

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna VOGRIČ

**VPLIV TEMPERATURE NA MEDCELIČNO SIGNALIZIRANJE S
ComX PRI BAKTERIJI *Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON INTERCELLULAR
SIGNALLING WITH ComX IN *Bacillus subtilis***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Iztok Dogša in za recenzentko prof. dr. Sonja Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentor: dr. Iztok Dogša

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Iztok Dogša

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Sonja Smole Možina

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Vesna Vogrič se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Vesna Vogrič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.22/.26:579.852.11:577.2.083(043)=163.6
KG *Bacillus subtilis*/komunikacija med celicami/medcelično signaliziranje/vpliv temperature/feromon ComX/odziv toplotnega šoka
AV VOGRIČ, Vesna
SA MANDIČ-MULEC, Ines (mentorica)/DOGŠA, Iztok (somentor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2013
IN VPLIV TEMPERATURE NA MEDCELIČNO SIGNALIZIRANJE S ComX PRI BAKTERIJI *Bacillus subtilis*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 56 str., 6 pregl., 15 sl., 4 pril., 36 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Vpliv temperature na signaliziranje s feromonom ComX pri bakteriji *Bacillus subtilis* trenutno še ni raziskan. V diplomski nalogi smo razvijali metodo za vrednotenje vpliva temperature na medcelično komunikacijo s ComX pri omenjeni bakteriji ter z optimizirano metodo preverili vpliv temperature na to medcelično signaliziranje. Seve *B. subtilis* smo gojili v kompetenčnem gojišču pri različnih temperaturah (24, 37 ter 51,5 °C) in vsebnost ComX v pridobljenih izrabljenih gojiščih preverili posredno z uporabo testerskega seva *B. subtilis* BD2876, ki ne sintetizira ComX, nosi pa zapis za *srfA-lacZ* fuzijo in se odziva na prisotnost ComX. Metodo smo optimizirali na nivoju gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah in sicer smo zmanjšali izhlapevanje gojišča med inkubacijo testerja in temperaturno variabilnost med samim encimskim testom v spektrofotometru. Uspeli smo razviti metodo za posredno detekcijo feromona ComX z eksperimentalno napako manjšo od 10 %. Rezultati merjenja po tej metodi kažejo, da se največja aktivnost *srfA-lacZ* testerskega seva pojavi v izrabljenem gojišču kulture, gojene pri najvišji temperaturi, tj. 51,5 °C. Nekoliko nižja je ta aktivnost v izrabljenem gojišču, pridobljenem pri temperaturi 37 °C, kjer je hitrost rasti bakterij sicer najvišja. Najnižja ekspresija *srfA-lacZ* se je pojavila v izrabljenih gojiščih sevov iz 24 °C. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je potencial izrabljenega gojišča, da sproži izražanje *srfA-lacZ* v pozitivni korelaciji s temperaturo, vendar ne korelira s hitrostjo rasti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22/.26:579.852.11:577.2.083(043)=163.6
CX *Bacillus subtilis*/cell-cell communication/intercellular signalling/effect of temperature/ComX pheromone/heat shock response
AU VOGRIČ, Vesna
AA MANDIČ-MULEC, Ines (supervisor)/DOGŠA, Iztok (co-advisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2013
TI THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON INTERCELLULAR SIGNALLING WITH ComX IN *Bacillus subtilis*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 56 p., 6 tab., 15 fig., 4 ann., 36 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The influence of temperature on signalling with ComX pheromone in *Bacillus subtilis* is not known yet. In this graduation thesis we aimed to develop a reliable method to evaluate the influence of temperature on cell-cell communication with ComX in *Bacillus subtilis* and examine the influence of temperature on ComX signalling. To prepare spent media, *B. subtilis* strains were grown in competence medium at different temperatures. The tester strain *B. subtilis* BD2876, which does not produce ComX, but responds to it and also carries the *srfA-lacZ* gene fusion reporter, was used to evaluate the potential of spent media for induction of the β -galactosidase activity. The method was optimised at several levels involving cultivation of the tester in spent media and minimization of media evaporation during cultivation in microtiter plates. The improvements were made to obtain more constant temperature during the final enzymatic test in the spectrophotometer. The developed method for indirect ComX detection has experimental error below 10 %. Results showed that spent media from the culture grown at 51,5 °C induced the highest *srfA-lacZ* activity and slightly lower activity was detected in spent media obtained from the 37 °C grown culture. Nevertheless, the growth rate of 37 °C culture was the highest. The lowest potency for *srfA-lacZ* induction was detected in spent media obtained from culture grown at 24 °C. From the results we can conclude that the potential of spent media to induce *srfA-lacZ* expression positively correlates with temperature, but does not correlate with the growth rate.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 QUORUM SENSING PRI BAKTERIJAH <i>Bacillus subtilis</i>	3
2.1.1 ComX feromon	3
2.1.2 CSF – kompetenčni in sporulacijski dejavnik	4
2.1.3 Komunikacijski sistem ComQXPA	4
2.1.4 Operon <i>srfa</i>	5
2.2 VPLIVI OKOLJSKIH DEJAVNIKOV	6
2.2.1 Vpliv temperature na izražanje genov pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.2.1.1 Stimulon toplotnega šoka pri bakterijah <i>B. subtilis</i>	8
2.2.2 Vpliv temperature na medcelično signaliziranje	11
2.2.3 Vpliv drugih dejavnikov na medcelično signaliziranje	14
2.2.3.1 Vpliv osmotskega šoka	14
2.2.3.2 Vpliv pH	14
2.2.3.3 Vpliv oksidativnega stresa	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.2.1 Bakterijski sevi	16
3.2.2 Pufri in raztopine	16
3.2.3 Gojišča	18
3.2 METODE	19
3.2.1 Optimizirana metoda testiranja izrabljenih gojišč bakterije <i>B. subtilis</i> , gojene pri različnih temperaturah	19
3.2.1.1 Izbira in vzdrževanje bakterijskih sevov	20
3.2.1.2 Pridobivanje izrabljenih gojišč	20
3.2.1.3 Rast testerskega seva v mikrotitrskih ploščah	21
3.2.1.3.1 Priprava testerskega seva za inokulacijo mikrotitrskih plošč	21
3.2.1.3.2 Priprava mikrotitrskih plošč, inokulacija in rastni pogoji	21
3.2.1.4 Testiranje izrabljenih gojišč – izvedba β -galaktozidaznega testa	23
3.2.1.4.1 Vrednotenje rasti bakterij v mikrotitrskih ploščah in priprava celic za testiranje β -galaktozidazne aktivnosti	23
3.2.1.4.2 Test β -galaktozidazne aktivnosti	23
3.2.2 Uvajanje in testiranje optimizacij	26

3.2.2.1	Optimizacija gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah.....	26
3.2.2.2	Optimizacija izbire seva	28
3.2.2.3	Optimizacija dolžine gojenja testerja za inokulacijo mikrotitrskih plošč	29
3.2.2.4	Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom	29
4	REZULTATI.....	32
4.1	UVAJANJE IN TESTIRANJE OPTIMIZACIJ	32
4.1.1	Optimizacija gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah.....	32
4.1.2	Optimizacija izbire seva.....	33
4.1.3	Optimizacija dolžine gojenja testerja za inokulacijo mikrotitrskih plošč	34
4.1.4	Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom.....	35
4.2	VPLIV TEMPERATURE NA POTENCIAL IZRABLJENEGA GOJIŠČA SEVOV <i>B. subtilis</i> ZA INDUKCIJO AKTIVNOSTI <i>srfA-lacZ</i> OPERONA	37
4.2.1	Vpliv temperature na rast producentskih in testerskih sevov <i>B. subtilis</i> (rastne krivulje ob pridobivanju izrabljenih gojišč)	37
4.2.2	Vpliv izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja, na izražanje <i>srfA-lacZ</i>	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
5.1	RAZPRAVA.....	44
5.1.1	Uvajanje in testiranje optimizacij.....	44
5.1.1.1	Optimizacija gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah.....	44
5.1.1.2	Optimizacija izbire seva	44
5.1.1.3	Optimizacija dolžine gojenja testerja za inokulacijo mikrotitrskih plošč	45
5.1.1.4	Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom	45
5.1.2	Vpliv temperature na potencial izrabljenega gojišča sevov <i>B. subtilis</i> za indukcijo aktivnosti <i>srfA-lacZ</i> operona	46
5.1.2.1	Vpliv temperature na rast producentskih in testerskih sevov <i>B. subtilis</i> (rastne krivulje ob pridobivanju izrabljenih gojišč)	46
5.1.2.2	Vpliv izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja, na izražanje <i>srfA-lacZ</i>	46
5.2	SKLEPI.....	49
6	POVZETEK.....	50
7	VIRI	52
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Stimulon toplotnega šoka pri bakterijah <i>Bacillus subtilis</i> : pregled regulonov, regulatorjev ter glavnih genov toplotnega šoka (Schumann, 2003).....	9
Preglednica 2: Producentški in testerski sevi <i>B. subtilis</i> , uporabljeni v preizkusih.	16
Preglednica 3: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče za plošče 1, 2, 3 pri optimizirani metodi testiranja rabljenih gojišč.	22
Preglednica 4: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče za kontrolno ploščo pri optimizirani metodi testiranja rabljenih gojišč.....	22
Preglednica 5: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče pri optimizaciji seva.....	28
Preglednica 6: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče pri optimizaciji temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom.	30

KAZALO SLIK

Slika 1: Zaznavanje celične gostote in regulacija genetske kompetence z izvenceličnimi peptidi, s ComX feromonom in sporulacijskim dejavnikom - CSF pri <i>Bacillus subtilis</i> (Lazazzera in Grossman, 1998).	5
Slika 2: Razporeditev genov, ki kodirajo sistem za zaznavanje celične gostote pri <i>Bacillus subtilis</i> (Lazazzera in Grossman, 1998).	5
Slika 3: Pregled različnih regulacijskih poti, vključenih v regulacijo kompetence pri bakterijah <i>B. subtilis</i> (Hamoen in sod., 2003).	11
Slika 4: Rast testerskega seva <i>Bacillus subtilis</i> pred optimizacijo rastnih pogojev (gojenje pri 37 °C) in po optimizaciji (gojenje pri 28 °C, dodatni ukrepi proti izgubi gojišča iz jamic mikrotitrne plošče).	33
Slika 5: Vrednosti β -galaktozidaznih aktivnosti v producerskem (PIG) in testerskem (TIG) izrabljenem gojišču pri PS in BD sevih <i>Bacillus subtilis</i> .	34
Slika 6: Primerjava izražanja <i>srfA-lacZ</i> (aktivnost β -galaktozidaze) sevov <i>B. subtilis</i> BD2876 v producerskem (PIG) in testerskem (TIG) izrabljenem gojišču v preizkusih, kjer smo za inokulum uporabili testerski sev v stacionarni fazi rasti (8h) ali v eksponentni fazi rasti (4h).	35
Slika 7: Prikaz β -galaktozidaznih aktivnosti seva <i>B. subtilis</i> BD2876, ki so bile izmerjene po dveh različnih postopkih ob merjenju s spektrofotometrom: postopku A (neoptimizirana metoda) in postopku B (optimizirana metoda).	36
Slika 8: Prikaz β -galaktozidaznih aktivnosti seva <i>B. subtilis</i> BD2876, normiranih na najvišjo vrednost pri neoptimizirani in pri optimizirani metodi merjenja s spektrofotometrom.	37
Slika 9: Rastne krivulje sevov <i>Bacillus subtilis</i> v erlenmajericah pri 37 °C, prikazani sta rastni krivulji za producerski sev BD2833 in testerski sev BD2876.	38
Slika 10: Rastne krivulje sevov <i>Bacillus subtilis</i> v erlenmajericah pri 51,5 °C, prikazani sta rastni krivulji za producerski sev BD2833 in testerski sev BD2876.	39
Slika 11: Rastne krivulje sevov <i>Bacillus subtilis</i> v erlenmajericah pri 24 °C, prikazani sta rastni krivulji za producerski sev BD2833 in testerski sev BD2876.	39
Slika 12: Primer obarvanosti mikrotitrne plošče po izvedbi β -galaktozidaznega testa.	40
Slika 13: Obarvanost kontrolne mikrotitrne plošče po izvedbi β -galaktozidaznega testa.	41
Slika 14: β -galaktozidazne aktivnosti testerskega seva <i>B. subtilis</i> BD2876, gojenega pri različnih koncentracijah producerskega izrabljenega gojišča (PIG), pridobljenega pri različnih temperaturah.	42
Slika 15: Primerjava β -galaktozidaznih aktivnosti / (FIR \times standard) testerskega seva <i>B. subtilis</i> med posameznimi preizkusi v gojiščih, pridobljenih pri treh različnih temperaturah (51,5 °C, 37 °C, 24 °C).	43

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rast testerskega seva PS1010 (*Bacillus subtilis*) v mikrotitrskih ploščah, stresanih na stresalniku za erlenmajerice in stresalniku za mikrotitrskie plošče.

Priloga B: β -galaktozidazna aktivnost testerskega seva PS1010 (*Bacillus subtilis*) v mikrotitrskih ploščah, stresanih na stresalniku za erlenmajerice in stresalniku za mikrotitrskie plošče (določanje najprimernejšega časovnega intervala za prekinitev rasti testerskega seva).

Priloga C: Rastne krivulje testerja BD2876 v mikrotitrskih ploščah pri rasti v mešanici svežega gojišča s 50 % producentnim izrabljenim gojiščem (PIG), v mešanici svežega gojišča s 50 % testerskim izrabljenim gojiščem (TIG) in v 100 % svežem gojišču (SG).

Priloga D: Prikaz β -galaktozidaznih aktivnosti po stolpcih mikrotitrskie plošče pred in po uvedbi optimizirane metode pri merjenju s spektrofotometrom.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A.E. ali A.U.	absorbančna enota (ang. absorbance unit)
AHL	N-acil homoserin lakton
ATP	adenozin trifosfat (ang. adenosine triphosphate)
BD sevi	sevi <i>B. subtilis</i> ferotipa 168 in sicer producentski sev BD2833 in testerski sev BD2876
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CM gojišče	kompetenčno gojišče (ang. competence medium)
ComX	zunajcelični signalni peptid pri <i>B. subtilis</i>
CSF	kompetenčni in sporulacijski dejavnik pri <i>B. subtilis</i> (ang. competence and sporulation factor)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
HSL	homoserin lakton
His/ Leu/ Met	Histidin/ Levcin/ Metionin
IG	izrabljeno gojišče
ME	Millerjeve enote
OD ₄₂₀	optična gostota pri valovni dolžini 420 nm
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid
PIG	izrabljeno gojišče producentskega seva
PS sevi	sevi <i>B. subtilis</i> ferotipa RS-D-2 in sicer producentski sev PS1004 in testerski sev PS1010
RCF	relativna centrifugalna sila (ang. relative centrifugal force)
RNA	ribonukleinska kislina
SG	sveže gojišče (kompetenčno)
t _{gen}	generacijski čas
TBAB gojišče	triptični krvni agar (ang. tryptic blood agar base)
TIG	izrabljeno gojišče testerskega seva

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Bakterije uporabljajo za medcelično signaliziranje majhne molekule, s katerimi lahko zaznavajo celično gostoto populacije ali kvorum (dovoljše število celic, ki povzroči spremembe izražanja določenih genov). Fiziološki odgovor na visoko celično gostoto pri *Bacillus subtilis* vključuje stimulacijo sporulacije in razvoj genetske kompetence - sposobnost prevzema eksogene DNA (Lazazzera in Grossman, 1998). Genetska kompetenca pri *B. subtilis* je pod kontrolo sistema za zaznavanje, ki ga kodira operon *comQXPA*. Signalna molekula ComX je izvencelični peptid, ki se izloča v okolje po modifikaciji s ComQ. Dvokomponentni sistem ComP-ComA zazna ComX feromon in sproži izražanje operona *srfA*, kar vodi v sintezo surfaktina in razvoj kompetence (Bacon Schneider in sod., 2002). Vpliv spreminjanja dejavnikov okolja na delovanje komunikacijskega sistema bakterij je v splošnem slabo raziskan, vpliv temperature na signaliziranje s ComX pa še ni poznan.

V diplomski nalogi smo razvili metodo za sledenje signalne molekule ComX pri *Bacillus subtilis* in preverili vpliv temperature na njeno koncentracijo v izrabljenih gojiščih. Ob tem smo predpostavili, da izrabljeno gojišče in ComX neodvisno vplivata na meritve z novo razvito metodo. Seve *B. subtilis* smo gojili pri različnih temperaturah (24 °C, 37 °C in 51,5 °C) in primerjali vpliv temperature na sintezo feromona ComX v gojišču preko izražanja gena *srfA*. Uporabili smo rekombinantni testerski sev s *srfA-lacZ* fuzijo, ki ne izraža lastnega feromona ComX, se pa nanj odziva in producentni sev, ki ComX producira (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Izvedli smo naslednje sklope eksperimentov: 1. gojenje testerskih in producentnih sevov bakterije *B. subtilis* pri 24 °C, 37 °C in 51,5 °C) in priprava njihovih izrabljenih gojišč, 2. izdelava pripomočkov za zagotavljanje enakomernih rastnih pogojev (vlažnost, temperatura, itd.) v mikrotitrskih ploščah ter pripomočkov za odpravo težav pri merjenju β -galaktozidazne aktivnosti, 3. gojenje testerskih sevov *B. subtilis* v mikrotitrskih ploščah v tekočem CM gojišču z

dodatkom različnih koncentracij producerskega oz. testerskega izrabljenega gojišča pri 28 °C, 4. merjenje β -galaktozidazne aktivnosti s pomočjo spektrofotometra.

Cilji naloge:

- Razviti metodo za zanesljivo določanje odziva komunikacijskega sistema bakterije *Bacillus subtilis* preko merjenja β -galaktozidazne aktivnosti,
- ugotoviti kakšen je vpliv različnih temperatur na izražanje oz. sintezo feromona ComX pri omenjeni bakteriji.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Optimizirana metoda detekcije feromona ComX bo omogočala merjenje količine sintetiziranega feromona z eksperimentalno napako, manjšo od 10 %,
- količina sintetiziranega feromona ComX je v pozitivni korelaciji s temperaturo – pri višji temperaturi se sintetizira več feromona,
- odnos med hitrostjo rasti in sintezo feromona ComX ni premosorazmeren.

2 PREGLED OBJAV

2.1 QUORUM SENSING PRI BAKTERIJAH *Bacillus subtilis*

Quorum sensing oziroma zaznavanje celične gostote je v bakterijskem svetu precej razširjen pojav, ki nadzoruje številne fiziološke procese. *Bacillus subtilis* preko zaznavanja celične gostote uravnava produkcijo protimikrobnih spojin ter vpliva na procese kompetence in sporulacije, z namenom povečanja možnosti preživetja v neugodnih razmerah (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Razvoj kompetence stimulirata dva peptidna feromona, ComX in kompetenčni sporulacijski dejavnik CSF. Kopičita se med eksponentno fazo rasti in poleg kompetence nadzorujeta tudi izražanje genov, udeleženih pri nekaterih drugih procesih (Lazazzera in Grossman, 1998).

2.1.1 ComX feromon

ComX feromon je pri *B. subtilis* glavni izvencelični signalni peptid, ki stimulira odgovor na visoko celično gostoto in razvoj genetske kompetence (Lazazzera in Grossman, 1998). Poleg *Bacillus subtilis* ta post-translacijsko modificiran oligopeptid proizvajajo tudi ostali sorodni bacili. Poznamo več različic feromona ComX. Pri naravnih izolatih bakterij rodu *Bacillus* se kaže izrazit polimorfizem v aminokislinskem zaporedju ComX, je pa pri vseh prisoten triptofanski del. Triptofanski ostanek vsebuje hidrofobno modifikacijo (Bacon Schneider in sod., 2002), modificiran je z izoprenoidom (geranilno ali pa farnezilno skupino). Ta modifikacija je ključna za feromonsko aktivnost, to je nastanek zrelega feromona ComX (Ansaldi in sod., 2002; Okada in sod., 2008).

