

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja BORIC

**RAZVOJ NOVE METODE ZA MERJENJE
MIKROVISKOZNOSTI V MIKROBIOLOGIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja BORIC

**RAZVOJ NOVE METODE ZA MERJENJE MIKROVISKOZNOSTI V
MIKROBIOLOGIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR MEASUREMENT OF
MICROVISCOSITY IN MICROBIOLOGY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. V njem opisane raziskave in poskusi so bili opravljeni na Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani in Laboratoriju za eksperimentalno fiziko mehke snovi, Oddelek za fiziko, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je 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

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

Članica: dr. Tjaša Danevčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Borić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK: 579.26.043: 532.13.08(043) = 163.6
KG mikrobiološke tehnike/ viskoznost gojišča/ rast mikroorganizmov/ *Vibrio*/ merjenje viskoznosti/ optična pinceta
AV BORIĆ, Maja
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 RAZVOJ NOVE METODE ZA MERJENJE MIKROVISKOZNOSTI V MIKROBIOLOGIJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 32 str., 6 sl., 1 pril., 62 vir
IJ SI
JI SI/en
AI Viskoznost, ki je mera za odpornost tekočine na deformacijo, je eden izmed slabše raziskanih dejavnikov okolja, ki vplivajo na rast in aktivnost mikroorganizmov. Zato smo v diplomski nalogi razvijali novo metodo, ki bo omogočila boljše proučevanje viskoznosti lokalnega okolja mikroorganizmov. V nalogi smo uporabili optično pinceto za določanje enodelčne aktivne mikroeologije. Ugotovili smo, da se med rastjo bakterij viskoelastičnost lokalnega okolja bakterij spreminja nelinearno. Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 je v prekonočni kulturi v minimalnem gojišču bistveno bolj povečala viskoznost lokalnega okolja kot v bogatem gojišču. Zaustavljanje povečevanja mikroviskoznosti v gojišču korelira z začetkom povečane sinteze pigmenta. Elastičnost matriksa je nizka in v matriksu prihaja predvsem do spremembe viskoznosti. Ugotavljamo, da je optična pinceta uporabno orodje za analizo viskoznosti lokalnega okolja bakterij ter ima dovolj veliko občutljivost za uporabo v mikrobiologiji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC: 579.26.043: 532.13.08(043) = 163.6
CX microbiological techniques/ medium viscosity/ growth of microorganisms/ *Vibrio*/ measurement of viscosity/ optical tweezers
AU BORIĆ, Maja
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 DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR MEASUREMENT OF MICROVISCOSITY IN MICROBIOLOGY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 32 p., 14 fig., 1 app., 62 ref
LA SI
AL sl/en
AB Viscosity is a measure for resistance of liquid to deformation and is less studied environmental factor which influence growth and activity of microorganisms. In this study we were developing a new method, that could enable better study of viscosity of local environment of microorganisms. In graduation thesis we used optical tweezers to determine one-particle active microrheology. We found out that viscoelasticity during bacterial growth changes in a non-linear way. Bacteria *Vibrio* sp. DSM14379 in over night culture increased viscosity of local environment in minimal growth medium more compared to bacteria grown in rich medium. When the rate of viscosity increase diminished synthesis of prodigiosin-like pigment increased. Elasticity of matrix was low, so in matrix the main change was change of viscosity. Based on obtained data, we can assert that optical tweezer is a useful tool for studying viscosity of local environment of bacteria and that the sensitivity is sufficient for use in microbiology.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PRILOG.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 VISKOZNOST.....	3
2.1.1 Merjenje viskoznosti.....	3
2.2 OPTIČNA PINCETA.....	4
2.2.1 Uporaba optične pincete v mikrobiologiji.....	6
2.2.1.1 Proučevanje bakterijskih pilov in gibanja bakterij.....	6
2.2.1.2 Študije adhezije bakterijskih celic na površino.....	6
2.2.1.3 Identifikacija bakterij ali bakterijskih spor v vodni raztopini.....	8
2.2.1.4 Študije nukleinskih kislin.....	9
2.2.1.5 Prikaz mikroskopske viskoznosti okolja glive <i>Aureobasidium pullulans</i>.....	9
2.2.2 Merjenje mikroeologije z optično pinceto.....	10
2.3 NARAVNI BAKTERIJSKI IZOLAT <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.....	12
2.3.1 Prodigiozin.....	12
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	14
3.1 MATERIAL.....	14
3.1.1 Kemikalije.....	14
3.1.2 Gojišča in raztopine.....	14
3.1.2.1 Gojišče M9.....	14
3.1.2.2 Gojišče PKS.....	15
3.1.3 Sev.....	15
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur v zaprtem ravnem sistemu.....	15
3.2.2 Določanje optične gostote bakterijske kulture in števila celic s CFU.....	16
3.2.3 Uporaba optične pincete za določanje viskoelastičnih lastnosti bakterijske kulture.....	16
3.2.4 Ekstrakcija rdečega pigmenta bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.....	18
3.2.5 Določanje koncentracije pigmenta bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.....	18

4	REZULTATI.....	19
4.1	MIKROVISKOZNOST V BOGATEM IN MINIMALNEM GOJIŠČU.....	19
4.2	VISKOELASTIČNOST LOKALNEGA OKOLJA BAKTERIJ MED RASTJO	20
4.3	KORELACIJA MED PRODUKCIJO PIGMENTA IN VISKOZNOSTJO RASTNEGA MEDIJA	21
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	23
5.1	SKLEPI.....	25
6	POVZETEK.....	26
7	VIRI	28
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema optične pasti (Block, 2003)	5
Slika 2: Primerjava izmerjenih viskoznosti različnih bakterijskih vzorcev vzeti med različnimi fazami rasti bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 z različnimi mikroreologijami (Osterman, 2009).....	11
Slika 3: Primerjava viskoznosti lokalnega okolja bakterij v prekonočnih kulturah v PKS s 3 % NaCl in M9.....	19
Slika 4: Mikroviskoznost lokalnega okolja bakterij v različnih fazah bakterijske rasti.....	20
Slika 5: Elastičnost lokalnega okolja bakterij v različnih fazah bakterijske rasti.....	21
Slika 6: Korelacija med viskoznostjo lokalnega okolja bakterij in koncentracijo pigmenta med bakterijsko rastjo.....	22

KAZALO PRILOG

Priloga A: Koncentracija ekstrahiranega pigmenta (mg/L) prekonočne kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 gojene v minimalnem M9 in bogatem PKS s 3 % (w/V) NaCl gojišču

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFM	mikroskopija na atomsko silo
CFU	enote, iz katerih se je razvila posamezna kolonija
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zeelkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
M9	minimalno gojišče z M9 solmi
OD	optična gostota
PKS	gojišče pepton-krvasni ekstrakt
RNK	ribonukleinska kislina
w/V %	utežno volumski odstotek

1 UVOD

Mikroorganizmi so odvisni od svojega okolja in se nanj tudi intenzivno odzivajo. Glavni parametri, ki vplivajo na rast in aktivnost mikroorganizmov, kot so temperatura, pH, kisik, tlak in slanost, so dobro raziskani (Madigan in Martinko, 2006). Med manj poznanimi parametri, ki vplivajo na delovanje mikroorganizmov, je viskoznost. Bakterije s svojo aktivnostjo spreminjajo viskoznost okolice, kar je verjetno bistvenega pomena za njihovo preživetje in lahko koristno biotehnološko izrabimo (npr. izdelava jogurta, čistilne naprave). Težave pri proučevanju spreminjanja viskoznosti lokalnega okolja bakterij se pojavijo pri metodologiji, saj že znani reometri, ki se med seboj ločijo glede na geometrijo uporabljenega pritiska, niso uporabni za merjenje mikroviskoznosti. Zato bomo v diplomski nalogi razvijali novo metodo merjenja mikroviskoznosti v mikrobiologiji z optično pinceto. Optična pinceta je bila v mikrobiologiji že uporabljena za proučevanje gibljivosti bakterij (Merz in sod., 2000; Maier, 2005), študijo adhezije celic na površino (Liang in sod., 2000; Comesano in sod., 2006), določanje fizikalnih lastnosti pilov (Jass in sod., 2004), kot orodje za merjenje mikroviskoznosti okolja bakterij pa še ne.

V nalogi bomo kot modelni sistem uporabili naravni bakterijski izolat *Vibrio* sp. DSM14379, ki poznano producira zunajcelični polisaharidni matriks. Uporabili bomo novo razvita orodja za določanje viskoelastičnih lastnosti, meddelčnih potencialov in samourejanja v mehki snovi z magneto-optično pinceto, ki so jih naredili v Laboratoriju za eksperimentalno fiziko mehke snovi na Oddelku za fiziko, Fakultete za matematiko in fiziko (Osterman, 2009).

