

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Olja BREGAR

**VPLIV SPREMINJANJA TEMPERATURE MED
RASTJO CELIC NA PRESNOVNO AKTIVNOST
BAKTERIJ *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Olja BREGAR

**VPLIV SPREMINJANJA TEMPERATURE MED RASTJO CELIC NA
PRESNOVNO AKTIVNOST BAKTERIJ *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF SHIFTING TEMPERATURE DURING CELL
GROWTH ON METABOLIC ACTIVITY OF BACTERIA
*Escherichia coli***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek medoddelčnega 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.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

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

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: 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: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Olja Bregar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22+579.26:536.5:546.17(043)=863
KG	fiziologija mikroorganizmov/ <i>Escherichia coli</i> /stres/šok ohlajanja/denitrifikacija/kloramfenikol
AV	BREGAR, Olja
SA	STOPAR, David (mentor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	VPLIV SPREMINJANJA TEMPERATURE MED RASTJO CELIC NA PRESNOVNO AKTIVNOST BAKTERIJ <i>Escherichi coli</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 50 str., 1 pregl. 15 sl., 1 pril., 54 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cilj naloge je ugotoviti, kako periodično spreminjanje temperature med rastjo vpliva na hitrost rasti in sposobnost za redukcijo nitrata bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> . Hitrost rasti in produkcijo nitrata bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> smo spremljali pri konstantni temperaturi ter s periodičnim spreminjanjem temperature med dvema temperaturnima ekstremoma (37 in 4 °C). Ugotovili smo, da pride ob zniževanju temperature do zastoja rasti, ne pa tudi do zastoja redukcije nitrata. Rast se ne zaustavi takoj ampak s 30 min zamikom, ko temperatura gojišča pade pod 14 °C. Podobno se intenzivna rast po prestatitvi na višjo temperaturo pojavi tedaj, ko temperatura preseže 28 °C. Spremljali smo tudi potencial za redukcijo nitrata. Opazili smo, da je produkcija nitrata največja pri kulturi, ki je bila na začetku eksperimenta izpostavljena šoku ohlajanja. Iz rezultatov izhaja, da periodično spreminjanje temperature signifikantno spremeni fiziologijo celic v primerjavi s tistimi celicami, ki so gojene pri konstantni temperaturi. Kultura, izpostavljena periodičnemu šoku ohlajanja, večino energetskega izplena nitratne redukcije porabi za premostitev stresa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 579.22+579.26:536.5:546.17(043)=863

CX physiology of microorganisms/*Escherichia coli*/stress/cold
shock/denitrification/chloramphenicol

AU BREGAR, Olja

AA STOPAR, David (supervisor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme
in Microbiology

PY 2007

TI INFLUENCE OF SHIFTING TEMPERATURE DURING CELL GROWTH
ON METABOLIC ACTIVITY OF BACTERIA *Escherichia coli*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 50 p., 1 tab., 15 fig., 1 ann., 54 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of this study is to determine the influence of periodical temperature shift during growth on the growth rate and the ability for nitrate reduction of bacteria from the species *Escherichia coli*. Growth rate and nitrate production of *Escherichia coli* were monitored during constant temperature conditions and during periodical shifting of temperature between two extremes (37 °C and 4 °C). Downshift of temperature caused growth inhibition, but not inhibition of nitrate reduction as well. Growth did not seize immediately but 30 minute after temperature downshift, when the media temperature was 14 °C or below. Similarly, intensive growth, after shifting the culture to higher temperature, occurred when the temperature reached 28 °C. We have also monitored potential for reduction of nitrate. We noticed that potential for the production of nitrite was far greater in the culture that was exposed to the cold shock in the beginning of its growth. The results show that periodical shifting of temperature significantly affected the physiology of cells compared to the cells grown at constant temperature conditions. Culture, exposed to periodical cold-shock, used the majority of its energy from nitrate reduction for overcoming the cold stress.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	2
2.2 ŠOK OHLAJANJA	3
2.2.1 Proteini šoka ohlajanja - CSP	4
2.2.1.1 CspA – glavni protein šoka ohlajanja	6
2.2.1.2 Družina proteinov, podobnih CspA	7
2.2.1.3 Ostali CSP	9
2.2.1.4 Trehaloza	11
2.2.2 Regulacija CspA in ostalih CSP	12
2.2.2.1 Regulacija gena <i>cspA</i>	12
2.2.2.2 Regulacija ostalih CSP	14
2.2.3 Termosensorji	16
2.3 REDUKCIJA NITRATA	17
2.3.1 Struktura nitratnih reduktaz	17
2.3.1.1 Membranska nitratna reduktaza kodirana v operonu <i>narGHJI</i>	17
2.3.1.2 Membranska nitratna reduktaza kodirana v operonu <i>narZYWV</i>	18
2.3.1.3 Periplazemska nitratna reduktaza kodirana v operonu <i>napABC</i>	18
2.3.2 Regulatorni mehanizmi in regulacija genske ekspresije nitratnih reduktaz	19
2.3.2.1 Regulacija s kisikom	19

2.3.2.2	Nitratna in nitritna regulacija	19
2.3.2.3	Drugi regulatorji	21
2.3.2.4	Operon <i>narGHJI</i>	21
2.3.2.5	Gen <i>narK</i>	22
2.3.2.6	Operon <i>narZYWV</i>	22
2.3.2.7	Operon <i>napABC</i>	22
2.3.3	Vpliv temperature	23
3	MATERIAL IN METODE DELA	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	Sevi	24
3.1.2	Kemikalije	24
3.1.3	Reagenti in raztopine	25
3.1.4	Gojišča	26
3.2	METODE	26
3.2.1	Merjenje temperature	26
3.2.2	Spremljanje hitrosti rasti	27
3.2.3	Spektrofotometrično merjenje nitrita	28
3.2.4	Model z mirujočimi celicami	28
3.2.5	Merjenje skupnih proteinov z metodo po Bradfordu	29
4	REZULTATI	30
4.1	IZMERJENA TEMPERATURA	30
4.2	HITROST RASTI <i>E. coli</i> PRI RAZLIČNIH TEMPERATURNIH REŽIMIHIH	33
4.3	PRODUKCIJA NITRITA PRI RAZLIČNO GOJENI BIOMASI	35
4.4	NITRITNA PRODUKCIJA V MODELU Z MIRUJOČIMI CELICAMI	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1	RAZPRAVA	38
5.2	SKLEPI	42
6	POVZETEK	43

7	VIRI	44
---	-------------	----

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Molekulska masa in izoelektrične točke proteinov šoka ohlajanja (VanBogelen in sod., 1996).	5

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Grafični prikaz rastne hitrosti <i>E. coli</i> v odvisnosti od temperature (Herendeen in sod., 1979).	2
Slika 2: Shematski prikaz modela proteinske ekspresije po šoku ohlajanja (Horn in sod., 2007).	3
Slika 3: Tri dimenzionalna struktura CspA (Yamanaka in sod., 1998).	6
Slika 4: Produkcija CspA pri bakteriji <i>E. coli</i> pri 37 °C (puščica označuje mesto redčitve; Brandi in sod., 1999).	7
Slika 5: Shematski prikaz regulacije CspA (Ermolenko in Makhatadze, 2002).	14
Slika 6: Primerjava zaporedij štirih genov družine CspA, ki se inducirajo s šokom ohlajanja (Wang in sod., 1999).	15
Slika 7: Odvisnost hitrosti denitrifikacije od temperature (Dawson in Murphy, 1972).	23
Slika 8: Izmerjena temperatura osnovnega gojišča v topli rastni komori.	30
Slika 9: Izmerjena temperatura osnovnega gojišča v hladno rastni komori.	31
Slika 10: Izmerjena temperatura gojišča v steklenički s periodičnim spreminjanjem temperature.	32
Slika 11: Izmerjena temperatura gojišča v steklenički s periodičnim spreminjanjem temperature.	33
Slika 12: Hitrost rasti <i>E. coli</i> pri različnih temperaturnih režimih.	34
Slika 13: Koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri različnih temperaturnih režimih.	35
Slika 14: Izmerjena koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri modelu z mirujočimi celicami in uporabi pufra s kloramfenikolom.	36
Slika 15: Izmerjena koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri modelu z mirujočimi celicami in uporabi pufra s kloramfenikolom.	37

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Izmerjena koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri modelu z mirujočimi celicami in uporabi pufra brez kloramfenikola.

1 UVOD

Mikroorganizmi so se zaradi preživetja primorani prilagajati na številne okoljske spremembe in stresne okoliščine. Zaradi vpliva temperature na vse reakcije, ki potekajo v celici, so prilagoditve na povišanje ali znižanje temperature verjetno ene izmed najpomembnejših. Klasična mikrobiologija temelji na preučevanju fiziologije celic pri konstantnih pogojih. Vendar se v naravi okoljski pogoji venomer spreminjajo, kar nedvomno vpliva tudi na aktivnost celic. V diplomski nalogi smo proučevali, kako periodično spreminjanje temperature vpliva na hitrost rasti celic vrste *Escherichia coli* v primerjavi s celicami, gojenimi pri konstantnih pogojih. Življenjski slog te bakterije je tak kot pri drugih enterobakterijah: hiter odhod iz toplega konstantnega črevesnega habitata v hladno okolje je nekaj povsem normalnega. Kulturo smo zato izmenično gojili pri temperaturi, ki omogoča optimalno rast, ter pri temperaturi, kjer je rast upočasnjena. Samo metabolno aktivnost celic smo merili z aktivnostjo nitratne redukcije. Encimsko aktivnost smo spremljali z modelom z mirujočimi celicami.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA

Cilj naloge je ugotoviti, kako periodično spreminjanje temperature vpliva na rast ter nitratno redukcijo celic vrste *Escherichia coli*.

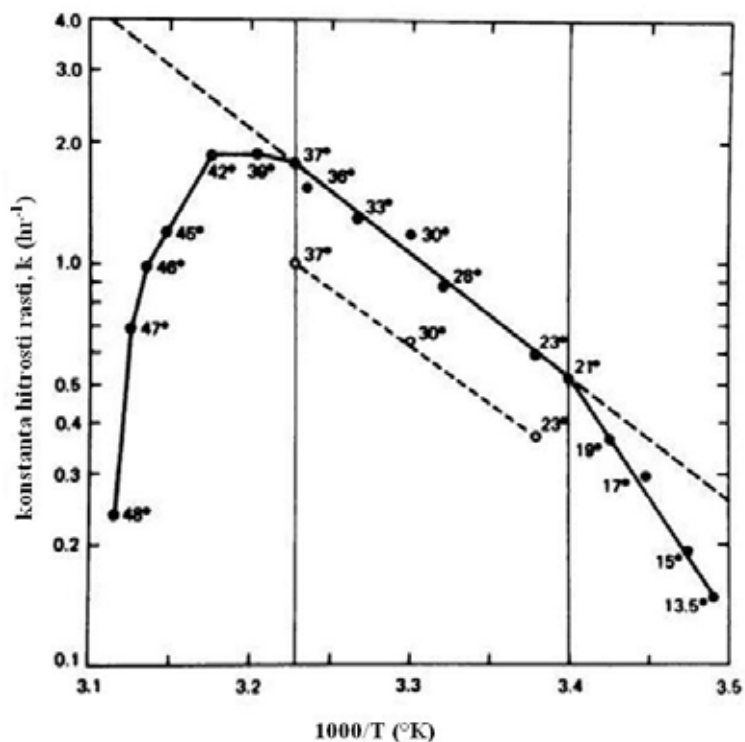
Predvidevamo, da periodično spreminjanje temperature upočasni hitrost rasti v primerjavi s kulturo, gojeno pri optimalnih konstantnih pogojih. Naša hipoteza je, da periodično spreminjanje temperature upočasni tudi metabolno aktivnost, kar bomo dodatno preverjali z modelom z mirujočimi celicami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* je tipska vrsta družine *Enterobacteriaceae*, ki jo najdemo v različnih ekoloških nišah. Vse vrste te družine so fakultativni anaerobi: dobro rastejo v odsotnosti kisika, ko fermentirajo substrate, ali pa, ko okoliščine dovoljujejo, anaerobno dihaajo (Stewart, 1988). V laboratoriju *E. coli* gojimo pri 37 °C ter v prisotnosti kisika, normalno pa ta vrsta kolonizira anaerobno okolje prebavnega trakta (Stewart, 1993).

Escherichia coli, tipičen mezofil, raste v razponu med 10 in 49 °C (zgornja meja je odvisna od dostopnosti hranil v gojišču, medtem ko je rast med temperaturama 20 in 37 °C odvisna le od temperature same). Z nižanjem temperature pod 20 °C ali z višanjem nad 40 °C pride do progresivno počasnejše rasti, ki se pri 9 ali 49 °C zaustavi (Slika 1; Herendeen in sod., 1979). Minimalna temperatura rasti *E. coli* je med 7,5 in 7,8 °C (Shaw in sod., 1971).

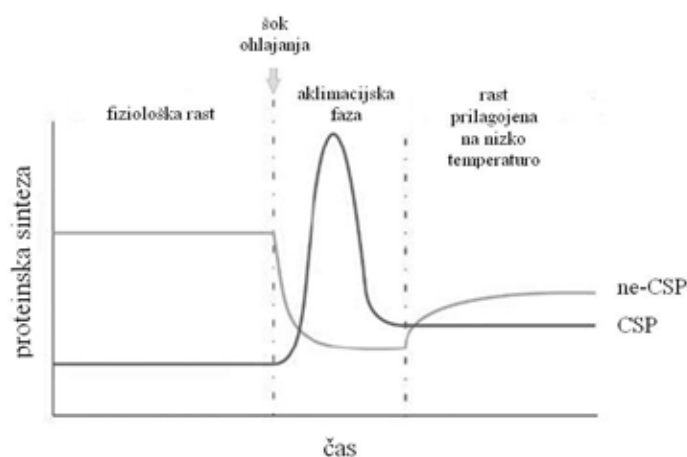


Slika 1: Grafični prikaz rastne hitrosti *E. coli* v odvisnosti od temperature (Herendeen in sod., 1979).

2.2 ŠOK OHLAJANJA

Če eksponentno rastočo kulturo *E. coli* s 37 °C prestavimo na nižjo temperaturo, recimo 10 °C, pride do zastoja rasti za približno 4 ure, nato pa zopet prične z eksponentno rastjo (Berry in Foegeding, 1997). Ta upočasnjena, prilagoditvena faza je rezultat minimalne rastne temperature in jo imenujemo aklimacijska faza (Bae in sod., 1997). Dokazano je, da večji kot je temperaturni preskok, daljša je lag faza (prilagoditvena faza). Če kulturo prestavimo z optimalne temperature rasti na minimalno, potem je lag faza lahko dolga tudi nekaj ur preden kultura zopet obnovi svojo rast (Shaw in Ingraham, 1967). Med samo aklimacijsko fazo pride do večjih fizioloških sprememb: zmanjšanje deleža nasičenih maščobnih kislin v celičnih membranah ter inhibicija DNA, RNA in proteinske sinteze (Schumann, 2000).

Takoj po premiku kulture z višje temperature na nižjo pride do šoka ohlajanja ter do prilagoditvenega odgovora, ki vključuje indukcijo proteinov šoka ohlajanja, imenovanih CSP (angl. cold shock proteins; tudi CIP: angl. cold induced proteins), vsaj 16 polipeptidov (Berry in Foegeding, 1997), med katerimi je glavni protein CspA (Goldstein in sod., 1990). Proteini šoka ohlajanja postanejo neaktivni ob koncu aklimacijske faze, ko celica zopet začne normalno rasti (Slika 2; Bae in sod., 1997).



Slika 2: Shematski prikaz modela proteinske ekspresije po šoku ohlajanja (Horn in sod., 2007). CSP so proteini šoka ohlajanja, ne – CSP pa so vsi drugi proteini.