ComX₁₆₈, s katerim smo izvajali preizkuse (producira ga laboratorijski sev *B. subtilis* ferotipa 168) je peptid, sestavljen iz desetih aminokislin (ADPITRQWGD) (Bacon Schneider in sod., 2002) in je postranslacijsko modificiran s farnezilno skupino (Okada in sod., 2008). Za produkcjo omenjenega feromona sta potrebna 2 gena in sicer *comQ* in *comX*. Gen *comX* kodira prekursor ComX, ki je sestavljen iz 55 aminokislin. Produkcija aktivnega ComX feromona zahteva procesiranje omenjenega prekursorja v 10 aminokislin, modifikacijo triptofanskega konca in eksport iz celice. Pri modifikaciji ComX feromona je

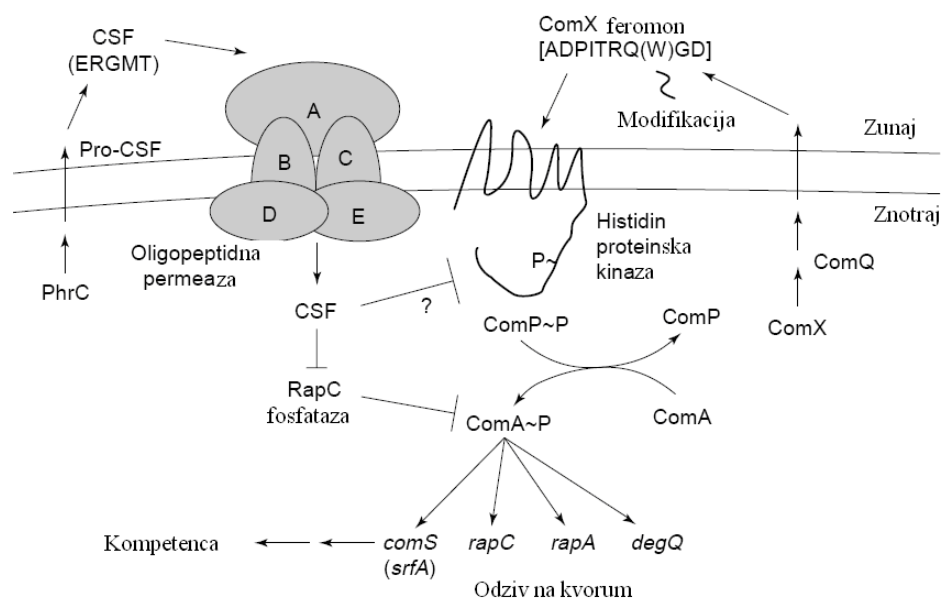
udeležen ComQ. Izvencelična koncentracija ComX feromona igra glavno vlogo pri časovnem usklajevanju odziva na kvorum (Bacon Schneider in sod., 2002).

2.1.2 CSF – kompetenčni in sporulacijski dejavnik

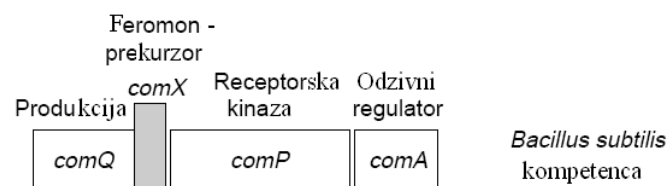
Tudi CSF je izvencelični peptid, ki ga bakterija izloči, nato pa se ta zopet prenese v celično notranjost, kjer vpliva na gensko izražanje. Gre za nemodificiran peptid, sestavljen iz petih aminokislin, ki se izvencelično akumulira, ko pride do visoke celične gostote. Kljub svoji majhnosti je CSF multifunkcionalen in ima vsaj tri različne aktivnosti. Pri nizkih koncentracijah (0,2-5 nM) stimulira izražanje genov, aktiviranih s ComA~P, vključno s kompetenčnim genom *comS*, pri višjih koncentracijah (>20 nM) pa CSF inhibira izražanje gena *comS* ter stimulira sporulacijo (Lazizzera in Grossman, 1998). CSF lahko inducira proteine toplotnega šoka (Hsp), ki celico zaščitijo pred poškodbami (Fujiya in sod., 2007).

2.1.3 Komunikacijski sistem ComQXPA

Za odgovor na ComX feromon sta potrebna membransko vezan protein histidin kinaza ComP in transkripcijski dejavnik ComA. ComP ima domnevno osem v membrano vezanih heliksov in je neposredni receptor za ComX feromon. Hidrofobna modifikacija na feromonu je potrebna za funkcijo in morda lahko pomaga povišati lokalno koncentracijo ComX pri membrani, kjer slednji lahko aktivira ComP. Aktivirana oblika ComP se avtofosforilira in odda fosfat transkripcijskemu faktorju ComA. Fosforilirana oblika ComA aktivira izražanje številnih genov, vključno z genom *comS*, ki je edini gen znotraj operona *srf* potreben za razvoj kompetence. ComS namreč aktivira transkripcijski dejavnik ComK, ki stimulira izražanje proteinov, potrebnih za transformacijo (Lazizzera in Grossman, 1998).



Slika 1: Zaznavanje celične gostote in regulacija genetske kompetence z izvenceličnimi peptidi, s ComX feromonom in sporulacijskim dejavnikom CSF pri *Bacillus subtilis*. V oklepajih zgoraj je prikazano aminokislinsko zaporedje obeh peptidov. ComX feromon kodira gen *comX*, CSF pa gen *phrC* (Lazazzera in Grossman, 1998).



Slika 2: Razporeditev genov, ki kodirajo sistem za zaznavanje celične gostote pri *Bacillus subtilis* (Lazazzera in Grossman, 1998).

2.1.4 Operon *srfA*

Operon *srfA* kodira multifunkcijske encime, ki pri *Bacillus subtilis* katalizirajo biosintezo lipopeptida surfaktina (Nakano in Zuber, 1993). Surfaktin, ki ga proizvaja *Bacillus subtilis*, spada v družino lipopeptidov in je eden izmed najučinkovitejših biosurfaktantov (Abdel-Mawgoud in sod., 2008). Surfaktin ima različne biološke aktivnosti, in sicer protimikrobno, protivirusno, protiglivično in protitumorsko aktivnost, poleg tega deluje tudi kot antikoagulant in ima hemolitično in fibrinolitično aktivnost (Ali in sod., 2010).

Operon *srfA* je potreben tudi za razvoj kompetence in za učinkovito sporulacijo, deluje kot posrednik v regulatorni kaskadi, ki uravna izražanje poznih kompetenčnih genov. Aktiviran je preko zgodnjih kompetenčnih genov *comP*, *comA*, *comQ* in *spo0K*, njegova ekspresija je uravnavana na transkripcijskem nivoju preko dvokomponentnega regulatornega para ComP in ComA, pri tem fosforiliran ComA deluje kot njegov transkripcijski regulator (Nakano in Zuber, 1993). Ključni regulacijski dejavnik, potreben za aktivacijo dodatnih kompetenčnih genov, je gen *comS*, ki se nahaja v operonu *srfA* (Solomon in sod., 1995). Njegovo izražanje je potrebno za aktivacijo transkripcijskega dejavnika ComK, kar vodi v razvoj kompetence (Solomon in sod., 1995).

2.2 VPLIVI OKOLJSKIH DEJAVNIKOV

2.2.1 Vpliv temperature na izražanje genov pri bakteriji *Bacillus subtilis*

Primarni habitat Gram pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* so predvsem tla ter rizosfera (Wipat in Harwood, 1999; Earl in sod., 2008). V tem ekosistemu se *B. subtilis* spopada s spreminjanjem različnih okoljskih dejavnikov. Spremembe v temperaturi predstavljajo ključni dejavnik, ki vpliva na rast celic in verjetno tudi na preživetje teh bakterij v tleh. V laboratorijskih razmerah lahko *B. subtilis* vzdržuje rast v temperaturnem območju od približno 11 °C (Nichols in sod., 1995) do 52 °C (Holtmann in Bremer, 2004). Prilagoditveni odzivi celic se sprožijo, ko se temperatura naglo zviša ali zniža v tem temperaturnem intervalu ali kadar celice gojimo dlje časa blizu zgornje ali spodnje meje omenjenega temperaturnega intervala. Spremembe v izražanju genov, ki se pojavijo po hitrem zvišanju temperature, so znane pod skupnim imenom kot odziv toplotnega šoka (Budde in sod., 2006). Ta odgovor pripelje do indukcije podskupine genov, imenovanih geni toplotnega šoka (»heat shock« geni), ki kodirajo proteine toplotnega šoka (»heat shock« proteine oz. »Hsp«) (Schumann, 2003).

Že Arnosti in sod. (1986) so ugotovili, da prenos celic *B. subtilis* iz 37 na 50 °C zaustavi sintezo večine celičnih proteinov in da vodi do indukcije vsaj 26 različnih proteinov po

približno 3 minutah po izpostavitvi. Temperaturni šok pri *B. subtilis* povzroči očitno povečanje sinteze majhnega števila proteinov toplotnega šoka, indukcija sinteze teh proteinov pozitivno korelira z dvigom temperature. Sinteza večine proteinov toplotnega šoka se ustali po 20-40 min po šoku. Temperaturni stres in nekatere druge oblike okoljskega stresa inducirajo sintezo značilnega seta proteinov pri skoraj vseh organizmih (Arnosti in sod., 1986). Tudi Hellman in sod. (2001) poročajo, da v odgovoru na toplotni stres *Bacillus subtilis* aktivira transkripcijo več kot 100 različnih genov. Ugotavljajo, da prenos *B. subtilis* iz 37 na 48 °C sproži zelo obsežen transkripcijski odgovor, ki je koordiniran s strani številnih različnih transkripcijskih dejavnikov. Več kot 5 % transkripcijsko aktivnih genov je induciranih vsaj trikrat bolj kot sicer in več kot 10 % genoma kaže izmerljivo indukcijo v odgovoru na toplotni šok (Hellman in sod., 2001).

Proteini toplotnega šoka omogočajo celici, da obvladuje stres zaradi visoke temperature. Večina teh proteinov spada v enega izmed dveh razredov in sicer molekulske šaperone ali od ATP odvisne proteaze. Največji problem za celico pri nenadnem toplotnem šoku je takojšen pojav denaturiranih in napačno zviti proteinov, ki so nagnjeni k agregaciji. To preprečijo šaperoni, ki spoznajo nepravilne strukture proteinov, se vežejo na polipeptidne verige in poskrbijo za to, da se polipeptidi pravilno zvijejo in sestavijo v celici. Zraven pa sodelujejo še proteaze, ki razgradijo tiste denaturirane proteine, ki se ne morejo ponovno zviti v njihovo prvotno 3-dimenzionalno strukturo (Schumann, 2003).

Indukcija stresnih proteinov je pomembna komponenta prilagoditvene mreže pri *Bacillus subtilis*. Različni tipi stresov kot so npr. temperaturni šok, osmotski stres, etanol, pomanjkanje kisika ali hranil, inducira enak set proteinov, imenovanih splošni stresni proteini. Njihova naloga je splošna, nespecifična zaščita celice pred neugodnimi razmerami. Poleg nespecifičnih splošnih stresnih proteinov zunanji stresni dejavniki inducirajo tudi set specifičnih stresnih proteinov, ki lahko zagotovijo zaščito pred specifičnim stresnim dejavnikom (Hecker in sod., 1996).

Pri *Bacillus subtilis* lahko definiramo več različnih skupin genov, ki se inducirajo pri visoki temperaturi, ločimo jih po regulatornih značilnostih (Hecker in sod., 1996). Veliko teh genov je del splošnega stresnega regulona, ki je pod kontrolo sigma dejavnika, σ^B ,

drugi so pod kontrolo regulatorjev toplotnega šoka HrcA in CtsR (Hellman in sod., 2001). Geni, kot so *lon*, *clpC*, *clpP* in *ftsH*, ki kodirajo toplotno inducibilne proteaze/šaperone, spadajo v posebno skupino genov splošnega stresa. Odzivajo se lahko na različne stresne dejavnike, vključno s temperaturnim stresom, neodvisno od σ^B ali CIRCE elementov (gre za obrnjene ponovitve, ang. controlling inverted repeat of chaperone expression). Indukcija teh genov zaradi stresa se pojavi na promotorjih, ki jih domnevno prepozna σ^A in verjetno vključuje dodatne regulatorne elemente (Hecker in sod., 1996).

Hellman in sod. (2001) so spremljali celoten transkripcijski odziv na toplotni šok in ugotovili močno indukcijo od σ^B odvisnih genov z značilno hitro indukcijo, čemur je sledila vrnitev na prvotno raven. Aktivacija σ^B regulona je največja komponenta odgovora na toplotni šok pri *B. subtilis*. Izmerili so indukcijo 70 poznanih ali predhodno predlaganih članov σ^B regulona in identificirali dodatnih 72 kandidatov kot članov σ^B regulona.

Tudi regulona HrcA in CtsR sta inducirana, vendar s počasnejšo kinetiko. Identificirali so številne gene, ki niso bili člani do tedaj znanega regulona toplotnega šoka. Opazno so zaznali zelo močno indukcijo biosinteze arginina in transportnih operonov. Analiza transkripcijskega profila *B. subtilis* po toplotnem šoku je razkrila poznane regulone toplotnega šoka, vključno z velikim od σ^B odvisnim splošnim stresnim regulonom, skupaj s številnimi operoni, za katere ni bilo pričakovano, da so temperaturno inducibilni. Med temi so prevladujoči operoni, ki so vključeni v biosintezo in transport arginina (Hellman in sod., 2001). Holtman in sod. (2004) so ugotovili, da lahko pri izpostavljenosti *B. subtilis* temperaturam blizu njegove zgornje temperaturne meje v povišanih koncentracijah zaznamo proteine toplotnega šoka kot so GroEL, GroES, DnaK in GrpE (Holtmann in sod., 2004).

2.2.1.1 Stimulon toplotnega šoka pri bakterijah *B. subtilis*

Geni toplotnega šoka pri evbakterijah so organizirani v številne razrede oz. regulone. Vsak razred je reguliran s pomočjo določenega transkripcijskega regulatorja, ki je lahko alternativni sigma dejavnik, transkripcijski aktivator ali pa transkripcijski represor. Vsi reguloni posamezne vrste skupaj sestavljajo stimulon toplotnega šoka (Schumann, 2003).

Stimulon toplotnega šoka pri *Bacillus subtilis* je v primerjavi z do sedaj znanimi stimuloni drugih bakterijskih vrst najbolj zapleten (Schumann, 2003). Kodira več kot 200 genov toplotnega šoka, ki so regulirani preko vsaj 6 različnih mehanizmov, torej spadajo k vsaj 6 razredom oz. regulonom. Dva razreda sta nadzorovana preko 2 transkripcijskih represorjev, en razred preko alternativnega sigma faktorja, četrti razred preko še vedno neznanega transkripcijskega aktivatorja, peti pa preko 2-komponentnega sistema za prenos signala. Obstaja še približno 80 dodatnih genov toplotnega šoka, ki sestavljajo šesti razred (Schumann, 2003).

B. subtilis ima prefinjeno mrežo regulonov toplotnega stresa in čeprav vsi reguloni reagirajo na toplotni stres, se lahko nekateri od njih odzivajo tudi na druge stresne dejavnike, npr. na stradanje ogljika, fosfata in kislinski stres (geni razreda II) ali sekrecijski stres (geni razreda V) (Schumann, 2003). Razlog za takšno kompleksnost regulonov pri *B. subtilis* je najbrž ta, da je *B. subtilis* tipična talna bakterija in je tako izpostavljena temperaturnim nihanjem in drugim stresom za razliko od *E. coli*, ki jo najdemo v črevesju (stimulon toplotnega šoka pri *E. coli* je sestavljen le iz 2 regulonov, iz σ^{32} in iz σ^E regulona, pri čemer je večina genov toplotnega šoka članov σ^{32} regulona (Schumann, 2003).

Vsi geni toplotnega šoka pri *B. subtilis* so izraženi na nizki stopnji pri 37 °C in prehodno inducirani pod pogoji toplotnega šoka (hiter dvig temperature na 48 – 50 °C). Indukcija genov toplotnega šoka se najprej pojavi na nivoju transkripcije. Omenjeni geni predstavljajo več kot 7 % transkripcijsko aktivnih genov in so v odgovoru na toplotni šok inducirani vsaj 3-krat. Odgovor na toplotni šok postane zaznaven že v prvi minuti po izpostavitvi toplotnemu stresu (Schumann, 2003).

Preglednica 1: Stimulon toplotnega šoka pri bakterijah *B. subtilis*: pregled regulonov, regulatorjev ter glavnih genov toplotnega šoka (Schumann, 2003).

Razred	Ime regulona	Regulator	Funkcija glavnih genov toplotnega šoka
I	HrcA	HrcA represor	Molekularni šaperoni
II	σ^S	Sigma faktor	Splošni stresni proteini
III	CtsR	CtsR represor	ATP-odvisne proteaze*
IV	HtpG	?	Molekularni šaperoni
V	CssRS	CssS kinaza, CssR odzivni regulator	Membransko zasidrane proteaze
VI	?	?	Različne funkcije

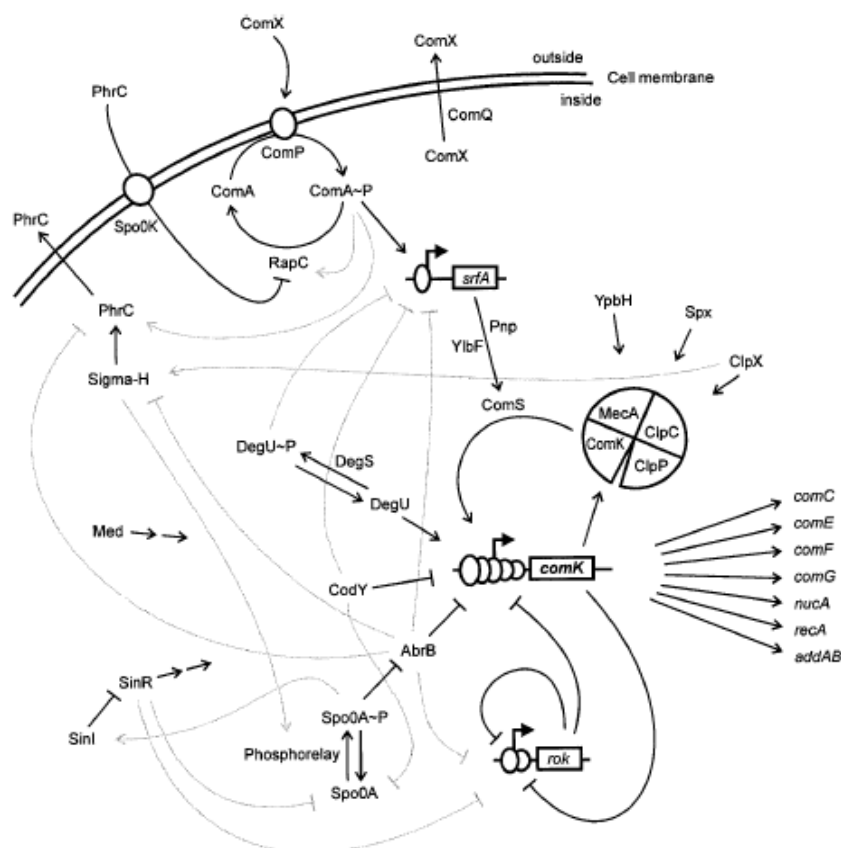
*ATP, adenozin trifosfat

Celični termometri in termosenzorji

Raziskave indukcijskih mehanizmov genov toplotnega šoka so razkrile 2 zelo različna regulatorna principa z različnimi izidi, direktno in indirektno zaznavanje toplote. Direktni senzorji toplote so RNA ali proteinske molekule, ki spremenijo konformacijo v odvisnosti od temperature, medtem ko so do sedaj znani indirektni senzorji toplote molekulski šaperoni, ki so vključeni v uravnavanje aktivnosti transkripcijskih regulatorjev in se vežejo z nenaravno zvitimi proteini. Četudi se izražanje genov toplotnega šoka, ki so pod nadzorom direktnih sensorjev nadaljuje na visoki stopnji dokler so celice izpostavljene visoki temperaturi (ti geni se ne izključijo), so tisti, ki so regulirani s strani indirektnih sensorjev, inducirani prehodno, kar pomeni, da mora regulatorni mehanizem zagotoviti vrnitev v prvotno stanje, tudi če so celice izpostavljene visoki temperaturi dlje časa. Za ločitev teh 2 mehanizmov se predlaga poimenovanje direktnih sensorjev kot termosenzorji in indirektnih sensorjev, ki vključujejo številne komponente kot celični termometri. Z nekaj izjemami so geni toplotnega šoka inducirani začasno in so pod kontrolo celičnih termometrov (Schumann, 2003).

