

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Julija BENKO

**VPLIV DIVJEGA TIPA *Vibrio* sp. NA  
KONKURENČNO SPOSOBNOST  
NEPIGMENTIRANIH SEVOV *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Julija BENKO

**VPLIV DIVJEGA TIPA *Vibrio* sp. NA KONKURENČNO  
SPOSOBNOST NEPIGMENTIRANIH SEVOV *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF WILD TYPE STRAIN OF *Vibrio* sp. ON THE  
FITNESS OF NONPIGMENTED STRAINS OF *Vibrio* sp.**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je dne 23.4.2009 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorico dr. Tjašo Danevčič in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentorica: dr. Tjaša Danevčič

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Predsednik komisije: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David Stopar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Tjaša Danevčič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Julija Benko

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.262 + 579.222 (043) = 163.6
KG	<i>Vibrio</i> sp./sodelovanje/altruizem/konkurenčna sposobnost/pigment
AV	BENKO, Julija
SA	STOPAR, David (mentor) / DANEVČIČ, Tjaša (somentorica) / ŽGUR BERTOK Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	VPLIV DIVJEGA TIPA <i>Vibrio</i> sp. NA KONKURENČNO SPOSOBNOST NEPIGMENTIRANIH SEVOV <i>Vibrio</i> sp.
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 36 str., 3 pregl., 14 sl., 14. pril, 43 vir.
IJ	SI
Jl	sl/en
AI	<p>Pojav altruizma je za raziskovalce, ki preučujejo evolucijo živih bitij, eden izmed težje razločljivih pojmov. Altruizem je namreč dejanje, ki škoduje neposredni konkurenčni sposobnosti osebk, ki to dejanje izvrši, a zviša posredno kooperativno zmožnost osebk, kateremu je bilo altruistično dejanje namenjeno. V diplomskem delu smo preučevali vpliv pigmentiranega divjega seva <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (<i>Vibrio</i> sp.) na njegovi nepigmentirani mutanti R in B. Za ugotavljanje rasti mutant R ali B ob prisotnosti divjega seva smo v urnih intervalih izmerili optično gostoto pri 650 nm monokultur divjega seva, mutante R in B ter kokultur divjega seva z eno izmed nepigmentiranih mutant v različnih razmerjih. Ugotovili smo, da divji sev <i>Vibrio</i> sp. na rast mutant v kokulturi ni vplival. Produkcijo pigmenta divjega seva smo ugotavljali z ekstrakcijo pigmenta z acetonom. Količino ekstrahiranega pigmenta divjega seva smo primerjali s količino pigmenta, ekstrahiranega iz kokultur divjega seva <i>Vibrio</i> sp. in mutante R ali B. Rezultati kažejo, da ob prisotnosti mutant divji sev v večini primerov sintetizira manj pigmenta. Vpliv divjega seva <i>Vibrio</i> sp. na mutanti R ali B smo ugotavljali z odvisnostjo konkurenčne sposobnosti mutante R oziroma B v kokulturi z divjim sevom v različnih razmerjih. Ugotovili smo, da je konkurenčna sposobnost mutante odvisna od njenega začetnega in končnega deleža v kokulturi.</p>

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.262 + 579.222 (043) = 163.6
CX	<i>Vibrio</i> sp./cooperation/altruism/fitness/pigment
AU	BENKO, Julija
AA	STOPAR, David (supervisor) / DANEVČIČ, Tjaša (co-advisor) / ŽGUR BERTOK Darja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2009
TI	INFLUENCE OF WILD TYPE STRAIN OF <i>Vibrio</i> sp. ON THE FITNESS OF NONPIGMENTED STRAINS OF <i>Vibrio</i> sp.
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 36 p., 3 tab., 14 fig., 14. app, 43 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	<p>Altruism is a perplexing behavior for evolutionary biologists to explain. Altruism is an act, which decreases the direct fitness of the organism executing the altruistic act. On the other hand, altruistic act increases the indirect fitness of organism, which the altruistic act was intended. In this study, optical density (OD<sub>650</sub>) of wild type strain of <i>Vibrio</i> sp., of nonpigmented mutant R or B and of coculture of wild type strain of <i>Vibrio</i> sp. and one of the nonpigmented strains of <i>Vibrio</i> sp. was measured in hourly intervals. The results showed, that growth rates of nonpigmented strains of <i>Vibrio</i> sp. in monoculture or coculture were the same. The pigment production of wild type strain of <i>Vibrio</i> sp. was studied with acetone extraction. We compared the amount of extracted pigment of wild type strain with the amount of extracted pigment in cocultures. The results indicate that wild type strain of <i>Vibrio</i> sp. in most cases produces less pigment in the presence of mutant R or mutant B than it does in the pure culture. Wild type strain of <i>Vibrio</i> sp. changed fitness of mutant R and mutant B in coculture. Fitness of mutant R and mutant B depended on their initial fractions in the coculture.</p>

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	V
KAZALO VSEBINE.....	VI
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 SOCIOBIOLOGIJA NA RAVNI MIKROORGANIZMOV .....	3
2.1.1 Altruizem kot posebna oblika socialnega stika.....	4
2.1.1.1 Pojav prevarantov v populaciji med seboj sodelujočih osebkov.....	6
2.1.1.1.1 Primer altruizma in sinteze sideroforov pri bakteriji <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> .....	8
2.1.2 Druge vrste socialnih stikov.....	9
2.2 NARAVNI RDEČE OBARVAN IZOLAT <i>VIBRIO</i> SP. ....	10
2.2.1 Prodigionini in prodigiozin .....	10
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIALI .....	13
3.1.1 Kemikalije.....	13
3.1.2 Gojišča .....	13
3.1.3 Bakterijski sevi.....	14
3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR.....	14
3.2.1 Gojenje bakterije <i>Vibrio</i> sp. ....	14
3.3 DOLOČANJE VPLIVA DIVJEGA SEVA <i>VIBRIO</i> SP. NA NEPIGMENTIRANI MUTANTI.....	15
3.3.1 Določanje CFU pigmentiranega seva <i>Vibrio</i> sp. ter nepigmentiranih mutant kot monokultur in kokultur .....	15
3.3.1.1 Določanja začetnega števila celic pigmentiranega seva <i>Vibrio</i> sp., nepigmentirane nepigmentirne mutante R ter nepigmentirane mutante B.....	15
3.3.1.2 Priprava vzorcev kokulture divjega seva <i>Vibrio</i> sp. nepigmentirane mutante R ali B ter določitev končnega števila celic divjega seva <i>Vibrio</i> sp. ter nepigmentiranih mutant.....	15
3.3.1.3 Določitev konkurenčne sposobnosti nepigmentiranih mutant v kokulturi.....	16

3.3.2 Določitev rastne krivulje nepigmentiranih mutant R ali B, divjega seva <i>Vibrio</i> sp. ter kokultur divjega seva in nepigmentiranih mutant .....	17
3.3.2.1 Določitev hitrosti rasti monokultur ( $\mu$ ) in kokultur ter nosilnosti okolja (K) ...	17
3.3.3 Določitev koncentracije nastalega pigmenta pri divjem sevu <i>Vibrio</i> sp., nepigmentiranih mutantah in njihovih kokulturah.....	18
3.3.3.1 Določanje koncentracije pigmenta .....	18
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>19</b>
4.1 RAST NEPIGMENTIRANIH SEVOV <i>VIBRIO</i> SP. V KOKULTURI Z DIVJIM SEVOM <i>VIBRIO</i> SP. DSM14379.....	19
4.2 VPLIV PIGMENTIRANEGA DIVJEGA SEVA <i>VIBRIO</i> SP. DSM14379 NA NEPIGMENTIRANE SEVE <i>VIBRIO</i> SP. ....	20
4.3. VPLIV SLANOSTI NA KONKURENČNO SPOSOBNOST NEPIGMENTIRANIH MUTANT .....	23
4.3.1 Vpliv slanosti na delež nepigmentirane rožnate oziroma bele mutante v kokulturi z divjim sevom <i>Vibrio</i> sp.....	23
4.3.2 Vpliv slanosti na pigmentiranost divjega seva <i>Vibrio</i> sp. v kokulturi z nepigmentiranima mutantama R ali B .....	24
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>28</b>
5.1 RAST NEPIGMENTIRANIH SEVOV <i>VIBRIO</i> SP. V KOKULTURI Z DIVJIM SEVOM <i>VIBRIO</i> SP. DSM14379.....	28
5.2 VPLIV PIGMENTIRANEGA DIVJEGA SEVA <i>VIBRIO</i> SP. NA NEPIGMENTIRANE MUTANTE.....	28
5.3 VPLIV SLANOSTI NA KONKURENČNO SPOSOBNOST NEPIGMENTIRANIH MUTANT .....	29
5.4 SKLEPI.....	31
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>32</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>33</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Delež <i>las</i> signal negativnih oziroma <i>las</i> signal slepih prevarantov po 48 urah gojenja s kooperatorji (Diggle in sod., 2007b: 413).	6
Slika 2: Odvisnost konkurenčne sposobnosti prevaranta od njegovega začetnega deleža v populaciji kooperatorjev ter prevarantov (Ross-Gillespie in sod., 2007: 334).	7
Slika 3: Strukturni razredi prodigioninov (Bennett in Bentley, 2000: 12,13).	11
Slika 4: Rastna krivulja divjega seva <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, nepigmentiranih sevov <i>Vibrio</i> sp. ter kokultur divjega seva in nepigmentiranega seva v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl.	19
Slika 5: Relativni fitnes ( $w$ ) mutante R glede na začetni delež mutante R ( $x_1$ ), ki je rasla v kokulturi z divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl oziroma v gojišču M9 s 5g/L glukoze pri 28 °C.	20
Slika 6: Relativni fitnes mutante B ( $w$ ) glede na začetni delež mutante B ( $x_1$ ), ki je rasla v kokulturi z divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. v gojišču gojišče PKS s 3% (w/V) NaCl oziroma v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.	21
Slika 7: Primerjava začetnega razmerja med mutanto R in divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. s končnim razmerjem mutante R in divjega seva <i>Vibrio</i> sp. v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl ali gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.	22
Slika 8: Primerjava začetnega razmerja med mutanto B in divjim sevom <i>Vibrio</i> sp. s končnim razmerjem mutante B in divjega seva <i>Vibrio</i> sp. v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl oziroma v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.	22
Slika 9: Primerjava začetnega deleža mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom s končnim deležem ustrezne mutante v kokulturi z divjim sevom v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.	23
Slika 10: Primerjava začetnega deleža mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom v mešanici s končnim deležem ustrezne mutante v kokulturi z divjim sevom v gojišču PKS z 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.	24
Slika 11: Količina pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva <i>Vibrio</i> sp. ter kokultur divjega seva z mutanto v različnih razmerjih v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.	25
Slika 12: Plošči PKS (3% (w/V) NaCl) s kokulturo mutante B z divjim sevom ter kokulturo mutante R z divjim sevom, (Benko, 2009).	25
Slika 13: Količina pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva <i>Vibrio</i> sp., ter kokultur divjega seva z mutanto v različnih razmerjih v gojišču M9 s 5g/L glukoze pri 28 °C.	26
Slika 14: Količina pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva <i>Vibrio</i> sp. ter kokultur divjega seva z mutanto R ali B v gojišču PKS z 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.	27



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tipi socialnih stikov med mikroorganizmi glede na njihov vpliv na neposreden fitnes (po West s sod., 2006a:418). .....	4
Preglednica 2: Volumska razmerja med pigmentiranim sevom <i>Vibrio</i> sp. ter nepigmentiranima mutantama. ....	16
Preglednica 3: Hitrost rasti ( $\mu$ ) ter nosilnost okolja (K) ter njuni standardni napaki (st $\mu$ , st K) čistih kultur ter kokultur .....	20

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Optična gostota (OD pri 650 nm) monokultur in kokultur divjega seva *Vibrio* sp. in nepigmentiranih mutant R in B po določenem času v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga B1: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante R ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga B2: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante R ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C

Priloga B3: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante B ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga B4: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante B ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C

Priloga B5: Začetno ter končno razmerje med mutanto R in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga B6: Začetno ter končno razmerje med mutanto R in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C

Priloga B7: Začetno ter končno razmerje med mutanto B in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga B8: Začetno ter končno razmerje med mutanto B in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C

Priloga C: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 10% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga D1: Količine ekstrakta pigmenta (mg pigmenta/celico wt) posameznih čistih kultur divjega seva *Vibrio* sp ter kokultur mutante R oziroma mutante B z divjim sevom *Vibrio* sp. v različnih razmerjih v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C

Priloga D2: Količine ekstrakta pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp ter kokultur mutante R oziroma mutante B z divjim sevom *Vibrio* sp. v različnih razmerjih v gojišču M9 z 5 g L<sup>-1</sup> glukoze pri 28 °C

Priloga D3: Količine ekstrakta pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture *Vibrio* sp. ter kokultur mutante R oziroma mutante B z divjim sevom *Vibrio* sp. v različnih razmerjih v gojišču PKS s 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.

Priloga E: Prednosti in slabosti sinteze molekul za skupno dobro (West in sod., 2006b: 603)

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16 S rRNA	del ribosomske RNA molekule
CFU	enote, iz katerih se je razvila posamezna kolonija
Da	dalton, enota za izražanje atomske mase
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zeelkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
fur	regulator vnosa železa pri bakteriji <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
gp-9	ang. general protein-9 rdeče ognjene mravlje
<i>las</i>	pot zaznavanja celične gostote, ki poleg poti <i>rhl</i> uravnava sintezo N-AHL
<i>luxIR</i>	sodelujeta pri bioluminiscenci, <i>luxI</i> kot induktor, <i>luxR</i> kot odzivni regulator
mutanta B	bela mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379
mutanta R	rahlo rožnata mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379
Na <sup>+</sup>	natrijev ion
NaCl	natrijev klorid
N-AHL	N- acil homoserin lakton
OD <sub>650</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
pig.	pigment
pvdS	sigma faktor, ki uravnava sintezo pioverdina pri bakteriji <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
r	sorodnost
<i>smaIR</i>	homologa <i>luxIR</i>
V/V %	volumsko - volumski odstotki
W	konkurenčna sposobnost oziroma fitness
w/V %	utežno - volumski odstotki
wt	divji sev

## 1 UVOD

V zadnjih letih je razmišljanje o sodelovanju med mikroorganizmi že povsem sprejeta ideja (Velicer, 2003). Pred tem je namreč veljalo prepričanje, da je edini cilj teh enoceličnih organizmov, da se delijo ter v okolje vnesejo čim več svojih potomcev (Gera in Srivastava, 2006). Danes je jasno, da se tudi pri mikroorganizmih odvijajo zapleteni socialni stiki (Velicer, 2003). Mnogo oblik sodelovanj na evkariontski ravni lahko preslikamo tudi na raven prokariotov (Crespi, 2001). Pojavlja se vprašanje, zakaj bi bakterija sploh sodelovala z drugimi bakterijami, če lahko s sebičnim obnašanjem pridobi korist, ki je ne deli z drugimi. Verjeten vzrok je, da se energija vložena v sodelovanje včasih poplača (Stevens in Hauser, 2004). Tako lahko gradnjo gnezda pri nevretenčarjih ter vretenčarjih povežemo z gradnjo mikrobnega biofilma. Lovljenje plena v krdelu pri velikih mačkah, levih ter divjih psih lahko povežemo z miksobakterijo *Myxococcus xanthus*, ki v velikem številu napade plen ter ga z encimi razgradi. Tudi patogene bakterije (na primer *Salmonella* in *Staphylococcus*) sprostijo virulentne dejavnike šele, ko dosežejo določeno število (Crespi, 2001). Tako se tudi pri mikroorganizmih pojavljajo socialni stiki, ki niso neposredno povezani z rastjo teh organizmov. S temi stiki lahko posamezniki uravnavajo svoje aktivnosti glede na populacijo v kateri se nahajajo (Gera in Srivastava, 2006). Prav tako lahko bakterije, ki nastopajo v večjem številu, na večjem prostoru spremenijo okolje v svojo korist (Hense in sod., 2007).

