

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko KRAJNC

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA
PRODUKCIJO ZUNAJCELIČNIH SIGNALNIH
MOLEKUL PRI NARAVNEM IZOLATU *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko KRAJNC

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA PRODUKCIJO
ZUNAJCELIČNIH SIGNALNIH MOLEKUL PRI NARAVNEM
IZOLATU *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PRODUCTION
OF EXTRACELLULAR SIGNALLING MOLECULES IN A
NATURAL ISOLATE *Vibrio* sp.**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. V njem opisane raziskave in poskusi so bili opravljeni na Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije BF je dne 13.05.2010 sprejela temo in za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorico dr. Tjašo Danevčič in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentorica: dr. Tjaša Danevčič

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko Krajnc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.222 + 579.266: 579.843 (043) = 163.6
KG	<i>Vibrio</i> sp./komunikacija med celicami/ zaznavanje celične gostote/ signalne molekule/ okoljski dejavniki/ izrabljeno gojišče/ poročevalski sevi/ detekcija signalnih molekul/ avtoinduktorji/ N-acil homoserin lakton/ AI-2/ bioluminiscenca
AV	KRAJNC, Marko
SA	STOPAR, David (mentor) / DANEVČIČ, Tjaša (somentorica) / ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA PRODUKCIJO ZUNAJCELIČNIH SIGNALNIH MOLEKUL PRI NARAVNEM IZOLATU <i>Vibrio</i> sp.
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 39 str., 2 pregl., 15 sl., 4 pril., 52 vir.
IJ	Sl
JI	Sl/en
AI	V diplomskem delu smo pokazali, da temperatura vpliva na produkcijo signalnih molekul. Za detekcijo in karakterizacijo signalnih molekul smo le-te ekstrahirali s pomočjo kislega etil acetata iz izrabljenih gojišč PKS in AB kulture divjega tipa <i>Vibrio</i> sp. Tip AHL signalnih molekul, ki jih v gojišče izloča bakterija, smo določili z uporabo TLC in poročevalskega seva <i>E. coli</i> JM109 (pSB401). Za detekcijo AI-2 smo uporabili biološki test s poročevalskim sevom <i>Vibrio harveyi</i> BB170. Ugotovili smo, da naravni izolat <i>Vibrio</i> sp. proizvaja le en tip AHL molekul, najverjetneje 3-okso-heksanoil-L-homoserin lakton. Metoda direktne kvantifikacije AHL molekul s poročevalskim sevom <i>E. coli</i> JM109 se v našem primeru ni izkazala za primerno. Dokazali smo vpliv temperature na produkcijo AI-2 signalnih molekul pri divjem sevu <i>Vibrio</i> sp.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.222 + 579.266: 579.843 (043)= 163.6
CX	<i>Vibrio</i> sp./ cell-to-cell communication/ quorum sensing/ signal molecules/ environmental factors/ spent media/ reporter strains / detection of signalling molecules/ autoinducers/ N-acyl homoserine lactone/ AI-2/ bioluminescence
AU	KRAJNC, Marko
AA	STOPAR, David (supervisor) / DANEVČIČ, Tjaša (co-advisor) / ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2011
TI	INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PRODUCTION OF EXTRACELLULAR SIGNALLING MOLECULES IN A NATURAL ISOLATE <i>Vibrio</i> sp.
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 39 p., 2 tab., 15 fig., 4 ann., 52 ref.
LA	Sl
AL	Sl/en
AB	In this study, the effect of temperature on signal production in <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 was studied. Signal molecules isolated from the spent media of the wild type strain <i>Vibrio</i> sp. grown in PKS and AB medium were extracted with acidified ethyl acetate. AHL molecules present in spent media were determined with TLC and biosensor strain <i>E. coli</i> JM109 pSB401. For detection of AI-2 molecules we used bioassay with <i>Vibrio harveyi</i> BB170 as a biosensor strain. The results indicate that <i>Vibrio</i> sp. produces just one type of AHL molecules, likely 3-oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone. Method for direct quantification of AHL molecules with <i>E. coli</i> JM109 as a reporter strain proved to be unsuitable for our study. It also produces AI-2 signal molecule, the production is temperature dependent.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 KOMUNIKACIJA PRI GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJAH.....	4
2.1.1 Model sistema za zaznavanje celične gostote pri bakteriji <i>Vibrio harveyi</i>	5
2.1.2 AHL sistem (sistem 1).....	7
2.1.2.1 Detekcija AHL molekul v laboratoriju.....	7
2.1.2.2 Problemi pri določanju AHL molekul z uporabo bioloških testov.....	9
2.1.3 AI-2 sistem (sistem 2)	10
2.1.3.1 Detekcija AI-2 molekul v laboratoriju	10
2.1.3.2 Problemi pri določanju AI-2 molekul z uporabo bioloških testov	11
2.2 REGULACIJA QS SISTEMA	12
2.2.1 Vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo AHL molekul.....	12
2.2.2 Vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo AI-2 molekul	12
2.3 NARAVNI IZOLAT <i>Vibrio</i> sp. DSM14379	13
3 MATERIALI IN METODE DELA.....	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Kemikalije	14
3.1.2 Gojišča in raztopine.....	15
3.1.2.1 Gojišče PKS	15
3.1.2.2 Gojišče AB	15
3.1.2.3 Gojišče LB	15
3.1.2.4 Raztopine	15
3.1.3 Sevi	16
3.2 METODE	16
3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur	16
3.2.2 Priprava izrabljenega gojišča	18
3.2.3 Ekstrakcija in vrednotenje pigmenta pri rožnati mutanti <i>Vibrio</i> sp.	18
3.2.4 Izolacija signalnih molekul iz izrabljenih gojišč kulture divjega tipa <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, zraslega pri različnih temperaturah	19

3.2.5 Detekcija acil homoserin laktinskih signalnih molekul v ekstraktih signalnih molekul s TLC in poročevalskim sevom <i>E. coli</i> JM109/pSB401	19
3.2.6 Direktna kvantifikacija acil homoserin laktinskih signalnih molekul v izrabiljenem gojišču s poročevalskim sevom <i>E. coli</i> JM109/pSB401	20
3.2.7 Detekcija prisotnosti signalnih molekul tipa AI-2 v izrabiljenih gojiščih s poročevalskim sevom <i>Vibrio harveyi</i> BB170.....	21
4 REZULTATI.....	23
4.1 VPLIV IZRABLJENEGA GOJIŠČA DIVJEGA TIPA NA PIGMENTACIJO IN RAST PRI ROŽNATI MUTANTI <i>Vibrio</i> sp.....	23
4.1.1 Vpliva izrabiljenega gojišča divjega tipa na pigmentacijo pri rožnati mutanti	23
4.1.2 Vpliva izrabiljenega gojišča divjega tipa na rast rožnate mutante	24
4.2 DETEKCIJA AHL SIGNALNIH MOLEKUL	24
4.2.1 Karakterizacija AHL signalnih molekul	25
4.3 KVANTIFIKACIJA AHL SIGNALNIH MOLEKUL	26
4.4 DETEKCIJA AI-2 SIGNALNIH MOLEKUL.....	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	32
5.1 DETEKCIJA AHL SIGNALNIH MOLEKUL	33
5.2 DETEKCIJA AI-2 SIGNALNIH MOLEKUL.....	34
5.3 SKLEPI.....	34
6 POVZETEK	35
7 VIRI	36
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Model sistema za zaznavanje celične gostote pri bakteriji <i>Vibrio harveyi</i> (Milton, 2006:63).....	6
Slika 2: Konstrukcija in uporaba AHL bakterijskega poročevalskega seva (Steindler in Venturi, 2007:2).	9
Slika 3: Producija bioluminiscence pri testu s poročevalskim sevom <i>Vibrio harveyi</i> BB170 (Taga, 2005: 1c.1.4).	11
Slika 4: Stopnja pigmentacije pri rožnati mutanti bakterije <i>Vibrio</i> sp. v gojišču PKS pri 28 °C z dodatkom izrabljenega gojišča divjega tipa bakterije <i>Vibrio</i> sp.....	23
Slika 5: Rast rožnate mutante bakterije <i>Vibrio</i> sp. ob dodatku izrabljenih gojišč (1:1), pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja divjega seva <i>Vibrio</i> sp., pri 28 °C preko noči (16 ur) v gojišču PKS	24
Slika 6: TLC plošči z nanešenimi 200-krat koncentriranimi ekstakti izrabljenih gojišč kultur divjega seva <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki smo jih gojili v gojišču PKS (A) in AB (B) pri različnih temperaturah.....	25
Slika 7: TLC plošča z različnimi tipi AHL molekul in koncentratom <i>Vibrio</i> sp.....	26
Slika 8: Umeritvena krivulja za OHHL v gojišču PKS v koncentracijskem območju 1,52 nm do 1,56 µm.....	27
Slika 9: Umeritvena krivulja za OHHL v gojišču AB v koncentracijskem območju od 1,52 nm do 1,56 µm.....	27
Slika 10: Normaliziran vrh bioluminiscence poročevalskega seva <i>E. coli</i> JM109/pSB401 pri različnih koncentracijah OHHL v gojišču PKS in AB po 3,5 urah inkubacije pri 37 °C	28
Slika 11: Normaliziran vrh bioluminiscence poročevalskega seva <i>E. coli</i> JM109/pSB401 pri gojišču PKS in AB v koncentracijskem območju 1,52 - 12,2 nm po 3,5 urah inkubacije pri 37°C	28
Slika 12: Bioluminiscanca poročevalskega seva <i>E. coli</i> JM109/pSB401 po času inkubacije pri 37 °C v gojišču PKS ob dodatku izrabljenih gojišč kultur divjega tipa <i>Vibrio</i> sp., pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja v istem gojišču	29

Slika 13: Bioluminiscanca poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 po času inkubacije pri 37 °C v gojišču AB ob dodatku izrabljenih gojišč kultur divjega tipa *Vibrio* sp., pridobjenih pri različnih temperaturah gojenja v istem gojišču 29

Slika 14: Bioluminiscanca pri poročevalskem sevu *Vibrio harveyi* BB170 ob dodatku izrabljenih gojišč PKS po času inkubacije pri 28 °C..... 30

Slika 15: Bioluminiscanca pri poročevalskem sevu *Vibrio harveyi* BB170 ob dodatku izrabljenih gojišč AB po času inkubacije pri 28 °C 31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bakterijski sevi in plazmidi uporabljeni v diplomskem delu 16

Preglednica 2: Izračun indukcije bioluminiscence (IB) ob času inkubacije 4,5 ur za preiskovane vzorce 30

KAZALO PRILOG

Priloga A: Primer VIS absorpcijskega spektra ekstrakta pigmenta v acetonu (pH 7), izoliranega iz celic rožnate mutante *Vibrio* sp. DSM 14379, ki so rasle v gojišču PKS pri 28 °C.

Priloga B: Količina pigmenta na gram suhe celične mase prekonočne kulture divjega tipa *Vibrio* sp. DSM14379 gojene v gojišču AB pri petih različnih temperaturah inkubacije.

Priloga C: TLC plošči z različnimi tipi AHL molekul.

Priloga D: Vpliv dodatka IG na bioluminiscenco pri poročevalskem sevu bakterije *E. coli* JM109.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AB	autoinducer bioassay broth
AHL	N-acil homoserin lakton
AI-1	avtoinduktor-1 (maščobno-kislinski derivati N-acilhomoserin laktonov)
AI-2	avtoinduktor-2 (metil-2,3,3,4-tetrahidroksitetrahidofuran)
dH ₂ O	destilirana voda
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
BHL	N-butanoil-DL-homoserin lakton
HHL	N-heksanoil-DL-homoserin lakton
IG	izrabljeno gojišče
IB	indukcija bioluminiscence
Kn	kanamicin
LB	Luria-Bertani broth
LuxI	AHL sintaza
LuxR	AHL receptor
mutanta R	rahlo rožnata mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379
MQ voda	deionizirana voda s sistemom MiliQ (Millipore)
M _w	molekulska masa
OD ₆₅₀	optična gostota izmerjena pri 650 nm valovne dolžine
OHHL	3-okso-heksanoil-L-homoserin lakton
OOHL	3-okso-oktanoil-DL-homoserin lakton
OTP	optimalna časovna točka (ang. <i>optimal time point</i>)
PKS	pepton-kvasni ekstrakt
pig	pigment
SmaIR	homologa LuxI in LuxR pri bakteriji <i>Serratia</i>
s.s.	suha snov
Tc	tetraciklin
TLC	tankoplastna kromatografija
VIS	vidni spekter
V/V	volumsko-volumski delež
w/V	utežno-volumski delež
wt	divji tip
QS	zaznavanje celične gostote oziroma kvoruma

1 UVOD

Da lahko bakterijske vrste učinkovito funkcirajo znotraj različnih okolij, so razvile zelo dovršene načine zaznavanja lokalnega okolja in prilagajanja na spremembe v okolju. Bakterijske populacije koordinirajo izražanje genov s pomočjo produkcije in zaznavanja različnih znotraj- in zunajceličnih signalov imenovanih "avtoinduktorji" (AI). Proces uskljenega izražanja genov preko produkcije, sproščanja in zaznavanja AI molekul pri bakterijah je bolj znan kot *quorum sensing*, - v nadaljevanju QS, (Fuqua in sod., 1994). V zadnjem desetletju so raziskovalci prišli do številnih novih dognanj o različnih QS sistemih, tipih AI molekul, genih reguliranih preko QS in njihovi ekofiziološki vlogi. Signalne molekule so razvrstili v štiri velike skupine (Pillai in Jesudhasan, 2006):

- avtoinduktor-1 (AI-1): maščobno-kislinski derivati N-acilhomoserin laktonov (AHL), ki jih najdemo pri po Gramu negativnih bakterijah in služijo za sporazumevanje med celicami iste vrste,
- avtoinduktor-2 (AI-2): družina molekul furanozil borat diestrov (Chen in sod., 2002), ki jih najdemo tako pri po Gramu negativnih kot po Gramu pozitivnih bakterijah. Služijo ne le za medcelično komuniciranje znotraj vrste, temveč tudi za sporazumevanje med celicami različnih vrst (Surette in sod., 1999),
- avtoinduktor-3 (AI-3): AI s trenutno neznano strukturo, ki je udeležen pri navzkrižnem sporazumevanju med bakterijo *E.coli* O157:H7 in gostiteljsko epinefrinsko celico (Kendall in sod., 2007),
- peptidi in kratkoverižne aminokisline uporabljene pri po Gramu pozitivnih bakterijah kot je *Bacillus subtilis* (Sperandio in sod., 2003).

Rezultati raziskav na področju regulacije produkcije signalnih molekul vse bolj jasno nakazujejo na to, da ni le celična gostota tista, ki vpliva na njihovo produkcijo, ampak tudi pogoji v okolju (prisotnost specifičnih hranil, temperatura, osmolarnost, pH) (Surette in sod., 1998; Cloak in sod., 2002; Yates in sod., 2002; Medina-Martínez in sod., 2006; Latour in sod., 2007). Pokazali so, da ima signaliziranje pomembno vlogo pri fenotipskih značilnostih bakterijskih populacij (Davies in sod., 1998). Nedavni rezultati kažejo na to, da je tudi sinteza rdečega pigmenta pri *Vibrio* sp. regulirana preko zaznavanja celične gostote (Štraser, 2008) in da okoljski dejavnik, kot je slanost, vpliva na produkcijo AHL signalnih molekul pri tem naravnem izolatu (Drčar, 2010). V diplomski nalogi želimo pokazati, da dejavniki okolja, kot sta temperatura in slanost, vplivajo na produkcijo rdečega pigmenta tudi preko regulacije produkcije signalnih molekul.

1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA

Namen diplomskega dela je preveriti prisotnost QS signalnih molekul AHL in AI-2 signalnega sistema pri modelnem sistemu *Vibrio* sp. DSM14379 in raziskati vpliv temperature inkubacije na sintezo signalnih molekul pri omenjeni bakteriji. V nalogi želimo obenem preveriti tudi ustreznost izbranih bioloških metod za detekcijo in kvantifikacijo signalnih molekul pri naravnem izolatu *Vibrio* sp. DSM14379. V ta namen bomo:

- določili vpliv dodatka izrabljenega gojišča kulture divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379, ki smo jo gojili pri petih različnih temperaturah preko noči v gojišču PKS, na produkcijo rdečega pigmenta pri nepigmentirani mutanti seva *Vibrio* sp.,
- izolirali signalne molekule divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 z ekstrakcijo le-teh iz izrabljenih gojišč (IG),
- poskušali dokazati prisotnost in ugotoviti tip ter količino AHL molekul, ki se pojavljajo v posameznih izrabljenih gojišč, pridobljenih pri gojenju divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS in AB ob različnih temperaturah inkubacije, s pomočjo ustrezne poročevalskega seva,
- preverili morebitno prisotnost AI-2 signalnih molekul v preučevanih izrabljenih gojiščih s pomočjo ustrezne poročevalskega seva.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- dodatek izrabljenega gojišča divjega seva *Vibrio* sp. DSM14379 poveča produkcijo rdečega pigmenta pri rožnati mutanti. Opazno povečanje produkcije pigmenta pričakujemo ob dodatku izrabljenega gojišča, pridobljenega pri optimalni temperaturi za rast bakterije *Vibrio* sp. (28°C),
- prisotnost AHL signalnih molekul pričakujemo predvsem v izrabljenih gojiščih, pridobljenih pri optimalni temperaturi za rast (28°C), in sicer v gojiščih PKS in AB ob dovolj koncentriranih ekstraktih. Koncentracije se bodo gibale v nM koncentracijskem rangu,

- pričakujemo prisotnost AI-2 signalnih molekul v izrabljenem gojišču kulture *Vibrio* sp. DSM14379, inkubirane pri optimalnih pogojih za rast ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$) v gojiščih PKS in AB.

