyses of each batch). Mol % was calculated with correlation factor between wt % and mol %, which is dependent on acyl chain length.

^a The acyl chains are denoted as n:k where n is the number of carbon atoms and k is the number of *cis* double bonds.

^{b-d} Unidentified acyl chains were not included.

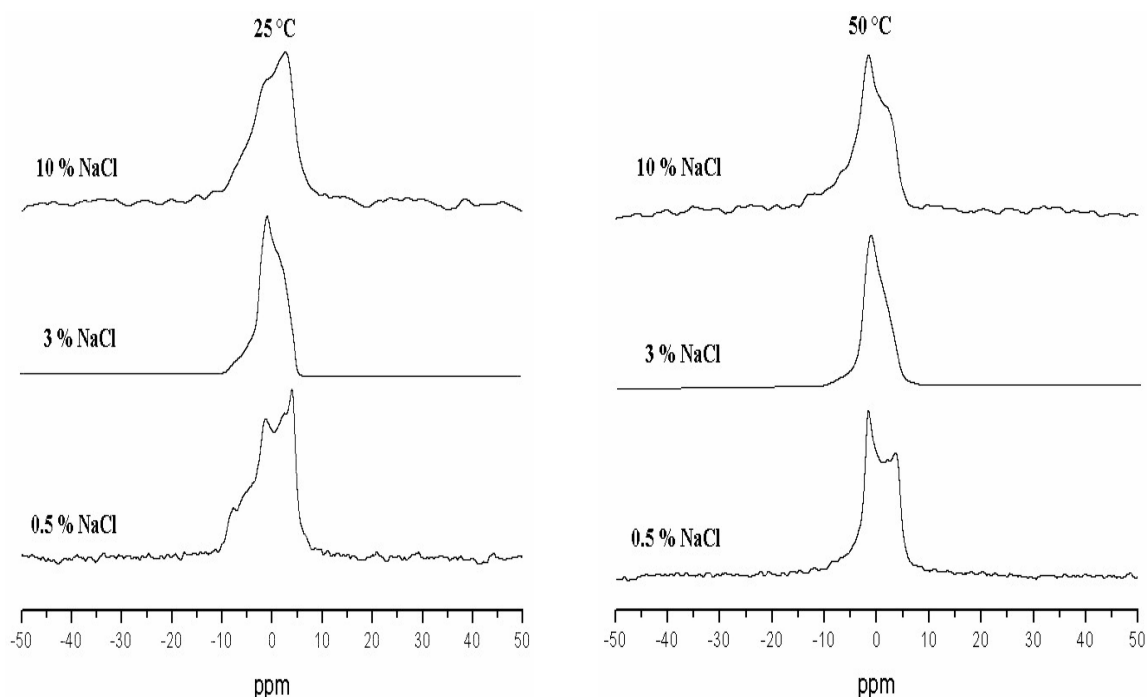
^d Average number of carbon atoms in the acyl chains which were weighted with amounts of each acyl chain.

V literaturi smo zaznali, da so pri bakterijah iz rodu *Vibrio* prisotne acilne verige s hidroksilno skupino, vezano na drugi ali tretji ogljikov atom (Ratledge in Wilkinson, 1988), zato smo pri GLC analizah uporabljali tudi referenčne hidroksi kisline, kot so 3-hidroksidekanoat, 3-hidroksidodekanoat in 2-hidroksidodekanoat. Teh hidroksi kislin nismo uspeli določiti v nobenem izmed lipidnih ekstraktov iz *Vibrio* sp.

4.2.2 Vpliv slanosti na urejenost bakterijske membrane

Za študij urejenosti membranskih lipidov bakterijskih celic *Vibrio* sp., ki so rasle pri različnih koncentracijah soli, smo izvedli ^{31}P -NMR meritve lipidnih ekstraktov. Slika 14 kaže ^{31}P -NMR spektre lipidnih ekstraktov, hidriranih z 20 % (wt) D_2O , posnetih pri 25 in 50 °C. Spekter je sestavljen iz dveh prispevkov, in sicer pri nižji eksperimentalni temperaturi (25 °C) imata ^{31}P -NMR spektra pri ekstremnih slanostih prevoj na levi strani (-1 ppm), medtem ko ima ^{31}P -NMR spekter pri lipidnih ekstraktih iz 3 % (w/V) NaCl prevoj na desni strani (4 ppm). Pri višji eksperimentalni temperaturi (50 °C) imajo ^{31}P -NMR spektri vseh lipidnih ekstraktov prevoj na desni strani (4 ppm).

Če primerjamo obe eksperimentalni temperaturi, vidimo, da je ^{31}P -NMR spekter najožji (15 ppm) pri lipidnih ekstraktih, pridobljenih iz celic, ki so rasle pri 3 % (w/V) NaCl in najširši (20 ppm) pri tistih, ki so rasle pri 10 % (w/V) NaCl. Pri ekstraktih iz 3 % (w/V) NaCl se razmerje med spektroskopskima vrhovoma pri -1 ppm in 4 ppm ne spreminja. Pri ekstraktih, pridobljenih iz bakterijskih celic, ki so rasle pri ekstremnih slanostih, se razmerje obrne, saj prevladuje pri 50 °C spektroskopski vrh pri -1 ppm, pri 25 °C pa spektroskopski vrh pri 4 ppm. Prav tako se razmerje med spektroskopskima vrhovoma pri -1 ppm in 4 ppm poveča pri višji eksperimentalni temperaturi 50 °C.



Slika 14: ^{31}P -NMR spektri lipidnih ekstraktov iz *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel pri različnih slanostih v gojišču PKE. Lipidni ekstrakti so bili hidrirani z 20 wt % D_2O . Spektri so bili posneti pri 25 in 50 °C in normalizirani na višino NMR signala pri 0 ppm pri 3 % (w/V) NaCl.

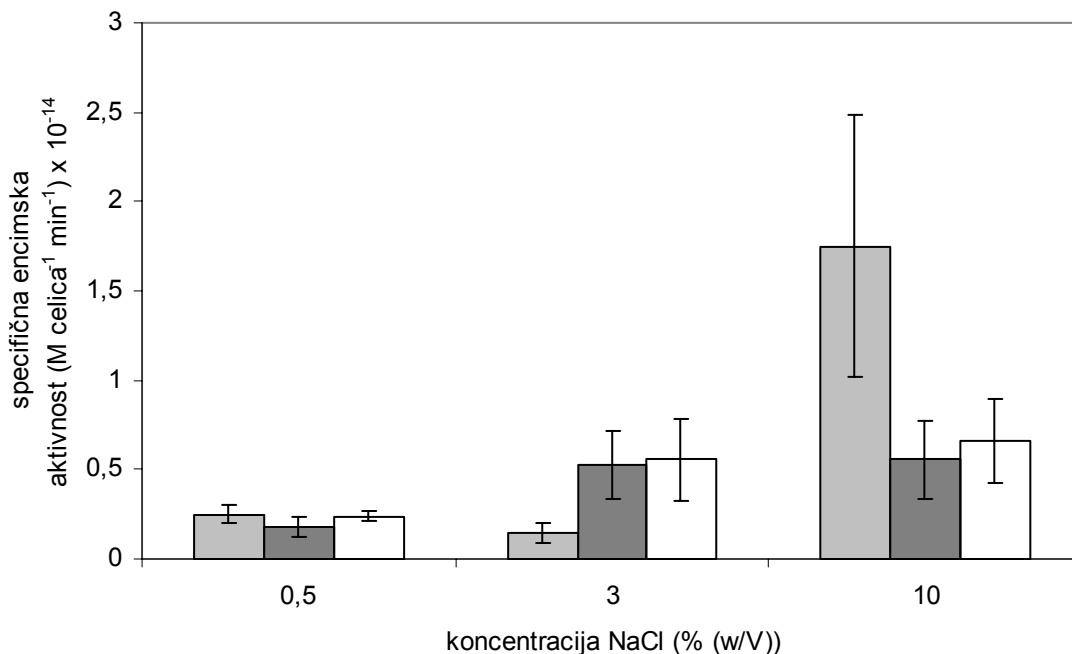
Figure 14: ^{31}P -NMR spectra of total lipid extracts isolated from *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at different salt concentrations. The lipid extracts were hydrated with 20 wt % D_2O . The spectra were recorded at 25 and 50 °C and normalized to the line height at 0 ppm at 3 % (w/V) NaCl.

4.3 VPLIV SLANOSTI NA MIKROBNI KATABOLIZEM

4.3.1 Vpliv slanosti na glikolitično aktivnost

Za spremljanje glikolitične aktivnosti bakterijskih celic *Vibrio* sp. pri različnih slanostih smo izbrali tri pomembne encime: glukoza-6-fosfat dehidrogenazo (G6PD), fosfofruktokinazo (PFK) in piruvat kinazo (PK). Rezultati kažejo, da slanost značilno vpliva na aktivnost G6PD (slika 15, svetlo sivi stolpci), kjer so razlike statistično značilne ($p < 0.05$). Pri aktivnosti PFK in PK (slika 15, temno sivi in beli stolpci) ne opazimo statistično značilnih razlik v njihovih aktivnostih s spreminjanjem slanosti. Med aktivnostmi PFK in PK tudi ni opaznih statistično značilnih razlik pri eni eksperimentalni slanosti. Specifična aktivnost vseh treh glikolitičnih encimov je približno enaka pri 0.5 % (w/V)

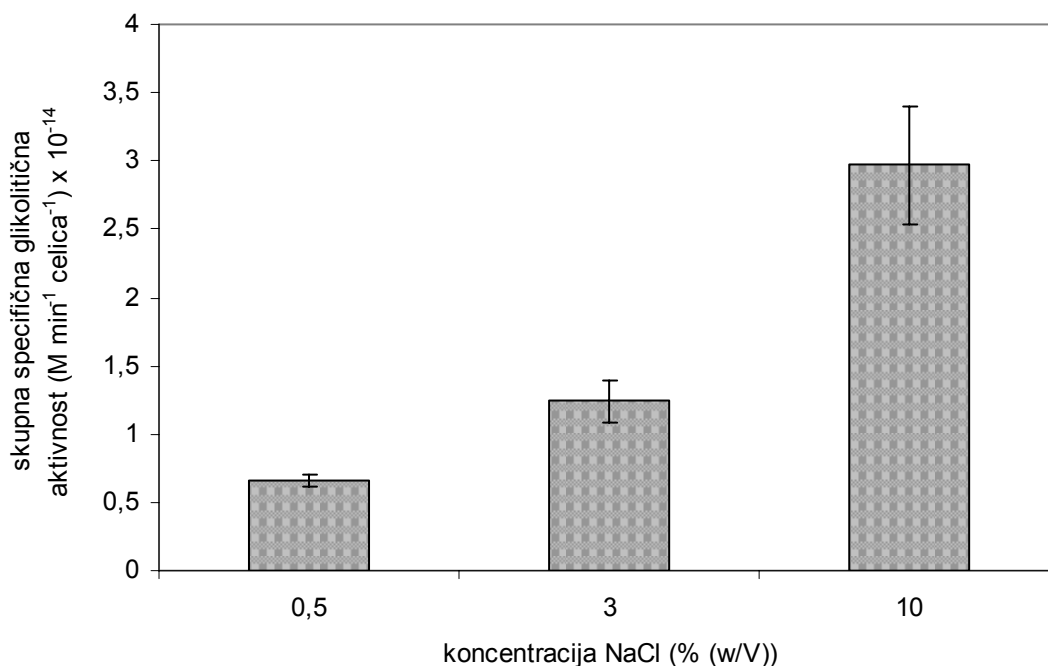
NaCl, medtem ko se aktivnost G6PD pri 3 % in 10 % (w/V) NaCl razlikuje od aktivnosti PFK in PK.



Slika 15: **Vpliv slanosti na specifično aktivnost glikolitičnih encimov pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Glukoza-6-fosfat dehidrogenazo (G6PD) predstavljajo svetlo sivi stolpci, fosfofruktokinazo (PFK) temno sivi stolpci in piruvat kinazo (PK) beli stolpci. Specifična encimska aktivnost je preračunana na celico, ki je rasla pri različnih koncentracijah soli v gojišču PKE. Povprečne vrednosti in standardni odkloni specifične encimske aktivnosti so izračunani iz štirih do sedmih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp.

Figure 15: **The effect of salinity on specific activity of glycolytic enzymes of *Vibrio* sp. DSM14379.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (light gray bars); phosphofructokinase (PFK) (dark gray bars); pyruvate kinase (PK) (white bars). The specific enzyme activity was determined per cell grown at different salt concentrations in PYE medium. The mean values and standard deviations were calculated from four to seven independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells.

Skupna aktivnost preučevanih glikolitičnih encimov se spreminja s slanostjo pri *Vibrio* sp. Iz slike 16 je razvidno, da skupna aktivnost spremljanih glikolitičnih encimov statistično značilno narašča v razmerju 1: 1,9: 4,5 z naraščajočo slanostjo ($p < 0,05$). Skupni pretok snovi skozi preučevane encime glikolitične poti je največji pri 10 % (w/V) NaCl v gojišču PKE, kjer znaša $3 \cdot 10^{-14} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{celica}^{-1}$.