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA

Glavni cilj naloge je razvijanje nove metode za merjenje mikroviskoznosti lokalnega okolja bakterij. V nalogi želimo pokazati, da je optična pinceta primerno orodje za določanje viskoelastičnih lastnosti medija v katerem rastejo bakterije. Pričakujemo, da bo nova metoda dovolj občutljiva, da bo omogočala spremljanje spremembe mikroviskoznosti med gojenjem mikroorganizmov v zaprtem sistemu gojenja in da bomo z novo metodo lahko spremljali spremembe viskoznosti v realnem času.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- bakterije s svojo aktivnostjo spreminjajo viskoznost gojišča med rastjo v zaprtem sistemu gojenja
- bakterijska kultura različno spremeni viskoznost bogatega in minimalnega gojišča
- produkcija sekundarnih metabolitov (npr. prodigiozin) se začne šele ob zadostnem povečanju mikroviskoznosti okolja bakterij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VISKOZNOST

Viskoznost je mera za odziv tekočine na strižno deformacijo in podaja notranje trenje tekočine pri pretakanju. Od nje je odvisna hitrost pretakanja tekočine, saj se viskozne tekočine težje pretakajo in mešajo. Proučevanje toka snovi se imenuje reologija. V idealnih, neviskoznih kapljevinah ni strižnih sil. Plasti tekočine polzijo neovirano druga mimo druge. V realnih tekočinah pa temu ni tako, saj zaradi viskoznosti počasnejše plasti zadržujejo hitrejše. Tako nastane v smeri, ki je pravokotna na plasti tekočine, gradient hitrosti (strižna hitrost). Med sosednjima plastema deluje strižna sila (F), ki je sorazmerna velikosti stične ploskve S in strižni hitrosti. Pri ravnih plasteh, kjer se hitrost spreminja le v prečni smeri, je strižna hitrost enaka $\delta v/\delta y$, to je spremembi hitrosti na enoto prečne razdalje (Stepišnik, 1997). Torej velja

$$F = \eta \frac{\delta v}{\delta y} S. \quad \dots(1)$$

Sorazmernostni koeficient η imenujemo koeficient viskoznosti oziroma viskoznost. Enota zanjo je $1 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1} = \text{N s m}^{-2} = \text{Pa s}$ (pascal sekunda) (Stepišnik, 1997). Viskoznost je neodvisna od tlaka (razen pri izjemno visokih tlakih), močno pa je odvisna od temperature (Stepišnik, 1998). Z višanjem temperature se viskoznost tekočine manjša. Na mikroskopski skali igra viskoznost veliko vlogo v dinamiki fizikalnih, kemijskih in bioloških sistemov, na primer na dinamiko molekul proteinov in njihove interakcije z ostalimi molekulami. Tudi razumevanje difuzijskih in transportnih procesov v bližini in na površini celic, ki vplivajo na rast, zahteva znanje o viskoznosti ravnega medija (Nemet in sod., 2002).

2.1.1 Merjenje viskoznosti

Viskoznost lahko določimo na različne načine in na različnih prostorskih skalah.

Viskoznost na makroskopski prostorski velikostni skali določamo z:

- merjenjem pretoka kapljevine skozi kapilaro (Stepišnik, 1997)
- meritvijo časa padanja kroglice v viskozni tekočini (Stepišnik, 1997)

- merjenjem dušenja mehanskega nihanja (piezoelektrični oscilator) v tekočini (Stepišnik, 1997)
- vrtenjem koaksialnih valjev v viskozni tekočini (Stepišnik, 1997)

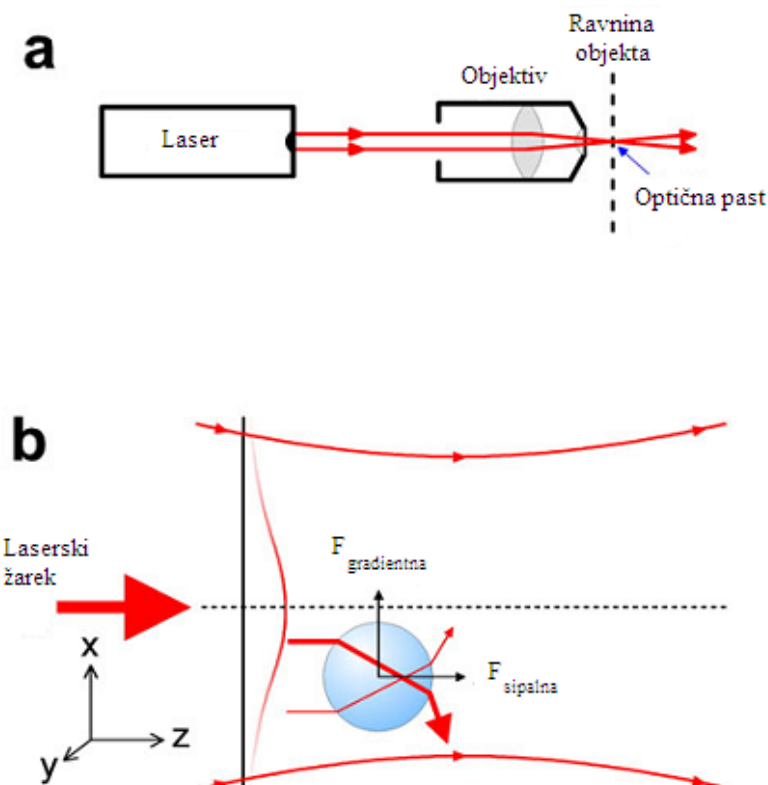
Za določanje viskoznosti z merjenjem materialnih lastnosti na mikroskopski velikostni skali uporabljamo:

- aktivne tehnike: podobne določanju viskoznosti pri klasični reologiji, na sondo delujemo s silo in merimo deformacijo medija (Osterman, 2009). Uporabljamo:
 - mikropipete (Evans in Skalak, 1980),
 - mikroskop na atomsko silo (Radmacher in sod., 1995),
 - optično pinceto (Valentine in sod., 1996)
 - mikreometer z magnetnimi kroglicami (Ziemann in sod., 1994; Amblard in sod., 1996; Bausch in sod., 1998).
- pasivne tehnike: spremljamo termične fluktuacije sond, ponavadi inertnih kroglic premera od nekaj deset nanometrov do nekaj mikrometrov, ki so vložene v merjeni material in iz njihove difuzije izračunamo linearni kompleksni strižni modul (Mason in sod., 1997; Gisler in Weitz, 1998).

2.2 OPTIČNA PINCETA

V nalogi bomo za mikreološke meritve uporabili optično pinceto. Optična pinceta je naprava, ki s pomočjo močno fokusiranega laserskega snopa omogoča brezkontaktno manipulacijo mikronskih in submikronskih delcev ter meritev sil v območju pikonewtonov (Osterman, 2009). Ashkin je leta 1970 pokazal, da mikronske delce z lomnim količnikom, večjim od okoliškega medija, optična sila povleče v središče močno fokusiranega laserskega snopa. Od leta 1986, ko so Ashkin, Chu in sodelavci razvili enožarkovno gradientno optično pinceto, ki omogoča ujetje delca v 3D prostoru (in ne samo ob površinah eksperimentalne celice), se tehnika stalno razvija (Osterman, 2009).

Optična past, s katero se ujamejo mikrodelci, je ustvarjena s fokusiranjem laserskega snopa z mikroskopskim objektivom. Na delec v pasti deluje optična sila, sestavljena iz dveh komponent: sipalne komponente (fotonski pritisk) v smeri širjenja žarka in gradientne komponente v smeri največjega gradienta intenzitete žarka. Če je gradientna komponenta večja od sipalne komponente, je delec ujet v točki, kjer se uravnotežijo sila teže, vzgon in optična sila (Osterman, 2009).



Slika 1: Shema optične pasti. (Block, 2003)

Optična pinceta je sestavljena iz treh glavnih elementov: laserja, sistema za krmiljenje laserskega snopa ter objektivu z veliko numerično aperturo. Pinceta je ponavadi postavljena na komercialni optični mikroskop, pri katerem gre laserski žarek od spodaj navzgor, saj tako gravitacijska sila deluje v nasprotno smer kot sipalna komponenta optične sile, kar omogoča stabilnejše ujetje delca v treh dimenzijah. Za krmiljenje laserskega snopa obstaja več načinov, npr. z zrcali na piezo elementih, prostorskim modulatorjem svetlobe (hologrfska optična pinceta) ali akusto-optičnimi deflektorji (Osterman, 2009).

2.2.1 Uporaba optične pincete v mikrobiologiji

2.2.1.1 Proučevanje bakterijskih pilov in gibanja bakterij

Z optično pinceto so raziskovali predvsem pile tipa IV, za katere je znano, da sodelujejo pri gibljivosti bakterij, tvorbi biofilmov, virulenci in vseh treh prokariontskih horizontalnih genskih prenosih (transformacija, konjugacija, transdukcija) (Merz in sod., 2000). Čeprav bi pričakovali, da so se raziskave osredotočile na najbolj poznano bakterijo *Escherichia coli*, je bila tu v središču pozornosti bakterija *Neisseria gonorrhoeae*, povzročiteljica gonoreje. Merz in sodelavci (2000) so v poskusih z optično pinceto ugotovili, da se bakterija *N. gonorrhoeae* obnaša socialno in se s pili tipa IV približuje z optično pastjo ujeti mikrokoloniji. Pri tem se pili tipa IV podaljšujejo in krajšajo ter s tem direktno omogočajo trzajoče (ang. »twitching«) gibanje bakterij po površini. Sile, s katerimi vlečejo bakterijo (ali kroglico, na katero so bakterije vezane), lahko presegajo 80 pN. Maier in sodelavci (2005) so predstavili hipotetičen model trzajočega gibanja bakterije *N. gonorrhoeae*, po katerem se pil bakterije najprej podaljša, nato pritrdi na podlago, potem pa skrajša, pri čemer povleče baterijo za seboj. Isti avtorji so objavili tudi študijo o hitrosti podaljševanja pilov, ki naj bi bila 350 ± 50 nm/s in pri silah večjih od 50 pN močno odvisna od sile vlečenja (Maier in sod., 2004).

2.2.1.2 Študije adhezije bakterijskih celic na površino

Pritrditev bakterije na gostiteljsko celico ali njene receptorje je zelo pomemben korak v patogenezi, prav tako pa je pomembno tudi pri pritrjevanju na druge površine pri nastanku biofilma. Za pritrnitev bakterij je v veliki večini primerov potreben biček ali pili, nekatere bakterije pa se lahko pritrjujejo zaradi njihovega zunajceličnega polisaharidnega matriksa. Raziskav adhezije bakterijskih celic na površino z optično pinceto ni bilo veliko. Glavna pomanjkljivost metode je maksimalna sila, ki jo lahko z optično pinceto izmerimo, 150 pN, za mnoge interakcije pa se pričakuje, da so sile večje (Camesano in sod., 2006).