V vsaki populaciji, kjer posamezniki sodelujejo in imajo od tega korist, se lahko pojavijo prevaranti, ki uživajo te koristi, a za njih ne »plačajo« (Velicer, 2003). Prevaranti se pojavijo prav zaradi koristi, ki so posledica sodelovanja ostalih mikroorganizmov (Travisano in Velicer, 2003). Prevaranti so največkrat mutante divjega tipa iste bakterije, saj bakterije raje sodelujejo s sorodno bakterijo. Ti se pojavljajo na primer pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, kjer mutante ne sintetizirajo invertaze, s katero divji tip iste kvasovke razgrajuje zunajcelično saharozo. Tako prevaranti ne izgubljajo energije s sintezo te učinkovine, a kljub temu hranila dobijo, saj saharozo razgrajuje divji tip. Še en tak primer je bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, kjer divji tip sintetizira siderofore, s katerimi pridobi netopno obliko železa iz okolja. Tudi tukaj prevaranti v kokulturi z divjim tipom uspevajo bolje (Foster in sod., 2006). S tem, ko prevaranti uspevajo in so v sorodu z divjim tipom bakterije, le-ta poskrbi, da se bodo njeni geni, čeprav posredno, prenašali v naslednje generacije (Diggle in sod., 2007a). Diggle in sod. (2008) so opredelili, da je sodelovanje, kjer se pojavijo prevaranti, evolucijsko stabilno v primeru ko sodelovanja prevaranti ne morejo izničiti in s tem ne morejo izpodrinuti med seboj sodelujočih osebkov.

## 1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterija *Vibrio* sp. je bila izolirana iz brakičnih voda Tržaškega zaliva (Gnezda-Meijer in sod., 2005). Ena izmed najbolj opaznih lastnosti *Vibrio* sp. je sinteza rdečega prodigiozinu podobnega pigmenta (Starič, 2007), ki zahteva vložek energije. Prodigiozini so sekundarni metaboliti (Williams, 1972), ki imajo protimikrobne (Gerber, 1971) in protiglivne učinke ter delujejo proti praživalim (Castro in sod., 1967). Nepigmentirani mutanti *Vibrio* sp. sta rahlo rožnata (R) ter bela (B) mutanta. Zaradi očitne razlike v obarvanosti in s tem povezanih metabolnih stroškov smo si divji sev *Vibrio* sp. ter njegove mutante izbrali kot model za preučevanje vpliva sobivanja mutant v populaciji med seboj sodelujočih osebkov.

Namen diplomskega dela je opredeliti vpliv divjega seva *Vibrio* sp. na konkurenčno sposobnost njegovih nepigmentiranih mutant. V ta namen bomo:

- ugotovili vpliv divjega tipa *Vibrio* sp. na rast in konkurenčno sposobnost nepigmentiranih mutant (rožnate in bele) v kokulturi z divjim tipom *Vibrio* sp.
- ugotovili ali začetni delež nepigmentiranih mutant in hranila vplivajo na pigmentiranost divjega tipa *Vibrio* sp. v kokulturi z nepigmentirano mutanto

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi bomo postavili naslednje hipoteze:

- divji tip *Vibrio* sp. vpliva na rast in konkurenčno sposobnost nepigmentiranih mutant (rožnata in bela)
- rast nepigmentiranih mutant (rožnata in bela) je v kokulturi z divjim tipom *Vibrio* sp. boljša kot rast čiste kulture nepigmentirane mutante R ali B

## 2 PREGLED OBJAV

Pojem sodelovanja oziroma kooperacije lahko uporabimo tako pri živali, ljudeh kot tudi pri mikroorganizmih. Sodelovanje se pojavlja med geni, ki gradijo genom; med celicami, ki sestavljajo večcelični organizem ter navsezadnje tudi med mikroorganizmi, ki s skupnim delom pridobijo javne/skupne dobrine (Foster in sod., 2006). Obnašanje oziroma dejanje nekega organizma je socialno naravnano, če ima posledice tako za izvajalca tega dejanja kot za posameznika, kateremu je bilo to dejanje namenjeno (West in sod., 2006a), tako lahko socialne stike razvrstimo glede na ugodnosti ter izgube, ki jih povzročijo (Foster in sod., 2001). Posledice nekega dejanja, torej, če je pozitivno oziroma negativno, določijo z opazovanjem posledic tega dejanja preko celotnega življenjskega obdobja posameznika (West in sod., 2006a).

### 2.1 SOCIOBIOLOGIJA NA RAVNI MIKROORGANIZMOV

Sociobiologija na področju mikroorganizmov je bila do nedavnega zanemarjena tema. Danes je to eno izmed najbolj preučevanih področij (Dunny in sod., 2008). Socialno življenje mikroorganizmov lahko razložimo s pomočjo sodelovanja med njimi. Socialen stik med mikroorganizmi lahko poimenujemo sodelovanje, če mikroorganizem, ki ga izvaja s tem nudi ostalim v okolici neko pridobitev in če se je to dejanje vsaj deloma zgodilo zaradi te pridobitve (West in sod., 2007b). Sodelovanje torej vpliva na posreden in neposreden fitnes mikroorganizmov (West in sod., 2007a). V tem primeru fitnes oziroma konkurenčna sposobnost izraža povprečen uspeh pri razmnoževanju nekega genotipa v določenem okolju (Elena in Lenski, 2003). Del tega fitnesa, ki predstavlja zmožnost proizvajanja lastnih potomcev, se imenuje neposreden fitnes oziroma direkten fitnes. Posreden fitnes posameznika je odvisen od kooperacije drugih mikroorganizmov (West in sod., 2007a). Seštevek neposrednega in posrednega fitnes-a imenujemo inkluzivni fitnes (ang. inclusive fitness) (West in sod., 2007b).

Na podlagi vpliva socialnega stika na neposreden fitnes sodelujočih mikroorganizmov, lahko socialne stike med njimi razdelimo v štiri razrede (Foster in sod., 2001) (Preglednica 1) (po West in sod., 2006a).

Preglednica 1: Tipi socialnih stikov med mikroorganizmi glede na njihov vpliv na neposreden fitnes (po West s sod., 2006a:418).

Vpliv socialnega stika na prejemnika		
	+	-
Vpliv socialnega stika na aktivnega udeleženca		
+	mutualizem	sebičnost
-	altruizem	kljubovalnost

West in sod. (2007b) navajajo, da je socialni stik, pri katerem imata korist oba osebka, tako aktivni udeleženec kot prejemnik, mutualističen (ang. mutual benefit). Pri tej obliki sodelovanja se zviša neposreden fitnes aktivnega mikroorganizma in tudi prejemnik ima koristi (West in sod., 2006b). Če ima v tej igri korist le prejemnik, se tako sodelovanje imenuje altruizem (ang. altruism). Pojav, kjer socialni stik izzove negativne posledice za prejemnika ter pozitivne za aktivnega udeleženca tega stika, imenujemo sebičnost (ang. selfishness). Stik, kjer imata oba udeleženca negativne posledice se imenuje kljubovalnost (ang. spite) (Foster in sod., 2001). Od zgoraj opisanih oblik socialnih stikov predstavljata obliko sodelovanja mutualizem ter altruizem, saj oba nudita prejemnikom neko pridobitev (West s sod., 2006b).

### 2.1.1 Altruizem kot posebna oblika socialnega stika

Za posameznike, ki preučujejo evolucijo živih bitij, je pojav altruističnega obnašanja eden izmed težje razložljivih pojmov (Diggle in sod., 2007a). Crespi (2001) je altruizem opredelil kot dejanje, ki škoduje neposrednemu fitnesu osebka, ki to dejanje izvrši, a zviša fitnes osebka, ki mu je bilo dejanje namenjeno. To je seveda v nasprotju z Darwinovo teorijo o naravni selekciji, po kateri preživijo le najmočnejši in najbolj sebični posamezniki (Diggle in sod., 2007). Kümmerli in sod. (2008) navajajo, da naravna selekcija izbere tiste posameznike, ki imajo najvišji inkluzivni fitnes.

Največkrat sta mikroorganizma v altruističnem odnosu sorodnika (West in sod., 2007a). To tezo je oblikoval W.D. Hamilton leta 1963 (Hamilton, 1963). Prve teze o teoriji izbora v korist sorodstva sta opisala Haldane in Fischer. Leta 1963 je Hamilton novo obliko naravne selekcije poimenoval teorija inkluzivnega fitnesa (ang. inclusive fitness theory). Pozneje jo je Maynard Smith preimenoval v bolj poznano teorijo o izboru v korist sorodstva (ang. kin selection theory) (Foster in sod., 2005).

S Hamiltonovim matematičnim modelom teorije inkluzivnega fitnesa (izbor v korist sorodstva) lahko razložimo, kdaj je altruistično obnašanje možno (West in sod., 2007b). Iz enačbe

$$rb - c > 0, \quad \dots(1)$$

kjer  $c$  predstavlja ceno altruistične oblike socialnega obnašanja za neposreden fitnes altruista,  $b$  ceno istega obnašanja na posreden fitnes prejemnika ter  $r$  stopnjo genetske sorodnosti med osebkoma (Diggle in sod., 2007a), lahko vidimo, da je altruistično obnašanje opravičeno, ko so pridobitve prejemnika ( $b$ ) glede na genetsko sorodnost med donorjem ter prejemnikom ( $r$ ) višje kot energijski vložek donorja ( $c$ ) (West in sod., 2007b). Tako lahko na podlagi Hamiltonovega pravila predpostavimo, da je sodelovanje na višji ravni, če sta  $r$  ali  $b$  višja in je  $c$  nižji (West in sod., 2007b). Sorodnost na nivoju genov je verjetnost, da je alel, ki je vpleten pri izražanju nekega socialno naravnane obnašanja, enak pri izvršitelju dejanja ter pri osebk, kateremu je socialno naravnano dejanje namenjeno (Crespi, 2001). Tako morajo imeti mikroorganizmi identične alele na enem ali več lokusih. Posledično lahko posameznik zviša pogostost svojega alela v naslednji generaciji tako, da altruistično ali kako drugače pomaga posamezniku z identičnim alelom na lokusu/lokusih (Foster in sod., 2006). Osebk sta v sorodu, če je  $r > 0$  (West in sod., 2007a). Če sta klona, je vrednost  $r$  enaka 1 in 0, če sta iz različnih rodov (West in sod., 2006b).

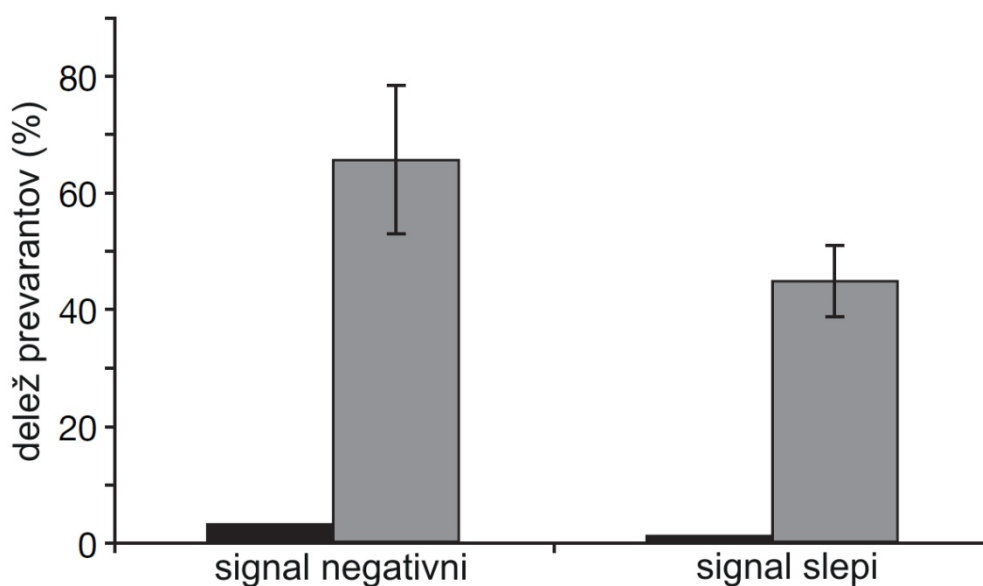
Iz tega lahko sklepamo, da nosilcu gena, ki je bil izbran v selekciji, ni potrebno zvišati neposrednega fitnesa. Gen, ki ga »prenaša«, se lahko prenaša v naslednje generacije tudi preko njegovih sorodnikov, ki imajo kopije istega gena (Hamilton, 1964). Za lažje razumevanje izbora v korist sorodstva si lahko predstavljamo osebek G ter osebek g. Osebek G izvaja altruistično obnašanje, osebek g ne. Kljub tezi, da v naravi preživi le najmočnejši osebek, najpomembnejši kriterij preživetja osebk G ni ta, kako njegovo obnašanje vpliva nanj, ampak kako njegovo obnašanje vpliva na ohranitev njegovih genov, genov osebk G. V populaciji bo več njegovih genov, če bo osebek g, kateremu je altruistično dejanje namenjeno, sorodnik osebk G (Hamilton, 1963).

Iz enačbe 1 lahko sklepamo, da so posamezniki raje sodelujejo, ko je njihov  $r$  višji. V tem primeru so namreč v ožjem sorodstvu. Tako mikroorganizmi sintetizirajo več molekul za skupno dobro, če je sorodstvo med njimi višje (Diggle in sod., 2007a). Visoko stopnjo sorodnosti organizmi dosežejo z diskriminacijo na podlagi sorodnosti ter z omejenim gibanjem (West in sod., 2007b). V primeru diskriminacije nek organizem loči med sorodnim organizmom in nesorodnim ter usmeri sodelovanje proti sorodnemu organizmu (nepotizem). Ta pojav je pogost v živalskem svetu, kjer si le sorodniki pomagajo pri oskrbovanju legla (West in sod., 2006b). Omejeno gibanje povzroči, da je na relativno majhni površini veliko število sorodnih celic. V tem primeru so celice altruistične brez diskriminacije, saj so verjetno skoraj vse sosednje celice med seboj sorodne (West in sod., 2007b).



### 2.1.1.1 Pojav prevarantov v populaciji med seboj sodelujočih osebkov

Ko je sodelovanje altruistično, je možnost pojava prevarantov zelo visoka, saj je ta oblika socialnega stika energijsko potratna za aktiven osebek ter prinaša ugodnosti prejemniku. Prevarant v tem primeru ne sodeluje, a uživa vse dobrine tega socialnega stika (Stevens in Hauser, 2004). Tako ima prevarant, ki ne sintetizira signalnih molekul, korist od lokalne celične gostote ne da bi v samo zaznavanje vlagal energijo. Imenujemo ga signal negativni prevarant (ang. signal negative cheater). Na drugi strani lahko prevarant sintetizira signalne molekule ali ne, a ne odgovori nanje. Torej ne sintetizira zahtevanih javnih dobrin in izrablja produkte sosednjih celic. Ta prevarat je signal slep prevarant (ang. signal blind cheater) (Diggle in sod., 2007b). Diggle in sod. (2007b) so preučevali prevarante bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki imajo okvare v *las* sistemu zaznavanje celične gostote. Kulturo divjega seva z eno izmed mutant (1-3% delež celotne kulture) so gojili 48 ur. Rezultati so pokazali, da se je število signal negativnih prevarantov povečalo iz 3% na 66%, signal slepih pa iz 1% na 45% (Slika 1).