Povezava med kompetenco in proteini toplotnega šoka

Med proteini toplotnega šoka in razvojem kompetence, ki je uravnavana s ComQXPA sistemom, obstaja določena povezava. Turgay in sod. (1997) so ugotovili, da protein toplotnega šoka ClpC pri bakterijah *B. subtilis* nadzoruje aktivnost kompetenčnega transkripcijskega faktorja ComK. ClpC naj bi ob prisotnosti ATP tvoril kompleks z MecA in ComK, zaradi česar naj bi se ComK ne mogel vezati na specifično DNA tarčo. Po dodatku ComS pa naj bi ta kompleks disociral in tako sprostil ComK (Turgay in sod., 1997). Kasneje so ugotovili, da dodatek ClpP h kompleksu sproži degradacijo ComK, sinteza ComS pa ščiti ComK pred razgradnjo (Hamoen in sod, 2003).



Slika 3: Pregled različnih regulacijskih poti, vključenih v regulacijo kompetence pri bakterijah *B. subtilis* (glavne poti so označene s temnejšimi črtami). V regulacijo sta vpeta tudi proteina toplotnega šoka ClpC in ClpP, ki tvorita kompleks s ComK (Hamoen in sod., 2003).

2.2.2 Vpliv temperature na medcelično signaliziranje

Pri bakterijah *B. subtilis* je regulatorna pot kompetence prepletena z regulatorno potjo odgovora na toplotni šok, prav tako pa tudi z regulatornimi potmi ostalih odgovorov na stres, kot so SOS odgovor, gibanje, sporulacija ter izločanje encimov za razgradnjo. Interakcija med temi potmi poteka na številnih mestih. Le manjše število regulatornih genov je specifičnih za posamezen odgovor na stres (Dubnau in Turgay, 2000).

Dokazano je, da lahko sestava hranil in okolje v katerem se bakterije nahajajo (npr. pH, temperatura) vplivajo na medcelično signaliziranje (Medina-Martinez in sod., 2006) pri nekaterih po Gramu negativnih bakterijah. Vpliv temperature na medcelično signaliziranje

pri bakterijah sicer ni dobro preučen, predvsem je v zvezi s tem malo znanega pri Gram pozitivnih bakterijah, kamor sodi tudi *Bacillus subtilis*. Podatkov o vplivu temperature na izražanje feromona ComX pri *B. subtilis* v znanstveni literaturi ni zaslediti.

V raziskavi, ki so jo opravili Ohno in sod. (1995), so preučevali vpliv temperature na proizvodnjo surfaktina pri bakterijah *B. subtilis*, s čemer bi morda lahko potegnili določene vzporednice s ComQXPA sistemom za zaznavanje kvoruma pri omenjeni bakteriji, saj ima ComX preko ComA-P pozitiven vpliv na izražanje surfaktina. Vpliv temperature so preučevali pri sevu *B. subtilis* RB14 med fermentacijo stranskega produkta sojinega tofuja, ki je bil uporabljen kot trden substrat. Temperatura gojenja sevov je variirala od 23 do 48 °C, pri tem se je izkazalo, da je bila optimalna temperatura za produkcijo surfaktina 37 °C. Ugotovili so, da se je produkcija surfaktina povečevala do temperature 37 °C, nad to temperaturo pa se je produkcija znižala (Ohno in sod., 1995).

Več raziskav v zvezi s temperaturno odvisnostjo sistema za zaznavanje celične gostote je bilo opravljenih pri po Gramu negativnih bakterijah. Pri slednjih so preiskovali predvsem temperaturni vpliv na produkcijo signalnih molekul, imenovanih N-acil-L-homoserin laktoni (AHL), ki jih Gram negativne bakterije uporabljajo pri medcelični komunikaciji.

Medina-Martinez in sod. (2006) so pri bakteriji *Aeromonas hydrophila* preverjali vpliv temperature na kinetiko produkcije N-butanoil-L-homoserin laktonov (C4-HSL), glavnih AHL pri tej bakteriji. Bakterije *A. hydrophila* so gojili pri temperaturah 12, 22, 30 in 37 °C. Študija je potrdila produkcijo C4-AHL pri 22 in 30 °C, izmerili so jo po 20-24 urah inkubacije. Pri teh dveh temperaturah je bilo opazno progresivno povečanje C4-HSL v času. Pri temperaturi 12 °C so produkcijo C4-HSL zaznali šele po 70 urah inkubacije, slednja je bila nižja kot pri 22 oz. 30 °C. Proizvodnja C4-HSL je bila največja pri 22 °C, nekoliko manjša pri 30 °C in najnižja pri 12 °C. Kljub nižji koncentraciji C4-HSL pri 12 °C ta temperatura ni bila inhibitorna za produkcijo omenjenih signalnih molekul. Pri temperaturi 37 °C avtorji niso zasledili produkcije C4-HSL, čeprav je bila gostota populacije dovolj visoka za zaznavo le-teh (Medina-Martinez in sod., 2006).

Latour in sod. (2007) so pri preučevanju termoregulacije zaznavanja kvoruma s homoserin laktoni (HSL) pri psihrotrofni bakteriji mehke gnilobe *Pectobacterium atrosepticum* ugotovili, da rastna temperatura signifikantno vpliva na produkcijo HSL. Produkcija je bila optimalna pri 24 °C, signifikanten nivo HSL so izmerili tudi pri 12 °C in celo pri 8 °C. Pri višjih temperaturah, to je pri 28 °C, pa se je pojavil negativen efekt. Ugotovili so, da pri odzivu na temperaturo sodeluje *expI*, ki kodira HSL sintetazo, na temperaturo občutljivi sigma dejavniki in male sRNA, ki bi naj delovali kot termosenzor. Termoregulacija zaznavanja kvoruma pri tej bakteriji se razlikuje od termoregulacije glavnih virulenčnih dejavnikov (Latour in sod., 2007).

McGowan in sod. (2005) poročajo o prekinitvi produkcije antibiotika karbapenema in zmanjšanju koncentracije signalnih molekul 3-oxo-C6-HSL v supernatantu kulture bakterije *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Ecc) pri temperaturi 37 °C. Ugotavljajo, da bi vpliv rastne temperature na produkcijo karbapenema pri Ecc lahko bil posredovan preko sistema za medcelično komunikacijo (Barnard in sod., 2007).

Tait in sod. (2010) so preučevali temperaturno odvisnost produkcije in inhibicije signala za medcelično komuniciranje pri bakterijah iz rodu *Vibrio*. Zanimivo je, da se je vpliv temperature na produkcijo signalnih molekul AHL med izolati precej razlikoval. Pri bakterijah *V. harveyi* je pri višjih temperaturah prišlo do razgradnje molekul AHL. Pri nekaterih sevih je produkcija AHL ostala nespremenjena pri temperaturah 18 °C, 25 °C in 30 °C, pri drugih sevih pa se je produkcija teh molekul zmanjšala z zvišanjem temperature (Tait in sod., 2010).

Raziskave o vplivu temperature na zaznavanje kvoruma z AHL molekulami so bile opravljene tudi pri bakteriji *Yersinia pseudotuberculosis*. Zaradi temperature, ki je kot ključni okoljski dejavnik odgovorna za regulacijo izražanja virulenčnih dejavnikov pri rodu *Yersinia*, so Yates in sod. (2002) preučevali produkcijo AHL v stacionarni fazi kultur, ki so rastle 24 ur pri 22 °C, 28 °C in 37 °C. Ugotovili so, da je raven AHL močno odvisna od rastne temperature. Količina omenjenih molekul je bila najvišja pri 22 °C, znatno se je znižala pri 28 °C in bila skoraj nezaznavna pri rasti na 37 °C. Prvotno so ti rezultati nakazovali na to, da bi lahko bila ekspresija oz. funkcija odgovarjajoče AHL sintetaze ali

razpoložljivost substrata temperaturno odvisna, iz česar bi lahko zaključili, da je zaznavanje kvoruma temperaturno odvisno. Vendar je bila znižana raven AHL najverjetneje posledica povečane stopnje od pH odvisne hidrolize signalnih molekul. AHL obroč je namreč zelo občutljiv na od pH odvisno laktonolizo, ki se pojavi zaradi alkalnega pH (ta lahko nastane kot posledica metabolizma bakterij) in se povečuje z višanjem temperature (Yates in sod., 2002).

V preizkusu, ki so ga opravili Yates in sod. (2002), je dvig temperature od 22 do 37 °C povečal stopnjo odpiranja oz. inaktivacije obročev AHL tako pri bakterijah *Pseudomonas aeruginosa* kot pri *Yersinia pseudotuberculosis*. Rezultati iz te raziskave kažejo da pri bakterijah, ki uporabljajo od AHL odvisno zaznavanje kvoruma, lokalni pH in temperatura ključno vplivata na koncentracijo AHL (Yates in sod., 2002).

2.2.3 Vpliv drugih dejavnikov na medcelično signaliziranje

2.2.3.1 Vpliv osmotskega šoka

Vpliv osmotskega šoka na zaznavanje celične gostote je bolje preučen pri Gram negativnih bakterijah. Hitra logaritemska rast, najustreznejši vir ogljika, nizek pH in visoka osmolarnost imajo za posledico povečano produkcijo signalnih molekul pri *E. coli* in *S. typhimurium*. Nasprotno pa stacionarna faza rasti, pomanjkanje najprimernejšega vira ogljika, nevtralen pH in nizka osmolarnost sprožijo zmanjšanje koncentracije signala avtoinduktorjev AI-2 (Surette in sod., 1999).

2.2.3.2 Vpliv pH

Ohsawa in sod. (2006) so preverili vpliv pH kulture na produkcijo surfaktina pri *B. subtilis*, ki je rasel ob prebitku glukoze in glutamina. Dodatek glukoze in glutamina v presežku rastnemu mediju inhibira izražanje mnogih poznih genov, vključno s *srf*. Pokazali so, da dvig pH kulture sprosti represijo glukoze-glutamina na surfaktinsko produkcijo. Izražanje

srf operona (ki kodira surfaktin sintetazo in kompetenčni regulatorni protein ComS) pri *Bacillus subtilis* je bilo zmanjšano v sporulacijskem gojišču z dodatkom glukoze in glutamina, pri katerem je pH kulture na koncu rasti znašal 5 ali manj. Zmanjšana je bila tudi produkcija podenot surfaktin sintetaze in produkcija samega surfaktina. Izražanje *srfA-lacZ*, ki se proti koncu eksponentne faze navadno poveča, je ostalo skoraj na enakem nivoju kot na sredi logaritemske faze. Dvig pH do skorajšnje nevtralnosti po dodatku pH stabilizatorja je imel za posledico dramatično povečanje izražanja *srfA-lacZ* in produkcije surfaktina. Ugotovili so, da je za od pH odvisno indukcijo izražanja *srf* potreben Spo0K (kodira permeazo, ki igra vlogo pri od celične gostote odvisni kompetenci in sporulaciji). CSF faktor, ki v odvisnosti od Spo0K regulira izražanje *srf*, pri tem ni potreben (odstranitev CSF z delecijo *phrC* gena ne oslabi indukcije izražanja *srf* zaradi dviga pH, čeprav nivo ne doseže tistega kot pri divjem tipu). Maksimalno izražanje *srf* tako pri nizkem kot pri nevtralnem pH zahteva ComP-ComA signalni sistem in domnevno ComX feromon. Rezultati nakazujejo, da je izražanje *srf* ob odgovoru na spreminjanje pH odvisno od Spo0K in še neidentificiranega izvenceličnega faktorja (Cosby in sod., 1998).

2.2.3.3 Vpliv oksidativnega stresa

V raziskavi, ki so jo opravili Hayashi in sod. (2005), so ugotovili, da je ekspresija operona *srfA* pri *Bacillus subtilis* zmanjšana pri obdelavi bakterijske kulture s H₂O₂. Slednji inaktivira PerR in s tem inhibira izražanje *srfA* gena. Vloga PerR pri ekspresiji *srfA* je neodvisna od drugih poznanih regulatorjev ekspresije *srfA*, kot so sistemi ComQXP, RapC-CSF in ClpXP-Spx (Hayashi in sod., 2005).

Oksidativni stres pa vpliva tudi na izražanje *comQXP* pri *Bacillus subtilis*. Mutanta v *sodA* (gen *sodA* kodira superoksid dismutazo), ne izraža *srfA* in ne preide v stanje kompetence. Transkripcija *comQXP* operona se zniža tudi ob dodatku parakvata, ki povzroči nastanek superoksidov. RapC-CSF in ClpXP-Spx sistema naj ne bi bila vključena pri učinku *sodA* na izražanje gena *srfA* (Ohsawa in sod., 2006). Inhibicija produkcije surfaktina med oksidativnim stresom bi naj bila posledica inhibicije od ComX odvisnega sistema za zaznavanje celične gostote (Ohsawa in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.2.1 Bakterijski sevi

V preizkusih smo uporabljali laboratorijske seve *Bacillus subtilis* 168 in sicer seva PS1004 in PS1010, ki nosita genski zapis za comQXPA lokus ferotipa RS-D-2 ter seva BD2833 in BD2876, ki nosita zapis za ferotip 168 (Preglednica 2). Seva PS1004 in BD2833 sta producentna seva, ki proizvajata feromon ComX in se nanj odzivata preko genske fuzije *srfA-lacZ*. Seva PS1010 in BD2876 sta testerna seva, ki nista sposobna sinteze aktivnega feromona ComX zaradi delecije gena *comQ*, se pa na ta feromon odzivata, ravno tako z indukcijo *srfA-lacZ*. Poleg naštetih značilnosti so vsi uporabljeni sevi med sabo izogeni in so auksotrofi za histidin, leucin in metionin.

Preglednica 2: Producentni in testerna seva *B. subtilis*, uporabljeni v preizkusih.

Sev	Genotip	Ferotip
PS1004	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (cat) (comQ comX comP</i> zamenjani z geni seva <i>B.subtilis</i> RS-D-2) <i>srfA-yfp (spec)</i>	RS-D-2
PS1010	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (cat) (comQ::pED375 comX</i> <i>comP</i> zamenjani z geni seva <i>B.subtilis</i> RS-D-2) <i>srfA-MCherry (Kn)</i>	RS-D-2
BD2833	<i>his leu met srfA-lacZ (tet)</i>	168
BD2876	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) comQ::Km</i>	168

3.2.2 Pufri in raztopine

Z-pufer:

K ₂ HPO ₄ (0,1 M)	17,4 g
KH ₂ PO ₄ (0,1 M)	13,6 g
KCl (10 mM)	0,75 g

MgSO ₄ (1 mM)	0,25 g
dH ₂ O	1000 ml
pH = 7	

Raztopina Z-pufra in β-merkaptioetanol:

β-merkaptioetanol (0,1 M)	0,7 ml
Z-pufer	100 ml

Raztopina ONPG:

Z-pufer	
ONPG (o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid)	4 mg/ml

Raztopina glukoze (50 %):

V čašo smo zatehtali 50 g glukoze ter nato na tehtnici dodali dH₂O do 100 g. Glukozo smo ob mešanju segrevali.

Raztopina kazein hidrolizata (2 %):

kazein hidrolizat	2 g
dH ₂ O	100 ml

Raztopina kvasnega ekstrakta (10 %):

kvasni ekstrakt	10 g
dH ₂ O	100 ml

Raztopina histidina (10 mg/ml):

histidin	1 g
dH ₂ O	100 ml

Raztopina levcina (10 mg/ml):

levcin	1 g
dH ₂ O	100 ml

Raztopina metionina (10 mg/ml):

metionin	1 g
dH ₂ O	100 ml

Raztopina MgCl₂ (1M):

MgCl ₂	9,52 g
dH ₂ O	100 ml

1 × SS raztopina:

KH ₂ PO ₄	6 g
K ₂ HPO ₄	14 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Na-citrat × 2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2 g
dH ₂ O	1000 ml

3.2.3 Gojišča

Gojišče TBAB:

TBAB (Tryptose Blood Agar Base)	12 g
dH ₂ O	do 400 ml

V 400 ml gojišča TBAB smo po avtoklaviranju in hlajenju v vodni kopeli dodali 100 µl 0,1 M MnCl₂ ter nato vsakemu gojišču za posamezen sev dodali ustrezne antibiotike.

Dodatki antibiotikov v TBAB gojišče:

- gojišče za sev PS1004: 400 µl tetraciklina (20 mg/l), 200 µl kloramfenikola (5 mg/l), 800 µl spektinomocina (100 mg/l),

- gojišče za sev PS1010: 400 µl tetraciklina (20 mg/l), 200 µl kloramfenikola (5 mg/l), 200 µl kanamicina (5mg/l),
- gojišče za sev BD2833: 400 µl tetraciklina (20 mg/l),
- gojišče za sev BD2876: 400 µl tetraciklina (20 mg/l), 200 µl kanamicina (10 mg/l).

TBAB gojišča smo prelili v petrijevke in jih do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

Kompetenčno gojišče:

glukoza (50 %)	4 ml
kazein hidrolizat (2 %)	4 ml
kvasni ekstrakt (10 %)	4 ml
histidin (10 mg/ml)	2 ml
levcin (10 mg/ml)	2 ml
metionin (10 mg/ml)	2 ml
MgCl ₂ (1M)	1 ml
1 × SS raztopina	do 400 ml

Kompetenčno gojišče smo pripravili v laminariju z dodajanjem posameznih sterilnih založnih raztopin, katerih priprava je opisana v poglavju »Pufri in raztopine«.

3.2 METODE

3.2.1 Optimizirana metoda testiranja izrabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah

Osnovni postopek preizkusa je zajemal pridobitev izrabljenih gojišč izbranih producentskih (producirajo ComX) in testerskih (ne producirajo ComX zaradi delecije gena *comQ*) sevov *Bacillus subtilis* pri treh različnih temperaturah, pripravo mešanic izrabljenih gojišč in gojenje testerskega seva v teh gojiščih. Preizkus smo izvajali v

mikrotitrskih ploščah pri različnih vsebnostih izrabljenih gojišč in nato v bakterijskih kulturah testerja merili izražanje *srfA* operona, ki se odziva na ComX. Izražanje *srfA* smo merili preko sledenja β -galaktozidazne aktivnosti v prisotnosti substrata ONPG. Meritve spremembe barve smo izvajali s spektrofotometrom. S to metodo smo posredno merili vsebnost ComX v posameznih izrabljenih gojiščih producentnega seva, ki smo ga gojili pri različnih temperaturah.

Razvoj tega postopka je zahteval več optimizacij, ki jih bomo opisali spodaj; zaradi preglednosti je najprej opisan končni, optimiziran postopek, nato pa sledi opis posameznih optimizacij.

3.2.1.1 Izbira in vzdrževanje bakterijskih sevov

Seve *B. subtilis* BD2833 (producent) in *B. subtilis* BD2876 (tester) smo vzgojili na agarju TBAB z ustreznimi antibiotiki pri 28 °C in jih v času ekperimentov precepljali tedensko na sveže gojišče. Kulture, zrasle na agarju TBAB, so nam služile kot inokulum za tekoče preizkuse.