Simpson in sodelavci (2002) so z optično pinceto merili adhezijsko silo med baterijsko celico (*Staphylococcus aureus* ali *S. epidermidis*) in proteinom fibronektin, ki je bil nanešen na kroglico s premerom 10 μm . Sevi *S. aureus* so imeli različne mutacije v izražanju proteinov, ki vežejo fibronektin (ang. fibronectin-binding proteins). Celico, ujeto z optično pinceto, so pripeljali do kroglice oblečene s fibronektinom. Potem so bakterijo različno hitro odmaknili od kroglice (bodisi takoj, bodisi po 20 sekundah), da so študirali časovno odvisnost interakcije. Izmerjene sile so bile v rangu med 15 in 26 pN, odvisno od obsega mutacije sevov.

Leta 2004 so Fällman in sodelavci uporabljali optično pinceto za proučevanje pilov P bakterije *Escherichia coli*, ki se izražajo pri 90 % sevov *E. coli*, ki povzročajo pielonefritis (infekcije zgornjega urinarnega trakta in ledvic), in jih zato smatrajo kot virulenčni dejavnik (Jass in sod., 2004). V raziskavi so merili adhezijsko silo med adhezinom pila P in njegovim Gal α 1 \rightarrow 4Gal β disaharidnim receptorjem, ki je prisoten na površini uroepitelnih celic. V raztopini so bile bakterije kovalentno vezane na večjo polistirensko kroglico, ki je bila pritrjena na krovno stekelce s hidrofobno interakcijo. Manjšo kroglico z receptorji za pile P so ujeli z optično pinceto in pripeljali v kontakt z bakterijskim pilom ujete bakterije na večji kroglici. Manjša kroglica je imela dva namena – predstavljala je površino za pritrditev pila, hkrati pa so na podlagi njenega premika iz središča optične pincete določili silo, ki je delovala na pile po premiku večje kroglice. Izmerjene sile so bile med 10 in 15 pN, ko so bile bakterije v stiku z manjšo kroglico le preko pilov, ter med 50 in 100 pN, ko so se bakterije stikale z manjšo kroglico (Fällman in sod., 2004).

Liang in sodelavci (2000) so proučevali FimH adhezin na koncih pilov tipa 1 bakterije *E. coli*, ki služi za vezavo na manozne skupine oligosaharidov na površini epitelijskih celic mehurja. Ta vezava je povezana s patogenostjo bakterije *E. coli*, ki je primarni povzročitelj infekcij urinarnega trakta. Merili so silo vezave bakterije *E. coli* na eritrocite morskih prašičkov, ki imajo manozne receptorje, tako, da so bakterijsko celico v optični pasti povlekli s hitrostjo, ki je pretrgala vez. Iz podatka o hitrosti so potem izračunali silo, s katero je bila bakterija *E. coli* vezana na eritrocit. Izmerjene sile so bile v območju med 3,5 in 18 pN.

2.2.1.3 Identifikacija bakterij ali bakterijskih spor v vodni raztopini

Chan in sodelavci (2004) so optično pinceto uporabili kot orodje za osamitev posameznega delca v raztopini, ki so ga nato analizirali z ramansko spektroskopijo. Slednja je analitično orodje za študij molekularne strukture in kemijske sestave, pri kateri za vsak tip delca dobimo različne ramanske spektre, na podlagi katerih lahko tipe delcev med seboj razlikujemo. V študiji so uporabili heterogeno vodno raztopino spor bakterije *Bacillus cereus*, silika kroglice in polistirenske kroglice. Rezultati so jasno ločili tri različne vrste delcev, iz podatkov pa so lahko dobili tudi relativno koncentracijo posameznega tipa delca v raztopini tako, da so analizirali 100 delcev naključno ujetih z optično pinceto, ki so jih nato analizirali z ramansko spektroskopijo v treh zaporednih eksperimentih. Na podlagi ramanskih spektrov so določili identiteto delca, iz deležev določenih delcev v vzorcih pa koncentracijo le-teh. Načrt za prihodnost je kombinacija optične pincete s principom pretočne citometrije, ki bi omogočala hitro identifikacijo bakterij in ostalih delcev v raztopinah. Sistem bi bil avtomatiziran in prilagojen na pretočni citometer, ki bi imel možnost ustavljanja toka skozi mikrokanal, ko bi laser zaznal prisotnost delca. Takrat bi se delec ujel z optično pastjo, potekla bi meritev ramanskega spektra, nato pa bi se tok zopet aktiviral, porinil analizirani delec iz pasti in omogočil analizo novega, kar bi se ponavljalo dokler se ne bi zbralo dovolj podatkov o vzorcu (Chan in sod., 2004).

Xie in sodelavci (2005) so metodo uporabili za identifikacijo šestih različnih vrst bakterij (*Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* in *Streptococcus salivarius*) v različnih rastnih fazah. Njihovi eksperimenti so obsegali gojenje posameznih kultur bakterij in kokultur, pa tudi sinhronizacijo celic po velikosti z gradientnim centrifugiranjem, da so bile raziskovane celice vse enako velike. Vsak vzorec so nato analizirali z metodo optične pincete in ramanske spektroskopije ter dobili spodbudne rezultate. Vrste bakterij so se po ramanskih spektrih dobro ločile, tudi če kulture niso bile sinhronizirane ali so bile v različnih fazah rasti. Analiza ramanskih spektrov različnih bakterijskih vrst bi lahko omogočila postavitve standardov, na podlagi katerih bi tekla hitra identifikacija organizmov, ki ne bi bila odvisna od gojitvenih ali molekularnih tehnik (Xie in sod., 2005).

2.2.1.4 Študije nukleinskih kislin

Bennink in Schärer sta leta 1999 z optično pinceto proučevala interakcije med DNK s proteinom RecA in molekulami barvila YOYO-1. Z optično pinceto sta ujela dve polistirenski kroglici, DNK je bila z enim koncec vezana na eno kroglico, z drugim pa na drugo. Vezava je bila preko povezovalca biotin-streptavidin. Merila sta silo, ki deluje na DNK in omogoča raztezanje molekule DNK, s čemer sta dobila podatke o elastičnosti molekule DNK. Ob dodatku proteina RecA se je molekula DNK dodatno raztegnila za 45 % svoje dolžine, ob dodatku barvila YOYO-1 pa za 10 do 20 % začetne dolžine (Bennink in Schärer, 1999). Elastično obnašanje dvovertične DNK je bilo ponazorjeno z modelom črvu-podobne verige (wormlike chain model), o konkretnih številkah pa avtorja ne govorita.

Silo in hitrost delovanja RNK polimeraze bakterije *Escherichia coli* sta merila Wang in Schnitzer (1998). Z optično pastjo sta delovala na kroglico s pritrjeno DNK molekulo. Ob prepisovanju z RNK polimerazo, ki je bila pritrjena na krovno stekelce, se je kroglica vezana na DNK premaknila iz središča pasti. Na podlagi premika sta ugotovila, da se RNK polimeraza bakterije *E. coli* premika vzdolž molekule DNK s hitrostjo večjo od 10 nukleotidov na sekundo, sila ob tem pa je bila večja od 14 pN (Wang in Schnitzer, 1998).

Berenike Maier in sodelavci (2004) so se posvetili vnosu gole bakterijske DNK v kompetentne celice bakterije *Bacillus subtilis*. DNK je bila vezana na kroglico, ki so jo ujeli z optično pinceto. Kompetentna celica je DNK skupaj s kroglico potegnila k sebi. Merili so silo, ko se je povezava med DNK in kroglice pretrgala. Sile so bile vedno večje od 20 pN. Pri transportu DNK v kompetentno celico *B. subtilis* je bil očitno vključen motor, ki proizvaja silo, s katero molekulo DNK vleče v celico (Maier in sod., 2004)

2.2.1.5 Prikaz mikroskopske viskoznosti okolja glive *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans je kvasovkam podobna gliva, ki izloča polisaharid pululan, kar poveča viskoznost okolja celic. Povečano viskoznost lahko zaznamo s konfokalnim mikroskopom in optično pinceto, kjer premikamo kroglico v vzorcu z optično pinceto z

določeno frekvenco naprej in nazaj (Nemet in sod., 2002). Zaradi viskoznosti začne kroglica zaostajati (fazni zaostanek) za optično pinceto, iz česar lahko določimo karakteristično časovno konstanto gibanja, ki je proporcionalna viskoznosti medija. Poleg teh analiz se s pomočjo skenirnega zrcala in meritve viskoznosti posname tudi slika, na kateri se vidi gradient viskoznosti v bližini pululan-producirajoče blastospore glive *A. pullulans*. Ta rezultat daje možnost izdelave distribucije viskoznosti materiala okoli celic, ki producirajo biopolimere (Nemet in sod., 2002).

2.2.2 Merjenje mikreologije z optično pinceto

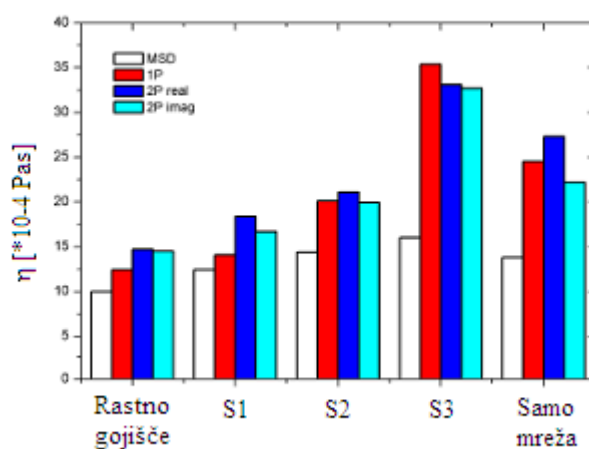
Do pred kratkim ni bilo postavljene metode, ki bi omogočala določanje mikreologije v mikrobioloških gojiščih. V primerjavi s klasično reologijo ima mikreologija več prednosti: potrebna je samo majhna količina vzorca (zadostuje že 1 μL), možna je meritev v nehomogenih okolij (npr. notranjosti evkariontske celice), dostopne so višje frekvence za manipulacijo (do 10^5 Hz; viskoznost je odvisna od frekvence, s katero delujemo na vzorec) (Osterman, 2009). Mikreologijo lahko dobimo z uporabo enodelčne mikreologije, kjer se viskoelastičnost določi iz gibanja ene same sonde, ali dvodelčne mikreologije, pri kateri analiziramo korelirano gibanje dveh (ali več) sond (Osterman, 2009).

