

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Aleš Goznik

**SPREMENJAVA PARAMETrov KVALITete LIZATA *VIBRIO SP.*
DSM14379 V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE NaCl**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE CHANGE OF THE *VIBRIO SP.* DSM14379 LYSATE QUALITY
PARAMETERS DEPENDING ON NaCl CONCENTRATION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, Oddelku za živilstvo, Katedri za mikrobiologijo in Katedri za biotehnologijo.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 29. 8. 2005 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja in za recenzentko prof. dr. Nino Gunde Cimerman

Mentor: prof. dr. David Stopar

Recenzentka: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

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: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Goznik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.26+579.24:546.33'131:577.3.08(043)=863
KG	ekologija mikroorganizmov/rast bakterij/ <i>Escherichia coli/Vibrio</i> sp./ <i>Pseudoalteromonas</i> sp./slanost/NaCl/modelni sistemi/lizati/ biomasa/sestava biomase/2-D elektroforeza/sonicirani lizati/avtoklavirani lizati/lizati pripravljeni z virusno indukcijo
AV	GOZNIK, Aleš
SA	STOPAR, David (mentor) / Gunde Cimerman, Nina (receptentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	SPREMENBA PARAMETROV KVALITETE LIZATA <i>VIBRIO</i> SP. DSM14379 V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE NaCl
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 50 str., 3 pregl., 12 sl., 3 pril., 63 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	V modelnem sistemu, v katerem smo ponazorili del mikrobne prehranjevalne zanke, smo bakterijski sev <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 gojili v bogatem (pepton, kvasni ekstrakt) gojišču 0,5; 3 in 10 % (w/v) NaCl, celice smo skoncentrirali in iz njih pripravili lizat, z avtoklaviranjem, sonikacijo ali pa virusno lizo. Razlike v sestavi celic oziroma lizata <i>Vibrio</i> sp. smo pokazali preko analize elementarne sestave (C:N:P:S) in 2-D proteinske elektroforeze. Na lizate smo nacepili <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ^M ali <i>Escherichia coli</i> K12, in ugotovljali razlike v učinkovitosti izrabe lizatov. Rast na lizatih smo preverjali spektrofotometrično, z merjenjem optične gostote (OD_{650}) po 24 urah. Pri <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ^M smo opazili razlike pri rasti na različnih lizatih, in sicer je sev najbolje rasel na lizatih, pripravljenih iz celic <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle pri optimalni slanosti (3 % (w/v)). Rast je bila najvišja na lizatih, pripravljenih s sonikacijo, rasti na virusnih lizatih pa nismo zaznali, verjetno zaradi prisotnosti protimikrobnih učinkovin, ki jih izloča <i>Vibrio</i> sp. <i>E. coli</i> je rasla najslabše na lizatih, ki so bili pripravljeni iz celic <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle pri 3 % NaCl. Rast <i>E. coli</i> na virusnih lizatih je bila znatno nižja v primerjavi z ostalimi (avtoklaviranje, sonikacija).

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 579.26+579.24:546.33'131:577.3.08(043)=863
CX ecology of microorganisms /bacterial growing/*Escherichia coli/Vibrio*
sp./*Pseudoalteromonas* sp./NaCl/model systems/lysates/biomass/composition of
biomass/2-D electrophoresis/lysates produced with sonication/lysates produced with
autoclaving/lysates produced with profage induction
AU GOZNIK, Aleš
AA STOPAR, David (supervisor) / Gunde Cimerman, Nina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2006
TI THE CHANGE OF THE *VIBRIO* SP. DSM14379 LYSATE QUALITY
PARAMETERS DEPENDING ON NaCl CONCENTRATION
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 50 p., 3 tab., 12 fig., 3 ann., 63 ref.
LA sl
AL sl / en
AB A bacterial strain *Vibrio* sp. DSM14379 was grown in a rich (peptone, yeast extract) medium at different concentrations 0,5; 3 and 10 % (w/v) of NaCl in a model system which represents a part of the microbial food web. The cells were concentrated and lysates were prepared by autoclaving, sonication or prophage induction. The differences in cell composition of *Vibrio* sp. lysate were shown through elemental composition (C:N:P:S) analysis and 2-D protein electrophoresis. We inoculated either *Pseudoalteromonas* sp.^M or *Escherichia coli* K12 in the various lysates, and determined the differences in lysate utilization efficiency. Growth on the lysates was measured spectrophotometrically (optical density after 24 hours). *Pseudoalteromonas* sp.^M grew best on lysates prepared from *Vibrio* sp. cells, which were grown at optimal salinity (3 % (w/v)). The growth was most intense on the lysate prepared by sonication, while we did not observe any growth on the lysates prepared with prophage induction, probably due to the presence of antimicrobial substances produced by *Vibrio* sp. *E. coli* growth was lowest on lysates prepared from *Vibrio* sp. cells, grown on 3 % (w/v) NaCl. *E. coli* growth on viral lysates was significantly lower when compared to the other lysate types (autoclave, sonification).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	XII
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MIKROBNA ZANKA	2
2.2 RAZTOPLJENA ORGANSKA SNOV	3
2.3 BAKTERIJSKI LIZAT IN NJEGOVA DOSTOPNOST	4
2.4 VPLIV POGOJEV RASTI NA SESTAVO BAKTERIJ	5
2.5 VPLIV KVALITETE HRANE NA FIZIOLOGIJO ORGANIZMA	6
3 MATERIALI IN METODE	8
3.1 RASTNA GOJIŠČA	8
3.2 RAZTOPINE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	9
3.3 RAZTOPINE ZA 2-D PROTEINSKO ELEKTROFOREZO	9
3.4 BAKTERIJSKI SEVI	12
3.5 EKSPERIMENTALNI SISTEM	13

3.5.1	Priprava lizata	13
3.5.1.1	Priprava lizata s avtoklaviranjem	13
3.5.1.2	Priprava lizata s sonikacijo	14
3.5.1.3.	Priprava lizata s indukcijo profaga (virusni lizat)	14
3.5.2	Koncentriranje lizata in prebitne koncentracije	14
3.6	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	15
3.7	ELEMENTARNA SESTAVA <i>VIBRIO</i> SP. PRI RAZLIČNIH SLANOSTIH	15
3.8	KARAKTERIZACIJA LIZATA	16
3.8.1	Proteinski profili različnih lizatov	16
3.8.1.1	Čiščenje proteinov	16
3.8.1.2	Nanos vzorca na gel za izoelektrično fokusiranje (IF)	17
3.8.1.3	Izoelektrično fokusiranje (IF)	18
3.8.1.4	SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza	20
3.8.1.5	Barvanje gela	22
3.8.1.6	Primerjava proteinskih profilov	23
3.9	RAST NA LIZATIH	23
3.9.1	Pridobivanje mitomicinskih mutant (MitC-mutant) in vpliv MitC na rast <i>Pseudoalteromonas</i> sp.^M in <i>E. coli</i>	23
3.9.2	Rast <i>Pseudoalteromonas</i> sp.^M in <i>E. coli</i> na minimalnem gojišču	24
3.9.3	Rast na lizatih	25
3.9.4	Rast v prisotnosti protimikrobnih učinkovin	25
4	REZULTATI	26
4.1	ELEMENTARNA SESTAVA CELIC <i>VIBRIO</i> SP.	26
4.2	PROTEINSKI PROFILI RAZLIČNIH LIZATOV	28
4.3	RAST NA LIZATIH	31
4.3.1	Določanje prebitne koncentracije lizata	31
4.3.2	Primerjava rasti <i>E. coli</i> in <i>Pseudoalteromonas</i> sp.^M na lizatih	

	pripravljenih z avtoklaviranjem	32
4.3.3	Primerjava rasti <i>Pseudoalteromonas</i> sp.^M in <i>E. coli</i> na različno pripravljenih lizatih	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.2	SKLEPI	38
6	POVZETEK	39
7	VIRI	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Postopki pri barvanju SDS gela	23
Preglednica 2:	Koncentracije ogljika, dušika, fosforja in žvepla v celicah <i>Vibrio</i> sp., gojenih pri različnih slanostih.	26
Preglednica 3:	Primerjava regij v proteinskih profilih glede na pojavljanje lis na gelih.	30

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz prehoda hrani med trofičnimi nivoji (Bratbak in sod., 1992).	3
Slika 2:	Plošča za rehidracijo trakov.	18
Slika 3:	Shematski prikaz aparature za izoelektrično fokusiranje.	19
Slika 4 a):	Prikaz vpetja steklenih plošč za 2-D elektroforezo, med katere vlijemo gel.	20
Slika 4 b):	Stranski prikaz sestavljenih banjice za 2-D. dimenzijo (SDS – PAGE) elektroforeze.	21
Slika 5:	Razmerja elementov v celicah <i>Vibrio</i> sp. pri različnih slanostih.	26
Slika 6:	Proteinski profil lizata, pridelanega iz celic <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle pri 0,5 % (w/v) NaCl.	28
Slika 7:	Proteinski profil lizata, pridelanega iz celic <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle pri 3 % (w/v) NaCl.	29
Slika 8:	Proteinski profil lizata, pridelanega iz celic <i>Vibrio</i> sp., ki so rasle pri 10 % (w/v) NaCl.	29
Slika 9:	Rast <i>Pseudoalteromonas</i> sp. pri različnih koncentracijah lizata, pripravljenega s avtoklaviranjem kulture <i>Vibrio</i> sp., ki je rasla pri 0,5 % (w/v) NaCl.	31
Slika 10:	Rast <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ^M in <i>E. coli</i> na lizatih, pripravljenih z avtoklaviranjem <i>Vibrio</i> sp.	32
Slika 11:	Rast <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ^M na lizatih <i>Vibrio</i> sp., ki so bili pripravljeni z avtoklaviranjem in soniciranjem.	33

Slika 12: Rast *E. coli* na lizatih *Vibrio* sp., ki je rasel na različnih slanostih 0,5; 3 in 10 % (w/v) 34
NaCl, pripravljenih s avtoklaviranjem, soniciranjem, in indukcijo profaga (virusno
lizo).

KAZALO PRILOG

Pril. A1: Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M pri različnih koncentracijah MitC.

Pril. A2: Vpliv virusnega lizata na rast *Pseudoalteromonas* sp.^M.

Pril. A3: Vpliv različnih koncentracij MitC na rast *E. coli* K 12 v gojišču MGJ.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

2-D elektroforeza	dvodimenzionalna elektroforeza
BCA	bikinkoninska kislina
BSA	standard govejega serumskega albumina
ddH ₂ O	bidestilirana voda
dH ₂ O	destilirana voda
DOM	raztopljen organski material (ang. "dissolved organic matter")
DSMZ	zaporedna številka, pod katero je sev deponiran v nemški zbirki kultur (nem. "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen")
DTT	p-ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> K12
IF	izoelektrično fokusiranje
JAA	jodacetamid
LM _{0,5}	rast <i>Vibrio</i> sp. pri slanosti 0,5 % (w/v) NaCl, iz kulture smo pripravili lizat – LM _{0,5}
LM ₁₀	rast <i>Vibrio</i> sp. pri slanosti 10 % (w/v) NaCl, iz kulture smo pripravili lizat – LM ₃
LM ₃	rast <i>Vibrio</i> sp. pri slanosti 3 % (w/v) NaCl, iz kulture smo pripravili lizat – LM ₁₀
MG	minimalno gojišče z manitolom, citratom in sorbitolom pripravili lizat
MitC	mitomicin-C
Mw	molska masa
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nanometrih
PKS	bogato gojišče (pepton, kvasni ekstrakt)

POD	partikularni organski material (ang. “particular organic matter”)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DSM06238
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. ^M	mitomicinske mutante <i>Pseudoalteromonas</i> sp.
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza
<i>Vibrio</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp. DSM14379

1 UVOD

Heterotrofne bakterije predstavljajo pomemben člen v morskih prehranjevalnih spletih, saj raztopljeno organsko snov (DOM) vgradijo v svoje celice in jo tako pretvorijo v partikularno obliko ter naredijo dostopno višjim organizmom preko mikrobne zanke. Do 50 % primarno producirane DOM se usmerja v mikrobno zanko, zato je izraba DOM s strani heterotrofnih mikroorganizmov pomembna za delovanje celotnega ekosistema.

Med pomembne vire DOM spada liza bakterijskih celic, med katero se celična vsebina lahko sprošča v okolico. Bakterije lizirajo zaradi različnih dejavnikov, poglavitna vzroka pa sta plenilstvo protozojev in litična dejavnost virusov. Nastali bakterijski lizat je potem dostopen drugim bakterijam kot vir hrani.

V diplomske nalogi smo proučili kako slanost vpliva na sestavo morskega izolata *Vibrio* sp. ter kako uspešno izkoristijo lizirano celično snov drugi bakterijski sevi; v našem primeru morski izolat *Pseudoalteromonas* sp.^M in *Escherichia coli*. Poleg tega smo preverili kako način priprave lizata (soniciranje, avtoklaviranje, virusna liza) vpliva na izrabo lizata.