Pri toplotnem šoku pride do indukcije posebnih proteinov, ki so potrebni za pravilno zvijanje proteinov ter za njihovo razgradnjo. Nasprotno, pa so pri šoku ohlajanja glavne spremembe: (i) pri membranski fluidnosti, ki se zmanjša, kar vodi do zaustavitve membransko vezanih celičnih funkcij kot so aktivni transport in proteinsko izločanje; (ii) pri sekundarnih strukturah RNA in DNA, ki postaneta stabilni, kar vpliva na učinkovitost mRNA translacije; (iii) DNA prepisovanja in podvojevanja (Yamanaka in sod., 1998); (iv) pri lokalnem taljenju DNA z RNA polimerazo (Schumann, 2000). Znano je, da mikroorganizmi prilagodijo sestavo membranskih fosfolipidov kot odgovor na temperaturne spremembe tako, da pri nizkih temperaturah povečajo vsebnost nenasičenih maščobnih kislin, zmanjšajo povprečno dolžino verig, povečajo razvejanost z metilom ter povečajo razmerje *anteiso*-razvejanih maščobnih kislin proti *iso*-razvejanim maščobnim kislinam (Yamanaka, 1999). Pri bakteriji *Escherichia coli* se količina *cis*-vakuenične kisline veča z nižanjem temperature. Ta odgovor ne zahteva *de novo* sinteze, ampak je vezan na protein, ki se konstitutivno izraža in je aktiven le pri nizki temperaturi (Berry in Foegeding, 1997), sama reakcija pa poteče v 30 sekundah po izpostavitvi šoku ohlajanja (Schumann, 2000). Na nivoju RNA in DNA CspA deluje kot RNA šaperon in s svojo vezavo prepreči oblikovanje sekundarnih struktur mRNA. Poleg CspA in prilagoditve sestave membran pa pride tudi do nekajkratnega povečanja drugih faktorjev: iniciacijski faktor 2α in 2β , NusA, H-NS, α podenota DNA giraze, RecA, Hsc66 ter drugi (Lelivelt in Kawula, 1995).

2.2.1 Proteini šoka ohlajanja - CSP

Proteine šoka ohlajanja lahko razdelimo v dva razreda:

- razred I: proteini, ki so izraženi pri 37 °C v izjemno majhnih količinah in se ob premiku na nižjo temperaturo njihova koncentracija nekajkrat poveča: CspA, CspB, CspG, CspI, CsdA, RbfA, NusA in PNPaza,
- razred II: pri 37 °C so izraženi zmerno, ob šoku ohlajanja pa se njihova vsebnost nekajkrat poveča: IF-2, H-NS, RecA, α podenota DNA giraze, Hsc66, HscB, TF

(angl. *trigger factor*), dihidrolipoamid acetiltransferaza in piruvat dehidrogenaza (Yamanaka, 1999).

Molekulska masa proteinov šoka ohlajanja ter njihove izoelektrične točke so navedene v preglednici 1.

Preglednica 1: Molekulska masa in izoelektrične točke proteinov šoka ohlajanja (VanBogelen in sod., 1996).

Protein	Molekulska masa [kDa]	Izoelektrična točka
Razred I		
CspA	7,3	5,9
CspB	7,7	
CspG	7,8	
CspI	7,7	
CsdA	70,5	
RbfA	15,2	med 5,8 in 6,0
NusA	63,1	4,8
PNPaza	77,2	5,3
Razred II		
IF-2		
H-NS	15,4	5,6
RecA	37,8	5,3
α podenota DNA giraze	96,9	5,3
Hsc66	65,7	
HscB	20,1	
TF	48,0	4,9
dihidrolipoamid acetiltransferaza	66,1	5,3
piruvat dehidrogenaza	99,6	5,8

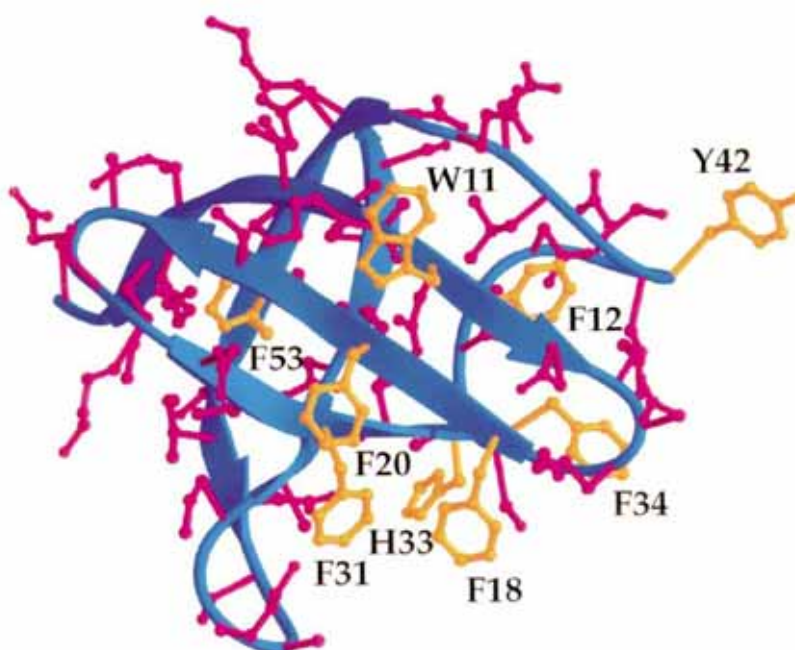
E. coli vsebuje devet genov CSP, ki sestavljajo veliko družino CspA proteinov in so se verjetno razvili kot rezultat številnih podvojitvev v genomu. Med seboj se razlikujejo tako na nivoju genske strukture in regulacije kot tudi na nivoju proteinske strukture in funkcije (Yamanaka in sod., 1998).

Yamanaka in sodelavci (1998) omenjajo več kot 50 odkritih proteinov, ki so homologni CspA ter uvrščeni v družino CspA podobnim proteinom. Evkariontski Y-box protein, tudi človeški YB-1 protein, vsebuje regijo imenovano CSD (angl. *c*old-*s*hock *d*omain), ki nosi 43 % podobnost s proteinom CspA (Graumann in Marahiel, 1998). Te evolucijsko visoko ohranjene regije imajo verjetno podobno funkcijo in strukturo (Yamanaka in sod., 1998).

2.2.1.1 CspA – glavni protein šoka ohlajanja

CspA, glavni protein šoka ohlajanja *Escherichie coli*, se močno inducira takoj ob šoku ohlajanja in takrat predstavlja kar 10 % celotne proteinske sinteze (Goldstein in sod., 1990). Med aklimacijsko fazo je izražanje CspA strogo regulirano tako na nivoju mRNA stabilnosti kot tudi na nivojih transkripcije in translacije (Bae in sod., 1997). Jiang in sod. (1993) pa so opazili indukcijo CspA tudi ob dodatku kloramfenikola.

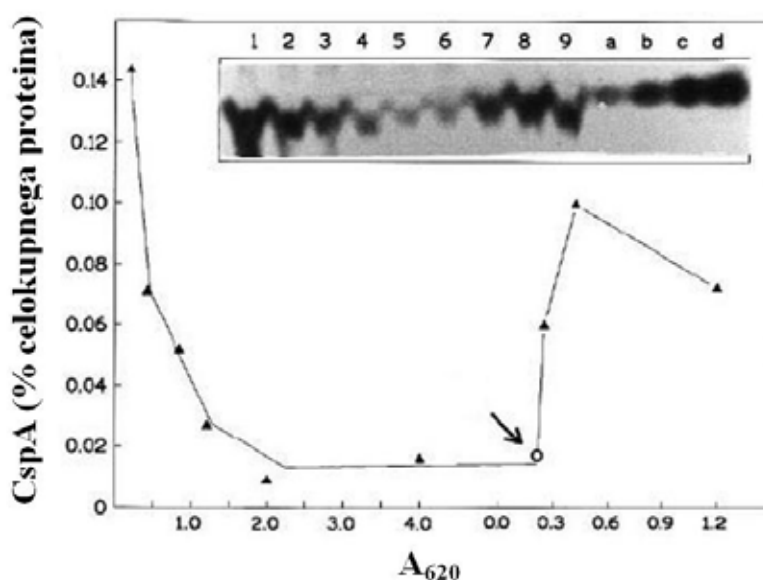
CspA je hidrofilen monomer, sestavljen iz 70 aminokislinskih ostankov, z maso 7,4 kDa. Tridimenzionalna struktura nam pokaže, da je protein sestavljen iz 5 antiparalelnih β -trakov, β 1 do β 5, ki so organizirani v β -sodček, sestavljen iz dveh β -plošč (Slika 3). Ena β -plošča sestavljena iz β 1- β 2- β 3 vsebuje 7 od 8 aromatskih ostankov (W11, F12, F18, F20, F31, F34 in Y42), ki so močno izpostavljeni, ter 2 lizinskih ostankov (K10 in K16). Tu se nahajata tudi dva RNA vezavna motiva, RNP1 (KGFGFI) na β 2 in RNP2 (VVFVHF) na β 3. Iz teh lastnosti lahko sklepamo, da je protein CspA RNA šaperon (Yamanaka in sod., 1998). CspA se lahko veže na enoverižno RNA in DNA, kar je verjetno rezultat interakcij med RNA in DNA baznimi ostanki ter aromatskimi stranskimi verigami CspA.



Slika 3: Tridimenzionalna struktura CspA (Yamanaka in sod., 1998).

CspA deluje kot aktivator prepisovanja vsaj dveh genov šoka ohlajanja: *hns*, ki kodira protein H-NS (glej nadaljevanje) ter *gyrA*, ki kodira α podenoto DNA giraze; oba gena pa vsebujeta zaporedje imenovano Y-box (Yamanaka in sod., 1998).

Brandi in sod. (1999) opozarjajo na veliko produkcijo proteina CspA med začetno fazo eksponentne rasti *E. coli* (Slika 4). Po vstopu kulture v stacionarno fazo so kulturo razredčili ter ponovno opazili rast produkcije CspA, ki je uravnavana s Fis/H-NS kontrolo prepisovanja DNA (Brandi in sod., 1999).



Slika 4: Produkcija CspA pri bakteriji *E. coli* pri 37 °C (Brandi in sod., 1999); puščica označuje mesto redčitve.

2.2.1.2 Družina proteinov, podobnih CspA

Prvi identificiran protein šoka ohlajanja je bil CspA pri *E. coli*, kasneje pa so odkrili številne homologne proteine tako v po Gramu pozitivnih bakterijah kot tudi v po Gramu negativnih bakterijah, vendar ne pri arhejah in cianobakterijah (Phadtare, 2004). Znotraj genoma *E. coli* so identificirali devet genov, ki imajo visoko zaporedno podobnost s CspA. Dolžina proteinov variira med 69 in 74 aminokislinskimi ostanki, izoelektrična točka pa med 5,53 in 10,72 (Yamanaka in sod., 1998). Kromosomska lokacija devetih genov

družine CspA *E. coli* je sledeča: gen *cspE*, 14,2 min (c); *cspD*, 19,9 min (cc); *cspH*, 22,6 min (cc); *cspG*, 22,6 min (c); *cspI*, 35,3 min (cc); *cspB*, 35,3 min (cc); *cspF*, 35,3 min (c); *cspC*, 41,1 min (cc); in *cspA*, 80,1 min (c); kjer (c) pomeni prepis v smeri urinega kazalca (angl. clockwise) in (cc) pomeni prepis v nasprotni smeri urinega kazalca (angl. counter-clockwise; Yamanaka, 1999).

Le CspA, CspB, CspG in CspI se inducirajo s šokom ohlajanja, CspD pa ob pomanjkanju hranil. CspA se inducira pri največjem temperaturnem razponu – med 10 in 30 °C, CspC in CspE se konstitutivno izražata pri normalnih pogojih rasti pri 37 °C, CspI se inducira pri najnižjem temperaturnem razponu – med 10 in 15 °C, CspB in CspG pa se inducirata med 10 in 20 °C (Yamanaka, 1999). Pri nizkih temperaturah so poleg RNA šaperonov, ki so odgovorni za pravilno translacijo, pomembni tudi DNA šaperoni, ki skrbijo za pravilno odvijanje DNA med podvojevanjem – to funkcijo naj bi nosila proteina CspB in CspG (Yamanaka in sod., 1998).

Aminokislinski ostanki, ki so odgovorni za oblikovanje hidrofobnega β -sodčka proteina CspA, so močno ohranjeni tudi pri drugih proteinih družine CspA, kar nakazuje na njihovo funkcijo kot RNA-vezavni proteini. Z izjemo CspF in CspH nosijo vsi močno ohranjene aromatske ostanke na RNA vezavnih motivih RNP1 in RNP2, kar jim olajša vezavo na enoverižno RNA. Za CspF in CspH predvidevajo, da se raje vežejo na DNA (Yamanaka in sod., 1998).

Dimer CspD je močno induciran med stacionarno fazo in nosi visoko homolognost s proteinom CspA iz *Haemophilus influenzae* (edini protein, ki je homologen CspA iz *E. coli*). Ta dva proteina sta si podobna na nivoju amino kislin. V primerjavi s CspA imata oba dodatno amino kislino na C-terminalnem delu ter sta brez treh amino ostankov na N-terminalnem delu. Pomembnejša pa je informacija, da imata v zaporedju zanke kar 13 od 15 amino ostankov popolnoma identičnih (Yamanaka in sod., 1998). Očiščen protein se veže na enoverižno RNA in DNA, vendar ne na dvoverižno DNA (Yamanaka, 1999).

CspC in CspE sta vpletena v regulacijo ekspresije dveh proteinov, vpletenih v stresni odgovor, RpoS in UspA (angl. universal protein A; Ermolenko in Makhatadze, 2002).

UspA se sintetizira kot odgovor na številne strese. CspC in CspE regulirata tudi izražanje stresnih genov kot so OsmY, Dps, ProP in KatG, verjetno preko indukcije RpoS samega. Ti geni so inducirani z osmotskim stresom, oksidativnim stresom ter z vstopom celice v stacionarno fazo. Ugotovimo lahko, da sta CspC in CspE vpletena v regulacijo številnih globalnih regulatornih dejavnikov, ki jih inducirajo različne okoljske stresne okoliščine (Phadtare, 2004).

Vseh devet proteinov družine proteinov, podobnih CspA lahko razdelimo v pet razredov: (i) CspA, CspB in CspG so inducirani s šokom ohlajanja, (ii) CspD deluje kot faktor stresa pomanjkanja hranil, (iii) CspC in CspE delujeta kot regulatorja prepisovanja in/ali pri kromosomski kondenzaciji, (iv) CspF in CspH nimata znane funkcije, ampak je le-ta verjetno nekaj posebnega, saj imata oba unikatno strukturo, (v) CspI nima znane funkcije (Yamanaka in sod., 1998).

2.2.1.3 Ostali CSP

H-NS, prej imenovan H1, je poleg HU eden najpomembnejših proteinov v bakterijskem kromatinu in vpliva na izražanje velikega števila genov. Protein je nevtralne narave, velik 15,4 kDa, in v gensko ekspresijo vpleten preko spreminjanja topologije DNA ter pakiranja kromosoma. Več parametrov nakazuje vlogo strukturne komponente bakterijskega kromatina: (i) v celici je prisotnih približno 20000 kopij proteina, kar je dovolj za pokritje večine kromosomske DNA; (ii) H-NS se veže na DNA z majhno zaporedno specifičnostjo; (iii) H-NS deluje na DNA tako *in vitro* kot *in vivo* (Tupper in sod., 1994).

Hsc66, ki je kodiran v genu *hscA*, je poleg DnaK edini identificiran protein družine Hsp70, skupine 70-kDa velikih proteinov toplotnega šoka v *Escherichia coli*. Gen *dnaK* se inducira ob povišanju temperature, gen *hscA* pa ob njenem znižanju – 3 ure po premiku s 37 na 10 °C pride do optimalne ekspresije Hsc66, koncentracija proteina se 11-krat poviša. Gen za Hsc66 se inducira tudi ob dodatku kloramfenikola. Zaradi podobnosti Hsc66 z DnaK (62 % podobnost na nivoju aminokislinskega zaporedja) lahko sklepamo na funkcijo. Hsp70 delujejo kot molekularni šaperoni in se vežejo na nastajajoče, nepravilno

zvite ali agregirane proteine ter z vezavo ali omogočijo ali ohranijo pravilno konformacijo, ali pa pomagajo pri proteinski razgradnji. Takoj navzgor od gena *hscA* so identificirali tudi gen *hscB*, ki pa je član superdružine *dnaJ*. Ker Hsc70 potrebuje za pravilno delovanje še produkt gena *dnaJ*, je torej logično, da tudi Hsc66 za pravilno delovanje potrebuje kofaktor, produkt gena *hscB* (Lelivelt in Kawula, 1995).

