

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Boštjan BIDOVEC

**FIZIOLOŠKI ODZIV BAKTERIJE *Escherichia coli*  
V RAZLIČNO VISKOZNIH GOJIŠČIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Boštjan BIDOVEC

**FIZIOLOŠKI ODZIV BAKTERIJE *Escherichia coli*  
V RAZLIČNO VISKOZNIH GOJIŠČIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF BACTERIUM *Escherichia coli*  
IN MEDIA WITH DIFFERENT VISCOSITIES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2014

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

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. David Stopar in za recenzentko prof. dr. Romana Marinšek Logar.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je diplomsko delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Boštjan Bidovec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.22/.26:579.842.1/.2(043)=163.3
- KG fiziologija mikroorganizmov/ekologija mikroorganizmov/*Escherichia coli*/viskoznost gojišča/reološke lastnosti/hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza/HMHEC
- AV BIDOVEC, Boštjan
- SA STOPAR, David (mentor) / MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2014
- IN FIZIOLOŠKI ODZIV BAKTERIJE *Escherichia coli* V RAZLIČNO VISKOZNIH GOJIŠČIH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 45 str., 2 pregl., 6 sl., 4 pril., 78 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V diplomskem delu smo raziskali vpliv viskoznosti na fiziologijo bakterije *Escherichia coli*. Preverili smo vpliv hidrofobno modificirane hidroksietil celuloze (HMHEC) na fizikalno-kemijske lastnosti gojišč in sposobnost *E. coli* za razgradnjo HMHEC-a. HMHEC v razponu koncentracije od 0 do 1 % (w/V) ni pomembno vplival na pH ali koncentracijo raztopljenega kisika v gojišču. Sposobnost *E. coli* za razgradnjo HMHEC-a smo preverili z merjenjem koncentracije redukcijskih koncev. *E. coli* ni bila sposobna razgraditi HMHEC. Hitrost rasti v odvisnosti od viskoznosti smo spremljali z merjenjem optične gostote (OD<sub>650</sub>) gojišč. Hitrost rasti se je pri najvišji viskoznosti zmanjšala. Aktivnost metabolizma in pretok ogljika skozi centralne metabolne poti smo spremljali preko endogene respiracije, celokupne dehidrogenazne aktivnosti in merjenjem aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, piruvat kinaze in fosfofruktokinaze. Pri viskoznosti, ki je bila 16 mPas ali višja, se je metabolna aktivnost znižala, tako na nivoju skupnih dehidrogenaz, kot tudi pri produkciji CO<sub>2</sub>. Z viskoznostjo se je statistično značilno povečala aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Povišana viskoznost je za *E. coli* predstavljala stres, ki se je odrazil v zmanjšani hitrosti rasti, nižjem končnem številu celic ter znižanimi aktivnosti piruvat kinaze in fosfofruktokinaze. Vpliv viskoznosti na bakterijske medvrstne odnose smo proučevali s tremi sevi: *E. coli*, *V. ruber* in mutanto bakterije *V. ruber*, ki ne proizvaja prodigiozina. Različne tipe kokultur smo gojili pri treh različnih viskoznostih gojišč in nato izračunali pripadajoči Maltuzijski fitness. Viskoznost ni statistično značilno vplivala na odnose med bakterijami gojenimi v kokulturah.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.22/.26:579.842.1/.2(043)=163.3

CX physiology of microorganisms/ecology of microorganisms/*Escherichia coli*/  
viscosity of medium/rheological properties/hydrophobically modified hydroxyethyl  
cellulose/HMHEC

AU BIDOVEC, Boštjan

AA STOPAR, David (supervisor) / MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology

PY 2014

TI PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF BACTERIUM *Escherichia coli* IN MEDIA  
WITH DIFFERENT VISCOSITIES

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 45 p., 2 tab., 6 fig., 4 ann., 78 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In this work we have studied the effect of viscosity on physiology of the bacterium *Escherichia coli*. Viscosity of the medium was changed with Hydroxyethyl cellulose (HMHEC). HMHEC in a concentration range from 0 to 1 % (w/V) did not significantly affect the pH or the concentration of dissolved oxygen in the culture medium. We determined the ability of *E. coli* to enzymatically degrade HMHEC by measuring the concentration of sugar reducing ends. *E. coli* was not able to degrade HMHEC. The effect of viscosity on the growth rate of *E. coli* was determined by optical density measurements (OD<sub>650</sub>) of culture medium. The growth rate was lowest at the highest viscosity. The metabolic activity and carbon flow rate were monitored by endogenous respiration, total dehydrogenase activity, and metabolic flow through glycolysis. At the viscosity of 16 mPas or higher the metabolic activity decreased both at the level of total dehydrogenase activity and production of CO<sub>2</sub>. Glucose-6-dehydrogenase activity increased significantly with viscosity. Increased viscosity of the growth media induced stress response in *E. coli*, which caused a reduction in growth rate, the final CFU number, activity of pyruvate kinase and phosphofructokinase. The influence of viscosity on bacterial inter-species relationships was studied with *E. coli*, *V. ruber* WT, and mutant *V. ruber* unable to produce prodigiosin pigment. Different types of co-cultures were grown at three different viscosities of the media and corresponding Malthusian fitness was calculated. Viscosity did not significantly affect the relationship between the co-cultured bacteria.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJ .....	3
2.2 VISKOZNOST KOT DEJAVNIK OKOLJA .....	5
<b>2.2.1 Viskoznost .....</b>	<b>5</b>
2.2.1.1 Meritev viskoznosti .....	6
2.2.1.2 Spreminjanje viskoznosti gojišč .....	6
2.2.1.3 Vpliv viskoznosti na bakterije .....	7
2.2.1.4 Gibanje bakterijskih celic v viskoznem okolju.....	7
2.2.1.5 Vpliv viskoznosti na rast .....	8
2.2.1.6 Vpliv viskoznosti na metabolizem .....	8
2.2.1.7 Vpliv viskoznosti na bakterijske medvrstne odnose.....	9
2.3 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i> KOT MODELNI ORGANIZEM.....	10
<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIAL .....	12
<b>3.1.1 Kemikalije .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2 Encimi .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.3 Gojišča in raztopine.....</b>	<b>14</b>
3.1.3.1 Gojišče M9 .....	14
3.1.3.2 Gojišče LB.....	14
3.1.3.3 Gojišče PKS.....	14
<b>3.1.4 Bakterijski sevi.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.5 Reagenti .....</b>	<b>15</b>
3.2 METODE .....	15
<b>3.2.1 Spreminjanje viskoznosti rastnih gojišč in meritve viskoznosti.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2 Celulolitična aktivnost bakterijskih sevov .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Gojenje bakterijskih sevov in določanje parametrov rasti.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4 Velikost in morfologija celic .....</b>	<b>17</b>

<b>3.2.5</b>	<b>Metabolna aktivnost celic .....</b>	<b>17</b>
3.2.5.1	Merjenje mikrobne respiracije s plinsko kromatografijo .....	17
3.2.5.2	Spektrofotometrično merjenje celokupne dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic .....	17
3.2.5.3	Aktivnost glikolitičnih encimov .....	18
<b>3.2.6</b>	<b>Bakterijske kokulture .....</b>	<b>19</b>
3.2.6.1	Gojenje kokultur .....	19
3.2.6.2	Ekstrakcija in kvantifikacija prodigiozina, ki ga proizvaja bakterija <i>Vibrio ruber</i> .....	19
<b>3.2.7</b>	<b>Statistična analiza rezultatov.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1	SPREMINJANJE VISKOZNOSTI GOJIŠČ S HIDRODFOBNO MODIFICIRANO HIDROKSJETIL CELULOZO (HMHEC).....	21
4.1.1	Uporaba HMHEC kot edinega vira ogljika in celolitična aktivnost bakterije <i>E. coli</i> .....	23
4.1.2	Reološke značilnosti gojišč med rastjo bakterije <i>E. coli</i> .....	24
4.2	VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA RAST BAKTERIJE <i>E. coli</i> .....	25
4.3	VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA METABOLIZEM BAKTERIJE <i>E. coli</i> ....	27
4.4	VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA BAKTERIJSKE ODNOSE V KOKULTURAH .....	30
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>32</b>
5.1	REOLOGIJA GOJIŠČ IN BAKTERIJSKIH KULTUR .....	32
5.2	VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJE <i>E. coli</i> .....	33
5.3	VPLIV VISKOZNOSTI NA BAKTERIJSKE ODNOSE V KOKULTURAH.....	34
5.4	SKLEPI.....	36
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>39</b>

ZAHVALA

PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

str.

**Preglednica 1:** Fizikalno-kemijski parametri gojišč z različno vsebnostjo hidrofobno modificirane hidroksietil celuloze (HMHEC). Viskoznost in strižna napetost sta podani pri strižni hitrosti  $1000 \text{ s}^{-1}$ . Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 2$ ). ..... 23

**Preglednica 2:** Viskoznost kultur bakterije *E. coli* po 24 urah rasti v gojiščih z različnimi koncentracijami HMHEC in reološko obnašanje le-teh ( $n = 5$ ). ..... 25



## KAZALO SLIK

str.

- Slika 1:** Viskoznost (A) in strižna napetost (B) gojišč z različnimi koncentracijami HMHEC v odvisnosti od strižne hitrosti. Podatki so prikazani kot povprečje in standardni odklon ( $n = 5$ ). Legenda: črna–0 % HMHEC, svetlo modra–0,2 % HMHEC, zelena–0,4 % HMHEC, oranžna–0,5 % HMHEC, roza–0,75 % HMHEC, vijolična–1 %. ..... 22
- Slika 2:** Koncentracija redukcijskih koncev v gojišču M9 z HMHEC (beli simboli) ter z glukozo in HMHEC (črni simboli) pred in po inkubaciji z bakterijo *E. coli* MG1655. Simbola pred točko  $t = 0$  predstavljata sterilno gojišče. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 2$ ). ..... 24
- Slika 3:** Hitrost rasti (A) in nosilnost okolja (B) bakterije *E. coli* MG1655 v različno viskoznih gojiščih. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 5$ ). ..... 26
- Slika 4:** Celokupna dehidrogenazna aktivnost (A) in hitrost endogene respiracije (B) bakterije *E. coli* MG1655 v gojiščih z različno viskoznostjo. Črtna črta prikazuje metabolno aktivnost pri najnižji viskoznosti. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 5$ ). ..... 28
- Slika 5:** Specifična aktivnost posameznih encimov glikolize v celičnih ekstraktih bakterije *E. coli* MG1655, gojene v gojiščih z različno viskoznostjo. Na grafu so prikazane aktivnosti sledečih encimov: glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (beli stolpci), piruvat kinaza (svetlo sivi stolpci) in fosfofruktokinaza (temno sivi stolpci). Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 3$ ). ..... 29
- Slika 6:** Maltuzijski fitness sevov *E. coli* (beli stolpci), *V. ruber* WT (rdeči stolpci) in *V. ruber* BM (rumeni stolpci) v različnih tipih kokultur (A-*E. coli* in *V. ruber* WT, B-*E. coli* in *V. ruber* BM, C-*E. coli*, *V. ruber* WT in *V. ruber* BM) gojenih pri treh različnih viskoznostih gojišč. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n = 3$ ). ..... 31

## KAZALO PRILOG

**PRILOGA A:** Velikost celic bakterije *E. coli* gojene pri različnih viskoznostih

**PRILOGA B:** Parametra nosilnost okolja in hitrost rasti bakterije *E. coli* v odvisnosti od viskoznosti gojišč

**PRILOGA C:** Celokupna dehidrogenazna aktivnost bakterije *E. coli* v odvisnosti od viskoznosti gojišč

**PRILOGA D:** Koncentracija prodigiozina, ki ga je proizvedla bakterija *V. ruber* v kokulturah pri različnih viskoznostih

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CCK	cikel citronske kisline
CFU	enote, iz katerih se je razvila posamezna kolonija (ang. colony forming unit)
d	dolžina
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zeelkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
HMHEC	hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza
K-12	oznaka seva <i>E. coli</i> , ki je bil izoliran jeseni leta 1922 v kraju Palo Alto, v Kaliforniji
M9	minimalno gojišče z M9 solmi
MG1655	oznaka seva K-12
OD	optična gostota (ang. optical density)
PKS	gojišče pepton-krvasni ekstrakt
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
š	širina
V/V %	prostorninski odstotek (ang. volume/volume percent)
w/V %	utežno volumski odstotek (ang. weight/volume percent)

## 1 UVOD

Bakterije so v nenehnem stiku s svojim okoljem. Okolje je vse tisto, kar bakterijske celice obdaja in vpliva na njihovo rast in delovanje. Pomembni dejavniki okolja, ki vplivajo na mikrobnost in so dobro raziskani, so: temperatura, pH, osmolarnost in dostopnost kisika. Mikroorganizmi so v svojem mikrookolju obdani s tekočinami, ki se neprestano gibljejo, gibanje tekočin in posledično notranje trenje tekočin podaja viskoznost. Vpliv viskoznosti na fiziologijo bakterij je slabše poznan.

Viskoznost gojišča vpliva na obnašanje tekočin. V čistilnih napravah je stopnja delovanja mikroorganizmov v aktivnem blatu odvisna od viskoznosti. Viskoznost igra pomembno vlogo v mnogih tehnoloških procesih, predvsem v proizvodnji barv, kjer uporabljajo različna gostila za čim bolj enakomeren nanos barve na površino. Viskoznost barvil je pomembna tudi v tiskarski industriji (npr. velikost kapljice, poraba barvila, debelina sloja in enakomernost nanosa, resolucija tiska oz. ločljivost barvne lestvice). V živilski tehnologiji je viskoznost hrane pomembna tako iz senzoričnega in estetskega kot tudi mikrobiološkega vidika, saj gostila znižujejo vodno aktivnost in podaljšujejo obstojnost živila. Pri bolnikih s cistično fibrozo je viskoznost sluzi (mukusa), nadvse pomemben dejavnik, saj zaradi povečane viskoznosti in posledično zastajanja sluzi v pljučih mukociliarno dvigalo ne uspe odstraniti sluzi, le-ta pa predstavlja gojišče za različne bakterije, izmed katerih je patološko najpomembnejša bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, ki povzroča hude pljučnice.

Vpliv viskoznosti gojišča na rast in delovanje bakterij je bil opisan pri po Gramu negativni bakteriji *Vibrio ruber* (Borić in sod., 2012), pri ostalih bakterijah je vpliv viskoznosti slabše poznan. V ta namen smo izbrali po Gramu negativno bakterijo *Escherichia coli* K-12 MG1655, ki spada med najboljše proučene bakterije. Uporabili smo orodja in metode, ki so bile razvite za sledenje fiziologije bakterij in določili način njihove prilagoditve na spremembe viskoznosti v okolju.

## 1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA

Namen diplomskega dela je proučiti fiziologijo bakterije *E. coli* v različno viskoznih gojiščih. Z diplomskim delom želimo pokazati, da je viskoznost pomemben fizikalni dejavnik okolja, ki lahko vpliva na rast in metabolizem bakterij, manj pa na odnose med različnimi bakterijami, gojenimi v kokulturah. Do sedaj se vplivu viskoznosti na fiziologijo bakterij ni posvečalo veliko pozornosti, zato bo diplomsko delo prispevek k prepoznavanju viskoznosti kot pomembnega fizikalnega dejavnika okolja.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomskem delu smo postavili naslednje hipoteze:

- hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza spremeni viskoznost, ne pa tudi drugih fizikalno-kemijskih lastnosti gojišč;
- bakterija *E. coli* ne razgradi hidrofobno modificirane hidroksietil celuloze, ki jo uporabljamo za spreminjanje viskoznosti gojišč;
- sprememba viskoznosti gojišč vpliva na:
  - rast bakterije *E. coli*,
  - metabolno aktivnost bakterije *E. coli*,
  - pretok ogljika skozi centralne metabolne poti pri bakteriji *E. coli*;
- z višanjem viskoznosti se ne spremenijo bakterijski medvrstni odnosi.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJ

Na rast in delovanje bakterij vplivajo mnogi okoljski dejavniki, med katerimi imajo ključno vlogo temperatura, pH, slanost, dostopnost hranil, koncentracija kisika, redoks stanje in UV sevanje (Kim in Gadd, 2008). Spremembe fizikalno-kemijskih pogojev v naravnem okolju predstavljajo za bakterije stres, ki se mu morajo prilagoditi.