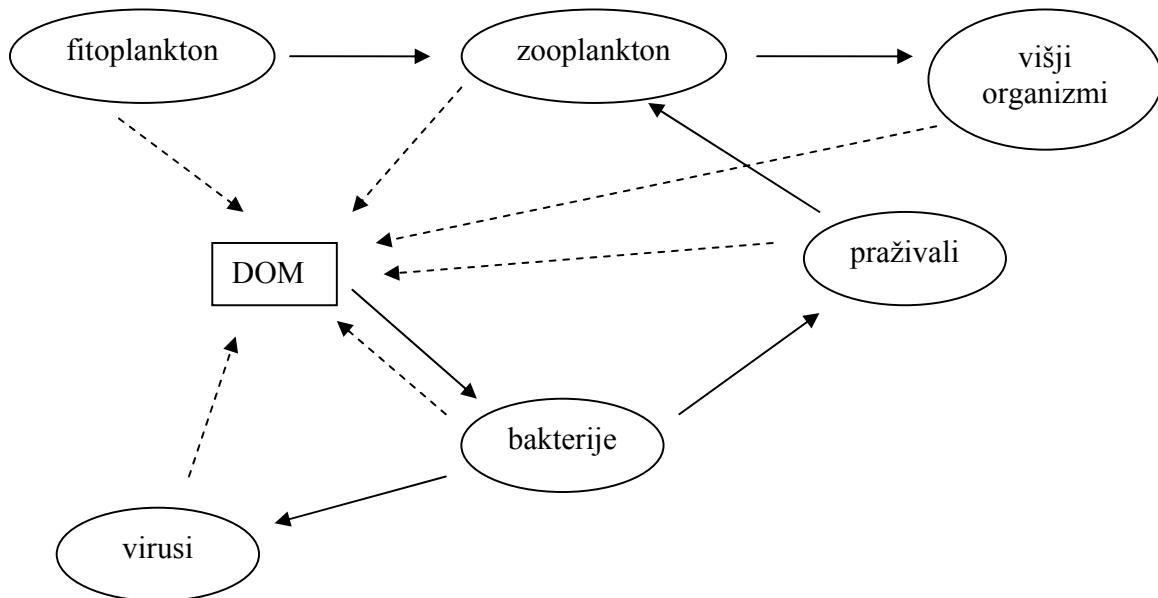
1.1 HIPOTEZE

- proteinska in elementarna sestava *Vibrio* sp. DSM14379, ki je rasel pri različnih slanostih je različna
- razlika v sestavi avtoklaviranega lizata v odvisnosti od koncentracije NaCl spremeni učinkovitost izrabe in s tem rast *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* na tem lizatu
- način priprave lizata vpliva na izkoristke lizata

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROBNA ZANKA

Osnovo delovanja vseh ekosistemov predstavlja pretok energije skozi različne prehranjevalne splete. Organizmi se v prehranjevalnih spletih po prehrani urejajo v t. i. trofične nivoje. Količina dostopne (kemijsko uporabne) energije se med prehodom od nižjih proti višjim nivojem zmanjšuje – od primarnih producentov preko primarnih do sekundarnih potrošnikov (Tarman, 1992). Ker produkcija na danem trofičnem nivoju vpliva na produkcijo na naslednjem, procesi na mikrobnih nivojih posredno vplivajo na delovanje celotnega ekosistema. Pomeroy (1974) je prvi objavil tedaj nov pogled na strukturo in dinamiko morskih prehranjevalnih spletov; v klasično prehranjevalno verigo je vključil mikroorganizme, ki so jim do tedaj pripisovali le vlogo v remineralizaciji odmrlih organizmov. Z odkrivanjem velike številčnosti in aktivnosti mikroorganizmov v morskih okoljih (Fuhrman in Azam, 1980) se je kmalu uveljavil tudi koncept "mikrobne zanke" (Azam s sod., 1983), ki je predstavil tok raztopljene organske snovi (DOM) iz primarne produkcije direktno v heterotrofne bakterije. Le-te pa so predstavljale plen protozojem; mineralizirano bakterijsko DOM spet privzamejo primarni producenti – ta DOM potem ni na voljo višjim trofičnim nivojem. Heterotrofne bakterije porabijo do 30 % dnevne fitoplanktonske produkcije v obliki DOM (Cole in sod., 1988). Shematsko je mikrobna zanka prikazana na Sliki 1. Centralni mehanizem v mikrobeni zanki je nastanek in poraba raztopljene organske snovi.



Slika 1: Prikaz prehoda hranil med trofičnimi nivoji. Polne črte predstavljajo prehranjevanje oziroma prehode med prehranjevalnimi spleti, medtem ko črtkane črte predstavljajo kako se raztopljen organski material vrača nazaj v DOM (Bratbak in sod., 1992)

2.2. RAZTOPLJENA ORGANSKA SNOV

Viri DOM so lahko različni (Pomeroy in Wiebe, 1993). Poleg fitoplanktonske produkcije se DOM izloča med hranjenjem protozojev in zooplanktona. DOM se izloča tudi iz samih bakterijskih celic zaradi bakterijske lize. Med glavne vzroke za razpad bakterijskih celic spadajo plenilstvo protozojev, drugih bakterij ter virusna infekcija (Fuhrman in Noble, 2000). Bakterijski virusi (bakteriofagi ali fagi) z infekcijo in lizo bakterijskih populacij pomembno vplivajo na pretok DOM v ekosistemu, ker prekinejo tok suspendirane organske snovi (POM) k višjim trofičnim nivojem in ustvarjajo nov vir DOM (Bratbak in sod., 1992). Fuhrman (1992) je postavil model, v katerem se zaradi virusne infekcije bakterijska produkcija v sistemu poveča za približno 30 %. Zaradi visoke številčnosti virusov (do $10^8/\text{mL}$ (Bergh in sod., 1989; Stopar in sod., 2004)) je virusna liza bakterij pomemben proces v naravi. Virusi se

v gostiteljski celici razmnožujejo na več načinov (Fuhrman in Suttle, 1993), litična infekcija pa je tista, ki vodi v razpad gostiteljske celice. Poleg litičnega cikla poznamo pri bakteriofagih še lizogeni cikel, pri katerem se fag ob vstopu v celico vgradi v kromosom (v obliki profaga) in se podvaja skupaj z gostiteljsko DNA. V stresnih razmerah pride do preklopa v litični cikel (indukcija profaga). V laboratoriju lahko induciramo profag z različnimi kemičnimi in fizikalnimi sredstvi. Zelo uspešno induciramo profag z antibiotikom mitomicinom (MitC) (Weinbauer in Suttle, 1999). Na podlagi izkušenj z delom na sevu *Vibrio* sp. DSM14379 in virusno indukcijo s pomočjo MitC (Gnezda Meijer, 2000; Černe, 2001; Odič, 2002; Stopar in sod., 2004; Gnezda Meijer, 2006) smo se v diplomski nalogi odločili za podoben eksperimentalni sistem za pripravo lizata s pomočjo virusne indukcije.

2.3. BAKTERIJSKI LIZAT IN NJEGOVA DOSTOPNOST

Z indukcijo profaga gostiteljska celica razpade. Sproščena celična vsebina, virusni lizat, lahko spodbuja rast neinficirane bakterijske populacije. Middelboe in sod. (1996) so preučevali vpliv virusne lize morske bakterije *Vibrio* sp. na rast naravne združbe proti virusom odpornega bakteriplanktona. Rast bakterij je bila v prisotnosti lizata seva *Vibrio* pospešena. Noble in sod. (1999) so podoben porast v neinficirani bakterijski populaciji opazovali po dodajanju koncentrata aktivnih virusov k bakterijskim združbam. Noble in Fuhrman (1999) sta z dodajanjem radioaktivno označenih virusov in produktov virusne lize pokazala tudi na izrabe le-teh s strani heterotrofnih bakterij. Bakterijski lizat pa je lahko tudi vir hranil za bakterije iste vrste (Ammerman in sod., 1984). Nioh in Furusaka (1968) sta pokazala rast bakterij na toplotno uničenih bakterijah iste vrste, Mason in Hamer (1987), Stramer in Starzyk (1978), in Corchero in sod. (2001) pa so podoben rezultat dobili s pripravo lizata s sonifikacijo – dodatek lizata v minimalno gojišče je bistveno izboljšal rast bakterij. Stramer in Starzyk (1978), ki sta poskuse izvedla s termofilnimi arhejami, sta poročala, da v naravnem okolju verjetno pride tudi do avtolize celic, ki potem pospešuje rast ostale populacije. Očitno je, da sproščena celična vsebina predstavlja vir hranil za heterotrofne bakterijske populacije in da na učinkovitost izrabe lizata vpliva njegova sestava. Odič (2002) je pokazal, da je učinkovitost

izrabe lizata lahko odvisna od načina priprave (avtoklaviranje oz. virusna liza), vendar je bila izraba lizata odvisna tudi od njegove količine, ki je bila pri različno pripravljenih lizatih verjetno različna. Zaradi tega smo v diplomski nalogi lizat pripravili z avtoklaviranjem, sonifikacijo in virusno lizo, pri čemer smo celice pred lizo skoncentrirali in s tem poskrbeli za dovolj visoko koncentracijo, da ni omejevala rasti in smo lahko primerjali dejansko kakovost lizata.

2.4. VPLIV POGOJEV RASTI NA SESTAVO BAKTERIJ

Med okolske dejavnike, ki vplivajo na rast in sestavo bakterijskih celic, spada tudi slanost. Ob osmotskem stresu se bakterijska fiziologija spremeni (Norbeck in Blomberg, 1995; Akhtar, 1997). Celice v okolju z visoko osmolarnostjo z vnosom iz okolja ali s sintezo povečajo znotrajcelične koncentracije določenih nizkomolekularnih kompatibilnih topljencev – osmolitov in s tem vzdržujejo osmotski tlak oz. preprečijo izgubo vode (Bakker in sod., 1987; Kempf in Bremer, 1998), v vsakem primeru pa osmotski šok vodi v spremembo biokemijske sestave celice. Spremembe v slanosti vplivajo tudi na strukturo proteoma. V neugodnih pogojih rasti bakterije preusmerijo del energije v sintezo proteinov, ki nasprotujejo stresnemu dejavniku (Amy in Morita, 1983; Neidhart in sod., 1990). Selektivna sinteza proteinov je bistvo vsakega stresnega odziva (Pedersen in sod., 1978). S spremenjanjem slanosti v okolju se spreminja nabor tako citoplazemskih kot membranskih proteinov (Kaye in Baross, 2004; Xu in sod., 2001) in tudi njihova sinteza (Nekolny, 2000). Spremembo strukture v proteomu lahko spremlijamo z 2-D elektroforezo proteinov (O'Farrell, 1975). Pri 2-D elektroforezi proteine najprej ločimo glede na izolektrično točko (prva dimenzija), nato pa glede na molekulsko maso (druga dimenzija). Rezultati, ki jih dobimo, so t. i. proteinski profili. S primerjavo različnih profilov in nadaljnjo identifikacijo posameznih proteinov – točk na gelu – lahko ugotovimo, kateri proteini se različno izražajo pri različnih pogojih (Bunai in Yamane, 2004). Botsford (1990) je pokazal, da pri osmotskem šoku pri *E. coli* pride do razlik v izražanju okoli 40 proteinov, Duché in sod. (2002) so pokazali podobno razliko v izražanju okoli 60 proteinov pri *Listeria monocytogenes*. Xu (2001) pa je vplive osmotskega

stresa na proteine opazoval pri sevu *Rhodobacter sphaeroides*, narejena je bila dvo-dimenzionalna (2-D) poliakrilamidno gelska elektroforeza (PAGE) membranskih proteinov. Opazovana je bila ekspresija le-teh pri rasti na gojišču brez NaCl in pri 4 % (w/v) koncentraciji NaCl. Opazili so razlike v sliki proteinskih profilov, ki so jih dobili kot rezultat 2-D elektroforeze. Nanašajo se predvsem na povečano ekspresijo določenih specifičnih osmoregulatornih membranskih proteinov SspA, SspB in SspC, katerih koncentracija je občutno večja pri kulturi, ki je rasla pri 4 % (w/v) NaCl, kot pri kulturi brez NaCl.

Ena izmed ključnih komponent hranične vrednosti oz. "kvalitete" lizata so poleg proteinov tudi lipidi (Volkman in sod., 1989), katerih sestava se med spremenjanjem slanosti spreminja (Danevčič in sod., 2005). Danevčič in sod. so prav tako pokazali, da se lipidi v membrani lahko pod vplivom slanosti, razporedijo v različne strukture in s tem predstavljajo tudi drugačno vrsto hrani za mikroorganizme v okolju. Pokazatelj razlik v sestavi so tudi elementarna razmerja. Tezuka (1990), Eccleston-Parry in Leadbeater (1995), Chrzanowski in sod. (1996) in Vrede in sod. (2002) so pokazali, da se bakterijska C:N:P razmerja lahko drastično spreminja pod različnimi pogoji rasti (npr. omejenost s hrани). Številni raziskovalci so pokazali, da spremenjena sestava hrane vpliva na učinkovitost izrabe z strani različnih mikroorganizmov (Jones in Flynn, 2005; Koski in sod., 1998; Wacker in sod., 2002; Brett in sod., 2000; Vrede in sod., 2002).

2.5 VPLIV KVALITETE HRANE NA FIZIOLOGIJO ORGANIZMA

Spremembe v sestavi hrane vplivajo na fiziologijo organizmov, ki se s tem prehranjujejo; to so pokazali na večini trofičnih nivojev, zlasti pa so to preučevali pri nevretenčarjih (rakci, ličinke). Običajni fiziološki znaki, ki so jih opazovali, so bili velikost organizma, hitrost rasti in razvoja, hranjenje, razmnoževanje, produkcija jajčec, število potomcev in življenska doba (Ward in Cummins, 1979; Korstad in sod., 1989; Brett in sod., 2000; Vrede in sod., 2002; Jones in Flynn, 2005; Tirelli in Mayzaud, 2005; Wacker in sod., 2002; Wacker in von Elert, 2004; Cruz-Rivera in Hay, 2000). Vpliv kvalitete hrane se pri nižjih trofičnih nivojih (npr. pri

protozojih) pozna predvsem pri selekciji hrane, ker protozoji običajno plenijo večje in bolj aktivne celice (Christaki in sod., 1998; del Giorgio in sod., 1996; Hahn in Höfle, 1999), pri bakterijah pa so tudi že pokazali selektivnost glede vira hrani (DOM), ker se nizkomolekularne spojine izrabljajo hitreje kot visokomolekularne (Amon in Benner, 1996; Sundh, 1992).

Razlike v kvaliteti bakterijskega lizata verjetno vodijo v razlike v fiziologiji bakterij, ki se z njimi hrani. Kako se kvaliteta lizata spreminja v odvisnosti od načina priprave lizata, ni raziskano. Glede na to, da bakterijski lizat kot vir DOM predstavlja osnovo prehranjevalnih spletov, so procesi, ki vplivajo na njegovo kvaliteto in s tem izrabo, lahko zelo pomembni za razumevanje delovanja prehranjevalnih spletov.

3 MATERIALI IN METODE

3. 1 RASTNA GOJIŠČA

Minimalno gojišče (gojišče MGJ)	Tris baza (pH 7,2) (MERCK) NaCl (MERCK) K ₂ HPO ₄ (Kemika) NH ₄ Cl (MERCK) CaCl ₂ × 2H ₂ O (MERCK) KCl (MERCK) MgSO ₄ × 7H ₂ O (Kemika) D(-)-manitol (Kemika) triNa-citrat dihidrat (MERCK) D-sorbitol (MERCK) destilirana voda (dH ₂ O)	6,1 g/L 17,6 g/L 0,075 g/L 1 g/L 1,45 g/L 0,75 g/L 12,3 g/L 1 g/L 1 g/L 1 g/L 1 L
------------------------------------	--	---

Bogato gojišče (gojišče PKS) (za trdna gojišča)	kvasni ekstrakt (Biolife) pepton (Biolife) MgCl ₂ × 6H ₂ O (Kemika) dH ₂ O agar (Biolife)	1 g/L 5 g/L 2 g/L 1 L 18 g/L
---	--	--

V gojišče PKS smo dodali različne koncentracije NaCl, v skladu z eksperimentalno shemo, in sicer 5 g/L (0,5 %), 30 g/L (3 %), oz. 100 g/L (10 % (w/v) NaCl). Trdna gojišča PKS smo pripravljali s 30 g/L NaCl.