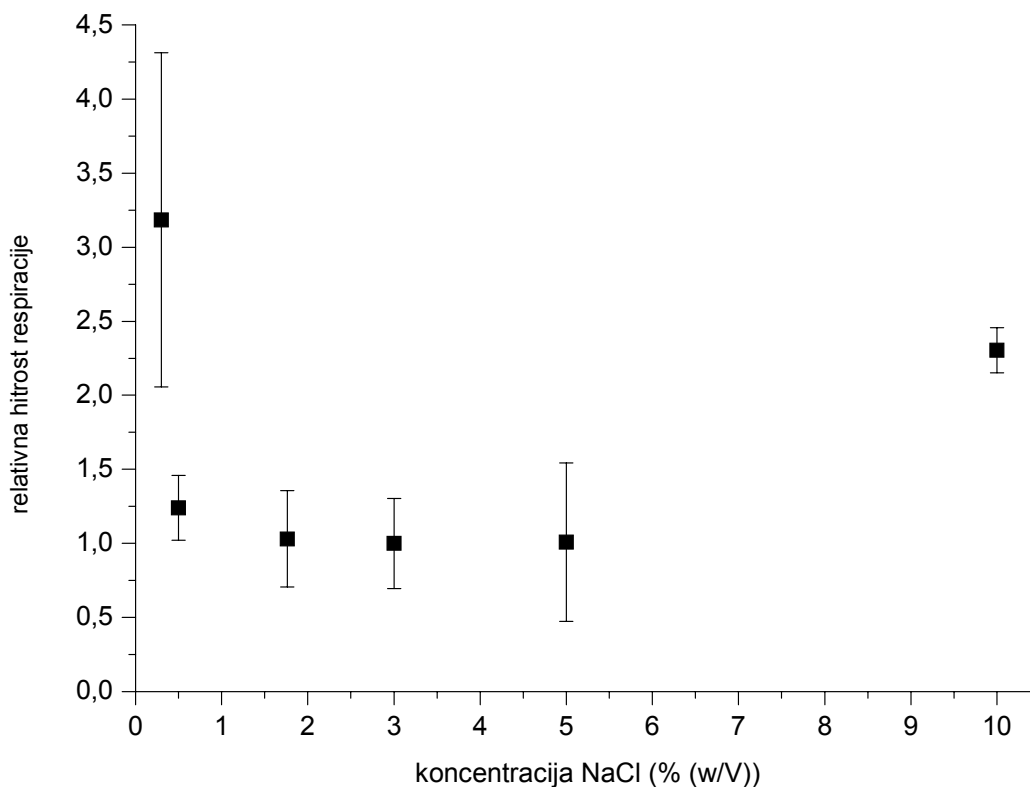
Slika 16: Vpliv slanosti na skupno aktivnost preučevanih glikolitičnih encimov pri *Vibrio* sp. DSM14379. Skupna encimska aktivnost je seštevek specifičnih aktivnosti encimov glukoze-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), fosfofruktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PK). Standardni odkloni so izračunani kot kvadratni koren vsote varianc posameznih encimskih aktivnosti.

Figure 16: The influence of salinity on total activity of measured glycolytic enzymes of *Vibrio* sp. DSM14379 cells. The mean values are sums of specific enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK). The standard deviations were calculated as square root of sum of variances for each enzyme activity.

4.3.2 Vpliv slanosti na sproščanje CO₂

Produkcija CO₂ je mera za mikrobovno respiracijo. Iz rezultatov je razvidno, da je hitrost respiracije pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 odvisna od koncentracije soli v rastnem gojišču (slika 17). V stresnih pogojih za rast bakterije *Vibrio* sp. (0.3 in 10 % (w/V) NaCl) je mikrobovna respiracija večja kot pri optimalnih pogojih za njeno rast ($p < 0.05$). Najnižjo hitrost respiracije smo izmerili pri 3 % (w/V) NaCl in znaša $2.5 \cdot 10^{-12} \text{ ml CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{celica}^{-1}$. Pri 0.3 % (w/V) NaCl je bila respiracija 3.2 krat, pri 10 % (w/V) NaCl pa 2.3 krat večja kot

pri optimalni slanosti. V ostalih primerih koncentracija soli ni znatno spremenila respiracijske aktivnosti celic *Vibrio* sp. v primerjavi z optimalno slanostjo.

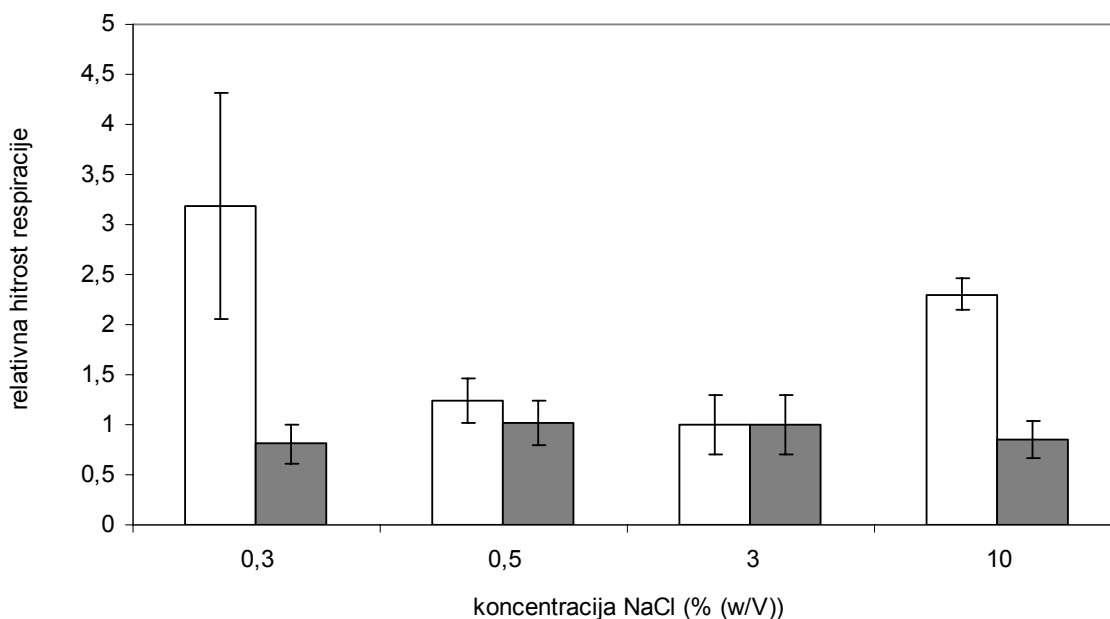


Slika 17: **Vpliv koncentracije NaCl na hitrost respiracije pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Hitrost respiracije je preračunana na celico, ki je rasla pri različnih koncentracijah soli v gojišču PKE. Povprečne vrednosti in standardni odkloni hitrosti respiracije so izračunani iz štiri neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (dve ponovitvi za vsako gojenje).

Figure 17: **The effect of salt concentration on the respiration rate of *Vibrio* sp. DSM14379 cells.** The respiration rate was determined per cell grown at different salt concentrations in PYE medium. The mean values and standard deviations were calculated from four independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells (two replicate analyses for each batch).

Zanimalo nas je tudi, ali so bakterijske celice sposobne hitrega prilagajanja respiracije na spremembo slanosti v okolju. Te rezultate smo primerjali s tistimi, ki so bili pridobljeni z dolgotrajnim izpostavljanjem bakterijskih celic konstantni koncentraciji soli oziroma z gojenjem bakterijskih celic pri teh pogojih.

V ta namen smo *Vibrio* sp., ki je rasel pri 3 % (w/V) NaCl, po gojenju prenesli v raztopino z nižjo ali višjo koncentracijo NaCl kot je bila v gojišču (slika 18, sivi stolpci). Rezultati kažejo, da ni statistično značilnih razlik v hitrosti respiracije v primerjavi s celicami, ki so rasle pri 0.5 % oziroma 3 % (w/V) NaCl. Očitne razlike lahko vidimo med hitrostjo respiracije bakterijskih celic, ki so rasle pri 0.3 ali 10 % (w/V) NaCl in celicami, ki so se na takšno okolje morale prilagoditi. V okolju z 0.3 % (w/V) NaCl je ta razlika 3.9 kratna, v okolju z 10 % (w/V) NaCl pa 2.7 kratna.

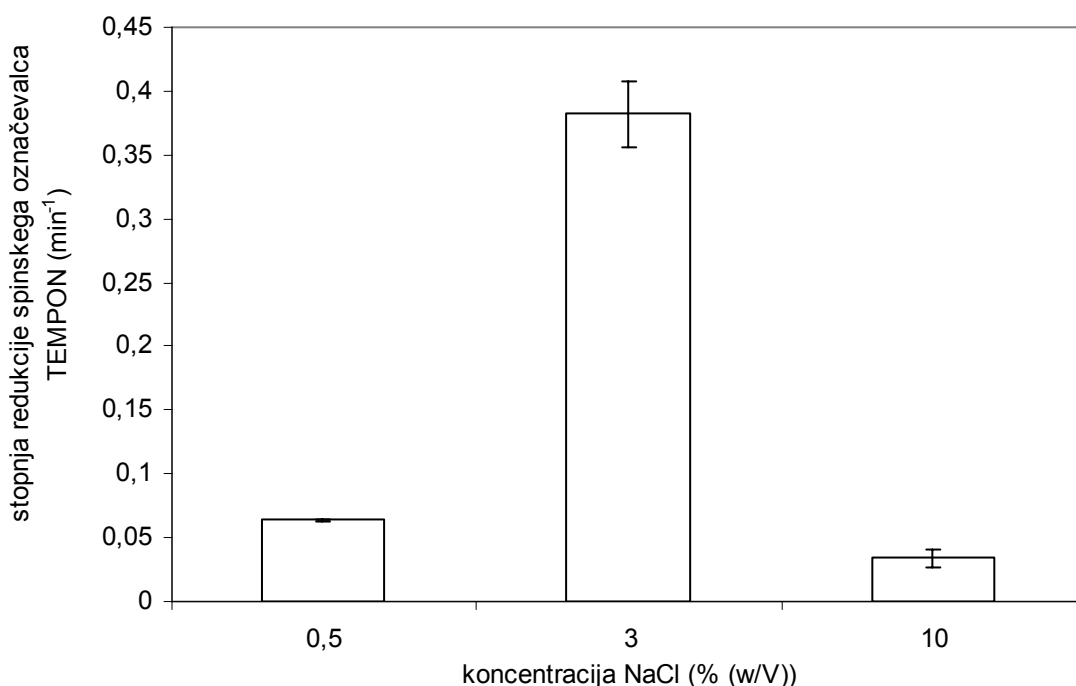


Slika 18: Hitrost respiracije pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v raztopino NaCl z 0.3, 0.5, 3 in 10 % (w/V) NaCl (sivi stolpci). Beli stolpci prikazujejo hitrost respiracije pri bakterijskih celicah, ki so rasle v gojišču PKE z izbrano slanostjo. Povprečne vrednosti in standardni odkloni hitrosti respiracije so izračunani iz štirih neodvisnih gojenj *Vibrio* sp. (dve ponovitvi za vsako gojenje).

Figure 18: The respiration rate of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at 3 % (w/V) NaCl and resuspended in NaCl solution with 0.3, 0.5, 3 and 10 % (w/V) NaCl (gray bars). White bars show the respiration rate of *Vibrio* sp. cells grown in PYE medium with different NaCl concentrations. The mean values and standard deviations were calculated from four independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells (two replicate analyses for each batch).

4.3.3 Vpliv slanosti in temperature na redukcijske sposobnosti bakterijskih celic

Redukcijska sposobnost bakterije *Vibrio* sp. je prikazana na sliki 19 in je odvisna od koncentracije soli v gojišču PKE. Pri 3 % (w/V) NaCl je redukcija spinskega označevalca TEMPON-a največja in pada proti obema ekstremoma. Razmerje med redukcijskimi sposobnostmi je 1 : 6 : 0.5 z naraščajočo slanostjo.

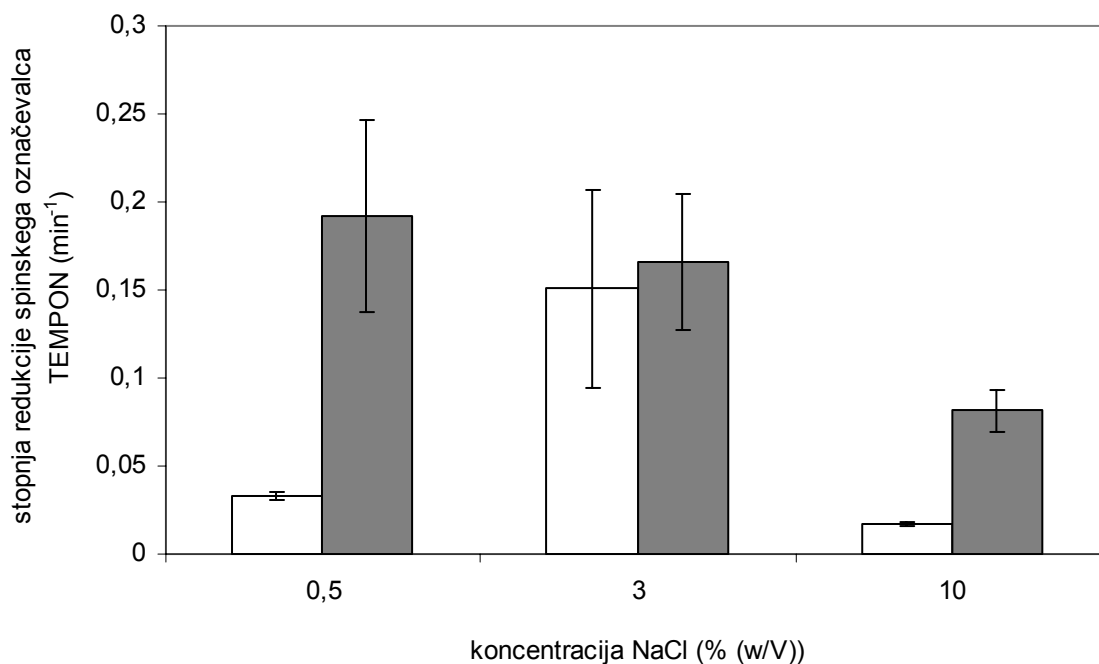


Slika 19: **Vpliv slanosti na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Stopnja redukcije spinskega označevalca predstavlja obratno vrednost časa, v katerem izgubimo 90 % EPR signala in je normalizirana na isto število celic pri različnih koncentracijah soli. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz dveh neodvisnih gojenj *Vibrio* sp.

Figure 19: **The effect of salt concentration on the TEMPON spin label reduction rate of *Vibrio* sp. DSM14379 cells.** The spin label reduction rate was obtained as the reciprocal of the time during which the EPR signal was reduced to the level of noise. The reduction rate was normalized to the same number of cells at different salt concentrations. The mean values and standard deviations were calculated from two independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells.

