

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja GORŠE

**MOLEKULARNOBIOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJ
IZOLIRANIH IZ POMIVALNIH STROJEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja GORŠE

**MOLEKULARNOBIOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJ IZOLIRANIH
IZ POMIVALNIH STROJEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**MOLECULAR ANALYSIS OF BACTERIA ISOLATED FROM
DISHWASHERS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Microbiology

Ljubljana, 2015

Gorše M. Molekularnobiološka analiza bakterij izoliranih iz pomivalnih strojev.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur-Bertok, za somentorico prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentorica: prof. Marjanca Starčič Erjavec

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja Gorše

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
 DK UDK 579.22/.26 : 579.84 : 577.2.083 + 579.065 (043) = 163.6
 KG patogeni mikroorganizmi/molekularna genetika/virulentni dejavniki/*Pseudomonas aeruginosa/Escherichia coli*/pomivalni stroji/piocianin/biofilm/PCR
 AV GORŠE, Maja, dipl. mikrobiol. (UN)
 SA ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/SEME, Katja (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
 LI 2015
 IN MOLEKULARNOBIOLOŠKA ANALIZA BAKTERIJ IZOLIRANIH IZ POMIVALNIH STROJEV
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
 OP X, 63 str., 14 pregl., 8 sl., 2 pril., 121 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AB Bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*) in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) veljata za ubikvitarna mikroorganizma, saj jima njuna sposobnost prilagajanja na širok spekter dejavnikov omogoča preživetje tudi v tako specifičnem okolju, kot je pomivalni stroj. Zaradi prisotnih virulentnih dejavnikov pa jih velkokrat najdemo tudi med povzročitelji različnih okužb pri človeku. Da bi ugotovili, ali pomivalni stroj predstavlja možen rezervoar potencialno patogenih bakterij, smo preučili 6 sevov *E. coli* in 7 sevov *P. aeruginosa*, izoliranih iz tesnila pomivalnih strojev. Seve *E. coli* smo umestili v filogenetske skupine in določili prisotnost zapisov značilnih za plazmide. Opredelili smo dolžino lipopolisaharida (LPS), ocenili frekvenco konjugativnega prenosa, preverili prisotnost lizogenih fagov, kolicinov in občutljivost za bakteriofag P1. Vsi sevi so pripadali filogenetski skupini A. Zapis za RepFIA smo dokazali pri 3 (50 %), zapise RepFIIA, *traT* in *traJ* pri 1 sevu (17 %). Vsi sevi so imeli O-antigensko verigo srednjih dolžin. Frekvence konjugativnega prenosa so variirale med 10^{-2} in 10^{-7} . Pri nobenem sevu nismo dokazali kolicinov, lizogenih fagov ali občutljivosti za bakteriofag P1. Sevom *P. aeruginosa* smo določili zapise za virulentne dejavnike in mobilne elemente. Določili smo frekvenco spontanih mutacij, sposobnost tvorbe biofilma, frekvenco konjugativnega prenosa in produkcijo piocianina. Zapise za *lasB*, *nan2*, *plcN* in *rhlAB* smo dokazali pri 7 (100 %), zapise *algD*, *exoS* in *toxA* pri 6 (86 %), zapis *nan1* pri 5 sevih (71 %). Frekvenca spontanih mutacij je variirala med 10^{-8} in 10^{-9} . Vsi sevi so bili sposobni tvorbe biofilma in produkcije piocianina, njihove količine so se med seboj močno razlikovale. Pri nobenem sevu *P. aeruginosa* ni prišlo do konjugativnega prenosa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
 DC UDC 579.22/.26 : 579.84 : 577.2.083 + 579.065 (043) = 163.6
 CX pathogens/molecular genetics/virulence factors/*Pseudomonas aeruginosa*/
Escherichia coli/dishwashers/piocianin/biofilm/PCR
 AU GORŠE, Maja
 AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca
 (co-advisor)/SEME, Katja (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
 PY 2015
 TY MOLECULAR ANALYSIS OF BACTERIA ISOLATED FROM DISHWASHER
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
 NO X, 63 p., 14 tab., 8 fig., 2 ann., 121 ref.
 LA sl
 AI sl/en
 AB Bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) are ubiquitous and adaptable microorganisms capable of surviving extreme environmental conditions and are present even in dishwashers. Due to the presence of different virulence factors they are capable of causing various infections. In order to determine whether dishwashers represent a reservoir of potentially pathogenic bacteria, 6 *E. coli* and 7 *P. aeruginosa* strains isolated from dishwasher seals were studied. *E. coli* strains were classified into phylogenetic groups and the presence of specific regions of plasmids were determined. The length of LPS was characterized, the frequency of conjugal transfer was evaluated, the presence of phages, colicins and sensitivity to bacteriophage P1 was checked. All *E. coli* strains belonged to phylogenetic group A. The gene for RepFIA was detected in 3 strains (50 %), RepFIIA, *traT* and *traJ* in 1 strain (17 %). All strains had intermediate O-antigen chain length. The conjugal transfer frequency varied from 10^{-2} to 10^{-7} . None of the strains possessed colicins, phages or was sensitive to bacteriophage P1. In the studied *P. aeruginosa* strains the presence of virulence factors and mobile elements was determined. The frequency of spontaneous mutations, biofilm formation ability, frequency of conjugal transfer and piocianin production were determined. Virulence factor genes *lasB*, *nan2*, *plcN* and *rhlAB* were detected in 7 (100 %), *algD*, *exoS* and *toxA* in 6 (86 %), and *nan1* in 5 strains (71 %). The frequency of spontaneous mutations varied from 10^{-8} to 10^{-9} . All *P. aeruginosa* strains were capable of biofilm formation and piocianin production, but their quantities differed significantly from each other. There was no conjugal transfer in any of the *P. aeruginosa* strains.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 BAKTERIJA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.3 LIPOPOLISAHARID (LPS)	4
2.4 PLAZMIDI	7
2.5 KONJUGATIVNI PRENOS PLAZMIDOV	8
2.6 KOLICINI	9
2.7 BAKTERIOFAGI	10
2.8 MOBILNI ELEMENTI PRI <i>P. aeruginosa</i>	11
2.9 VIRULENTNI DEJAVNIKI PRI <i>P. aeruginosa</i>	11
2.10 PIOCIANIN	12
2.11 BIOFILM PRI <i>P. aeruginosa</i>	12
2.12 SPONTANE MUTACIJE PRI <i>P. aeruginosa</i>	14
2.13 HIPERMUTATORSKI SEVI.....	14
2.14 METODE PCR	15
2.14.1 ERIC-PCR	15
2.14.2 Filogenetski PCR	16
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1. MATERIALI	19
3.1.1 Bakterijski sevi	19
3.1.1.1 Laboratorijski bakterijski sevi	19
3.1.2 Plazmidi	20
3.1.2.1 Plazmid pRK2	20
3.1.2.2 Plazmid pOX38	20
3.1.3 Gojišča	20
3.1.3.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)	20
3.1.3.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah.....	21
3.1.3.3 Priprava trdnih minimalnih gojišč (MG)	21
3.1.3.4 Priprava R-mehkega agarja	21
3.1.3.5 Priprava R-plošč	21
3.1.4 Kemikalije.....	22

3.1.5 Encimi in standardne DNA-lestvice.....	23
3.1.6 Začetni oligonukleotidi.....	23
3.1.7 Pufri in reagenti.....	25
3.1.7.1 Ekstrakcija LPS	25
3.1.7.1.1 Pufer za lizo	25
3.1.7.1.2 Pufer za lizo s SDS	25
3.1.7.1.3 2 × nanašalni pufer.....	25
3.1.7.2 Barvanje LPS s srebrom.....	25
3.1.7.2.1 Fiksacijski pufer.....	25
3.1.7.2.2 Oksidacijski pufer	25
3.1.7.2.3 Pufer za barvanje	25
3.1.7.2.4 Pufer za razvijanje barve	26
3.1.7.2.5 Pufer za ustavitev razvijanja barve	26
3.1.7.3 Tris-glicin SDS-PAGE.....	26
3.1.7.3.1 Gel za Tris-glicin SDS-PAGE	26
3.1.7.3.2 10 × Tris-glicin SDS-PAGE pufer.....	26
3.1.7.4 5 × pufer TBE.....	26
3.1.7.5 Izolacija plazmidne DNA z alkalno denaturacijo	27
3.1.7.5.1 Raztopina I.....	27
3.1.7.5.2 Raztopina II	27
3.1.7.5.3 Raztopina III	27
3.1.8 Komercialni kompleti.....	27
3.1.9 Oprema	27
3.2 METODE.....	29
3.2.1 Gojenje izolatov	29
3.2.2 Preverjanje občutljivosti za antibiotike	29
3.2.3 Shranjevanje bakterijske kulture	29
3.2.4 Veržna reakcija s polimerazo (PCR)	29
3.2.4.1 Priprava celičnih lizatov	29
3.2.4.2 ERIC-PCR.....	29
3.2.4.3 Filogenetski PCR	30
3.2.4.4 PCR za preverjanje prisotnosti plazmidov	30
3.2.4.5 Preverjanje prisotnosti virulentnih dejavnikov in mobilnih elementov pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	32
3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza	34
3.2.6 LPS-profiliranje z metodo SDS-PAGE.....	34
3.2.6.1 Ekstrakcija LPS in elektroforeza	34
3.2.6.2 Barvanje LPS s srebrom	34
3.2.7 Izolacija plazmidne DNA z metodo alkalne denaturacije	35
3.2.8 Izolacija plazmidne DNA s komercialnim kompletom QIAGEN Plasmid Midi Kit	35
3.2.9 Restrikcija izoliranih plazmidov z restrikcijskim encimom EcoRI.....	36
3.2.10 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi <i>E. coli</i> (recipient) × <i>E. coli</i> HB101 pOX38:Cm (donor).....	36
3.2.11 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi <i>E. coli</i> (recipient) × <i>E. coli</i> MV10 pRK2:Tc (donor)	36
3.2.12 Indukcija lizogenih fagov z UV	36