**Temperatura** je eden najpomembnejših okoljskih dejavnikov, ki vpliva na rast in preživetje mikroorganizmov. Razlikujemo med štirimi skupinami mikroorganizmov, glede na njihov temperaturni optimum, in sicer: psihrofili (0-10 °C), ki uspevajo pri nizkih temperaturah, mezofili, ki uspevajo pri srednjih temperaturah (10-40 °C), termofili z visokim temperaturnim optimumom (40-70 °C) ter hipertermofili z optimumom pri zelo visokih temperaturah (70-95 °C in več) in ekstremni hipertemofili (> 100 °C). *E. coli* je tipičen mezofil z optimalno temperaturo v kompleksnem gojišču 39 °C, maksimalno temperaturo 48 °C ter minimalno temperaturo 8 °C. Bakterije se na okolje z višjo temperaturo od njihovega optimuma prilagajajo z izražanjem proteinov toplotnega šoka. Ti preprečujejo denaturacijo celičnih struktur in molekul, pomagajo pri zvižanju proteinov ter omogočajo lažjo translokacijo proteinov v membrani (Kim in Gadd, 2008). Odziv na toplotni šok uravnava sigma faktorja  $\sigma E$  in  $\sigma H$ . Z višanjem temperature se poveča tudi fluidnost membrane, zato se vanje vgradijo nasičene maščobne kisline, ki povečajo rigidnost (Sinensky, 1974). Obratno se zgodi pri hladnem šoku, pri čemer bakterije v svojih membranah akumulirajo nenasičene maščobne kisline (Sinensky, 1974; Kim in Gadd, 2008). *E. coli* poleg sprememb v sestavi membrane tudi zniža hitrost rasti in nivo metabolizma (Ivančič in sod., 2009; Ivančič, 2012).

S **pH** vrednostjo podajamo kislost oz. alkalnost okolja. Vsak organizem uspeva pri določenem razponu pH vrednosti okolja in običajno znaša 2-3 enote pH okrog pH optimuma. Večina naravnih okolij ima pH med 5 in 9. Organizmom, ki najbolje uspevajo pri nizkih pH vrednostih, pravimo acidofili, medtem ko alkalofili naseljujejo okolja z visokim pH. Večina mikroorganizmov, vključno z *E. coli*, spada v skupino

neutrofilov s pH optimumom med 6 in 8. Kljub različnim pH vrednostim zunanega okolja mora biti znotrajcelični pH blizu nevtralnega, da ne pride do poškodb makromolekul, ki so občutljive na kislo oz. bazično okolje (Madigan in Martinko, 2006).

Glede na to, kako dobro so se organizmi zmožni prilagoditi na **slanost** okolja, jih uvrstimo med ne-halotolerantne, halotolerantne, halofile ter ekstremne halofile, ki za rast potrebujejo 15-30 % soli (Madigan in Martinko, 2006). Bakterije se prilagajajo na spremembe v slanosti okolja oz. osmotski stres tako, da bodisi vzdržujejo koncentracijski gradient s črpanjem anorganskih ionov v celico, bodisi sintetizirajo oz. koncentrirajo kompatibilne organske topljence. (Oren, 2001; Madigan in Martinko, 2006). Pri obeh procesih se porablja energija v obliki ATP (Oren, 2001), kar se odraža na slabši rasti ter intenzivnejšem metabolizmu (Danevčič, 2006). Odziv bakterij na spremembe v slanosti okolja se kaže tudi v prilagojeni sestavi in urejenosti njihovih membran (Lindblom in Rilfors, 1992). *E. coli* spada med ne-halotolerantne mikroorganizme.

**Dostopnost hranil** je eden izmed pglavitnih dejavnikov, potrebnih za rast. Ko bakterijam zmanjkuje hranil, najprej zaustavijo rast (Madigan in Martinko, 2006), obenem se v celicah sprožijo prilagoditveni procesi, ki vključujejo: znižanje sinteze proteinov, povišanje koncentracije (p)ppGpp (Kim in Gadd, 2008), ki poveča izražanje splošnega regulatorja rpoS ( $\sigma^S$ ), zaradi katerega se spremenita velikost in oblika celice, ter sestava membrane (Kim in Gadd, 2008).

**Koncentracija kisika** je pomembna v aktivnem metabolizmu in rasti aerobnih kultur, kjer se kisik porablja. Nižje koncentracije kisika aktivirajo druge poti metabolizma, kot so uporaba alternativnih prejemnikov elektronov in fermentacija. Posledično se spremeni potek CCK, aktivacija encimov kot sta fumarat reduktaza in nitrat reduktaza, ter aktivnost glioksilatnega cikla in metabolizma maščob (Kim in Gadd, 2008). *E. coli* spada med fakultativne anaerobe, kar pomeni, da bolje raste v prisotnosti kisika, lahko pa raste tudi v anaerobnih okoljih, takrat vrši anaerobno dihanje ali fermentacijo.

**UV sevanje** letalno učinkuje na mikroorganizme, saj poškoduje DNA in onemogoči prepisovanje in prevajanje genetskih informacij (Qiu in sod., 2004). Bakterije preprečujejo poškodbe, nastale kot posledica UV sevanja, s kopičenjem pigmentov (melanin, karotenoidi in drugi) v svojih membranah ali slojih spor, ki absorbirajo pri valovnih dolžinah v UV območju. Splošno razširjeni so tudi popravljalni mehanizmi, ki vključujejo rekombinacijo, fotoreaktivacijo ter izrezovanje poškodovanih mest z endonukleazami (Goosen in Moolenaar, 2008). Bakterije pri poškodbah DNA aktivirajo tudi SOS odziv, pri čemer morajo biti celice metabolno aktivne. Pri *E. coli* je SOS odziv reguliran s proteinom RecA, ki nastane na mestih poškodb DNK in aktivira samocepitve proteina LexA (Butala in sod., 2011). Že manjše poškodbe vodijo v izražanje genov *lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB* in *uvrD*, katerih cilj je popraviti nastale poškodbe. Če jim to ne uspe, se aktivira še izražanje genov *sulA*, *umuD* in *umuC*. Protein SulA ustavi celično delitev z inhibicijo oblikovanja proteinskega obroča FtsZ, kar stimulira popraviljanje poškodb s sistemom UmuDC (Lehninger in sod., 2004).

## 2.2 VISKOZNOST KOT DEJAVNIK OKOLJA

### 2.2.1 Viskoznost

Viskoznost je fizikalna lastnost tekočin, ki pove, kako se tekočina odzove na deformacijo zaradi delovanja strižnih sil ter kakšno je notranje trenje tekočine pri pretakanju. Bolj viskozne tekočine se težje pretakajo in mešajo, saj počasnejše plasti tekočine zadržujejo hitrejše. V smeri, ki je pravokotna na plast tekočine, zato nastane gradient hitrosti (strižna hitrost). Med sosednjima plastema pa deluje strižna sila ( $F$ ), ki je sorazmerna velikosti stične ploskve  $S$  in strižni hitrosti. Pri ravnih plasteh, kjer se hitrost spreminja le v prečni smeri, je strižna hitrost enaka  $\delta v/\delta y$ , to je spremembi hitrosti na enoto prečne razdalje (enačba 1):

$$F = \eta S \frac{dv_x}{dy}$$

...(1)

Sorazmernostni koeficient  $\eta$  imenujemo koeficient viskoznosti oziroma viskoznost. Enota zanjo je  $1 \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1} = \text{Nsm}^{-2} = \text{Pas}$  (paskal sekunda). Na viskoznost vpliva temperatura,



in sicer se z višanjem temperature viskoznost tekočine manjša, od tlaka pa je neodvisna (Stepišnik, 1997). Glede na viskoznost ločimo različne tipe tekočin: newtonske in nnewtonske. Za newtonske tekočine velja, da sta strižna napetost in prirastek hitrosti premo sorazmerna, medtem ko za nnewtonske tekočine omenjeno ne velja. Nnewtonske tekočine se po viskoznosti ločijo na tiksotropne, reopektične, dilatantne in pseudoplastične. Tiksotropne so bolj pogoste, zanje velja, da se njihova viskoznost pod vplivom sile s časom zmanjša, reopektičnim tekočinam pa se viskoznost s časom poveča (Batchelor, 2000; Kirby, 2010).

#### 2.2.1.1 Meritev viskoznosti

Merjenje viskoznosti se opravlja z različnimi instrumenti oz. tehnikami, ki so odvisni od območja meritev. Tako ločimo merjenja viskoznosti na makroskopski in mikroskopski velikostni skali. V diplomskem delu smo viskoznost merili na makro skali z rotacijskim reometrom.

#### 2.2.1.2 Spreminjanje viskoznosti gojišč

Za spreminjanje viskoznosti gojišč se uporabljajo polimeri, ki temeljijo na ogljikovih hidratih (agar, agaroza, celuloza, karboksimetil celuloza) ter proteinih (želatina). Hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza (HMHEC), ki smo jo uporabili kot gostilo v tem diplomskem delu, se proizvaja v več različicah in se uporablja v širokem naboru industrijskih aplikacij (npr. gostila za barve in barvila, zobne kreme in kozmetični izdelki), kakor tudi v proizvodnji živil. HMHEC je hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza, ki ima na hidroksietilno skupino vezano različno število alkilnih skupin (MS faktor). Gre za stabilen, bel prašek, ki je dobro topen v vodi. Vodna raztopina HMHEC je prozorna in ne omejuje merjenja optične gostote.

### 2.2.1.3 Vpliv viskoznosti na bakterije

Večina študij, kjer se bakterije uporabljajo kot modelni organizmi, se izvaja pri dveh ekstremnih pogojih viskoznosti: v nizko viskoznih tekočih gojiščih, kot je npr. morska voda z viskoznostjo od 0,8 do 1,8 mPas; odvisno od temperature (Fofonoff, 1962) ter v visoko strukturiranih viskoznih biofilmih z viskoznostjo od 1 Pas do  $10^8$  Pas (Hall-Stoodley in sod., 2004). Obstajajo znatne razlike v genski ekspresiji ter fiziologiji med bakterijami teh dveh ekstremov (Davey in O'Toole G, 2000; Resch in sod., 2006; Resch in sod., 2005). Kaj se dogaja v okoljih z vmesno viskoznostjo, ni dobro znano, razen v primeru bakterije *Vibrio ruber*, katerega odziv na povišano viskoznost je bil nedavno opisan (Borić in sod., 2012).

### 2.2.1.4 Gibanje bakterijskih celic v viskoznem okolju

Viskoznost znatno vpliva na gibanje bakterij, pri čemer oblika, velikost in običkanost bakterij igrajo pomembno vlogo. Gojišča z visoko viskoznostjo bolj prizadenejo gibanje kokov in kratkih palčk kot dolgih, zavitih bakterij, npr. iz rodov *Campylobacter* ali *Spirochaetes* (Nakamura in sod., 2006; Shigematsu in sod., 1998). Bakterije s polarno nameščenim bičkom se gibljejo počasneje kot lateralno običkane bakterije pri isti viskoznosti v okolju, kjer vrednosti ne presegajo 60 mPas. Minimalna imobilizacijska viskoznost (MIV) je tista vrednost viskoznosti, pri kateri so celice imobilizirane. MIV za bakterijo *E. coli* znaša 60 mPas, medtem ko je pri spirohetah 1000 mPas ali več (Greenberg in Canale-Parola, 1977). Bakterije se na različne načine prilagajajo spremembam viskoznosti. Bakteriji *Leptospira interrogans* in *Treponema denticola* spremenita celično morfologijo, kar jima omogoča dobro gibljivost v visoko viskoznih gojiščih (Cox in Twigg, 1974). Bakterija *Helicobacter pylori* regulira aktivnost ureaze, s čemer spremeni pH vrednost želodčnega mukusa in s tem vpliva na viskoelastičnost mucina, da se lažje giblje (Celli in sod., 2009). Določeni vibriji tvorijo peritrihe bičke pri povišani viskoznosti (Atsumi in sod., 1996), nekatere bakterije, ki so že peritriho običkane, pa na površini tvorijo še več bičkov (McCarter, 2004).

#### 2.2.1.5 Vpliv viskoznosti na rast

Z višanjem viskoznosti gojišč se spremeni mnogo dejavnikov, povezanih z rastjo bakterij. Difuzija hranil, kisika, celičnih presnovkov ter antibiotikov se upočasni (Borriello in sod., 2004). V biofilmih tako nastanejo gradienti, ki predstavljajo stres za bakterije, saj je npr. koncentracija kisika lahko do 30-krat višja v tekočini nad biofilmom kot v njegovi notranjosti (Folsom in sod., 2010). Bakterije se najprej odzovejo z upočasnjeno rastjo, ki se pri istih bakterijskih sevih iz  $0,6-0,8 \text{ h}^{-1}$  v tekočih kulturah zniža na  $0,01-0,08 \text{ h}^{-1}$  v biofilmih (Borriello in sod., 2004; Folsom in sod., 2010). Upočasnjena rast bakterij v biofilmih je vsota večih dejavnikov, ne samo spremembe viskoznosti, saj gre za kompleksen fiziološki odziv.

#### 2.2.1.6 Vpliv viskoznosti na metabolizem

Bistvena razlika med planktonskimi bakterijami ter bakterijami znotraj biofilmov je v izražanju njihovih genov (Bentley in Meganathan, 1982; Folsom in sod., 2010; Greenberg in Canale-Parola, 1977). Za bakterijo *E. coli* velja, da se približno 38 % vseh genov izraža različno v tekoči kulturi v primerjavi z biofilmom istega seva. V manjši meri so izraženi geni, ki so povezani z metabolizmom, v večji meri pa geni, ki so udeleženi v podvajanju DNA (Prigent-Combaret in sod., 1999). Kljub temu se v biofilmih v primerjavi s planktonskimi celicami poviša izražanje genov *gluA*, *gudB* in *glmS* ter genov, ki nosijo zapis za proteine, sodelujoče v ciklu citronske kisline (CCK), kar vodi v povišano glikolizo in fermentacijo. Povišana je tudi pot pentoze fosfata, ki celice oskrbi s sladkorji in poveča njihovo redukcijsko moč (Resch in sod., 2006), sinteza kompleksnih aminokislin, aktivirajo se stresni geni (npr. geni za alkalni šok ter geni za detoksifikacijo reaktivnih kisikovih zvrsti – katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza), zmanjša pa se sinteza toksinov (Resch in sod., 2005). Ugotovljeno je bilo, da spremembe v viskoznosti gojišč vplivajo tako na primarni kot na sekundarni metabolizem bakterije *Vibrio ruber* (Borić in sod., 2012). Visoka viskoznost predstavlja stres za bakterijo *Vibrio ruber*, ki se kaže v povišani stopnji respiracije, predvsem v povišanju aktivnosti glukoze-6-fosfat-dehidrogenaze, ki direktno vodi v pot pentoze fosfata, ter celokupne dehidrogenazne aktivnosti, ki vibriju najverjetneje služi za ohranitev gibanja pri povišanih viskoznostih.