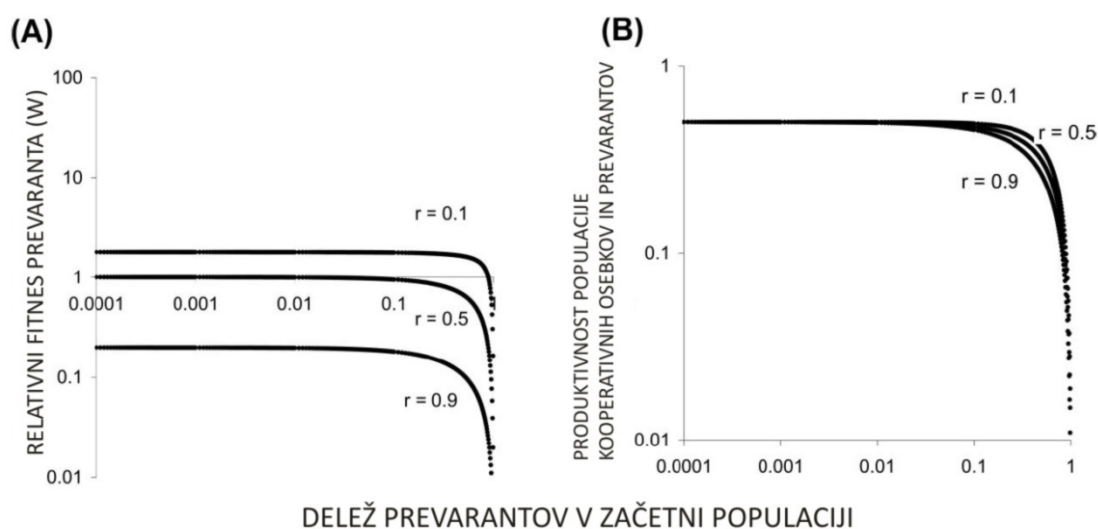


Slika 1: *Las* signal negativni oziroma *las* signal slepi prevaranti po 48 urah gojenja z v sodelovanju aktivnih osebkov povečajo svoj končni delež (siva stolpca) glede na začetni delež (črna stolpca) (Diggle in sod., 2007b: 413).

Sintetizirane zunajcelične molekule za skupno dobro so na voljo mikroorganizmom, ki jih sintetizirajo ter vsem ostalim v okolici, ki jih mogoče ne. Posledično lahko torej vplivajo na neposreden ter posreden fitnes v združbi (West in sod., 2007a). Ker se altruistično obnašanje največkrat pojavlja v populaciji sorodnik osebkov (West in sod., 2007b), so prevaranti mutante v sodelovanju aktivnega osebkov (West in sod., 2006b). Ker so mutante, je njihov r glede na v sodelovanju aktiven osebek enak 0, če gledamo samo sorodnost glede na

dejavnost, zaradi katere populacija sodeluje (npr. sinteza sideroforov pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*). Ker pa je v altruistični populaciji pomembna povprečna sorodnost, lahko prevaranti v njej kljub vsemu preživijo (West in sod., 2006b). Sodelovanje med bakterijami je iz evolucijskega pogleda stabilno, če ga pojav prevarantov ne more izničiti (Diggle in sod., 2008). Torej v primeru ko se mutante oziroma prevaranti ne morejo razrasti in znižati povprečno sorodnost za dano sodelovanje v populaciji (West in sod., 2006b).

V populaciji sodelujočih osebkov in prevarantov je torej fitnes posameznika funkcija prispevka molekul za skupno dobro, ki jih sintetizira ter povprečen prispevek molekul za skupno dobro s strani celotne populacije. V tej populaciji namreč prevaranti izkoriščajo molekule za skupno dobro na račun sosednjih celic, ki jih v sodelovanju s sosednjimi celicami sintetizirajo (Diggle in sod., 2008). Diggle in sod. (2007b) navajajo, da je fitnes oziroma konkurenčna sposobnost prevarantov odvisna od njihovega števila. Njihov fitnes se znižuje, ko jih je vedno več ter zvišuje, ko jih je manj (Dunny in sod., 2008) (Slika 2).



Slika 2: Odvisnost konkurenčne sposobnosti prevaranta od njegovega začetnega deleža v populaciji v sodelovanju aktivnih osebkov ter prevarantov (Ross-Gillespie in sod., 2007: 334). Slika A predstavlja odvisnost relativnega fitnesa prevaranta od njegovega začetnega deleža, označenega na abscisni osi ter od sorodnosti (označena z  $r$  nad krivuljo). Slika B predstavlja produktivnost mešane kulture v sodelovanju aktivnih osebkov ter prevarantov v odvisnosti od deleža prevarantov ter sorodnosti v populaciji (povzeto po Ross-Gillespie in sod., 2007).

Torej lahko na krajši rok prevaranti v populaciji predstavljajo večino, saj ne vlagajo energije v sintezo molekul za skupno dobro. Na dolgi rok takšna populacija propade, saj je vedno manj bakterij, ki dejansko sintetizirajo le-te molekule (Dunny in sod., 2008). Število prevarantov je omejeno tudi z izborom v korist sorodstva, saj druge bakterije raje sodelujejo s posamezniki, ki so genetsko bolj sorodni (Foster in sod., 2006). Glede na okolje v katerem nek osebek živi, lahko njegov fitnes izrazimo kot funkcijo dveh spremenljivk: kot ceno sinteze molekul za skupno dobro in kot pozitivne posledice sinteze le-teh molekul za posameznika oziroma populacijo.

Tako lahko fitness tega posameznika zapišemo kot

$$w(s, \hat{s}) = g(s)h(\hat{s}) \quad \dots(2)$$

kjer je  $w$  relativni fitness,  $g$  predstavlja zmanjšanje rasti posameznika, ki je sintetiziral molekule za skupno dobro ( $s$ );  $h$  je zvišan dostop posameznika do molekul za skupno dobro ( $\hat{s}$ ). Tako količina teh molekul, ki so dostopne za posameznika, leži med količino, ki jo posameznik sam sintetizira ( $s$ ) ter povprečnim doprinosom populacije kot celote ( $\bar{s}$ ).

Dostopnost molekul za skupno dobro je odvisna še od sorodnosti med partnerji ( $r$ ). Če je  $r$  enak 0, je populacija mešana in sorodnosti ni. Če je  $r$  enak 1, populacijo predstavljajo kloni, kjer prevaranti sodelujejo le s prevaranti (Ross-Gillespie in sod., 2007). Tako prevaranti lažje preživijo v populaciji manj sorodnih bakterij in propadejo v združbi klonov (Foster in sod., 2006). Relativna konkurenčna sposobnost prevarantov ( $w$ ) nam pove, ali se je število prevarantov v populaciji zvišalo ( $w > 1$ ), zmanjšalo ( $w < 1$ ) oziroma ostalo enako ( $w = 1$ ) (Ross-Gillespie in sod., 2007).

#### 2.1.1.1.1 Primer altruizma in sinteze sideroforov pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*

Prevaranti se pojavljajo tudi v populaciji bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki je po Gramu negativna bakterija ter povzroča bolezni pri rastlinah, živalih in ljudeh (Diggle in sod., 2007b). Bakterija je pri ljudeh vzrok različnih okužb. Med bolj znanimi je cistična fibroza, kjer gre za kronično vnetje pljuč. Tudi tu bakterije za rast potrebujejo železo, saj je le-to glavno *in vivo* pomanjkanje pri parazitskih bakterijah (Visca in sod., 2006). V aerobnih pogojih je prisotno železo v netopni Fe (III) obliki. Iz povezave med sintezo sideroforov ter rastjo bakterije lahko sklepamo, da sinteza sideroforov pozitivno vpliva na invazivnost te bakterije (West in Buckling, 2002). Gostitelj teh bakterij se poskuša okužbi izogniti tako, da razvije različne mehanizme s katerimi onemogoči parazitskim bakterijam dostop do topne oblike železa tako (West in sod., 2006b), da železo veže na transferin, laktoferin oziroma feritin (Schaible in Kaufmann, 2004). Bakterije pa lahko sintetizirajo siderofore s katerimi iz okolja pridobivajo železo. Sinteza sideroforov je oblika sodelovanja med bakterijami. Celotna populacija bakterij ima od te sinteze korist, saj pridobijo železo. Sama sinteza sideroforov je za posamezno bakterijo energijsko potratna (West in sod., 2006b). Tako je fitness posamezne celice pozitivno povezan s povprečno količino sintetiziranih molekul za skupno dobro (v tem primeru sideroforov), ki so jih lokalne individualne celice sintetizirale (Diggle in sod., 2007a). Dejstvo, da je sinteza sideroforov za posamezno celico energijsko potratna omogoča pojav prevarantov, ki sideroforov ne sintetizirajo, a vseeno uživajo vse dobre posledice sinteze letih s strani sintetizirajočih osebkov (Harrison in sod., 2006). V primeru *Pseudomonas aeruginosa* divji sev sintetizira siderofore, kar predstavlja prednost, ko je v okolju malo dostopnega železa (West in sod., 2006b). Glavni oziroma primarni siderofor bakterije

*Pseudomonas aeruginosa* je pioverdin (ang. pyoverdin). Njegovo sintezo uravnava sigma faktor PvdS, ki ga uravnava regulator vnosa železa (ang. ferric uptake regulator, Fur). Ko je v celici koncentracija železa dovolj visoka, protein Fur tvori kompleks z železom, ki se veže na *pvdS* promotor in posledično prekine sintezo pioverdina (Kümmerli in sod., 2008). Pioverdin predstavlja skupino difuzibilnih zeleno fluorescirajočih molekul. Odkrili so ga leta 1892, leta 1970 so opisali njegov pomen pri vezavi netopne oblike železa iz okolja. Zanimanje za pioverdin se je povečalo, ko so odkrili njegovo biološko vlogo pri *Pseudomonas aeruginosa*. Tako med drugim vpliva na virulenco in medcelično komunikacijo. Ko so pregledovali vzorce sputuma bolnikov s cistično fibrozo, so ugotovili, da vsebuje velike količine pioverdina. Nato so bakterijsko združbo vzorca natančneje preučili, ob tem jih je presenetilo dejstvo, da več kot četrtina izolatov *Pseudomonas aeruginosa* ni sintetizirala pioverdina. Tako so v pljučih bolnika s cistično fibrozo pioverdin sintetizirajoče *Pseudomonas aeruginosa* ter pioverdin nesintetizirajoči prevaranti (Visca in sod., 2006). Sinteza pioverdina s strani divjega seva bakterije pozitivno vpliva na sosednje bakterije, ki pioverdina mogoče sploh ne sintetizirajo in pridobivajo železo preko divjega tipa iste bakterije (Kümmerli in sod., 2008).

## 2.1.2 Druge vrste socialnih stikov

Obliki socialnega stika sta še sebičnost ter kljubovalnost (West in sod., 2006b; Foster in sod., 2001). Izbira sebične ter mutualistične oblike socialnega stika je logična, saj obe obliki prinašata neposredno pridobitev za aktivnega posameznika (Foster in sod., 2001). Hamilton je z enačbo 1 dokazal da je tudi altruistična oblika obnašanja upravičena izbira, če sta posameznika v sorodu (West in sod., 2007b). Zakaj bi bil posameznik do drugega osebk v kljubovalni obliki socialnega stika in tako škodil tudi sebi, je manj očitno. Lahko bi bila negativna oblika altruističnega obnašanja. Posledično se posameznik obnaša kljubovalno do posameznika, s katerim ni v sorodu ( $r < 0$ ). Tak posameznik zelo verjetno nima istih genov kot aktivni posameznik. Taka oblika obnašanja je upravičena, ker v okolju zniža frekvenco genov tekmecev. V tem razmerju ima korist sorodnik aktivnega posameznika. Najbolj znan primer takšnega obnašanja je pojav zelena brade pri rdeči ognjeni mravlji (*Solenopsis invicta*). Heterozigotne delavke (*Bb*), ki imajo na *Gp-9* (ang. general protein-9) lokusu alel *b*, ubijejo kraljice *BB*, ki tega alela nimajo. Pomanjkanje alela *b* poimenujemo pojav zelena brade, saj zglada kot da delavke neposredno identificirajo kraljice brez tega alela (Foster in sod., 2001). Foster in sod. (2006) navajajo, da ima gen *Gp-9* zapis za protein, ki veže feromone. Pojav zelene brade je Dawkins leta 1976 razložil kot pojav, pri katerem imajo nosilci gena, ki je potreben za altruizem neko očitno lastnost s pomočjo katere se prepoznavajo z ostalimi nosilci gena, ki so prav tako altruisti (Foster in sod., 2001). Populacij, ki temeljijo na pojavu zelene brade je malo, saj jih lahko prevaranti, ki pridobijo lastnost, po kateri se populacija med seboj prepozna (zeleno brado), hitro prerastejo (West in sod., 2007b).

## 2.2 NARAVNI RDEČE OBARVAN IZOLAT *Vibrio* sp.

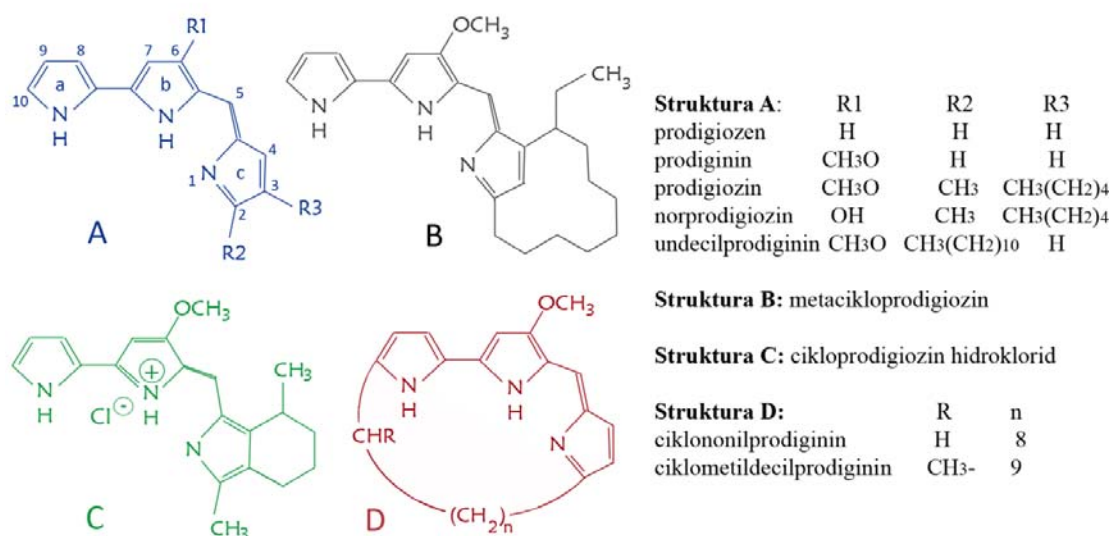
Bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 (*Vibrio* sp.) so izolirali iz brakičnih voda Tržaškega zaliva. Izolat za rast potrebuje Na<sup>+</sup> (Gnezda-Meijer in sod., 2005). Danevčič (2006) navaja, da v gojišču PKS *Vibrio* sp. raste do vključno 17% (w/V) NaCl in je torej halotoleranten mikroorganizem. Najbolj ugodna koncentracija NaCl za rast je 3% (w/V) v gojišču PKS (Danevčič, 2006). Bakterija raste v temperaturnem razponu od 15 do 43°C (Danevčič, 2006). Na podlagi morfoloških in biokemičnih lastnosti so bakterijo uvrstili v rod *Vibrio*. Sev je deponiran v DSMZ kot *Vibrio* sp. (DSM 14379) (Gnezda-Meijer in sod., 2005).

Ena izmed najbolj opaznih lastnosti *Vibrio* sp. je sinteza rdečega pigmenta (Starič, 2007). Sinteza pigmenta je najvišja pri 3% (w/V) NaCl. Če koncentracijo NaCl zvišamo ali znižamo, sinteza pigmenta močno upade. Na sintezo pigmenta vpliva tudi temperatura, njegova sinteza je najintenzivnejša pri temperaturi 28°C (Starič, 2007). Povečano sintezo pigmenta so opazili po prehodu v stacionarno fazo rasti, zato lahko sklepamo, da je pigment sekundarni metabolit (Starič, 2007). Pigment je po absorpcijskem spektru prodigiozinu podobna molekula (Štraser, 2008).

Poleg divjega seva *Vibrio* sp. (DSM 14379) (Gnezda-Meijer in sod., 2005) poznamo še dve njegovi nepigmentirani mutanti, in sicer mutanto R (rahlo rožnata mutanta), pridobljeno z UV mutagenozo ter mutanto B (bela mutanta), pridobljeno s staranjem kulture v tekočem gojišču PKS (Štraser, 2008).