3. 2 RAZTOPINE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

BCA kit za določanje proteinov (Sigma)	bikinkoninska kislina (BCA) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ standard govejega serumskega albumina (BSA)	raztopina 4 % (w/v) raztopina 0,1 % (w/v) raztopina
NaOH (MERCK)		1 M raztopina

3. 3 RAZTOPINE ZA 2-D PROTEINSKO ELEKTROFOREZO

Mineralno olje (Sigma)

Kit za čiščenje proteinov (Amersham)	precipitant ko-precipitant pufer za spiranje aditiv	raztopina raztopina raztopina raztopina
--------------------------------------	--	--

Rehidracijski pufer	urea (Sigma) CHAPS (Amersham) amfoliti (pH 3-10) (Amersham) bromfenol modro (Sigma) p-ditiotreitol (DTT) (Fluka) bidestilirana voda (ddH ₂ O)	540 g/L 20 g/L 20 ml/L 0,02 g/L 2,8 mg/L 1 L
---------------------	---	---

DTT dodamo v raztopino tik pred uporabo; preostale sestavine lahko zmešamo skupaj in raztopino (brez DTT) hranimo pri – 20 °C.

ločitveni gel za SDS-PAGE (14 % zamreženost)	akrilamid / bisakrilamid (30 %/0,8 %) 1,5 M Tris-HCl (pH 8) 10 % (w/v) SDS (MERCK) 10 % (w/v) APS (MERCK) TEMED (MERCK)	18,3 mL 9,8 mL 10,4 mL 195 µL 13 µL
---	---	---

sklopitveni gel za SDS-PAGE	agaroza	0,5 g
	1x SDS pufer	100 mL

Pufer za uravnoteženje trakov za izoelektrično fokusiranje:

osnovna raztopina	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) urea (Sigma) glicerol (Sigma) SDS (Sigma) bromfenol modro (Sigma) ddH ₂ O	5 mL 36 g 30 mL 2 g 0,002 g 100 mL
pufer I	dodamo DTT (Fluka)	1 g/100 mL
pufer II	dodamo jodacetamid (JAA) (Sigma)	4,8 g/100 mL

Osnovno raztopino imamo lahko pripravljeno dalj časa, medtem ko dodatke v pufer I oz. II dodamo tik pred uporabo, pri čemer morajo biti ostale komponente popolnoma raztopljene.

	1× pufer	5× pufer
Pufer za SDS-PAGE	Tris-baza (Sigma)	3 g

glicin (MERCK)	14,4 g	72 g
SDS (Sigma)	1 g	5 g
ddH ₂ O	1 L	1 L

Raztopine za barvanje elektroforetskih gelov:

raztopina za fiksacijo	95 % (v/v) etanol	100 mL
	ledocetna kislina (MERCK)	25 mL
	ddH ₂ O	250 mL

raztopina za predtretiranje	95 % (v/v) etanol (MERCK)	75 mL
	10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ × 5H ₂ O (MERCK)	5 mL
	Na-acetat (Kemika)	17 g
	ddH ₂ O	250 mL

raztopina za barvanje	20 % (w/v) AgNO ₃ (Sigma)	3,125 mL
	ddH ₂ O	250 mL

raztopina za razvijanje	Na ₂ CO ₃ (MERCK)	12,5 g
	37 % formaldehid (MERCK)	200 µL
	ddH ₂ O	500 mL

raztopina za ustavitev reakcije	EDTA-Na ₂ × 2H ₂ O (Kemika)	7,3 g
	ddH ₂ O	500 mL

3. 4 BAKTERIJSKI SEVI

<i>Vibrio</i> sp. DSM14379	naravni izolat iz Škocjanskega zatoka
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DSM06238*	naravni izolat iz Sečoveljskih solin
<i>Escherichia coli</i> K12	laboratorijski izolat

* z gojenjem v prisotnosti mitomicina smo pridobili mitomicinske mutante tega seva

Sev *Vibrio* sp. smo uporabili za produkcijo lizata, na katerem smo gojili seva *Pseudoalteromonas* sp.^M ali *E. coli*. *Pseudoalteromonas* sp.^M smo uporabili, ker je bilo že pokazano, da sev raste na lizatu *Vibrio* sp. (prvotna oznaka seva 3c_m; Odič, 2002). Ker *Vibrio* sp. med rastjo izloča v okolje protimikrobne učinkovine, v prisotnosti katerih *Pseudoalteromonas* sp.^M ne raste smo uporabili *E. coli*, pri kateri je že predhodno bila ugotovljena odpornost na omenjene učinkovine (Jerman, 2004).

Seve smo hranili na trdnih gojiščih PKS na 4 °C in jih precepljali na sveža trdna gojišča 1x mesečno. Kadar smo potrebovali kulturo za eksperiment, smo seve nacepili iz trdnih gojišč v tekoča gojišča PKS in inkubirali preko noči pri 28 °C v temi, na stresalniku pri 200 obr/min. Tudi nadaljnji postopki gojenja so potekali pri teh pogojih. Pri precepljanju v sveža tekoča gojišča smo prenašali 1 % (v/v) vcepek.

Pseudoalteromonas sp.^M in *E. coli* uspešno rasteta tako na 1,76 % in 3 % (w/v) koncentraciji NaCl. Koncentracija NaCl 1,76 % (w/v) je prisotna v minimalnem gojišču ter osnovni mineralni raztopini, ki smo ju uporabili za resuspenzijo skoncentriranih *Vibrio* sp celic ter pripravo lizata, na katerem sta potem rasla *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli*. 3 % (w/v) koncentracija NaCl je prisotna v PKS gojiščih, ki smo jo uporabljali za shranjevanje kulture na trdnih gojiščih in pripravo tekočih kultur za eksperiment.

3. 5 EKSPERIMENTALNI SISTEM

3. 5. 1 Priprava lizata

Osnovna shema eksperimenta predvideva, da se določen bakterijski sev hrani z lizatom drugega seva, pri čemer lizat predstavlja edini vir hrani za sev, ki raste na lizatu. Lizat smo v vseh eksperimentih pripravili iz seva *Vibrio* sp. Le-tega smo nagojili v gojišču PKS z 0,5; 3 ali 10 % (w/v) NaCl, do pozne eksponencialne faze, ki smo jo določili z merjenjem optične gostote pri 650 nm (OD₆₅₀; Iskra - Photometer MA 9510). Ko je kultura doseгла 75 % maksimalne OD₆₅₀, smo celice centrifugirali 15 min pri 16000 × g in jih resuspendirali v 10 mL minimalnega gojišča (MGJ). S tem smo odstranili gojišče PKS in izenačili slanost. Lizate smo zaradi lažje prepozname poimenovali po koncentraciji NaCl na kateri je rasel *Vibrio* sp. iz katerih smo jih pripravili. Tako je oznaka lizata *Vibrio* sp., ki je rasel na 0,5 % (w/v) NaCl - LM_{0,5}, 3 % (w/v) NaCl - LM₃ in 10 % (w/v) NaCl - LM₁₀. PKS smo uporabili zato, da bi pridobili čim več biomase. MGJ pa zato, da bi med pripravo virusnega lizata z indukcijo virusov *Vibrio* sp., le-ta še vedno rasel med samo ekspresijo lizogenih virusov, saj je to pogoj za razpad celic in sprostitev celične vsebine v okolje. Samo izjemoma smo namesto MGJ uporabili mineralno osnovo (MGJ brez virov ogljika), in sicer pri pripravi lizata z avtoklaviranjem in sonificiranjem za testiranje rasti *E. coli*. Namreč, *E. coli* bi v nasprotnem primeru rasla tudi na substratu in ne samo na lizatu. Volumen kulture, ki smo jo centrifugirali, je variiral v odvisnosti od tega, koliko smo želeli koncentrirati celice (glej točko 3. 5. 2). Iz tako pripravljenih suspenzij smo pripravili lizat, in sicer na tri načine.

3. 5. 1. 1 Priprava lizata z avtoklaviranjem

Suspenzijo smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C in zatem centrifugirali 15 min pri 16000 × g v sterilnih centrifugirkah. Supernatant, ki je vseboval raztopljeni del lizata, smo prenesli v sterilno erlenmajerico ter shranili na 4 °C.

3. 5. 1. 2 Priprava lizata s sonikacijo

Suspenzijo smo prenesli v sonikacijsko epruveto in sonicirali 10 min (MSE 150 Watt Ultrasonic Disintegrator PG-302) pri amplitudi vibracije sonde 6 mikronov. Sonicirali smo 10 krat po 30 sekund s 30-sekundnimi presledki, da se suspenzija ni pregrevala. Med sonikacijo smo epruveto hranili v posodi z ledom. Po sonikaciji smo suspenzijo centrifugirali 15 min pri $16000 \times g$ in supernatant, ki je vseboval raztopljeni del lizata, prefiltrirali skozi filtre s porami premera $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius) v sterilno erlenmajerico, ter shranili na 4°C .

3. 5. 1. 3 Priprava lizata z indukcijo profaga (virusni lizat)

Suspenziji smo dodali antibiotik mitomicin-C (MitC, Sigma) v končni koncentraciji $30 \mu\text{g}$ MitC / mL suspenzije. Suspenzijo smo inkubirali 24 ur pri 28°C na stresalniku pri 200 obr/min v temi – v tem času so se v celicah *Vibrio* sp. inducirali profagi in lizirali celice. Suspenzijo smo centrifugirali 15 min pri $16000 \times g$ in supernatant, ki je vseboval raztopljeni del lizata, prefiltrirali skozi filtre s porami premera $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius) v sterilno erlenmajerico, ter shranili na 4°C .

3. 5. 2 Koncentriranje lizata in določanje prebitne koncentracije lizata v gojišču

Namen naloge je bil pokazati na razlike v kakovosti različnih lizatov. Zato je bilo potrebno zagotoviti, da sama količina oz. koncentracija hrani v različnih lizatih ne omejuje rasti. Opravili smo eksperimente, v katerih smo preverili, kako se s spremembou koncentracije lizata spremenja nosilnost okolja (maksimalni OD_{650}) bakterije, ki na tem lizatu raste, in določili stopnjo, do katere je potrebno celice pred liziranjem koncentrirati, da je koncentracija hrani v pridobljenem lizatu prebitna. Najnižja prebitna koncentracija je bila tista, nad katero se nosilnost okolja ni več znatno povečevala. Mero za koncentracijo lizata je predstavljala koncentracija proteinov v lizatu.

Vsi eksperimenti, pri katerih smo primerjali rast med različnimi lizati, so potekali pri prebitnih (nelimitnih) koncentracijah lizata.

3. 6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov smo določili po metodi BCA (Smith in sod., 1985). Komercialni kit (Sigma-Aldrich, Inc.) vsebuje reagent A (raztopino bikinkoninske kisline), reagent B (4 % (v/v) raztopino CuSO₄) in standardno raztopino govejega serumskega albumina (BSA, 1 mg/mL). V 1 mL gojišča z lizatom smo dodali 200 µL 1M NaOH, premešali na vorteksu in inkubirali 10 min v vodni kopeli pri 90 °C. Nato smo 100 µL suspenzije dodali v epruveto z 2 mL reagenta BCA (mešanica A:B = 50:1). Mešanico smo premešali in inkubirali 15 min v vodni kopeli pri 60 °C. V tem času je potekla barvna reakcija. Mešanico smo ohladili na sobno temperaturo in izmerili absorbanco pri 562 nm (A₅₆₂; Philips UV/Visible Spectrophotometer PU8620). Za slepi vzorec smo uporabili mešanico 100 µL dH₂O in 2 mL reagenta BCA.

Koncentracijo proteina v vzorcu smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo jo narisali z nanašanjem različnih koncentracij standarda BSA (v območju 0-1 mg/mL) proti izmerjenim vrednostim A₅₆₂. Umeritveno krivuljo smo narisali za vsako serijo meritev posebej.

3. 7 ELEMENTARNA SESTAVA CELIC *VIBRIO* SP. PRI RAZLIČNIH SLANOSTIH

Pri določanju elementarne sestave celic smo predpostavili, da se ista elementarna sestava ohrani tudi v lizatu. Celice *Vibrio* sp. smo gojili v bogatem gojišču pri 0,5; 3 ali 10 % (w/v) NaCl, do pozne eksponencialne faze, centrifugirali 15 min pri 16000 × g, in usedlino posušili pri 40 °C do konstantne teže. Iz 0,7 g usedline smo 0,2 g uporabili za določanje vsebnosti C, N in S na CNS Analyzer-ju (elementni analizator LECO 2000, metoda ISO 13878, modificirana: dodan S), 0,5 g pa smo uporabili za določanje vsebnosti P s kislinskim razkrojem pod tlakom (mikrovalovna peč Milestone ETHOS 900, metoda ÖNORM L 1085) in meritvijo na spektrofotometru, UV VIS Spectrophotometer Varian Cary 50, metoda ISO 6878, modificirana. Meritve so bile ponovljene 2-krat, s tem da smo celice zbrali iz več neodvisnih gojitvenih poskusov in predstavljajo povprečen vzorec. Iz podatkov o vsebnostih elementov smo izračunali razmerja C:N, C:P in C:S.

3. 8 KARAKTERIZACIJA LIZATA

3. 8. 1 Proteinski profili različnih lizatov

Proteinske profile smo pridobili z dvo-dimenzionalno (2-D) gelsko elektroforezo proteinov, in sicer na lizatih, pripravljenih z avtoklaviranjem. Celice *Vibrio* sp., ki smo jih gojili pri 0,5 ali 10 % (w/v) NaCl, smo pred pripravo lizata skoncentrirali 40-krat, celice, ki smo jih gojili pri 3 % (w/v) NaCl, pa 13-krat. V pripravljenih lizatih smo izmerili koncentracije proteinov in posamezne lizate po potrebi redčili z dH₂O, da smo dosegli približno 1 mg/mL (optimalno koncentracijsko območje za elektroforezo). Izenačitev koncentracije med posameznimi vzorci je potrebna za medsebojno primerjavo; v nasprotnem primeru bi se lahko zgodilo, da bi bili določeni proteini zaradi prenizke koncentracije na gelih šibko izraženi, kar bi preprečilo medsebojno primerjavo gelov.