Viskoznost vpliva tudi na sintezo sekundarnega metabolita prodigiozina, čigar protimikrobno delovanje nudi vibriju kompetitivno prednost v okolju (Starič in sod., 2010). Pri nižjih viskoznostih se sinteza prodigiozina začne prej ter traja dlje časa, medtem ko se pri višjih viskoznostih pigment sintetizira le kratek čas in ga zato nastane manj (Borić in sod., 2012). Višanje viskoznosti ima podoben vpliv na glive. Pri glivi *Aspergillus carbonarius*, ki je pomembna v živilski mikrobiologiji, so opazili zmanjšano hitrost rasti in spremembe v sekundarnem metabolizmu (zmanjšana sinteza toksičnega metabolita ohratoksina), ki so jih pripisali različni porazdelitvi hranil in kisika (Kapetanakou in sod., 2011). Posebno dobro so opisane razlike v fiziologiji med planktonskimi celicami ter biofilmi pri bakterijah, ki uspevajo v obeh oblikah rasti in so medicinsko pomembne. Tako je znano, da je v biofilmu bakterije *Streptococcus aureus* 17-krat bolj izražena fumarat dehidrogenaza, kar vodi v večjo produkcijo kisline ob tvorbi energije. Celice se z zakisanostjo spopadejo s sintezo ureaze, ki razcepi ureo do amoniaka in ogljikovega dioksida (Resch in sod., 2005).

#### 2.2.1.7 Vpliv viskoznosti na bakterijske medvrstne odnose

Bakterije so v naravnih okoljih prisotne v mešanih kulturah, kjer s pomočjo komunikacije, tekmovanja in sintrofije optimalno delujejo. Obstajajo štirje glavni tipi medvrstnih odnosov, ki odražajo fitnes posameznega organizma v prisotnosti drugega (West in sod., 2007). Kadar obstaja med sevoma sožitje, imata oba korist oz. pozitiven fitnes. V parazitskem odnosu ima korist le prejemnik, medtem ko pri amenzalizmu en bakterijski sev izloča protimikrobno snov, ki zavira rast drugega seva. V naravi se redko pojavlja četrti tip medsebojnih odnosov, saj imata pri t.i. kljuovalnem odnosu oba udeležena seva negativen fitnes (Foster in Bell, 2012). Viskoznost vpliva na odnose med bakterijami, saj so v viskoznem okolju prisotne le lokalne kompeticije med sevi na istem območju ob istem času, medtem ko v okolju z nizko viskoznostjo med sabo tekmujejo vsi prisotni sevi (Czaran in Hoekstra, 2009). V biofilmih, ki so sestavljeni iz več vrst, sta prisotna tako sožitje kot tekmovanje, katerih posledice se odražajo na strukturi, razvoju in delovanju biofilma (Moons in sod., 2009). Bakterije v biofilmih izločajo antibiotike, ki služijo zagotavljanju prednosti sevu, ki jih izloča, lahko pa služijo tudi medceličnemu signaliziranju, ki služi vzdrževanju mikrobnih združb (Linares in sod., 2006).

### 2.3 BAKTERIJA *Escherichia coli* KOT MODELNI ORGANIZEM

V diplomskem delu smo kot modelni sistem za proučevanje vpliva viskoznosti na fiziologijo bakterij uporabili bakterijo *E. coli*, ki spada v družino enterobakterij znotraj rodu gamaproteobakterij. Gre za po Gramu negativno, fakultativno anaerobno bakterijo paličaste oblike. *E. coli* je del mikrobiote tankega črevesa endotermnih organizmov, kjer proizvaja vitamin K2 (Bentley in Meganathan, 1982) in preprečuje naselitev patogenih bakterij znotraj tankega črevesa. Določeni serotipi povzročajo zastrupitve pri ljudeh, pri čemer gre največkrat za oralno-fekalni prenos bolezni (Hudault in sod., 2001). *E. coli* in njej sorodne bakterije so sposobne horizontalnega prenosa dednega materiala znotraj populacije, ki obsega tako konjugacijo kot tudi transdukcijo ter transformacijo.

*E. coli* je najbolj raziskan prokariotski modelni organizem. Gojeni sevi so dobro prilagojeni na laboratorijsko okolje in so za razliko od divjih tipov izgubili sposobnost rasti v črevesju, mnogi tudi niso več zmožni tvorbe biofilmov (Vidal in sod., 1998). *E. coli* so uporabili kot pionirski organizem pri različnih odkritjih, kot so konjugacija (Lederberg in Tatum, 1946), bakteriofagna genetika, z njo so razložili topografijo genske strukture (Benzer, 1961) ter opazovali evolucijske premike v laboratorijih, npr. speciacijo znotraj populacije, ki je delu populacije omogočila aeroben metabolizem citrata (Blount in sod., 2008). Metabolizem *E. coli* je zelo dobro poznan (Lehninger in sod., 2004; Boyer, 2005).

Dolga zgodovina raziskovanja ter pripravnost za genetske manipulacije je bakterijo *E. coli* uvrstila med pomembne delovne organizme v sodobnem biološkem inženiringu ter industrijski mikrobiologiji (Lee, 1996). Bakterija *E. coli* se uporablja kot gostiteljski organizem za izdelavo rekombinantne DNA s pomočjo plazmidov in restrikcijskih encimov in kot tak predstavlja osnovni mikroorganizem v biotehnologiji (Russo, 2003). Ena izmed prvih uporabnih aplikacij rekombinantne DNA tehnologije je bila manipulacija bakterije *E. coli* za proizvodnjo človeškega inzulina (Tof, 1994), sicer pa se uporablja za izdelavo številnih heterolognih proteinov (Cornelis, 2000). V mutantah *E. coli* lahko izrazimo proteine z več disulfidnimi vezmi (Bessette in sod., 1999) in celo proteine, ki potrebujejo post-translacijske modifikacije, kot je glikozilacija (Wacker in sod., 2002). Modificirani sevi se uporabljajo v izdelavi cepiv (Howard in sod., 2013), bioremediacijah

(Chen in Wilson. 1997), produkciji biogoriv (Howard in sod., 2013) ter imobiliziranih encimov (Cornelis, 2000).

V diplomskem delu smo proučili odziv *E. coli* v območju srednje viskoznosti med 0,8 ter 29,4 mPas. To so viskoznosti, ki jih bakterije velikokrat srečajo v naravnih habitatih, npr. viskoznost človeškega mukusa, sline ter solz (Lai in sod., 2009). Prav tako se s povišanimi viskoznostmi soočajo v biotehnoloških procesih, kjer bi nam poznavanje fiziologije odziva na povišano viskoznost koristilo v smislu optimizacije biotehnoloških postopkov.

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Kemikalije

- 1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan (TTF)  $M_w = 303,37$  g/mol (Fluka, Švica)
- 1,4-ditio-DL-treitol  $C_4H_{10}O_2S_2$  (DTT)  $M_w = 154,25$  g/mol (Fluka, Švica)
- 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC)  $C_{19}H_{15}ClN_4$   $M_w = 334,81$  g/mol (Merck, Nemčija)
- 2-propanol  $C_3H_8O$   $M_w = 60,1$  g/mol (Merck, Nemčija)
- 96 % (V/V) etanol  $C_2H_5OH$   $M_w = 46,07$  g/mol (Merck, Nemčija)
- aceton  $C_3H_6O$   $M_w = 58,08$  g/mol (Merck, Nemčija)
- adenzin-5'-difosfat dinatrijeva sol (ADP)  $C_{10}H_{13}N_5Na_2O_{10}P_2$   $M_w = 471,17$  g/mol (Fluka, Švica)
- adenzin-5'-trifosfat dinatrijeva sol hidrat (ATP)  $C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot H_2O$   $M_w = 569,15$  g/mol (Fluka, Švica)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- agaroz (Sigma, ZDA)
- amonijev klorid  $NH_4Cl$   $M_w = 53,49$  g/mol (Merck, Nemčija)
- brezvodni metanol  $CH_3OH$   $M_w = 32,04$  g/mol (Merck, Nemčija)
- cetil trimetil amonijev bromid (CTAB)  $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$   $M_w = 364,45$  g/mol (Sigma, ZDA)
- destilirana voda (demineralizirana voda)
- D-fruktoza-6-fosfat dinatrijeva sol dihidrat  $C_6H_{11}Na_2O_9P \cdot 2H_2O$   $M_w = 340,1$  g/mol (Fluka, Švica)
- D-(+)-glukoza  $C_6H_{12}O_6$   $M_w = 180,16$  g/mol (Kemika, Hrvaška)
- D-glukoza-6-fosfat natrijeva sol  $C_6H_{12}O_9PNa$   $M_w = 282,12$  g/mol (Fluka, Švica)
- dinatrijev hidrogen fosfat  $Na_2HPO_4$   $M_w = 141,96$  g/mol (Merck, Nemčija)
- DNS reagent (3,5-dinitrosalicilna kislina)
- etilendiaminotetraocetna kislina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA)  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$   $M_w = 372,2$  g/mol (Sigma, ZDA)

- fosfoenolpiruvična kislina kalijeve sol (PEP-K)  $C_3H_4KO_6P$   $M_w = 206,13$  g/mol (Fluka, Švica)
- fosforna kislina  $H_3PO_4$   $M_w = 98,00$  g/mol (Sigma, ZDA)
- hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza (HMHEC) (Ashland, ZDA)
- kalcijev klorid dihidrat  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   $M_w = 147,02$  g/mol (Sigma, ZDA)
- kalijev dihidrogen fosfat  $KH_2PO_4$   $M_w = 136,09$  g/mol (Merck, Nemčija)
- kalijev klorid  $KCl$   $M_w = 74,55$  g/mol (Merck, Nemčija)
- klorovodikova kislina  $HCl$   $M_w = 36,5$  g/mol (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- led očetna kislina  $CH_3CO_2H$   $M_w = 60,05$  g/mol (Sigma, ZDA)
- magnezijev klorid heksahidrat  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$   $M_w = 203,3$  g/mol (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   $M_w = 246,48$  g/mol (Merck, Nemčija)
- manganov sulfat hidrat  $MnSO_4 \cdot H_2O$   $M_w = 169,01$  g/mol (Kemika, Hrvaška)
- metanol  $CH_3OH$   $M_w = 32,04$  g/mol (Merck, Nemčija)
- miliQ voda (deionizirana voda)
- natrijev hidroksid  $NaOH$   $M_w = 40$  g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid  $NaCl$   $M_w = 58,5$  g/mol (Merck, Nemčija)
- ninhidrin  $C_9H_6O_4$   $M_w = 178,14$  g/mol (Sigma, ZDA)
- očetna kislina  $CH_3COOH$   $M_w = 60,05$  g/mol (Riedel-de Haën, Švedska)
- ogljikov dioksid  $CO_2$  1 % (V/V) v  $N_2$  (Messer, Slovenija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- reduciran  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid dinatrijeve sol hidrat (NADH)  $C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2 \cdot H_2O$   $M_w = 727,46$  g/mol (Fluka, Švica)
- toluen  $C_6H_5CH_3$   $M_w = 92,14$  g/mol (Sigma, ZDA)
- tripton (Biolife, Italija)
- trishidroksimetil-aminometan hidroklorid (Tris-HCl)  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$   $M_w = 157,6$  g/mol (Sigma, ZDA)
- uranil acetat  $UO_2(OCOCH_3)_2 \cdot 2H_2O$   $M_w = 424,15$  g/mol (Sigma, ZDA)
- $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat dinatrijeve sol (NADP)  $C_{21}H_{26}N_7Na_2O_{17}P_3$   $M_w = 787,38$  g/mol (Fluka, Švica)



### 3.1.2 Encimi

- aldolaza iz zajčje mišice M~161000 (Fluka, Švica)
- glicerol-3-fosfat dehidrogenaza iz zajčje mišice M~78000 (Fluka, Švica)
- L-laktat dehidrogenaza iz zajčje mišice M~140000 (Fluka, Švica)
- triozafosfat izomeraza iz *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, ZDA)

### 3.1.3 Gojišča in raztopine

#### 3.1.3.1 Gojišče M9

Uporabljali smo tekoče gojišče M9 z naslednjo sestavo:

200 mL 5x M9 soli (64 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 150 g  $\text{NaCl}$ , 1000 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ )

2 mL 1M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,1 mL 1M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

20 mL 500 g/L glukoze (končna koncentracija glukoze v gojišču je 10 g/L)

750 mL  $\text{dH}_2\text{O}$

#### 3.1.3.2 Gojišče LB

Uporabljali smo tekoče gojišče LB. Sestava gojišča je:

10 g tripton

5 g kvasni ekstrakt

5 g  $\text{NaCl}$

do 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$

Za trdna gojišča LB smo dodali 15 g agar-agar na 1 L gojišča.

#### 3.1.3.3 Gojišče PKS

Uporabljali smo tekoče PKS z dodatkom 3 %  $\text{NaCl}$ . Sestava gojišča je:

5 g peptokompleks

1 g kvasni ekstrakt

2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

30 g  $\text{NaCl}$  (za 3 % (w/V)  $\text{NaCl}$  v gojišču)

do 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$

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

### 3.1.4 Bakterijski sevi

Uporabljali smo naslednje bakterijske seve:

- *Escherichia coli* K-12 MG1655 (*E. coli*),
- *Vibrio ruber* DSM14379 (*V. ruber*),
- *Vibrio ruber* nepigmentirana mutanta (*V. ruber* BM; Štraser, 2008).

### 3.1.5 Reagenti

DNS reagent za določanje koncentracije redukcijskih koncev:

- 5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline
- 100 mL 2M NaOH,
- v 25 mL destilirane vode
- 150 g K, Na-tartrata,

#### Postopek priprave raztopine za določanje redukcijskih koncev sladkorjev

Raztopino za določanje redukcijskih koncev sladkorjev pripravimo iz dveh predhodno pripravljenih raztopin. Prvo izhodiščno raztopino pripravimo tako, da v 100 mL 2M NaOH med segrevanjem raztopimo 5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline. Drugo izhodiščno raztopino pripravimo tako, da v 25 mL destilirane vode med segrevanjem raztopimo 150 g K, Na-tartrata. Pripravljeni izhodiščni raztopini združimo v bučki in dopolnimo z destilirano vodo do oznake 500 mL.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Spreminjanje viskoznosti rastnih gojišč in meritve viskoznosti

Viskoznost smo merili na reometru Physica MCR-301 (Anton Paar, Graz, Austria), ki meri viskoznost na podlagi vrtenja ene plošče proti drugi, med katerima je vzorec. Temperatura pri meritvi je bila 25 °C, razdalja med ploščama 0,25 mm. Približno 750 µL vzorca smo nanесли med obe plošči. Reološke krivulje v območju strižne hitrosti med 1 in 1000 s<sup>-1</sup> smo izmerili v 29 korakih, izvedenih v časovnem intervalu 5 sekund. Če ni drugače navedeno, so rezultati viskoznosti podani pri strižni hitrosti 1000 s<sup>-1</sup>. pH gojišč ter koncentracijo

raztopljenega kisika v tekočih gojiščih z in brez HMHEC smo izmerili z multimetrom Oakton PCD 650 (Oakton Instruments, Illinois, USA).

