

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nejc STARIČ

**VPLIV OKOLJSKIH FAKTORJEV  
NA PRODUKCIJO BARVILA NARAVNEGA  
IZOLATA *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nejc STARIČ

**VPLIV OKOLJSKIH FAKTORJEV NA PRODUKCIJO BARVILA  
NARAVNEGA IZOLATA *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PIGMENT  
PRODUCTION IN A NATURAL ISOLATE *Vibrio* sp.**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 16.6.2006 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja in za recenzenta doc. dr. Hrvoja Petkovića.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Recenzent: doc.dr. Hrvoje Petković

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Hrvoja Petković

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nejc Starič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22 + 579.26 : 582.231 : 547.97(043) = 863
KG	<i>Vibrio</i> sp./pigmenti/barvila/naravna barvila/prodigionini/prodigiozin/produkcija pigmenta/vpliv temperature/vpliv slanosti/vpliv vira ogljika
AV	STARIČ, Nejc
SA	STOPAR, David (mentor) / PETKOVIČ, Hrvoje (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	VPLIV OKOLJSKIH FAKTORJEV NA PRODUKCIJO BARVILA NARAVNEGA IZOLATA <i>Vibrio</i> sp.
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 37 str., 15 sl., 5 pril., 32 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Rdeči pigment, prodigiozin, je eden izmed prodigioninov, ki jih proizvajajo nekatere vrste bakterije <i>Serratia</i> , aktinomicete in druge bakterije. Prodigiozini so zanimivi zaradi svojih imunosupresivnih, protibakterijskih in protiglivnih učinkov. V diplomskem delu smo preučevali vpliv različnih okoljskih faktorjev na produkcijo prodigiozina pri rdeče pigmentirani bakteriji <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, izolirani iz priobalnih voda severnega Jadranskega morja. V ta namen smo bakterijo gojili v gojišču s pepton-kvasnim ekstraktom pri različnih slanostih (0,5-10 % (w/V) NaCl), pri različnih temperaturah (15-43 °C) in v minimalnem gojišču z različnimi viri ogljika ter z različnimi koncentracijami glukoze (1-50 g/L). Spremljali smo tudi produkcijo pigmenta tekom rasti. Rdeči pigment smo iz bakterijskih celic ekstrahirali z acetonom in spektrofotometrično analizirali. Rezultati kažejo, da imajo vsi preučevani faktorji vpliv na produkcijo pigmenta. Največ pigmenta je bakterija proizvedla pri 3 % (w/V) NaCl, pri 28 °C in pri koncentraciji glukoze 5 g/L. Pokazali smo tudi, da je prodigiozin sekundarni metabolit bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.22 + 579.26 : 582.231 : 547.97(043) = 863
CX	<i>Vibrio</i> sp./pigments/biological pigments/prodiginines/ prodigiosin/pigment production/effect of temperature/effect of salinity/effect of carbon source
AU	STARIČ, Nejc
AA	STOPAR, David (supervisor) / PETKOVIČ, Hrvoje (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2007
TI	INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PIGMENT PRODUCTION IN A NATURAL ISOLATE <i>Vibrio</i> sp.
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 37 str., 15 sl., 5 pril., 32 vir.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Red pigment prodigiosine is one of prodiginines, produced by <i>Serratia</i> sp., actinocetes and other bacteria. Prodigiosins are known to have antibacterial, cytotoxic and immunosuppressive activities. In this study, red pigmented bacterium <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, isolated from the estuarine waters in the Northern Adriatic Sea was used to study the effect of different environmental factors on bacterial pigmentation. <i>Vibrio</i> sp. was grown aerobically in a peptone-yeast extract medium at different salinities (0.5-10 % (w/V) NaCl) and at different temperatures (15-43 °C). In addition, <i>Vibrio</i> sp. was grown in a mineral medium with different glucose concentrations (1-50 g/L). The red pigment was extracted from bacterial cells with acetone and analysed spectrophotometrically. The results suggest that salt, temperature and concentration of glucose influenced pigment synthesis. The highest pigment production was obtained at 3 % (w/V) NaCl, 28 °C and 5 g/L glucose. The results indicate that prodigiosine is a secondary metabolite of <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PRODIGIONINI – PRODIGIOZIN.....	3
2.2 PRODUKCIJA PRODIGIOZINA PRI BAKTERIJAH.....	4
2.3 VPLIVI DEJAVNIKOV OKOLJA NA PRODUKCIJO BARVILA .....	6
<b>2.3.1 Vpliv temperature .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Vpliv slanosti.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.3 Vpliv hranil .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.4 Vpliv ostalih faktorjev.....</b>	<b>7</b>
2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE PRODIGIOZINA.....	7
2.5 BIOLOŠKA AKTIVNOST PRODIGIOZINA IN SORODNIH SPOJIN .....	8
<b>2.5.1 Verjetne ekološke funkcije.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5.2 Farmakološke lastnosti .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5.3 Prodigiozini v industriji .....</b>	<b>9</b>
2.6 METODE EKSTRAKCIJE IN DETEKCIJE PIGMENTA .....	10
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIALI .....	11
<b>3.1.1 Kemikalije .....</b>	<b>11</b>

<b>3.1.2</b>	<b>Sestava gojišč .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Bakterijski sev.....</b>	<b>12</b>
3.2	GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR.....	12
<b>3.2.1</b>	<b>Spremljanje vpliva slanosti.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Spremljanje vpliva različnih virov ogljika.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Spremljanje vpliva različne koncentracije glukoze.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Spremljanje vpliva temperature .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Ugotavljanje produkcije pigmenta med rastjo .....</b>	<b>14</b>
3.3	EKSTRAKCIJA, DETEKCIJA IN VREDNOTENJE PIGMENTA .....	14
<b>3.3.1</b>	<b>Ekstrakcija pigmenta .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Detekcija pigmenta.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Vrednotenje suhe celične mase.....</b>	<b>15</b>
3.4	IZRAČUNI IN STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	15
<b>3.4.1</b>	<b>Integriranje spektrov .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Statistična obdelava podatkov .....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>16</b>
4.1	VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO PIGMENTA.....	16
4.2	VPLIV TEMPERATURE NA PRODUKCIJO PIGMENTA.....	19
4.3	VPLIV VIRA OGLJIKA NA PRODUKCIJO PIGMENTA .....	20
<b>4.3.1</b>	<b>Produkcija pigmenta pri različnih virih ogljika.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Produkcija pigmenta pri različnih koncentracijah glukoze.....</b>	<b>24</b>
4.4	PRODUKCIJA PIGMENTA GLEDE NA FAZE RASTI BAKTERIJSKE KULTURE .....	26
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>29</b>
5.1	PRODUKCIJA PIGMENTA V STRESNIH POGOJIH.....	29
5.2	VPLIV RAZLIČNIH VIROV OGLJIKA NA PRODUKCIJO PIGMENTA .....	30
5.3	SPREMINJANJE PRODUKCIJE PIGMENTA TEKOM RASTI.....	30
5.4	SKLEPI.....	32
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>33</b>

<b>7 VIRI .....</b>	<b>34</b>
---------------------	-----------

**ZAHVALA**

**PRILOGE**



## KAZALO SLIK

Slika 1:	Prodigiozin in sorodne spojine (Bennet in Bentley, 2000).	4
Slika 2:	Kolonije bakterije <i>Serratia marcescens</i> (Fürstner in sod., 2003) in <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (Starič, 2007) na plošči.	5
Slika 3:	Vpliv slanosti na produkcijo pigmenta pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	16
Slika 4:	Vpliv slanosti na obarvanost kulture bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v gojišču.	17
Slika 5:	VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibro</i> sp., gojenih pri različnih slanostih.	18
Slika 6:	Vpliv temperature na produkcijo pigmenta pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	19
Slika 7:	VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibro</i> sp., gojenih pri različnih temperaturah.	20
Slika 8:	Vpliv različnih virov ogljika na produkcijo pigmenta pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	21
Slika 9:	Vpliv vira ogljika na obarvanost kulture bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v gojišču.	22
Slika 10:	VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibro</i> sp., gojenih z različnimi enostavnimi viri ogljika.	23
Slika 11:	Vpliv različnih koncentracij glukoze na produkcijo pigmenta pri <i>Vibrio</i> sp. DSM14379.	24
Slika 12:	Vpliv koncentracije glukoze na obarvanost kulture bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v gojišču.	25
Slika 13:	VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibro</i> sp., gojenih pri različnih koncentracijah glukoze.	26
Slika 14:	Spremljanje rasti kulture bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 skozi čas.	27
Slika 15:	VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije <i>Vibro</i> sp.	28

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Vpliv koncentracije NaCl na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS.
- Priloga A2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS pred ekstrakcijo.
- Priloga B1: Vpliv temperature na produkcijo pigmenta *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS.
- Priloga B2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, gojenih pri različnih temperaturah v gojišču PKS pred ekstrakcijo.
- Priloga C1: Vpliv različnih virov ogljika na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14397 v gojišču M9 z dodanim enostavnim virom ogljika.
- Priloga C2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, gojenih pri različnih virih ogljika v gojišču M9 pred ekstrakcijo.
- Priloga D1: Vpliv koncentracije glukoze na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču M9.
- Priloga D2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, gojenih pri različnih koncentracijah glukoze v gojišču M9 pred ekstrakcijo.
- Priloga E1: Spremljanje produkcije pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379 med rastjo v gojišču PKS.
- Priloga E2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, med rastjo v gojišču PKS pred ekstrakcijo.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
$M_w$	Molekulska masa
OD <sub>650</sub>	Optična gostota pri 650 nm
PKS	Pepton kvasni ekstrakt
VIS	Vidni spekter
V/V %	Volumsko – volumski odstotki
w/V %	Utežno – volumski odstotki

## 1 UVOD

Mikroorganizmi proizvajajo veliko različnih pigmentov. Ti so pomembni za zaščito in preživetje mikrobov. Rjavi pigmenti melanini, ki jih proizvaja veliko bakterijskih vrst, ščitijo celice pred izsušitvijo in pred UV sevanjem (Margalith, 1992). Sinteza karotenoidov omogoča zaščito bakterij pred foto-oksidacijo in pred poškodbami, ki jih povzroči vidna svetloba (Griffiths in sod., 1955). Več bakterijskih pigmentov deluje kot antagonisti proti drugim organizmom. Violacein, vijoličen pigment bakterije *Chromobacterium violaceum*, je poznan po svoji protibakterijski aktivnosti (Lichstein in Van de Sand, 1945). Pigmenti fenazini, ki jih proizvajajo sevi bakterijskih vrst *Pseudomonas* in *Streptomyces*, so prav tako poznani protibakterijski agensi (Egan in sod., 2002).

Zgoraj našteje funkcije bakterijskih pigmentov jim dajejo tudi možnosti za uporabo v biotehnologiji. Glede na to, da je veliko pigmentov sekundarnih metabolitov, je tudi njihovo pridobivanje v večjih količinah ekonomsko ugodno. Znane so na primer »anti-fouling« lastnosti bakterijskih pigmentov (Egan in sod., 2002), kar jim omogoča uporabo v ladjedelstvu. Velik potencial imajo pigmenti mikrobnega izvora tudi v tekstilni industriji (Chiba in sod., 2006).

Rdeči pigment, prodigiozin, je eden izmed prodigioninov, ki jih proizvajajo nekatere vrste bakterije *Serratia*, aktinomicete in druge bakterije (Grimont in Grimont, 1978). To je linearni tri pirol in tipični sekundarni metabolit, ki se pojavlja v poznejših stopnjah bakterijske rasti (Williams in sod., 1971). Prodigiozini nimajo definirane fiziološke funkcije pri produkcijskih sevih. Poznana je njihova proti glivna, proti bakterijska, imunosupresivna in proti tumorska aktivnost (Fürstner, 2003; Giri in sod., 2004).

