

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gorazd STOJKOVIČ

**VPLIV HITREGA PERIODIČNEGA  
SPREMINJANJA TEMPERATURE NA RAST  
BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gorazd STOJKOVIČ

**VPLIV HITREGA PERIODIČNEGA SPREMINJANJA  
TEMPERATURE NA RAST BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF FAST PERIODIC TEMPERATURE  
CYCLING ON GROWTH OF BACTERIA *Escherichia coli***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Stojkovič G. Vpliv hitrega periodičnega spremenjanja temperature na rast bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2008

---

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

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za recenzentko pa prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentor: prof. dr. David STOPAR

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:                        prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK  
   Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Gorazd Stojkovič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24:579.26:579.842(043)=163.6
KG	<i>Escherichia coli</i> /stres/ohladitveni stres/vpliv temperature/periodično spreminjanje temperature/optična gostota/rast/filamentacija
AV	STOJKOVIČ, Gorazd
SA	STOPAR, David (mentor)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota meddodelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	VPLIV HITREGA PERIODIČNEGA SPREMINJANJA TEMPERATURE NA RAST BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 34 str., 13 sl., 24 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	

V diplomski nalogi smo preučevali, kako periodično spreminjanje temperature med 37 in 5 °C vpliva na hitrost rasti mikrobnih celic in njihovo metabolno aktivnost. Z merjenjem optične gostote in koncentracije CO<sub>2</sub> smo ugotovili, da se celice ne odzovejo na hitre periodične spremembe temperature in da ob ponovni inkubaciji na 37 °C rastejo z enako hitrostjo kot pred izpostavitvijo nizki temperaturi brez izrazite lag faze. Pri režimu gojenja s hitrim periodičnim spreminjanjem temperature se proizvodnja beljakovin, za razliko od počasnega periodičnega spreminjanja temperature, glede na kulturo, ki je bila gojena konstatno pri 37 °C, ni spremenila. Pri poskusih, kjer smo celice po začetnem znižanju iz 37 °C inkubirali na 5 °C se je optična gostota zaradi podaljševanja celic v prvih 5 dneh povečala za približno dvakrat. Kulture, ki smo jih po daljši inkubaciji na 5 °C prestavili na 37 °C, niso začele rasti takoj po prestaviti. Lag faza se je povečevala z dolžino inkubacije na 5 °C do 5. dne inkubacije, nato se z dolžino inkubacije ni več podaljševala.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.24:579.26:579.842(043)=163.6
CX	<i>Escherichia coli</i> /stress/cold shock/effect of temperature/periodic changing of temperature/optic density/growth/filamentation
AU	STOJKOVIC, Gorazd
AA	STOPAR, David (supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	INFLUENCE OF FAST PERIODIC TEMPERATURE CYCLING ON GROWTH OF BACTERIA <i>Escherichia coli</i>
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 34 p., 13 fig., 24 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	

The aim of this study was to determine the influence of periodic temperature changes between 37 and 5 °C on the growth rate and metabolic activity of *Escherichia coli*. As determined by optical density and CO<sub>2</sub> concentration measurements, fast periodic temperature changes do not allow cells to adapt. When cells are transferred from 5 °C to 37 °C growth resumes immediately at the same growth rate as before exposition to low temperatures, without a lag phase. As determined by 2D gel electrophoresis, fast temperature changes in contrast to slow temperature changes do not alter protein synthesis when compared to a constantly growing culture. In experiments where the culture was cooled from 37 to 5 °C and incubated at that temperature for a prolonged period of time, optical density doubled in about 5 days and remained at that level afterwards. Cells grown at 5 °C for several days and then transferred to 37 °C exhibited a growth lag which increased for 5 days and then ceased to increase.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA . . . . .	iii
KEY WORDS DOCUMENTATION . . . . .	iv
KAZALO VSEBINE . . . . .	vi
KAZALO SLIK . . . . .	vii
KAZALO PRILOG . . . . .	viii
OKRAJŠAVE . . . . .	ix
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Namen in hipoteze</b> . . . . .	<b>2</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Ohladitveni šok</b> . . . . .	<b>3</b>
<b>2.2 Rast pri nizkih temperaturah</b> . . . . .	<b>7</b>
<b>2.3 Rast pri ne-konstantnih temperaturah</b> . . . . .	<b>8</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Merjenje temperature</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>3.2 Organizem</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>3.3 Reagenti in raztopine</b> . . . . .	<b>9</b>
3.3.1 Tris-HCl . . . . .	9
3.3.2 Fiziološka raztopina . . . . .	9
<b>3.4 Gojišče</b> . . . . .	<b>10</b>
<b>3.5 Gojenje</b> . . . . .	<b>10</b>
3.5.1 Predpriprava . . . . .	10
3.5.2 Gojenje celic na 37 °C . . . . .	10
3.5.3 Gojenje celic s hitrim spremenjanjem temperature . . . . .	10
3.5.4 Gojenje celic s počasnim spremenjanjem temperature . . . . .	11
3.5.5 Vpliv hitrega spremenjanja temperature na celice, ki so bile dalj časa izpostavljene nizki temperaturi . . . . .	11

3.5.6 Vpliv počasnega spremenjanja temperature na celice, ki so bile dalj časa izpostavljene nizki temperaturi . . . . .	12
<b>3.6 Meritve optične gostote . . . . .</b>	<b>12</b>
<b>3.7 Meritve koncentracije CO<sub>2</sub> . . . . .</b>	<b>12</b>
<b>3.8 Izolacija beljakovin . . . . .</b>	<b>13</b>
<b>3.9 2D gelska elektroforeza . . . . .</b>	<b>13</b>
<b>3.10 Obdelava podatkov . . . . .</b>	<b>14</b>
<b>3.11 Mikroskopiranje . . . . .</b>	<b>14</b>
 <b>4 REZULTATI</b>	 15
<b>4.1 Merjenje temperature . . . . .</b>	<b>15</b>
4.1.1 Hitro spremjanje temperature . . . . .	15
4.1.2 Počasno spremjanje temperature . . . . .	16
<b>4.2 Gojenje <i>E. coli</i> pri različnih temperaturnih režimih . . . . .</b>	<b>17</b>
4.2.1 Gojenje <i>E. coli</i> s hitrim periodičnim spremjanjem temperature	17
4.2.2 Gojenje <i>E. coli</i> s počasnim periodičnim spremjanjem temperature	19
4.2.3 Proizvodnja CO <sub>2</sub> med rastjo <i>E. coli</i> pri različnih temperaturnih režimih . . . . .	21
4.2.4 Revitalizacija kulture <i>E. coli</i> po hranjenju na 5 °C pri različnih temperaturnih režimih . . . . .	22
 <b>5 RAZPRAVA</b>	 27
<b>5.1 Sklepi . . . . .</b>	<b>30</b>
 <b>6 POVZETEK</b>	 31
 <b>7 VIRI</b>	 32
 <b>ZAHVALA</b>	 35
 <b>PRILOGE</b>	 36

## KAZALO SLIK

1	Rastna hitrost <i>E. coli</i> v odvisnosti od temperature (Herendeen in sod., 1979) . . . . .	4
2	Hitro segrevanje in ohlajanje gojišča v serumskih stekleničkah . . . . .	16
3	Počasno segrevanje in ohlajanje gojišča v serumskih stekleničkah . . . . .	17
4	Rast <i>E. coli</i> pri različnih temperaturnih režimih gojenja - hitro spremjanje temperature . . . . .	18
5	Rast <i>E. coli</i> pri hitrem spremicanju temperature - modificiran graf . . . . .	19
6	Rast <i>E. coli</i> pri različnih temperaturnih režimih gojenja - počasno spremjanje temperature . . . . .	20
7	Rast <i>E. coli</i> pri počasnem spremicanju temperature - modificiran graf . . . . .	21
8	Rast <i>E. coli</i> in izmerjena koncentracija CO <sub>2</sub> . . . . .	22
9	Primerjava rasti med kulturama <i>E. coli</i> , ki sta bili različno hitro ohlajeni na 5 °C in inkubirani pri tej temperaturi za 3 dni . . . . .	23
10	Dolžina lag faze pri različnih režimih ohlajanja kulture <i>E. coli</i> na 5 °C in inkubaciji za različno dolgo obdobje . . . . .	24
11	Rast kulture <i>E. coli</i> pri gojitvi na 5 °C . . . . .	25
12	Beljakovinski profil kulture <i>E. coli</i> gojene konstantno pri 37 °C za 4 ure	26
13	Beljakovinski profil kulture <i>E. coli</i> gojene konstantno pri 37 °C za 4 ure	26

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Rast *E. coli* po 5 dnevnem gojenju na 5 °C in aproksimacija podatkov z Boltzmannovo funkcijo.

Priloga B: Primera določitve začetka rasti kulture po 3 dnevnem gojenju *E. coli* na 5 °C.

Priloga C: Rast *E. coli* in izmerjena koncentracija CO<sub>2</sub>

Priloga D: *Escherichia coli* po 15 dnevnem gojenju na 5 °C.

## OKRAJŠAVE

2D elektroforeza - dvodimenzionalna poliakrilamidna gelska eletroforeza

ACP - proteinski prenašalec acilne skupine

CHAPS (angl. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) - ionski detergent

cs geni - geni ohladitvenega šoka

DTT - ditiotreitol

G - zemeljski pospešek ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )

## 1 UVOD

Običajno so mikrobiološke laboratorijske raziskave izvedene pri konstantnih fizikalno kemijskih pogojih. Uporabljamo rastne komore za uravnavanje temperature, pufre za vzdrževanje konstantne pH vrednosti gojišča, vedno iste vire hrani (v koncentracijah, ki običajno močno presegajo koncentracije istih snovi v okolju), poleg tega pa mikroorganizme gojimo v čistih kulturah. Posledično je večina mikrobiološkega znanja pridobljenega pri konstantnih pogojih, kar pa ne odraža naravnega okolja mikroorganizmov. V naravi so konstantne razmere bolj izjema kot pravilo, hrane je običajno premalo. pH, redoks stanje in drugi dejavniki se spreminjajo tudi kot posledica delovanja drugih organizmov ali mikroba samega.

Raziskave pri konstantnih pogojih nam omogočijo vpogled v sicer izjemno kompleksne biološke sisteme in olajšajo razumevanje njihovih mehanizmov. Informacija, ki jo na ta način pridobimo velja v izbranem laboratorijskem sistemu, ni pa nujno, da velja tudi v okolju. Tam je namreč organizem izpostavljen drugačnim razmeram, ki od njega zahtevajo tudi drugačno fiziološko stanje. Posledično je lahko delovanje organizma v okolju različno od delovanja organizma v našem sistemu. Postavi se vprašanje, ali na tak način pridobljeno znanje v laboratoriju velja tudi v naravnih razmerah.

Pomemben dejavnik, ki vpliva na rast bakterij je temperatura. Ta se spreminja na različnih časovnih skalah od sekund (nihanje temperature zaradi gibanja molekul atmosfere) do let (podnebne spremembe) in organizem se mora za preživetje znati prilagoditi. Pri bakterijah sta poznana dva odziva na povišano in znižano temperaturo, ki kulturi omogočita preživetje izven idealnega temperaturnega območja, vendar sta bila ta dva pojava preučevana predvsem z enkratno izpostavitvijo neugodnim temperaturam. Ne vemo, ali se bakterije pri periodičnem spremicanju temperature enako odzovejo, ali je odziv drugačen. Poleg tega ne vemo, kako se bakterije odzivajo na različne hitrosti temperaturnih sprememb.

## 1.1 Namen in hipoteze

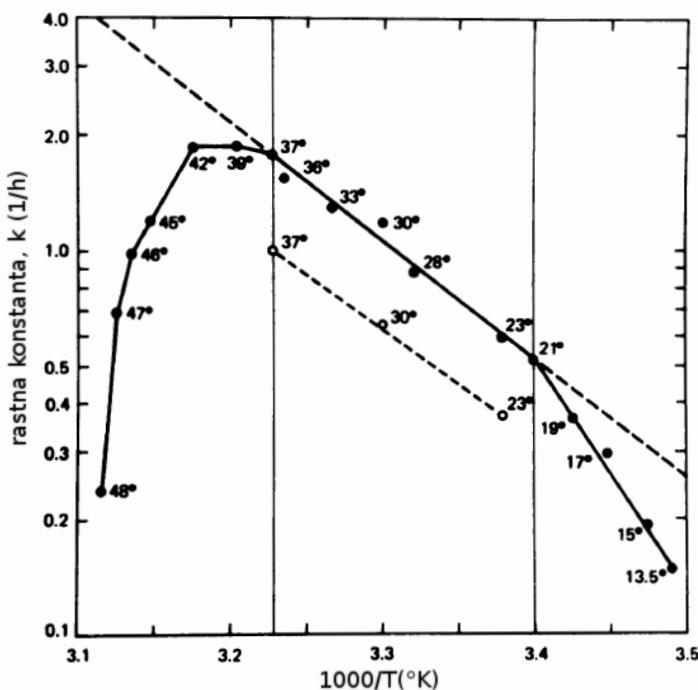
V diplomski nalogi želimo preučiti, kako periodično spremicanje temperature s hitrim prehodom med 37 in 5 °C vpliva na rast bakterije *Escherichia coli*. Poleg tega želimo preučiti, kakšen vpliv ima hitrost spremicanja temperature na celico in kako se bo ta odzvala na inkubacijo pri nizkih temperaturah za daljše časovno obdobje.