V primeru, ko so bakterijske celice rasle pri 3 % (w/V) NaCl in so bile oprane ter resuspendirane v pufru z nižjo ali višjo koncentracijo soli, je prišlo do hitrega prilagajanja stopnje redukcije spinskega označevalca pri 10 % (w/V) NaCl (slika 20, sivi stolpci). Pri

celicah, ki so rasele pri optimalnih pogojih za rast *Vibrio* sp. (3 % (w/V) NaCl), in bile nato prenešene v 0.5 % (w/V) NaCl ni statistično značilnih razlik v začetnem redukcijskem odzivu. Bakterije, ki so dobro prilagojene bodisi na visoke ali nizke koncentracije soli, imajo približno petkrat nižji potencial redukcije spinskega označevalca v obeh ekstremih v primerjavi s hitrim odgovorom celic (slika 20). Enak vpliv na redukcijske sposobnosti celic se je pokazal, ko smo celice inkubirali eno uro v okolju s spremenjeno koncentracijo soli in nato dodali spinski označevalec (podatki niso prikazani).



Slika 20: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel pri 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v Tris-HCl pufer z 0,5, 3 in 10 % (w/V) NaCl (sivi stolpci). Redukcija spinskega označevalca je normalizirana na isto število celic. Spinski označevalec smo dodali celični suspenziji 5 minut po spremembi koncentracije soli v okolju. Beli stolpci prikazujejo stopnjo redukcije spinskega označevalca pri *Vibrio* sp., ki je rasel v gojišču PKE z izbrano slanostjo. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz dveh neodvisnih gojenj *Vibrio* sp.

Figure 20: The TEMPON spin label reduction rate of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at 3% (w/V) NaCl, washed and resuspended in Tris-HCl buffer with 0,5, 3 and 10% (w/V) NaCl (gray bars). The spin label reduction rate was normalized to the same number of cells. The TEMPON was added to the cell suspension 5 minutes after salt concentration has been changed. White bars show the spin label reduction rate of *Vibrio* sp. cells grown in PYE with different NaCl concentrations. The mean values and standard deviations were calculated from two independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells.

Da bi določili mesto redukcije spinskega označevalca v bakterijskih celicah, smo preverili redukcijo le-tega v pufru, gojišču in pri avtoklaviranih celicah. Iz preglednice 2 vidimo, da do redukcije spinskega označevalca TEMPON-a ne pride v puferski raztopini in gojišču PKE, niti ko celice toplotno obdelamo z avtoklaviranjem. Torej za redukcijo spinskega označevalca nujno potrebujemo žive (intaktne) celice.

Preglednica 2: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a v različnih raztopinah.

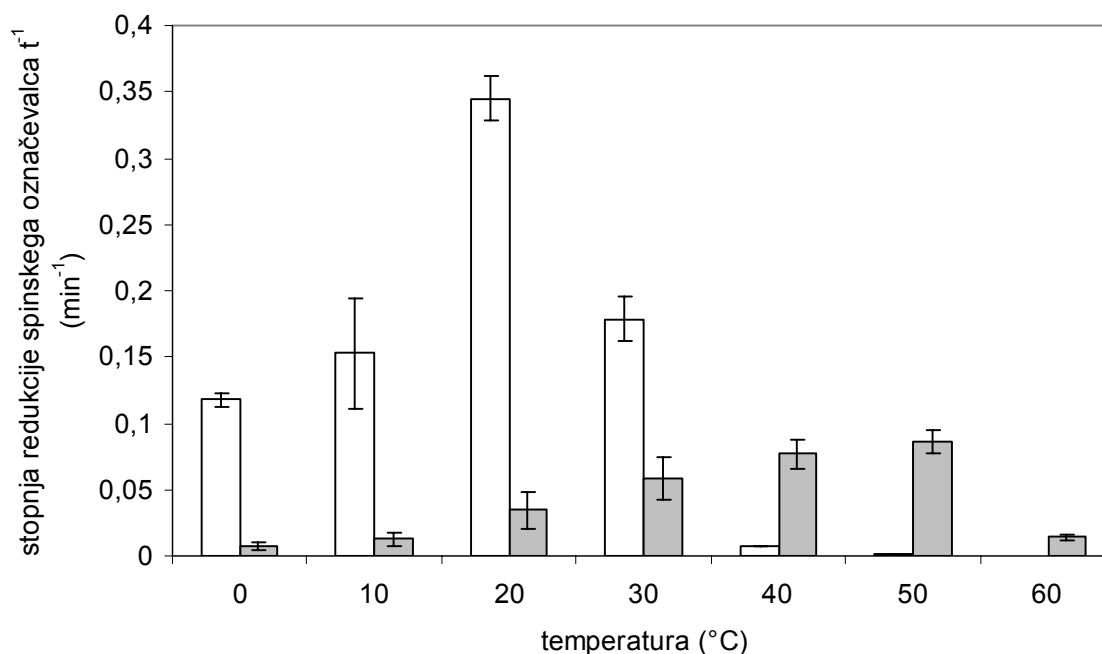
Table 2: TEMPON spin label reduction rate in different solutions.

Raztopina	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON (min^{-1})
20 mM Tris-HCl pufer (pH 7.4)	0
Gojišče PKE	0
Avtoklavirana suspenzija celic <i>Vibrio</i> sp. (121 °C, 15 min)	0

V nadaljevanju smo pokazali, da je redukcija TEMPON-a bistveno počasnejša pri celicah, ki smo jih obdelali z ultrazvokom. Pri celicah, obdelanih z ultrazvokom, se je reduciralo približno 70 % TEMPON-a v dveh urah, za razliko od intaktnih celic, kjer je prišlo do 100 % redukcije TEMPON-a v 20 minutah. Prav tako je bila redukcija TEMPON-a približno 1.2 krat počasnejša pri intaktnih celicah kot pri sferoplastih. Z uporabo lipofilnega spinskega označevalca MeFASL smo pokazali, da je njegova redukcija približno 3.3 krat hitrejša pri sferoplastih kot pri intaktnih celicah.

Redukcijska sposobnost celic v odvisnosti od temperature je prikazana na sliki 21. Pri *Vibrio* sp., ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl pri 28 °C do pozne eksponentne faze in je bil nato prenešen na nižjo ali višjo temperaturo, je bila izmerjena maksimalna stopnja redukcije TEMPON-a pri 20 °C in je potem počasneje padala proti 0 °C kot proti 50 °C. Pri 50 °C je bila redukcijska sposobnost celic *Vibrio* sp. že močno zmanjšana. Pri *E. coli*, ki je rasla v gojišču M9 pri 37 °C in bila nato prenesena na nižjo ali višjo temperaturo, je bila izmerjena maksimalna stopnja redukcije spinskega označevalca pri 50 °C in je nato hitreje padala proti 60 °C kot proti 0 °C. Porazdelitev redukcije spinskega

označevalca je v obeh primerih podobna in je nesimetrična. Pri 0 °C je bila stopnja redukcije TEMPON-a trinajstkrat višja pri *Vibrio* sp. kot pri *E. coli*. To razmerje je s temperaturo padalo.

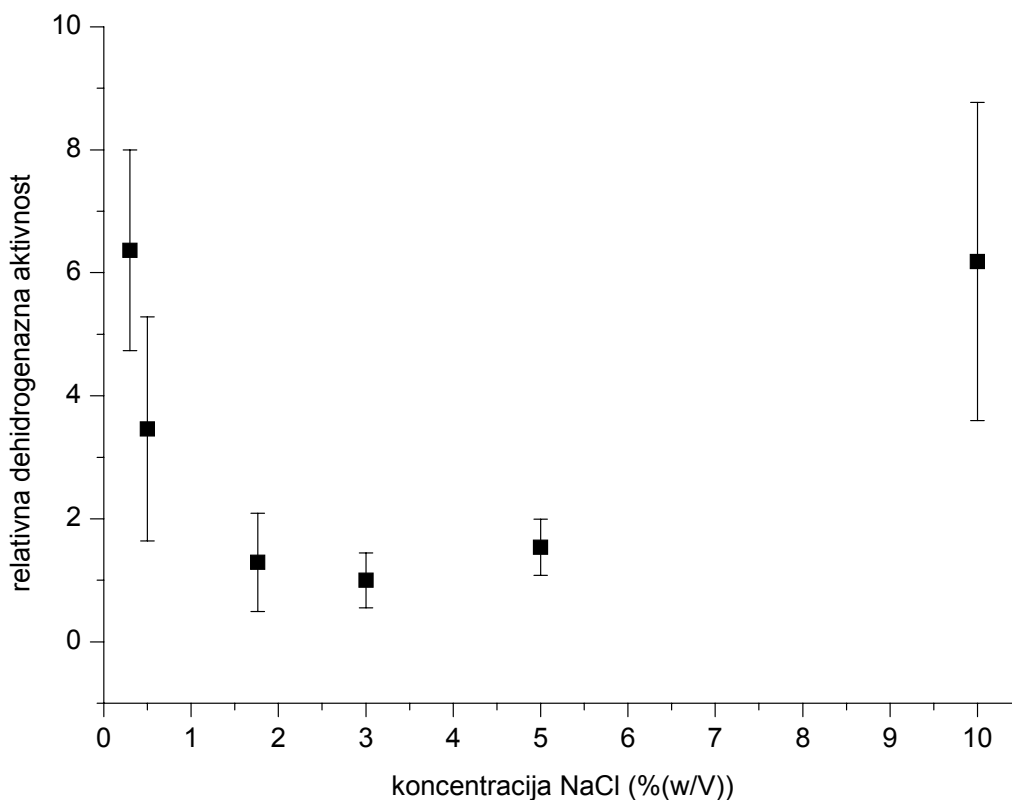


Slika 21: Vpliv temperature na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki rase v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl pri 28 °C (beli stolpci) ter *E. coli* ESH10 K-12, ki je rasla v gojišču M9 pri 37 °C (sivi stolpci). Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijskih kultur.

Figure 21: The effect of temperature on the TEMPON spin label reduction rate in *Vibrio* sp. DSM14379 grown in PYE medium containing 3 % (w/V) NaCl at 28 °C (white bars) and *E. coli* ESH10 K-12 grown in M9 medium at 37 °C (gray bars). The mean values and standard deviations were calculated from three independent growth experiments of bacterial culture.

Poleg tega smo tudi preverili, kako vpliva temperatura na hitrost rasti pri *Vibrio* sp. v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in pri *E. coli* v gojišču M9 (priloga B). Ugotovili smo, da je temperaturni razpon rasti obeh mikroorganizmov med 15 in 44 °C in da je njuna hitrost rasti največja pri 40 °C.

4.3.4 Vpliv slanosti na dehidrogenazno aktivnost

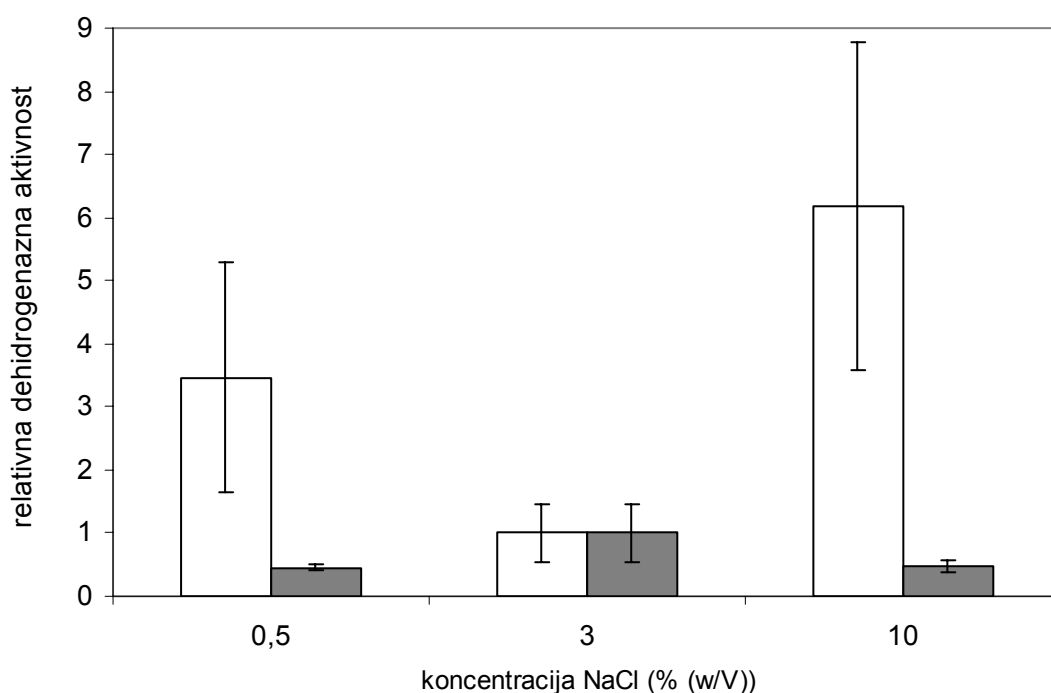


Slika 22: Vpliv slanosti na relativno dehidrogenazno aktivnost pri *Vibrio* sp. DSM14379. Dehidrogenazna aktivnost je preračunana na celico, ki je rasla pri različnih koncentracijah soli v gojišču PKE. Povprečne vrednosti in standardni odkloni dehidrogenazne aktivnosti so izračunani iz treh do šestih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (tri ponovitve za vsako gojenje).

Figure 22: The effect of salinity on the relative dehydrogenase activity of *Vibrio* sp. DSM14379 cells. The dehydrogenase activity was determined per cell grown in PYE medium with different salt concentrations. The mean values and standard deviations were calculated from three to six independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells (three replicate analyses for each batch).

Dehidrogenazna aktivnost pri *Vibrio* sp. v odvisnosti od slanosti je prikazana na sliki 22. Pri optimalnih pogojih za rast (3 % (w/V) NaCl), je dehidrogenazna aktivnost najnižja in znaša $2.3 \cdot 10^{-9} \mu\text{g TTF} \cdot \text{celica}^{-1}$. V stresnih pogojih (0.3 in 10 % (w/V) NaCl) je dehidrogenazna aktivnost šestkrat večja od vrednosti izmerjene pri 3 % (w/V) NaCl ($p < 0.05$).

