

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alja ŠTRASER

**OPIS LASTNOSTI RDEČEGA PIGMENTA IZ
NARAVNEGA IZOLATA BAKTERIJE *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alja ŠTRASER

**OPIS LASTNOSTI RDEČEGA PIGMENTA IZ NARAVNEGA
IZOLATA BAKTERIJE *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF A RED PIGMENT FROM THE
NATURAL ISOLATE *Vibrio* sp.**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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 23. 6. 2008 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorja dr. Tjašo Danevčič in za recenzenta doc. dr. Hrvoja Petkovića.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentor: dr. Tjaša Danevčič

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

Član: doc. dr. Hrvoje Petković
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Alja Štraser

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.222+579.266:547.97:579.843 (043) = 163.6
KG	<i>Vibrio</i> sp./pigmenti/barvila/naravna barvila/prodigionini/prodigiozin/ pH/protimikrobne snovi/protibakterijska aktivnost/zaznavanje celične gostote
AV	ŠTRASER, Alja
SA	STOPAR, David (mentor) / DANEVČIČ, Tjaša (somentor) / PETKOVIĆ Hrvoje (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	OPIS LASTNOSTI RDEČEGA PIGMENTA IZ NARAVNEGA IZOLATA BAKTERIJE <i>Vibrio</i> sp.
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 51 str., 19 sl., 16 pril., 92 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Rdeči pigmenti prodigiozini so zanimivi zaradi svojih imunosupresivnih, protibakterijskih in protiglivnih učinkov. V diplomskem delu smo preučevali rdeč pigment, ki smo ga pridobili iz kulture bakterije <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (<i>Vibrio</i> sp.), izolirane iz Škocjanskega zatoka, ter ugotavliali vpliv pH na barvo, protibakterijsko aktivnost ekstrakta pigmenta ter povezavo med zaznavanjem celične gostote in produkcijo pigmenta. Za ugotavljanje vpliva pH smo ekstrahirali pigment z acetonom, ter določili absorpcijske spektre ekstrakta pigmenta pri različnih pH vrednostih. Ugotovili smo, da je ekstrakt pigmenta v acetonu pri nizkem pH rožnate barve in ima absorpcijski maksimum pri 530 nm, pri visokem pH je rumen z absorpcijskim maksimumom pri 460 nm. Pigment ima pKa med 7,93 in 8,01. Protibakterijsko aktivnost smo določali z difuzijsko metodo z diskami na agarskih ploščah in z merjenjem spremembe optične gostote kultur v tekočem gojišču ob dodatku ekstrakta pigmenta. Rezultati kažejo, da ima ekstrakt pigmenta širok spekter protibakterijskega delovanja, saj deluje proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam. Producija pigmenta je najvrjetneje odvisna tudi od signalnih molekul, ki jih v okolje izloča divji tip. To smo ugotovili tako, da smo rožnati mutanti (mutanti R) omogočili interakcijo s signalnimi molekulami divjega tipa v tekočem gojišču oziroma preko difuzije na plošči, kar je povzročilo produkcijo pigmenta pri mutanti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.222+579.266:579.843:547.97 (043) = 163.6
CX	<i>Vibrio</i> sp./pigments/biological pigments/prodiginines/ prodigiosin/pigment production/pH/antimicrobial/antibacterial activity/quorum sensing
AU	ŠTRASER, Alja
AA	STOPAR, David (supervisor) / DANEVČIČ, Tjaša (co-advisor) / PETKOVIĆ Hrvoje (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	CHARACTERIZATION OF A RED PIGMENT FROM THE NATURAL ISOLATE <i>Vibrio</i> sp.
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 51 p., 19 fig., 16 an., 92 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	The red pigments prodigiosins are interesting molecules because of their imunosuppressive, antibacterial and antifungal properties. In this work, we studied a red pigment extracted from the bacteria culture <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (<i>Vibrio</i> sp.) isolated from the Škocjanski zatok in the Adriatic sea. We studied the influence of pH on the color, antibacterial properties of the pigment extract and the connection between quorum sensing and the production of the pigment. For the purpose of pH studies the pigment was extracted with acetone. The results showed, that the pigment extract is pink in acid with the absorption maximum at 530 nm and yellow at high pH values with the absorption maximum at 460 nm, and its pKa is between 7,93 and 8,01. The antibacterial activity was tested with disk diffusion method on agar plates and by measuring the change of optical density after the addition of the pigment extract to different cultures in a liquid medium. The pigment extract showed a broad range of antibacterial activity. It was active against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Pigment production in <i>Vibrio</i> sp. is probably dependent on signal molecules produced by the wild type strain. This has been demonstrated by interaction of non-pigmented mutant strain with signal molecules produced by the wild type strain in both liquid medium and on agar plates, which enabled repigmentation of the mutant strain.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN OPREDELITEV PROBLEMA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRODIGININI IN PRODIGIOZIN	3
2.1.1 Struktura in fizikalne lastnosti prodigiozina	4
2.1.2 Fiziološka vloga in biološka aktivnost	7
2.1.3 Farmakološke lastnosti prodigininov	8
2.1.4 Biosinteza in regulacija biosinteze prodigiozina	9
2.1.4.1 Zaznavanje gostote celične populacije pri vibrijih	9
2.1.4.2 Regulacija sinteze prodigiozina preko zaznavanja gostote celične populacije pri bakteriji <i>Serratia marcescens</i>	11
2.2 RDEČE OBARVANA BAKTERIJA <i>Vibrio</i> sp.....	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Kemikalije	13
3.1.2 Gojišča	13
3.1.3 Bakterijski sevi.....	14
3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR	15
3.2.1 Gojenje bakterije <i>Vibrio</i> sp. za ekstrakcijo pigmenta	15
3.2.2 Gojenje sevov za določanje protibakterijske aktivnosti	15
3.2.3 Gojenje sevov za ponovno pigmentacijo mutant <i>Vibrio</i> sp.....	15
3.3 EKSTRAKCIJA IN VREDNOTENJE PIGMENTA	16
3.3.1 Ekstrakcija pigmenta	16
3.3.2 Določanje mase suhe snovi bakterijskih celic	16
3.3.3 Vrednotenje koncentracije ekstrakta pigmenta	16
3.4 UGOTAVLANJE VPLIVA pH NA ABSORBCIJSKI SPEKTER PIGMENTA.....	18
3.4.1 Spreminjanje pH in merjenje pH ekstrakta v acetonu	18

3.4.1.1 Obdelava podatkov	18
3.5 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI	19
3.5.1 Protibakterijsko delovanje bakterije <i>Vibrio</i> sp.	19
3.5.2 Protibakterijska aktivnost pigmenta v ekstraktu in izrabljenem gojišču z difuzijsko metodo z diskami	19
3.5.3 Določanje protibakterijske aktivnosti ekstrakta pigmentov tekoči kulturi	19
3.5.4 Določanje protibakterijske aktivnosti ekstrakta pigmenta na mikrotiterskih ploščah.....	20
3.5.4.1 Obdelava podatkov, pridobljenih s testom na mikrotiterskih ploščah.....	21
3.6 POVRNITEV PIGMENTACIJE PRI MUTANTAH BAKTERIJE <i>Vibrio</i> sp., KI NE PRODUCIRATA PIGMENTA	22
3.6.1 Opazovanje vpliva divjega tipa in nekaterih drugih bakterij na spreminjanje obarvanosti mutant bakterije <i>Vibrio</i> sp. na plošči	22
3.6.2 Določanje količine ekstrakta pigmenta, ki sta ga producirali mutanti v stiku z izrabljenim gojiščem divjega tipa ali druge mutante	22
4 REZULTATI.....	24
4.1 VPLIV pH NA BARVO IN ABSORPCIJSKI SPEKTER PIGMENTA	24
4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKTA PIGMENTA BAKTERIJE <i>Vibrio</i>. sp.....	26
4.2.1 Protibakterijsko delovanje kolonij bakterije <i>Vibrio</i> sp.....	26
4.2.2 Protibakterijska aktivnost na ploščah z difuzijsko metodo z diskami.....	27
4.2.2 Protibakterijsko delovanje ekstrakta pigmenta na različne bakterijske seve ...	32
4.2.3 Protibakterijska aktivnost v tekoči kulturi	29
4.3 POVRNITEV PIGMENTACIJE PRI MUTANTAH BAKTERIJE <i>Vibrio</i> sp.....	33
4.3.1 Povrnitev pigmentacije mutant na plošči	33
4.3.2 Vsebnost pigmenta v celicah mutant <i>Vibrio</i> sp. ob dodatku izrabljenega gojišča divjega tipa bakterije <i>Vibrio</i> sp.....	35
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	36
5.1 SPREMENJAVA BARVE PIGMENTA	36
5.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKTA PIGMENTA	37
5.3 ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE PRI <i>Vibrio</i> sp.....	38
5.4 SKLEPI.....	41
6 POVZETEK	42
7 VIRI	43

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO SLIK

Slika 1:	Strukturni tipi prodigininov (Bennett in Bentley, 2000: 12,13).....	4
Slika 2:	UV-VIS / pH titracija sintetičnega prodigiozina v raztopini acetonitrila in vode (1:1) pri 25°C (Melvin in sod., 2002: 738).....	5
Slika 3:	Protonacija in ravnotežne pretvorbe rotamerov prodigiozina (Melvin in sod., 2002: 734)	6
Slika 4:	Shema zaznavanja celične gostote pri baktrijah <i>Vibrio harveyi</i> in <i>Vibrio cholerae</i> (Miller in sod., 2002: 304 in 310; Henke in Bassler, 1994b: 690). 10	
Slika 5:	Shema predpostavljenega modela regulacije sinteze prodigiozina pri bakteriji <i>Serratia marcescens</i> pri nizki (levo) in visoki celični gostoti (desno) (Fineran in sod., 2005: 1508).....	11
Slika 6:	Absorpcijski - VIS spektri (380 – 600 nm) ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v acetolu z različnimi pH vrednostmi.	24
Slika 7:	Barva ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v acetolu z različnimi pH vrednostmi.....	25
Slika 8:	Vpliv pH na absorpcijo ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v acetolu pri valovnih dolžinah 460 in 530 nm.	25
Slika 9:	Vpliv divjega tipa, bele in rahlo rožnate mutante <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 na rast morskega izolata 5A	29
Slika 10:	Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v 7 % etanolu in izrabljenega gojišča <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 divjega tipa, bele in rahlo rožnate mutante na sev 5A.....	305
Slika 11:	Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v 7 % etanolu in izrabljenega gojišča <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 divjega tipa, bele in rahlo rožnate mutante na bakterijo <i>Escherichia coli</i> ESH10 K12.	30
Slika 12:	Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v 7 % etanolu na produkcijski sev	316
Slika 13:	Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v 7 % etanolu na bakterijo <i>Escherichia coli</i> ESH10 K12.....	32
Slika 14:	Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v 7 % etanolu na bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> IS75.....	27
Slika 15:	Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 v 7 % etanolu in kloramfenikola na rast morskega izolata 5A v tekočem gojišču...	28

Slika 16:	Minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki po petih urah inkubacije po dodatku ekstrakta pigmenta povzroči 50 % inhibicijo rasti organizma v primerjavi s kontrolo.....	33
Slika 17:	Plošče z agariziranim gojiščem PKS na katerih sta nacepljena po dva seva. Divji tip <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 in rahlo rožnata mutanta (zgoraj levo), divji tip in bela mutanta (zgoraj desno) ter bela in rahlo rožnata mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (spodaj).....	34_Toc201026247
Slika 18:	Plošči z agariziranim gojiščem PKS na katerih sta nacepljena po dva seva. Bakterija <i>Serratia marcescens</i> in bela mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (levo), bakterija <i>Serratia marcescens</i> in rahlo rožnata mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379 (desno).....	30
Slika 19:	Vsebnost pigmenta v celicah mutant <i>Vibrio</i> sp. DSM14379, ki so rasle v svežem gojišču in ob dodatku izrabljenega gojišča.....	30

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Umeritvena krivulja, ki prikazuje povezavo med površino absorpcijskega spektra in koncentracijo ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp.
- Priloga B1: Absorbcija ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. pri valovnih dolžinah 460 in 530 nm pri različnih pH.
- Priloga B2: Parametri Boltzmanovega modela krivulje, ki popisuje absorbanco ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. pri 460 nm pri različnih pH.
- Priloga B3: Parametri Boltzmanovega modela krivulje, ki popisuje absorbanco ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. pri 530 nm pri različnih pH
- Priloga C1: Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na produkcijski sev
- Priloga C2: Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na bakterijo *Escherichia coli*
- Priloga C3: Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na bakterijo *Bacillus subtilis*
- Priloga C4: Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na morski izolat 5A
- Priloga C5: Vpliv antibiotika kloramfenikola na morski izolat 5A
- Priloga D1: MIC₅₀ ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. pri testiranih sevih
- Priloga D2: Protibakterijsko delovanje ekstrakta pigmenta iz mutante B in R *Vibrio* sp. proti morskemu izolatu 5A
- Priloga E1: Absorpcijski spektri ekstrakta pigmenta iz mutante B in R *Vibrio* sp., ki sta rasli v svežem gojišču in v gojiščih z dodatkom izrabljenega gojišča, v acetonu
- Priloga E2: Absorpcijski spektri ekstrakta pigmenta iz mutante B in R *Vibrio* sp., kjer zaradi dodatka izrabljenega gojišča ni prišlo do povečane sinteze pigmenta, v acetonu
- Priloga E3: Absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta iz divjega tipa *Vibrio* sp. v 7% etanolu
- Priloga E4: Absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta iz bakterije *Serratia marcescens* v acetonu z različnimi pH vrednostmi
- Priloga F: Količina ekstrakta pigmenta na g suhe snovi pri mutantah nastalega zaradi dodatka izrabljenega gojišča

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHL	N-acilhomoserin lakton
A	adenozin
A_{460}	absorbanca pri valovni dožini 460 nm
A_{530}	absorbanca pri valovni dožini 530 nm
A_{\max}	absorpcijski maksimum
AI-2	avtoinduktorska molekula – 2, furanozil borat diester
ATP	Adenozin-5'-trifosfat
BHL	N-butanoil-L-homoserin lakton
mutanta B	bela mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379
CAI-1	od CqsA odvisna avtoinduktorska molekula – 1, neznana struktura
Cl^-	kloridni ion
Cm	kloramfenikol
Da	dalton, enota za izražanje atomske mase
DNA	deoksi ribonukleinska kislina
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, zbirka mikroorganizmov
H^+	vodikov ion
HAI-1	Harveyi avtoinduktorska molekula -1, 4-hidroksil C4 homoserin lakton
HHL	N-heksanoil-L-homoserin lakton
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
lx	lux, SI enota za intenziteto svetlobe
MAP	prekurzor za sintezo prodigiozina, 2-metil-3-n-amilil-pirol
MBC	prekurzor za sintezo prodigiozina, 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karbaldehid
MIC_{50}	minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta pigmenta iz bakterije <i>Vibrio</i> sp., ki 5 ur po dodatku povzroči 50 % inhibicijo rasti testnega organizma

M_w	molekulska masa
NO_3^-	nitratni ion
OD	optična gostota
OD_{650}	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
OH^-	hidroksilni ion
pKa	negativni logaritem disociacijske konstante kisline
mutanta R	rahlo rožnata mutanta <i>Vibrio</i> sp. DSM14379
rpm	obrati na minuto
S	svedberg, enota posedanja delcev v ultracentrifugi
S.S.	suha snov
T	timin
TLC	tankoplastna kromatografija
UV	ultra vijolična svetloba
V/V %	volumsko - volumski odstotki
VIS	vidni spekter
w/V %	utežno - volumski odstotki
$x \square$	povprečje
σ	standardni odklon, statistična mera razprtitev vrednosti okoli povprečja

1 UVOD

Pigmenti so molekule, ki so sposobne absorbirati le določene valovne dolžine svetlobe, kar jim daje značilno obarvanost. Bakterije proizvajajo številne pigmente. Absorpcija specifičnih valovnih dolžin svetlobe jim služi pri fototrofiji ter zaščiti celice pred njenimi škodljivimi učinki. Številnim bakterijskim vrstam kot zaščita pred svetlobo služijo melanini (Margalith, 1992). Vijoličen pigment violacein, ki ga večinoma sintetizirajo bakterije iz rodu *Chromobacterium* (Konzen in sod., 2006) celice ščiti pred UV radiacijo. Najpogostejši bakterijski pigmenti so karotenoidi, ki jih producira večina rdeče, oranžno in rumeno obarvanih bakterij (Sobin in Stahly, 1941). Ti bakterije ščitijo pred fotooksidacijo in poškodbami, ki jih povzroči vidna svetloba (Griffiths in sod., 1955) in so vpleteni v bakterijsko fotosintezo poleg klorofila a in fikobilinov, pri cianobakterijah, ter bakterioklorofilov, pri škrlatnih in drugih fotosintetskih bakterijah (Cohen-Bazire in sod., 1964).

Bakterijski pigmenti imajo večinoma tudi druge pomembne lastnosti. Poznamo veliko bakterijskih pigmentov, ki antagonistično delujejo na druge bakterije, glice in višje organizme. S tem bi lahko bakterijam, ki jih proizvajajo, ponujali prednost pri naseljevanju okolja, izkoriščanju hranil in razmnoževanju, ter jih ščitili pred organizmi, ki se z njimi hranijo. Antibiotično delovanje je znano za fenazine, ki vključujejo preko petdeset pigmentov, ki jih producirajo fluorescentne bakterije iz rodu *Pseudomonas* in nekaterih drugih rodov (Mavrodi in sod, 2006). Zanimive farmakološke lastnosti so odkrili tudi pri violaceinu (Konzen in sod., 2006) in živo rdečih pigmentih prodigininih, med katere sodi tudi prodigiozin, ki deluje proti bakterijam, protozojem in patogenim glivam (Fürstner, 2003).

Kljudno lastnostim pigmentov, je njihova fiziološka vloga v bakterijski celici pogosto nepoznana. Njihova sinteza je regulirana preko številnih mehanizmov, med katere sodi zaznavanje celične gostote ali »Quorum sensing« (Williamson in sod., 2006). Sistem zaznavanja celične gostote omogoča bakterijam medsebojno komunikacijo s pomočjo zunajceličnih signalnih molekul in s tem usklajeno izražanje genov, ki so regulirani preko tega sistema (Miller in sod., 2002), med katerimi so tudi geni za sintezo prodigiozina pri bakteriji *Serratia marcescens* (Thomson in sod., 2000; Fineran in sod., 2005).

1.1 NAMEN DELA IN OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterija *Vibrio* sp. DSM14379 (*Vibrio* sp.) izolirana iz Škocjanskega zatoka (Stopar in sod., 2004) proizvaja rdeč pigment, ki spada v družino prodigiozinom podobnih molekul. Te molekule proizvajajo bakterije iz rodov *Serratia*, *Vibrio* in nekatere aktinomicete. Prodigiozini nimajo definirane fiziološke funkcije pri produkcijskih sevih. Poznana je njihova proti glivna, proti bakterijska, imunosupresivna in proti tumorska aktivnost.

Namen diplomskega dela je opis lastnosti pigmenta, zato bomo:

- ugotovili vpliv pH na spremembo absorpcijskega spektra in barve pigmenta,
- ugotovili protibakterijski učinek pigmenta na nekatere izbrane bakterijske seve,
- preverili ali je sinteza pigmenta pri *Vibrio* sp. regulirana z zaznavanjem celične gostote.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- pH vpliva na barvo in absorpcijski spekter pigmenta,
- pigment ima omejen protibakterijski učinek,
- sinteza pigmenta je regulirana preko mehanizma zaznavanja celične gostote.

2 PREGLED OBJAV

Prodigiozin in sorodni pigmenti so vzbujali pozornost ljudi že v preteklosti, saj rdeče obarvane viskozne kolonije nekaterih sevov *Serratia marcescens* močno spominjajo na kaplje krvi (Bennett in Bentley, 2000). Te bakterije pogosto rastejo na kruhu, polenti in drugih živilih bogatih s škrobom. Eden prvih, ki je za vzrok pojava krvi podobne snovi v hrani označil mikroorganizme, je bil Dr. Vincenzo Sete leta 1824. Sete je menil, da je v pojav vpletena gliva, ki jo je poimenoval *Zaogalactina imetroppha* (iz grščine, živa sluz na hrani). Prvi, ki je organizem poimenoval *Serratia marcescens*, misleč, da gre za glivo, je bil po navedbah zgoraj navedenih avtorjev Bartolomeo Bizio. Sete in Bizio sta pigment tudi ekstrahirala v etanolu in ga uporabila za barvanje svile in volne ter ugotovila, da ni obstojen na svetlobi. Avtorja navajata, da je bil prodigiozin prvič izoliran 1902, njegovo kemijsko strukturo so določili 1960.

Danes se znanstveniki posvečajo proučevanju prodigiozina in sorodnih molekul zaradi potencialne uporabe v medicini. Kot modelni organizem za proučevanje teh pigmentov je največkrat bakterija *Serratia marcescens*.

2.1 PRODIGININI IN PRODIGIOZIN

Prodiginini sestavljajo skupino rdečih pigmentov, ki jih producirajo številne bakterije iz rodu *Serratia*, *Actinomycetes* (*Streptomyces coelicolor*) ter številne morske bakterije (*Hahella chejuensis*, *Pseudoalteromonas denitrificans*) (Williamson in sod., 2006). Prodigiozin je sekundarni metabolit (Williams, 1973), ki ga producirajo tudi bakterije iz rodu *Vibrio*, kot so bakterije *Vibrio gazogenes* (Allen G.R. in sod., 1983), *Vibrio psychroerythrus* (Aoust in Gerber, 1974) in *Vibrio rhizosphaerae* (Kumar in Nair, 2007). Našli so ga tudi pri morski bakteriji *Vibro ruber*, ki so jo izolirali iz vzorca morske vode, iz plitve obalne regije Keelung v Tajvanu (Shieh in sod., 2003). Mešanico prodigininov (Prodigiozin, cikloprodigiozin in heptaprodigiozin) so našli tudi pri bakteriji *Vibrio* sp. KSJ45, ki so jo izolirali iz morskih sedimentov (Alihosseini in sod., 2008).

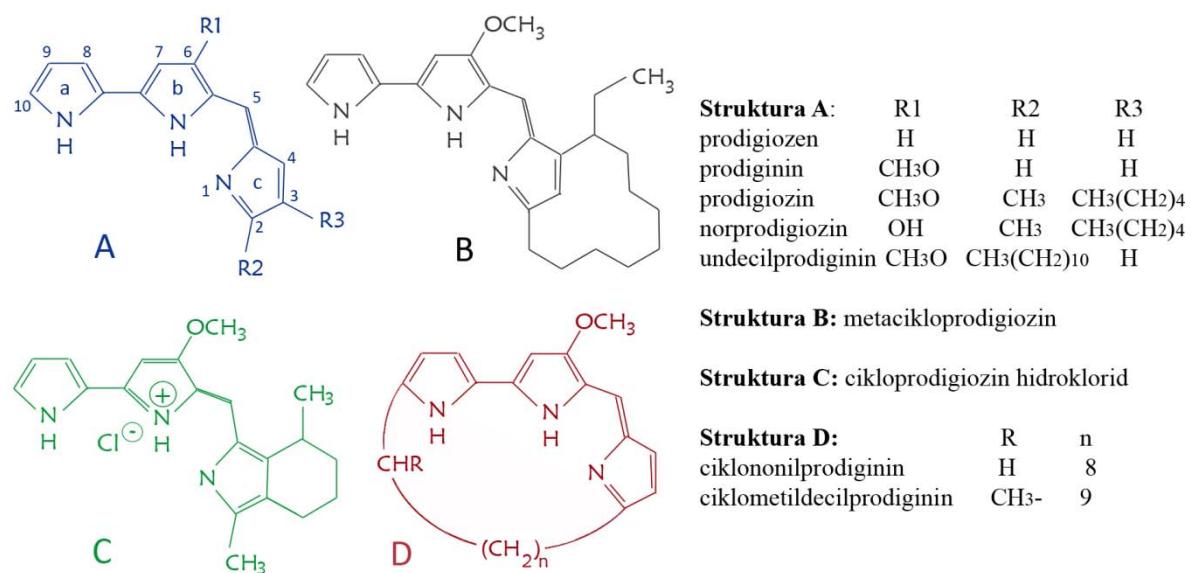
Kot pri mnogih sekundarnih metabolitih, se tudi pri prodigininih še vedno razpravlja o fiziološki vlogi le teh v bakterijski celici (Williamson in sod. 2006). Prav tako ne poznamo natančne lokacije prodigiozina v celici, saj so ga odkrili v znotrajceličnih in zunajceličnih frakcijah (Williamson in sod. 2005). Purkayastha in Williams (1960) sta bila mnenja, da je prodigiozin zaradi svoje močno nepolarne narave povezan s celičnim ovojem. Skoraj tri desetletja kasneje sta Kobayashi in Ichikawa (1989) ugotovila, da se prodigiozin pri bakteriji *Serratia marcescens* nahaja v notranji membrani, v kompleksu s 100 kDa velikim proteinom, ki je najbrž povezan z nastankom pigmenta.