3.2.1.2 Pridobivanje izrabljenih gojišč

Producentni in testni sev smo precepili z agarja TBAB v sterilno kompetenčno gojišče (25 ml) v 100 ml erlenmajerice. Kulture smo inkubirali na stresalniku 16 ur pri temperaturi 37 °C in 200 obr./min. ter preko noči kulturo redčili na 2 % v erlenmajerice (250 ml) s 50 ml svežega kompetenčnega gojišča. Za vsak preizkus smo izvedli 6 ponovitev za producentni in 6 ponovitev za testni sev, pri čemer smo bakterijske kulture inkubirali na treh različnih temperaturah, t.j. na 24 °C, na 37 °C ter na 51,5 °C (z izbrano temperaturo 51,5 °C smo želeli doseči dovolj visoko temperaturo, ki pa bi še vedno dopuščala rast *B. subtilis*, vendar z nekoliko nižjo hitrostjo rasti kot pri 37 °C), pri 200 obr./min. Rast smo spremljali z merjenjem absorbance pri OD₆₅₀. Eno uro po prehodu bakterij v stacionarno fazo rasti smo kulture centrifugirali 10 min pri 10000 ref (centrifuga Sigma 3K30, Sigma laboratory centrifuges) pri sobni temperaturi ter supernatant prefiltrirali preko 0,22 μ m filtra. Tako smo pridobili sterilno izrabljeno gojišče testerja oz. producenta. Pridobljena izrabljena gojišča smo do uporabe shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.2.1.3 Rast testerskega seva v mikrotitrskih ploščah

3.2.1.3.1 Priprava testerskega seva za inokulacijo mikrotitrskih plošč

Testerski sev, namenjen za inokulacijo mikrotitrskih plošč, smo gojili v erlenmajericah v tekočem kompetenčnem gojišču (25 ml). Uporabljali smo inkubacijo s stresanjem pri 200 obratih/ minuto in 37 °C. Inkubirali smo 4 - 4,5 ur oz. do dosežene optične gostote sevov ($1,5 \pm 0,1$) a.e. To kulturo smo nato uporabili za inokulum pri preizkusih, kot je opisano spodaj.

3.2.1.3.2 Priprava mikrotitrskih plošč, inokulacija in rastni pogoji

V vsakem preizkusu smo uporabili štiri polipropilenske mikrotitrške plošče. Tri mikrotitrške plošče smo uporabili za gojenje testerja v mešanici svežega kompetenčnega gojišča in izrabljenih gojišč (producentskih oziroma testerskih); testirali smo gojišča, pridobljena pri različnih temperaturah (24 °C, 37 °C in 51,5 °C) in pri tem eno ploščo uporabili za testiranje gojišča, pridobljenega pri eni temperaturi. Sveže gojišče (SG) in izrabljeno gojišče (IG) smo na plošče nanegli v razmerju 1:1 in sicer 100 µl svežega gojišča ter 100 µl izrabljenega gojišča. IG je bilo sestavljeno iz producentkega (PIG) in iz testerskega izrabljenega gojišča (TIG), ki smo jih med seboj zmešali v različnih razmerjih. Od leve proti desni strani mikrotitrške plošče je koncentracija producentkega izrabljenega gojišča (PIG) naraščala, koncentracija testerskega izrabljenega gojišča (TIG) pa padala, tako, da smo čez ploščo ustvarili gradient (delež PIG v celotnem izrabljenem gojišču je znašal od 0 na levi, do 1 na desni strani plošče). V vsako jamico smo k posamezni mešanici gojišč dodali še 2 % inokulum testerskega seva *B. subtilis* BD2876 (Preglednica 3). Četrta plošča nam je služila za kontrolo. V prvih dveh stolpcih smo imeli nenacepljeno mešanico SG in TIG, v naslednjih dveh stolpcih pa nenacepljeno mešanico SG in PIG, kar nam je služilo za kontrolo kontaminacije testerskih oziroma producentkega izrabljenih gojišč (k1 oz. k2). Naslednje tri stolpce smo zaradi zmanjšanja možnosti kontaminacije izrabljenih gojišč pustili prazne. V osmem stolpcu smo imeli kontrolo rasti testerja v

samem svežem gojišču (k3). V zadnje štiri stolpce pa smo v jamice dodali TIG oziroma PIG iz predhodno narejenega, preverjenega preizkusa, ki je dal pozitivne rezultate na β -galaktozidazno aktivnost, sveže gojišče ter 2 % inokulum testerja. Ti zadnji stolpci so nam služili kot standard za preverjanje izvedenega β -galaktozidaznega testa (k4 in k5, Preglednica 4) v tekočem preizkusu.

Preglednica 3: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče za plošče 1, 2, 3 pri optimizirani metodi testiranja rabljenih gojišč. Nadaljnje vrstice mikrotitrne plošče so enake prvi prikazani vrstici.

Stolpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Komponente												
SG* (μ l) + tester (2 %)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TIG* (μ l)	100	100	90	90	75	75	50	50	25	25	0	0
PIG* (μ l)	0	0	10	10	25	25	50	50	75	75	100	100
delež PIG v IG	0		0,1		0,25		0,5		0,75		1	

*SG - sveže gojišče, IG – izrabljeno gojišče, PIG - izrabljeno gojišče producenta, TIG - izrabljeno gojišče testerja

Preglednica 4: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče za kontrolno ploščo pri optimizirani metodi testiranja rabljenih gojišč. Nadaljnje vrstice mikrotitrne plošče so enake prvi prikazani vrstici.

Stolpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Komponente	k1		k2		prazno			k3	k4		k5	
SG* (μ l) + tester (2%)	0	0	0	0	/	/	/	200	100	100	100	100
TIG* (μ l)	200	200	0	0	/	/	/	0	100	100	0	0
PIG* (μ l)	0	0	200	200	/	/	/	0	0	0	100	100

*SG - sveže gojišče, PIG - izrabljeno gojišče producenta, TIG - izrabljeno gojišče testerja

Po nanosu vseh komponent na mikrotitrne plošče smo za prehajanje kisika v plošče vstavili plastične nosilce, jih pokrili s pokrovi ter pokrove na plošče pritrdili s krep lepilnim trakom (aerotape, 25 x 50). Vse mikrotitrne plošče smo stehali ter jih nato inkubirali v topli sobi pri 28 °C. Za zagotavljanje vlažne atmosfere in enakomernih razmer za rast bakterij v jamicah vseh štirih mikrotitrskih plošč smo plošče položili v skupno vrečo (volumna cca. 30 l) z dodanimi zvitki mokrih papirnatih brisačk. Te so zagotavljale z vodo nasičeno atmosfero in s tem preprečile izhlapevanje vode iz mikrotitrskih plošč.

Dodatno smo za ohranjanje vlažne atmosfere v celotni topli sobi na tla položili še posodo z vodo. Mikrotitrne plošče smo na stresalnik fiksirali z gumijastimi podložkami. Za zagotavljanje zadostne količine kisika med gojenjem bakterij smo vrečo napolnili z zrakom in jo tesno zaprli. Tako pripravljene mikrotitrne plošče smo inkubirali preko noči (16 ur, stresalnik Tehnica, Vibromix 31, 1000 obr/min). Naslednji dan smo izvedli β -galaktozidazni test.

3.2.1.4 Testiranje izrabljenih gojišč – izvedba β -galaktozidaznega testa

3.2.1.4.1 Vrednotenje rasti bakterij v mikrotitrskih ploščah in priprava celic za testiranje β -galaktozidazne aktivnosti

Po prekonočni rasti testerskega seva v mikrotitrskih ploščah smo plošče stehali in s tem preverili količino izhlapelega gojišča oziroma vode. S pomočjo optičnega čitalca (spektrofotometra, Thermo electron corporation, Multiscan spectrum) smo nato izmerili OD₆₅₀ in tako preverili rast testerskega seva v mikrotitrskih ploščah. Po merjenju absorbance smo mikrotitrne plošče centrifugirali 10 minut pri 3000 obr./min, na temperaturi 4 °C in nato iz vsake jamice odstranili po 180 μ l supernatanta. Med odstranjevanjem supernatanta iz posamezne mikrotitrne plošče smo ostale plošče postavili na led zaradi zmanjšanja možnosti termičnega gibanja celic nazaj v supernatant.

3.2.1.4.2 Test β -galaktozidazne aktivnosti

Centrifugiranim celicam smo po odstranitvi supernatanta dodali reagente za vrednotenje aktivnosti β -galaktozidaze. V vsako jamico posamezne mikrotitrne plošče smo dodali po 180 μ l raztopine Z-pufra z dodanim β -merkaptetanolom (0,7 %), vsebino smo resuspendirali in zmešali z vorteksom. Nato smo dodali toluen in sicer po 10 μ l v vsako jamico mikrotitrne plošče, resuspendirali, zmešali z vorteksom ter mikrotitrne plošče inkubirali pol ure na ledu. Po inkubaciji smo v posamezno jamico mikrotitrne plošče

dodali 50 μ l raztopine ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, 4mg/ml Z-pufra), ki je substrat za encim β -galaktozidazo. Pred tem smo posamezno mikrotitrsko ploščo in ONPG raztopino predhodno segreli na 30 °C. S segrevanjem smo dosegli primerno temperaturo za delovanje encima β -galaktozidaze ter ustvarili poenotene temperaturne pogoje za vsak posamezen preizkus. V raztopini Z-pufra je ONPG brezbarven, po reakciji razgradnje omenjenega substrata z β -galaktozidazo pa lahko zaznamo rumeno obarvanost, saj se ONPG razgradi na galaktozo in rumeno obarvan o-nitrofenol. Hitrost razgradnje ONPG zaradi te obarvanosti lahko spremljamo z merjenjem absorbance pri 420 nm, izmerjena optična gostota je sorazmerna količini prisotne β -galaktozidaze oz. posredno količini feromona ComX v izrabljenem gojišču. Mikrotitrsko ploščo smo za merjenje v spektrofotometru prekrili s polistirenskimi plastičnimi pokrovi za mikrotitrsko ploščo, ki so preprečevali izhlapevanje β -merkaptetanola (zdravju škodljiva, strupena spojina z izredno močnim vonjem) v zrak. Med mikrotitrsko ploščo in plastični pokrov smo namestili objektna stekelca, ta so preprečevala razžiranje pokrova zaradi toluena, prisotnega v reakcijski mešanici (motnost zaradi uničenja pokrovov bi nam sicer onemogočila meritve optične gostote). Ob straneh plošč smo za fiksacijo objektnih stekelc vstavili izdelane podložke ter plošč postavili v predhodno segret spektrofotometer. Temperaturo v spektrofotometru smo nastavili na 33,5 °C. S tem smo zagotovili, da je temperatura mikrotitrsko plošč ostala na približno 30 °C. Hitrost razgradnje ONPG smo spremljali preko zaporednih meritev OD vzorcev pri 420 nm (spektrofotometer Thermo electron corporation, Multiscan spectrum). Protokol merjenja, ki smo ga uporabili za naše meritve je obsegal 3-minutno inkubacijo plošč nad grelnim blokom spektrofotometra ter nato 8 zaporednih meritev optične gostote z 1-minutno inkubacijo nad grelnim blokom spektrofotometra med posameznimi meritvami. S takim postopkom smo dosegli primerno temperaturo za delovanje encima β -galaktozidaze in enakomerno porazdelitev toplote čez vso mikrotitrsko ploščo med celotnim postopkom merjenja.

Aktivnost β -galaktozidaze smo iz dobljenih rezultatov izračunali po naslednji formuli (podana v Millerjevih enotah):

$$\beta\text{-gal. aktivnost} = \frac{K(A_{420}) \times (V_{\text{reak. meš.}} - V_{H_2O}) \times (V_{\text{merjenje}} - V_{H_2O})}{(A_{650} - A_{650 \text{ kontr.}}) \times (V_{\text{dodan}} - V_{H_2O}) \times 0,3} \times 1000 \quad \dots\dots(1)$$

*A₆₅₀ - absorbanca vzorca (celične suspenzije) pri 650 nm, izmerjena pred reakcijo z β-galaktozidazo

*A_{650 kontr.} - absorbanca kontrolnega vzorca (gojišča brez dodanih celic) pri 650 nm, izmerjena pred reakcijo z β-galaktozidazo

*V merjenje - volumen vzorca ob merjenju A₆₅₀ (volumen celične suspenzije med rastjo v mikrotitrskih ploščah)

*K(A₄₂₀) - koeficient oz. naklon premice, pridobljen iz točk zaporednih meritev absorbanc vzorca pri 420 nm med potekom reakcije z β-galaktozidazo

*V dodan - volumen celične suspenzije, uporabljene v reakciji β-galaktozidaznega testa

*V reak.meš. - volumen reakcijske mešanice (usedlina celic z dodanimi reagenti)

*V H₂O - volumen izhlapele vode med gojenjem v mikrotitrskih ploščah

*faktor 0,3/(V_{merjenje}-V_{H₂O}) smo uporabili za korekcijo absorbance zaradi manjšega volumna (200 μl)

Za prikaz β-galaktozidaznih aktivnosti pri različnih temperaturah in različnih koncentracijah rabljenih gojišč smo od posameznih vrednosti aktivnosti odšteli aktivnost v samem testerskem gojišču in tako izločili vpliv signalnega peptida CSF na izražanje operona *srfA-lacZ*. Za končni prikaz, t.j. primerjavo med različnimi preizkusi, pri določeni koncentraciji rabljenih gojišč, pa smo posamezne dobljene vrednosti β-galaktozidaznih aktivnosti delili s faktorjema, ki smo ju poimenovali FIR in standard.

Faktor FIR smo dobili tako, da smo izračunali ploščino pod rastno krivuljo producentov sevov (grafi rasti ob pridobivanju rabljenih gojišč) pri posamezni temperaturi ter nato to vrednost delili s 100. S tem smo upoštevali koliko časa so imele bakterije na voljo za proizvodnjo feromona ComX in koliko ga je v podanem časovnem obdobju producirala ena bakterija (feromon / št. bakterij × čas).

Standard pa je bil pozitivna kontrola, zanj smo v vseh treh preizkusih uporabili ista izrabljena gojišča, ki so bila predhodno testirana in je njihova β-galaktozidazna aktivnost

dala preverjene rezultate. Standard smo izračunali tako, da smo od β -galaktozidazne aktivnosti v kontrolnem producentskem rabljenemu gojišču odšteli β -galaktozidazno aktivnost v kontrolnem testerskem rabljenemu gojišču. Tako smo encimsko aktivnost med različnimi poskusi normalizirali na preverjen standard. S tem smo zmanjšali vpliv variabilnosti občutljivosti testerja med posameznimi preizkusi.

3.2.2 Uvajanje in testiranje optimizacij

Optimizacija metode testiranja prisotnosti ComX v izrabljenih gojiščih, pridobljenih iz bakterijskih kultur, gojenih pri različnih temperaturah (prejšnje poglavje), je zahtevala več korakov. Ti so za posamezne optimizacije opisani kot ločeni preizkusi, v katerih smo primerjali določeno spremenljivko (postopek A, postopek B). Boljša od dveh variant (imenovana Optimizirana metoda) je nato predstavljala del končnega postopka, opisanega v poglavju »Optimizirana metoda testiranja rabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah«.

3.2.2.1 Optimizacija gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah

V sklopu optimizacije rasti testerskega seva v mikrotitrskih ploščah smo izvedli dva preizkusa. V prvem preizkusu (postopek A) smo uporabili seve *B. subtilis* PS1004 (producent) in *B. subtilis* PS1010 (tester), pri drugem preizkusu (postopek B) pa seve *B. subtilis* BD2833 (producent) in *B. subtilis* BD2876 (tester).

Za vsak preizkus smo uporabili 3 mikrotitrške plošče z identično mešanico gojišč. Sestava komponent v posamezni jamici plošče je prikazana v Preglednici 3. Za inokulacijo plošč smo uporabili testerski sev, ki smo ga pred inokulacijo gojili 8 ur v tekočem kompetenčnem gojišču pri temperaturi 37 °C, z neprekinjenim stresanjem pri 200 obratih/minuto. Mikrotitrške plošče smo inkubirali 16 ur (prekonočna inkubacija) s stresanjem pri temperaturi 37 °C ali pri 28 °C. V prvem preizkusu smo inkubacijo plošč

izvedli po postopku A – neoptimizirana metoda, v drugem preizkusu pa po postopku B – optimizirana metoda.

Postopek A- neoptimizirana metoda:

- Za boljše prehajanje kisika v gojišče med inkubacijo plošč smo med mikrotitrsko ploščo in pokrov postavili male okrogle gumijaste podložke.
- Za zagotavljanje vlažne atmosfere med gojenjem testerja smo vsako od plošč posebej inkubirali v navadni prozorni plastični vreči (za hranjene živil) s priloženimi mokrimi brisačkami.
- Plošče smo inkubirali pri 37 °C

Postopek B – optimizirana metoda:

Postopek je bil enak optimizirani metodi, opisani v poglavju »Optimizirana metoda testiranja rabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah«, kratek povzetek:

- Za boljši dostop zraka smo izdelali plastične nosilce, s katerimi smo privzdignili pokrove plošč (za stabilnost pokrovov smo le-te na plošče prilepili).
- Da bi preprečili premikanje plošč pri stresanju, smo med mikrotitrsko ploščo in robove stresalnika vstavili gumijaste podložke.
- Vse mikrotitrsko ploščo smo skupaj inkubirali v eni sami, večji vreči (sicer namenjeni avtoklaviranju). Za ohranjanje vlažne atmosfere v notranjosti vreče smo priložili mokre papirnate brisačke, za vzdrževanje primerne vlažnosti v celotni topli sobi smo na tla postavili še posodo z vodo.
- Temperaturo inkubacije smo znižali na 28 °C.

V obeh preizkusih smo plošče pred in po inkubaciji stehali za izračun izhlapele tekočine in izmerili OD₆₅₀ za primerjavo rasti.

3.2.2.2 Optimizacija izbire seva

Izvedli smo preizkus, v katerem smo med seboj primerjali β -galaktozidazne aktivnosti sevov *B. subtilis* in sicer testerskega seva PS1010 in testerskega seva BD2876. Izvedli smo različico postopka, opisanega v poglavju »Optimizirana metoda testiranja rabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah«. Izrabljena gojišča smo pridobili iz bakterijske kulture, gojene 8 ur pri 37 °C.

Postopek A – neoptimizirana metoda:

- Uporabili smo producentsko in testersko izrabljeno gojišče sevov PS (producentski sev PS1004, testerski sev PS1010) in tester PS1010.

Postopek B – optimizirana metoda:

- Uporabili smo producentsko in testersko izrabljeno gojišče sevov BD (producentski sev BD2833, testerski sev BD2876) ter tester BD2876.

Za postopek A smo uporabili 3, za postopek B pa 4 mikrotitrne plošče, z mešanico gojišč, prikazano v Preglednici 5. Tester, namenjen za inokulacijo mikrotitrskih plošč, smo gojili 8 ur, odvzeli smo ga v stacionarni fazi rasti.

Preglednica 5: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrne plošče pri optimizaciji seva, nadaljnje vrstice plošče so bile enake prvi vrstici.

Stolpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Komponente												
SG* (μ l)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TIG* (μ l)	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	0
PIG* (μ l)	100	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100
tester (2%)	Da				Da				Ne (kontrola)			

*SG - sveže gojišče, TIG - izrabljeno gojišče testerja, PIG - izrabljeno gojišče producenta

Mikrotitrne plošče smo inkubirali 16 ur pri 28 °C, po inkubaciji smo izvedli meritve β -galaktozidaznih aktivnosti (postopek inkubacije opisan v poglavju »Optimizirana metoda testiranja rabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah«, pri merjenju pa smo uporabljali še neoptimizirano metodo merjenja v spektrofotometru,

opisano v nadaljevanju, v poglavju »Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom – Postopek A«).

3.2.2.3 Optimizacija dolžine gojenja testerja za inokulacijo mikrotitrskih plošč

Pri tem eksperimentu smo želeli primerjati β -galaktozidazno aktivnost testerja *B. subtilis* BD2876 v odvisnosti od rastne faze pred inokulacijo mikrotitrskih plošč. Ravnali smo se po postopku, opisanem v poglavju »Optimizirana metoda testiranja rabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah« ter najprej pridobili izrabljena gojišča (pri 37 °C). Uporabili smo 4 mikrotitrške plošče, od tega smo dve inokulirali po postopku A, drugi dve pa po postopku B.

Postopek A – neoptimizirana metoda

- Mikrotitrski plošči smo inokulirali s testerskim sevom BD2876, ki je bil v stacionarni fazi rasti (tester smo gojili 8 ur).

Postopek B – optimizirana metoda

- Za inokulacijo mikrotitrskih plošč smo uporabili testerski sev BD2876, ki je bil v eksponentni fazi rasti (tester smo gojili približno 4 ure).