RbfA (angl. ribosome-binding factor A; Ramos in sod., 2001) je potreben za optimalno rast pri nizkih temperaturah (Yamanaka, 1999). Veže se na 30S podenoto ribosoma (Phadtare in sod., 1999) in preoblikuje nefunkcionalne ribosome v obliko, prilagojeno na nizko temperaturo (Wick in Egli, 2004).

TF (angl. trigger factor) nosi molekulsko šaperonsko funkcijo peptidil-prolil izomeraze. Poveže se z nastajajočimi polipeptidi na ribosomih, se veže na GroEL ter poveča afiniteto GroEL za nezvite proteine, kar pospeši razgradnjo določenih polipeptidov. TR igra pomembno vlogo v celicah pri nizkih temperaturah. Ko kulturo *E. coli* shranimo pri 4 °C, le-ta eksponentno izgubi viabilnost. Celice z zmanjšano količino TF hitreje odmrejo, tiste s prekomerno količino pa kažejo veliko večjo viabilnost (Yamanaka, 1999).

CsdA (angl. cold shock DEAD-box protein A; Ramos in sod., 2001) je protein, ki se veže na ribosome ter odvijata sekundarne strukture RNA (Phadtare in sod., 1999). Helikazna aktivnost CsdA se vplete v oblikovanje stabilne strukture steblo-zanka regije 5'-UTR. Ta protein torej pri pogojih šoka ohlajanja deluje tako, da odvijata sekundarne strukture mRNA proteinov šoka ohlajanja, ter jih obvaruje pred RNazo III – kar bi lahko bil poglavitni faktor povečanja CspA in drugih proteinov šoka ohlajanja (Ermolenko in Makhatadze, 2002).

PNPaza je produkt gena *pnp*, ki kodira 3'→5' eksonukleazno polinukleotidno fosforilazo (Polissi in sod., 2003) in je odgovorna za razgradnjo *cspA* mRNA ter mRNA drugih proteinov šoka ohlajanja v pozni aklimacijski fazi in med rastjo pri nizkih temperaturah. Ekspresija *pnp* je avtoregulirana: PNPaza se veže na svojo mRNA blizu Shine-Dalgarnovega zaporedja ter preprečuje interakcijo mRNA s 30S podenoto. Menijo, da ima tekmovanje med PNPazo in 30S podenoto za vezavo na *pnp* mRNA pomembno vlogo pri

indukciji ekspresije PNPaze med šokom ohlajanja. Predstavljen pa je bil tudi drugi model: v procesiranje primarnih prepisov *pnp* je vpletena RNaza III, na katero naj bi se vezala PNPaza in ustavila translacijo ter preusmerila *pnp* mRNA v razgradnjo. Šok ohlajanja povzroči drastično povečanje stabilnosti dupleksa RNA in povečanje koncentracije PNPaze (Gualerzi in sod., 2003).

NusA je vpleten v terminacijo in antiterminacijo transkripcije (Phadtare in sod., 1999).

IF-2 (angl. initiation factor 2; Ramos in sod., 2001) je translacijski iniciacijski faktor, ki pomaga pri vezavi iniciacijske tRNA (fMet-tRNA) na 30S podenoto rRNA (Yamanaka, 1999).

Koncentracija **GyrA** se poveča s šokom ohlajanja, saj glavni protein šoka ohlajanja, CspA, vpliva na Y-box v njegovem promotorju, kar vodi k aktivaciji prepisovanja DNA. DNA giraza negativno navija DNA, vemo pa, da se ta oblika DNA močno poveča pri kulturi izpostavljeni šoku ohlajanja (Wick in Egli, 2004).

2.2.1.4 Trehaloza

Varovalna vloga sladkorja trehaloze med toplotnim in osmotskim šokom je že dolgo poznana. Pred kratkim pa so odkrili njeno vlogo pri *E. coli*. Šok ohlajanja povzroči povečanje koncentracije sladkorja trehaloze v celici (Gualerzi in sod., 2003). Pri premiku kulture s 37 na 16 °C zaznamo 8-kratno povišanje koncentracije trehaloze (Wick in Egli, 2004). Šok ohlajanja inducira OtsA (trehalozna fosfatna sintaza) in OtsB (trehalozna fosfatna fosfataza), kar pripelje do povečanja koncentracije trehaloze. Oba gena sta odvisna od RpoS. Njuna mRNA kaže visoko stabilnost pri 16 °C, zaporedji pa vsebujeta domeno »cold box«, ki je značilna za gene, inducirane s šokom ohlajanja. Ne vedo natančno kako trehaloza varuje celice pred šokom ohlajanja, vendar menijo, da preprečuje denaturacijo in agregacijo proteinov, deluje kot lovilec prostih radikalov in tako preprečuje oksidativne poškodbe ter stabilizira celično membrano (Phadtare, 2004).

2.2.2 Regulacija CspA in ostalih CSP

2.2.2.1 Regulacija gena *cspA*

Monocistronski gen *cspA* se na kromosomu *E. coli* nahaja pri 80,1 minuti in je preveden v smeri urinega kazalca (Yamanaka, 1999). Ekspresija gena *cspA* je regulirana na nivoju prepisovanja DNA, mRNA stabilnosti in translacije (Yamanaka, 1999).

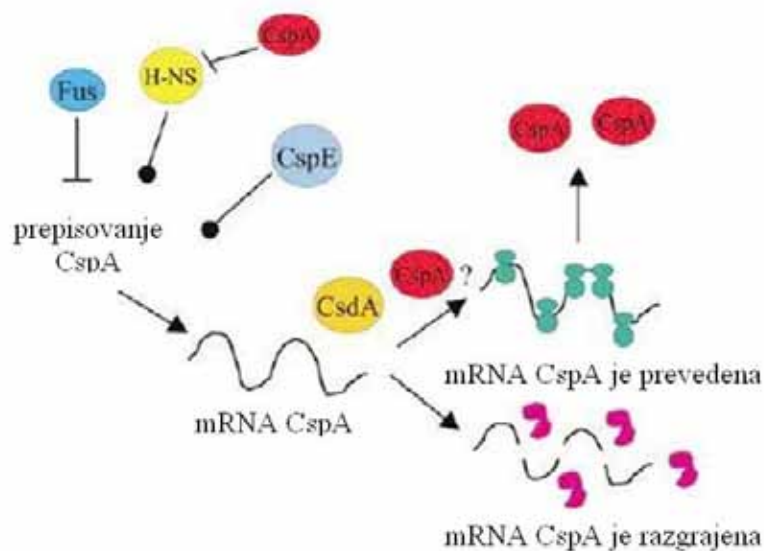
Promotor *cspA* ima dva zelo pomembna elementa: takoj navzgor od -35 promotorja *cspA* se nahaja regija, bogata z adenozinskimi in timinskimi baznimi ostanki, ki deluje kot element UP ter poveča transkripcijo ter prisotnost TGn motiva takoj nad zaporedjem -10. α podenota RNA polimeraze prepozna element UP in kaže močno transkripcijsko afiniteto (Yamanaka, 1999). Zanimivo je, da je promotor *cspA* aktiven tudi pri 37 °C, vendar je tokrat produkcija CspA komaj zaznavna, saj je stabilnost njegove mRNA močno odvisna od temperature in se razpolovi že po 12 sekundah (Yamanaka in sod., 1998). Vendar se s šokom ohlajanja (pri 15 °C) mRNA stabilizira (razpolovna doba se poveča na 20 minut) in tako, za razliko od indukcije toplotnega šoka, za nastanek CspA faktor prepisovanja DNA ni potreben. Po prilagoditvi na nizke temperature pride do represije izražanja CspA, *cspA* mRNA se destabilizira in koncentracija CspA upade (Yamanaka in sod., 1998).

mRNA gena *cspA* ima 14 baz, imenovanih DB (angl. downstream box), ki se nahajajo 12 baznih parov navzdol od začetnega kodona *cspA*. Je komplementarna anti-DB regiji 16S rRNA ter igra zelo pomembno vlogo pri translaciji mRNA med aklimacijsko fazo (Yamanaka in sod., 1998). DB mRNA in anti-DB rRNA tvorita dupleks, ki je odgovoren za povečanje translacije (Yamanaka, 1999). Tudi drugi geni prvega razreda, čigar indukcija se drastično poveča ob šoku ohlajanja, imajo regijo DB, kar jim omogoča učinkovito translacijo med aklimacijsko fazo (Yamanaka in sod., 1998; Yamanaka, 1999). Yamanaka in sod. (1998) opozarjajo, da prekomerna produkcija skrajšane *cspA* mRNA povzroči popolno blokado celične rasti pri nizkih temperaturah. Pojav imenujemo LACE (angl. low-temperature antibiotic effect of truncated c*s*pA expression; Yamanaka in sod., 1998). Menijo, da je pojav posledica skrajšane mRNA, ki še vedno nosi zaporedje DB in

učinkovito tvori začetni kompleks, tako da ujame vse ribosomske podenote v celici (Yamanaka, 1999).

Gen *cspA* se prepisuje skupaj z neprevedenimi 159 bazami na 5' koncu (5'-UTR: angl. untranslated region), ki igra pomembno vlogo pri stabilizaciji mRNA ter predstavlja vezavna mesta za aktivacijske ali represijske molekule (Vasina in sod., 1998). Ta regija tvori stabilno strukturo steblo-zanka, ki je visoko ohranjena med geni proteinov šoka ohlajanja, kot so *cspB*, *cspG* in *cspA*.

Ekspresija *cspA* je regulirana tudi na nivoju translacije. V 5'-UTR regiji, takoj navzgor od Shine-Dalgarnovega zaporedja, se nahaja cepilno mesto za RNazo E. To mesto je odgovorno za ekstremno nestabilnost mRNA in posledično izjemno nizke koncentracije CspA pri 37 °C. Torej lahko zaključimo, da je 5'-UTR zaporedje odgovorno za nestabilnost mRNA pri 37 °C (Yamanaka, 1999). 5'-UTR regija *cspA* mRNA vsebuje značilno območje imenovano »cold box«, ki je visoko ohranjeno tudi pri drugih genih šoka ohlajanja in igra vlogo pri represiji izražanja *cspA* (Bae in sod., 1997). To zaporedje tvori stabilno strukturo steblo-zanka in igra vlogo pri avtoregulaciji izražanja *cspA* (Yamanaka, 1999). CspA z vezavo na 5'-UTR svoje lastne mRNA destabilizira sekundarno strukturo mRNA, kar kaže na vlogo RNA šaperona, ki z vezavo onemogoči oblikovanje stabilne sekundarne strukture RNA molekul pri nizkih temperaturah in s tem olajša translacijo celične mRNA pri nizkih temperaturah (Slika 5; Bae in sod., 1997).



Slika 5: Shematski prikaz regulacije CspA (Ermolenko in Makhatadze, 2002).

Iniciacijski faktor IF-2 inducira promotor CspA, H-NS pa ga inhibira. Indukcija H-NS je regulirana s strani CspA, kar kaže na avtoregulacijo (Ermolenko in Makhatadze, 2002). Prav tako CspA regulira gen *pnp*, RNaza PNP pa razgrajuje *cspA* mRNA (Wick in Egli, 2004).

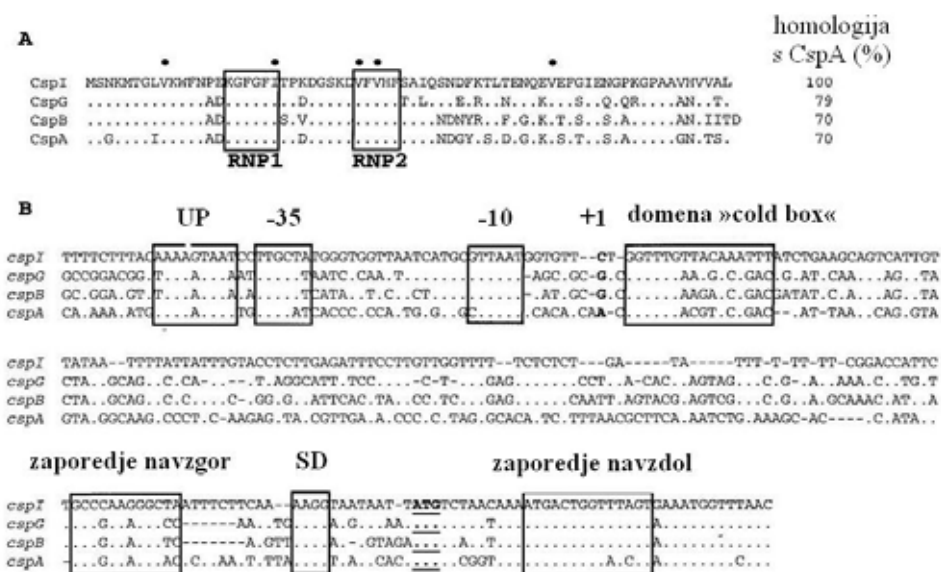
CspA, poleg CspE in CspC, deluje tudi kot antiterminator prepisovanja DNA pri ρ -neodvisnih terminatorjih. Vloga antiterminatorja prepisovanja je vzrok indukcije drugih genov šoka ohlajanja: *nusA*, *infB*, *rbfA* in *pnp*. Antiterminacija je omogočena s preprečitvijo nastanka sekundarne strukture RNA (Wick in Egli, 2004).

Wilson in Nierhaus (2004) omenjata protein Y, ki ga inducira šok ohlajanja in se veže na 30S podenoto ribosoma, zmanjša natančnost translacije ter preprečuje vezavo mRNA in iniciacijske fMet-tRNA na ribosom, s čimer preprečuje začetek translacije.

2.2.2.2 Regulacija ostalih CSP

Geni *cspA*, *cspB*, *cspG* in *cspI* imajo nekaj skupnih točk genske regulacije izražanja: (i) vsi štirje geni vsebujejo element UP takoj navzgor od regije -35, kar pripomore k visoki

promotorski aktivnosti pri nizkih temperaturah (Wang in sod., 1999) ter podaljšano -10 regijo, kar vodi k visoki promotorski aktivnosti pri nizkih temperaturah; (ii) mRNA molekule vseh štirih genov vsebujejo nenavadno dolg 5' konec (159 baz pri *cspA* mRNA, 161 baz pri *cspB* mRNA, 156 baz pri *cspG* mRNA ter 145 baz pri *cspI* mRNA), ki igra eno najpomembnejših vlog pri induciranju proteinov šoka ohlajanja; (iii) vsi imajo domeno »cold box« pri 5' koncu 5'-UTR, ki igra vlogo pri avtorepresiji njihovih genov ob koncu aklimacijske faze (Wang in sod., 1999); (iv) vsi geni vsebujejo zaporedje DB takoj navzdol od začetnega translacijskega kodona, ki je pomemben pri povečanju translacije (Slika 6). Glede na strukturno podobnost, lahko sklepamo o podobni regulaciji vseh štirih genov (Yamanaka, 1999). Vendar se 5'-UTR vseh štirih genov malenkostno razlikuje, kar vodi do nastanka različnih sekundarnih struktur njihove mRNA in posledično do različne stabilnosti teh mRNA. Zaradi razlik v stabilnosti njihovih mRNA opazimo različno izražanje teh proteinov pri različnih temperaturah (Wang in sod., 1999).



Slika 6: Primerjava zaporedij štirih genov družine CspA, ki se inducirajo s šokom ohlajanja (Wang in sod., 1999).

Vse našteje lastnosti pa govorijo v prid indukciji z nizko temperaturo. Zanimivo je, da ima gen *cspI* visoko homologijo s kodirajočo regijo *cspG*, vendar nima 5'-UTR regije, kar kaže na drugačno regulacijo njegove indukcije, kljub enaki funkciji v celici (Yamanaka in sod., 1998).

Gena *cspC* in *cspE* imata motiv tipičen za σ^{70} promotorje (Yamanaka in sod., 1998). CspE je pomemben tudi pri kondenzaciji kromosoma in pri ustavitvi antiterminacije prepisovanja proteina faga λ s strani Q. Prav tako je CspE negativni regulator *cspA* pri 37 °C (Yamanaka, 1999).