2.1.1 Struktura in fizikalne lastnosti prodigozina

Prodiginini so pirolni alkaloidi s tremi pirolnimi obroči, kjer sta dva direktno povezana, tretji je povezan preko metenskega mostička (Gerber, 1975) v strukturo piril dipiril metena (Fürstner, 2003) (Slika 1). Bennett in Bentley (2000) navajata, da so osnovno strukturo ali jedro trivialno poimenovali prodigiozen, medtem ko imajo prodiginini dodatno metoksi ($-\text{OCH}_3$) skupino vezano na ogljikovem atomu na šestem mestu (Slika 1), kot jo imajo večinoma vsi naravni produkti. Malo številne naravne analoge, ki imajo namesto metoksi skupine hidroksilne ($-\text{OH}$), so poimenovali norprodiginini (Gerber, 1975).

Prodigozin ima molekulsko formulo $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ in se od drugih prodigininov razlikuje po tem, da ima na osnovno strukturo vezano metilno skupino in alkilno verigo s 5 C atomi (Bennett in Bentley, 2000). Po IUPAC nomenklaturi prodigozin poimenujemo kot 2,2'-bipirol,4-metoksi-5-[5-metil-4-pentil-2H-pirol-2-jlidene]metil], lahko ga poimenujemo tudi glede na osnovno strukturo kot 2-metil-3-pentil-6-metoksiprodigiozen ali 2-metil-3-pentilprodiginin (Gerber, 1975). Verjetno je slednje poimenovaje primernejše, saj je uporabnejše, če kot prodigozene označimo le sintetične produkte, ki ponavadi nimajo metoksi skupine na šestem ogljikovem atomu (Hearn in sod., 1970).

Poznamo štiri obsežne strukturne razrede prodigininov (Slika 1) (Bennett in Bentley, 2000). Prva skupina vključuje prodiginine, ki imajo na osnovni strukturi vezane le ravne alkilne verige (Slika 1, A), kakršna sta prodigozin in undecilprodiginin (Williamson in sod. 2006). Ostale tri skupine predstavljajo ciklične derivate prodigininov (Slika 1, B,C,D) (Bennett in Bentley, 2000).

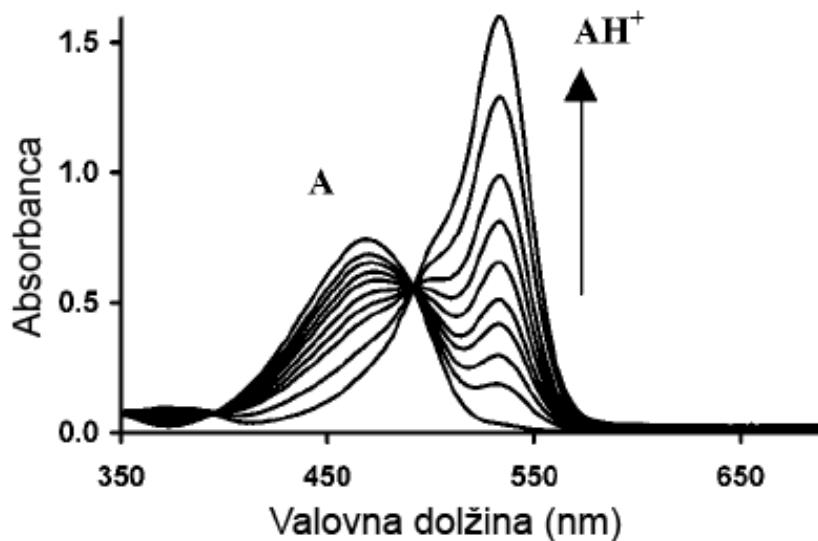


Slika 1: Strukturni tipi prodigininov (Bennett in Bentley, 2000: 12,13).

Prodigiozin tvori lesketajoče, temno rdeče obarvane kristale, v obliki kvadratnih piramid z zelenkastim odsevom, medtem ko tvori hidroklorid ($C_{20}H_{26}ClN_3O$) škrlatne kristale (Bennett in Bentley, 2000). Pigment je v raztopinah lahko obarvan rdeče do rožnato ali oranžno do rumeno. S papirno kromatografijo so ločili tudi modro frakcijo (Williams in sod., 1956). V nadaljnjih raziskavah so Green in sodelavci (1956) ugotovili, da gre pri modri in rdeči frakciji za podobno snov, vendar z različno molekulsko maso, ter da bi modra frakcija, z večjo molekulsko maso, lahko predstavljala dimerno obliko prodigiozina.

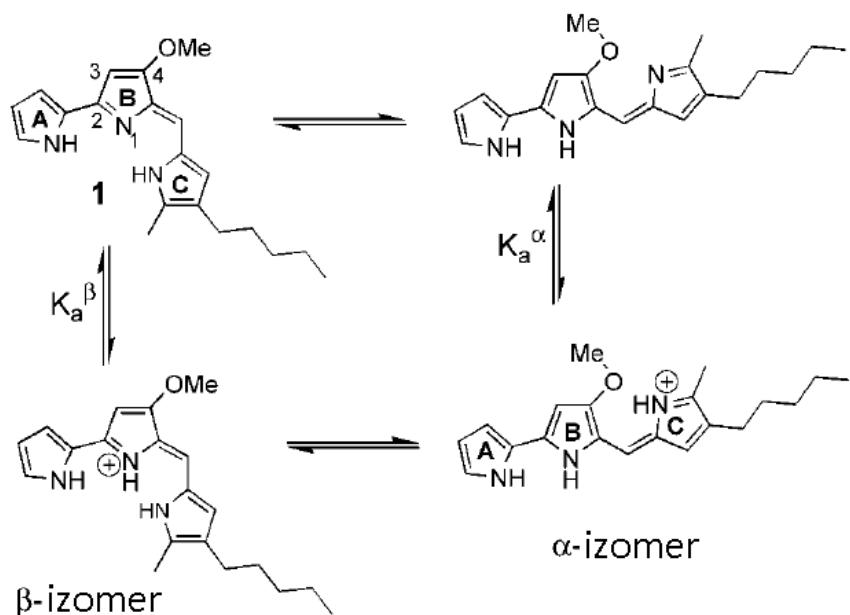
Za intenzivno barvo prodigininov je odgovoren konjugiran sistem sedmih dvojnih vezi (Bennett in Bentley, 2000). Struktura osnovnega jedra pigmenta, 2,2'-bipirolil-pirimetena, omogoča različne geometrijske izomere, glede na ravnotežni položaj molekul okrog vezi, ki povezujejo pirolne obroče. Spreminjanje konformacije iz ene izomerne oblike v drugo bi lahko bila posledica protonacije in deprotonacije dušikovih atomov (Rizzo in sod., 1999).

V večini objav je navedeno, da v kislem okolju protonirana oblika prodigiozina absorbira največ svetlobe pri valovni dolžini med 533 in 535 nm, in je obarvana rdeče, v alkalnem pa so proste baze obarvane rumeno in je absorpcija največja pri približno 470 nm (Williams in sod., 1956; Lewis in Corpe, 1963; Melvin in sod., 2002; La in sod., 2007) (Slika 2). Določili so tudi točko, kjer pride do spremembe barve pigmenta. La in sodelavci (2007) navajajo, da je pK_a prodigiozina v raztopini acetonitrila in vode (1:1) 7.98. V vodni raztopini dioksana pK_a znaša 7.6, v vodni raztopini etanola pa 8.23 (Hearn in sod., 1968).



Slika 2: UV-VIS / pH titracija sintetičnega prodigiozina v raztopini acetonitrila in vode (1:1) pri 25 °C (Melvin in sod., 2002: 738).

Rizzo in sodelavci (1999) navajajo, da obstajata dve geometrijski izomeri, α in β (Slika 3). α izomera obstaja v okolju z nizkim pH, ko je dušikov atom C obroča protoniran in morda tvori vodikovo vez s kisikom na B obroču. β izomera obstaja v okolju z visokim pH.



Slika 3: Protonacija in ravnotežne pretvorbe rotamerov prodigiozina (Melvin in sod., 2002: 734).

Vedno ni mogoče povezati barve pigmenta s pH. Allen E.G. (1967) navaja, da se kolonije bakterije *Serratia marcescens* s staranjem spreminjajo iz oranžne v bolj rdeče, medtem ko postaja gojišče bolj alkalno ter da je kultura v nemešanem globokem tekočem gojišču pri dnu obarvana bolj rdeče kot pri vrhu, čeprav je pH gojišča višji od sedem. Pojav so poskušali razložiti s povezavo med spremembo barve in oksidacijsko-reduksijskim stanjem pigmenta. Z dodajanjem reducentov in oksidantov v raztopino pigmenta z ustaljenim pH so ugotovili, da lahko obstaja pigment v oksidirani obliki in je obarvan rumeno med tem ko je reducirana rdeča. Tako naj bi bile stare kolonije intenzivnejše rdeče obarvane zaradi kopiranja reducentov, vzrok intenzivnejše rdeče obarvanega dna tekoče kulture pa so reducirajoči pogoji na dnu. La in sodelavci (2007) navajajo, da je absorpcija svetlobe pri fenolnih derivatih prodigiozina odvisna od tautomerne oblike. V enolni obliki derivat največ svetlobe absorbira pri 460 nm, v keto oblikah pa pri 530 nm.

Prodigiozin je nestabilen in občutljiv na svetlobo (Allen E.G., 1967). Osvetlitev vpliva tudi na njegovo vsebnost v celicah (Ryazantseva in sod., 1994). Pri celicah *Serratia marcescens*, ki so jih izpostavili svetlobi valovnih dolžin od 500 do 600 nm in intenziteti svetlobe 200-250 lx, se je vsebnost pigmenta zmanjšala za 50%. Pri valovnih dožinah 370 do 500 nm in enaki intenziteti svetlobe, pa se je zmanjšala celo za 80%. Pokazali so tudi, da celice, ki so rasle v temi, vsebujejo več pigmenta, kot celice, ki so rasle na svetlobi.

2.1.2 Fiziološka vloga in biološka aktivnost

V mnogih objavah omenjajo široko protibakterijsko delovanje prodigininov. Prodigiozin antibiotično deluje proti *Bacillus subtilis* (Cang in sod., 2000). Gerber (1971) navaja, da prodigiozin pri koncentraciji 10 µg/ml protibakterijsko deluje na *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus smegmatis*, *Micrococcus rhodochrous* in *Streptomyces somaliensis*. Poleg tega imata rdeče obarvana seva *Vibrio ruber* in *Vibrio rhizosphaerae* izolirana iz rizosfere mangrov in riža protibakterijski učinek na po Gramu negativne bakterije (*Xanthomonas oryzae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*) (Kumar in Nair, 2007).

Prodigiozin antibiotično deluje tudi proti patogenim glivam kot so *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* in *Sporotrichum schenckii* pri MIC₅₀ med 1 in 3,2 µg/ml ter proti glivi *Candida albicans* pri MIC₅₀ 22 µg/ml (Castro in sod., 1967). Pri 10 µg/ml deluje na glive *Actinomadura madurae*, *Trichophyton mentagrophytes*, pri koncentraciji 25 µg/ml proti *Nocardia asteroides*, vpliv pri višjih koncentracijah kaže še proti številnim drugim glivam (Gerber, 1971). Castro (1967) navaja, da prodigiozin deluje tudi proti praživalim kot sta *Plasmodium berghei* in *Plasmodium falciparum*. Ravno tako obarvani sevi *Serratia marcescens* lizirajo parazita *Trypanosoma cruzi* pri čemer igra pomembno vlogo prodigiozin (Azambuja in sod., 2004). Kim in sodelavci (2008) so ugotovili, da prodigiozin deluje tudi algicidno proti strupenim dinoflagelatom, kot sta *Gyrodinium impudicum* in *Heterosigma akashiwo* ter že pri koncentraciji 10³ mg/l proti *Cochlodinium polykrikoides* (Jeong in sod., 2005).

Poleg antibiotičnih lastnosti prodigiozina so predpostavili tudi vlogo pri pritrjanju na površine in razpršitvi bakterij (Burger in Bennett, 1985; Williamson in sod. 2006). V kapljicah, ki so nastale zaradi dvigovanja zračnih mehurčkov skozi tekoče gojišče, je bilo v primerjavi z nepigmentiranim sevom *Serratia marcescens* več pigmentiranih celic (Burger in Bennett, 1985; Syzdek, 1985). Predpostavljen je bilo, da so pigmentirane celice manj topne v vodi, zaradi produkциje prodigiozina (Burger in Bennett, 1985). Rosenberg in sodelavci (1986) so ugotovili, da so hidrofobni tudi nekateri sevi *Serratia marcescens*, v odsotnosti prodigiozina. Očitno hidrofobnost površine ni le posledica prisotnosti pigmenta (Bennett in Bentley, 2000).

Vlogo prodigiozina v metabolizmu *Serratia marcescens* in vpliv svetlobe nanj so poskušali razvozlati Ryazantseva in sodelavci (1995). Ugotovili so, da so pigmentirane celice pri osvetljenosti 5400 lx, v primerjavi s kontrolo, povečale energetsko raven do 1,5 J h⁻¹ (g suhe snovi)⁻¹. Kontrola (nepigmentirane celice) in pigmentirane celice, ki so rastle v temi so kazale enako raven skladisčene energije od 0,4 do 0,7 J h⁻¹ (g suhe snovi)⁻¹. Za primerjavo navajajo, da lahko fotosintetska enocelična alga *Chlorella* skladisči 175 J h⁻¹ (g suhe snovi)⁻¹. Tako so pokazali, da pigmentirane celice *Serratia marcescens*, ki je tipična heterotrofna bakterija, lahko skladisčijo svetlobno energijo.

Predlagali so tudi da bi biosinteza prodigiozina lahko predstavljala »metabolni odtok« za odtekanje odvečnega prolina iz primarnega metabolizma (Hood in sod., 1992). Poleg tega so mu pripisali tudi vlogo prejemnika elektronov v celičnem dihanju bakterije *Serratia marcescens* (Allen E.G., 1967).

Seganish in Davis (2005) sta ugotovila, da lahko prodigiozin deluje kot prenašalec kloridnega aniona (Cl^-). Ugotovila sta tudi, da ne tvori pore, temveč je mobilni prenašalec Cl^- . Njuni rezultati so tudi pokazali, da prodigiozin deluje kot anionski antipoter $\text{Cl}^- / \text{NO}_3^-$. Večinoma pa avtorji navajajo, da prodigiozin deluje kot H^+ / Cl^- simporter ali izmenjevalec $\text{OH}^- / \text{Cl}^-$ (Ohkuma in sod., 1998; Sato in sod., 1998).

2.1.3 Farmakološke lastnosti prodigininov

Prodiginini kot antibiotiki niso primerni za uporabo v humani medicini, saj so pri efektivnih koncentracijah strupeni in imajo sistemske učinke (Castro in sod., 1967). Bolj perspektivno je njihovo delovanje na človeškega parazita *Plasmodium falciparum*, ki povzroča malarijo, saj je učinkovito tudi pri nižjih koncentracijah, ki niso citotoksične (Castro, 1967). Isaka in sodelavci (2002) so pokazali, da metacikloprodigiozin, izoliran iz bakterije *Streptomyces spectabilis*, že pri koncentraciji $0.005 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ doseže inhibicijo rasti parazita za 50 %. Kljub temu je bilo za razvoj protimalarijskih učinkovin na osnovi prodigioninov storjeno le malo.

Za medicino so prodiginini zanimivi predvsem zaradi sposobnosti vzbujanja programirane celične smrti, apoptoze. Sposobni so sprožiti apoptozo rakastih celic številnih človeških celičnih linij, pri tem imajo le malo vpliva na normalne celice (Yamamoto C. in sod., 1999). Pri nizkih koncentracijah delujejo prodiginini kot zaviralci imunskega sistema (Pérez-Tomás in sod., 2003). Mehanizem delovanja naj bi tudi pri imunosupresiji vključeval vzbujanje apoptoze (Azuma in sod., 2000). *In vitro* prodigiozin selektivno inhibira blastogenezo T celic, medtem ko *in vivo* zavira od T celic odvisni protitelesni odziv (Melvin in sod., 2002). V študijah povezave med strukturo in biološko aktivnostjo so ugotovili, da sta za citotoksičnost prodigiozina pomembena heterociklični obroč A, ki vsebuje dušik, in metoksi skupina na obroču B (D'Alessio in sod., 2000).

Za razvoj zdravil s prodiginini, kot učinkovinami, je potrebno določiti mehanizem delovanja, ne mehanizem protimikrobnega delovanja, kot tudi ni znan mehanizem vzbujanja apoptoze. Prav tako še ne poznamo tarčnega mesta v celici. Možna tarča je DNA, saj se prodigiozin z njo učinkovito veže v malem grabnu, predvsem v delih bogatih z AT baznimi pari (Melvin in sod., 1999). Tarče bi lahko bile tudi ATP-aza v lizosomih, pri kateri naj bi prišlo do razklopitve zaradi simporterskega (H^+ / Cl^-) delovanja prodigiozina (Sato in sod., 1998; Yamamoto C. in sod., 1999; Yamamoto D. in sod., 2000a, 2000b),

zunanja membrana mitohondrijev, kjer bi vezava prodigiozina povzročila razklopitev F₀-F₁-ATPaze (Konno in sod., 1998; Kataoka in sod., 1995), ali še neznan prodigiozinski receptor, ki bi sprožil aktivacijo kaspaze 8 in tako apoptozo (Pérez-Tomás in sod., 2003).

2.1.4 Biosinteza in regulacija biosinteze prodigiozina

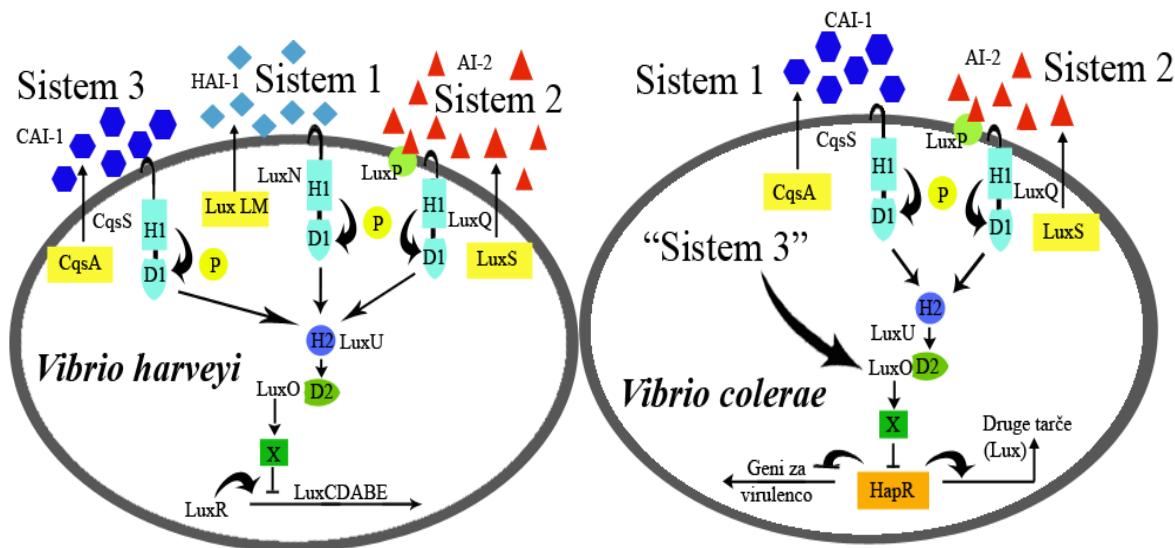
Prekurzorji v biosintezi prodigiozina so prolin, serin, alanin (Bennett in Bentley, 2000; Quadri in Williams, 1971), glicin in ocetna kislina (Hubbard in Rimington, 1950). Donor metilne skupine na C6 je metionin (Fürstner, 2003; Quadri in Williams, 1971). Biosinteza pri bakteriji *Serratia marcescens* poteka preko razcepljene poti, ki se konča z encimsko kondenzacijo končnih produktov, 2-metil-3-n-amilil-pirola (MAP) (Williamson in sod., 2006) in 4-metoksi-2,2'-bopirol-5-karbaldehida (MBC) (Morrison, 1966; Goldschmidt in Williams, 1968). Sinteza je regulirana preko mehanizmov, kot sta mehanizem odgovora na stradanje (pomanjkanje aminokislin) »stringent response« pri *Streptomyces coelicolor* A3(2) in zaznavanje celične gostote ali »Quorum sensing« (Williamson in sod., 2006).

Zaznavanje celične gostote temelji na interakciji zunajcelične signalne molekule s transkripcijskim aktivatorjem, ki povezuje ekspresijo genov z gostoto celične populacije (McClean in sod., 1997). Signalne ali avtoinduktorske molekule (AI) so kemijsko različne, slednje ime izhaja iz regulacijskega sistema, ki predstavlja pozitivno povratno zanko, ki je bila odkrita pri morskih rodovih *Vibrio* in *Photobacterium* (Geisenberger, 2000). Pri po Gramu negativnih bakterijah so signalne molekule ponavadi N-acilhomoserin laktone (AHL), ki se med seboj razlikujejo po N-acilnih stranskih verigah (McClean in sod., 1997). Pri bakteriji *Vibrio harveyi* so odkrili še drugo molekulo, furanozil borat diester (Martinelli in sod., 2004). Ta molekula je AI-2 (avtoinduktor-2) in je vključena v drug sistem zaznavanja celične gostote, ki so ga odkrili pri tej bakteriji (Coulthurst in sod., 2004). Kasneje so ugotovili, da je AI-2 ali vsaj homolog encima LuxS, ki je potreben za sintezo AI-2, prisoten tudi pri drugih po Gramu negativnih in pozitivnih bakterijah (Schauder in sod., 2001). Ni pa nujno, da bakterije, ki imajo LuxS, uporabljajo AI-2 za signalizacijo (Wintzer in sod., 2002; McNab in Lamond, 2003).

2.1.4.1 Zaznavanje gostote celične populacije pri vibrijih

Bassler in sodelavci (1994a) navajajo, da se *Vibrio harveyi* odziva na tri različne signalne molekule (Slika 4, levo). Poleg HAI-1 (*Harveyi* avtoinduktor) in AI-2 ima tudi CAI-1 (od CqsA odvisen avtoinduktor) sistem. Medtem ko je HAI-1, eden od acil homoserin laktонov, specifičen za vrsto (Bassler in sod., 1997), je AI-2 bolj nespecifičen in je vpletен v medvrstno signalizacijo (Xavier in Bassler, 2003). CAI-1, ki ga najdemo pri vibrijih, je morda medrodovni signal (Henke in Bassler, 2004a).

Vibrio harveyi se na signalne molekule odziva preko dvokomponentne fosforilacijske kaskade, ki nadzira produkcijo glavnega regulatorja LuxR (Walters in Bassler, 2006) (Slika 4, levo). Senzorji LuxN, CqsS in LuxQ zaznajo odgovarjajoče signale HAI-1, CAI-1 in AI-2 (Henke in Bassler, 2004b). Kadar signalne molekule niso prisotne v zadostni koncentraciji senzorski proteini delujejo kot kinaze, ki fosforilirajo LuxU, ta fosfat prenese na LuxO (Bassler in sod., 1994b). LuxO posredno inhibira sintezo LuxR. V prisotnosti signalnih molekul senzorji delujejo kot fosfataze, ki defosforilirajo LuxO in s tem inhibirajo delovanje LuxO, kar omogoča sintezo LuxR, ki regulira izražanje tarčnih genov (Walters in Bassler, 2006). Walters in Bassler (2006) navajata, da se pri *Vibrio harveyi* nekateri promotorji odzovejo le, ko so prisotne vse tri prej naštete signalne molekule, drugi pa so specifični za posamezno molekulo.