Predviedvamo, da hitra sprememba temperature celicam ne dopušča metabolne prilagoditve in, da se sestava beljakovin glede na kontrolo ne bo spremenila.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 Ohladitveni šok

Bakterija *Escherichia coli* je fakultativni anaerob, ki je običajno prisotna v prebavnem traktu živali. Iz tega izhaja, da najboljše raste med 37 in 40 °C (Madigan in sod., 2003). Temperaturno območje rasti je od 7,5 do 49 °C. Slika 1 prikazuje Arrheniusov graf odvisnosti rastne konstante od temperature. Na grafu opazimo večje linearne območje med 21 in 37 °C. V tem območju se rastna hitrost spreminja sorazmerno s temperaturo, pri višjih in nižjih temperaturah pa se rastna hitrost progresivno zmanjšuje (Herendeen in sod., 1979; Jones in sod., 1987). Če v območju med 20 in 37 °C gojišču s celicami spremenimo temperaturo, začnejo celice takoj rasti pri hitrosti, ki je značilna za novo temperaturo. Če je začetna ali končna temperatura izven tega območja pa celice rabijo nekaj časa (za obdobje ene delitve ali več), da se prilagodijo na novo temperaturo (Ng in sod., 1962). V območju med 20 in 37 °C so deleži posameznih beljakovin konstantni, spreminja pa se hitrost sinteze beljakovin (Lemaux in sod., 1978). Pri temperaturah višjih od 37 °C in nižjih od 20 °C pa se deleži beljakovin spremenijo (Herendeen in sod., 1979). Beljakovinam, ki se bolj intenzivno proizvajajo pri povišani temperaturi, pravimo beljakovine toplotnega šoka (ang. heat shock proteins), tistim, ki se bolj intenzivno proizvajajo pri znižani temperaturi pa beljakovine ohladitvenega šoka (ang. cold shock proteins) (Lemaux in sod., 1978). Posledično odzivoma pravimo toplotni šok (ang. heat shock response) oziroma ohladitveni šok (ang. cold shock response) (Jones in sod., 1987).

Slika 1: Rastna hitrost *E. coli* v odvisnosti od temperature (Herendeen in sod., 1979)

Ohladitveni šok pri *Escherichia coli* nastopi, ko kulturo celic hitro ohladimo za najmanj 13 °C. Pri tem začetna in končna temperatura nista pomembni, le da sta znotraj območja rasti bakterij. Odziv na ohladitveni šok zato sproži tako ohladitev iz 37 na 10 °C kakor tudi ohladitev iz 42 na 29 °C. Večja kot je temperaturna razlika, močnejši je odziv. Prav tako je odziv močnejši, tem nižja je končna temperatura gojišča (Jones in sod., 1992).

Po prestaviti kulture iz 37 °C na temperaturo nižjo od 20 °C najprej nastopi faza, ko rast ni prisotna. Ta faza traja od ene do več ur, odvisno od temperature na katero celice ohladimo in temperaturne razlike. Bolj kot je temperatura blizu minimalne temperaturo rasti organizma, daljša je ta faza. Pri prestaviti iz 37 °C na 10 °C faza brez rasti traja 4 ure, pri prestaviti iz 37 na 24 °C pa le 10 minut (Jones in sod., 1992). 2D elektroforeza pokaže, da se takrat poveča sinteza približno 27 beljakovin, ki jih kodirajo *cs* geni (geni ohladitvenega šoka). Povečanje koncentracije je od 1,3 do 30 kratno, precej pa je odvisno od faze, v kateri so celice, ko jih prestavimo na nižjo temperaturo. Med odzivom na ohladitveni šok se ne prične proizvajati nobena beljakovina, ki ne bi bila prisotna že pri rasti pri optimalni temperaturi (Guarlezi in sod.,

2003). Koncentracija beljakovin ohladitvenega šoka se začne povečevati že po pol ure, najbolj intenzivno pa se proizvajajo po dveh urah po prestavitevi. Nasprotno se sinteza ostalih snovi (drugih beljakovin, RNA in DNA) v celici takrat zelo upočasni oziroma zaustavi. Izjema so le nekatere beljakovine udeležene pri transkripciji in translaciji, katerih sinteza se nadaljuje, kljub temu, da je pri nerastoči kulturi proizvodnja običajno inhibirana (Jones in sod., 1987). Posebej je inhibirana proizvodnja beljakovin, ki sodelujejo pri toplotnemu šoku (Jones in sod., 1992). Spremenijo se tudi membrane – poveča se delež nenasičenih maščobnih kislin, vendar pa to ni nujno potrebno za rast pri nizki temperaturi (Shaw in Ingraham, 1967).

Po fazi brez rasti nastopi faza v kateri začnejo celice hitro rasti (skoraj dvakrat hitreje kot sicer pri tej temperaturi), vendar le za obdobje ene delitve. Nato se rastna hitrost zmanjša in ostane konstantna (Ng in sod., 1962).

V primeru, da so celice pred prestavitevijo na nižjo temperaturo izpostavljene prehranskemu stresu, se odziv na ohladitveni šok slabo razvije, rast pa ni mogoča (Jones in sod., 1992). Tudi pri anaerobni rasti odziva na ohladitveni šok ne zaznamo. Premestitev celic na 10 °C v tem primeru ne povzroči nastanka vmesne lag faze. Prav tako je zastoj v rasti odvisen od vira ogljika. Pri rasti na glukozi celice prenehajo rasti za določen čas, medtem ko pri rasti na sukcinatu rastejo naprej. Pomembno je v kakšnih pogojih celica raste pred izpostavitvijo nizki temperaturi in manj kakšni so pogoji pri inkubaciji na 10 °C (Shaw in Ingraham, 1967).

Če celice ponovno prestavimo iz temperature nižje od 20 °C v toplejše okolje, je sprva opaziti manjšo hitrost rasti kot bi jo pričakovali glede na temperaturo gojenja. Pri prestavitevi kulture gojene na 10 °C na 37 °C se šele po približno 6 urah vzpostavi normalna hitrost rasti, značilna za to temperaturo. Medtem potečeta približno 2 delitvi celic (Ng in sod., 1962).

Znižanje temperature ima v celici predvsem naslednje učinke: zmanjšanje fluidnosti membrane, počasnejše in/ali nepravilno zvijanje beljakovin, stabilizacija sekundarnih struktur nukleinskih kislin, razpad polisomov in kopiranje 70S partiklov (Phadtare, 2004; Jones in Inouye, 1994). Pri *E. coli* se pri nizkih temperaturah aktivira ACP, desaturaza, ki poveča fluidnost membrane s pretvorbo nasičenih maščobnih kislin v ne-

nasičene (Phadtare, 2004). Celice so sicer sposobne rasti pri nizki temperaturi tudi brez spremicanja membran, kar kaže, da fluidnost membran ni ključna za rast pri nizkih temperaturah (Shaw in Ingraham, 1967). Bolj pomembno se zdi, da pri prestavitevi kulture *E. coli* iz 37 °C na temperaturo nižjo od 8 °C pride do kopiranja ribosomalnih podenot in 70S partiklov ter razdružitve polisomov z mRNA (Broeze in sod., 1977), ponovna inkubacija kulture na 37 °C pa povzroči hitro zmanjšanje koncentracije ribosomalnih podenot. Sinteza beljakovin se po izpostavitvi znižani temperaturi sicer nadaljuje še nekaj časa, vendar le do takrat, ko se prevede vsa mRNA, ki je že prisotna na ribosomih. Na novo nastale mRNA molekule pa se ne prevedejo v beljakovine (Jones in Inouye, 1994; Broeze in sod., 1977). Kot kaže je omejujoči dejavnik iniciacija sinteze beljakovin. Domnevajo, da se zaradi znižanja temperature ribosomi ne morejo sestaviti in je zato sinteza beljakovin prekinjena. Čeprav je dokazov malo pa dosedanje raziskave nakazujejo na to, da beljakovine ohladitvenega šoka opravljajo funkcijo šaperonov za beljakovine in mRNA. Glede na to, da bi lahko beljakovine s takimi funkcijami pomagale pri sestavljanju ribosomov pri nizkih temperaturah, se zdi ta predlog smiseln (Gualerzi in sod., 2003). Nezmožnost iniciacije sinteze beljakovin je verjetno glavni razlog za zaustavitev rasti takoj po izpostavitvi kulture nizkim temperaturam. Rast se lahko nadaljuje šele takrat, ko se proizvedejo beljakovine ohladitvenega šoka, ki omogočijo iniciacijo sinteze beljakovin. Nezmožnost iniciacije sinteze beljakovin je verjetno tudi razlog za popolno prekinitev rasti pri 7,8 °C. Predvidevajo, da pri temperaturi nižji od 7,8 °C ni možna iniciacija sinteze beljakovin niti ob sproženem odzivu na ohladitveni šok (Jones in Inouye, 1994).

Tudi sicer večina dokazov kaže na to, da se beljakovine, ki se bolj intenzivno proizvajajo pri nizkih temperaturah vežejo z nukleinskimi kislinami (Jones in sod., 1987; Phadtare, 2004). To je razumljivo, saj nukleinske kisline pri nizkih temperaturah tvorijo stabilne sekundarne strukture, ki negativno vplivajo na transkripcijo, translacijo in sestavljanje ribosomov. Nadzor teh struktur je zato pomemben za normalno delovanje celice. Natančni mehanizmi delovanja produktov *cs* genov povečini niso jasni. Nobeden ne nastopa le pri nizkih temperaturah – vse lahko zaznamo tudi pri rasti pri 37 °C (Guarlezi in sod., 2003). Celici lahko izbrišemo skoraj katerikoli *cs* gen (izjema so tisti, ki

so pomembni za rast pri vseh temperaturah - na primer *infA* ) pa posledice zanjo ne bodo usodne. Šele z izbrisom več *cs* genov (pri *E. coli* 4 od 9 genov) dobimo celice, ki so občutljive na nizke temperature. Poleg tega so le redki produkti *cs* genov nujni za normalno rast celic pri nizki temperaturi in hkrati nepomembni pri optimalni temperaturi. (Gualerzi in sod. 2003)

Poleg beljakovin ohladitvenega šoka se pri nizkih temperaturah v celici tvorijo še druge snovi, ki celici pomagajo preživeti v težkih razmerah. Tako se pri nenadnem znižanju temperature poveča koncentracija trehaloze v celici, podobno kot se to zgodi pri osmotskem stresu in pri topotnem šoku. Predlaganih načinov delovanja trehaloze je več (kot šaperon, lovilec prostih radikalov, stabilizacija membran), natančen mehanizem delovanja trehaloze pri ohladitvenem šoku pa še ni poznan (Kandror in sod., 2002).

## 2.2 Rast pri nizkih temperaturah

Minimalna temperatura rasti je definirana kot tista temperatura, pri kateri lahko nek organizem za dalj časa vzdržuje kontinuirano rast. Za *Escherichia coli* je ta temperatura med 7,5 in 7,8 °C. Za krajši čas pa lahko nekateri organizmi rastejo tudi pod minimalno temperaturo rasti. Shaw in sod. (1971) so preučevali rast *E. coli* pri 6 °C po prestavitevi iz 10 °C. Povečevanje optične gostote je trajalo približno en teden, potem pa povečanja ni bilo več mogoče zaznati. Skupno se je optična gostota povečala za dvakrat. Podobno so opazili tudi Gill in sod. (2001), ko so kulturo *E. coli* gojili pri 2, 4, 5 in 6 °C. Pri 6 °C se je optična gostota povečala za več kot 3-krat, pri 3, 4 in 5 °C pa za več kot 2-krat. Pri 2 °C povečanja optične gostote ni bilo. Pri 6 °C so povečanje optične gostote opazili do 6 dni po začetku inkubacije, pri 5 °C do 5 dni, pri 4 °C do 4 dni, pri 3 °C pa do 3 dni. Pri tem se število celic ni bistveno spremenilo. Povečanje optične gostote ob enakem številu celic nakazuje na to, da so se celice pri takem načinu gojenja podaljšale. Že leta 1968 je namreč Shaw opazil, da se pri inkubaciji pri temperaturah, nižjih od minimalne temperature rasti, pri *E. coli* pojavijo filamenti. Taka rast je časovno omejena, saj celice rastejo običajno do enega tedna po prehodu na nizko temperaturo, potem pa se rast ustavi. Vendar se v

primeru, da so celice občasno (najmanj vsakih 12 ur) izpostavljene temperaturi višji od 7 °C, taka rast lahko nadaljuje dalj časa (Jones in sod., 2004). Tvorba filamentov pri nizkih temperaturah in obseg rasti je sicer močno odvisen od seva (Gill in sod., 2007). Filamentozna rast sicer ni omejena le na temperature, nižje od minimalne temperature rasti. Tudi pri višjih temperaturah (do 10 °C) je opazno podaljšanje celic, vendar je to zelo odvisno od opazovanega seva (Gill in sod., 2007). Filamentozna rast se sicer pojavlja tudi v drugačnih pogojih, na primer pri okužbi urinarnega trakta (Justice in sod., 2006).

### 2.3 Rast pri ne-konstantnih temperaturah

Raziskave na tem področju so omejene predvsem na patogene organizme, ki jih najdemo v hrani in na preučevanje njihove rasti pri pogojih, ki so običajni pri predelavi in distribuciji hrane. Mitchell in sod. (1995) so gojili kulturo bakterij *Salmonella typhimurium* LT2 pri periodično nihajoči temperaturi med 4 in 22 °C s periodami od 60 do 240 minut. Opazili so, da se kultura glede na temperaturo predvidljivo obnaša (raste pri 22 °C in miruje pri 4 °C), med rastjo z različno dolgimi periodami pa niso opazili razlike. Bovill in sod. (2001) so opazovali rast bakterij *Listeria monocytogenes*, *Salmonella stanley* in *Salmonella thompson* pri nihajočih temperaturah. Različni temperturni gradienti pri ohladitvi kulture *Listeria monocytogenes* iz 25 na 2 °C na rast po prestavitevi niso imeli vpliva. Enako so opazili tudi pri prestavitevi *Salmonella stanley* in *Salmonella thompson* iz 25 na 10 °C. Tudi kulture (vseh preučevanih vrst), ki so jih izmenično prestavljali med nizko in visoko temperaturo, se po končanem periodičnem gojenju med seboj niso razlikovale glede na rast in sposobnost preživetja.