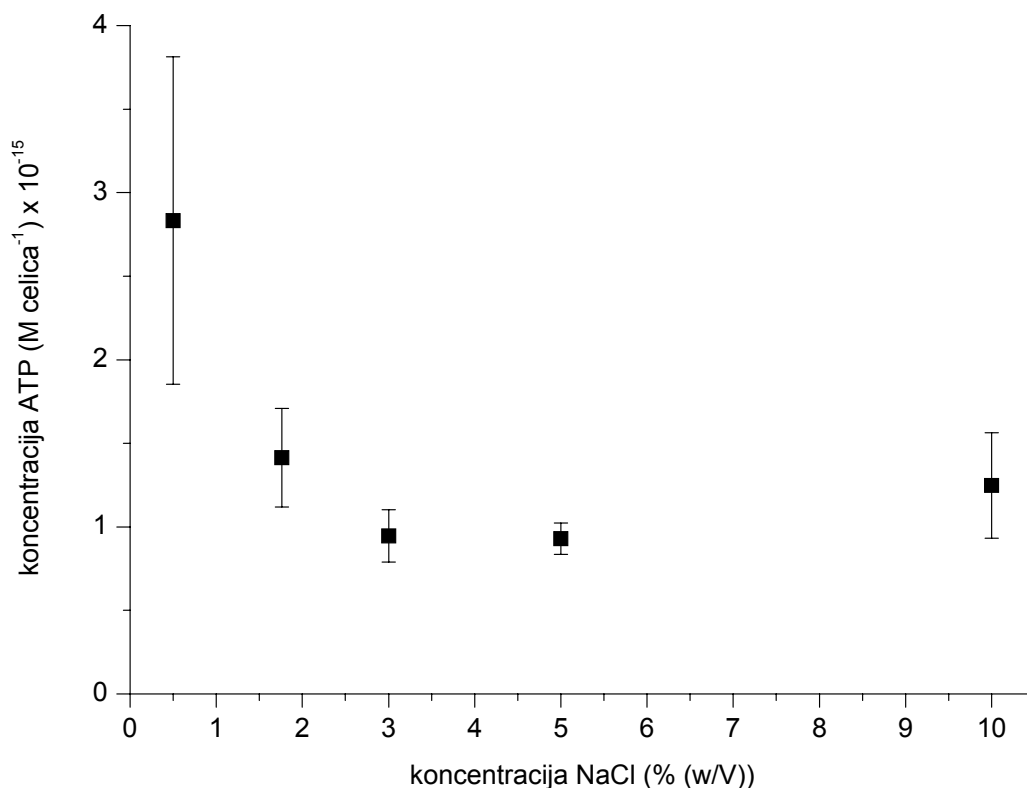
V primeru, ko je *Vibrio* sp. rasel pri 3 % (w/V) NaCl in smo ga po gojenju prenesli v Tris-HCl pufer z nižjo ali višjo koncentracijo NaCl kot je bila v gojišču, ni prišlo do takojšnjega prilagajanja *Vibrio* sp. celic na novo okolje, saj ni bilo statistično značilnih razlik v njihovi dehidrogenazni aktivnosti (slika 23, sivi stolpci). Razlike v dehidrogenazni aktivnosti so opazne, če primerjamo celice, ki so rasle pri 0.5 in 10 % (w/V) NaCl, in celice, ki so rasle pri 3 % (w/V) NaCl in so bile nato prenešene v okolje z 0.5 ali 10 % (w/V) NaCl. V teh primerih se je dehidrogenazna aktivnost z višanjem koncentracije soli glede na pogoje rasti zmanjšala za 13.2 krat, z nižanjem pa za 7.7 krat.



Slika 23: Relativna dehidrogenazna aktivnost pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v okolju s 3 % (w/V) NaCl, in bil prenešen v raztopino NaCl z 0.5, 3 in 10 % (w/V) NaCl (sivi stolpci). Beli stolpci prikazujejo relativno dehidrogenazno aktivnost bakterijskih celic, ki so rasle v gojišču PKE z izbrano koncentracijo soli. Povprečne vrednosti in standardni odkloni dehidrogenazne aktivnosti so izračunani iz treh do šestih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (tri ponovitve za vsako gojenje).

Figure 23: The relative dehydrogenase activity of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at 3 % (w/V) NaCl and resuspended in NaCl solution with 0.5, 3 and 10 % (w/V) NaCl (gray bars). White bars show the relative dehydrogenase activity of *Vibrio* sp. cells grown in PYE medium with different NaCl concentrations. The mean values and standard deviations were calculated from three to six independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells (three replicate analyses for each batch).

4.3.5 Vpliv slanosti na nivo ATP v celici



Slika 24: **Vpliv slanosti na skupno koncentracijo ATP v celicah *Vibrio* sp. DSM14379.** Koncentracija ATP je preračunana na celico, ki je rasla pri različnih koncentracijah soli v gojišču PKE. Povprečne vrednosti in standardni odkloni skupne koncentracije ATP so izračunani iz petih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (dve ponovitvi za vsako gojenje).

Figure 24: **The effect of NaCl on the total ATP level in *Vibrio* sp. DSM14379 cells.** The total ATP concentration was determined per cell grown at different salt concentrations in PYE medium. The mean values and standard deviations were calculated from five independent growth experiments of *Vibrio* sp. cells (two replicate analyses for each batch).

Na sliki 24 je prikazana skupna koncentracija ATP v celicah *Vibrio* sp. v odvisnosti od koncentracije soli v gojišču PKE. Pri minimalni koncentraciji soli v gojišču je prisotna največja skupna koncentracija ATP v bakterijski celici. Ta znaša $2.8 \cdot 10^{-15} \text{ M} \cdot \text{celica}^{-1}$ in je trikrat večja od skupne koncentracije ATP pri optimalni slanosti za rast *Vibrio* sp. ($p < 0.05$). Poleg tega z večanjem koncentracije soli v gojišču ni statistično značilnih razlik

($p > 0.05$) v skupni koncentraciji ATP v celici v primerjavi z optimalno koncentracijo soli za rast *Vibrio* sp.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V doktorski nalogi smo si zastavili naslednje cilje:

- pokazati vpliv osmotskega stresa na (i) bakterijsko rast; (ii) sestavo, aktivnost in urejenost bakterijske membrane in (iii) metabolno aktivnost pri *Vibrio* sp.
- razviti novo metodo za direktno merjenje transporta elektronov v elektronski transportni verigi bakterijskih celic pri različnih dejavnikih okolja (npr. slanost, temperatura).

Rezultati kažejo, da osmotski stres dolgoročno vpliva na vse proučevane procese in nam omogočajo vpogled v energijski metabolizem pri *Vibrio* sp. med osmotskim stresom.

5.1 VPLIV SLANOSTI NA ENERGIJSKI METABOLIZEM PRI *Vibrio* sp.

5.1.1 Rast *Vibrio* sp.

Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 za svojo rast potrebuje NaCl in lahko tolerira povišane koncentracije soli v gojišču. *Vibrio* sp. namreč raste do 17 % (w/V) NaCl v gojišču PKE (slika 12, priloga A). Gre torej za halotolerantni mikroorganizem, ki je prilagojen na okolje, iz katerega je bil izoliran (brakično okolje – Škocjanski zatok). Poleg tega raste *Vibrio* sp. v širokem območju temperatur, saj je rast v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl prisotna od 15 °C do 44 °C (priloga B1). Izmerjena optimalna temperatura za rast 40 °C je za morski izolat zelo visoka, saj običajno temperature v tem okolju ne dosegajo tako visokih vrednosti.

5.1.2 Sestava, urejenost in aktivnost membrane

Spremembe okoljskih dejavnikov se odražajo tako na fiziološkem kot tudi na biokemijskem nivoju *Vibrio* sp. Pokazali smo, da slanost vpliva na lipidno sestavo membrane pri *Vibrio* sp. in posledično na njeno aktivnost ter strukturiranost. Pri optimalnih pogojih za rast (3 % (w/V) NaCl) ima *Vibrio* sp. v membrani 20 mol % lizo-PE (slika 13), kar je mnogo več kot je bilo predhodno pokazano za druge sorodne bakterije iz rodu *Vibrio* (Hanna in sod., 1984). Lizolipidi lahko tvorijo v membrani tako normalne micelarne kot normalne heksagonalne strukture kar je odvisno od pogojev, v katerih se le-ti nahajajo (Arvidson in sod., 1985). Ti lipidi torej destabilizirajo lipidni dvosloj in s tem povečajo

prepustnost membrane za vodo ter inducirajo zlitje med celicami (Lucy, 1970; Poole in sod., 1970; van Echteld in sod., 1981; Fuller in Rand, 2001). Zaradi tega imata glavna membranska lipida PE in lizo-PE, ki ju sintetizira *Vibrio* sp., visoko tendenco za tvorbo nelamelarnih struktur.

Naši rezultati se delno ujemajo z rezultati, ki so bili objavljeni na sorodni bakteriji *Vibrio costicola* (Hanna in sod., 1984). Pri tej bakteriji PE in PG skupaj prispevata 73-81 mol % membranskih lipidov, medtem ko so DPG, lizo-PE in lizo-PG manjše lipidne komponente. Molski delež PE proti molskemu deležu PG pada od 2.4 na 0.8 v gojišču z 0.5 in 3 M NaCl. Podobno predstavljata pri *Vibrio* sp. PE in PG skupaj 73-94 mol % membranskih lipidov. Molski delež PE proti molskemu deležu PG pada od 3.5 do 1.7 v gojišču z 0.5 % (w/V) (kar je 0.085 M) in 3 % (w/V) (kar je 0.5 M) NaCl in naraste do 2.2 v gojišču z 10 % (w/V) (kar je 1.7 M) NaCl (priloga C). Pri primerljivih koncentracijah soli, delež PE proti deležu PG pri *Vibrio costicola* pada z naraščajočo slanostjo, medtem ko pri našem izolatu *Vibrio* sp. narašča.

Tudi sestava acilnih verig je odvisna od koncentracije soli v gojišču PKE (preglednica 1). Naši rezultati kažejo, da je pri *Vibrio* sp. najbolj zastopana acilna veriga 18:1, katere delež se giba med 50 in 70 mol % in pada z naraščajočo koncentracijo soli. Poleg tega skupni delež nenasičenih acilnih verig (18:1 in 16:1) pada, delež nasičenih acilnih verig (18:0 in 16:0) narašča z naraščajočo slanostjo. Ob primerjavi naših rezultatov s sestavo acilnih verig pri *Vibrio costicola* ugotovimo, da se le-ti kvantitativno razlikujeta med seboj (Hanna in sod., 1984). Pri *Vibrio costicola* se delež 18:1 giba med 25 in 40 mol % in doseže največjo vrednost pri 1 M NaCl. Skupni delež nenasičenih acilnih verig doseže največjo vrednost, skupni delež nasičenih acilnih verig pa najmanjšo vrednost pri optimalni slanosti. Prav tako sintetizira *Vibrio costicola* mnogo večje deleže acilnih verig 16:0 in 16:1 ter mnogo manjše deleže 18:0 in 18:1 kot *Vibrio* sp. Če primerjamo nekatere acilne verige, ugotovimo, da se pri *Vibrio costicola* deleža acilnih verig 16:1 in 18:0 ne spreminjata znatno z naraščajočo koncentracijo NaCl, medtem ko pri *Vibrio* sp. oba deleža naraščata z naraščajočo slanostjo.

Vpliv sestave acilnih verig in polarnih glav pri različnih slanostih na urejenost bakterijske membrane smo pokazali z ^{31}P -NMR spektroskopijo. ^{31}P -NMR spektri lipidnih ekstraktov so kompleksni, vendar različni (slika 14). Lipidi lahko v membrani tvorijo različne strukture, od lamelarnih do nelamelarnih. Spektri lipidnih ekstraktov iz *Vibrio* sp. ne kažejo izrazitih lamelarnih struktur in zanje značilnega lipidnega dvosloja. Vsi lipidni ekstrakti tvorijo mešanico lamelarnih in izotropnih struktur pri obeh eksperimentalnih temperaturah. Delež izotropne faze je največji v ekstraktih, pridobljenih iz celic, ki so rasle pri 3 % (w/V) NaCl. Izotropna komponenta lahko predstavlja tako micelarne kot tudi kubične faze. Znano je namreč, da se micelarna faza običajno tvori pri višjih vsebnostih vode (Lindblom in Rilfors, 1989). Zaradi tega dejstva in nizke vsebnosti vode, prisotne v lipidnih ekstraktih, ter sestave polarnih glav, predstavlja izotropna komponenta zelo verjetno kubičnim strukturam podobno fazo. Lipidni ekstrakti celic, ki so rasle pri 3 % (w/V) NaCl, imajo največ kubičnim strukturam podobne faze, kar je skladno z dejstvom, da ti ekstrakti vsebujejo najmanjši delež PE in največji delež lizo-PE ter PG in DPG skupaj. Poleg tega prisotnost velikega deleža lizo-PE v vseh lipidnih ekstraktih pripomore bolj verjetno k tvorbi normalne kot obrnjene strukture (Arvidson in sod., 1985; Lindblom in Rilfors, 1989; Fuller in Rand, 2001). To pomeni, da tvorijo lipidni ekstrakti *Vibrio* sp. mešanico lamelarnih in normalnih, kubičnim strukturam podobnih faz.

Rezultati urejenosti lipidnih ekstraktov *Vibrio* sp. celic se razlikujejo od rezultatov, pridobljenih na lipidnih ekstraktih iz *Vibrio costicola* (Sutton in sod., 1991). Lipidni ekstrakti *Vibrio costicola*, ki je rasel pri 1 M NaCl, so tvorili mešanico lamelarnih in obrnjenih heksagonalnih struktur pri 25 °C, medtem ko so lipidni ekstrakti celic pri 3 M NaCl tvorili samo lamelarne strukture (Sutton in sod., 1991). Poleg tega so ^{31}P -NMR študije na lipidnih ekstraktih *Escherichia coli* pokazale tvorbo samo lamelarne faze tekočih kristalov pri temperaturi, pri kateri je mikroorganizem rasel, medtem ko so ti ekstrakti tvorili obrnjene kubične ali obrnjene heksagonalne faze le pri povišani temperaturi (Morein in sod., 1996). Fosfolipidi, izolirani iz po Gramu negativne bakterije *Megasphaera elsdenii*, tudi tvorijo obrnjene heksagonalne strukture pri temperaturah nad optimalno temperaturo rasti (Kaufman in sod., 1990). Vsi ti rezultati so v nasprotju z našimi, ki kažejo, da membranski lipidi izolirani iz *Vibrio* sp. celic tvorijo pretežno normalne, kubičnim strukturam podobne faze že pri optimalni temperaturi za rast te bakterije,

neodvisno od testirane koncentracije soli (slika 14). Ta nenavadna urejenost lipidov nakazuje, da imajo membranski proteini odločilno vlogo pri vzdrževanju strukturne integritete lipidnega dvosloja teh celic.