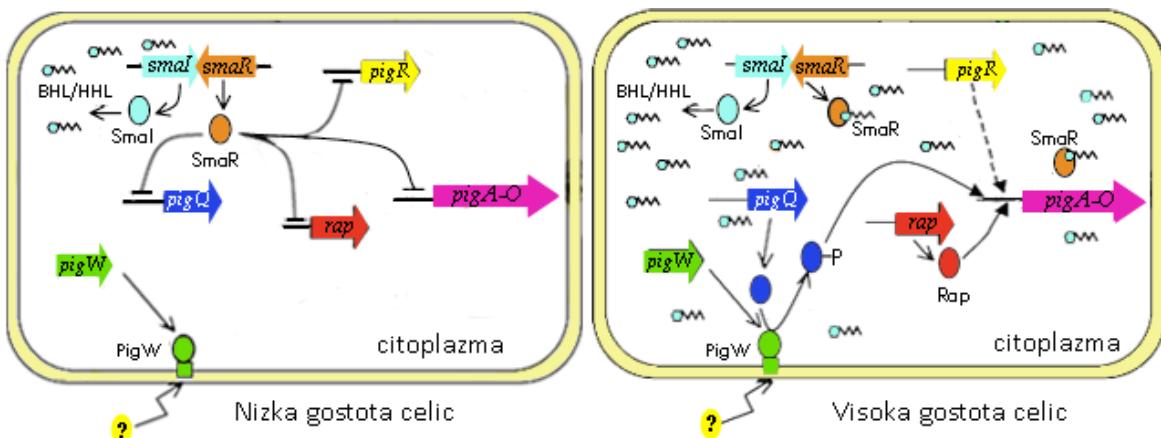
Slika 4: Shema zaznavanja celične gostote pri bakterijah *Vibrio harveyi* in *Vibrio cholerae* (Miller in sod., 2002: 304 in 310; Henke in Bassler, 1994b: 6903). HAI-1 (svetlo modre kare), AI-2 (rdeči trikotniki) in CAI-1 (modri šestkotniki) so signalne molekule, LuxN, LuxQ in CqsS so odgovarjajoči senzorji. Lux LM, LuxS in CqsA so proteini potrebni za sintezo signalnih molekul. P je fosfatna skupina. LuxU je histidin fosfotransferaza, LuxO je regulator odziva. X je represor *lux* genov, ki so regulirani z zaznavanjem celične gostote. LuxR in HapR sta aktivatorja prepisa genov. LuxCDABE so produkti genov iz luciferaznega operona. H je histidin, D je aspartat. Puščice predstavljajo aktivacijo, pravokotnica na koncu črte predstavlja inhibicijo.

Miller in sodelavci (2002) so pokazali, da ima tudi *Vibrio cholerae* vsaj tri senzorske sisteme (Slika 4, desno), ki paralelno regulirajo virulenco. Sistem 1 sestavlja CAI-1, katere sinteza je odvisna od CqsA, in senzor CqsS (Slika 4, desno). Drugi sistem je podoben AI-2 sistemu pri *Vibrio harveyi*. Sistem 3 deluje paralelno s prvima dvema. LuxO in HapR, ki je funkcionalni analog LuxR pri *Vibrio cholerae* (Jobling in Holmes, 1997), dobivata informacije od vseh treh sistemov (Slika 4, desno).

2.1.4.2 Regulacija sinteze prodigiozina preko zaznavanja gostote celične populacije pri bakteriji *Serratia marcescens*

Številni avtorji navajajo, da je sinteza prodigiozina pri bakteriji *Serratia marcescens* pod kontrolo mehanizma zaznavanja celične gostote (Thomson in sod., 2000; Fineran in sod., 2005) (Slika 5). Pri nekaterih sevih *Serratia marcescens* je zunajcelični signal vpletен v zaznavanje celične gostote AI-2 (Couldhourst in sod., 2004), v glavnem pa avtorji navajajo, da so signalne molekule AHL (Thomson in sod., 2000; Slater in sod., 2003; Fineran in sod., 2005). Sev *Serratia marcescens* ATCC 39006 producira vsaj dve različni signalni molekuli, N-butanoil-L-homoserin lakton (BHL) in N-heksanoil-L-homoserin lakton (HHL), ki sta vpleteni v regulacijo sinteze prodigiozina (Thomson in sod., 2000).

Thomson in sodelavci (2000) navajajo, da ima bakterija *Serratia marcescens* zapis za proteina SmaI in SmaR, ki sta homologa LuxI in LuxR. SmaI (aktivator sekundarnih metabolitov) je potreben za sintezo AHL (Thomson in sod., 2000). SmaR se veže z DNA in zavira izražanje PigR, PigQ in Rap (Slater in sod., 2003). Fineran in sodelavci (2005) so predpostavili model regulacije sinteze prodigiozina pri *Serratia marcescens* (Slika 5).



Slika 5: Shema predpostavljenega modela regulacije sinteze prodigiozina pri bakteriji *Serratia marcescens* pri nizki (levo) in visoki celični gostoti (desno) (Fineran in sod., 2005: 1508). SmaI sintetizira signalne molekule BHL in HHL (svetlo modri krogci z repki). SmaR - represor genov *pigR*, *pigQ*, *rap*, *pigA* do *O*, PigW – senzor, PigQ – aktivator prepisa genov, PigR – protein vpletен v regulacijo sinteze prodigiozina, Rap – je regulator sinteze antibiotika in pigmenta, *pigA-O* geni za proteine potrebne za sintezo prodigiozina, P - fosfatna skupina. Geni so pisani v poševni pisavi z malo začetnico, produkti genov pa z veliko začetnico in pokončno pisavo. Puščice predstavljajo aktivacijo, pravokotnica na koncu črte predstavlja inhibicijo.

Pri nizki gostoti celične populacije (Slika 5, levo) SmaR prepreči izražanje *pigR*, *pigQ* in *rap*. Protein PigR je pozitivni regulator sinteze prodigiozina. PigQ je transkripcijski aktivator in je del dvokomponentnega sistema, katerega senzor je PigW, ki se odziva na še nepoznane signale (Thomson in sod., 2000). Rap je regulator sinteze antibiotika in pigmenta, ki se veže na DNA in aktivira prepis genov (Thomson in sod., 1997).

Ko se gostota celic poveča (Slika 5, desno), se poveča tudi koncentracija BHL in HHL, ki se vežejo s SmaR. Vezava verjetno povzroči konformacijsko spremembo proteina, ki zmanjša afiniteto SmaR do DNA in sinteza PigR, PigQ in Rap je neovirana. PigW s fosforilacijo aktivira PigQ. Aktiviran PigQ in protein Rap aktivirata ekspresijo genov *pigA-O*, ki sestavljajo operon z zapisom za prodigiozin, in se prepišejo kot enotna policistronska mRNA (Slater in sod., 2003). Tudi PigR pozitivno vpliva na izražanje genov *pigA-O*, vendar ni znano, ali je regulacija na nivoju transkripcije (Thomson in sod., 2000).

2.2 RDEČE OBARVANA BAKTERIJA *Vibrio* sp.

Bakterijo *Vibrio* sp. so izolirali iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka v Tržaškem zalivu (Stopar in sod., 2004). *Vibrio* sp. je halotoleranten mikroorganizem, ki tolerira do 17 % (w/V) NaCl (Danevčič in sod., 2005). Optimalna koncentracija soli za rast je pri koncentraciji NaCl okoli 3 % (w/V) (Danevčič, 2006). Koncentracija soli vpliva tako na strukturiranost (deleži lipidov z različnimi polarnimi glavami, sestava acilnih verig) in aktivnost lipidne membrane, kot tudi na metabolizem bakterije (Danevčič, 2006). Pretok snovi skozi glikolitične poti narašča s slanostjo, dihalna veriga pa je najaktivnejša pri 3 % (w/V) NaCl. Pri ekstremnih slanostih se kot odgovor na osmotski stres metabolizem pospeši (poveča se hitrost respiracije, nivo ATP v celici in dehidrogenazna aktivnost) in bakterija porabi večino energije za vzdrževalne procese (Danevčič, 2006). Slanost vpliva tudi na vsebnost makroelementov v celici, ter na kopičenje mikroelementov (Odić in sod., 2006). Vsebnost makroelementov (C, N, P, S) se z naraščanjem slanosti zmanjšuje medtem ko razmerji C:P in C:S naraščata. Mikroelementov Na, Mg, Ca, Zn je največ, K in Fe najmanj pri slanosti 3 % (w/V) NaCl.

Predhodne raziskave so pokazale tudi, da *Vibrio* sp. v svojem genomu nosi zapis za vsaj en profag, ki ga lahko induciramo z mitomicinom C, kar povzroči sproščanje morfološko različnih bakteriofagom podobnih delcev iz celice (Gnezda-Meier in sod., 2006). Pri bakteriji *Vibrio* sp. so opazovali tudi izvencelični polisaharid, katerega sestava vpliva na difuzijo molekul skozenj (Stopar in sod., 2002).

Ena najzanimivejših lastnosti *Vibrio* sp. je, da producira rdeč pigment, ki ga izloča tudi v gojišče. Pigment je sekundarni metabolit bakterije in se najintenzivneje sintetizira v stacionarni fazi rasti (Starč, 2007). Pigment se močno veže na različne materiale, kot je naprimer plastika. Sinteza je odvisna od dejavnikov okolja in je največja pri 28 °C, v gojišču M9 s 3 % NaCl (w/V) ter glukozo (5 g/l) kot virom ogljika (Starč, 2007). Sodeč po obliki absorpcijskega spektra ekstrakta pigmenta in drugih lastnostih, je pigment podoben prodigiozinu. Številne publikacije navajajo, da so našli prodigiozin pri številnih morskih bakterijah iz rodu *Vibrio* (Aoust in Gerber, 1974; Allen G.R. in sod., 1983; Shieh in sod., 2003; Kumar in Nair, 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- aceton $C_3H_6O M_w = 58,08 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- amonijev klorid $NH_4Cl M_w = 53,49 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- destilirana voda
- D-(+)-glukoza $C_6H_{12}O_6 M_w = 180,16 \text{ g/mol}$ (Kemika, Hrvaška)
- dinatrijev hidrogen fosfat $Na_2HPO_4 M_w = 141,96 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- etanol 96 % (V/V) $C_2H_5OH M_w = 46,07 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- kalcijev klorid dihidrat $CaCl_2 \cdot 2H_2O M_w = 147,02 \text{ g/mol}$ (Zorka Šabac, Srbija in Črna Gora)
- kalijev dihidrogen fosfat $KH_2PO_4 M_w = 136,09 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- kloramfenikol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5 M_w = 323,132 \text{ g/mol}$ (Sigma, USA)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- magnezijev klorid heksahidrat $MgCl_2 \cdot 6H_2O M_w = 203,3 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat $MgSO_4 \cdot 7H_2O M_w = 246,48 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- D-(-)-manitol $C_6H_{14}O_6 M_w = 182,17 \text{ g/mol}$ (Kemika, Hrvaška)
- natrijev dihidrogen fosfat dihidrat $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O M_w = 156,01 \text{ g/mol}$ (Kemika, Hrvaška)
- natrijev hidroksid $NaOH M_w = 40,00 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid $NaCl M_w = 58,5 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- tripton (Biolife, Italija)
- vodikov klorid $HCl M_w = 36,46 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)

3.1.2 Gojišča

- gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt):
 - 5 g peptokompleks
 - 1 g kvasni ekstrakt
 - 2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
 - 30 g NaCl
 - 1000 ml destilirane vode

- gojišče M9:

- 200 ml 5xM9 soli (64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 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 ustrezeni koncentraciji (10 ml 50 % (w/V) glukoze)
- 750 ml destilirane vode

- gojišče PKE:

- 6 g peptokompleks
- 3 g kvasni ekstrakt
- 1000 ml destilirane vode

- gojišče LB:

- 10 g tripton
- 5 g kvasni ekstrakt
- 10 g NaCl
- 1000 ml destilirane vode

Za trdna gojišča smo dodali 15 g in za gojišča za difuzijo 12 g agar-agar na 1 liter.

3.1.3 Bakterijski sevi

- *Bacillus subtilis* IS75 (*Bacillus subtilis*)
- *Escherichia coli* ESH10 K-12 (*Escherichia coli*)
- *Micrococcus luteus*
- Morski izolati (2B, 5A, 5C in 5D) – niso taksonomsko opredeljeni
- *Pseudoalteromonas* sp.
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas putida* DSM 291^T (*Pseudomonas putida*)
- *Pseudomonas stutzeri* JM300 (*Pseudomonas stutzeri*)
- *Salmonella typhimurium*
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Vibrio* sp. DSMZ14379 (*Vibrio* sp.)
- *Vibrio* sp. DSMZ14379 rahlo rožnata mutanta, pridobljena z UV mutagenezo (mutanta R)
- *Vibrio* sp. DSMZ14379 bela mutanta, pridobljena s staranjem kulture v tekočem gojišču PKS (mutanta B)

3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

3.2.1 Gojenje bakterije *Vibrio* sp. za ekstrakcijo pigmenta

Kulturo *Vibrio* sp., ki smo jo uporabili za ekstrakcijo pigmenta, smo iz trdnega gojišča PKS s 3% (w/V) NaCl, precepili v 5 ml tekočega PKS 3 % (w/V) NaCl, ter jo inkubirali na stresalniku (Vibromix 40, Tehnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto (rpm) in 28 °C do eksponentne faze rasti. Nato smo z 1 % (V/V) inokulumom nacepili tekoče gojišče M9 s 5 mg/ml glukoze ter inkubirali na stresalniku pri 200 rpm preko noči pri 28 °C.

3.2.2 Gojenje sevov za določanje protibakterijske aktivnosti

Za gojenje divjega tipa *Vibrio* sp. in njegovih mutant ter morskih izolatov 2B, 5A, 5C, 5D in bakterije *Pseudoalteromonas* sp. smo uporabili gojišče PKS s 3 % (w/V) NaCl. Seve smo inkubirali pri 28 °C na stresalniku pri 200 rpm.

Pseudomonade (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*) in bakterijo *Serratia marcescens* smo gojili na gojišču PKE. Seve smo inkubirali pri 28 °C na stresalniku pri 200 rpm.

Enterobakterije (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* in *Staphylococcus epidermidis* smo gojili na gojišču LB ter jih inkubirali pri 37 °C na stresalniku pri 200 rpm.

Pred izvedbo eksperimentov smo seve s trdnega gojišča nacepili v 5 ml ustreznega, tekočega gojišča ter jih inkubirali preko noči na stresalniku pri ustrezeni temperaturi. Naslednji dan smo z 1 % (V/V) prekonočne kulture nacepili 20 ml gojišča, ter kulturo inkubirali pri enakih pogojih, do optične gostote pri valovni dolžini 650 nm (OD₆₅₀) med 0.3 in 0.4, izmerjene s fotometrom (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija).

3.2.3 Gojenje sevov za ponovno pigmentacijo mutant bakterije *Vibrio* sp.

Za pridobivanje izrabljenega gojišča smo mutante in divji tip *Vibrio* sp. iz trdnega gojišča precepili v 5 ml tekočega gojišča PKS ter inkubirali pri 28 °C na stresalniku pri 200 rpm preko noči. Po inkubaciji smo nacepili 40 ml gojišča PKS z 1 % (V/V) prekonočne kulture in inkubirali pri enakih pogojih preko noči. Mutanti bakterije *Vibrio* sp. smo pred eksperimentom precepili v 5 ml tekočega gojišča PKS in inkubirali pri enakih pogojih preko noči. Naslednji dan smo ju precepili v 80 ml gojišča, pripravljenega kot je opisano na strani 21, inkubirali pod enakimi pogoji preko noči.

3.3 EKSTRAKCIJA IN VREDNOTENJE PIGMENTA

3.3.1 Ekstrakcija pigmenta

Pigment smo ekstrahirali z acetonom (Giri in sod., 2004). Prekonočno kulturo, ki smo ji izmerili OD₆₅₀ s pomočjo fotometra (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija), smo centrifugirali 10 minut pri 14000 obratih in 4 °C v centrifug (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili ter celice resuspendirali v enakem volumnu acetona. Ekstrakt v acetonu smo nato stresali 90 minut. Pri majhnih volumnih smo ekstrakt stresali na stresalniku VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, USA) v mikrocentrifugirkah, pri velikih pa v bučkah na Vibromix 40 (Tehtnica, Slovenija) pri 200 rpm. Po ekstrakciji smo odstranili ostanke celic s centrifugiranjem 10 min pri 13000 rpm (Tehtnica Centric 150, Slovenia).

Ko smo potrebovali ekstrakt v etanolu, smo ekstrakt v acetonu sušili pri 37 °C čez noč do konstantne teže. Naslednji dan smo pripravili koncentrirano raztopino v 96 % etanolu, ki smo ga pred uporabo redčili do izhodiščnega volumna s koncentracijo etanola 7%.

3.3.2 Določanje mase suhe snovi bakterijskih celic

Vzporedno z ekstrakcijo smo določali maso suhe snovi, tako da smo 50 ml prekonočne kulture centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm in 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili, ter pelet resuspendirali v 1 ml sterilne destilirane vode. Nato smo raztopino prenesli v petrijevko, ki smo jo prej stehtali, ter sušili pri 37 °C do konstantne mase. S tehtanjem smo določili suho maso snovi, pri čemer smo uporabili tehtnico SBC 33 (Scaltec, Nemčija).

3.3.3 Vrednotenje koncentracije ekstrakta pigmenta

V steklen tehtič, ki smo ga prej posušili na 37 °C in ga stehtali (SBC 33, Scaltec, Nemčija), smo dodali znan volumen ekstrakta pigmenta v 96 % etanolu in sušili pri 37 °C do konstantne mase. Nato smo tehtič ponovno stehtali ter dobljeni masi odšteli maso tehtiča, ki smo jo določili na začetku. Tako smo dobili maso suhega ekstrakta, ki je bila v dodanem volumnu ekstrakta. Iz vrednosti smo izračunali koncentracijo v mg/l, pri čemer smo upoštevali, da je bil ekstrakt koncentriran.

Posušen ekstrakt smo raztopili v 96 % etanolu, ter dodali sterilno destilirano vodo, tako da smo dobili izhodiščni volumen raztopine s koncentracijo etanola 7 %. Dobljeno raztopino smo nato redčili s 7 % etanolom, tako da smo dobili 12 različnih redčitev, od 1 do 10 krat,

ki smo jih v treh ponovitvah po 300 µl nanesli v luknjice mikrotiterske plošče. Z optičnim čitalcem (Multiscan Spectrum, Thermo, Finska) smo izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah med 420 in 620 nm s korakom po 5 nm. Za ničlitev smo uporabili 7 % etanol.

Dobljene rezultate smo obdelali s programom Origin 8. Spektre smo integrirali in tako določili površine, ki so proporcionalne količini pigmenta. Nato smo narisali umeritveno krivuljo, ki predstavlja odvisnost velikosti površine spektra pigmenta od koncentracije ekstrakta v mg/l. Določili smo linearno enačbo, ki je popisala umeritveno krivuljo:

$$y = 3,46x + 1,42 \quad \dots (1)$$

y = Površina (P) spektra pigmenta, x = koncentracija (C) ekstrata v mg/l

Izpeljali smo enačbo, s katero lahko izračunamo koncentracijo ekstrakta iz izmerjene površine spektra pigmenta v 300 µl raztopine 7 % etanola.

$$P \text{ spektra} = 3,46 \times C \text{ ekstrakta} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) + 1,42 \quad \dots (2)$$

$$C \text{ ekstrakta} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{P \text{ spektra} - 1,42}{3,46} \quad \dots (3)$$

3.4 UGOTAVLJANJE VPLIVA pH NA ABSORPCIJSKI SPEKTER PIGMENTA

3.4.1 Spreminjanje pH in merjenje pH ekstrakta pigmenta v acetonu

120 ml ekstrakta pigmenta iz kulture *Vibrio* sp. v acetonu smo alikvotirali v steklene tehtice po 6 ml. pH smo merili s pH metrom (WTW pH 720, inoLab, Nemčija), ki smo ga umerili z dvotočkovno kalibracijo. Ko smo izmerili izhodiščni pH, smo v vsaki nadaljnji steklenički pH spremenili z dodatkom ustrezne količine 0,01 M ali 0,1 M kisline (HCl) ali baze (NaOH). Tako smo dobili stekleničke z različnimi vrednostmi pH, v razponu od 1 do 12. Raztopino v steklenički, ki smo ji dodajali HCl ali NaOH, smo med merjenjem pH mešali na magnetnem mešalu (Magnetic stirrer HI 190M, HANNA instruments, Portugalska).

Tudi 10 krat koncentriranemu ekstraktu pigmenta iz bakterije *Serratia marcescens* v acetonu smo z dodatkom različnih količin 0,1 M HCl in NaOH spremenili pH na štiri različne vrednosti v razponu od 3 do 10.

Vzorce smo nanesli na mikrotitersko ploščo v treh ponovitvah po 300 µl ter izmerili absorpcijski spekter z optičnim čitalcem (Multiscan Spectrum, THERMO, Finska) pri valovnih dolžinah od 380 do 600 nm s korakom po 5 nm. Za ničlitev smo uporabili aceton.

3.4.1.1 Obdelava podatkov

Dobljene spektre smo integrirali, da smo jih lahko normirali na enako površino. Trem ponovitvam smo določili povprečno vrednost in standardno deviacijo.

Da bi ugotovili, kako se absorbanca spreminja s pH pri določeni valovni dolžini, smo narisali graf, ki prikazuje absorbanco pri 460 in 530 nm (A_{460} in A_{530}) v odvisnosti od pH. Točkam smo določili krivuljo, ki jih je najbolje popisala. Za določanje ustrezne krivulje smo uporabili program Origin 8 in Boltzmannovo funkcijo.

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}} + A_2 \quad \dots(4)$$

Kjer sta x in y neodvisna in odvisna spremenljivka in x predstavlja pH vrednosti ter y predstavlja absorbanco pri 460 ali 530 nm. A_1 je A_{460} ali A_{530} pri najnižjem pH in A_2 pri najvišjem. Parameter x_0 predstavlja tisto vrednost x, kjer je y enak $(A_2 - A_1)/2$.

3.5 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

3.5.1 Protibakterijsko delovane bakterije *Vibrio* sp.

Na ploščo PKS smo konfluentno nacepili morski izolat 5A ter nato s sterilnimi zobotrebci napikirali kulture bakterije *Vibrio* sp. divjega tipa in mutant. Po inkubaciji preko noči na 28°C smo opazovali cone inhibicije.

3.5.2 Protibakterijska aktivnost pigmenta v ekstraktu in izrabljenem gojišču z difuzijsko metodo z diskami

Na plošče PKS in LB smo konfluentno nacepili seva 5A in bakterije *Escherichia coli*. Na plošče smo položili tri diske za testiranje antibiotikov (MARCHEREY-NAGEL GmbH & Co., Nemčija), s premerom 6 mm, in nanje nakapljali 10 µl izrabljenega gojišča *Vibrio* sp. divjega tipa, mutante B in R. Na druge plošče smo položili štiri diske ter nanje nakapljali 10 µl ekstrakta *Vibrio* sp. divjega tipa, mutante B in mutante R v 7 % etanolu ter 7 % etanol kot kontrolo. Po inkubaciji preko noči na ustrezni temperaturi smo opazovali cone inhibicije.

3.5.3 Določanje protibakterijske aktivnosti ekstrakta pigmenta v tekoči kulturi

V 250 ml erlenmajericah z rilčki z 20 ml gojišča smo gojili seve (*Vibrio* sp., 5A, *E. coli*, *B. subtilis*) in merili optično gostoto pri 650 nm (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija) vsake pol ure. Ko so sevi prešli v eksponentno fazo rasti, pri OD₆₅₀ med 0,3 in 0,4, smo dodali 1 % (V/V) ekstrakta pigmenta v 7 % etanolu. V kontrolne erlenmajerice smo dodali le 7 % etanol. Po dodatku smo merili OD₆₅₀ na 30 minut še vsaj 5 ur ter čez 20 ur. Delali smo v treh ponovitvah, tako da smo za vsak sev imeli tri eksperimentalne in tri kontrolne ponovitve. Eksperiment smo dvakrat ponovili.

Eksperiment s kloramfenikolom smo izvedli enako kot prejšnjega z razliko, da smo kdvetema ponovitvama s sevom 5A dodali antibiotik kloramfenikol v 96 % etanolu, tako da je bila koncentracija antibiotika v ponovitvah 20 µg/ml. Kot kontrolo smo v dve ponovitvi s sevom 5A dodali 96 % etanol. OD₆₅₀ smo merili še vsaj 10 ur po dodatku ter zadnjič izmerili še po 25 urah, da smo dobili vpogled v kinetiko dogajanja.

3.5.4 Določanje protibakterijske aktivnosti ekstrakta pigmenta na mikrotiterskih ploščah

Protibakterijsko aktivnost ekstrakta pigmenta smo preverili še za druge bakterijske seve. V ta namen smo uporabili test na mikrotiterskih ploščah (Turcotte in sod., 2004), ki smo ga prilagodili našim potrebam.

Uporabili smo sterilne polistirenske mikrotiterske plošče s 96 luknjicami. V vsako luknjico smo dali 100 µl ustreznega gojišča ter naredili redčitveno vrsto ekstrakta. V prve luknjice smo dali po 25 µl ekstrakta v 7 % etanolu, v kontrolne ponovitve pa enako količino 7 % etanola. Redčitve smo naredili tako, da smo prenašali po 20 µl v naslednjo luknjico in vsakič trikrat premešali raztopino.