Ekspresija gena *cspD* ni inducirana s šokom ohlajanja, temveč s stacionarno fazo in s stradanjem z ogljikom. Prav tako pa je ekspresija zelo pogojena s hitrostjo rasti. Regulacija *cspD* poteka na nivoju transkripcije in ne translacije (Yamanaka, 1999), vendar ni odvisna od stacionarnega sigma faktorja σ^s (Yamanaka in sod., 1998).

Gena *cspF* in *cspH* imata regijo -10 značilno za proteine toplotnega šoka, vendar ju visoka temperatura ne inducira (Yamanaka in sod., 1998). Wang in sod. (1999) omenjajo, da je gen *cspF* povezan s *cspB*. Drugega žal še ni znanega (Yamanaka, 1999).

2.3.3 Termosenzorji

Do sedaj so predstavili dva glavna mehanizma zaznavanja hitrih sprememb v temperaturi. Wick in Egli (2004) opisujeta stabilizacijo *cspA* mRNA pri nizkih temperaturah, kar vodi k povečanju koncentracije CspA, vendar sam mehanizem še ni povsem razjasnjen. Ribosomi lahko igrajo vlogo senzorjev šoka ohlajanja pri *E. coli* (Usulu in Tezcan, 2000). Fiziološki signal za indukcijo šoka ohlajanja je ustavitev pričetka translacije, povzročena s premikom temperature. Trije proteini, IF-2, CsdA ter RbfA, so inducirani z zastojem začetka translacije in pomagajo ribosomom pri translaciji. CsdA je prav tako vpleten pri odvijanju sekundarnih struktur mRNA pri optimalni rasti pri nizkih temperaturah (Schumann, 2000).

Med termosenzorje uvrščajo tudi supernavijanje DNA, ki igra pomembno vlogo pri podvojevanju, transkripciji in rekombinaciji (Phadtare, 2004).

Pri bakteriji *Pseudomonas syringae* so pokazali vpliv višanja in nižanja temperature na fosforilacijo in defosforilacijo membranskih proteinov, kar nakazuje vlogo membranskih proteinov pri zaznavanju okoljske temperature (Chattopadhyay, 2006).

2.3 REDUKCIJA NITRATA

E. coli, tipska vrsta družine *Enterobacteriaceae* (Stewart, 1988), v odsotnosti kisika uporablja nitrat kot končni prejemnik elektronov (Stewart in MacGregor, 1982). Anaerobna respiracija, imenovana tudi denitrifikacija, je disimilatorna redukcija nitratnih oksidov, ki v odsotnosti kisika služijo kot končni prejemniki elektronov. To metabolno pot uporablja skupina taksonomsko raznolikih bakterij, ki sintetizirajo številne reduktaze, ki jim omogočajo redukcijo nitratnih oksidov v odsotnosti kisika (Knowles, 1982). Bakterijska denitrifikacija je zelo pomemben proces pri globalnem kroženju dušika (Zumft in Körner, 1997).

Med anaerobiozo pride do hierarhične regulacije alternativnih dihalnih prejemnikov elektronov (Stewart, 1994a). Energetsko je najprimernejša pot anaerobnega dihanja uporaba formiata kot donorja elektronov za redukcijo nitrata. Nitrat zavre ekspresijo genov za druge poti dihanja (Stewart, 1993). Prisotnost nitrata sproži sintezo encimov nitratnega dihanja, nitratnih reduktaz. Nitrit, prav tako učinkovit elektronski akceptor, tudi sproži sintezo nekaterih dihalnih encimov, nitritnih reduktaz. Nitrat zavre sintezo nitritnih reduktaz, nitrit pa jih sproži (Stewart, 1994a).

2.3.1 Struktura nitratnih reduktaz

2.3.1.1 Membranska nitratna reduktaza kodirana v operonu *narGHJI*

NarGHI je membransko vezana nitratna reduktaza, ki z oksidacijo ubikinola povzroči protonski gradient (Ferguson, 1994) ter s tem oskrbi celico z energijo (Bonney in Demoss, 1994). Encim je kodiran v operonu *narGHJI*, ki se nahaja v lokusu *chlC* (Stewart,

1994b). Encim je sestavljen iz dveh domen ter številnih kofaktorjev; citoplazemska domena je zgrajena iz α (NarG) in β (NarH) podenote, membranska pa iz γ (NarI) podenote (Moreno-Vivián in sod., 1999). α in β podenoti imata kofaktor molibdopterin ter 4 FeS centre (Bonnefoy in Demoss, 1994). V celici sta ti podenoti vezani na γ podenoto, ki vsebuje dva hema tipa *b* (Showe in DeMoss, 1968) in je zgrajena iz petih transmembranskih α -heliksov (Philippot in Højberg, 1999). β podenota je globularni protein s štirimi FeS centri, α podenota pa nosi katalitično mesto, kjer pride do redukcije nitrata, ter 4 FeS centre in kofaktor molibdopterin (Philippot in Højberg, 1999).

2.3.1.2 Membranska nitratna reduktaza kodirana v operonu *narZYWV*

Nitratna reduktaza Z, NRZ, kodirana v operonu *narZYWV*, ima zelo podobne biokemijske značilnosti kot NRA. Membransko vezani encim je sestavljen iz 3 podenot s podobno molekulsko maso kot podenote NRA ter z enakimi kofaktorji (Moreno-Vivián in sod., 1999). Philippot in Højberg (1999) sta povzela, da sta podenoti, kodirani na *narZ* in *narY*, homologni α in β podenotama NarGHI. NRA in NRZ katalizirata redukcijo nitrata in klorata ter sta obe inhibirani z azidom. Edina razlika med encimoma je v njuni občutljivosti na različne dejavnike: NRZ je neodvisna od kisika, kar kaže na vlogo pri prehodu z aerobnega v anaeroben metabolizem (Philippot in Højberg, 1999).

2.3.1.3 Periplazemska nitratna reduktaza kodirana v operonu *napABC*

Tretja disimilatorna nitratna reduktaza je bila najprej identificirana v *R. sphaeroides* (Philippot in Højberg, 1999). Periplazemska nitratna reduktaza, encim NapABC, ali okrajšano NAP, je prav tako odgovoren za disimilacijo nitrata (Stewart in sod., 2002). Od drugih dveh membransko vezanih nitratnih reduktaz se razlikuje že po tem, da je sestavljen le iz dveh podenot ter citokroma *c* (Bonnefoy in Demoss, 1994). Katalitična podenota, velika približno 90 kDa, NapA, veže kofaktor molibdopterin in 4 FeS centre, približno 16kDa pa je velika podenota NapB, ki veže nase dva hema tipa *c* (Richardson in sod.,

2001). Ti dve podenoti imata na N-terminalnem koncu regijo značilno za proteine izločene v periplazmo. Ta regija je sestavljena iz približno 25 pozitivno nabitih amino ostankov hidrofobne domene, ki vsebuje alaninske ostanke na mestih -3 in -1 od cepitvenega mesta za signalno peptidazo (Philippot in Højberg, 1999). NAP ni občutljiv na kisik (Zumft, 1997) ter ne reducira klorata (Ferguson, 1994). Njegova ekspresija je konstantna, tako pri aerobnih kot tudi pri anaerobnih pogojih (Bonneyoy in Demoss, 1994).

Za razliko od NRZ, ki je bila odkrita le pri *E. coli*, so NAP odkrili tudi pri drugih organizmih. Ta odkritja so zastavila mnogo vprašanj o funkciji NAP. Predpostavljajo, da je NAP vpletena v vzdrževanje redoks stanja celice med prilagoditvijo z aerobne na anaerobno rast (Philippot in Højberg, 1999).

2.3.2 Regulatorni mehanizmi in regulacija genske ekspresije nitratnih reduktaz

2.3.2.1 Regulacija s kisikom

Fnr so prvič izolirali iz *E. coli* kot transkripcijski aktivator anaerobnega dihanja (Unden in sod., 1995). Danes je znano, da je generalni regulator anaerobnega dihanja in stimulira veliko število genov, katerih produkti so vpleteni v anaerobno respiracijo (Bonneyoy in Demoss, 1994). Fnr deluje tudi kot represor genov aerobnega metabolizma ter je vpleten v avtorepresijo svojega gena *fnr* (Philippot in Højberg, 1999).

2.3.2.2 Nitratna in nitritna regulacija

V *E. coli* so identificirali dvojni dvokomponentni sistem, 4 encime, ki so vpleteni v nadziranje nitrata in nitrita med anaerobnim dihanjem. Sistem je sestavljen iz dveh homolognih odzivnih regulatorjev, produkta genov *narL* in *narP*, ki aktivirata ali zavirata ekspresijo tarčnega operona kot odziv na prisotnost nitrata ali nitrita ter iz dveh homolognih histidinskih proteinov s kinazno aktivnostjo, produkta genov *narX* in *narQ*, ki delujeta kot senzorja nitrata in nitrita ter prisotnost obeh molekul sporočata regulatorjema

(Stewart, 1994a). Gena *narX* in *narL* skupaj tvorita operon *narXL*, ki je lociran pri 27,4 minuti na genetski mapi *E. coli*, gen *narQ* je lociran pri 54,8 minuti, gen *narP* pa pri 48,7 minuti (Philippot in Højberg, 1999). Senzorja NarX in NarQ s periplazemsko domeno zaznata prisotnost nitrata ali nitrita v periplazmi (Stewart, 1994a). NarX in NarQ sta proteina velikosti 598 in 566 amino kislinskih ostankov in imata 32 % homologijo. Topologija proteinov je podobna drugim senzornim proteinom dvokomponentnega sistema. N-terminalni konec je zgrajen iz dveh transmembranskih regij, med katerima 120 amino kislin sega v periplazmo, C-terminalni konec pa sega v citoplazmo. Signal je alosterično prenesen preko membrane do citoplazemske domene, kjer poteče avtofosforilacija NarX in NarQ na mestu histidina ter nastaneta NarX-P in NarQ-P. Fosfat je prenesen na odzivna regulatorja NarL in NarP. Ta dva regulatorja, velikosti 24 kDa sta homologna v kar 44 % amino kislinskega zaporedja. NarL ima N-terminalno domeno sestavljeno iz pet β -plošč in pet α -heliksov, C-terminalno domeno pa sestavljajo štiri α -heliksi. Obe domeni sta povezani s kratkim α -heliksom. Neaktiviran/defosforiliran NarL ima C-terminalno domeno blokirano z N-terminalno domeno, kar preprečuje vezavo na DNA. Fosforilacija aspartanskega amino ostanka z NarX ali NarQ vodi do rotacije C-terminalne vezavne domene in do vezave na *cis* element tarčnega operona. Oba senzorja, NarX-P in NarQ-P, sta ob prisotnosti nitrata sposobna fosforilacije NarL in NarP, vendar ima NarQ-P višjo kinazno afiniteto do NarL. Če pa je nitrat odsoten, ima NarX visoko fosfatazno aktivnost do NarL-P in le majhno do NarP-P. Fosfatna aktivnost NarQ je šibkejša in večinoma naravnana le proti NarP-P (Philippot in Højberg, 1999).

V prisotnosti nitrita NarX deluje kot negativni regulator NarL-P, NarQ pa kaže predvsem kinazno aktivnost za NarL in NarP. Torej v prisotnosti nitrita zaradi fosfatazne aktivnosti NarX in kinazne aktivnosti NarQ pride do znižanja NarL-P (Philippot in Højberg, 1999).

Dvokomponentni Nar regulatorni sistem glede na dostopnost nitrata in nitrita pozitivno in negativno regulira veliko število genov: *fdnGHI* (format dehidrogenaza), *narGHJI*, *narK*, *napABC*, *nirB*, *nrfA*, *frdABCD* (fumaratna reduktaza), *adhE*, *dmsA*, *modA*, *pfl* ter druge (Stewart, 1994a). Te operone lahko razdelimo v dva razreda: v prvem so tisti operoni, ki jih regulira le NarL (*narGHJI*) ter tisti, ki jih regulira NarL in NarP (*napABC*; (Philippot in Højberg, 1999).

2.3.2.3 Drugi regulatorji

Na regulacijo genov anaerobnega dihanja vplivajo tudi faktorji kot so IHF, H-NS, Fis (Unden in Bongaerts, 1997) in RpoS (Chang in sod., 1999).

Alternativni vegetativni sigma faktor RpoS (σ^S) je močan globalni regulator, ki regulira ekspresijo pri prehodu kulture v stacionarno fazo ter pri različnih oblikah stresa. RpoS močno vpliva na ekspresijo NRZ dihalnega kompleksa. RpoS deluje na ekspresijo gena *narY*, ki je podenota nitratne reduktaze Z. Ta regulacija poteka primarno v aerobnih pogojih. Odkrili pa so, da je indukcija NRZ povečana tudi v stacionarni fazi, vendar naj bi to bila posledica nižje vsebnosti kisika (Chang in sod., 1999).

2.3.2.4 Operon *narGHJI*

Showe in DeMoss (1968) sta že dolgo tega pokazala, da je sinteza nitratne reduktaze prisotna v anaerobnih pogojih ter popolnoma inducirana z nitratom. Regulacija poteka na nivoju prepisovanja DNA in je regulirana z dvema faktorjema: Fnr in NarL (Bonney in Demoss, 1994).

Tarčni geni, ki jih regulira Fnr, so tisti, ki kodirajo redoks encime, encime vpletene v elektronski transfer, transmembranske nosilce anaerobnih katabolitov, encime centralne anaerobne metabolne poti ali fermentacije, encime anaerobnih biosintetskih poti ter genske regulatorje, toksine ali snovi, vpletene v detoksifikacijo (Unden in sod., 1995). Fnr je citoplazemski faktor, ki vsebuje 4 FeS centre (Unden in Bongaerts, 1997), deluje kot senzor dostopnosti kisika (Spiro, 1994) ter se veže 41,5 baznih parov navzgor od mesta začetka prepisovanja (Philippot in Højberg, 1999).

Senzorja NarX ali NarQ fosforilirata NarL ter ga ob prisotnosti nitrata aktivirata. Vendar le NarX lahko deaktivira NarL z defosforilacijo. Indukcija *narGHJI* zahteva poleg aktiviranega NarL tudi IHF (angl. integration host factor) heterodimer velikosti 10 kDa, ki

se veže na specifične dele DNA ter pomaga pri upogibanju DNA (Bonnefoy in Demoss, 1994).

2.3.2.5 Gen *narK*

Tako kot operon *narGHJI* tudi gen *narK* pozitivno regulirajo Fnr, NarL in IHF. 5' neprevedene regije gena *narK* vsebujejo dve Fnr vezavni mesti ter dve NarL vezavni mesti. Anaerobna ekspresija je odvisna le od Fnr vezavnih mest, medtem ko izražanje v prisotnosti nitrata poleg Fnr zahteva tudi aktiviran NarL (Bonnefoy in Demoss, 1994).

2.3.2.6 Operon *narZYWV*

Bonnefoy in Demoss (1994) sta opazila, da je operon *narZYWV* konstitutivno izražen, ne glede na nivo kisika, dostopnost nitrata, prav tako pa ni reguliran s strani Fnr. Na celotnem lokusu *chlZ* niso odkrili specifičnih vezavnih zaporedij za NarL, NarP ali Fnr.