### 3.2.2 Celulolitična aktivnost bakterijskih sevov

Celulolitično aktivnost sevov smo določili po metodi, ki jo je opisal Miller (1959). Bakterijski sev *E. coli* smo nacepili v gojišče M9 z 2 g/L glukoze ter 1 % (w/V) HMHEC. Hkrati smo sev nacepili tudi v enaka gojišča brez glukoze. Vzorce smo vzeli ob času inokulacije ter po 24 urah inkubacije pri 37 °C in 200 rpm ter jim določili koncentracijo redukcijskih koncev. 1 mL vzorca smo centrifugirali ter supernatantu dodali 1 mL DNS reagenta. Mešanico smo 15 minut inkubirali na 100 °C, jo ohladili v vodni kopeli ter izmerili absorbanco pri 485 nm. Hkrati z vzorci smo naredili tudi vzorce sterilnih gojišč in standarde z glukozo. Iz umeritvene krivulje smo nato določili koncentracijo redukcijskih koncev, ki ponazarja celulolitično aktivnost sevov. Koncentracijo redukcijskih sladkorjev smo podali v mM.

### 3.2.3 Gojenje bakterijskih sevov in določanje parametrov rasti

Če ni navedeno drugače, smo bakterijski sev *E. coli* najprej nacepili v bogato gojišče LB in ga inkubirali preko noči ali najmanj 8 ur pri ustrezni temperaturi in 200 rpm. Potem smo 1 % inokulum precepili v ustrezno minimalno M9 gojišče in inkubirali pri 37 °C in 200 rpm. Za rastne krivulje smo prvih 10 do 12 ur na vsako uro izmerili OD<sub>650</sub> na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija), potem pa še po 24 urah rasti. Za določanje aktivnosti metabolizma smo gojili seve do pozne logaritemske faze.

Izmerjenim optičnim gostotam vzorcev smo prilegali krivuljo z enačbo 2 (Danevčič in sod., 2005):

$$OD_{650}(t) = \frac{K \times OD_{650,t_0}}{OD_{650,t_0} + e^{-\mu t} (K \times OD_{650,t_0})} \dots(2)$$

kjer je  $K$  nosilnost okolja,  $\mu$  hitrost rasti ( $\text{h}^{-1}$ ) in  $OD_{650,t_0}$  optična gostota pri 650 nm v času  $t = 0$ . Rast bakterijskih celic smo spremljali tudi z določanjem števila bakterijskih kolonij

na mL vzorca (CFU mL<sup>-1</sup>). Fitnes bakterijskih celic smo izračunali kot naravni logaritem količnika med številom celic na koncu in številom celic na začetku inkubacije (Ahn in sod., 2006).

### 3.2.4 Velikost in morfologija celic

Velikost in morfologijo celic smo opazovali z mikroskopom Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Nemčija) s 400x povečavo, velikost celic pa smo izmerili s programom AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Nemčija). Meritve celic smo opravili z orodji v programu ImageJ (Carl Zeiss, Nemčija). Izmerili smo 180 celic v treh vidnih poljih.

### 3.2.5 Metabolna aktivnost celic

#### 3.2.5.1 Merjenje mikrobne respiracije s plinsko kromatografijo

Bakterijski sev *E. coli* smo gojili do pozne logaritemske faze rasti (10 h), celice v 5 mL kulture sedimentirali s centrifugiranjem pri 14972xg za 15 minut pri 4 °C in jih oprali v fiziološki raztopini (0,85 % NaCl). Oprane celice smo resuspendirali v 5 mL fiziološke raztopine in jih plinotesno zaprli v stekleničke. Razmerje med plinsko in vodno fazo je bilo 2:1 (V/V). Količino CO<sub>2</sub> smo izmerili takoj po zaprtju stekleničke in po eni uri aerobne inkubacije pri ustrezni temperaturi (Odić in sod., 2007). Količino sproščenega CO<sub>2</sub> smo merili na plinskem kromatografu z detektorjem na toplotno prevodnost. Kontrolni vzorci so bile ustrezne raztopine NaCl. Število celic smo določili za vsak vzorec s štetjem CFU mL<sup>-1</sup>. Rezultate smo podali kot mL sproščenega CO<sub>2</sub> na uro na celico (Odić in sod., 2007; Danevčič in Stopar, 2011; Danevčič, 2006). Relativna hitrost respiracije je bila normirana na hitrost respiracije pri najnižji viskoznosti (0,9 mPas).

#### 3.2.5.2 Spektrofotometrično merjenje celokupne dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic

Za merjenje dehidrogenazne aktivnosti smo uporabljali redoks indikator trifeniltetrazolijev klorid (TTC), ki omogoča poenostavljeno merjenje dehidrogenazne aktivnosti (Danevčič, 2006). TTC je lahko prejemnik elektronov za mnoge dehidrogenaze, ki ga reducirajo

v netopni formazan (TTF). Kristali slednjega se kopičijo v aktivnih celicah, zato ga je potrebno ekstrahirati iz celic z organskimi topili (acetone, metanol) in meriti spektrofotometrično. Pri redukciji TTC v TTF pride do spremembe barve iz rumene v vijolično. Bakterijski sev *E. coli* smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, celice v 10 mL kulture smo sedimentirali s centrifugiranjem pri 14972xg za 15 minut pri 4 °C in jih sprali v 20 mM Tris-HCl pufri (pH 7,4) z ustrežno koncentracijo soli. Oprane celice smo resuspendirali v 1 mL 20 mM Tris-HCl pufra z ustrežno koncentracijo soli in jim dodali 1 mL 1 % (w/V) TTC v 0,1 M Tris-HCl (pH 7,7), 50 µL 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 50 µL 1 M glukoze. TTC ni bil dodan v kontrolne vzorce. Vse vzorce smo inkubirali eno uro pri 37 °C s stresanjem pri 200 rpm. Nastali TTF smo z metanolom ekstrahirali iz celic 15 minut, ki smo jih sedimentirali s centrifugiranjem. Koncentracijo nastalega TTF smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 485 nm. Količino proteinov v celicah smo določili z meritvijo proteinov na spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, ZDA) ali z Bradfordovim reagentom (Sigma, ZDA), po navodilih proizvajalca. Celokupno dehidrogenazno aktivnost smo podali kot µmol nastalega TTF na minuto na mg proteina. Relativna dehidrogenazna aktivnost je bila normirana na dehidrogenazno aktivnost izmerjeno pri najnižji viskoznosti (0,9 mPas).

### 3.2.5.3 Aktivnost glikolitičnih encimov

Bakterijski sev *E. coli* MG1655 smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, celice v 10 mL kulture sedimentirali s centrifugiranjem pri 14972xg za 15 minut pri 4 °C in jih oprali v fiziološki raztopini NaCl. Celične ekstrakte smo pripravili po postopku, ki ga navajata Danevčič in Stopar (2011). Celice smo 300-krat skoncentrirali in ultrazvočno dezintegrirali v 12 korakih po 30 sekund, z vmesnim premorom 30 sekund. Amplituda ultrazvoka je bila 6 µm, moč pa 3,5 W/cm<sup>2</sup>. S tem smo sprostili celične encime. Ekstrakte smo pridobili s centrifugiranjem pri 10397xg za 10 min pri sobni temperaturi in jih shranili pri -20 °C. Aktivnost encimov piruvat kinaza in glukoza-6-fosfat dehidrogenaza smo izmerili po postopku Padilla in sod. (2004). Pri merjenju aktivnosti piruvat kinaze je bil uporabljen 1 mM NADH namesto 3 mM NADH, kot je zapisano v originalnem postopku. Fosfofruktokinazno aktivnost smo merili po postopku Andersen in sod. (2001), pri čemer je bila končna koncentracija NADH 0,5 mM namesto 0,2 mM, kot je zapisano

v originalnem postopku. Kinetiko vseh glikolitičnih encimov smo izmerili preko porabe ali sinteze NADH. Absorbanca NADH je bila izmerjena spektrofotometrično pri valovni dolžini 340 nm. Spremembe v  $A_{340}$  smo merili 20 minut v korakih po pol minute. Naklon linearnega dela kinetičnih krivulj je predstavljal hitrost encimske reakcije. Koncentracijo proteinov smo merili s spektrofotometrom Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, ZDA) ali z Bradfordovim reagentom (Sigma, ZDA), po navodilih proizvajalca. Rezultati encimskih aktivnosti smo preračunali po postopku Danevčič in Stopar (2011) in so podani kot U na mg proteina. Relativne encimske aktivnosti so bile normalizirane na encimsko aktivnost pri najnižji viskoznosti (0,9 mPas).

### 3.2.6 Bakterijske kokulture

#### 3.2.6.1 Gojenje kokultur

Bakterijski sev *E. coli* MG1655 smo gojili v kokulturah z *V. ruber* ali z *V. ruber* BM. Seve smo gojili ločeno v PKS gojišču s 3 % NaCl oz. LB gojišču (*E. coli*) preko noči pri 28 °C in 200 rpm. Kokulture smo nacepili v sveže M9 gojišče z 10 g/L glukoze in različnimi viskoznostmi (0,9, 16 in 26,5 mPas, kar ustreza 0, 0,75 in 1 % koncentraciji HMHEC) v razmerju *V. ruber* : *E. coli* 1:2 (V/V). Število celic (CFU) smo določili na začetku in na koncu 20 urne inkubacije pri 28 °C in 200 rpm. CFU smo šteli na PKE ploščah brez NaCl (za *E. coli*) ter na PKS ploščah s 3 % NaCl (za vse seve). Maltuzijski fitness sevov smo izračunali na podlagi števila celic (Ahn in sod, 2006).

#### 3.2.6.2 Ekstrakcija in kvantifikacija prodigiozina, ki ga proizvaja bakterija *Vibrio ruber*

Iz vsake kokulture, v kateri je rasla bakterija *V. ruber* DSM14379, smo ekstrahirali in kvantificirali nastali prodigiozin. 1,5 mL kulture smo centrifugirali 10 minut pri 10000 obratih in 4 °C (Laboratory centrifuges SIGMA 3K30, Nemčija). Po centrifugiranju smo odlili supernatant ter pigment ekstrahirali z acetonom (Giri in sod., 2004) tako, da smo usedlino celic resuspendirali v enakem volumnu acetona. Ekstrakt v acetonu smo nato stresali 90 minut na stresalniku pri 28 °C. Po stresanju smo ostanke celic odstranili s centrifugiranjem 15 min pri 10000 obratih in 4 °C.

300  $\mu$ L ekstrakta pigmenta v acetonu vsakega vzorca smo v treh ponovitvah nanegli na mikrotitrsko ploščo ter izmerili absorpcijski spekter z optičnim čitalcem Multiscan Spectrum (THERMO, Finska) pri valovnih dolžinah od 380 do 600 nm (korak po 5 nm, ločljivost 2 nm). Za ničlitev smo uporabili čisto topilo - aceton. Dobljene spektre smo s programom OriginPro 7.5 integrirali. Iz površine integriranega spektra smo iz umeritvene krivulje odčitali koncentracijo pigmenta v mg/L.

### **3.2.7 Statistična analiza rezultatov**

Rezultate smo statistično ovrednotili s Studentovim t testom za dva neodvisna vzorca. Vzorci s p-vrednostjo enako ali nižjo od 0,05 so bili statistično značilno različni.

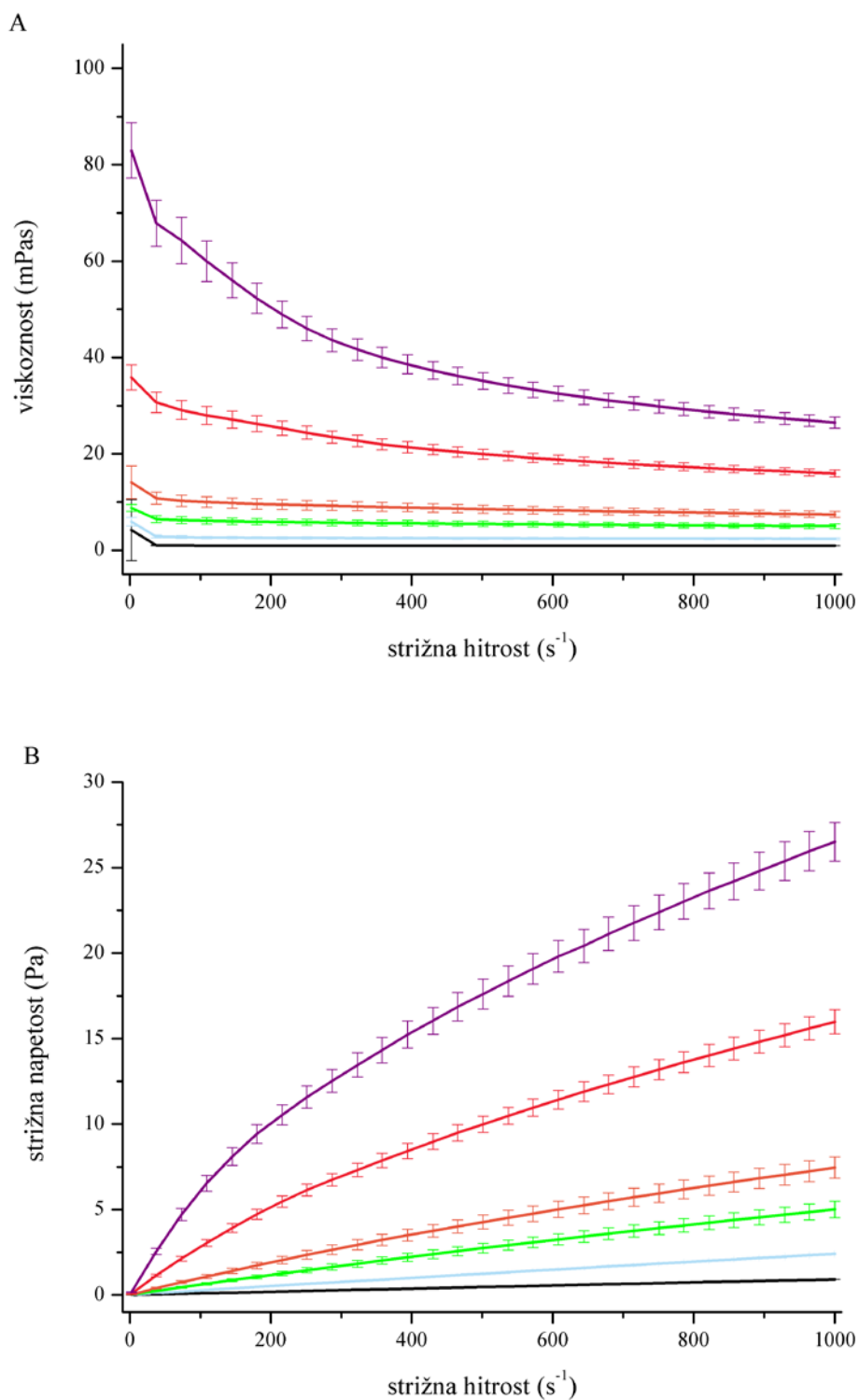
## 4 REZULTATI

### 4.1 SPREMINJANJE VISKOZNOSTI GOJIŠČ S HIDRODFOBNO MODIFICIRANO HIDROKSJETIL CELULOZO (HMHEC)

Za spreminjanje viskoznosti gojišč smo uporabili polimer hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza (HMHEC), ki smo ga v gojišča dodali v šestih različnih koncentracijah. Le-te so bile od 0 pa do 1 % (w/V).

Viskoznost gojišč se je višala s koncentracijo HMHEC (Slika 1). Skladno s tem je strižna napetost gojišč naraščala z višanjem koncentracije HMHEC. Odnos med koncentracijo HMHEC in viskoznostjo gojišč pri najvišji strižni hitrosti je eksponenten. Reološke značilnosti gojišč brez dodanega HMHEC so newtonske, kar pomeni, da se s spreminjanjem strižne hitrosti viskoznost in strižna napetost nista pomembno spreminjali. Z dodatkom HMHEC se je reološko obnašanje gojišč spremenilo v nenewtonsko, zanj je značilna odvisnost viskoznosti in strižne napetosti od strižne hitrosti. Ta učinek je bil z višanjem koncentracije HMHEC večji.