### 1.1 NAMEN DELA IN OPREDELITEV PROBLEMA

Morski izolat bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 (zelo verjetno gre za novo vrsto) so pred šestimi leti izolirali na Katedri za mikrobiologijo, BF. Opazili so, da v gojišče izloča

pigment z do tedaj še ne poznanimi lastnostmi in učinki. Kasneje so preizkušali različne lastnosti tega pigmenta. Poleg določenih proti bakterijskih učinkov so ugotovili tudi, da se pigment močno veže na različne plastične materiale.

Namen diplomske naloge je pokazati kako izbrani okoljski dejavniki:

- koncentracija NaCl v gojišču
- temperatura inkubacije
- viri ogljika

plovlivajo na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp.

Vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo pigmenta smo določili z merjenjem absorpcijskega spektra ekstrahiranega pigmenta.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Znano je, da je sinteza pigmentov rastno pogojena, zato smo sklepali, da:

- je produkcija pigmenta odvisna od faze rasti, v kateri so bakterije
- glede na optimalo slanost rasti zvišanje ali znižanje slanosti zmanjša produkcijo barvila,
- glede na optimalno temperaturo rasti zvišanje ali znižanje temperature zmanjša produkcijo barvila,
- se produkcija pigmenta spreminja s spreminjanjem vira ogljika (npr. glukoza, fruktoza, glutamat),
- se produkcija pigmenta spreminja s spreminjanjem koncentracije glukoze kot edinega vira ogljika.

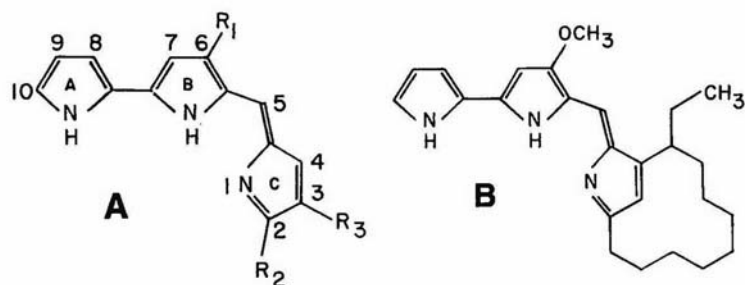
## 2 PREGLED OBJAV

Veliko različnih bakterij sintetizira pigmente. V zraku najdemo ponavadi rumene in rožnate Gram-pozitivne mikrokoke, v rečnih izolatih najdemo več različnih barv, prevladujejo bakterije vrst *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Chromobacteria*, *Serratia* in *Pseudomonas*. Karotenoidi so široko razširjeni med bakterijami in igrajo pomembno vlogo pri zaščiti pred škodljivimi učinki svetlobe. Rdeči in modri pigmenti cianobakterij so pomembni pri fotosintezi. V izolatih talnih bakterij najdemo pigment violacein, zanj domnevajo, da ima za bakterijo vlogo zaščite pred bakteriofagnimi protozoji in nematodi. Zelo pogosto najdemo rdeče pigmentirane bakterije, ki imajo prodigiozinu podobne pigmente (Moos, 2002)

### 2.1 PRODIGIONINI – PRODIGIOZIN

Večina do sedaj objavljenih študij, povezanih s prodigiozini je bila opravljena na bakteriji *Serratia marcescens*, medtem ko je produkcija prodigionina pri *Vibrio* sp. in drugih morskih bakterijah slabše raziskana (Williamson in sod., 2006).

Glavni pigment bakterije *Serratia marcescens*, prvotno imenovan prodigiozin, je bil izoliran leta 1902 (Bennet in Bentley, 2000). Njegova linearna tri pirolna struktura je bila razkrita v šestdesetih letih z delno in popolno sintezo (Williamson in sod., 2006). Prodigiozin kot ga poznamo sedaj,  $C_{20}H_{25}N_3O$ , ima nenavadno strukturo s tremi pirolnimi obroči in je piril dipiril meten. Dva obroča sta direktno povezana med seboj, tretji pa je pripet z metenskim mostičkom (Gerber, 1975).



Struktura I A	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Prodigiozen	H	H	H
Prodigionin	CH <sub>3</sub> O	H	H
Norprodigiozin	HO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
Prodigiozin	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
Undecilnorprodigiozin	HO	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	H
Undecilnorprodigiozin	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	H

#### Struktura I B

Metacikloprodigiozin ima podobno strukturo, vendar z butilnim substituentom ter s samo sedmimi CH<sub>2</sub> skupinami v obroču.

**Slika 1: Prodigiozin in sorodne spojine (Bennet in Bentley, 2000).**

Prodigiozin oblikuje svetleče kristale v obliki kvadratnih piramid, ki so temno rdeče barve z zelenim odsevom. Hidroklorid prodigiozina C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>O oblikuje kristale škrlatne barve (Bennet in Bentley, 2000).

## 2.2 PRODUKCIJA PRODIGIOZINA PRI BAKTERIJAH

Biosnteza prodigiozina je sestavljena iz dveh poti, ki privedeta do encimske kondenzacije končnih produktov teh dveh poti. To sta 2-metil-3-n-amil-pirol (MAP) in 4-metoksi -2,2'-bipirol-5-karbaldehid (MBC) (Williamson in sod., 2006)

Veliko sevov bakterije *Serratia marcescens* sintetizira prodigiozin. Proizvodnja pigmenta s to bakterijo ima dolgo in pisano zgodovino. Prodigiozin – producirajoča baktrija *S.*

*marcescens* je bila uporabljena kot označevalec pri modeliranju razširjanja bakterij pri biološkem vojskovanju. Ista bakterija naj bi bila kriva tudi za čudežni pojav "krvavitve" kruha med verskimi obredi (Williamson in sod., 2006). Najbolj znan tak primer je »Čudež pri Bolseni«, ki se je zgodil leta 1236 blizu Italijanskega mesta Bolsena, severno od Rima. V cerkvi Svete Kristine je duhovnik je med maševanjem opazil kako »kri« kaplja iz hostije (Fürstner in sod., 2003).



**Slika 2: Kolonije bakterije *Serratia marcescens* (Fürstner in sod., 2003) (levo) in *Vibrio* sp. DSM14379 (desno) na plošči (Starič, 2007).**

Prodigionini so bili uporabljeni tudi kot modelni sekundarni metaboliti zaradi njihove vidne obarvanosti. Gre za klasični sekundarni metabolit, ki se pojavlja samo v poznejših stopnjah bakterijske rasti (Williamson in sod., 2006). *Vibrio ruber* sp. nov. tvori rdeče obarvane kolonije na gojišču. Aceton-metanolni ekstrakt barvila ima absorpcijski maksimum pri 535 nm. Z infrardečo spektroskopijo so pokazali, da gre za prodigiozin, podoben tistemu pri *V. gazogenes* (Shieh in sod., 2003).



## 2.3 VPLIVI DEJAVNIKOV OKOLJA NA PRODUKCIJO BARVILA

Sinteza prodigionina se odziva na številne fiziološke in okoljske faktorje. Ti vključujejo: temperaturo, založenost s kisikom, pH, svetlobo, ionsko jakost. Znano je, da poleg spreminjanja virov ogljika in dušika, vplivajo na produkcijo prodigionina tudi dostopnost anorganskega fosfata, soli, detergenti, različni anioni in kationi (Williamson in sod., 2006).

### 2.3.1 Vpliv temperature

Sinteza prodigiozina pri sevih bakterije *Serratia marcescens* je največja med 20 in 25 °C, čeprav je optimalna temperatura za rast bakterije 37 °C. Encim, ki katalizira zadnjo stopnjo v sintezi pigmenta je zelo temperaturno občutljiv (Farrell in Rose, 1967). Drugi viri navajajo nekoliko drugačne temperature. Optimalno produkcijo pigmenta (pri *S. marcescens*) so tako opazili pri 28 °C. Odvisno od medija se produkcija pigmenta ustavi pri 30 °C v bogatem gojišču oziroma pri 42 °C (gojišče z maščobnimi kislinami) (Giri in sod., 2004).

### 2.3.2 Vpliv slanosti

Študij vpliva okoljskih faktorjev na produkcijo prodigiozina pri bakteriji *Vibrio gazogenes* je pokazal, da s povečevanjem slanosti do 600 mM NaCl narašča tudi koncentracija pigmenta v kulturi. Najboljšo rast *V. gazogenes* so opazili pri 100 mM koncentraciji NaCl (Allen in sod., 1983).

### 2.3.3 Vpliv hranil

Optimalno rast in produkcijo pigmenta pri bakteriji *Vibrio gazogenes* so zaznali pri 3 % (w/V) koncentraciji glukoze v gojišču. Pri koncentracijah nad 3 % (w/V) se je produkcija pigmenta znižala, rast celic je ostala nespremenjena (Allen in sod., 1983).

Sev bakterije *S. marcescens* S389, je na gojišču z etanolom dajal do 3 mg mL<sup>-1</sup> prodigiozina. Ob tem v gojišču ni bilo anorganskega fosfata in NaCl. Ta izplen barvila je bil približno 200-krat večji od prej znanih (Cang in sod., 2000).

Za *Vibrio gazogenes* so ugotovili, da so pri rasti v kompleksnem mediju, najvišje koncentracije pigmenta (80 ng (mg proteina)<sup>-1</sup>) opazne po desetih urah inkubacije. V kemijsko definiranem gojišču (brez triptona, kvasnega ekstrakta in natrijevega hidrogen sulfata ter z dodanim kalijevim dihidrogen ortofosfatom in PABA (para-amino benzoična kislina) se je specifična koncentracija prodigiozina povečala za dvajsetkrat (Allen in sod., 1983).

#### 2.3.4 Vpliv ostalih faktorjev

Že pred časom so pri *S. marcescens* pokazali tudi pomen aeracije za produkcijo prodigiozina. S povečanjem aeracije so v tekočem gojišču dosegli večjo in hitrejšo produkcijo prodigiozina in L-asparagina (Heinemann in sod., 1970).

Kot pri mnogih sekundarnih metabolitih, je tudi biosinteza prodigioninov odvisna od faze rasti. Do najvišje produkcije prihaja od pomanjkanju hranil, ob stresu in ko celice vstopijo v stacionarno fazo (Williamson in sod., 2006).

### 2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE PRODIGIOZINA

Kompleksna regulacija sinteze prodigioninov vključuje fiziološke in okoljske signale. Tako bakterije vrste *Serratia* kot *Streptomyces* spp. sintetizirajo številne majhne signalne molekule, ki imajo vlogo v regulaciji sinteze prodigioninov. Pomembno vlogo pri igra mehanizem zaznavanja gostote. Kemični signali, ki jih proizvajajo bakterije, se akumulirajo s povečevanjem celične gostote dokler ni dosežen določen koncentracijski prag, ob katerem signalne molekule vzbudijo spremembe v izražanju tarčnih genov (Williamson in sod., 2006).

Pri bakteriji *Serratia* 39006 sestavljata quorum-sensing lokus gena *smal* in *smar* (Thomson in sod., 2000). Pri nizkih gostotah celic Smar reprimira transkripcijo skupine *pig* genov vsaj delno z reprimiranjem sinteze regulatorjev *pigR*, *rap* in *pigQ*. S povečevanjem gostote celic narašča tudi nivo C4-HSL/C6-HSL, ki inhibira DNA-vezavno aktivnost Smar. To pomeni sintezo PigQ, PigR in Rap proteinov, kar vodi v aktivacijo sinteze pigmenta (Slater in sod., 2003; Wasserman in sod., 1973).