3.2.13 Določanje občutljivosti seva za bakteriofag P1	37
3.2.14 Določanje kolicinogenosti sevov <i>E. coli</i>.....	37
3.2.15 Preverjanje frekvence mutacij bakterij <i>P. aeruginosa</i> z antibiotikom rifampicinom	37
3.2.16 Določanje sposobnosti tvorbe biofilma in kvantifikacija na polistirenski mikrotitrski ploščici (a) in v epruvetah (b)	38
3.2.17 Določanje produkcije bakterijskega pigmenta piocianina pri sevih <i>P. aeruginosa</i>.....	38
3.2.18 Preverjanje frekvence konjugacije z dvema sevoma <i>P. aeruginosa</i> (recipienta) in <i>E. coli</i> MV10 pRK2:Tc (donor)	38
4 REZULTATI.....	39
4.1 ERIC-PCR	39
4.2 FILOGENETSKE SKUPINE	40
4.3 PRISOTNOST PLAZMIDOV	40
4.4 PROFIL LPS	42
4.5 OCENA FREKVENCE KONJUGATIVNEGA PRENOSA	43
4.6 PRISOTNOST LIZOGENIH FAGOV	43
4.7 OBČUTLJIVOST ZA BAKTERIOFAG P1	44
4.8 KOLICINOGENOST	44
4.9 VIRULENTNI DEJAVAJNIKI IN MOBILNI ELEMENTI SEVOV <i>P. aeruginosa</i>	44
4.10 FREKVENCA MUTACIJ SEVOV <i>P. aeruginosa</i> Z RIFAMPICINOM	45
4.11 SPOSOBNOST TVORBE BIOFILMA SEVOV <i>P. aeruginosa</i>	45
4.12 PRODUKCIJA PIGMENTA PIOCIANINA	47
5 RAZPRAVA.....	48
6 SKLEPI	51
7 POVZETEK	52
8 VIRI.....	53
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih izolatov <i>E. coli</i> in <i>P. aeruginosa</i>	19
Preglednica 2: Seznam uporabljenih laboratorijskih sevov.	19
Preglednica 3: Končne koncentracije antibiotikov v gojiščih.	20
Preglednica 4: Založna raztopina $10 \times A$	21
Preglednica 5: Priprava nanašalnega in ločevalnega gela za Tris-glicin SDS-PAGE s 30 %, 19 : 1 akril-/bisakril-amidom	26
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi in programi PCR uporabljeni pri sevih <i>E. coli</i>	31
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi in programi PCR uporabljeni pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	33
Preglednica 8: Filogenetske skupine sevov <i>E. coli</i>	40
Preglednica 9: Rezultati metode PCR za preverjanje prisotnosti plazmidov pri sevih <i>E. coli</i>	40
Preglednica 10: Frekvence konjugacij 2 donorskih sevov v recipientske seve <i>E. coli</i>	43
Preglednica 11: Prisotnost virulentnih dejavnikov in mobilnih elementov pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	44
Preglednica 12: Frekvence mutacij z Rif pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	45
Preglednica 13: Rezultati merjenj absorbance pri 595 nm in povprečje meritev pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	46
Preglednica 14: Producija piocianina pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Splošna struktura lipopolisaharida pri po Gramu negativnih bakterijah (Caroff in sod., 2002)	5
Slika 2: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin pri izolatih <i>E. coli</i> (Clermont in sod., 2013)	18
Slika 3: Prikaz elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR izolatov <i>E. coli</i>	39
Slika 4: Prikaz elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR izolatov <i>P. aeruginosa</i>	39
Slika 5: Prikaz izoliranih plazmidov sevov <i>E. coli</i>	41
Slika 6: Profili LPS sevov <i>E. coli</i>	42
Slika 7: Sposobnost tvorbe biofilma pri sevih <i>P. aeruginosa</i>	46
Slika 8: Prikaz negativega in 2 pozitivnih rezultatov tvorbe biofilma.....	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica vseh rezultatov analize sevov *E. coli*.

Priloga B: Preglednica vseh rezultatov analize sevov *P. aeruginosa*.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
bp	bazni par
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CFU	kolonijska enota (ang. »colony forming unit«)
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. »deoxyribonucleic acid«)
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (ang. »ethylenediaminetetraacetic acid«)
ERIC-PCR	PCR z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na zaporedja ERIC (ang. »enterobacterial repetitive intergenic consensus«)
kb	kilobazni par
kDa	kilodalton
LB	gojišče Luria Bertani
LPS	lipopolisaharid
<i>P. aeruginosa</i>	bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. »polymerase chain reaction«)
RAPD	PCR, ki deluje po principu naključno pomnoženih fragmentov (ang. »Random Amplification of Polymorphic DNA«)
Rif	rifampicin
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. »reactive oxygen species«)
SDS	natrijev dodecilsulfat (ang. »sodium dodecyl sulphate«)
SDS-PAGE	natrijev dodecilsulfatna poliakrilamidna gelska elektroforeza
TBE	tris borat EDTA
Tc	tetraciklin
TEMED	tetrametyl etilendiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
V	volt
U	encimska enota (ang. »unit«)
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Mikroorganizmi so v splošnem ubikvitarni in se navadno nahajajo kot del heterogenih skupnosti, znotraj katerih prihaja do medvrstnih interakcij. Njihova rast in sposobnost razmnoževanja je v veliki meri odvisna od pogojev, ki so določeni z okoljem, v katerem se nahajajo. Enega izmed preživetvenih mehanizmov zagotovo predstavlja tudi sposobnost pritrjevanja in tvorbe biofilma. Gre za s polimernim matriksom obdano skupnost celic, ki so veliko manj občutljive kot v prosto živeči, planktonski obliki rasti. Tako je še posebej zaskrbljujoča sposobnost tvorbe biofilma pri patogenih bakterijah, saj kar v 80 % lahko predstavlja vir okužbe (Barsoumian in sod., 2015). Poleg tega človek neprestano ustvarja nove ekološke niše, za katere so lahko značilne ekstremne življenske razmere, ki omogočijo preživetje le majhnemu številu vrst mikroorganizmov.

Eden izmed takšnih primerov so tudi pomivalni stroji, ki so v zadnjem desetletju postali del našega vsakdana v velikem številu gospodinjstev. Zanje so značilne večje količine hranil, ki jih v pomivalni stroj vnese človek sam, visoka vлага, tako med samim procesom pomivanja, kot tudi med nedelovanjem pomivalnega stroja, občasno visoke temperature glede na program pomivanja in visoke vrednosti pH zaradi uporabe različnih detergentov in ostalih dodatkov.

Ne dolgo tega je raziskovalna skupina prof. dr. Nine Gunde-Cimerman dokazala v vzorcih izoliranih iz pomivalnih strojev iz Slovenije in drugih geografskih območij glive rodov *Aspergillus*, *Candida*, *Magnusiomyces*, *Fusarium*, *Penicillium* in *Rhodotorula* ter najpogostejsi, črni kvasovki *Exophiala dermatitidis* in *Exophiala phaeomuriformis* (Zalar in sod., 2011). Obe slednji vrsti lahko pri ljudeh povzročata sistemske okužbe in kolonizirata pljuča bolnikov s cistično fibrozo. Pomivalni stroji bi lahko predstavljali tudi vir patogenih oz. oportunističnih bakterijskih vrst, kot sta *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*.

Predstavniki rodu *Pseudomonas* in *Escherichia* zaradi vsestranske metabolne zmogljivosti in velikega potenciala za prilagajanje na spreminjajoče se okoljske razmere, naseljujejo širok spekter okolij, med njimi tudi pomivalne stroje. Zaradi različnih seleksijskih in evolucijskih pritiskov, ki vplivajo na populacijsko strukturo posameznih sevov, lahko sicer nepatogeni sevi predstavljajo rezervoar za razvoj novih patogenih sevov, odpornih proti številnim antibiotikom (Silby in sod., 2011). Okužbe z njimi lahko povzročijo različne bolezni pri ljudeh, še posebej ogroženi so posamezniki z imunsko oslabljeni sistemom.