3. 8. 1. 1 Čiščenje proteinov

Za čiščenje proteinov smo uporabili 2-D Clean-Up Kit (Amersham), ki vsebuje precipitant in koprecipitant, ki omogočataobarjanje proteinov, in pufer za spiranje ("wash buffer") ter aditive, ki dodatno očistijo proteine. Pufer za spiranje pred uporabo prenesemo vsaj za 1 uro na – 20 °C. V 2 mL epico smo dali 200 µL vzorca in 600 µL precipitanta, premešali in inkubirali 15 min na ledu. Nato smo suspenzijo ponovno premešali na vorteksu in dodali 600 µL koprecipitanta, in centrifugirali 10 min pri 8000 × g pri 4 °C. Previdno smo odstranili supernatant, pelet pa resuspendirali v 80 µL koprecipitanta in inkubirali 5 min na ledu. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri 8000 × g pri 4 °C, previdno odstranili supernatant, še enkrat centrifugirali 30 sekund in odstranili ostanek supernatanta. Nato smo v usedlino dodali 50 µL ddH₂O in usedlino dispergirali, dodali 1 mL pufra za spiranje in 5 µL aditiva ter premešali. Vzorec smo vsaj 30 min inkubirali na ledu, vmes pa smo vsakih 10 min premešali na vorteksu. Suspenzijo smo nato centrifugirali 10 min pri 8000 × g pri 4 °C, odstranili

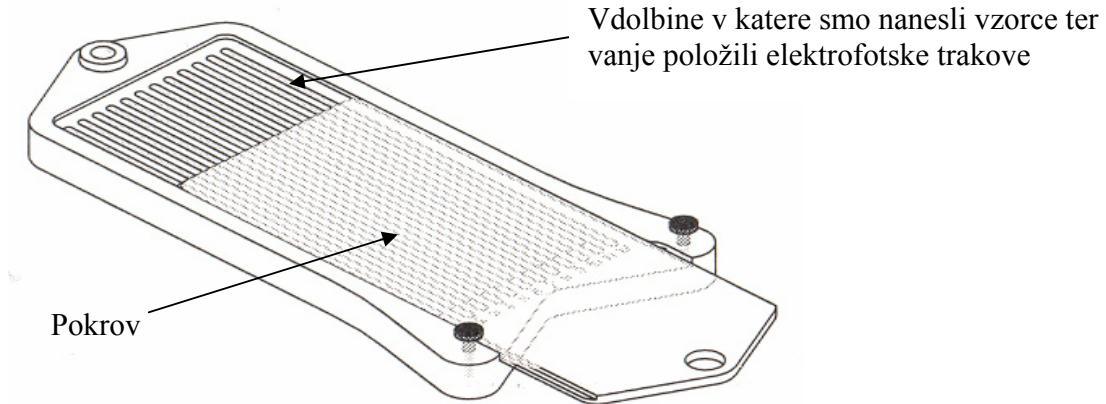
supernatant in pelet posušili na zraku, vendar ne dalj kot 5 min. Nato smo dodali 300 µL rehidracijskega pufra in mešali, dokler se vsebina ni raztopila. V taki obliki smo hranili vzorec do naslednjega koraka.

Pred nanosom vzorca v vdolbine smo vzorec centrifugirali 10 min pri 0 °C, in supernatant ponovno centrifugirali, da smo se znebili neraztopljenih delcev. Vzorce smo do nanosa na trakove shranili pri – 20 °C (če nameravamo analizo izvesti v roku 24 ur) oz. pri – 80 °C.

3. 8. 1. 2 Nanos vzorca na gel za izoelektrično fokusiranje (IF)

Izoelektrično fokusiranje (IF) smo izvedli na pripravljenih elektroforetskih trakovih z imobiliziranim pH gradientom v gelu na plastični foliji. Nanos vzorca na trak (t. i. rehidracija trakov) poteka v posebni plošči z vdolbinami, kamor nanesemo vzorec in nanj položimo trak, da se vzorec vsrka v gel (Slika 2). Pred nanosom smo vzorce odtajali pri sobni temperaturi ter še enkrat preverili, ali se je pojavila usedlina; če je do tega prišlo, smo vzorec ponovno centrifugirali 10 min pri 0°C ter se s tem znebili še zadnjih nečistoč.

Ploščo za rehidracijo trakov smo postavili na ravno podlago. V vdolbino za elektroforetski trak smo nanesli 250 µL vzorca, raztopljenega v rehidracijskem pufru, ki vsebuje 1 mg proteina. Elektroforetske trakove hranimo pri – 20 °C. Trak smo prenesli na sobno temperaturo in z njega s pinceto odstranili zaščitno prevleko ter ga hitro položili v vdolbino z vzorcem, in sicer s stranjo na kateri se nahaja gel z imobiliziranim pH gradientom navzdol. Morebitne mehurčke smo odstranili z iglo. Čez trak smo nanesli 3 mL mineralega olja, in sicer po 1 mL z vsake strani in 1 mL na sredini, da se je olje enakomerno razporedilo. S tem smo preprečili izhlapevanje vzorca ter kristalizacijo ureae. Posodo smo prekrili s pokrovom in trakove inkubirali 13 ur (rehidracija trakov).

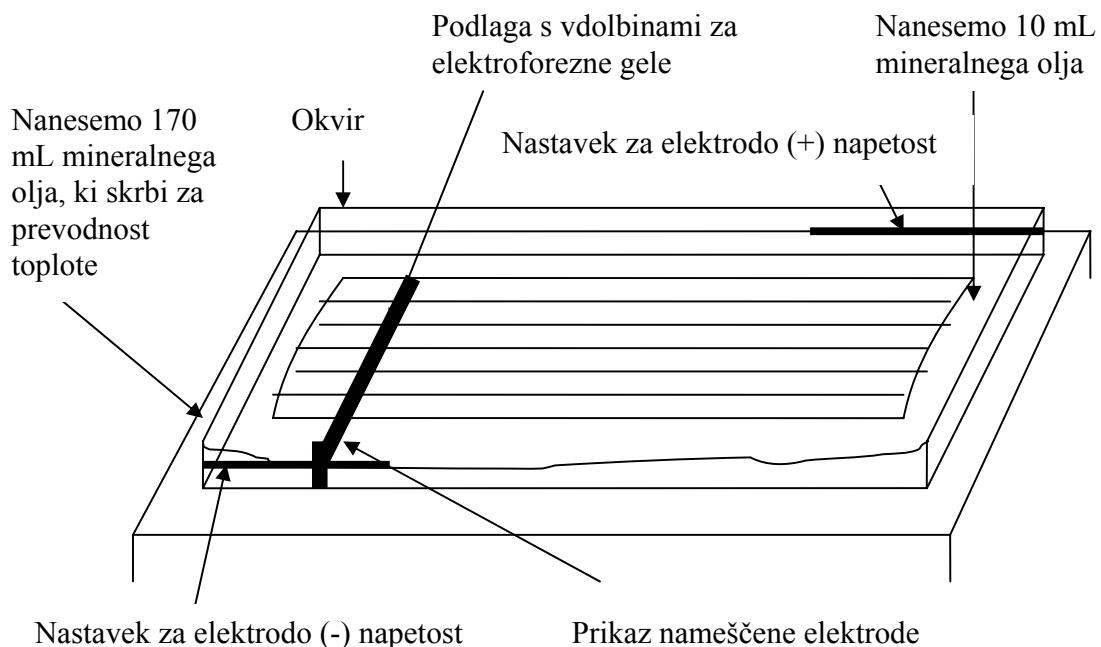


Slika 2: Plošča za rehidracijo trakov.

3. 8. 1. 3 Izoelektrično fokusiranje (IF)

Priprava aparature za IF:

- na elektroforetsko ploščo sistema za IF (Amersham) smo nanesli 3-4 mL mineralnega olja
- na ploščo smo položili očiščen okvir z nastavki za elektrode
- v okvir smo dodali še 10 mL mineralnega olja
- v tako pripravljen okvir smo položili podlago, ki ima vdolbine za elektroforezne gele
- nad konec gelov smo položili poseben elektroforezni trak, ki skrbi za prevodnost elektrike med elektrodami in samim gelom; trak smo predhodno sprali z dH₂O
- na trakove smo namestili elektrode, v sestavljenou aparaturom smo nalili 170 mL mineralnega olja in priklopili na sistem za hlajenje, s tem smo preprečili izhlapevanje in kristalizacijo uree; od te stopnje naprej ne smemo več premikati posode, saj lahko olje pride med elektrodo in trakove in tako prekine tok (pričak celotne aparature je na Sliki 3)
- posodo smo pokrili in priklopili na napajalnik



Slika 3: Shematski prikaz aparature za izoelektrično fokusiranje.

Nastavili smo program za IF

- prva faza: 300 V, 5 mA, 5 W, 1 min
- druga faza: gradient 300-3500 V, 5 mA, 5 W, 90 min
- tretja faza: 3500 V, 5 mA, 5 W, 4 h

Po poteku IF smo trakove z geli prenesli v plastično vrečko in spravili na -80°C .

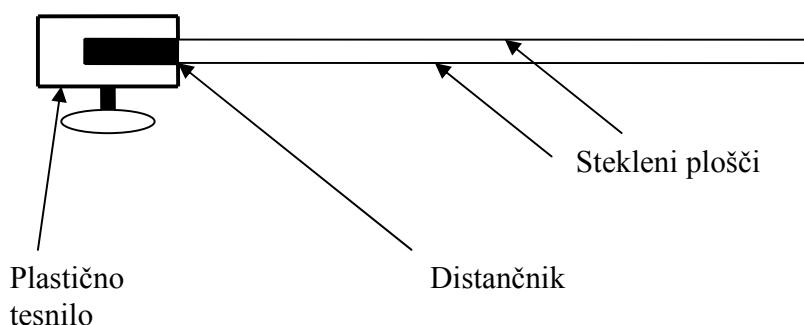
3. 8. 1. 4 SDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

Najprej smo sestavili aparaturo za SDS-PAGE. Vse dele smo pred sestavljanjem skrbno počistili oz. obrisali, da smo zagotovili enakomerno porazdelitev gela in pravilno potovanje vzorca. Dve stekleni plošči smo s pomočjo distančnikov namestili na ustrezno medsebojno

razdaljo (1 mm). Nato smo ju poravnali in fiksirali s plastičnimi tesnili (slika 4 a). Sestavljen par plošč smo vpeli v podstavek in ga fiksirali (slika 4 b).

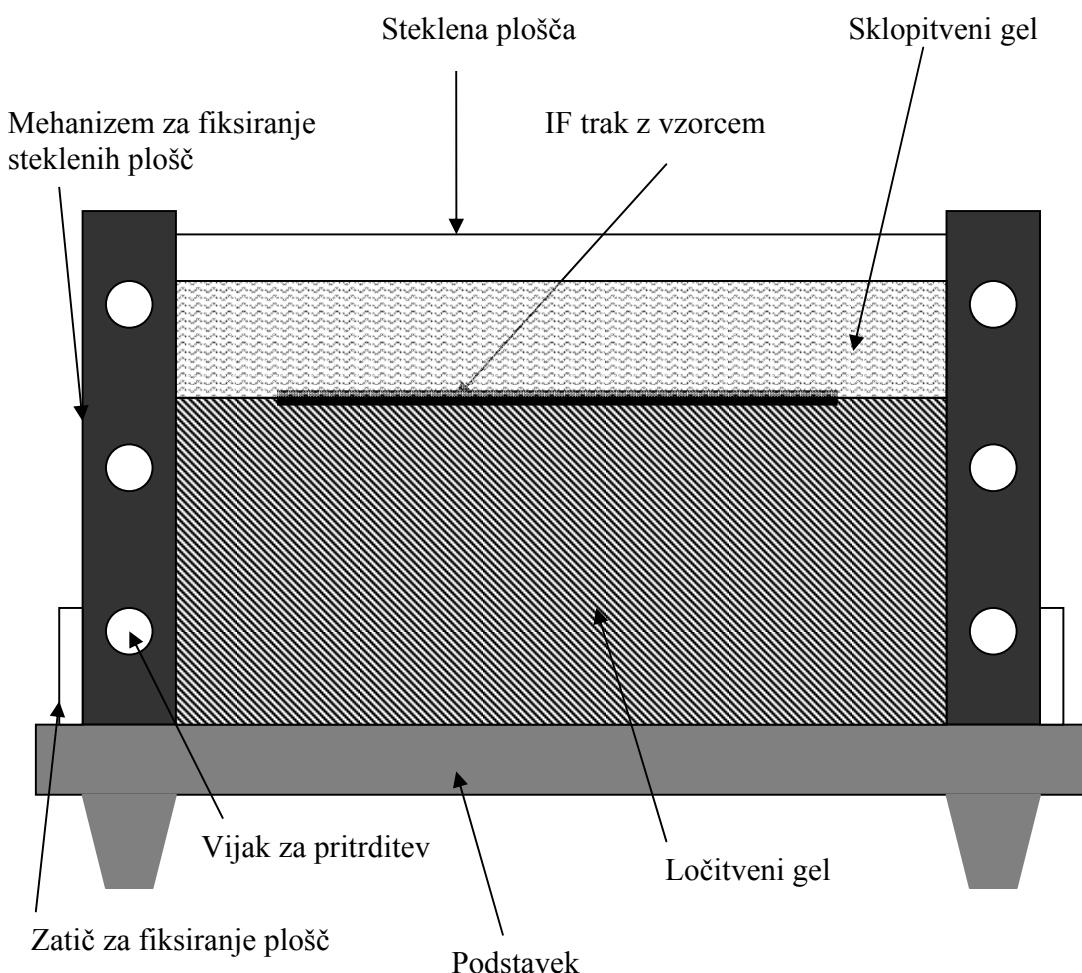
Pripravili smo 14% ločitveni gel za SDS-PAGE in ga 10 min sonificirali v ultrazvočni kopeli, da smo odstranili morebitne mehurčke, ki bi lahko motili potovanje proteinov. 19 mL gela smo vlili med pripravljeni stekleni plošči in gel nadplastili z 1 mL ddH₂O, s čimer smo preprečili prehitro strjevanje in kristalizacijo gela. Strjevanje gela traja vsaj dve uri. Ko se je gel strdil, smo odlili vodo ter gel popivnali s papirnato brisačo, da je bila površina popolnoma suha. Na tako pripravljen ločitveni gel smo s siringo nanesli 10 mL raztopljenega sklopitvenega gela (slika 4 b).

a)



Slika 4 a: Prikaz vpetja steklenih plošč za 2-D elektroforezo, med katere vlijemo gel

b)



Slika 4 b: Stranski prikaz sestavljenje banjice za drugo dimenzijo (SDS – PAGE) elektroforeze. Med stekleni plošči s siringo vlijemo 19 mL ločitvenega gela in počakamo, da se strdi. Po strditvi nadplastimo z sklopitvenim gelom, v katerega takoj položimo IF trak z nanesenim vzorcem. Ko se tudi agarozni gel strdi, celotno sestavljeno banjico ločimo od postavka in jo namestimo v posodo, v kateri poteka druga dimenzija.