V vseh štirih ploščah smo imeli identično sestavo gojišč, v obeh postopkih smo uporabili ista izrabljena gojišča testerja BD2876 (TIG) in producenta BD2833 (PIG). Mešanica gojišč v jamicah mikrotitrskih plošč je bila enaka kot pri poglavju Optimizacija seva in je prikazana v Preglednici 5. Po 16-urni inkubaciji mikrotitrskih plošč na 28 °C pri 1000 obr./min smo izvedli β -galaktozidazni test (postopek enak kot pri »Optimizaciji seva«).

3.2.2.4 Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom

V preizkusu smo želeli izboljšati temperaturne pogoje pri merjenju beta-galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom z namenom pridobiti čimbolj optimalne rezultate po

merjenju. Sledili smo postopku, opisanem v poglavju »Optimizirana metoda testiranja rabljenih gojišč bakterije *B. subtilis*, gojene pri različnih temperaturah«, s to razliko, da smo pridobili le izrabljeno gojišče producenta (BD2833) in sicer pri temperaturi 37 °C. Uporabili smo 2 mikrotitrski plošči z identično sestavo gojišč (Preglednica 6).

Preglednica 6: Prikaz sestavin v posameznih jamicah v eni vrstici mikrotitrski plošče pri optimizaciji temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom. Nadaljnje vrstice mikrotitrski plošče so enake prvi prikazani vrstici.

Stolpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Komponente												
SG* (μ l) + (2%) tester BD2876	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PIG* (μ l)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*SG - sveže gojišče, PIG - izrabljeno gojišče producenta

Po inkubaciji mikrotitrskih plošč, smo izvedli β -galaktozidazni test. Pri tem smo pri eni od plošč beta-galaktozidazno aktivnost merili po postopku A, pri drugi pa po postopku B.

Postopek A – neoptimizirana metoda:

- Plošče smo po inkubaciji na ledu pustili za kratek čas pri sobni temperaturi ter jih nato brez predhodnega segrevanja odnesli na merjenje v spektrofotometer, ONPG raztopina je bila pred dodatkom na plošče hranjena pri sobni temperaturi.
- Temperaturo v spektrofotometru smo nastavili na 37 °C.
- Program merjenja v spektrofotometru je obsegal začetno enominutno inkubacijo s stresanjem ter nato trideset zaporednih meritev optične gostote vzorcev pri 420 nm vsakih 30 sekund (plošča se je pri tem zaradi pogostih meritev večino časa v spektrofotometru zadrževala desno od grelca).

Postopek B – optimizirana metoda:

- Mikrotitrski plošče in ONPG raztopino smo pred merjenjem v spektrofotometru segreti na 30 °C.
- Temperaturo v spektrofotometru smo nastavili na 33,5 °C (kar je zagotavljalo temperaturo 30 °C na mikrotitrski plošči).

- Sestavili smo nov protokol merjenja v spektrofotometru, pri katerem so se mikrotitrške plošče po prenosu v spektrofotometer najprej 3-minute inkubirale nad grelcem, nato pa je sledilo 8 zaporednih meritev optične gostote z 1-minutno inkubacijo nad grelcem med posameznimi meritvami.

Po prihodu plošč iz spektrofotometra smo ploščam z infrardečim brezkontaktnim termometrom (Extech instruments, 42529) izmerili temperaturo ter zabeležili beta-galaktozidazne aktivnosti, izmerjene pri obeh ploščah.

4 REZULTATI

4.1 UVAJANJE IN TESTIRANJE OPTIMIZACIJ

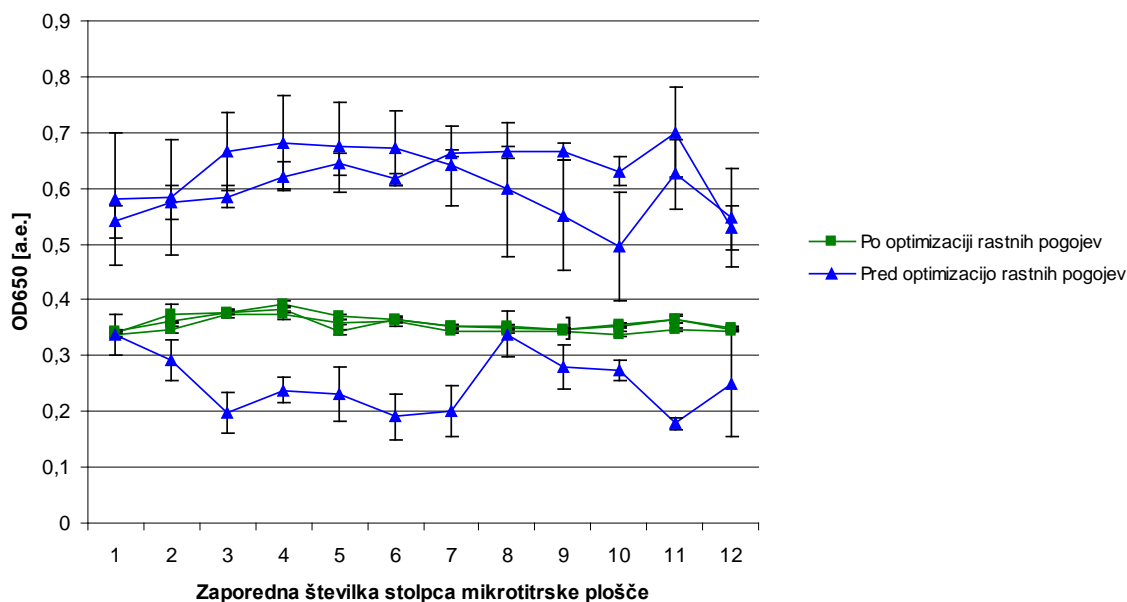
4.1.1 Optimizacija gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah

V okviru tega preizkusa smo primerjali rast dveh sevov, ki smo jih gojili pri različnih pogojih oz. po različnih postopkih. Postopek A (neoptimizirana metoda) je zajemal inkubacijo mikrotitrskih plošč v tankih prozornih vrečkah s priloženimi vlažnimi brisačkami pri 37 °C, ob uporabi malih gumijastih podložk za prehod zraka. V postopku B (optimizirana metoda) smo to metodo gojenja poskušali izboljšati z inkubacijo pri 28 °C, z uporabo trpežnejše vreče in dodatnimi pripomočki za zračnost ter zaščito pri stresanju in ohranjanju vlage.

Ugotovili smo, da so bili po inkubaciji pri neoptimizirani metodi volumni v jamicah posamezne mikrotitrsko plošče že na pogled precej različni (nekatero jamice so bile skoraj prazne), gojišče je prehajalo med jamicami, podložke za dovod zraka so se med inkubacijo premikale, netrpežne plastične vrečke so se naluknjale ter brisačke izsušile. Nasprotno pa smo pri optimizirani metodi uspeli preprečiti pretirano izhlapevanje, volumni gojišča v jamicah pa so bili praktično čez vso ploščo enaki. Povprečna izguba vode na mikrotitrsko ploščo je bila pri neoptimizirani metodi (14 ± 9) %, pri optimizirani metodi pa se je povprečna izguba tekočine na ploščo znižala na (4 ± 1) %.

Slika 4 prikazuje izmerjeno optično gostoto testerskih sevov *Bacillus subtilis* po prekonočni inkubaciji mikrotitrskih plošč. Modra barva označuje optično gostoto seva *B. subtilis* PS1010, gojenega po neoptimizirani metodi, zelena barva pa optično gostoto seva *B. subtilis* BD2876, ki smo ga gojili po optimizirani metodi. Pri tem vsaka posamezna točka predstavlja povprečje absorbanc v jamicah enega stolpca na posamezni mikrotitrski plošči, vsaka posamezna krivulja pa eno od plošč (točke so med seboj povezane le zaradi preglednosti). Na grafu lahko opazimo precejšnje nihanje v optičnih gostotah sevov pri gojenju po neoptimiziranem postopku. Odstopanje med absorbancami posameznih jamic stolpca je bilo relativno veliko, kar nakazujejo veliki intervali napak. Poleg tega lahko vidimo, da so v eni od plošč absorbance bile občutno nižje kot pri drugih dveh, razpon

absorbanc je bil med 0,2 in 0,7 a.e. Na zeleno obarvanih grafih, ki prikazujejo vrednosti OD₆₅₀ med preizkusom po optimizirani metodi, pa so se vrednosti gibale med 0,3 in 0,4 a.e. (na 200 µl volumna v jamici) in bile torej dosti bolj homogene.

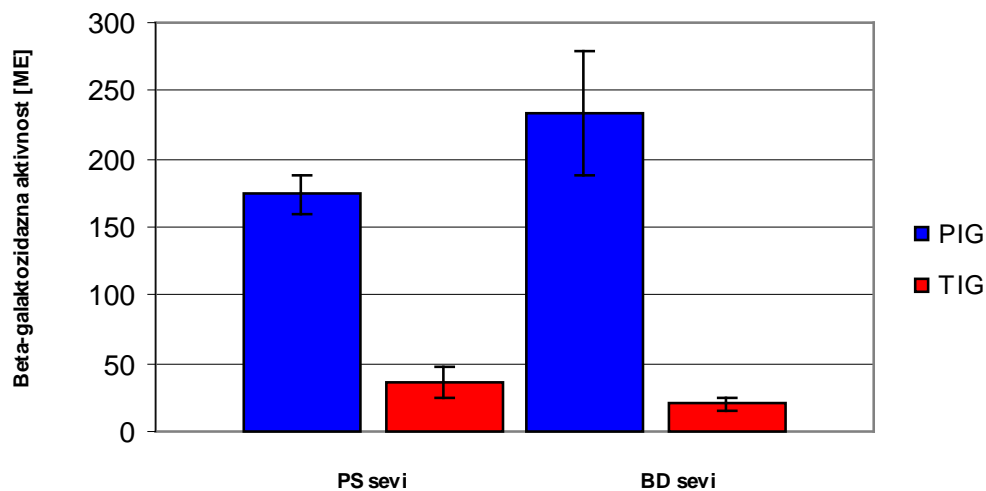


Slika 4: Rast testerskega seva *Bacillus subtilis* pred optimizacijo ravnih pogojev (gojenje pri 37 °C) in po optimizaciji (gojenje pri 28 °C, dodatni ukrepi proti izgubi gojišča iz jamic mikrotitrskje plošče). Vsaka zaporedna številka predstavlja 8 eksperimentalnih ponovitev, vključenih v eno prikazano variablo rasti (OD₆₅₀). Vse zaporedne številke prikazujejo ločene ponovitve teh variabel. Vsaka krivulja predstavlja ločeno mikrotitrsko ploščo. Krivulja pred optimizacijo prikazuje rast sevov PS, krivulja po optimizaciji pa rast sevov BD (v tem času smo namreč izvedli tudi menjavo sevov).

4.1.2 Optimizacija izbire seva

Primerjali smo β -galaktozidazne aktivnosti dveh izogenih testerskih sevov *Bacillus subtilis*, PS1010 in BD2876, ki sta se razlikovala v *comP* receptorju (različen ferotip). Sev PS1010 je imel tudi dodatno vključeno fuzijo fluorescenčnega gena *srfA-MCherry*. Ugotovili smo, da so se pri testerju BD2876, gojenem v producerskem izrabljenem gojišču (PIG), v povprečju pojavile nekoliko višje aktivnosti β -galaktozidaze kot pri sevu PS1010 (Slika 5), vendar razlike niso bile signifikantne (p-vrednost je 0,07 ($\alpha = 0,05$)). Zanimivo je, da je sev BD2876 slabše rasel (OD₆₅₀ do 0,3 a.u.) kot sev PS1010 (OD₆₅₀ do

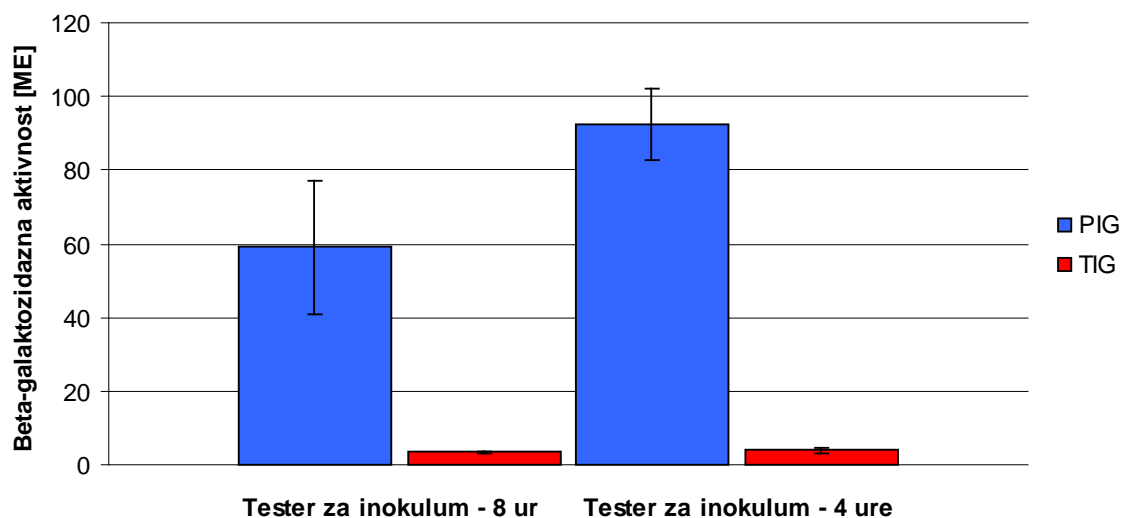
0,9 a.u.), kar bi lahko vplivalo na končni izračun, vendar sta se oba seva podobno odzivala na prisotnost ComX in je pri obeh prišlo do indukcije β -galaktozidaze v PIG, medtem ko je bila aktivnost precej nižja v TIG.



Slika 5: Vrednosti β -galaktozidaznih aktivnosti v producerskem (PIG) in testerskem (TIG) izrabljenem gojišču pri PS in BD sevih *Bacillus subtilis*. Posamezen stolpec PS sevov predstavlja povprečje 96 tehničnih ponovitev v jamicah, posamezen stolpec BD sevov pa 128 tehničnih ponovitev v jamicah mikrotitrskih plošč. (Testerski sev smo gojili pri 28 °C, izrabljena gojišča smo pridobili pri 37 °C.)

4.1.3 Optimizacija dolžine gojenja testerja za inokulacijo mikrotitrskih plošč

Ugotovili smo, da rastna faza testerskega seva, ki smo ga nacepili v PIG, ni signifikantno vplivala na aktivnost β -galaktozidaze (p-vrednost znaša 0,15 ($\alpha = 0,05$)). Po 8 urah gojenja je β -galaktozidazna aktivnost znašala (60 ± 20) ME, po 4 urah gojenja pa je bila nekoliko višja in sicer (95 ± 10) ME. Podoben odziv testerja smo izmerili tudi v TIG, kjer je bila aktivnost β -galaktozidaze ($3 \pm 0,5$) ME, če smo tester kot inokulum gojili 8 ur in (4 ± 1) ME, če smo ga gojili le 4 ure (Slika 6).

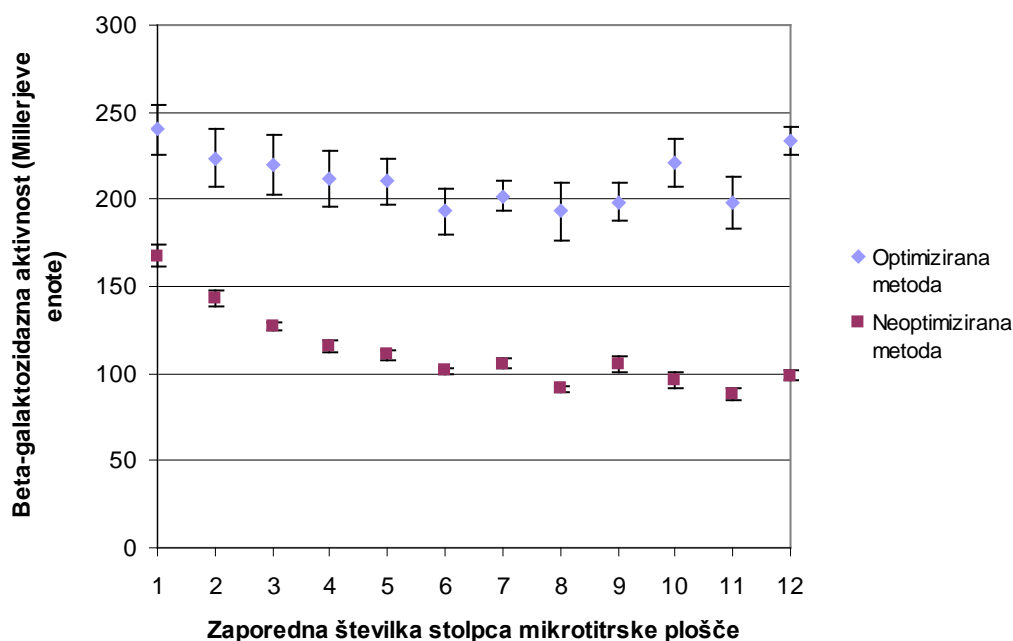


Slika 6: Primerjava izražanja *sfmA-lacZ* (aktivnost β -galaktozidaze) sevov *B. subtilis* BD2876 v producerskem (PIG) in testerskem (TIG) izrabljenem gojišču v preizkusih, kjer smo za inokulum uporabili testerski sev v stacionarni fazi rasti (8h) ali v eksponentni fazi rasti (4h). Vsak od stolpcev prikazuje povprečje 64 ponovitev v jamicah mikrotitrskih plošč. (Testerski sev smo gojili pri 28 °C, izrabljena gojišča smo pridobili pri 37 °C.)

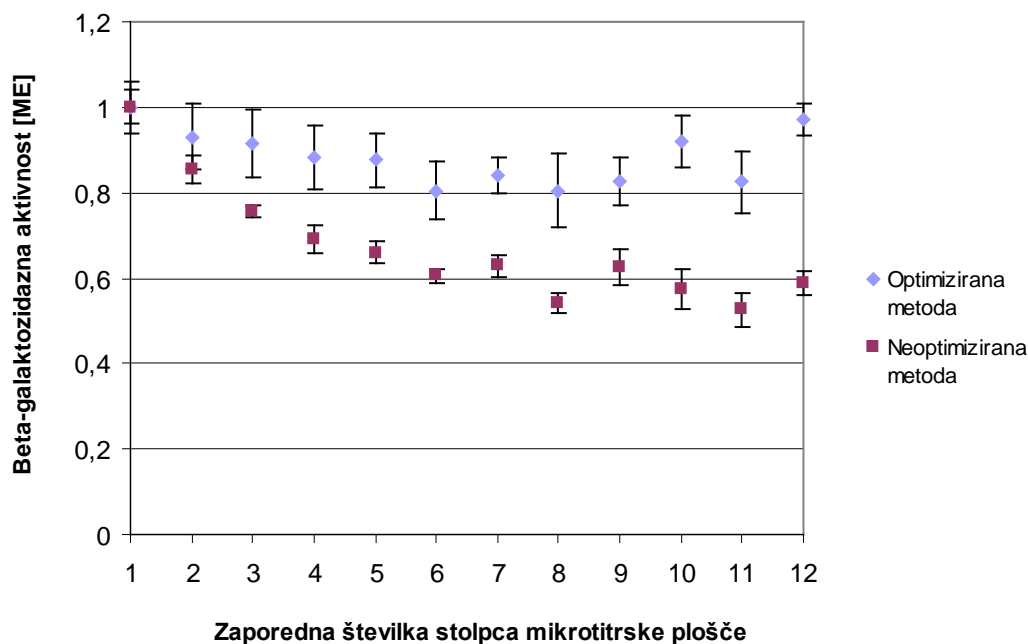
4.1.4 Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom

Pri merjenju temperature mikrotitrskih plošč z infrardečim termometrom takoj po meritvah v spektrofotometru se je pri neoptimizirani metodi temperatura plošč gibala od 34 °C na levi in le do 30 °C na desni strani plošče. Ugotovili smo, da je to bila posledica pogostih zaporednih meritev v spektrofotometru, zaradi česar se je v plošča v spektrofotometru večino časa zadrževala desno od grelca (tu je potekalo merjenje). Pri optimizirani metodi, kjer smo reagent ONPG pred nanosom na mikrotitrsko ploščo segreli, ploščo s tolueniziranimi celicami pred dodatkom ONPG inkubirali pri 30 °C ter spremenili protokol merjenja v spektrofotometru (inkubacija plošč nad grelcem, manjše število meritev), nam je uspelo preprečiti nastanek gradienta temperature vzdolž mikrotitrsko plošč. Z uvedenimi spremembami smo dosegli čez celotno ploščo temperaturo 30 +/-1 °C. Poleg tega so se pokazale razlike v β -galaktozidazni aktivnosti med obema metodama, saj je bila

β -galaktozidazna aktivnost pri aplikaciji neoptimizirane metode za 50 % nižja in je upadala iz leve proti desni, pri optimizirani metodi pa je bila izmerjena aktivnost bolj homogena (Sliki 7 in 8). Razlike v aktivnosti so bile signifikantno različne ($p=1,78 \times 10^{-10}$, $\alpha=0,05$). Pri optimizirani metodi so se sicer pojavile večje napake kot pri merjenju po neoptimizirani metodi. Razlika med napakami pri obeh metodah je manj očitna, če se primerjajo relativne napake (Slika 8).