**Slika 1:** Viskoznost (A) in strižna napetost (B) gojišč z različnimi koncentracijami HMHEC v odvisnosti od strižne hitrosti. Podatki so prikazani kot povprečje in standardni odklon ( $n = 5$ ). Legenda: črna–0 % HMHEC, svetlo modra–0,2 % HMHEC, zelena–0,4 % HMHEC, oranžna–0,5 % HMHEC, roza–0,75 % HMHEC, vijolična–1 %.

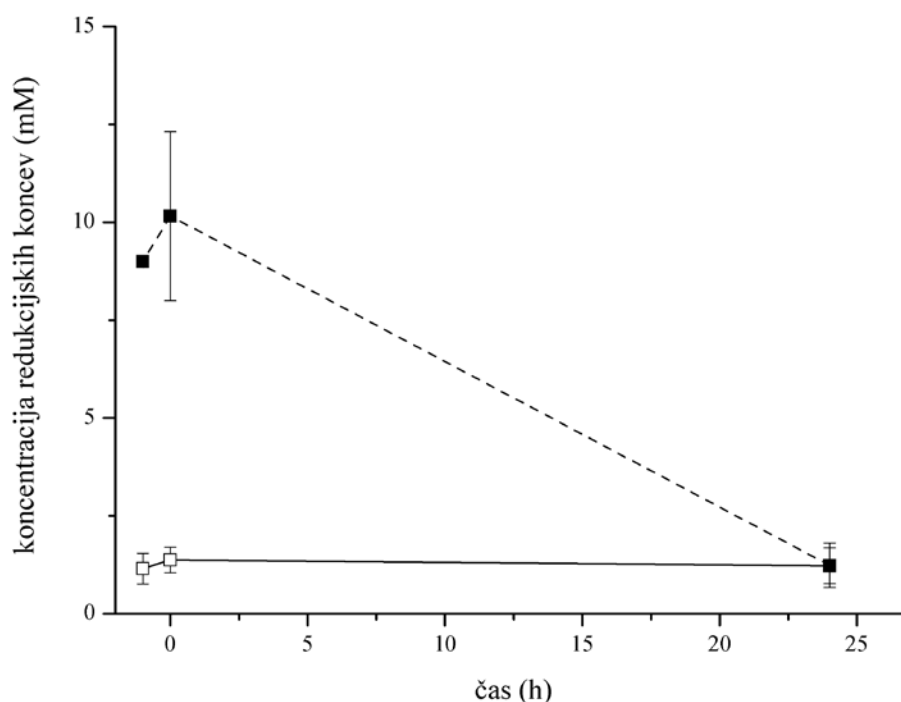
Gojišča z dodanim HMHEC so se obnašala pseudoplastično. pH in koncentracija raztopljenega kisika z višanjem koncentracije HMHEC rahlo upadata, glede na mersko napako je omenjeni pojav statistično značilen.

**Preglednica 1:** Fizikalno-kemijski parametri gojišč z različno vsebnostjo hidrofobno modificirane hidroksietil celuloze (HMHEC). Viskoznost in strižna napetost sta podani pri strižni hitrosti  $1000 \text{ s}^{-1}$ . Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 2$ ).

Koncentracija HMHEC (% w/V)	Viskoznost (mPas)	pH	Koncentracija raztopljenega kisika (mg/L)
0	$0,90 \pm 0,01$	$7,25 \pm 0,01$	$5,53 \pm 0,07$
0,2	$2,4 \pm 0,2$	$7,21 \pm 0,01$	$5,47 \pm 0,12$
0,4	$5,0 \pm 0,5$	$7,20 \pm 0,01$	$5,38 \pm 0,11$
0,5	$7,5 \pm 0,6$	$7,18 \pm 0,01$	$5,30 \pm 0,11$
0,75	$16,0 \pm 0,7$	$7,18 \pm 0,01$	$5,31 \pm 0,10$
1	$26,5 \pm 1,1$	$7,18 \pm 0,01$	$5,22 \pm 0,04$

#### 4.1.1 Uporaba HMHEC kot edinega vira ogljika in celulolitična aktivnost bakterije *E. coli*

Bakterija *E. coli* ne more uporabljati HMHEC kot edini vir ogljika v gojišču (Borić, 2013). Do rasti v gojišču s HMHEC ni prišlo, saj je bila optična gostota kultur po končani inkubaciji približno 0,03 (ob inokulaciji je bila optična gostota 0,03). V kontrolnem gojišču s HMHEC in z dodano glukozo je kultura bakterije *E. coli* dosegla optično gostoto okoli 1,17. Kljub temu, da bakterija *E. coli* polimera HMHEC ne uporablja kot vir hranil, pa bi ga še vedno lahko encimsko razgradila, zato smo preverili encimsko razgradnjo HMHEC z metodo določanja koncentracije redukcijskih koncev (Simčič, 2011; Borić, 2013). Z metodo merjenja koncentracije redukcijskih koncev merimo količino prostih skupin, pri katerih lahko pride do redukcije. Pri encimski razgradnji polimerov nastajajo oligomeri oz. monomeri, kar poveča koncentracijo izpostavljenih redukcijskih koncev. Le-to smo spektrofotometrično izmerili na podlagi umeritvene krivulje z znanimi koncentracijami glukoze.



**Slika 2:** Koncentracija redukcijskih koncev v gojišču M9 z HMHEC (beli simboli) ter z glukozo in HMHEC (črni simboli) pred in po inkubaciji z bakterijo *E. coli* MG1655. Simbola pred točko  $t = 0$  predstavljata sterilno gojišče. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 2$ ).

V gojišču M9 z HMHEC se koncentracija redukcijskih koncev po 24-urni inkubaciji ni statistično značilno spremenila (Slika 2). To pomeni, da bakterija *E. coli* ni izražala celulolitične aktivnosti in da molekule HMHEC niso bile razgrajene (inertnost HMHEC). V kolikor je bila HMHEC dodana glukoza, smo na začetku inkubacije zaznali visoko koncentracijo redukcijskih koncev, ki pa je po 24 urah inkubacije padla na raven, ki je bila značilna za gojišča brez dodane glukoze, kar nakazuje na to, da so celice *E. coli* porabile vso glukozo v gojišču.

#### 4.1.2 Reološke značilnosti gojišč med rastjo bakterije *E. coli*

Med rastjo bakterije *E. coli* v gojiščih z različno viskoznostjo v primerjavi s sterilnimi gojišči ni prišlo do pomembnih sprememb v reoloških značilnostih gojišč (Preglednica 2). Viskoznost izmerjena pri strižni hitrosti  $1000 \text{ s}^{-1}$  je ostala praktično nespremenjena.

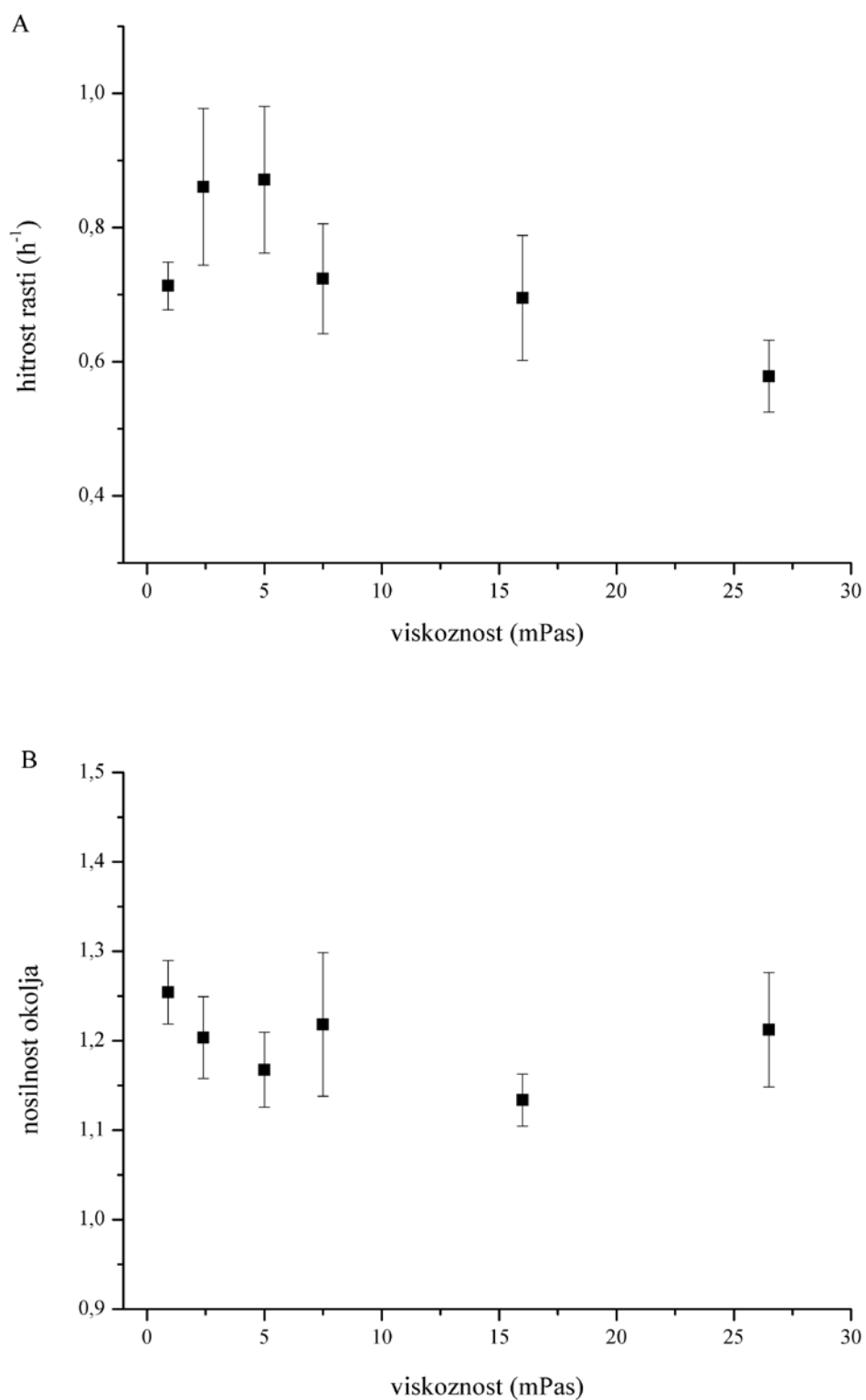
**Preglednica 2:** Viskoznost kultur bakterije *E. coli* po 24 urah rasti v gojiščih z različnimi koncentracijami HMHEC in reološko obnašanje le-teh (n = 5).

Koncentracija HMHEC (% , w/V)	Viskoznost bakterijskih kultur pred inokulacijo (mPas)	Viskoznost bakterijskih kultur po 24 urah rasti (mPas)	Reološko obnašanje
0	0,9 ± 0,01	0,93 ± 0,02	newtonsko
0,2	2,4 ± 0,2	2,42 ± 0,15	pseudoplastično
0,4	5,0 ± 0,5	4,97 ± 0,42	pseudoplastično
0,5	7,50 ± 0,6	7,40 ± 0,61	pseudoplastično
0,75	16,0 ± 0,7	16,08 ± 0,68	pseudoplastično
1	26,5 ± 1,1	26,22 ± 0,76	pseudoplastično

#### 4.2 VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA RAST BAKTERIJE *E. coli*

Na podlagi prejšnjih raziskav (Borić in sod., 2012; Borić, 2013) in literature (Sauer in sod., 2002; Anderl in sod., 2003; Walters in sod., 2003; Borriello in sod., 2004; Resch in sod., 2005; Resch in sod., 2006; Folsom in sod., 2010; Kapetanakou in sod., 2011) smo pričakovali, da bo viskoznost gojišč vplivala na rast bakterije *E. coli*, kar smo eksperimentalno preverili tako, da smo bakterijo *E. coli* gojili v različno viskoznih M9 gojiščih in spremljali optično gostoto kultur.

Hitrosti rasti so bile med 0,6 in 0,9 h<sup>-1</sup>. (Slika 3A). Statistično se je razlikovala hitrost izmerjena pri najvišji viskoznosti (26,5 mPas), kjer je bila hitrost rasti približno 20 odstotkov nižja kot v kontroli. Podobno kažejo tudi rezultati za nosilnosti okolja (Slika 3B) in števila celic z metodo določanja števila kolonij (CFU/mL), ki ne kaže statistično značilnega upada, razen pri viskoznosti 26,5 mPas, ko je končno število celic padlo na  $(1,21 \pm 0,12) \times 10^9$  CFU/mL (podatki niso prikazani).



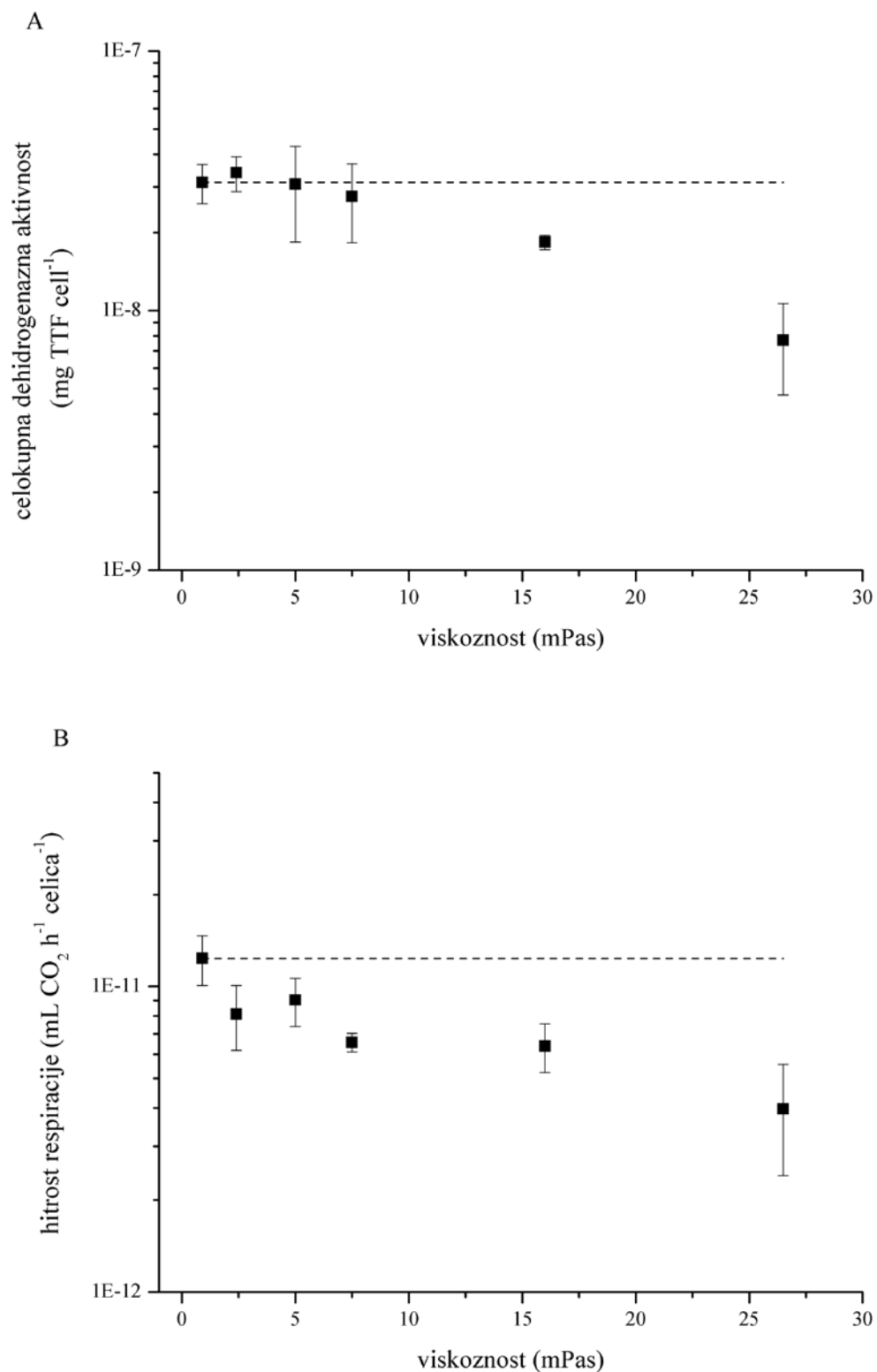
**Slika 3:** Hitrost rasti (A) in nosilnost okolja (B) bakterije *E. coli* MG1655 v različno viskoznih gojiščih. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 5$ ).