### 2.2.1 Prodigionini in prodigiozin

Glede na strukturo delimo prodigionine v 4 razrede. V prvem razredu najdemo le prodigionine, ki imajo ravne alkilne skupine (Slika 3,A) (Bennett in Bentley, 2000; Williamson in sod., 2006). Sem uvrščamo tudi prodigiozine. V ostale tri razrede se uvrščajo ciklične oblike prodigioninov (Slika 3, B, C, D).



Slika 3: Strukturni razredi prodigioninov (Bennett in Bentley, 2000: 12,13)

Leta 1902 so iz bakterije *Serratia marcescens* izolirali rdeč pigment, poimenovan prodigiozin. Ime prodigiozin v literaturi uporabljajo kot splošen izraz za družino podobnih pigmentov. Osnovno strukturo pigmenta so trivialno poimenovali prodigiozen, strukturo z dodatno metoksi skupino na šestem ogljiku prodiginin. Redke naravne analoge z OH skupino na šestem ogljikovem atomu norprodigionine (Slika 1) (Bennett in Bentley, 2000). Prodigiozini sodijo v družino naravnih pigmentov, ki jih sintetizirajo *Serratia marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrus* (Huh in sod., 2007), *Streptomyces coelicolor* (Williamson in sod., 2006) in drugi. Natančno mesto prodigiozina v celici je še nejasno. Zgodnje študije so pokazale, da je to zelo hidrofobna molekula, ki je verjetno povezana s celičnim ovojem. Pri bakteriji *Serratia marcescens* je pigment v notranji membrani, kjer nastopa v kompleksu s 100-kDa velikim proteinom (Williamson in sod., 2006).

Bennett in Bentley (2000) navajata, da je prodigiozin tipični sekundarni metabolit. Ima nenavadno strukturo iz treh pirolnih obročev. Dva od teh obročev sta neposredno povezana, tretji je na strukturo povezan preko metenskega mostička. Celotna struktura se imenuje piril dipiril meten in ima molekulska formulo C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O. Pomembno vlogo pri sintezi prodigiozina imajo očetna kislina, glicin, prolin, serin, alanin (Bennett in Bentley, 2000), acetat ter metionin (Harris in sod., 2004), sama biosinteza prodigiozina poteka po dveh ločenih poteh, katerih zadnja stopnja sinteze je encimska kondenzacija 2-metil-3-n-amil pirola (MAP) s 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karbaldhida (MBC) (Fineran in sod., 2005). Bakterija *Serratia* sp. ATCC 39006 sintetizira vrsto signalnih molekul, ki sodelujejo pri uravnavi sinteze prodigiozinov (Slater in sod., 2003). Tako je pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 sinteza pigmenta uravnana preko zaznavanja celične gostote, s katerim uravnavajo sintezo genov *pigA-O* v operonu *Pig*. V primeru bakterije *Serratia* sp. ATCC 39006 so homologe *luxIR*

molekule *smaI* ter *smaR* (aktivator sekundarnega metabolizma). *SmaI* je N-acil homoserin lakton (*N-AHL*) sintetaza (Fineran in sod., 2005), ki sintetizira dvojico signalnih molekul- N-butanoil-L-homoserin laktone (C4-HSL) ter N-heksanoil-L-homoserin laktone (C6-HSL) (Williamson in sod., 2006). Ko je gostota celic prenizka, *SmaR* onemogoča prepis *pig* skupine (Williamson in sod., 2006) tako, da se veže na DNA. Ko je gostota celic dovolj visoka, se nivo C4-HSL ter C6-HSL poviša (Fineran in sod., 2005). Molekule C4-HSL ter C6-HSL zavirajo sposobnost *SmaR*, da se veže na DNA molekulo (Williamson in sod., 2006). Posledično steče biosinteza pigmenta (Williamson in sod., 2006).

V primeru prodigiozinu podobnega rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. je Starič (2007) pokazal, da je njegova sinteza odvisna od dejavnikov okolja kot so slanost, temperatura, koncentracija glukoze in vira ogljika.

Sekundarni metaboliti so različne molekule z nizko molekulsko maso, ki v celici običajno nimajo vidne vloge. Najbolj intenzivna sinteza teh molekul poteka v stacionarni fazi celični rasti. Sinteza sekundarnih metabolitov poteka po drugačnih poteh kot sinteza primarnih metabolitov. Predvideva se na primer, da je vir pirolnih skupin, potrebnih za sintezo prodigiozina, amino kisline in acetat in ne intermediat cikla sukcinat-glicin kot pri porfirinih (primarni metaboliti). Torej te molekule niso potrebne za celično rast in njihovo razmnoževanje (Williams, 1972).

Zakaj torej mikroorganizmi sploh sintetizirajo sekundarne metabolite? Na vprašanje obstaja več odgovorov. Dva najbolj skrajna sta, da sekundarni metaboliti nimajo nikakršnega vpliva na celice. Nasprotno prepričanje pa pravi, da ima oziroma je nekoč na neki stopnji evolucije imel biološko aktivnost, ki je vplivala na fitness mikroorganizmov (Firn in Jones, 2000). Slater in sod. (2003) navajajo, da bi lahko bila sinteza prodigiozina pri bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006 metabolni odtok presežka produktov primarnega metabolizma.

Prodigionini imajo kot sekundarni metaboliti protimikrobni učinek proti *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus smegmatis* (Gerber, 1971), *Bacillus subtilis* (Cang in sod., 2000). Poleg tega ima pigment protiglivi učinek proti patogenim glivam kot so *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* ter *Sporotrichum schenkii* (Castro in sod., 1967). Kot antibiotiki v humani medicini prodigionini niso primerni, ker imajo pri učinkovitih koncentracijah sistemske učinke. V humani medicini je bolj zanimivo njihovo delovanje proti praživalim (npr. človeškega parazita *Plasmodium falciparum*, ki povzroča malarijo). Nanj deluje že pri koncentracijah, ki niso citotoksične (Castro in sod., 1967). Zanimiva lastnost prodigioninov je tudi njihova sposobnost povzročitve programirane celične smrti rakavih celičnih linij z minimalnim vplivom na normalne celice (Harris in sod., 2004).

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Kemikalije

- aceton  $C_3H_6O$   $M_w = 58,08$  g/mol (Merck, Nemčija)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- destilirana voda
- D-(+)-glukoza  $C_6H_{12}O_6$   $M_w = 180,16$  g/mol (Kemika, Hrvaška)
- dinatrijev hidrogen fosfat  $Na_2HPO_4$   $M_w = 141,96$  g/mol (Merck, Nemčija)
- etanol 96 % (V/V)  $C_2H_5OH$   $M_w = 46,07$  g/mol (Merck, Nemčija)
- kalcijev klorid dihidrat  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   $M_w = 147,02$  g/mol (Zorka Šabac, Srbija)
- kalijev dihidrogen fosfat  $KH_2PO_4$   $M_w = 136,09$  g/mol (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- magnezijev klorid heksahidrat  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$   $M_w = 203,3$  g/mol (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   $M_w = 246,48$  g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid  $NaOH$   $M_w = 40,00$  g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid  $NaCl$   $M_w = 58,5$  g/mol (Merck, Nemčija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- tripton (Biolife, Italija)

#### 3.1.2 Gojišča

- Gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt): 5 g peptokompleks
  - 1 g kvasni ekstrakt
  - 2 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
  - 30 g (3% (w/V) PKS) ali 100g (10%(w/V) PKS)  $NaCl$
  - 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 150 g  $\text{NaCl}$  ter 1000 mL destilirane vode)
  - 2 mL 1M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0,1 mL 1M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - 10 mL 500 g  $\text{L}^{-1}$  glukoze (končna koncentracija glukoze v gojišču 5 g  $\text{L}^{-1}$ )
  - 750 mL destilirane vode

Za trdna gojišča PKS smo dodali 15 g agar-agar na 1000 mL tekočega gojišča.

### 3.1.3 Bakterijski sevi

- *Vibrio* sp. DSM14379 (*Vibrio* sp.)
- *Vibrio* sp. DSM14379 (rahlo rožnata mutanta, mutanta R), pridobljena z UV mutagenezo
- *Vibrio* sp. DSM14379 (bela mutanta, mutanta B), pridobljena s staranjem kulture v tekočem gojišču PKS

## 3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

### 3.2.1 Gojenje bakterije *Vibrio* sp.

Kulturo divjega (pigmentiranega) seva *Vibrio* sp. ter kulturo nepigmentiranih mutant (mutante R in mutante B) smo iz trdnega gojišča PKS s 3% (w/V)  $\text{NaCl}$  precepili v 5 mL tekočega gojišča PKS s 3% (w/V)  $\text{NaCl}$  oziroma gojišča M9 s 5 g  $\text{L}^{-1}$  glukoze. Kulture smo nacepili posamezno. Gojišča, nacepljena s pigmentiranim sevom *Vibrio* sp. oziroma z eno izmed nepigmentiranih mutant, smo gojili 8 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28°C.

### 3.3 DOLOČANJE VPLIVA DIVJEGA SEVA *Vibrio* sp. NA NEPIGMENTIRANI MUTANTI

#### 3.3.1 Določanje CFU pigmentiranega seva *Vibrio* sp. ter nepigmentiranih mutant kot monokultur in kokultur

##### **3.3.1.1 Določanja začetnega števila celic pigmentiranega seva *Vibrio* sp., nepigmentirane nepigmentirne mutante R ter nepigmentirane mutante B**

Iz 5 mL tekočega gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl oziroma gojišča M9 s 5 g/L glukoze) (3.2.1) smo odvzeli 100  $\mu$ L kulture pigmentiranega seva *Vibrio* sp. oziroma eno izmed nepigmentiranih mutant ter naredili redčitveno vrsto. Na PKS plošče s 3% (w/V) NaCl smo nanесли redčitve  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  v dveh ponovitvah. To je predstavljalo začetno število celic.

##### **3.3.1.2 Priprava vzorcev kokulture divjega seva *Vibrio* sp. nepigmentirane mutante R ali B ter določitev končnega števila celic divjega seva *Vibrio* sp. ter nepigmentiranih mutant**

Za določanje vpliva pigmentiranega seva *Vibrio* sp. na nepigmentirani mutanti smo vzporedno z 3.3.1.1 iz 5 mL tekočega gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl oziroma gojišča M9 s 5 g/L glukoze odvzeli po 1% (V/V) inokuluma pigmentiranega seva oziroma ustreznega deleža ene izmed nepigmentiranih mutant. Ta volumen smo nacepili v 50 mL gojišča PKS s 3% ali 10 % (w/V) NaCl, če smo kulturo odvzeli iz 5 mL PKS tekočega gojišča s 3% (w/V) NaCl oziroma v 50 mL gojišča M9 s 5 g/L glukoze, če smo kulturo odvzeli iz 5 mL tekočega gojišča M9 s 5 g/L glukoze. Volumska razmerja med pigmentiranim sevom ter nepigmentirano mutanto smo spreminjali kot je prikazano v preglednici 2.

Preglednica 2: Volumska razmerja med pigmentiranim sevom *Vibrio* sp. ter nepigmentiranimi mutantama. Številka za mutanto R oziroma B predstavlja volumski delež te mutante v kokulturi. Delež smo izračunali tako, da smo volumen mutante R ali B v kokulturi delili z volumnom divjega seva *Vibrio* sp. v kokulturi.

Oznaka kokulture		Razmerje v kokulturi	Gojišče
WTR2	WTB2	0,5 mL divjega seva ter 1 mL mutante	PKS s 3% (w/V) NaCl, M9 s 5 g/L glukoze
WTR1,5	WTB1,5	0,5 mL divjega seva ter 0,75 mL mutante	PKS s 3% (w/V) NaCl
WTR1	WTB1	0,5 mL divjega seva ter 0,5 mL mutante	PKS s 3% ter 10% (w/V) NaCl, M9 s 5 g/L glukoze
WTR0,5	WTB0,5	0,5 mL divjega seva ter 0,25 mL mutante	PKS s 3% (w/V) NaCl, M9 s 5 g/L glukoze
WTR0,2	WTB0,2	0,5 mL divjega seva ter 0,1 mL mutante	PKS s 3% (w/V) NaCl
WTR0,1	WTB0,1	0,5 mL divjega seva ter 0,05 mL mutante	PKS s 3% (w/V) NaCl

Nacepljena 50 mL tekoča gojišča smo inkubirali na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28°C preko noči (16 ur). Naslednji dan smo izmerili optično gostoto pri 650 nm ( $OD_{650}$ ) na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija) ter naredili redčitveno vrsto vseh nacepljenih mono- oziroma ko-kultur. Redčitve  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  smo v dveh ponovitvah nanesti na PKS plošče s 3% (w/V) NaCl. S tem smo določili končno število celic.

### 3.3.1.3 Določitev konkurenčne sposobnosti nepigmentiranih mutant v kokulturi

Prešteli smo kolonije na ploščah PKS s 3% (w/V) NaCl, ki so predstavljale začetno oziroma končno število celic. Nato smo določili začetni ter končni delež nepigmentirane mutante. Začetni delež ( $x_1$ ) nepigmentiranih mutant smo izračunali tako, da smo CFU začetnega stanja monokulture mutante (mutanta R, mutanta B) delili s seštevkom začetnega stanja divjega seva *Vibrio* sp. in ustrezne nepigmentirane mutante. Končni delež ( $x_2$ ) nepigmentiranih mutant smo določili tako, da smo CFU končnega stanja mutante v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. delili s seštevkom CFU nepigmentirane mutante ter divjega seva *Vibrio* sp.

Na podlagi začetnih ter končnih deležev nepigmentiranih mutant v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. smo izračunali relativni fitnes oziroma konkurenčno sposobnost rožnate ali bele mutante glede na divji sev *Vibrio* sp. s pomočjo enačbe

$$W = \frac{x_2 \cdot (1 - x_1)}{x_1 \cdot (1 - x_2)} \quad \dots(3)$$

kjer sta  $x_1$  začetni delež prevarantov v populaciji in  $x_2$  končni delež prevarantov v populaciji ter izračunali relativni fitnes oziroma konkurenčno sposobnost rožnate ali bele mutante glede na divji sev *Vibrio* sp. ( $W$ ) (Diggle in sod., 2007b).

### 3.3.2 Določitev rastle krivulje nepigmentiranih mutant R ali B, divjega seva *Vibrio* sp. ter kokultur divjega seva in nepigmentiranih mutant

1 % (V/V) prekončne kulture divjega seva *Vibrio* sp. ter nepigmentiranih mutant iz 5 mL gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl smo nacepili v 50 mL gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl kot monokulture (divji sev *Vibrio* sp., mutanta R, mutanta B) ali kot kokulture WTR1, WTR2 in WTB1, WTB2. Takoj smo izmerili optično gostoto pri 650 nm ( $OD_{650}$ ) na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija). Postopek smo ponovili v urnih intervalih do osmih ur stresa na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28°C. S pomočjo izmerjenih optičnih gostot pri 650 nm smo narisali rastle krivulje za monokulture in kokulture.

#### 3.3.2.1 Določitev hitrosti rasti monokultur ( $\mu$ ) in kokultur ter nosilnosti okolja ( $K$ )

S pomočjo logistične enačbe

$$OD_{650}(t) = \frac{K \cdot OD_{650,t_0}}{OD_{650,t_0} + e^{-\mu t} \cdot (K - OD_{650,t_0})} \quad \dots(4)$$

kjer je  $K$  nosilnost okolja (zgornja meja številčnosti populacije),  $\mu$  hitrost rasti ( $h^{-1}$ ),  $OD_{650,t_0}$  je optična gostota pri 650 nm pri času  $t_0$  (Danevčič, 2005) smo v programu OriginPro8 določili hitrost rasti ter nosilnost okolja monokultur ter kokultur.