Pomivalni stroji kot ekološka niša, poleg predstavnikov glivnih rodov, do sedaj še niso dobro raziskani. Iz tega razloga smo se odločili preučiti bakterije *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*, ki so jih do sedaj uspeli izolirati iz tesnila pomivalnih strojev na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. S tem namenom smo preučili 8 izolatov *Escherichia coli* in 8 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, pridobljenih z vzorčenjem 30 pomivalnih strojev v Sloveniji.

1.1 NAMEN DELA

Opredeliti seve vrst *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* izoliranih iz tesnila pomivalnih strojev iz Slovenije.

Sevom vrste *Escherichia coli* določiti filogenetsko skupino, opredeliti njihove dolžine LPS, preučiti mobilne elemente vpletene pri horizontalnih prenosih DNA kot so plazmidi ter sposobnost privzema tuje DNA. Preveriti prisotnost lizogenih fagov in kolicinov.

Za seve vrste *Pseudomonas aeruginosa* preučiti raven spontanih mutacij, nabor genov za virulentne dejavnike in nekatere mobilne elemente DNA, sposobnost tvorbe biofilma, produkcije piocianina in privzema tuje DNA.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V okviru tematike našega raziskovalnega dela smo postavili sledeče delovne hipoteze:

- V pomivalnih strojih nastajajo biofilmi, iz katerih izoliramo za človeka potencialno patogene seve bakterijskih vrst *E. coli* in *P. aeruginosa*.
- Sevi *E. coli* in *P. aeruginosa* izolirani iz pomivalnih strojev imajo genetske mobilne elemente, ki omogočajo širjenje determinant virulence in odpornosti proti antibiotikom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je po Gramu negativna bakterija, paličaste oblike, ki jo uvrščamo v družino *Enterobacteriaceae*. Je fakultativni anaerob in kemoorganotrof. Večina sevov bakterije *E. coli* je gibljivih in ne sporulira. Leta 1885 jo je izolirano iz blata otroka prvi opisal nemški pediater Theodor Escherich (Mainil, 2013). Najdemo jo v prebavilih človeka in toplokrvnih živali, v vodi in zemlji (Madigan in Martinko, 2006). Mnogi sevi spadajo med komenzalne predstavnike črevesne mikrobiote, nekateri pa so pomembni patogeni, ki povzročajo širok spekter bolezni, od samoomejvitvenih do smrtnih (Nataro in sod., 2011).

Komenzalni sevi *E. coli* le redko povzročijo bolezen, izjema so imunsko oslabljene osebe oz. kadar pride do poškodb gastrointestinalnih preprek. Pomembno vlogo imajo pri sintezi vitamina K, vitamina B₇, absorbciji hrane in tvorbi blata (Kaper in sod., 2004).

Za patogene seve *E. coli* je značilen raznolik nabor virulentnih dejavnikov, kot so na primer toksini, fimbrije, adhezini, kapsula in hemolizin, ki lahko povzročijo bolezensko stanje pri zdravi populaciji. Lahko so zapisani na mobilnih genetskih elementih (otoki patogenosti) in konjugativnih plazmidih, ki omogočajo razširjanje med različnimi sevi oz. vrstami (Kaper in sod., 2004). Delimo jih na črevesne patogene (IPEC) in zunajčrevesne patogene (ExPEC) seve *E. coli*. Pri obeh skupinah razlikujemo različne virotipe oz. patotipe, ki imajo določeno kombinacijo virulentnih dejavnikov.

V skupino IPEC uvrščamo virotipe:

- enterotoksigene (ETEC),
- enteropatogene (EPEC),
- enteroinvazivne (EIEC),
- enterohemoragične (EHEC),
- enteroagregativne (EAEC) in
- nekrotoksigene *E. coli* (NTEC).

V skupino ExPEC uvrščamo virotipe:

- uropatogene (UPEC),
- meningitis povzročajoče (MNEC) in
- sepsa povzročajoče *E. coli* (SEPEC) (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009).

2.2 BAKTERIJA *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) je ubikvitaren, zelo prilagodljiv po Gramu negativen bacil in oportunistični patogen, ki povzroča različne okužbe pri ljudeh in živalih (Kenna in sod., 2007). Bakterija ima minimalne prehranske zahteve in tolerira širok temperturni razpon (Siegel, 2008). Je drugi najpogostejši povzročitelj bolnišnične pljučnice in pljučnice nastale zaradi umetne ventilacije. Prav tako je pomemben patogen pri imunsko oslabljenih bolnikih, kot so bolniki z AIDS-om, rakom, opeklinami in cistično fibrozo (Driscoll in sod., 2007). Bolniki s cistično fibrozo so še posebej dovetni za okužbe pljuč, z manjšim številom mikrobnih patogenov, med katerimi je *P. aeruginosa*

najpomembnejši za razvoj bolezni in smrtnost. Začetne okužbe najverjetneje izhajajo iz okolja in se zgodaj pojavijo pri dojenčkih in manjših otrocih (Gibson in sod., 2003).

Nemukoidne kolonijske oblike *P. aeruginosa*, ki so značilne za zgodnje okužbe so relativno občutljive za antibiotike, zato je okužbo možno hitro in agresivno zdraviti (Burns in sod., 2001). Če zdravljenje okužbe ni pravočasno oz. ni učinkovito, se sčasoma razvije kronična mukoidna oblika okužbe, za katero je značilno da se alginat, ki ga sintetizira *P. aeruginosa* poveže z bronhialno sluzjo in tvori kompleksen biofilm, kar vodi do odpornosti proti antibiotikom, neučinkovite fagocitoze in stalnega vnetja, ki ga povzročijo nevtrofilci (Kenna in sod., 2007).

Učinkovitost *P. aeruginosa* kot patogene bakterije je predvsem zaradi nabora virulentnih mehanizmov in njegove velike metabolne zmogljivosti, vključno z odpornostjo proti antibiotikom zaradi neprepustne zunanje membrane, sposobnosti iznašanja antibiotikov, nagnjenosti h kolonizaciji površin v obliki biofilma in sposobnosti sprejemanja in obdržanja plazmidov, na katerih so zapisi za odpornosti proti antibiotikom (Driscoll in sod., 2007).

2.3 LIPOPOLISAHARID (LPS)

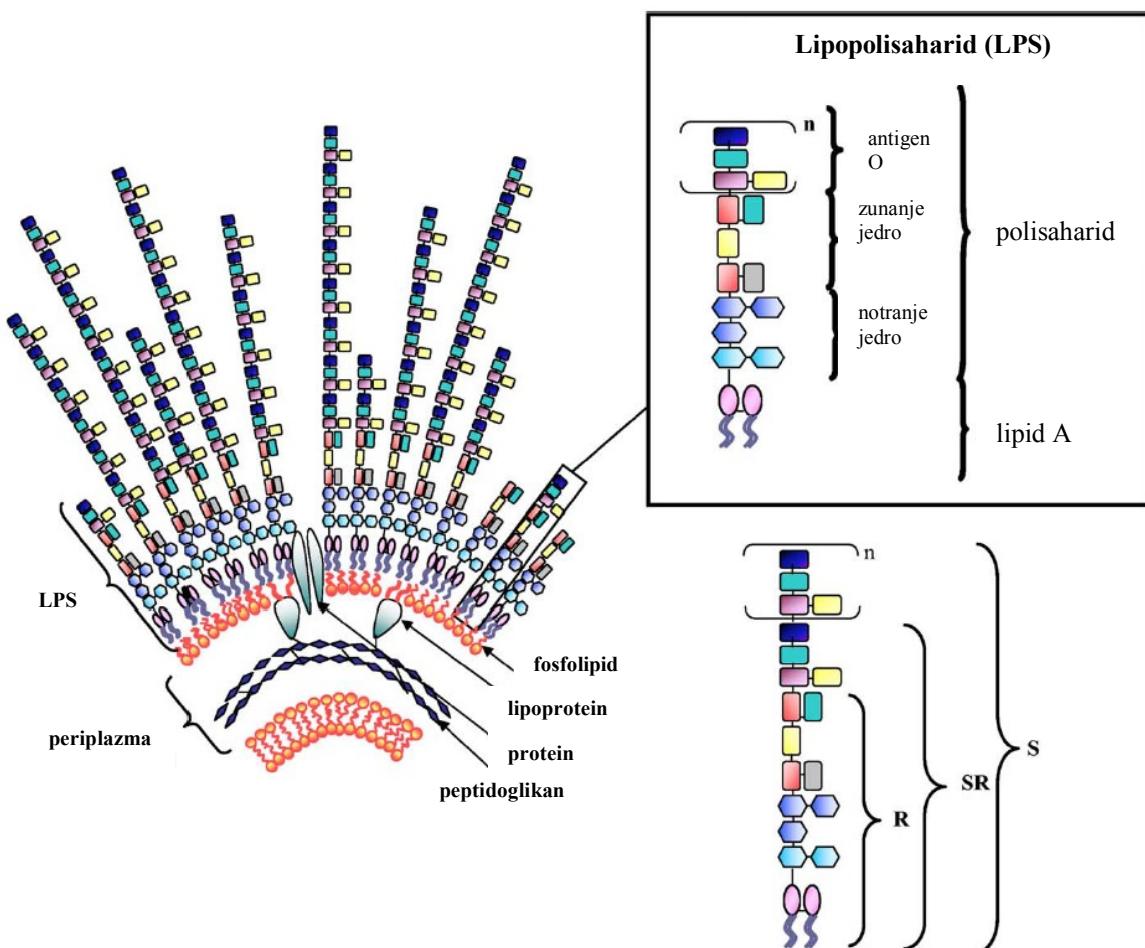
Steno po Gramu negativnih bakterij sestavlja dva lipidna sloja, med katerima je tanka plast peptidoglikana. Notranji sloj je sestavljen iz glicerofosfolipidov, zunanji pa je bogat z lipopolisaharidom (LPS), ki predstavlja do 75 % celične površine (Raetz in Whitfield, 2002; Silipo in sod., 2010).