Pri enodelčni pasivni mikreologiji je sonda ujeta v nepremični optični pasti, njene fluktuacije pa dajo informacijo o mehanskih lastnostih snovi, saj se iz zaporednih leg ujetega delca izračuna povprečen kvadrat odmika (Osterman, 2009). Če je snov pretrda in termične fluktuacije ne povzročijo zaznavne deformacije, se lahko uporabi enodelčna aktivna mikreologija, pri kateri je sonda ujeta v sinusno premikajoči optični pasti. Odziv sonde na oscilirajočo silo je odvisen od mehanskih lastnosti okoliškega medija. Njegov viskoelastični modul je moč izračunati iz izmerjenega razmerja amplitud in faznega zaostanka za lego pasti, torej iz odziva sonde na gibanje pasti (Osterman, 2009).

Enodelčna reologija poda pravilne rezultate samo v primeru, če je sonda večja od vseh struktur, ki jih imamo v mediju. Tej omejitvi se je moč izogniti z uporabo dvodelčne mikreologije, ki je neobčutljiva na lokalne nehomogenosti, saj meri mehanske lastnosti

materiala na dolžinski skali, ki je določena z razdaljo med obema delcema (Osterman, 2009). Pri dvodelčni aktivni mikroreologiji se uporabljata dve optični pasti, v vsaki pa je ujeta sonda. S harmoničnim spreminjanjem lege delca v prvi (trdi) pasti se aktivno deformira medij, delec v drugi (šibkejši) pasti pa je indikator deformacije medija na mestu pasti (Osterman, 2009). Kompleksni viskoelastični modul vzorca se določi iz odziva sonde na oscilirajočo silo, ki deluje na pogonski delec. Teoretičen opis odziva je nekoliko bolj zapleten kot pri enodelčni mikroreologiji.

V diplomski nalogi smo uporabili enodelčno aktivno mikroreologijo, saj so dobljeni rezultati primerljivi z rezultati dvodelčne mikroreologije in boljši od enodelčne pasivne mikroreologije, kar je razvidno iz slike 2, obenem pa za analizo podatkov s to metodo porabimo najmanj časa.



Slika 2: Primerjava izmerjenih viskoznosti različnih bakterijskih vzorcev vzeti med različnimi fazami rasti bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 z različnimi mikroreologijami. Enodelčna pasivna mikroreologija (MSD, bela), enodelčna aktivna mikroreologija (rdeča) in dvodelčna aktivna mikroreologija (modra – realni del, turkizna – imaginarni del dvodelčne odzivne funkcije). Legenda: rastno gojišče: čisto gojišče; S1: vzorec vzet v fazi prilagajanja bakterijske rasti; S2: vzorec vzet v eksponentni fazi bakterijske rasti; S3: vzorec vzet v stacionarni fazi bakterijske rasti; samo mreža: vzorec vzet v stacionarni fazi, ki smo mu s centrifugiranjem odstranili celice. (Vir: Osterman, 2009)

2.3 NARAVNI BAKTERIJSKI IZOLAT *VIBRIO* SP. DSM14379

V nalogi smo kot modelni sistem za proučevanje viskoelastičnih lastnosti rastnega medija med rastjo bakterij uporabljali naravni bakterijski izolat *Vibrio* sp. DSM14379. Bakterija je bila izolirana iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka in spada v družino *Vibrionaceae*, razred γ *Proteobacteria*, deblo *Proteobacteria*. Je po Gramu negativna bakterija z obliko ukrivljene palčke in jo lahko najdemo v slanih vodah. Ni sporogena in je fakultativni anaerob. Zanj je značilna halotolerantnost, saj lahko tolerira do 17 % (w/V) NaCl, najbolje pa raste pri 3 % (w/V) NaCl (Danevčič, 2006). V svojem genomu ima zapis za vsaj en profag, ki ga lahko induciramo z mitomicinom C, ob čemer se sproščajo morfološko različni bakteriofagom podobni delci (Gnezda-Meijer in sod., 2006). Stopar in sodelavci so leta 2002 ugotovili, da izolat producira zunajcelični polisaharidni matriks, ki vpliva na difuzijo molekul skozenj. Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 proizvaja in v gojišče izloča rdeče obarvan pigment soroden prodigiozinu (Štraser, 2008), ki je sekundarni metabolit in se najbolj intenzivno izloča v stacionarni fazi rasti (Starič, 2007). Sinteza pigmenta se poveča ob pomanjkanju hranil in stresu. Bakterija sintetizira največ barvila pri 28 °C v gojišču M9 s 3 % (w/V) NaCl ter 5 g/L glukozo (Starič, 2007). Ekstrakt pigmenta ima širok spekter protibakterijskega delovanja (Štraser, 2008). Njegova sinteza je odvisna od mehanizmov za zaznavanje celične gostote.

2.3.1 Prodigiozin

Barvilo, ki ga producira *Vibrio* sp. ob prehodu v stacionarno fazo, je pigment, ki spada v skupino rdečih pigmentov imenovanih prodiginini. Prodigionine proizvajajo številne bakterije iz rodu *Serratia*, *Actinomycetes* (*Streptomyces coelicolor*) ter morske bakterije (*Hahella chejuensis*, *Pseudoalteromonas denitrificans*) (Williamson in sod., 2006). Je sekundarni metabolit, ki ga producirajo tudi bakterije iz rodu *Vibrio*, kot so *Vibrio gazogenes* (Allen in sod., 1983), *Vibrio psychroerythrus* (Aoust in Gerber, 1974), *Vibrio rhizosphaerae* (Kumar in Nair, 2007), *Vibrio ruber* (Shieh in sod., 2003) in *Vibrio* sp. KSJ45 (Alihosseini in sod., 2008).

Molekula prodigiozina je po strukturi piril dipiril meten s kemijsko formulo $C_{20}H_{25}N_3O$. Sestavljajo jo trije pirolni obroči, med katerimi sta dva direktno povezana, tretji pa je pripet z metenskim mostičkom (Gerber, 1975). Prekurzorji v biosintezi prodigiozina so prolin, serin, alanin (Quadri in Williams, 1971; Bennett in Bentley, 2000), glicin in očetna kislina (Hubbard in Rimington, 1950). Pri bakteriji *Serratia marcescens* poteka biosinteza preko razcepljene poti, ki se konča z encimsko kondenzacijo končnih produktov, 2-metil-3-n-amilil-pirola (Williamson in sod., 2006) in 4-metoksi-2,2'-bipirol-karbaldehida (Morrison, 1966; Goldschmidt in Williams, 1968). Sinteza je regulirana preko mehanizmov odgovora na stradanje (ang. stringent response) in zaznavanje celične gostote (ang. quorum sensing) (Williamson in sod., 2006).

Prodigiozin in njemu sorodne molekule imajo protibakterijske (Gerber, 1971; Kumar in Nair, 2007; Štraser, 2008), protiglivne (Castro in sod., 1967; Gerber, 1971) in protiparazitske aktivnosti (Castro, 1967; Azambuja in sod., 2004). Nekateri avtorji pigmentu pripisujejo še druge vloge, kot so odvajanje odvečnega prolina iz metabolizma (Hood in sod., 1992), sprejem elektronov v celičnem dihanju bakterije *Serratia marcescens* (Allen E.G., 1967), H^+/Cl^- simporter ali izmenjevalec OH^-/Cl^- (Ohkuma in sod., 1998; Sato in sod., 1998), vloga pri pritrjanju (Williamson in sod., 2006). Najbolj zanimiva lastnost, ki ima velik biotehnološki potencial, je sposobnost indukcije programirane celične smrti rakavih celic z minimalnim vplivom na normalne celice (Yamamoto C. in sod., 1999).

V nalogi nas bo zanimalo, ali je produkcija pigmenta povezana s spremembo viskoelastičnih lastnosti gojišča, med rastjo bakterije. Bakterije namreč lahko z izločanjem makromolekul povečajo viskoznost svojega neposrednega okolja in na ta način zmanjšajo difuzijsko translacijo signalnih molekul, ki so potrebne za sprožitev sinteze pigmenta. Ko je dosežena kritična koncentracija celic, je signala v neposredni bližini celic dovolj, da pride do kvalitativne spremembe in koordiniranega delovanja celic. Pričakujemo, da je kritična gostota celic posledica spremembe viskoeleastičnih lastnosti medija, ki ne omejuje samo difuzijske translacije signalnih molekul, ampak tudi bakterijskih celic, ki proizvajajo signal.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

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)
- 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 klorid $NaCl$ $M_w = 58,5$ g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid $NaOH$ $M_w = 40,00$ g/mol (Merck, Nemčija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)

3.1.2 Gojišča in raztopine

3.1.2.1 Gojišče M9

Uporabljali smo tekoče gojišče M9 z naslednjo sestavo:

- 200 mL 5x M9 soli (64 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 15 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 150 g $NaCl$, 1000 mL dH_2O)
- 2 mL 1M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,1 mL 1M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 20 mL 500 g/L glukoze (končna koncentracija glukoze v gojišču je 10 g/L)
- 750 mL dH_2O

3.1.2.2 Gojišče PKS

Uporabljali smo tekoče PKS z dodatkom 3 % NaCl. Sestava gojišča je:

- 5 g peptokompleks
- 1 g kvasni ekstrakt
- 2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 30 g NaCl (za 3 % (w/V) NaCl v gojišču)
- do 1 L dH_2O

Za trdna gojišča PKS smo dodali 15 g agar-agar na 1 L gojišča.

3.1.3 Sev

Uporabljali smo sev bakterije *Vibrio* sp. DSM14379.

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur v zaprtem rastnem sistemu

Bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 smo iz plošče z gojiščem PKS s 3 % (w/V) NaCl precepili v tekoče gojišče PKS in inkubirali preko noči na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C v temi ter prisotnosti kisika.