Jones in sod. (2004) so gojili *E. coli* pri 2, 4 in 6 °C, vsakih 6, 12 ali 24 ur pa so temperaturo za 35 minut dvignili na 10 °C. Ugotovili so, da se rasti *E. coli* pri takih temperturnih režimih ne da natančno napovedati, da pa lahko bakterije, ki so občasno izpostavljene temperaturam nad minimalno temperaturo za rast, rastejo tudi pri temperaturi nižji od minimalne potrebne za rast.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Merjenje temperature

Temperaturo gojišča v serumskih stekleničkah smo merili z merilcem ThermoLogR podjetja Cole Parmer. Napravo smo nastavili tako, da je meritev temperature samodejno izvedla vsakih 15, 30 ali 60 sekund, odvisno od hitrosti spremenjanja temperature v gojišču.

Temperaturo hladne komore, tople komore in vodne kopeli smo merili s klasičnim termometrom, ki vsebuje alkohol.

### 3.2 Organizem

Pri vseh poskusih, ki smo jih izvedli, smo uporabljali bakterijo *Escherichia coli* ESH10 K-12 iz mikrobiološke zbirke Katedre za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Je eden najbolje preučenih organizmov, kar predstavlja prednost pri raziskavah.

### 3.3 Reagenti in raztopine

#### 3.3.1 Tris-HCl

10 mM Tris-HCl smo pripravili z uporabo Tris-Base (Merck). Zatehtali smo 1,21 g Tris-Base in 85,57 g saharoze (Kemika, Hrvaška) ter ju raztopili v dvakrat destilirani vodi do 1000 ml. Pufer smo nato sterilizirali preko filtra s pomočjo vakuumske črpalke.

#### 3.3.2 Fiziološka raztopina

Fiziološko raztopino smo pripravili iz 2,25 g NaCl (Merck) in dvakrat destilirane vode do 250 ml. Po pripravi smo raztopino avtoklavirali pri 121 °C in 1,2 bar za 15 minut.

### 3.4 Gojišče

*E. coli* smo gojili v tekočih in trdnih gojiščih LB. Tekoče gojišče LB smo pripravili po naslednjem postopku:

10 g NaCl (Merck), 10 g triptona (Biolife) in 5 g kvasnega ekstrakta (Biolife) smo re-suspendirali v destilirani vodi in v bučki dopolnili do 1l. Gojišče smo prelili v serumske stekleničke in jih avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in 1,2 bar.

Za pripravo trdnih gojišč smo dodali 15 g agarja (Agar technical, Biolife) na liter tekočega gojišča.

### 3.5 Gojenje

#### 3.5.1 Predpriprava

Celice *E. coli* smo za poskus pripravili tako, da smo jih dan pred poskusom precepili iz starega trdnega gojišča na novo in ga inkubirali pri 37 °C 8 ur. Po preteku 8 ur smo iz nove plošče celice nacepili v tekoče gojišče v serumski steklenički, ki smo jo nato preko noči stresali pri 200 vrtljajih na minuto v topli komori (37 °C). Z vedno istim postopkom smo zagotovili, da so bile celice v podobnem fiziološkem stanju.

#### 3.5.2 Gojenje celic na 37 °C

Prekonočno kulturo smo 100 krat redčili z 50 ml na 37 °C ogretega gojišča in jo postavili v stresalno kopel Julabo ShakeTemp SW22. Kopel smo nastavili na 37 °C in 200 vrtljajev na minuto. Kulturo smo pri konstantni temperaturi gojili 7 ur. Meritve optične gostote smo izvajali vsakih 30-60 minut, odvisno od predvidene hitrosti spremenjanja optične gostote.

#### 3.5.3 Gojenje celic s hitrim spremenjanjem temperature

Prekonočno kulturo smo 100 krat redčili z 50 ml na 37 °C ogretega gojišča in jo postavili v stresalno kopel Julabo ShakeTemp SW22. Kopel smo predhodno ogreli na 37 °C in

nastavili na 200 vrtlajev na minuto. Po enourni inkubaciji na 37 °C smo stekleničke vzeli iz kopeli in jih prenesli v hladno komoro, kjer je bila postavljena posoda z vodo in ledom (0 °C). Stekleničke smo ohladili na 5 °C z ročnim krožnim mešanjem v posodi v 3 minutah (Slika 2). Nato so se stekleničke stresale pri 200 vrtlj./min in 5 °C za 57 minut. Celice smo nato prestavili v stresalno kopel (37 °C), kjer smo jih ponovno gojili eno uro. Ta postopek smo ponavljali do prehoda celic v stacionarno fazo po 7 urah. Režim spremenjanja temperature je bil 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C. Skupno so bile celice torej 4 krat izpostavljene temperaturi 37 °C in 3 krat temperaturi 5 °C. Meritve optične gostote smo izvajali na vsakih 15 minut pri gojenju na 37 °C, pri gojenju na 5 °C pa meritev nismo izvajali, saj rasti v tem času ni bilo.

### **3.5.4 Gojenje celic s počasnim spremenjanjem temperature**

Prekonočno kulturo smo 100 krat redčili z 50 ml na 37 °C ogretega gojišča in jo postavili na stresalnik v toplo komoro (37 °C). Stresalnik smo nastavili na 200 vrtlajev na minuto. Po enourni inkubaciji na 37 °C smo stekleničke prenesli na stresalnik v hladno komoro (200 vrtlj./min in 5 °C), kjer so ostale 1 uro. Celice smo nato ponovno prestavili v toplo komoro. Ta postopek smo ponavljali do prehoda celic v stacionarno fazo po 11 urah. Režim spremenjanja temperature je bil 37 °C - 5 °C - 37 °C. Skupno so bile celice 6 krat izpostavljene temperaturi 37 °C in 5 krat temperaturi 5 °C. Meritve optične gostote smo izvajali na vsakih 15 minut.

### **3.5.5 Vpliv hitrega spremenjanja temperature na celice, ki so bile dalj časa izpostavljene nizki temperaturi**

Prekonočno kulturo smo 100 krat redčili z 50 ml na 37 °C ogretega gojišča in jo postavili v stresalno kopel. Kopel smo nastavili na 37 °C in 200 vrtlajev na minuto. Po enourni inkubaciji na 37 °C smo stekleničke vzeli iz kopeli in jih prenesli v hladno komoro, kjer je bila postavljena posoda z vodo in ledom (0 °C). Stekleničke smo ohladili z ročnim krožnim mešanjem v posodi v 3 minutah. Nato smo stekleničke prestavili na stresalnik

(200 vrtlj./min in 5 °C), kjer so ostale 1 uro. Nato smo celice prestavili s stresalnika na tla v hladni komori, kjer so, glede na poskus ostale različno dolgo (1 dan, 3 dni, 5 dni, 8 dni ali 15 dni). Po preteku tega časa smo celice prestavili ponovno na stresalnik za 1 uro, da so se celice premešale in nato v stresalno kopel (37 °C) za eno uro. Pri poskusu, kjer smo merili vpliv hitrega spremenjanja temperature na celice, ki so bile nizki temperaturi izpostavljene 1 uro, smo po ročnem ohlajanju in enournem stresanju celice takoj prestavili v stresalno kopel (37 °C).

### **3.5.6 Vpliv počasnega spremenjanja temperature na celice, ki so bile dalj časa izpostavljene nizki temperaturi**

Postopek je bil enak kot je opisan v prejšnjem podpoglavlju, le da smo celice po začetnem enournem gojenju na 37 °C počasi ohladili s stresanjem v hladni komori pri 200 vrtljajih na minuto.

## **3.6 Meritve optične gostote**

Optično gostoto smo merili s spektrofotometrom Multiskan spectrum podjetja Thermo (ZDA). Ob določenem času smo s pomočjo brizge in igle preko gumijastega zamaška serumske stekleničke vzeli 300  $\mu\text{L}$  suspenzije in jo prenesli v mikrotitrsko ploščo. Za slepi vzorec je služila enaka količina sterilnega gojišča LB. Meritve so bile izvedene pri valovni dolžini 650 nm. Vsako meritev smo izvedli enkrat.

## **3.7 Meritve koncentracije CO<sub>2</sub>**

Koncentracijo CO<sub>2</sub> smo merili s plinskim kromatografom Hewlett Packard 5890A in integratorjem Hewlett Packard 3392A. Kromatograf je imel vgrajen TCD detektor (toplotno prevodno celico). Uporabljali smo kolono napolnjeno s Porapak R 100/120 polnilom dolžine 1,83 m in preseka 3 mm. Pretok nosilnega plina (helij) je bil 180 ml/min. Pečica je bila nastavljena na 50 °C, injektor in detektor pa na 100 °C.

### 3.8 Izolacija beljakovin

Za ločitev beljakovin z 2D elektroforezo smo pripravili beljakovinske ekstrakte. Kulturo smo gojili kot je opisano v poglavjih 3.5.2 in 3.5.3, odvisno od poskusa. Po zaključenem gojenju smo kulturo prenesli iz serumske stekleničke v 50 ml centrifugirko. Kulturo smo pri 3000 vrtlj./min in 4 °C za 10 minut centrifugirali v centrifugi 3K30 (Sigma). Supernatant smo odlili. Pelet smo s pomočjo vrtinčnika resuspendirali v 50 ml Tris-HCl. Kulturo smo ponovno za 10 minut centrifugirali pri 3000 vrtlj./min in 4 °C. Ta postopek spiranja kulture s Tris-HCl smo 4-krat ponovili. Po zadnjem spiranju smo celice resuspendirali v rehidracijskem pufru (urea, tiourea, CHAPS, amfoliti in DTT), ki smo mu tik pred uporabo primešali DTT v končni koncentraciji 65 mmol/l. Rehidrirano kulturo smo prestavili v 2 ml mikrocentrifugirke in jo sonificirali pri valovni dolžini 6 mikrometrov. Kulturo smo sonificirali 4 krat po 15 sekund s 30 sekund premora za ohlajanje kulture. Sonificirano kulturo smo nato centrifugirali za 30 minut pri 4 °C in 21000G. Supernatant (beljakovinski ekstrakt) alikvotirali po 100 µl na mikrocentrifugirko in ga prestavili na -80 °C. Pred tem smo odvzeli 60 µl ekstrakta za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu. Celotno izolacijo beljakovin smo izvedli aseptično in na ledu. Koncentracijo beljakovin v celičnem ekstraktu smo izmerili metodo po Bradfordu (1976).

### 3.9 2D gelska elektroforeza

Dvodimenzionalna gelska elektroforeza je najbolj uveljavljena metoda za ločevanje več-jega števila beljakovin. Omogoča ločevanje beljakovin glede na njihovo izoelektrično točko in glede na velikost (Fey in Larsen, 2001). Na tak način lahko med seboj ločimo tudi več kot 1000 beljakovin. Poleg tega lahko iz gela določimo tudi količino posameznih beljakovin v celici in tako zaznamo že najmanjše spremembe v izražanju beljakovin in ne le na novo izraženih beljakovin. Zato je posebej primerna za spremjanje odziva celice na spremenjene okoljske dejavnike (Lilley in sod., 2001). Dvodimenzionalna gelska elektroforeza v kombinaciji z masno spektroskopijo pa omogoča takojšnjo identifikacijo ločene beljakovine iz gela. Tehnika je zato, kljub nekaterim pomanjkljivostim glavno

orodje proteomike (Fey in Larsen, 2001). V našem poskusu smo dvodimenzionalno gelsko elektroforezo izvedli na enak način kot Semenič in sod. (2008).

### 3.10 Obdelava podatkov

Podatki so bili obdelani (izračun povprečij in standardnega odklona) s pomočjo programa OpenOffice.org Calc. Grafi so bili izrisani s pomočjo programa QtiPlot, prav tako smo ta program uporabili za izračun in izris regresijskih premic in njihovih odvodov. Programa sta delovala na operacijskem sistemu Ubuntu 8.04.

Karakteristični čas segrevanja in ohlajanja kulture smo izračunali tako, da smo na eksperimentalne podatke spremenjanja temperature po času (Slika 2) prilegali eksponentno enačbo.

$$y = y_0 + Ae^{-\frac{x}{t}} \quad (1)$$

kjer je  $t$  karakteristični čas,  $x$  čas v sekundah,  $A$  predeksponencialni faktor,  $y_0$  zamik v smeri  $y$  in  $y$  temperatura pri danem času.

Začetek rasti kulture po inkubacij na 5 °C za različno dolgo časa smo določili tako, da smo na eksperimentalne podatke rasti po prestavitvi na 37 °C prilegali Boltzmannovo funkcijo. Funkcijo smo nato odvajali in tako dobili naklon krivulje v posamezni točki. Arbitrarno smo se odločili, da bomo za začetek rasti privzeli tisti trenutek, ko je odvod v točki presegel 0,002. Primer določitve je v prilogah A in B.

Gele pridobljene iz 2D elektroforeze smo analizirali s programom Dymension podjetja Syngene (VB).