## 2.5 BIOLOŠKA AKTIVNOST PRODIGIOZINA IN SORODNIH SPOJIN

### 2.5.1 Verjetne ekološke funkcije

Kot tipični sekundarni metaboliti, prodigiozin in sorodne spojine nimajo jasno definirane fiziološke funkcije v organizmih, ki jih proizvajajo. Možno je, da ima pigmentirana bakterija *S. marcescens* prednost v ekološki razširitvi (Burger in Bennett, 1985). Pokazali so korelacijo med barvnimi variacijami pri bakteriji *Serratia* sp. in količino flagelarnih antigenov. Očitna je ko-regulacija sinteze pigmenta in flagelina. Variacije teh površinskih antigenov lahko omogočajo patogenim sevom, da se izognejo imunskemu sistemu (Paruchuri in Harshey, 1987).

### 2.5.2 Farmakološke lastnosti

V zadnjih letih je bilo prodigiozinu pripisano veliko število zanimivih farmakoloških funkcij. Pri limfomu T-celic YAC-1, je undecil prodigionin močno zmanjšal vključevanje [<sup>3</sup>H]-acetata v lipidno frakcijo (Kataoka in sod., 1995). Inhibitorni efekt undecil prodigionina in acidifikacija intracelularnih organelov lahko razloži nekatere njegove imunosupresivne lastnosti (Bennet in Bentley, 2000).

Undecil prodigionin in meta cikloprodigiozin, izolirana iz bakterije *Streptomyces hirosimensis* sta močna inhibitorja namnožitve T-limfocitov (Nakamura in sod., 1989).

### 2.5.3 Prodigiozini v industriji

Pred razvojem sintetičnih kemičnih barvil je bil prodigiozin kratek čas v uporabi v komercialni proizvodnji za barvanje svile in volne (Bennet in Bentley, 2000).

V proizvodnji papirja predstavljajo problem nekatere rožnate bakterije, ki povzročajo nastanek rožnatih madežev na papirju. Poleg bakterije *S. marcescens*, domnevajo, da so to še bakterijske vrste *Serratia plymuthica*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus agilis* in *Alcaligenes viscosus* (Oppong in sod., 2000).

Rožnata obarvanost polivinil klorida, ki je posledica razrasta bakterij, je pogost pojav v industriji plastike. Do te obarvanosti prihaja na pohištvu, prekitem z vinilom, na vinilnih stenskih oblogah in vratih (Gerber in Stahly, 1975).

## 2.6 METODE EKSTRAKCIJE IN DETEKCIJE PIGMENTA

Metode, ki so jih v raziskavah uporabljali za ekstrakcijo pigmenta in za njegovo detekcijo so naslednje.

- Bakterijska vrsta *S. marcescens*, ekstrakcija z acetonom, analiza čistega pigmenta z masno spektroskopijo (Giri in sod., 2004).
- Bakterijska vrsta *S. marcescens*, ekstrakcija z mešanico acetona in 0,2 M citratnega pufru v razmerju 3:1, pri pH 3,0. Razredčitev supernatanta z 80 % (V/V) kislim (HCl) acetonom, pH 3, nato spektrofotometrična analiza pri valovni dolžini 535 nm (Cang in sod., 2000).
- Bakterijska vrsta *Vibrio gazogenes*, prekonočna ekstrakcija s kislim metanolom (4 mL 1M HCl in 96 mL metanola). Spektrofotometrična analiza supernatanta pri valovni dolžini 535 nm (Allen in sod., 1983).
- Bakterijska vrsta *Vibrio ruber* sp. nov., ekstrakcija z mešanico acetona in metanola v razmerju 7:2. UV spektrofotometrična analiza supernatanta v območju 300 do 800 nm (Shieh in sod., 2003).

Mi smo se odločili za ekstrakcijo pigmenta z acetonom in spektrofotometrično analizo ekstrakta v območju med 420 in 620 nm.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

- aceton  $C_3H_6O$   $M_w = 58,08$  (Merck, Nemčija)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- destilirana voda
- D-fruktoza  $C_6H_{12}O_6$   $M_w = 180,16$  (Fluka, Švica)
- D-glukoza  $C_6H_{12}O_6$   $M_w = 180,16$  (Kemika, Hrvaška)
- dinatrijev hidrogen fosfat  $Na_2HPO_4$   $M_w = 141,96$  (Merck, Nemčija)
- D-glutaminska kislina  $C_5H_9NO_4$   $M_w = 147,13$
- kalcijev klorid dihidrat  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   $M_w = 147,02$  (Zorka Šabac, Srbija in Črna Gora)
- kalijev dihidrogen fosfat  $KH_2PO_4$   $M_w = 136,09$  (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- magnezijev klorid heksahidrat  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$   $M_w = 203,3$  (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   $M_w = 246,48$  (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid  $NaCl$   $M_w = 58,5$  (Merck, Nemčija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- tripton (Biolife, Italija)

##### 3.1.2 Sestava gojišč

- gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt) (Gnezda-Meijer in sod., 2006):

5 g peptokompleks

1 g kvasni ekstrakt

2 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

1000 mL destilirane vode

za 0,5 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 5 g NaCl

za 1,76 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 17,6 g NaCl

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

za 5 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 50 g NaCl

za 10 % (w/V) NaCl v gojišče dodamo 100 g NaCl

- gojišče M9: 200 mL 5xM9 soli (64 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 150 g NaCl in 1000 mL destilirane vode)
  - 2 mL 1M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0,1 mL 1M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - vir ogljika v ustrezni koncentraciji
  - 750 mL destilirane vode

Za trdna gojišča dodamo 15 g agar-agar na 1 liter tekočega gojišča.

### 3.1.3 Bakterijski sev

- *Vibrio* sp. DSM14379 (Danevčič in sod., 2005; Gnezda-Meijer in sod., 2006; Odić in sod. 2007)

## 3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

Za študij vpliva različnih dejavnikov smo uporabljali bakterijski sev *Vibrio* sp. DSM14379. Gre za morski izolat iz Škocjanskega zatoka, ki za rast potrebuje NaCl.

Kulturo smo najprej nacepili iz trdnega gojišča PKS v tekoče gojišče PKS (5 mL) s 3 % (w/V) NaCl. Nato smo kulturo v eksponentni fazi rasti precepili (1% (V/V) inokulum) v 200 mL ustreznega gojišča v erlenmajerici. Delali smo v treh ponovitvah.

Kulturo *Vibrio* sp. smo ohranjali v viabilnem stanju tako, da smo jo enkrat tedensko precepili na sveže trdno gojišče PKS, jo inkubirali pri 28 °C 24 ur in hranili pri 4 °C en teden.

### **3.2.1 Spremljanje vpliva slanosti**

Bakterijski sev smo gojili aerobno v tekočem gojišču PKS z različnimi koncentracijami NaCl (0,5; 1,76; 3,5; 10 % (w/V) NaCl). Kulture smo gojili do stacionarne faze (OD<sub>650</sub> v prilogi) na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C v temi.

### **3.2.2 Spremljanje vpliva različnih virov ogljika**

Bakterijski sev smo gojili aerobno v minimalnem gojišču z različnimi viri ogljika, izbranimi glede na rast *Vibrio* sp. Ti viri ogljika so bili: glukoza (različne koncentracije), glutamat (10 g/L) in fruktoza (10 g/L). Poleg tega smo bakterijski sev gojili tudi v bogatem gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl in z 10 g/L glukoze. Kulture smo gojili do stacionarne faze (OD<sub>650</sub> v prilogi) na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C v temi.

### **3.2.3 Spremljanje vpliva različne koncentracije glukoze**

Bakterijski sev smo gojili aerobno v gojišču M9 z dodano glukozo v različnih koncentracijah (1, 5, 10 in 50 g/L). Kulture smo gojili do stacionarne faze (OD<sub>650</sub> v prilogi) na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 28 °C v temi.

### **3.2.4 Spremljanje vpliva temperature**

Bakterijski sev smo gojili aerobno v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl. Pri temperaturah 15, 20 in 43 °C smo kulture do stacionarne faze (OD<sub>650</sub> v prilogi) gojili v vodni kopeli s stresalnikom (Julabo Shake Temp SW22, Julabo Labtechnik GmbH, Nemčija) pri 200 vrtljajih na minuto. Pri temperaturah 28 in 37 °C smo kulture gojili na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto v termostatirani komori.



### **3.2.5 Ugotavljanje produkcije pigmenta med rastjo**

Za spremljanje produkcije pigmenta skozi faze rasti, smo kulturo v pozni eksponentni fazi rasti inokulirali v 400 mL gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl in gojili aerobno pri 28 °C, v temi, na stresalniku (Tehtnica Železniki EV-403, Slovenija) pri 200 vrtljajih na minuto. Hitrost rasti bakterijske kulture smo spremljali z meritvami OD na vsako uro.

Glede na rezultate meritev OD, ki so nam služili kot pokazatelj raastne faze, smo odvzeli štiri vzorce, na katerih smo opravili ekstrakcijo, spektrofotometrično analizo in jim določili suho celično maso. Prvi vzorec smo odvzeli po treh urah, drugega po petih, tretjega po sedmih in četrtega po 24 urah inkubacije.

Iz opravljenih analiz vzorcev smo za posamezne rastne faze določili količino pigmenta na mg suhe celične mase. Vse meritve in izračuni za posamezne vzorce so potekali enako kot pri vseh ostalih vzorcih.

## **3.3 EKSTRAKCIJA, DETEKCIJA IN VREDNOTENJE PIGMENTA**

### **3.3.1 Ekstrakcija pigmenta**

Pred začetkom ekstrakcije smo bakterijski kulturi po končani inkubaciji izmerili optično gostoto pri 650 nm ( $OD_{650}$ ) na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija).

Za ekstrakcijo smo iz gojišča s kulturo odvzeli po 1 mL vzorca za ekstrakcijo. Vzorec smo centrifugirali (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija) pri 8000 obr/min in temperaturi 4 °C, 10 minut. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 1mL acetona in dodatno premešali na vortexu ( Tehtnica Železniki, Vibromix 114, Slovenija). Ekstrakcija je potekala uro in pol na stresalniku z nastavkom za dvanajst mikrocentrifugirk pri 2600 obr/min. Po končani ekstrakciji smo vzorce spet centrifugirali pri 8000 obr/min in temperaturi 4 °C, 10 minut. Supernatant smo uporabili v naslednji stopnji – detekciji pigmenta.

### **3.3.2 Detekcija pigmenta**

Za spektrofotometrično analizo smo vzeli po 300  $\mu$ L supernatanta (ekstrakt v acetonu) in ga prenesli v mikrotitrne plošče. Spektre smo izmerili na (Multiscan Spectrum, Thermo, Finska) pri sobni temperaturi pri valovni dolžini od 420 do 620 nm. Za ničlitev smo uporabili čisto topilo – aceton.

### **3.3.3 Vrednotenje suhe celične mase**

Za določanje suhe celične mase smo iz gojišča s kulturo odvzeli 50 mL vzorca in ga centrifugirali na 4 °C pri 13000 vrtljajih na minuto, 10 minut (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili, pelet pa resuspendirali v 50 mL sterilne destilirane vode in ponovno centrifugirali na 4 °C pri 13000 vrtljajih na minuto, 10 minut. Supernatant smo odlili in pelet resuspendirali v 2 mL sterilne destilirane vode. 2 ml alikvot smo prenesli v Petrijeve plošče, katere smo predhodno stehali. Pokrite plošče smo sušili na zraku, pri 37 °C, do konstantne teže. Po končanem sušenju smo plošče s suho celično maso stehali. Iz razlike v masah smo izračunali suho celično maso.

## **3.4 IZRAČUNI IN STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV**

### **3.4.1 Integriranje spektrov**

Po končani spektrofotometrični analizi, smo dobljene spektre analizirali s programom OriginPro 7.5. Vsak spekter posebej smo integrirali, integral spektra nam je predstavljal površino, ki je proporcionalna količini pigmenta. Za primerjavo rezultatov smo rezultate normirali in izrazili površino spektra na mg suhe celične mase.