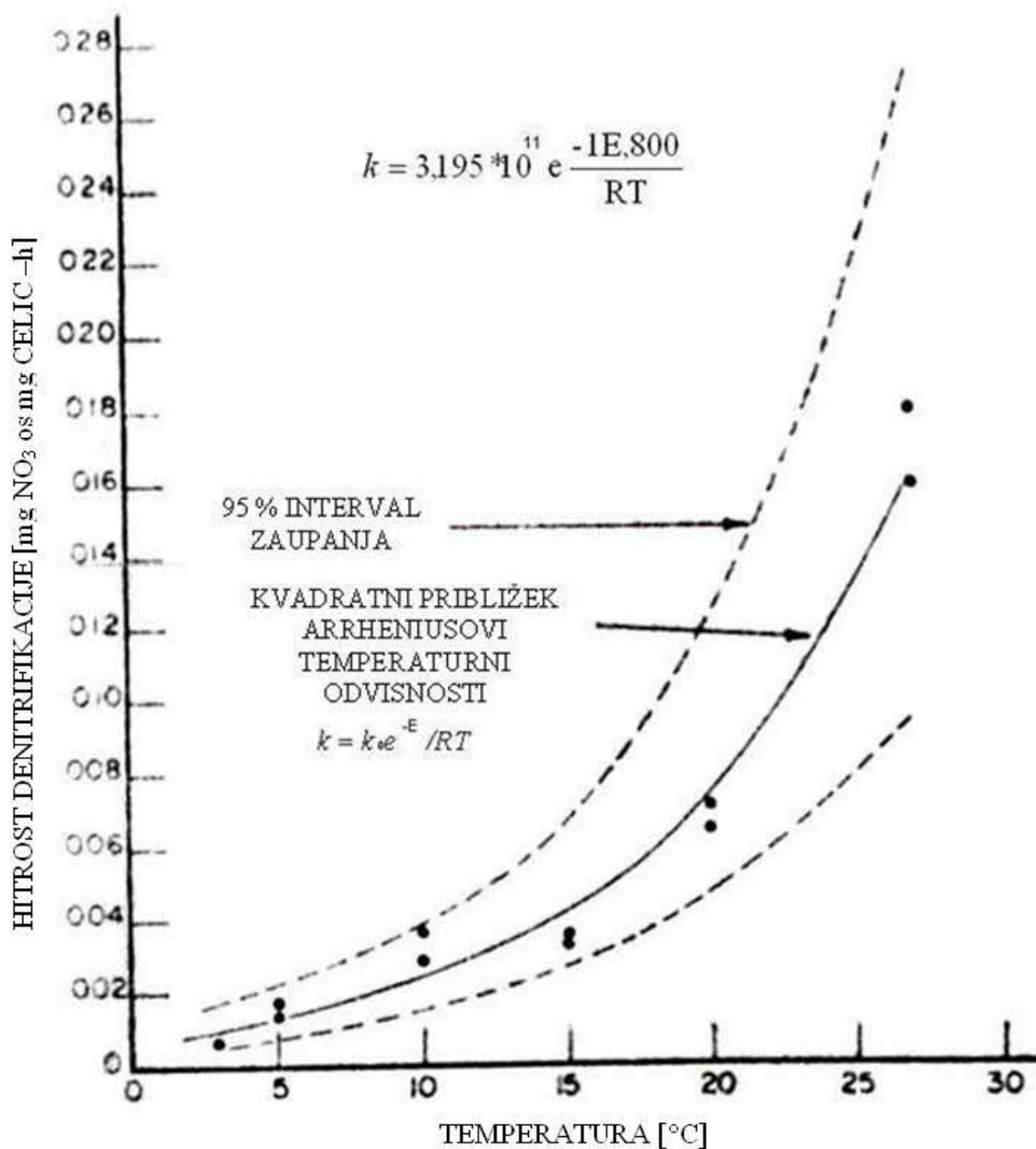
2.3.2.7 Operon *napABC*

Mesto regulacije ekspresije reduktaze NAP z nitratom ali nitritom se nahaja 61,5 baznih parov navzgor od mesta začetka prepisovanja. Ekspresijo operona *napABC* regulirata NarL in NarP (Philippot in Højberg, 1999).

Navzgor od gena *nap* so odkrili pet značilnih zaporedij za vezavo Fnr, kar potrjuje domnevo, da je regulacija genov *nap* odvisna od Fnr in anaerobioze (Philippot in Højberg, 1999).

2.3.4 Vpliv temperature

Knowles (1982) je povzel, da ima temperatura velik vpliv na denitrifikacijo v zemeljskih vzorcih, vendar ne tako velik pri vodnih vzorcih. Pokazal je, da ima temperatura velik vpliv na hitrost denitrifikacije (Slika 7). Saad in Conrad (1993) sta ugotovila, da je denitrifikacija odvisna od temperature okolja.



Slika 7: Odvisnost hitrosti denitrifikacije od temperature (Dawson in Murphy, 1972).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Sevi

Uporabljali smo sev vrste *Escherichia coli* DSH10 K12 iz mikrobiološke zbirke Katedre za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Bakterijo *Escherichia coli* DSH10 K12 smo gojili na trdnem agarju (LB) pri temperaturi 37 °C preko noči in shranili pri temperaturi 4 °C; sev smo precepili enkrat na štirinajst dni.

3.1.2 Kemikalije

Uporabljali smo naslednje kemikalije:

Biolife, Milano, Italija

agar-agar

Merck, Darmstadt, Nemčija

KH₂PO₄

NaOH

KNO₃

Sigma, St. Louis, Missouri, ZDA

gojišče LB

kloroform

Bradford reagent

Fluka Chemie, Deisenhofen, Nemčija

fosforna kislina, 85 %

NEDA (naftiletildiamin)

BSA (goveji serumski albumin)

SA (sulfanil amid)

Kemika, Zagreb, Hrvaška

kloramfenikol

3.1.3 Reagenti in raztopine

Fiziološka raztopina

Pripravili smo 0,9-odstotno raztopino NaCl v deionizirani vodi in jo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in 101,3 kPa nadtlaka.

Nitritni reagent SA+NEDA

Barvni reagent smo pripravili po sledečem postopku: v deionizirani vodi smo razredčili nasičeno fosforno kislino ter dodali sulfanilamid. Po raztapljanju smo dodali še naftiletildiamin, raztopili ter dopolnili z deionizirano vodo do zelenega volumna.

Fosfatni pufer

Pripravili smo 0,05 M fosfatni pufer s pH 7,6. V deionizirani vodi smo raztopili KH_2PO_4 z dodatkom NaOH, umerili pH na 7,6 ter avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in 101,3 kPa nadtlaka.

Fosfatni pufer s kloramfenikolom

Uporabili smo fosfatni pufer s kloramfenikolom. Fosfatnemu pufru smo po avtoklaviranju dodali kloramfenikol v končni koncentraciji 200 µg/ml.

KNO₃

Pripravili smo 20 % raztopino KNO₃ v deionizirani vodi in jo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in 101,3 kPa nadtlaka.

3.1.4 Gojišča

LB:

Uporabljali smo tekoče in trdno osnovno gojišče LB ter tekoče osnovno gojišče LB z dodatkom kalijevega nitrata.

Osnovno gojišče LB:

LB broth 20 g
deionizirana voda do 1000 ml

Sestavine smo resuspendirali v deionizirani vodi ter avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in 101,3 kPa nadtlaka. Za trdno osnovno gojišče LB smo dodali agar v končni koncentraciji 15 g/l. Za tekoče osnovno gojišče LB z dodatkom nitrata, smo avtoklaviranemu tekočemu osnovnemu gojišču LB dodali kalijev nitrat v končni koncentraciji 10 mM.

3.2 METODE

3.2.1 Merjenje temperature

Z merilcem temperature ThermoLogR RTD smo izmerili temperaturo gojišča v 50-mililitrski penicilinski steklenički pri različnih temperaturnih režimih. Stekleničko s senzorjem smo dali v toplo sobo in odčitavali temperaturo v 5 minutnih intervalih. Temperaturo v topli rastni komori smo merili preko dneva ter preko noči. Merjenje

temperature gojišča smo opravili tudi v hladni rastni komori; preko dneva. Prav tako smo izmerili temperaturo gojišča s periodičnim spreminjanjem temperature:

- iz laboratorija (sobna temperatura) smo penicilinsko stekleničko z gojiščem in senzorjem prestavili v toplo sobo pri 37 °C ter merili eno uro, nato smo temperaturo merili eno uro v hladni rastni komori pri 4 °C ter ponovili cikel spreminjanja temperature 4-krat,
- iz laboratorija (sobna temperatura) smo penicilinsko stekleničko z gojiščem in senzorjem prestavili v hladno sobo pri 4 °C ter merili eno uro, nato smo temperaturo merili eno uro v topli rastni komori pri 37 °C ter cikel spreminjanja temperature ponovili 4-krat.

3.2.2 Spremljanje hitrosti rasti

Bakterijo *Escherichia coli* DSH10 K12 smo gojili v tekočem gojišču LB z dodanim nitratom. Kulturo smo gojili pri različnih temperaturah ter spremljali rast spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 650 nm.

Kulturo smo gojili na sledeče načine:

- konstantno pri 37 °C ter vsake 30 minut odvzeli 300 µl vzorca in izmerili absorbance v mikrotitrskih ploščah s spektrofotometrom Multiscan Spectrum;
- s periodičnim spreminjanjem temperature, začnši pri 37 °C. Kulturo smo gojili pri dveh različnih temperaturah: pri 37 °C ter pri 4 °C. Pri vsaki temperaturi smo celice inkubirali 1 uro, samo temperaturo pa periodično spreminjali. Gojili smo jih 5 ur, začnši pri 37 °C: 37 °C – 4 °C – 37 °C – 4 °C – 37 °C;
- s periodičnim spreminjanjem temperature, začnši pri 4 °C. Kulturo smo gojili pri dveh različnih temperaturah: pri 37 °C ter pri 4 °C. Pri vsaki temperaturi smo celice inkubirali 1 uro, samo temperaturo pa periodično spreminjali. Gojili smo jih 8 ur, začnši pri 4 °C: 4 °C – 37 °C – 4 °C – 37 °C – 4 °C – 37 °C – 4 °C – 37 °C.

3.2.3 Spektrofotometrično merjenje nitrita

V epruveto smo odpipetirali po 3 ml deionizirane vode ter po 1 ml nitritnega reagenta SA+NEDA ter 1 ml vzorca. Za ničenje smo dodali 1ml deionizirane vode, za standard 1 ml standardne raztopine nitrita (1 mg/l), za merjene vzorce pa po 1ml ustrezno razredčenega vzorca. Vsebino epruвет smo premešali z Vibromix-om ter pustili stati 20 minut. S spektrofotometrom PU8620 series smo izmerili absorbanco pri 540 nm.

Med celično rastjo pri različnih temperaturah smo vsakih 30 ali 60 minut odvzeli vzorec ter izmerili nitrit. Kulture *E. coli* smo gojili na iste načine kot pri spremljanju hitrosti rasti (točka 3.2.2).

3.2.4 Model z mirujočimi celicami

Z modelom z mirujočimi celicami smo spremljali, kako različno gojena biomasa vpliva na redukcijo nitrata.

Celice smo gojili na različne načine:

- konstantno pri 37 °C,
- periodično spreminjanje temperature: eno uro pri 37 °C, eno uro pri 4 °C, ter tako ponavljali 5 ur,
- periodično spreminjanje temperature: eno uro pri 4 °C, eno uro pri 37 °C, ter tako ponavljali 8 ur,
- periodično spreminjanje temperature: eno uro pri 37 °C, dve uri pri 4 °C, ter tako ponavljali 7 ur.

Po končani inkubaciji so kulture imele primerljivo optično gostoto med 0,3 in 0,35. Nagojene celice smo ločili od gojišča s centrifugiranjem (10 minut pri 8000 obr/min) ter dvakrat sprali s 50 mM fosfatnim pufrom (pH 7,6). V enem poskusu pufer ni vseboval kloramfenikola, v drugem pa ga je v končni koncentraciji 200 µg/ml. Nato smo določili skupne proteine z metodo po Bradfordu (točka 3.2.5) ter prenesli ustrezno količino celic, ki so odgovarjale 0,3 mg/ml skupnih proteinov, v penicilinske stekleničke, ki smo jim dodali

še petkrat razredčeno gojišče LB (redčili smo s fiziološko raztopino), ter fosfatni pufer (z ali brez kloramfenikola) do končnega volumna 10 ml. Atmosfero v plinotesno zaprtih penicilinskih stekleničkah z reakcijsko mešanico smo trikrat zaporedoma vakuumirali, atmosfero nadomestili s čistim dušikom in termostatirali 10 minut v vodni kopeli pri 37 °C. Odvzeli smo vzorec ter dodali ustrezno količino 2 mM KNO₃. Naslednji vzorec smo odvzeli po 1 minuti, nato pa vsak naslednji v razmaku 5 minut.

Odvzetim vzorcem smo z dodatkom 50 µl kloroforma ustavili reakcijo, jih centrifugirali 10 minut pri 8000 obr/min ter spektrofotometrično merili nitrit kot je opisano pod točko 3.2.3.

3.2.5 Merjenje skupnih proteinov z metodo po Bradfordu

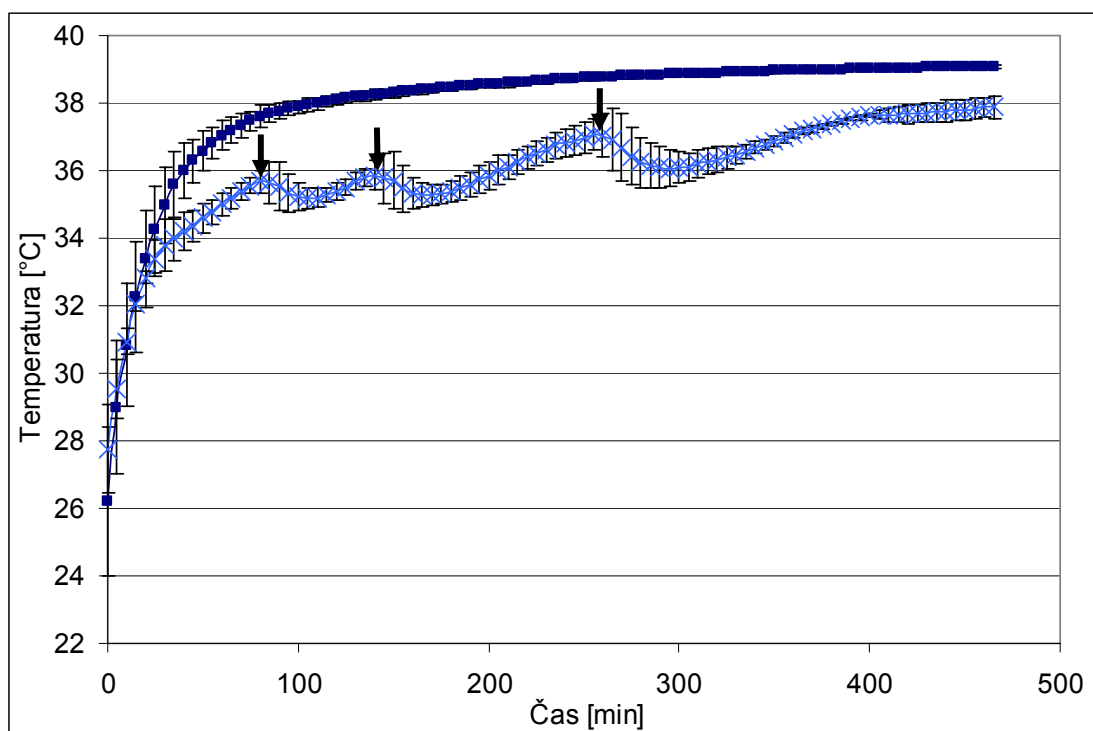
Skupne proteine smo merili z metodo po Bradfordu (Smith in sod., 1985). Najprej smo napravili umeritveno krivuljo. Zamešali smo serijo znanih koncentracij BSA (angl. albumin from bovine serum) ter po 5 µl dodali v jamice mikrotitrne plošče k 250 µl reagenta po Bradfordu. Mešali smo 30 sekund ter nato 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri 595 nm ter pripravili umeritveno krivuljo.

Nagojene celice, ki smo jih pripravili, kot je opisano pod točko 3.2.4, smo alkalno lizirali. Centrifugirane celice smo resuspendirali v fosfatnem pufru (z ali brez kloramfenikola), dvakrat redčili v destilirani vodi ter dodali 1 ml 0,2 M NaOH. Mešanico smo segrevali 5 minut v vreli vodi ter nato ohladili v ledu. V mikrotitrne luknjice smo dali 250 µl reagenta Bradford ter dodali 5 µl vzorca. Ploščo smo mešali na mikrotitrskem mešalniku 30 sekund in inkubirali na sobni temperaturi 5 minut. S spektrofotometrom Multiscan Spectrum smo izmerili absorbanco pri 595 nm. Koncentracijo proteinov smo ugotovili s primerjavo z umeritveno krivuljo.