### 3.11 Mikroskopiranje

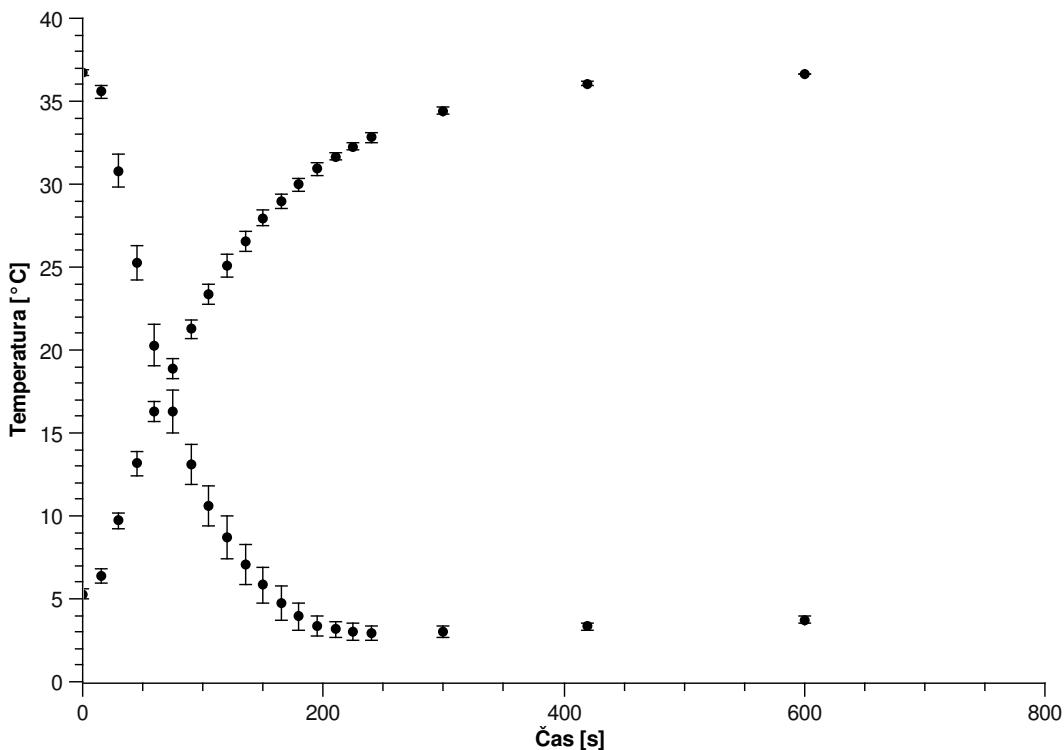
Kulturo smo si ogledali z mikroskopom Reicher (Avstrija). Preparate smo barvali po Gramu in z akridin oranžem in jih preko mikroskopa fotografirali z digitalnim fotoaparatom.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Merjenje temperature

#### 4.1.1 Hitro spremjanje temperature

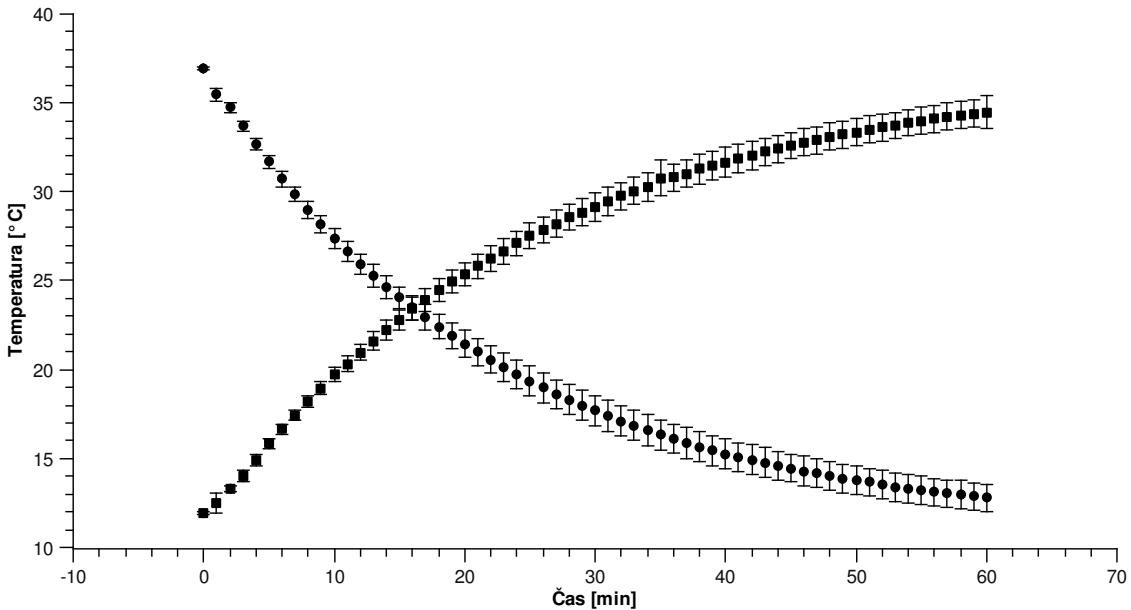
Potek sprememb temperature v gojišču pri poskusu s hitrim spremicanjem temperature je prikazan na sliki 2. Vidimo, da se gojišče segreje nad 36 °C po 7 minutah, 37 °C pa doseže v nadaljnje pol ure. Eksperimentalnim podatkom smo prilegali eksponentno funkcijo in iz nje določili karakteristični čas. Karakteristični čas segrevanja je bil približno 2 minuti (118s). Za ohladitev kulture do 5 °C so potrebne 3 minute, karakteristični čas pa je v tem primeru 1,3 minute (79 sekund). Tako segrevanje kot ohlajanje natančno sledi eksponentni funkciji, le prva meritev v obeh primerih odstopa. Razlog je segrevanje ozziroma ohlajanje same stekleničke. Zaradi tega smo prvo točko v obeh primerih pri računanju karakterističnega časa izpustili.



Slika 2: Hitro segrevanje in ohlajanje gojišča v serumskih stekleničkah: ■ prikazuje podatke za hitro segrevanje, ● prikazuje podatke za hitro ohlajanje; graf prikazuje povprečja eksperimentalnih podatkov z izračunanimi standardnimi odkloni ( $n=4$ )

#### 4.1.2 Počasno spremjanje temperature

Slika 3 prikazuje spremjanje temperature v gojišču pri počasnem segrevanju in ohlajanju. Tako kot pri hitrem ohlajanju in segrevanju se tudi tukaj podatki lepo prilegajo eksponentni funkciji. Kultura v enourni inkubaciji ne doseže  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ohladi pa se na približno  $12,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Karakteristični čas za segrevanje je približno 28, za ohlajanje pa 22 minut. Podobno kot pri hitrem ohlajanju tudi tukaj spremembe temperature natančno sledijo eksponentni funkciji.



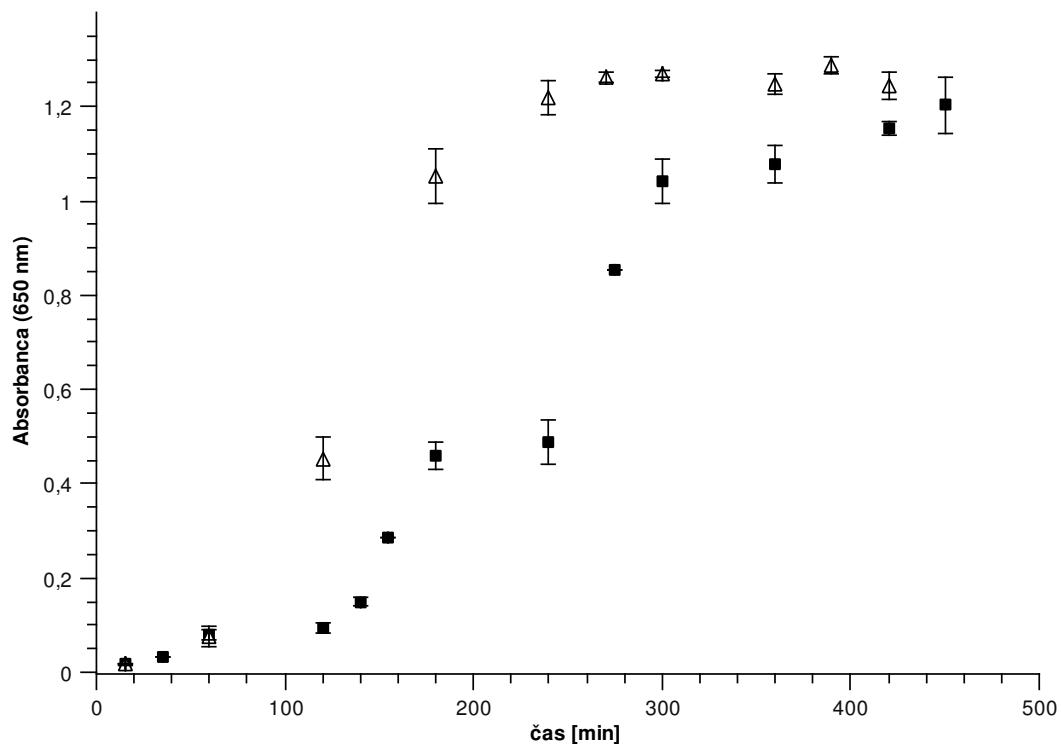
Slika 3: Počasno segrevanje in ohlajanje gojišča v serumskih stekleničkah: ■ prikazuje podatke za počasno segrevanje, ● prikazuje podatke za počasno ohlajanje; graf prikazuje povprečja eksperimentalnih podatkov z izračunanimi standardnimi odkloni ( $n=5$ )

## 4.2 Gojenje *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih

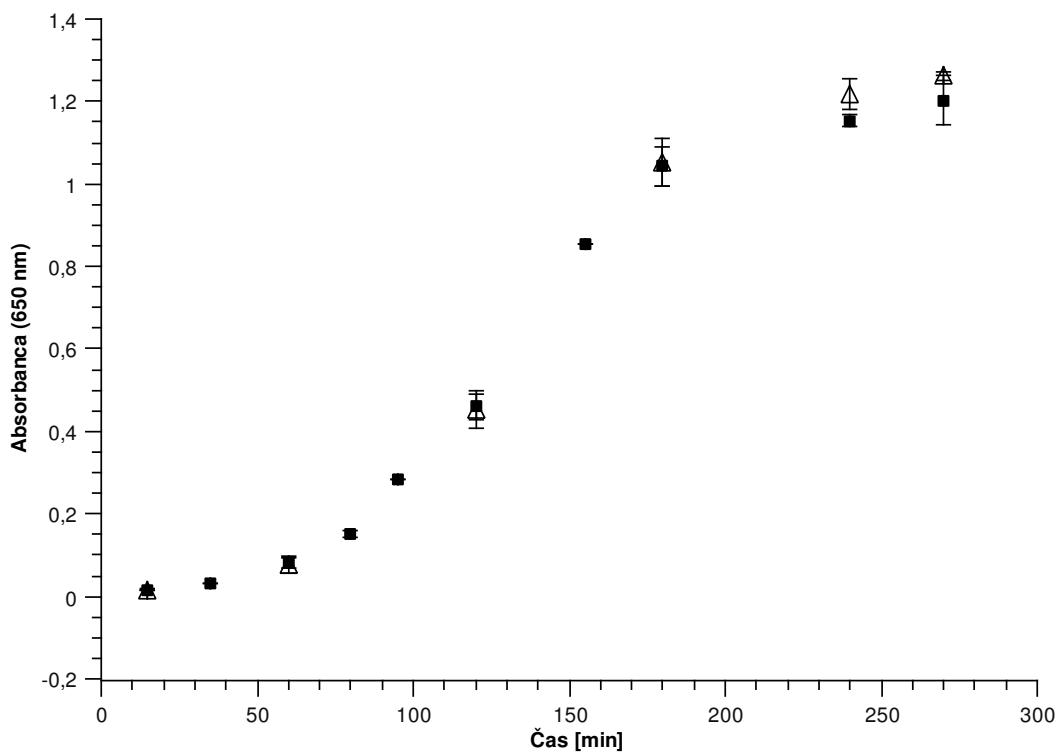
### 4.2.1 Gojenje *E. coli* s hitrim periodičnim spremenjanjem temperature

Slika 4 prikazuje rast *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih. Kultura, ki je bila konstantno gojena na  $37^{\circ}\text{C}$  ima rastno krivuljo značilne sigmoidne oblike. V stacionarno fazo rasti preide približno po 4 urah gojenja pri optični gostoti 1,2. Pri kulturi, ki je bila gojena pri režimu  $37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$  in s hitrim spremenjanjem temperature je krivulja rasti stopničasta. Med obdobji inkubacije na  $37^{\circ}\text{C}$  je vidna intenzivna rast (podvojevalni čas približno 25 minut); med obdobji inkubacije na  $5^{\circ}\text{C}$  se celice ne delijo (krivulja je vodoravna). V stacionarno fazo rasti pride kultura gojena s periodičnim spremenjanjem temperature po približno 7,5 urah pri enaki optični gostoti kot pri kulturi, ki je bila gojena konstantno na  $37^{\circ}\text{C}$ , torej pri

1,2. Kot je razvidno iz grafa, sta tudi hitrosti rasti obeh kultur pri inkubaciji na 37 °C primerljivi. To potrjuje Slika 5, kjer smo iz grafa na Sliki 4 izrezali obdobja ko je bila kultura na 5 °C in se celična gostota ni povečevala. Graf smo nato zlepili skupaj. Vidimo, da je rast obeh kultur v obdobjih rasti na 37 °C skoraj enaka.