Seve, ki smo jih testirali, smo gojili v 20 ml ustreznega gojišča v erlenmajericah z rilčki. Ko so sevi zrastli do OD₆₅₀ med 0,3 in 0,4, smo v vsako luknjico dodali po 100 µl kulture. Delali smo v dveh ponovitvah, tako da smo dali posamezni sev v 4 vrstice, od katerih sta bili dve eksperimentalni, z rečitveno vrsto ekstrakta, dve pa kontrolni, z rečitveno vrsto etanola. Dodatno smo za vsako gojišče pripravili še štiri ničelne vrstice, od katerih sta bili dve vrstici z redčitveno vrsto ekstrakta in dve z redčitveno vrsto etanola, namesto kulture pa smo dodali 100 µl ustreznega gojišča.

Takoj po dodatku kulture v eksperimentalne in kontrolne ter gojišča v ničelne ponovitve, smo izmerili OD₆₅₀ z optičnim čitalcem (Multiscan Spectrum, THERMO, Finska), ki je predstavljala optično gostoto v času t₀. OD₆₅₀ smo merili vsako uro, 5 ur. Med meritvami smo mikrotiterske plošče inkubirali na ustrejni temperaturi brez stresanja. Pokrovček mikrotiterske plošče smo pri merjenju v optičnemu čitalcu odstranili.

Izmerili smo spekter ekstrakta v etanolu, tako da smo lahko določili koncentracijo ekstrakta v posameznih redčitvah.

Po istem postopku smo preverili tudi protibakterijsko aktivnost ekstraktov mutante R in mutante B bakterije *Vibrio* sp. na sevu 5A.

3.5.4.1 Obdelava podatkov, pridobljenih s testom na mikrotiterskih ploščah

Vrednostim OD₆₅₀ v ponovitvah smo določili povprečno vrednost in standardno deviacijo. Dobljenim rezultatom smo, za vsako uro (pred inkubacijo (t₀) in po pet urni inkubaciji (t₅) in vsako rečitev posebej, odšteli ničelne vrednosti, ki so predstavljale optično gostoto, ki jo ima gojišče z redčitveno vrsto brez kulture:

$$OD_{t0} (\text{kultura} + 7\% \text{ etanol}) - OD_{t0} (\text{gojišče} + 7\% \text{ etanol}) = OD_{t0,k} \dots (5)$$

$$OD_{t5} (\text{kultura} + 7\% \text{ etanol}) - OD_{t5} (\text{gojišče} + 7\% \text{ etanol}) = OD_{t5,k} \dots (6)$$

$$OD_{t0} (\text{kultura} + \text{ekstrakt}) - OD_{t0} (\text{gojišče} + \text{ekstrakt}) = OD_{t0,e} \dots (7)$$

$$OD_{t5} (\text{kultura} + \text{ekstrakt}) - OD_{t5} (\text{gojišče} + \text{ekstrakt}) = OD_{t5,e} \dots (8)$$

OD_{t0} je OD₆₅₀ v času t₀ (tako po dodatku kulture), OD_{t5} je OD₆₅₀ v času t₅ (po petih urah inkubacije), OD_{t0,k} je OD₆₅₀ kontrolne kulture (kultura, ki smo ji dodali 7 % etanol) v času t₀, OD_{t5,k} je OD₆₅₀ kontrolne kulture v času t₅ OD_{t0,e} je OD₆₅₀ eksperimentalne kulture (kultura, ki smo ji dodali ekstrakt pigmenta) v času t₀. OD_{650,t5,e} je OD₆₅₀ eksperimentalne kulture v času t₅.

Razliko v OD₆₅₀ zaradi dodatka ekstrakta pigmenta smo določili po formuli:

$$\Delta OD_{650} = (OD_{650,t_5,k} - OD_{650,t_0,k}) - (OD_{650,t_5,e} - OD_{650,t_0,e}) \dots (9)$$

Kjer je razlika v optični gostoti enaka razliki optične gostote kontrole in vzorca, nastali v petih urah inkubacije.

Odstotek razlike v OD₆₅₀ zaradi dodatka ekstrakta pigmenta:

$$\% \Delta OD_{650} = \frac{(OD_{650,t_5,k} - OD_{650,t_0,k}) - (OD_{650,t_5,e} - OD_{650,t_0,e})}{(OD_{650,t_5,k} - OD_{650,t_0,k})} \cdot 100\% \dots (10)$$

Kjer je %ΔOD₆₅₀ odstotek inhibicije rasti organizma in je enak razliki OD₆₅₀ med eksperimentalno in kontrolno kulturo nastalo v petih urah inkubacije, deljeno z OD₆₅₀ kontrolne kulture, nastalo v petih urah inkubacije.

Iz tako pridobljenih podatkov smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo ekstrakta pigmenta (MIC₅₀ (Casey in sod., 2004)), ki po petih urah inkubacije po dodatku ekstrakta pigmenta povzroči 50 % inhibicijo rasti testnega organizma, torej koncentracija ekstrakta pigmenta, pri kateri je %ΔOD₆₅₀ enak 50 %. Metoda in parameter sta prilagojena potrebam eksperimenta.

3.6 POVRNITEV PIGMENTACIJE PRI MUTANTAH BAKTERIJE *Vibrio* sp., KI NE PRODUCIRATA PIGMENTA

3.6.1 Opazovanje vpliva divjega tipa in nekaterih drugih bakterij na spremjanje obarvanosti mutant bakterije *Vibrio* sp. na plošči

Na plošče z gojiščem PKS smo v neposredno bližino (3-5 mm) nacepili po dva seva. Skupaj smo nacepili divji tip *Vibrio* sp. in belo mutantno (mutantno B), ki ne producira rdečega pigmenta, divji tip in rahlo rožnato mutantno (mutantno R), ki producira zelo malo rdečega pigmenta, ter mutantni skupaj. Mutanti bakterije *Vibrio* sp. smo nacepili tudi na plošče skupaj z bakterijama *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* ter morskim izolatom 5A. Inkubirali smo na 28°C 3 dni in opazovali spremembo obarvanosti mutant.

3.6.2 Določanje količine ekstrakta pigmenta, ki sta ga producirali mutantni v stiku z izrabljenim gojiščem divjega tipa ali druge mutante

Pripravili smo izrabljenega gojišča divjega tipa *Vibrio* sp. in mutant, tako da smo prekonočne kulture centrifugirali 15 minut pri 15000 obratih in 4°C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Supernatant smo prefiltrirali skozi filter s porami premera 0,2 µm ter ga shranili pri -20°C.

Opazovali smo vpliv izrabljenega gojišča divjega tipa *Vibrio* sp. na mutantno R in B, vpliv izrabljenega gojišča mutantne R na mutantno B ter vpliv izrabljenega gojišča mutantne B na mutantno R. Za vsako od opazovanih kombinacij smo pripravili dve eksperimentalni in dve kontrolni ponovitvi. Za eksperimentalne ponovitve smo v dve erlenmajerici dali 40 ml svežega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl in 40 ml izrabljenega gojišča, kot kontrole pa smo imeli po dve erlenmajerici s svežim gojiščem (80 ml).

Erlenmajerice smo nacepili z mutantama (1 % (V/V) inokulum) in jih inkubirali preko noči na stresalniku pri približno 200 rpm in 28°C. Naslednji dan smo ekstrahirali pigment iz vsake ponovitve. Celice smo 10 krat koncentrirali, s centrifugiranjem pri 13000 obratih (Tehnica Centric 150, Slovenija). Nadaljnje stopnje ekstrakcije so potekale kot je opisano na strani 16. Iz vsake erlenmajerice smo pigment ekstrahirali iz 10 ml kulture v dveh ponovitvah, tako da smo na koncu iz vsakega vzorca dobili po 2 ml 10 krat koncentriranega ekstrakta pigmenta v acettonu iz eksperimentalnih erlenmajeric in enako iz kontrolnih.

Za vsak vzorec smo pri dveh ponovitvah izmerili absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta v acettonu.

Dve ponovitvi ekstrakta pigmenta iz vsakega vzora smo posušili ter jih ponovno raztopili v etanolu in izmerili spektre.

Obakrat smo nanesli tri ponovitve po 300 µl vsakega vzorca ter izmerili absorbanco (Multiscan Spectrum, THERMO, Finska) pri valovnih dolžinah od 420 do 620 nm s korakom po 5 nm. Za ničlitev smo uporabili aceton, pri vzorcih ekstrakta pigmenta v acetonu, in 7 % etanol pri vzorcih ekstrakta v etanolu.

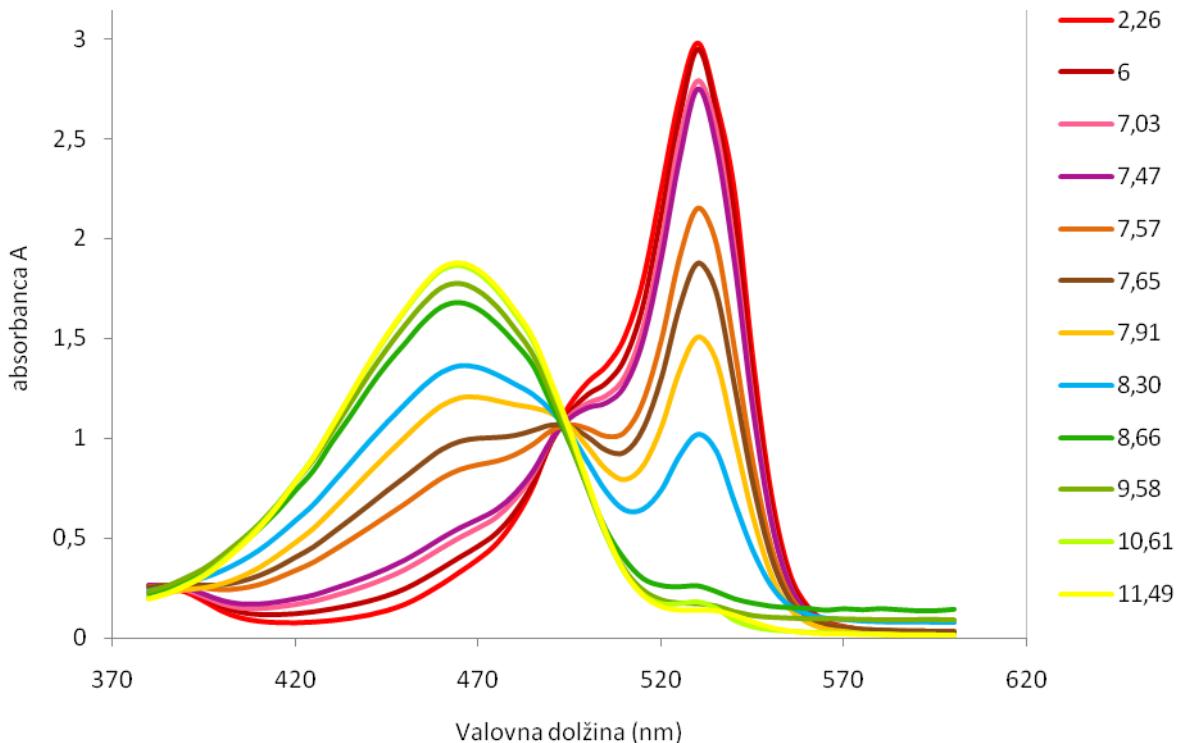
Določili smo površine spektrov s programom OriginPro 8 in površinam spektra v etanolu določili odgovarjajočo koncentracijo ekstrakta, tako da smo lahko primerjali količino pigmenta, ki je nastala v eksperimentalnih in kontrolnih erlenmajericah.

Za vsako kulturo smo določili maso suhe snovi, po postopku kot je opisano na strani 16, ter preračunali koliko pigmenta je nastalo na g suhe snovi.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV pH NA BARVO IN ABSORPCIJSKI SPEKTER PIGMENTA

Sprememba pH vrednosti je vplivala na barvo in absorpcijski spekter pigmenta (Slika 6). Pri pH nižjem od 7,5 je bila barva pigmenta intenzivno rožnata (Slika 7). Z naraščanjem pH do 8,3 je postajala bolj oranžna, pri višjem pH je postala intenzivno rumena (Slika 7). Pri prekomerni titraciji ekstrakta z NaOH je postala barva žareče rumena. Po dodatku HCl je prišlo do ponovne spremembe barve v rožnato ter spet v rumeno ob dodatku NaOH, kar kaže na reverzibilnost spremembe barve ekstrakta pigmenta.



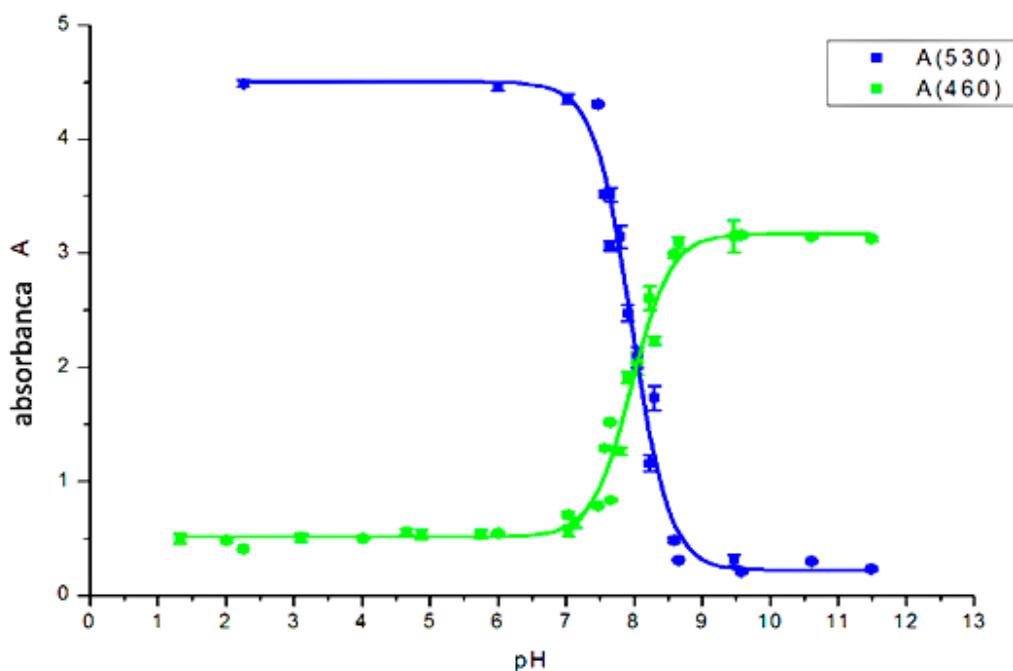
Slika 6: Absorpcijski - VIS spektri (380 – 600 nm) ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v acetonu z različnimi pH vrednostmi.

Absorpcijski spekter se je s pH spremenjal tako, da je bila pri pH nižjem od 7,9 absorpcija najbolj intenzivna pri 530 nm. Vrh pri tej valovni dolžini je z naraščanjem pH padal, pojavljati pa se je pričel vrh pri 460 nm (Slika 6). Oba vrhova sta bila približno enako visoka pri pH med 7,91 in 8,30, kar je razvidno iz slike 8. Pri pH nad 9,5 je vrh pri 530 nm skoraj popolnoma izginil. Izobestična točka je pri valovni dolžini 495 nm.



Slika 7: Barva ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v acetonu z različnimi pH vrednostmi.

Slika 8 prikazuje upad absorbance pri valovni dolžini 530 nm z naraščajem pH ter sočasno naraščanje absorbance pri 460 nm. Vrednosti so prikazane v Prilogi B1. Absorpcija se pri nizkih pH vrednostih, vse do 7 skoraj ni spremjalna. Pri pH nad 7 je prišlo do hitrega preskoka barve ter spremembe absorpcije. Absorbanci pri 460 in 530 nm sta se najmočneje spreminali pri pH med 7,00 in 8,66. V tem območju je imel ekstrakt tudi veliko pufersko kapaciteto.



Slika 6: Vpliv pH na absorpcijo ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v acetonu pri valovnih dolžinah 460 in 530 nm.

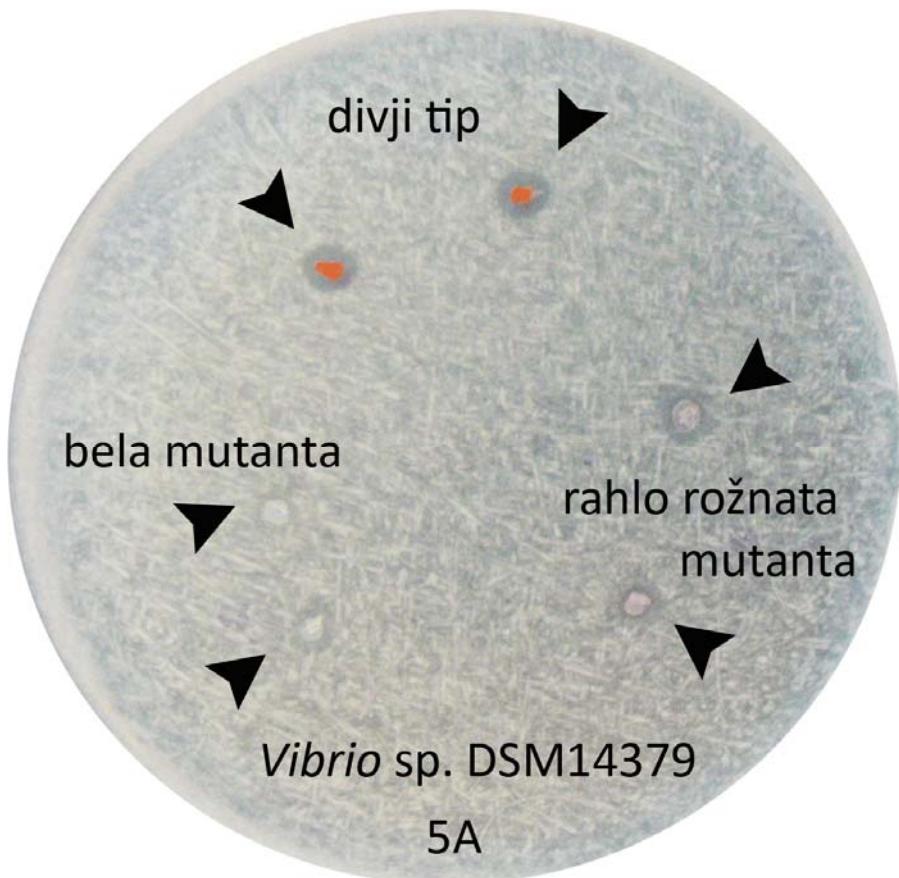
S pomočjo Boltzmannovega modela smo določili pK_a pri $7,96 \pm 0,04$ pri krivulji absorbance pri 460 nm, pri 530 nm pa $7,97 \pm 0,04$ (Priloga B2 in Priloga B3).

4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKTA PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio*. sp.

Protimikrobovno aktivnost bakterije *Vibrio* sp. smo izmerili na tri različne načine: s pomočjo neposrednega kontakta med kolonijami *Vibrio* sp. in testirane kulture (i); difuzijske metode z diskami (ii); in v tekoči kulturi (iii).

4.2.1 Protibakterijsko delovanje kolonij bakterije *Vibrio* sp.

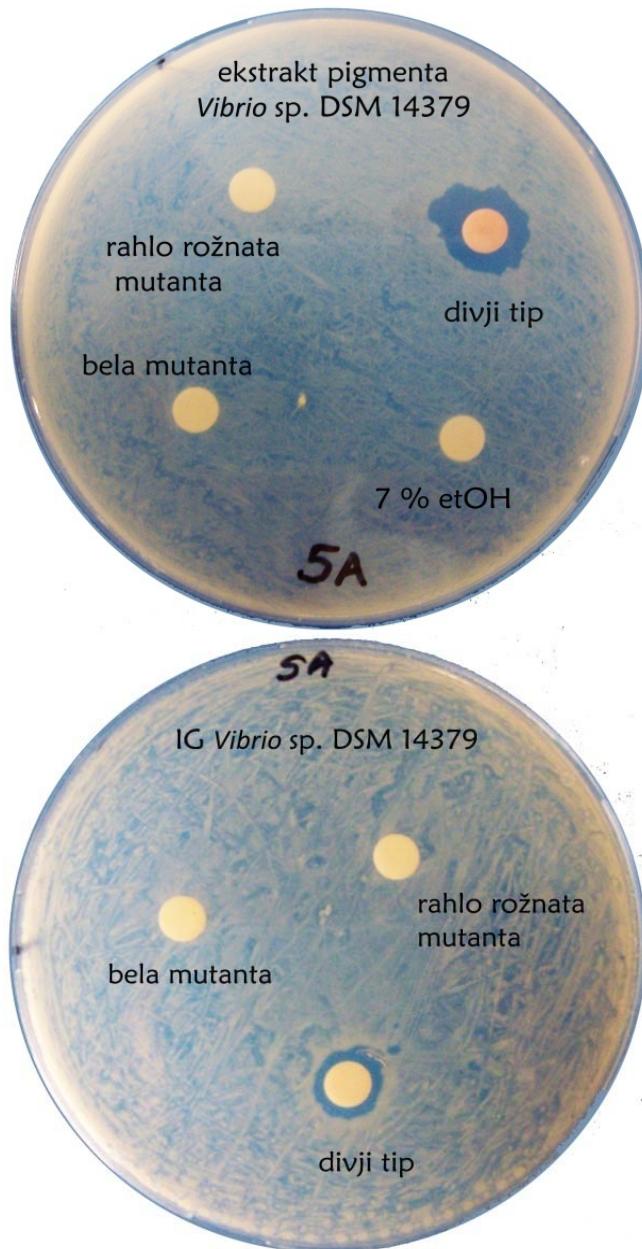
Divji tip bakterije *Vibrio* sp. je popolnoma zaviral rast morskega izolata 5A na plošči (Slika 9). Med tem ko sta mutanti *Vibrio* sp. le šibko vplivali nanj. Okoli kolonij rahlo rožnate mutante (mutante R) ni prišlo do popolne zbistritve, vendar je bila tam rast seva 5A nekoliko šibkejša (Slika 9). Medtem ko je bila okoli kolonij bele mutante (mutante B) rast seva 5A skoraj nespremenjena (Slika 9).



Slika 9: Vpliv divjega tipa, rahlo rožnate in bele mutante *Vibrio* sp. DSM14379 na rast morskega izolata 5A. Divji tip je napikiran zgoraj, rahlo rožnata mutanta desno in bela mutanta levo spodaj.

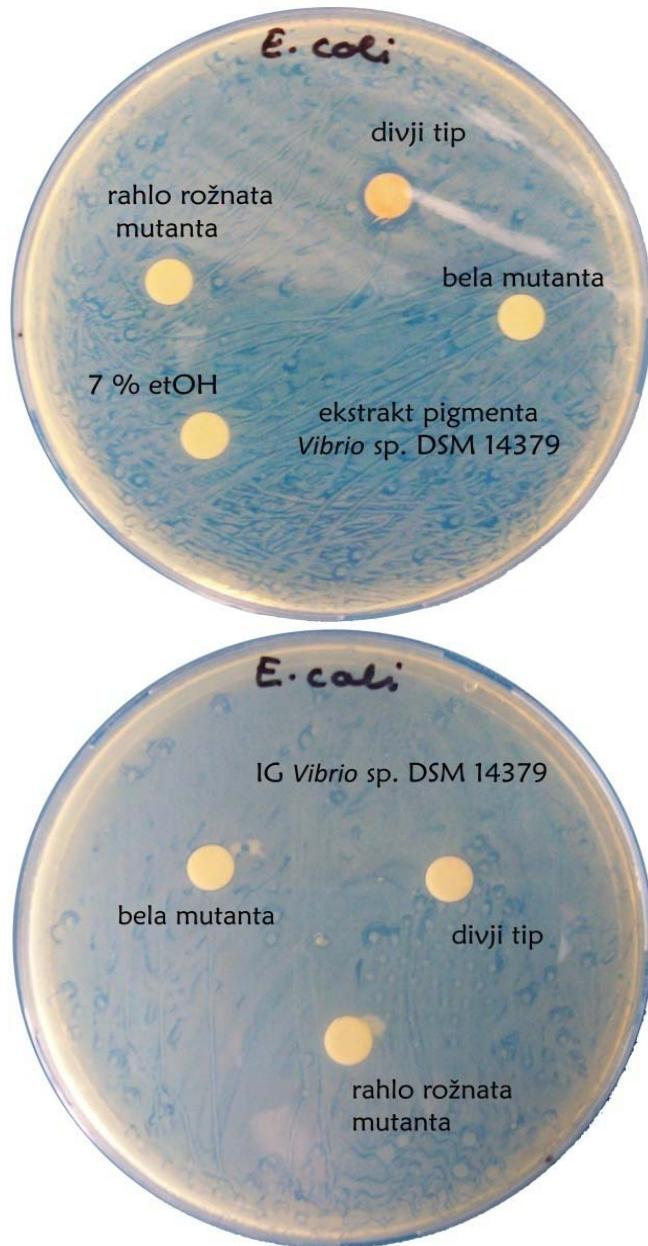
4.2.2 Protibakterijska aktivnost na ploščah z difuzijsko metodo z diskki

Ekstrakt pigmenta *Vibrio* sp. divjega tipa je vplival na rast seva 5A tudi, ko smo protmikrobeno aktivnost testirali na diskih z znano koncentracijo ekstrakta (Slika 10, zgoraj). Pri disku z ekstraktom divjega tipa, smo izmerili inhibicijsko cono s premerom 14 ± 3 mm. Pri diskih z ekstraktom mutant ter pri kontroli s 7 % etanolom inhibicijske cone ni bilo. Prav tako izrabljeno gojišče mutante R in B ni imelo vpliva na rast seva 5A. Pri disku z izrabljenim gojiščem divjega tipa pa smo izmerili cono inhibicije s premerom 11 mm (Slika 10, spodaj).