2 PREGLED OBJAV

Mikroorganizmi so nenehno izpostavljeni številnim dražljajem iz okolja, kot so spremembe v temperaturi, osmolarnosti, pH-ju ali dostopnosti hrani. Kot odgovor na te spremembe so bakterije razvile številne sisteme, ki omogočajo prilagoditve na okoljska nihanja. Dvokomponentni regulacijski sistemi mikroorganizmom omogočajo zaznavanje in odzivanje na številne okoljske dejavnike z aktivacijo oz. represijo specifičnih tarčnih genov. To je le eden izmed mnogih mehanizmov prilagajanja. Sledilo je odkritje obstoja višega nivoja mikrobnega zaznavanja in odzivanja v obliki medcelične komunikacije s pomočjo majhnih signalnih molekul. Sprva so menili, da se ta proces pojavlja le pri nekaterih vrstah (npr. *Vibrio fischeri*, *Streptococcus pneumoniae*). Dandanes ima zelo velik delež mikroorganizmov sposobnost zaznavanja in odzivanja na prisotnost sosednjih mikrobnih populacij.

Za številne difuzibilne molekule z nizko molekulsko maso, ki se proizvajajo med bakterijsko rastjo, so sprva menili, da gre za odpadni produkt oz. produkt detoksifikacije. Študije v preteklih nekaj letih so pokazale, da nekatere izmed izločenih molekul lahko služijo kot signalne molekule ali avtoinduktorji, ko njihove koncentracije dosežejo prag kritične koncentracije. Definirali so številne sisteme povezane z zaznavanjem signalnih molekul, in večina sodi med oblike regulacije, ki jo poznamo kot zaznavanje celične gostote oziroma *quorum sensing* (QS). Ta proces avtoindukcije nikakor ne smemo zamenjevati z avtoregulacijo oz. avtorepresijo. Proses temelji na produkciji signalnih molekul z nizko molekularno maso, katerih koncentracija zunaj celice je povezana z gostoto populacije proizvajajočega organizma. Sosednje celice lahko zaznavajo te molekule in to omogoča celotni populaciji, da sproži usklajen odziv, ko koncentracija signalnih molekul preseže kritično mejo (Fuqua in sod., 1994).

V diplomskem delu bomo kot modelni organizem uporabljali naravni izolat iz rodu *Vibrio*, zato se bomo posvetili le medceličnim signalnim sistemom, značilnim za po Gramu negativne bakterije. Poudarek je predvsem na sistemih, ki uporabljajo N-acil homoserin laktone (AHL) in avtoinduktorje tipa 2 (AI-2) kot signalne molekule za uravnavanje izražanja različnih fizioloških funkcij.

2.1 KOMUNIKACIJA PRI PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJAH

Medcelično komuniciranje uravnava pomembne mikrobne procese, kot so rast, sporulacija, produkcija toksinov, virulenza, sinteza antibiotikov, gibanje, kolonizacij, ipd. Način odzivanja, imenovan *quorum sensing*, bakterijam poveča zmožnost preživetja v okolju z nenehno spremenjajočimi se pogoji. Bakterije so sposobne zaznati nenaden porast gostote populacije in se nanj koordinirano odzvati s spremembo izražanja določenih genov. Ta poseben tip regulacije s pomočjo zaznavanja celične gostote (QS) vključuje

nizkomolekularne signalne molekule, ki enostavno prehajajo skozi celico v medij in obratno.

Najbolje preučeni QS sistemi pri po Gramu negativnih bakterijah zajemajo N-acil homoserin laktone (AHL). Z večanjem gostote bakterijske populacije prihaja do kopiranja AHL molekul in ko le-te dosežejo kritično koncentracijo sledi interakcija molekul z ustreznim receptorskim proteinom. Kompleks receptorski protein-AHL se veže na promotorsko regijo tarčnega gena, kar omogoča modulacijo genskega izražanja in ponavadi njihovo aktivacijo.

QS je prvič opazil Nealson s sodelavci (1970) pri morskih bakterijah *Vibrio harveyi* in *Vibrio fischeri*. Nato so sledile številne študije bakterijske komunikacije in predvidevajo, da naj bi QS sistemi predstavljeni globalni regulator bakterijskega genskega izražanja. Ker so ti sistemi ključni tudi pri razvoju bakterijske virulence, predstavlja danes iskanje inhibitorjev QS regulacije potencialno novo strategijo obrambe pred bakterijskimi infekcijami in napoveduje novo generacijo protimikrobnih agensov, uporabnih na številnih področjih.

2.1.1 Model sistema za zaznavanje celične gostote pri bakteriji *Vibrio harveyi*

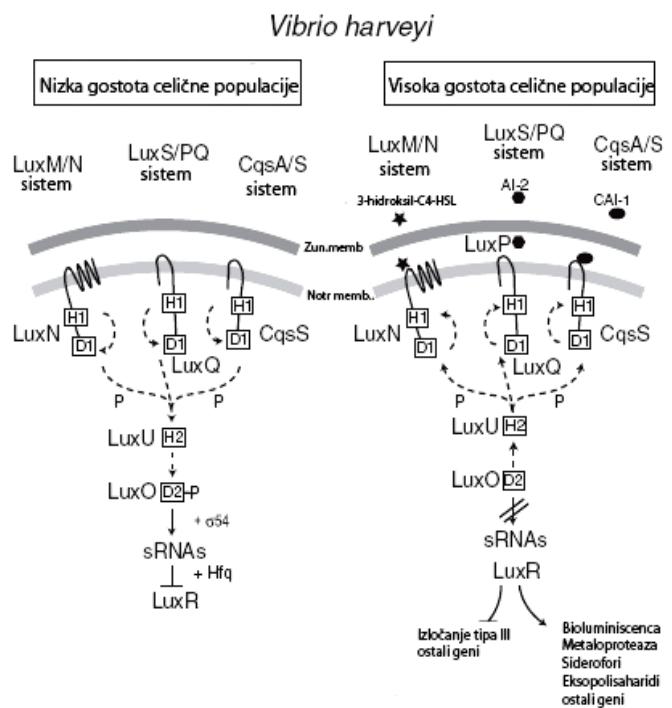
Pri bakteriji *V. harveyi* obstajajo trije tipi signalnih sistemov odvisnih od celične gostote, ki regulirajo bioluminiscenco, produkcijo eksopolisaharidov, sideroforov in metaloproteaz ter zavirajo sistem izločanja tipa III. Sestavljeni so iz specifičnega senzorja in signalne molekule, imenovane avtoinduktor (AI) (Milton, 2006).

Tipi signalnih sistemov pri bakteriji *Vibrio harveyi*:

- signalni sistem 1: LuxM/N sistem (AHL sistem) je visoko vrstno specifičen in je sestavljen iz senzorja 1 in avtoinduktorja-1 (AI-1) iz družine homoserin lakton podobnih molekul – AHL. LuxM protein sintetizira N-(3-hidroksibutanoil)-L-homoserin laktone, medtem ko LuxN predstavlja receptor kamor se le-ti vežejo (Cao in Meighen, 1989),
- signalni sistem 2: LuxS/PQ sistem (AI-2 sistem) je manj vrstno specifičen, zanj se domneva, da naj bi imel pomembno vlogo pri medvrstnem komuniciranju. Ta sistem sestavlja senzor 2 (LuxQ) in avtoinduktor-2 (3A-methyl-5,6-dihydro-furo(2,3-D)(1,3,2)dioksaborole-2,2,6,6A-tetraol oz. AI-2), ki ga sintetizira LuxS protein. Seznam Gram negativnih bakterij, ki uporabljajo podoben QS mehanizem z enim izmed opisanih AI sistemov, narašča. LuxS gen, potreben za sintezo AI-2 oz. njegovi homologi, se pojavlja v številnih na novo preučevanih bakterijah (Sperandio in sod., 1999),
- signalni sistem 3: CqsA/S sistem je manj raziskan, vanj so vključene CAI-1 (cholerae autoinducer 1) signalne molekule, ki nastajajo s pomočjo CqsA proteina, in receptor CqsS. Struktura signalnih molekul CAI-1 je (S)-3-hidroksitridekan-4-on (Kelly, 2009).

Receptorji za 3-hidroksi-C₄-HSL, AI-2 in CAI-1 po strukturi spominjajo na proteine, ki so vključeni v dvokomponentni regulatorni sistem. Vsak sistem vsebuje histidin kinazo in odzivno regulatorno domeno, vendar brez DNA-vezavne domene. Pri nizkih gostotah celične populacije, med odsotnostjo signalnih molekul, receptorji LuxN, LuxQ in CqsS usklajeno prenesejo fosfatno skupino z njihove odzivne regulatorne domene na fosfotransferazo LuxU. Fosfat se nato prenese na odzivno regulatorno domeno aktivatorja LuxO. Fosforiliran LuxO aktivira prepis vsaj dveh majhnih regulatornih RNK (sRNK), ki skupaj z RNK šaperonom Hfq destabilizira mRNK, ki kodira glavni regulator, LuxR.

Pri visokih gostotah celične populacije se signalne molekule, ki jih proizvajajo LuxM, LuxS in CqsA, kopičijo in se vežejo na pripadajoč receptor. 3-hidroksil-C₄ HSL in CAI-1 se neposredno vežeta na LuxN in CqsS, medtem ko se AI-2 veže na LuxQ s pomočjo periplazemskega proteina LuxP. Ob vezavi signalnih molekul na omenjene receptorje, le-ti začnejo delovati kot fosfataze in omogočijo defosforilacijo LuxO ter njegovo inaktivacijo. Ob tem ne prihaja več do prepisa sRNK molekul, *luxR* mRNA ostane stabilna in se lahko izrazi. LuxR inducira bioluminiscenco in produkcijo eksopolisaharidov, sideroforov in metaloproteaz ter zavira sistem izločanja tipa III (Freeman in Bassler, 1999; Freeman, 2000; Henke in Bassler, 2004).



Slika 1: Model sistema za zaznavanje celične gostote pri bakteriji *Vibrio harveyi* (Milton, 2006:63)

Omenjeni tipi signalnih molekul so strukturno različni, vendar so sinergistično vključeni v regulacijo izražanja genov, ne le pri *Vibrio harveyi*, ampak tudi pri ostalih bakterijskih vrstah. V nadaljevanju sta podrobnejše predstavljena le prva dva sistema, ki največkrat

nastopata kot predmet poglobljenih študij bakterijskega sporazumevanja pri po Gramu negativnih bakterijah.

2.1.2 AHL sistem (sistem 1)

AHL molekule nastajajo preko LuxI encimske aktivnosti in so sistemsko specifični, variirajo v dolžini acilne skupine (C₄-C₁₈), tipu substitucije na tretjem ogljiku (vodik/hidroksi/okso skupina), ter prisotnosti ene ali več dvojnih vezi med ogljiki v maščobno-kislinski verigi (npr. N-β ketokaproil-AHL). Na LuxR receptorske proteine se specifično vežejo le ustrezne AHL molekule. Receptorji se lahko odzivajo tudi na druge AHL molekule, vendar pri večjih koncentracijah (Parsek in Greenberg, 2000). Ta QS sistem se največkrat pojavlja pri po Gramu negativnih bakterijah in bakterijam omogoča komunikacijo na nivoju vrste.

Ugotovili so, da imajo AHL molekule igrajo pomembno vlogo pri po Gramu negativnih bakterijah, ki jih najdemo v pokvarjeni hrani. Preverili so produkcijo AHL molekul pri 146 sevih iz družine *Eubacteriaceae* izoliranih iz hrane. Vsi razen enega seva proizvajajo AHL molekule. Za uspešnost pridobljenih rezultatov so morali vzporedno uporabiti različne poročevalske sisteme. Pri večini sevov so ugotovili, da proizvajajo več kot en tip AHL molekul (Ravn in sod., 2001). Podobno študijo je objavil tudi Gram s sodelavci leta 1999. Signaliziranje preko AHL molekul je zelo pomembno tudi pri tvorbi biofilma pri nekaterih organizmih (Davies in sod., 1998).

Sistem celičnega zaznavanja regulira številne fenotipske odzive pri po Gramu negativni bakteriji *Serratia* sp. ATCC 39006, med drugim tudi biosintezo rdečega tripirolnega pigmenta, prodigiozina (2-metil-3-pentil-6-metoksiprodigiozin) (Harris, 2004). QS sistem pri *Serratia* sp. ATCC 39006 sestavlja protein SmaI, ki sintetizira C₄-HSL in represor transkripcije SmaR. SmaI/R je homolog LuxI/R sistema in je aktivator sekundarnih metabolitov pri bakteriji *Serratia* sp. protein SmaR inhibira prepis biosintetskega operona (*pigA-O*) za proizvodnjo prodigiozina ob odsotnosti C₄-HSL (ob nizki gostoti celične populacije). Proces se ob interakciji SmaR z C₄-HSL sprosti, ko celična gostota naraste (Thomson in sod., 2000). Pri študiji regulacije fenotipskega izražanja s QS sistemom so nedavne študije pokazale kompleksno regulatorno mrežo, ki vključuje številne okoljske dejavnike pri proizvodnji prodigiozina (Hariss, 2004; Fineran in sod., 2005). Takšna regulatorja sta PigX in PigZ. Mutacije teh regulatorjev povzročijo povečan prepis *pigA-O* biosintetskega operona, kar povzroči močno povečano pigmentacijo (Fineran, 2007).

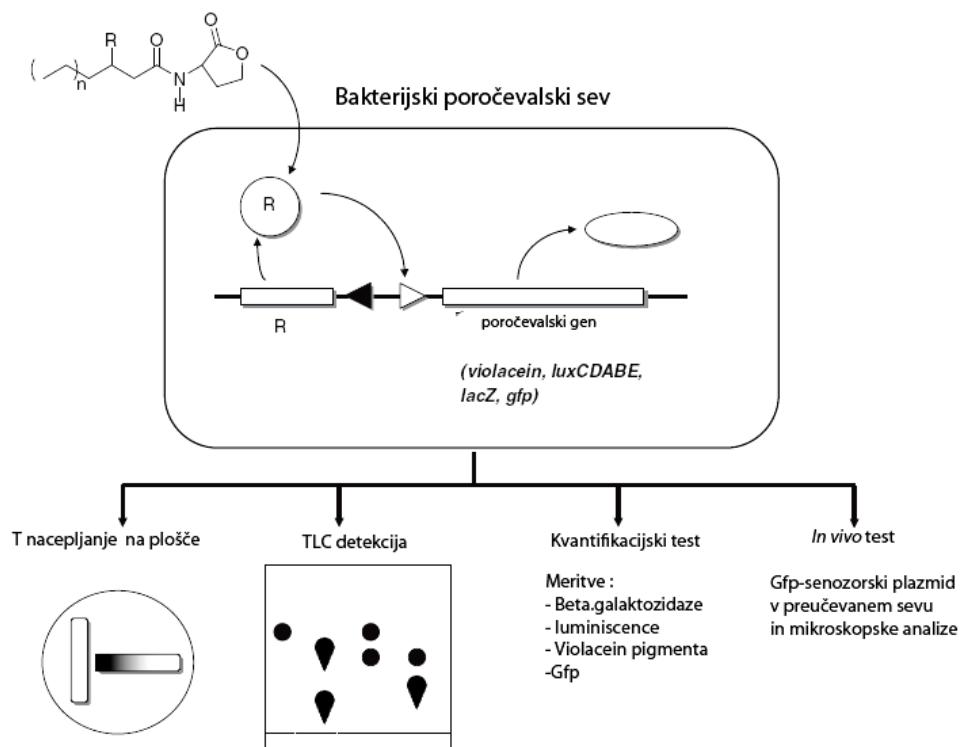
2.1.2.1 Detekcija AHL molekul v laboratoriju

Prisotnost AHL aktivnosti v filtratih bakterijskih kultur zaznavamo s pomočjo biološkega testa z uporabo specifičnih bakterijskih sevov. Glede na to, da obstaja velika raznolikost pri molekulah AHL, je težko izbrati idealni poročevalski sev. Za učinkovito karakterizacijo molekul AHL, prisotnih v preučevanih vzorcih, je večkrat potrebna vzporedna uporaba več

različnih bioloških zaznavnih sistemov (Ravn, 2001). Potrebno je poudariti, da ti biološki testi ne potrdijo prisotnosti posameznih molekul AHL, temveč le pokažejo na aktivnost značilno za primere, ko so prisotne molekul AHL e v okolju. V uporabi je več različnih poročevalskih sistemov za dokazovanje prisotnosti molekul AHL, ki se različno odzivajo na različne tipe molekul AHL.

- *Agrobacterium tumefaciens* NT1 s poročevalskim plazmidom pDCI41E33, ki vsebuje fuzijo *lacZ* gena s *traG* genom (regulira avtoindukcijo), je zelo občutljiv predvsem na 3-okso-substituirane AHL derivate z dolžino stranske verige od 4 do 12 C atomov. Slabše reagira na 3-nesubstituirane AHL molekule, medtem ko se na N-butanoil-L-homoserin lakton ne odziva. *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) zaznava AHL molekule s srednje in dolgočasno stransko acilno skupino (Shaw, 1997). Test z uporabo omenjenih poročevalskih sevov temelji na pojavu modrih con zaradi aktivnosti β-galaktozidaze.
- Poročevalski sev *Chromobacterium violaceum* CV026 je mini Tn5 mutanta divjega seva *C. violaceum* ATCC 31532, ki ne producira C₆-HSL molekul. Ob prisotnosti molekul AHL s stransko acilno skupino s 4 do 8 ogljikovimi atomi v okolini pride do inducirane produkcije pigmenta violaceina. Molekule AHL z daljšimi stranskimi acilnimi skupinami (C₁₀-C₁₄) inhibirajo produkcijo pigmenta (McClean in sod., 1997).
- Winson s sodelavci (1998) je za potrebe študije procesov uravnavanih s QS skonstruiral *luxCDABE* poročevalske plazmidne vektorje iz bakterije *Photobacterium luminescens*, ki se odzivajo na aktivacijo LuxR in njegovih homologov LasR ter RhlR ob prisotnosti različnih molekul AHL. Poročevalski sev *Escherichia coli* JM109 z vključenim plazmidom pSB401 vsebuje omenjeno gensko kaseto *luxCDABE* in reagira predvsem na C₆ ter C₈ AHL molekule z ali brez okso-substicij na tretjem C atomu. Prisotnost molekul AHL v vzorcu inducira bioluminiscenco pri tej bakteriji preko LuxR receptorja na površini celice (Winson, 1998). Omenjeni sev smo uporabili tudi v diplomskem delu za detekcijo in karakterizacijo molekul AHL v izrabljenih gojiščih in kasnejšo kvantifikacijo.
- Poulter s sodelavci (2010) je znanje na področju regulacije produkcije prodigiozina pri *Serratia* sp. ATCC 39006 uporabil pri konstrukciji enostavnega vizualizacijskega poročevalskega seva SP19, ki je specifičen za kratkoverižne AHL molekule. Povečal je občutljivost obstoječega poročevalskega seva *Serratia* sp. ATCC 39006 z vnosom dveh mutacij (*pigX* in *pigZ*), ki omogočata povečano produkcijo prodigiozina. Mutiran poročevalski sev SP 19 (*smaI*, *pigX*, *pigZ*) tako predstavlja poceni in občutljivo metodo za študije bakterijskega sporazumevanja s kratkoverižnimi AHL molekulami (C₄-HSL, C₆-HSL, 3-okso-C₆-HSL) kot v primeru vrst iz rodov *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia* in druge.