Slika 4: Rast *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih gojenja: △ prikazuje rast kulture gojene neprestano pri 37 °C; ■ prikazuje rast bakterije gojene s hitrim spremiščanjem temperature; karakteristični čas za segrevanje je bil 118 s, za ohlajanje pa 79 s; graf prikazuje povprečja eksperimentalnih podatkov z izračunanimi standardnimi odkloni ( $n=7$ )

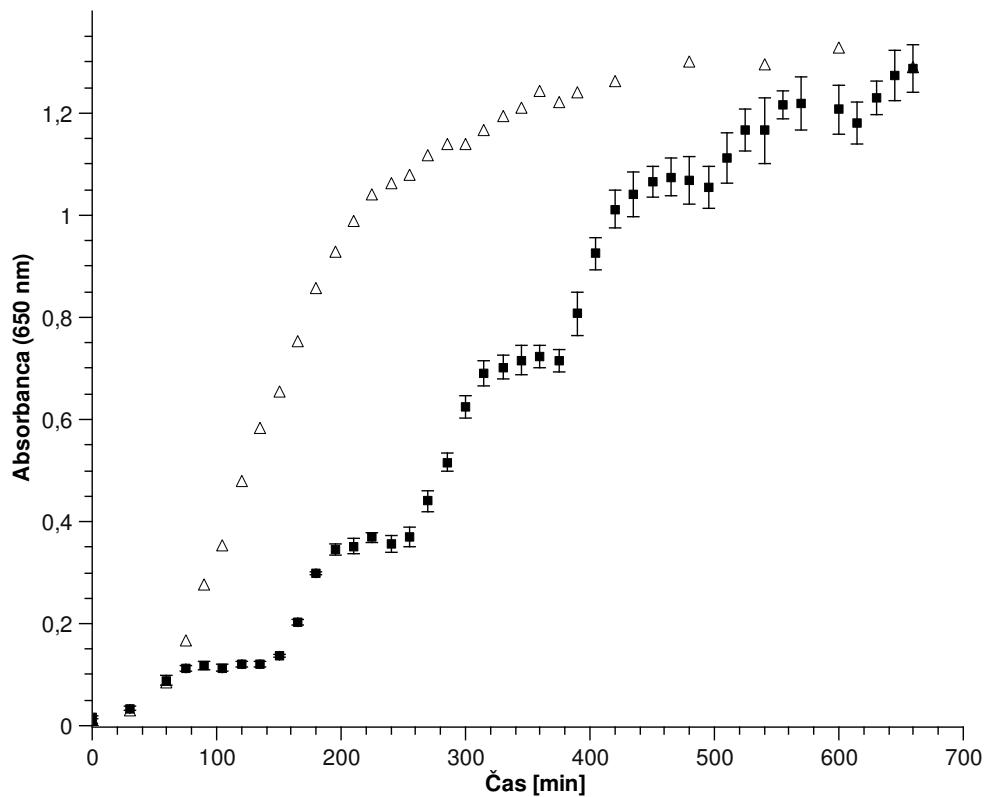


Slika 5: Rast *E. coli* pri gojenju s hitrim spremenjanjem temperature - modificiran graf:  $\Delta$  prikazuje rast kulture gojene konstantno pri  $37^{\circ}\text{C}$ ; ■ prikazuje rast kulture gojene s hitrim spremenjanjem temperature, ki smo ji grafično odstranili obdobja brez rasti, ko je bila kultura na  $5^{\circ}\text{C}$

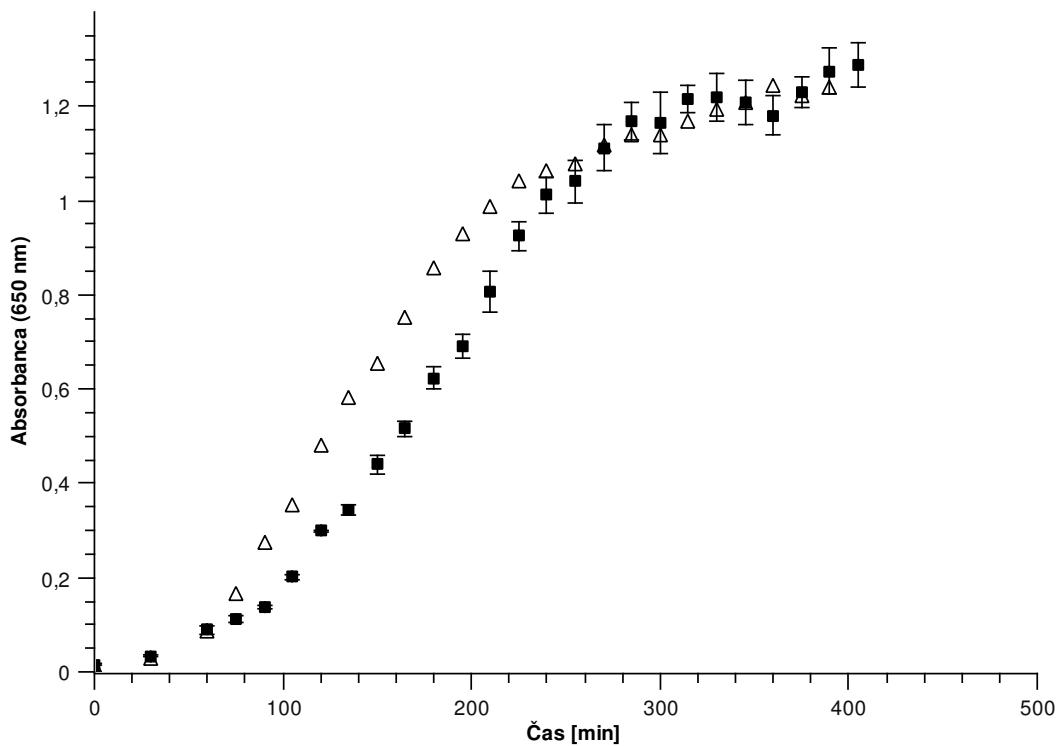
#### 4.2.2 Gojenje *E. coli* s počasnim periodičnim spremenjanjem temperature

*E. coli* smo gojili tudi s počasnim periodičnim spremenjanjem temperature med  $37$  in  $5^{\circ}\text{C}$ , kar prikazuje Slika 6. Tu smo kulturo ohlajali in segrevali počasneje, pri čemer je bil karakteristični čas za segrevanje  $1678$  s (približno 28 minut), za ohlajanje pa  $1300$  s (22 minut). To je približno 16-krat počasneje kot pri hitrem ohlajanju oziroma 14-krat počasneje kot pri hitrem segrevanju. V tem primeru je kultura pri režimu  $37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$  do stacionarne faze potrebovala 11 ur, kar je 4 ure več kot v primeru, ko smo kulturo ohladili in segreli hitro (Slika 4). Podobno kot pri hitrem spremenjanju temperature smo tudi grafu na Sliki 6 izrezali obdobja, ko je bila kultura na  $5^{\circ}\text{C}$  in dobili graf na Sliki 7. Vidimo, da se podatki o optični gostoti pri različnih temperaturnih režimih ujemajo pri nižjih

vrednostih in ob prehodu v stacionarno fazo rasti, v fazi eksponentne rasti pa ne.



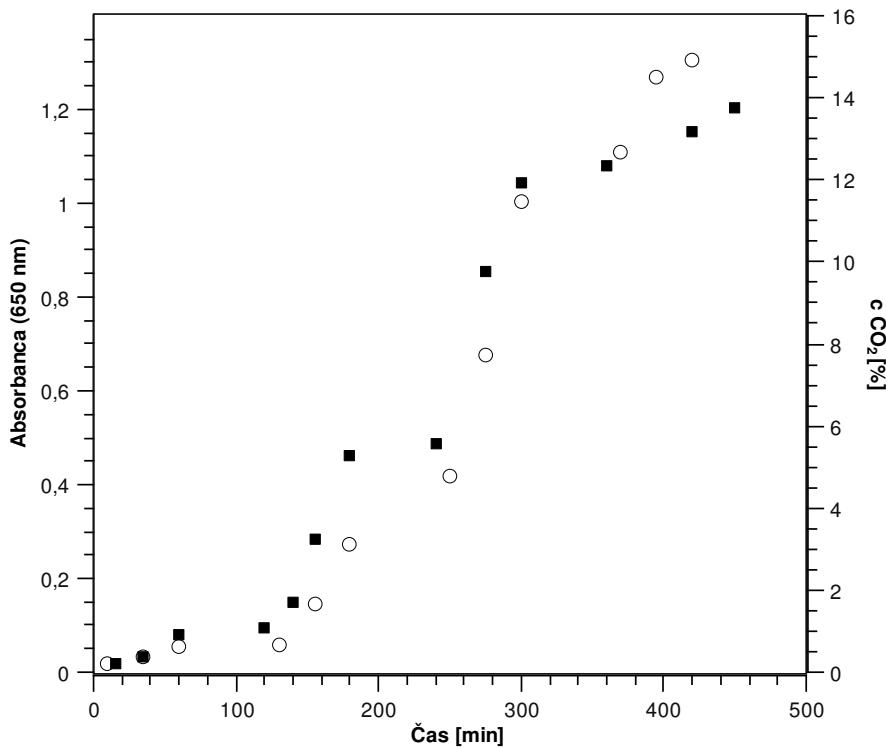
Slika 6: Rast *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih gojenja: Δ prikazuje rast kulture gojene konstantno pri 37 °C; ■ prikazuje rast kulture gojene s počasnim spremenjanjem temperature; karakteristični čas za segrevanje je bil 1678 s, za ohlajanje pa 1300 s; graf prikazuje povprečja eksperimentalnih podatkov z izračunanimi standardnimi odkloni(n=4)



Slika 7: Rast *E. coli* pri počasnem spremenjanju temperature - modificiran graf:  
 $\Delta$  prikazuje rast kulture gojene konstantno pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\blacksquare$  prikazuje rast kulture gojene s počasnim spremenjanjem temperature, ki smo ji grafično odstranili obdobja brez rasti

#### 4.2.3 Proizvodnja $\text{CO}_2$ med rastjo *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih

Poleg merjenja optične gostote smo rast *E. coli* pri različnih temperaturnih režimih spremljali tudi z merjenjem koncentracije  $\text{CO}_2$  v serumskih stekleničkah s kulturo. Odvzeli smo vzorec plinske faze in določili vsebnost  $\text{CO}_2$  s plinskim kromatografom. Slika 8 prikazuje spremenjanje koncentracije  $\text{CO}_2$  in spremenjanje optične gostote. Kulturna je v stacionarno fazo prešla pri približno 16% koncentraciji  $\text{CO}_2$ , kar odgovarja optični gostoti 1,2. Če iz grafa na Sliki 8 izrežemo obdobja, ko ni rasti vidimo, da spremenjanje koncentracije  $\text{CO}_2$  in spremenjanje optične gostote dobro sovpadata (Priloga C).



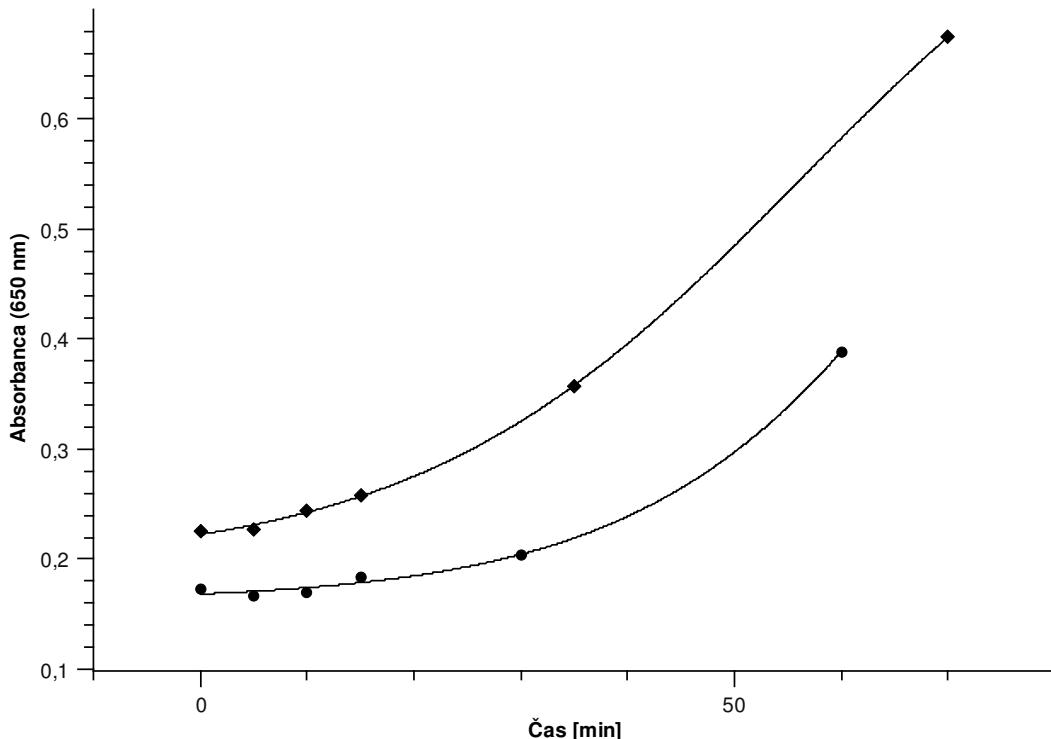
Slika 8: Rast *E. coli* in izmerjena koncentracija  $\text{CO}_2$ : Graf prikazuje rast kulture pri gojenju s hitrim spremjanjem temperature (■) in izmerjeno koncentracijo  $\text{CO}_2$  (○) v serumski steklenički. ( $n=7$ )

#### 4.2.4 Revitalizacija kulture *E. coli* po hranjenju na 5 °C pri različnih temperaturnih režimih

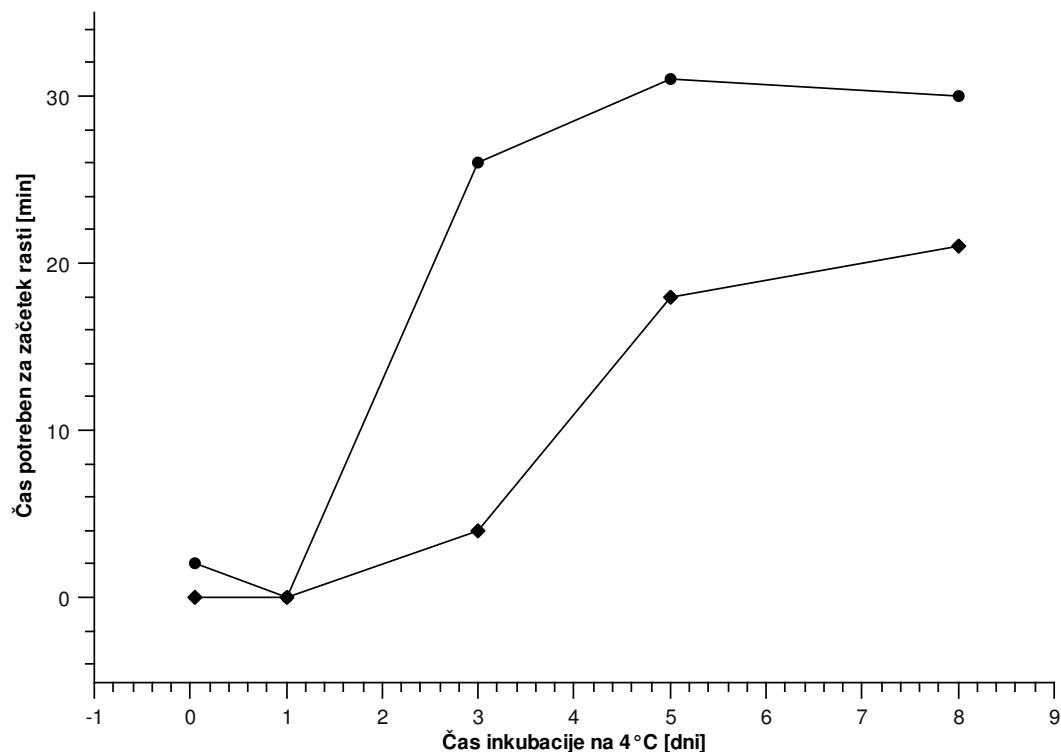
Kulturo *E. coli* smo najprej gojili eno uro, nato smo jo ohladili na 5 °C in jo pri tej temperaturi inkubirali za 1 uro oziroma za 1, 3, 5, 8 ter 15 dni. Za tem smo jo ponovno prestavili na 37 °C za eno uro in opazovali rast z optično gostoto. Ohlajanje kulture smo izvedli na 2 načina. Pri prvem je bil karakteristični čas za ohlajanje 1,3 minute (79 sekund), pri drugem je bil 21,7 minute (1300 sekund). Na Sliki 9 lahko vidimo, da kultura, ki je bila ohlajena počasi in 3 dni inkubirana na 5 °C, začne prej rasti kot tista, ki je bila ohlajena hitro in inkubirana na 5 °C za enako obdobje.