Slika 7: Prikaz β -galaktozidaznih aktivnosti seva *B. subtilis* BD2876, ki so bile izmerjene po dveh različnih postopkih ob merjenju s spektrofotometrom: postopku A (neoptimizirana metoda) in postopku B (optimizirana metoda). Podane so povprečne vrednosti aktivnosti v posameznih stolpcih mikrotitrne plošče (vsaka od točk predstavlja 8 tehničnih ponovitev v jamicah). Testerski sev smo gojili pri 28 °C.



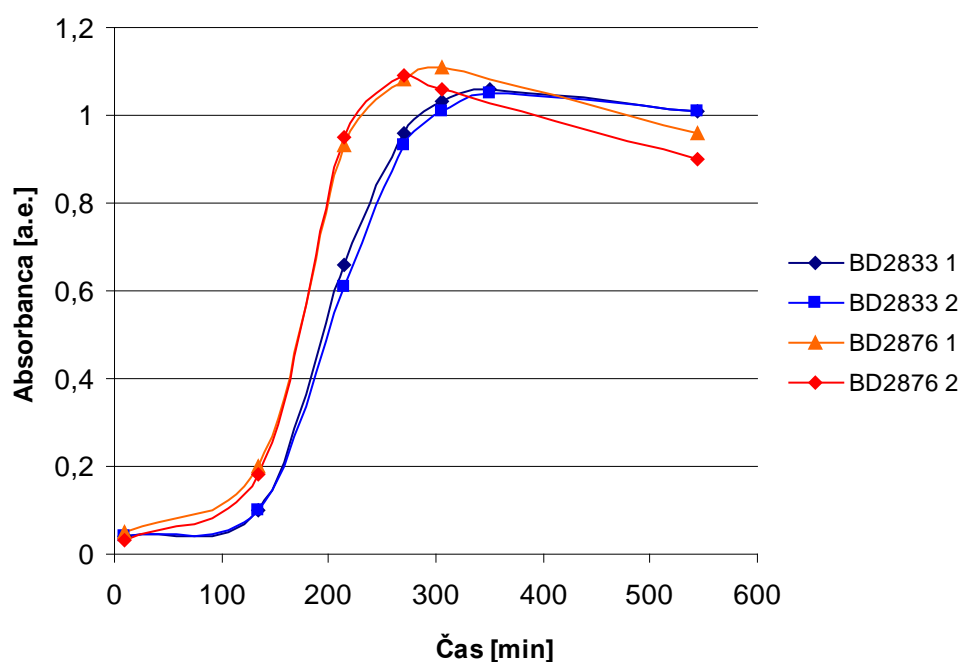
Slika 8: Prikaz β -galaktozidaznih aktivnosti seva *B. subtilis* BD2876, normiranih na najvišjo vrednost pri neoptimizirani in pri optimizirani metodi merjenja s spektrofotometrom. Prikazane so povprečne vrednosti v posameznih stolpcih obeh mikrotitrskih plošč.

4.2 VPLIV TEMPERATURE NA POTENCIAL IZRABLJENEGA GOJIŠČA SEVOV *B. subtilis* ZA INDUKCIJO AKTIVNOSTI *srfA-lacZ* OPERONA

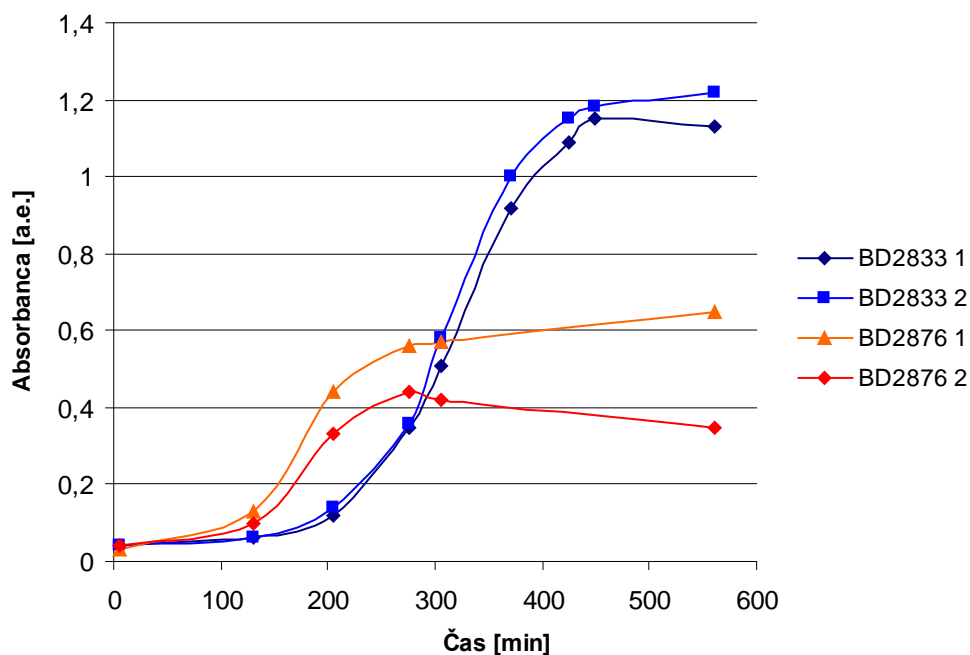
4.2.1 Vpliv temperature na rast producentskih in testerskih sevov *B. subtilis* (rastne krivulje ob pridobivanju izrabljenih gojišč)

Izrabljena producentna in testerska gojišča *Bacillus subtilis* (BD2833 in BD2876) smo gojili pri treh različnih temperaturah (24 °C, 37 °C in 51,5 °C). Prikazane so rastne krivulje, ki predstavljajo eno izmed treh bioloških ponovitev, narejenih v duplikatih (Slike 9, 10, 11). Hitrost rasti je bila najvišja pri gojenju sevov pri 37 °C (generacijski čas t_{gen} testerja cca. 35 ± 2 min in producenta 42 ± 1 min) (Slika 9), nekoliko nižja pri gojenju na 51,5 °C (t_{gen} testerja cca. 43 ± 1 min in producenta 48 ± 1 min) (Slika 10), najnižja pa pri temperaturi 24 °C (t_{gen} testerja cca. 101 ± 3 min in producenta 124 ± 1 min) (Slika 11). Testerski sevi BD2876 so v povprečju rastle hitreje od producentskih sevov BD2833,

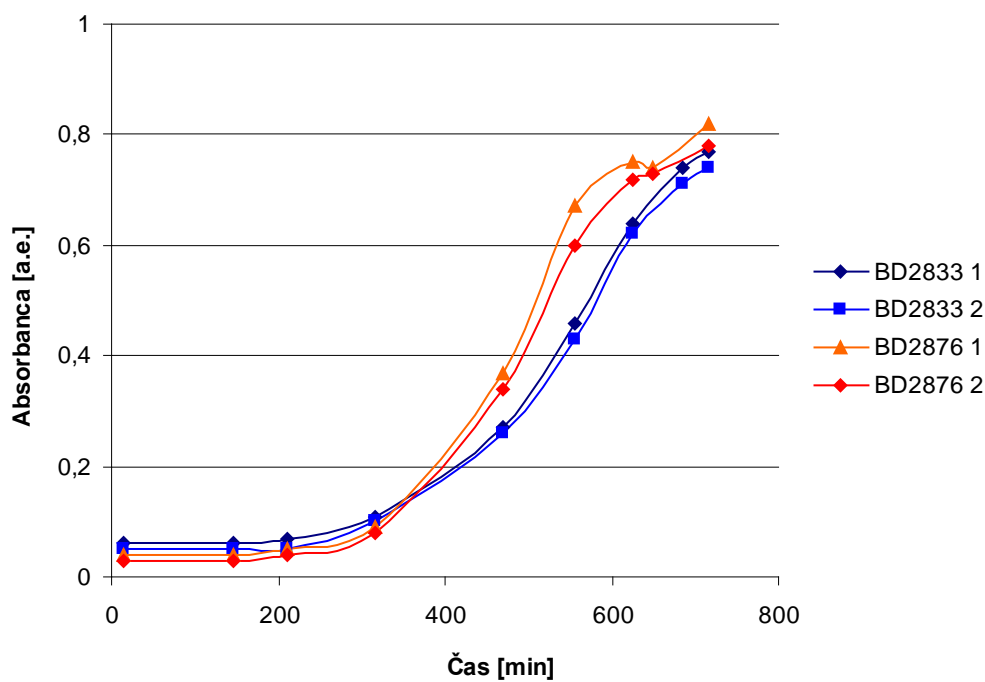
hitreje so vstopili v stacionarno fazo rasti. Pri 37 °C je imel tester nekoliko krajšo lag fazo in tako dosegel stacionarno fazo rasti nekoliko prej kot producent. Zanimiva razlika med rastjo testerja in producenta je izrazitejša pri 51,5 °C, kjer tester vstopi v stacionarno fazo hitreje kot producent in tudi doseže veliko nižjo maksimalno optično gostoto. Slabša rast testerskega seva pri 51,5 °C (Slika 10), se je pojavila pri dveh od treh ponovitev poskusa, za kar ne najdemo razlage. Pri 24 °C sta tako tester kot producent rasla počasneje in zopet je tester dosegel stacionarno fazo hitreje kot producent (Slika 11).



Slika 9: Rastne krivulje sevov *Bacillus subtilis* v erlenmajericah pri 37 °C, prikazani sta rastni krivulji za producerski sev BD2833 in testerski sev BD2876.



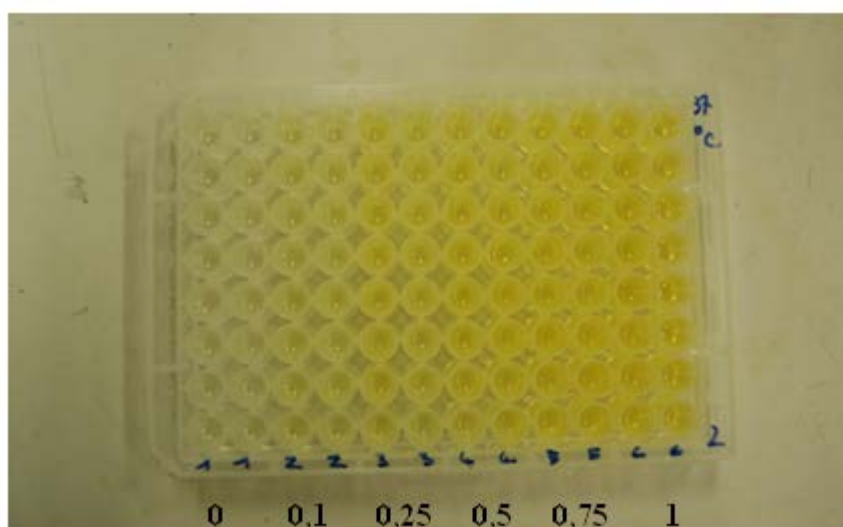
Slika 10: Rastne krivulje sevov *Bacillus subtilis* v erlenmajericah pri 51,5 °C, prikazani sta rastni krivulji za producerski sev BD2833 in testerski sev BD2876.



Slika 11: Rastne krivulje sevov *Bacillus subtilis* v erlenmajericah pri 24 °C, prikazani sta rastni krivulji za producerski sev BD2833 in testerski sev BD2876.

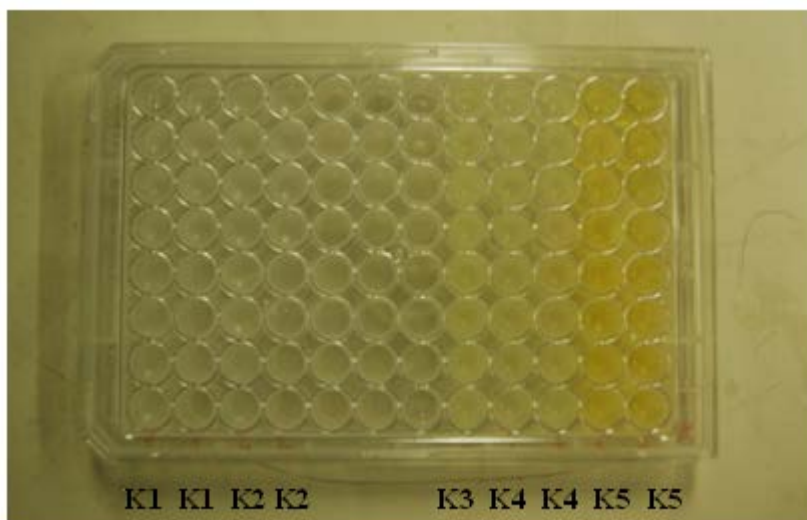
4.2.2 Vpliv izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja, na izražanje *srfa-lacZ*

Na Sliki 12 je prikazana aktivnost β -galaktozidaze testerskega seva, ki smo ga gojili v PIG, pridobljenem pri 37 °C. Viden je gradient obarvanosti in sicer se z leve proti desni strani plošče obarvanost povečuje zaradi večanja deleža PIG in s tem signalnega peptida ComX. V jamicah brez dodanega PIG se je obarvanost le rahlo povečala.



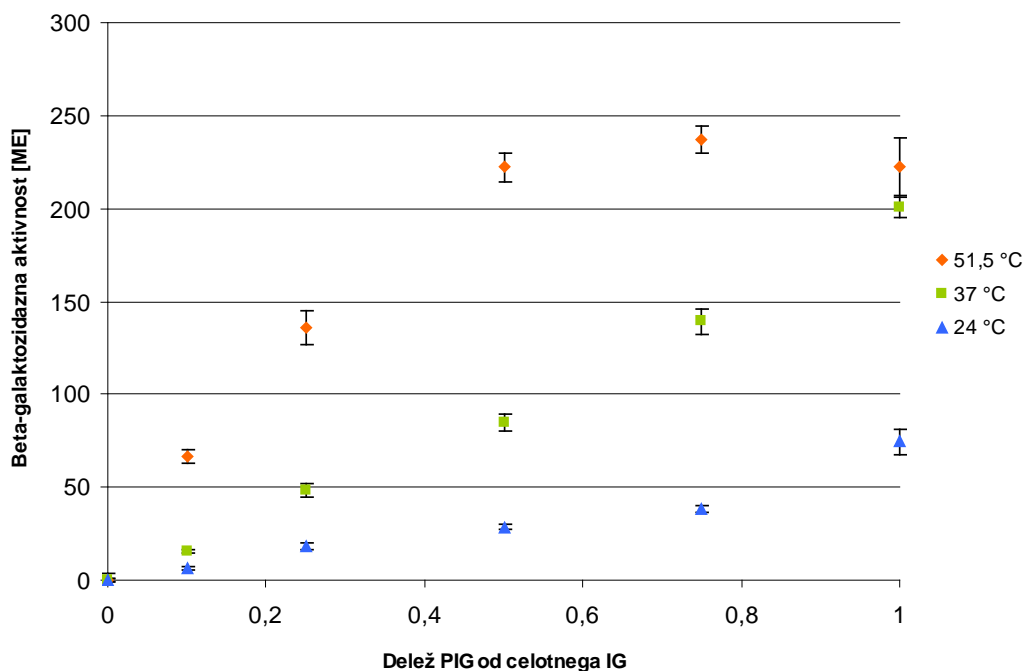
Slika 12: Primer obarvanosti mikrotitrne plošče po izvedbi β -galaktozidaznega testa. Plošča je nacepljena s testerskim sevom *Bacillus subtilis* BD2876 v mešanici svežega CM gojišča ter izrabljenih gojišč testerja ter producenta (vzdolž plošče v različnih koncentracijah), pridobljenih pri 37 °C. S številkami je naveden delež PIG v izrabljenem gojišču v primerjavi s celotnim izrabljenim gojiščem (IG).

Kontrolna plošča je prikazana na Sliki 13. Povsem brezbarvne so bile jamice v prvih štirih stolpcih, kjer je bilo prisotno le izrabljeno gojišče testerskega seva (K1) oziroma producenta (K2), ki ga nismo nacepili s testerskim sevom. Reakcija razgradnje ONPG tu ni potekla. Rahlo spremenjena barva se je pojavila v jamicah s testerskim sevom, nacepljenim v svežem gojišču (K3) ter v jamicah s testerskim sevom, nacepljenim v TIG (K4). Intenzivno rumeno obarvanost zaradi razgradnje ONPG substrata smo zaznali v jamicah zadnjih dveh stolpcev (K5), ki so vsebovale testerski sev BD2876 ter izrabljeno gojišče producenta (PIG).



Slika 13: Obarvanost kontrolne mikrotitrne plošče po izvedbi β -galaktozidaznega testa. Vsebina v jamicah po stolpcih: K1 – izrabljeno gojišče testerskega seva, K2 – izrabljeno gojišče producenta, K3 – testerski sev *Bacillus subtilis* BD2876 v svežem gojišču, K4 – testerski sev BD2876 v izrabljenem gojišču testerskega seva, K5 – testerski sev BD2876 v izrabljenem gojišču producenta.

Pri izračunu vrednosti β -galaktozidaznih aktivnosti smo od β -galaktozidaznih aktivnosti testerja, gojenega pri posameznih koncentracijah PIG odšteli β -galaktozidazne aktivnosti testerja, ki je rasel v testerskem izrabljenem gojišču (TIG). Najvišjo hitrost pretvorbe ONPG substrata smo opazili pri ploščah s producentnim izrabljenim gojiščem (PIG), pridobljenim po gojenju bakterij pri 51,5 °C približno 7 ur. Vrednosti β -galaktozidazne aktivnosti so tu najvišje pri vseh koncentracijah PIG, najvišjo vrednost pa dosežejo pri ≥ 75 % PIG (237 ± 7 Millerjevih enot). Nekoliko manjše vrednosti β -galaktozidazne aktivnosti so se pojavile pri PIG, pridobljenim pri 37 °C, najnižje pa so bile te vrednosti pri PIG, dobljenim pri 24 °C. V obeh primerih se pojavi najvišja β -galaktozidazna aktivnost pri 100 % PIG in sicer 201 ± 5 ME pri gojišču pridobljenemu pri 37 °C ter 74 ± 7 ME pri gojišču pridobljenemu pri 24 °C. β -galaktozidazna aktivnost opazno narašča s povečevanjem koncentracije PIG (Slika 14).