Za gojenje v zaprtem sistemu v bogatem gojišču smo v sveže gojišče PKS precepili 1 % (V/V) inokuluma prekonočne kulture in inkubirali na stresalniku pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Za gojenje v minimalnem gojišču M9 z 10 g/L glukoze je bil postopek enak.

Vzorci za primerjavo mikroviskoznosti prekonočnih kultur v različno bogatih gojiščih smo vzeli po prekonočni inkubaciji. Vzorce za merjenje mikroviskoznosti bakterijske kulture v različnih fazah rasti smo odvzeli v fazi prilagajanja - lag, v fazi aktivne rasti - log in stacionarni fazi. Vzorce za spremljanje sprememb koncentracije pigmenta in sprememb mikroviskoznosti rastočih kultur v prvih 10 urah rasti smo jemali vsako uro.

3.2.2 Določanje optične gostote bakterijske kulture in števila celic s CFU

Gojenim bakterijskim kulturam smo ob vzorčenju izmerili optično gostoto pri 650 nm (OD_{650}) na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija). Izmerjenim optičnim gostotam vzorcev smo prilegali krivuljo z enačbo (Danevčič in sod., 2005)

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

kjer je K nosilnost okolja, μ hitrost rasti (h^{-1}) in OD_{650,t_0} optična gostota pri 650 nm v času $t = 0$.

Število celic smo določili z določanjem števila celic, ki so sposobne delati kolonije (CFU). V ta namen smo pripravili redčitveno vrsto s fiziološko raztopino (0,9 % (w/V) NaCl. Na plošče PKS s 3 % (w/V) NaCl smo nanegli redčitve 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} in 10^{-9} (odvisno od vzorca smo za štetje izbrali tri). Po inkubaciji na 28 °C, ki je trajala 24 ur ali več, smo prešteli število kolonij in izračunali število CFU na mililiter vzorca.

3.2.3 Uporaba optične pincete za določanje viskoelastičnih lastnosti bakterijske kulture

V raziskavah smo uporabljali optično pinceto, zgrajeno okrog optičnega mikroskopa (Zeiss, Axiovert200M) z objektivom (Zeiss, Achroplan 63x/0.9W; vodna imerzija, N.A. 0.9) in diodno črpanega trdninskega laserja (Coherent, Compass1064-2500, valovna dolžina 1064 nm, maksimalna moč 2.5 W). Laserski snop usmerjata dva pravokotno postavljena akusto-optična detektorja (AA Opto-electronic, DTSXY-250-1064-002, akustična frekvenca 60-90 MHz). Akustično valovanje zanju proizvaja računalniško nadzorovan kontroler za krmiljenje žarka (Aresis, BSC-01). Ta omogoča nanometersko natančnost določanje lege pasti in časovno deljenje žarka na več tisoč "hkratnih" neodvisnih optičnih pasti. Sliko zajema CMOS kamera (Pixelink, PLA-741), ki podpira snemanje s hitrostjo do 1000 slik na sekundo (Osterman, 2009).

Vsakemu vzorcu v mikrocentrifugirki smo dodali 1 μL silika kroglic (razredčene v vodi do koncentracije $10^{-4}/\text{mL}$) s premerom 3,22 μm , ki smo jih premešali na vibracijskem mešalu. 20 μL vzorca smo nanegli v komoro, pripravljeno iz objektnega in krovnega stekelca, ob straneh zlepljena s silikonom. Po napolnitvi komore z vzorcem smo s silikonom še popolnoma zaprli komoro. Meritve smo izvajali pri sobni temperaturi. Moč laserja je bila pri vseh poskusih konstantna, in sicer 300 mW. Meritve so bile sestavljene iz sledečih korakov. Najprej smo v vidnem polju našli dve kroglici in ju ujeli z dvema pastema, ki sta bili med seboj oddaljeni za 10 μm . Kroglice smo nato dvignili približno 30 μm od površine, da bližina površine ne bi vplivala na meritve. Levo past smo pustili na fiksni poziciji z 20 % polne trdote pasti in je bila namenjena le držanju kroglice. Desna past je bila maksimalno trda in je služila za sinusno harmonično gibanje desne kroglice bodisi v smeri pasti (vodoravno) bodisi v pravokotni smeri na smer pasti (prečno) s konstantno amplitudo 1 μm . Meritve so potekale pri različnih nihajnih frekvencah (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 in 50 Hz), celoten postopek pa smo ponovili še pri 50% trdoti leve pasti. Koraki merjenja, spreminjanja frekvenc in trdote leve pasti so zapisani v računalniškem programu, ki sam vodi meritve.

Enačba gibanja kroglice s premerom a je

$$[k + k_m]x(t) + 6\pi\eta a\dot{x}(t) = kA\sin(\omega t) \quad \dots(3)$$

v kateri je η viskoznost raztopine in je $k_m = 24\pi G'a(1-\nu)/(5-6\nu)$ lokalna trdota materiala z modulom G' in Poissonovim razmerjem ν , k je trdota pasti in A in ω sta amplituda in kotna frekvenca gibanja pasti.

Odziv kroglice na oscilirajočo silo je

$$x(t) = D(\omega) \sin[\omega t - \delta(\omega)] \quad \dots(4)$$

pri čemer je razmerje amplitud enako

$$d(\omega) = \frac{D(\omega)}{A} = \frac{k}{\sqrt{(k + k_m)^2 + (6\pi a \eta \omega)^2}} \quad \dots(5)$$

in je fazni zaostanek

$$\delta(\omega) = \arctan \frac{6\pi a \eta \omega}{k + k_m} \quad \dots(6)$$

Elastični (G') modul in viskozni (G'') modul se izračunata kot

$$G'(\omega) = \frac{k_m(\omega)}{6\pi a} = \frac{k}{6\pi a} \left[\frac{\cos \delta(\omega)}{d(\omega)} - 1 \right] \quad \dots(7)$$

$$G''(\omega) = \omega \eta(\omega) = -\frac{k}{6\pi a} \left[\frac{\sin \delta(\omega)}{d(\omega)} \right]$$

3.2.4 Ekstrakcija rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. DSM14379

Bakterijski kulturi *Vibrio* sp. DSM14379 v treh paralelkah v tekočem gojišču M9 z 10 g/L glukoze (3.3.1.2) oziroma prekonočnim kulturam v PKS s 3 % NaCl in M9 z 10 g/L glukoze smo izmerili OD₆₅₀ s fotometrom (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija). Nato smo 1,5 mL kulture iz vsake paralelke oziroma prekonočne kulture 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 pri sobni temperaturi. Po stresanju smo ostanke celic odstranili s centrifugiranjem 15 min pri 10000 obratih in 4 °C.

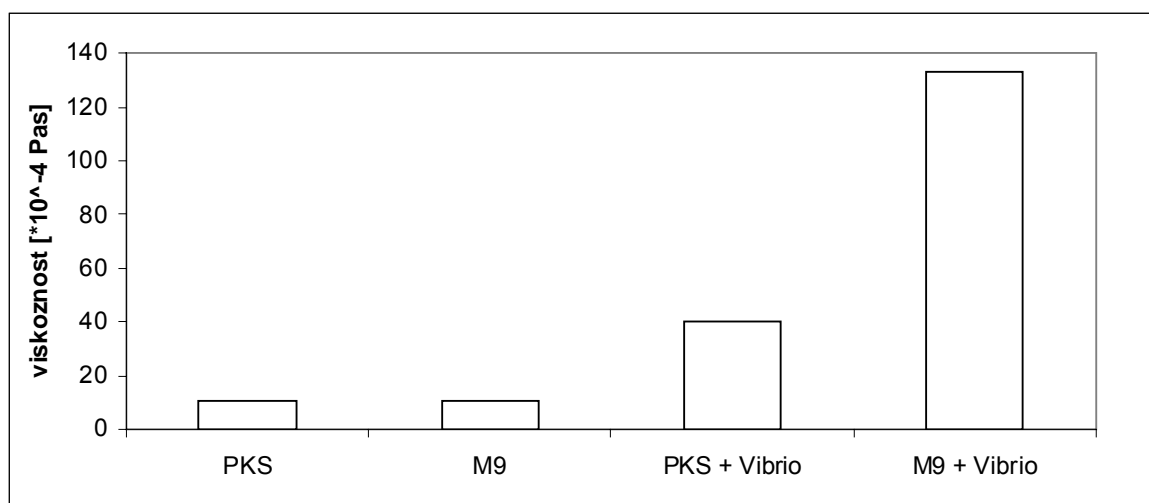
3.2.5 Določanje koncentracije pigmenta bakterije *Vibrio* sp. DSM14379

300 µL ekstrakta pigmenta v acetonu vsakega vzorca smo v treh ponovitvah nanesti 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 7.5 integrirali. Iz površine integriranega spektra smo s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo pigmenta v mg/L.

4 REZULTATI

4.1 MIKROVISKOZNOST V BOGATEM IN MINIMALNEM GOJIŠČU

Razlike v mikroviskoznosti prekonočnih kultur bakterije *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasla v bogatem (PKS) ali minimalnem (M9) gojišču so prikazane na sliki 3. Sveži neinokulirani gojišči imata primerljivo viskoznost, ki znaša okrog $1,0 \cdot 10^{-3}$ Pas. Bakterije, ki so rasle v bogatem gojišču so viskoznost prekonočne kulture povečale za 3-krat v primerjavi s svežim gojiščem, v minimalnem gojišču pa za 13,7-krat. Optična gostota vzorca prekonočne kulture v bogatem gojišču je bila 1,595 in je bila primerljiva optični gostoti vzorca v minimalnem gojišču ($OD_{650} = 1,631$). Število celic, ki delajo kolonije, je bilo $1 \cdot 10^{10}$ CFU/mL v bogatem in $1 \cdot 10^9$ CFU/mL v minimalnem gojišču.