Podatke smo obdelali kot je opisano v poglavju 3.10 in določili čas, po katerem je posamezen vzorec pričel rasti. Ti časi so prikazani na Sliki 10. Vidimo, da pri krajših obdobjih inkubacije na 5 °C (1 ura in 1 dan), način ohlajanja na začetek rasti nima

vpliva, pri daljših obdobjih pa je razlika precejšnja. Najdaljšo lag fazo (zamik do začetka rasti) smo opazili pri inkubaciji za 3 dni, kjer kultura, ki je bila ohlajena počasi začne rasti po 4 minutah, tista, ki je bila ohlajena hitro pa po 26 minutah. Dolžina lag faze se po 5-8 dneh inkubacije na 5 °C ne povečuje več.

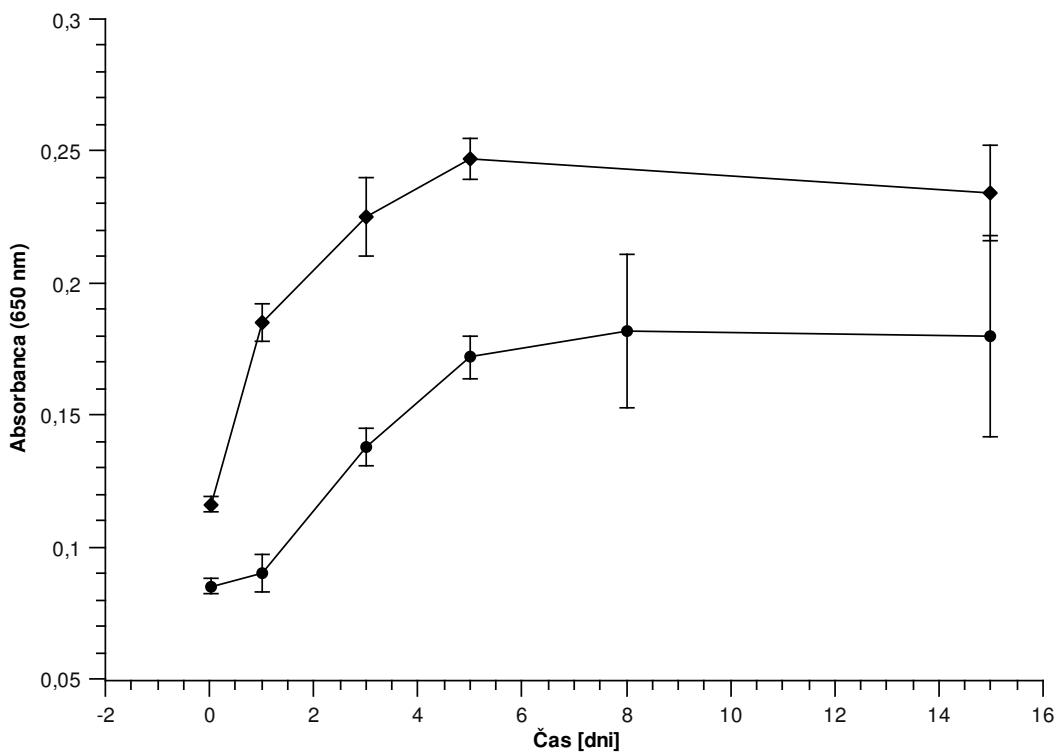


Slika 9: Primerjava rasti med kulturama *E. coli*, ki sta bili inkubirani za 3 dni pri 5 °C in nato prestavljeni na 37 °C: ● prikazujejo rast kulture, ki je bila ohlajena hitro (karakteristični čas 1,3 minute), ♦ prikazuje kulturo, ki je bila ohlajena počasi (karakteristični čas 21,7 minute). Črta prikazuje krivuljo, dobljeno s prileganjem na eksperimentalne podatke. Kultura, ki je bila ohlajena hitro je začela rasti po 26 minutah, kultura, ki je bila ohlajena počasi pa po 5 minutah (določitev je prikazana v Prilogi B)



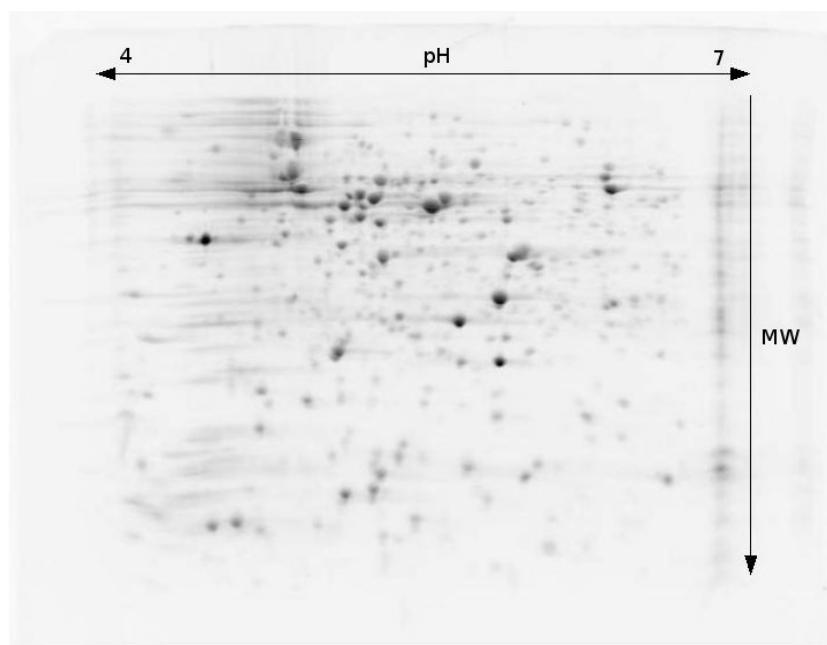
Slika 10: Dolžina lag faze pri različnih režimih ohlajanja kulture *E. coli* na 5 °C in inkubacijskih razmerah: ● prikazujejo rast kulture, ki je bila ohlajena hitro (karakteristični čas 79 sekund), ◆ pa kulture, ki je bila ohlajena počasi (karakteristični čas 1300 s). Črta je dodana zaradi boljše preglednosti grafa in ne določa vrednosti med točkami.

Pri gojenju kulture *E. coli* na 5 °C smo opazili, da se optična gostota povečuje prvih 5 dni, potem pa se rast zaustavi (Slika 11). Pri kulturi, ki je bila ohlajena hitro rast po 1 dnevu gojenja še ni prisotna, pri počasi ohlajeni kulturi pa smo opazili, da kultura na 5 °C začne rasti še pred potekom prvih 24 ur, optična gostota pa se povečuje do 5 dneva gojenja na 5 °C (Slika 11). Zaradi počasnega ohlajanja je kultura rastla še nekaj časa po prestavitev na 5 °C (Slika 6), zato je že prva vrednost večja od vrednosti pri hitrem ohlajanju, kar pa ne pomeni, da je v tem času kultura ponovno začela rasti. Obema kulturama se je optična gostota med gojenjem na 5 °C približno podvojila.

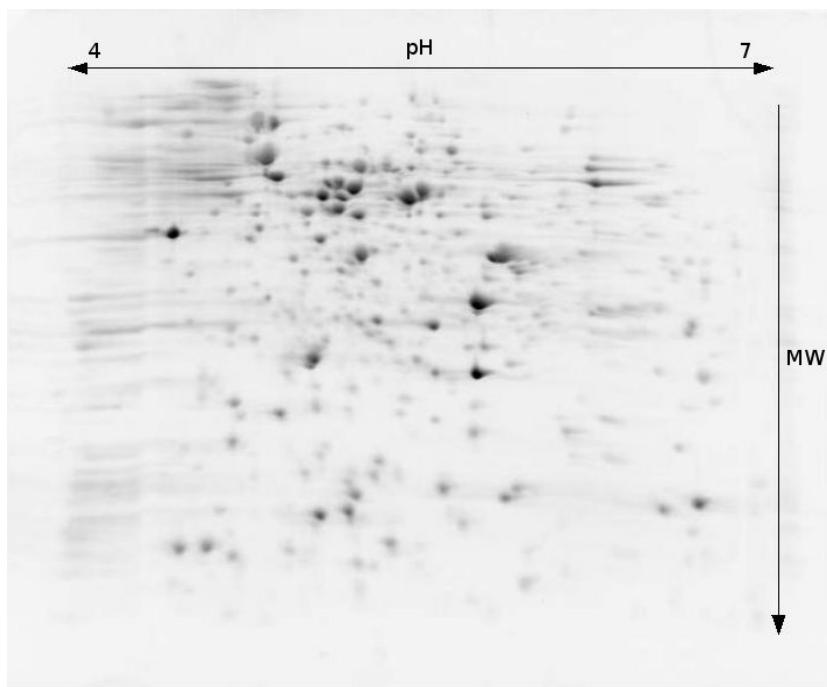


Slika 11: Rast kulture *E. coli* pri gojitvi na 5 °C: ● prikazuje optično gostoto po gojenju na 5 °C po hitrem ohlajanju na 5 °C, ◆ prikazuje optično gostoto po gojenju na 5 °C po počasnem ohlajanju na 5 °C. Črta je dodana zaradi boljše preglednosti grafa in ne določa vrednosti med točkami. Graf prikazuje povprečja eksperimentalnih podatkov z izračunanimi standardnimi odkloni ( $n=6$ ).

Z merjenjem hitrosti rasti (optična gostota) in metabolizma (koncentracija CO<sub>2</sub>) smo pokazali, da bakterije, ki smo jim hitro spremenjali temperaturo niso zaznale, da so bile v vmesnem času na 5 °C, saj so nadaljevale z enako hitrostjo rasti kot pred izpostavitvijo nizkim temperaturam. Da bi to potrdili na molekularnem nivoju, smo primerjali beljakovinska profila kontrolne kulture gojene na 37 °C in kulture, ki smo ji periodično spremenjali temperaturo. Slika 12 prikazuje gel kontrolne stekleničke, ki je bila 4 ure konstantno gojena na 5 °C, Slika 13 pa gel vzorčne stekleničke, ki je bila gojena 7 ur pod režimom 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C. Analiza obeh gelov je pokazala, da si statistično nista različna. Vse beljakovine, ki so prisotne na enem gelu lahko najdemo tudi na drugem, prav tako pa ni statistično značilnih razlik v koncentraciji posameznih beljakovin.



Slika 12: Beljakovinski profil kulture *E. coli* gojene konstantno pri 37 °C za 4 ure: Beljakovine so ločene glede na pH (horizontalno) in molekulsko maso (vertikalno).



Slika 13: Beljakovinski profil kulture *E. coli* gojene 7 ur pod režimom 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C. Beljakovine so ločene glede na pH (horizontalno) in molekulsko maso (vertikalno).

## 5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo želeli preučiti kako periodično spreminjanje temperature med rastjo bakterij vpliva na rast mikrobnih celic. Odločiti smo se morali s kakšno amplitudo, frekvenco in hitrostjo spremembe bomo celice gojili. V literaturi je zelo malo podatkov o tem, kakšne temperaturne gradiante so raziskovalci uporabili pri preučevanju ohladitvenega šoka, zato smo si gradiente izbrali po lastni presoji. Za počasnejšo različico smo izbrali ohlajanje s karakterističnim časom 1300 sekund. S hitrejšo različico ohlajanja pa smo želeli kulturo čim hitreje ohladiti, saj smo želeli preveriti, kako se bodo celice odzvale na zelo hitro ohladitev. Predvidevali smo, da se celica na 5 minutno ali hitrejše ohlajanje ne bo odzvala, zato smo poskušali celice ohladiti prej kot v 5 minutah. Uporaba vodne kopeli s temperaturo 0 °C ob sočasnem spremeljanju temperature se je izkazala za dovolj hitro in ponovljivo metodo.