LPS je nujno potreben za preživetje po Gramu negativnih bakterij, saj sodeluje pri pravilnem sestavljanju zunanje membrane. Je toplotno stabilen kompleks iz amfifilnih makromolekul, ki predstavlja permeabilno bariero številnim molekulam, vključno z detergenti, antibiotiki, toksičnimi barvili in kovinami. Zaradi njegove lokacije, molekule LPS interagirajo z drugimi biološkimi sistemi, sodelujejo pri interakcijah bakterije z gostiteljem kot so adhezija, kolonizacija, virulenza in simbioza.

LPS oz. endotoksin je močan aktivator prirojenega imunskega odziva in ima ključno vlogo pri patogenezi okužb s po Gramu negativnimi bakterijami pri rastlinskih ali živalskih gostiteljih (Takeuchi in Akira, 2010).

V večini bakterij ima LPS enotno osnovno strukturo, ki vključuje tri domene:

- lipofilni del, imenovan lipid A,
- hidrofilni glikan, imenovan O-specifični polisaharid (O-antigen), in
- povezovalno oligosaharidno jedro (Slika 1).



Slika 1: Splošna struktura lipopolisaharida pri po Gramu negativnih bakterijah (povzeto po Caroff in sod., 2002).

R – hrapav (ang. »rough«), SR – manj hrapav (ang. »semi-rough«), S – gladek (ang. »smooth«).

Oligosaharidno jedro je razdeljeno na notranje jedro poleg lipida A in zunanje jedro poleg O-antigena. Notranje jedro sestavljajo najmanj 1 ostanek 3-deoksi-D-mano-oktulozonske kislino (KDO) in več heptoz, kot je npr. L-glicero-D-manoheptoza (Raetz in Whitfield, 2002), ki so pogosto substituirane s fosfatom, pirofosfatom ali difosfoetanolaminom. Zunanje jedro je ponavadi sestavljeni iz heksoz kot so D-glukoza, D-galaktoza, D-glukozamin, D-galaktozamin ali derivati N-acetila (Caroff in sod., 2002). KDO zelo redko najdemo pri drugih glikanih, zato je lahko pokazatelj za prisotnost LPS (Raetz in Whitfield, 2002). Pogostost variacij strukture jedra med sevi določenega bakterijskega rodu je manjša: pri rodu *Salmonella* je znana samo 1 struktura jedra, medtem ko je pri *E. coli* znanih 5 tipov (Zähringer in sod., 1994).

Lipid A je najbolj ohranjen del LPS, je nujen za bakterijsko preživetje in odgovoren za endotoksičnost (Zähringer in sod., 1994; Holst in Molinaro, 2009; Silipo in Molinaro, 2010). Njegova osnovna struktura pri *Enterobacteriaceae* in mnogih drugih bakterijah se ne razlikuje, in je sestavljena iz β -1,6-D-glukozamin disaharida, ki je povezan z maščobno kislino in ima fosfatno skupino na pozicijah C-1' in C-4'. Kadar imajo fosfatne skupine kationsko substituento kot sta L-arabinozamin ali fosfoetanolamin je bakterija bolj odporna

proti več kationskim peptidom. Polisaharid je povezan z lipidom A preko KDO na poziciji C-6' nereduktivnega glukozaminskega ostanka (Caroff in sod., 2002).

Struktura O-antigena, kadar je prisoten, določa specifičnost serotipa pri bakterijskih vrstah ali sevih. Ponavlajoče se enote so sestavljene iz 1–8 sladkorjev in so pred dodajanjem na jedro polimerizirane. Celotna veriga lahko vsebuje do 50 takšnih enot (Caroff in sod., 2002). Dolžina verige O-antigena je regulirana s polisaharid-ko-polimerazo, ki določa stopnjo polimerizacije O-antigena (Caroff in Karibian, 2003). Razlike v številu ponavljačih se enot O-antigena povzročajo heterogenost LPS, kar lahko vidimo s SDS-gelsko elektroforezo (Haeffner-Cavaillon in sod., 1998).

Sloje LPS delimo glede na sestavo O-antigena. Divje tipe enterobakterijskih vrst z O-antigeni imenujemo tudi sevi z gladkim slojem LPS, (ang. »smooth«) (S-LPS), zaradi morfologije njihovih kolonij. »Semi-rough« LPS (SR-LPS) se pojavi pri sevih, ki imajo le 1 enoto O-antigena. Enterobakterijske mutante, ki ne vsebujejo O-antigena imenujemo hrapav LPS, (ang. »rough«) (R-LPS), LPS teh mutant imenljeno Ra, Rb,... Re glede na padajočo dolžino jedra. Minimalna struktura LPS potrebna za rast po Gramu negativnih enterobakterij je mutanta Re (Re-LPS), ki ima lipid A povezan le z dvema ostankoma KDO. Tipični laboratorijski sevi imajo različne mutacije ali delecije, ki preprečujejo dodajanje O-antigena na oligosaharidno jedro, posledično imajo R-LPS (Caroff in sod., 2002).

Večina sevov *E. coli* s S-LPS ima osnovno O-antgensko verigo dolgo od 10 do 18 enot O, kljub temu prihaja tudi do velikih razlik med sevi z enakim O-antigenom. Zato so predlagali delitev glede na prevladujočo dolžino O-antgenske verige LPS na kratke (7-16), vmesne (10-18) in dolge (16-25) O-antgenske verige (Franco in sod., 1998).

Dolžina O-antgenske verige je pomemben pokazatelj virulentnosti bakterij. Vpliva lahko na:

- jakost bakterijske adherence na gostiteljsko celico, daljša kot je O-antgenska veriga, večja je moč adherence (Strauss in sod., 2009),
- učinkovitost konjugacije: zaradi prisotnosti daljšega O-antigena recipientskih celic, je otežena vzpostavitev kontakta med recipientsko in donorsko bakterijsko celico, in posledično manjša frekvenca konjugativnega prenosa (Anthony in sod., 1994),
- občutljivost za bakteriofage,
- občutljivost za celice imunskega odziva: predvsem daljše O-antgenske verige preprečijo vezavo gostiteljskega komplementa na bakterijsko površino in tako varujejo bakterijo pred liziranjem. Če je polisaharidna veriga kratka oz. odstranjena, gostiteljevo protitelo reagira z antigenom na bakterijski površini in pride do lize bakterije s strani komplementa. Prav tako so lahko bakterijske celice z daljšimi O-antgenskimi verigami LPS odporne proti fagocitozi (Lerouge in Vanderleyden, 2001).

2.4 PLAZMIDI

Plazmidi so krožni ali linearni zunajkromosomski replikoni, ki jih najdemo pri številnih predstavnikih domen *Bacteria*, *Archaea* in *Eukaryota* (Shintani in sod., 2015).

Smillie in sodelavci (2010) so poročali, da je okoli 14 % v celoti sekvenciranih plazmidov konjugativnih. Konjugacija je eden od najbolj učinkovitih mehanizmov širjenja genetskih elementov med bakterijami. Plazmidi so tako med najpomembnejšimi pri bakterijski komunikaciji, omogočajo hitro evolucijo in sposobnosti prilagajanja bakterij (Aminov, 2011), saj gostitelju zagotovijo širok nabor pomembnih genetskih lastnosti, ki vključujejo odpornost proti antibiotikom, težkim kovinam, sevanju, ostale dejavnike virulence, dodatne metabolne poti in produkcijo bakteriocinov (del Solar in sod., 1998). Plazmidi so prav tako pomembno genetsko orodje uporabljeno za manipulacijo in analiziranje mikroorganizmov, z vnosom, spremjanjem ali odstranitvijo tarčnih genov (Sota in Top, 2008).