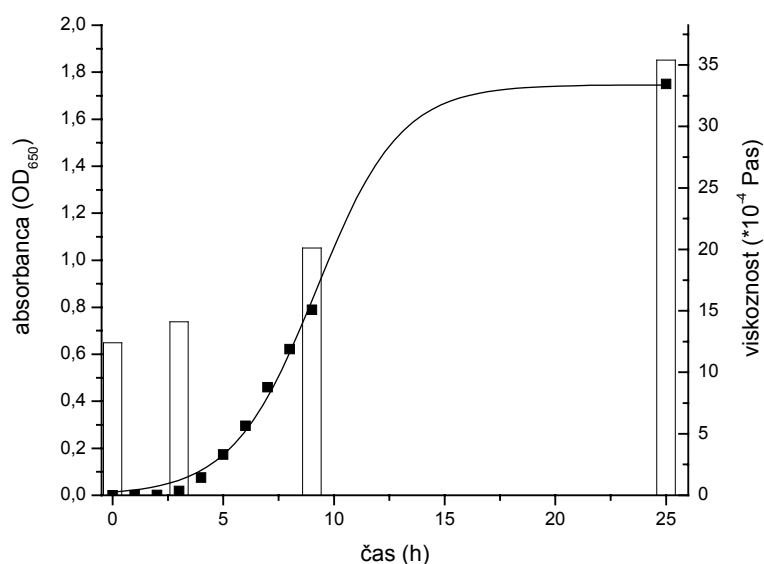


Slika 3: Primerjava viskoznosti lokalnega okolja bakterij v prekonočnih kulturah v PKS s 3% NaCl in M9. Meritve smo izvedli le v eni ponovitvi.

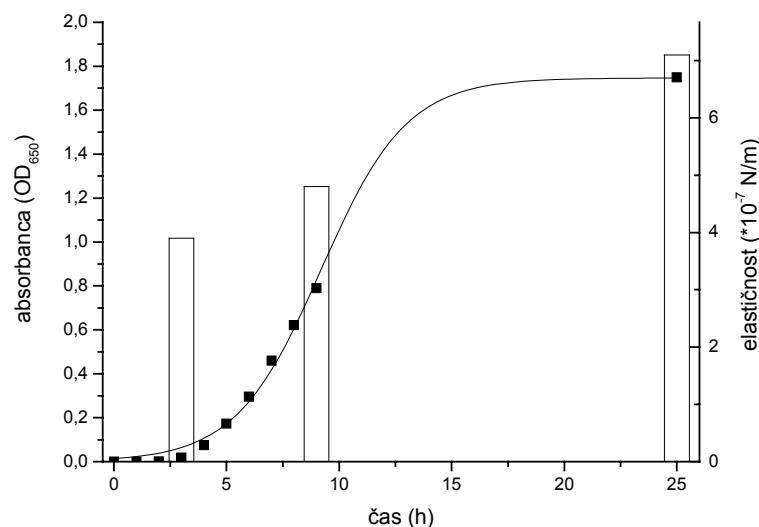
Legenda: PKS: PKS 3 % (w/V) NaCl; M9: gojišče M9 z 10 g/L glukoze; PKS + Vibrio: vzorec prekonočne kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl; M9 + Vibrio: vzorec prekonočne kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču M9 z 10 g/L glukoze.

4.2 VISKOELASTIČNOST LOKALNEGA OKOLJA BAKTERIJ MED RASTJO

Viskoznost in elastičnost neposrednega okolja bakterij *Vibrio* sp. DSM14379 smo izmerili v fazi prilagajanja, eksponentni fazi in stacionarni fazi rasti. Rastna krivulja, pridobljena z meritvami optične gostote je prikazana na slikah 4 in 5, skupaj s podatki o viskoznosti in elastičnosti. Iz slike 4 vidimo, da mikroviskoznost z rastjo bakterijske kulture narašča. Maksimalna viskoznost je bila izmerjena v stacionarni fazi in je bila 2,5-krat večja od viskoznosti v fazi prilagajanja. Tudi elastičnost bakterijskega okolja z rastjo kulture narašča (slika 5) in je v stacionarni fazi približno 2-krat večja kot v fazi prilagajanja.



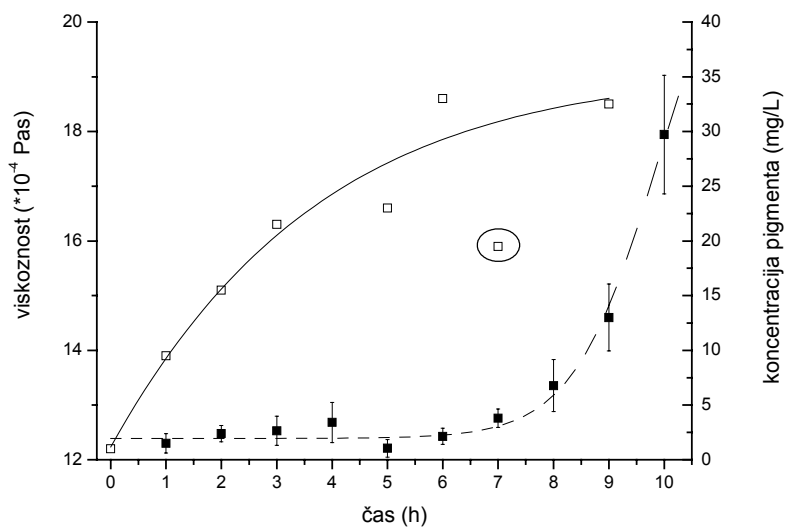
Slika 4: Mikrovizkoznost lokalnega okolja bakterij v različnih fazah bakterijske rasti. Bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 smo gojili v gojišču M9 z 10 g/L glukoze. Vzorce smo odvzeli v fazi prilagajanja (po 3 urah), v eksponentni fazi rasti (po 9 urah) in v stacionarni fazi rasti (po 25 urah). Na x-osi je čas inkubacije v urah, na primarni y-osi optična gostota (kvadrati), na sekundarni y-osi viskoznost (stolpci). Izmerjenim optičnim gostotam je prilegana krivulja pridobljena z logistično enačbo (črta) kot je opisano v 3.2.2.



Slika 5: Elastičnost lokalnega okolja bakterij v različnih fazah bakterijske rasti. Bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 smo gojili v gojišču M9 z 10 g/L glukoze. Vsako uro smo izmerili optično gostoto (OD₆₅₀), vzorce smo odvzeli v fazi prilagajanja (po 3 urah), v eksponentni fazi rasti (po 9 urah) in v stacionarni fazi rasti (po 25 urah). Na x-osi je čas inkubacije v urah, na primarni y-osi optična gostota (kvadrati), na sekundarni y-osi elastičnost (stolpci). Izmerjenim optičnim gostotam je prilegana krivulja pridobljena z logistično enačbo (črta) kot je opisano v 3.2.2.

4.3 KORELACIJA MED PRODUKCIJO PIGMENTA IN VISKOZNOSTJO RASTNEGA MEDIJA

Sprememba viskoznosti in koncentracija rdečega pigmenta do pozne eksponentne faze rasti sta prikazani na sliki 6. Iz slike je razvidno, da koncentracija ekstrahiranega pigmenta tekom bakterijske rasti začne znatno naraščati šele po približno 7 urah, pred tem je koncentracija pigmenta dokaj nizka in konstantna. Koncentracija pigmenta v gojišču po 10 urah rasti je 30 mg/L, kar je približno 20-krat več kot na začetku. Sprememba viskoznosti v prvih 10 urah inkubacije je zrcalna slika produkcije pigmenta. Viskoznost takoj po inokulaciji gojišča z bakterijami hitro narašča in se po približno šestih urah začne zaustavljati ter narašča počasneje. Do hitrega začetnega porasta viskoznosti je prišlo v času, ko se število celic ni znatno povečalo.



Slika 6: Korelacija med viskoznostjo lokalnega okolja bakterij in koncentracijo pigmenta med bakterijsko rastjo. Bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 smo gojili v gojišču M9 z 10 g/L glukoze. Na osi x je prikazan čas inkubacije v urah), na primarni y osi viskoznost (beli kvadratki), na sekundarni y osi pa koncentracija pigmenta (črni kvadratki). Neprekinjena črta ponazarja prilegano sigmoidno krivuljo meritvam viskoznosti, črtkana črta pa prilegano eksponentno krivuljo meritvam koncentracije pigmenta. Meritve viskoznosti smo naredili v eni paralelki, meritve pigmenta pa v treh. Obkrožena je meritev viskoznosti po 7 urah rasti, ki znatno odstopa in je za prileganje krivulje nismo upoštevali.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilj te diplomske naloge je pokazati, da je optična pinceta primerno orodje za določanje viskoznosti neposrednega okolja bakterij. Za modelni sistem smo uporabljali bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379, ki smo jo gojili v minimalnem in bogatem gojišču. Teoretična izhodišča za analizo podatkov o mikroviskoznosti so opisana v doktorski nalogi Natana Ostermana (Osterman, 2009). V tej diplomski nalogi smo že razvite metode uporabili za določanje viskoznosti lokalnega okolja bakterij v različnih gojiščih ter za določanje korelacije med mikroviskoznostjo gojišča in produkcijo sekundarnih metabolitov, ki je vezana na doseganje kritične gostote celic in medcelično komuniciranje.

Z metodo merjenja mikroviskoznosti z optično pinceto merimo le mikroviskoznost medija, ki se spreminja zaradi aktivnosti bakterijskih celic, izogibamo pa se meritvam, kjer bi celice neposredno lahko vplivale na rezultat (Osterman, 2009). Tako smo meritve, kjer so bile bakterije vezane na sondo zanemarili. Da je do povečanja mikroviskoznosti prišlo zaradi spremembe medija in ne zaradi povečanega števila bakterij, je razvidno iz slike 2, kjer smo iz rastnega medija odstranili bakterijske celice. Pričakovano je mikroviskoznost nekoliko padla, vendar je bila še vedno znatno večja od mikroviskoznosti neinokuliranega gojišča. Očitno s centrifugiranjem odstranimo celice in del viskoznega matriksa, ki je nanje vezan.