Poročevalski sevi se lahko uporablajo za vizualizacijo TLC plošč. Ploščo po razviju prelijemo s poročevalskim sevom z dodanim svežim gojiščem in inkubiramo preko noči (Shaw in sod., 1997; Gram in sod., 1999). Obstajajo tudi hitri preliminarni testi s katerimi preverjamo odzivnost poročevalskega seva na različne AHL molekule in testne kulture, kot so pravokotno nacepljanje na plošče ter difuzijska metoda v jamicah. Odziv poročevalskega seva nam lahko služi tudi pri kvantifikaciji AHL molekul, kjer zasledujemo intenziteto signala in na podlagi umeritvene krivulje določimo koncentracijo AHL molekul v preučevanem vzorcu.



Slika 2: Konstrukcija in uporaba AHL bakterijskega poročevalskega seva (Steindler in Venturi, 2007:2). Na sliki so prikazani različni pristopi analiz prisotnosti signalnih molekul z uporabo bakterijskega biosenzorja, kjer preko njihovega signala sklepamo o naravi signalnih molekul v preučevanih vzorcih.

2.1.2.2 Problemi pri določanju AHL molekul z uporabo bioloških testov

Negativni rezultat nakazuje na to, da preučevani bakterijski sev verjetno ne producira AHL molekul. Kljub temu ne moremo vedno z gotovostjo zaključiti, da odsotnost signala obenem pomeni, da preučevani sev ne producira AHL molekul. Razlogi so različni:

- bakterija lahko producira nove, še ne odkrite, AHL molekule, ki jih z obstoječimi poročevalskimi sevi ne moremo zaznati,
- bakterijski sev lahko proizvaja AHL molekule v zelo nizkih koncentracijah, ki so pod mejo zaznavanja uporabljenega biosenzorja,

- pojav bakteriostatskega efekta zaradi snovi, ki jih proizvaja in sprošča v okolje preučevani oz. poročevalski sev,
- snovi, prisotne v okolju, lahko vplivajo le na fenotipsko izražanje poročevalskih sevov, medtem ko na njihovo rast nimajo vpliva. Omenjeni pojav imenujemo *quenching* oziroma dušenje signala ''na račun'' prisotnih molekul, ki delujejo antagonistično.

Do pojava dušenja signala pride zaradi malenkostnih strukturnih variacij med podobnimi avtoinduktorji oziroma metaboliti, ki tekmujejo za vezavno mesto na površini in na ta način preprečijo fenotipsko izražanje poročevalskih bakterij. Antagonizem QS so v preteklosti opazovali le med ozko sorodnimi bakterijskimi vrstami. Inhibitorne lastnosti pri celičnem sporazumevanju kažejo tudi nekateri metaboliti, ki jih producirajo ostale nesorodne skupine mikroorganizmov. Teasedale in sodelavci (2009) so pokazali, da tudi sekundarni metaboliti po Gramu pozitivne morske bakterije *Halobacillus salinus* vplivajo na QS regulirane fenotipske odzive številnih po Gramu negativnih poročevalskih sevov. Ti netoksični metaboliti lahko delujejo kot antagonisti bakterijskega QS sistema, kjer tekmujejo za vezavno mesto receptorja z N-acil homoserin laktoni. Inhibirajo lahko bioluminiscenco pri bakteriji *Vibrio fischeri* BB120 ob kokultivaciji, produkcijo violaceina pri bakteriji *Chromobacterium violaceum* CV026 ter produkcijo zelenega fluorescenčnega proteina (GFP) pri bakteriji *Escherichia coli* JB525, medtem ko na samo rast nimajo vpliva (Teasedale in sod., 2009).

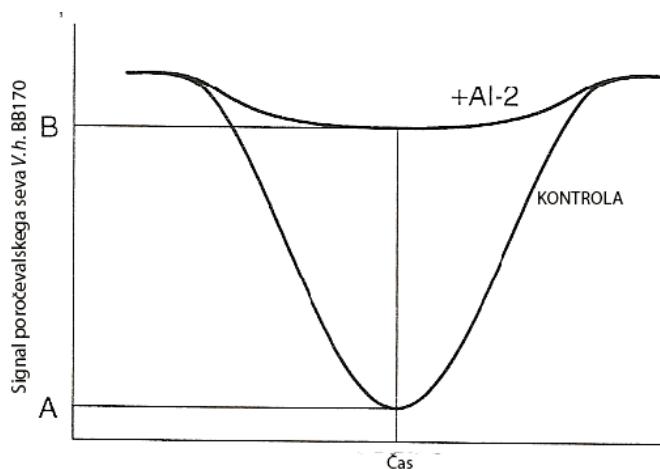
Feniletilamidi predstavljajo nov kemotip naravnih inhibitorjev QS sistemov. Fenilbutanoil-homoserin lakton inhibira vezavo OHHL pri bakterijah *E. coli* in *V. fischeri*, ki vsebujejo protein LuxR (Schaefer, 1996; Geske, 2008). 3-okso-C₁₂-(2-aminofenol) inhibira produkcijo GFP pri bakterijskem sevu *Pseudomonas aeruginosa* (Smith, 2003), kot tudi produkcijo TraR pri bakteriji *Agrobacterium tumefaciens* (Geske, 2007).

2.1.3 AI-2 sistem (sistem 2)

Poleg omenjenih AHL molekul so nedavno odkrili novo družino signalnih molekul, furanozil borat diester znano tudi kot AI-2. Za ta tip signalnih molekul se predvideva, da je poleg komunikacije na nivoju celica-celica znotraj vrste vpletен tudi v medvrstno sporazumevanje (Bassler in sod., 1997)

2.1.3.1 Detekcija AI-2 molekul v laboratoriju

Prisotnost AI-2 molekul v vzorcih lahko zaznamo s pomočjo poročevalskega seva bakterije *Vibrio harveyi*, ki ga je skonstruirala Bassler s sodelavci. Pri *V. harveyi* BB170 luxN::Tn5 je senzor za AI-1 (drugi avtoinduktor pri bakteriji *V. harveyi* tipa AHL) mutiran, zato ta sev proizvaja močno svetlobo le ob prisotnosti AI-2 molekul. Gen *luxS* (AI-2 sintaza) ostaja nespremenjen. Torej, ta sev proizvaja poleg ostalih avtoinduktorjev tudi AI-2 in ob višjih celičnih gostotah inducira produkcijo svetlobe (Bassler in sod., 1993).



Slika 3: Producija bioluminescence pri testu s poročevalskim sevom *Vibrio harveyi* BB170 (Taga, 2005: 1C.1.4).

Med odsotnostjo AI-2 molekul v okolini, bioluminiscenca ob pričetku testa pada (nekje 3-5 ur), nato ‚na račun‘ avtoindukcije lastnih AI-2 molekul prične postopoma naraščati (kontrola, slika 2). Če bodo AI-2 molekule že prisotne v vzorcu ob pričetku testa, bo do indukcije bioluminiscence prišlo že pred samoindukcijo (+AI-2, slika 2). Količina AI-2 molekul v preučevanih izrabljenih gojiščih se izračuna v točki, kjer prihaja do samoindukcije (navpična črta, slika 2). Ob koncu testa namreč vsi vzorci dosežejo maksimalno luminiscenco (Taga, 2005).

2.1.3.2 Problemi pri določanju AI-2 molekul z uporabo bioloških testov

Bassler in sodelavci so že leta 1993 uspeli pokazati, da glukoza s katabolno represijo vpliva na zmanjšanje bioluminiscence pri testu z bakterijo *V. harveyi* BB170. Supernatant celične kulture *V. harveyi* BB152, ki je služil za pozitivno kontrolo, so izpostavili različnim koncentracijam glukoze. Že pri 2 mM končni koncentraciji glukoze v izrabljenem gojišču je prišlo do popolne inhibicije produkcije svetlobe. Na drugi strani dodatek galaktoze ne povzroči nikakršne spremembe v produkciji svetlobe. Prisotnost laktata v izrabljenih gojiščih testiranih mlečnokislinskih bakterij povzroči upad pH vrednosti v testnih mešanicah in je posledično ovirana produkcija svetlobe. Zaradi tega pH preučevanih izrabljenih gojišč vedno nevtraliziramo preden dodamo *Vibrio* poročevalski sev (DeKeermaecker, 2003). Na rast in bioluminiscenco *V. harveyi* BB170 močno vplivajo elementi v sledovih. Predvsem dodatek Fe^{3+} v določenem koncentracijskem območju v mediju preinokuluma kulture izboljša ponovljivost in varianco testa. Ostali elementi v sledovih in vitaminji dodani neposredno v testno gojišče, povzročijo inhibitorni vpliv. Borat vpliva na zaznavanje AI-2 molekul in daje lažno pozitivne rezultate (Vilchez, 2006).

2.2 REGULACIJA QS SISTEMA

Rezultati raziskav na področju regulacije produkcije AI molekul vse bolj jasno nakazujejo na to, da ni le celična gostota tista, ki vpliva na produkcijo signalnih molekul, ampak tudi pogoji v okolju (prisotnost specifičnih hrаниl, temperatura, osmolarnost, pH).

2.2.1 Vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo AHL molekul

Podatki, ki jih je predstavil Yates s sodelavci (2002), kažejo, da lokalna temperatura in pH močno vplivata na stopnjo, pri kateri bakterija *Pseudomonas aeruginosa* doseže prag kritične koncentracije AHL molekul.

Padec nivoja AHL molekul ob povišanih temperaturah so zabeležili tudi pri bakteriji *Erwinia carotovora*, ki je lahko posledica treh različnih razlogov. Prvi je nestabilnost AHL molekul ob povišanih temperaturah, AHL sintaze so lahko temperaturno občutljive in tretji razlog je limitna koncentracija prekurzorjev AHL molekul (S-adenozil-metionin) (Hasegawa, 2005).

Tudi pri *in vitro* sintezi AHL molekul so pokazali, da je stimulirana pri nižjih temperaturah (Stevens, 1996). Ob preverjanju vplivov okoljskih dejavnikov (temperatura, koncentracije glukoze) na produkcijo N-butanoil-L-homoserin laktona pri bakteriji *Aeromonas hydrophila* so pokazali, da je njihova produkcija pri 22 °C in 30 °C po 24 urah inkubacije bistveno višja kot pri temperaturi 12 °C po 72 urah inkubacije, ko je populacija dosegla podobno celično gostoto. Pri temperaturi 37 °C niso zaznali produkcije signalnih molekul, kljub doseženi visoki gostoti celične populacije (Medina-Martínez in sod., 2006).

Podobno študijo so opravili tudi na psihrotolerantni bakteriji *Pectobacterium atrosepticum*, ki proizvaja štiri type AHL molekul v širokem temperaturnem območju. Bakterijska kultura je rasla pri 8 °C, 12 °C, 15 °C, 20 °C, 24 °C in 28 °C. Optimalno produkcijo AHL molekul so zaznali pri 24 °C, nekoliko manj pri 12 °C in 8 °C. Negativni vpliv se je pojavil pri 28 °C (Latour, 2007).

2.2.2 Vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo AI-2 molekul

Raziskava, ki sta jo opravila Surrete in Bassler (1998), je pokazala, da na produkcijo AI-2 pri bakteriji *Salmonella typhimurium* in *E. coli* ne vpliva le visoka celična gostota, temveč tudi rastni pogoji (temperatura, osmolarnost) in prisotnost glukoze ter ostalih preferenčnih virov ogljika v mediju. K indukciji produkcije AI-2 signalnih molekul pri bakteriji *S. typhimurium* prispevata tako prisotnost glukoze kot padec pH-ja. Prav tako rast na nekaterih ostalih ogljikovih hidratih (fruktoza, manoza, glukozamin, galaktoza in arabinosa) inducira produkcijo signalnih molekul. Povečana osmolarnosti in osmotski šok prav tako povečata produkcijo signalnih molekul. Povečanje aktivnosti AI-2 je lahko posledica sproščanja na novo sintetiziranih avtoinduktorjev že izdelanih avtonduktorjev, shranjenih znotraj celic, represije razgradnje ali katerakoli kombinacija naštetih aktivnosti.

Tako je pri bakteriji *S. typhimurium* težko določiti kdaj so celice proizvajalke AI in kdaj poteka razgradnja signalnih molekul. Oba procesa lahko nastopata istočasno. Pokazali so, da pri visoki osmolarnosti razgradnja signalnih molekul poteka v zelo majhnem obsegu (Surrente in Bassler, 1999).

Ko so preučevali produkcijo AI-2 pri bakterijah *Salmonella typhimurium* in *E. coli* O157:H7 v vzorcih živil (mleko, kokošja juha in Brucella broth) ter vpliv okolja (temperatura) in vlogo QS pri preživetju bakterij v matriksu hrani, so odkrili, da je največja produkcija AI-2 molekul pri vseh vzorcih pri 37 °C po 24 urah inkubacije. Pri 4 °C so zaznali minimalno oz. nikakršno AI-2 aktivnost pri bakterijah, ki so rasle v mleku in kokošji juhi (Cloak, 2002).

2.3 NARAVNI IZOLAT *Vibrio* sp. DSM14379

Vibrio sp. DSM14379 so izolirali iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka. Pri omenjenem naravnem izolatu je zanimiva predvsem produkcija rdečega pigmenta, ki je soroden že opisanim pigmentom iz družine prodigioninov (Bennett in Bentley, 2000; Williamson in sod., 2006). Gre za sekundarni metabolit, ki se najmočneje izraža v stacionarni fazi, njegova produkcija je v veliki meri odvisna od okoljskih dejavnikov (Starič in sod., 2010).

Vpliv okolja ni edini dejavnik, ki vpliva na produkcijo pigmenta, nedavni rezultati namreč kažejo, da je sinteza pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. regulirana tudi preko zaznavanja celične gostote oz. QS. Ugotovili so namreč, da se nepigmentirana mutanta R obarva v prisotnosti molekul, najverjetneje signalnih molekul, ki so prisotne v okolju divjega tipa. Molekule izločene v okolje pri gojenju divjega tipa *Vibrio* sp., inducirajo sintezo pigmenta pri rožnati mutanti za približno faktor 30 (Štrasser, 2008). Uspeli so tudi pokazati, da okoljski dejavnik kot je slanost vpliva na produkcijo AHL signalnih molekul in, da je le-ta najvišja pri 3% slanosti, kjer je tudi rast *Vibrio* sp. optimalna. Pri ekstremnih slanostih je produkcija signalnih molekul močno zmanjšana (Drčar, 2010).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

- aceton C_3H_6O $M_w= 58,08$ g/mol (Merck, Nemčija)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- deionizirana voda (MiliQ)
- destilirana voda
- dikalijev hidrogen sulfat K_2HPO_4 $M_w= 174,18$ g/mol (Merck, Nemčija)
- glicerol $C_3H_8O_3$ $M_w= 92,09$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- etil acetat CH_3CO_2 $M_w= 88,11$ g/mol (Merck, Nemčija)
- etanol 96 % (v/v) C_2H_5OH $M_w= 46,07$ g/mol (Merck, Nemčija)
- kalijev dihidrogen fosfat KH_2PO_4 $M_w= 136,09$ g/mol (Merck, Nemčija)
- kanamicin (založna koncentracija 50 mg/ml; SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- kazamino kisline (Becton Dickinson, ZDA)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- L-arginin $C_5H_{15}N_3O_2$ $M_w= 174,2$ g/mol (Merck, Nemčija)
- magnezijev klorid heksahidrat $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $M_w= 203,30$ g/mol (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $M_w= 246,48$ g/mol (Merck, Nemčija)
- metanol CH_3OH $M_w= 32,04$ g/mol (Merck, Nemčija)
- metanojska kislina CH_2O_2 $M_w= 43,03$ g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid $NaCl$ $M_w= 58,44$ g/mol (Merck, Nemčija)
- N-heksanoil-DL-homoserin lakton $C_{10}H_{17}NO_3$ $M_w= 199,25$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- N-oktanoil-DL-homoserin lakton $C_{12}H_{21}NO_3$ $M_w= 227,30$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- N-butiril-DL-homoserin lakton $C_8H_{13}NO_3$ $M_w= 171,19$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- N-dekanoil-DL-homoserin lakton $C_{14}H_{25}NO_3$ $M_w= 255,35$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- N-heptanoil-DL-homoserin lakton $C_{11}H_{19}NO_3$ $M_w= 213,27$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- N-(β -Ketokaproil)-L-homoserin lakton $C_{10}H_{15}NO_4$ $M_w= 213,23$ g/mol (SIGMA-ALDRICH, ZDA)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- tetraciklin (založna koncentracija 20 mg/ml; SIGMA-ALDRICH, USA)
- tripton (Biolife, Italija)
- TLC plošče- silika gel 60 RP 18 F_{254S} , 20 x 20 cm, (Merck, Nemčija)
- železov klorid heksahidrat $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ $M_w= 270,30$ g/mol (Merck, Nemčija)

3.1.2 Gojišča in raztopine

3.1.2.1 Gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt-sol)

Sestava gojišča je:

- 5 g peptokompleks,
- 1 g kvasni ekstrakt,
- g MgCl₂·6H₂O,
- 1000 ml destilirane vode.