Kot kontrola nam je služila kultura *E. coli* gojena na 37 °C, ki je rastla po pričakovanjih (Slika 4). Pri hitrem spreminjanju temperature je v skladu s pričakovanjimi kultura pri gojenju na 37 °C eksponentno rastla, v času gojenja na 5 °C pa rasti nismo opazili. Zanimivo je, da je kultura po ponovni prestavitevi na 37 °C, takoj začela rasti z enako hitrostjo kot v predhodnem ciklu gojenja na 37 °C. To kaže na to, da celice s hitro ohladitvijo "zamrznemo" v trenutnem fiziološkem stanju (torej v eksponentni fazi rasti). Po ponovni prestavitevi na 37 °C celice rastejo naprej enako hitro kot pred ohladitvijo. Celice ne zaznajo, da so bile v vmesnem času na 5 °C. To je v skladu z našo hipotezo, da hitra sprememba temperature celicam ne dopušča metabolne prilagoditve.

Da bi to potrdili, smo iz celic gojenih konstantno pri 37 °C in celic gojenih pod režimom 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °Cs hitrim ohlajanjem izolirali beljakovine in naredili 2D elektroforezo. Zanimalo nas je, ali se bo v vzorcu pojavila kakšna nova beljakovina in ali se bo spremenila koncentracija katere od že prisotnih beljakovin. Tako eno kot drugo bi pomenilo, da se je celica odzvala na okoljske spremembe in da je zato sposobna spremembe v času spreminjanja temperature, torej prej kot v 3 minutah. Analiza podatkov elektroforeze je pokazala, da sta beljakovinska profila enaka. Izražanje beljakovin se količinsko ni spremenilo, prav tako med gojenjem ni

nastala nobena nova vrsta beljakovine. Gojenje celic pod režimom 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C s hitrim ohlajanjem na metabolizem celic torej ni vplivalo. S tem smo potrdili hipotezo, da hitro ohljanje kulture celicam ne dopušča prilagoditve. Metabolizem celic se ni spremenil in zato se posledično ni spremenila niti rast.

Drugačno obnašanje celic smo zasledili pod režimom 37 °C - 5 °C - 37 °C s počasnim spremenjanjem temperature (Slika 6). Kultura je rastla pri gojenju na 37 °C in mirovala na 5 °C, prehod pa je bil v primerjavi s prejšnjim načinom gojenja značilno bolj počasen. Celice so za prenehanje rasti po prestavitevi na 5 °C potrebovale približno 20 minut, prav toliko za ponoven začetek rasti po prestavitevi na 37 °C. Kultura, ki je bila gojena s počasnim ohlajanjem in ogrevanjem je do stacionarne faze rasti potrebovala precej več časa (11 ur) kot tista, ki je bila gojena s hitrim ohlajanjem in ogrevanjem (7 ur). Razlog je v temu, da je bila slednja med gojenjem v povprečju izpostavljena višjim temperaturam. Prehod je bil namreč oster in v le nekaj minutah po prestavitevi iz 5 na 37 °C je kultura že rastla z največjo hitrostjo. Nasprotno je kultura, ki je bila ohlajena in segreta počasi po prestavitevi iz 5 na 37 °C potrebovala veliko časa da se je temperatura gojišča približala optimalni in je kultura dosegla največjo hitrost rasti. Glede na literaturo bi pričakovali, da prilagoditev celic med počasnim ohlajanjem vpliva na hitrost rasti po ponovni prestavitevi na 37 °C in da bo hitrost rasti pri kulturi, ki je bila ohlajena počasi, počasnejša (Ng in sod., 1962). Za natančno določitev razlike v hitrosti rasti nismo opravili poskusa, zato tega ne moremo potrditi.

2D eletroforeze v tem primeru nismo naredili, saj so to predhodno že opravili Semenič in sod. (2008). Ugotovili so, da počasno periodično spremenjanje temperature med 37 in 4 °C spremeni beljakovinski profil bakterij, saj so se nekatere beljakovine izražale bolj intenzivno, nekatere pa manj intenzivno kot pri kontrolni kulturi, ki je bila gojena konstantno pri 37 °C. Če je časa dovolj se pri periodičnem spremenjanju temperature torej molekularni odgovor na spremenjene razmere razvije. V našem eksperimentu časa očitno ni bilo dovolj in zato ni bilo odgovora. Za uspešno prilagoditev celic na spremenjene razmere je torej bistvena hitrost sprememb.

Poleg merjenja optične gostote smo med rastjo kulture spremljali tudi koncentracijo

CO<sub>2</sub> pri hitrem spreminjanju temperature. Ugotovili smo (Slika 8 in Priloga C), da se koncentracija CO<sub>2</sub> s časom spreminja podobno kot optična gostota. Koeficient korrelacije med optično gostoto in koncentracijo CO<sub>2</sub> znaša 0,975. To je pričakovani rezultat, saj se za rast potrebna energija proizvaja pri celičnemu dihanju, katerega končni produkt je CO<sub>2</sub>.

Z naslednjim poizkusom smo ugotovljali, ali hitrost ohlajanja kulture vpliva na rast kulture pri ponovnem gojenju na 37 °C. Primerjali smo 2 načina ohlajanja - takega s karakterističnim časom 1,3 minute (hitro ohlajanje) in takega s karakterističnim časom 21,7 minute (počasno ohlajanje). Ugotovili smo, da za kulturo pri krajsih časih gojenja (1 ura in 1 dan) na 5 °C način ohlajanja ni pomemben, pri daljšem gojenju (3, 5, 8 in 15 dni) na 5 °C pa se je pojavila razlika (Slika 10). Čas potreben za začetek rasti se je povečeval s časom inkubacije na 5 °C. Dolžina lag faze se pri počasnem in hitrem ohlajanju spreminja na podoben način, zato lahko sklepamo, da je vzrok za lag fazo na celičnem nivoju v obeh primerih enak, le obseg je različen. Iz grafa je razvidno, da po prestavitevi na 5 °C v celici še potekajo določeni procesi, saj se z daljšanjem izpostavitve nizkim temperaturam daljša tudi čas, potreben za ponoven začetek rasti pri ponovnem gojenju na 37 °C ne glede na predhodno zgodovino gojenja. Poleg tega je očitno, da so celice, ki so se počasi ohlajale in so imele možnost za prilagoditev bolje prilagojene na hranjenje na nizki temperaturi.

Pojav lag faze po ponovni prestavitevi na 37 °C po inkubaciji na 5 °C je mogoče povezan s pojavom filamentozne rasti pri tej temperaturi. Kulture, ki so bile hitro ohlajene na 5 °C in 8 ali 15 dni gojene pri tej temperaturi smo po koncu gojenja pogledali pod mikroskopom. Opazili smo filamente dolžine do 150 µm, ki jih pred gojenjem na 5 °C ni bilo. Kulturo smo nato gojili na 37 °C in opazili, da se filamenti razgradijo. To je v skladu z dosedanjimi raziskavami (Shaw, 1968). Fotografija kulture po 15 dnevnom gojenju na 5 °C je v Prilogi D.

Pri inkubaciji na 5 °C se je ne glede na režim spreminjanja temperature optična gostota povisala za približno 2-krat, kar je v skladu z rezultati prejšnjih raziskav (Gill in sod., 2001). Možna razlaga za enako povečanje optične gostote pri obeh temperturnih režimih je ta, da je v celicah v obeh primerih približno enako število beljakovin v

fazi prevajanja na ribosomih. Ko se vse obstoječe mRNA molekule prepišejo se rast zaustavi, saj nove mRNA molekule ne nastanejo (Jones in Inouye, 1994; Broeze in sod., 1977). Zaradi tega je povečanje optične gostote enako, kljub temu, da kultura, ki je bila ohlajena počasi začne rasti pred kulturo, ki je bila ohlajena hitro. Navedene domneve bi bilo potrebno še dodatno eksperimentalno potrditi.

Če primerjamo Sliko 10 in Sliko 11 vidimo, da je rast na 5 °C prisotna do 5 dneva gojenja pri tej temperaturi, enako dolgo pa se povečuje tudi dolžina lag faze po revitalizaciji na 37 °C. Očitno je, da sta rast pri nizki temperaturi in dolžina lag faze po revitalizaciji povezana. To bi lahko bilo povezano s pretvorbo celic v filamentozno obliko. Možno je, da se celice pri počasnem ohlajanju v manjši meri pretvorijo v filamentozno obliko in zato pri ponovni izpostavitvi višji temperaturi prej začnejo rasti.

## 5.1 Sklepi

- celice *E. coli* se ne odzivajo na spremembe temperature iz 37 na 5 °C, ki se zgodijo prej kot v 3 minutah; to kaže beljakovinski profil celic, ki se glede na beljakovinski profil celic, ki so gojene konstantno pri 37 °C, ne spremeni
- celice, ki jih hitro ohladimo iz 37 °C na 5 °C in tam gojimo za 8 ali 15 dni, rastejo filamentozno; po ponovni prestavitev na 37 °C se podaljša lag faza glede na celice, ki smo jih počasi ohladili iz 37 na 5 °C, kar kaže, da je za boljše preživetje celic na nizki temperaturi potrebna prilagoditev celic.

## 6 POVZETEK

Mikroorganizmi živijo v okolju, ki se nenehoma spreminja. Eden od dejavnikov, ki opredeljujejo rast mikroorganizmov je temperatura. Rast pri konstatnih temperaturah je pri bakteriji *Escherichia coli* že dobro preučena, zato smo se pri naših raziskavah osredotočili na vpliv periodičnih sprememb temperature na rast. Z gojenjem celic v zaprtem rastnem sistemu in merjenjem optične gostote s spektrofotometrom smo preučevali odziv celic na periodično nihanje temperature med 37 in 5 °C. Poleg spremeljanja rasti z optično gostoto smo merili tudi koncentracijo CO<sub>2</sub> v plinski fazi. Ugotovili smo, da se koncentracija CO<sub>2</sub> spreminja podobno kot optična gostota ne glede na režim spremicanja temperature.

Zanimalo nas je, ali se celice lahko odzovejo na hitre periodične spremembe temperature. Ugotovili smo, da je sprememba temperature iz 37 na 5 °C, ki se zgodi v času, ki je krajši od 3 minut premalo za odziv celic na spremenjene razmere, saj so ob ponovni inkubaciji na 37 °C rasle enako kot pred izpostavitvijo nizki temperaturi. Da bi preverili, če se zaradi nihanja temperature spremeni beljakovinski profil celice smo naredili 2D elektroforezo beljakovinskih ekstraktov kulture, ki je bila gojena konstantno pri 37 °C in kulture, ki smo jo izmenično gojili pri 37 in 5 °C. Rezultati so potrdili naše domneve, da celice ostanejo nespremenjene, saj med geloma ni bilo značilnih razlik.

Spremljali smo tudi rast *E. coli* pri gojenju na 5 °C. Ugotovili smo, da se optična gostota povečuje 5 do 8 dni, nato pa ostane konstantna. Kultura, ki je bila iz 37 na 5 °C ohlajena počasi je začela rasti prej kot tista, ki je bila ohlajena hitro. Sklepamo, da se celice med počasnim ohlajanjem boljše prilagodijo nizkim temperaturam. Z ogledom mikroskopskih preparatov celic, ki so bile hitro ohlajene in gojene za 8 ali 15 dni na 5 °C smo ugotovili, da so se celice med inkubacijo pri 5 °C podaljšale, čemur smo tudi pripisali povečanje optične gostote.

## 7 VIRI

- Bovill R. A., Bew J., Baranyi J. 2001. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature II. Rapidly changing temperatures. International Journal of Food Microbiology 67: 131–137.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Broeze R. J., Solomon C. J., Pope D. H. 1977. Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Bacteriology, 134, 3: 861-874.
- Fey S. J., Larsen P. M. 2001. 2D or not 2D. Current Opinion in Chemical Biology, 5: 26–33.
- Gill C. O., Badoni M., Jones T. H. 2007. Behaviours of log phase cultures of eight strains of *Escherichia coli* incubated at temperatures of 2, 6, 8 and 10 °C. International Journal of Food Microbiology 119: 200–206.
- Gill C. O., Greer G. G. , Jones T., Badoni M., Dilts B. D. 2001. Induction of lag phase by chiller temperatures in *Escherichia coli* growing in broth or on pork. Food Microbiology, 18: 141-149.
- Gualerzi C. O., Giuliodori A. M., Pon C. L. 2003. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. Journal of Molecular Biology, 331, 3: 527-539.
- Herendeen S. L., Vanbogelen R. A., Neidhardt F. C. 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. Journal of Bacteriology, 139, 1: 185-194.
- Jones P. G., Cashel M., Glaser G., Neidhardt F. C. 1992. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 174, 12: 3903-3914.
- Jones T., Gill C. O., McMullen L. M. 2004. The behaviour of the log phase *Escherichia*

*coli* at temperatures that fluctuate about the minimum for growth. Letters in Applied Microbiology 39: 296–300.

Jones P. G., Inouye M. 1994. The cold-shock response — a hot topic. Molecular Microbiology, 11,5: 811-818.

Jones P. G., Vanbogelen R. A., Neidhardt F. C. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 169, 5: 2092-2095.

Justice S. S., Hunstad D. A., Seed P. C., Hultgren S. J. 2006. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 52: 19884-19889.

Kandror O., DeLeon A., Goldberg A. L. 2002 Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 15: 9727-9732.

Lemaux P. G., Herendeen S. L., Bloch P. L., Neidhardt F. C. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. Cell, 13, 3: 427-434.