Primerjava spremembe mikroviskoznosti okolja bakterij iz prekončnih kultur v bogatem in minimalnem gojišču kaže, da bakterije različno spreminjajo svoje lokalno okolje. Relativno je povečanje mikroviskoznosti v minimalnem gojišču približno 4-krat večje kot v bogatem gojišču. Ker je bilo v minimalnem gojišču za faktor 10 manj celic to pomeni, da so celice v minimalnem mediju znatno bolj spremenile svoje lokalno okolje kot v bogatem gojišču. Če preračunamo viskoznost na celico, dobimo za celice v minimalnem gojišču bistveno večjo viskozno aktivnost kot v bogatem. Verjetno je večja sprememba viskoznosti okolja bakterij v minimalnem gojišču prilagoditev na manjšo količino hranil, ki omogoča lažje preživetje in razmnoževanje. Prehransko siromašnejša okolja poznano povečajo sintezo nekaterih sekundarnih metabolitov. Npr. sinteza pigmenta prodigiozina se v ob pomanjkanju hranil poveča (Williamson in sod., 2006). Skladno s tem smo ugotovili, da je

bila v prekončni bakterijski kulturi v minimalnem gojišču 3-krat večja sinteza rdečega barvila kot v bogatem (glej prilogo 1).

Zaradi bistveno večjega mikroviskoznega odziva pri bakterijah gojenih v minimalnem gojišču, smo za nadaljnje eksperimente uporabljali samo minimalno gojišče. Rezultati spremljanja mikroviskoznosti okolja v različnih fazah bakterijske rasti kažejo, da se mikroviskoznost med rastjo povečuje. To se sklada z rezultati Al-Asheha in sodelavcev (2002), ki so opazili naraščanje viskoznosti z zviševanjem koncentracije biomase pri bakterijah *Pseudomonas aeruginosa* in *Bacillus cereus*. Po drugi strani so Klapper in sodelavci (2002) za biofilm izgrajen iz bakterij *Pseudomonas aeruginosa* ugotovili viskoznost med $2,7 \cdot 10^2$ in $1,8 \cdot 10^4$ Pas, ki je pričakovano veliko večja od viskoznosti v naših tekočih gojiščih. Tudi elastičnost med bakterijsko rastjo narašča, v stacionarni fazi je 2-krat večja kot v fazi prilagajanja. Vendar pa je velikostni rang sprememb elastičnosti majhen ($\sim 10^{-7}$ N/m), tako da o znatni elastičnosti prekončnega gojišča ne moremo govoriti. Za primerjavo, z AFM (ang. atomic force microscopy) izmerjena elastična konstanta biofilma bakterije *Escherichia coli* je 0,23 N/m, biofilma bakterije *Bacillus subtilis* pa 0,41 N/m (Volle in sod., 2008). Viskoznost in elastičnost ponavadi podajamo skupaj kot viskoelastičnost materiala. Glede na naše rezultate lahko trdimo, da se neposredno okolje bakterij v prekončni kulturi obnaša viskozno in manj elastično.

Sprememba viskoznosti med rastjo bakterij vpliva na njihovo mobilnost. Zmanjšanje mobilnosti zaradi povečane viskoznosti bi lahko vplivalo na povečanje lokalne gostote bakterij in posledično na povečano medcelično komuniciranje. Bakterija *Vibrio* sp. DSM 14379 proizvaja rdeče barvilo, ki je sekundarni metabolit. Sinteza pigmenta se začne ob zadostni gostoti bakterijskih celic in se uravnava z mehanizmom zaznavanja celične gostote (angl. quorum sensing) (Thomson in sod., 2000). Ko se koncentracija signalnih molekul v gojišču poveča preko kritične koncentracije, se aktivirajo geni za sintezo pigmenta. Signalne molekule so običajno nizkomolekularne spojine, ki imajo relativno veliko difuzijsko konstanto. Npr. acilhomoserin lahktoni, AHL, ki so poznane signalne molekule pri po Gramu negativnih bakterij imajo difuzijsko konstanto $4,9 \cdot 10^{-6}$ cm²/s (Horswill in sod., 2007). Glede na znano Stokes–Einstein enačbo je difuzijska konstanta inverzno odvisna od viskoznosti in polmera molekule (Friedman, 2008). Ker z višanjem

viskoznosti ostaja lokalna koncentracija signalnih molekul večja bi pričakovali, da bo učinkovitost signaliziranja in posledično produkcija pigmenta večja. Kot je razvidno iz slike 6, obstaja povezava med viskoznostjo in koncentracijo pigmenta v gojišču med rastjo bakterijske kulture. Izgleda, da se produkcija pigmenta začne šele, ko mikroviskoznost okolja bakterij doseže kritično vrednost, kar omogoča kopičenje signalnih molekul zaradi zmanjšane difuzijske translacije. Vendar bi za potrditev omenjene hipoteze potrebovali dodatne eksperimente, kjer bi v stacionarnih pogojih ob nespremenjeni gostoti celic spreminjali mikroviskoznost in merili količino pigmenta.

Glavni namen diplomske naloge je bil pokazati, da podatki, ki jih pridobimo z optično pinceto, omogočajo določanje viskoznosti neposrednega okolja bakterij. Glede na dobljene rezultate lahko trdimo, da je nova metoda občutljiva, saj omogoča meritve v tekočih gojiščih med gojenjem bakterij v relativno kratkih časovnih intervalih. Trenutno je sicer čas potreben za analizo podatkov približno 2 dni, vendar pričakujemo, da se bo z optimizacijo delovanja programskih orodij čas potreben za analizo skrajšal. Obenem pričakujemo, da bomo lahko z optično pinceto preučevali viskoznost različnih mikrobiološko zanimivih vzorcev (npr. spremembe viskoznosti zaradi razgrajevanja ali proizvodnje kompleksnih polimerov, vpliv mikroviskoznosti na obnašanje mikroorganizmov).

5.1 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov lahko trdimo, da:

- je optična pinceta uporabno orodje za analizo viskoznosti lokalnega okolja bakterij ter ima dovolj veliko občutljivost za uporabo v mikrobiologiji
- bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 so v minimalnem gojišču bistveno bolj povečale mikroviskoznost kot bakterije, ki so rasle v bogatem gojišču
- med rastjo bakterij se viskoelastičnost spreminja nelinearno
- elastičnost matriksa je nizka, in v matriksu prihaja predvsem do spremembe viskoznosti
- zaustavljanje povečevanja mikroviskoznosti v gojišču korelira z začetkom povečane sinteze pigmenta.

6 POVZETEK

Mikroorganizmi so odvisni od svojega okolja, ki vpliva na njihovo rast in aktivnost. Viskoznost, ki je mera za odpornost tekočine na deformacijo, predvsem viskoznost na mikrometrskih skalah, ki so za mikroorganizme najbolj pomembne, je eden izmed slabše raziskanih dejavnikov okolja. Zato smo v diplomski nalogi preizkušali novo metodo, ki bo omogočila boljše proučevanje in poglobljanje znanja o viskoznosti okolice mikroorganizmov.

Kljub temu, da je optična pinceta v mikrobiologiji že znano orodje za proučevanje bakterijskih pilov in gibanja (Merz in sod., 2000; Maier in sod., 2004), adhezije celic na površino (Liang in sod., 2000; Simpson in sod., 2002; Jass in sod., 2004; Fällman in sod., 2004; Camesano in sod., 2006), identifikacijo bakterij (Chan in sod., 2004; Xie in sod., 2005) in proučevanje nukleinskih kislin (Wang in Schnitzer, 1998; Bennink in Schärer, 1999; Maier in sod., 2004), je za merjenje viskoznosti še nihče ni uporabljal.

V nalogi smo uporabili optično pinceto za določanje enodelčne aktivne mikrореologije, ki je dovolj občutljiva, analiza dobljenih podatkov pa je z njo najbolj enostavna in najmanj časovno zamudna. Pri tej metodi spremljamo gibanje kroglice v vzorcu bakterijske kulture, ki smo jo ujeli z optično pinceto, pri različnih trdotah optične pasti in frekvencah nihanja. Iz gibanja kroglice s pomočjo enačb gibanja dobimo podatek o viskoznosti in tudi o elastičnosti proučevanega vzorca. Kot modelni sistem smo uporabljali bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379, ki producira prodigiozinu podoben rdeč pigment (Starič, 2007; Štraser, 2008). Zanimalo nas je, kako bakterije spremenijo viskoznost svojega okolja tekom rasti v zaprtem sistemu, in ali obstaja povezava med produkcijo pigmenta ter spremembo viskoelastičnosti gojišča.

Z eksperimenti smo ugotovili, da bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 v prekonočni kulturi močno poveča mikroviskoznost. Sprememba mikroviskoznosti je znatno večja v minimalnem gojišču v primerjavi s spremembo mikroviskoznosti v bogatem gojišču. Med rastjo bakterij se viskoznost spreminja nelinearno. Glede na to, da zaustavljanje povečevanja mikroviskoznosti sovpada z začetkom povečane sinteze pigmenta je verjetno,

da je viskoznost pomemben člen pri mehanizmu zaznavanje kritične gostote celic. V eksperimentu smo dobili tudi podatke o elastičnosti, ki se sicer med rastjo spreminja, vendar pa so območja velikosti sprememb tako majhni, da lahko trdimo, da se neposredno okolje bakterij obnaša predvsem viskozno in manj elastično.

Glede na dobljene rezultate lahko trdimo, da je nova metoda dovolj občutljiva, da omogoča meritve v tekočih gojiščih med gojenjem bakterij v relativno kratkih časovnih intervalih. Trenutno je sicer čas potreben za analizo podatkov približno 2 dni, vendar pričakujemo, da se bo z optimizacijo delovanja programskih orodij za analizo skrajšal. Obenem pričakujemo, da bomo lahko z optično pinceto preučevali viskoznost različnih mikrobiološko zanimivih vzorcev.