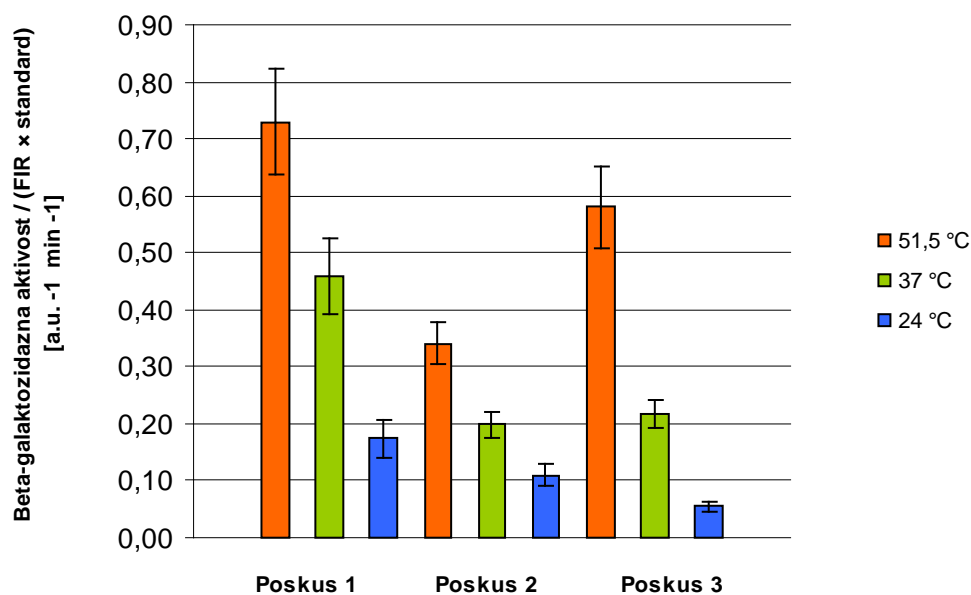
Slika 14: β -galaktozidazne aktivnosti testerskega seva *B. subtilis* BD2876, gojenega pri različnih koncentracijah producentnega izrabljenega gojišča (PIG), pridobljenega pri različnih temperaturah. Testerski sev smo gojili pri 28 °C. Za vsako vrednost aktivnosti smo izvedli 16 tehničnih ponovitev v jamicah mikrotitrskih plošč, prikazana točka predstavlja skupno povprečje. Na sliki je podana standardna napaka.

Napake pri merjenju β -galaktozidaznih aktivnosti pri različnih temperaturah in različnih koncentracijah izrabljenih gojišč so se v splošnem gibale v rangu pod 10 %. Povprečna relativna napaka aktivnosti β -galaktozidaze je v treh neodvisnih preizkusih pri različnih koncentracijah izrabljenih gojišč (Slika 14) znašala (7 ± 2) % pri optimizirani metodi, medtem ko je pri neoptimizirani metodi znašala (20 ± 8) %.

Primerjali smo β -galaktozidazne aktivnosti treh neodvisnih preizkusov, pri katerih smo uporabili 25 % PIG. Za to koncentracijo smo se odločili zato, ker se tu β -galaktozidazne aktivnosti med različnimi temperaturami vidno razlikujejo, kar kaže na občutljivost testerskega seva za to koncentracijo PIG. Pri višjih koncentracijah PIG je receptor verjetno že nasičen s ComX. Pri izračunu smo upoštevali faktor rasti celic producentnega seva ob pridobitvi PIG (vrednost FIR), kar nam poda število bakterij, ki je feromon proizvajalo na

časovno enoto. Poleg tega pa smo upoštevali tudi standard, ki je v preizkusih predstavljal pozitivno kontrolo.

Pri primerjavi rezultatov treh neodvisnih preizkusov (Slika 15) ugotavljamo, da so se vrednosti β -galaktozidaznih aktivnosti / (FIR \times standard) pri 25 % PIG med posameznimi preizkusi sicer razlikovale, vendar je bil trend enak. Najvišje vrednosti β -galaktozidazne aktivnosti / FIR \times standard smo izmerili, če je bilo PIG pripravljeno pri rasti producenta pri 51,5 °C, vrednosti so bile nižje pri PIG (37 °C), najnižje pa pri PIG (24 °C). Razlike med aktivnostmi β -galaktozidaze v PIG z različnih temperatur so bile signifikantno različne in sicer: $p=0,026$ za primerjavo β -gal. aktivnosti med PIG (51,5 °C) in PIG (37 °C), $p=0,017$ za primerjavo β -gal. aktivnosti med PIG (37 °C) in PIG (24 °C) ter $p=0,07$ za primerjavo β -gal. aktivnosti med PIG (51,5 °C) in PIG (24 °C).



Slika 15: Primerjava β -galaktozidaznih aktivnosti / (FIR \times standard) testerskega seva *B. subtilis* med posameznimi preizkusi v gojiščih, pridobljenih pri treh različnih temperaturah (51,5 °C, 37 °C, 24 °C). Testerski sev smo gojili pri 28 °C. Prikazani so rezultati pri 25 % PIG. Vsak stolpec predstavlja povprečje 16 tehničnih ponovitev v jamicah mikrotitrne plošče, na grafu so podane standardne napake.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Uvajanje in testiranje optimizacij

5.1.1.1 Optimizacija gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah

Z zagotavljanjem ustrezno vlažne atmosfere, znižanjem temperature gojenja testerskega seva v mikrotitrskih ploščah preko noči s 37 °C na 28 °C in z izdelavo dodatnih pripomočkov nam je uspelo znatno zmanjšati prekomerno izgubo tekočine iz jamic mikrotitrskih plošč. Z gojenjem v skupni vreči smo tudi izenačili razmere za vse v preizkusu uporabljene plošče, na kar kaže enakomerno izhlapevanje med posameznimi ploščami. Po optimizaciji se je zmanjšala variabilnost optične gostote kultur, ki se je pri neoptimizirani metodi pojavila zaradi neenakomernih volumnov v jamicah. Pri gojenju v mikrotitrskih ploščah je potrebna previdnost pri vzdrževanju volumnov v posameznih jamicah, saj se z izhlapevanjem spremeni razmerje hranil, zaradi česar lahko pride do spremembe v rasti bakterij, to pa lahko pomembno vpliva na končne izračune β -galaktozidazne aktivnosti. Z uvedbo optimizirane metode smo torej dosegli primerne in enakomerne razmere za rast za vse jamice vseh uporabljenih mikrotitrskih plošč in s temi spremembami omogočili nadaljnje eksperimentalno delo z manjšo eksperimentalno napako.

5.1.1.2 Optimizacija izbire seva

Rezultati primerjave beta-galaktozidazne aktivnosti med testerskima sevoma *B. subtilis* PS1010 in BD2876 so pokazali, da se je nekoliko višja aktivnost pojavila ob uporabi sevov BD (pri rasti v producerskem izrabljenem gojišču - PIG). Razlike sicer niso bile signifikantne ($p=0,07$ pri stopnji značilnosti 0,05). Morda so producerske bakterije *B.*

subtilis BD2833 proizvedle nekoliko več feromona ComX kot producerske bakterije *B. subtilis* PS1004 oz. je bil testerski sev BD morda malce bolj občutljiv na ComX, čeprav tega ne moremo trditi, saj nismo izmerili ComX z direktno metodo. Pri BD sevih se je poleg višje β -galaktozidazne aktivnosti v PIG pojavila tudi nižja aktivnost v testerskem izrabljenem gojišču (TIG), kar je bilo za vrednotenje vpliva temperature na produkcijo feromona ComX ugodno. Za sledenje količine ComX z biosenzorjem je namreč zaželeno, da je razlika med vzorcem in kontrolo čim večja, saj to omogoča lažje sledenje vpliva okoljskih dejavnikov (npr. temperature). Iz tega razloga smo se kljub nesignifikantnim razlikam odločili za uporabo sevov BD za nadaljnje preizkuse.

5.1.1.3 Optimizacija dolžine gojenja testerja za inokulacijo mikrotitrskih plošč

Preizkus, pri katerem smo spremljali razlike v β -galaktozidaznih aktivnostih v odvisnosti od rastne faze testerja BD2876, je pokazal nekoliko višje β -galaktozidazne aktivnosti v primeru, ko je tester za inokulum bil inokuliran na mikrotitrski plošče v eksponentni fazi rasti (v našem primeru po 4 urah gojenja). Vendar pa razlike niso signifikantne ($p = 0,15$ pri stopnji značilnosti 0,05). Pri testerskem sevu, inokuliranem v eksponentni fazi rasti, se je pojavila večja razlika med β -galaktozidaznimima aktivnostma v PIG (producerskem izrabljenem gojišču) in TIG (testerskem izrabljenem gojišču) kot pri testerskem sevu v stacionarni fazi, kar je bilo zaželeno. Kljub nesignifikantni razlikam smo se pri nadaljnjih preiskusih odločili v prid krajšemu gojenju testerskega seva, kar nam je tudi časovno olajšalo eksperimentalno delo.

5.1.1.4 Optimizacija temperature med merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti s spektrofotometrom

Z uvedbo segrevanja plošč in ONPG raztopine na 30 °C pred merjenjem v spektrofotometru smo poskrbeli za lažje vzdrževanje konstantne temperature na plošči med

samim merjenjem. Pri neoptimizirani metodi je bila namreč začetna temperatura, pri kateri je reakcija začela teči, veliko nižja od končne temperature v spektrofotometru in encim β -galaktozidaza ni mogel optimalno delovati skozi celoten potek merjenja. Z optimizacijo protokola merjenja v spektrofotometru smo dosegli, da se je plošča v celoti med merjenjem zadrževala pretežno nad grelcem in tako odpravili pregrevanje na levi strani plošče oz. temperaturni gradient, ki se je pojavljal vzdolž nje pri neoptimizirani metodi. Poleg tega so rezultati pri optimizirani metodi pokazali signifikantno višje β -galaktozidazne aktivnosti ($p < 0,00001$ pri stopnji značilnosti 0,05) iz česar lahko zaključimo, da je bila povprečna temperatura v gojišču v jamicah mikrotitrne plošče po optimizaciji bližje optimalni temperaturi za delovanje encima β -galaktozidaze.

5.1.2 Vpliv temperature na potencial izrabljenega gojišča sevov *B. subtilis* za indukcijo aktivnosti *srfA-lacZ* operona

5.1.2.1 Vpliv temperature na rast producentskih in testerskih sevov *B. subtilis* (rastne krivulje ob pridobivanju izrabljenih gojišč)

Primerjava rastnih krivulj producentskih in testerskih sevov *Bacillus subtilis* (BD2833 in BD2876), ki smo jih gojili pri različnih temperaturah, je pokazala najvišjo hitrost rasti pri 37 °C, nekoliko nižjo pri 51,5 °C ter najnižjo pri 24 °C, kar je bilo tudi pričakovati.

5.1.2.2 Vpliv izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah gojenja, na izražanje *srfA-lacZ*

Izražanje *srfA-lacZ* pri testerskem sevu *B. subtilis* BD2876 se z naraščanjem deleža producentskega izrabljenega gojišča (PIG) ter z višanjem temperature pri pridobivanju izrabljenih gojišč povečuje. Ker se z višanjem deleža PIG povečuje koncentracija signalnega peptida ComX (ComX najdemo le v PIG), bi lahko, ob predpostavki, da je aktivnost testerskega seva odvisna predvsem od koncentracije ComX, višje rezultate β -gal. aktivnosti pripisali večji količini tega feromona. Rahla obarvanost ob prisotnosti

testerskega seva, nacepljenega v svežem ali testerskem izrabljenem gojišču, se pojavi zaradi prisotnosti peptida CSF, ki tudi inducira izražanje *srfA* operona (Solomon in sod., 1996) in se sintetizira tudi v testerskih sevih. Naraščanje β -galaktozidaznih aktivnosti z večanjem deleža PIG je vidno pri vseh treh temperaturah (24, 37 in 51,5 °C). Najvišje vrednosti β -galaktozidazne aktivnosti se pojavijo pri 100 % PIG, odstopanje najdemo le pri temperaturi 51,5 °C, kjer sklepamo, da se je biosenzor zasičil. Kaže, da ima temperatura precejšen vpliv na količino β -galaktozidaze in s tem morda na sintezo ComX (vpliv faktorja CSF na β -galaktozidazno aktivnost smo v grafičnih prikazih že odšteli).

Odstopanja pri prikazu β -galaktozidaznih aktivnosti pri različnih koncentracijah izrabljenih gojišč niso velika, eksperimentalna napaka se v povprečju giblje okoli 7 %. Pred uvedenimi optimizacijami je bila napaka približno 20 %. Izboljšava optimizirane metode se kaže tudi v približno 4-krat višjih vrednostih β -galaktozidaznih aktivnosti, ki smo jih dosegli z uvedbo optimizacij in z redčenjem PIG (sistem se je pri višjih koncentracijah PIG pri 51,5 °C že zasičil). Rezultati torej potrjujejo našo hipotezo, da bo optimizirana metoda detekcije feromona ComX s pomočjo biosenzorja (testerskega seva) omogočala posredno merjenje količine sintetiziranega feromona preko aktivnosti β -galaktozidaze z eksperimentalno napako, manjšo od 10 %.

Najvišje β -galaktozidazne aktivnosti se v naši raziskavi pojavljajo pri gojenju testerskega seva v izrabljenem gojišču (IG), pridobljenem pri najvišji temperaturi, torej pri 51,5 °C, sledi aktivnost v IG (37 °C), najnižjo aktivnost testerskega seva pa zaznamo v IG, pridobljenem iz kulture, gojene pri 24 °C. Primerjava vrednosti β -galaktozidaznih aktivnosti med neodvisnimi biološkimi preizkusi pri 25 % deležu PIG (linearno območje testa) sicer pokaže določena odstopanja v vrednostih med posameznimi preizkusi. Kljub odstopanjem pa se vseeno pri vsakem neodvisnem preizkusu posebej ohranja omenjeno razmerje med različnimi temperaturami in ekspresijo *srfA*; rezultati so statistično značilni.

Ob naši prvotni predpostavki da signalni peptid ComX neodvisno vpliva na rezultate β -galaktozidaznih aktivnosti testerskega seva, smo glede na rezultate sklepali, da se produkcija ComX povečuje z naraščanjem temperature, pri kateri gojimo bakterije za pridobitev izrabljenega gojišča. Vrhar (2012) je v diplomskem delu tudi pokazala, da se koncentracije feromona ComX v izrabljenih gojiščih povečujejo z višanjem temperature ob pridobitvi izrabljenih gojišč in so bile tudi njene meritve višje za IG pri 51 °C kot pri 37 °C

ali pri 24 °C, kar se sklada z našo hipotezo. Vendar pa istočasno navaja, da se pri višji temperaturi pojavi nižja ekspresija genov *comX* in *comQ*, prav tako pa se pri 51 °C precej zniža tudi ekspresija *srfA-lacZ*. Gena *comX* in *comQ* sta bistvena pri sintezi signalne molekule ComX (Bacon Schneider in sod., 2002) in njuno zmanjšano izražanje pri višjih temperaturah nakazuje na potencialno zmanjšano sintezo ComX. Tudi nekatere druge raziskave, v katerih so preiskovali temperaturno odvisnost izražanja signalnih molekul AHL pri po Gramu negativnih bakterijah, kažejo v prid zmanjšanju produkcije signalnih molekul pri višjih temperaturah (Medina-Martinez in sod., 2006; Barnard in sod., 2007; Tait in sod., 2010). Podoben učinek naj bi temperatura imela tudi na izražanje *srfA*; Ohno in sod. (1995) so pri preučevanju vpliva temperature na produkcijo surfaktina pri *B. subtilis* ugotovili, da se je pri gojenju sevov pri temperaturah 23, 37 in 48 °C pojavi optimalna produkcija pri 37 °C, nad to temperaturo pa se le-ta zniža. Naraščanje β -galaktozidaznih aktivnosti testerja z naraščanjem temperature ob pridobitvi izrabljenih gojišč v naših preizkusih bi lahko razložili s prej omenjenim pojavom višjih koncentracij ComX v izrabljenem gojišču pri visokih temperaturah. Morda je to posledica večje difuzije molekul ComX v izvencelični prostor zaradi višjih temperatur (Vrhar, 2012). Vendar pa je zanimivo to, da se izražanje *srfA* testerskega seva *B. subtilis* ob rasti pri različnih temperaturah spremeni tudi ob konstantni koncentraciji ComX. Ugotovili so, da je bila v tem primeru ekspresija *srfA* pri 51 °C minimalna, nekoliko višja pri 37 °C in najvišja pri 24 °C (Vrhar 2012). To se razlikuje od naših rezultatov, kjer je bila ekspresija *srfA* največja pri 51,5 °C in se je s temperaturo nižala, vendar smo mi testirali vpliv izrabljenih gojišč, pridobljenih pri različnih temperaturah, medtem, ko je bila temperatura gojenja testerskega seva konstantna (28 °C). Kot kaže pa vseeno na izražanje gena *srfA* in s tem na pojav β -galaktozidaznih aktivnosti ne vpliva le feromon ComX, kot smo najprej domnevali, ampak gre tu za vpliv drugih dejavnikov, ki vplivajo na dinamiko izražanja *srfA* v odvisnosti od temperature. Morda ta faktor vpliva na katero od komponent komunikacijskega sistema comQXPA ali pa vpliva po neki drugi poti na izražanje gena *srfA*. Naši rezultati bi lahko torej bili delno odraz količine signalnega peptida ComX v posameznem izrabljenem gojišču, delno pa morda tudi odraz vpliva neznanega regulatorja izražanja *srfA*, katerega aktivnost/koncentracija se viša z višanjem temperature. Glede na podatke Vrhar (2012) ne moremo potrditi naše hipoteze, da je količina sintetiziranega ComX v pozitivni korelaciji s

temperaturo, se pa s temperaturo vsekakor povečuje potencial izrabljenega gojišča za indukcijo *srfA-lacZ*.

Poleg tega hitrost rasti ne vpliva bistveno na zmožnost izrabljenega gojišča, da sproži izražanje *srfA-lacZ*, saj je bila hitrost rasti producenta najvišja pri 37 °C in ne pri 51,5 °C, kjer je bila glede na naše podatke ekspresija gena *srfA* največja. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da odnos med hitrostjo rasti in sintezo omenjenega feromona ni premosorazmeren, kar potrjuje naše prvotne domneve.

5.2 SKLEPI

- Metoda za posredno določanje količine feromona ComX preko merjenja β -galaktozidazne aktivnosti sevov *B. subtilis* po uvedenih optimizacijah omogoča merjenje z eksperimentalno napako, manjšo od 10 %.
- Potencial izrabljenega gojišča, da sproži ekspresijo *srfA-lacZ*, se večja z naraščanjem temperature ob pridobitvi izrabljenega gojišča; ekspresija *srfA* je najvišja pri 51,5 °C in najnižja pri 24 °C.
- Povečan potencial izrabljenega gojišča za indukcijo gena *srfA-lacZ* pri višjih temperaturah ne moremo pripisati le koncentraciji ComX, glede na podatke, ki jih je objavila v diplomskem delu Vrhar (2012).
- Hitrost rasti sevov *B. subtilis* ne korelira premosorazmerno s potencialom izrabljenega gojišča, da inducira izražanje gena *srfA-lacZ*.

6 POVZETEK

Vpliv dejavnikov okolja na zaznavanje kvoruma pri bakterijah je v splošnem slabo poznan. Namen diplomskega dela je bil optimizirati metodo za testiranje vpliva okoljskih dejavnikov (temperature) na medcelično komunikacijo, natančneje na produkcijo feromona ComX pri bakteriji *Bacillus subtilis*.

Operon *comQXPA* pri *B. subtilis* kodira mehanizem za zaznavanje celične gostote in nadzoruje razvoj genetske kompetence in drugih prilagoditev stacionarne stopnje rasti. ComQ je protein, ki modificira peptidno signalno molekulo ComX, ki se nato izloči iz celice. Feromon ComX zazna dvokomponentni sistem ComP-ComA, kar vodi v izražanje gena *srfA* ter s tem v razvoj kompetence in produkcijo surfaktina (Bacon Schneider in sod., 2002).

V preizkusih smo uporabili dva seva *B. subtilis* in sicer producentski sev BD2833, ki proizvaja feromon ComX ter testerski sev BD2876, ki omenjenega feromona ne sintetizira, se pa nanj lahko odzove (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Oba seva sta v genomu vsebovala fuzijo genov *srfA-lacZ*. Producentske in testerske seve *B. subtilis* smo gojili pri različnih temperaturah (51,5 °C, 37 °C in 24 °C) ter pri teh temperaturah pridobili njihova izrabljena gojišča. Izrabljena gojišča testerskega oz. producentskega seva smo testirali na vsebnost ComX s pomočjo biosenzorja (testerskega seva) ter tako preverjali vpliv temperature na sintezo omenjenega feromona posredno preko izražanja gena *srfA-lacZ* testerskega seva.