4 REZULTATI

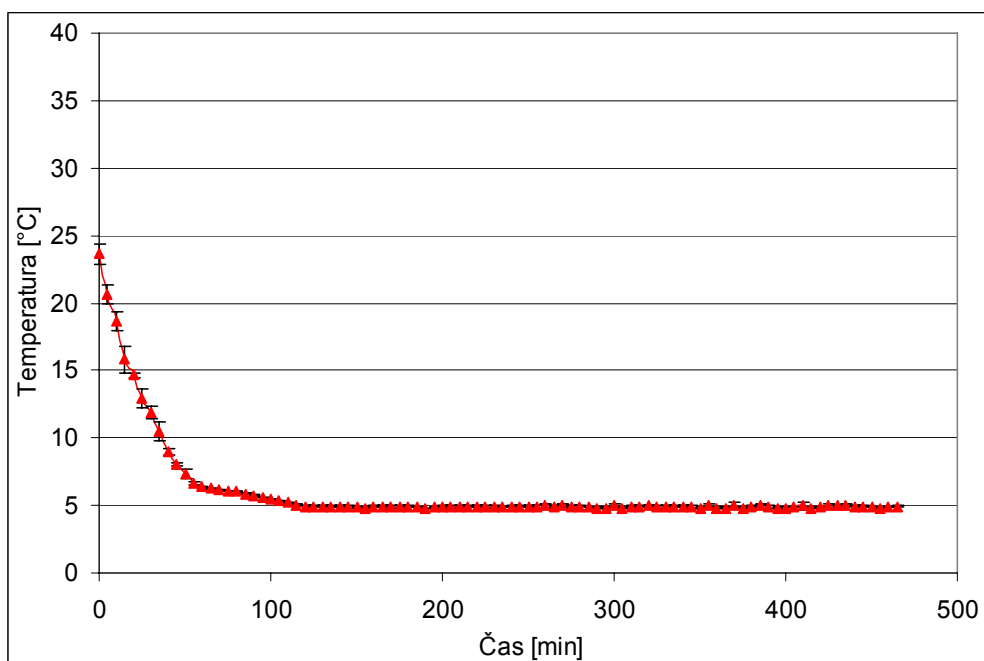
4.1 IZMERJENA TEMPERATURA

Slika 8 prikazuje izmerjeno temperaturo gojišča v 50-mililitrski penicilinski steklenički, ki je bila prenešana v toplo rastno komoro (37 °C). Na krivulji, ki prikazuje meritve temperature preko dneva, opazimo nihanje temperature gojišča za 1-2 °C. Nihanje temperature je sovpadalo z odpiranjem vrat komore. Merjenje temperature v topli rastni komori preko noči, ko ni bilo odpiranja vrat v rastni komori, je pokazalo ustalitev temperature pri 39 °C brez nihanja. V primeru meritev temperature preko noči je temperatura gojišča 60 minut po prestavitvi v toplo rastno komoro dosegla 95 % končne temperature.



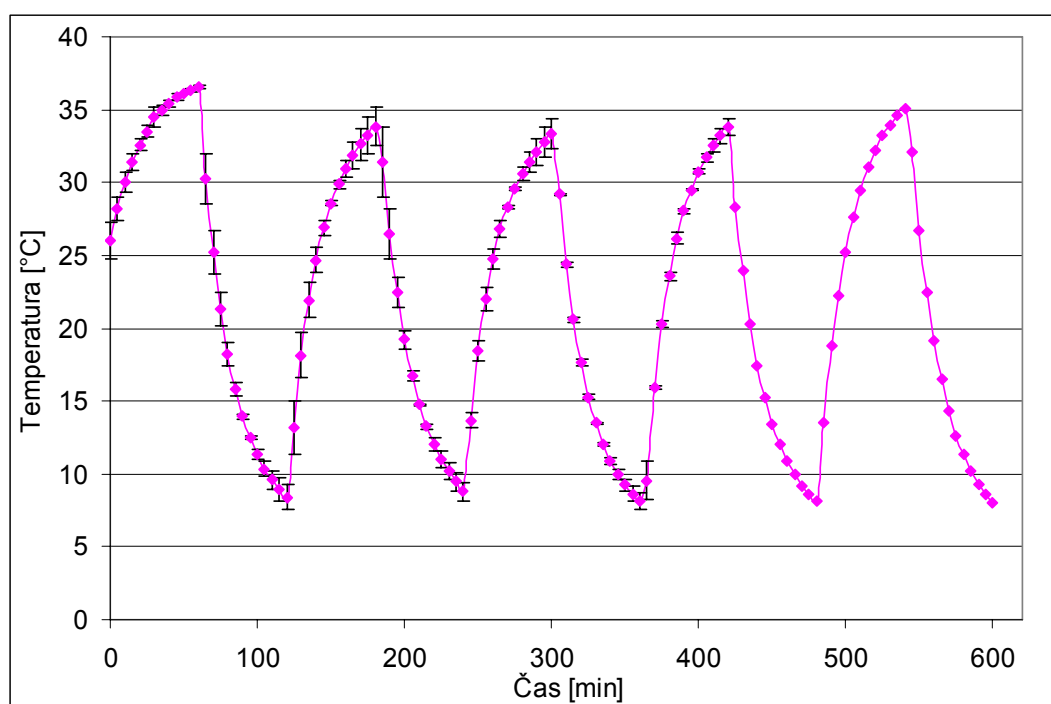
Slika 8: Izmerjena temperatura osnovnega gojišča v topli rastni komori po prestavitvi iz sobne temperature; meritve smo izvedli na dva načina: s simboli x so prikazane meritve izvedene preko dneva; s simboli ■ pa meritve, izvedene preko noči; puščice označujejo čas odpiranja vrat rastne komore.

Prav tako smo izmerili temperaturo rastnega gojišča, postavljenega v hladno rastno komoro (4 °C). Na sliki 9 je prikazan padec temperature po premiku penicilinske stekleničke z gojiščem iz sobne temperature v hladno komoro, kjer se je temperatura ustalila pri 5 °C. Meritve so bile izvedene preko dneva in ker nismo opazili nobenega nihanja kljub odpiranju vrat v rastno komoro, meritev preko noči nismo izvedli.



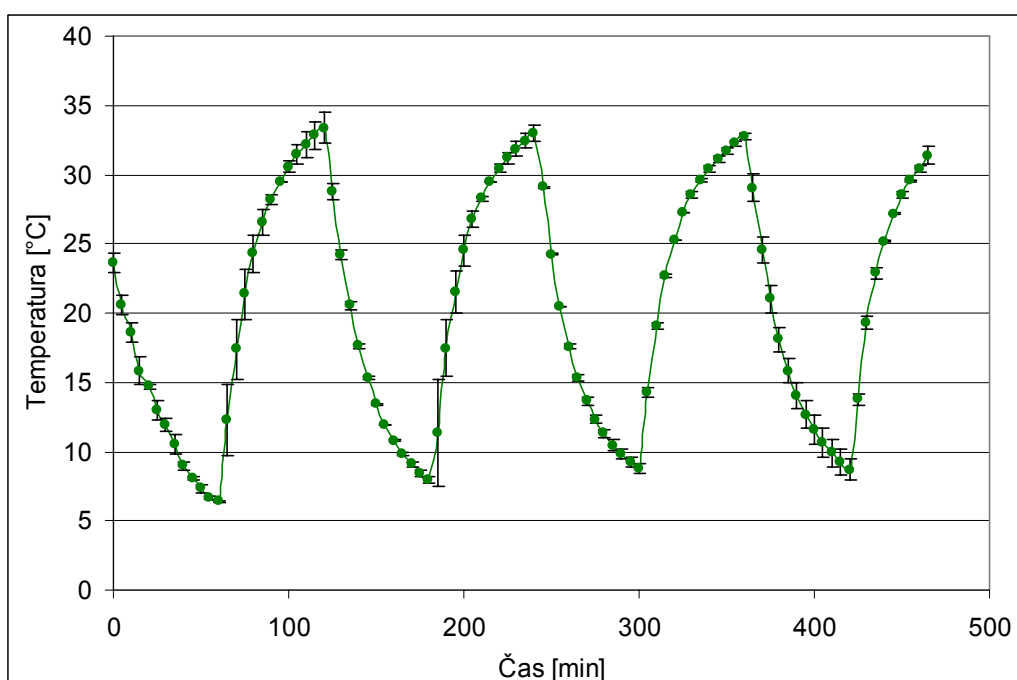
Slika 9: Izmerjena temperatura osnovnega gojišča v hladni rastni komori po prestavitvi iz sobne temperature.

Slika 10 prikazuje izmerjeno temperaturo gojišča v 50-mililitrski penicilnski steklenički ob režimu periodičnega spreminjanja temperature. Stekleničke smo iz sobne temperature prestavili za 1 uro na 37 °C, nadaljevali z eno uro pri 4 °C ter cikel spreminjanja temperature ponovili 4-krat. Na sliki 10 vidimo, da temperatura gojišča po 1 uri pri 37 °C doseže 36,6 °C. Ko stekleničko prestavimo v hladno rastno komoro, se temperatura zniža do 8,4 °C. Ko smo stekleničko prestavili ponovno na 37 °C, je temperatura gojišča dosegla 33,8 °C. Od tu dalje se je z večanjem števila ciklov temperatura ustalila pri minimalno 8 °C in maksimalno 35 °C. Periodičnemu spreminjanju temperature okolja je temperatura gojišča sledila, vendar pa odziv ni bil sinusoiden.



Slika 10: Izmerjena temperatura gojišča v steklenički s periodičnim spreminjanjem temperature (vsako uro) pri temperaturnem režimu 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 °C.

Podobno smo izmerili temperaturo gojišča v penicilinski steklenički s periodičnim spreminjanjem temperature, vendar smo tokrat gojišče s sobne temperature najprej postavili za 1 uro na 4 °C, nadaljevali pri 37 °C ter cikel spreminjanja temperature ponovili 3-krat. Iz slike je razvidna končna dosežena temperatura po eni uri po premiku v hladno komoro, ki je bila 6,4 °C. Temperatura gojišča po eni uri po premiku v toplo rastno komoro je dosegla 34 °C in je ostala vsak naslednji cikel podobna. Spodnja meja temperature se po eni uri po premiku v hladno komoro ustali pri 8 °C.

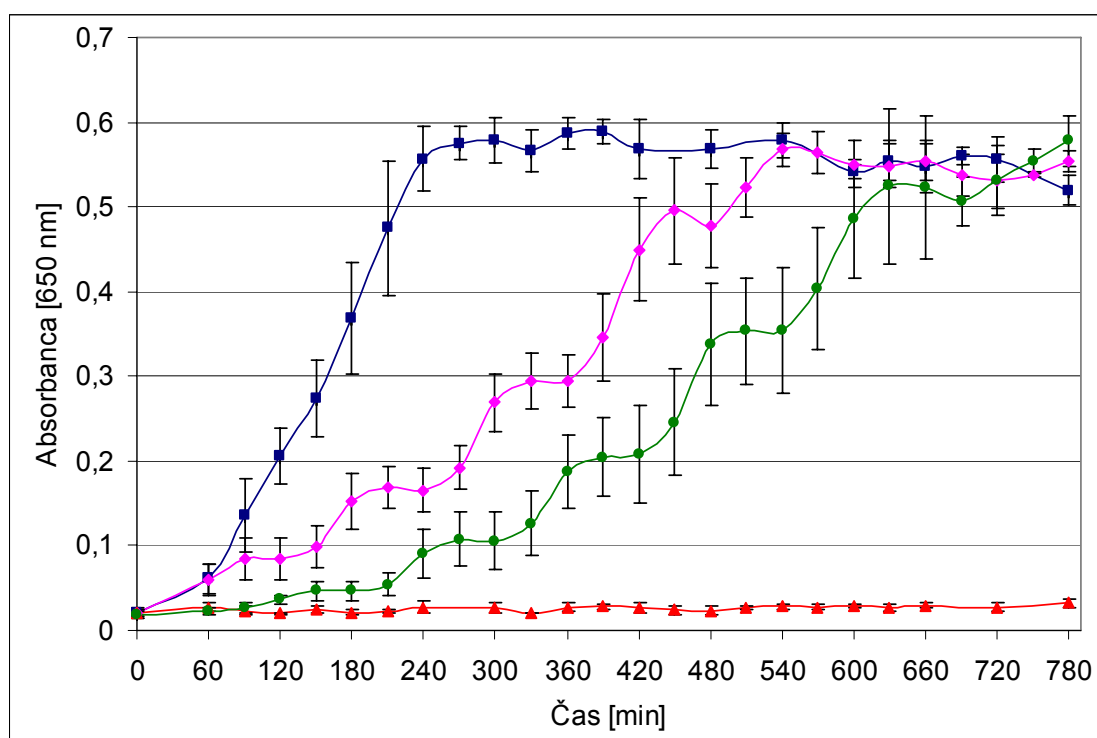


Slika 11: Izmerjena temperatura gojišča v steklenički s periodičnim spreminjanjem temperature (vsako uro) pri temperaturnemu režimu 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C.

4.2 HITROST RASTI *E.coli* PRI RAZLIČNIH TEMPERATURNIH REŽIMIHIH

Slika 12 prikazuje hitrost rasti *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih. Kultura, gojena konstantno pri 37 °C, ima značilno obliko logaritemske rastne krivulje. Po približno 4 urah kultura preneha eksponentno rasti in doseže stacionarno stanje, po nadaljnjih 6 urah pa prične gostota nekoliko padati. Optična gostota kulture, gojene pri 4 °C, se ne spreminja in ostaja približno 0,02. Rastna krivulja kulture, ki smo jo gojili s periodičnim spreminjanjem

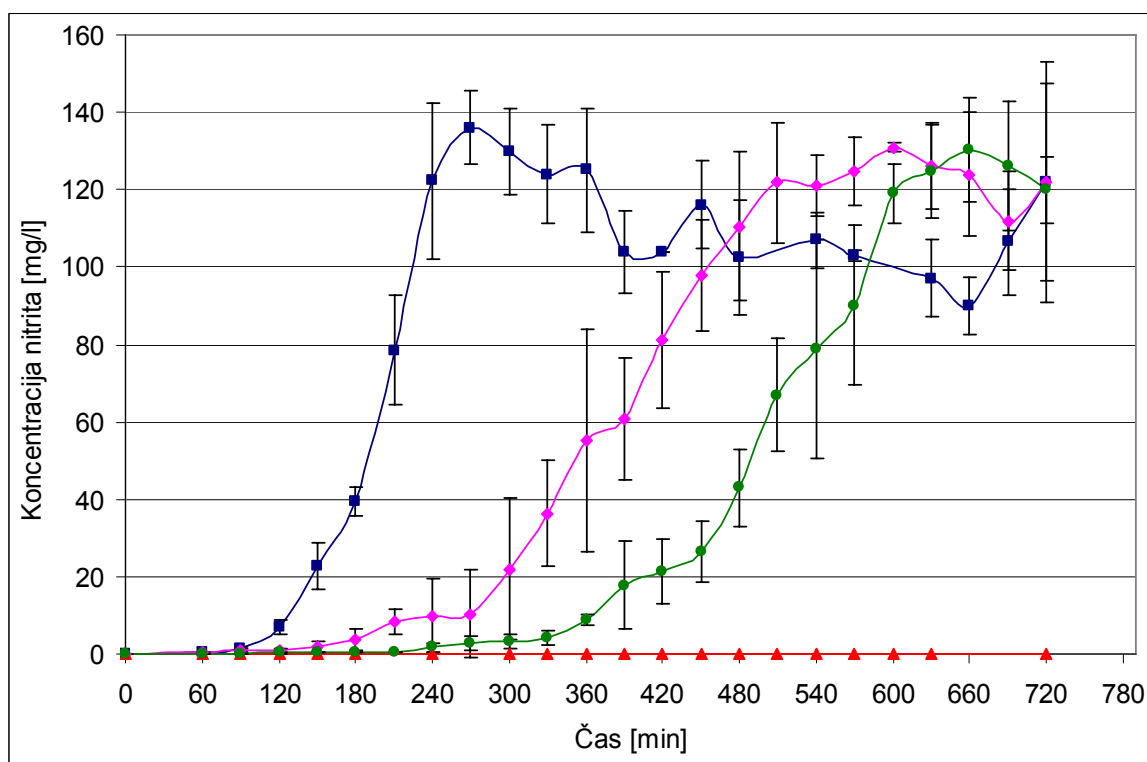
temperature, začeni pri 37 °C, preide v stacionarno fazo po 9 urah gojenja. Krivulja je značilne stopničaste oblike, kjer ravnine predstavljajo zastoje rasti. Do zastoja rasti pride po prenosu kulture v hladno rastno komoro, vendar ne takoj, ampak s časovnim zamikom 30 minut. Podobno opazimo rast z zamikom po prenosu na višjo temperaturo. Iz slike je tudi razvidno, da je hitrost rasti posameznega odseka podobna hitrosti rasti kulture, gojene pri 37 °C. Kultura, ki smo jo gojili s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni pri 4 °C, prav tako kaže vidne zastoje rasti in stopničasto obliko. Na tej krivulji lahko opazimo, da ta kultura stacionarno fazo rasti doseže po 12 urah gojenja. Na začetku kultura potrebuje približno 4 ure da doseže optično gostoto 0,09, medtem ko kultura, gojena konstantno pri 37 °C, doseže to gostoto že po dobri uri. Iz krivulje lahko opazimo, da je po tem, ko je kultura dosegla optično gostoto 0,1, hitrost rasti posameznih odsekov primerljiva hitrosti rasti kulture gojene konstantno pri 37 °C.