7 VIRI

- Al-Asheh S., Abu-Jdayil B., Abumasser N., Barakat A. 2002. Rheological characteristics of microbial suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30: 67-74.
- Alihosseini F., Ju K., Lango J. Hammock B.D., Sun G. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their application on textile materials. *Biotechnology Progress*, 24: 742-747.
- Allen E.G. 1967. Conditions of the colour change of prodigiosin. *Nature*, 216, 2: 929-931
- Allen G.R., Reichelt J.L., Gray P.P. 1983. Influence of environmental factors and medium composition on *Vibrio gazogenes* growth and prodigiosin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 6: 1727-1732.
- Amblard F., Maggs A.C., Yurke B., Pargellis A.N., Leibler S. 1996. Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks. *Physics Review Letters*, 77, 21: 4470-4473.
- Aoust J.Y.D., Gerber N.N. 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. *Journal of Bacteriology*, 118, 2: 756-757.
- Ashkin A. 1970. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physics Review Letters*, 24, 156 – 159.
- Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., Chu S. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11,5: 288-290.
- Azambuja P., Feder D., Garcia E.S. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 107: 89-96.
- Bausch A.R., Ziemann F., Boulbitch A.A., Jacobson K., Sackmann E. 1998. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75, 4: 2038-2049.
- Bennet J.W., Bentley R. 2000. Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 1-32.
- Bennink M.L., Schäfer O.D., Kanaar R., Sakata-Sogawa K., Schins J.M., Kanger J.S., de Groot B.G., Greve J. 1999. Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using optical tweezers: interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1. *Cytometry*, 36: 200-208.

- Block S.M. 2003. Optical Tweezers: An introduction. Stanford, Stanford University, Department of Biological Sciences (februar 2003): 3 str.
<http://www.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm>
(avgust, 2009)
- Camesano T.A., Liu Y., Datta M. 2007. Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques. *Advances in Water Resources*, 30: 1470-1491.
- Castro A.J. 1967. Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature*, 213: 903-904.
- Castro A.J., Gale G.R., Means G.E., Tertzakian G. 1967. Antimicrobial properties of pyrrole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 10: 29-32.
- Chan J.W., Esposito A.P., Talley C.E., Hollars C.W., Lane S.M., Huser T. 2004. Reagentless identification of single bacterial spores in aqueous solution by confocal laser tweezers raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76: 599-603.
- 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 energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 94 str.
- Evans E.A., Skalak R. 1980. *Mechanics and thermodynamics of biomembranes*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 254 str.
- Fällman E., Schedin S., Jass J., Andersson M., Uhlin B.E., Axner O. 2004. Optical tweezers based force measurement system for quantitating binding interactions: system design and application for study of bacterial adhesion. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 1429-1437.
- Fällman E., Schedin S., Jass J., Uhlin B.E., Axner O. 2005. The unfolding of P pili quaternary structure by stretching is reversible, not plastic. *EMBO Reports*, 6: 52-56.
- Friedman M.H. 2008. *Principles and models of biological transport*. 2nd ed. New York, Springer: 510 str.
- Gerber N.N. 1971. Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri*. *Journal of Antibiotics*, 24, 9: 636-640.
- Gerber N.N. 1975. Prodigiosin-like pigments. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3: 469-485.

- Giri A.V., Anandkumar N., Muthukumaram G., Pennatur G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: DOI: 10.1186/1471-2180-4-11: 1 str.
- Gisler T., Weitz D. 1998. Tracer microrheology in complex fluids: Dynamic aspects of colloids and interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3, 6: 586-592.
- Gnezda-Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2006. Host physiological status determines phage-like particle distribution in the lysate. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 1: 135-145.
- Goldschmidt M.C., Williams R.P. 1968. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *Journal of Bacteriology*, 96, 3: 609-616.
- Hood D.W., Heidstra H., Swoboda U.K., Hudson D.A. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Interaction between primary and secondary metabolism – a review. *Gene*, 115, 1-2: 5-12.
- Horswill A.R., Stoodley P., Stewart P.S., Parsek M.R. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:371–380.
- Hubbard R., Rimington C. 1950. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochemical Journal*, 46, 2: 220-225.
- Jass J., Schedin S., Fällman E., Ohlsson J., Nilsson U.J., Uhlin B.E., Axner O. 2004. Physical properties of *Escherichia coli* P pili measured by optical tweezers. *Biophysical Journal*, 87: 4271-4283.
- Klapper I., Rupp C.J., Cargo R., Purvedorj B., Stoodley P. 2002. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 80, 3: 289-296.
- Kumar N.R., Nair S. 2007. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2241-2246.
- Liang M.N., Smith S.P., Metallo S.J., Choi I.S., Prentiss M., Whitesides G.M. 2000. Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to mannose-presenting surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 24: 13092-13096.
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.

- Maier B. 2005. Using laser tweezers to measure twitching motility in *Neisseria*. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 344-349.
- Maier B., Chen I., Dubnau D., Sheetz M.P. 2004. DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nature Structural and Molecular Biology*, 7: 643-649.
- Mason T.G., Ganesan K., van Zanten J.H., Wirtz D., Kuo S.C. 1997. Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*, 79, 3282 – 3285.
- Merz A.J., So M., Sheetz M.P. 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407: 98-102.
- Morrison D.A. 1966. Prodigiosin synthesis in mutants of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 91, 4: 1599-1604.
- Nemet B.A., Shabtai Y., Cronin-Golomb M. 2002. Imaging microscopic viscosity with confocal scanning optical tweezers. *Optics Letters*, 27, 4: 264-266.
- Ohkuma S., Sato T., Okamoto M., Matsuya H., Arai K., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H. 1998. Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H⁺/Cl⁻ symport. *Biochemical Journal*, 334: 731-741.
- Osterman N. 2009. Študij viskoelastičnih lastnosti, meddelčnih potencialov in samourejanja v mehki snovi z magneto-optično pinceto. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko, Oddelek za fiziko: 147 str.
- Quadri S.M.H., Williams R.P. 1971. Incorporation of methionine into prodigiosin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 230, 1: 181-184.
- Radmacher M., Fritz M., Hausma P. 1995. Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. *Biophysical Journal*, 69, 1: 264-270.
- Sato T., Konno H., Tanaka Y., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H., Ohkuma S. 1998. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34: 21455-21462.
- Shieh W.Y., Chen Y.W., Chaw S.M., Chiu H.H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively aerobic bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 479-484.
- Simpson K.H., Bowden M.G., Hook M., Anvari B. 2002. Measurement of adhesive forces between *S. epidermidis* and fibronectin-coated surfaces using optical tweezers. *Lasers in Surgery and Medicine*, 31:45-52.

- 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.
- Stepišnik J. Fizikalni praktikum I. 1997. Ljubljana, Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije: 111 str.
http://www.fiz.uni-lj.si/~stipe/sola/praktikum_i/viskoz.pdf , 14.8.2009
- Stopar D., Trček T., Štrancar J. 2002. Electron paramagnetic resonance characterization of the exopolysaccharide layer produced by bacteria. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7, 1: 167-169.
- 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.
- Thomson N.R., Crow M.A., McGowan S.J., Cox A., Salmond G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenam antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Molecular Microbiology*, 36, 6: 539-556.
- Valentine M.T., Dewalt L., Ou-Yang H.D. 1996. Forces on a colloidal particle in a polymer solution: a study using optical tweezers. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 8: 9477-9482.
- Volle C.B., Ferguson M.A., Aidala K.E., Spain E.M., Nunez M.E.. 2008. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 67: 32–40.
- Wang M.D., Schnitzer M.J., Yin H., Landick E., Gelles J., Block S.M. 1998. Force and velocity measured for single-molecules of RNA polymerase. *Science*, 282: 902-907.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 887-899.
- Xie C., Mace J., Dinno M.A., Tang W., Newton J.R., Gemperline P.J. 2005. Identification of single bacterial cell in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 77: 4390-4397.
- Yamamoto C., Takemoto H., Kuno K., Yamamoto D., Tsubura A., Kamata K., Hirata H., Yamamoto A., Kano H., Seki T., Inoue K. 1999. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology*, 30, 4: 894-902.
- Ziemann F., Radler J., Sackmann E. 1994. Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead microrheometer. *Biophysical Journal*, 66, 6: 2210-2216.

ZAHVALA

Hvala mojemu mentorju prof. dr. Davidu Stoparju za ponujeno priložnost, nasvete, ideje, konstruktivne razprave in vložen čas;

Veliko časa pri eksperimentih, analizi podatkov ter risanju grafov je vložila vedno prijazna asist. dr. Tjaša Danevčič, pri oblikovanju grafov pa je pomagal tudi Nejc Starič;

A hvala gre tudi recenzentki te diplome prof. dr. Darji Žgur Bertok in predsednici komisije za zagovor diplome prof. dr. Ines Mandić Mulec;

Laboratorijske ure z optično pinceto sem preživela z dr. Natanom Ostermanom iz Oddelka za Fiziko, FMF, ki mi je analiziral rezultate in enostavno razlagal komplicirane fizikalne stvari, in Vesno, s katero je bilo delo zabavno, analize rezultatov pa hitre; končno verzijo je pregledal tudi prof. dr. Igor Poberaj;

Absolutno nujne, drobne nasvete za delo mi je dala Simona Leskovec;

Vsi prijatelji, ki mi stojite ob strani in me spravljate v smeh, še posebno Tanja, Katja in Boštjan;

A šele Matjaž je naredil moj svet popoln;

Mami in oči sta v mojem življenju nepogrešljiva.

PRILOGE

Priloga A: Koncentracija ekstrahiranega pigmenta (mg/L) prekonočne kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 gojene v minimalnem M9 z 10 g/L glukoze in bogatem PKS s 3 % (w/V) NaCl gojišču. V preglednici so napisane meritve in standardne deviacije ter optični gostoti obeh kultur. Priloga grafično prikazuje dobljene rezultate.

Vzorec	Optična gostota (OD ₆₅₀)	Koncentracija pigmenta [mg/L]	Standardna deviacija koncentracije pigmenta [mg/L]
PKS 3% NaCl	1,595	103,4	11,8
M9	1,631	301,4	7,9