Za 3 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo še 30 g NaCl

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

3.1.2.2 Gojišče AB (autoinducer bioassay medium)

Sestava gojišča je:

- g kazamino kislin,
- 12,3 g MgSO₄·7H₂O,
- do 970 ml destilirane vode.

Za 3 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo še 30 g NaCl.

Po avtoklaviranju smo dodali:

- 10 ml 1M K-fosfatni pufer (pH=7),
- 10 ml 0,1M L-arginin,
- 10 ml 50 % (V/V) glicerol.

3.1.2.3 Gojišče LB (Luria-Bertani broth)

Sestava gojišča je:

- 10 g tripton,
- 5 g kvasni ekstrakt,
- 10 g NaCl (za 1 % (w/V) NaCl v gojišču) oz. 30 g NaCl za 3 % (w/V).

Za trdna gojišča LB smo dodali 15 g agar-agar na 1 l gojišča, za agarizirano gojišče za prelitje TLC plošč 12 g agar-agar na 1 l gojišča.

Za LB Tc smo tik pred inokulacijo dodali tetraciklin ($c_{založna} = 20 \text{ mg/ml} \Rightarrow c_{končna} = 10 \mu\text{g/ml}$)

3.1.2.4 Raztopine

Priprava 10 mM raztopine standardov AHL signalnih molekul (založna koncentracija):

- N-heksanoil-DL-homoserin lakton (C₆-HSL): zatehtamo 1,99 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola,

- N-oktanoil-DL-homoserin lakton (C_8 -HSL): zatehtamo 2,28 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola,
- N-butiril-DL-homoserin lakton (C_4 -HSL): zatehtamo 1,71 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola,
- N-dekanoil-DL-homoserin lakton (C_{10} -HSL): zatehtamo 2,56 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola,
- N-heptanoil-DL-homoserin lakton (C_7 -HSL): zatehtamo 2,14 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola,
- N-(β -ketokaproil)-L-homoserin lakton (3-okso- C_6 -HSL): zatehtamo 2,13 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola.

Priprava 4,69 mM raztopine signalnih molekul 3-okso- C_6 -HSL: zatehtamo 1 mg, prenesemo v mikrocentrifugirko in raztopimo v 1 ml 96 % (V/V) etanola.

3.1.3 Sevi

Preglednica 1: Bakterijski sevi in plazmidi uporabljeni v diplomskem delu

Sev	Genotip	pomemben fenotip
<i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (<i>Vibrio</i> sp.)		divji tip naravnega izolata
<i>Vibrio</i> sp. DSM14379 - rahlo rožnata mutanta (mutanta R)		okvara produkcije rdečega pigmenta
<i>Escherichia coli</i> JM109 (<i>E. coli</i>)	pSB401 <i>luxRI::luxABCDE</i>	Tc ^r , (AHL poročevalski sev)
<i>Vibrio harveyi</i> BB120 (ATCC® BAA-1116)		Km ^r , AI-1 ⁺ ; AI-2 ⁺
<i>Vibrio harveyi</i> BB170 (ATCC® BAA-1117)	<i>luxN::Tn5</i>	Km ^r , AI-1 ⁺ ; AI-2 ⁺ , Senzor 1 ⁻ , Senzor 2 ⁺ (AI-2 poročevalski sev)
<i>Vibrio harveyi</i> BB152 (ATCC® BAA-1119)	<i>luxL::Tn5</i>	Km ^r , AI-1 ⁻ , AI-2 ⁺

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur

3.2.1.1 Gojenje bakterije *Vibrio* sp. za pripravo izrabljenih gojišč pri različnih temperaturah

Za pripravo izrabljenih gojišč divjega tipa *Vibrio* sp. DSM14379 smo najprej precepili kulturo *Vibrio* sp. iz trdnega gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl v tekoče gojišče (5 ml) PKS s 3 % (w/V) NaCl in inkubirali 8 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto in 28 °C v temi ter prisotnosti kisika. Nato smo kulturo v eksponentni fazи rasti precepili (1 % (V/V) inokulum) v 100 ml svežega gojišča v

erlenmajerici in inkubirali 16 ur na stresalniku pri 200 obratih na minuto pri petih različnih temperaturah: 15 °C, 20 °C, 28 °C, 37 °C, 43 °C. Opravili smo dve ponovitvi. Pri gojenju v tekočem gojišču AB 3 % (w/V) NaCl je bil postopek enak.

3.2.1.2 Gojenje rožnate mutante *Vibrio* sp. ob dodatku izrabljenih gojišč bakterije *Vibrio* sp. gojene pri različnih temperaturah

Kulturo rožnate mutante *Vibrio* sp. smo precepili iz trdnega gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl v tekoče gojišče (5 ml) PKS 3 % (w/V) NaCl in inkubirali 8 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto in 28 °C. V sveže gojišče PKS 3 % (w/V) NaCl (kontrola) oz. mešanico svežega gojišča in ustreznega izrabljenega gojišča bakterije *Vibrio* sp. (1:1, skupni volumen: 50 ml) smo inokulirali 1 % (V/V) kulture rožnate mutante v eksponentni fazi rasti. To smo inkubirali 16 ur na stresalniku pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Opravili smo tri ponovitve.

3.2.1.3 Gojenje kulture poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 za tankoplastno kromatografijo

Kulturo bakterije *E. coli* JM109 smo iz trdnega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl z dodatkom tetraciklina (založna koncentracija je 20 mg/ml; končna koncentracija 10 µg/ml) precepili v 5 ml tekočega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl Tc ter inkubirali pri 200 obratih na minuto pri 37 °C preko noči. V tekoče gojišče LB 1 % (w/V) NaCl Tc (50 ml) smo prenesli 2 % (V/V) inokuluma prekonočne kulture ter inkubirali pod enakimi pogoji.

3.2.1.4 Gojenje kulture poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 za kvantifikacijo AHL molekul v tekočem gojišču

Kulturo bakterije *E. coli* JM109 smo iz trdnega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl z dodatkom tetraciklina (založna koncentracija je 20 mg/ml; končna koncentracija 10 µg/ml) precepili v 5 ml tekočega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl Tc ter inkubirali pri 200 obratih na minuto pri 37 °C do eksponentne faze rasti (5-6 ur). Nato smo v 50 ml svežega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl brez dodanega tetraciklina inokulirali kulturo *E. coli* JM109 (1 % (V/V) inokuluma) ter inkubirali 16 ur pri 200 obratih na minuto pri 37 °C.

3.2.1.5 Gojenje kulture poročevalskega seva *Vibrio harveyi* BB170

Kulturo *Vibrio harveyi* BB170 smo precepili iz trdnega gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl v tekoče gojišče AB 3 % (w/V) NaCl (5 ml) z dodanim kanamicinom (založna koncentracija je 50 mg/ml; končna koncentracija 50 µg/ml). Gojili smo do eksponentne faze rasti (6-7 ur) na stresalniku pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Nato smo nacepili 1 % (V/V) inokuluma kulture *Vibrio harveyi* BB170 v sveže gojišče AB 3 % (w/V) NaCl z dodanim kanamicinom (20 ml). Sledila je 16 urna inkubacija na stresalniku pri 200 obratih na minuto pri 28 °C .

3.2.1.6 Gojenje bakterije *Vibrio harveyi* BB120 za pripravo izrabljenega gojišča in ekstrakta signalnih molekul

Postopek je enak kot je opisan v točki 3.2.1.1, le da je inkubacija potekala samo pri 28°C.

3.2.2 Priprava izrabljenega gojišča

Kulturo smo po končani inkubaciji sterilno prelili v centrifugirke (~50 ml) in centrifugirali 15 minut pri 13000 obratih na minuto pri 4 °C. Nato smo previdno prelili vsebino supernatanta v 50 ml brizge z nastavljenim sterilnim filtrom s porami premera 0,20 µm. Počasi ob ognju smo prefiltrirali vsebino v 50 ml sterilne centrifugirke ter filtrat shranili na -20 °C.

3.2.3 Ekstrakcija in vrednotenje pigmenta pri rožnati mutanti *Vibrio* sp.

3.2.3.1 Ekstrakcija pigmenta v acetonu

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1,5 ml bakterijske kulture in centrifugirali 10 minut pri 10000 obratih in 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Po centrifugiranju smo odlili supernatant ter pigment ekstrahirali z acetonom (Giri in sod., 2004) tako, da smo usedlino celic resuspendirali v enakem volumnu acetona. Ekstrakt v acetonu smo nato stresali 90 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Po stresanju smo ostanke celic odstranili s centrifugiranjem 15 minut pri 10000 obratih na minuto in 4 °C.

3.2.3.2 Določanje koncentracije pigmenta bakterije *Vibrio* sp. DSM14379

Iz vsakega vzorca smo po 300 µl ekstrakta pigmenta v acetonu v treh ponovitvah nanesli na mikrotitrsko ploščo ter izmerili absorpcijski spekter z optičnim čitalcem (Multiscan Spectrum, THERMO, Finska) pri valovnih dolžinah od 380-600 nm (koraki po 5 nm, ločljivost 2 nm). Za ničlitev smo uporabili čisto topilo - aceton. Dobljene spekture smo s programom OriginPro 8.0 integrirali (priloga A). S površine integriranega spektra smo s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo pigmenta v mg/l:

$$y = 2,924 \cdot x , \quad \dots(1)$$

kjer y predstavlja površino spektra pigmenta v acetonu (V=300 µl) med 380-600 nm in x, koncentracijo pigmenta v mg/l.

3.2.3.3 Vrednotenje suhe celične mase

Za določanje suhe celične mase smo odvzeli 40 ml kulture in centrifugirali 10 minut pri 13000 obratih na minuto pri 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili, celice resuspendirali v 40 ml sterilne MQ vode in ponovno centrifugirali pod enakimi pogojmi. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v nekaj

ml (cca. 5 ml) sterilne MQ vode. Suspenzijo smo previdno prenesli v predhodno stehtan tehtič (pred tehtanjem smo ga sušili na 105 °C 24 ur) in jo sušili na 105 °C 24 ur. Po končanem sušenju smo tehtič s suho celično maso ponovno stehtali. Iz razlike v masah smo izračunali suho celično maso.

3.2.4 Izolacija signalnih molekul iz izrabljenih gojišč kulture divjega tipa *Vibrio* sp. DSM14379, zraslega pri različnih temperaturah

3.2.4.1 Ekstrakcija signalnih molekul iz izrabljenih gojišč

Signalne molekule smo ekstrahirali iz 45 ml izrabljenega gojišča z dodatkom enakega volumna etil acetata z 0,5 % (V/V) metanojske kisline. Mešanico smo mešali trikrat po 30 sekund na mešalu, nato smo prenesli organsko (etilacetatno) fazo v novo stekleničko in izrabljenemu gojišču ponovno dodali 45 ml topila. Postopek smo ponovili trikrat. Na koncu smo združili vse tri frakcije etil acetata (~135 ml) in topilo izparevali z dušikom. Posušen ekstrakt smo 200-krat koncentrirali v 96 % (V/V) etanolu.

3.2.5 Detekcija acil homoserin laktonskih signalnih molekul v ekstraktih signalnih molekul s TLC in poročevalskim sevom *E. coli* JM109/pSB401

3.2.5.1 Tankoplastna kromatografija s poročevalskim sevom *E. coli* JM109/pSB401

Na TLC plošče 20x20 cm (silika gel 60 RP-18 F_{254S}) smo nanesli 100 µl 200-krat koncentriranih ekstraktov signalnih molekul (ekstrahiranih iz izrabljenih gojišč PKS in AB 3 % (w/V) NaCl pripravljenih pri petih različnih temperaturah inkubacije; 15 °C, 20 °C, 28 °C, 37 °C, 43 °C) in 2 µl 10 mM sintetičnih AHL molekul (C₆-HSL, C₈-HSL, C₄-HSL, C₁₀-HSL, C₇-HSL, 3-okso-C₆-HSL) v 96 % (V/V) etanolu. Razvijanje TLC kromatogramov je potekalo približno štiri ure pri sobni temperaturi z razvijalcem metanol/MQ voda (60:40 (V/V)). TLC plošče smo po razvijanju sušili vsaj 15 minut in jih sterilno prelili s termostatiranim agariziranim gojiščem s kulturo biosenzorja *E. coli* JM109/pSB401 (temperatura okoli 50 °C). Priprava le-tega je opisana v točki 3.2.5.2. Prelite TLC plošče smo inkubirali preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo plošče s poročevalskim sevom bakterije *E. coli* JM109 fotografirali z dokumentacijskim sistemom s CCD kamero visoke ločljivosti (G:BOX, Syngene, Velika Britanija) v temi s 30 minutnim zajemanjem signala. Dobljene podatke smo obdelali z računalniškim programom za zajem slik GeneSnap (Syngene, Velika Britanija).

3.2.5.2 Priprava agariziranega gojišča s kulturo poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401

Kulturo za TLC smo pripravili tako, da smo 50 ml kulture poročevalskega seva *E. coli* gojenega 24 ur pri optimalnih pogojih (glej točko 3.2.1.3) prelili v 100 ml termostatiranega

agariziranega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl z dodanim tetraciklinom (1,2 % (w/V) agar 50 °C). S tako pripravljeni raztopino smo prelili TLC ploščo.

3.2.6 Direktna kvantifikacija acil homoserin laktonskih signalnih molekul v izrabljjenem gojišču s poročevalskim sevom *E. coli* JM109/pSB401

3.2.6.1 Priprava kulture poročevalskega seva za kvantifikacijo AHL

Gojenje kulture *E. coli* JM109/pSB401 je opisano v točki 3.2.1.3. Po 16 urni inkubaciji smo kulturo redčili v razmerju 1:10 (10 ml kulture, 90 ml svežega gojišča LB 1 % (w/V) NaCl). Redčeno prekonočno kulturo smo nato dodajali k vzorcem na mikrotitrski plošči.

3.2.6.2 Priprava redčitvene vrste raztopine sintetičnih signalnih molekul OHHL za umeritveno krivuljo (v koncentracijskem območju 1,5 nM - 1,56 µM)

Redčitveno vrsto smo opravili v štirih ponovitvah z uporabo večkanalne pipete. V prve luknjice smo odpipetirali 195,75 µl gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl in nato dodali 4,25 µl sintetičnih signalnih molekul OHHL v koncentraciji 4,69 mM. Nato smo dobro premešali in prenesli 100 µl vsebine v naslednjo luknjico, kamor smo predhodno odpipetirali 100 µl gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl. Postopek smo ponovili šestkrat. Tako smo dobili raztopino sintetičnih signalnih molekul OHHL v koncentraciji 3,125 µM. Iz zadnjih luknjic smo prenesli 100 µl vsebine v prve luknjice nove plošče za nadaljnjo redčitev, ki smo jo vzporedno opravljali na dveh ločenih ploščah. Belo s prozornim dnom (μ CLEAR Plate, Greiner bio-one, Nemčija) smo uporabili za merjenje optične gostote, črno (96F non-treated black microwell plates, NUNC, Danska) za merjenje bioluminiscence. Predhodno smo v vse luknjice odpipetirali 100 µl gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl. Ponovno smo dobro premešali in prenesli 100 µl v naslednjo luknjico. Postopek smo ponovili vse do zadnje luknjice, kamor nismo dodali vsebine predhodne luknjice. V vse luknjice smo nato dodali 100 µl desetkrat redčene kulture poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 (v gojišču LB 1 % (w/V) NaCl). Tako smo dobili redčitveno vrsto v koncentracijskem območju od 1,5 nM do 1,56 µM.

Zgoraj opisani postopek smo ponovili za pripravo redčitvene vrste OHHL v gojišču AB 3 % (w/V) NaCl.

3.2.6.3 Priprava različnih variant dodatkov z in brez dodanega sintetičnega OHHL

Delali smo na dveh ločenih ploščah. Belo s prozornim dnom (μ CLEAR Plate, Greiner bio-one, Nemčija) smo uporabili za merjenje optične gostote, črno (96F non-treated black microwell plates, NUNC, Danska) za merjenje bioluminiscence. Vzorce smo nanašali v štirih ponovitvah. Po vrsti smo odpipetirali po 100 µl izrabljjenega gojišča PKS 3 % (w/V) NaCl pridobljenega pri 15 °C, nato 20 °C, 28 °C, 37 °C in 43 °C. To smo ponovili še za izrabljena gojišča AB 3 % (w/V) NaCl. Na konec plošče smo kot negativno kontrolo

dodali enako količino svežega gojišča PKS oz. AB 3 % (w/V) NaCl. Vsem vzorcem smo nato dodali 100 µl kulture poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401. Postopek smo ponovili na preostalih vzorcih, le da smo dodali še sintetični OHHL v končni koncentraciji 1,56 µM.

3.2.6.4 Vrednotenje bioluminiscence in optične gostote vzorcev v mikrotitrskih ploščah

Tako po dodatku kulture poročevalskega seva smo pomerili bioluminiscenco in optično gostoto (OD_{650}) vzorcev (čas 0) s čitalcem TECAN Safire II, Švica. Nato smo postopek ponavljali 30 minut. Vmes smo plošče inkubirali pri 37 °C brez stresanja oziroma mešanja. Podatke za bioluminiscenco smo sproti vnašali v graf in spremljali kdaj bo prišlo do uklona ter takrat prekinili merjenje. Rezultate smo predstavili kot bioluminiscenco normirano na optično gostoto v odvisnosti od časa. Vrednosti v času, kjer je bil vrh bioluminiscence pri večini vzorcev, tako imenovano optimalno časovno točko (OTP), smo uporabili pri določanju korelacije med normirano bioluminiscenco in koncentracijo sintetičnega OHHL. Z linearno aproksimacijo smo določili enačbo premice in korelačijski faktor. Na podlagi te enačbe smo kasneje določili koncentracijo OHHL v naših vzorcih. Problem navzkrižne kontaminacije pri merjenju proizvedene svetlobe poročevalskega seva smo delno rešili z uporabo črne mikrotitrsko plošče.