### 3.3.3 Določitev koncentracije nastalega pigmenta pri divjem sevu *Vibrio* sp., nepigmentiranih mutantah in njihovih kokulturah

Prekonočnim monokulturam (divji sev *Vibrio* sp., mutanta R, mutanta B) oziroma kokulturam (divji sev *Vibrio* sp. z eno izmed mutant v različnih razmerjih) v tekočem gojišču PKS s 3% ali 10% (w/V) NaCl ali gojišču M9 s 5 g/L glukoze (3.3.1.2) smo izmerili OD<sub>650</sub> s fotometrom (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija). Nato smo 1,5 mL kulture monokulture in kokultur v mikrocentrifugikah centrifugirali 10 minut pri 10000 obratih in 4°C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Po centrifugiranju smo odlili supernatant ter pigment ekstrahirali z acetonom (Giri in sod., 2004) tako, da smo usedlino celic resuspendirali v enakem volumnu acetona. Ekstrakt v acetonu smo nato stresali 90 minut na stresalniku. Po stresanju smo ostanke celic odstranili s centrifugiranjem 15 min pri 10000 obratih in 4°C.

#### 3.3.3.1 Določanje koncentracije pigmenta

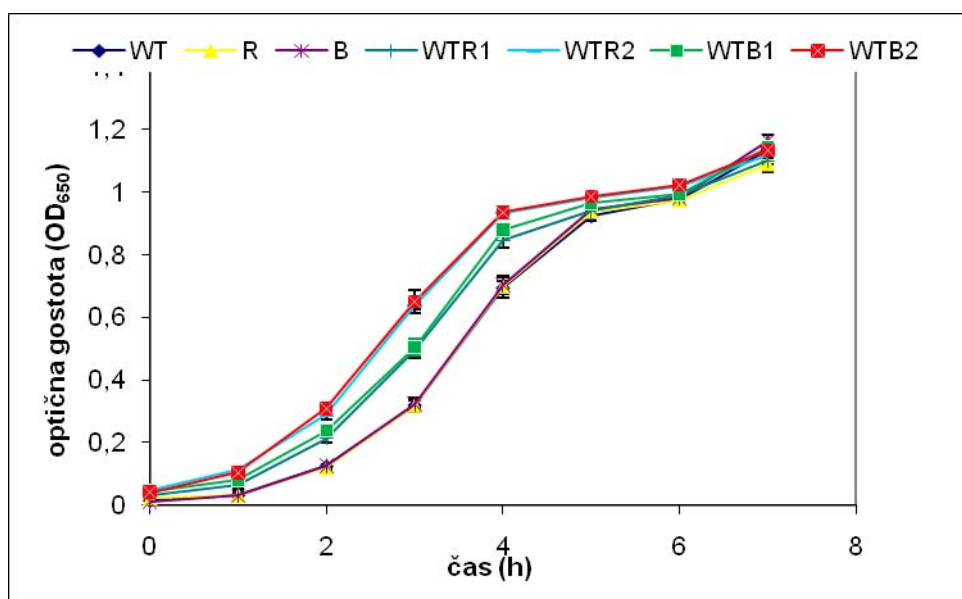
300 µL ekstrakta pigmenta v acetonu vsakega vzorca smo v treh ponovitvah nanegli na mikrotitrsko ploščo ter izmerili absorpcijski spekter z optičnim čitalcem (Multiscan Spectrum, THERMO, Finska) pri valovnih dolžinah od 380 do 600 nm (korak po 5 nm, ločljivost 2 nm). Za ničlitev smo uporabili čisto topilo-aceton. Dobljene spektre smo s programom OriginPro 8 integrirali. Iz površine integriranega spektra smo s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo pigmenta v mg L<sup>-1</sup>. Količino pigmenta, ekstrahiranega iz kokultur divjega seva *Vibrio* sp. in ene izmed nepigmentiranih mutant, smo normirali na število celic divjega seva *Vibrio* sp. v kokulturi. V primeru ekstrakcije pigmenta iz monokulture divjega seva *Vibrio* sp. smo količino pigmenta normirali na število celic divjega seva *Vibrio* sp..

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAST NEPIGMENTIRANIH SEVOV *Vibrio* sp. V KOKULTURI Z DIVJIM SEVOM *Vibrio* sp. DSM14379

Rast pigmentiranega seva ter nepigmentiranih mutant v monokulturi in kokulturi je prikazana na sliki 4. Kot je razvidno iz slike (Priloga A) je rastna krivulja monokultur divjega seva ter nepigmentiranih sevov (mutanta R ter mutanta B) je zelo podobna. Nepigmentirani sevi so v čisti kulturi rahlo obarvani (mutanta R) oziroma niso obarvani (mutanta B).

Kokultura divjega seva *Vibrio* sp. ter ene izmed nepigmentiranih mutant je imela opazno krajši prehod v hitro eksponentno rast kot čiste kulture (monokulture), vendar se hitrost rasti ( $h^{-1}$ ) ni zelo razlikovala (Preglednica 3, parameter  $\mu$ ). Kokulture ter monokulture so dosegle primerljivo nosilnost okolja (K) in so po približno petih urah prešle v stacionarno fazo rasti (Preglednica 3, parameter K).



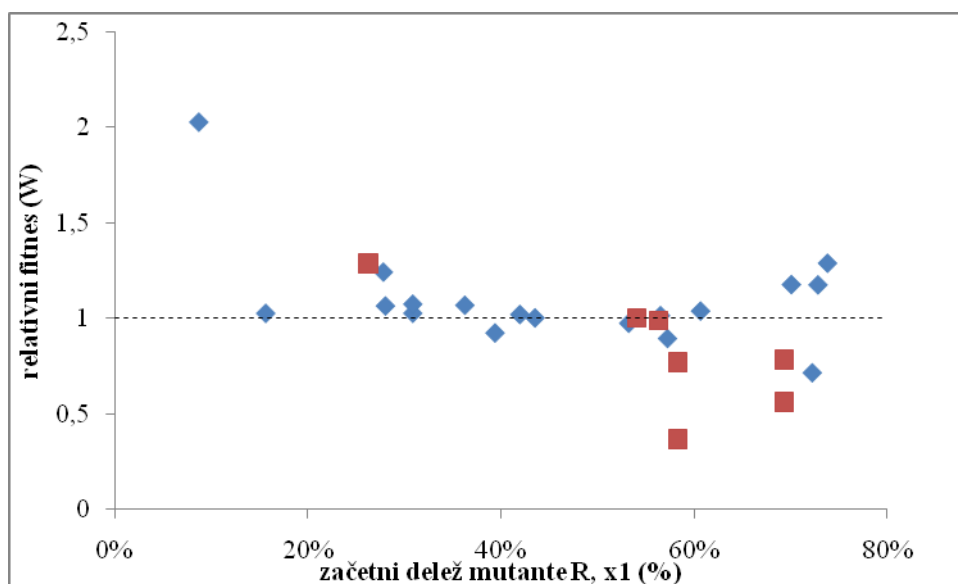
Slika 4: Rastna krivulja divjega sev *Vibrio* sp. DSM14379, nepigmentiranih sevov *Vibrio* sp. ter kokultur divjega seva in nepigmentiranega seva v dveh različnih razmerjih, ki so rasli v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.

Preglednica 3: Hitrost rasti ( $\mu$ ) ter nosilnost okolja (K) ter njuni standardni napaki (st  $\mu$ , st K) čistih kultur ter kokultur (Slika 4). Parametra smo dobili s programom OriginPro8 (preko logistične enačbe, enačba 4)

	$\mu$ , h <sup>-1</sup>	st $\mu$ , h <sup>-1</sup>	K	st K
WT	1,25	0,09	1,09	0,02
R	1,36	0,08	1,06	0,02
B	1,25	0,10	1,12	0,03
WTR1	1,29	0,09	1,05	0,02
WTR2	1,30	0,07	1,07	0,01
WTB1	1,23	0,10	1,08	0,02
WTB2	1,30	0,08	1,08	0,02

## 4.2 VPLIV PIGMENTIRANEGA DIVJEGA SEVA *Vibrio* sp. DSM14379 NA NEPIGMENTIRANE SEVE *Vibrio* sp.

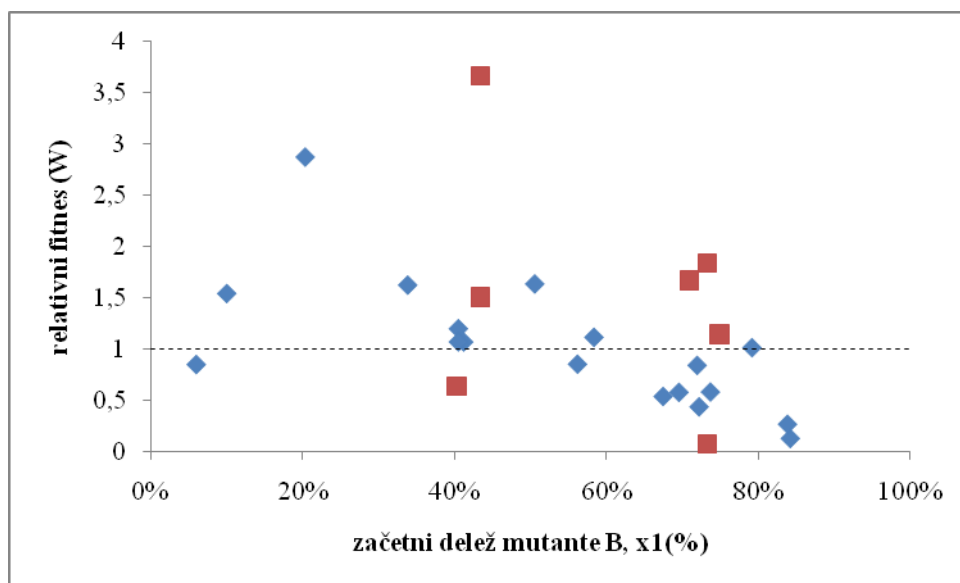
Konkurenčna sposobnost nepigmentiranih mutant v kokulturi s pigmentiranim sevom *Vibrio* sp. je prikazana na sliki 5 in 6. Konkurenčna sposobnost (W) mutante R se je v kokulturi z divjim sevom nižala z višjim začetnim deležem mutante tako v primeru gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl (Slika 5, priloga B2) kot v gojišču M9 s 5 g/L glukoze (Slika 5, priloga B1).



Slika 5: Relativni fitness ( $w$ ) mutante R glede na začetni delež mutante R ( $x_1$ ), ki je rasla v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl (modri karo) oziroma v gojišču M9 s 5g/L glukoze (rdeči kvadrati) pri 28 °C. Vodoravna črta predstavlja nespremenjeno konkurenčno sposobnost mutante v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp v vrednosti 1.

Podobno lahko iz slike 6 domnevamo tudi za mutanto B (Priloga B3, B4). Tudi v primeru bele mutante njena konkurenčna sposobnost v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. pada z večanjem njenega začetnega deleža v kokulturi z *Vibrio* sp.. V obeh primerih (mutanta R in

mutanta B) je padanje konkurenčne sposobnosti bolj izrazito v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl kot v gojišču M9 s 5 g/L glukoze.

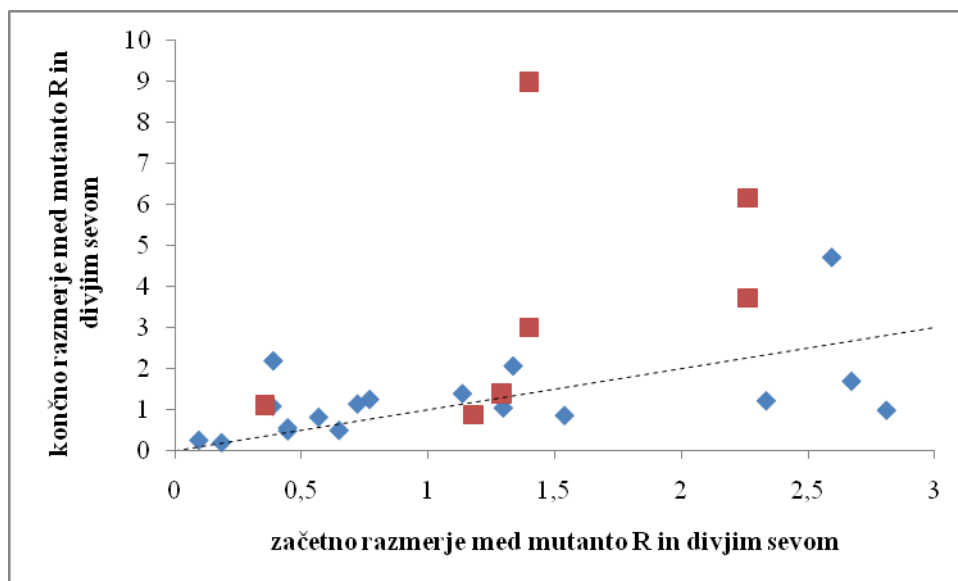


Slika 6: Relativni fitnes mutante B ( $w$ ) glede na začetni delež mutante B ( $x_1$ ), ki je rasla v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. v gojišču gojišče PKS s 3% (w/V) NaCl (modri karo) oziroma v gojišču M9 s 5 g/L glukoze (rdeči kvadrati) pri 28 °C. Vodoravna črta predstavlja nespremenjeno konkurenčno sposobnost mutante v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. v vrednosti 1.

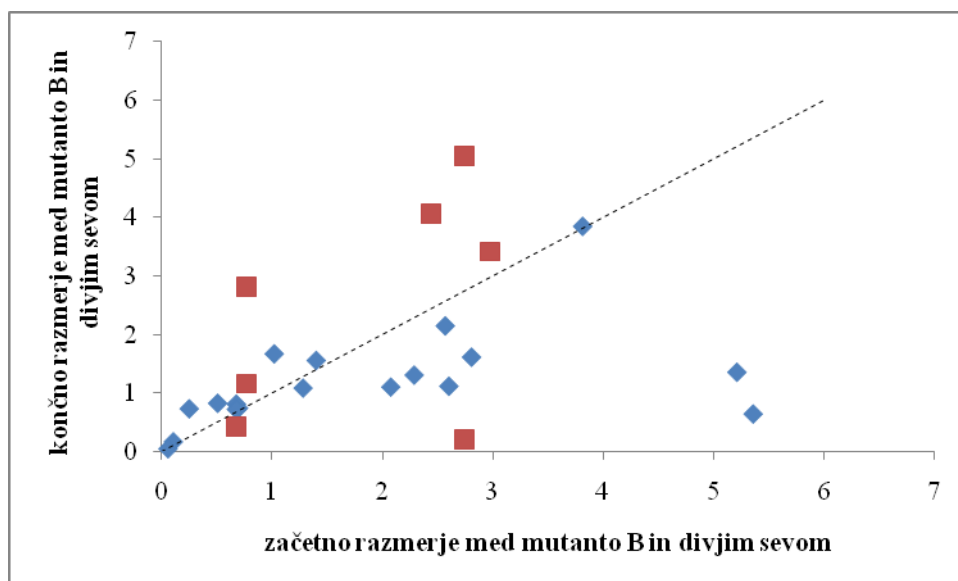
Vodoravni črti na sliki 5 in 6 razmejita deleže tistih prevarantov (nepigmentiranih mutant), ki so v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. zvišali svoj fitnes ( $w > 1$ ), od tistih, ki se jim je fitnes zmanjšal ( $w < 1$ ) oziroma tistih, katerih fitnes je ostal enak ( $w = 1$ ). Rezultati kažejo, da se je konkurenčna sposobnost mutante R in mutante B pri njenih nižjih začetnih deležih povečala.

Odvisnost mutante in divjega seva smo podali tudi kot razmerje med prevaranti in kooperativnimi osebki na začetku in koncu eksperimenta. Začetno razmerje predstavlja razmerje med začetnim deležem prevaranta ( $x_1$ ) ter začetnim deležem kooperativnega osebka (pigmentiran sev *Vibrio* sp.) ( $1 - x_1$ ). Začetno razmerje smo primerjali s končnim razmerjem med isto mutanto ter divjim sevom ( $x_2$  oziroma  $1 - x_2$ ) (Slika 7 in 8, priloga B5 in B6 za mutanto R oziroma B7 in B8 za mutanto B) (Ross-Gillespie in sod., 2007). Točke, ki so na slikah 8 in 9 nad črtkano črto, predstavljajo tista razmerja med mutanto R oziroma B ter divjim sevom *Vibrio* sp., kjer je mutanta R oziroma B rastla v kokulturi boljše kot divji sev. Pri mutanti R (Slika 7) vidimo, da je mutanta v kokulturiv gojišču M9 z 5 g/L glukoze rastla v večini primerov boljše kot divji sev, nasprotno v primeru gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl ne opazimo izrazitega trenda v korist mutante glede na začetno razmerje med mutanto R in divjim sevom *Vibrio* sp..