IF trakove smo pred nanosom na SDS-gel uravnotežili; uravnoteženje zagotovi ustrezni pH v neposredni okolini proteinov in proteine vzdržuje v denaturirani obliki ter olajša prenos proteinov na SDS-gel. Trak smo prenesli iz -80°C , ga izrezali iz plastične vrečke ter položili v epruveto z 10 mL pufra I. Trak smo položili ob steno epruvete, s stranjo na kateri se nahaja gel navzgor, in epruveto zamašili. Epruveto smo počasi horizontalno stresali 15 min. Po pretečenem času smo trak direktno prenesli v epruveto z 10 mL pufra II in na enak način

ponovno stresali 15 min. Nato smo trak prenesli na papirnato brisačo in popivnali odvečno tekočino.

Trak smo potem položili na še tekoč sklopitveni gel med ploščama, tako da se je vzorec, ki se je že porazdelil po pH-gradientu, prenesel iz IF-gela na SDS-gel. Posodo za SDS-PAGE smo priklopili na usmernik in spet poskrbeli za hlajenje sistema. Posodo smo napolnili z 800 mL 5× SDS pufra in dolili 3,2 L dH₂O.

Nastavili smo program za elektroforezo:

- prva faza: 300 V, 20 mA, 120 W, 15 min
- druga faza: 1000 V, 40 mA, 120 W, 120 min

Trajanje druge faze ni točno določeno, električni tok smo ustavili, ko je barvilo (bromfenol modro) doseglo dno gela.

Po preteku SDS-PAGE smo gel hitro prenesli v posodo za barvanje.

3. 8. 1. 5 Barvanje gela

Barvanje gela omogoča zaznavanje do 0,2 ng proteina, ki se na gelu pojavi kot lisa oz. točka. Barvanje poteka v 8 korakih, kot je prikazano v Preglednici 1.

Preglednica 1: Postopki pri barvanju SDS gela.

korak	postopek	čas
1	fiksacija	30 min
2	predtretiranje	30 min
3	izpiranje z 250 mL ddH ₂ O	3 x 5 min
4	barvanje z AgNO ₃	20 min
5	izpiranje z 250 mL ddH ₂ O	2 x 1 min
6	razvijanje	2-5 min
7	ustavitev reakcije	10 min
8	izpiranje z 250 mL ddH ₂ O	3 x 5 min

3. 8. 1. 6 Primerjava proteinskih profilov

Gel smo fotografirali in vizualno s primerjavo regij določili razlike med posameznimi vzorci.

3. 9 RAST NA LIZATIH

3. 9. 1. Pridobivanje mitomicinskih mutant (MitC-mutant) in vpliv MitC na rast *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli*

Priprava virusnega lizata vključuje indukcijo z MitC, ki potem ostane v gojišču z lizatom. Zato morajo biti celice *Pseudoalteromonas* sp. in *E. coli*, ki jih nameravamo gojiti na virusnem lizatu, odporne proti MitC.

Odpornost za *Pseudoalteromonas* sp. smo preverili z mitomicinskim testom (MitC-test, Odič, 2002). Sev smo nacepili v dve erlenmajerici s tekočim gojiščem PKS (3 % (w/v) NaCl). Ko sta kulturi vstopili v eksponencialno fazo rasti, smo v eno izmed kultur dodali MitC (inducirana kultura), druga pa je bila kontrolna (brez MitC). V obeh kulturah smo spremljali OD₆₅₀: če je le-ta v inducirani kulturi začela padati, OD₆₅₀ kontrolne kulture pa je še naraščala, je to pomenilo, da je izbrani sev občutljiv za MitC. V tem primeru smo 40 ur po indukciji (po

tem času je že prišlo do rasti mutant) kulturo precepili v sveže tekoče gojišče in ponovno dodali MitC. Postopek smo ponavljali, dokler nismo dobili kulture, ki ob dodatku MitC ni začela propadati (t. j., kontrolna in inducirana kultura sta se podobno obnašali). Tako dobljene mutante – *Pseudoalteromonas* sp.^M – smo nacepili na trdno bogato gojišče z dodanim MitC in jih na takem gojišču tudi vzdrževali. *E. coli* K12 je odporna na antibiotik MitC. Potrebno je bilo preveriti kolikšna je maksimalna koncentracija antibiotika, pri kateri *E. coli* raste in da samo koncentracija MitC nima vpliva na rast seva.

3. 9. 2 Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* na minimalnem gojišču

Iz preteklega dela na sistemu z *Vibrio* sp. in *Pseudoalteromonas* sp.^M (Odič, 2002) vemo, da slednji raste bistveno slabše kot na lizatu na gojišču MGJ, medtem ko *Vibrio* sp. raste, kar je pomembno pri pripravi virusnega lizata. Nezmožnost rasti *Pseudoalteromonas* sp.^M na MGJ smo preverili z nacepljanjem in spremljanjem OD₆₅₀ po 24 urah. Pričakovali smo vrednost OD₆₅₀ manjšo kot 0,1. Za *E. coli* je bilo potrebno preveriti rast na MGJ gojišču, saj omenjena bakterija raste na substratih prisotnih v tem gojišču. Dobljeno vrednost OD₆₅₀ moramo upoštevati pri rasti *E. coli* na lizatu in odšteti od celokupne vrednosti OD₆₅₀ (samo virusni lizat). V primeru rasti *E. coli* na lizatih pridobljenih z avtoklaviranjem in soniciranjem smo namesto MGJ gojišča uporabili mineralno osnovo le-tega, s tem smo izločili druge vire C razen lizata.

3. 9. 3 Rast na lizatih

Za opredelitev kvalitete različnih lizatov smo primerjali vrednosti OD₆₅₀ kultur *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli*, ki so rasle v lizatih s prebitnimi koncentracijami. Pred samo nacepitvijo eksperimentalnih sevov na lizat smo zmerili OD₆₅₀ le-tega, odšteli od dobljenega celokupnega rezultata, ter tako dobili dejansko vrednost OD₆₅₀, ki je posledica rasti *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* na lizatu. Preverjali smo različno pridelavo lizata, ter vpliv same slanosti (0,5 %; 3 %; 10 % (w/v) NaCl) na kvaliteto lizata pri vseh različno pripravljenih lizatih.

3. 9. 4 Rast v prisotnosti protimikrobnih učinkovin

Glede na to, da rasti *Pseudoalteromonas* sp.^M pri nobeni redčitvi virusnega lizata nismo zaznali, smo preverili rast *Pseudoalteromonas* sp.^M v prisotnosti virusnega lizata še na trdnih gojiščih PKS. Na trdno gojišče smo razmazali 100 µL prekonočne kulture *Pseudoalteromonas* sp.^M in na sredino gojišča kanili 10 µL skoncentriranega virusnega lizata. Petrijevko smo inkubirali 48 ur pri 28 °C v temi. V primeru zaviralnega učinka smo pričakovali cono zbistritve na sredini sicer preraslega gojišča. Iz opravljenih študij (Jerman, 2004) vemo, da sev *E. coli* K12 ni občutljiv za protimikrobine učinkovine *Vibrio* sp. in je torej ustrezen za študije kakovosti lizata.

4 REZULTATI

4. 1. ELEMENTARNA SESTAVA CELIC *VIBRIO* SP.

V Preglednici 2 so prikazane koncentracije C, N, P in S v celicah *Vibrio* sp. pri različnih slanostih. Z naraščanjem slanosti opazimo upad v vsebnosti vseh elementov, najbolj pade delež S.

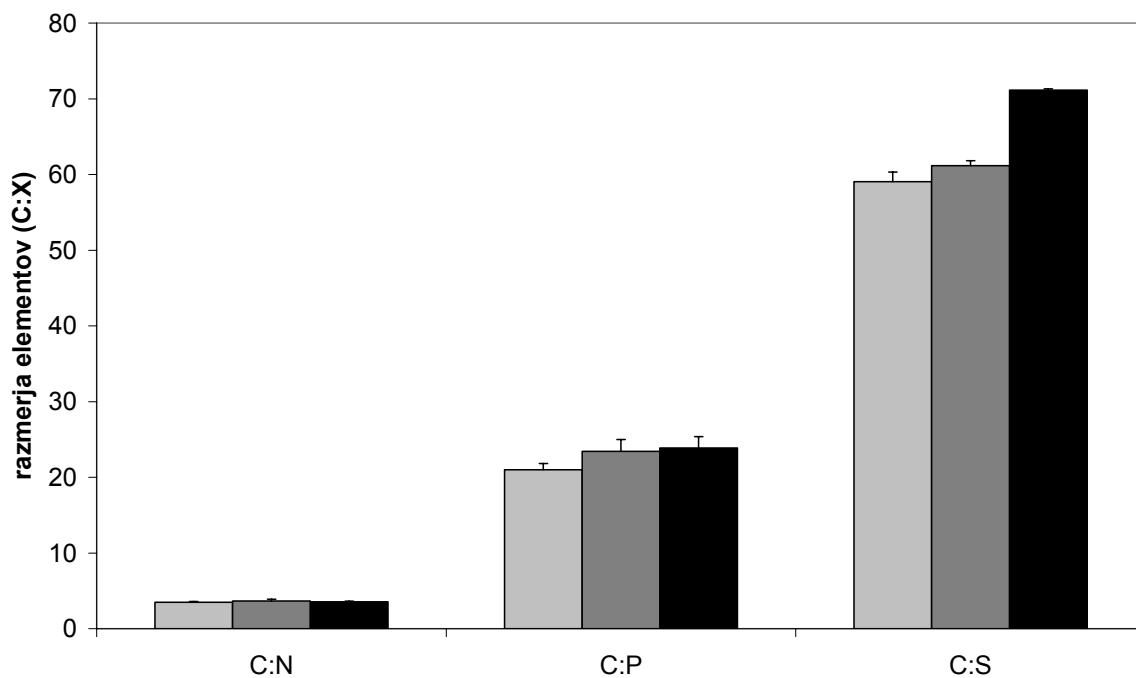
Vrednosti C:N razmerja so prikazane na Sliki 5 in so neodvisne od slanosti.

Razmerje C:P naraste od vrednosti 20 pri 0,5 (w/v) NaCl na 25 pri 3 % in 10 % (w/v) NaCl.

Pri 0,5 % in 3 % (w/v) NaCl je vrednost C:S okrog 60, pri 10 % (w/v) NaCl pa znaša 71. Z višanjem slanosti se znatno spremeni le razmerje C:S (Slika 5).

Preglednica 2. Koncentracije ogljika, dušika, fosforja in žvepla v celicah *Vibrio* sp., gojenih pri različnih slanostih. Prikazana so povprečja \pm sd ($n = 2$). Prikazana so tudi razmerja C:N:P:S.

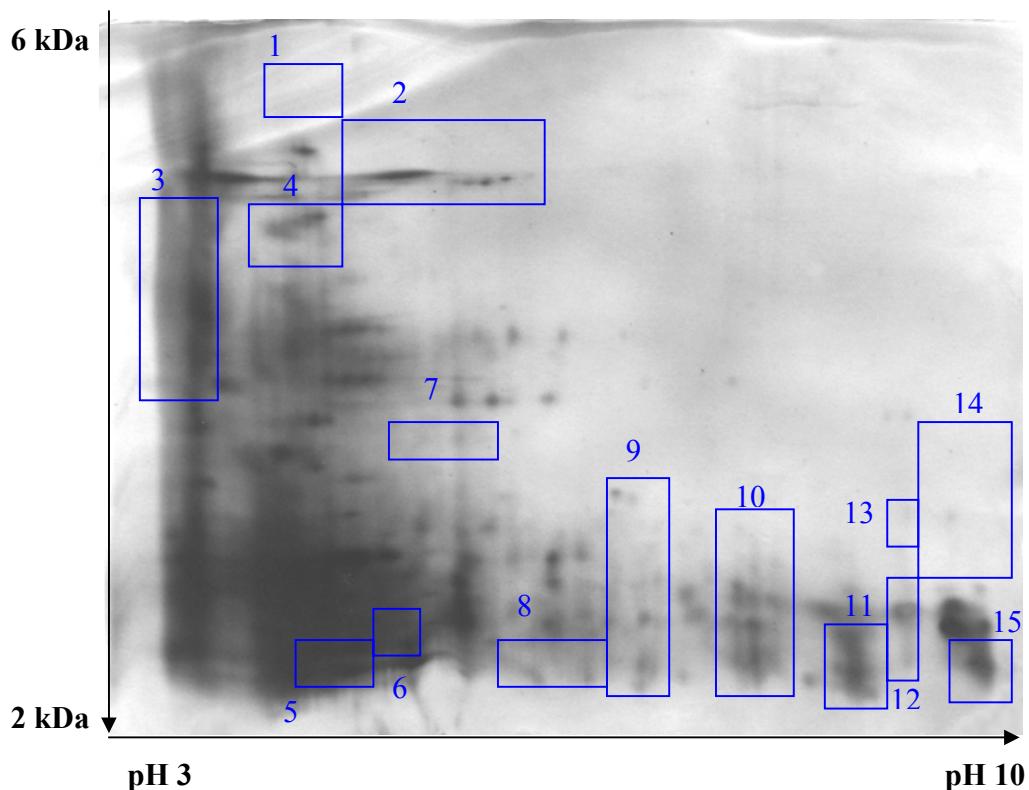
% (w/v) NaCl	koncentracija elementa [mg/g suhe biomase]				C : N : P : S
	C	N	P	S	
0.5	440.0 ± 1.4	126.0 ± 0.1	21.0 ± 0.1	7.5 ± 0.3	100 : 29 : 5 : 2
3	427.0 ± 0.1	116.5 ± 0.7	18.2 ± 0.1	7.0 ± 0.1	100 : 27 : 4 : 2
10	414.5 ± 0.7	116.0 ± 0.1	17.4 ± 0.1	5.8 ± 0.1	100 : 28 : 4 : 1



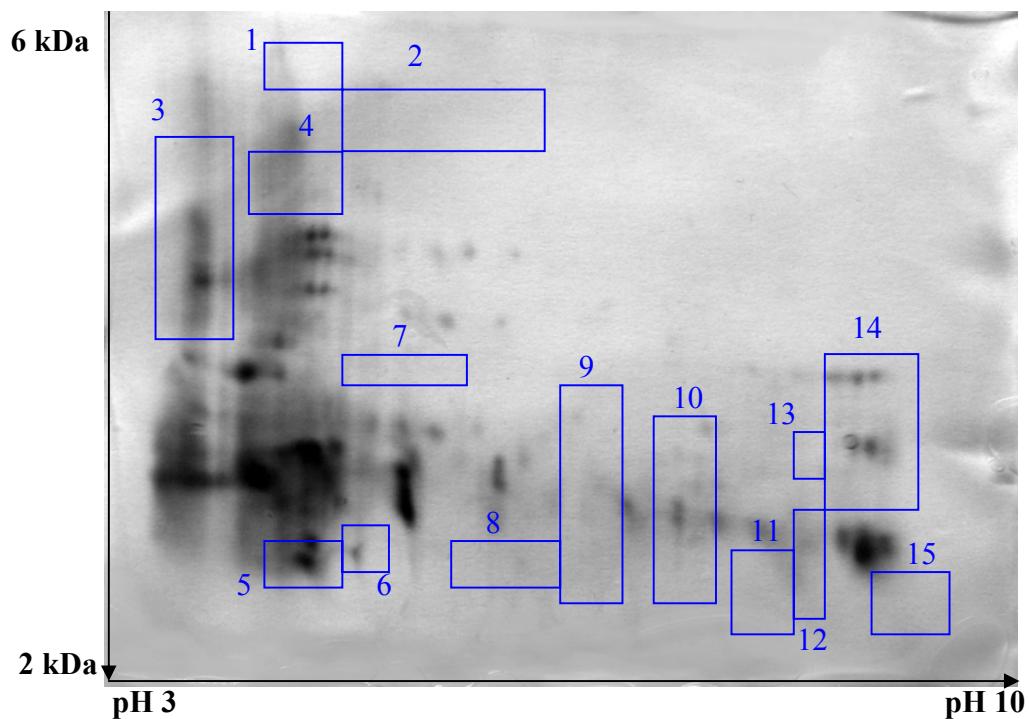
Slika 5: Razmerja elementov v celicah *Vibrio* sp. pri različnih slanostih. Prikazana so povprečja \pm sd ($n = 2$). □ 0,5 % (w/v) NaCl, ■ 3 % (w/v) NaCl, ■ 10 % (w/v) NaCl.