Slika 10: Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v 7 % etanolu in izrabljenega gojišča *Vibrio* sp. DSM14379 divjega tipa, bele in rahlo rožnate mutante na sev 5A.

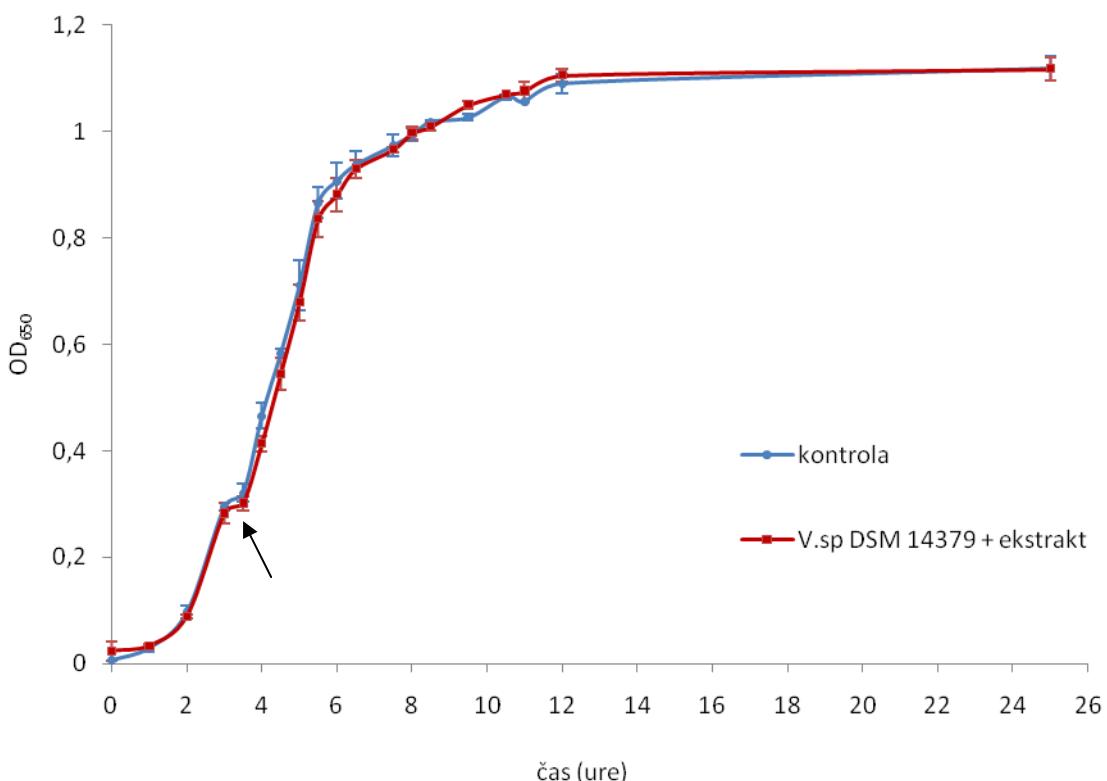
Pri *E. coli* ni bilo inhibicijske cone okoli nobenega diska, razen rahle inhibicije pri ekstraktu pigmenta divjega tipa (Slika 11). Izmerili smo cono s premerom približno 9 mm.



Slika 11: Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v 7 % etanolu in izrabljenega gojišča *Vibrio* sp. DSM14379 divjega tipa, bele in rahlo rožnate mutante na bakterijo *Escherichia coli* ESH10 K12.

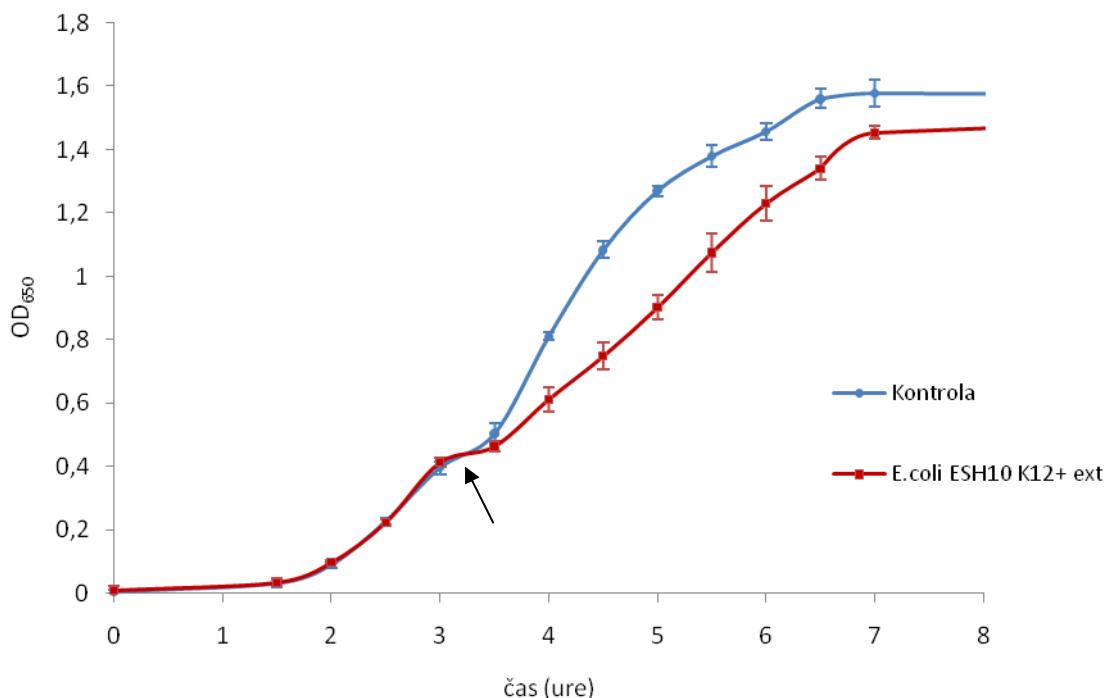
4.2.3 Protibakterijska aktivnost v tekoči kulturi

Ekstrakt pigmenta ni kazal avtoihibirajočega učinka na rast *Vibrio* sp. (Slika 12, Priloga C1).

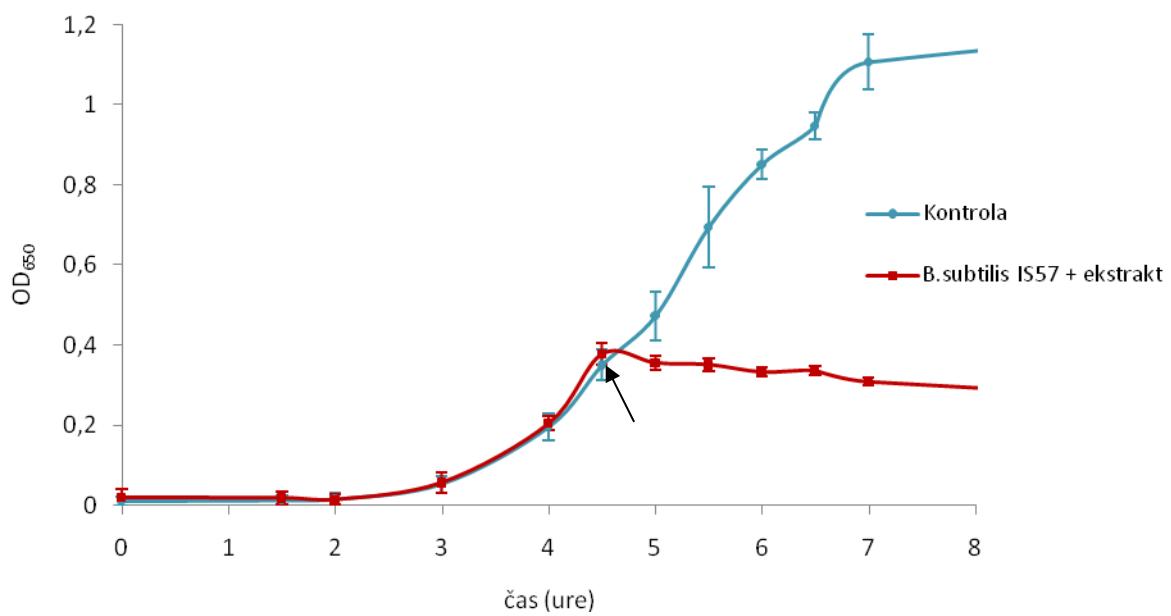


Slika 12: Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v 7 % etanolu na proizvodnji sev. Koncentracija ekstrakta pigmenta v kulturi $1,15 \pm 0,07$ mg/l. Puščica prikazuje trenutek dodatka ekstrakta pigmenta.

Ekstrakt pigmenta je rahlo zaviral rast bakterije *Escherichia coli* vsaj 4 ure po dodatku ekstrakta pigmenta (Slika 13, Priloga C2), vendar se po 24 urah inkubacije OD₆₅₀ koltrolna in eksperimentalna kultura nista signifikantno razlikovali. Ekstrakt pigmenta je imel izrazit vpliv na bakterijo *Bacillus subtilis*, pri kateri je OD₆₅₀ po dodatku pričela padati, medtem ko je v kontrolni kulturi OD₆₅₀ naraščala (Slika 14, Priloga C3). Po 24 urah inkubacije je kontrolna kultura bakterije *Bacillus subtilis* dosegla OD₆₅₀ $1,49 \pm 0,05$, pri kulturi, kjer smo dodali ekstrakt pigmenta pa je OD₆₅₀ padel do $0,07 \pm 0,03$.

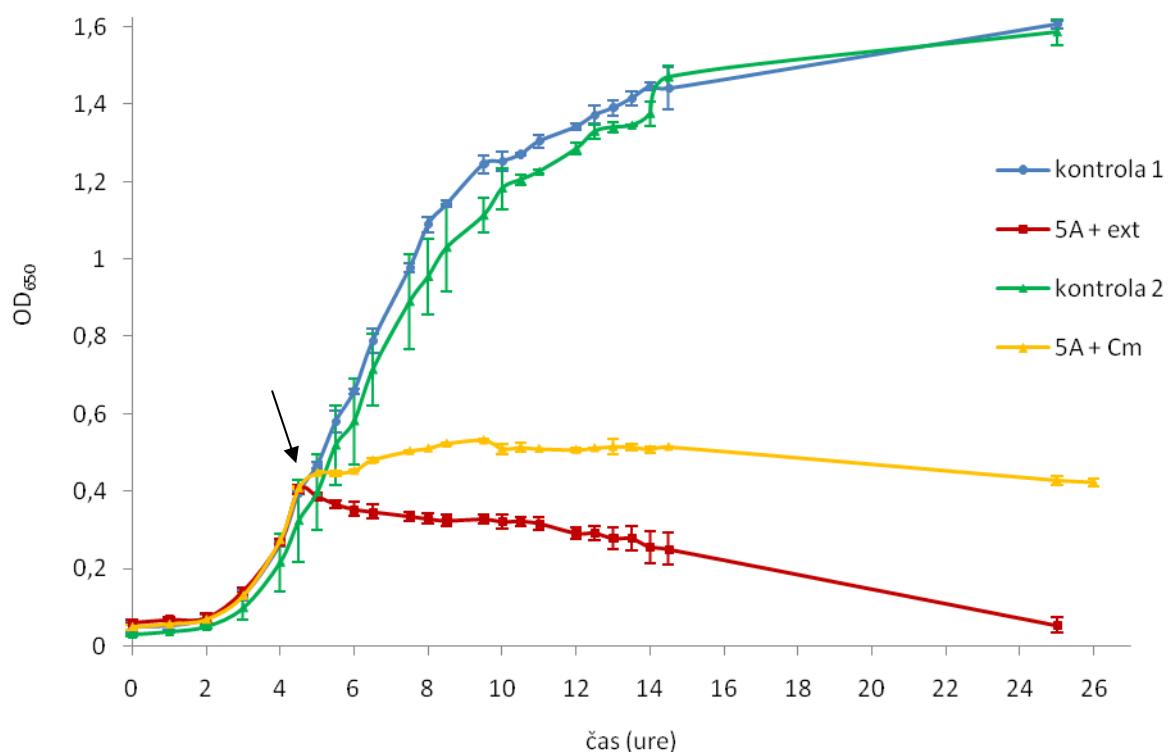


Slika 13: Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v 7 % etanolu na bakterijo *Escherichia coli* ESH10 K12. Koncentracija ekstrakta pigmenta v kulturi $0,94 \pm 0,08$ mg/l. Puščica prikazuje trenutek dodatka ekstrakta pigmenta.



Slika 14: Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v 7 % etanolu na bakterijo *Bacillus subtilis* IS75. Koncentracija ekstrakta pigmenta v kulturi $0,94 \pm 0,08$ mg/l. Puščica prikazuje trenutek dodatka ekstrakta pigmenta.

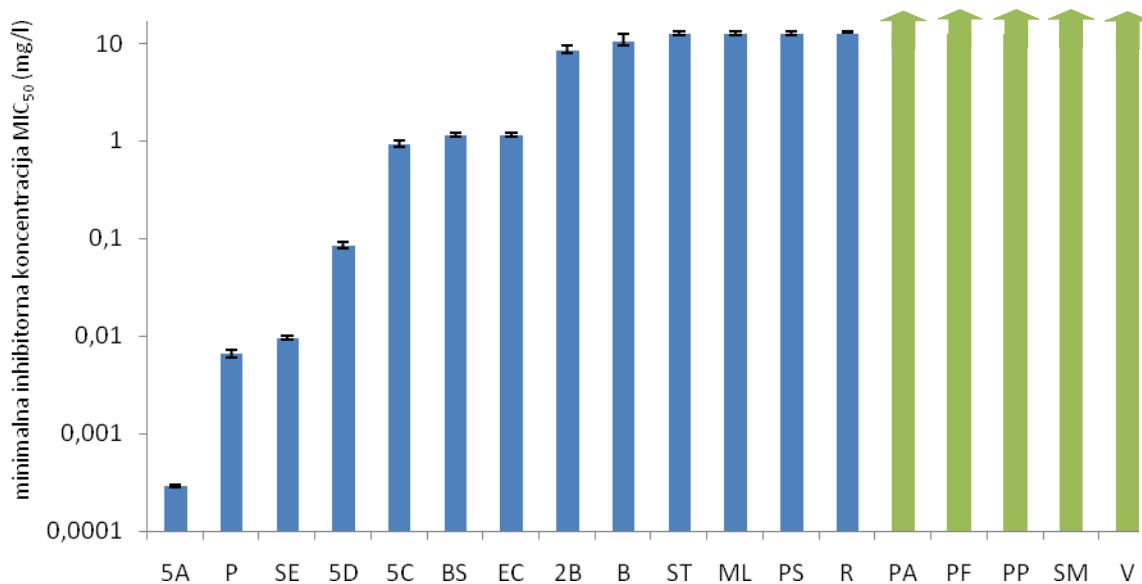
Ekstrakt pigmenta je imel močan vpliv na rast morskega izolata 5A (Slika 15, Priloga C4). Takoj po dodatku ekstrakta pigmenta je bila opazna sprememba OD₆₅₀, ki je začela padati in je po 25 urah dosegla vrednost OD₆₅₀ okrog 0,05. Kontrolna kultura je v tem času dosegla stacionarno stanje z OD₆₅₀ okrog 1,6. Ker smo poskušali ugotoviti ali je proces lize celic, ki ga povzroči dodatek ekstrakta pigmenta aktivno vezan na sintezo proteinov, smo kulturi morskega izolata 5A dodali kloramfenikol. Za razliko od kulture brez dodanega kloramfenikola je OD₆₅₀ v kulturah s kloramfenikolom ostajal v času 25 ur po dodatku ekstrakta pigmenta bolj ali manj enak.



Slika 15: Vpliv ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379 v 7 % etanolu in kloramfenikola na rast morskega izolata 5A v tekočem gojišču. Koncentracija ekstrakta pigmenta v kulturi $1,15 \pm 0,07$ mg/l, koncentracija kloramfenikola 20 mg/l. Puščica prikazuje trenutek dodatka ekstrakta pigmenta in kloramfenikola. **Kontrola 1** – kultura z dodatkom 7 % etanola, **5A + ext** – kultura z dodatkom ekstrakta pigmenta v 7 % etanolu, **kontrola 2** – kultura z dodatkom 96 % etanola, **5A + Cm** – kultura z dodatkom kloramfenikola v 96 % etanolu.

4.2.2 Protibakterijsko delovanje ekstrakta pigmenta na različne bakterijske seve

Protimikrobnou aktivnost ekstrakta pigmenta smo izmerili tudi pri drugih bakterijah pri različnih koncentracijah ekstrakta pigmenta in iz podatkov izračunali minimalno inhibitorno koncentracijo (Slika 16). Najmočnejše je ekstrakt pigmenta vplival na morski izolat 5A, pri katerem smo ugotovili tudi najnižjo MIC_{50} ($0,29 \pm 0,01 \mu\text{g/l}$). Vplival je tudi na vse ostale morske izolate, ki smo jih testirali. MIC_{50} smo pokazali tudi pri mutanti R in mutanti B *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*. Vrednosti MIC_{50} so prikazane v Prilogi D1.



2B, 5A, 5C in 5D – morski izolati, P – *Pseudoalteromonas* sp., SE – *Staphylococcus epidermidis*, BS – *Bacillus subtilis* IS75, EC – *Escherichia coli* ESH10 K12, B – bela mutanta *Vibrio* sp. DSM14379, ST – *Salmonella typhimurium*, ML – *Micrococcus luteus*, PS – *Pseudomonas stutzeri*, R – rahlo rožnata mutanta *Vibrio* sp. DSM14379, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, PF – *Pseudomonas fluorescens*, PP – *Pseudomonas putida*, SM – *Serratia marcescens*, V – *Vibrio* sp. DSM14379

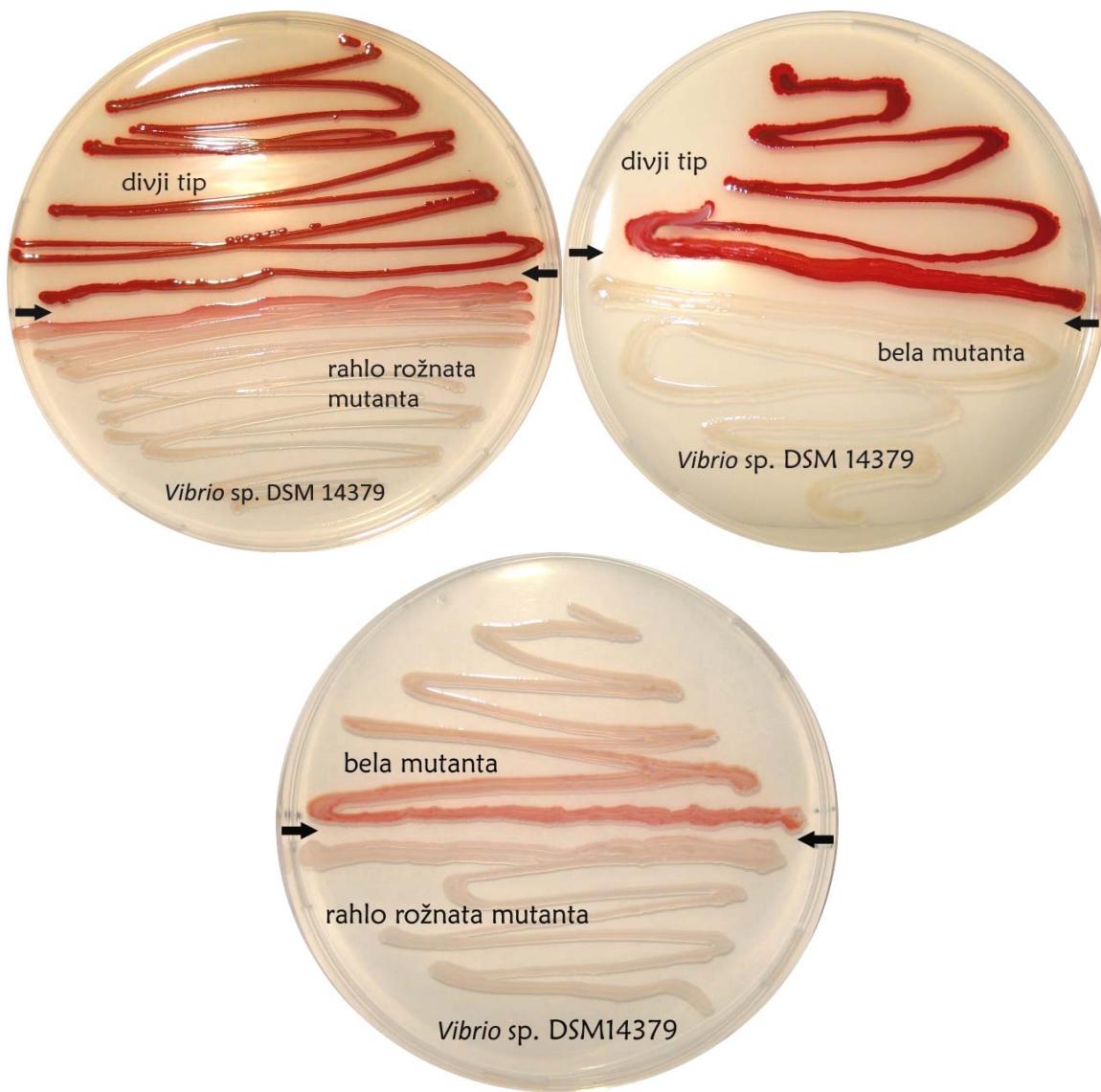
Slika 16: Minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta pigmenta ekstrahiranega iz *Vibrio* sp. DSM14379, ki po petih urah inkubacije po dodatku ekstrakta pigmenta povzroči 50 % inhibicijo rasti organizma v primerjavi s kontrolo. Zeleni stolpci s puščicami predstavljajo tiste bakterijske vrste pri katerih tudi pri najvišjih testiranih koncentracijah ekstrakta pigmenta nismo zasledili protimikrobnega učinka.

Pri bakterijskih sevih *Vibrio* sp. divji tip, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* in *Serratia marcescens* nismo pri nobeni od testiranih koncentracij ekstrakta pigmenta zaznali MIC_{50} . Prav tako nismo zaznali protibakterijskega delovanja nekoncentriranega ekstrakta pigmenta iz mutante B in mutante R na morski izolat 5A. Desetkrat koncentriran ekstrakt pigmenta ($0,34 \text{ mg/l}$) mutante R je protibakterijsko vplival na sev 5A ($MIC_{50} = 0,46 \pm 0,10 \text{ mg/l}$) (Priloga D2).

4.3 POVRNITEV PIGMENTACIJE PRI MUTANTAH BAKTERIJE *Vibrio* sp.

4.3.1 Povrnitev pigmentacije mutant na plošči

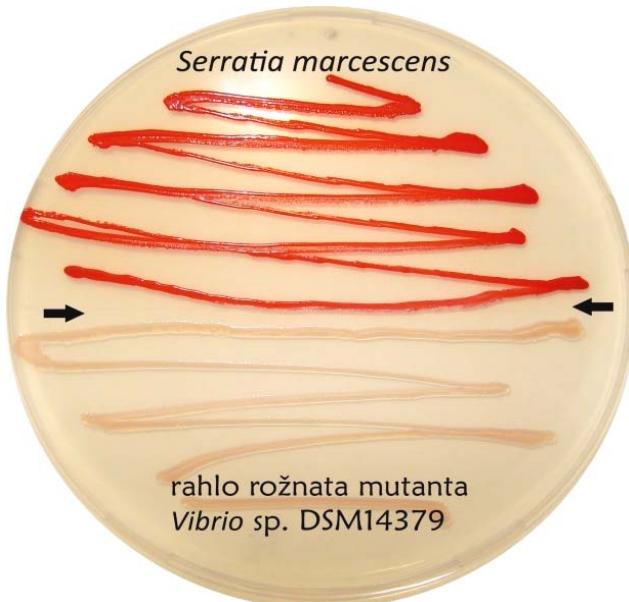
Mutanta R (rahlo rožnata mutanta) se je v bližini divjega tipa *Vibrio* sp. obarvala (Slika 17, zgoraj levo). Mutanta B (bela mutanta) se v stiku z divjim tipom ni obarvala (Slika 17, zgoraj desno), obarvala se je le na plošči v bližini mutante R (Slika 17, spodaj). Bližina mutante B ni vplivala na obarvanost mutante R (Slika 17, spodaj).