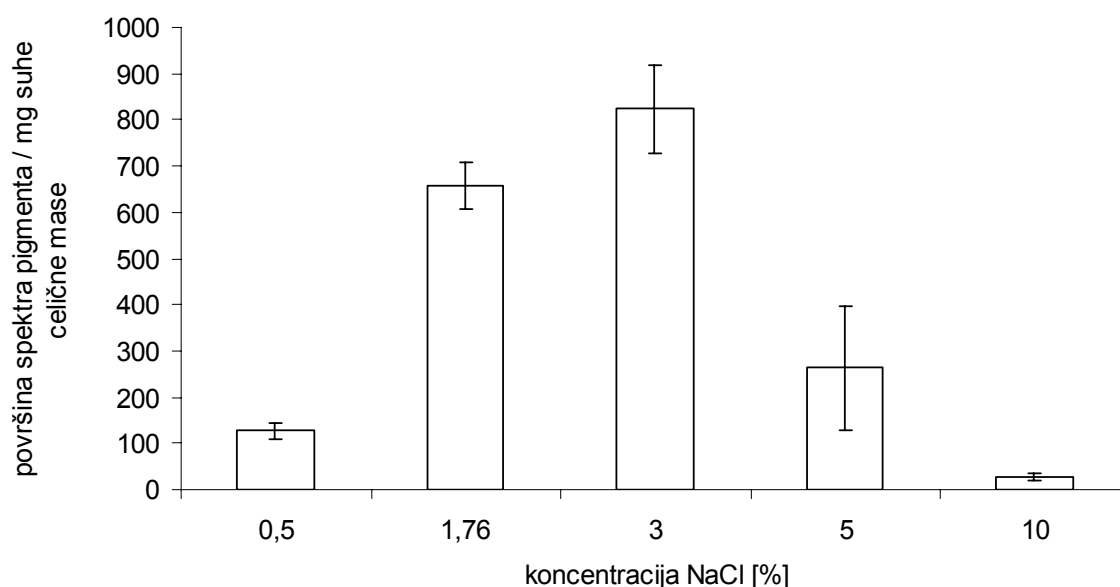
### **3.4.2 Statistična obdelava podatkov**

Vsi prikazani rezultati so povprečne vrednosti treh ali več neodvisnih meritev, ki so jim dodani standardni odkloni.

## 4 REZULTATI

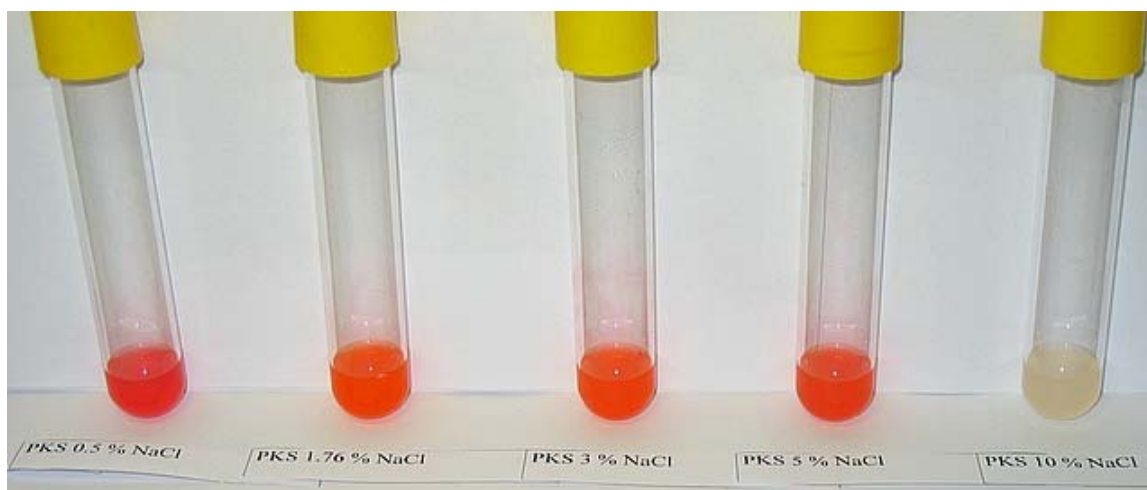
V diplomski nalogi smo postavili hipotezo, da na produkcijo pigmenta vplivajo okoljski dejavniki. Bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 smo gojili v gojiščih z različno slanostjo, pri različnih temperaturah in z različnimi viri ogljika.

### 4.1 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO PIGMENTA



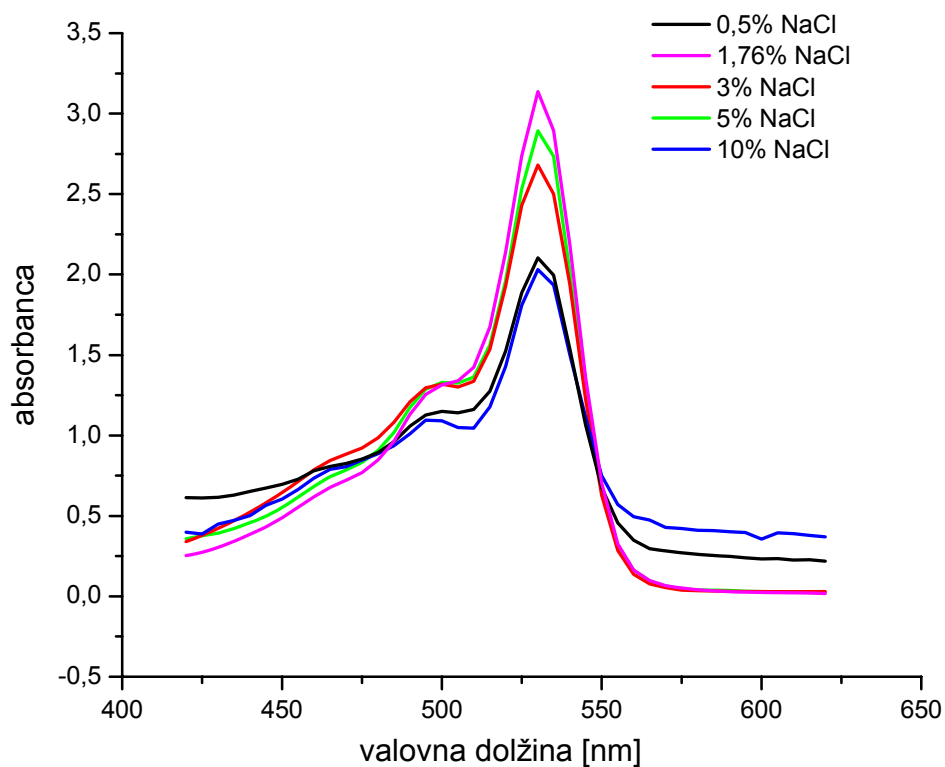
**Slika 3: Vpliv slanosti na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Rezultati so podani na miligram suhe celične mase. Koncentracija NaCl v gojišču PKS je izražena v w/V odstotkih. Pri vsaki koncentraciji smo opravili tri neodvisna gojenja in za vsako gojenje tri ekstrakcije in tri meritve spektra. Kulturo smo gojili pri 28°C.

Kot je razvidno iz slike 3, koncentracija NaCl v gojišču vpliva na produkcijo pigmenta. Produkcija pigmenta je najvišja pri 3 % (w/V) NaCl. Pri povišani oz. znižani koncentraciji produkcija močno pade. Bakterija pri 3 % (w/V) NaCl proizvede 31-krat več pigmenta kot pri 10 % (w/V) NaCl. Poleg različne koncentracije pigmenta v gojiščih z različno koncentracijo soli, je bila tudi obarvanost gojišč različna (slika 4).



**Slika 4: Vpliv slanosti na obarvanost kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču.** Na sliki so razvrščena gojišča PKS z dodanim NaCl s kulturo bakterije *Vibrio* sp.. Od leve proti desni si sledijo 0,5; 1,76; 3; 5 in 10 % koncentracije NaCl.

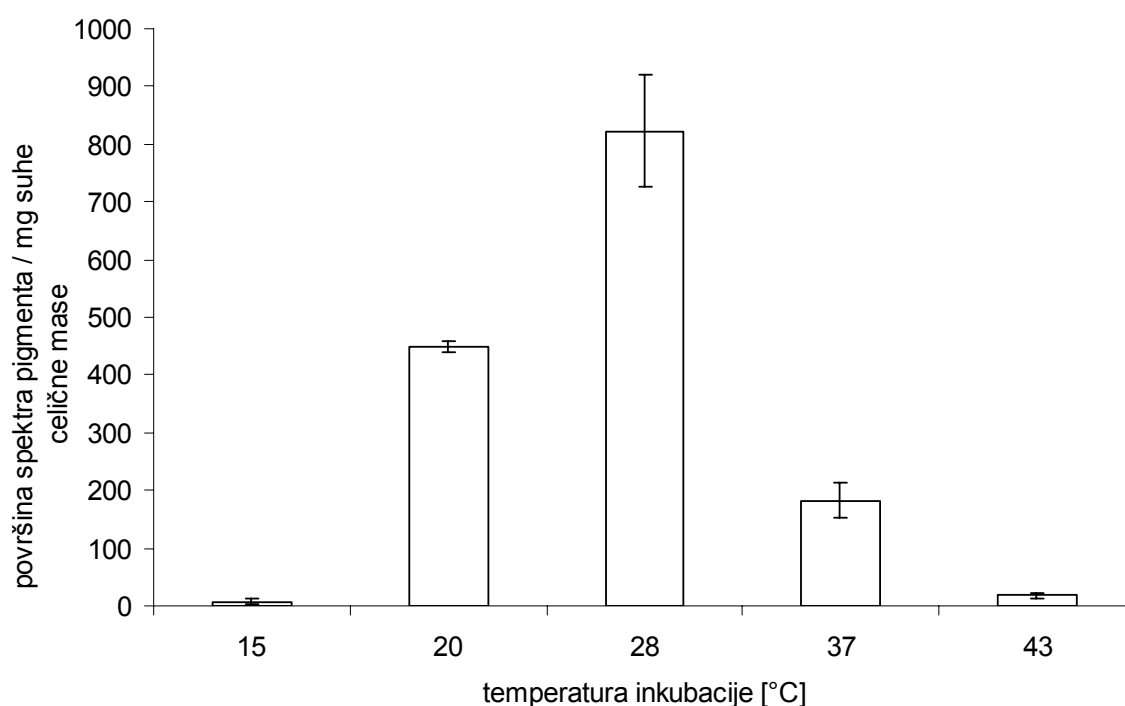
Kot je razvidno iz slike 5, so se razlike v obarvanosti kulture pokazale tudi po primerjavi spektrov, posnetih pri različnih slanostih. Ker so spektri normalizirani na enako površino, so razlike med posameznimi krivuljami posledica različne absorpcije pri različnih valovnih dolžinah. Pri vseh spektrih opazimo skupne vrhove pri valovni dolžini 460, 495 in 530 nm. Pri različnih slanostih se spreminja razmerje med temi tremi spektroskopskimi vrhovi. Poleg tega se opazno spreminja absorbanca pri nizkih in visokih valovnih dolžinah (<480 in >560 nm). Predvsem izstopata spektra pri 0,5 in 10 % (w/V) NaCl, ki absorbirata pri valovnih dolžinah >560 nm. Oba spektra sta bila pridobljena po predhodnem koncentriranju pigmenta.



**Slika 5: VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp., gojenih pri različnih slanostih.** Celice smo gojili v gojišču PKS z 0,5; 1,76; 3; 5 in 10 % (w/V) NaCl, pri temperaturi 28 °C. Spektri so bili normalizirani na enako površino (integral). Absorbanco smo izmerili v območju od 420 do 620 nm.