Prisotni so tako pri po Gramu negativnih, kot po Gramu pozitivnih bakterijah, in se med seboj razlikujejo po velikosti, številu kopij in genetski strukturi. Razpon velikosti je med 300 bp in 2400 kb, zelo pogosto so prisotni v obliki kovalentno zaprte krožne dvoverižne molekule DNA, najdemo pa tudi linearne plazmide (Kado, 1998). Plazmidi imajo sisteme, ki jim zagotavljajo njihovo samostojno podvajanje, poleg tega pa vsebujejo tudi mehanizme, ki uravnavajo njihovo število kopij in s tem zagotovijo nemoteno dedovanje med delitvijo celice (Carattoli, 2009). Običajno so različni plazmidi prisotni v celici v različnem številu kopij, nekateri so prisotni v 1–3 kopijah, drugi pa tudi čez 100 kopij (Madigan in Martinko, 2006).

V plazmidih se podvajanje prične na mestu *oriV* (ang. »origin of vegetative replication«). Dobro so poznani trije glavni mehanizmi podvajanja krožnih plazmidov: θ podvojevalni mehanizem, podvojevalni mehanizem kotalečega se kroga (ang. »rolling-circle replication«) in tip podvojevanja z verižnim premikom (del Solar in sod., 1998). Mnogo plazmidov s θ podvojevalnim mehanizmom vsebuje ponavljača zaporedja DNA, ali iterone, ki se vežejo na replikacijsko iniciacijski protein Rep (Shintani in sod., 2015). Družina plazmidov ColE1 prav tako spada med θ -tip replikacijskih plazmidov, katerih podvojevanje je močno kontrolirano z antisense RNA (Brantl, 2004).

Samoprenosljivi plazmidi pri po Gramu negativnih bakterijah imajo običajno celoten nabor genov potrebnih za prenos, mesto začetka prenosa (*oriT*), protein relaksazo, povezovalni protein tipa IV (T4CP) in sistem izločanja tipa IV (T4SS) (Garcillán-Barcia in sod., 2011).

Leta 1971 sta Hedges in Datta predlagala shemo za razvrstitev plazmidov, ki temelji na stabilnosti plazmidov oz. inkompatibilnosti plazmidov (Carattoli, 2009). Inkompatabilitet (Inc) je definirana kot nezmožnost plazmidov, s podobnimi replikacijskimi in particijskimi sistemi, da se stabilno podvojujejo v isti gostiteljski celici. Skupine Inc so neodvisno razvrščene v tri različne rodove; poznamo 27 skupin Inc pri *Enterobacteriaceae*, 14 skupin Inc pri *Pseudomonas* in približno 18 skupin Inc pri *Staphylococcus* (Carattoli, 2009). Več skupin Inc predstavnikov *Pseudomonas* je enakih tistim pri enterobakterijah, kot je IncP-1 (ekvivalentna IncP), IncP-3 (ekvivalentna IncA/C), IncP-4 (ekvivalentna IncQ) in IncP-6

(ekvivalentna IncG/U). Klasifikacija v skupine Inc temelji na zaporedju aminokislin replikacijsko iniciacijskega proteina (Rep) (Shintani in sod., 2015).

Širjenje plazmidov, ki imajo zapis za gene razširjenega spektra β -laktamaz (ESBL) je velik problem pri zdravljenju okužb, ki jih povzročajo enterobakterije (Paterson, 2006). Skupina plazmidov, ki jih najdemo pri enterobakterijah, kot so *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* in *Yersinia*, vključujejo veliko število virulentnih plazmidov. Lastnosti, ki so povezane z virulenco *E. coli*, skoraj izključno najdemo pri družini plazmidov IncF (Johnson in Nolan, 2009).

Mnogo plazmidov ima tudi odvisnostne sisteme, ki v glavnem temeljijo na sistemu toksin-antitoksin, in so sposobni ubijanja hčerinskih celic, ki ne podedujejo plazmida med celično delitvijo. Ti sistemi učinkovito spodbujajo obstoj plazmida v bakterijski populaciji, ne glede na druge selekcijske pritiske in ne zagotavljajo nobenih koristi za bakterije, ki imajo plazmid (Carattoli, 2009).

2.5 KONJUGATIVNI PRENOS PLAZMIDOV

Bakterijska konjugacija je proces, pri katerem je plazmidna DNA prenesena iz ene bakterije v drugo in je posredovana s sistemom izločanja tipa IV (T4SS) (Ilangoan in sod., 2015). Za ta mehanizem je potreben direktni kontakt med dvema celicama (ang. »cell-to-cell«). Vsa informacija potrebna za konjugativni prenos je običajno zapisana na konjugativnih plazmidih (Madigan in Martinko, 2006). Vsaka bakterija, ki ima samoprenosljiv plazmid je potencialni donor, vsaka bakterija, ki takšnega plazmida nima, je potencialni recipient (Russell, 2006).

Pri po Gramu negativnih bakterijah se na površini donorske celice nahaja cevasta struktura, konjugativni pilus, s katerim prepozna in se pritrdi na recipientsko celico. Po pritrditvi se konjugativni pilus prične krčiti, in tako se donorska in recipientska celica tesno zblížata. Prične se tvorba mostu (ang. »mating bridge«) ali pore med donorjem in recipientom. Veriga DNA donorske celice je razcepljena, nanjo se pritrdi encim relaksaza. Verigi plazmidne DNA se ločita in kompleks enoverižna DNA-relaksazni nukleoprotein se prenese v recipientsko celico, kjer se prenešena DNA zaokroži, podvoji in izrazi. Po konjugaciji recipientsko celico, ki je prejela DNA imenujemo transkonjuganta (Snyder in Champness, 2003).

T4SS je vsestranski sistem, ki lahko prenaša ne le DNA, temveč tudi toksine in efektorske proteine. Konjugativni T4SS sestavlja 12 proteinov, ki so imenovani VirB1–11 in VirD4. Pred prenosom je DNA v citoplazmi procesirana s kompleksom imenovanim relaksosomom, nato je preusmerjena do T4SS, s katerim se prenese do recipientske celice (Ilangoan in sod., 2015). Konjugacijski sistemi posredujejo prenos DNA med celicami iste vrste (Lawley in sod., 2003), vendar so dokazali ta proces tudi med celicami različnih bakterijskih vrst in celo prenos od prokariontske do evkariontske celice (Fernandez-Gonzales in sod., 2011). Konjugacija značilno prispeva k horizontalnemu prenosu genov in plastičnosti genoma, ter je odgovorna za razvoj večkratno odpornih bakterij, ki predstavljajo glavno grožnjo za človekovo zdravje (Ilangoan in sod., 2015).

2.6 KOLICINI

Kolicini so proteinski toksini, katerih sinteza je inducirana s sistemom SOS. Bakterije *E. coli* si z njihovo produkcijo tako zagotovijo selektivno prednost pred drugimi bakterijami iste vrste ali sorodnih vrst, kot so *Salmonella* in *Shigella* (James in sod., 2002).

Glede na mehanizem prenosa kolicine delimo na skupino A in skupino B. Za skupino A so značilni kolicini, ki so v tarčno celico vnešeni s sistemom Tol, to so kolicini A, E1 – E9, K, L, N, S4, U in Y. Skupina B obsega kolicine, ki uporablajo sistem TonB, sem uvrščamo kolicine B, D, H, Ia, Ib, M, 5 in 10 (Cascales in sod., 2007). Najbolj preučeni so kolicini E, ki se vežejo na protein BtuB, visoko afinitetni receptor za vitamin B₁₂. Kolicini E so okoli 60 kDa veliki proteini, imajo tri funkcionalne domene, vsaka je vpletena v eno od treh stopenj ubijanja drugih bakterijskih celic. To so:

- C-terminalna domena, s citotoksično aktivnostjo,
- domena R, ki je odgovorna za vezavo na receptor,
- in N-terminalna domena (domena T), ki je odgovorna za translokacijo citotoksične C-terminalne domene skozi zunanjou membrano.

Ločimo tri citotoksične aktivnosti:

- tvorba ionskih kanalov, ki depolarizira notranjo membrano, značilna za kolin E1,
- H-N-H endonukleazna aktivnost, ki razgradi kromosomske DNA, značilna za kolin E2, E7, E8 in E9,
- in ribonukleazna aktivnost, ki specifično reže 16S rRNA, značilna za kolin E3, E4 in E6 oz. specifično tRNA (kolin E5).