Vse te spremembe v sestavi in urejenosti bakterijske membrane lahko vodijo k spremembam njene aktivnosti. Pokazali so, da imajo lipidi PE, PG in DPG ključno vlogo pri mnogih membransko vezanih procesih v *Escherichia coli* (Dowhan, 1997; Rilfors in sod., 1999; Cronan, 2003). V našem primeru smo kot pokazatelj spremenjene aktivnosti biološke membrane po spremembi slanosti okolja izbrali njene redukcijske sposobnosti (slika 19). S spremljanjem redukcije spinskega označevalca TEMPON-a v celični suspenziji, ki poteka zelo hitro, lahko opazujemo dogajanje oziroma spremembe v dihalni verigi bakterijskih celic (Rapoport in sod., 1999). Iz rezultatov lahko sklepamo, da bakterijske celice ne poskušajo vzdrževati konstantne stopnje redukcije spinskega označevalca v membrani, ko rastejo pri različnih koncentracijah soli v rastnem gojišču. *Vibrio* sp. ima največjo stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a v okolju s 3 % (w/V) NaCl (slika 19).

V primeru spremembe slanosti okolja k višjim ali nižjim koncentracijam se redukcijske sposobnosti celic hitro odzovejo na novo okolje. Redukcijska sposobnost se namreč spremeni že po petih minutah od spremembe slanosti okolja (slika 20). To nakazuje, da lahko membrana reagira relativno hitro s spreminjanjem svojega redukcijskega potenciala kot odgovor na spremembe slanosti. V primeru trenutnega zvišanja ali znižanja koncentracije soli ostane redukcijska sposobnost celic precej višja glede na celice, ki so rasle pri višji ali nižji slanosti. Kljub temu trenutni odziv membrane pri nespremenjeni sestavi ne more razložiti odziva celic, ki so prilagojene na te pogoje. To z drugimi besedami pomeni, da mora celica dolgoročno spremeniti sestavo membrane za vzdrževanje homeostaze, kar posledično spremeni tudi njene redukcijske lastnosti. Kratkoročno pa lahko celica s povišanimi redukcijskimi sposobnostmi pripomore k lažjemu in hitrejšemu prilagajanju na nove razmere.

5.1.3 Metabolna aktivnost bakterijskih celic

Kako spremembe okoljskih dejavnikov vplivajo na metabolne poti v celici je odvisno od nivoja njihove regulacije. Glikolitični procesi so v celici eni najbolj reguliranih (Lehninger in sod., 1993; Koebsmann in sod., 2002). Zato je zanimivo, da obstajajo razlike v aktivnosti encimov PFK, PK in G6PD v odvisnosti od slanosti (slika 15). To ima lahko za celico pomembne posledice (npr. povečana aktivnost G6PD lahko vpliva na tvorbo osmolitov). Preko aktivnosti G6PD je reguliran pretok ogljika med ED in PP potjo glikolize (Moritz in sod., 2000). Pri višjih koncentracijah soli v okolju torej lahko prihaja do povečanja pretoka ogljika skozi PP pot glikolize pri *Vibrio* sp., kar ima za posledico večjo redukcijsko moč in s tem povečano biosintetsko aktivnost za vzdrževanje homeostaze. To nakazuje, da je pri G6PD regulacija manj striktna, saj sprememba slanosti okolja vpliva na njeno aktivnost pri *Vibrio* sp. To je do neke mere razumljivo, saj zahtevajo stresni pogoji reorganizacijo celice (npr. membrane), za kar je potrebna redukcijska moč, ki jo celice dobijo iz PP metabolne poti. Poleg tega skupen pretok snovi skozi glikolitične poti linearno narašča s slanostjo (slika 16). Ti rezultati se ne ujemajo s trditvijo, da se z večanjem PFK aktivnosti povečuje skupna glikolitična aktivnost (Lehninger in sod., 1993), saj se pri *Vibrio* sp. PFK aktivnost ne spreminja s slanostjo. Iz vsega tega sledi, da so ključni regulatorni encimi (PFK in PK) centralnega metabolizma bakterijskih celic pri *Vibrio* sp. dobro regulirani. Sprememba slanosti namreč ne vpliva bistveno na njuno aktivnost ($p > 0.05$).

Na podobno prilagoditev smo naleteli pri proučevanju respiracije. *Vibrio* sp. prilagaja hitrost respiracije spremembam slanosti okolja (slika 17). Bolj kot so ti pogoji neugodni, hitrejša je respiracija. Torej potrebuje *Vibrio* sp. v stresnih pogojih več energije za preživetje oziroma vzdrževanje homeostaze. V ta namen bakterijske celice hitreje dihajo oziroma povečajo aktivnost tistih procesov, ki tvorijo energijo. Ti rezultati so v nasprotju s trditvijo, da se z večanjem osmolarnosti zmanjšuje hitrost respiracije (Wood, 1999). Prav tako so ti rezultati v nasprotju z meritvami endogene respiracije pri *Bacillus cereus*, kjer doseže respiracija maksimalno vrednost pri 0.2 M NaCl (Ingram, 1940).

Bakterije so sposobne prilagajanja na spremembe dejavnikov okolja na več različnih nivojih in različno hitro. Pri trenutni spremembi slanosti okolja, od optimalne proti

ekstremni, se hitrost respiracije ni bistveno spremenila in je bila v primerjavi z respiracijo celic, ki so rasle v ekstremnih pogojih, nižja. Iz tega lahko sklepamo, da je respiracija proces, ki se ne odzove hitro na spremembe slanosti v okolju (slika 18).

Kakšna je oksidativna sposobnost celic po spremembi slanosti, smo preverjali tudi z dehidrogenazno aktivnostjo. Ta aktivnost je vezana na delovanje vseh dehidrogenaz v bakterijski celici; dehidrogenaze v dihalni verigi, v glikolitičnih poteh in v ciklu citronske kisline. Oksidativna sposobnost *Vibrio* sp. je najmanjša pri optimalni slanosti in se večja z osmotskim stresom (slika 22). Ti rezultati sovpadajo s hitrostjo bakterijske respiracije, saj je tam, kjer je hitrost respiracije največja, tudi dehidrogenazna aktivnost največja (sliki 17, 22). Z drugimi besedami, večja kot je dehidrogenazna aktivnost, večja je hitrost mikrobne respiracije. To je v skladu z do sedaj poznanimi podatki, da več kot je celic, ki so sposobne redukcije tetrazolijevih soli (npr. CTC), večje je sproščanje CO₂ na celico (Créach in sod., 2003). Ti rezultati o metabolni aktivnosti celic tudi sovpadajo z dejstvom, da je produkcija CO₂ večinoma rezultat aktivnosti treh dehidrogenaznih encimov v CCK (izocitrat, α -ketoglutarat in piruvat dehidrogenaze) (Roy in Packard, 2001).

S prenosom bakterijskih celic v novo okolje s spremenjeno koncentracijo soli ni prišlo do takojšnjih sprememb oziroma prilagajanj v dehidrogenazni aktivnosti (slika 23). Le-ta je bila približno enaka pri vseh koncentracijah soli in je bila nižja od tiste, ko so celice rasle pri konstantni slanosti. Iz tega lahko sklepamo, da *Vibrio* sp. ni sposoben hitrega prilagajanja dehidrogenazne aktivnosti oziroma oksidativne sposobnosti na spremembe slanosti okolja. Ta odziv je enak trenutnemu odzivu pri respiraciji, le da je razlika med na osmotski stres prilagojenimi in neprilagojenimi celicami večja pri dehidrogenazni aktivnosti kot respiraciji.

Kot zadnji pokazatelj metabolnega stanja bakterijskih celic smo izbrali nivo ATP v celici. Skupna koncentracija ATP v celici *Vibrio* sp. ostaja dokaj konstantna s spremembami slanosti okolja (slika 24). Značilno je povečana le pri minimalni koncentraciji soli (0.5 % (w/V) NaCl) ($p < 0.05$). Ker smo izmerili neto produkcijo ATP, ne moremo z gotovostjo povedati, ali se je spremenila hitrost sinteze ali hitrost porabe ATP. Poleg tega tudi ne vemo, ali sta pri minimalni koncentraciji soli sinteza in poraba ATP na celico večji ali

manjši kot pri ostalih slanostih. Ti rezultati kažejo delno ujemanje s podatki iz literature, ki navajajo, da prihaja pri izpostavljanju celic osmotskemu stresu do povečanja koncentracije ATP v celici (Ohwada in sod., 1994; Varela in sod., 2004). Od te trditve najbolj odstopa relativno nizka koncentracija ATP pri 10 % (w/V) NaCl. Poleg tega je izmerjena skupna količina ATP na celico *Vibrio* sp. za približno deset do stokrat manjša od vrednosti, ki jo navaja literatura (Hamilton in Holm-Hansen, 1967; Stanley, 1986). Literaturni podatek namreč navaja, da je običajno količina ATP na celico 10^{-15} g, medtem ko se pri *Vibrio* sp. ta vrednost giblje med 10^{-16} in 10^{-17} g ATP na celico.

Spremembe na fiziološkem in biokemijskem nivoju kot odgovor na osmotski stres kažejo sposobnost celic *Vibrio* sp., da prilagodijo svoj metabolizem tem pogojem. V ekstremnih razmerah za njihovo rast, ko je hitrost rasti upočasnjena, je metabolizem pospešen ter se večina energije porabi za vzdrževalne procese in ne za rast. Iz rezultatov sklepamo, da vzdrževalna energija ni enaka v obeh ekstremih, kljub temu da sta vzorca podobna. Torej je glavna naloga celic v stresnih pogojih povečana produkcija energije in njena večinska poraba za vzdrževalne namene.

V primeru trenutnih sprememb slanosti je *Vibrio* sp. sposoben hitrega odgovora na nivoju redukcijskih sposobnosti membrane, medtem ko je za hitrost respiracije in dehidrogenazno aktivnost potreben daljši čas prilagajanja. To kaže, da lahko celica z obstoječo sestavo dopušča hitre spremembe dejavnikov okolja, vendar nanje ni prilagojena. Na daljši rok mora celica nujno spremeniti svojo sestavo (npr. membrane), kar zahteva vložek energije.

5.2 RAZVOJ METODE ZA DIREKTNO MERJENJE TRANSPORTA ELEKTRONOV V DIHALNI VERIGI BAKTERIJSKIH CELIC PO INDUCIRANEM STRESU

Merjenje transporta elektronov v dihalni verigi *in vivo* je zahteven eksperiment. Za direktno merjenje transporta elektronov v dihalni verigi bi lahko uporabili stabilne radikale ali spinske označevalce. Vemo namreč, da ko spinski označevalec sprejme elektron in se reducira, EPR signal ugasne.

Glavno vprašanje, ki se pri tem pojavi, je: kje pride do redukcije spinskega označevalca? Iz rezultatov je razvidno, da do redukcije spinskega označevalca ne pride v pufru oziroma v

gojišču (preglednica 2). Do redukcije ne pride niti v avtoklavirani celični suspenziji, ampak samo pri intaktnih celicah (preglednica 2). Skladno s tem smo pokazali, da je redukcija celic, obdelanih z ultrazvokom, počasnejša kot pri intaktnih celicah. Na to vpliva zmanjšanje števila celic, saj ultrazvok uniči le del populacije. Podobno so pokazali tudi pri *E. coli*, kjer je bila redukcija celic obdelanih z ultrazvokom počasnejša, saj se je v 2 urah reduciralo le 21 % spinskega označevalca TEMPON (Rapoport in sod., 1999). Poleg tega smo pokazali, da redukcija spinskega označevalca ne poteka na zunanji membrani, saj smo pri sferoplastih izmerili hitrejšo redukcijo spinskega označevalca kot pri intaktnih celicah. Ko smo odstranili zunanjo membrano, je bila njegova redukcija pospešena. Pomembno je tudi, da je bila kinetika redukcije pri sferoplastih hitrejša pri lipofilnem spinskem označevalcu MeFASL v primerjavi s hidrofilnim označevalcem TEMPON-om, medtem ko pri intaktnih celicah MeFASL skoraj ni bil reducirán. MeFASL je namreč večja molekula od TEMPON-a in je bil njen dostop do redukcijskih centrov v membrani otežen. Vsi ti rezultati kažejo, da poteka redukcija predvsem v citoplazemski membrani in so skladni s tem, da je večina prostih elektronov lociranih v nepolarnem okolju membrane bakterijske celice. To je predvsem posledica dejstva, da so nabite molekule, ki reagirajo z elektronom in posledično blokirajo elektronski transport, večinoma izključene iz membrane. Ker je nitroksidni spinski označevalec TEMPON majhna vodotopna molekula, je razumljivo, da lahko sprejme elektron v membrani in je v njej tudi reducirán (Almeida in sod., 1998; von Ballmoos in sod., 2002). Torej je izguba intenzitete EPR signala pri celicah posledično odvisna predvsem od membranskih komponent (Baldassare in sod., 1974). Temu v prid govori tudi dejstvo, da so s pomočjo spinskih označevalcev lahko študirali aktivni transport v membranskih veziklih *Escherichia coli* (Baldassare in sod., 1974). Iz vseh teh spoznanj lahko zaključimo, da je redukcija TEMPON-a lahko mera za merjenje direktnega transporta elektronov v dihalni verigi.