## 4.2 VPLIV TEMPERATURE NA PRODUKCIJO PIGMENTA

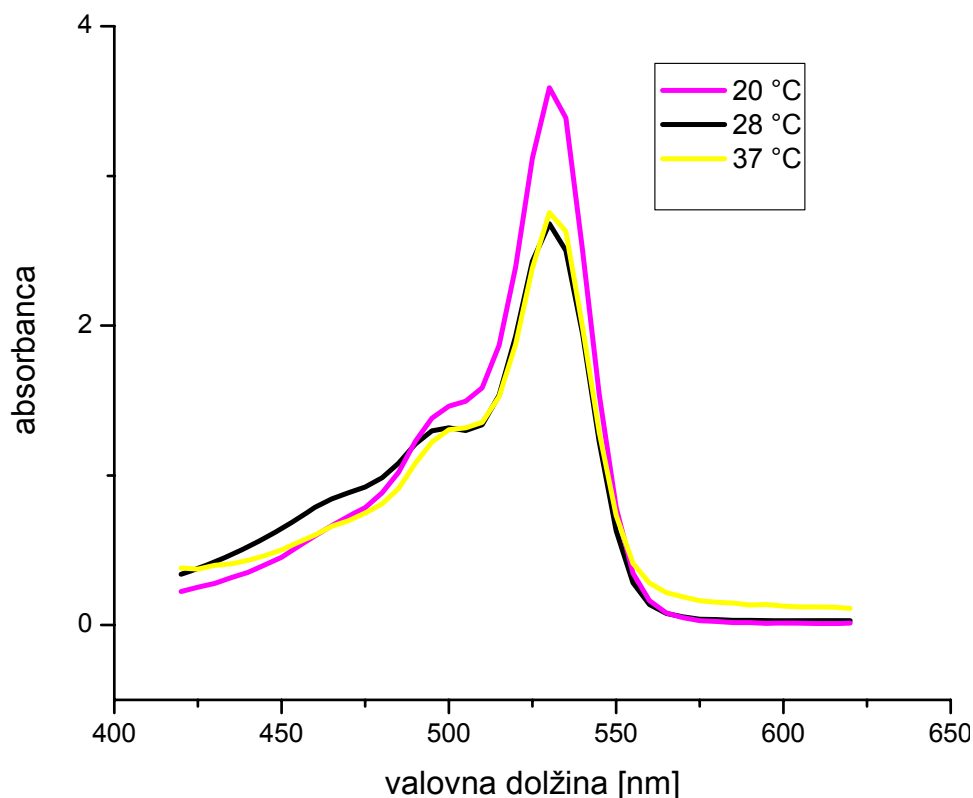
Kot je razvidno iz slike 6, ima temperatura zelo velik vpliv na produkcijo pigmenta. Največ pigmenta na celico opazimo pri temperaturi 28 °C. Pri močno znižani ali zelo povišani temperaturi obarvanosti skoraj ni opaziti. Bakterija *Vibrio* sp. lahko raste od 15 do 43 °C. Pri 28°C bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 proizvede 45-krat več pigmenta na enoto biomase kot pri 43 °C in kar 115-krat več kot pri 15 °C.



**Slika 6: Vpliv temperature na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Rezultati so podani na miligram suhe celične mase. Bakterije smo gojili v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl pri različnih temperaturah. Pri vsaki temperaturi smo opravili tri neodvisna gojenja in za vsako gojenje tri ekstrakcije in tri meritve spektra.

Opazne so bile tudi razlike v obarvanosti kultur po inkubaciji na različnih temperaturah. Kulture, inkubirane na 15 in 43 °C skoraj niso kazale rdečkaste obarvanosti, prevladala je obarvanost samih bakterijskih celic (bledo rumena, bela). Pri temperaturah 20, 28 in 37 °C so bile barve v različnih odtenkih rdečkaste z različno intenziteto.

Na sliki 7 vidimo razlike v obliki spektrov pri različnih temperaturah gojenja. Oblika spektrov je podobna kot pri spremembi slanosti. Pozicije spektroskopskih vrhov pri 460, 495 in 530 nm se s temperaturo ne spreminjajo. Spreminja pa se razmerje med njimi. Pri temperaturi 15 n 43 °C je bila koncentracija pigmenta prenizka za spektrofotometrično analizo.



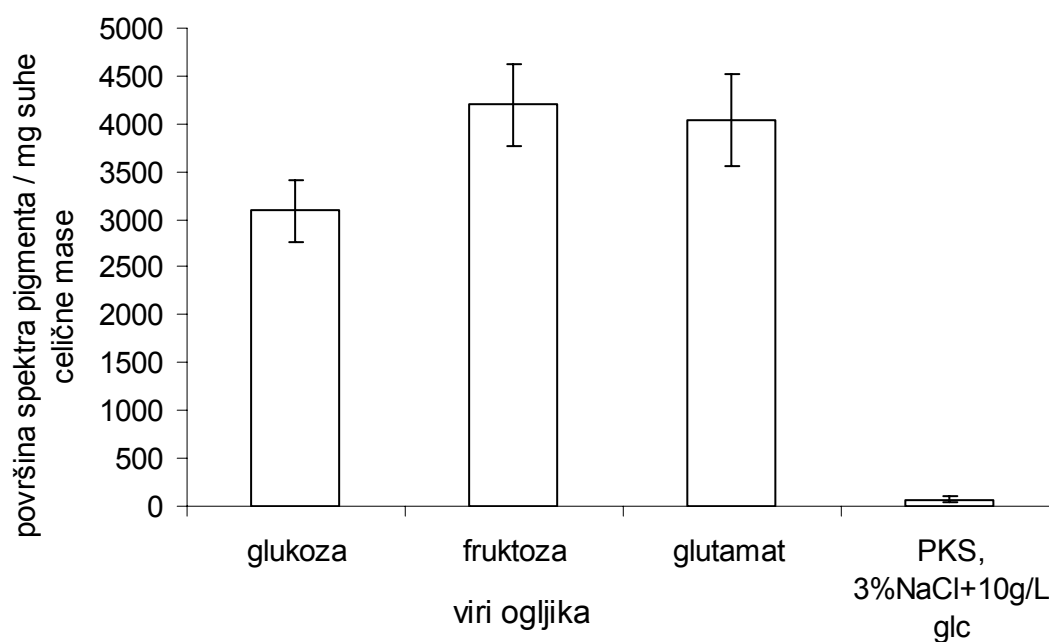
**Slika 7: VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibro* sp., gojenih pri različnih temperaturah.** Celice smo gojili v gojišču PKS s 3 % (w/V) pri različnih temperaturah. Spektri so bili normalizirani na enako površino (integral). Absorbanco smo izmerili v območju od 420 do 620 nm.

#### 4.3 VPLIV VIRA OGLJIKA NA PRODUKCIJO PIGMENTA

##### 4.3.1 Produkcija pigmenta pri različnih virih ogljika

Na sliki 8 vidimo, da različni enostavni viri ogljika v gojišču vplivajo na produkcijo pigmenta. Že na prvi pogled izstopa nizka produkcija pigmenta v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl in dodano glukozo v koncentraciji 10 g/L. V primerjavi z minimalnim gojiščem (M9)

je dodatek glukoze v bogato gojišče (PKS) zmanjšal produkcijo pigmenta za 12-krat. Dodatek fruktoze ali glutamata v minimalno gojišče (M9) je povečal produkcijo pigmenta glede na dodatek glukoze. Te razlike so vidne tudi kot različne obarvanosti kultur.



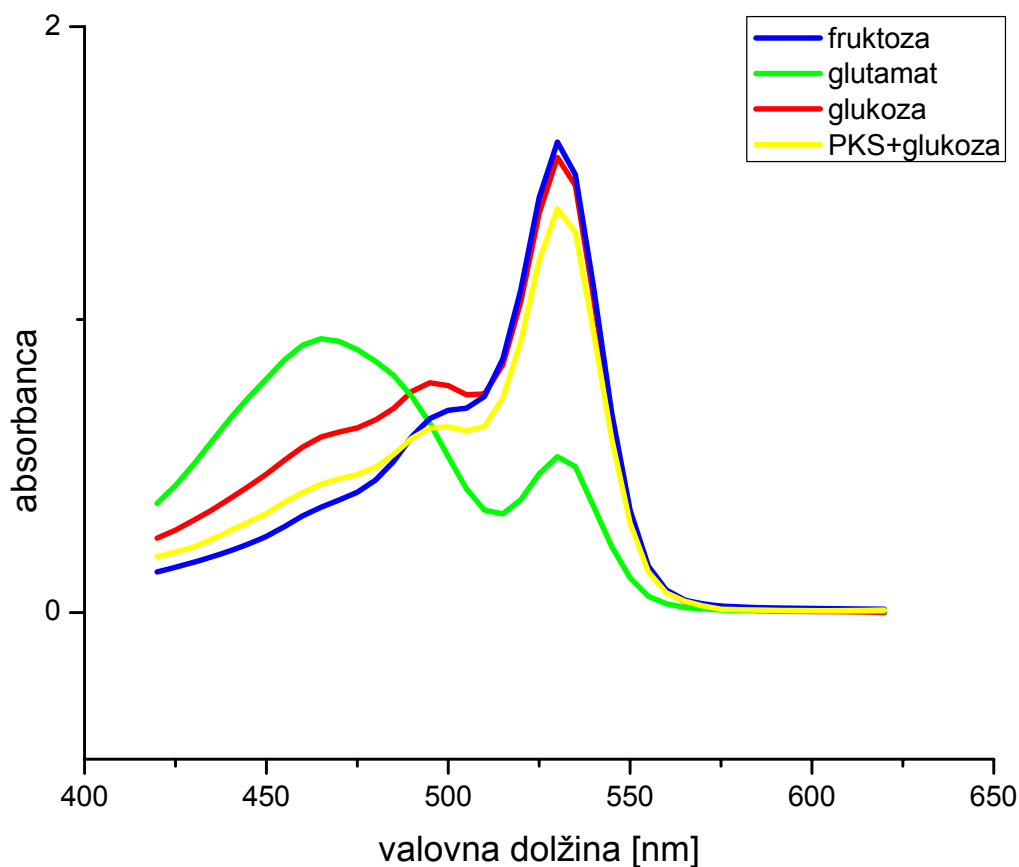
**Slika 8: Vpliv različnih virov ogljika na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Rezultati so podani na miligram suhe celične mase. Koncentracija dodane glukoze, fruktoze in glutamata v gojišču M9 je bila 10 g/L. Kot primerjava je dodan rezultat za gojišče PKS s tremi odstotki NaCl in 10 g/L glukoze. Vse kulture smo gojili pri 28 °C. Pri vsakem viru ogljika smo opravili tri neodvisna gojenja in za vsako gojenje tri ekstrakcije in tri meritve spektra.

Na sliki 9 vidimo razliko v obarvanosti kulture v gojišču z različnimi viri ogljika. Najbolj izstopa močno rožnata pri gojišču PKS z dodano glukozo. Pri teh pogojih je količina pigmenta na enoto suhe celične mase najmanjša.





**Slika 9: Vpliv vira ogljika na obarvanost kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču.** Na sliki so prikazana gojišča M9 s kulturo. Od leve proti desni si sledijo dodani viri ogljika; glukoza + PKS, fruktoza, glutamat in glukoza. Vsi v koncentraciji 10 g/L.