Kolicine proizvajajo tisti sevi *E. coli*, ki imajo kolinogene plazmide imenovane pCol. Te seve imenujemo kolinogeni in jih pogosto najdemo v naravnem okolju in črevesju živali. Kolinogeni sevi običajno vsebujejo več različnih plazmidov, med njimi je le eden specifično kolinogen. Poznamo dva razreda kolinogenih plazmidov pCol:

- Tip I: majhni plazmidi med 6 in 10 kb, ki so običajno prisotni v približno 20-ih kopijah v celici in so lahko transportirani v prisotnosti drugega konjugativnega plazmida. Kolicini skupine A so običajno zapisani na plazmidih tipa I, in so izločeni iz celice v medij.
- Tip II: so večji, okoli 40 kb veliki konjugativni plazmidi, prisotni le v 1 kopiji v celici in imajo poleg genov za kolinogene aktivnost tudi druge gene. Kolicini skupine B so običajno zapisani na plazmidih tipa II in niso izločeni v okolje (Cascales in sod., 2007).

Kolinogeni plazmidi tipa I imajo zapis za en sam kolin, kolinogeni plazmidi tipa II pa za dva kolina, na primer B in D, B in M ali Ia in V. Različni plazmidi imajo lahko zapis za podobne koline (Cascales in sod., 2007).

Izražanje kolina je inducirano s poškodbami DNA ali okoljskimi dejavniki, kot so naraščajoča gostota bakterijske populacije in primanjkovanje hrani. Celice *E. coli*, ki imajo pCol običajno proizvajajo baktericidne kolicine v manjših količinah, izpostavljanje snovem, ki poškodujejo DNA, kot je na primer UV-sevanje ali mitomicin C, pa vzpodbudi povečano sintezo kolina. Za slednje je odgovoren SOS-odziv, ki aktivira proteinazo

RecA in posledično inaktivira protein LexA, ki je represor mnogih genov za popravljanje poškodb DNA in plazmidnih genov za sintezo kolicina (Cursino in sod., 2002).

Za sproščanje kolicina v zunajcelično okolje sta potrebni ekspresija in aktivacija proteina BRP (ang. »bacteriocin release protein«) oz. proteina za lizo (Cursino in sod., 2002).

Bakterije, ki proizvajajo kolicine so odporne proti lastnim kolinom, zaradi antagonističnega proteina – proteina za imunost (ang. »immunity protein«), ki se veže in inaktivira citotoksično domeno (James in sod., 2002).

2.7 BAKTERIOFAGI

Bakteriofagi so virusi sposobni okužbe prokariontske celice. Zanje je značilna zunana proteinska kapsida, ta obdaja genetski material, ki je lahko v različnih oblikah, najpogosteje je to dvostranska DNA.

Proteini, ki so zapisani v bakteriofagu in vključeni v lizogeno konverzijo (proses v katerem nepatogena bakterija postane patogena) zagotavljajo mehanizme za vdor v gostiteljsko celico, izogibanje gostiteljevi imunski obrambi in poškodbo gostiteljske celice. Pridobitev takšnih genov prispeva k selektivni prednosti bakterijskega gostitelja, kar se kaže v širjenju klonov (Boyd in Brüssow, 2002).

Bakteriofagi imajo tako velik vpliv na evolucijo bakterijskega genoma, so pomemben vektor za lateralni prenos DNA med bakterijskimi sevi, poleg tega pa so tudi potencialno orodje za zdravljenje okužb z proti antibiotikom odpornimi bakterijskimi patogeni (Canchaya in sod., 2003).

Bakteriofag λ lahko okuži tudi bakterijo *E. coli*. Poleg kapside, ki obdaja dvostransko DNA ima rep, s katerim se pritrdi na gostiteljsko celico in skozi katerega potuje v gostiteljsko celico genski material bakteriofaga. Temu lahko sledi litični ali lizogeni cikel. Večinoma pride do litičnega cikla, kjer bakterija prične izražati gene, potrebne za sintezo kapside in repa, ter litične proteine, ki povzročijo lizo gostiteljske celice in sproščanje sestavljenih virionov v okolico. V določenih primerih pride do lizogenega cikla, kjer se fagna DNA vgradi v kromosom gostiteljske celice. Takšno obliko nato imenujemo profag. Ti imajo represorske sisteme, ki ohranjajo profage v mirujočem stanju, dokler ni aktiviran SOS-sistem v gostiteljski celici. Takrat pride do izražanja utišanih profagnih genov in litičnega cikla (Waldor in Friedman, 2005).

Pri sevih STEC *E. coli* najdemo dva glavna razreda Stx, Stx1 in Stx2. Geni *stx* se nahajajo v genomu profaga družine λ . Stx1 in Stx2 najmočneje prispevata tudi k virulenci enterohemoragičnih *E. coli* (EHEC) (Waldor in Friedman, 2005).

2.8 MOBILNI ELEMENTI PRI *P. aeruginosa*

Kar 10 % genoma *P. aeruginosa* je fleksibilnega in omejenega na specifična kromosomska mesta, genomske otoke. PAGI 1 (*P. aeruginosa* genomic island) je bil prvi genomski otok opisan v *P. aeruginosa*, v izolatu iz vzorca okužbe urinarnega trakta, in je prisoten pri približno 85 % kliničnih izolatov (Pereira in Cardoso, 2014). Integrone in plazmidi so prav tako del tega fleksibilnega genoma (Hacker in Carniel, 2001). Vsi veljajo za mobilne elemente, ki prispevajo k uspešni prilagoditvi seva na določeno okoljsko nišo in širjenju genov za odpornost proti antibiotikom. Integrone razreda 1 pogosto najdemo v kliničnih izolatih *P. aeruginosa*, medtem ko so integrone razreda 2 redki, o tem da bi našli integrone razreda 3 pri *P. aeruginosa* pa še niso poročali (Kung in sod., 2010).

2.9 VIRULENTNI DEJAVNIKI PRI *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ima veliko število virulentnih faktorjev, ki so prisotni na površini celice ali pa zunajcelični, večina jih kontrolira zaznavanje kvorum (ang. »quorum-sensing«), medcelični signalni sistem (Galloway in sod., 2011).

Pri *P. aeruginosa* sta opisana dva glavna sistema zaznave kvorum, *las* in *rhl*. Nekateri geni, vključno z *aprA*, *lasA*, *lasB* in *toxA* so uravnani s sistemom *las* in ramlolipid-sinteznim genom *rhlAB*, *lasB* pa je do določene mere uravnani s sistemom *rhl* (Popat in sod., 2008).

Zapis za alginat se nahaja na genih *alg*, vključno z *algD* in sodeluje pri nastanku mukoidnih kolonij *P. aeruginosa*. Prispeva h kroničnem vnetju pljuč, saj ščiti bakterijo pred antibiotiki in gostiteljevim imunskim sistemom (Hay in sod., 2012). Sprememba iz nemukoidnega v mukoidni fenotip je pokazatelj resnosti okužbe, mehanizmi odgovorni za to spremembo vključujejo posttranslacijsko regulacijo, kompleksno ureditev transkripcijske regulacije in mutacije genoma v hipermutabilnih regijah (Rehm, 2010).

Za poškodbe pljučnega tkiva so odgovorni tudi ostali virulentni dejavniki z drugačnimi mehanizmi. Biosinteza proteinov je inhibirana z eksotoksinom A, ki je zapisan na genu *toxA* (Chieda in sod., 2011), za elastolitično aktivnost pri pljučnem tkivu je odgovorna cinkova metaloproteaza, elastaza LasB, katere zapis se nahaja na genu *lasB* (Ghorbel-Bellaaj in sod., 2012). Eksoenzim S, ADP-riboziltransferaza, ki je zapisan na genu *exoS*, se izloča znotraj gostiteljske celice (Sun in sod., 2012) in ga povezujejo s citotoksičnostjo, ki jo povzroča *P. aeruginosa* (Olson in sod., 1997). Hidroliza fosfolipidov, ki so sestavni del pljučnih surfaktantov, je povzročena z dvema fosfolipazama C, ki sta zapisani na genih *plcH* in *plcN* (Konig in sod., 1997), kar lahko povzroči bistveno povečano vezavo bakterij zaradi spremembe na epiteljski površini z eksoproducti *P. aeruginosa*, zlasti s proteazami in nevraminidazami (*nan1* in *nan2*) (Cacalano in sod., 1992; Davies in sod., 1999).

Integrone so genetski elementi, ki omogočajo učinkovito vključevanje in izražanje zunanjih genov. Imajo pomembno vlogo pri pridobivanju, izražanju in razširjanju genov odpornosti proti antibiotikom, zlasti pri po Gramu negativnih patogenih bakterijah. Nahajajo se na transpozonih ali plazmidih, zato je širjenje omogočeno preko horizontalnega prenosa.

Pomembni so pri prilagoditvi bakterij na okolje in evoluciji bakterijskega genoma. Poznamo 5 razredov integronov, najpogosteje med njimi se pojavljajo integroni razreda I. Vsem integronom so skupni gen *intI*, *attI* in promotor Pc. Integraza *IntI* (gen *intI*) je sposobna vključevanja proste genske kasete preko rekombinacijskega mesta *attI*. Ko je le ta vključena, pa je izražena s promotorjem Pc (Gillings, 2014).