Lilley K. S., Razzaq A., Dupree P. 2001. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. Current Opinion in Chemical Biology, 6: 46–50

Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice - Hall: 377-378

Mitchell G.A., Brocklehurst T.F., Parker R. in Smith A.C. 1995. The effect of transient temperatures on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2. II: excursions outside the growth range. Journal of Applied Bacteriology, 79:128-134

Ng H., Ingraham J. L., Marr A. G. 1962. Damage and derepression in *Escherichia coli* resulting from growth at low temperatures. Journal of Bacteriology, 84: 331-339

Phadtare S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. Current

Issues in Molecular Biology, 6: 125-136

Semenič T., Jamnik P., Mandič-Mulec I., Raspor P., Stopar D. 2008. Fiziološki odgovor bakterije *Escherichia coli* na periodično spremicanje temperature. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P. (ur.), Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo : 119-127

Shaw M. K. 1968. Formation of filaments and synthesis of macromolecules at temperatures below the minimum for growth of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 95, 1: 221-230

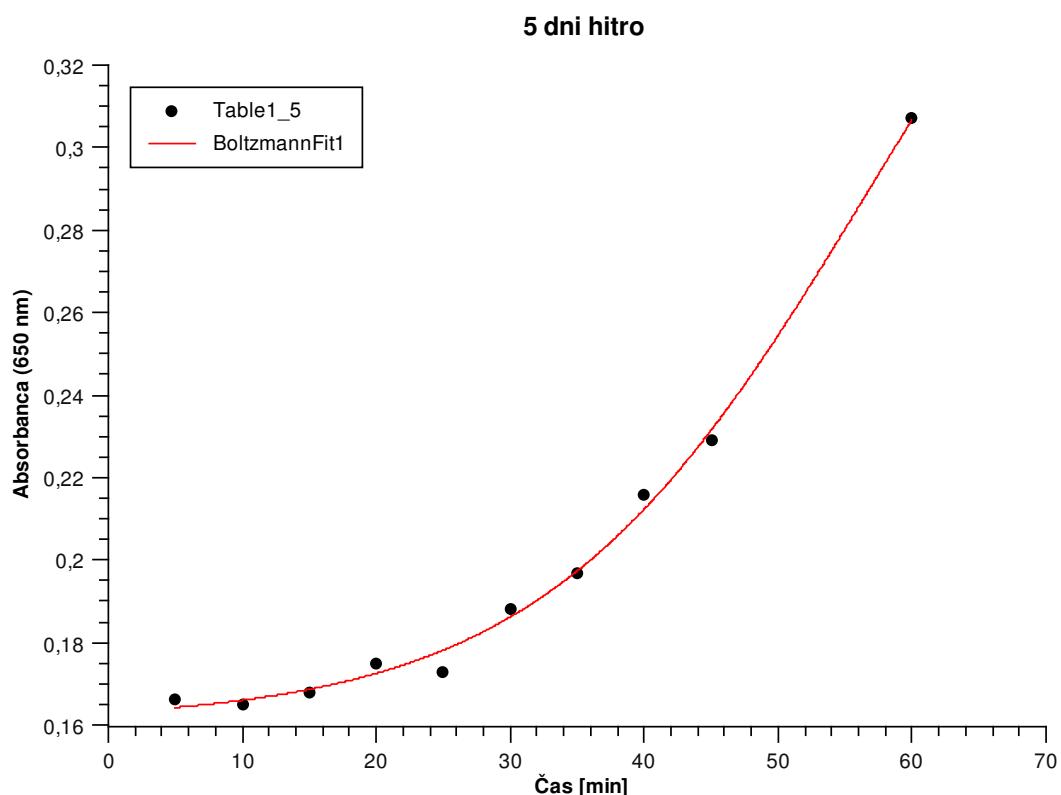
Shaw M. K., Ingraham J. L. 1967. Synthesis of macromolecules by *Escherichia coli* near the minimal temperature for growth . Journal of Bacteriology, 94, 1: 157-164.

Shaw M. K., Marr A.G., Ingraham J. L. 1971. Determination of the minimal temperature for growth of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 105, 2: 683-684.

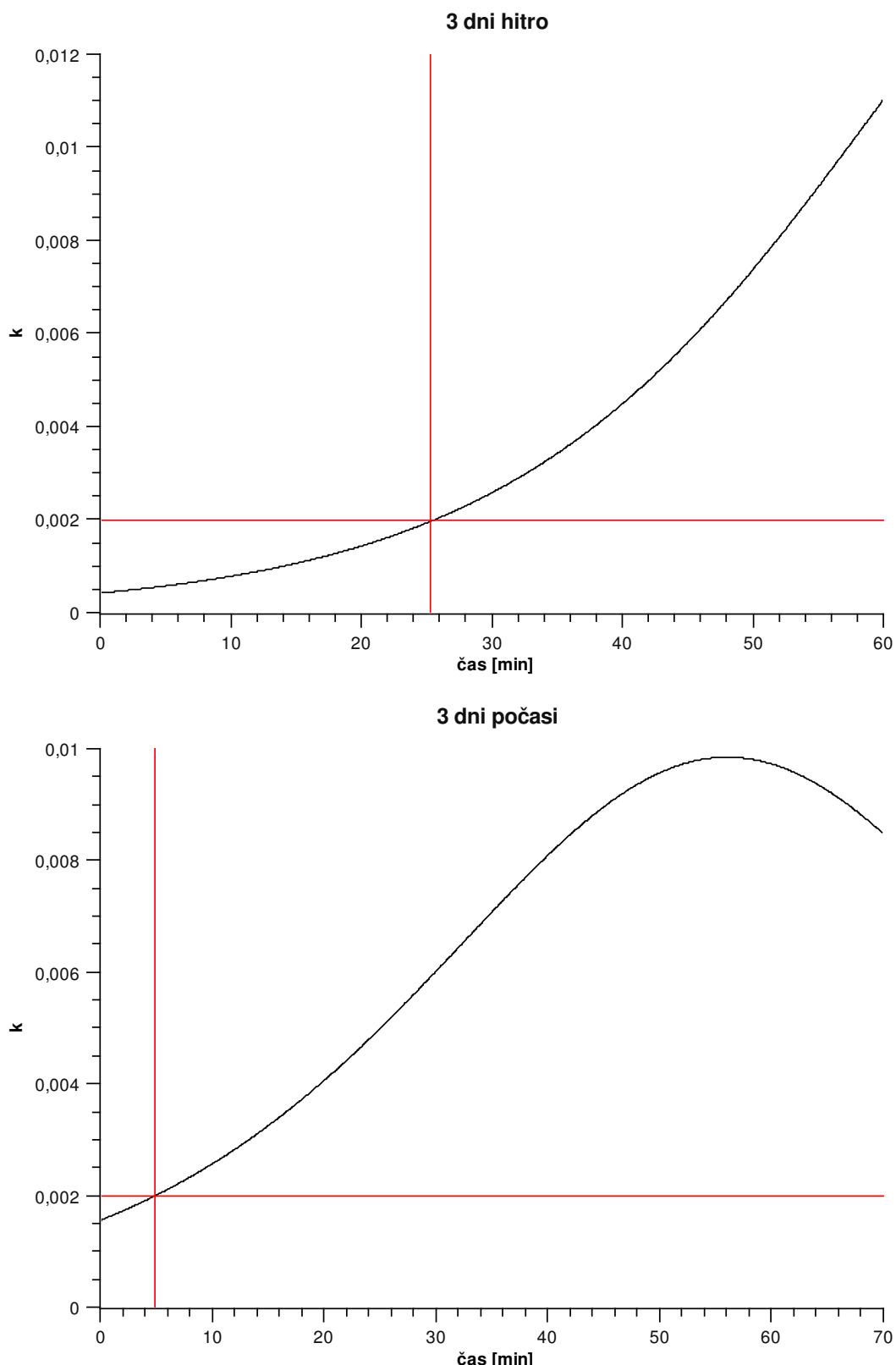
## ZAHVALA

Zahvaljujem sem vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo za nasvete in pomoč pri izvedbi poskusov za diplomsko delo. Posebej se za pomoč zahvaljujem mentorju prof. dr. Davidu Stoparju in delovni mentorici Tini Semenič. Posebna zahvala gre tudi doc. dr. Poloni Jamnik iz Katedre za biotehnologijo, Oddelek za živilstvo za pomoč pri izvedbi 2D elektroforeze in prof. dr. Darji Žgur Bertok za hiter in temeljit pregled diplome.

## PRILOGE

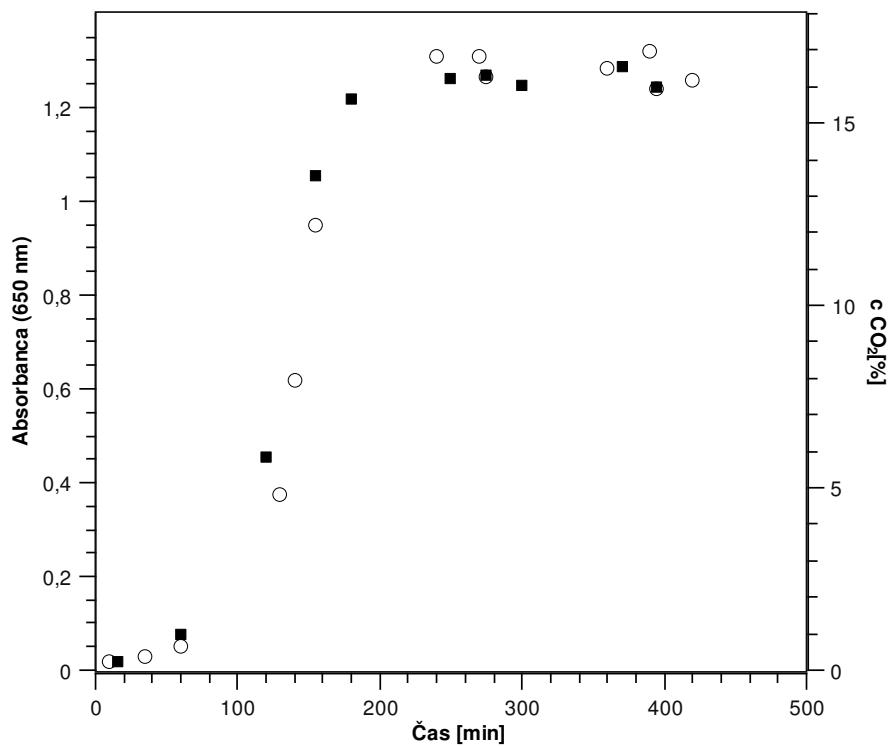


Priloga A: Rast *E. coli* po 5 dnevnem gojenju na 5 °C in aproksimacija podatkov z Boltzmannovo funkcijo. Točke predstavljajo eksperimentalne vrednosti, krivulja pa njihovo aproksimacijo z Boltzmannovo funkcijo.

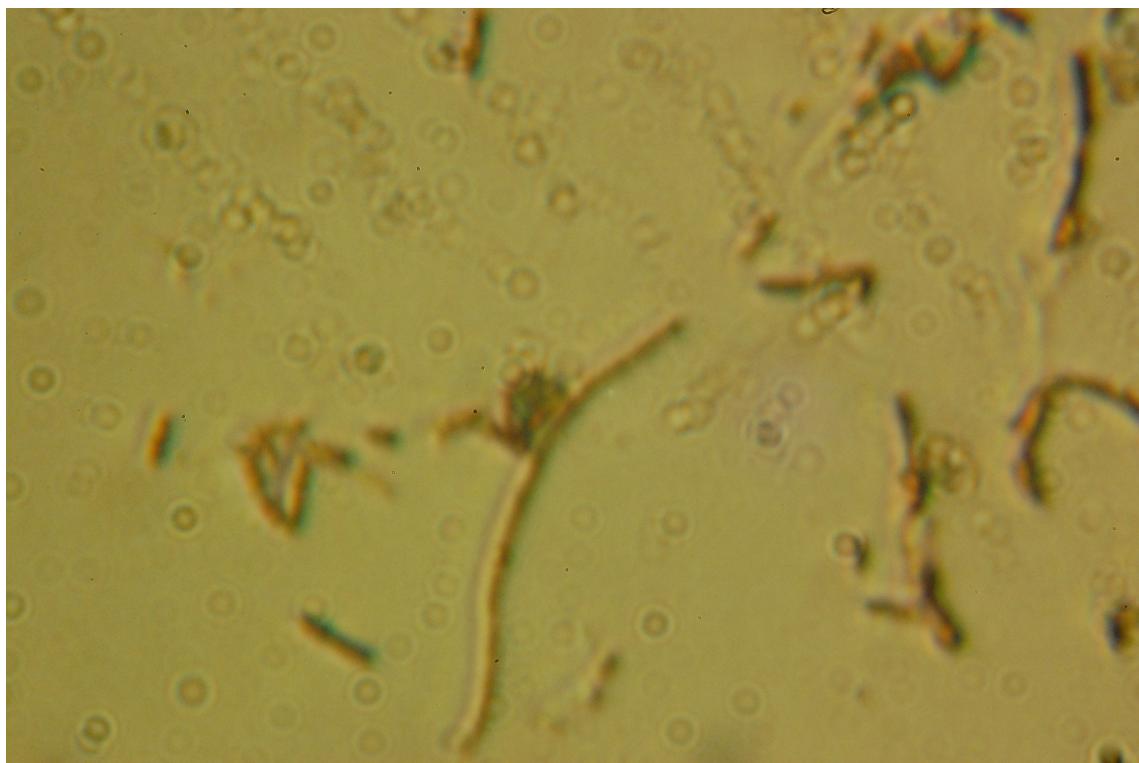


Priloga B: Primera določitve začetka rasti kulture po 3 dnevnom gojenju *E. coli* na 5 °C. Krivulja predstavlja odvod funkcije, ki smo jo prilegali na podatke dobljene po 3

dnevнем gojenju *E. coli* na 5 °C, križ pa označuje točko, ki smo jo določili kot začetek rasti kulture. Na y os je nanešen k, ki predstavlja naklon tangente v posamezni točki funkcije, ki smo jo dobili s prileganjem na eksperimentalne podatke, ki prikazujejo rast *E. coli* po prestavitevi na 37 °C po 3 dnevni inkubaciji na 5 °C.



Priloga C: Rast *E. coli* in izmerjena koncentracija CO<sub>2</sub>: Graf prikazuje rast kulture pri režimu 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C - 5 °C - 37 °C ( ■ ) in izmerjeno koncentracijo CO<sub>2</sub> (○) v serumski steklenički potem kosmo izrezali obdobja, ko je bila kultura na 5 °C.



Priloga D: *Escherichia coli* po 15 dnevnem gojenju na 5 °C. Na fotografiji vidimo celice filamentozne oblike, ki so značilne za *E. coli* gojeno pri nizkih temperaturah.