Na transport elektronov v membrani lahko vpliva več različnih okoljskih dejavnikov (npr. slanost, temperatura). V nalogi smo pokazali, da se s spremembo slanosti v gojišču pokažejo razlike v redukcijskih sposobnostih membrane celic *Vibrio* sp. (sliki 19, 20). V nadaljevanju nas je zanimalo, kako se redukcijske sposobnosti membrane odzovejo na spremembo temperature okolja, v katerem se nahajata bakteriji *Vibrio* sp. in *E. coli*. Ugotovili smo, da je redukcijska sposobnost celic odvisna od temperature (slika 21). Torej

imata *E. coli* in *Vibrio* sp. različne sposobnosti prilagajanja membrane kot posledice spreminjanja temperature. Poleg tega smo pokazali, da sta *Vibrio* sp., ki je rasel pri 28 °C, in *E. coli*, ki je rasla pri 37 °C, sposobna prilagoditi svoje redukcijske sposobnosti membrane tudi pri temperaturah, pri katerih ne rasteta več (nad 45 °C in pod 10 °C) (priloga B). Iz tega sledi, da sta transport elektronov in redukcijska sposobnost membrane potrebna, vendar ne zadostna pogoja za rast celic. Očitno so pri rasti celic pri povišani ali znižani temperaturi prisotni drugi procesi, ki lahko preprečijo njihovo rast ali povzročijo njihov propad ob sicer še aktivnem transportu elektronov v dihalni verigi.

5.3 SKLEPI

- o Sprememba slanosti okolja poleg hitrosti rasti *Vibrio* sp. določa tudi sestavo, aktivnost in urejenost membrane ter metabolno aktivnost. Osmotski stres vpliva na (i) povečanje hitrosti mikrobne respiracije, dehidrogenazne aktivnosti, glikolitične aktivnosti in nivoja ATP v bakterijski celici (ii) spremembo sestave polarnih glav ter acilnih verig v membrani (iii) zmanjšanje transporta elektronov v dihalni verigi oziroma redukcijske sposobnosti bakterijskih celic in zmanjšanje sposobnosti tvorbe nelamelarnih struktur iz lipidnih ekstraktov membrane.
- o V pogojih osmotskega stresa porabi celica več energije za vzdrževalne procese kot za rast.
- o *Vibrio* sp. je sposoben hitrega prilagajanja na osmotski stres na nivoju redukcijskih sposobnosti membrane, medtem ko potrebuje za respiracijsko in dehidrogenazno aktivnost daljši čas prilagajanja.
- o Z metodo EPR spektroskopije lahko direktno merimo transport elektronov v dihalni verigi oziroma spremljamo redukcijske sposobnosti membrane bakterijskih celic v odvisnosti od dejavnikov okolja (npr. slanost, temperatura).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Bakterije se morajo v okolju nenehno prilagajati spremembam fizikalno-kemijskih dejavnikov okolja kot so temperatura, hranila, pH in slanost. Zaradi tega smo v doktorski nalogi spremljali vpliv slanosti na pomembnejše energijske poti v bakterijski celici kot so glikoliza, cikel citronske kisline in dihalna veriga, in tako vrednotili njihov vpliv na celično energetiko bakterije *Vibrio* sp. DSM14379. Namen naloge je bil pokazati vpliv osmotskega stresa na (i) bakterijsko rast; (ii) sestavo, aktivnost in urejenost bakterijske membrane in (iii) metabolno aktivnost pri *Vibrio* sp. Poleg tega smo želeli tudi razviti novo metodo za direktno merjenje transporta elektronov v dihalni verigi bakterijskih celic pri različnih dejavnikih okolja (npr. slanost, temperatura). Bakterijo *Vibrio* sp. smo gojili v gojišču PKE z različnimi koncentracijami soli. Ugotovili smo, da je to halotoleranten mikroorganizem, ki raste optimalno pri 1.76 % (w/V) NaCl, ne raste brez NaCl in tolerira do 17 % (w/V) NaCl v gojišču PKE. Slanost ne vpliva samo na rast, ampak tudi na lipidno sestavo membrane pri *Vibrio* sp. ter posledično na njeno aktivnost in strukturiranost. *Vibrio* sp. sintetizira štiri različne polarne glave kot so PE, PG, DPG in lizo-PE katerih delež se spreminja s slanostjo. Delež anionskih lipidov (PG + DPG) in delež lizo-PE sta največja pri 3 % (w/V) NaCl, medtem ko je delež PE pri teh pogojih najmanjši. Prav tako je sestava acilnih verig odvisna od slanosti. Skupni delež nenasičenih acilnih verig (18:1 in 16:1) pada, delež nasičenih acilnih verig (18:0 in 16:0) pa narašča z naraščajočo slanostjo. Vpliv sestave acilnih verig in polarnih glav na urejenost bakterijske membrane smo pokazali z ³¹P-NMR spektroskopijo. Lipidni ekstrakti tvorijo mešanico lamelarnih struktur in normalnih, kubičnih strukturam podobnih faz kar je posledica visokega deleža PE in lizo-PE pri vseh slanostih. Vse te spremembe lahko vodijo tudi k spremembam aktivnosti membrane, zato smo z EPR spektroskopijo spremljali redukcijo spinskega označevalca TEMPON-a in s tem opazovali dogajanje v bakterijski dihalni verigi. Ugotovili smo, da je stopnja redukcije TEMPON-a največja pri 3 % (w/V) NaCl. Da se s slanostjo spreminja metabolizem *Vibrio* sp., smo pokazali na več različnih nivojih. S spremljanjem aktivnosti glikolitičnih encimov (G6PD, PFK in PK) smo pokazali, da skupni pretok snovi skozi glikolitične poti narašča s slanostjo. Poleg tega smo ugotovili, da se hitrost respiracije, nivo

ATP v celici in dehidrogenazna aktivnost povečajo pri ekstremnih slanostih. V primeru trenutne spremembe slanosti je *Vibrio* sp. sposoben hitrega odgovora na nivoju redukcijskih sposobnosti membrane, medtem ko je za hitrost respiracije in dehidrogenazno aktivnost potreben daljši čas prilagajanja. Spremembe na fiziološkem in biokemijskem nivoju kot odgovor na osmotski stres kažejo sposobnost *Vibrio* sp., da prilagodi svoj metabolizem tem pogojem. V ekstremnih razmerah, ko je hitrost rasti upočasnjena in je metabolizem pospešen, se večina energije porabi za vzdrževalne procese in ne za rast. Iz tega izhaja, da je glavna naloga celic v stresnih pogojih povečana produkcija energije in njena večinska poraba za vzdrževalne namene. Z EPR spektroskopijo lahko preko redukcije spinskega označevalca TEMPON-a direktno merimo transport elektronov v dihalni verigi v odvisnosti od dejavnikov okolja, kot so slanost in temperatura. Pokazali smo, da do redukcije spinskega označevalca ne pride v pufru, v gojišču ali pri avtoklavirani celični suspenziji. Redukcija TEMPON-a se zmanjša pri obdelavi celic z ultrazvokom zaradi zmanjšanja števila intaktnih celic in poveča pri sferoplastih, kjer je zaradi odstranitve celične stene olajšan dostop TEMPON-a do redukcijskih centrov. Prav tako se pri sferoplastih poveča stopnja redukcije lipofilnega označevalca MeFASL-a v primerjavi s hidrofilnim označevalcem TEMPON-om. Ti rezultati nakazujejo, da TEMPON po vsej verjetnosti sprejme elektrone iz bakterijske dihalne verige na membrani. Poleg tega smo v nalogi tudi pokazali, da se redukcijske sposobnosti membrane odzovejo na spremembo temperature. Tako *Vibrio* sp. kot *E. coli* imata sposobnosti prilagajanja transporta elektronov v membrani v odvisnosti od temperature. Njun temperaturni razpon redukcijskih sposobnosti je večji kot je temperaturni razpon rasti posameznega organizma.

6.2 SUMMARY

Bacteria can adapt their metabolism to changes in physico-chemical properties of the environment such as temperature, nutrients, pH and salinity. In the doctoral dissertation, we studied the effect of salinity on glycolysis, tricarboxylic acid cycle and respiratory chain of *Vibrio* sp. DSM14379. The aim of this study was to show the influence of osmotic stress on: (i) bacterial growth, (ii) on lipid composition, activity and phase behavior of bacterial membranes and; (iii) on metabolic activity of *Vibrio* sp. At the same time, we have aimed to develop a new method for a direct measurement of electron transport in the

membrane as a response to changes in environmental conditions (i.e. salinity, temperature). *Vibrio* sp. is a halotolerant microorganism that can not grow without NaCl and grows at up to 17 % (w/V) NaCl. It has an optimal growth rate at 1.76 % (w/V) NaCl in PYE medium. The salinity can influence lipid composition of *Vibrio* sp. and, consequently, phase behavior and activity of the membrane. *Vibrio* sp. synthesizes four different polar head groups (PE, PG, DPG and lyso-PE). The amounts of anionic lipids (PG + DPG) and lyso-PE were highest at 3 % (w/V) NaCl, while the amount of PE was lowest at those conditions. Total amount of unsaturated acyl chains (18:1 and 16:1) decreased, while the amount of saturated acyl chains (18:0 and 16:0) increased with increasing salinity. Changes in lipid composition can influence lipid phase behavior of the membrane. Lipid extracts from *Vibrio* sp. formed mixtures of lamellar and normal cubic-like phases as a result of high amount of lyso-PE and PE at all salt concentrations. Changes in the membrane composition can also lead to changes in the membrane activity. We studied the reduction of the spin label TEMPON with EPR spectroscopy to show the activity of bacterial respiratory chain under different salt concentrations. The highest reduction rate of TEMPON was obtained at 3 % (w/V) NaCl. We have also determined how salinity affects bacterial metabolism at different physiological levels. The overall flux through glycolytic enzymes (G6PD, PFK and PK) increased with increasing salinity, while the respiration rate, ATP level and dehydrogenase activity were higher at both salt extremes. Hence it follows that metabolic activity is uncoupled from growth and *Vibrio* sp. spends more energy for maintenance than for growth at extreme salinities. When cells were washed and resuspended in a buffer solution with increased or decreased salt concentration, they adjusted their reduction kinetics of TEMPON to the new environmental conditions within less than 5 min. On the other hand, cell respiration rate and dehydrogenase activity were adjusted more slowly. The reduction rate of TEMPON measured by EPR spectroscopy is a useful method for a direct measurement of the electron transport activity in bacterial cells as a result of changes in environmental conditions such as salinity and temperature. There was no reduction of TEMPON in a buffer solution, growth medium and in an autoclaved cell suspension. Furthermore, the reduction rate was slower when cells were sonicated. The highest reduction rate of TEMPON was obtained in spheroplasts. Also, the reduction rate of lipophilic spin label MeFASL was faster than the reduction of hydrophilic spin label TEMPON in spheroplasts. Therefore, the results suggest that TEMPON probably accepts

electrons from the bacterial respiratory chain in the membrane. Our study also showed that both salinity and temperature influence membrane reduction potential. The reduction potential is different for *Vibrio* sp. and *E. coli* as a result of temperature changes. Temperature range for TEMPON reduction is wider than bacterial growth range at different temperatures.

7 VIRI

Adams R.L., Russell N.J. 1992. Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and lipid composition in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. Canadian Journal of Microbiology, 38: 823-827.

Ahlin P., Kristl J., Pečar S., Štrancar J., Šentjurs M. 2003. The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. Journal of Pharmaceutical Sciences, 92, 1: 58-66.

Alef K., Nannipieri P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. London, Academic Press: 576 str.

Almeida L.E., Borissevitch I.E., Yushmanov V.E., Tabak M. 1998. Different micellar packing and hydrophobicity of the membrane probes TEMPO and TEMPOL influence their partition between aqueous and micellar phases rather than location in the micelle interior. Journal of Colloid and Interface Science, 203: 456-463.

Andersen H.W., Solem C., Hammer K., Jensen P.R. 2001. Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and glycolytic flux. Journal of Bacteriology, 183, 11: 3458-3467.

Arvidson G., Brentel I., Khan A., Lindblom G., Fontell K. 1985. Phase equilibria in four lysophosphatidylcholine/water system. Exceptional behaviour of 1-palmitoyl-glycerophosphocholine. European Journal of Biochemistry, 152: 753-759.

Atkins P.W. 1998. Physical chemistry. 6th ed. Oxford, Oxford University Press: 1014 str.

Baldassare J.J., Robertson D.E., McAfee A.G., Ho C. 1974. A spin-label study of energy-coupled active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. Biochemistry, 13, 25: 5210-5214.

Baumann P., Schubert R.H.W. 1984. Vibrionaceae. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1. Krieg N.R., Holt J.G. (eds.). Baltimore, London, Williams & Wilkins: 964 str.

Bergmeyer H.U. 1974. Methods of enzymatic analysis. Vol. 1. 2nd ed. New York, Academic Press, Inc.: 565 str.

Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 8: 911-917.

Chan M., Virmani Y.P., Himes R.H., Akagi J.M. 1973. Spin-labeling studies on the membrane of a facultative thermophilic *Bacillus*. Journal of Bacteriology, 113, 1: 322-328.

Chapman D.A., Killian G.J., Gelerinter E., Jarrett M.T. 1985. Reduction of the spin-label TEMPONE by ubiquinol in the electron transport chain of intact rabbit spermatozoa. Biology of Reproduction, 32: 884-893.

Cheer S., Gentile J.H., Hegre C.S. 1974. Improved methods for ATP analysis. Analytical Biochemistry, 60: 102-114.

Chen K., Morse P.D. II, Swartz H.M. 1988. Kinetics of enzyme-mediated reduction of lipid soluble nitroxide spin labels by living cells. Biochimica et Biophysica Acta, 943: 477-484.

Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. 1956. Microdetermination of phosphorus. Analytical Chemistry, 28: 1756-1758.

Cocaign-Bousquet M., Guyonvarch A., Lindley N.D. 1996. Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2: 429-436.

Cook K.L., Garland J.L. 1997. The relationship between electron transport activity as measured by CTC reduction and CO₂ production in mixed microbial communities. *Microbial Ecology*, 34: 237-247.

Créach V., Baudoux A.C., Bertru G., Le Rouzic B. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 19-28.

Cronan J.E. 2003. Bacterial membrane lipids: Where do we stand? *Annual Review of Microbiology*, 57: 203-224.

Csonka L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53, 1: 121-147.

Cullis P.R., de Kruijff B. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559: 399-420.

Cvitkovitch D.G., Gutierrez J.A., Bleiweis A.S. 1997. Role of the citrate pathway in glutamate biosynthesis by *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 179, 3: 650-655.

de Kruijff B. 1997. Lipid polymorphism and biomembrane function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1: 564-569.

Dowhan W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annual Review of Biochemistry*, 66: 199-232.

Even S., Lindley N.D., Coccagn-Bousquet M. 2003. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology*, 149:1935-1944.