3.2.7 Detekcija signalnih molekul tipa AI-2 v izrabljenih gojiščih s poročevalskim sevom *Vibrio harveyi* BB170

3.2.7.1 Priprava kulture poročevalskega seva bakterije *Vibrio harveyi* BB170 za določanje signalnih molekul tipa AI-2.

Kulturo poročevalskega seva smo gojili, kot je omenjeno v točki 3.2.1.4. Kulturo smo nato redčili do $OD_{600}=0,7$ s svežim gojiščem AB 3 % (w/V) NaCl (66 % kulture + 34 % svežega gojišča) in dodali $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ do končne koncentracije 1,2 mM. Nato smo kulturo gojili dalje v AB-Fe mediju do $OD_{600}=1,1$ pri 28 °C in 200 obr/min (cca. 2,5 ure). Kulturo smo po tem 5000-krat redčili v svežem gojišču AB 3 % (w/V) NaCl (Taga, 2005).

3.2.7.2 Priprava mikrotitrsko plošče za določanje prisotnosti AI-2 v izrabljenem gojišču

Vzporedno smo delali na dveh ločenih ploščah. Belo s prozornim dnem (μ CLEAR Plate, Greiner bio-one, Nemčija) smo uporabili za merjenje optične gostote, črno (96F non-treated black microwell plates, NUNC, Danska) za merjenje bioluminiscence. V posamezne luknjice smo odpipetirali 180 µl 5000-krat redčene kulture poročevalskega seva *Vibrio harveyi* BB170 in dodali 20 µl testnega vzorca. (90 % kulture + 10 % IG). Kot negativno kontrolo smo namesto vzorca dodali 10 % (V/V) gojišča AB 3 % (w/V) NaCl. Za kontrolo gojišča smo uporabili 10 % (V/V) gojišča PKS in AB s 3 % (w/V) NaCl. Pozitivno kontrolo je predstavljal dodatek izrabljenega gojišča kulture *Vibrio harveyi*

BB152 (AHL⁻, AI-2⁺) h kulturi poročevalskega seva. Opravljali smo štiri ponovitve. Mikrotitrskie plošče smo inkubirali pri 28 °C.

3.2.6.3 Vrednotenje bioluminiscence in optične gostote vzorcev v mikrotitrskih ploščah

Tako po dodatku kulture poročevalskega seva smo izmerili bioluminiscenco in optično gostoto OD₆₅₀ vzorcev (čas 0) s čitalcem TECAN Safire II. Nato smo postopek ponavljali vsakih 30 minut. Vmes smo plošče inkubirali pri 28 °C. Podatke za bioluminiscenco smo sproti vnašali v graf in spremljali upadanje intenzitete svetlobe. Merjenje smo prekinili, ko je prišlo do porasta bioluminiscence pri kontrolah gojišča (AB in PKS s 3 % (w/V) NaCl). Rezultate smo predstavili kot bioluminiscenco normirano na optično gostoto v odvisnosti od časa. Na skupnem grafu smo določili optimalno časovno točko (OTP), pri kateri je bila pri večini vzorcev bioluminiscanca najmanjša. Vrednosti, izmerjene v tej točki, smo uporabili pri izračunu indukcije bioluminiscence na račun prisotnosti AI-2 signalnih molekul v dodanih izrabljenih gojiščih. Problem navzkrižne kontaminacije pri merjenju proizvedene svetlobe poročevalskega seva smo rešili z uporabo črne mikrotitrskie plošče.

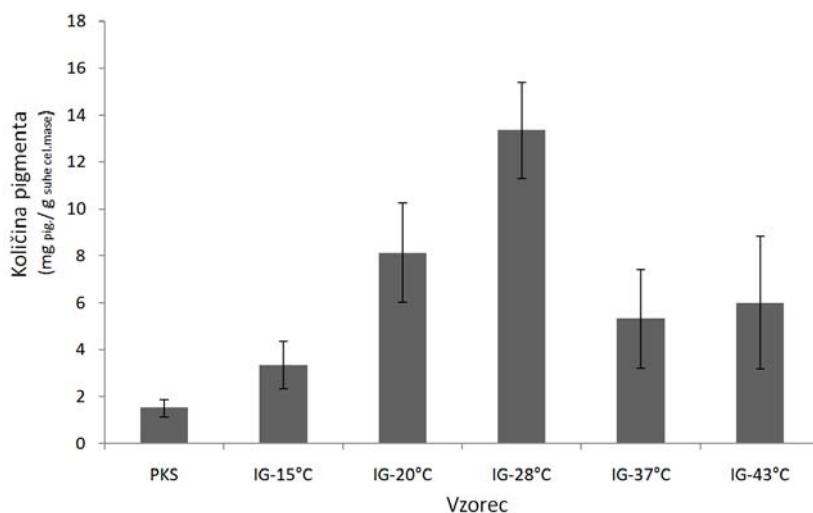
4 REZULTATI

4.1 VPLIV IZRABLJENEGA GOJIŠČA DIVJEGA TIPA NA PIGMENTACIJO IN RAST PRI ROŽNATI MUTANTI *Vibrio* sp.

V nalogi smo preverili kako izrabljeno gojišče divjega tipa *Vibrio* sp. vpliva na pigmentacijo in rast pri rožnati mutantni *Vibrio* sp.

4.1.1 Vpliv izrabljenega gojišča divjega tipa na pigmentacijo pri rožnati mutantni

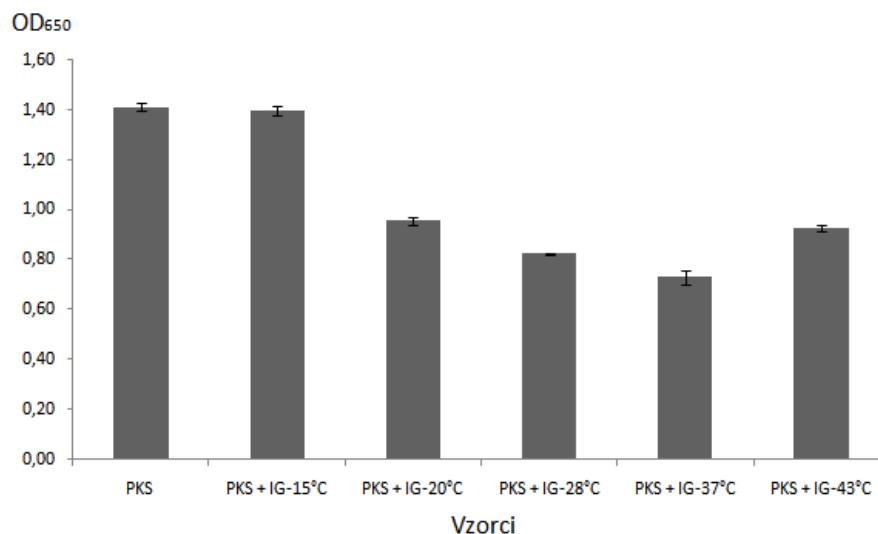
Mutanta R, ki je rasla v gojišču PKS brez dodanega izrabljenega gojišča divjega tipa *Vibrio* sp., je po pričakovanjih pokazala zelo nizko stopnjo pigmentacije ($1,5 \text{ mg}_{\text{pig.}}/\text{g}_{\text{s.s.}}$) in nam je služila kot negativna kontrola. Ker smo v nadaljevanju preverjali vpliv temperature na produkcijo signalnih molekul, smo pripravili izrabljena gojišča divjega tipa *Vibrio* sp. pri petih različnih temperaturah. Povečanje produkcije pigmenta smo zaznali pri vseh vzorcih po dodatku IG. Indukcija pigmentacije pri mutantni R je največja v primeru, ko smo gojišču PKS dodali IG, pridobljen pri gojenju divjega seva *Vibrio* sp. pri 28°C ($\approx 13 \text{ mg}_{\text{pig.}}/\text{g}_{\text{s.s.}}$), ki je tudi sicer optimalna temperatura za rast in produkcijo pigmenta pri tem naravnem izolatu (priloga B). V tem primeru je mutantna R proizvedla skoraj devetkrat več pigmenta na enoto biomase kot v primeru, ko mutantna R v gojišču PKS nismo dodali izrabljenega gojišča. Količino pigmenta v IG pred dodatkom k rožnati mutantni nismo posebej določali.



Slika 4: Stopnja pigmentacije pri rožnati mutantni bakteriji *Vibrio* sp. v gojišču PKS pri 28°C z dodatkom izrabljenega gojišča (IG) divjega tipa bakterije *Vibrio* sp., ki je rasla pri različnih temperaturah preko noči (16 ur). Oznaka IG s pripisano temperaturo (15°C , 20°C , 28°C , 37°C , 43°C) predstavlja rast rožnate mutante z dodatkom izrabljenega gojišča divjega tipa *Vibrio* sp., pridobljenega pri tej temperaturi. Negativno kontrolo predstavlja rast rožnate mutante v svežem gojišču PKS brez dodanega IG. Na y osi so prikazane količine pigmenta, ki smo jih normirali na gram suhe celične mase. Opravili smo tri ponovitve in rezultate prikazali kot povprečne vrednosti s standardnimi odkloni.

4.1.2 Vpliva izrabljenega gojišča divjega tipa na rast rožnate mutante

Vzporedno smo preverili, kako dodatek izrabljenega gojišča divjega seva *Vibrio* sp. vpliva na rast rožnate mutante po prekonočni inkubaciji na 28 °C. Iz spodnjega grafa je razvidno, da je rast rožnate mutante ob dodatku izrabljenega gojišča, pridobljenega pri optimalni temperaturi rasti *Vibrio* sp. (28 °C), zmanjšana skoraj za polovico v primerjavi s kontrolo (PKS). Prav tako na zmanjšano rast rožnate mutante vplivajo tudi ostala izrabljena gojišča pridobljena pri temperaturah 20 °C, 37 °C in 43 °C. Izrabljeno gojišče pridobljeno pri gojenju divjega seva pri 15 °C ne vpliva na rast rožnate mutante.

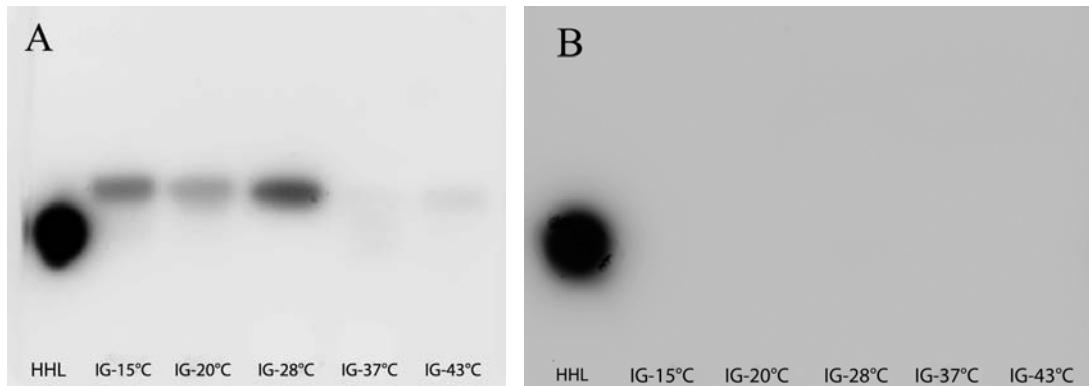


Slika 5: Rast rožnate mutante bakterije *Vibrio* sp. ob dodatku izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja divjega seva *Vibrio* sp., pri 28 °C preko noči (16 ur) v gojišču PKS.. Na x-osi so predstavljeni vzroci, kjer PKS + IG-15 °C pomeni rast rožnate mutante ob svežem gojišču PKS in dodatku IG divjega tipa pridobljenega pri temperaturi 15 °C. Za negativno kontrolo smo gojili rožnato mutanto le v gojišču PKS brez dodanega IG (PKS). Opravili smo tri ponovitve in rezultate prikazali kot povprečne vrednosti s standardnimi odkloni.

4.2 DETEKCIJA AHL SIGNALNIH MOLEKUL

Da bi preverili prisotnost signalnih molekul v izrabljenih gojiščih divjega seva *Vibrio* sp., smo pripravili ekstrakte signalnih molekul, ekstrahirane iz IG divjega seva *Vibrio* sp. pridobljenih iz gojišča PKS in AB pri petih različnih temperaturah inkubacije. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo skušali ločiti posamezne frakcije. Za vizualizacijo in dokazovanje prisotnosti signalnih molekul smo TLC metodo sklopili z uporabo poročevalskega seva bakterije *E. coli* JM109/pSB401. Predhodne raziskave so pokazale, da je signal zelo šibak, če na ploščo nanašamo nekoncentrirane ekstrakte signalnih molekul, zato smo ekstrakte 200-krat koncentrirali. Na plošči, kamor smo nanesli koncentrirane ekstrakte izrabljenih gojišč, pridobljenih pri gojenju divjega seva *Vibrio* sp. v gojišču PKS, smo dobili pozitivne rezultate pri vseh vzorcih (slika 6A). Pri IG pridobljenem pri 37 °C in

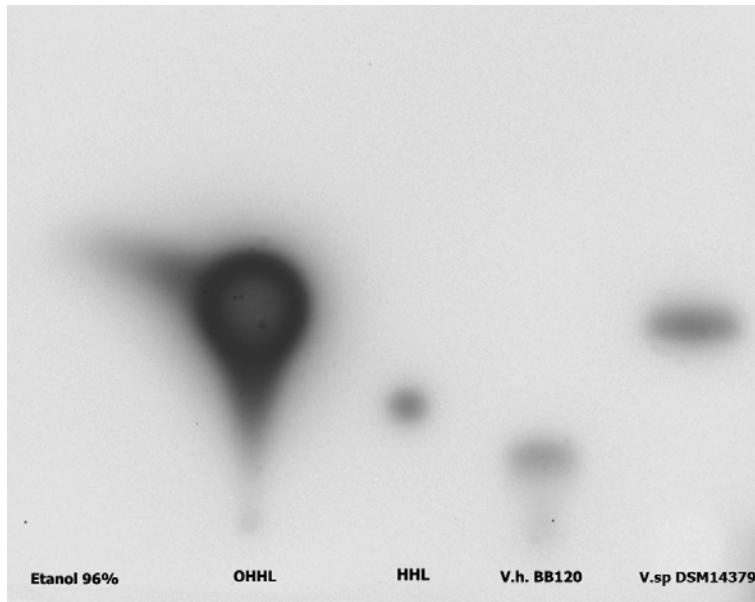
43 °C smo zaznali rahlo bioluminiscenco. Lise pri vseh pozitivnih vzorcih so v linij, kar nakazuje, da gre v vseh primerih najverjetneje za isti tip AHL molekul. Na plošči, kjer smo nanesli ekstrakte iz gojišča AB, poročevalski sev ni zaznal prisotnosti AHL signalnih molekul in posledično ni oddajal bioluminiscence (slika 6B). Na obeh ploščah smo kot pozitivno kontrolo uporabili sintetične AHL signalne molekule tipa N-heksanoil-DL-homoserin lakton (HHL), ki so na obeh ploščah povzročile podobno jasen odziv poročevalskega seva.



Slika 6: TLC plošči z nanešenimi 200-krat koncentriranimi ekstrakti izrabljenih gojišč kultur seva *Vibrio* sp. DSM14379, ki smo jih gojili v gojišču PKS (A) in AB (B) pri različnih temperaturah 24 ur. Na TLC ploščo smo nanašali 100 µl 200-krat koncentriranega ekstrakta signalnih molekul. Oznaka ob IG nakazuje pri kateri inkubacijski temperaturi je bilo izrabljeno gojišče pripravljeno. Npr. IG-15 °C predstavlja 200-krat koncentrirani ekstrakt izrabljenega gojišča pridobljenega ob gojenju seva *Vibrio* sp. pri temperaturi 15 °C. Na obeh ploščah smo kot pozitivno kontrolo uporabili sintetični AHL standard N-heksanoil-DL-homoserin lakton (HHL) pripravljen v 96 % etanolu v koncentraciji 10 mM (2 µl).

4.2.1 Karakterizacija AHL signalnih molekul

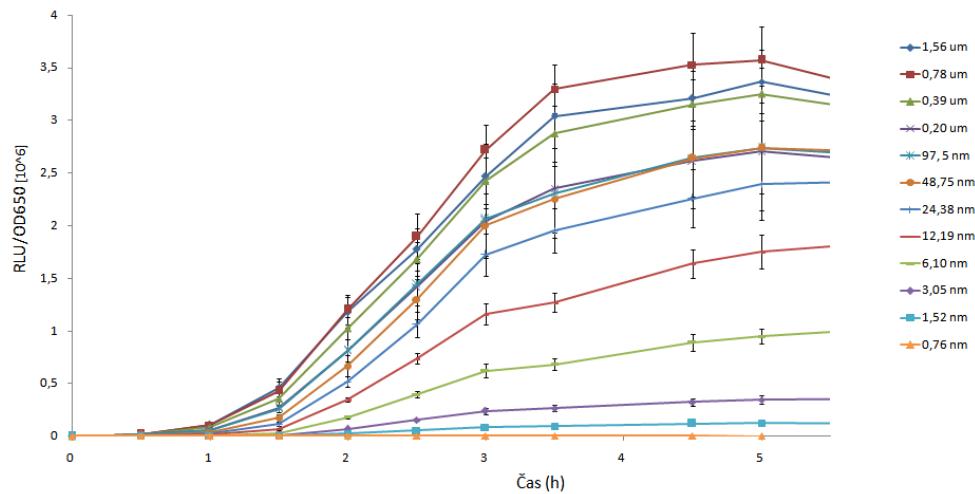
V nadaljevanju smo skušali določiti za kateri tip AHL molekul gre v našem primeru. Na ploščo smo nanesli, poleg že uporabljenega HHL, še 3-oksoheksanoil-L-homoserin lakton (OHHL) za katerega smo menili, da bi lahko predstavljal tip AHL molekule, ki se pojavlja v naših vzorcih. Preiskusili smo še druge tipe sintetičnih AHL molekul v kombinaciji z našim vzorcem. Slike teh TLC plošč so skupaj z opisom priložene v prilogi C. Pri nobeni izmed uporabljenih signalnih molekul, razen pri OHHL, ni prišlo do pozitivne identifikacije. Glede na to, da gre pri vseh vzorcih za isti tip AHL molekule (lise so v liniji), smo na TLC ploščo nanesli le en 200-krat koncentriran ekstrakt kulture *Vibrio* sp., ki je rasla v gojišču PKS na 28 °C (PKS-IG 28 °C). Na sliki 7 vidimo, da sta poziciji našega signala in OHHL primerljivi. Tako smo predvidevali, da preučevani sev *Vibrio* sp. najverjetneje producira AHL molekule tipa OHHL. Dokaj močan signal je viden tudi pri koncentriranem ekstraktu iz IG kulture *Vibrio harveyi* BB120 (producira AHL – tip BHL in AI-2 signalne molekule) pripravljenem v gojišču PKS, ki nam je služil kot dodatna pozitivna kontrola.