Slika 7: Primerjava začetnega razmerja med mutanto R in divjim sevom *Vibrio* sp. ( $x_1/(1-x_1)$ ) s končnim razmerjem mutante R in divjega seva *Vibrio* sp. ( $x_2/(1-x_2)$ ). Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl (modri karo) ali gojišču M9 s 5 g/L glukoze (rdeči kvadrati) pri 28 °C.



Slika 8: Primerjava začetnega razmerja med mutanto B in divjim sevom *Vibrio* sp. ( $x_1/(1-x_1)$ ) s končnim razmerjem mutante B in divjega seva *Vibrio* sp. ( $x_2/(1-x_2)$ ). Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl (modri karo) oziroma v gojišču M9 s 5 g/L glukoze (rdeči kvadrati) pri 28 °C.

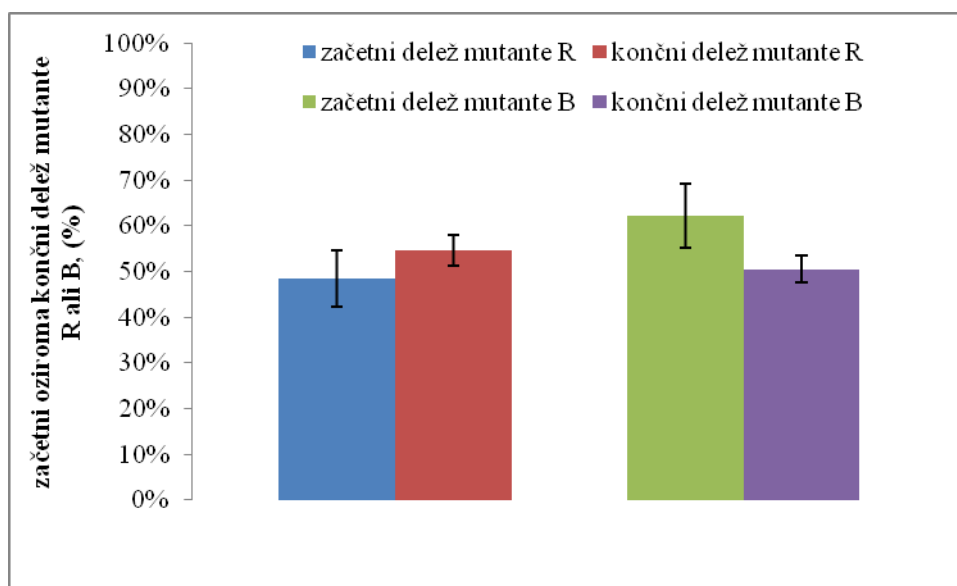
V primeru mutante B za razliko od mutante R opazimo izrazito negativno odvisnost med začetnimi ter končnimi razmerji med mutanto in divjim sevom *Vibrio* sp (Slika 8). V gojišču M9 z 5 g/L glukoze je večina odvisnosti med začetnim in končnim razmerjem med mutanto B ter divjim sevom pozitivnih (Slika 8).

## 4.3. VPLIV SLANOSTI NA KONKURENČNO SPOSOBNOST NEPIGMENTIRANIH MUTANT

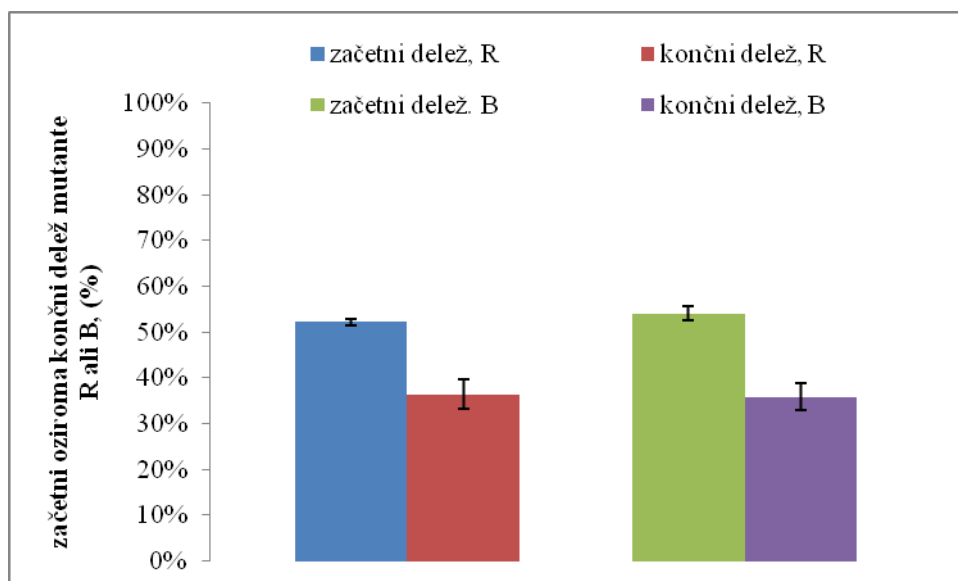
### 4.3.1 Vpliv slanosti na delež nepigmentirane rožnate oziroma bele mutante v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp.

Vpliv okoljskega dejavnika na končni delež nepigmentirane mutante v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. je prikazan na slikah 9 in 10. Optimalno okolje za rast bakterije *Vibrio* sp. je predstavljalo tekoče gojišče PKS s 3% (w/V) NaCl, ekstremno okolje je predstavljalo gojišče PKS z 10% (w/V) NaCl.

Primerjali smo odvisnost med začetnim ter končnim deležem nepigmentirane mutante R ali B v mešanici WTR1 ter WTB1 in ugotovili, da je v primeru gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl (Slika 9) končni delež mutante R višji kot njen začetni delež, vendar razlika ni značilna. Končni delež mutante B je nižji kot njen začetni delež. V primeru povečane slanosti (Slika 10, priloga C) končni delež obeh mutant značilno nižji od začetnega deleža.



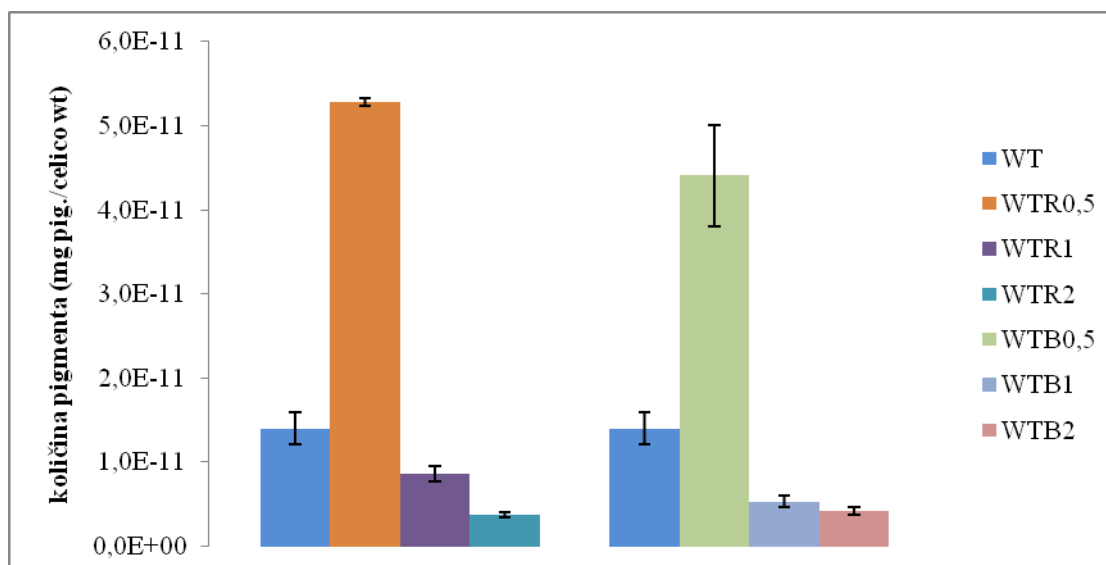
Slika 9: Primerjava začetnega deleža mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom v mešanici WTR1 in WTB1 s končnim deležem ustrezne mutante v kokulturi z divjim sevom. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.



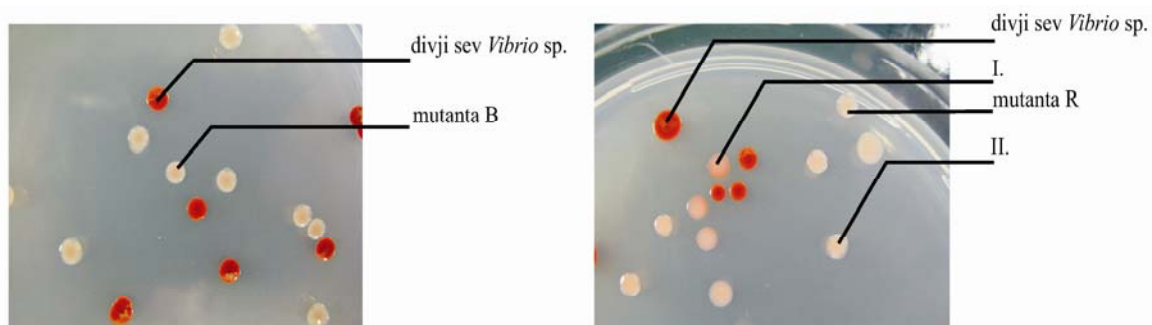
Slika 10: Primerjava začetnega deleža mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom v mešanici WTR1 in WTB1 s končnim deležem ustrezne mutante v kokulturi z divjim sevom. Kokultura je rasla v gojišču PKS z 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.

#### 4.3.2 Vpliv slanosti na pigmentiranost divjega seva *Vibrio* sp. v kokulturi z nepigmentiranima mutantama R ali B

Ob gojenju celic v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl se v kokulturi z mutanto količina pigmenta divjega seva *Vibrio* sp. na celico divjega seva *Vibrio* sp. zmanjša v primerjavi s čisto kulturo divjega seva (Slika 11, priloga D1). V primeru ko je začetni delež nepigmentiranih mutant manjši od divjega seva (WTR0,5 in WTB0,5), je količina pigmenta močno povečana, tako se v kokulturi z mutanto R količina pigmenta poveča za približno 3,8-krat, medtem ko se v kokulturi z mutanto B poveča za 3,15-krat. Razliko med količinama ekstrahiranega pigmenta iz kokulture divjega seva in mutante B oziroma divjega seva in mutante R lahko povežemo tudi z opažanji na sliki 12. Na sliki 12 vidimo, da se kolonije mutante R v bližini divjega seva obarvajo (I.). Kolonije mutante R, ki niso v bližini, ostanejo neobarvane (II.). Leva plošča predstavlja kokulturo divjega seva *Vibrio* sp. ter mutante B. V tem primeru mutanta B ni v nobenem primeru obarvana.

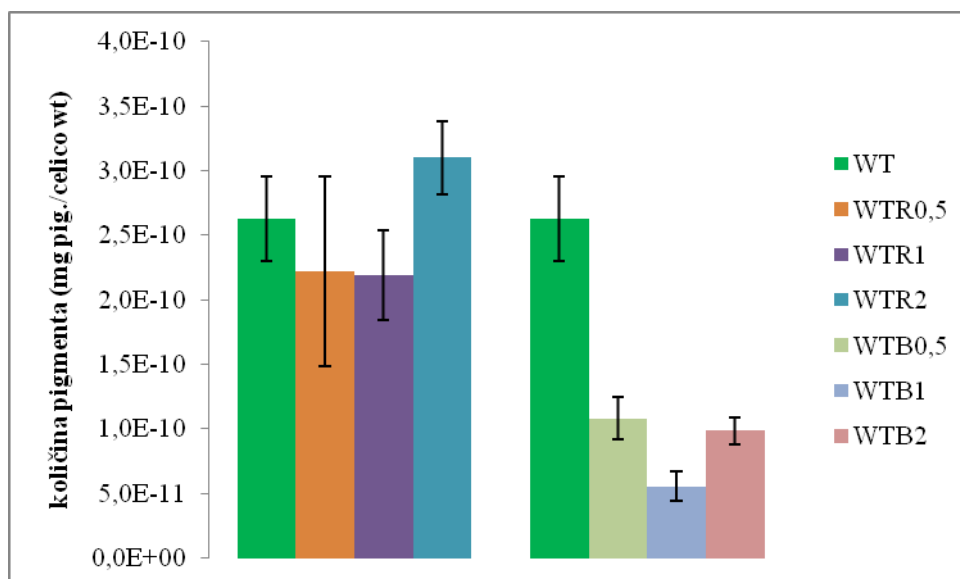


Slika 11: Količina pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp. ter kokultur divjega seva z mutanto v različnih razmerjih. Kulture so rasle v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.



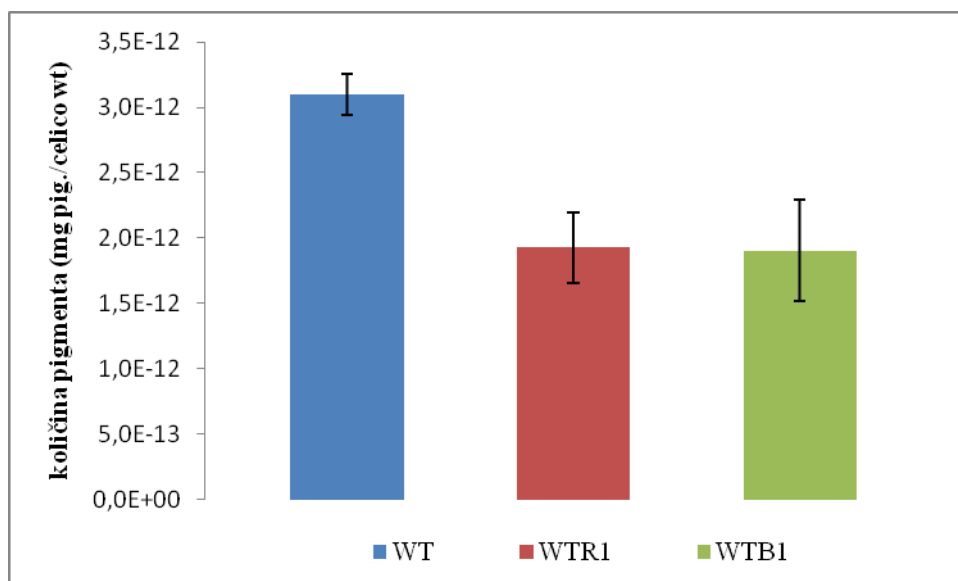
Slika 12: Plošči PKS (3% (w/V) NaCl) s kokulturo mutante B z divjim sevom (levo) ter kokulturo mutante R z divjim sevom (desno), redčitev  $10^{-8}$  (Benko, 2009).

V primeru gojišča M9 je količina ekstrahiranega pigmenta v vseh primerih višja kot v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl (Slika 13, priloga D2). Količina pigmenta divjega seva v kokulturi z mutanto R se ne spreminja značilno v primerjavi s čisto kulturo, medtem ko je količina pigmenta divjega seva v kokulturi z mutanto B nižja v vseh uporabljenih razmerjih v primerjavi s čisto kulturo divjega seva *Vibrio* sp. (Slika 13) in narašča s padanjem začetnega volumskega deleža mutante B.



Slika 13: Količina pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp., ter kokultur divjega seva z mutanto v različnih razmerjih. Kulture so rasle v gojišču M9 s 5g/L glukoze pri 28 °C.

Ko slanost povečamo, (gojišče PKS z 10% (w/V) NaCl) (Slika 14, priloga D3) je količina ekstrahiranega pigmenta manjša kot v primeru gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl. V primeru čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp. v gojišču PKS s 10% (w/V) NaCl smo ekstrahirali 4,5 krat manj pigmenta kot v primeru gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl, v primeru mešanice WTR1 4,4 krat manj kot pri WTR1 pri optimalni slanosti in v primeru mešanice WTR1 2,8-krat manj pigmenta kot pri WTB1 pri optimalni slanosti.