Fox M.A., White J.P., Hosie A.H.F., Lodwig E.M., Poole P.S. 2006. Osmotic upshift transiently inhibits uptake via ABC transporters in Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 188, 14: 5304-5307.

Fujiwara-Nagata E., Kogure K., Kita-Tsukamoto K., Wada M., Eguchi M. 2003. Characteristics of Na⁺-dependent respiratory chain in *Vibrio anguillarum*, a fish pathogen, in comparison with other marine *Vibrios*. FEMS Microbiology Ecology, 44: 225-230.

Fuller N., Rand R.P. 2001. The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. Biophysical Journal, 81: 243-254.

Gebhard S., Ronimus R.S., Morgan H.W. 2001. Inhibition of phosphofructokinases by copper(II). FEMS Microbiology Letters, 197: 105-109.

Gnezda Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2006. Host physiological status determines phage-like particle distribution in the lysate. FEMS Microbiology Ecology, 55, 1: 136-145.

Goldfine H., Johnston N.C., Mattai J., Shipley G.G. 1987. Regulation of bilayer stability in *Clostridium butyricum*: studies on the polymorphic phase behavior of ether lipids. Biochemistry, 26: 2814-2822.

Gruner S.M. 1989. Stability of lyotropic phases with curved interfaces. Journal of Physical Chemistry, 93: 7562-7570.

Haddock B.A., Jones C.W. 1977. Bacterial respiration. Bacteriological Reviews, 41, 1: 47-99.

Hakeda Y., Fukunaga N. 1983. Effect of temperature stress on adenylate pools and energy charge in a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. ABE-1. Plant and Cell Physiology, 24, 5: 849-856.

Hamel R.D., Appanna V.D. 2001. Modulation of TCA cycle enzymes and aluminum stress in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Inorganic Biochemistry, 87: 1-8.

Hamilton R.D., Holm-Hansen O. 1967. Adenosine triphosphate content of marine bacteria. *Limnology and Oceanography*, 12: 319-324.

Hanna K., Bengis-Garber C., Kushner D.J., Kogut M., Kates M. 1984. The effect of salt concentration on phospholipid and fatty acid composition of the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 669-675.

Hansen T., Schlichting B., Schönheit P. 2002. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the *g6pd* gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 216: 249-253.

Hatzinger P.B., Palmer P., Smith R.L., Peñarrieta C.T., Yoshinari T. 2003. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 47-58.

Heipieper H.J., Meinhardt F., Segura A. 2003. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 1-7.

Hsu J.C. 1996. Multiple comparisons: theory and methods. 1st ed. New York, Chapman & Hall: 296 str.

Huijbregts R.P.H., de Kroon A.I.P.M., de Kruijff B. 2000. Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469: 43-61.

Ingram M. 1940. The influence of sodium chloride and temperature on the endogenous respiration of *Bacillus cereus*. *Journal of General Physiology*, 23: 773-780.

Jung K., Ristori S., Gallori E., Martini G. 1998. Stability of water-soluble and lipid-soluble paramagnetic probes in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425: 387-397.

Jurica M.S., Mesecar A., Heath P.J., Shi W., Nowak T., Stoddard B.L. 1998. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-biphosphate. *Structure*, 6: 195-210.

Kates M. 1986. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier: 464 str.

Kaufman A.E., Goldfine H., Narayan O., Gruner S.M. 1990. Physical studies on the membranes and lipids of plasmalogen-deficient *Megasphaera elsdenii*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 55: 41-48.

Kempf B., Bremer E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170: 319-330.

Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R. 2002. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *Journal of Bacteriology*, 184, 14: 3909-3916.

Kogut M., Russell N.J. 1984. The growth and phospholipid composition of a moderately halophilic bacterium during adaptation to changes in salinity. *Current Microbiology*, 10: 95-98.

Koynova R., Caffrey M. 1994. Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines. *Chemistry and Physics of Lipids*, 69: 1-34.

Kunte H.J. 2006. Osmoregulation in bacteria: compatible solute accumulation and osmosensing. *Environmental Chemistry*, 3: 94-99.

Lanyi J.K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 38, 3: 272-290.

Larsen M.H., Blackburn N., Larsen J.L., Olsen J.E. 2004. Influence of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. Microbiology, 150: 1283-1290.

Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 1993. Principles in biochemistry with an extended discussion of oxygen-binding proteins. 2nd ed. New York, Worth Publishers, Inc.: 1013 str.

Lessie T., Neidhardt F.C. 1967. Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase. Journal of Bacteriology, 93, 4: 1337-1345.

Lindblom G. 1996. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and lipid phase behaviour and lipid diffusion. V: Advances in lipid methodology. Vol.3. Christie W.W. (ed.). Dundee Scotland, Oily Press: 133-209.

Lindblom G., Rilfors L. 1989. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance. Biochimica et Biophysica Acta, 988: 221-256.

Lindblom G., Rilfors L. 1992. Nonlamellar phases formed by membrane lipids. Advances in Colloid and Interface Science, 41: 101-125.

Lucy J.A. 1970. The fusion of biological membranes. Nature, 227: 814-817.

Lundin A., Thore A. 1975. Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. Applied Microbiology, 30, 5: 713-721.

Macomber R.S. 1998. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 378 str.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey, Prentice Hall International, Inc.: 986 str.

Maness P.C., Smolinski S., Blake D.M., Huang Z., Wolfrum E.J., Jacoby W.A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 9: 4094-4098.

McEwan A.G., Jackson J.B., Ferguson S.J. 1984. Rationalization of properties of nitrate reductases in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Archives of Microbiology*, 137, 4: 344-349.

Mignone C.F., Donati E.R. 2004. ATP requirements for growth and maintenance of iron-oxidizing bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 18: 211-216.

Miller K.J. 1985. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the phospholipid and fatty acid compositions of a halotolerant *Planococcus* sp. *Journal of Bacteriology*, 162, 1: 263-270.

Morein S., Andersson A.S., Rilfors L., Lindblom G. 1996. Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12: 6801-6809.

Moritz B., Striegel K., de Graaf A.A., Sahm H. 2000. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*. *European Journal of Biochemistry*, 267: 3442-3452.

Muñoz M.E., Ponce E. 2003. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 135: 197-218.

Nichols D.S., Olley J., Garda H., Brenner R.R., McMeekin T.A. 2000. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6: 2422-2429.

Odić D., Turk V., Stopar D. 2006. Environmental stress determines quality of bacterial lysate and its utilization efficiency in a simple microbial loop. *Microbial Ecology*, sprejeto v tisk.

Oh S., Kogure K., Ohwada K., Simidu U. 1991. Correlation between possession of a respiration-dependent Na⁺ pump and Na⁺ requirement for growth of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 6: 1844-1846.

Ohno Y., Yano I., Masui M. 1979. Effect of NaCl concentration and temperature on the phospholipid and fatty acid compositions of a moderately halophilic bacterium, *Pseudomonas halosaccharolytica*. *Journal of Biochemistry*, 85: 413-421.

Ohwada T., Sagisaka S., Sato T. 1994. An exclusive increase in the concentration of ATP as a result of osmotic stress in *Escherichia coli* B. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 8: 1512-1513.

Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 2: 334-348.

Oren A. 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 466: 61-72.

Padilla L., Krämer R., Stephanopoulos G., Agosin E. 2004. Overproduction of trehalose: heterologous expression of *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1: 370-376.

Pilot J.D., East J.M., Lee A.G. 2001. Effects of bilayer thickness on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 40: 8188-8195.

Poole A.R., Howell J.I., Lucy J.A. 1970. Lysolecithin and cell fusion. *Nature*, 227: 810-813.

Ramos A., Neves A.R., Ventura R., Maycock C., López P., Santos H. 2004. Effect of pyruvate kinase overproduction on glucose metabolism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 150: 1103-1111.

Rapoport N., Smirnov A.I., Pitt W.G., Timoshin A.A. 1999. Bioreduction of Tempone and spin-labeled gentamicin by Gram-negative bacteria: kinetics and effect of ultrasound. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362, 2: 233-241.

Ratledge C., Wilkinson S.G. 1988. *Microbial lipids*. Vol. 1. London, Academic Press: 963 str.

Record M.T., Courtenay E.S., Cayley D.S., Guttman H.J. 1998. Responses of *E.coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 143-148.

Rengpipat S., Lowe S.E., Zeikus J.G. 1988. Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetothylicus*. *Journal of Bacteriology*, 170, 7: 3065-3071.

Richardson D.J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 146: 551-571.

Rietveld A.G., Killian J.A., Dowhan W., de Kruijff B. 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 17: 12427-12433.

Rilfors L., Hauksson J.B., Lindblom G. 1994. Regulation and phase equilibria of membrane lipids from *Bacillus megaterium* and *Acholeplasma laidlawii* strain A containing methyl-branched acyl chains. *Biochemistry*, 33: 6110-6120.

Rilfors L., Lindblom G. 2002. Regulation of lipid composition in biological membranes - biophysical studies of lipids and lipid synthesizing enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26: 112-124.

Rilfors L., Niemi A., Haraldsson S., Edwards K., Andersson A.S., Dowhan W. 1999. Reconstituted phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli* is activated by anionic phospholipids and micelle-forming amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1438: 281-294.

Rönsch H., Krämer R., Morbach S. 2003. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *Journal of Biotechnology*, 104: 87-97.

Roy S.O., Packard T.T. 2001. CO₂ production rate predicted from isocitrate dehydrogenase activity, intracellular substrate concentrations and kinetic constants in the marine bacterium *Pseudomonas nautica*. *Marine Biology*, 138: 1251-1258.

Ruijter G.J.G., Panneman H., Visser J. 1997. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1334: 317-326.

Sankaram M.B., Powell G.L., Marsh D. 1989. Effect of acyl chain composition on salt-induced lamellar to inverted hexagonal phase transitions in cardiolipin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 980, 3: 389-392.

Schreier S., Polnaszek C.F., Smith I.C.P. 1978. Spin labels in membranes. Problems in practice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 515: 375-436.

Seddon J.M., Cevc G., Marsh D. 1983a. Calorimetric studies of the gel-fluid (L_β-L_α) and lamellar-inverted hexagonal (L_α-H_{II}) phase transitions in dialkyl- and diacylphosphatidylethanolamines. *Biochemistry*, 22: 1280-1289.

Seddon J.M., Kaye R.D., Marsh D. 1983b. Introduction of the lamellar-inverted hexagonal phase transition in cardiolipin by protons and monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 734, 2: 347-352.

Skjerdal O.T., Sletta H., Flenstad S.G., Josefsen K.D., Levine D.W., Ellingsen T.E. 1996. Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 635-642.

Slater J.L., Huang C.H., Adams R.G., Lewin I.W. 1989. Polymorphic phase behavior of lysophosphatidylethanolamine dispersions. A thermodynamic and spectroscopic characterization. *Biophysical Journal*, 56: 243-252.

Sleator R.D., Hill C. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 49-71.

Smith J.J., McFeters G.A. 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 161-175.

Smith S.N., Pugh G.J.F. 1979. Evaluation of dehydrogenase as a suitable indicator of soil microflora activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 1: 279-281.

Stanley P.E. 1986. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods in Enzymology*, 133: 14-22.

Stopar D., Černe A., Žigman M., Poljšak-Prijatelj M., Turk V. 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 47: 1-8.

Stopar D., Trček T., Štrancar J. 2002. Electron paramagnetic resonance characterization of the exopolysaccharide layer produced by bacteria. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7, 1: 167-169.

Sugimoto S., Shiio I. 1987. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 1: 101-108.

Sutton G.C., Russell N.J., Quinn P.J. 1990. The effect of salinity on the phase behaviour of purified phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Chemistry and Physics of Lipids*, 56: 135-147.

Sutton G.C., Russell N.J., Quinn P.J. 1991. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1061: 235-246.

Tabatabai M.A. 1993. Soil enzymes. V: Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties. Weaver R.W. (ed.). Wisconsin, Madison, Soil Science Society of America: 775-863.

Trevors J.T. 1984. Electron transport system activity in soil, sediment and pure cultures. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 11, 2: 83-100.

Tuovila B.J., Dobbs F.C., LaRock P.A., Siegel B.Z. 1987. Preservation of ATP in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 12: 2749-2753.

van Echteld C.J.A., de Kruijff B., Mandersloot J.G., de Gier J. 1981. Effects of lysophosphatidylcholines on phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol liposome systems as revealed by ^{31}P -NMR, electron microscopy and permeability studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 649, 2: 211-220.

Varela C., Agosin E., Baez M., Klapa M., Stephanopoulos G. 2003. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 547-555.

Varela C.A., Baez M.E., Agosin E. 2004. Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7: 4222-4229.

Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 2: 504-544.

von Ballmoos C., Meier T., Dimroth P. 2002. Membrane embedded location of Na⁺ or H⁺ binding sites on the rotor ring of F₁F₀ ATP synthases. *European Journal of Biochemistry*, 269, 22: 5581-5589.

Wells M.A., Dittmer J.C. 1963. The use of sephadex for the removal of nonlipid contaminants from lipid extracts. *Biochemistry*, 2, 6: 1259-1263.

Welsh D.T., Lindsay Y.E., Caumette P., Herbert R.A., Hannan J. 1996. Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately halophilic sulfate reducing bacterium, *Desulfovibrio halophilus*. *FEMS Microbiology Letters*, 140: 203-207.

White D. 2000. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2nd ed. New York, Oxford University Press: 565 str.

Wolf A., Krämer R., Morbach S. 2003. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Molecular Microbiology*, 49, 4: 1119-1134.

Wood J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 1:230-262.

Wouters J.A., Kamphuis H.H., Hugenholtz J., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abee T. 2000. Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 9: 3686-3691.