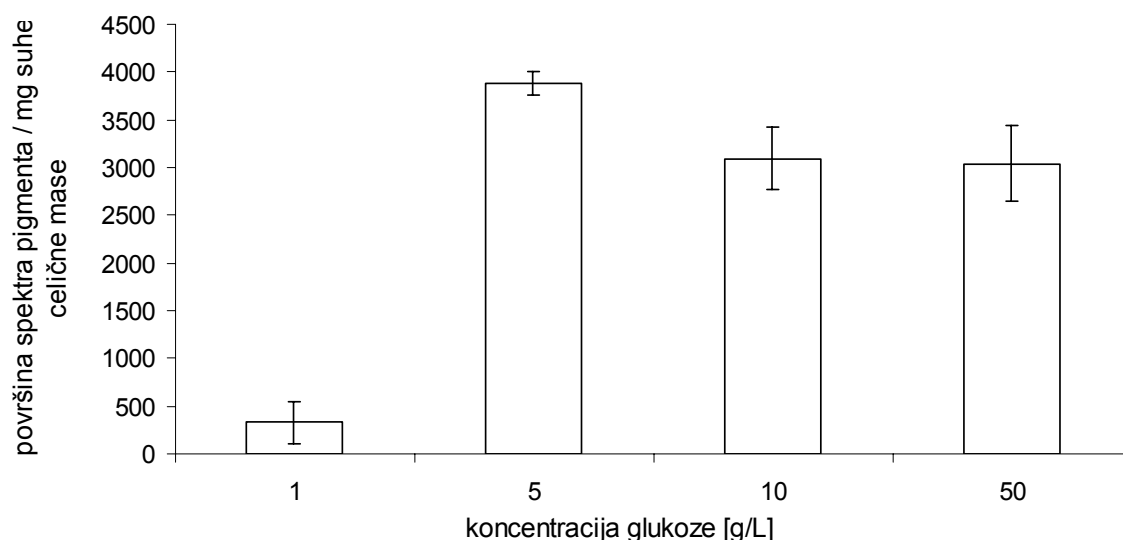


**Slika 10: VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibro* sp., gojenih z različnimi enostavnimi viri ogljika.** Celice smo gojili v gojišču M9 dodano fruktozo, glutamatom in glukozo pri temperaturi 28°C. Spektri so bili normalizirani na enako površino (integral). Absorbanco smo izmerili v območju od 420 do 620 nm.

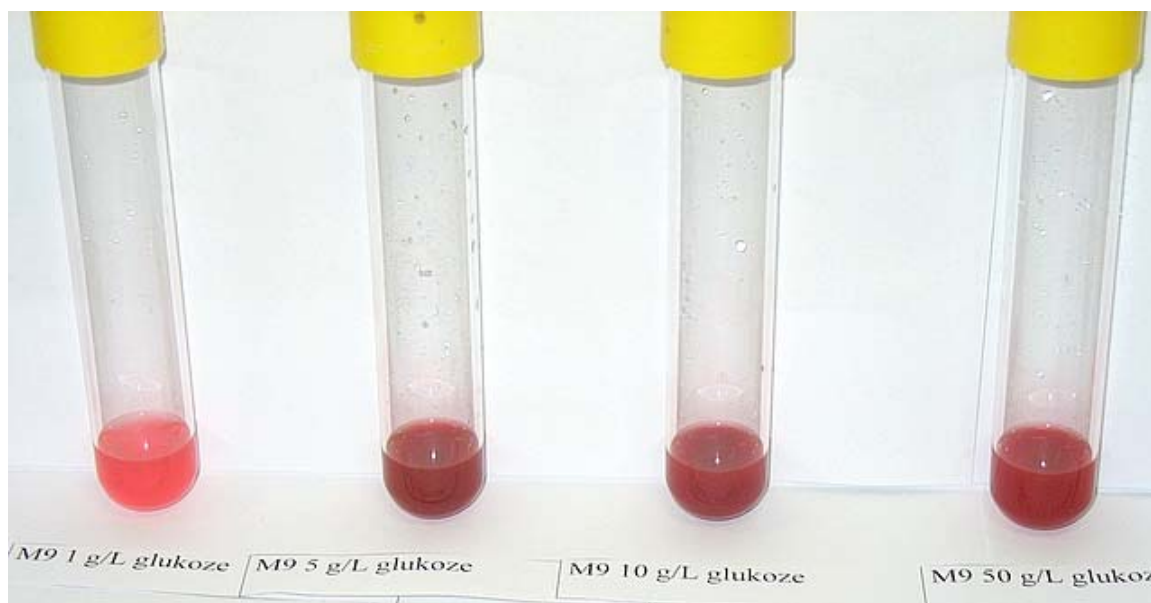
Večje razlike med posameznimi viri ogljika opazimo, če primerjamo posnete spektre (slika 10). Po obliki sta si najbolj podobna spektra pri glukozi v minimalnem in bogatem gojišču. Najbolj različen je spekter pri glutamatu kot viru ogljika. Pri različnih virih ogljika ostajajo vrhovi spektrov na enakih pozicijah (460, 495 in 530 nm), razmerja med njimi pa se signifikantno spreminjajo. Posebno je to opazno pri glutamatu, kjer je vrh pri 460 nm višji od tistega pri 530 nm.

### 4.3.2 Produkcija pigmenta pri različnih koncentracijah glukoze

Vpliv koncentracije glukoze je prikazan na sliki 11. Produkcija pigmenta je bila najvišja pri koncentraciji 5 g/L in najnižja pri koncentraciji 1 g/L. Tudi rast je bila pri koncentraciji 1 g/L slabša kot pri višjih koncentracijah, kar smo opazili pri merjenju OD<sub>650</sub> in pri določanju suhe celične mase. Z višanjem koncentracije glukoze preko 5 g/L koncentracija barvila pada. Med gojiščema z dodano glukozo v koncentraciji 10 g/L in 50 g/L nismo zaznali bistvenih razlik v količini pigmenta.



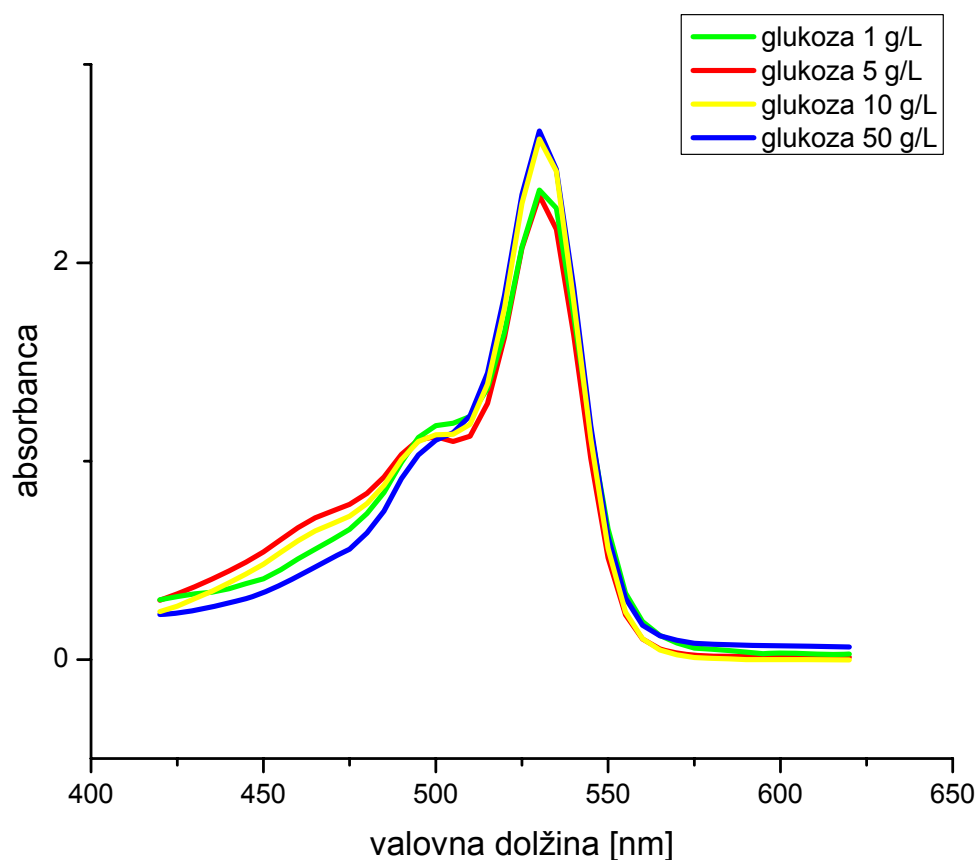
**Slika 11: Vpliv različnih koncentracij glukoze na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379.** Rezultati so podani na miligram suhe celične mase. Koncentracija dodane glukoze v gojišču M9 je bila 1, 5, 10 in 50 g/L. Kulturo smo gojili pri temperaturi 28 °C. Pri vsaki koncentraciji smo opravili tri neodvisna gojenja in za vsako gojenje tri ekstrakcije in tri meritve spektra.



**Slika 12: Vpliv koncentracije glukoze na obarvanost kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču.**

Na sliki so razvrščena gojišča M9 s kulturo. Od leve proti desni si sledijo koncentracije glukoze: 1, 5, 10 in 50g/L.

Kot vidimo na sliki 12, vplivajo različne koncentracije glukoze v gojišču tudi na obarvanost kulture. Svetlejša barva pri koncentraciji 1 g/L je verjetno posledica slabše rasti bakterij.



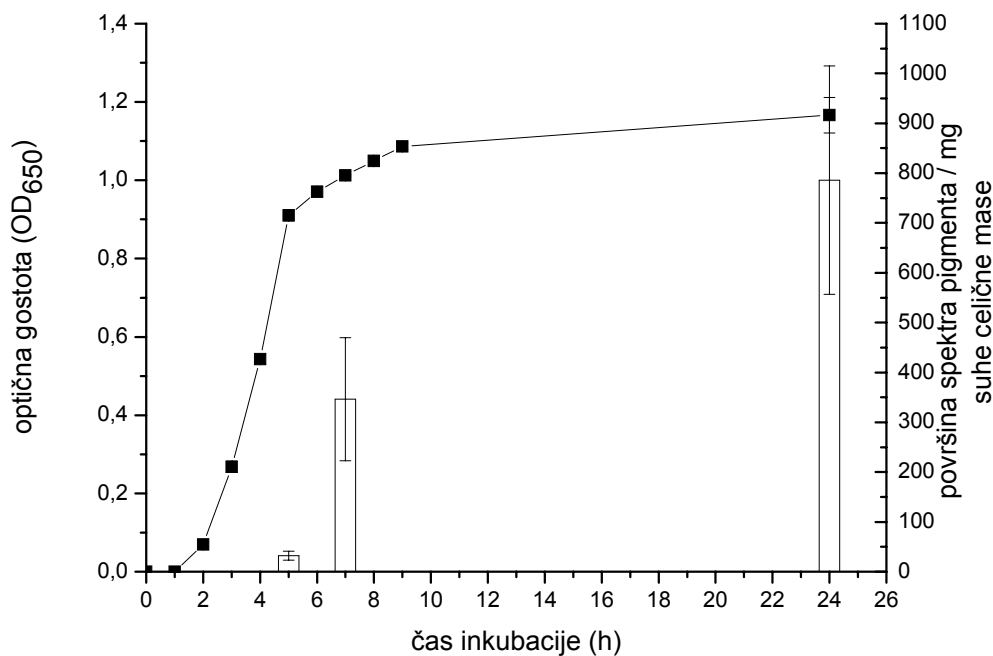
**Slika 13:** VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibro* sp., gojenih pri različnih koncentracijah glukoze. Celice smo gojili v gojišču M9 dodano glukozo v koncentraciji 1, 5, 10 in 50 g/L, pri temperaturi 28 °C. Spektri so bili normalizirani na enako površino (integral). Absorbanco smo izmerili v območju od 420 do 620 nm.

Spektri ekstraktov pigmenta na sliki 13 kažejo podobno sliko kot pri spreminjanju temperature in slanosti. Vrhovi ostajajo pri 460, 495 in 530 nm. Razlike so samo v razmerjih, kar kaže, da gre za spremembo v obarvanosti. V območju od 550 do 620 nm so si spektri zelo podobni. Največje razlike so v območju med 450 in 500 nm.