Slika 14: Količina pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp. ter kokultur divjega seva z mutanto R ali B v mešanici WTR1 in WTB1. Kulture so rasle v gojišču PKS z 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilj diplomskega dela je preučiti vpliv divjega seva *Vibrio* sp. na konkurenčno sposobnost nepigmentiranih mutant (R in B). V ta namen smo gojili mutanto in divji sev v kokulturi ter ugotavljali vpliv prisotnosti divjega seva *Vibrio* sp. na rast in konkurenčno sposobnost nepigmentiranih mutant ter preučili ali začetni delež mutante v kokulturi z divjim sevom vpliva na konkurenčno sposobnost mutante pri različnih okoljskih pogojih.

### 5.1 RAST NEPIGMENTIRANIH SEVOV *Vibrio* sp. V KOKULTURI Z DIVJIM SEVOM *Vibrio* sp. DSM14379

Pokazali smo, da prisotnost divjega seva *Vibrio* sp. ne vpliva na rast rahlo rožnate mutante (R) ter bele (B) mutante (Slika 4). Prisotnost divjega seva ne vpliva ne na hitrost rasti ( $\mu$ ) niti na nosilnost okolja (K) (Preglednica 3). Višja optična gostota pri 650 nm je verjetno posledica večjega začetnega volumna celic v kokulturah. Prav tako ne moremo trditi, da divji sev *Vibrio* sp. vpliva na lag fazo rasti kokultur, saj je bolj strma začetna faza v primeru kokultur zelo verjetno posledica večje začetne biomase in ne krajše lag faze. Težava z meritvijo optične gostote je, da ne moremo ločiti med prispevkom mutante in divjega seva. V kokulturi obstaja možnost dopolnjevanja pri rasti v kokulturi (npr. divji sev lahko raste počasneje, mutanta hitreje) in zato ni opazne spremembe v optični gostoti. V naših poskusih predpostavljamo, da je edina razlika med mutantama in divjim sevom v sposobnosti sinteze pigmenta, vendar ga divji sev prične sintetizirati šele v pozni stacionarni fazi, kar verjetno razloži odsotnost razlik v eksponentni fazi rasti. Da bi to potrdili, bi morali OD<sub>650</sub> kultur meriti dalj časa, a bi se posledično soočili s problemom propadanja kultur.

### 5.2 VPLIV PIGMENTIRANEGA DIVJEGA SEVA *Vibrio* sp. NA NEPIGMENTIRANE MUTANTE

Rezultati na slikah 5 in 6 kažejo, da je konkurenčna sposobnost mutant R ali B v kokulturi z pigmentiranim sevom *Vibrio* sp. odvisna od začetnega deleža mutant v kokulturi. Pokazali smo, da z višanjem začetnega deleža mutante R oziroma mutante B njuna konkurenčna sposobnost pada. Isto navajajo tudi Ross-Gillespie in sodelavci (2007), ki opisujejo, da se konkurenčna sposobnost prevaranta znižuje z višanjem začetnega deleža prevaranta ter s sorodnostjo v populaciji ( $r$ ) (Slika 2, A). Oziroma, če predpostavimo, da sta mutanti v populaciji prevaranta, se v primeru visoke zastopanosti prevarantov v populaciji zniža

sorodnost populacije. Tako divji sev ne sodeluje več s prevaranti, ki posledično ne more več izkoriščati javnih dobrin, ki jih divji sev sintetizira.

Na slikah 7 in 8, ki prikazujeta odvisnost med začetnim ter končnim razmerjem med mutanto R ali B in divjim sevom *Vibrio* sp., diagonala loči točke, ki predstavljajo kokulture, v katerih je mutanta rastle bolje kot divji sev *Vibrio* sp., od tistih, kjer je divji sev uspeval bolje kot nepigmentirana mutanta R ali B. Odstopanje od diagonal torej kaže na prisotnost ali odsotnost interakcij (soodvisnot) mutante z divjim sevom. Glede na dobljene rezultate lahko trdimo, da je opazna pozitivna interakcija med divjim sevom in mutantama v gojišču M9 s 5 g/L glukoze, verjetno zaradi lažje dostopnih hranil. V gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl je interakcija med divjim sevom in mutanto R nevtralna, med divjim sevom ter mutanto B pa negativna. Torej, več kot je mutante B, manj koristi ima od divjega seva in zato slabše raste.

### 5.3 VPLIV SLANOSTI NA KONKURENČNO SPOSOBNOST NEPIGMENTIRANIH MUTANT

Iz rezultatov (Sliki 9 in 10) je razvidno, da okolje vpliva na konkurenčno sposobnost mutante R in B. V ekstremnem okolju (Slika 10), ki ga predstavlja gojišče PKS z 10% (w/V) NaCl, mutanti v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. preživita v manjšem končnem deležu kot v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl (Slika 9).

Podobne rezultate kot na sliki 9 navajajo tudi Diggle in sodelavci (2007b), ki so primerjali rast signal negativnih prevarantov oziroma signal slepih prevarantov v kokulturi z divjim tipom *Pseudomonas aeruginosa* (Slika 1). Ker se v našem primeru v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri mutanti R začetno in končno stanje v okviru eksperimentalne napake ne razlikujeta, pri mutanti B pa je končno stanje nižje, bi lahko sklepali, da je mutanta R v našem primeru signal negativni prevarant, ki signala ne sintetizira, a nanj odgovarja. Mutanta B bi lahko bila signal slepi prevarant, ki na signal ne odgovarja.

Domnevo o signal negativnem in slepem prevarantu lahko povežemo tudi z rezultati na slikah 11 in 13. V primeru, da imamo v kokulturi velik volumen mutant (WTR1, WTR2 in WTB1, WTB2) deluje prisotnost mutant zaviralno na sintezo pigmenta divjega seva tako v gojišču PKS s 3% (w/V) kot v gojišču PKS z 10% (w/V) NaCl (Slika 14). Možno je, da se v primeru večjega volumna kokultur, signal, ki je potreben za sintezo pigmenta in ga sintetizira le divji sev *Vibrio* sp., redči in se tako sinteza pigmenta tudi zmanjša. To lahko povežemo z navajanji West-a in sodelavcev (2006b, priloga E), ki so pokazali, da je produktivnost kokulture kooperativnega osebka ter prevaranta nižja kot produktivnost populacije, sestavljene le iz kooperativnih osebkov. Podobno navajajo tudi Ross-Gillespie in sodelavci (2007) (Slika 2, B). Pri nizkih začetnih koncentracijah mutant v kokulturi (WTR0,5 in WTB0,5) sinteza pigmenta iz še nepojasnjenih razlogov močno naraste ne glede na vrsto mutante. Še bolj



nenavadno je obnašanje v gojišču M9 s 5g/L glukoze, kjer zaviralni učinek mutante R na sintezo pigmenta izgine, a ni porasta sinteze pigmenta pri majhnih začetnih deležih mutant. V tem tipu gojišča in pri tej mutanti je verjetno večja produkcija pigmenta divjega seva posledica lažje dostopnih hranil (glukoza). Tudi Starič (2007) navaja, da je v primeru gojišča M9 s 5 g/L glukoze, količina ekstrahiranega pigmenta divjega seva večja kot v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl. Če primerjamo sliki 11 (gojišče PKS s 3% (w/V) NaCl) in 14 lahko vidimo, da je v primeru slike 14 (gojišče PKS z 10% (w/V) NaCl) količina ekstrahiranega pigmenta v vseh primerih nižja kot na sliki 11. V gojišču PKS z 10% (w/V) NaCl divji sev namreč sintetizira 31 krat manj pigmenta kot v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl (Starič, 2007).

Rezultati, ki so prikazani v tej diplomski nalogi predstavljajo začetek raziskovanja vpliva bližnjih sorodnikov na sintezo pigmenta. Rezultati so zanimivi, saj kažejo na to, da je sinteza pigmenta kot je že poznano uravnana in odvisna od signalnih molekul, poleg tega je odvisna tudi od okoljskih dejavnikov, kar je manj znano dejstvo ter od prisotnosti bližnjih sorodnih vrst, kar je povsem na novo odprta tema.

## 5.4 SKLEPI

Z našimi eksperimenti smo potrdili, da:

- divji sev *Vibrio* sp. DSM14379 v kokulturi z nepigmentirano mutanto ne vpliva na eksponentno fazo rasti nepigmentiranih mutant R in B
- na rast mutante R in mutante B v prisotnosti pigmentiranega seva *Vibrio* sp. v gojišču vpliva tudi okolje
- konkurenčna sposobnost mutante R oziroma B je odvisna od začetnega deleža ustrezne mutante v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp.
- konkurenčna sposobnost mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. se znižuje z večanjem njenega začetnega deleža v kokulturi
- mutanta B bi lahko bila signal slepi prevarant, mutanta R signal negativni prevarant

## 6 POVZETEK

Pojavi sodelovanja med mikroorganizmi so danes že povsem sprejeti koncepti (Velicer, 2003). Že leta 1963 je Hamilton opisal pojav altruizma med mikroorganizmi (Hamilton, 1963), ki ga je kasneje Crespi opredelil kot dejanje, ki škoduje osebk, ki ga izvrši, a pozitivno vpliva na osebek, ki mu je bilo to dejanje namenjeno (Crespi, 2001). Hamilton je pojav altruizma poimenoval teorija inkluzivnega fitnesa (konkurenčne sposobnosti) (Hamilton, 1963). Tako torej ta oblika sodelovanja negativno vpliva na neposredno konkurenčno sposobnost ali fitnes, ki predstavlja zmožnost proizvajanja lastnih potomcev (West in sod., 2007a). Hkrati altruizem vpliva tudi na posreden fitnes posameznika, ki mu je bilo altruistično dejanje namenjeno (West in sod., 2007a). Seštevek posrednega ter neposrednega fitnesa se imenuje inkluzivni fitnes (inclusive fitness) (West in sod., 2007b). Ker altruistična oblika stika negativno vpliva na aktiven osebek, Hamilton (1963) navaja, da se ta oblika sodelovanja pojavlja predvsem med sorodniki. Prav zaradi tega je teorijo inkluzivnega fitnesa Maynard Smith preimenoval v bolj znano teorijo o izboru na podlagi sorodstva (kin selection theory) (Foster in sod., 2005). Tako torej nosilcu gena, ki je bil izbran v selekciji, ni potrebno zvišati neposreden fitnes, saj ga lahko v naslednje generacije prenaša tudi preko sorodnikov, ki nosijo isti gen (Hamilton, 1964). V razmerjih, kjer ima prejemnik korist s strani drugega osebk, se lahko hitro pojavijo prevaranti, ki niso kooperativni, a uživajo vse dobrine altruistične oblike stika (Stevens in Hauser, 2004). Diggle in sod. (2007b) delijo prevarante na signal negativne ter na signal slepe.

V diplomski nalogi smo preučevali divji sev *Vibrio* sp. DSM14379 ter njegov vpliv na nepigmentirana seva *Vibrio* sp.–mutanto R ter mutanto B. V ta namen smo v različnih tekočih gojiščih gojili čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp. oziroma mutant R ali B ter kokulture divjega seva *Vibrio* sp. z eno izmed mutant v različnih razmerjih. Preverjali smo vpliv divjega seva na rast mutant v kokulturi, produkcijo pigmenta divjega seva v kokulturi z mutanto ter spremembe konkurenčne sposobnosti mutante v kokulturi z divjim sevom.

Dobljeni rezultati kažejo, da prisotnost divjega seva *Vibrio* sp. ne vpliva na eksponentno fazo rasti mutante R in mutante B. Relativni fitnes se z višanjem začetnega deleža mutante v kokulturi z divjim sevom znižuje, prav tako je odvisen tudi od okolja. Količina pigmenta v kokulturi je odvisna od deleža mutante v tej kokulturi in se z višanjem deleža mutante znižuje. Iz dobljenih rezultatov domnevamo, da je mutanta R signal negativni prevarant in mutanta B signal slepi prevarant.

## 7 VIRI

- Bennett J.W., Bentley R., 2000. Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 1-32.
- Cang S., Sanada M., Johdo O., Nagamatsu Y., Yoshimoto A. 2000. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology Letters*, 22: 1761-1765.
- Castro A.J., Gale G.R., Means G.E., Tertzakian G. 1967. Antimicrobial properties of pyrrole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 10: 29-32.
- Crespi B.J. 2001. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 4: 178-183.
- Danevčič T., Rilfors L., Štrancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8.
- Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetske metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 94 str.
- Diggie S.P., Gardner A., West S.A., Griffin A.S. 2007a. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philosophical transactions of the Royal Society B – Biological Sciences*, 362, 1483: 1241-1249.
- Diggie S.P., Griffin A.S., Campell G.S., West S.A. 2007b. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature Letters*, 450: 411-414.
- Diggie S.P., West S.A., Gardner A., Griffin A.S. 2008. Communication in bacteria. V: *Sociobiology of communication: an interdisciplinary perspective*. Huges D., D'Etorre P. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 11-31.
- Dunny G.M., Brickman T.J., Dworkin M. 2008. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *BioEssays*, 30: 296-298.
- Elena S.F., Lenski R.E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature*, 4: 457-469.
- Fineran P.C., Slater H., Everson L., Hughes K., Salmond G.P.C. 2005. Biosynthesis of tripyrrole and  $\beta$ -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Molecular Microbiology*, 6, 56: 1495-1517.
- Firm R.D., Jones C.G. 2000. The evolution of secondary metabolism – a unifying model. *Molecular Microbiology*, 37, 5: 989-994.

- Foster K.R., Wenseleers, Ratnieks F.L.W. 2005. Kin selection is the key to altruism. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 2: 57-60.
- Foster K.R., Wenseleers T., Ratnieks F.L.W. 2001. Spite: Hamilton's unproven theory. *Annales Zoologici Fennici*, 38: 229-238.
- Foster K.R., Parkinson K., Thompson C.R.L. 2006. What can microbial genetics teach sociobiology. *Trends in Genetics*, 23, 2: 74-80.
- Gera C., Srivastava S. 2006. Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. *Current Science*, 90, 5: 666-677.
- Gerber N.N. 1971. Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri*. *Journal of Antibiotics*, 24, 9: 636-640.
- Giri A.V., Anandkumar N., Muthukumaram G., Pennathur G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: 11-11.
- Gnezda-Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2005. Host physiological status determines phage – like particle distribution in the lysate. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 1: 136-145.
- Hamilton W.D. 1963. The evolution of altruistic behavior. *American Naturalist*, 97, 896: 354-356.
- Hamilton W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour II. *Journal of Theoretical Biology*, 7: 17-52.
- Harris A.K.P., Williamson N.R., Slater H., Cox A., Abbasi S., Foulds I., Simonsen H.T., Leeper F.J., Salmond G.P.C. 2004. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*, 150: 35547- 3560.
- Harrison F., Browning L.E., Vos M., Buckling A. 2006. Cooperation and virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. *BMC Biology*, 4: 21.
- Hense B.A., Kuttler C., Müller J., Rothballer M., Hartmann A., Kreft J.U. 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum-sensing. *Nature*, 5: 230-239.
- Huh J.E., Yim J.H., Lee H.K., Moon E.Y., Rhee D.K., Pyo S. 2007. Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF- $\kappa$ B activation in murine peritoneal macrophages. *International Immunopharmacology*, 7: 1825-1833.
- Kümmerli R., Jiricny N., Clake L.S., West S.A., Griffin A.S. 2008. Phenotypic plasticity of cooperative behaviour in bacteria. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 3: 589-598.