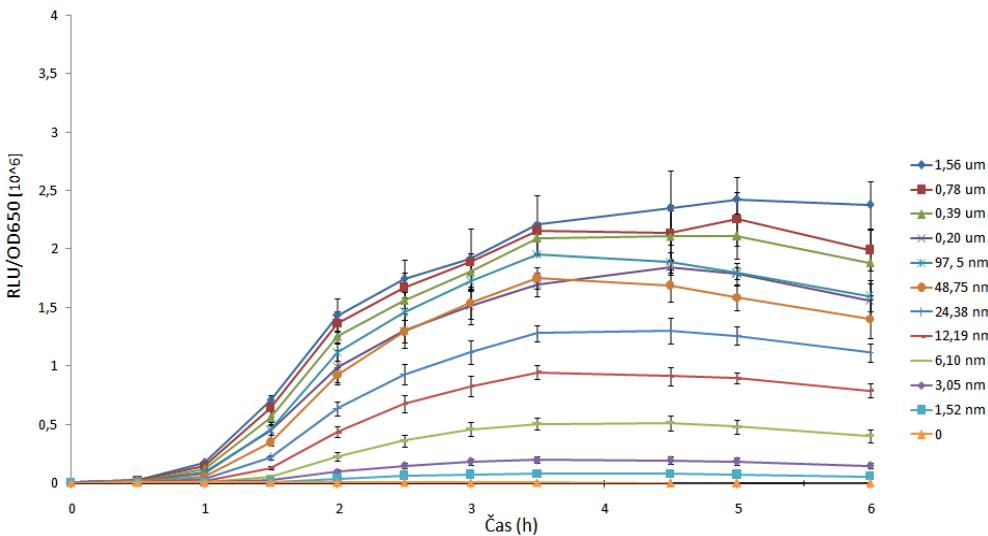
Slika 7: TLC plošča z različnimi tipi AHL molekul in koncentratom *Vibrio* sp. Na ploščo smo nanesli po 2 µl vsakega vzorca. Za negativno kontrolo smo nanesli prefiltriran 96 % (V/V) etanol. Različna tipa sintetičnih AHL molekul, 3-oksoheksanoil-L-homoserin lakton (OHHL) in N-heksanoil-DL-homoserin lakton (HHL) v 96 % (V/V) etanolu v koncentraciji 0,1 mM sta predstavljala pozitivno kontrolo. 200-krat koncentriran ekstrakt signalnih molekul *Vibrio harveyi* BB120 (producira BHL in AI-2) pripravljen iz izrabljenega gojišča PKS nam je služil za dodatno pozitivno kontrolo. V zadnjo kolono smo nanesli še preiskovani vzorec, 50 µl 200-krat koncentriranega ekstrakta signalnih molekul iz *Vibrio* sp. DSM14379.

4.3 KVANTIFIKACIJA AHL SIGNALNIH MOLEKUL

Z metodo opisano v točki 3.2.6 smo želeli določiti količino signala in vpliv temperature na produkcijo AHL molekul. V ta namen smo pripravili umeritveni krivulji za OHHL v gojišču PKS in AB. Na slikah 8 in 9 opazimo, da doseže sev maksimalno bioluminiscenco nekje po 3,5 - 4 urah inkubacije na 37 °C in da se bioluminiscanca s časom spreminja v odvisnosti od količine signalnih molekul. Vrednosti bioluminiscence smo normirali pri 3,5 urah inkubacije. V tej točki so posamezne krivulje najbolj ločene in je odziv sistema maksimalen.

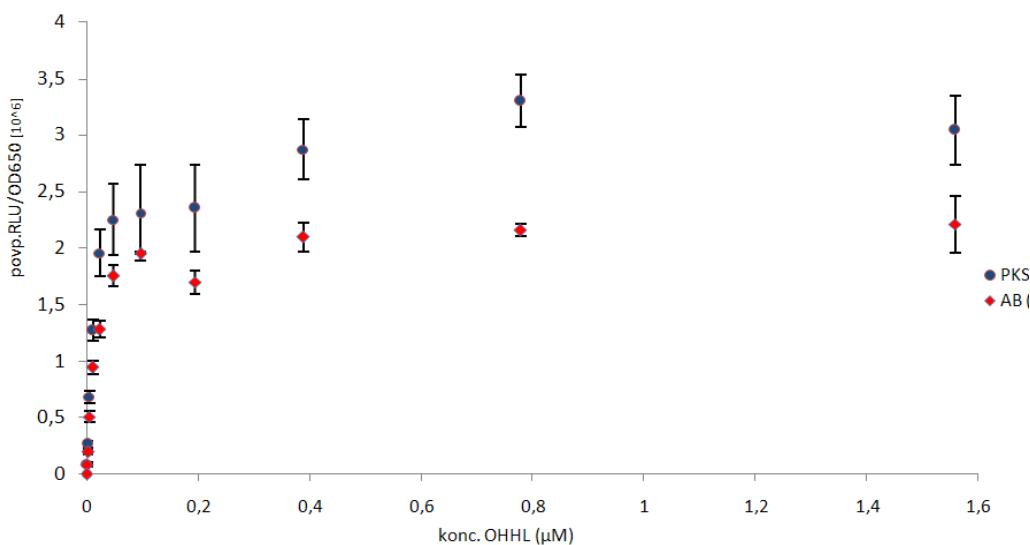


Slika 8: Umeritvena krivulja za OHHL v gojišču PKS v koncentracijskem območju 1,52 nM do 1,56 μ M. Odziv poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 na različne koncentracije sintetičnih signalnih molekul N-3-oksoheksanoil-L-homoserin lakton (OHHL), po času. Na y osi so prikazane vrednosti bioluminiscence normirane glede na optično gostoto kulture *E. coli* JM109 izmerjeno pri 650 nm. Na x osi je prikazan čas inkubacije.

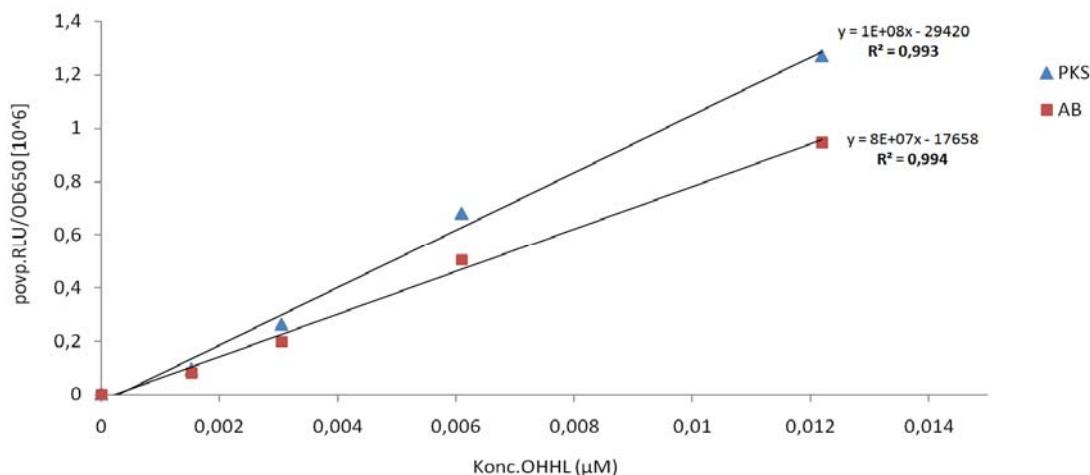


Slika 9: Umeritvena krivulja za OHHL v gojišču AB v koncentracijskem območju od 1,52 nM do 1,56 μ M. Odziv poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 na različne koncentracije sintetičnih signalnih molekul N-3-oksoheksanoil-L-homoserin lakton (OHHL), po času. Na y osi so prikazane vrednosti bioluminiscence normirane glede na optično gostoto kulture *E. coli* JM109 izmerjeno pri 650 nm. Na x osi je prikazan čas inkubacije.

Kot je razvidno iz slike 10 se bioluminiscanca z višanjem koncentracije OHHL saturira. Opazili smo, da prihaja do izrazitega dušenja bioluminescence pri koncentracijah višjih od 100 nM. Začetni linearni odziv smo uporabili za določanje koncentracije OHHL (slika 11).

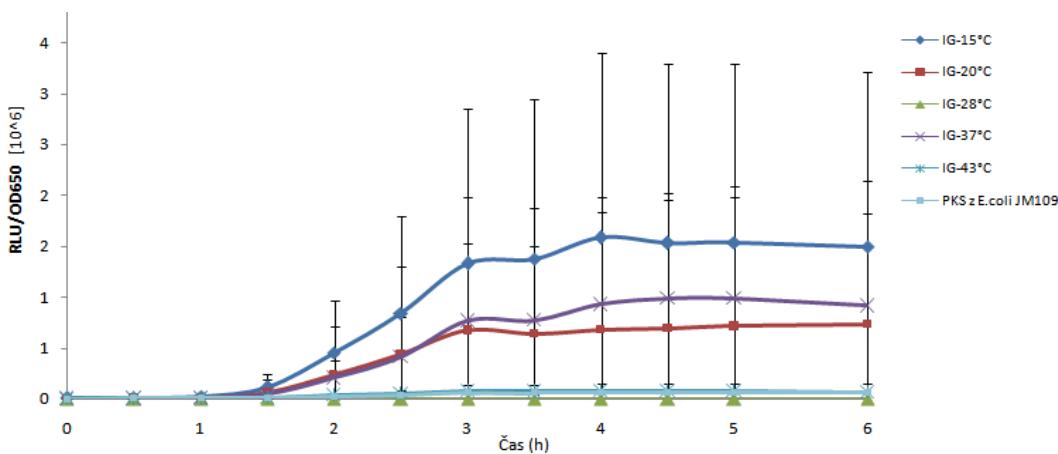


Slika 10: Normaliziran vrh bioluminiscence poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 pri različnih koncentracijah OHHL v gojišču PKS ter AB po 3,5 urah inkubacije pri 37 °C.

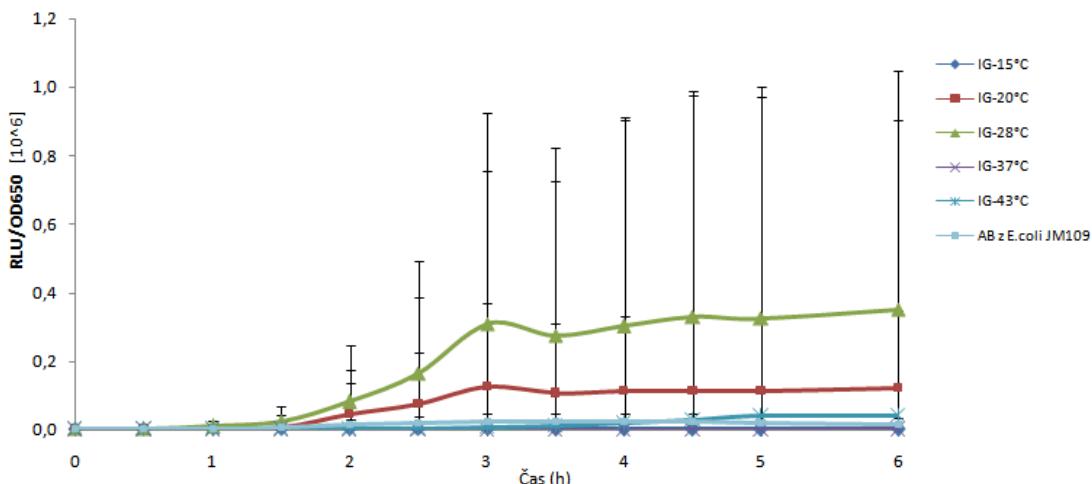


Slika 11: Normaliziran vrh bioluminiscence poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 v gojišču PKS in AB v koncentračnem območju 1,52 - 12,2 nM po 3,5 urah inkubacije pri 37 °C.

S pomočjo poročevalskega seva bakterije *E. coli* JM109 smo nato skušali oceniti količino AHL signalnih molekul prisotnih v izrabljenih gojiščih bakterijske kulture *Vibrio* sp. DSM14379 gojene pri petih različnih temperaturah. Kot je razvidno iz slik 12 in 13 so vrednosti pri večini vzorcev precej nizke in standardni odkloni zelo veliki. Zaradi tega nismo uspeli zanesljivo izmeriti količine AHL molekul pri obeh testiranih izrabljenih gojiščih. Poročevalski sev je po šestih urah inkubacije kazal opazno rast, vendar je verjetno prišlo do inhibicije oziroma ugašanja bioluminiscence (quenching).



Slika 12: Bioluminiscanca poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 po času inkubacije pri 37 °C v gojišču PKS ob dodatku izrabljenih gojišč kultur divjega tipa *Vibrio* sp., pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja v istem gojišču. Y os predstavlja vrednosti bioluminiscence, normirano na OD₆₅₀ v isti časovni točki. Na x osi je prikazan čas inkubacije na 37 °C. Negativno kontrolo predstavlja odziv poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 v gojišču PKS brez dodatka izrabljenega gojišča (PKS 3 % z *E. coli*). Pri preostalih vzorcih smo k svežemu gojišču PKS in poročevalskemu sevu dodali izrabljena gojišča. Oznaka ob IG nakazuje, pri kateri temperaturi inkubacije divjega seva *Vibrio* sp. je bilo izrabljeno gojišče pripravljeno.

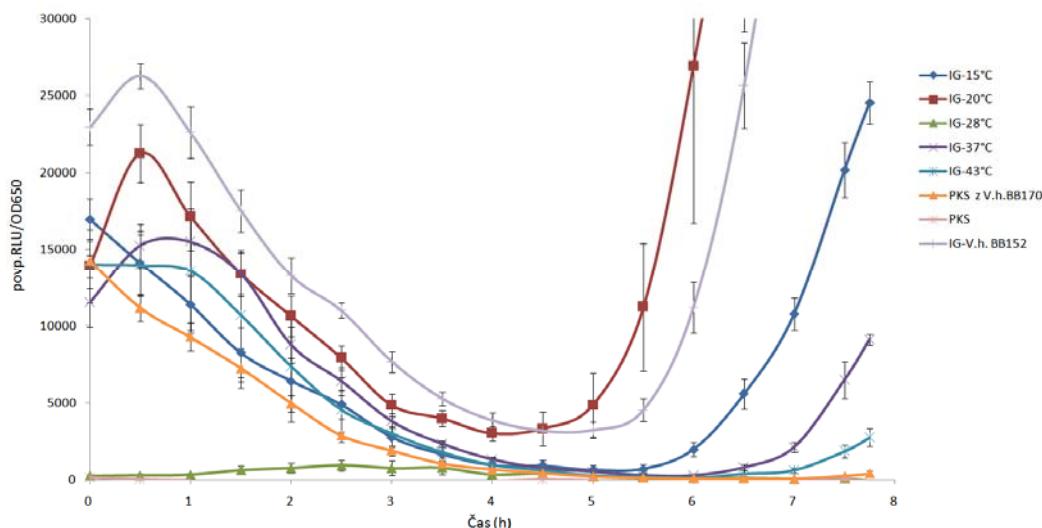


Slika 13: Bioluminiscanca poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 po času inkubacije pri 37 °C v gojišču AB ob dodatku izrabljenih gojišč kultur divjega tipa *Vibrio* sp., pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja v istem gojišču. Y os predstavlja vrednosti bioluminiscence, normirano na OD₆₅₀ v isti časovni točki. Na x osi je prikazan čas inkubacije na 37 °C. Negativno kontrolo predstavlja odziv poročevalskega seva *E. coli* JM109/pSB401 v gojišču AB brez dodatka izrabljenega gojišča (AB 3 % z *E. coli*). Pri preostalih vzorcih smo k svežemu gojišču AB in poročevalskemu sevu dodali izrabljena gojišča. Oznaka ob IG nakazuje, pri kateri inkubacijski temperaturi je bilo izrabljeno gojišče pripravljeno.