Slika 17: Plošče z agariziranim gojiščem PKS na katerih sta nacepljena po dva seva. Divji tip *Vibrio* sp. DSM14379 in rahlo rožnata mutanta (zgoraj levo), divji tip in bela mutanta (zgoraj desno) ter bela in rahlo rožnata mutanta *Vibrio* sp. DSM14379 (spodaj). Ekperiment smo 3 krat ponovili.

Morski izolat 5A in bakterija *Escherichia coli*, kot negativni kontroli, nista imeli vpliva na obarvanost nobene od mutant *Vibrio* sp.

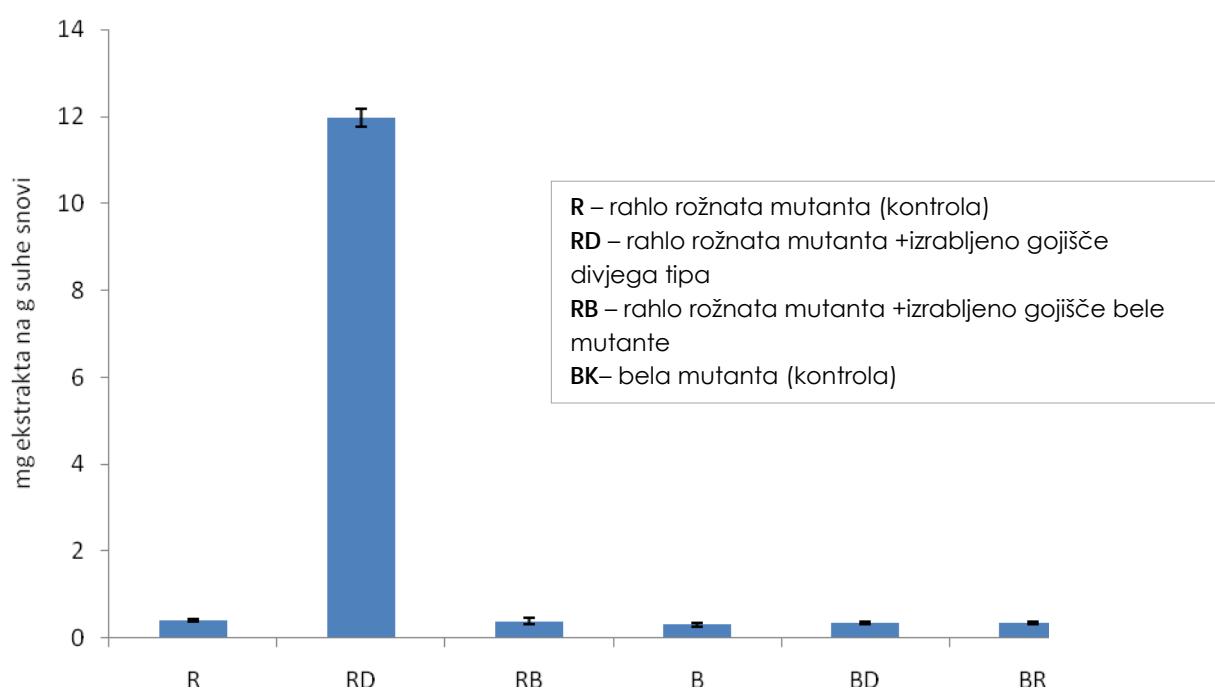
Vpliva bakterije *Serratia marcescens*, ki proizvaja podobno barvilo kot divji tip bakterije *Vibrio* sp., na mutantno R *Vibrio* sp. nismo zaznali (Slika 18, zgoraj). Pri mutanti B *Vibrio* sp. smo v bližini *Serratia marcescens* opazili rahlo obarvanost (Slika 18, spodaj).



Slika 18: Plošči z agariziranim gojiščem PKS na katerih sta nacepljena po dva seva. Bakterija *Serratia marcescens* in rahlo rožnata mutanta *Vibrio* sp. DSM14379 (zgoraj), bakterija *Serratia marcescens* in bela mutanta *Vibrio* sp. DSM14379 (spodaj).

4.3.2 Vsebnost pigmenta v celicah mutant *Vibrio* sp. ob dodatku izrabljenega gojišča divjega tipa bakterije *Vibrio* sp.

V kulturi mutante R, ki je rastla v gojišču z dodanim izrabljenim gojiščem divjega tipa, je nastalo $11,97 \pm 0,21$ mg na g suhe snovi, skoraj 30 krat več kot v kontrolni kulturi (Slika 19). Kljub temu, da se je količina pigmenta po dodatku izrabljenega gojišča divjega tipa močno povečala je bila še vedno za 8,5 krat manjša kot v divjem tipu. Pri ostalih kulturah, ki so rastle v svežem gojišču ali v gojišču z dodatkom izrabljenega gojišča pa se vsebnost pigmenta ni signifikantno razlikovala (Slika 19), in je bila manjša od 0,4 mg pigmenta na g suhe snovi (Priloga F).



Slika 19: Vsebnost pigmenta v celicah mutant *Vibrio* sp. DSM14379, ki so rasle v svežem gojišču in ob dodatku izrabljenega gojišča.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Namen diplomskega dela je opis lastnosti pigmenta. Cilji, ki smo si jih zastavili, so bili ugotoviti vpliv pH na spremembo absorpcijskega spektra in barve pigmenta, ugotoviti protibakterijski učinek pigmenta na nekatere izbrane bakterijske seve, in preveriti ali je sinteza pigmenta pri bakteriji *Vibrio* sp. regulirana z zaznavanjem celične gostote.

5.1 SPREMENBA BARVE EKSTRAKTA PIGMENTA

Pokazali smo, da se barva (Slika 6) in absorpcijski spekter (Slika 7) ekstrakta pigmenta iz *Vibrio* sp. v acettonu spreminjata s spreminjanjem pH, kar se sklada z ugotovitvami Hearna in sodelavcev (1968), Rizza in sodelavcev (1999) ter Melvina in sodelavcev (2002). Absorpcijski spektri ekstrakta pigmenta v acettonu pri različnih pH so podobni titracijskim krivuljam sintetičnega prodigiozina v acetonitrilu in vodi (1:1(V/V)) (Melvin in sod., 2002). Vendar se ne ujemajo popolnoma z absorpcijskimi spektri ekstrakta pigmenta v acettonu iz bakterije *Serratia marcescens* (Priloga E4). Absorpcijska maksimuma (A_{\max}) ekstrakta pigmenta iz bakterije *Serratia marcescens* sta tako v kislem (535 nm), kot alkalnem (465 nm) različna od maksimumov ekstrakta pigmenta iz *Vibrio* sp. Tudi titracijske krivulje se med seboj razlikujejo (Priloga E4). Razlikujeta se tudi pKa vrednosti. Medtem, ko je pKa ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. $7,97 \pm 0,04$, je pKa ekstrakta pigmenta iz bakterije *Serratia marcescens* nižji (~7), saj pride do preskoka barve pri pH nekje med 6,88 in 7,54.

V kislem acettonu ($\text{pH} < 7,9$) smo določili A_{\max} ekstrakta pigmenta iz *Vibrio* sp. pri valovni dolžini 530 nm. Tako vrednost so določili tudi Alihosseini in sodelavci (2008) za prodigiozin v metanolu pri pH 3. Vendar pa v objavah naletimo na različne vrednosti A_{\max} za prodigiozin v kislem mediju. Nekateri avtorji navajajo, da je A_{\max} prodigiozina v kisli mešanici acetonitrila in vode (1:1 (V/V)) pri 533 nm (Melvin in sod., 2002; La in sod., 2007). Drugi ga navajajo pri 535 nm (Williams in sod., 1956; Lewis in Corpe, 1963; Allen E.G., 1967). Hubbard in Rimington (1950) navajata, da je v 85 % etanolu pri valovni dolžini med 535 in 540 nm. Po drugi strani avtorji navajajo A_{\max} prodigiozina v kislem pri enaki valovni dolžini v različnih ekstrakcijskih medijih, tako da le različni mediji verjetno niso razlog za različne rezultate. Williams s sodelavci (1956) ter Lewis in Corpe (1963) navajajo, da je maksimum prodigiozina pri 535 nm v kislem absolutnem etanolu, medtem ko je Allen E.G. (1967) isti A_{\max} dobil v mešanici acetona in vode. Tako kažejo tudi naši rezultati, saj smo izmerili A_{\max} ekstrakta pigmenta iz *Vibrio* sp. v kislem pri enaki valovni dolžini tako v 7 % etanolu (Priloga E3), kot v acettonu (Slika 6), ne glede na to, da se absorpcijska spektra ekstrakta pigmenta v teh dveh ekstrakcijskih medijih razlikujeta. Vzrok te razlike je verjetno različna topnost ekstrakta pigmenta v medijih, saj vsebuje 7% etanol velik delež vode, medtem ko je acetton povsem nepolaren.

V acetonu z višjimi pH vrednostmi je ekstrakt pigmenta iz *Vibrio* sp. največ svetlobe absorbiral pri 460 nm. Tudi to se ne ujema s podatki iz objav, kjer najdemo maksimum v alkalnem v acetonitrilu in vodi (1:1 (V/V)) pri 486 nm (Melvin in sod., 2002; La in sod., 2007), medtem ko večinoma navajajo, da je pri 470 nm (Williams in sod., 1956; Hubbard in Rimington, 1950; Lewis in Corpe, 1963). Vse slednje navedbe so za prodigiozin v absolutnem etanolu. Ti rezultati nakazujejo, da gre v našem primeru zelo verjetno za pigment z drugačno kemijo skozi strukturo. Ker je za bakterijo *Serratia marcescens* znano, da sintetizira prodigiozin (Gerber, 1974; Bennett in Bentley, 2000; Williamson in sod., 2006) lahko glede na razlike zaključimo, da pigment iz *Vibrio* sp. ni prodigiozin, temveč prodigiozinu podoben pigment.

Do spremembe barve ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. pride nekje med pH 7,9 in 8,3. Vzrok bi lahko bila sprememba konformacije pigmenta zaradi protonacije (Rizzo in sod., 1999). Določili smo tudi pKa pigmenta v acetonu pri $7,97 \pm 0,04$, kar sovpada s spoznanji La in sodelavcev (2007), ki navajajo da je pKa prodigiozina v raztopini acetonitrila in vode (1:1) 7,98.

5.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKTA PIGMENTA

Ker nimamo podatkov o čistosti pigmenta, govorimo o protibakterijskemu delovanju ekstrakta pigmenta. Da protibakterijski učinek lahko pripisujemo pigmentu potrjujejo rezultati, ki so pokazali, da mutanti, ki ne producirata pigmenta, oziroma ga producirata zelo malo nimata skoraj nobenega protimikrobnega vpliva na morski izolat 5A, na katerega je ekstrakt divjega tipa od vseh testiranih bakterijskih sevov vplival najmočneje in pri katerem smo določili najnižjo MIC₅₀ ($0,29 \pm 0,01 \mu\text{g/l}$).

Ekstrakt pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. ima širok spekter protimikrobnega delovanja, saj deluje na različne po Gramu pozitivne in negativne bakterije. Protibakterijsko delovanje smo zaznali tako pri po Gramu negativnih bakterijah, *Escherichia coli* in *Salmonella typhimurium*, ki spadata v bakterijsko družino Enterobacteriaceae med γ-Proteobakterije, kot tudi pri po Gramu pozitivnih bakterijah, *Micrococcus luteus*, ki spada v deblo Actinobacteria, ter *Staphylococcus epidermidis* in *Bacillus subtilis*, ki spadata med bacile v deblo Firmicutes.

Kot pričakovano je ekstrakt protibakterijsko deloval na morske izolate 2B, 5A, 5C, 5D in bakterijo *Pseudoalteromonas* sp., saj so ti sevi izolirani iz istega okolja kot bakterija *Vibrio* sp. in bi produkcija pigmenta produkcijskemu sevu lahko ponujala prednost pri tekmovanju za hranila in prostor v določeni ekološki niši.

Ekstrakt pigmenta ni oviral rasti produkcijskega seva, prav tako pa ni deloval proti bakteriji *Serratia marcescens*, ki sintetizira prodigiozin. Ekstrakt ni imel vpliva na preiskovane seve iz rodu *Pseudomonas*, razen *Pseudomonas stutzeri*. Kar bi lahko pojasnili z raziskavo, v kateri navajajo, da so tudi pri bakteriji iz rodu *Pseudomonas*, ki prav tako spada med γ -Proteobakterije ekstrahirali prodigiozin in njegove homologe (Gandhi in sod., 1973). Prav tako so rezultati skladni z objavo, kjer Gerber (1971) navaja, da prodigiozin tudi pri visokih koncentracijah (50 µg/ml) ne vpliva na *Pseudomonas aeruginosa*. Pri sicer višji koncentraciji je ekstrakt pigmenta deloval proti mutantama *Vibrio* sp. Pri mutanti B, ki ne producira rdečega pigmenta od mutante R, smo določili tudi nižjo MIC₅₀ kot pri slednji. Rezultati nakazujejo povezavo med rezistenco in sintezo pigmenta.

V primerjavi z delovanjem antibiotika kloramfenikola, pri efektivni koncentraciji (20 mg/l), na 5A, je ekstrakt že pri koncentraciji 1,15 ± 0,07 mg/l povzročil znižanje OD₆₅₀. Mehanizma delovanja kloramfenikola in estraka pigmenta iz *Vibrio* sp. sta verjetno različna. Ekstrakt pigmenta je imel pri nižji koncentraciji v primerjavi s kloramfenikolom močnejši vpliv na sev 5A. Medtem ko je kloramfenikol na sev 5A deloval bakteristatično, je ekstrakt pigmenta verjetno liziral celice. Kloramfenikol prepreči sintezo proteinov v bakterijskih celicah tako, da se veže na 23S rRNA 50S podenote ribosoma (Marconi in sod., 1990) in preprečuje nastajanje peptidnih vezi (Gale in Folkes, 1953). Rast bakterij se ustavi, zato se OD₆₅₀ ne spreminja več. Po dodatku ekstrakta k sevu 5A, je OD₆₅₀ pričela padati, kar kaže na propad celic. Čeprav je bila koncentracija ekstrakta v tem eksperimentu relativno visoka, smo baktericidno delovanje proti 5A zaznali tudi pri zelo nizkih koncentracijah (0,53 ± 0,03 µg/l) pri testu z mikrotiterskimi ploščami.

5.3 ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE PRI *Vibrio* sp.

Mutanti *Vibrio* sp., ki smo jih uporabili za raziskavo imata okvaro v sintezi rdečega pigmenta. Mutanta B, ki smo jo pridobili s staranjem kulture, ne sintetizira rdečega pigmenta, medtem ko ga mutanta R, ki smo jo pridobili z UV mutagenezo, sintetizira zelo malo. Vzroki za nesposobnost sinteze rdečega pigmenta, v obsegu, kot ga je zmožen sintetizirati divji tip, so lahko številni. Mutanti, bi lahko imeli okvarjenega katerega koli ali več različnih genov potrebnih za sintezo pigmenta. Lahko bi imeli okvaro v primarnem metabolizmu, na primer v biosintezi gradnikov pigmenta, kot so verjetno aminokisline prolin, serin, alanin in glicin. Slednja možnost ni verjetna, saj sta obe mutanti prototrofa, ker rasteta v minimalnem mediju, brez dodanih aminokislín. Na razpolago ostajajo preproste razlage, ki bi lahko pojasnile komplementacijo mutacije zgolj z rastjo v bližini divjega tipa ali druge mutante. Mutanti imata lahko okvaro v sintezi enega od končnih prekurzorjev MAP ali MBC, v zadnji stopnji sinteze pigmenta – kondenzaciji MAP in MBC, v kolikor sinteza poteka enako kot pri drugih prodigininah, ali v regulaciji sinteze pigmenta – sintezi signalnih molekul.

Znano je, da je zaznavanje celične gostote pri bakterijah iz rodu *Vibrio* pomemben mehanizem regulacije (Bassler in sod., 1994a; Miller in sod., 2002; Coulthurst in sod., 2004). Poleg tega so pokazali, da je produkcija prodigiozina pri bakteriji *Serratia marcescens* regulirana preko tega mehanizma (Thomson in sod., 2000; Fineran in sod., 2005). Zato bi bilo možno, da je tako tudi pri bakteriji *Vibrio* sp. Enostavna razlaga rezultatov bi bila, da mutanta R ni sposobna sintetizirati signalnih molekul, ki so vpletene v zaznavanje celične gostote, in te molekule zazna v okolju v katerega jih sprošča divji tip in se nanje odzove s produkcijo pigmenta, saj se mutanta R na plošči, ko raste v bližini divjega tipa, močneje obarva.

Dodatek izrabljenega gojišča divjega tipa je v celicah mutante R povečal vsebnost pigmenta za okoli 30 krat v primerjavi z vsebnostjo pigmenta v celicah mutante R, ki je rastla v svežem gojišču. Kljub temu je vsebnost pigmenta še zmeraj več kot 10 krat manjša od vsebnosti pigmenta pri divjem tipu. Da se po dodatku signalnih molekul k mutanti, ki jih ni sposobna sintetizirati, ekspresijski profil ne obnovi popolnoma, navajajo tudi Kendall in sodelavci (2007). Absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta, ki pri mutanti R nastane zaradi dodatka izrabljenega gojišča divjega tipa, se v acetonu ujema z absorpcijskim spektrom ekstrakta pigmenta divjega tipa v acetonu (Priloga E1).

Zanimivo je, da se mutanta B pod vplivom zunajceličnih molekul divjega tipa na plošči ne obarva. Obarvala se je na plošči v bližini mutante R in bakterije *Serratia marcescens*. V tekočem gojišču z dodatkom izrabljenega gojišča mutante R se ni obarvala, kar ni skladno z rezultati na ploščah. Ena od možnih razlag je ta, da je bila v tekočem gojišču koncentracija snovi, ki so inducirale sintezo pigmenta na trdnem gojišču manjša. Kljub temu, da je bil čas inkubacije primerljiv, pride na plošči lokalno do višje gostote celic kot v tekočem gojišču, kjer je rast enakomerna zaradi stresanja, kar bi lahko pojasnilo razliko v koncentraciji signalnih molekul in molekul, katerih sinteza je regulirana z zaznavanjem celične gostote.

Ob dodatku izrabljenega gojišča divjega seva h kulturi mutante B, se produkcija pigmenta na g suhe snovi sicer ne spremeni signifikantno, vendar pa je absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta podoben absorpcijskemu spektru rdečega pigmenta divjega tipa (Priloga E2). S prostim očesom spremembe barve nismo zaznali. Ker so bili ekstrakti 10 krat koncentrirani, to pomeni, da je količina novonastalega pigmenta po dodatku izrabljenega gojišča divjega seva pri mutanti B zelo nizka. Tako je absorpcijski spekter, ki smo ga dobli pri muranti B v gojišču z dodanim izrabljenim gojiščem divjega seva, verjetno posledica pigmenta divjega tipa, ki je že bil prisoten v izrabljenem gojišču. Podobno razlago lahko ponudimo za spremembo absorpcijskega spektra ekstrakta pigmenta iz mutante B (Priloga E2), ki je rasla v prisornosti izrabljenega gojišča mutante R.

Glede na to, da divji tip ne inducira sinteze pigmenta pri mutanti B, pri tej mutanti verjetno ne gre le za okvaro v sintezi signalnih molekul. Možno je, da je okvara v eni od poti sinteze prekurzorjev pigmenta (MAP in MBC), ki jih je v okolju divjega tipa manj ali jih ni, saj se ne akumulirajo temveč se hitro pretvorijo v prodigiozin. Omenjenih prekurzorjev je lahko več v okolju mutante R, ki lahko inducirajo sintezo barvila v B mutanti. Dauenhauer in sodelavci (1984) navajajo, da rekombinantne bakterije *Escherichia coli*, v katere so klonirali gene za sintezo prodigiozina iz *Serratia marcescens*, prodigiozina največkrat niso sintetizirale. Pri nekaterih rekombinantnih sevih so produkcijo prodigiozina inducirali tako, da so jih nacepili na plošče z gojiščem, ki je vsebovalo prekurzor MAP, MBC ali oba. Našli so številne mutante *Serratia marcescens*, ki niso bile sposobne sinteze prodigiozina in so imele okvare v sintezi MAP ali MBC. Avtorja navajata tudi, da prekurzorja MAP in MBC, ki ju sintetizirajo različni sevi *Serratia marcescens*, lahko prehajata v gojišče.

Rezultati kažejo, da mutanti R in B potrebujeta za produkcijo pigmenta različne stimulante. Medtem ko ustrezne molekule za indukcijo sinteze pigmenta mutanta R pridobi v okolju v katerem raste divji sev *Vibrio* sp., potrebuje mutanta B stimulante, ki jih dobi iz okolja mutante R ali bakterije *Serratia marcescens* ne more pa jih pridobiti iz gojišča v katerem raste divji sev *Vibrio* sp.

Bakterija *Escherichia coli* in sev 5A nista vplivali na obarvanost nobene od mutant, kar kaže na to da signalne molekule potrebne za indukcijo sinteze pri mutantah najbrž niso AI-2, ki jih sintetizira več različnih bakterij, med katerimi je tudi bakterija *Escherichia coli* (Schauder in sod., 2001).

Možno je, da je pri ponovni pigmentaciji mutant vpletenih več različnih signalnih molekul, kot jih je pri zaznavanju celične gostote drugih vrst iz rodu *Vibrio* (Bassler in sod., 1994a; Miller in sod., 2002). Mutanta R, ki sintetizira nekaj pigmenta, morda ni sposobna sintetizirati signalnih molekul, ki so v večji meri odgovorne za regulacijo sinteze pigmenta, producira pa drug signal, ki je vzrok za to da se sintetizira nekaj pigmenta. To možnost potrjujejo rezultati avtorjev Thomson in sodelavcev (2000), ki so ugotovili, da mutanta *Serratia marcescens*, okvarjena v sintezi HHL in BHL, producira več pigmenta ob dodatku BHL kot HHL, tudi pri visokih koncentracijah.

Če bi se izkazalo, da gre pri mutanti R za okvaro v sintezi signalnih molekul, bi jo lahko uporabili kot biosenzor za detekcijo teh, kakor so uporabili SmaI^r mutanto bakterije *Serratia marcescens* (Thomson in sod., 2000). Zato bi bilo potrebno ugotoviti katere signalne molekule inducirajo sintezo pigmenta pri *Vibrio* sp. in koliko različnih signalnih molekul je sposobnih indukcije.

5.4 SKLEPI

Z našimi eksperimenti smo potrdili, da:

- pH vpliva na absorpcijski spekter in barvo ekstrakta pigmenta v acetonu
- pri nizkem pH je pigment v acetonu rožnat in ima A_{\max} pri 530 nm
- pri visokem pH je pigment v acetonu rumen in ima A_{\max} pri 460 nm
- pKa pigmenta v acetonu je pri $7,97 \pm 0,04$
- pigment iz bakterijie *Vibrio* sp. ni prodigiozin temveč prodigiozинu podobna molekula
- ekstrakt pigmenta deluje protibakterijsko proti morskim izolatom 2B, 5A, 5C, 5D, bakteriji *Pseudoalteromonas* sp. ter bakterijam *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas stutzeri* in mutantama bakterije *Vibrio* sp.
- Pri testiranih koncentracijah ekstrakt pigmenta nima vpliva na produkcijski sev *Vibrio* sp. in bakterije *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*.
- Molekule, ki so prisotne v okolju divjega tipa *Vibrio* sp., inducirajo sintezo pigmenta in za okoli 30 krat povečajo vsebnost pigmenta na g suhe snovi bakterijskih celic pri mutanti R.
- Molekule, prisotne v okolju mutante R in bakterije *Serratia marcescens*, inducirajo sintezo pigmenta pri mutanti B na plošči.

6 POVZETEK

Prodigiozin in sorodni pigmenti so vzbujali pozornost ljudi že v preteklosti in so bili odgovorni za številne »čudeže« (Bennett in Bentley, 2000). Danes se jim znanstveniki posvečajo predvsem zaradi njihovih imunosupresivnih (Pérez-Tomás in sod., 2003) in protitumorskih (Yamamoto C. in sod., 1999) učinkov. Prodigiozini nimajo definirane fiziološke funkcije pri produkcijskih sevih. Poznano je tudi njihovo delovanje proti bakterijam, protozojem in patogenim glivam (Fürstner, 2003). Rdeči pigment, prodigiozin, je eden izmed prodigininov, ki jih proizvajajo nekatere bakterije vrste *Serratia*, aktinomicete in druge. Prodigiozin je rožnato-rdeč v kislem okolju z A_{max} pri valovni dolžini med 533 in 535 nm, medtem ko je v alkalnem obarvan rumeno in ima A_{max} pri približno 470 nm (Williams in sod., 1956; Lewis in Corpe, 1963; Melvin in sod., 2002; La in sod., 2007). Sinteza prodigozina pri bakteriji *Serratia marcescens* je pod kontrolo mehanizma zaznavanja celične gostote (Thomson in sod., 2000; Fineran in sod., 2005), signalne molekule pa so AHL (Thomson in sod., 2000; Slater in sod., 2003; Fineran in sod., 2005).