2.10 PIOCIANIN

Ena najbolj značilnih lastnosti bakterije *P. aeruginosa* je proizvodnja pigmentov. Sevi *P. aeruginosa* proizvajajo in izločajo različne redoks aktivne komponente fenazina. Najbolj preučen med njimi je pigment piocianin (Ho Sui in sod., 2012). Ta je odgovoren za modrozeleno barvo, ki je značilna za *Pseudomonas* spp. in je tako virulentni dejavnik kot tudi signalna molekula za zaznavo kvorum pri *P. aeruginosa* (Lau in sod., 2004).

Piocianin uravnava redoks stanje in povzroča nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki lahko povzročijo oksidativni stres, kar posledično vpliva na homeostazo kalcija (Lau in sod., 2004; Winstanley in Fothergill, 2008). pride do zaviranja celičnega dihanja, izčrpavanja znotrajceličnega cAMP iz celice, zmanjša se tudi koncentracija ATP, kar vpliva na klorove ionske kanalčke, ki so uravnani s konformacijskimi spremembami ATP (Winstanley in Fothergill, 2008). Piocianin zavira sproščanje prostaciklina, kar lahko inaktivira človeško V-ATPazo (vpletena v endocitozo), α 1-proteaznega inhibitorja (uravnava aktivnost serinske proteaze, vključno z nevtrofilno elastazo) in dušikovega oksida (vpliva na pretok krvi, krvni tlak in imunske funkcije) (Winstanley in Fothergill, 2008).

Piocianin na več načinov vpliva na gostiteljev imunski odziv, da lahko pride do nastanka kronične okužbe. Raziskave kažejo, da lahko piocianin prepreči razvoj učinkovitega odziva celic T proti *P. aeruginosa* in prepreči aktivacijo monocitov in makrofagov, preko zaviranja produkcije citokinov (Winstanley in Fothergill, 2008).

Visoke koncentracije piocianina v sputumu bolnikov s cistično fibrozo kažejo, da ima piocianin vlogo pri poškodbah pljučnega tkiva s kronično okužbo in zgodnje (v logaritemski fazi rasti) prekomerno izražanje virulentnih dejavnikov, ki so uravnani z zaznavanjem kvorum, kot so LasA, elastaza in piocianin (Fothergill in sod., 2007).

Pri *P. aeruginosa* PAO1 je piocianin sintetiziran iz korizmata z encimi, katerih zapisi so na dveh homolognih operonih *phz* (Mavrodi in sod., 2001). Gena *phzS* in *phzM* sta odgovorna za pretvorbo fenazin-1-karboksilne kislino v piocianin v zadnjih stopnjah biosinteze. Operona *phz* sta 98,3 % identična na nivoju DNA (Ho Sui in sod., 2012).

2.11 BIOFILM PRI *P. aeruginosa*

Ena glavnih bakterijskih strategij za kolonizacijo skoraj vseh vrst okolij, od naravnih ekosistemov do bolnišničnih okolij in človeških gostiteljev, je razvoj biofilma, strukturirane večcelične skupnosti, ki je ujeta v polimerni matriks (Costerton in sod.,

1999). Bakterijski biofilmi so bolj odporni proti antibiotikom in efektorjem imunskega sistema (protitelesa in fagociti) ter predstavljajo glavni vir perzistentne okužbe (Hogardt in Heesemann, 2010).

Eden najbolje preučenih primerov nastanka biofilma je pri bakteriji *P. aeruginosa*. Pri bolnikih s cistično fibrozo, ki so kolonizirani s *P. aeruginosa*, sta značilna 2 različna fenotipa bakterijskih kolonij. Prvi fenotip je povezan s proizvodnjo alginata (polimer manuronske in glukuronske kisline, ki tvorita viskozen gel okoli bakterije). Drugi tip je hrapav (ang. »rough«), za katerega je značilna odsotnost alginata. Prisotnost alginata je pokazatelj virulentnosti, sevi ki ga proizvajajo so bolj agresivni od tistih ki ga ne (Flemming in sod., 2007).

EPS (zunajcelični polisaharidi) določa razmere za celice v biofilmu z vplivom na poroznost, gostoto, vsebnost vode, naboj, sorpcijske lastnosti, hidrofobnost in mehansko stabilnost (Flemming in Wingender, 2002). EPS so polimeri mikrobnega izvora, v katerega so vsidrani mikroorganizmi. Sestavlja ga veliko različnih proteinov, glikoproteinov, glikolipidov, v nekaterih primerih tudi velike količine okoljske DNA (Flemming in sod., 2007). Yang in sodelavci (2007) so ugotovili, da je okoljska DNA ena glavnih komponent matriksa v biofilmih *P. aeruginosa*. Ta funkcioniра kot znotrajcelični povezovalec in tako stabilizira biofilm, njeno izločanje pa je pod uravnavanjem sistema za zaznavanje kvorum.

Fiziologija bakterij, ki jih najdemo v biofilmu, je heterogena in odvisna od specifičnega mesta, ki ga mikroorganizem zavzema v posamezni mikrokoloniji. Od površine biofilma proti notranjosti biofilma se pojavi gradient hranil, kar vpliva na fiziologijo in posledično prilaganje hitrosti rasti, generacijskega časa, občutljivosti za antibiotike, antigenske variabilnosti, doveznosti za opsonizacijo in fagocitozo in funkcije alginata kot negativnega imunomodulatorja pri gostitelju (Pier, 2007).

Glavne signalne molekule pri *P. aeruginosa* so homoserin laktoni, ki delujejo kot kemotaktični dejavniki in privlačijo bližje bakterijske celice (Madigan in Martinko, 2006).

Nastanek biofilma poteka v treh stopnjah: začetna pritrditev, nastanek zrelega biofilma in disperzija, kjer se subpopulacija oddalji od biofilma, omogoči ponovitev tega cikla in nastanek novega zrelega biofilma.

Biofilme, ki jih tvori *P. aeruginosa*, ločimo na dva glavna tipa glede na njihovo strukturo:

- raven biofilm (ang. »flat«) za katerega je značilna konfluentna, enotna rast bakterij na površini in
- strukturiran biofilm, ki je sestavljen iz celičnih agregatov, ki jih ločujejo kanali ali vmesni prostori.

Med omenjenima tipoma obstaja gradient struktur biofilma. Oba tipa imata povečano toleranco za antibiotike, kljub temu pa je raven biofilm bolj občutljiv za antibiotike kot strukturiran (Allesen-Holm in sod., 2006).

Biofilmi so prav tako idealni za izmenjavo genskega materiala in ohranjanje velikega in dostopnega genskega bazena. Horizontalni prenos genov je olajšan, ker so celice ves čas v neposredni bližini in niso popolnoma imobilizirane (Hausner in Wuertz, 1999).

2.12 SPONTANE MUTACIJE PRI *P. aeruginosa*

Prilagoditvena strategija bakterij na nova okolja ali neugodne razmere je selekcija sevov s povečano stopnjo mutacij, mutatorjev (Costerton in sod., 1999; Oliver in sod., 2000; Mena in sod., 2008).

Seve *P. aeruginosa* lahko uvrstimo v 4 kategorije glede na frekvenco mutacije. To so:

- normo-mutatorji (frekvenca mutacije je med 7×10^{-9} in 2×10^{-7}),
- šibki mutatorji (sevi s frekvenco mutacij manjšo od 2×10^{-7}),
- močni mutatorji (kadar je frekvenca mutacij višja od 10^{-6} ali približno $20 \times$ višja kot pri sevu PAO1).
- hipo-mutatorji (sevi s frekvenco mutacij manjšo od 7×10^{-9}) (Kenna in sod., 2007).

Sevi *P. aeruginosa* z močno povečano stopnjo mutacij, ki imajo okvarjen popravljalni sistem za neujemanje baznih parov (ang. »mismatch repair«), so zelo pogosti povzročitelji kroničnih okužb in s povečano odpornostjo proti antibiotikom (Costerton in sod., 1999; Oliver in sod., 2000; Mena in sod., 2008). Sevi z zmerno povečano stopnjo mutacij (šibki mutatorji), so tudi dokazano prisotni v kroničnih okužbah in prav tako povezani z odpornostjo proti antibiotikom (Ciofu in sod., 2010).

Subletalne koncentracije antibiotikov delujejo kot mutageni pri *P. aeruginosa* preko oksidacijskih poškodb povezanih z radikali, kar lahko vodi do pridobitve odpornosti proti antibiotiku zaradi kromosomskih mutacij ali do pojava odpornih sevov oz. novih in bolje prilagojenih sevov v procesu adaptivne radiacije (Nair in sod., 2012).