Spremembe morfologije bakterijskih celic pri različnih viskoznostih smo preverili s svetlobno mikroskopijo in meritvami velikosti celic. Velikost in morfologija celic se statistično značilno nista spremenili, pri čemer je bila povprečna dolžina celic  $1,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ , povprečna širina pa  $0,83 \pm 0,07 \mu\text{m}$ .

#### 4.3 VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA METABOLIZEM BAKTERIJE *E. coli*

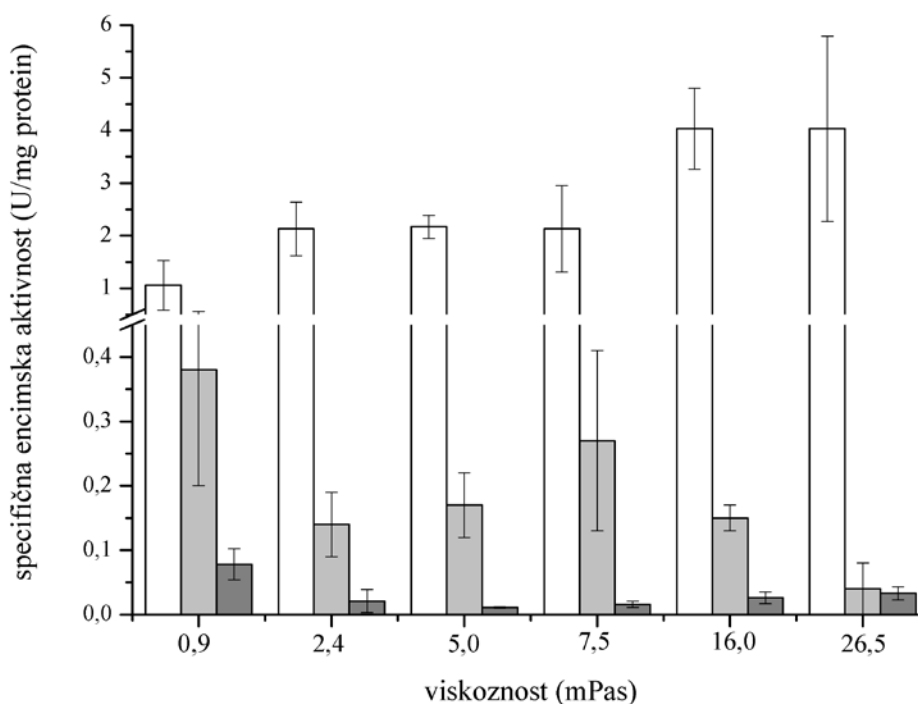
Hipotezo, da viskoznost gojišč vpliva na celokupno metabolno aktivnost ter na pretok ogljika skozi centralne metabolne poti, smo eksperimentalno preverili preko spektrofotometričnega določanja encimskih aktivnosti ter kromatografskega določanja hitrosti endogene respiracije. Slika 4A prikazuje celokupno dehidrogenazno aktivnost bakterije *E. coli*, gojene pri različnih viskoznostih. V rangu viskoznosti med 0,9 in 7,5 mPas ni statistično značilnih razlik, pri čemer so se vrednosti gibale okrog  $3 \times 10^{-8} \mu\text{g}$  TTF na celico. Pri viskoznosti 16 mPas je razviden trend upadanja celokupne dehidrogenazne aktivnosti. Podobno kot pri hitrosti rasti in nosilnosti okolja pa statistično odstopa celokupna dehidrogenazna aktivnost bakterije *E. coli*, gojene pri viskoznosti gojišča 26,5 mPas, ko je bila encimska aktivnost  $7,70 \pm 2,96 \times 10^{-9} \mu\text{g}$  TTF na celico.

V primerjavi z začetno viskoznostjo 0,9 mPas, pri kateri je celokupna dehidrogenazna aktivnost znašala  $31,2 \pm 5,41 \times 10^{-9} \mu\text{g}$  TTF na celico, je to približno štirikrat manj. Dehidrogenaze so encimi, ki so v bakterijskem metabolizmu prisotne tako v glikolizi, kot tudi v ciklu citronske kisline in elektronski transportni verigi. Ker se  $\text{CO}_2$  v največji meri sprošča med glikolizo in ciklom citronske kisline, rezultati obeh testov metabolne aktivnosti bakterij običajno korelirajo (Creach in sod., 2003; Danevčič in Stopar, 2011; Roy in Packard, 2001). Iz Slike 4B je razviden trend upadanja endogene respiracije bakterije *E. coli*, ki glede na najnižjo viskoznost gojišča postane statistično značilen pri viskoznosti 16,0 mPas ali več. Pri najvišji viskoznosti (26,5 mPas) je hitrost endogene respiracije  $4 \pm 1,6 \times 10^{-12} \text{ mL CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ celica}^{-1}$ , kar je približno tretjina hitrosti endogene respiracije pri najnižji viskoznosti.



**Slika 4:** Celokupna dehidrogenazna aktivnost (A) in hitrost endogene respiracije (B) bakterije *E. coli* MG1655 v gojiščih z različno viskoznostjo. Črtnana črta prikazuje metabolno aktivnost pri najnižji viskoznosti. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 5$ ).

Pretok ogljika skozi centralne metabolne poti smo določali preko aktivnosti izbranih glikolitičnih encimov, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (GPD), fosfofruktokinaza (PFK) in piruvat kinaza (PK). Aktivnost encima GPD kaže trend naraščanja z višanjem viskoznosti, pri čemer je glede na vrednost encimske aktivnosti pri viskoznosti 0,9 mPas statistično značilna višja aktivnost GPD pri viskoznosti 16 mPas. Pri 26,5 mPas je encimska aktivnost podobno povišana (znaša približno 4 U na mg proteina), vendar pa zaradi večjega standardnega odklona vrednost ni statistično značilna. Aktivnost encima PK kaže trend padanja z višanjem viskoznosti, pri čemer je bila aktivnost pri 26,5 mPas statistično značilno različna od aktivnosti pri 0,9 mPas in je znašala 0,043 U na mg proteina, kar je 9-krat manj kot pri 0,9 mPas. Aktivnost PFK pri 0,9 mPas je bila  $0,078 \pm 0,024$  U na mg proteina in je pri 2,4 mPas statistično značilno upadla ter se z višanjem viskoznosti ni več spreminjala. Če primerjamo aktivnosti vseh treh glikolitičnih encimov, vidimo, da je bila najvišja aktivnost izmerjena pri encimu glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, medtem ko je bila najnižja aktivnost izmerjena pri encimu fosfofruktokinaza.



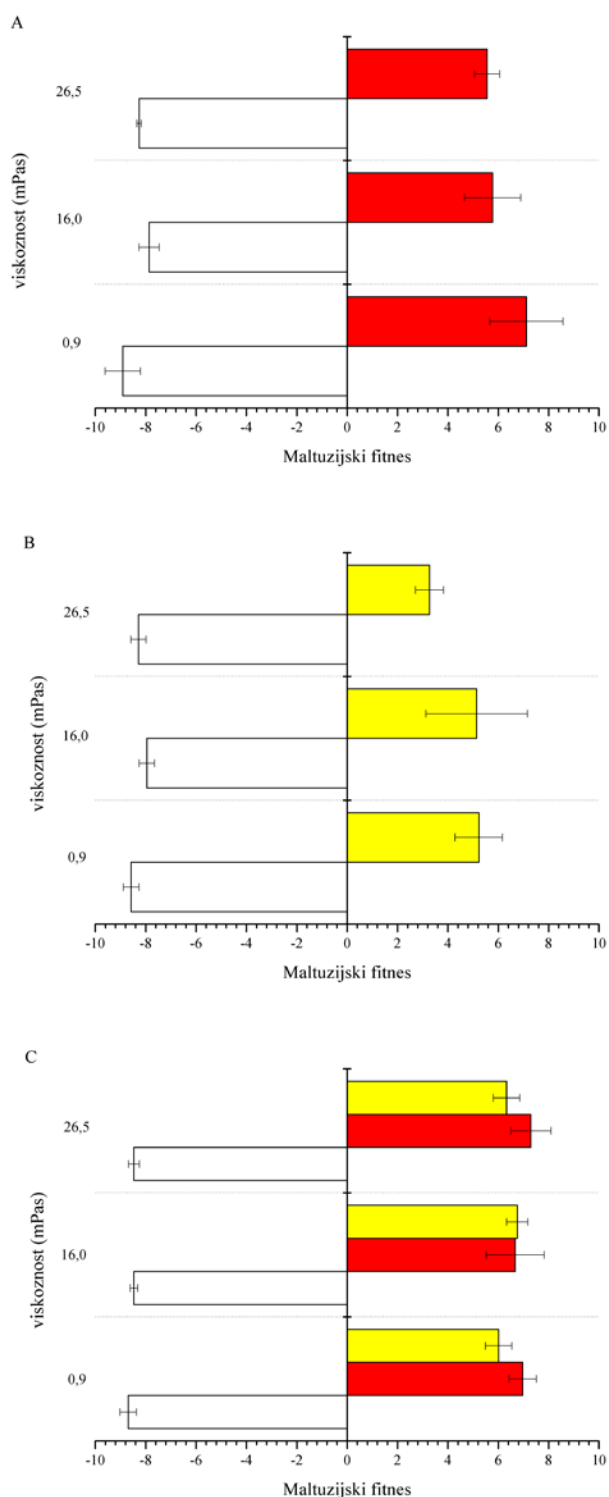
**Slika 5:** Specifična aktivnost posameznih encimov glikolize v celičnih ekstraktih bakterije *E. coli* MG1655, gojene v gojiščih z različno viskoznostjo. Na grafu so prikazane aktivnosti sledečih encimov: glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (beli stolpci), piruvat kinaza (svetlo sivi stolpci) in fosfofruktokinaza (temno sivi stolpci). Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ( $n \geq 3$ ).



#### 4.4 VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA BAKTERIJSKE ODNOSNE V KOKULTURAH

V svojem naravnem okolju se bakterije le redko nahajajo same, zato nas je zanimalo, če viskoznost vpliva na interakcije med bakterijami v kokulturah. Glede na prejšnje raziskave (Borić, 2013) smo predvidevali, da bistvenih razlik v fitnessih bakterij v kokulturah ne bo. Bakterijo *E. coli* smo gojili z bakterijo *V. ruber*, ki proizvaja protibakterijsko delujoč pigment prodigiozin. Kot kontrolo smo uporabili mutanto bakterije *V. ruber* (BM – bela mutanta), ki ne proizvaja pigmenta (Štraser, 2008). Kokulture smo gojili pri treh različnih viskoznostih (0,9, 16,0 in 26,5 mPas). Določili smo Maltuzijski fitness vseh bakterij v kokulturah in opazili, da ima bakterija *E. coli* pri vseh viskoznostih in kombinacijah z vibriji negativen Maltuzijski fitness, ki je bil v rangu med -7,5 in -10, kar kaže na propad celic v kokulturi. Koncentracija prodigiozina je z viskoznostjo padala od 126 do 53 mg/L, vendar je fitness ostal statistično značilno nespremenjen (Slika 6A). Bakteriji *V. ruber* ali nepigmentirana mutanta sta imeli v kokulturi z *E. coli* pozitiven fitness v razponu med +3 in +7, pri tem je imela mutanta nekoliko nižji fitness. Odnos, za katerega so značilni takšni fitnessi, je amenzalizem. Kljub temu, da nepigmentirana mutanta bakterije *V. ruber* ne proizvaja protimikrobnega agensa prodigiozina, pa njena prisotnost onemogoči rast in razmnoževanje bakterije *E. coli* (Slika 6B). Še več, razlike v fitnessih *E. coli* v kokulturi z divjim tipom bakterije *V. ruber* oziroma nepigmentirano mutanto nismo opazili (Slika 6A in 6B), kar nakazuje, da prodigiozin ni edini protimikrobni agens v testiranih kokulturah.

Čeprav se zdi, da prodigiozin nima najpomembnejše vloge pri inhibiciji rasti *E. coli*, pa njegova sinteza od divjega tipa bakterije *V. ruber* zahteva velik energetski vložek, kar bi se lahko poznalo na fitnessu bakterije, ki tekmuje s sorodnim sevom (v našem primeru z belo mutanto *V. ruber* BM) za kolonizacijo ekološke niše. V ta namen smo pripravili trojne kokulture in določili Maltuzijski fitness sevov. Podobno kot v dvojnih kokulturah je imela bakterija *E. coli* izrazito negativen fitness (med -8,5 in -8,7), medtem ko sta imela oba seva bakterije *V. ruber* podoben fitness, ki je bil v rangu med +6 in +7,3 (Slika 6C).



**Slika 6:** Maltuzijski fitness sevov *E. coli* (beli stolpci), *V. ruber* WT (rdeči stolpci) in *V. ruber* BM (rumeni stolpci) v različnih tipih kokultur (A-E. coli in *V. ruber* WT, B-E. coli in *V. ruber* BM, C-E. coli, *V. ruber* WT in *V. ruber* BM) gojenih pri treh različnih viskoznostih gojišč. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Bakterije so neposredno odvisne od okolja, v katerem živijo, in se na spremembe fizikalno-kemijskih dejavnikov hitro odzivajo. Bakterije se lahko znajdejo v različno viskoznih okoljih, npr. v morski vodi, katere viskoznost variira med 0,8 in 1,8 mPas (Fofonoff, 1962) ali v biofilmih, kjer je viskoznost med 1 Pas pa vse do  $10^8$  Pas (Cheong in sod., 2009; Hall-Stoodley in sod., 2004). Med obema omenjenima ekstremoma je veliko srednje viskoznih okolij, na primer človeški mukus, slina ali solze, ki so približno 100-krat bolj viskozne kot voda (Cone, 1999; Lai in sod., 2009). Nedavno objavljeni rezultati kažejo, da je potrebno viskoznost ravnega gojišča (tudi v območju srednje viskoznosti) obravnavati kot pomemben dejavnik okolja, ki lahko vpliva tako na rast in metabolizem različnih bakterij (Borić in sod., 2012; Borić, 2013), zato smo kot modelni organizem za nadaljnje proučevanje bakterijske fiziologije v srednje viskoznih gojiščih izbrali dobro poznano bakterijo *Escherichia coli*. V ta namen smo uporabili že razvite metode za sledenje bakterijske rasti in metabolne aktivnosti ter meritve viskoznosti.

### 5.1 REOLOGIJA GOJIŠČ IN BAKTERIJSKIH KULTUR

Za spreminjanje viskoznosti ravnih gojišč smo pri diplomskem delu uporabili polimer hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza (HMHEC). Meritve so pokazale, da HMHEC v razponu koncentracije od 0 do 1 % (w/V) ne vpliva znatno na pH ali koncentracijo raztopljenega kisika v gojišču (Preglednica 1), kot tudi ne na vodno aktivnost (Borić in sod., 2012).