V diplomskem delu smo preučevali rdeč pigment iz bakterije *Vibrio* sp., izolirane iz priobalnih voda severnega Jadranskega morja. Ugotavliali smo vpliv pH na barvo in absorpcijski spekter, protibakterijsko aktivnost ekstrakta pigmenta ter povezavo med zaznavanjem celične gostote in produkcijo pigmenta. Za ugotavljanje vpliva pH smo ekstrahirali pigment z acetonom, ter določili absorpcijske spektre ekstrakta pigmenta pri različnih pH. Protibakterijsko aktivnost smo določali na agarskih ploščah in z merjenjem spremembe OD₆₅₀ kultur v tekočem gojišču ob dodatku ekstrakta pigmenta. Da bi ugotovili, ali je sinteza pigmenta regulirana z zaznavanja celične gostote, smo uporabili mutanti *Vibrio* sp., ki ne producirata rdečega pigmenta, oziroma ga producirata zelo malo. Omogočili smo interakcijo zunajceličnih signalnih molekul, ki jih v okolje sproščajo nekatere bakterije, z mutantama v tekočem gojišču in na plošči ter opazovali obarvanost.

Ugotovili smo, da pigment iz bakterije *Vibrio* sp. ni prodigiozin, temveč prodigiozinu sorodna molekula. Barva in absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta iz *Vibrio* sp. se spremenjata s pH, iz rožnato-rdeče barve (A_{max} 530 nm) v kislem, preko oranžne v rumeno (A_{max} 460 nm) v alkalnem, s pKa pri približno 8. Pri ekstraktu pigmenta smo, kot je znano za prodiginine, pokazali tudi širok spekter protibakterijskega delovanja, proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam. Rezultati kažejo na to, da je sinteza pigmenta pri *Vibrio* sp. regulirana tudi preko zaznavanja celične gostote. Najverjetnejše je v regulacijo sinteze vpletenih več regulacijskih sistemov, ki inducirajo sintezo pigmenta v prisotnosti še neznanih zunajceličnih signalov. Mutanta R se obarva v prisotnosti molekul, verjetno signalnih molekul, ki so prisotne v okolju divjega tipa. Mutanta B pa se obarva v prisotnosti mutante R in bakterije *Serratia marcescens* in ima verjetno drugačno ali dodatno okvaro.

7 VIRI

- Alihosseini F., Ju K., Lango J., Hammock B.D., Sun G. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology Progress*, 24: 742-747.
- Allen E.G. 1967. Conditions of the colour change of prodigioain. *Nature*, 216, 2: 929-931.
- 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.
- Aoust J.Y.D., Gerber N.N. 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. *Journal of Bacteriology*, 118, 2: 756-757.
- Azambuja P., Feder D., Garcia E.S. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 107: 89-96.
- Azuma T., Watanabe N., Yagisawa H., Hirata H., Iwamura M., Kobayashi Y. 2000. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology*, 46: 29–37.
- Bassler B.L., Greenberg E.P., Stevens A.M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 179, 12: 4043–4045.
- Bassler B.L., Wright M., Silverman M.R. 1994a. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology*, 13, 2: 273–286.
- Bassler B.L., Wright M., Silverman M.R. 1994b. Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 12, 3: 403–412.
- Bennett 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 nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 2: 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.
- Casey J.T., O'Cleirigh C., Walsh P. K., O'Shea D. G. 2004. Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 3: 327-334.
- Castro A. J. 1967. Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature*, 213: 903-904.
- Castro A.J., Gale G.R., Means G.E., Tertzakian G. 1967. Antimicrobial properties of pyrrole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 10: 29-32.
- Cohen-Bazire G., Pfennig N., Kunisawa R. 1964. The fine structure of green bacteria. *Journal of Cell Biology*, 22: 207-225.
- Coulthurst S.J., Kurz C.L., Salmond G.P.C. 2004. *luxS* mutants of *Serratia* defective in autoinducer-2-dependent ‘quorum sensing’ show strain-dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin. *Microbiology*, 150: 1901–1910.
- D'Alessio R., Bargiotti A., Carlini O., Colotta F., Ferrari M., Gnocchi P., Isetta A., Mongelli N., Motta P., Rossi A., Rossi M., Tibolla M., Vanotti E. 2000. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 13: 2557 – 2565.
- 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: 43-76.
- Danevčič T., Rilfors 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8.
- Dauenhauer S.A., Hull R.A., Williams R.P. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Serratia marcescens* genes encoding prodigiosin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 158, 3: 1128-32.

- Fineran P.C., Slater H., Everson L., Hughes K., Salmond G.P.C. 2005. Biosynthesis of tripyrrole and β -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Molecular Microbiology*, 56, 6: 1495–1517.
- Fürstner A. 2003. Chemistry and biology of rosephilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. *Angewandte Chemie: International Edition*, 42, 31: 3582–3603.
- Gale E.F., Folkes J.P. 1953. The assimilation of amino-acids by bacteria. 15. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal*, 53, 3: 493–498.
- Gandhi N.M., Nazareth J., Divekar P.V., Kohl H., De Souza N.J. 1973. Magnesidin, a novel magnesium-containing antibiotic. *Journal of Antibiotics*, 26, 12: 797-798.
- Geisenberger O. 2000. Nachweis, Verbreitung und Bedeutung von N-Acyl-L-homoserinlactonen bei Gram-negativen Bakterien. Doktor dissertation. München, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie.: 93.
- Gerber N.N. 1971. Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri*. *Journal of Antibiotics*, 24, 9: 636-640.
- Gerber N.N. 1975. Prodigiosin-like pigments. CRC Critical Reviews in Microbiology, 3, 4: 469-485.
- 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: 136–145.
- Goldschmidt M.C., Williams R.P. 1968. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *Journal of Bacteriology*, 96, 3: 609–616.
- Green D.A., Rappaport D.A., Williams R.P. 1956. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. II. Characterization of the blue and the combined red pigments of prodigiosin. *Journal of Bacteriology*, 72, 4: 483–487.

- Griffiths M., Sistrom, W., Cohen-Bazire, G, Stanier, R.Y. 1955. Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, 176: 1211-1214.
- Hearn W.R., Medina-Castro J., Elson M.K. 1968. Colour change of prodigiosin. *Nature*, 220: 170-171.
- Hearn W.R., Elson M.K., Williams R.H., Medina-Castro J. 1970. Prodigiosene [5-(2-pyrryl)-2,2'-dipyrrylmethene] and some substituted prodigiosenes. *Journal of Organic Chemistry*, 35, 1: 142-146.
- Henke J.M., Bassler B.L. 2004a. Quorum sensing regulates type iii secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186, 12: 3794–3805.
- Henke J.M., Bassler B.L. 2004b. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 186, 20: 6902–6914.
- Hood D.W., Heidstra H., Swoboda U.K., Hudson D.A. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Interaction between primary and secondary metabolism – a review. *Gene*, 115, 1-2: 5-12.
- Hubbard R., Rimington C. 1950. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochemical Journal*, 46, 2: 220–225.
- Isaka M., Jaturapat A., Kramyu J., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y. 2002. Potent *in vitro* antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 4: 1112–1113.
- Jeong H., Yim J.H., Lee C., Choi S., Park Y.K., Yoon S.H., Hur C., Kang H., Kim D., Lee H.H., Park K.H., Park S., Park H., Lee H.K., Oh T.K., Kim J.F. 2005. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Research*, 33, 22: 7066-7073.
- Jobling M.G., Holmes R.K. 1997. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Molecular Microbiology*, 26, 5: 1023–1034.
- Kataoka T., Muroi M., Ohkuma S., Waritani T., Magae J., Takatsuki A., Kondo S., Yamasaki M., Nagai K. 1995. Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H+-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing. *FEBS Letters*, 359: 53-59.

- Kendall M.M., Rasko D.A., Sperandio V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 75, 10: 4875–4884.
- Kim D., Jihyun F.K., Joung H.Y., Soon-Kyeong K., Choong H.L., Hong K.L. 2008. Red to red - the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 1-9.
- Kobayashi N., Ichikawa Y. 1989. A protein associated with prodigiosin formation in *Serratia marcescens*. *Microbiology and Immunology*, 33, 4: 257-263.
- Konno H., Matsuya H., Okamoto M., Sato T., Tanaka Y., Yokoyama K., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H., Ohkuma S. 1998. Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: evidence for their H⁺/Cl⁻ symport activity. *Journal of Biochemistry*, 124, 3: 547-556.
- Konzen M., De Marco D., Cordova C.A.S., Vieira T.O., Antonio R.V., Creczynski-Pasa T.B. 2006. Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 8307–8313.
- Kumar N.R., Nair S. 2007. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2241–2246.
- La J.Q.-H., Michaelides A.A., Manderville R.A. 2007. Tautomeric equilibria in phenolic a-ring derivates of prodigiosin natural products. *Journal of Physical Chemistry*, 111: 11803-11811.
- Lewis S.M., Corpe W.A. 1963. Prodigiosin-producing bacteria from marine sources. *Applied Microbiology*, 12, 1: 13-7.
- Marconi R.T., Lodmell J.S., Hill W.E. 1990. Identification of a rRNA/chloramphenicol interaction site within the peptidyltransferase center of the 50S subunit of the *Escherichia coli* ribosome. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 14: 7894-7899.
- Margalith P.Z. 1992. Pigment microbiology. 1st ed. London, Chapman & Hall: 156 str.
- Martinelli D., Grossmann G., Séquin U., Brandl H., Bachofen R. 2004. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology*, 4: 25-35.

- Mavrodi D.V., Blankenfeldt W., Thomashow L.S. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. Annual Review of Phytopathology, 44: 417-45.
- McClean K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology, 143: 3703-3711.
- McNab R., Lamont R.J. 2003. Microbial dinner-party conversations: the role of LuxS in interspecies communication. Journal of Medical Microbiology, 52: 541–545.
- Melvin M.S., Ferguson D.C., Lindquist N., Manderville R.A. 1999. DNA binding by 4-methoxypyrrolic natural products. Preference for intercalation at AT sites by tambjamine E and prodigiosin. Journal of Organic Chemistry, 64, 18: 6861-6869.
- Melvin M.S., Tomlinson J.T., Park G., Day C.S., Saluta G.R., Kucera G.L., Manderville R.A. 2002. Influence of the a-ring on the proton affinity and anticancer properties of the prodigiosins. Chemical Research in Toxicology, 15, 5: 734-741.
- Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. 2002. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. Cell, 110: 303–314.
- Morrison D. A. 1966. Prodigiosin synthesis in mutants of *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology, 91, 4: 1599–1604.
- Odić D., Turk V., Stopar D. 2007. Environmental stress determines the quality of bacterial lysate and its utilization efficency in simple microbial loop. Microbial Ecology, 53: 639-649.
- Ohkuma S., Sato T., Okamoto M., Matsuya H., Arai K., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H. 1998. Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H⁺/Cl⁻ symport. Biochemical Journal, 334: 731-741.
- Pérez-Tomás R., Montaner B., Llagostera E., Soto-Cerrato V. 2003. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer. Biochemical Pharmacology, 66: 1447–1452
- Purkayasha M., Williams R.P. 1960. Association of pigment with the cell envelope of *Serratia marcescens* (*Chromobacterium prodigiosum*). Nature, 187: 349-350.

- Qadri S.M.H., Williams R.P. 1971. Incorporation of methionine into prodigiosin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 230, 1: 181-184.
- Rizzo V., Morelli A., Pincioli V., Sciangula D., D'Alessio R. 1999. Equilibrium and kinetics of rotamer interconversion in immunosuppressant prodigiosin derivatives in solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 1: 73-78.
- Rosenberg M., Blumberger Y., Bar-Ness R., Rubinstein E., Mazor Y. 1986. Cell surface hydrophobicity of pigmented and nonpigmented clinical *Serratia marcescens* strains. *Infection and Immunity*, 51, 3: 932-935.
- Ryazantseva I.N., Andreyeva I.N., Klementyeva G.S., Ogorodnikova T.I., Petrov V.Y. 1995. Pigment-dependent light influence on the energetics of *Serratia marcescens*. *Thermochimica Acta*, 251: 63-67.
- Sato T., Konno H., Tanaka Y., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H., Ohkuma S. 1998. Prodigiosins as a new group of H^+/Cl^- symporters that uncouple proton translocators. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34: 21455-21462.
- Schauder S., Shokat K., Surette M.G., Bassler B.L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41, 2: 463-476.
- Seganish J.L., Davis J.T. 2005. Prodigiosin is a chloride carrier that can function as an anion exchanger. *Chemical Communications*, 46: 5781-5783.
- Shieh W.Y., Chen Y., Chaw S., Chiu H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 479-484.
- Slater H., Crow M., Everson L., Salmond G.P.C. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Molecular Microbiology*, 47, 2: 303-320.
- Sobin B., Stahly G.L. 1941. The isolation and absorption spectrum maxima of bacterial carotenoid pigments. *Journal of Bacteriology*, 44, 3: 265-276.
- Starč N. 2007. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije.: 32-32.

- Stopar D., Černe A., Žigman M., Poljšak-Prijatelj M., Turk V. 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 47: 1-8.
- Stopar D., Trček T., Štrancar J. 2002. Electron paramagnetic resonance characterization of the exopolysaccharide layer produced by bacteria. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7, 1: 167-169.
- Syzdek L.D. 1985. Influence of *Serratia marcescens* pigmentation on cell concentrations in aerosols produced by bursting bubbles. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1: 173-178.
- Thomson N.R., Cox A., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P., Salmond G.P.C. 1997. The Rap and Hor proteins of *Erwinia*, *Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*, 26, 03: 531–544.
- Thomson N.R., Crow M.A., McGowan S.J., Cox A., Salmond G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Molecular Microbiology*, 36, 3: 539-556.
- Turcotte C., Lacroix C., Kheadr E., Grignon L., Fliss I. 2004. A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 283– 293.
- Waters C.M., Bassler B.L. 2006. The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes & Development*, 20: 2754-2767.
- Williams R.P., Green J.A., Rappaport D.A. 1956. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. I. Spectral and paper chromatographic properties of prodigiosin. *Journal of Bacteriology*, 71, 1:115-120.
- Williams R.P. 1973. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 25, 3: 396-402.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J. Salmond G.P.C 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodigionines. *Nature Reviews Microbiology*, 56, 4: 887-899.

- Williamson N.R., Simonsen H.T., Ahmed R.A.A., Goldet G., Slater H., Woodley L., Leeper F.J., Salmond G. P.C. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylpyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 56, 4: 971–989.
- Winzer K., Hardie K.R., Burgess N., Doherty N., Kirke D., Holden M.T.G., Linforth R., Cornell K.A., Taylor A.J., Hill P.J., Williams P. 2002. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology*, 148: 909–922.
- Xavier K.B., Bassler B.L. 2004. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 2: 191-197.
- Yamamoto C., Takemoto H., Kuno K., Yamamoto D., Tsubura A., Kamata K., Hirata H., Yamamoto A., Kano H., Seki T., Inoue K. 1999. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H₁/Cl₂ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology*, 30, 4: 894-902.
- Yamamoto D., Uemura Y., Tanaka K., Nakai K., Yamamoto C., Takemoto H., Kamata K., Hirata H., Hioki K. 2000a. Cycloprodigiosin hydrochloride H⁺/Cl⁻ symporter induces apoptosis and differentiation in HL-60 cells. *International Journal of Cancer*, 88, 1: 121-128.
- Yamamoto D., Kiyozuka Y., Uemura Y., Yamamoto C., Takemoto H., Hirata H., Tanaka K., Hioki K., Tsubura A. 2000b. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 126, 4: 191-197.

ZAHVALA

Za pomoč pri nastanku diplomskega dela se zahvaljujem

prof. dr. Davidu Stoparju, za predloge, nasvete in strokovne popravke, prijaznost, podporo in poslušno uho,

dr. Tjaši Danevčič, za zastavljanje eksperimentov, veliko pomoč pri delu v laboratoriju in nasploh, za prijaznost in čas, strokovne popravke, ter za vse odgovore na moja vprašanja,

Simoni Leskovac za potrpljenje in koristne nasvete,

Nejcu Stariču za pomoč in družbo v laboratoriju,

vsem ostalim iz katedre za Mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, za zabavno, zanimivo in nepozabno študijsko leto,

doc. dr. Hrvoju Petroviču, za recenzijo pisnega izdelka,

vsem članom in predsednici komisije za zagovor diplomske naloge **prof. dr. Ines Mandić Mulec**, za posvečen čas in trud,

in nenazadnje profesorjem in asistentom iz biotehniške fakultete, za znanje, ki so ga delili z menoj.

Zahvaljujem se tudi

mami Nevenki, očetu **Matjažu**, bratu **Jerneju** in ostali družini,

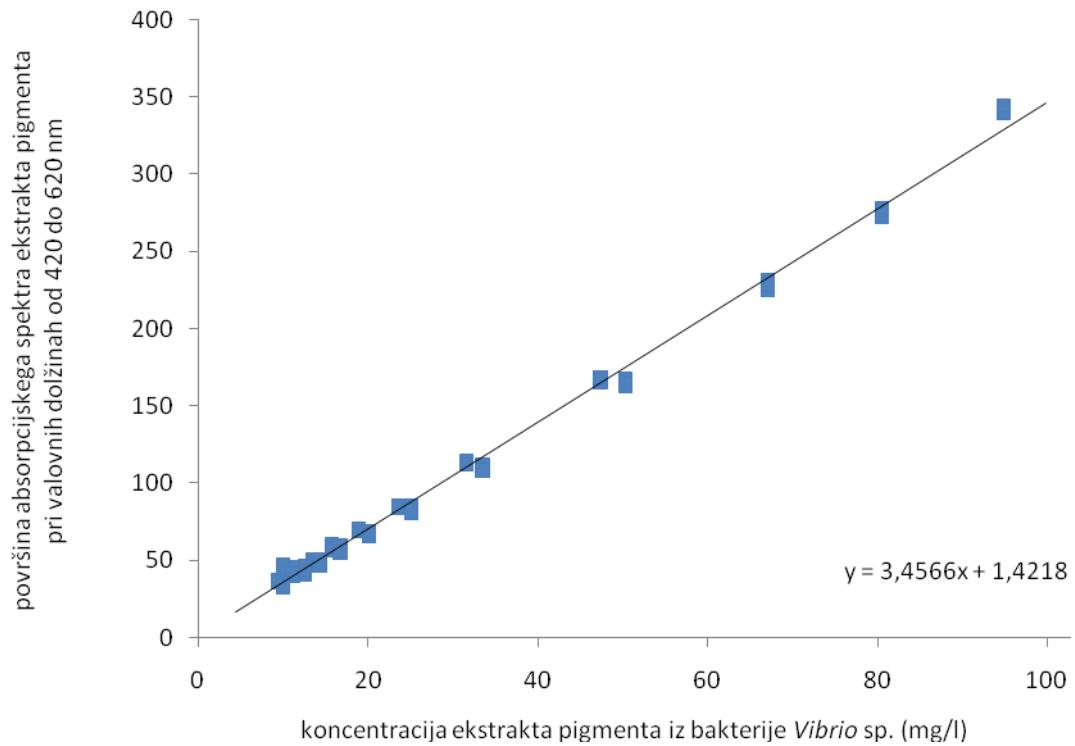
fantu in najboljšemu prijatelju **Roku**,

vsem prijateljem, med njimi pa še posebej **Katji** in **Maji** ;)

Razlogi za zahvale, bi bili preveč obsežni zato:

Hvala vam zato ker ste in za vse kar ste.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja, ki prikazuje povezavo med površino absorpcijskega spektra in koncentracijo ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. v acetolu.

Priloga B1: Absorpcija ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. v acetonu pri valovnih dolžinah 460 in 530 nm pri različnih pH.

pH	A ₄₆₀	σ	A ₅₃₀	σ
2,26	0,27	0,01	2,98	0,03
6	0,35	0,00	2,95	0,05
7,03	0,45	0,01	2,79	0,04
7,47	0,51	0,01	2,75	0,02
7,57	0,80	0,01	2,15	0,01
7,65	0,94	0,01	1,88	0,01
7,91	1,16	0,03	1,51	0,04
8,3	1,33	0,07	1,02	0,08
8,59	1,70	0,02	0,31	0,02
8,66	1,66	0,12	0,26	0,17
9,58	1,75	0,06	0,17	0,08
10,61	1,84	0,01	0,18	0,01
11,49	1,86	0,02	0,14	0,02

Priloga B2: Parametri Boltzmannovega modela krivulje, ki popisuje absorbanco ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. v acetonu pri 460 nm pri različnih pH.

Enačba:	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$	
Chi ² /DoF	0,02	
R ²	0,98	
Parameter	Vrednost	Standardni odklon
A1	0,51	0,05
A2	3,17	0,08
x0	7,96	0,04
dx	0,28	0,03

Priloga B3: Parametri Boltzmannovega modela krivulje, ki popisuje absorbanco ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. v acetonu pri 530 nm pri različnih pH.

Enačba:	$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$	
Chi ² /DoF	0,06	
R ²	0,98	
Parameter	Vrednost	Standardni odklon
A1	4,50	0,15
A2	0,22	0,12
x0	7,97	0,04
dx	0,28	0,03

Priloga C1: **Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na produkcijski sev.**
Ekstrakt pigmenta v 7 % etanolu in 7 % etanol kot kontrolo smo dodali po treh urah inkubacije. Dodali smo 1 % (V/V) ekstrakta pigmenta s koncentracijo $115,0 \pm 6,8$ mg/l, ter enako količino 7 % etanola. P1, P2, P3 so ponovitve, $x\bar{x}$ je povprečje, σ je standardni odklon.

čas (ure)	OD ₆₅₀ Kontrola					OD ₆₅₀ <i>Vibrio</i> sp. + ekstrakt pigmenta				
	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ
0	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,02	0,02	0,02
1	0,02	0,02	0,04	0,03	0,01	0,03	0,04	0,03	0,03	0,00
2	0,09	0,10	0,10	0,10	0,01	0,08	0,09	0,09	0,09	0,00
3	0,28	0,31	0,30	0,30	0,02	0,26	0,29	0,29	0,28	0,02
3,5	0,29	0,34	0,33	0,32	0,02	0,29	0,31	0,31	0,30	0,01
4	0,47	0,46	0,47	0,47	0,01	0,40	0,42	0,42	0,41	0,01
4,5	0,53	0,60	0,62	0,58	0,05	0,51	0,55	0,57	0,54	0,03
5	0,68	0,73	0,72	0,71	0,03	0,64	0,70	0,69	0,68	0,03
5,5	0,83	0,87	0,90	0,87	0,03	0,80	0,87	0,83	0,84	0,03
6	0,91	0,88	0,93	0,91	0,03	0,85	0,91	0,88	0,88	0,03
6,5	0,93	0,92	0,96	0,94	0,02	0,91	0,94	0,94	0,93	0,02
7,5	0,98	0,96	0,98	0,97	0,01	0,96	0,97	0,97	0,97	0,00
8	0,99	0,99	1,00	0,99	0,00	0,99	1,01	0,99	1,00	0,01
8,5	1,02	1,01	1,02	1,02	0,01	1,02	1,01	1,00	1,01	0,01
9,5	1,02	1,03	1,03	1,03	0,00	1,04	1,06	1,05	1,05	0,01
10,5	1,09	1,06	1,05	1,07	0,02	1,09	1,06	1,06	1,07	0,02
11	1,08	1,04	1,05	1,06	0,02	1,09	1,08	1,06	1,08	0,01
12	1,13	1,08	1,06	1,09	0,04	1,13	1,09	1,09	1,11	0,02
25	1,19	1,08	1,09	1,12	0,06	1,14	1,11	1,10	1,12	0,02

Priloga C2: **Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na bakterijo *Escherichia coli***. Ekstrakt pigmenta v 7 % etanolu in 7 % etanol kot kontrolo smo dodali po treh urah inkubacij. Dodali smo 1 % (V/V) ekstrakta pigmenta s koncentracijo 94,0 \pm 8,1 mg/l, ter enako količino 7 % etanola. P1, P2, P3 so ponovitve, $x\bar{x}$ je povprečje, σ je standardni odklon.