Slika 12: Hitrost rasti *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih: oznaka ■ nam prikazuje kulturo, gojeno konstantno pri 37 °C; oznaka ◆ nam prikazuje kulturo, gojeno pri temperaturnem režimu: 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C; oznaka ● nam prikazuje kulturo, gojeno pri temperaturnem režimu: 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C; oznaka ▲ pa nam prikazuje kulturo, gojeno pri 4 °C.

4.3 PRODUKCIJA NITRITA PRI RAZLIČNO GOJENI BIOMASI

Med merjenjem hitrosti rasti pri različnih temperaturnih režimih smo odvzemali tudi vzorce za določitev koncentracije nitrita. Pri kulturi, gojeni konstantno pri 37 °C, zaznamo produkcijo nitrita po 2 urah, do zastoja pa pride po 4,5 urah. Vendar že 90 minut po vstopu kulture v stacionarno fazo opazimo padanje koncentracije nitrita. Pri kulturi, gojeni pri 4 °C, nitritne produkcije v času eksperimenta ne zaznamo. Pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni pri 37 °C, zaznamo nitritno produkcijo po 3,5 urah, do zastoja pa pride po 8,5 urah, tik pred vstopom kulture v stacionarno fazo. Tu ne opazimo padca koncentracije nitrita v stacionarni fazi. Pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni pri 4 °C, zaznamo nitritno produkcijo šele po 6 urah, do zastoja pa pride po 10 urah. Zaustavljanje produkcije nitrita pri nizkih temperaturah je precej manj opazno kot pri hitrosti rasti. Kinetika nastanka nitrita je pri temperaturnem režimu 37 – 4 – 37 °C ali 4 – 37 – 4 °C počasnejša kot pri 37 °C.

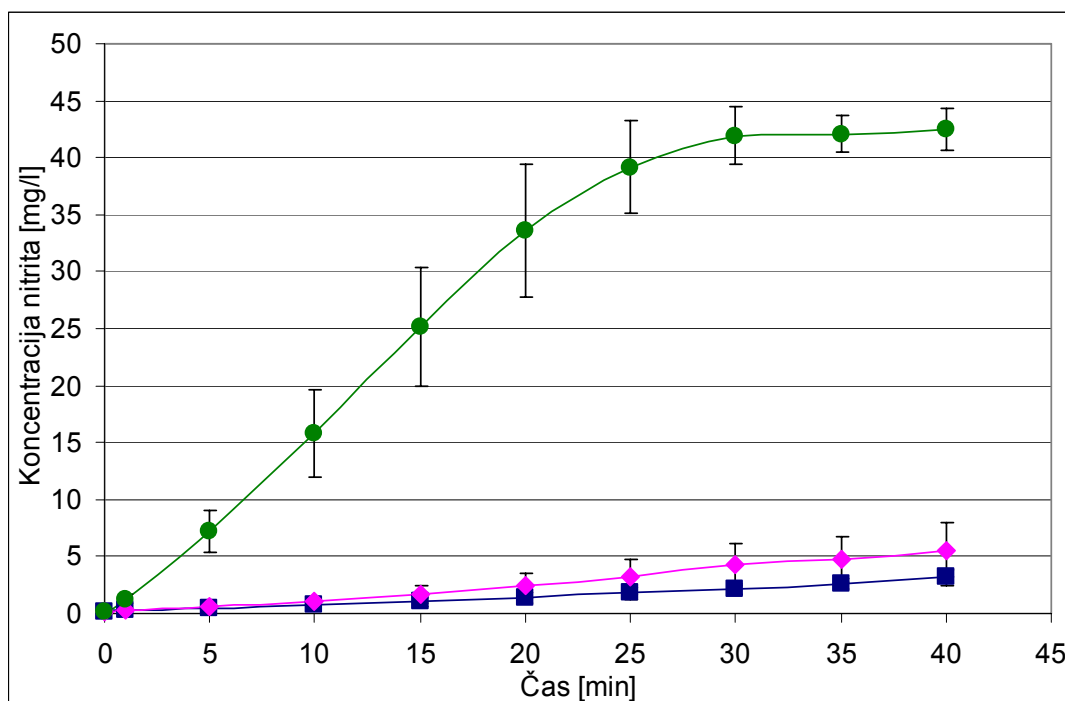


Slika 13: Koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri različnih temperaturnih režimih: oznaka ■ prikazuje kulturo, gojeno konstantno pri 37 °C; oznaka ◆ prikazuje kulturo, gojeno pri temperaturnem režimu: 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C; oznaka ● prikazuje kulturo, gojeno pri temperaturnem

režimu: 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 °C; oznaka ▲ pa prikazuje kuturo, gojeno pri 4 °C.

4.4 NITRITNA PRODUKCIJA V MODELU Z MIRUJOČIMI CELICAMI

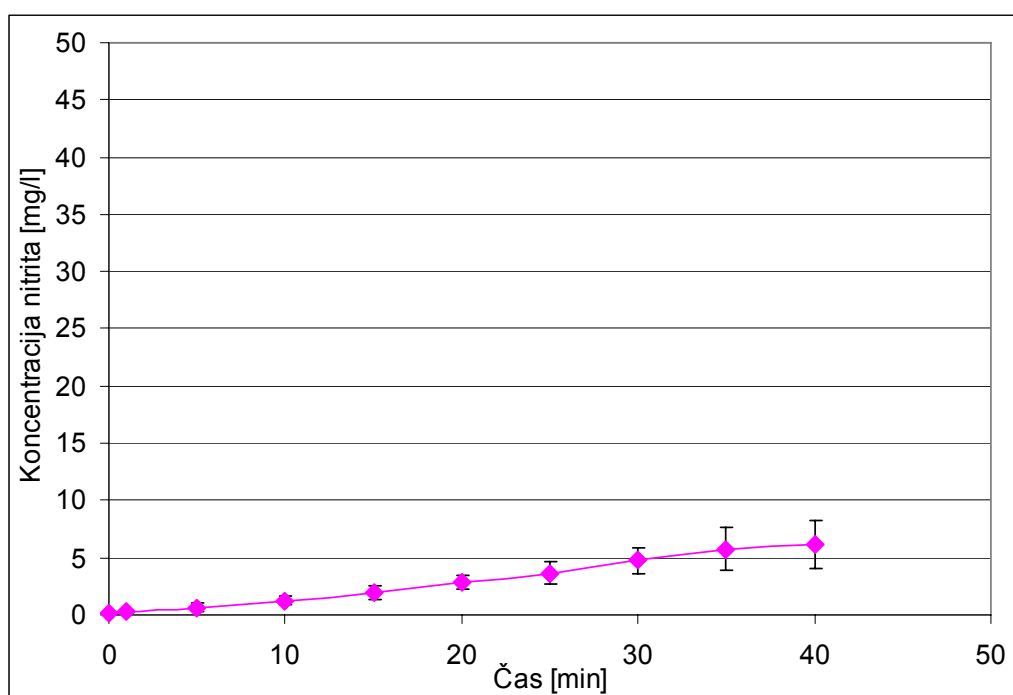
Za primerjavo celic, ki so bile podvržene različnim temperaturnim režimom smo celice namnožili do začetka eksponentne faze rasti, to je do iste optične gostote in nato naredili encimski test za nitratno reduktazo z modelom mirujočih celic. Ker lahko v času trajanja eksperimenta v modelu z mirujočimi celicami pride do aktivne sinteze proteinov, smo naredili poskus ob dodatku kloramfenikola. Iz slike 14 je razvidno, da je bila produkcija nitrita najvišja pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni pri 4 °C. Po 40 minutah je v kulturi nastalo 42 mg/l nitrita. Pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni pri 37 °C, je po 40 minutah nastalo mnogo manj nitrita, le okoli 6 mg/l nitrita. Pri kulturi, gojeni konstantno pri 37 °C, je produkcija nitrita najmanjša, po 40 minutah je nastalo le 4 mg/l nitrita.



Slika 14: Izmerjena koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri modelu z mirujočimi celicami in uporabi pufru z kloramfenikolom. Biomasa je bila različno gojena: oznaka ■ označuje biomaso, gojeno dve uri pri

konstantnih 37 °C; oznaka ♦ označuje biomaso, gojeno pri temperaturnem režimu: 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C; oznaka ● pa nam prikazuje kulturo, gojeno pri temperaturnem režimu: 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C.

Ker je bil encimski odziv kulture pri temperaturnem režimu 37 – 4 – 37 °C in 4 – 37 – 4 °C zelo različen, kar bi lahko bilo posledica dejstva da je bila kultura pri režimu 4 – 37 – 4 °C dlje časa pri nizki temperaturi, smo naredili nov poskus, kjer smo pri temperaturnem režimu 37 – 4 – 37 °C podaljšali čas pri 4 °C. Na ta način smo izenačili čas, ki ga kultura preživi pri nizki temperaturi. To kulturo smo najprej gojili eno uro pri 37 °C, nato smo jo premaknili za dve uri na 4 °C, sledila je enourna inkubacija pri 37 °C, nakar smo cikel spreminjanja temperature zopet ponovili. Izmerili smo, da je po 40 minutah nastalo 6 mg/l nitrita, kar je enako kot celice pri poskusu, ko je bila kultura na 4 °C eno uro in ne dve uri.



Slika 15: Izmerjena koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri modelu z mirujočimi celicami in uporabi pufra s kloramfenikolom. Biomaso smo gojili po sledečem režimu: 1 ura pri 37 °C, dve uri pri 4 °C, ena ura pri 37 °C, dve uri pri 4 °C ter ena ura pri 37 °C.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Osnovni parameter, ki smo ga v diplomski nalogi spreminjali, je bila temperatura. Na začetku nas je zanimalo, po kolikšnem času se temperatura gojišča ustali, če gojišče prenesemo iz sobne temperature na 37 °C oziroma na 4 °C. Primerjava krivulj dnevnega in nočnega merjenja temperature v topli rastni komori kaže, da je nihanje temperature gojišča, izmerjenega preko dneva, najverjetneje posledica odpiranja vrat. Odpiranju vrat rastne komore se ne moremo izogniti, lahko pa ga zmanjšamo na minimalno, čemur smo se v nadaljnjem delu skušali približati. Izmerjena temperatura gojišča v hladni komori ne kaže nihanja, čeprav so bila vrata med merjenjem tudi odpirana. Sklepamo, da se razlog za razliko v nihanju temperature skriva v volumnu tople in hladne sobe. Topla rastna komora je veliko manjša, le okoli 7 m³ in ob odpiranju vrat pride do zamenjave relativno večjega deleža zraka, kar se pokaže v padcu temperature. Ker je hladna rastna komora večja, okoli 30 m³, odpiranje vrat nima zaznavnega vpliva na temperaturo gojišča v njej. Z merjenjem periodično spreminjane temperature smo pokazali, da je 60-minutni interval dovoljšen za ohladitev (na približno 8 °C) oziroma segrevanje (na približno 34 °C) gojišča v penicilinski steklenički. Za osnovni namen te diplomske naloge je to sprejemljivo, saj gre za znatno nihanje temperature v temperaturnem območju, ki omogoča aktivnost *E. coli*.

Iz rastne krivulje kulture, gojene konstantno pri 37 °C, lahko jasno razberemo različne faze rasti *E. coli*: lag faza, faza eksponentne rasti, stacionarna faza in faza odmiranja. S krivulje kulture, gojene v rastni komori pri 4 °C, lahko vidimo, da je ta temperatura prenizka za rast, saj ni opaznega porasta v optični gostoti. Glede na rezultate meritev temperature sklepamo, da je bila temperatura gojišča okrog 5 °C, kar očitno ne zadošča za rast *E. coli*. Stopničasta oblika krivulj kultur, gojenih s periodičnim spreminjanjem temperature, je posledica nižanja in višanja temperatur. Ravnina stopnice je posledica zastoja rasti zaradi prenizke temperature. Vsakič po premiku kulture na nižjo temperaturo pride do zastoja rasti, vendar ne takoj po premiku, saj se temperatura v gojišču ne spusti takoj, ampak šele po 30 minutah. Če primerjamo graf hitrosti rasti in graf merjenja temperature gojišča s periodičnim spreminjanjem temperature, lahko vidimo, da je za zastoj rasti potreben padec

temperature v gojišču pod 14 °C. Podobno opazimo tudi pri višanju temperature. Takoj po premiku na višjo temperaturo, ko še ni prišlo do znatnega segrevanja gojišča, rasti ne opazimo. Približno 30 minut po prestavitvi kulture iz hladne v toplo komoro, ko se temperatura dvigne nad 28 °C pride do obnove eksponentne rasti. Merjenje hitrosti rasti z optično gostoto ima nekatere pomanjkljivosti. Predvsem je metoda relativno slabo občutljiva. Potrebno je dokaj veliko povečanje števila celic, da opazimo spremembe v optični gostoti. Morozov in Petin (2007) opozarjata na odmiranje celic v kulturi, izpostavljeni periodičnemu šoku pri tovrstnih poskusih spreminjanja temperature gojišča. Po drugi strani pa je bistvena prednost merjenja optične gostote v relativno enostavnem poskusu in hitro pridobljenih podatkih. Menimo, da bi pri nadaljnjih poskusih bilo priporočljivo izmeriti hitrost rasti ne samo z optično gostoto, temveč tudi z ugotavljanjem števila viabilnih celic (npr. mikroskopsko z viabilnim barvanjem).

S primerjavo krivulje hitrosti rasti in krivulje koncentracije nitrita v odvisnosti od časa sklepamo, da pride do začetka produkcije nitrita v vseh rastočih kulturah z optično gostoto med 0,17 do 0,2. Do zastoja kopičenja nitrita pa je prišlo ob zelo različnih časih glede na vstop kulture v stacionarno fazo. Kultura, gojena pri konstantnih 37 °C, je potrebovala od zaznavanja nitrita do zastoja produkcije 1,5 ure. Do zastoja nastajanja nitrita je prišlo takoj po vstopu kulture v stacionarno fazo rasti. Kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začenši pri 37 °C oziroma 4 °C sta potrebovali od začetka produkcije nitrita do zastoja produkcije 4 oziroma 5 ur. Pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začenši pri 37 °C do zastoja produkcije pa pride 30 minut pred vstopom kulture v stacionarno fazo rasti. Pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začenši pri 4 °C pride do zastoja 2 uri pred vstopom kulture v stacionarno fazo. Koncentracija nitrita, ko pride do zastoja kopičenja, je enaka kot začetna koncentracija nitrata. To kaže, da je kultura porabila celoten nitrat in da je to razlog prenehanja kopičenja nitrita. Predvidevamo, da se z nitratno redukcijo pridobljena energija obeh kultur, ki smo ju gojili s periodičnim spreminjanjem temperature, uporabi za premostitev šoka ohlajanja. Namreč, proizvedli sta enako količino nitrita kot kultura, gojena konstantno pri 37 °C, pa kljub temu še nista vstopili v stacionarno fazo rasti. Pri kulturi, gojeni konstantno pri 37 °C, zaznamo rahel padeč koncentracije nitrita kakšno uro po vstopu kulture v stacionarno fazo rasti. Ta padeč težko razložimo – lahko bi bil

posledica redukcije nitrata do amonijaka, vendar bi za dokaz potrebovali dodatne eksperimente, ki bi pokazali, kaj se dogaja z nitritom po vstopu kulture v stacionarno fazo.