V okviru optimizacije metode smo optimizirali rast testerskega seva v mikrotitrskih ploščah, pri čemer smo plošče opremili z nosilčki za boljše prehajanje kisika, podložkami za fiksacijo pokrovov ter jih inkubirali v vreči, v primerno vlažni atmosferi. S tem smo uspeli zmanjšati izhlapevanje in ustvariti razmere za enakomerno rast testerja čez celotno mikrotitrsko ploščo. Sledila je optimizacija seva in sicer smo seve PS *Bacillus subtilis* zamenjali s sevi BD iste vrste. Z zamenjavo sevov smo pri BD sevih zaznali malce višje β -galaktozidazne aktivnosti v primerjavi s sevi PS *Bacillus subtilis*. Preverili smo vpliv

rastne faze testerskega seva za inokulacijo mikrotitrskih plošč, na katerih smo merili β -galaktozidazno aktivnost. Optimizacija je vključila tudi segrevanje plošč in ONPG raztopine na 30 °C ter prilagoditev temperature in programa merjenja v spektrofotometru pred začetkom preizkusa. To je prispevalo k bolj temperaturno izenačenim razmeram vzdolž celotne mikrotitrskje plošče ter konstantni temperaturi za delovanje encima β -galaktozidaze od začetka do konca poteka reakcije. Rezultati so pokazali signifikantno višje β -galaktozidazne aktivnosti pri izboljšani metodi. Eksperimentalna napaka pri merjenju β -galaktozidaznih aktivnosti pri različnih deležih producerskega izrabljenega gojišča je bila po uvedenih omenjenih optimizacijah manjša od 10 %, pred optimizacijami pa je ta napaka bila 20 %. Poleg tega je bila vrednost β -galaktozidaznih aktivnosti pred uvedbo optimizacij tudi do 4-krat manjša.

Meritve β -galaktozidazne aktivnosti pri gojenju testerskega seva v izrabljenih gojiščih, pridobljenih pri različnih temperaturah, so pokazale, da je bilo izražanje *srfA-lacZ* najvišje v izrabljenem gojišču, ki smo ga pridobili pri 51,5 °C, nekoliko nižja pri 37 °C in najnižja pri 24 °C. Ti rezultati nakazujejo, da je sposobnost izrabljenega gojišča, da inducira izražanje *srfA*, v pozitivni korelaciji s temperaturo. Morda bi s temperaturo lahko naraščala tudi količina ComX feromona, vendar tega na osnovi naših preizkusov ne moremo trditi. Hitrost rasti je bila najvišja pri 37 °C in ne pri 51,5 °C, kar kaže, da vpliv temperature ni v direktni korelaciji s hitrostjo rasti in torej ne gre za premosorazmeren odnos.

7 VIRI

Abdel-Mawgoud A.M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A. 2008. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150, 3: 289-303

Ali A., Ikramullah M., Asif S., Ahmad A., Jamal A., Jaffri S. A. 2010. Evaluation of lipopeptide (surfactin) production by *Bacillus subtilis*. *Biomedica*, 26: 34-38

Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Molecular Microbiology*, 44, 6: 1561-73

Arnosti D.N., Singer V.L., Chamberlin M.J. 1986. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 168, 3: 1243-1249

Bacon Schneider K., Palmer T.M., Grossman A. D. 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 2: 410-419

Barnard A.M.L., Bowden S.D., Burr T., Coulthurst S.J., Monson R.E., Salmond G. P. C. 2007. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 362: 1165-1183

Budde I., Steil L., Scharf C., Völker U., Bremer E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*, 152, 831–853

Cosby W. M., Vollenbroich D., Lee O. H., Zuber P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K

oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 180, 6: 1438–1445

Dubnau D., Turgay K. 2000. The regulation of competence in *Bacillus subtilis* and its relation to stress response. V: *Bacterial stress responses*. Storz G., Hengge-Aronis R. (eds.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 249-260

Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269-275

Fujiya M., Musch M.W., Nakagawa Y., Hu S., Alverdy J., Kohgo Y., Schneewind O., Jabri B., Chang E.B. 2007. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe*, 1, 4: 299-308.

Hamoen L.W., Venema G., Kuipers O.P. 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149: 9–17

Hayashi K., Ohsawa T., Kobayashi K., Ogasawara N., Ogura M. 2005. The H₂O₂ stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187, 19: 6659–6667

Hecker M., Schumann W., Völker U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 19, 3: 417–428

Helmann J.D., Winston Wu M.F., Kobel P.A., Gamo F.J., Wilson M., Morshedi M.M., Navre M., Paddon C. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *Journal of Bacteriology*, 183, 24: 7318–7328

Holtmann G., Bremer E. 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of the Opu transporters. *Journal of Bacteriology*, 186: 1683–1693

Holtmann G., Brigulla M., Steil L., Schütz A., Barnekow K., Völker U., Bremer E. 2004. RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *Journal of Bacteriology*, 186: 6150–6158

Latour X., Diallo S., Chevalier S., Morin D., Smadja B., Burini J.-F., Haras D., Orange N. 2007. Thermoregulation of N-Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 12: 4078-4081

Lazazzera B.A., Grossman A.D. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology*, 6, 7: 288-294

Medina-Martínez M.S., Uyttendaele M., Demolder V., Debevere J. 2006. Effect of temperature and glucose concentration on the N-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. *Food Microbiology*, 69: 534–540

McGowan S.J., Barnard A.M.L., Bosgelmez G., Sebahia M., Simpson N.J.L., Thomson N.R., Todd D.E., Welch M., Whitehead N.A., Salmond G.P.C. 2005. Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing dependent control pathway. *Molecular Microbiology*, 55, 2: 526–545

Nakano M.M., Zuber P. 1993. Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 175, 10: 3188-3191

Nichols D.S., Nichols P.D., McMeekin T.A. 1995. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and ice-sea. *Science Progress*, 78: 311–348

Ohno A., Ano T., Shoda M. 1995. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 5: 517-519

Ohsawa T., Tsukahara K., Sato T., Ogura M. 2006. Superoxide stress decreases expression of *srfA* through inhibition of transcription of the *comQXP* quorum-sensing locus in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, 139: 203–211

Okada M., Yamaguchi H., Sato I., Tsuji F. 2008. Chemical structure of posttranslational modification with a farnesyl group on tryptophan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, 3: 914–918

Schumann W. 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress & Chaperones* 8, 3: 207–217

Solomon J.M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A.D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 9: 547-558

Solomon J. M., Lazazzera B. A., Grossman A. D. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 10: 2014-2024

Surette M.G., Miller M.B., Bassler B.L. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 1639–1644

Štefanič P., Mandić-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756-1764

Tait K., Hutchinson Z., Thompson F.L., Munn C.B. 2010. Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 1: 145-150

Turgay K., Hamoen L.W., Venema G., Dubnau D. 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 11: 119-128

Vrhar M. 2012. Vpliv temperature na izražanje gena *comX* bakterije *Bacillus subtilis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 43-48

Wipat A., Harwood C.R. 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 1-9

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

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem svojemu delovnemu mentorju, dr. Iztoku Dogši, za posvečen čas, potrpljenje ter stalno pomoč in podporo tekom izvedbe celotne diplomske naloge.

Za mentorstvo, vse koristne napotke in razumevanje bi se rada zahvalila prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

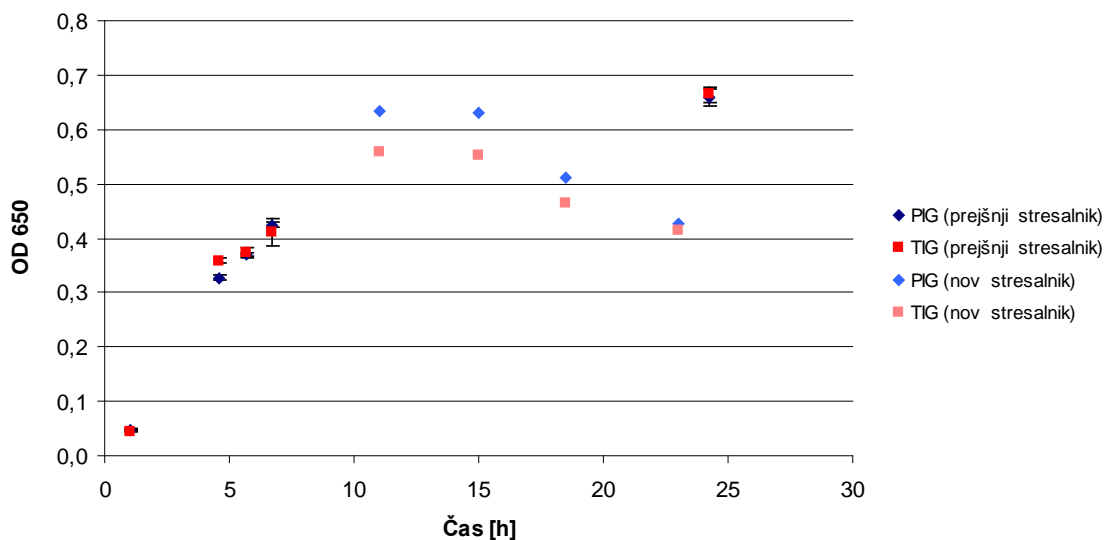
Prof. dr. Sonji Smole Možina se zahvaljujem za hiter in strokoven pregled diplomskega dela. Za oblikovno popravilo naloge bi se zahvalila tudi gospe Lini Burkan Makivić.

Za pomoč in vse nasvete pri eksperimentalnem delu se zahvaljujem Simoni Leskovec. Prav tako hvala vsem ostalim na Katedri za mikrobiologijo, ki so mi s svojimi predlogi in drugače pomagali pri izvedbi poskusov.

Posebna zahvala gre mojim domačim, in sicer za vso podporo, ki so mi jo nudili tekom študija ter za potrpljenje in spodbudo, tudi ko sem včasih imela kakšen težek dan...

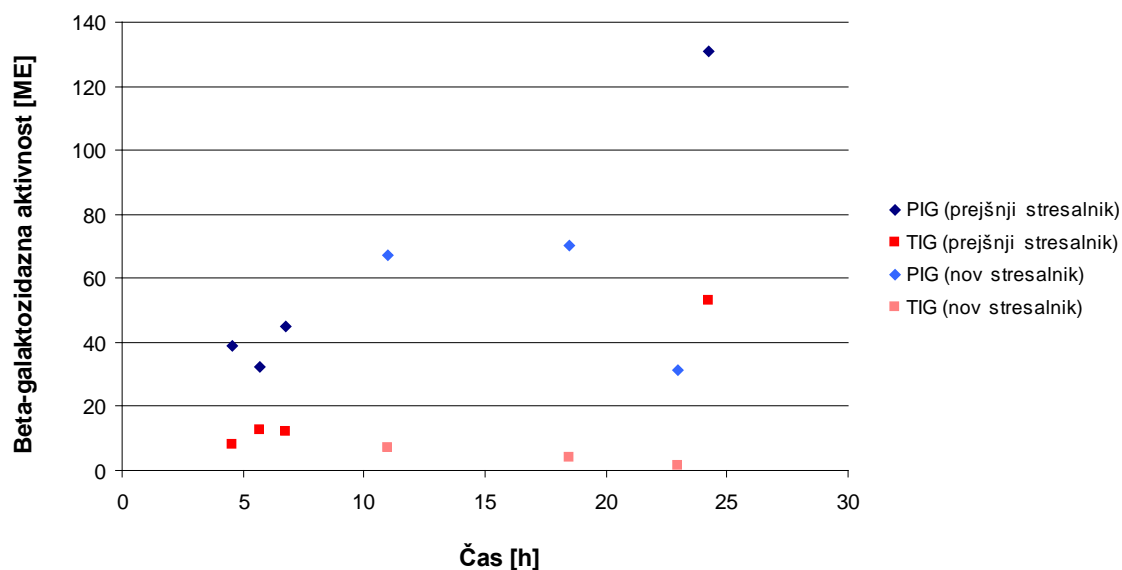
In nazadnje, hvala Sonji, Tini, Vesni, Katarini za skupaj prebite urice polne smeha...z vami je bil še tako težek kilometer dolg le par korakov. Hvala tudi vsem ostalim, ki so mi krajšali čas, preživet na faksu in drugje, ter naredili moje študijske dneve lepe...

PRILOGE



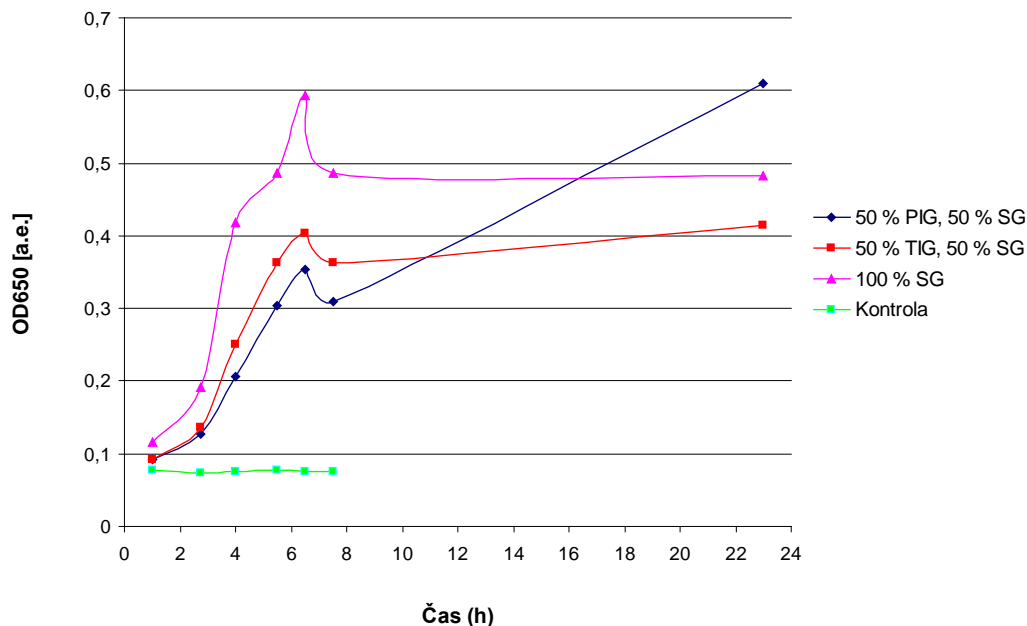
Priloga A: Rast testerskega seva PS1010 (*Bacillus subtilis*) v mikrotitrskih ploščah, stresanih na stresalniku za erlenmajerice in stresalniku za mikrotitrsko ploščo.

V jamicah ene mikrotitrsko ploščo je bilo 50 % svežega gojišča (SG), 50 % izrabljenega gojišča producenta (PIG) ter 2 % inokulum testerja, v jamicah druge ploščo pa smo PIG nadomestili z izrabljenim gojiščem testerja (TIG). Ploščo smo gojili na 37 °C. Zaradi menjave stresalnika med samim preizkusom so mikrotitrsko ploščo najprej inkubirali pri 250 obr./min, v drugem delu preizkusa pa na novem stresalniku za mikrotitrsko ploščo pri 1000 obr./min. Med gojenjem smo v zaporednih časovnih intervalih prekinjali rast testerja ter merili OD₆₅₀. Modre točke označujejo rast v PIG, rdeče oz. rožnate točke pa rast v TIG.



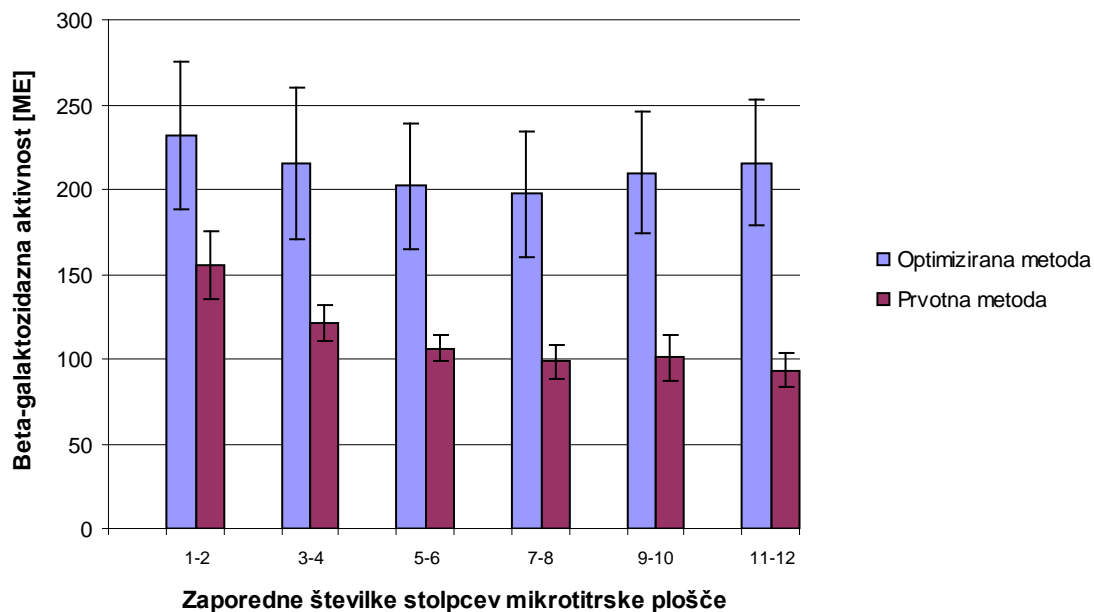
Priloga B: β -galaktozidazna aktivnost testerskega seva PS1010 (*Bacillus subtilis*) v mikrotitrskih ploščah, stresanih na stresalniku za erlenmajerice in stresalniku za mikrotitrsko ploščo (določanje najprimernejšega časovnega intervala za prekinitev rasti testerskega seva).

Pridobili smo β -galaktozidazne aktivnosti testerskega seva PS1010 v mikrotitrskih ploščah in sicer z namenom ugotoviti v kateri fazi gojenja se pojavljajo najprimernejše aktivnosti za izvajanje meritev. Modre točke označujejo rast v PIG, rdeče oz. rožnate točke pa rast v TIG. Izbrani čas gojenja je moral omogočati praktično izvedbo preizkusa, čim višje β -gal. aktivnosti ter zadostno razliko med β -gal. aktivnostma v PIG in TIG. Zaradi nadaljnega dela z novim stresalnikom smo preferenčno upoštevali točke, dobljene z le-tem. Največja razlika v β -galaktozidaznih aktivnostih med gojenjem testerja v PIG in TIG na novem stresalniku se je pokazala pri 12 in 19 urah rasti. Ker smo predpostavljali, da se ravno tako visoke vrednosti β -galaktozidaznih aktivnosti pojavijo tudi med omenjenima časovnima intervaloma in zaradi lažje praktične izvedbe, smo se odločili, da je rast testerja v mikrotitrskih ploščah najbolj smiselno prekiniti po 16 urah gojenja.



Priloga C: Rastne krivulje testerja BD2876 v mikrotitrskih ploščah pri rasti v mešanici svežega gojišča s 50 % producentnim izrabljenim gojiščem (PIG), v mešanici svežega gojišča s 50 % testerskim izrabljenim gojiščem (TIG) in v 100 % svežem gojišču (SG).

Najboljša rast testerja BD2876 se je pojavila v 100 % svežem gojišču, nekoliko slabšo rast smo zaznali v mešanici SG z izrabljenimi gojišči, torej v mešanici SG s 50 % PIG oziroma s 50 % TIG. Po 16 urah gojenja v mikrotitrskih ploščah (tu smo v preizkusih prekinili rast in izvajali nadaljnje meritve) so bile že krepko v stacionarni fazi rasti. Točka OD_{650} pri 23 urah gojenja testerskega seva v mešanici 50 % SG s 50 % PIG, ki izstopa, je posledica kontaminacije.



Priloga D: Prikaz β -galaktozidaznih aktivnosti po stolpcih mikrotitrne plošče pred in po uvedbi optimizirane metode pri merjenju s spektrofotometrom.

Za naslednji prikaz smo združili po dva zaporedna stolpca mikrotitrne plošče ter prikazali njuno povprečje β -galaktozidazne aktivnosti (to smo izvedli za lažjo primerjavo, saj je bila pri meritvah v mikrotitrskih ploščah vsebina dveh zaporednih stolpcev vedno enaka - 2 ponovitvi). Vijolični stolpci prikazujejo rezultate pred optimizacijo, modri stolpci pa rezultate po optimizaciji. Pri optimizirani metodi ni vidnega padca β -galaktozidaznih aktivnosti z leve proti desni strani plošče, kot to lahko opazimo pri merjenju po predhodni metodi.