čas (ure)	OD ₆₅₀ Kontrola					OD ₆₅₀ <i>E. coli</i> ESH10 K12 + ekstrakt pigmenta				
	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ
0	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	0,01	0,02
1,5	0,04	0,02	0,04	0,03	0,01	0,02	0,05	0,03	0,03	0,01
2	0,10	0,08	0,10	0,09	0,01	0,09	0,10	0,10	0,10	0,00
2,5	0,22	0,22	0,24	0,23	0,01	0,24	0,22	0,21	0,22	0,01
3	0,41	0,38	0,40	0,40	0,02	0,43	0,40	0,41	0,41	0,01
3,5	0,51	0,47	0,53	0,50	0,03	0,48	0,46	0,45	0,46	0,02
4	0,81	0,83	0,80	0,81	0,01	0,65	0,57	0,61	0,61	0,04
4,5	1,08	1,06	1,11	1,08	0,03	0,78	0,70	0,77	0,75	0,04
5	1,25	1,28	1,28	1,27	0,02	0,95	0,88	0,88	0,90	0,04
5,5	1,36	1,42	1,36	1,38	0,04	1,14	1,01	1,08	1,08	0,06
6	1,44	1,48	1,45	1,46	0,03	1,29	1,19	1,21	1,23	0,05
6,5	1,56	1,59	1,53	1,56	0,03	1,37	1,30	1,36	1,34	0,04
7	1,56	1,63	1,55	1,58	0,04	1,45	1,44	1,48	1,45	0,02
24	1,50	1,59	1,54	1,54	0,05	1,61	1,68	1,59	1,63	0,04

Priloga C3: **Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na bakterijo *Bacillus subtilis*.** Ekstrakt pigmenta v 7 % etanolu in 7 % etanol kot kontrolo smo dodali po štirih urah in pol. Dodali smo 1 % (V/V) ekstrakta pigmenta s koncentracijo 94,0 \pm 8,1 mg/l, ter enako količino 7 % etanola. P1, P2, P3 so ponovitve, $x\bar{x}$ je povprečje, σ je standardni odklon.

čas (ure)	OD ₆₅₀ Kontrola					OD ₆₅₀ <i>B. subtilis</i> + ekstrakt pigmenta				
	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ
0	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,04	0,01	0,00	0,02	0,02
1,5	0,00	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,00	0,02	0,02
2	0,00	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01
3	0,03	0,07	0,06	0,05	0,02	0,08	0,06	0,03	0,06	0,03
4	0,17	0,23	0,19	0,20	0,03	0,22	0,21	0,19	0,20	0,02
4,5	0,31	0,39	0,34	0,35	0,04	0,41	0,36	0,37	0,38	0,03
5	0,42	0,54	0,46	0,47	0,06	0,38	0,35	0,34	0,36	0,02
5,5	0,61	0,81	0,67	0,70	0,10	0,36	0,33	0,36	0,35	0,02
6	0,81	0,88	0,86	0,85	0,04	0,34	0,33	0,32	0,33	0,01
6,5	0,93	0,99	0,93	0,95	0,03	0,35	0,34	0,32	0,34	0,01
7	1,04	1,18	1,11	1,11	0,07	0,31	0,32	0,30	0,31	0,01
24	1,44	1,50	1,53	1,49	0,05	0,10	0,06	0,05	0,07	0,03

Priloga C4: Vpliv ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. na morski izolat 5A.
 Ekstrakt pigmenta v 7 % etanolu in 7 % etanol kot kontrolo smo dodali po štirih urah in pol. Dodali smo 1 % (V/V) ekstrakta pigmenta s koncentracijo $114,95 \pm 6,77$ mg/l, ter enako količino 7 % etanola. P1, P2, P3 so ponovitve, $x\bar{x}$ je povprečje, σ je standardni odklon.

ure	OD ₆₅₀ Kontrola					OD ₆₅₀ 5A + ekstrakt pigmenta				
	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ	P1	P2	P3	$x\bar{x}$	σ
0	0,0 6	0,05	0,04	0,05	0,01	0,06	0,07	0,06	0,06	0,00
1	0,0 6	0,05	0,04	0,05	0,01	0,08	0,07	0,06	0,07	0,01
2	0,0 8	0,07	0,06	0,07	0,01	0,08	0,08	0,06	0,07	0,01
3	0,1 5	0,12	0,12	0,13	0,01	0,15	0,14	0,14	0,14	0,01
4	0,2 7	0,26	0,26	0,27	0,01	0,28	0,26	0,27	0,27	0,01
4,5	0,4 0	0,39	0,40	0,40	0,00	0,42	0,40	0,40	0,41	0,01
5	0,4 7	0,47	0,46	0,47	0,01	0,39	0,39	0,38	0,39	0,01
5,5	0,5 9	0,55	0,60	0,58	0,03	0,38	0,36	0,36	0,37	0,01
6	0,6 7	0,65	0,66	0,66	0,01	0,37	0,34	0,35	0,35	0,02
6,5	0,8 1	0,75	0,80	0,79	0,03	0,37	0,33	0,34	0,35	0,02
7,5	0,9 6	0,99	0,98	0,98	0,01	0,35	0,33	0,33	0,34	0,01
8	1,0 7	1,11	1,09	1,09	0,02	0,34	0,32	0,33	0,33	0,01
8,5	1,1 4	1,14	1,15	1,14	0,01	0,34	0,31	0,32	0,33	0,01
9,5	1,2 6	1,26	1,22	1,25	0,02	0,33	0,34	0,32	0,33	0,01
10	1,2 7	1,22	1,26	1,25	0,03	0,34	0,31	0,31	0,32	0,02
10,	1,2	1,27	1,27	1,27	0,00	0,34	0,31	0,32	0,32	0,01

5	7									
11	1,3 2	1,30	1,29	1,30	0,02	0,34	0,31	0,30	0,32	0,02
12	1,3 5	1,35	1,33	1,34	0,01	0,31	0,29	0,28	0,29	0,01
12, 5	1,3 9	1,38	1,35	1,37	0,02	0,31	0,28	0,28	0,29	0,02
13	1,4 1	1,38	1,38	1,39	0,02	0,31	0,28	0,25	0,28	0,03
13, 5	1,4 2	1,40	1,43	1,42	0,02	0,31	0,28	0,25	0,28	0,03
14	1,4 6	1,44	1,44	1,45	0,01	0,30	0,24	0,22	0,26	0,04
14, 5	1,4 9	1,45	1,38	1,44	0,05	0,30	0,24	0,22	0,25	0,04
25	1,1 9	1,08	1,09	1,12	0,06	0,08	0,05	0,04	0,05	0,02

Priloga C5: **Vpliv antibiotika kloramfenikola na morski izolat 5A.** Antibiotik v 96 % etanolu in 96% etanol kot kontrolo smo dodali po štirih urah in pol. Dodali smo 40 µl kloramfenikola (20 mg/l), ter enak volumen 96 % etanola. P1, P2, P3 so ponovitve, x□ je povprečje, σ je standardni odklon.

čas (ure)	OD ₆₅₀ Kontrola				OD ₆₅₀ 5A + kloramfenikol			
	P1	P2	x□	σ	P1	P2	x□	σ
0	0,03	0,03	0,03	0,00	0,05	0,05	0,05	0,01
1	0,04	0,04	0,04	0,00	0,06	0,05	0,06	0,00
2	0,05	0,05	0,05	0,01	0,07	0,07	0,07	0,00
3	0,08	0,12	0,10	0,03	0,13	0,13	0,13	0,01
4	0,16	0,27	0,22	0,07	0,27	0,28	0,27	0,00
4,5	0,25	0,40	0,32	0,11	0,41	0,41	0,41	0,00
5	0,33	0,47	0,40	0,10	0,44	0,45	0,45	0,00

5,5	0,45	0,59	0,52	0,10	0,44	0,45	0,45	0,01
6	0,50	0,66	0,58	0,11	0,45	0,45	0,45	0,00
6,5	0,65	0,78	0,71	0,09	0,48	0,48	0,48	0,01
7,5	0,80	0,98	0,89	0,12	0,51	0,50	0,50	0,00
8	0,88	1,02	0,95	0,10	0,51	0,51	0,51	0,00
8,5	0,95	1,11	1,03	0,11	0,53	0,52	0,52	0,00
9,5	1,08	1,14	1,11	0,05	0,53	0,53	0,53	0,00
10	1,15	1,22	1,18	0,05	0,50	0,52	0,51	0,01
10,5	1,19	1,20	1,20	0,01	0,52	0,50	0,51	0,01
11	1,23	1,22	1,23	0,00	0,51	0,51	0,51	0,00
12	1,26	1,28	1,28	0,02	0,50	0,51	0,51	0,01
12,5	1,34	1,32	1,33	0,02	0,51	0,51	0,51	0,00
13	1,33	1,35	1,34	0,01	0,50	0,53	0,52	0,02
13,5	1,34	1,35	1,35	0,00	0,51	0,52	0,51	0,01
14	1,40	1,35	1,38	0,03	0,51	0,50	0,51	0,01
14,5	1,44	1,39	1,47	0,03	0,51	0,52	0,52	0,00
25	1,61	1,56	1,59	0,03	0,44	0,42	0,43	0,01

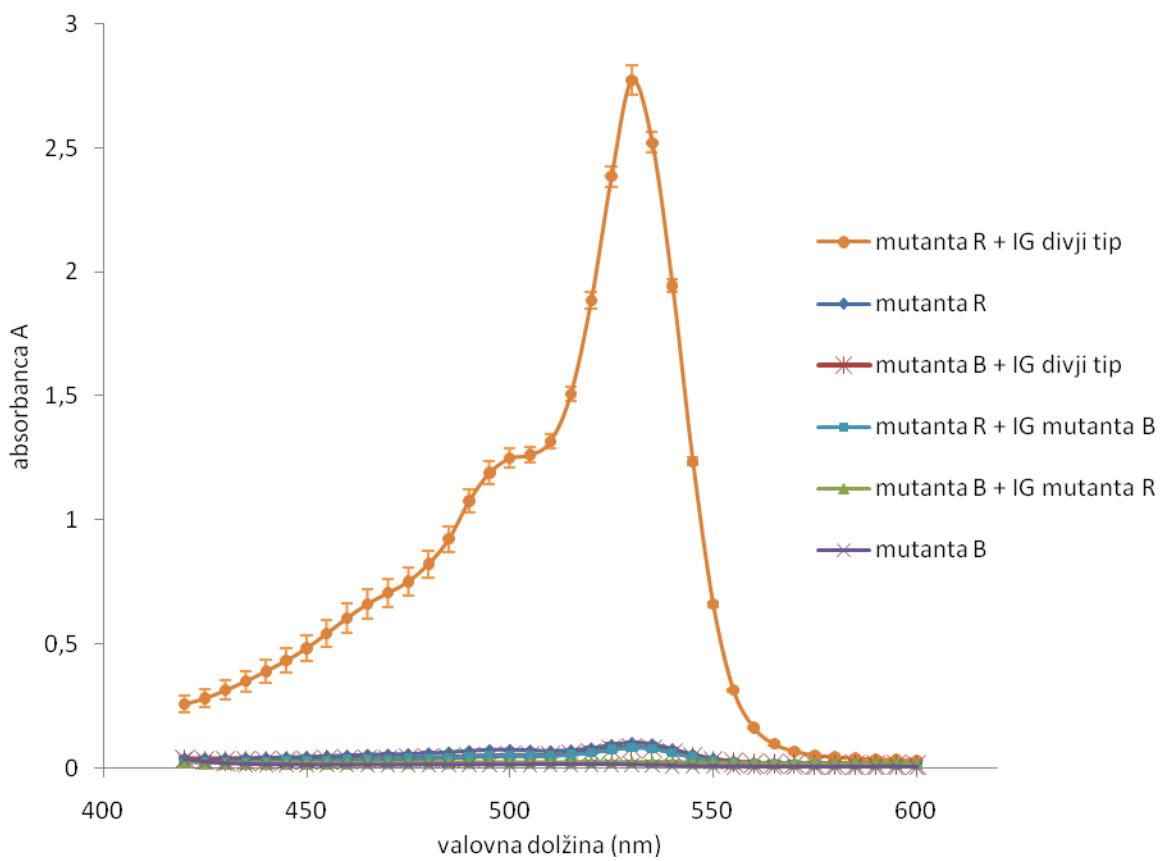
Priloga D1: **MIC₅₀ ekstrakta pigmenta iz bakterije *Vibrio* sp. pri testiranih sevih.**
 Zvezdica (*) pomeni %ΔOD₆₅₀ pri najvišji koncentraciji ekstrakta pigmenta, ki smo jo uporabili.

sev	Število + redčitev	MIC ₅₀ ekstrakta pigmenta iz bakterije <i>Vibrio</i> sp. (mg/l)	%ΔOD ₆₅₀ (%) pri MIC ₅₀
2B	1	8,80 ± 0,85	108,50 ± 3,68
5A	6	2,89 10 ⁻⁴ ± 0,09 10 ⁻⁴	56,91 ± 5,42
5C	2	0,94 ± 0,07	73,56 ± 3,70
5D	3	8,56 10 ⁻² ± 0,68 10 ⁻²	85,49 ± 2,30
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	4	6,61 10 ⁻³ ± 0,64 10 ⁻³	57,19 ± 9,85
<i>Vibrio</i> sp.	divji tip	> 12,94	45,02 ± 2,81 *

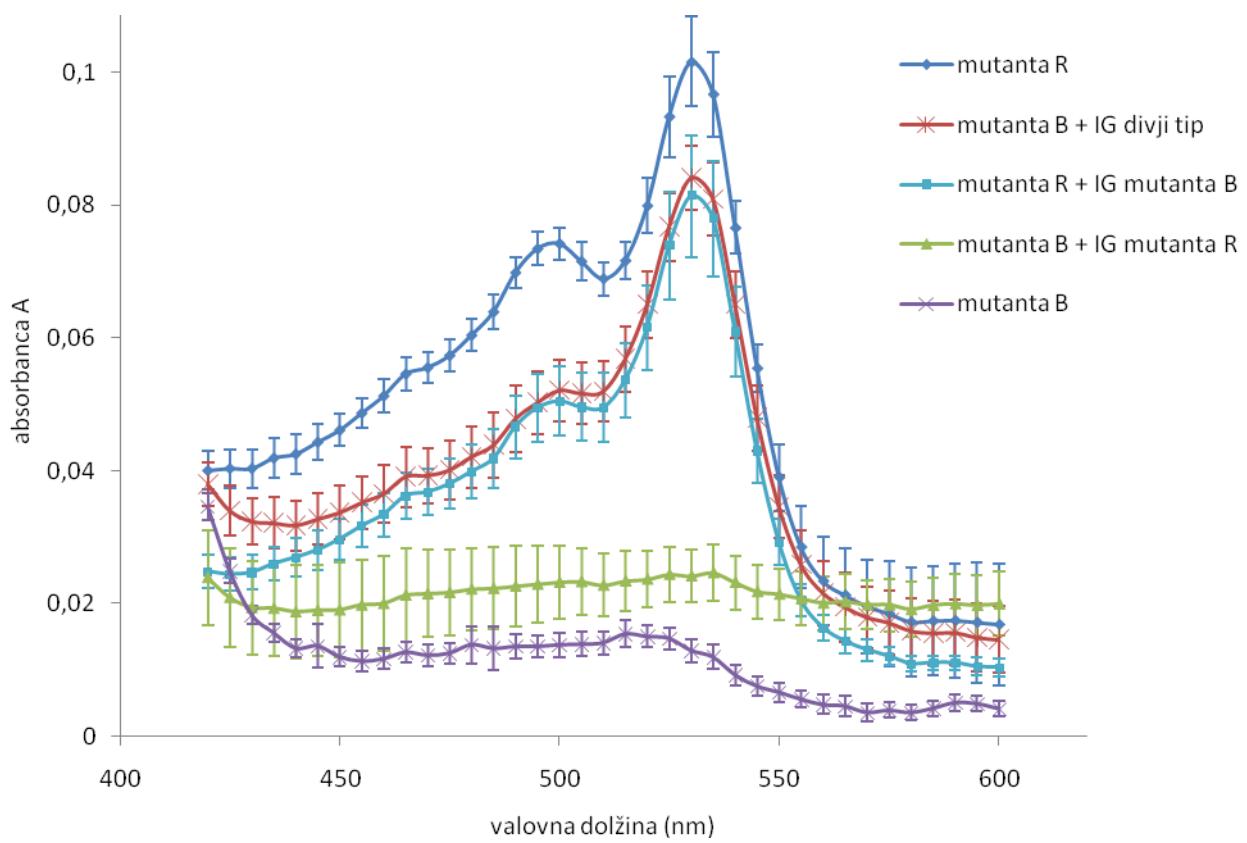
	mutanta R	1	13,08 \pm 0,14	55,66 \pm 2,67
	mutanta B	1	10,95 \pm 1,40	82,57 \pm 1,82
	<i>Escherichia coli</i>	2	1,17 \pm 0,05	51,39 \pm 2,09
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	12,89 \pm 0,59	81,53 \pm 5,94
	<i>Bacillus subtilis</i>	2	1,17 \pm 0,05	77,53 \pm 1,83
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	9,68 10^{-3} \pm 0,44 10^{-3}	68,94 \pm 8,80
	<i>Micrococcus luteus</i>	1	12,89 \pm 0,59	115,32 \pm 1,29
	<i>Serratia marcescens</i>	0	> 12,30	-19,79 \pm 1,74 *
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	12,89 \pm 0,59	53,58 \pm 0,59
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	> 12,30	26,24 \pm 1,23 *
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	> 12,30	24,07 \pm 0,92 *
	<i>Pseudomonas putida</i>	0	> 12,30	33,44 \pm 3,98 *

Priloga D2: Protibakterijsko delovanje ekstrakta pigmenta iz mutante B in R *Vibrio* sp. proti morskemu izolatu 5A.

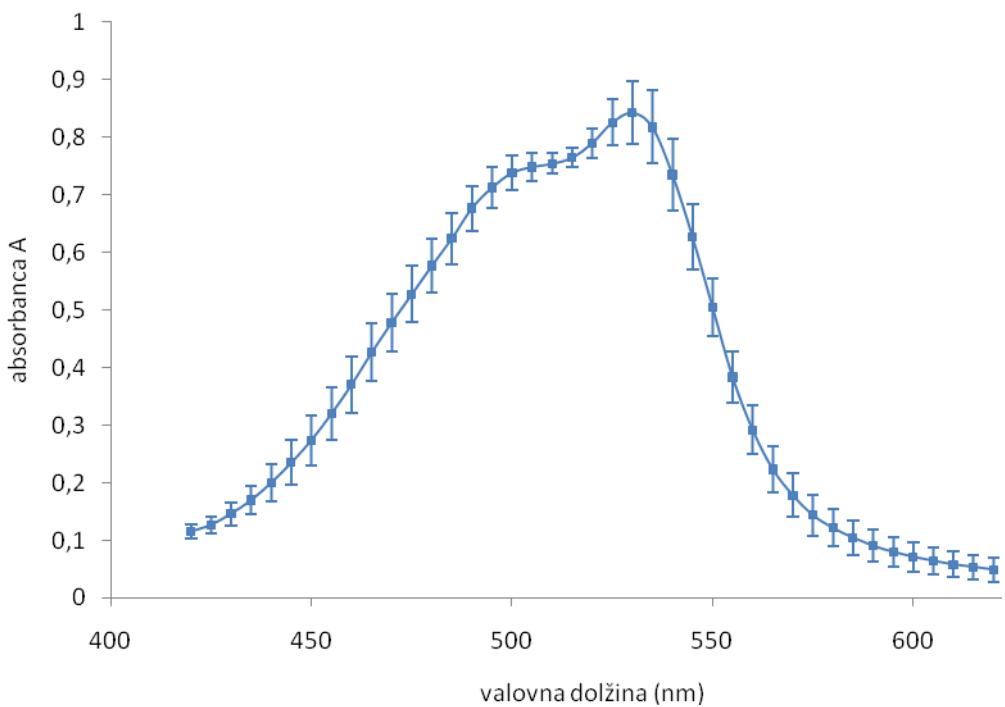
Ekstrakt pigmenta	Koncentracija ekstrakta pigmenta (mg/l)	% ΔOD_{650} (%)
10 x mutanta B	0,34 \pm 0,05	8,33 \pm 4,19
1 x mutanta B	0,03 \pm 0,00	-10,87 \pm 2,09
10 x mutanta R	0,46 \pm 0,10	117,42 \pm 3,46
1 x mutanta R	0,04 \pm 0,01	48,53 \pm 10,38



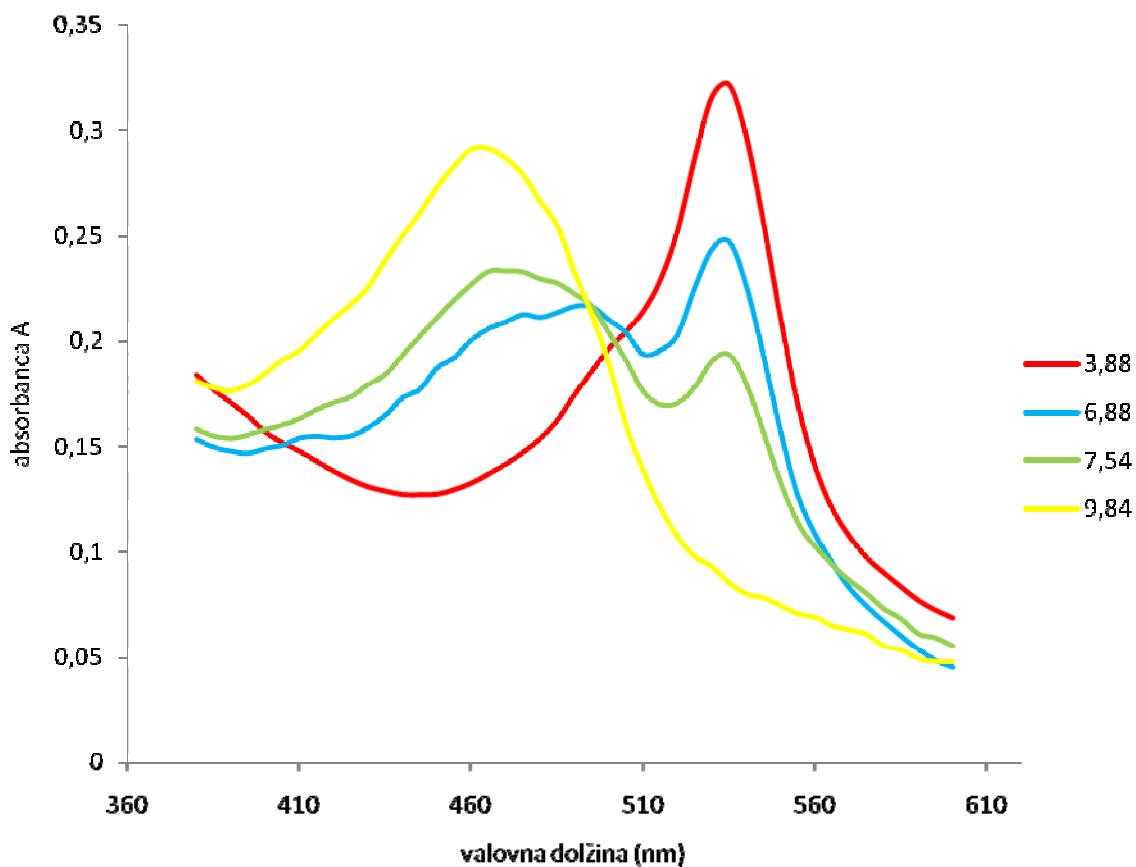
Priloga E1: **Absorpcijski spektri ekstrakta pigmenta iz mutante B in R, ki sta rasli v svežem gojišču in v gojiščih z dodatkom izrabljenega gojišča, v acetonu.** Ekstrakti pigmenta so 10 krat koncentrirani.



Priloga E2: **Absorpcijski spektri ekstrakta pigmenta iz mutante B in R, kjer zaradi dodatka izrabljenega gojišča ni prišlo do povečane sinteze pigmenta, v acetonu.**
Spektri ekstrakta pigmenta so 10 krat koncentrirani.



Priloga E3: **Absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta iz divjega tipa *Vibrio* sp. v 7 % etanolu.** Ekstrakt pigmenta je 5 krat redčen. Vrednost pH je neznana, vendar je spekter povprečje 8 ponovitev. Vrednosti pH so približno 7.



Priloga E4: **Absorpcijski spekter ekstrakta pigmenta iz bakterije *Serratia marcescens* v acetonu z različnim pH vrednostmi.** Ekstrakt pigmenta je 10 krat koncentriran. Spektri so normirani na isto površino.

Priloga F: Količina ekstrakta pigmenta na g suhe snovi pri mutantah nastalega zaradi dodatka izrabljenega gojišča.

vzorec	Količina ekstrakta pigmenta (mg _{ext} /g _{s.s.})	σ (mg _{ext} /g _{s.s.})
mutanta R	0,40	0,03
mutanta R + izrabljeno gojišče (divji tip)	11,97	0,21
mutanta R + izrabljeno gojišče (mutanta B)	0,39	0,06
mutanta B	0,32	0,04
mutanta B + izrabljeno gojišče (divji tip)	0,34	0,03
mutnata B + izrabljeno gojišče (mutanta R)	0,34	0,03
divji tip	101,99	4,27