#### 4.4 PRODUKCIJA PIGMENTA GLEDE NA FAZE RASTI BAKTERIJSKE KULTURE

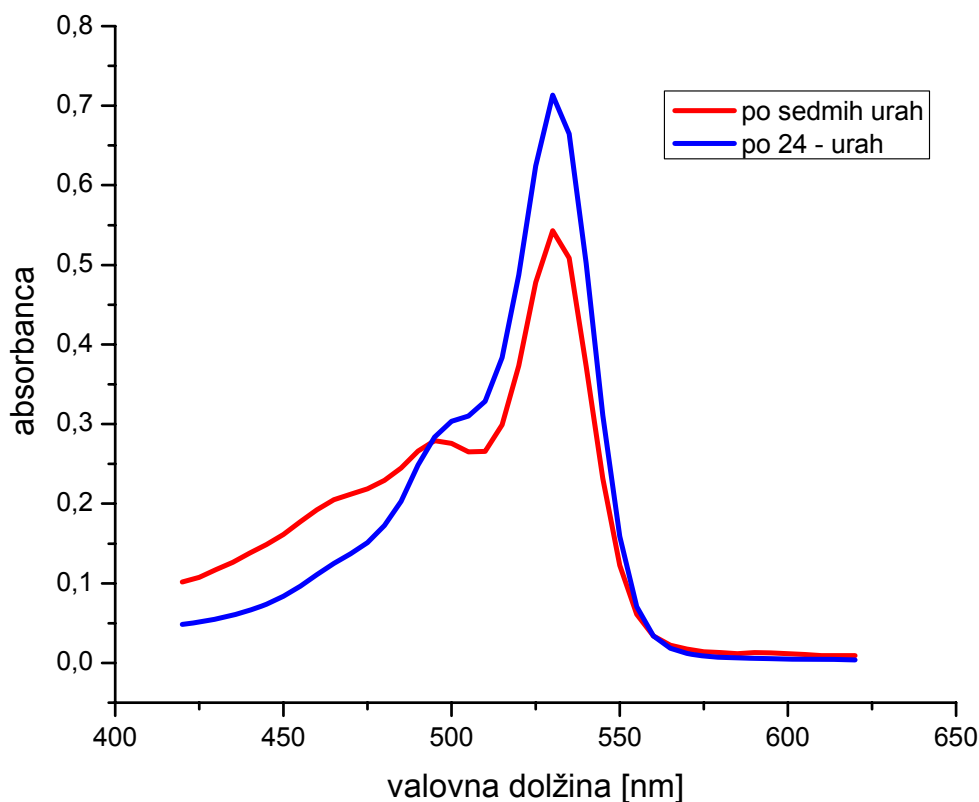
Za spremljajnje produkcije pigmenta tekom rasti smo bakterijski kulturi merili  $OD_{650}$  v enakih časovnih intervalih in v štirih časovnih točkah (po petih, sedmih in štiriindvajsetih

urah) opravili tudi ekstrakcijo pigmenta in spektrofotometrično analizo ter določili suho celično maso (slika 14).



**Slika 14: Spremljanje rasti kulture bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 skozi čas.** Bakterijo smo gojili v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl, pri temperaturi 28°C. Na osi x je čas inkubacije v urah. Na primarni (levi) y osi je podana optična gostota ( $OD_{650}$ ) ob posameznih vzorčenjih. Na podlagi teh podatkov je narisana rastna krivulja. Na sekundarni y osi (desni) je površina spektra pigmenta na mg suhe celične mase ob opravljenih ekstrahiranjih pigmenta iz odvzetih vzorcev. Iz vsake od treh neodvisnih gojitev smo opravili tri ekstrakcije pigmenta in tri meritve spektra.  $OD_{650}$  smo izmerili v treh neodvisno gojenih kulturah.

Po treh urah inkubacije je bila količina pigmenta pod mejo detekcije. Druga ekstrakcija je sledila po petih urah inkubacije, tu je bila že opazna manjša količina pigmenta. Po sedmih urah inkubacije smo zaznali približno desetkrat večjo količino pigmenta kot po petih urah. Po 24 urah je bilo pigmenta največ, še trikrat več kot po sedmih urah (slika 14).



**Slika 15: VIS spektri ekstraktov pigmenta, pridobljenega iz celic bakterije *Vibrio* sp.** Celice smo gojili v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl, pri temperaturi 28 °C. Spektri so bili normalizirani na enako površino (integral). Absorbanco smo izmerili v območju od 420 do 620 nm.

Ob primerjavi spektrov, posnetih po sedmih in 24-ih urah inkubacije vidimo (slika 15) največje razlike v območju od 420 do 500 nm. Pozicije spektrofotometričnih vrhov pri 460, 495 in 530 nm ostajajo nespremenjene, spreminja se razmerje intenzitet pri teh valovnih dolžinah. Od 550 do 620 nm sta si spektra zelo podobna.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomski nalogi smo si zastavili naslednje glavne cilje:

- pokazati, da je produkcija pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 odvisna od slanosti, od temperature in od vira ogljika v gojišču,
- pokazati, da se produkcija pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 spreminja skozi faze rasti.

### 5.1 PRODUKCIJA PIGMENTA V STRESNIH POGOJIH

Znano je, da je rast bakterije *Vibrio* sp. DSM14379 najboljša pri 3 % (w/V) NaCl (Danevčič in sod, 2005), zato smo pričakovali, da bo pri teh pogojih tudi produkcija pigmenta najvišja. Ta koncentracija soli se je v resnici izkazala kot optimalna. V stresnih pogojih slanosti (0,5 in 10 % (w/V)) smo opazili močno zmanjšano produkcijo pigmenta. Pri bakteriji *Vibrio gazogenes* (Allen in sod, 1983) so najvišjo produkcijo prodigiozina opazili pri 3,48 % (w/V) NaCl, rast je bila najboljša pri 0,58 % (w/V) NaCl. Kaže torej, da sta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 optimalni koncentraciji NaCl za rast in produkcijo pigmenta bolj podobni kot to velja za *V. gazogenes*, kjer je produkcija pigmenta višja pri koncentracijah, ki že predstavljajo skrajne pogoje za rast. Pri bakteriji *Serratia rubidea* N-1 so navečjo rast in največjo produkcijo prodigiozina opazili pri 4,6 % (w/V) NaCl. Pri višanju koncentracije soli je produkcija pigmenta padala skupaj z upadom rasti (Yamazaki in sod, 2006).

Rezultati kažejo, da je produkcija pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 najvišja pri temperaturi 28 °C. Pri skrajnih temperaturah 15 in 43 °C je obarvanost zanemarljiva, produkcija pigmenta je komaj zaznavna. Ti dve temperaturi predstavljata že stres za bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 (Danevčič, 2006). Pri bakteriji *Serratia marcescens* je produkcija prodigiozina največja med 20 in 25 °C, medtem ko je optimum za rast bliže 37 °C (Farrell in Rose, 1976). Mi smo pri *Vibrio* sp. opazili večji razkorak med optimalno temperaturo za rast (~40 °C) in produkcijo pigmenta (28 °C).



Pri analizi spektrov (slika 5) lahko vidimo, da gre pri različnih slanostih za enak pigment, kar nam kaže prisotnost spektroskopskih vrhov. Glede na opažene razlike v posameznih delih spektra gre verjetno za določene spremembe v strukturi zunanjih skupin v molekuli prodigiozina. Te spremembe so lahko posledica različnih dejavnikov v gojišču. Količina raztopljenih soli lahko na primer znatno vpliva na ionsko jakost raztopine. S spremembo pH lahko pride do protonacije in deprotonacije. Ker so spektri normirani na isto površino, lahko trdimo, da razlike v višini posameznih vrhov povzročajo različno obarvanost.

## 5.2 VPLIV RAZLIČNIH VIROV OGLJIKA NA PRODUKCIJO PIGMENTA

Rezultati ne kažejo velikih razlik med glukozo in fruktozo kot edinim virom ogljika glede na produkcijo pigmenta in rast celic. Pri glutamatu opazimo večje odstopanje. Pri primerjavi spektrov glutamat izstopa, saj ima najvišji vrh pri 460 nm in ne pri 530 nm, kot je običajno pri ostalih (slika 10). Vidna je tudi razlika v obarvanosti kulture (slika 9). Na glutamatu je bila celična rast najslabša ( $OD_{650}$ ). S svojo močno rožnato obarvanostjo najbolj izstopa kultura, gojena v gojišču PKS z dodano glukozo. Glede na to, da smo na bogatem gojišču z glukozo dobili manj pigmenta kot na bogatem gojišču brez dodane glukoze, sklepamo, da glukoza v bogatem gojišču negativno vpliva na produkcijo pigmenta, vendar rasti ne inhibira, saj glede na PKS brez glukoze pri enaki slanosti ni prišlo do zmanjšanja suhe celične mase.

Opazne so razlike v produkciji pigmenta med različnimi koncentracijami glukoze. Optimum za produkcijo pigmenta je pri 5 g/L. Pri *Vibrio gazogenes* so optimum za rast in produkcijo pigmenta določili pri 30 g/l glukoze. Višje koncentracije glukoze so reprimirale sintezo pigmenta, vendar ne rasti celic (Allen in sod., 1983). Mi smo nižjo produkcijo pigmenta opazili že pri koncentraciji 10 g/l, enak učinek se je pokazal tudi pri koncentraciji 50 g/l.

## 5.3 SPREMINJANJE PRODUKCIJE PIGMENTA TEKOM RASTI

Količino pigmenta smo spremljali tudi tekom rasti bakterijske kulture. Po sedmih urah je bila koncentracija pigmenta desetkrat večja od tiste po petih urah. Ekstrakcija po 24 urah

je pokazala še trikrat več pigmenta. Tudi pri bakteriji *Vibrio gazogenes* so povečano produkcija pigmenta opazili ob prehodu v stacionarno fazo rasti ter po več kot desetih urah v stacionarni fazi (Allen in sod., 1983). Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je opazovani pigment sekundarni metabolit bakterije *Vibrio* sp. DSM14379.

Pri primerjavi spektrov, posnetih po sedmih in štiriindvajsetih urah gojenja, vidimo, da sta si spektra različna. Vrhovi sicer ostajajo na enakih mestih, vendar so opazne velike razlike v območju od 420 do 500 nm. Te razlike pripisujemo spremembam v gojišču v času med sedmimi in štiriindvajsetimi urami. Iz rezultatov izhaja, da so celice na prehodu v stacionarno fazo in v stacionarni fazi različne, ker se kaže v različnem absorpcijskem spektru pigmenta.

#### 5.4 SKLEPI

- Koncentracija NaCl ima izrazit vpliv na produkcijo pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379. Optimum za produkcijo pigmenta v gojišču PKS je pri 3 % (w/V) NaCl.
- Optimalna temperatura za produkcijo pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 je 28 °C.
- Glutamat kot vir ogljika ima velik vpliv na absorpcijski spekter pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379.
- Optimalna koncentracija glukoze za produkcijo pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 je v gojišču M9 okoli 5 g/L.
- Opazovani pigment je sekundarni metabolit bakterije *Vibrio* sp. DSM14379. Najmočneje se izraža v stacionarni fazi.

## 6 POVZETEK

Mikroorganizmi proizvajajo veliko različnih pigmentov. Ti so pomembni za zaščito in preživetje mikrobov. Rdeči pigment, prodigiozin, je eden izmed prodigioninov, ki jih proizvajajo nekatere vrste bakterije *Serratia*, aktinomicete in druge bakterije (Grimont in Grimont, 1978). To je linearni tri pirol in tipični sekundarni metabolit, ki se pojavlja v poznejših stopnjah bakterijske rasti (Williams in sod., 1971). Prodigiozini nimajo definirane fiziološke funkcije pri produkcijskih sevih. Poznana je njihova proti glivna, proti bakterijska, imunosupresivna in proti tumorska aktivnost (Fürstner 2003; Giri in sod., 2004). Večina do sedaj objavljenih študij, povezanih s prodigiozini je bila opravljena na bakteriji *Serratia marcescens*, medtem ko je produkcija prodigionina pri *Vibrio* sp. in drugih morskih bakterijah slabše raziskana.