4. 2 PROTEINSKI PROFILI RAZLIČNIH LIZATOV

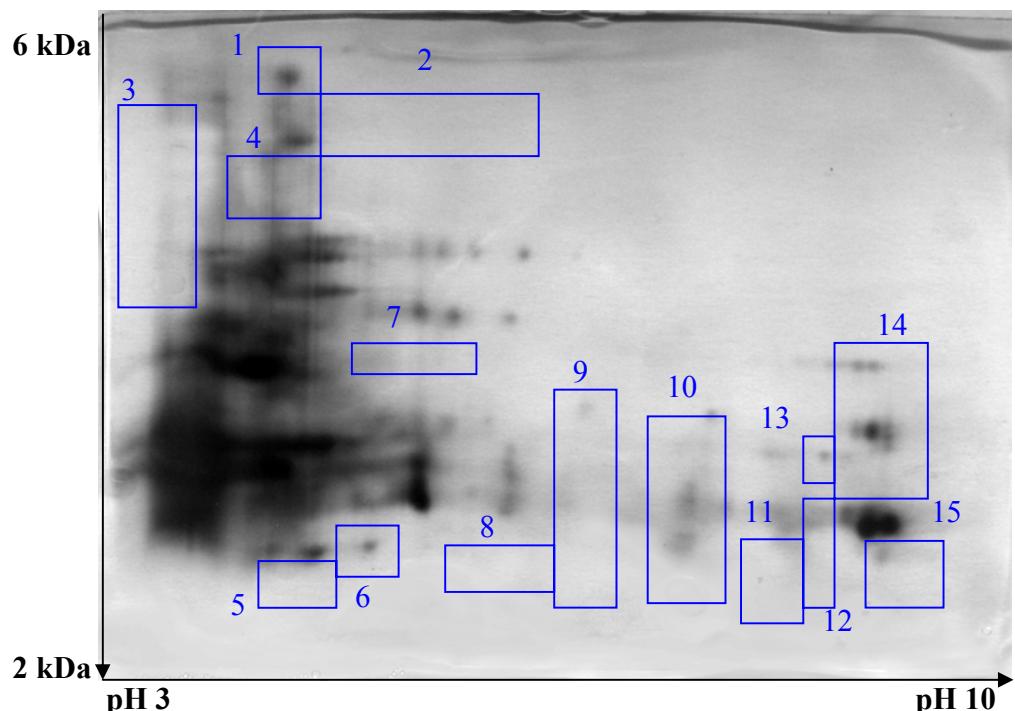
Proteinske profile lizatov, pripravljenih z avtoklaviranjem celic *Vibrio* sp., ki smo jih nagojili pri različnih slanostih, smo analizirali v dveh neodvisnih ponovitvah. Na Sliki 6, Sliki 7 in Sliki 8 so prikazane fotografije SDS-PAGE gelov s proteinskimi profili različnih lizatov. Regije, v katerih smo opazili razlike med profili so označene. Razlike med profili so prikazane v Preglednici 3.



Slika 6: Proteinski profil lizata, pridelanega z avtoklaviranjem celic *Vibrio* sp., ki so rasle pri 0,5 % (w/v) NaCl.



Slika 7: Proteinski profil lizata, pridelanega z avtoklaviranjem celic *Vibrio* sp., ki so rasle pri 3 % (w/v) NaCl.



Slika 8: Proteinski profil lizata, pridelanega z avtoklaviranjem celic *Vibrio* sp., ki so rasle pri 10 % (w/v) NaCl.

Preglednica 3: Primerjava regij v proteinskih profilih glede na pojavljanje lis na gelih. + jasno vidne točke, -/+ šibko vidne točke ali ni mogoče razbrati, - ni moč zaznati točk

regija	lizat iz celic, ki so rasle pri		
	0,5 % (w/v) NaCl	3 % (w/v) NaCl	10 % (w/v) NaCl
1	-	-	+
2	+	-	-
3	+	+	-
4	+	-	-
5	-/+	+	-
6	-/+	+	+
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	+
10	+	-/+	-/+
11	+	-	-
12	+	-	-
13	-	-	+
14	-	+	+
15	+	-	-/+

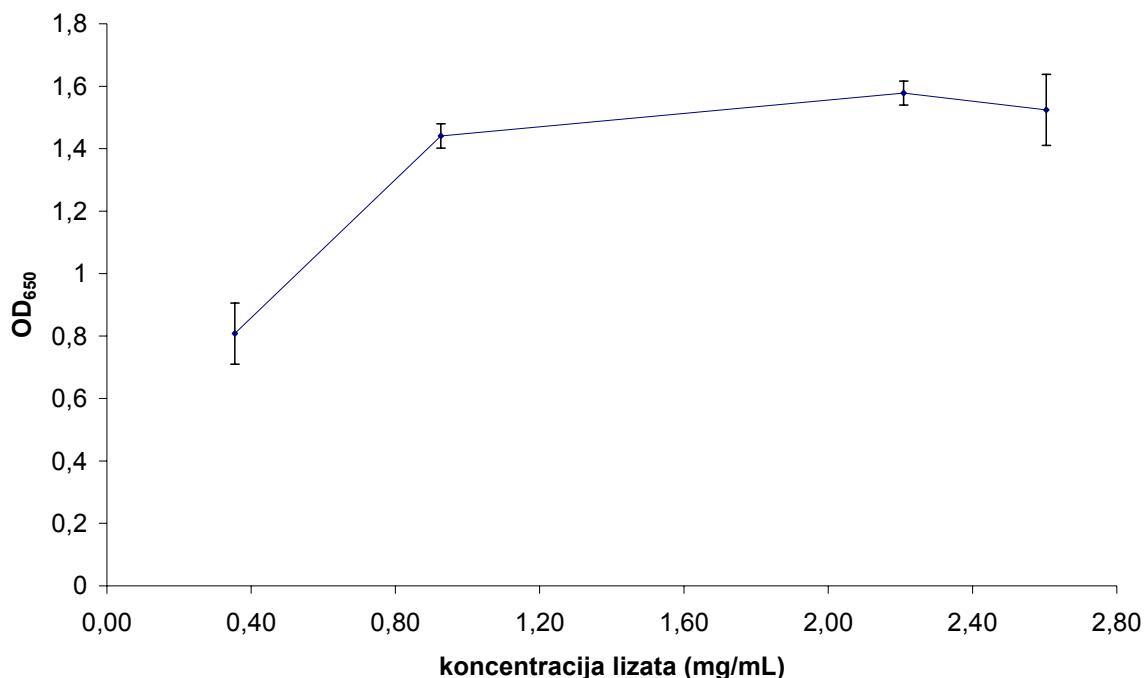
Splošni vzorec razporeditve lis je bil enak v vseh lizatih; proteini so se pred vsem nakopičili v območju nizkega pH (3-5) in nizke Mw (2-4 kDa). Nekoliko širše so se razporedili v območju nizke Mw. Lise smo opazili tudi v območju visoke Mw, vendar samo pri nizkih pH vrednostih. Kljub splošno podobnim vzorcem pa določene razlike lahko opazimo (Preglednica 3).

Gel na Sliki 6 se v regijah 2, 4, 7, 8, 11 in 12 razlikuje od Slike 7 in 8. Gel na Sliki 7 se od Slike 6 in 8 jasno loči v regijah 9 in 15, kjer ne zasledimo lis, ki so drugače prisotne. Gel na Sliki 8 se loči od Slik 6 in 7 v regijah 1 in 13.

4. 3 RAST NA LIZATIH

4.3.1 Določanje prebitne koncentracije lizata

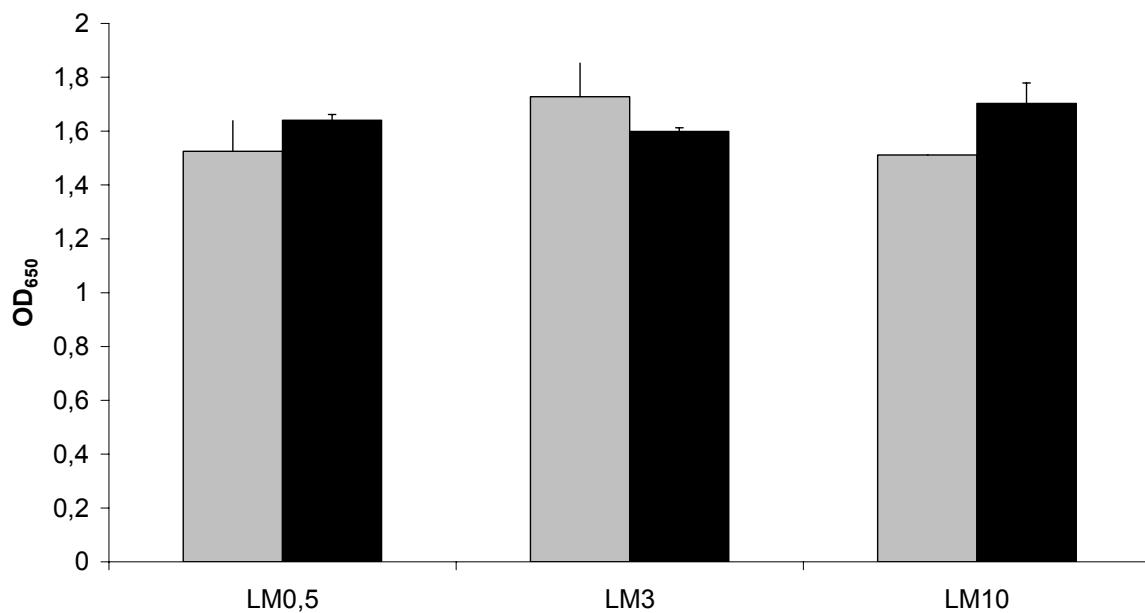
Ker je učinkovitost izrabe lizata odvisna tako od koncentracije kot kvalitete lizata smo vse eksperimente delali pri prebitnih koncentracijah lizata. To je pri tistih koncentracijah kjer koncentracija lizata ne vpliva na rast *Pseudoalteromonas* sp.^M ali *E. coli*.



Slika 9: Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M pri različnih koncentracijah lizata, pripravljenega z avtoklaviranjem kulture *Vibrio* sp., ki je rasla pri 0,5 % (w/v) NaCl. Prikazana so povprečja ± sd (n = 3). OD₆₅₀ merjena po 24 urah.

Na Sliki 9 je prikazana rast *Pseudolteromonas* sp.^M na različnih koncentracijah lizata *Vibrio* sp. pridelanega s avtoklaviranjem. Iz Slike 9 je razvidno, da smo nelimitno koncentracijo lizata dosegli pri 1,2 mg/ml proteina v lizatu. Pri nadalnjem delu smo vedno uporabili nelimitne koncentracije lizata tako, da na rezultat vpliva kvaliteta in ne količina lizata.

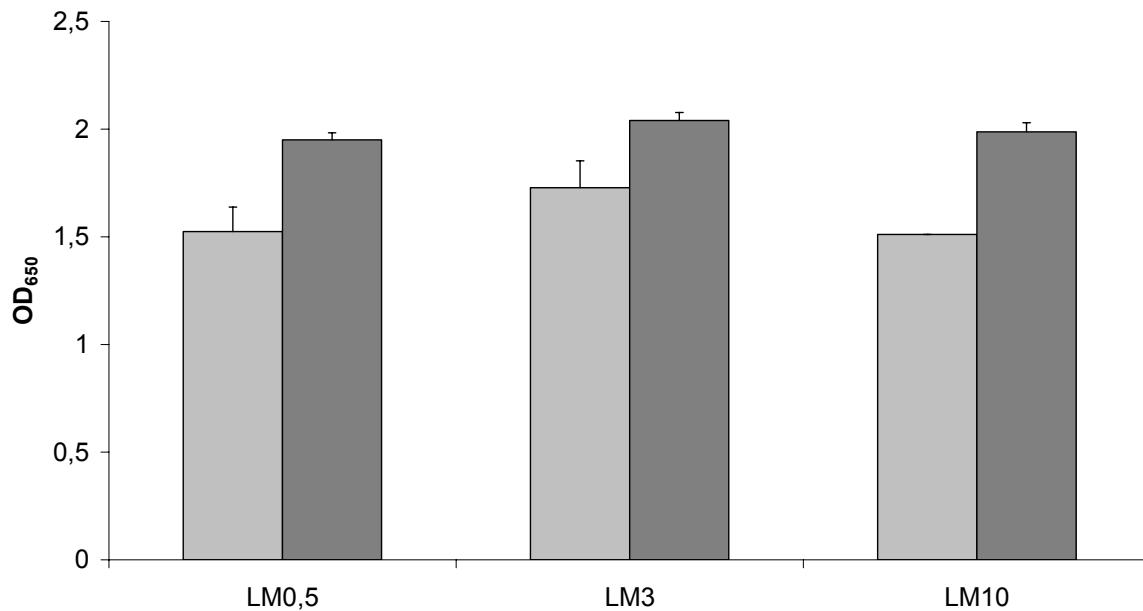
4.3.2 Primerjava rasti *E. coli* in *Pseudoalteromonas* sp.^M na lizatih pripravljenih s avtoklaviranjem



Slika 10: Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M (◻) in *E. coli* (■) na lizatih, pripravljenih z avtoklaviranjem *Vibrio* sp. Prikazana so povprečja ± sd (n = 3). Prikazana je rast pri različnih slanostih LM_{0,5}, LM₃ in LM₁₀. OD₆₅₀ merjena po 24 urah.