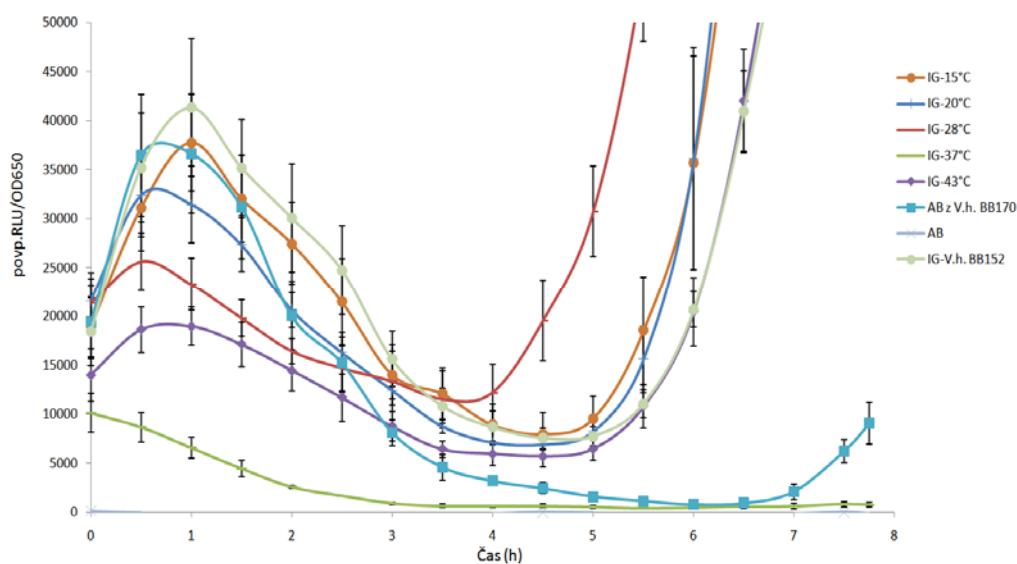
4.4 DETEKCIJA AI-2 SIGNALNIH MOLEKUL

S pomočjo poročevalskega seva *Vibrio harveyi* BB170 smo hoteli dokazati prisotnost AI-2 signalnih molekul v izrabljenih gojiščih. Vzorec, kjer smo dodali zgolj gojišče in

poročevalski sev, nam je služil za kontrolo gojišča. S pomočjo te kontrole smo določili optimalno časovno točko (OTP) po 4,5 urah inkubacije na 28 °C (sliki 14 in 15). Točka nam v nadaljevanju predstavlja osnovo za določitev koncentracije AI-2 molekul v preučevanih vzorcih. Uporabili smo jo pri izračunu vseh vzorcev, izjema je bil vzorec IG-28 °C v gojišču AB, kjer smo točko OTP določili po štirih urah inkubacije. V tej točki poročevalski sev proizvede najmanj svetlobe, nato se krivulji dvigujeta s pomočjo samoindukcije poročevalskega seva (Taga, 2005). Vsi vzorci v OTP, razen IG-28 °C pri gojišču PKS in IG-37 °C pri gojišču AB, kažejo višjo bioluminiscenco kakor v primeru kontrole gojišča, kar nakazuje na prisotnost AI-2 v izrabljenih gojiščih. Sev *Vibrio harveyi* BB152 smo uporabili za pozitivno kontrolo in pomoč pri oceni količine AI-2 signalnih molekul v preučevanih vzorcih. Ta sev, namreč, dokazano proizvaja signalne molekule tipa AI-2.



Slika 14: Bioluminiscanca pri poročevalskem sevu *Vibrio harveyi* BB170 ob dodatku izrabljenih gojišč PKS po času inkubacije pri 28 °C. Kot negativno kontrolo smo uporabili sveže gojišče PKS brez dodatka kulture (PKS). Kontrolo gojišča je predstavljala redčena kultura poročevalskega seva z dodatkom svežega gojišča PKS (PKS z V.h. BB170). Dodatek izrabljenega gojišča kulture *Vibrio harveyi* BB152 v gojišču PKS (AI-2+) k redčeni kulturi poročevalskega seva je predstavljal pozitivno kontrolo (IG V.h. BB152). Oznaka IG s pripisano temperaturo predstavlja izrabljeno gojišče divjega seva *Vibrio* sp., pridobljeno z gojenjem pri tej temperaturi.



Slika 15: Bioluminiscanca pri poročevalskem sevu *Vibrio harveyi* BB170 ob dodatku izrabljenih gojišč AB po času inkubacije pri 28 °C. Kot negativno kontrolo smo uporabili sveže gojišče PKS brez dodatka kulture (AB). Kontrolo gojišča je predstavljala redčena kultura poročevalskega seva z dodatkom svežega gojišča AB (AB z V.h. BB170). Dodatek izrabljenega gojišča kulture *Vibrio harveyi* BB152 v gojišču AB (AI-2+) k redčeni kulturi poročevalskega seva je predstavljal pozitivno kontrolo (IG V.h. BB152). Oznaka IG s pripisano temperaturo predstavlja izrabljeno gojišče divjega seva *Vibrio* sp., pridobljeno z gojenjem pri tej temperaturi.

Vrednosti bioluminescence v točki OTP smo uporabili za izračun indukcije bioluminiscence (IB). Dobljene vrednosti bioluminiscence preučevanih vzorcev smo delili z velikostjo signala pri kontroli gojišča. Vrednosti IB pri posameznih vzorcih so prikazane v spodnji preglednici. Opazimo, da so vrednosti pri izrabljenih gojiščih pridobljenih v gojišču AB višje kot pri izrabljenih gojiščih v gojišču PKS. V primerjavi s preostalimi vzorci signifikantno izstopata vzorca IG-20 °C pri gojišču PKS in IG-28 °C pri gojišču AB. Standardni odkloni pri vseh vrednostih so sorazmerno visoki.

Preglednica 3: Izračun indukcije bioluminiscence (IB) poročevalskega seva *Vibrio harveyi* BB170 ob času inkubacije 4,5 ur za preiskovane vzorce s standarnim odklonom (SD)

Vzorec	PKS	SD	AB	SD
IG-15 °C	1,87	1,02	3,72	1,35
IG-20 °C	6,69	2,52	3,32	0,65
IG-28 °C	0,93	0,50	8,89*	2,40
IG-37 °C	1,77	0,37	0,51	0,23
IG-43 °C	1,09	0,27	3,81	0,90
IG BB152 (pozitivna kontrola)	5,88	1,13	2,91	0,71
gojišče + V.h. BB170 (kontrola gojišča)	1,00	/	1,00	/
gojišče (negativna kontrola)	0,00	/	0,00	/

* Pri IG-28 °C v gojišču AB smo pri izračunu IB upoštevali OTP pri 4 h (glej slika 15, rdeča krivulja)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Regulacija številnih procesov v bakterijski celici je pod vplivom okoljskih dejavnikov. V diplomski nalogi smo preverili kako temperatura vpliva na produkcijo signalnih molekul pri naravnem izolatu *Vibrio* sp. DSM14379. V nalogi smo uporabili mutanto R, ki ima najverjetneje okvarjen en ali več genov odgovornih za sintezo signalnih molekul (Štraser, 2008). Nadaljnje raziskave z mutantom R, kot poročevalskim sevom, so pokazale, da se le-ta ne odziva na nobeno od testiranih sintetičnih AHL molekul. Odgovarja le na ekstrakt molekul *Vibrio* sp. (Drčar, 2010), kar so dokazali s pravokotnim nacepljanjem na plošče in difuzijsko metodo v jamicah. V tem primeru je bližina divjega seva *Vibrio* sp. povzročila povrnitev pigmentacije mutanta R. Ker mutanta R ni najboljši poročevalski sev za testiranje AHL molekul, smo v tem delu izbrali *E. coli* JM109/pSB401 kot poročevalski sev. Bakterija *E. coli* JM109 se odziva na 3-okso-C₆-HSL, 3-okso-C₈-HSL, C₆-HSL, 3-okso-C₁₀-HSL ter C₁₄-HSL (Drčar, 2010).

Z merjenjem stopnje pigmentacije rožnate mutante ob dodatku izrabljenih gojišč pridobljenih pri gojenju divjega tipa *Vibrio* sp. pri različnih temperaturah smo želeli pokazati, da temperatura vpliva na produkcijo signalnih molekul. Predvidevali smo, da je produkcija signalnih molekul pri divjem tipu največja pri optimalni temperaturi za rast, ko je tudi produkcija pigmenta maksimalna. Starič (2007) je preverjal vpliv temperature na produkcijo pigmenta pri divjem sevu *Vibrio* sp. v gojišču PKS in ugotovitve prikazal v grafu, ki ima značilno obliko zvona. Pri 28 °C divji sev proizvede 45-krat več pigmenta na enoto biomase kot pri 43 °C in kar 115-krat več kot pri 15 °C. Na podlagi teh ugotovitev smo domnevali, da bo indukcija pigmentacije rožnate mutante pri 28 °C najvišja, krivulja pa bo imela obliko zvona. Dobljeni rezultati potrjujejo našo domnevo. Največje povečanje produkcije pigmenta pri mutanti R smo zaznali pri 28 °C (\approx 13 mg pig./g s.s.), optimalni temperaturi za rast in produkcijo pigmenta pri divjem sevu *Vibrio* sp. Pri tej temperaturi je povečanje pigmentacije pri mutanti R za 4-krat večje kot v primeru dodatka IG divjega seva *Vibrio* sp., pridobljenega pri 15 °C in za 2,5-krat večje kot pri dodatku IG pridobljenega pri 37 °C. S tem sicer nismo dokazali, da so za indukcijo pigmentacije pri mutanti R odgovorne signalne molekule, ki jih mutanta ne more proizvajati, vendar pa rezultati nakazujejo, da so v izrabljenem gojišču komponente, ki omogočajo povečanje pigmentacije in so odvisne od temperature gojenja. V nadaljevanju smo zato skušali dokazati prisotnost signalnih molekul tipa AHL in AI-2, ki se najpogosteje pojavljata pri vibrijih in bi lahko vplivala na produkcijo rdečega barvila.

5.1 DETEKCIJA AHL SIGNALNIH MOLEKUL

Pri poskusu detekcije signalnih molekul tipa AHL v koncentriranih ekstraktih IG iz dveh različnih gojišč, smo pozitivne rezultate dobili le pri ekstraktih iz gojišča PKS ne pa pri gojenju v AB gojišču (slika 6B). V gojišču AB, ki se večkrat uporablja pri študijah produkcije signalnih molekul in naj bi induciral produkcijo signalnih molekul, divji sev *Vibrio* sp. verjetno ni izločal AHL molekul. Uporabljen poročevalski sev *E. coli* JM109/pSB401 načeloma odgovarja na večino AHL molekul, vendar kljub temu ne moremo z gotovostjo trditi, da v gojišču AB ni prisotnih AHL molekul. Lahko so v preučevanih vzorcih komponente, ki motijo detekcijo signalnih molekul bodisi preko vezave na receptorska mesta na površini bodisi inhibicije rasti poročevalskega seva.

Na sliki 6A so jasno vidne lise pri ekstraktih pridobljenih pri različnih temperaturah inkubacije, slabše vidni sta le pri ekstraktu s temperaturo inkubacije 37 °C in 42 °C. Vse lise so poravnane, kar nakazuje na to, da je v ekstraktih izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah, prisoten le en tip AHL molekul. Ker smo na TLC plošče nanašali 200-krat koncentrirane ekstrakte IG, se AHL molekule v gojiščih PKS pojavljajo verjetno v zelo nizkih nM koncentracijah. Metoda omogoča kvalitativno določitev prisotnosti AHL molekul. Rezultati nakazujejo, da je pri višjih temperaturah sinteza signala zmanjšana. Glede na rezultate je v gojišču verjetno prisoten 3-okso-heksanoil homoserin lakton (OHHL).

Direktna kvantifikacija AHL molekul s pomočjo poročevalskega seva *E. coli* JM109 na preučevanih vzorcih ni bila uspešna. Na čistih kulturah in pri uporabi sintetične signalne molekule OHHL v obeh gojiščih (PKS in AB) je bil odziv poročevalskega seva pričakovani. Pri kompleksnem vzorcu, kot je izrabljeno gojišče naravnega izolata *Vibrio* sp., pa smo naleteli na težave. Pojav "quenchinga" oziroma dušenja signala nam je ob sorazmerno veliki eksperimentalni napaki onemogočal merjenje količine proizvedene svetlobe poročevalskega seva pri naših vzorcih. Že Winzer s sod. (2002) je omenjal to problematiko. Kadar preučujemo signaliziranje določene vrste bakterij s pomočjo analize izrabljenega gojišča, imamo poleg signalnih molekul v vzorcu še celo kopico ostalih bakterijskih produktov. Eden takšnih je rdeč pigment, ki dokazano vpliva zaviralno na rast nesorodnih bakterijskih vrst (Štraser, 2008), kot tudi na rast mutante iste vrste bakterij. Pokazali smo namreč, da izrabljena gojišča divjega seva *Vibrio* sp. vplivajo na zmanjšano rast pri rožnati mutanti (slika 5). Ko smo gojišču PKS dodali IG, pridobljeno z gojenjem divjega seva pri temperaturi, kjer je produkcija rdečega pigmenta visoka, smo opazili upad rasti rožnate mutante po 16 urni inkubaciji na 28 °C, glede na negativno kontrolo. Rast ni bila inhibirana le v primeru, ko smo svežemu gojišču PKS z rožnato mutanto dodali IG, pridobljen pri temperaturi 15 °C.

5.2 DETEKCIJA AI-2 SIGNALNIH MOLEKUL

S pomočjo poročevalskega seva *Vibrio harveyi* BB170 smo skušali dokazati prisotnost AI-2 signalnih molekul v izrabljenih gojiščih, pridobljenih z gojenjem divjega seva *Vibrio* sp. v gojišču PKS in AB. V raziskavo smo poleg gojišča PKS vključili tudi gojišče AB, ker naj bi spodbujalo produkcijo signalnih molekul in, ker se uporablja v testih določanja signalnih molekul tipa AI-2 pri bakteriji *Vibrio harveyi* kot poročevalskem organizmu. Opazili smo, da je v primeru povečanega odziva poročevalskega seva prišlo do pojava navzkrižne detekcije (ang. *cross-talking*), kar smo delno omejili z uporabo črnih mikrotitrskih plošč, kjer je odboj bioluminiscence od sten mikrotitrskih luknjic zmanjšan. Na ta način smo zmanjšali vpliv sosednjih vzorcev pri merjenju in zagotovili reprezentativne rezultate. Če primerjamo slike 14 in 15 opazimo, da so vrednosti bioluminiscence pri pozitivni kontroli in preučevanih vzorcih v gojišču AB signifikantno višje. Poročevalski sev se bolje odziva na izrabljena gojišča divjega seva *Vibrio* sp., pridobljena iz gojišča AB, kot pa iz gojišča PKS. Močno izstopata dva vzorca, IG-20 °C pri gojišču PKS in IG-28 °C pri gojišču AB, ki imata signifikantno višjo indukcijo bioluminiscence kot preostali vzorci. Če primerjamo njihove IB vrednosti z vrednostmi pri pozitivni kontroli, lahko zaključimo, da omenjeni izrabljeni gojišči vsebujejo signalne molekule tipa AI-2. Pri preostalih vzorcih je koncentracija AI-2 nižja. Ti rezultati kažejo, da temperatura vpliva na produkcijo AI-2 signalnih molekul.

5.3 SKLEPI

Z našimi eksperimenti smo potrdili, da pri divjem sevu *Vibrio* sp. DSM14379:

- izrabljeno gojišče vsebuje komponente, ki inducirajo produkcijo rdečega pigmenta pri nepigmentirani rožnatih mutanti.
- Proizveden je le en tip AHL signalnih molekul. Najverjetnejše gre za 3-oksoheksanoil homoserin lakton, ki se pojavlja v gojišču PKS v zelo nizkih (nM) koncentracijah. AHL molekul v IG, pridobljenem iz gojišča AB z izbranim poročevalskim sevom nismo zaznali.
- Metoda direktnе kvantifikacije AHL molekul, prisotnih v izrabljenih gojiščih *Vibrio* sp. s poročevalskim sevom *E. coli* JM109/pSB401 je neprimerena zaradi snovi, ki jih divji sev izloča v gojišče in vplivajo na bioluminiscenco ter rast poročevalskega seva.
- Producija AI-2 molekul je odvisna od temperature. Bolj intenzivna produkcija je v gojišču AB kot v gojišču PKS.

6 POVZETEK

Za bakterije je v preteklosti veljalo, da obstajajo v okolju zgolj kot ločene, posamezne celice, ki privzemajo hranila, če so le-ta prisotna in se razmnožujejo v primeru ugodnih pogojev. Vendar se je paradigma, ki predvideva, da ti organizmi niso zmožni kompleksnih interakcij, postopoma opustila. Spoznanja, da bakterije lahko zaznavajo in se odzivajo na dražljaje iz okolja ter, da so sposobne koordinirane aktivnosti, so znanstvenike dokončno prepričala o obstoju višje organiziranosti tudi na nivoju bakterij. Področje moje diplomske naloge je bilo usmerjeno v signaliziranje med bakterijami in kako okolje vpliva na produkcijo in izločanje signalnih molekul.

V diplomskem delu smo preučevali vpliv temperature na produkcijo AHL in AI-2 signalnih molekul. Dokazali smo prisotnost obeh tipov signalnih molekul v IG preučevanega seva. Pokazalo se je, da tudi hranila močno vplivajo na produkcijo signalnih molekul. Tako smo AHL molekule zasledili zgolj v gojišču PKS, medtem ko je produkcija AI-2 intenzivnejša v gojišču AB. Z izbrano metodo kvantifikacije AHL molekul nam ni uspelo določiti količino signala, ki je prisotna v posameznih IG. Glede na rezultate sklepamo, da se koncentracije najverjetneje gibljejo v nM koncentracijskem rangu. Pri poskusu določitve količine AI-2 smo pokazali, da temperatura vpliva na količino AI-2 molekul v IG.

Ugotovitve kažejo na to, da izbrana metoda neposredne kvantifikacije AHL signalnih molekul v izrabljenih gojiščih divjega seva *Vibrio* sp. ni primerna, zato se bo v prihodnje verjetno potrebno posluževati ostalih metod določanja količine signalnih molekul, GC-MS ali uporaba mutant, ki se ne odzivajo na prisotne metabolite v izrabljenih gojiščih. Pri določitvi količine AI-2 molekul v IG smo uspeli pokazati, da temperatura vpliva na produkcijo signalnih molekul. V stresnih pogojih bakterije z zmanjšanjem produkcije signalnih molekul in s tem pigmentiranosti omejijo izgubo energije ter povečajo zmožnost preživetja. Pigment tako dobi vlogo luksuzne dobrine, ki ga bakterija izloča v okolje v primeru ugodnih pogojev.

7 VIRI

- Bassler B. L., Wright M., Showalter R. E., Silverman M. R. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology*, 9: 773-786.
- Bassler B. L., Greenberg E. P., Stevens A. M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 179, 12: 4043-4045.
- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B. L., Hughson F.M. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415: 545-549.
- Cloak O. M., Solow B. T., Briggs C. E., Chen C., Fratamico P. M. 2002. Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 9: 4666-4671.
- Danevčič T., Stopar D. 2009. Protimikrobne snovi iz morskih mikroorganizmov: primer *Vibrio* sp. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost: Protimikrobne snovi. Raspored P., Petkovič H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 107-119.
- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglesias B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science*, 280: 295-298.
- DeKeermaecker C. J., Vanderleyden J. 2003. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as reporter. *Microbiology Comment*, 149: 1953-1956.
- Drčar T. 2010. Določanje signalnih molekul in vpliv slanosti na njihovo produkcijo pri bakteriji *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 44-50.
- Fineran P. C., Slater H., Everson L., Hughes K., Salmond G. P. C. 2005. Biosynthesis of tripyrrole and β -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Molecular Microbiology*, 56, 6: 1495-1517.
- Freeman J. A., Bassler B. L. 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 31: 665-677.
- Freeman J. A., Lilley B. N., Bassler B. L. 2000. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 35: 139-149.

Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176, 2: 269-275.

Geske G. D., O'Neill J. C., Miller D. M., Wezeman R. J., Mattmann M. E., Lin Q., Blackwell H. E. 2008. Comparative analyses of N-acylated homoserine lactones reveal unique structural features that dictate their ability to activate or inhibit quorum sensing. *ChemBioChem*, 9: 389-400.

Geske G. D., Wezeman R. J., Siegel A. P., Blackwell H. E. 2005. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society*, 127: 12762-12763.

Giri A. V., Anandkumar N., Muthukumaran G., Pennathur G. 2004. A novel medium for enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: 4-11.

Gram L., Christensen A. B., Ravn L., Molin S., Givskov M. 1999. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the *Enterobacteriaceae* isolated from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 8: 3458-3463.

Harris A. K., Williamson N. R., Slater H., Cox A., Abbasi S., Foulds I., Simonsen H. T., Leeper F. J., Salmond G. P. 2004. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*, 150: 3547-356.

Hasegawa H., Chatterjee A., Cui Y., Chatterjee A. K. 2005. Elevated temperature enhanced virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-acyl-homoserine lactone, and extracellular proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8: 4655-4663.

Henke J. M., Bassler B. L. 2004. Three parallel quorum sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 186, 20: 6902-6914.

Horswill A.R., Stoodley P., Stewart P. S., Parsek M. R. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 371-380.

Kelly R. C., Bolitho M. E., Higgins D. A., Lu W., Ng W. L., Jeffrey P. D., Rabinowitz J. D., Semmelhack M. F., Hughson F. M., Bassler B. L. 2009. The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nature Chemical Biology*, 5, 12: 891-895.

Kendall M. M., Rasko D. A., Sperandio V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 75, 10: 4875-4884.

Latour X., Diallo S., Chevalier S., Morin D., Smadja B., Burini J. F., Haras D., Orange N. 2007. Thermoregulation of N-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft

rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 12: 4078–4081.

McClean K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. A. B., Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143: 3703–3711.

McNab R., Lamont R. J. 2003. Microbial dinner-party conversations: the role of LuxS in interspecies communication. *Journal of Medical Microbiology*, 52: 541-545.

Medina-Martinez M. S., Uyttendaele M., Demoldera V., Debevere J. 2006. Effect of temperature and glucose concentration on the N-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. *Food Microbiology*, 23: 534–540.

Milton D. L. 2006. Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 61–71.

Parsek M. R., Greenberg E. P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 97, 16: 8789-8793

Pillai S. D., Jesudhasan P. R. 2006. Quorum sensing: how bacteria communicate. *Food Technology*, 60, 4: 42-50.

Poulter S., Carlton T. M, Su X., Spring D.R., Salmond G. P. C. 2010. Engeneering of new prodigiosin-based biosensors of *Serratia* for facile detection of short-chain N-acyl homoserine lactone quorum-sensing molecules. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 2: 322-328.

Ravn L., Christensen A. B., Molin S., Givskov M. 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 239–251

Schaefer A. L., Hanzelka B. L., Eberhard A., Greenberg E. P. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *Journal of Bacteriology*, 178: 2897–2901.

Shaw P. D., Ping G., Daly S. L., Cha C., Cronan J. E., Rinehart K. L., Farrand S. K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 94: 6036-6041.

Smith K. M., Bu Y., Suga H. 2003. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chemistry & Biology*, 10: 563–571.

Sperandio V., Mellies J.L., Nguyen W., Shin S., Keper J.B. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, 96, 26: 15196-15201.

Starč N. 2007. Vpliv okoljskih faktorjev na produkcijo barvila naravnega izolata *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 30-30.

Starč N., Danevčič T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 Pigment production: A competitive advantage in the environment? Microbial Ecology, 60, 3: 592-598.

Steindler L., Venturi V. 2007. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. FEMS Microbiology Letter, 266: 1-9.

Stevens A.M., Greenberg E.P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. Journal of Bacteriology, 179, 2: 557-562.

Surette M.G., Bassler B.L. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, 95: 7046-7050.

Surette M.G., Bassler B.L. 1999. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology, 31, 2: 585-595.

Štraser A. 2008. Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 35-35.

Taga M.E. 2005. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. Current Protocols in Microbiology: 1C.1.1-1C.1.8.

Teasdale M.E., Liu J., Wallace J., Akhlaghi F., Rowley D.C. 2009. Secondary metabolites produced by marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 75, 3: 567-572.

Thomson N.R., Crow M.A., McGowan S.J., Cox A., Salmond G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. Molecular Microbiology, 36: 539-556.

Van Houdt R., Givskov M., Michiels C.W. 2007. Quorum sensing in *Serratia*. FEMS Microbiology, 31: 407-424.

Vilchez R., Lemme A., Thiel V., Schulz S., Sztajer H., Wagner-Döbler I. 2007. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387: 489-496.

Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 25: 365-404.

Winson M.K., Swift S., Fish L., Throup J.P., Jörgensen F., Chhabra S.R., Bycroft B.W., Williams P., Stewart G. 1998. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiology Letters, 163: 185-192.

Yan L., Allen M.S., Simpson M.L., Sayler G.S., Cox C.D. 2007. Direct quantification of N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone in culture supernatant using a whole-cell bioreporter. Journal of Microbiological Methods, 68: 40–45.

Yates A.E., Philipp B., Buckley C., Atkins S., Chhabra S.R., Sockett E.R., Goldner M., Dessaix Y., Camara M., Smith H., Williams P. 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity, 70, 10: 5635-5646.

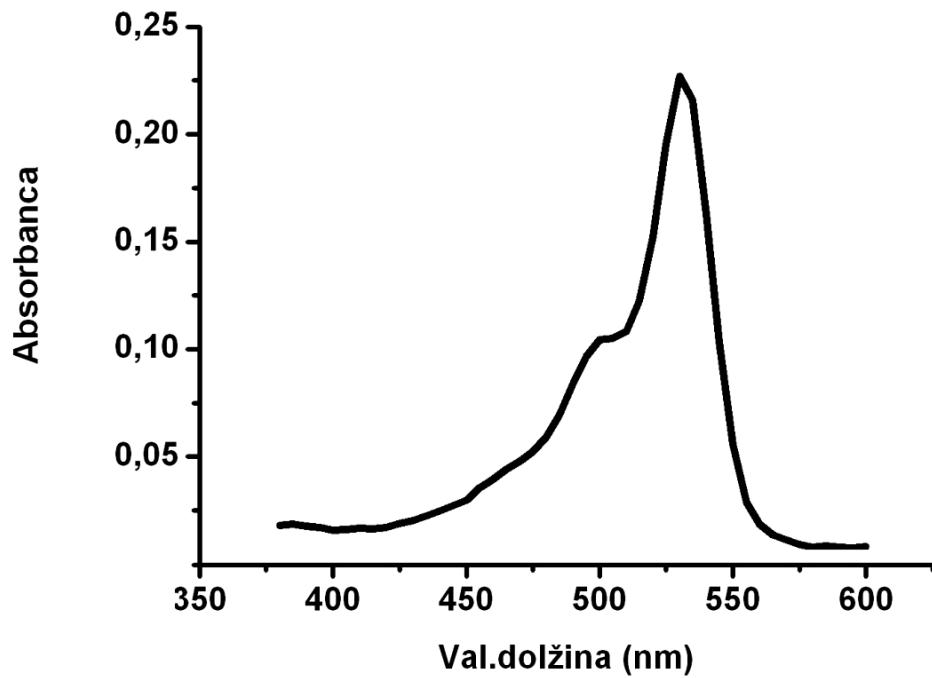
Zaitseva V.Y, Granik V.G., Belik A.S., Koksharova O.A., Khmel I.A. 2010. Activation of bioluminescence of sensor *Escherichia coli* strains used to detect N-acyl-homoserine lactones in presence of nitrofurans and NO generators. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 25, 2: 71-76.

ZAHVALA

Zahvalo najprej namenjam prof. dr. Davidu Stoparju za mentorstvo, pomoč in usmeritve pri izdelavi diplomskega dela. Posebna zahvala gre tudi moji somentorici dr. Tjaši Danevčič, ki je bila potrežljiva z mano in veliko pripomogla k mojemu delu ter vsem ostalim članom kolektiva na Katedri za mikrobiologijo Biotehniške fakultete, ki so mi kakorkoli pomagali in me spodbujali. Zahvaljujem se tudi prof. Darji Žgur-Bertok za strokovni pregled diplomskega dela.

Zlasti pa bi se rad zahvalil svojim staršem, bratu, ostalim družinskim članom ter prijateljem, ker so mi veliko pomagali in verjeli vame tekom študija.

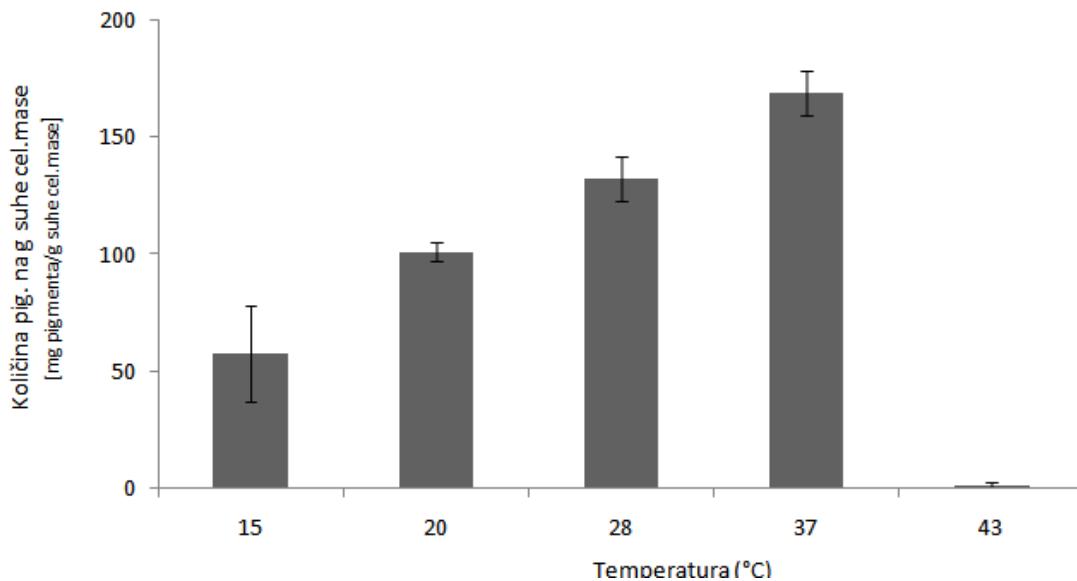
PRILOGE



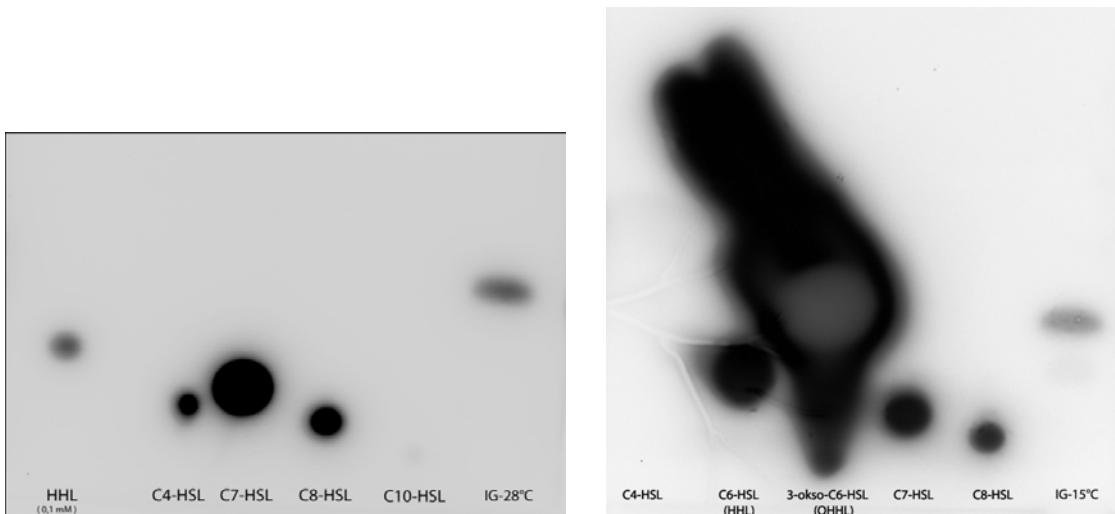
Priloga A: Primer VIS absorpcijskega spektra ekstrakta pigmenta v acetonu (pH7), izoliranega iz celic rožnate mutante *Vibrio* sp. DSM 14379, ki so rasle v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl pri 28 °C.

Priloga B1: Količina pigmenta na gram suhe celične mase prekonočne kulture divjega tipa *Vibrio* sp. DSM14379 gojene v gojišču AB pri petih različnih temperaturah inkubacije. Opravili smo tri ponovitve. V preglednici so zapisane meritve ter standardne deviacije (SD) ponovitev.

Temperatura (°C)	Količina pigmenta [mg pig/g suhe cel.mase]	SD
15	57,74	20,40
20	101,33	4,19
28	132,40	9,50
37	169,32	9,68
43	1,42	1,13



Priloga B2: Graf prikazuje vpliv temperature na produkcijo rdečega prigmenta pri naravnem izolatu *Vibrio* sp.



Priloga C: TLC plošči z različnimi tipi AHL molekul. TLC plošči smo po razvijanju v mediju metanol/ MQ voda (60:40, V/V) za vizualizacijo prelili s poročevalskim sevom *E. coli* JM109/pSB401 v LB Tc ter inkubirali na 37 °C 24 ur.

Od leve proti desni smo nanesli pet različnih AHL standardov (5 μ l) in preučevani vzorec, 200-krat koncentriran ekstrakt signalnih molekul pridobljen pri prekonočnem gojenju (16 ur) divjega tipa bakterije *Vibrio* sp. v gojišču PKS pri 28°C oziroma 15°C (50 μ l).

LEGENDA:

C₄-HSL (butiril-DL-homoserin lakton): 10 mM

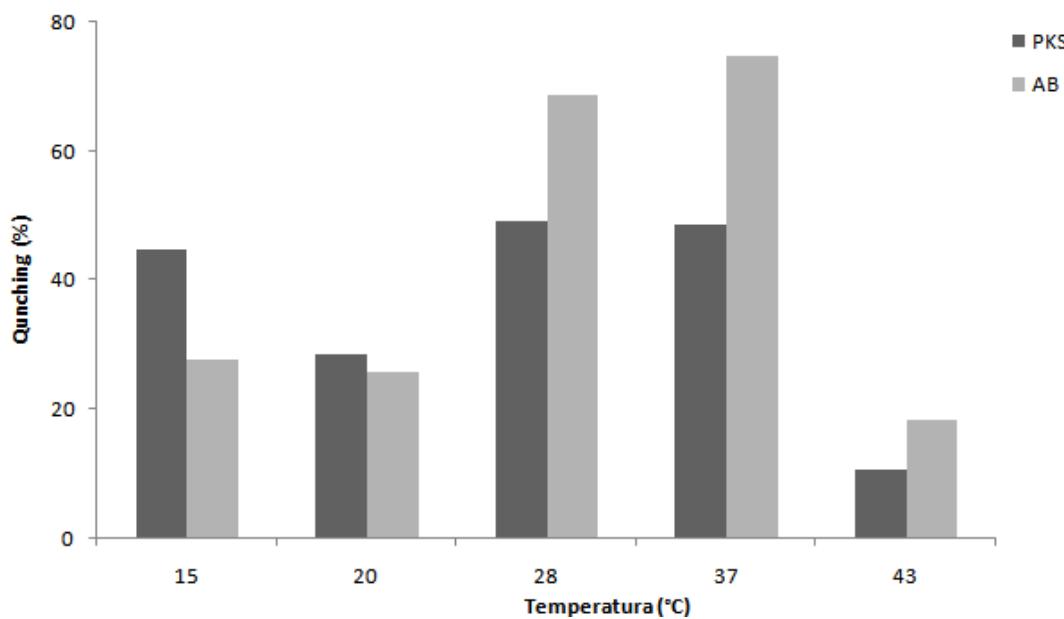
C₆-HSL (N-heksanoil-DL-homoserin lakton) - HHL: 0,1 mM oz. 1 mM

3-okso-C₆-HSL (N-(β -ketokaproil)-L-homoserin lakton)-OHHL: 10 mM

C₇-HSL (N-heptanoil-DL-homoserin lakton): 10 mM

C₈-HSL (N-oktanoil-DL-homoserin lakton): 10 mM

C₁₀-HSL (N-dekanoil-DL-homoserin lakton): 10 mM



Priloga D: Vpliv dodatka IG na bioluminiscenco pri poročevalskem sevu bakterije *E. coli* JM109. Dušenje bioluminiscence pri poročevalskem sevu *E. coli*, "na račun" snovi prisotnih v IG, smo določili tako, da smo poleg vzorcev vzporedno izmerili bioluminiscenco istih vzorcev, vendar z dodano znano količino sintetičnih signalnih molekul OHHL (konc. 1,56 µM). Iz razlike v dobljenem signalu smo izračunali delež zmanjšanja bioluminiscence (Q) in rezultate prikazali v odstotkih. Preverjali smo vpliv IG pridobljenih iz dveh različnih gojišč, PKS in AB.

$$Q = \frac{(IG \text{ z OHHL} - IG)}{\text{samo gojišče z OHHL}} \times 100, (\%)$$