Biomasa v modelu z mirujočimi celicami smo gojili aerobno brez nitrata, vendar pri različnih temperaturnih režimih. Pri vseh temperaturnih režimih, razen pri 4 °C, kjer ni bilo rasti, so bile celice pred začetkom encimskega testa v primerljivi rasti. Model z mirujočimi celicami omogoča sledenje porabe nitrata. Poraba nitrata je odvisna od koncentracije encimov in njihovih aktivnosti. Ker je bila koncentracija celic pri različnih temperaturnih režimih primerljiva, so opažene razlike v količini reducirane nitrata predvsem posledica nihanja temperature. Po gojenju smo kulturo centrifugirali in spirali s pufram s kloramfenikolom, izmerili koncentracijo skupnih proteinov, nato pa nadaljevali z vakuumiranjem ter temperiranjem pri 37 °C. Po 10 minutah temperiranja samo dodali nitrat in pričeli odvezovati vzorce v časovnih intervalih. Skupno je do začetka eksperimenta preteklo 90 minut. To je dovolj dolgo časovno obdobje, da lahko pride do sinteze novih proteinov. Bacchus in Javor (1975) sta že pred časom pokazala, da kloramfenikol povsem zavre bakterijsko proteinsko sintezo z vezavo na 50S podenoto ribosoma, s čimer inhibira encimsko peptidilno transferazo, zato kloramfenikol uporabljajo za preprečitev *de novo* sinteze proteinov. Po drugi strani pa so različni avtorji v zadnjem času pokazali, da kloramfenikol povzroči enak odgovor kulture kot šok ohlajanja (Usulus in Tezcan, 2000) in inducira proteine šoka ohlajanja CspA, CspB ter CspG (Ermolenko in Makhatadze, 2002). Tako so Jiang in sod. (1993) pokazali, da kloramfenikol inducira ekspresijo gena *cspA* na nivoju transkripcije in inducira gen *hscA*, katerega protein Hsc66 deluje kot molekularni šaperon (Lelivelt in Kawula, 1995). Dodatek kloramfenikola prav tako tudi zniža nivo (p)ppGpp v celici, kar lahko privede do transkripcije nekaterih dodatnih genov v *E. coli* (Jiang in sod., 1993). Torej lahko glede na dosedanjo literaturo trdimo, da kloramfenikol inducira proteine šoka ohlajanja ter druge genske produkte, ki so vpleteni v globalno regulacijo odgovora na stresne dejavnike – med katerimi je najpomembnejši RpoS (Ermolenko in Makhatadze, 2002). Visoka produkcija nitrata pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni pri 4 °C, je verjetno rezultat višje aktivnosti in vsebnosti nitratnih reduktaz. Iz dosedanje literature nam je znano, da sta NAP in NRZ izražena konstitutivno ter je njuna regulacija odvisna od različnih faktorjev, med drugimi tudi RpoS, ki je globalni stresni regulator, sintetizira pa se tudi kot odgovor na šok

ohlajanja. Med šokom ohlajanja poleg sinteze RpoS pride tudi do indukcije drugih pomembnih globalnih regulatorjev kot so H-NS, IHF, AppY (Unden in Bongaerts, 1997). Murray in Knowles (1999) sta pokazala, da je kloramfenikol preprečil *de novo* sintezo proteinov nitritnih reduktaz, kar vodi v kopičenje nitrita.

Kopičenje nitrita bi lahko bilo vsaj delno tudi posledica biološke razgradnje kloramfenikola. Dendooven in sod. (1994) so odkrili, da nitrit nastane tudi kot produkt razgradnje kloramfenikola. V njihovem eksperimentu so ugotovili, da se je koncentracija nitrita že po 10 minutah povečevala sorazmerno s koncentracijo dodanega kloramfenikola. Pri 3,68 mM koncentraciji kloramfenikola je koncentracija nitrita hitro poskočila. V našem eksperimentu je bila koncentracija kloramfenikola veliko nižja, le 0,62 mM, tako da te razlage v našem primeru ne moremo v popolnosti sprejeti in porast nitrita ne moremo v tolikšni meri pripisovati razgradnji kloramfenikola. Poleg tega je prišlo do izrazitega porasta nitrita samo pri enem temperaturnem režimu. Nekateri avtorji (Brooks in sod., 1992) so celo objavili, da naj bi kloramfenikol inhibiral aktivnost obstoječih denitrifikacijskih encimov – trdijo, da koncentracija 300 mg/l povsem inhibira produkcijo N₂O. Wu in Knowles (1995) opozarjata, da je koncentracija kloramfenikola najpomembnejši faktor, ki je odgovoren za to, ali pride do inhibicije proteinske sinteze ali tudi do inhibicije obstoječih encimov (0,31 do 0,5 μM koncentracija je dovolj šnja za zaustavitev sinteze proteinov). V kolikor bi želeli ugotoviti vpliv kloramfenikola na nitrit, bi bil primeren poskus z različnimi koncentracijami kloramfenikola, s čimer bi videli, kolikšna koncentracija kloramfenikola vpliva na indukcijo nitratnih reduktaz. Naredili smo tudi poskus, kjer smo za model z mirujočimi celicami uporabili pufer brez kloramfenikola (Priloga A) in opazovali odziv kultur, gojenih z različnim temperaturnim režimom. Pri kulturi, gojeni konstantno na 37 °C, smo zaznali največjo produkcijo nitrita, sledila je kultura, gojena s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni na 37 °C, najmanjša produkcija pa je bila pri kulturi, gojeni s periodičnim spreminjanjem temperature, začeni na 4 °C. Žal je bilo opravljenih premalo dodatnih poskusov, da bi lahko razložili ta pojav. V času pred samim eksperimentom namreč preteče 90 minut in lahko prihaja do sinteze dodatnih encimov, kar oteži razlago dobljenih rezultatov.

Dolžina trajanja izpostavljanju nizki temperaturi, torej šoka ohlajanja, bi lahko vplivala na kopičenje nitrita in visoko aktivnost nitratnih reduktaz. V ta namen smo podaljšali čas izpostavljanje kulture nizkim temperaturam. Namesto eno uro na 4 °C smo kulturo imeli dve uri na 4 °C. Rezultati so pokazali, da čas, ki ga kultura preživi na nizki temperaturi, ko se le ta ustali, ni pomemben za produkcijo nitrita. Do prilagoditve na šok ohlajanja je verjetno prišlo med samim ohlajanjem. Ker je bil ta čas enak pri obeh eksperimentih je tudi produkcija nitrita primerljiva. Iz rezultatov izhaja, da se pri kulturi, ki je dlje časa izpostavljena nizkim temperaturam zaustavi tako redukcija nitrita kot tudi rast bakterij *Escherichia coli*.

5.2 SKLEPI

- Periodično spreminjanje temperature spremeni dinamiko rasti *E. coli* glede na konstantne pogoje; zaradi večkratnega pospeševanja in zaviranja rasti, kultura potrebuje dlje časa da doseže stacionarno fazo.
- Periodično spreminjanje temperature spremeni kinetiko nastanka nitrita; hitrost nastanka nitrita je počasnejša pri celicah, kjer periodično variramo temperaturo.
- Začetni pogoji pri katerih začnemo namnoževati bakterije *E. coli* vplivajo na fiziologijo populacije; celice, ki gredo skozi 37-4-37 °C cikel nimajo enakega fiziološkega odgovora kot celice, ki gredo skozi 4-37-4 °C cikel spreminjanja temperature.

6 POVZETEK

Mikroorganizmi so se zaradi preživetja primorani prilagajati na številne okoljske spremembe in stresne okoliščine. Zaradi vpliva temperature na vse celične reakcije so prilagoditve na povišanje ali znižanje temperature verjetno ene izmed najpomembnejših. Klasična mikrobiologija temelji na preučevanju celic pri konstantnih pogojih, vendar se v naravi pogoji stalno spreminjajo, kar nedvomno vpliva tudi na aktivnost celic.

V diplomski nalogi smo preučili vpliv periodičnega spreminjanja temperature na hitrost rasti *E. coli*. Ugotovili smo, da znižanje temperature povzroči zastoj rasti kulture ter da je začetna temperatura gojenja zelo pomembna. Do zastoja ali pospeševanja rasti po spremembi temperature pride z zamikom. Prav tako smo preučili vpliv periodičnega spreminjanja temperature na redukcijo nitrata. Naši rezultati kažejo, da se energijski izplen nitratne redukcije verjetno uporabi za premostitev šoka ohlajanja.

Ker je redukcija nitrata ekološko gledano zelo pomemben proces, smo načrtovali tudi poskus, kjer smo ugotavljali vpliv šoka ohlajanja in dodatek kloramfenikola na to metabolno reakcijo. Iz rezultatov vidimo, da hladni šok nitrarno redukcijo poveča. Kloramfenikol z vezavo na ribosomsko podenoto prepreči *de novo* sintezo proteinov, vseeno pa inducira glavni protein šoka ohlajanja, CspA. Ker je iz dosedanje literature znano, da šok ohlajanja inducira tudi gene, ki so vpleteni v globalni regulatorni nadzor, predvidevamo, da šok ohlajanja vpliva na povečanje potenciala za redukcijo nitrata. V prihodnosti bi bili potrebni dodatni poskusi, ki bi te predpostavke potrdili.

7 VIRI

- Bacchus A.N., Javor G.T. 1975. Stability of *Escherichia coli* membrane proteins during chloramphenicol treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, 3: 387-389
- Bae W., Jones P.G., Inouye M. 1997. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. *Journal of Bacteriology*, 179, 22: 7081-7088
- Berry E.D., Foegeding P.M. 1997. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, 60, 12: 1583-1594
- Bonnefoy V., Demoss J.A. 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66, 1-3: 47-56
- Brandi A., Spurio R., Gualerzi C.O., Pon C.L. 1999. Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions. *EMBO Journal*, 18, 6: 1653-1659
- Brooks M.H., Smith R.L., Macalady D.L. 1992. Inhibition of existing denitrification enzyme activity by chloramphenicol. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 5:1746-1753
- Chang L., Wei L.L.C., Audia J.P., Morton R.A., Schellhorn H.E. 1999. Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Molecular Microbiology*, 34, 4: 756-766
- Chattopadhyay M.K. 2006. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Biosciences*, 31, 1: 157-165
- Dawson R.N., Murphy K.L. 1972. Temperature dependency of biological denitrification. *Water Research*, 6: 71-83
- Dendooven L., Splatt P., Anderson J.M. 1994. The use of chloramphenicol in the study of the denitrification process – some side effects. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 7: 925-927
- Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. 2002. Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 11: 1902-1913
- Goldstein J., Pollitt N.S., Inouye M. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1: 283-287

- Graumann P.L., Marahiel M.A. 1998. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 8: 286-290
- Gualerzi C.O., Giuliodori A.M., Pon C.L. 2003. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *Journal of Molecular Biology*, 331, 3: 527-539
- Herendeen S.L., VanBogelen R.A., Neidhardt F.C. 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *Journal of Bacteriology*, 139, 1: 185-194
- Horn G., Hofweber R., Kremer W., Kalbitzer H.R. 2007. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 12: 1457-1470
- Jiang W., Jones P., Inouye M. 1993. Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *Journal of Bacteriology*, 175, 18: 5824-5828
- Knowles R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46, 1: 43-70
- Lelivelt M.J., Kawula T.H. 1995. Hsc66, an Hsp70 homolog in *Escherichia coli*, is induced by cold shock but not by heat shock. *Journal of Bacteriology*, 177, 17: 4900-4907
- Moreno-Vivián C., Cabello P., Martinez-Luque M., Blasco R., Castillo F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology*, 181, 21: 6573-6584
- Morozov I.I., Petin V.G. 2007. The influence of cyclic heating and cooling on *Escherichia coli* survival. *Microbiology*, 76, 2: 172-176
- Murray R.E., Knowles R. 1999. Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 8: 3487-3492
- Phadtare S., Alsina J., Inouye M. 1999. Cold shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 2: 175-180
- Phadtare S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6: 125-136
- Philippot L., Højberg O. 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1446, 1-2: 1-23
- Polissi A., De Laurentis W., Zangrossi S., Briani F., Longhi V., Pesole G., Deho G. 2003. Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Research in Microbiology*, 154, 8: 573-580

- Ramos J.L., Gallegos M.T., Marques S., Ramos-González M.I., Espinosa-Urgel M., Segura A. 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 2: 166-171
- Richardson D.J., Berks B.C., Russell D.A., Spiro S., Taylor C.J. 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 2: 165-178
- Saad O.A.L.O., Conrad R. 1993. Temperature dependence of nitrification, denitrification, and turnover of nitric oxide in different soils. *Biology and Fertility of Soils*, 15: 21-27
- Schumann W. 2000. Function and regulation of temperature-inducible bacterial proteins on the cellular metabolism. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 67: 1-33
- Shaw M.K.; Ingraham, J.L. 1967. Synthesis of macromolecules by *Escherichia coli* near the minimal temperature for growth. *Journal of Bacteriology*, 94, 1: 157-164
- Shaw M.K., Marr A.G., Ingraham J.L. 1971. Determination of the minimal temperature for growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 105, 2: 683-684
- Showe M.K., DeMoss J.A. 1968. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 95, 4: 1305-1313
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 1: 76-85
- Spiro S. 1994. The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66, 1-3: 23-36
- Stewart V., MacGregor C.H. 1982. Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of *chlC*, *chlE*, and *chlG* loci. *Journal of Bacteriology*, 151, 2: 788-799
- Stewart V. 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiological Reviews*, 52, 2: 190-232
- Stewart V. 1993. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 9, 3: 425-434
- Stewart V. 1994. Dual interacting two-component regulatory systems mediate nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 145, 5-6: 450-454

- Stewart V. 1994. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66, 1-3: 89-110
- Stewart V., Lu Y.R., Darwin A.J. 2002. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 184, 5: 1314-1323
- Tupper A.E., Owen-Hughes T.A., Ussery D.W., Santos D.S., Ferguson D.J., Sidebotham J.M., Hinton J.C., Higgins C.F. 1994. The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro. *EMBO Journal*, 13, 1: 258-268
- Uden G., Becker S., Bongaerts J., Holighaus G., Schirawski J., Six S. 1995. O₂-Sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*, 164, 2: 81-90
- Uden G., Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320, 3: 217-234
- VanBogelen R., Abshire K., Pertsemelidis A., Clark R., Neidhardt F. 1996. Gene protein database of *Escherichia coli* K-12, edition 6. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Vol. 2: Cellular and molecular biology. 2nd ed. Neidhardt F.C. (ed.). Washington, ASM Press: 2067-2117
- Vasina J.A., Peterson M.S., Baneyx F. 1998. Scale-up and optimization of the low-temperature inducible *cspA* promoter system. *Biotechnology Progress*, 14, 5: 714-721
- Wang N., Yamanaka K., Inouye M. 1999. CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. *Journal of Bacteriology*, 181, 5: 1603-1609
- Wick L.M., Egli T. 2004. Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Advances Biochemical Engineering/Biotechnology*, 89: 1-45
- Wilson D.N., Nierhaus K.H. 2004. The how and Y of cold shock. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11, 11: 1026-1028
- Wu Q., Knowles R. 1995. Effect of chloramphenicol on denitrification in *Flexibacter canadensis* and "*Pseudomonas denitrificans*". *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2: 434-437
- Yamanaka K., Fang L., Inouye M. 1998. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology*, 27, 2: 247-255
- Yamanaka K. 1999. Cold shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, 2: 193-202

Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 533-616

Zumft W.G., Körner H. 1997. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 1-2: 43-58

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Davidu Stoparju ter celotni Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta za vodenje, nasvete in pomoč pri praktičnem delu. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Romani Marinšek Logar za recenzijo.

Zahvaljujem se družini in prijateljem, ki so mi nesebično stali ob strani ter me spodbujali, ko sem to najbolj potrebovala.

Zahvaljujem se tudi vsem drugim, ki so mi v času študija pomagali ter kakorkoli sodelovali pri nastajanju tega dela.

PRILOGA A: Izmerjena koncentracija nitrita v odvisnosti od časa pri modelu z mirujočimi celicami in uporabi pufra brez kloramfenikola. kloramfenikolom. Biomasa je bila različno gojena: oznaka ■ označuje biomaso, gojeno dve uri pri konstantnih 37 °C; oznaka ◆ označuje biomaso, gojeno pri temperaturnem režimu: 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C; oznaka ● pa nam prikazuje kulturo, gojeno pri temperaturnem režimu: 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 – 4 – 37 °C.