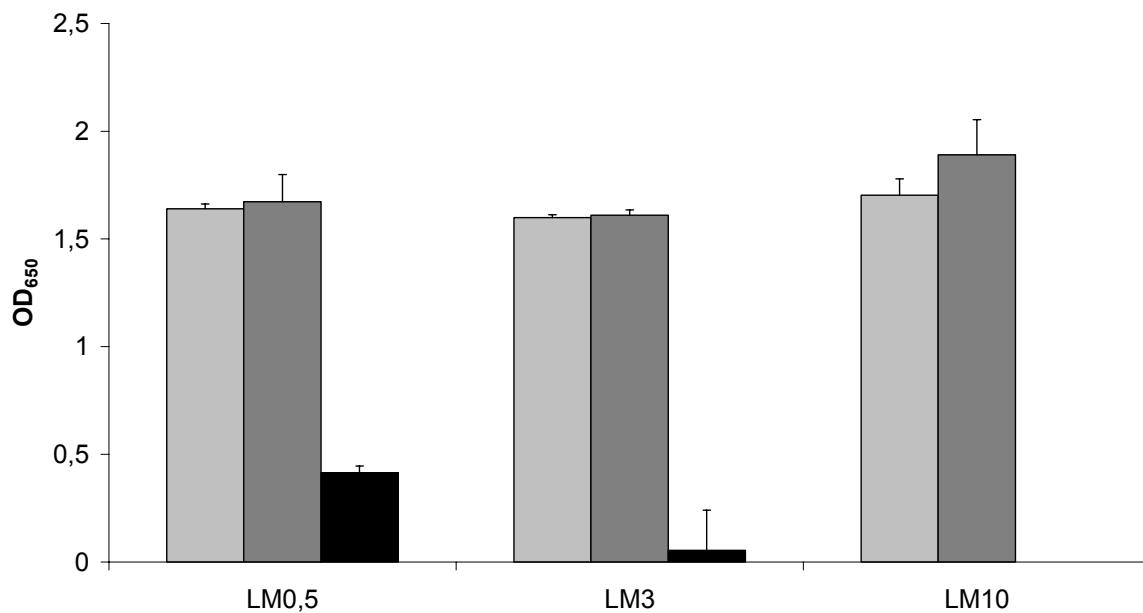
Slika 10 prikazuje primerjavo rasti med *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* na lizatu pridobljenem z avtoklaviranjem. Iz slike je razvidno, da *Pseudoalteromonas* sp.^M bolje raste pri LM₃. Medtem ko *E. coli* doseže višji OD₆₅₀ pri lizatih, pripravljenih iz celic, ki so rastle v "ekstremnih slanostih" (LM_{0,5} in LM₁₀).

4.3.3 Primerjava rasti *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* na različno pripravljenih lizatih



Slika 11: Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M na lizatih *Vibrio* sp., ki so bili pripravljeni z avtoklaviranjem (◻) in soniciranjem (■). Prikazana je rast pri različnih slanostih LM_{0,5}, LM₃ in LM₁₀. Prikazana so povprečja ± sd (n = 3). OD₆₅₀ merjena po 24 urah.

Primerjava rasti *Pseudoalteromonas* sp.^M na lizatih *Vibrio* sp. pripravljenih z avtoklaviranjem in soniciranjem skoncentrirane kulture na Sliki 11 kaže, da lizat, ki je bil pripravljen s soniciranjem doseže višji OD₆₅₀, kot lizat, ki smo ga pripravili z avtoklaviranjem. Razlika v vrednost OD₆₅₀ je najvišja pri LM_{0,5} in LM₁₀. Pri soniciranem lizatu se vpliv slanosti na kvaliteto lizata zmanjša.



Slika 12: Rast *E. coli* na lizatih *Vibrio* sp., ki je rasel na različnih slanostih 0,5; 3 in 10% (w/v) NaCl, pripravljenih s avtoklaviranjem (□), soniciranjem (■), in indukcijo profaga (virusno lizo) (■). Prikazana je rast pri različnih slanostih LM_{0,5}, LM₃ in LM₁₀. Prikazana so povprečja ± sd (n = 3), virusni lizat ± sd (n=2). OD₆₅₀ merjena po 24 urah.

Na Sliki 12 je prikazana primerjava rasti *E. coli* na lizatih pridelanih z avtoklaviranjem, soniciranjem ter pri LM_{0,5} in LM₃ s pomočjo virusne indukcije (virusni lizat). Statistično značilnih razlik nismo opazili med lizati pridelanimi z avtoklaviranjem in soniciranjem. Pri obeh je odvisnost od slanosti podobna. Lizati pridelani z virusno indukcijo so omogočali precej nižjo rast *E. coli* kot lizati pridelani z avtoklaviranjem ali soniciranjem. Podobno kot pri avtoklaviranjih in soniciranih se tudi rast pri virusnih lizatih LM₃ zmanjša v primerjavi z LM_{0,5}. Virusnega lizata LM₁₀ nismo uspeli pridobiti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo uporabili eksperimentalni modelni sistem z dvema bakterijskima sevoma. Celice *Vibrio* sp. smo najprej izpostavili različnim slanostim, nato smo na različne načine pripravili lizat. Na lizatih smo nagojili *Pseudoalteromonas* sp.^M oz. *E. coli* in ugotovili učinkovitost izrabe različnih lizatov.

Razlike v elementarni sestavi celic *Vibrio* sp., ki so rastle pri različnih slanostih, se kažejo v razmerju C:S, medtem ko se razmerja C:N in C:P niso spremenila. Ti rezultati kažejo, da bodisi do razlik v sestavi prihaja na nivoju elementov, ki so v celici manj zastopani (žveplo in mikroelementi), bodisi elementarna razmerja niso dovolj natančen pokazatelj sprememb v celičnih komponentah – nabor spojin v celici (npr. kompatibilnih topljencev) se lahko spremeni, medtem ko elementarno razmerje ostane enako. Kot je pokazal Odić s sod. (2006) so razmerja med mikroelementi precej bolj indikativna in prihaja do večjih sprememb s slanostjo.

Razlike v sestavi lizatov smo ugotavljali tudi z 2-D elektroforezo proteinov, in sicer samo pri lizatih, pripravljenih z avtoklaviranjem. Ker avtoklaviranje denaturira določen del proteinov, je tudi ločevanje le-teh z 2-D elektroforezo slabše, posledica pa so razvlečene lise na gelih in kopiranje proteinov v ozkih meritvenih območjih (Slike 6-8). Kljub temu pa se proteinski profili signifikantno razlikujejo pri različnih slanostih, kar kaže, da je kvaliteta lizatov različna. To se sklada tudi z rezultati Danevčič s sod. (2005), ker se je s spremembijo slanosti znatno spremenila sestava lipidov *Vibrio* sp. V drugem delu naloge smo preverjali, ali različna sestava lizatov pomeni tudi različno učinkovitost njihove izrabe.

Rast bakterij na lizatih smo v vseh primerih lahko merili spektrofotometrično, kar pomeni, da je bila prirast na vseh lizatih znatna (metoda ima spodnjo mejo zaznavanja okrog 10^5

celic/mL). To pomeni, da so lizati zagotavljeni lahko dostopen vir hranil. Primerjava rasti *E. coli* in *Pseudoalteromonas* sp.^M na različnih lizatih pokaže, da se obnašata različno. Medtem ko je pri *Pseudoalteromonas* sp.^M največja rast na LM₃, je pri *E. coli* tam najmanjša. Razlike med posameznimi lizati niso velike. Odič s sod. (2006) je pokazal, da je precej bolj občutljiva metoda kot OD₆₅₀ za določanje učinkovitosti izrabe lizata, določanje koncentracije proteinov, merjenje respiracije, hitrost vgradnje leucina ali timidina. Kljub majhnim razlikam v nosilnosti okolja je zanimivo, da sta *E. coli* in *Pseudoalteromonas* sp.^M občutljiva na kvaliteto vendar na različen način.

Ker je avtoklaviranje precej agresiven postopek priprave lizata, smo rezultate pridobljene na avtoklaviranem lizatu primerjali z lizati pripravljenimi s sonikacijo in virusno pridobljenimi lizati. Pri *Pseudoalteromonas* sp.^M nismo uspeli pridobiti virusnega lizata. Vzrok je verjetno v protimikrobnih učinkovinah (Jerman, 2004), ki onemogočajo rast *Pseudoalteromonas* sp.^M (glej Priloga A2). Zato smo v nadaljevanju dela izbrali *E. coli*, ki je odporna proti protimikrobnim učinkovinam (Jerman, 2004). Kljub temu nam ni uspelo pripraviti LM₁₀ zaradi razmeroma slabe rasti *Vibrio* sp. pri tej slanosti.

Pseudoalteromonas sp.^M je bolje rastel na lizatih, pripravljenih s sonifikacijo, kot na tistih, pripravljenih z avtoklaviranjem. Vzrok je verjetno v tem, da sonifikacija ne razbije vseh celičnih komponent in se v raztopino sprostijo predvsem lažje dostopne spojine, medtem ko se celični deli med pripravo lizata odstranijo. Zaradi tega se verjetno tudi zmanjša vpliv različnih lizatov na rast *Pseudoalteromonas* sp.^M.

Pri rasti *E. coli* v lizatih, pripravljenih z avtoklaviranjem smo opazili manjše razlike na različnih LM kot pri *Pseudoalteromonas* sp.^M. To kaže, da *E. coli* očitno uspe bolje izenačiti razlike v kvaliteti lizatov, kot *Pseudoalteromonas* sp.^M. Nekoliko večje razlike smo opazili pri soniciranih lizatih, kjer je bil trend sprememb podoben tistim pri avtoklaviranih. Rast *E. coli* na lizatih iz celic, ki so rastle pri LM_{0,5} je bila signifikantno večja kot pri LM₃. Virusno pridelana lizata LM_{0,5} in LM₃ kažeta podoben trend kot soniciran in avtoklaviran lizat, vendar

pa je rast *E. coli* znatno nižja. Glede na to, da so v gojišču z virusnim lizatom prisotne mnoge komponente, ki lahko vplivajo na rast bakterij, npr. sproščeni virusi, mitomicin in protimikrobne učinkovine je nižja rast v virusnih lizatih glede na avtoklaviran in soniciran lizat pričakovana. Rast na virusnem lizatu je očitno bistveno bolj kompleksen proces v primerjavi z rastjo na mehansko in termično pripravljenih lizatih. Glede na to, da virusi predstavljajo pomembno komponento v mikrobnih prehranjevalnih zankah bi bilo potrebno v prihodnje tovrstne eksperimente razširiti, saj preliminarni rezultati kažejo, da ima kvaliteta gostitelja pomemben vpliv na kvaliteto lizata.

5.2 SKLEPI

- Slanost je dejavnik, ki vpliva na celice *Vibrio* sp. Posledično se spremeni elementarna sestava proteinov.
- Različna sestava lizatov vodi v različno učinkovitost izrabe lizata s strani *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli*. Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M je največja pri LM₃, medtem je rast *E. coli* pri LM₃ najmanjša.
- Lizat, pripravljen s sonikacijo, predstavlja lažje dostopen vir hrani za *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* kot lizat, pripravljen z avtoklaviranjem.
- Virusni lizat omogoča rast *E. coli* vendar je rast precej manjša kot pri avtoklaviranem in soniciranem lizatu. Kvaliteta virusnega lizata ima pomemben vpliv na rast *E. coli*.

6 POVZETEK

Heterotrofne bakterije imajo zaradi presnavljanja DOM pomembno vlogo v prehranjevalnih spletih. Med vire DOM spada tudi bakterijski lizat – celična vsebina, ki se v okolje sprošča zaradi plenilstva protozojev in virusne lize. Glavna hipoteza v diplomske nalogi je, da se lizati, nastali iz bakterijske kulture, ki je rasla pod različnimi pogoji, razlikujejo med seboj po sestavi in posledično po dostopnosti za druge bakterije. V modelnem sistemu smo bakterijski sev *Vibrio* sp. DSM14379 gojili pri različnih slanostih (0,5; 3 in 10 % (w/v) NaCl), celice sprali in pripravili lizat, z avtoklaviranjem, sonifikacijo ali pa virusno lizo. Na tako pripravljene lizate smo nacepili *Pseudoalteromonas* sp.^M ali *E. coli* K12, in ugotavliali razlike v učinkovitosti izrabe lizatov. Razlike v sestavi celic oz. avtoklaviranega lizata *Vibrio* sp. smo pokazali preko elementarne sestave (merili smo vsebnost elementov C:N:P:S) in 2-D elektroforeze proteinov. Rast na lizatih smo preverjali spektrofotometrično, z merjenjem OD₆₅₀ po 24 urah. Primerjava rasti *Pseudoalteromonas* sp.^M in *E. coli* na avtoklaviranem lizatu, nam pove, da *Pseudoalteromonas* sp.^M bolje raste na lizatih pridobljenih iz *Vibrio* sp., ki je rasel na optimalni slanosti LM₃, medtem ko *E. coli* doseže višje vrednosti OD₆₅₀ pri rasti na lizatih, ki so bili narejeni iz *Vibrio* sp., ki je rasel pri ekstremnih slanostih LM_{0,5} in LM₁₀. Rast je bila najvišja na lizatu, pripravljenem s sonikacijo. Rasti na virusnem lizatu nismo zaznali, verjetno zaradi prisotnosti protimikrobnih učinkovin, ki jih *Vibrio* sp. izloča v okolico in s tem inhibira rast drugih bakterij. Zato smo uporabili sev *E. coli*. Pri *E. coli* nismo zaznali razlik pri rasti na lizatih, pripravljenih z avtoklaviranjem ali sonifikacijo. Rast *E. coli* na virusnih lizatih je bila znatno nižja v primerjavi z ostalimi (avtoklaviranje, sonikacija). Kvaliteta virusnega lizata je vplivala na rast *E. coli*. Prevezava hrani na bakterijskem trofičnem nivoju je pomemben proces, ki lahko posredno vpliva na dogajanja v celotnem prehranjevalnem spletu. Iz rezultatov je razvidno, da ima kvaliteta lizata pomembno vlogo v kroženju snovi v mikrobnih prehranjevalnih spletih.