ZAHVALA

- o Mentorju prof. dr. Davidu Stoparju, ki mi je dal drugačen pogled v svet mikrobov, verjel vame, mi zaupal in spodbujal moj raziskovalni duh.
- o Prof. dr. Ivanu Mahnetu, ki mi je omogočil nadaljevati raziskovalno delo.
- o Prof. dr. Ines Mandič Mulec, ki me je vpeljala v pedagoški proces in mi s svojimi izkušnjami in nasveti ta korak nekoliko olajšala.
- o Doc. dr. Janezu Štrancarju, ki mi je dal možnost spremljanja bakterij z EPR spektroskopijo in mi z nasveti pomagal pri eksperimentiranju in pisanju naloge.
- o Prof. dr. Göranu Lindblomu in dr. Leifu Rilforsu, ki sta me sprejela v laboratorij mrzlega Severa in mi razkrila čarobni svet lipidov in NMR.
- o Prof. dr. Petru Rasporju za hiter pregled doktorske disertacije in koristne napotke za njen lepši izgled.
- o Iztoku, da je z mano opazoval kako bakterije jedo označevalce in znal popestriti dolge ure merjenja na EPR spektrometru. Brez njega bi bil to zame še vedno čudežni stroj.
- o Kaji za pomoč pri meritvah ATP in nasvete o glikolizi pri *Vibrio* sp.
- o Blažu, ki mi je znal prisluhniti in mi s svojimi izkušnjami na področju analitike znal osvetliti marsikateri problem.
- o Simoni, ki mi je v času mojega druženja z aparaturami razkrila mnogo laboratorijskih skrivnosti in mi s tem pomagala hitreje doumeti njihovo delovanje.
- o Duškotu, ki mi je razkril veliko skrivnosti o nepredvidljivosti vibrija.
- o Barbari in Polonci, ki sta me znali v »težkih« trenutkih eksperimentiranja razvedriti in vliti upanje, da sem na pravi poti.
- o Ostalim sodelavcem Vesni, Janezu in Poloni, ki so mi vsak po svoje poskušali popestriti dneve preživete v laboratoriju.
- o Staršem in starim staršem, ki so mi pomagali graditi to pot in me na njej nenehno podpirali.
- o Sestri Tadeji, ki me je poslušala in razumela po napornih urah, uspešno ali neuspešno, preživetih v laboratoriju.

PRILOGE

Priloga A: **Vpliv slanosti na hitrost rasti pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKE.**
Povprečne vrednosti in standardni odkloni hitrosti rasti so izračunani iz treh do petih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Hitrost rasti μ (h^{-1})	p-vrednost
0.15	0.46 ± 0.08	$2 \cdot 10^{-9}$
0.3	0.57 ± 0.05	$2 \cdot 10^{-6}$
0.5	0.65 ± 0.08	$4 \cdot 10^{-7}$
1.76	1.07 ± 0.07	1
3	1.04 ± 0.05	1
5	0.86 ± 0.04	0.43
7	0.67 ± 0.02	$1 \cdot 10^{-5}$
8	0.62 ± 0.15	$1 \cdot 10^{-6}$
9	0.58 ± 0.01	$2 \cdot 10^{-7}$
10	0.53 ± 0.03	$1 \cdot 10^{-9}$
12	0.43 ± 0.15	$1 \cdot 10^{-8}$
14	0.43 ± 0.11	$1 \cdot 10^{-8}$
15	0.36 ± 0.01	$1 \cdot 10^{-9}$
16	0.26 ± 0.12	$6 \cdot 10^{-11}$
17	0.097 ± 0.032	$4 \cdot 10^{-16}$

Priloga B: **Vpliv temperature na hitrost bakterijske rasti.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni hitrosti rasti so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterij *Vibrio* sp. in *E. coli*.

Priloga B1: Hitrost rasti pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl v odvisnosti od temperature.

Temperatura (°C)	Hitrost rasti μ (h ⁻¹)	p-vrednost
15	0.18 ± 0.01	4·10 ⁻⁷
20	0.5 ± 0.02	3·10 ⁻⁶
25	0.74 ± 0.01	2·10 ⁻⁵
30	1.28 ± 0.04	0.07
40	1.53 ± 0.08	1
42	1.06 ± 0.13	0.001
43	0.36 ± 0.02	1·10 ⁻⁶
44	0.085 ± 0.006	2·10 ⁻⁷

Priloga B2: Hitrost rasti pri *Escherichia coli* ESH10 K-12 v gojišču M9 v odvisnosti od temperature.

Temperatura (°C)	Hitrost rasti μ (h ⁻¹)	p-vrednost
15	0.13 ± 0.01	1·10 ⁻⁸
20	0.24 ± 0.03	3·10 ⁻⁸
25	0.53 ± 0.02	8·10 ⁻⁷
30	0.85 ± 0.02	8·10 ⁻⁴
40	1.07 ± 0.02	1
42	0.73 ± 0.01	3·10 ⁻⁵
43	0.59 ± 0.05	2·10 ⁻⁶
44	0.76 ± 0.03	5·10 ⁻⁵

Priloga C: Vpliv slanosti na sestavo polarnih glav v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.
Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz dveh neodvisnih gojenj *Vibrio* sp. (tri ponovitve analiz fosforja na vsakem lipidnem ekstraktu).

Priloga C1: Vpliv slanosti na delež lizofosfatidiletanolamina (lizo-PE) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Molski delež lizo-PE (% mol)	p-vrednost
0.5	4.6 ± 1.95	2·10 ⁻⁷
3	19.1 ± 1.1	1
10	6.5 ± 2	6·10 ⁻⁶

Priloga C2: Vpliv slanosti na delež fosfatidiletanolamina (PE) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Molski delež PE (% mol)	p-vrednost
0.5	73.4 ± 1.5	6·10 ⁻¹⁸
3	45.4 ± 8.5	1
10	62 ± 3.9	3·10 ⁻⁹

Priloga C3: Vpliv slanosti na delež fosfatidilglicerola (PG) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Molski delež PG (% mol)	p-vrednost
0.5	20.9 ± 1.5	0.16
3	27.5 ± 4.5	1
10	28.5 ± 2.2	1

Priloga C4: Vpliv slanosti na delež difosfatidilglicerola (DPG) v membrani *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Molski delež DPG (% mol)	p-vrednost
0.5	1.1 ± 0.5	0.1
3	8 ± 4.7	1
10	3.1 ± 2.6	1

Priloga D: Vpliv slanosti na aktivnost glikolitičnih encimov pri *Vibrio* sp. DSM14379.

Povprečne vrednosti in standardni odkloni specifične encimske aktivnosti so izračunani iz štirih do sedmih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp.

Priloga D1: Vpliv slanosti na aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) pri *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Specifična encimska aktivnost ($\text{M min}^{-1} \text{ celica}^{-1}$)	p-vrednost
0.5	$2.5 \cdot 10^{-15} \pm 4.9 \cdot 10^{-16}$	1
3	$1.5 \cdot 10^{-15} \pm 6 \cdot 10^{-16}$	1
10	$1.5 \cdot 10^{-14} \pm 8 \cdot 10^{-15}$	$3 \cdot 10^{-20}$

Priloga D2: Vpliv slanosti na aktivnost fosfofruktokinaze (PFK) pri *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Specifična encimska aktivnost ($\text{M min}^{-1} \text{ celica}^{-1}$)	p-vrednost
0.5	$1.75 \cdot 10^{-15} \pm 5.65 \cdot 10^{-16}$	0.27
3	$5.3 \cdot 10^{-15} \pm 1.9 \cdot 10^{-15}$	1
10	$5.6 \cdot 10^{-15} \pm 2.2 \cdot 10^{-15}$	1

Priloga D3: Vpliv slanosti na aktivnost piruvat kinaze (PK) pri *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Specifična encimska aktivnost ($\text{M min}^{-1} \text{ celica}^{-1}$)	p-vrednost
0.5	$2.4 \cdot 10^{-15} \pm 2.9 \cdot 10^{-16}$	1
3	$5.6 \cdot 10^{-15} \pm 2.3 \cdot 10^{-15}$	1
10	$6.6 \cdot 10^{-15} \pm 2.4 \cdot 10^{-15}$	1

Priloga D4: Vpliv slanosti na skupno aktivnost preučevanih glikolitičnih encimov pri *Vibrio* sp. DSM14379.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Specifična encimska aktivnost ($\text{M min}^{-1} \text{ celica}^{-1}$)
0.5	$6.6 \cdot 10^{-15} \pm 4.8 \cdot 10^{-16}$
3	$1.2 \cdot 10^{-14} \pm 1.5 \cdot 10^{-15}$
10	$3 \cdot 10^{-14} \pm 4.3 \cdot 10^{-15}$

Priloga E: **Vpliv slanosti na hitrost respiracije.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni hitrosti respiracije so izračunani iz štiri neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (dve ponovitvi za vsako gojenje).

Priloga E1: Relativna hitrost respiracije pri *Vibrio* sp. DSM14379 v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču PKE.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Relativna hitrost respiracije	p-vrednost
0.3	3.2 ± 1.1	$5 \cdot 10^{-15}$
0.5	1.2 ± 0.2	1
1.76	1 ± 0.3	1
3	1 ± 0.3	1
5	1 ± 0.5	1
10	2.3 ± 0.15	$2 \cdot 10^{-5}$

Priloga E2: Relativna hitrost respiracije pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v okolja z različnimi koncentracijami soli.

Spremenjena koncentracija NaCl (% (w/V))	Relativna hitrost respiracije	p-vrednost v primerjavi z vrednostmi pri 3 % (w/V) NaCl	p-vrednost v primerjavi z vrednostmi pri isti koncentraciji NaCl
0.3	0.8 ± 0.2	1	$2 \cdot 10^{-13}$
0.5	1 ± 0.2	1	1
3	1 ± 0.3	1	1
10	0.85 ± 0.19	1	$2 \cdot 10^{-6}$

Priloga F: **Vpliv slanosti na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a.**
 Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz dveh neodvisnih gojenj *Vibrio* sp.

Priloga F1: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379 v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču PKE (štirikrat redčeni vzorci koncentriranih celic).

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON t^{-1} (min^{-1})	p-vrednost
0.5	0.06 ± 0.001	$3 \cdot 10^{-4}$
3	0.4 ± 0.03	1
10	0.03 ± 0.01	$2 \cdot 10^{-4}$

Priloga F2: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v okolja z različnimi koncentracijami soli (desetkrat redčeni vzorci koncentriranih celic).

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON t^{-1} (min^{-1})	p-vrednost
0.5	0.03 ± 0.002	0.014
3	0.15 ± 0.06	1
10	0.02 ± 0.001	0.014

Spremenjena koncentracija NaCl (% (w/V))	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON t^{-1} (min^{-1})	p-vrednost v primerjavi z vrednostmi pri 3 % (w/V) NaCl	p-vrednost v primerjavi z vrednostmi pri isti koncentraciji NaCl
0.5	0.19 ± 0.06	1	$2 \cdot 10^{-4}$
3	0.17 ± 0.04	1	1
10	0.08 ± 0.01	0.02	$1 \cdot 10^{-4}$

Priloga G: **Vpliv temperature na stopnjo redukcije spinskega označevalca TEMPON-a.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijskih kultur.

Priloga G1: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl pri 28 °C, v odvisnosti od temperature inkubacije.

Temperatura inkubacije (°C)	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON t^{-1} (min ⁻¹)	p-vrednost
0	0.1 ± 0.005	$4 \cdot 10^{-4}$
10	0.15 ± 0.04	$1 \cdot 10^{-3}$
20	0.35 ± 0.02	1
30	0.18 ± 0.02	$2 \cdot 10^{-3}$
40	0.008 ± 0	$4 \cdot 10^{-5}$
50	0.001 ± 0	$3 \cdot 10^{-5}$

Priloga G2: Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON-a pri *Escherichia coli* ESH10 K-12, ki je rasla v gojišču M9 pri 37 °C, v odvisnosti od temperature inkubacije.

Temperatura inkubacije (°C)	Stopnja redukcije spinskega označevalca TEMPON t^{-1} (min ⁻¹)	p-vrednost
0	0.009 ± 0.00003	$4 \cdot 10^{-7}$
10	0.015 ± 0.0001	$6 \cdot 10^{-7}$
20	0.04 ± 0.003	$8 \cdot 10^{-6}$
30	0.07 ± 0.002	$9 \cdot 10^{-4}$
40	0.08 ± 0	1
50	0.08 ± 0	0.48
60	0.02 ± 0	$2 \cdot 10^{-9}$

Priloga H: **Vpliv slanosti na dehidrogenazno aktivnost.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni dehidrogenazne aktivnosti so izračunani iz treh do šestih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (tri ponovitve za vsako gojenje).

Priloga H1: Relativna dehidrogenazna aktivnost pri *Vibrio* sp. DSM14379 v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču PKE.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Relativna dehidrogenazna aktivnost	p-vrednost
0.3	6.4 ± 1.6	$2 \cdot 10^{-10}$
0.5	3.5 ± 1.8	$6 \cdot 10^{-4}$
1.76	1.3 ± 0.8	1
3	1 ± 0.5	1
5	1.5 ± 0.5	1
10	6.2 ± 2.6	$1 \cdot 10^{-13}$

Priloga H2: Relativna dehidrogenazna aktivnost pri *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel v gojišču PKE s 3 % (w/V) NaCl in bil prenešen v okolja z različnimi koncentracijami soli.

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Relativna dehidrogenazna aktivnost	p-vrednost v primerjavi z vrednostmi pri 3 % (w/V) NaCl	p-vrednost v primerjavi z vrednostmi pri isti koncentraciji NaCl
0.5	0.45 ± 0.05	1	$6 \cdot 10^{-4}$
3	1 ± 0.5	1	1
10	0.47 ± 0.09	1	$6 \cdot 10^{-11}$

Priloga I: Vpliv slanosti na skupno koncentracijo ATP v celici *Vibrio* sp. DSM14379.

Povprečne vrednosti in standardni odkloni celokupne koncentracije ATP so izračunani iz petih neodvisnih gojenj bakterije *Vibrio* sp. (dve ponovitvi za vsako gojenje).

Koncentracija NaCl (% (w/V))	Skupna koncentracija ATP v celici (M celica⁻¹)	p-vrednost
0.5	$2.8 \cdot 10^{-15} \pm 9.8 \cdot 10^{-16}$	$7 \cdot 10^{-10}$
1.76	$1.4 \cdot 10^{-15} \pm 2.95 \cdot 10^{-16}$	0.27
3	$9.5 \cdot 10^{-16} \pm 1.6 \cdot 10^{-16}$	1
5	$9.3 \cdot 10^{-16} \pm 9.4 \cdot 10^{-17}$	1
10	$1.25 \cdot 10^{-15} \pm 3.2 \cdot 10^{-16}$	1