- Ross-Gillespie A., Gardner A., West S.A., Griffin A.S. 2007. Frequency dependence and cooperation: Theory and test with bacteria. *American Naturalist*, 170, 3: 331-342.
- Schaible U.E., Kaufmann S.H.E. 2004. Iron and microbial infection. *Nature*, 2: 946-953.
- Slater H., Crow M., Everson L., Salmond G.P.C. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Molecular Microbiology*, 2, 47: 303-320.
- Starič N. 2007. Vpliv okoljskih faktorjev na produkcijo barvila naravnega izolata *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 37 str.
- Stevens J.R., Hauser M.D. 2004. Why be nice? Psychological constraints on the evolution of cooperation. *Trends in Cognitive Sciences*, 8, 2: 60-65.
- Štraser A. 2008. Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.
- Travisano M., Velicer G.J. 2003. Strategies of microbial cheater control. *Trends in Microbiology*, 12, 2: 72-78.
- Velicer G.J. 2003. Social strife in the microbial world. *Trends in Microbiology*, 11, 7: 330-337.
- Visca P., Imeri F., Lamont I.L. 2006. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15, 1: 22-30.
- West S.A., Buckling A. 2002. Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proceedings of the Royal Society London Series B*, 270: 37-44.
- West S.A., Griffin A.S., Gardner A. 2006a. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, string reciprocity and group selection. *European Society for Evolutionary Biology*, 20: 115-132.
- West S.A., Griffin A.S., Gardner A., Diggle S.P. 2006b. Social evolution theory for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 597-607.
- West S.A., Diggle S.P., Buckling A., Gardner A., Griffin A.S. 2007a. The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 38:53-77.
- West S.A., Griffin A.S., Gardner A. 2007b. Evolutionary Explanations for Cooperation. *Current Biology*, 17, 16: R661-R672.
- Williams R.P. 1972. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 25, 3: 396-402.

Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P.C. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature reviews Microbiology*, 56, 4: 887-899.

## ZAHVALA

Iskrena hvala mojemu mentorju prof. dr. Davidu Stoparju, ki si je vedno z veseljem vzel čas zame in moje rezultate ter mi s svojimi nasveti ter ugotovitvami zelo pomagal, tako pri obdelavi podatkov kot pri pisanju diplome.

Ta diplomska naloga nikoli ne bi bila v takšni obliki brez moje somentorice asist. dr. Tjaše Danevčič, ki je kljub temu, da je vedno zasuta z delom, našla čas zame in mi potrpežljivo odgovarjala na čisto vsa moja vprašanja, mi svetovala ter me vodila pri zastavljanju eksperimentov. Tjaša, hvala ti za vse, res si zlata.

Nejc, Špela in Luka, hvala za ves smeh, pogovore in nasvete. Tjaša, hvala za družbo in vse kavice. Simona, hvala, da si mi vedno pomagala in mi posojala PKS gojišča. Hvala še vsem ostalim iz katedre za Mikrobiologijo (oddelek za živilstvo).

Zahvaljujem se tudi prof.dr. Darji Žgur Bertok za recenzijo moje diplome ter predsednici komisije za zagovor diplomskega dela prof. dr. Ines Mandić-Mulec za posvečen čas in trud.

In seveda vsem profesorjem in profesoricam, ki so mi tekom mojega študija razkrivali svet mikroorganizmov ter me vsako leto bolj navdušili nad mojim študijem.

Zahvalila bi se še Alji za vse napotke, vse sprehode s Tigo in Taro.

Navsezadnje bi se zahvalila še mojim staršem, ki so najboljši starši na svetu. Hvala vama za vse kar sta mi omogočila, kar sta naredila iz mene, za podporo in prijateljstvo. Posebej hvala tudi mojemu fantu Matiji za prelepa skupna leta, skupno načrtovanje prihodnosti in vso ljubezen, ki mi jo daješ.



## PRILOGE

Priloga A: Optična gostota (OD pri 650 nm) monokultur in kokultur divjega seva *Vibrio* sp. in nepigmentiranih mutant R in B po določenem času (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ur stresanja) v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C. Rezultati so podani kot povprečja in standardne napake 3 neodvisnih gojenj mono in kokultur.

		OD650		st. nap.					
čas (h)	WT	$\bar{\sigma}$	R	$\bar{\sigma}$	B	$\bar{\sigma}$	WTR1	$\bar{\sigma}$	
0	0,015	0,005	0,024	0,019	0,011	0,008	0,032	0,016	
1	0,032	0,008	0,033	0,001	0,031	0,014	0,065	0,011	
2	0,125	0,004	0,120	0,005	0,127	0,004	0,214	0,013	
3	0,320	0,023	0,319	0,017	0,323	0,013	0,494	0,025	
4	0,693	0,033	0,697	0,019	0,703	0,028	0,845	0,023	
5	0,923	0,015	0,936	0,013	0,945	0,010	0,940	0,003	
6	0,976	0,002	0,972	0,005	0,980	0,012	0,987	0,006	
7	1,130	0,007	1,086	0,024	1,162	0,018	1,098	0,013	
čas (h)	WTR2	$\bar{\sigma}$	WTB1	$\bar{\sigma}$	WTB2	$\bar{\sigma}$			
0	0,047	0,005	0,045	0,009	0,042	0,006			
1	0,114	0,008	0,082	0,005	0,104	0,002			
2	0,289	0,015	0,238	0,009	0,308	0,014			
3	0,636	0,011	0,504	0,027	0,650	0,035			
4	0,932	0,006	0,878	0,020	0,933	0,007			
5	0,982	0,007	0,964	0,008	0,984	0,012			
6	1,016	0,010	0,991	0,018	1,022	0,011			
7	1,116	0,008	1,139	0,011	1,131	0,004			

Priloga B1: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante R ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.

	Začetni delež mutante, $X_1$	Končni delež mutante, $X_2$	Konkurenčna sposobnost, $W$
WTR1	0,737	0,496	1,291
	0,280	0,687	1,067
	0,435	0,556	1,005
	0,565	0,510	1,017
	0,572	0,674	0,897
	0,362	0,449	1,071
WTR2	0,606	0,462	1,041
	0,722	0,825	0,718
	0,728	0,629	1,177
	0,532	0,582	0,977
WTR0,5	0,278	0,520	1,244
	0,393	0,330	0,926
	0,308	0,325	1,029
	0,308	0,357	1,077
WTR0,2	0,156	0,161	1,029
WTR0,1	0,087	0,201	2,029
WTR1,5	0,419	0,532	1,023
	0,700	0,549	1,179

Priloga B2: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante R ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.

Začetni delež mutante, $X_1$	Končni delež mutante, $X_2$	Konkurenčna sposobnost, $W$
0,263	0,526	1,287
0,541	0,466	1,002
0,563	0,581	0,990
0,693	0,860	0,565
0,583	0,900	0,370
0,693	0,788	0,786
0,583	0,750	0,771

Priloga B3: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante B ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.

	Začetni delež mutante, $X_1$	Končni delež mutante, $X_2$	Konkurenčna sposobnost, $W$
WTB1	0,843	0,393	0,115
	0,675	0,525	0,355
	0,339	0,454	1,621
	0,584	0,609	1,111
	0,723	0,528	0,430
	0,563	0,521	0,847
WTB2	0,506	0,626	1,632
	0,738	0,618	0,575
	0,839	0,576	0,261
	0,720	0,683	0,836
WTB0,5	0,204	0,424	2,872
	0,413	0,428	1,064
	0,406	0,449	1,194
	0,406	0,421	1,065
WTB0,2	0,101	0,147	1,538
WTB0,1	0,061	0,052	0,844
WTB1,5	0,696	0,567	0,572
	0,792	0,794	1,009

Priloga B4: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante B ter izračunana sprememba konkurenčne sposobnosti ( $w$ ) glede na deleže iste mutante. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.

Začetni delež mutante, $X_1$	Končni delež mutante, $X_2$	Konkurenčna sposobnost, $W$
0,403	0,300	0,635
0,709	0,802	1,666
0,749	0,773	1,147
0,733	0,834	1,841
0,434	0,738	3,668
0,733	0,165	0,072
0,434	0,536	1,505

Priloga B5: Izračunano začetno ter končno razmerje med mutanto R in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.

	Začetno razmerje, $X_1/(1-X_1)$	Končno razmerje, $X_2/(1-X_2)$
<b>WTR1</b>	2,809	0,984
	0,388	2,194
	0,769	1,251
	1,296	1,042
	1,335	2,068
	0,568	0,815
<b>WTR2</b>	1,538	0,857
	2,593	4,726
	2,671	1,695
	1,135	1,393
<b>WTR0,5</b>	0,384	1,083
	0,648	0,492
	0,445	0,481
	0,445	0,556
<b>WTR0,2</b>	0,185	0,193
<b>WTR0,1</b>	0,095	0,251
<b>WTR1,5</b>	0,721	1,138
	2,334	1,216

Priloga B6: Izračunano začetno ter končno razmerje med mutanto R in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.

	Začetno razmerje, $X_1/(1-X_1)$	Končno razmerje, $X_2/(1-X_2)$
<b>WTR1</b>	0,356	1,111
	1,177	0,871
	1,290	1,385
<b>WTR2</b>	2,260	6,167
	1,398	9,000
<b>WTR0,5</b>	2,260	3,714
	1,398	3,000

Priloga B7: Izračunano začetno ter končno razmerje med mutanto B in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C.

	Začetno razmerje, $X1/(1-X1)$	Končno razmerje, $X2/(1-X2)$
<b>WTB1</b>	5,356	0,647
	2,079	1,106
	0,513	0,831
	1,405	1,560
	2,605	1,120
	1,286	1,090
<b>WTB2</b>	1,025	1,673
	2,810	1,617
	5,210	1,359
	2,571	2,150
<b>WTB0,5</b>	0,256	0,736
	0,702	0,748
	0,683	0,815
	0,683	0,727
<b>WTB0,2</b>	0,112	0,172
<b>WTB0,1</b>	0,064	0,054
<b>WTB1,5</b>	2,291	1,311
	3,814	3,848

Priloga B8: Izračunano začetno ter končno razmerje med mutanto B in divjim sevom *Vibrio* sp.. Kokultura je rasla v gojišču M9 s 5 g/L glukoze pri 28 °C.

	Začetno razmerje, $X1/(1-X1)$	Končno razmerje, $X2/(1-X2)$
<b>WTB1</b>	0,675	0,429
	2,438	4,063
	2,977	3,415
<b>WTB2</b>	2,739	5,042
	0,767	2,813
<b>WTB0,5</b>	2,739	0,197
	0,767	1,154

Priloga C: Začetni ( $x_1$ ) ter končni ( $x_2$ ) delež mutante R ali B v kokulturi z divjim sevom *Vibrio* sp. Kokultura je rasla v gojišču PKS s 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.

<b>WTR1</b>		<b>WTB1</b>	
Začetni delež, $X_1$	Končni delež, $X_2$	Začetni delež, $X_1$	Končni delež, $X_2$
0,516	0,412	0,557	0,405
0,516	0,338	0,557	0,396
0,540	0,287	0,492	0,275
0,516	0,421	0,557	0,357
0,522	0,364	0,541	0,358
0,006	0,032	0,016	0,030

povp  
6

Priloga D1: Količine ekstrakta pigmenta (mg pigmenta/celico wt) posameznih čistih kultur divjega seva *Vibrio* sp ter kokultur mutante R oziroma mutante B z divjim sevom *Vibrio* sp. v različnih razmerjih v gojišču PKS s 3% (w/V) NaCl pri 28 °C. V preglednici so podane se meritve ter povprečja in standardne napake količine ekstrahiranega pigmenta.

Količina ekstrahiranega pigmenta  
 (mg pigmenta/celico wt)

<b>WT</b>	<b>WTR1</b>	<b>WTR2</b>	<b>WTR0,5</b>	
8,09E-12	1,06E-11	4,36E-12	5,16E-11	
8,64E-12	1,01E-11	4,68E-12	5,37E-11	
8,59E-12	1,13E-11	3,06E-12	5,44E-11	
8,61E-12	5,88E-12	3,45E-12	5,17E-11	
9,87E-12	6,83E-12	3,41E-12	5,33E-11	
1,02E-11	6,89E-12		5,21E-11	
7,57E-12				
8,27E-12				
8,38E-12				
8,18E-12				
8,51E-12				
8,61E-12				
2,85E-11				
2,91E-11				
2,81E-11				
2,11E-11				
2,13E-11				
2,10E-11				
1,40E-11	8,60E-12	3,79E-12	5,28E-11	povprečje
1,93E-12	9,52E-13	3,09E-13	4,75E-13	б
<b>WTB1</b>	<b>WTB2</b>	<b>WTB0,5</b>		
6,72E-12	4,61E-12	5,53E-11		
6,96E-12	4,79E-12	5,87E-11		
7,11E-12	4,51E-12	5,84E-11		
3,39E-12	1,93E-12	3,06E-11		
3,85E-12	4,44E-12	3,09E-11		
3,98E-12	4,73E-12	3,06E-11		
5,34E-12	4,17E-12	4,41E-11		povprečje
7,20E-13	4,50E-13	6,00E-12		б

Priloga D2: Količine ekstrakta pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture divjega seva *Vibrio* sp ter kokultur mutante R oziroma mutante B z divjim sevom *Vibrio* sp. v različnih razmerjih v gojišču M9 z 5 g L<sup>-1</sup> glukoze pri 28 °C. V preglednici so podane vse meritve ter povprečja in standardne napake količine ekstrahiranega pigmenta.

Količina ekstrahiranega pigmenta  
 (mg pigmenta/celico wt)

<b>WT</b>	<b>WTR1</b>	<b>WTR2</b>	<b>WTR0,5</b>	
1,04E-10	1,66E-10	3,49E-10	1,79E-10	
9,58E-11	1,61E-10	3,81E-10	1,94E-10	
1,07E-10	1,55E-10	3,83E-10	1,96E-10	
4,58E-10	4,12E-10	2,33E-10	5,76E-10	
4,52E-10	3,92E-10	2,65E-10	1,19E-10	
4,45E-10	4,11E-10	2,48E-10	7,03E-11	
1,68E-10	8,82E-11			
1,67E-10	9,38E-11			
1,87E-10	9,38E-11			
1,77E-10	2,1E-10			
1,88E-10	2,29E-10			
1,93E-10	2,17E-10			
2,2E-10				
2,24E-10				
2,13E-10				
4,38E-10				
4,48E-10				
4,43E-10				
2,63E-10	2,19E-10	3,1E-10	2,22E-10	povprečje
3,28E-11	3,52E-11	2,8E-11	7,36E-11	σ
<b>WTB1</b>	<b>WTB2</b>	<b>WTB0,5</b>		
6,27E-12	1,1E-10	1,41E-10		
7,75E-12	1,16E-10	1,46E-10		
7,34E-12	1,16E-10	1,43E-10		
1,13E-10	6,2E-11	6,28E-11		
1,14E-10	1,18E-10	9,1E-11		
1,11E-10	6,87E-11	6,48E-11		
4,78E-11				
4,76E-11				
5,06E-11				
5,29E-11				
5,41E-11				
5,5E-11				
5,57E-11	9,85E-11	1,08E-10		povprečje
1,14E-11	1,06E-11	1,63E-11		σ



Priloga D3: Količine ekstrakta pigmenta (mg pigmenta/celico wt) čiste kulture *Vibrio* sp. ter kokultur mutante R oziroma mutante B z divjim sevom *Vibrio* sp. v različnih razmerjih v gojišče PKS s 10% (w/V) NaCl pri 28 °C.

Količina ekstrakta pigmenta  
(mg pigmenta/celico wt)

WT	WTR1	WTB1
2,66E-12	3,11E-12	3,11E-12
2,78E-12	3,31E-12	3,78E-12
3,00E-12	3,37E-12	3,32E-12
2,39E-12	2,10E-12	2,70E-12
2,52E-12	2,11E-12	3,16E-12
2,91E-12	2,14E-12	8,93E-13
3,60E-12	1,06E-12	8,54E-13
3,79E-12	8,38E-13	8,85E-13
4,08E-12	7,18E-13	5,74E-13
2,77E-12	1,61E-12	9,16E-13
3,64E-12	1,31E-12	7,64E-13
3,04E-12	1,47E-12	
3,10E-12	1,93E-12	1,91E-12
1,57E-13	2,70E-13	3,86E-13

povp

б

Priloga E: Prednosti in slabosti sinteze molekul za skupno dobro (West in sod., 2006b: 603). Slika a predstavlja rast populacije, ki jo gradijo le kooperativni osebki (cooperators) oziroma rast populacije, ki jo gradijo le prevaranti (cheats). Slika b predstavlja rast populacije, sestavljene iz kooperativnih osebkov in prevarantov v razmerju 1:1.