7 VIRI

Akhtar N., Blomberg A., Adler. L. 1997. Osmoregulation and protein expression in a *pbs2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to hypersaline stress. FEBS Letters, 403: 173-180

Ammerman J. W., Fuhrman J. A., Hagström Å., Azam F. 1984. Bacterioplankton growth in seawater. I. Growth kinetics and cellular characteristic in seawater cultures. Marine Ecology-Progress Series, 18:31-39

Amon R. M. W., Benner R. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. Limnology and Oceanography, 41, 1: 41-51

Amy P. S., Morita R. Y. 1983. Protein patterns of growing and starved cells of a marine *Vibrio* sp. Applied and Environmental Microbiology, 45, 6: 1748-1752

Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.-A., Thingstad F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology-Pogress Series, 10: 257-263

Bakker E. P., Booth I. R, Dinnbier U., Epstein W., Gajewska A. 1987. Evidence for multiple potassium export systems in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 169: 3743-3749

Bergh O., Børsholm K. Y., Bratbak G., Heldal M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340: 467-468

Botsford J. L. 1990. Analysis of protein expression in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 72: 355-360

Bratbak G., Heldal M., Thingstad T. F., Riemann B., Haslund O. H. 1992. Incorporation of viruses into the budget of microbial C-transfer. A first approach. *Marine Ecology-Progress Series*, 83: 273-280

Brett M. T., Muller-Navarra D. C., Park S.-K. 2000. Empirical analysis of the effect of phosphorus limitation on algal food quality for freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 45, 7: 1564-1575

Bunai K., Yamane K., 2005. Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography B*, 815: 227–236

Christaki U., Dolan J. R., Pelegri S., Rassoulzadegan F. 1998. Consumption of picoplankton-size particles by marine ciliates: Effects of physiological state of the ciliate and particle quality. *Limnology and Oceanography*, 43, 3: 458-464

Chrzanowski T. H., Kyle M., Elser J. J., Sterner R. W. 1996. Element ratios and growth dynamics of bacteria in an oligotrophic Canadian shield lake. *Aquatic Microbial Ecology*, 11: 119-125

Cole J. J., Findlay S., Pace M. L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecoystems: a cross-system overview. *Marine Ecology-Progress Series*, 43: 1-10

Corchero J. L., Cubarsi R., Vila P., Aris A., Villaverde A. 2001. Cell lysis in *Escherichia coli* cultures stimulates growth and biosynthesis of recombinant proteins in surviving cells. *Microbiological Research*, 156, 1: 13-18

Cruz-Rivera E., Hay M. E. 2000. Can quantity replace quality? Food choice, compensatory feeding, and fitness of marine mesograzers. *Ecology*, 81, 1: 201-219

Černe A. 2001. Pojavljanje lizogenije in polilizogenije pri bakterijskih izolatih iz morskih okolij v Tržaškem zalivu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 39 str.

Danевчиč 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

del Giorgio P. A., Gasol J. M., Vaqué D., Mura P., Agustí S., Duarte C. M. 1996.
Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of
active bacteria in a coastal marine estuary. Limnology and Oceanography, 41, 6: 1169-1179

Duché O., Trémoulet F., Namane A. 2002. A proteomic analysis of the salt stress response of
Listeria monocytogenes. FEMS Microbiology Letters, 215: 183-188

Eccleston-Parry J. D., Leadbeater B. S. C. 1995. Regeneration of phosphorus and nitrogen by
four species of heterotrophic nanoflagellates feeding on three nutritional states of a single
bacterial strain. Applied and Environmental Microbiology, 61, 3: 1033-1038

Fuhrman J. A. 1992. Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food
web. V: Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Falkowsky P. G.,
Woodhead A. D. (eds.) New York, Plenum Press: 361-383

Fuhrman J. A., Azam F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal
waters of British Columbia, Antarctica, and California. Applied and Environmental
Microbiology, 39, 6: 1085-1095

Fuhrman J. A., Noble R. T. 2000. Causative agents of bacterial mortality and the consequences to marine food webs. V: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifax, Avgust 9-14, 1998. Bell C. R., Brylinsky M., Johnson-Green P. (eds.). Halifax, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology: 145-152

Fuhrman J. A., Suttle C. A. 1993. Viruses in marine planktonic systems. Oceanography, 6, 2: 51-63

Gnezda Meijer K. 2000. Dinamika indukcije bakteriofagov pri morskih bakterijskih lizogenih izolatih pri različnih fizioloških pogojih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 37 str.

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

Hahn M. W., Höfle M. G. 1999. Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 4863-4872

Jamnik P. 2002. Odziv kvasovke *Candida intermedia* na Cr(VI) kot stresni dejavnik.
Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij
biotehnologije: 83 str.

Jerman V. 2004. Karakterizacija in čiščenje protimikrobne učinkovine bakterije *Vibrio* sp.
Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije: 44 str.

Jones R. H., Flynn K. J. 2005. Nutritional status and diet composition affect the value of
diatoms as copepod prey. Science, 307: 1457-1459

Kaye J. Z., Baross J. A. 2004. Synchronous effects of temperature, hydrostatic pressure, and
salinity on growth, phospholipid profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species
isolated from deep-sea hydrothermal-vent and sea surface environments. Applied and
Environmental Microbiology, 70, 10: 6220-6229

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

Koski M., Breteler W. K., Schogt N. 1998. Effect of food quality on rate of growth and
development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). Marine
Ecology-Progress Series, 170: 169-187

Mason C. A., Hamer G. 1987. Cryptic growth in *Klebsiella pneumoniae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 25: 577-584

Middelboe M., Jørgensen N. O. G., Kroer N. 1996. Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. Applied and Environmental Microbiology, 62: 1991-1997

Neidhart F. C., Ingraham J. L., Schaechter M. 1990. Physiology of the bacterial cell. Sunderland, Sinauer Associates: 506 str.

Nekolny D., Chaloupka J. 2000. Protein catabolism in growing *Bacillus megaterium* during adaptation to salt stress. FEMS Microbiology Letters, 184: 173-177

Nioh I., Furusaka C. 1968. Growth of bacteria in the heat-killed cell suspensions of the same bacteria. Journal of General and Applied Microbiology, 14: 373-385

Noble R. T., Fuhrman J. A. 1999. Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products. Aquatic Microbial Ecology, 20: 1-11

Noble R. T., Middleboe M., Fuhrman J. A. 1999. The effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. Aquatic Microbial Ecology, 18:1-13

Norbeck J., Blomberg A. 1996. Protein expression during exponential growth in 0.7 M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 137: 1-8

Odić D. 2002. Vpliv indukcije profaga na sproščanje in prevezavo hrani v mikrobeni zanki.
Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 52 str.

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

O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 250, 10: 4007-4020

Pedersen S., Bloch P. L., Reeh S., Neidhart F. C. 1978. Patterns of protein synthesis in *E. coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. Cell, 14, 1: 179-190

Pomeroy L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. BioScience, 24: 499-504

Pomeroy L. R., Wiebe W. J. 1993. Energy sources for microbial food webs. Marine Microbial Food Webs, 7, 1:101-118

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: 76-85

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

Stramer S. L., Starzyk M. J. 1978. Improved growth of *Thermus aquaticus* on cellular lysates. *Microbios*, 23, 93-94: 193-198

Sundh I. 1992. Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 9: 2938-2947

Tarman K. 1992. Osnove ekologije in ekologija živali. 1. izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 547 str.

Tezuka Y. 1990. Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates. *Microbial Ecology*, 19, 3: 227-238

Tirelli V., Mayzaud P. 2005. Relationship between functional response and gut transit time in the calanoid copepod *Acartia clausi*: role of food quantity and quality. Journal of Plankton Research, 27, 6: 557-568

Volkman J. K., Jeffrey S. W., Nichols P. D., Rogers G. I., Garland C. D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 128, 3: 219-240

Vrede K., Heldal M., Norland S., Bratbak G. 2002. Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. Applied and Environmental Microbiology, 68, 6: 2965-2971

Wacker A., Becher P., von Elert E. 2002. Food quality effects of unsaturated fatty acids on larvae of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Limnology and Oceanography, 47, 4: 1242-1248

Wacker A., von Elert E. 2004. Food quality controls egg quality of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: The role of fatty acids. Limnology and Oceanography, 49, 5: 1794-1801

Ward G. M., Cummins K. W. 1979. Effects of food quality on growth of a stream detritivore, *Paratendipes albimanus* (Meigen) (Diptera: Chironomidae). Ecology 60, 1: 57-64

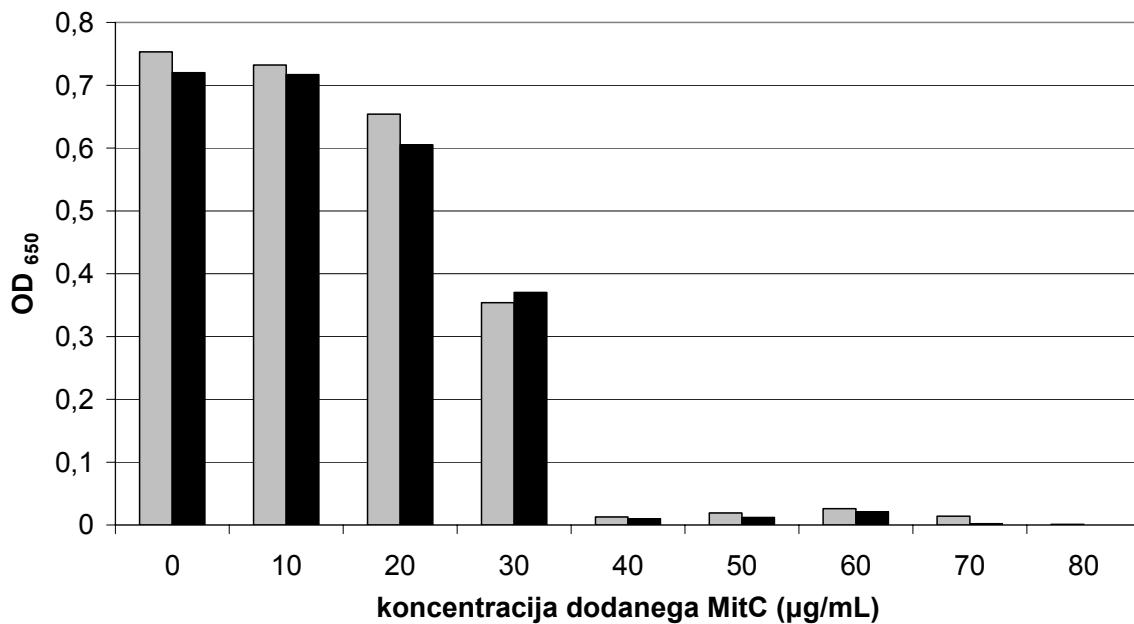
Weinbauer, M. G., Suttle C. A. 1999. Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquatic Microbial Ecology*, 18:217-225

Xu C., Ren H., Wang S., Peng X. 2004, Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Research in Microbiology*, 155: 835–842

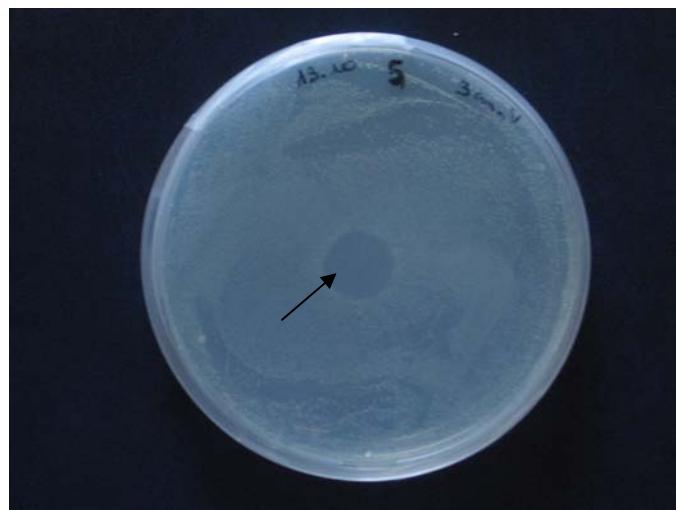
Xu X., Abo M., Okubo A., Yamazaki S. 2001. Salt-stress-responsive membrane proteins in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 2: 228-230

Priloga A

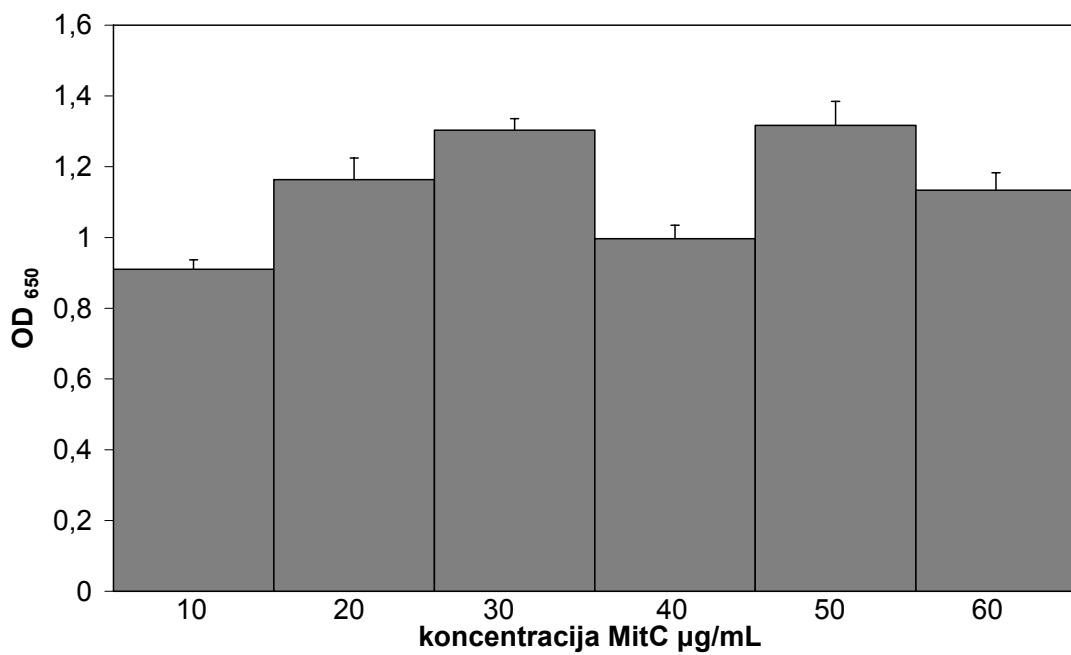
Rast v prisotnosti MitC



Priloga A1: Rast *Pseudoalteromonas* sp.^M pri različnih koncentracijah MitC. Rast smo ovrednotili z merjenjem OD₆₅₀. Najvišja koncentracija, ki še omogoča rast, je 30 µg MitC / mL gojišča. □ rast po 24 urah ■ rast po 48 urah



Priloga A2: Vpliv virusnega lizata na rast *Pseudoalteromonas* sp.^M. Koncentracija proteinov lizata je bila 11 mg/mL. V sredini je s puščico označena cona inhibicije na mestu, kamor je bil nanešen lizat. Slika je bila posneta 2 dni po nacepitvi.



Priloga A3: Vpliv različnih koncentracij MitC na rast *E. coli* K 12 v gojišču MGJ. Prikazana so povprečja \pm sd (n = 3). OD₆₅₀ merjenja po 24 urah.