Polimer HMHEC je zadostoval potrebam diplomskega dela, saj je predvsem vplival na reološke značilnosti gojišč. S tem smo potrdili prvo postavljeno hipotezo. Viskoznost gojišč je bila med 0,9 in 26,5 mPas, kar ustreza srednje viskoznim okoljem (Borić, 2013). Prisotnosti HMHEC je gojišča spremenila iz newtonske tekočine v pseudoplastično. Viskoznost se je po dodatku HMHEC nižala z višanjem strižne hitrosti, strižna napetost pa višala (Slika 1). Ker uporabljen sev *E. coli* MG1655 ni uporabljal HMHEC kot edini vir ogljika in ga tudi ni encimsko razgradil (Slika 2), lahko trdimo, da je HMHEC za to bakterijo inerten polimer. S temi rezultati smo potrdili drugo hipotezo diplomskega dela. Rast bakterija *E. coli* ni vplivala na reologijo gojišča, kar je različno od bakterije

*Vibrio ruber*, ki je med rastjo v HMHEC viskoznost gojišča spreminjala. Kulture v gojiščih s HMHEC so izkazovale pseudoplastično obnašanje. Take reološke značilnosti bakterijskih kultur so že bile opisane pri drugih bakterijah (Al-Asheh in sod., 2002).

## 5.2 VPLIV VISKOZNOSTI GOJIŠČ NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJE *E. coli*

Hitrost rasti se je pri najvišji uporabljeni viskoznosti znižala. Skladno s tem smo zaznali tudi manjše število celic po 24 urah rasti. Celice so ostajale morfološko enake pri vseh viskoznostih gojišč. Kljub relativno majhni spremembi v hitrosti rasti pa je prišlo do relativno velike spremembe v fiziologiji bakterij z višanjem viskoznosti. Aktivnost metabolizma smo spremljali preko endogene respiracije in celokupne dehidrogenazne aktivnosti. Slednja je globalni fiziološki parameter, ki je odvisen od mikrobnega metabolizma v glikolizi, ciklu citronske kisline in elektronski transportni verigi. Naši rezultati kažejo, da se pri viskoznosti 16 mPas ali višji metabolna aktivnost niža, tako na nivoju dehidrogenaz, kot tudi pri produkciji CO<sub>2</sub> (Slika 4). To ni presenetljivo, saj sta ta dva parametra pogosto v korelaciji (Borić in sod., 2012; Creach in sod., 2003; Danevčič in Stopar, 2011; Roy in Packard, 2001). Pretok ogljika skozi različne glikolitične poti smo spremljali preko aktivnosti posameznih encimov, udeleženih pri vstopu v glikolizo (PFK), vstopu v pot pentoze fosfata (GPD) in prehodu iz glikolize v cikel citronske kisline (PK). Aktivnost GPD je naraščala z višanjem viskoznosti gojišč (Slika 5), na podlagi česar lahko sklepamo, da je pretok ogljika skozi pot pentoze fosfata povišan. Ta proces zagotavlja celici redukcijske ekvivalente in ogljikove intermediate za biosintezo. Pot pentoze fosfata se lahko nadaljuje tudi v CCK, vendar rezultati kažejo, da temu ni tako, saj je aktivnost encima PK bistveno nižja od encima GPD. Aktivnost encima PK je z višanjem viskoznosti rahlo padala (Slika 5), kar je v skladu s celokupno dehidrogenazno aktivnostjo in endogeno respiracijo. Najmanj ogljika je šlo skozi EMP pot glikolize, kar sklepamo na podlagi najnižje aktivnosti encima PFK.

Pri bakteriji *E. coli* je torej prišlo do sprememb in prilagoditev na nivoju metabolizma, ko je bila viskoznost gojišč enaka ali višja od 16 mPas. Ta odziv je različen kot pri bakteriji *V. ruber*, kjer se je z višanjem viskoznosti metabolna aktivnost povišala (Borić in sod., 2012; Borić, 2013). Povišana viskoznost za bakterijo *E. coli* nedvomno predstavlja stres, saj se je znižala hitrost rasti, končno število celic in tudi metabolna aktivnost. To je

lahko posledica spremenjene difuzije hranil in omejenega gibanja bakterijskih celic pri povišani viskoznosti. Za *E. coli* je že vrsto let znana t.i. negativna viskotaksa, kar pomeni, da se celice aktivno premikajo stran od viskoznih gojišč (Sherman, 1982). Očitno celice pridobijo manj hranil, zaradi česar sta se zmanjšali hitrost rasti (Slika 3A) in aktivnost metabolizma (Slika 4). Podobnost z odzivom bakterije *V. ruber* smo opazili na nivoju aktivnosti poti pentoze fosfata. Ta ima očitno pomembno vlogo, saj zagotavlja ravnotežje med NADH in NADPH ter številne intermediate za biosintezo. Pri bakteriji *E. coli*, kakor tudi pri bakteriji *V. ruber*, ti niso usmerjeni v spremembo morfologije, saj le-te nismo opazili. Pri nekaterih bakterijah iz rodu *Vibrio* so namreč pokazali, da se pri višjih viskoznostih polarna običkanost spremeni v peritriho, ki naj bi zagotavljala boljše gibanje v viskoznih okoljih. Bakterija *E. coli* je že naravno peritriho običkana, zato je sprememba tipa običkanosti malo verjetna. S tem smo potrdili tretjo hipotezo, da sprememba viskoznosti gojišč vpliva na rast bakterije *E. coli*, metabolno aktivnost in pretok ogljika skozi centralne metabolne poti pri bakteriji *E. coli*. Bakterija *E. coli* se nahaja v prebavnem traktu toplokrvnih sesalcev, kjer je izpostavljena srednje viskoznim tekočinam, zato se njen odziv na povišanje viskoznosti razlikuje od odziva bakterije *V. ruber*, katere naravni habitat so plitve estuarijske in oceanske vode (Shieh in sod., 2003; Stopar in sod., 2004; Borić in sod., 2011).

### 5.3 VPLIV VISKOZNOSTI NA BAKTERIJSKE ODNOSNE V KOKULTURAH

Bakterije so v naravnih okoljih večinoma prisotne v mešanih združbah. Odnosi med bakterijami v naravnih okoljih so zelo pomembni, saj so bakterije sposobne medsebojne komunikacije kot tudi socialnega vedenja. V splošnem glede na fitness posameznih članov kokultur ločimo 4 različne tipe odnosov: simbiozo, amenzalizem, parazitizem in kljubovanje (West in sod., 2007). Viskoznost kot pomemben okoljski dejavnik lahko neposredno vpliva na bakterijsko komunikacijo (Horswill in sod., 2007), kot tudi na interakcije med bakterijskimi celicami (Kummerli e tal., 2009; LeGac in Doebeli, 2010). V diplomskem delu smo preučili bakterijske odnos med bakterijami *E. coli*, *V. ruber* in mutanto bakterije *V. ruber*, ki ne proizvaja prodigiozina. Prodigiozin je produkt sekundarnega metabolizma bakterije *V. ruber*, ki ima raznovrstne lastnosti (bakteriocidne, antikarcinogene, uporaba kot industrijsko barvilo) in deluje protimikrobno na *E. coli*.

Fitnes bakterije *E. coli* je bil v vseh tipih testiranih kokultur vedno negativen, medtem ko sta imela oba vibrija vedno pozitiven fitnes (Slika 6), kar pomeni, da je bil odnos med vibrijema in bakterijo *E. coli* tipa amenzalizem. Za razliko od prejšnjih raziskav (Borić, 2013) smo v diplomskem delu za eksperimente s kokulturami uporabili minimalno gojišče. Tip gojišča bi bil lahko pomemben pri vlogi prodigiozina pri inhibiciji rasti bakterije *E. coli*. V našem primeru ni bilo razlik v fitnesu bakterije *E. coli* v kombinaciji z divjim tipom ali z belo mutanto, medtem ko je v kompleksnem PKS gojišču razlika bila (Borić, 2013). Ker viskoznost gojišča vpliva na produkcijo prodigiozina pri bakteriji *V. ruber* (Borić in sod., 2012; Borić, 2013), smo pri višjih viskoznosti opazili upad koncentracije nastalega pigmenta, kar pa se ni poznalo pri fitnesu bakterije *E. coli*. Rezultati z belo mutanto potrjujejo pričakovanja, da bakterija *V. ruber* proizvaja še neidentificirane spojine, ki delujejo protibakterijsko (Starič in sod., 2010). Znano je, da lahko protibakterijsko delujejo različni sistemi za izločanje, kot na primer tip sekrecije VI pri bakteriji *Vibrio cholerae*, ki učinkovito inhibira bakterijo *E. coli* (MacIntyre in sod., 2010). Prisotnost različnih protimikrobnih mehanizmov ni presenetljiva, saj mikroorganizmi stremijo k izboljšanju svojega preživetja v okolju.

Pri kokulturi, sestavljeni iz treh različnih bakterijskih sevov, smo pričakovali, da bo bela mutanta *V. ruber* izkoristila in zavzela ekološko nišo na račun divjega tipa *V. ruber*, saj le-ta porabi znatno količino celične energije in molekul za biosintezo za produkcijo prodigiozina. Rezultati so pokazali, da se fitnesa obeh bakterij nista statistično značilno razlikovala. Opažen odnos med sevoma je ostajal enak kljub spremembam v viskoznosti rastnega gojišča, podobno kot pri kokulturah, ki so bile sestavljene iz dveh sevov. Ti rezultati nakazujejo, da viskoznost ni imela vpliva na medvrstne odnose. Kljub temu je potrebno omeniti, da je odsotnost vpliva viskoznosti na interakcije med bakterijami lahko posledica izvedbe eksperimenta, saj so se v našem primeru kokulture gojile v tekočih gojiščih, ki so se stresala, medtem ko so bili eksperimenti drugih raziskovalcev izvedeni v poltrdnih ali trdnih gojiščih oziroma v tekočih gojiščih, ki se niso stresali (Kummerli in sod., 2009; LeGac in Doebeli, 2010).

#### 5.4 SKLEPI

Na podlagi eksperimentalno dobljenih rezultatov lahko trdimo, da:

- je hidrofobno modificirana hidroksietil celuloza primeren polimer za spreminjanje viskoznosti rastnih gojišč, saj spremeni le reologijo, ne pa tudi drugih, za rast pomembnih, fizikalno-kemijskih lastnosti gojišč;
- bakterija *E. coli* ni encimsko razgradila hidrofobno modificirane hidroksietil celuloze in ni spremenila reologije rastnih gojišč;
- viskoznost gojišč je vplivala na hitrost rasti, število celic, porabo kisika, metabolno aktivnost in pretok ogljika skozi centralne metabolne poti pri bakteriji *E. coli*, ne pa na nosilnost okolja in morfologijo celic;
- viskoznost ni vplivala na odnose med bakterijami gojenimi v kokulturah; amenzalizem med bakterijo *E. coli* in obema vibrijema ter sobivanje obeh sevov bakterije *V. ruber*.

## 6 POVZETEK

Mikroorganizmi so odvisni od svojega okolja, ki vpliva na njihovo rast in aktivnost. Viskoznost, ki je mera za odpornost tekočine na deformacijo, je eden izmed slabše raziskanih dejavnikov okolja. Vpliv viskoznosti gojišč na rast in delovanje bakterij je bil predhodno opisan pri po Gramu negativni bakteriji *Vibrio ruber*. V diplomskem delu smo preverili, kako viskoznost vpliva na fiziologijo bakterije *Escherichia coli*. Viskoznost smo merili z rotacijskim reometrom, za spreminjanje viskoznosti gojišč pa smo uporabili HMHEC, ki ima mnoge industrijske aplikacije. Preverili smo ali HMHEC lahko spreminja fizikalno-kemijske lastnosti uporabljenega gojišča. Merili smo pH gojišča ter koncentracijo kisika v gojišču. Meritve so pokazale, da HMHEC v razponu koncentracije od 0 do 1 % (w/V) ne vpliva na pH ali koncentracijo raztopljenega kisika v gojišču, kot tudi ne na vodno aktivnost. Polimer HMHEC je s tem zadostil potrebam diplomskega dela, saj je vplival predvsem na reološke značilnosti gojišč. Pokazali smo, da uporabljen sev *E. coli* MG1655 ni uporabljal HMHEC kot edini vir ogljika in ga tudi ni encimsko razgradil. Poleg tega smo pokazali, da so bakterijske celice ostale enake oblike pri vseh viskoznostih gojišč.

Hitrost rasti v odvisnosti od viskoznosti smo spremljali z merjenjem optične gostote ( $OD_{650}$ ) gojišč. Ugotovili smo, da se hitrost rasti pri najvišji viskoznosti zniža. Skladno s tem smo zaznali tudi manjše število celic po 24 urah rasti. Aktivnost metabolizma in pretok ogljika skozi centralne metabolne poti smo spremljali preko endogene respiracije in celokupne dehidrogenazne aktivnosti. Naši rezultati kažejo, da se pri viskoznosti 16 mPas ali višji metabolna aktivnost niža, tako na nivoju skupnih dehidrogenaz kot tudi pri produkciji  $CO_2$ . Statistično značilno se poveča aktivnost encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Z višanjem viskoznosti gojišč je prišlo do prilagoditev na nivoju metabolizma, vendar na drugačen način kot pri bakteriji *V. ruber*, pri kateri se je respiracija povečala. Rezultati kažejo, da povišana viskoznost za bakterijo *E. coli* predstavlja stres, saj se je znižala hitrost rasti, končno število celic in tudi metabolna aktivnost. Proučili smo tudi kako viskoznost vpliva na bakterijske medvrstne odnose. Uporabili smo tri seve: *E. coli*, *V. ruber* in mutanto bakterije *V. ruber*, ki ne proizvaja prodigiozina. Različne tipe kokulture smo gojili pri treh različnih viskoznostih gojišč. Po inkubaciji smo kokulture



nacepili na plošče ter prešteli kolonije, ki so zrasle, in izračunali pripadajoči Maltuzijski fitnes. Viskoznost ni statistično značilno vplivala na odnose med bakterijami gojenimi v kokulturah. Med bakterijo *E. coli* in obema vibrijema obstaja amenzalizem, ne glede na viskoznost okolja. Enako se sobivanje obeh sevov bakterije *V. ruber* z viskoznostjo ne spreminja.

## 7 VIRI

- Ahn H.J., La H.J., Forney L.J. 2006. System for determining the relative fitness of multiple bacterial populations without using selective markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 11: 7383-7385
- Al-Asheh S., Abu-Jdayil B., Abunasser N., Barakat A. 2002. Rheological characteristics of microbial suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30: 67-74
- Anderl J.N., Zahller J., Roe F., Stewart P.S. 2003. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 4: 1251-1256
- Andersen H.W., Solem C., Hammer K., Jensen P.R. 2001. Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and glycolytic flux. *Journal of Bacteriology*, 183, 11: 3458-3467
- Atsumi T., Maekawa Y., Yamada T., Kawagishi I., Imae Y., Homma M. 1996. Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 178, 16: 5024-5026
- Batchelor G.K. 2000. An introduction to fluid dynamics. Cambridge, University Press: 615 str.
- Bentley R., Meganathan R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, 46, 3: 241-280
- Benzer S. 1961. On the topography of the genetic fine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 3: 403-415
- Bessette P.H., Aslund F., Beckwith J., Georgiou G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 24: 13703-13708
- Blount Z.D., Borland C.Z., Lenski R.E. 2008. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 23: 7899-7906
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2012. Viscosity dictates metabolic activity of *Vibrio ruber*. *Frontiers in Microbiology*, 3: 255, doi: 10.3389/fmicb.2012.00255: 12 str.
- Borić M. 2013. Vpliv viskoznosti medija na ekofiziologijo bakterije *Vibrio ruber*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 140 str.

- Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A.M., Ehrlich G.D., Stewart P.S. 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 7: 2659-2664
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Butala M., Klose D., Hodnik V., Rems A., Podlesek Z., Klare J.P., Anderluh G., Busby S.J., Steinhoff H.J., Zgur-Bertok D. 2011. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research*, 39, 15: 6546-6557
- Celli J.P., Turner B.S., Afdhal N.H., Keates S., Ghiran I., Kelly C.P., Ewoldt R.H., McKinley G.H., So P., Erramilli S., Bansil R. 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 34: 14321-14326
- Chen S., Wilson D.B. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg(2+)-contaminated environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 6: 2442-2445
- Cheong F.C., Duarte S., Lee S.-H., Grier D.G. 2009. Holographic microrheology of polysaccharides from *Streptococcus mutans* biofilms. *Rheologica Acta*, 48, 1: 109-115
- Cone R. 1999. Mucus. V: Mucosal immunology. Ogra P.L., Mescecky M., Lamm M.E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. (eds.). San Diego, Academic Press: 43-64
- Cornelis P. 2000. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 450-454
- Cox P.J., Twigg G.I. 1974. Leptospiral motility. *Nature*, 250: 260-261
- Creach V., Baudoux A.C., Bertru G., Rouzic B.L. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 19-28
- Czaran T., Hoekstra R.F. 2009. Microbial communication, cooperation and cheating: quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. *PloS One*, 4, 8: e6655, doi: 10.1371/journal.pone.0006655: 10 str.
- Danevčič T., Rilfors L., Štrancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8
- Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 94 str.

- Danevčič T., Stopar D. 2011. Asymmetric response of carbon metabolism at high and low salt stress in *Vibrio* sp. DSM14379. *Microbial Ecology*, 62: 198-204
- Davey M.E., O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 4: 847-867
- Fofonoff N. P. 1962. Physical properties of sea water. V: The sea -ideas and observations on progress in the study of the seas. Vol 1. Physical oceanography. Hill M.N. (ed.). New York, John Wiley and Sons: 22-27
- Folsom J.P., Richards L., Pitts B., Roe F., Ehrlich G.D., Parker A., Mazurie A., Stewart P.S. 2010. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiology*, 10: 294, doi:10.1186/1471-2180-10-294: 17 str.
- Foster K.R., Bell T. 2012. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Current Biology*, 22, 19: 1845-1850
- 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, doi:10.1186/1471-2180-4-11: 10 str.
- Goosen N., Moolenaar G.F. 2008. Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair*, 7: 353-379
- Greenberg E.P., Canale-Parola E. 1977. Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *Journal of Bacteriology*, 132, 1: 356-358
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2: 95-108
- Horswill A.R., Stoodley P., Stewart P.S., Parsek M.R. 2007. The effect of the chemical, biological and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 371-380
- Howard T.P., Middelhaufe S., Moore K., Edner C., Kolak D.M., Taylor G.N., Parker D.A., Lee R., Smirnov N., Aves S.J., Love J. 2013. Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 19: 7636-7641
- Hudault S., Guignot J., Servin A.L. 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, 49: 47-55

Bidovec B. Fiziološki odziv bakterije *Escherichia coli* v različno viskoznih gojiščih.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2014

---

Ivančič T. 2012. Fiziološki odziv bakterije *Escherichia coli* na periodično spreminjanje temperature. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 81 str.

Ivančič T., Vodovnik M., Marinšek-Logar R., Stopar D. 2009. Conditioning of the membrane fatty acid profile of *Escherichia coli* during periodic temperature cycling. *Microbiology*, 155, 10: 3461-3463

Kapetanakou A.E., Ampavi A., Yanniotis S., Drosinos E.H., Skandamis P.N. 2011. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* *in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiology*, 28: 727-735

Kim B.H., Gadd A.M. 2008. Bacterial physiology and metabolism. New York, Cambridge University Press: 529 str.

Kirby B.J. 2010. Micro- and nanoscale fluid mechanics: Transport in microfluidic devices. Cambridge University Press: 536 str.

Kummerli R., Griffin A.S., West S.A., Buckling A., Harrison F. 2009. Viscous medium promotes cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of The Royal Society. Biological Sciences*, 276: 3531-3538

Lai S.K., Wang Y.Y., Wirtz D., Hanes J. 2009. Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 2: 86-100

Lederberg J., Tatum E.L. 1946. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature*, 158: 558

Lee S.Y. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14, 3: 98-105

Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 2004. Principles in biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. New York, Worth Publishers, Inc.: 1013 str.

Linares J.F., Gustafsson I., Baquero F., Martinez J.L. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 51: 19484-19489

Lindblom G., Rilfors L. 1992. Nonlamellar phases formed by membrane lipids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 41: 101-125

Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.

McCarter L.L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7, 1-2: 18-29

Bidovec B. Fiziološki odziv bakterije *Escherichia coli* v različno viskoznih gojiščih.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2014

---

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428

Moons P., Michiels C.W., Aertsen A. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 3: 157-168

Nakamura S., Adachi Y., Goto T., Magariyama Y. 2006. Improvement in motion efficiency of the spirochete *Brachyspira pilosicoli* in viscous environments. *Biophysical Journal*, 90, 8: 3019-3026

Odić D., Turk V., Stopar D. 2007. Environmental stress determines the quality of bacterial lysate and its utilization efficiency in a simple microbial loop. *Microbial Ecology*, 53, 4: 639-649

Oren A. 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 466, 1-3: 61-72

Padilla L., Krämer R., Stephanopoulos G., Agosin E. 2004. Overproduction of trehalose: heterologous expression of *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1:370-376

Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 19: 5993-6002

Qiu X., Sundin G.W., Chai B., Tiedje J.M. 2004. Survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 after UV radiation exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 11: 6435-6443

Resch A., Leicht S., Saric M., Pasztor L., Jakob A., Gotz F., Nordheim A. 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics*, 6, 6: 1867-1877

Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Gotz F. 2005. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5: 2663-2676

Roy S.O., Packard T.T. 2001. CO<sub>2</sub> production rate predicted from isocitrate dehydrogenase activity, intracellular substrate concentration and kinetic constants in the marine bacterium *Pseudomonas nautica*. *Marine Biology*, 138, 6: 1251-1258

Russo E. 2003. The birth of biotechnology. *Nature*, 421: 456-457

Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184, 4: 1140-1154

- Shieh W.Y., Chen Y.W., Chaw S.M., Chiu H.H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 2: 479-484
- Shigematsu M., Umeda A., Fujimoto S., Amako K. 1998. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 6: 521-526
- Sherman M.Y., Timkina E.O., Glagolev A.N. 1982. Viscosity taxis in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 13, 2: 137-140
- Simčič A. 2011. Biorazgradnja derivatov celuloze z bakterijo *Cellulomonas uda*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 57 str.
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 2: 522-525
- Starič N., Danevcic T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production--a competitive advantage in the environment? *Microbial Ecology*, 60, 3: 592-598
- Stepišnik J. 1997. Fizikalni praktikum I. Ljubljana, Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije: 111 str.
- 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
- Štraser A. 2008. Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.
- Tof I. 1994. Recombinant DNA technology in the synthesis of human insulin. Victoria, Little Tree Pty. Ltd: 12 str.  
<http://www.littletree.com.au/dna.htm> (27. okt. 2013)
- Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune P. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology*, 180, 9: 2442-2449
- Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W., Aebi M. 2002. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 298, 5599: 1790-1793

Bidovec B. Fiziološki odziv bakterije *Escherichia coli* v različno viskoznih gojiščih.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2014

---

Walters M.C. III, Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1: 317-323

West S.A., Griffin A.S., Gardner A. 2007. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 2: 415-432



## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Davidu Stoparju za odlično mentorstvo.

Prof. dr. Romani Marinšek Logar se zahvaljujem za kritično recenzijo diplomskega dela in vse ostale pripombe, ki so pripomogle h kvalitetnejšemu izdelku.

Dr. Maji Borić se zahvaljujem za vso izkazano pomoč pri diplomskem delu.

Hvala Skupini JUB in podjetju Tehnološki raziskovalni center JUB d.o.o., ki sta omogočila uporabo reometra Anton Paar Physica MCR-301.

Zahvaljujem se tudi dr. Janezu Orehku za vso pomoč pri merjenju viskoznosti na Jubovem reometru.

Hvala vsem na Katedri za mikrobiologijo, ki so mi nudili pomoč in podporo.

Zahvaljujem se vodji Knjižnice in INDOK Oddelka za živilstvo ge. Lini Burkan Makivić za natančen strokovni pregled diplomskega dela.

*Hvala Maja*

*Hvala moji družini, hvala Olga in Bojan*

*Hvala tebi Kati*

*Hvala tebi Gaber*

*Hvala tebi Bor*

## PRILOGA A

Velikost celic bakterije *E. coli* gojene pri različnih viskoznostih

Legenda: **d - dolžina** (velikost bakterijske celice, merjeno vzdolžno), **š - širina** (velikost bakterijske celice, merjeno prečno), **velika tiskana latinska črka; A, B, C** (zaporedna oznaka vidnega polja), **velika tiskana arabska številka; 1, 2, ..., 10** (zaporedna oznaka bakterijske celice v dotičnem vidnem polju)

HMHEC	0 %		0,2 %		0,4 %		0,5 %		0,75 %		1 %	
	d (μm)	š (μm)	d (μm)	š (μm)	d (μm)	š (μm)	d (μm)	š (μm)	d (μm)	š (μm)	d (μm)	š (μm)
1 A	1,79	0,81	1,96	0,92	1,85	0,81	1,82	0,88	1,67	0,67	1,85	0,67
2 A	1,84	0,81	1,82	0,81	1,79	0,81	1,75	0,88	1,82	0,80	1,96	0,81
3 A	1,53	0,95	1,85	0,92	1,73	0,81	1,96	0,99	1,79	0,81	1,75	0,73
4 A	1,82	0,83	1,95	0,92	1,82	0,88	1,82	0,73	1,79	0,83	1,85	0,81
5 A	1,90	1,03	1,79	0,81	1,96	0,83	1,70	0,73	1,73	0,81	1,70	0,67
6 A	1,79	0,81	1,90	0,99	1,76	0,81	1,63	0,67	1,82	0,83	1,76	0,81
7 A	1,79	0,98	1,50	0,67	2,01	0,99	1,66	0,83	1,85	0,83	1,79	0,81
8 A	1,95	0,98	1,73	0,81	1,66	0,67	1,96	0,98	1,70	0,67	1,73	0,81
9 A	1,85	0,88	1,67	0,82	1,82	0,88	1,63	0,81	1,66	0,88	1,90	0,88
10 A	1,96	0,92	1,63	0,81	1,90	0,88	1,85	0,83	1,66	0,81	1,79	0,83
1 B	1,96	0,81	1,79	0,81	1,96	0,98	1,79	0,83	1,82	0,83	1,90	0,95
2 B	1,85	0,81	1,82	0,88	1,95	0,83	1,82	0,88	1,79	0,81	1,79	0,81
3 B	1,75	0,95	1,76	0,81	1,98	0,95	1,63	0,69	1,61	0,69	1,96	0,99
4 B	1,85	0,83	1,85	0,92	1,75	0,88	1,75	0,81	1,76	0,69	1,75	0,83
5 B	1,73	1,03	1,79	0,81	1,90	0,95	1,63	0,65	1,70	0,73	1,82	0,81
6 B	1,79	0,81	1,63	0,88	1,85	0,95	1,66	0,65	1,66	0,83	1,85	0,81
7 B	1,92	0,98	1,82	0,81	1,67	0,73	1,82	0,73	1,63	0,81	1,79	0,81
8 B	1,63	0,98	1,79	0,82	1,79	0,81	1,79	0,81	1,82	0,73	1,82	0,67
9 B	1,79	0,88	1,96	0,99	1,79	0,83	1,63	0,65	1,82	0,81	1,98	0,95
10 B	1,95	0,92	1,63	0,83	1,95	0,98	1,73	0,69	1,63	0,73	1,66	0,67
1 C	1,96	0,95	1,96	0,95	1,73	0,81	1,98	0,95	1,61	0,73	1,96	0,99
2 C	1,67	0,73	1,63	0,65	1,79	0,83	1,82	0,83	1,82	0,83	1,84	0,73
3 C	1,61	0,73	1,73	0,81	1,82	0,83	1,70	0,83	1,70	0,80	1,70	0,88
4 C	1,82	0,83	1,79	0,81	1,95	0,98	1,76	0,73	1,73	0,69	1,90	0,81
5 C	1,63	0,65	1,85	0,88	1,96	0,99	1,79	0,81	1,46	0,65	1,67	0,88
6 C	1,73	0,81	1,82	0,81	1,63	0,81	1,75	0,73	1,82	0,88	1,82	0,83
7 C	1,79	0,65	1,98	0,95	1,79	0,83	1,63	0,81	1,82	0,67	1,85	0,81
8 C	1,90	0,92	1,82	0,83	1,82	0,88	1,96	0,92	1,70	0,67	1,76	0,88
9 C	1,96	0,98	1,95	0,98	1,82	0,83	1,82	0,81	1,82	0,88	1,67	0,81
10 C	1,98	0,99	1,96	0,81	1,95	0,98	1,82	0,67	1,61	0,81	1,79	0,83
povp.	1,82	0,87	1,80	0,85	1,84	0,87	1,77	0,79	1,73	0,77	1,81	0,82
odkl.	0,12	0,10	0,12	0,08	0,10	0,08	0,11	0,10	0,09	0,07	0,09	0,09

## PRILOGA B

Parametra nosilnost okolja in hitrost rasti bakterije *E. coli* v odvisnosti od viskoznosti gojišč

Viskoznost (mPas)	Nosilnost okolja	Hitrost rasti (1/h)
0,90 ± 0,02	1,254 ± 0,035	0,713 ± 0,05
2,4 ± 0,2	1,204 ± 0,046	0,861 ± 0,046
5,0 ± 0,4	1,168 ± 0,042	0,871 ± 0,046
7,4 ± 0,6	1,219 ± 0,080	0,724 ± 0,082
16,1 ± 0,7	1,134 ± 0,029	0,695 ± 0,093
26,2 ± 0,8	1,212 ± 0,064	0,579 ± 0,053

## PRILOGA C

Celokupna dehidrogenazna aktivnost bakterije *E. coli* v odvisnosti od viskoznosti gojišč

Viskoznost (mPas)	Celokupna dehidrogenazna aktivnost ( $\mu\text{g TTF/celica}$ )
$0,90 \pm 0,02$	$3,12 \pm 0,54 \times 10^{-8}$
$2,4 \pm 0,2$	$3,40 \pm 0,52 \times 10^{-8}$
$5,0 \pm 0,4$	$3,07 \pm 1,23 \times 10^{-8}$
$7,4 \pm 0,6$	$2,76 \pm 0,93 \times 10^{-8}$
$16,1 \pm 0,7$	$1,83 \pm 0,12 \times 10^{-8}$
$26,2 \pm 0,8$	$7,70 \pm 2,96 \times 10^{-9}$

## PRILOGA D

Koncentracija prodigiozina, ki ga je proizvedla bakterija *V. ruber* v kokulturah pri različnih viskoznostih

Viskoznost (mPas)	Koncentracija prodigiozina v kokulturah (mg/L)	
	<i>E. coli</i> + <i>V. ruber</i> WT	<i>E. coli</i> + <i>V. ruber</i> WT + <i>V. rubber</i> BM
0,9	126,26 ± 2,82	87,15 ± 6,94
7,5	103,91 ± 5,83	71,15 ± 14,12
26,5	52,79 ± 19,80	30,50 ± 13,45