V diplomskem delu smo preučili vplive okoljskih faktorjev (temperatura, vir ogljika, slanost) na produkcijo prodigiozina pri naravnem izolatu bakterije *Vibrio* sp. DSM14379. Spremljali smo tudi produkcijo pigmenta tekom rasti. V ta namen smo bakterijo gojili v gojiščih z različno slanostjo, v minimalnih gojišču z različnimi viri ogljika in z različno koncentracijo glukoze ter v bogatem gojišču pri različnih temperaturah. Pri spremembi okoljskih pogojev smo opazili različne obarvanosti kulture, od svetlo rožnate do oranžno-rdečkaste in vijolične. Razlike v barvi, katere smo opazili s prostim očesom, smo tudi ovrednotili z merjenjem količine proizvedenega pigmenta ter z merjenjem spektra ekstrakta pigmenta v območju od 420 do 620 nm. Ugotovili smo, da ima koncentracija NaCl izrazit vpliv na produkcijo pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379. Optimum za produkcijo pigmenta v gojišču PKS je pri 3 % (w/V) NaCl. Optimalna temperatura za produkcijo pigmenta je 28 °C. Glutamat kot vir ogljika ima velik vpliv na absorpcijski spekter pigmenta. Optimalna koncentracija glukoze za produkcijo pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. DSM14379 je v gojišču M9 okoli 5 g/L. Opazovani pigment je sekundarni metabolit bakterije. Najmočneje se izraža v stacionarni fazi.

## 7 VIRI

- Allen G.R., Reichelt J.L., Gray P.P. 1983. Influence of environmental factors and medium composition on *Vibrio gazogenes* growth and prodigiosin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 6: 1727-1732.
- Bennet J.W., Bentley R. 2000. Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 1-32.
- Burger S.R., Bennett J.W. 1985. Droplet enrichment factors of pigmented and non-pigmented *Serratia marcescens*: Possible selective function for prodigiosin. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 487-490.
- Cang S., Sanada M., Johdo O., Nagamatsu Y., Yoshimoto A. 2000. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology Letters*, 22: 1761-1765.
- Chiba S., Tsuyoshi N., Fudou R., Ojika M., Murakami Y., Ogoma Y., Oguchi M., Yamanaka S. 2006. Magenta pigment produced by fungus. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52: 201-207.
- Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti.: 94 str.
- Danevčič T., Rilfos L., Štancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8.
- Egan S., James S., Holmström C, Kjelleberg S. 2002. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environmental Microbiology*, 4, 8: 433-442.
- Farrell J., Rose A. 1967. Temperature effects on microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 21: 101-120.

- Fürstner A. 2003. Chemistry and biology of rosephilin and the prodigiosin alkaloids: A survey of the last 2500 years. *Angewandte Chemie International Edition*, 42: 3582-3603.
- Gerber N.N. 1975. Prodigiosine-like pigments. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3: 469-485.
- Gerber N.Y., Stahly D.P. 1975. Prodiginine (prodigiosin-like) pigments from *Streptoverticillium rubroreticuli*, an organism that causes pink staining of polyvinyl chloride. *Applied Microbiology*, 30, 5: 807-810.
- Giri A.V., Anandkumar N., Muthukumaram G., Pennathur G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: 11-11.
- Gnezda-Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2006. Host physiological status determines phage-like particle distribution in the lysate. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 1: 135-145.
- Griffiths M., Sistrom, W., Cohen-Bazire, G., Stanier, R.Y. 1955. Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, 176: 1211-1214.
- Grimont P.A.D., Grimont F. 1978. The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology*, 32: 221-248.
- Heinemann B., Howard A.J., Palocz H.J. 1970. Influence of dissolved oxygen levels on production of L-Asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 19, 5: 800-804.
- Kataoka T., Magae J., Yamasaki M., Nagai K. 1995. Prodigiosin 25-C perturbs permeation of acetate in cultured cell line. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59: 1891-1859.
- Lichstein H.C., van de Sand, V.F. 1945. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Diseases*, 76: 47-51.
- Margalith P.Z., 1992. *Pigment Microbiology*. 1<sup>ST</sup> ed. London, Chapman & Hall: 156 str.

- Moos M. 2002. Bacterial pigments. *Microbiologist - Society for Applied Microbiology*, December 2002: 10-12. [www.sfam.org.uk](http://www.sfam.org.uk)
- Nakamura A., Magae J., Tsuji R.F., Yamasaki M., Nagai K. 1989. Suppression of cytotoxic T cell induction *in vivo* by prodigiosin 25-C. *Transplantation*, 47: 1013-1016.
- Odić D., Turk V., Stopar D. 2007. Environmental stress determines the quality of bacterial lysate and its utilization efficiency in simple microbial loop. *Microbial Ecology*, 53: 639-649.
- Oppong D., King V.M., Zhou X., Bowen J.A. 2000. Cultural and biochemical diversity of pink-pigmented bacteria isolated from paper mill slimes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25: 74-80.
- Paruchuri D.K., Harshey R.M. 1987. Flagellar variation in *Serratia marcescens* is associated with color variation. *Journal of Bacteriology*, 169, 1: 61-65.
- Shieh W.Y., Chen Y.W., Chaw S.M., Chiu H.H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively aerobic bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 479-484.
- Slater H., Crow M., Everson L., Salmond G.P. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenam, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Molecular Biology*, 47, 3: 303-320.
- Thomson N.R., Crow M.A., McGowan S.J., Cox A., Salmond G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenam antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Molecular Microbiology*, 36, 3: 539-556.
- Wassermann H.H., Skles R.J., Peverada P., Shaw C.K., Cushley R.J., Lipsky C.R. 1973. Biosynthesis of prodigiosin. Incorporation patterns of C-labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by fourier transform nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 95, 20: 6874-6875.

- Williams R. P., Gott, C.L., Qadri, H, Scott, R.H. 1971. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 106, 2: 438-443.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J. Salmond G.P. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews. Microbiology*, 4: 887-899.
- Yamazaki G., Nishimura S., Ishida A., Kanagasabhapathy M., Zhou X., Nagata S., Morohoshi T., Ikeda T. 2006. Effect of salt stress on pigment production of *Serratia rubidaea* N-1: A potential indicator strain for screening quorum sensing inhibitors from marine microbes. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52: 113-117.



## **ZAHVALA**

Hvala vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge. In vsem, ki so mi pomagali skozi leta študija. Hvala vam.

## PRILOGE

Priloga A1: **Vpliv koncentracije NaCl na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni količine pigmenta na enoto suhe celične mase so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije in treh ekstrakcij za vsako gojenje. Koncentracija NaCl je podana v w/V odstotkih. Bakterije smo gojili pri 28 °C.

Koncentracija NaCl [%] (w/V)	Površina spektra pigmenta / mg suhe celične mase	St.odklon
0,5	127,20	17,41
1,76	657,15	51,52
3	823,13	96,86
5	263,07	132,72
10	26,29	7,09

Priloga A2: **Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS pred ekstrakcijo.** Optično gostoto smo merili pri 650 nm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije. Koncentracija NaCl je podana v w/V odstotkih.

Koncentracija NaCl [%] (w/V)	OD <sub>650</sub>	St. odklon
0,5	1,22	0,01
1,76	1,37	0,03
3	1,48	0,02
5	1,36	0,07
10	0,94	0,01

**Priloga B1: Vpliv temperature na produkcijo pigmenta *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču PKS.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni količine pigmenta na enoto suhe celične mase so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije in treh ekstrakcij za vsako gojenje. Bakterije smo gojili pri 3 % (w/V) NaCl

<b>Temperatura gojenja [°C]</b>	<b>Površina spektra pigmenta / mg suhe celične mase</b>	<b>St. odklon</b>
<b>15</b>	7,13	5,23
<b>20</b>	449,51	9,94
<b>28</b>	823,13	96,86
<b>37</b>	182,51	30,48
<b>43</b>	18,00	4,08

**Priloga B2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, gojenih pri različnih temperaturah v gojišču PKS pred ekstrakcijo.** Optično gostoto smo merili pri 650 nm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije. Bakterije smo gojili pri 3 % (w/V) NaCl.

<b>Temperatura gojenja [°C]</b>	<b>OD<sub>650</sub></b>	<b>St. odklon</b>
<b>15</b>	0,70	0,01
<b>20</b>	1,14	0,01
<b>28</b>	1,48	0,02
<b>37</b>	1,00	0,03
<b>43</b>	0,61	0,01

Priloga C1: **Vpliv različnih virov ogljika na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14397 v gojišču M9 z dodanim enostavnim virom ogljika.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni količine pigmenta na enoto suhe celične mase so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije in treh ekstrakcij za vsako gojenje. Vsi viri ogljika so bili dodani v koncentraciji 10 g/L. Bakterije smo gojili pri 28 °C.

<b>Vir ogljika v gojišču M9 (10 g/L)</b>	<b>Površina spektra pigmenta / mg suhe celične mase</b>	<b>St.odklon</b>
<b>fruktoza</b>	4195,54	421,50
<b>glutamat</b>	4033,87	478,98
<b>glukoza</b>	3093,48	324,60
<b>PKS+glukoza</b>	69,13	33,05

Priloga C2: **Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, gojenih pri različnih virih ogljika v gojišču M9 pred ekstrakcijo.** Optično gostoto smo merili pri 650 nm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije. Bakterije smo gojili pri 28 °C.

<b>Vir ogljika v gojišču M9 (10 g/L)</b>	<b>OD<sub>650</sub></b>	<b>St. odklon</b>
<b>fruktoza</b>	1,37	0,06
<b>glutamat</b>	0,41	0,04
<b>glukoza</b>	1,49	0,17
<b>PKS+glukoza</b>	2,04	0,03

**Priloga D1: Vpliv koncentracije glukoze na produkcijo pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379 v gojišču M9.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni količine pigmenta na enoto suhe celične mase so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije in treh ekstrakcij za vsako gojenje. Bakterije smo gojili pri 28 °C.

<b>Koncentracija glukoze v gojišču M9 [g/L]</b>	<b>Površina spektra pigmenta / mg suhe celične mase</b>	<b>St. odklon</b>
<b>1</b>	326,91	223,47
<b>5</b>	3877,89	122,16
<b>10</b>	3093,48	324,60
<b>50</b>	3040,36	394,91

**Priloga D2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, gojenih pri različnih koncentracijah glukoze v gojišču M9 pred ekstrakcijo.** Optično gostoto smo merili pri 650 nm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije. Bakterije smo gojili pri 28 °C.

<b>Koncentracija glukoze v gojišču M9 [g/L]</b>	<b>OD<sub>650</sub></b>	<b>St. odklon</b>
<b>1</b>	0,57	0,06
<b>5</b>	1,82	0,17
<b>10</b>	1,49	0,17
<b>50</b>	1,73	0,03

**Priloga E1: Spremljanje produkcije pigmenta pri *Vibrio* sp. DSM14379 med rastjo v gojišču PKS.** Povprečne vrednosti in standardni odkloni količine pigmenta na enoto suhe celične mase so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije in treh ekstrakcij za vsako gojenje. Bakterije smo gojili pri 3 % (w/V) NaCl, pri 28 °C.

<b>Ekstrakcija po [h]</b>	<b>Površina spektra pigmenta / mg suhe celične mase</b>	<b>St. odklon</b>
<b>3</b>	291,282	78,730
<b>5</b>	32,177	8,785
<b>7</b>	346,484	123,561
<b>24</b>	785,813	228,996

**Priloga E2: Optična gostota kulture bakterij *Vibrio* sp. DSM14379, med rastjo v gojišču PKS pred ekstrakcijo.** Optično gostoto smo merili pri 650 nm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterije. Bakterije smo gojili pri 3 % (w/V) NaCl, pri 28 °C.

<b>Ekstrakcija po [h]</b>	<b>OD<sub>650</sub></b>	<b>St. odklon</b>
<b>3</b>	0,35	0,02
<b>5</b>	0,94	0,02
<b>7</b>	1,13	0,01
<b>24</b>	1,41	0,03