Vedno več je tudi dokazov, ki podpirajo koncept dihalnih poti bolnikov s cistično fibrozo kot prostorsko in časovno heterogeno okolje, ki zagotavlja seleksijski pritisk za adaptivno radiacijo in specializacijo na posamezno okolje (Hauser in sod., 2011). Napogosteje prepoznana prilagoditev je prehod v mukoidni fenotip, pogosto pojavljajoče mutacije pa so v regulatorjih sistema za zaznavanje kvorum, kar vodi do upada produkcije virulentnih dejavnikov. Mutacije, ki vplivajo na iztočne (ang. »efflux«) črpalke pa vodijo v odpornost proti antibiotikom (Smith in sod., 2006; Hauser in sod., 2011).

2.13 HIPERMUTATORSKI SEVI

Hipermutabilne bakterije ali »hipermutatorji« so bakterije, ki imajo visoko stopnjo mutacije (do $1000 \times$). Ta pojav so sprva opisali pri patogeni *E. coli* (Herman in Modrich, 1981). Hipermutacija je pomembna prilagoditev bakterij na dolgotrajnejši obstoj (Mena in sod., 2008) in ima ključno vlogo pri razvoju večkratne odpornosti proti antibiotikom (Maciá in sod., 2005).

Ugotovili so, da je edinstveno okolje pljuč bolnikov s cistično fibrozo, njihovo variabilno oskrbo s hranili, nihanjem vnetnega odziva in izpostavljenostjo agresivni in daljši terapiji z antibiotiki, zelo dovetno za razvoj hipermutatskega fenotipa bakterij (Oliver in sod., 2000; Ciofu in sod., 2005). Raziskave kažejo da je 37–54 % bolnikov s cistično fibrozo okuženih s *P. aeruginosa* s hipermutatorskim fenotipom, za katerega je značilna povišana frekvenca spontanih mutacij (Oliver in sod., 2000; Maciá in sod., 2004; Ciofu in sod., 2005).

Hipermutatorski sevi imajo običajno spremembe v genih, ki sodelujejo pri sistemih izogibanja napak v DNA (Miller, 1996). Večina teh sevov izoliranih iz pacientov ima okvarjen popravljalni sistem neujemanja baznih parov, največkrat je okvarjen gen *mutS* (Oliver in sod., 2000; Oliver in sod., 2002; Maciá in sod., 2004). Popravljalni sistem neujemanja baznih parov predstavlja veliko oviro za medvrstne rekombinacije. Odstranitev te ovire poveča frekvenco horizontalnih prenosov genov, ki je pomemben mehanizem pridobljene odpornosti proti antibiotikom pri bakterijah (Chopra in sod., 2003). Povezava med visoko stopnjo odpornosti proti antibiotikom *P. aeruginosa* pri bolnikih s cistično fibrozo in prisotnostjo visokega deleža hipermutabilnih sevov je konstantno dokumentirana (Oliver in sod., 2000; Oliver in sod., 2002; Maciá in sod., 2004; Maciá in sod., 2005), vendar pa ni soglasja o tem ali obstaja vzročna povezava med povečano antimikrobnou odpornostjo in hipermutabilnostjo (Lutz in sod., 2013).

2.14 METODE PCR

2.14.1 ERIC-PCR

Bakterijski genomi na splošno veljajo za manj kompleksne in mnogo manjše od evkariontskih, vendar so kljub temu pri bakterijah opisali številne družine kratkih ponavljačih se zaporedij (30–150 bp) (Tobes in Ramos, 2005). Malo je znanega o njihovem izvoru, evoluciji in morebitnih funkcijah. Večina teh zaporedij je omejenih na eno samo vrsto ali na zelo tesno povezane vrste, medtem ko nekatere vrste teh zaporedij sploh nimajo, kar pomeni da ta zaporedja verjetno ne sodelujejo pri temeljnih življenjskih funkcijah, kot so npr. rast, preživetje ali pomnoževanje. Večina kratkih ponavljačih se zaporedij so nepopolni palindromi, s potencialom za tvorbo sekundarne strukture, ki lahko povečajo stabilnost mRNA (Wilson in Sharp, 2006).

Zaporedja ERIC (ang. »Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus«), opisana tudi kot medgenske ponavljače enote, se razlikujejo od večine ostalih bakterijskih ponavljačih se zaporedij v tem, da jih najdemo pri velikem številu bakterijskih vrst. Zaporedja ERIC so močno ohranjene, 126 bp dolge nekodirajoče regije, ki se večkrat ponovijo v bakterijskem genomu. Lokacija zaporedij ERIC variira med posameznimi sevi (Meacham in sod., 2003). Prvič so bila opisana pri *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in ostalih predstavnikih *Enterobacteriaceae* (Wilson in Sharp, 2006). Število kopij zaporedja ERIC variira med vrstami, ocenili so da ima *E. coli* K-12 okoli 30 kopij, medtem ko jih ima *S. enterica* Typhimurium 150 (Duchaud in sod., 2003).

Zaporedja ERIC so pomembna predvsem zato, ker se uporabljajo kot osnova za določanje prstnega odtisa bakterijskega genoma. Leta 1991 so Versalovic in sod. (1991), poročali o

metodi ERIC-PCR, ki temelji na sposobnosti naleganja komplementarnih oligonukleotidov na zaporedja ERIC in pomnoževanju DNA med temi zaporedji pod pogojem, da je interval med zaporedji ERIC manjši od 5 kb. Ker bakterijski genom vsebuje več zaporedij ERIC pride do pomnoževanja več produktov PCR. Razlike v številu in lokaciji zaporedij ERIC pri različnih sevih *E. coli* se kažejo v različnem številu in velikosti produktov PCR med posameznimi sevi (Chulain in sod., 2006).

Molekularna genotipizacija bakterij z ERIC-PCR je hitrejša in cenovno ugodnejša od genotipizacijskih metod, kot sta metoda PFGE ali sekvenciranje več lokusov (MLST). Ima večjo sposobnost razlikovanja kot ostale tehnike, zaradi česar se pogosto uporablja (Meacham in sod., 2003).

V različnih študijah so potrdili, da lahko pridobimo DNA-prstne odtise z metodo ERIC-PCR tudi pri drugih organizmih, kateri v genomu nimajo zapisa zaporedij ERIC. To so dokazali pri rodovih *Rhizombium*, *Frankia*, *Staphylococcus*, *Legionella*, *Xanthomonas* in *Pseudomonas* ter pri glivah *Aspergillus* in *Fusarium*. Glede na te rezultate se začetni oligonukleotidi vežejo nespecifično na naključna mesta v genomu, kar pomeni da lahko metoda ERIC-PCR deluje tudi po principu naključno pomnoženih fragmentov (metoda RAPD) (Gillings in Holley, 1997).

2.14.2 Filogenetski PCR

Znotraj vrste *E. coli* obstaja obsežna genetska raznolikost (Clermont in sod., 2013). Sevi, ki so sposobni povzročiti zunajčervesne okužbe verjetneje pripadajo filogenetski skupini B2 ali D, kot A ali B1 (Picard in sod., 1999; Johnson in Stell, 2000).

Zaradi kliničnega pomena teh ugotovitev so predlagali enostavno metodo razvrščanja izolatov v filogenetske skupine. Leta 2000 so Clermont in sodelavci opisali preprost tripleks PCR, ki je omogočal da izolate razvrstimo v eno od filogenetskih skupin A, B1, B2 ali D. Pri tej metodi se uporablja kombinacija treh označevalcev DNA, gen *chuA*, *yjaA* in fragment DNA TspE4.C2. Gen *chuA* sodeluje pri transportu hema pri enterohemoragičnem sevu O157:H7, *yjaA* so odkrili pri preučevanju celotnega genoma seva K-12, vendar njegova funkcija še ni poznana (Clermont in sod., 2000) in fragment TspE4.C2, ki so ga kasneje okarakterizirali kot domnevni gena za lipazo/esterazo (Gordon in sod., 2008).

Vse večje število sevov *E. coli*, ki so analizirani z metodo MLST ali imajo v celoti sekvencirane genome, povečuje naše poznavanje genetske raznolikosti sevov *E. coli*. Obstoj filogenetske skupine E, nekdanji manjši nabor nerazvrščenih sevov, pri katerih je O157:H7 najbolje poznan, je sedaj dobro poznana (Tenaillon in sod., 2010). Prav tako je sedaj dobro poznana filogenetska skupina F, ki jo sestavljajo sorodni sevi skupine B2 (Jaureguy in sod., 2008; Clermont in sod., 2011a). Filogenetska skupina C je bila predlagana za tesno povezano vendar različno od filogenetske skupine B1 (Moissenet in sod., 2010; Clermont in sod., 2011a). Walk in sodelavci (2009) so poročali o več novih linijah *Escherichia*, ki se genetsko razlikujejo od vrste *E. coli*, medtem ko jih fenotipsko ni mogoče ločiti. Vsaj enega od teh kriptičnih linij (klad I *Escherichia*), glede na obseg rekombinacije med sevi iz klada I in *E. coli*, smatramo za filogenetsko skupino *E. coli*.

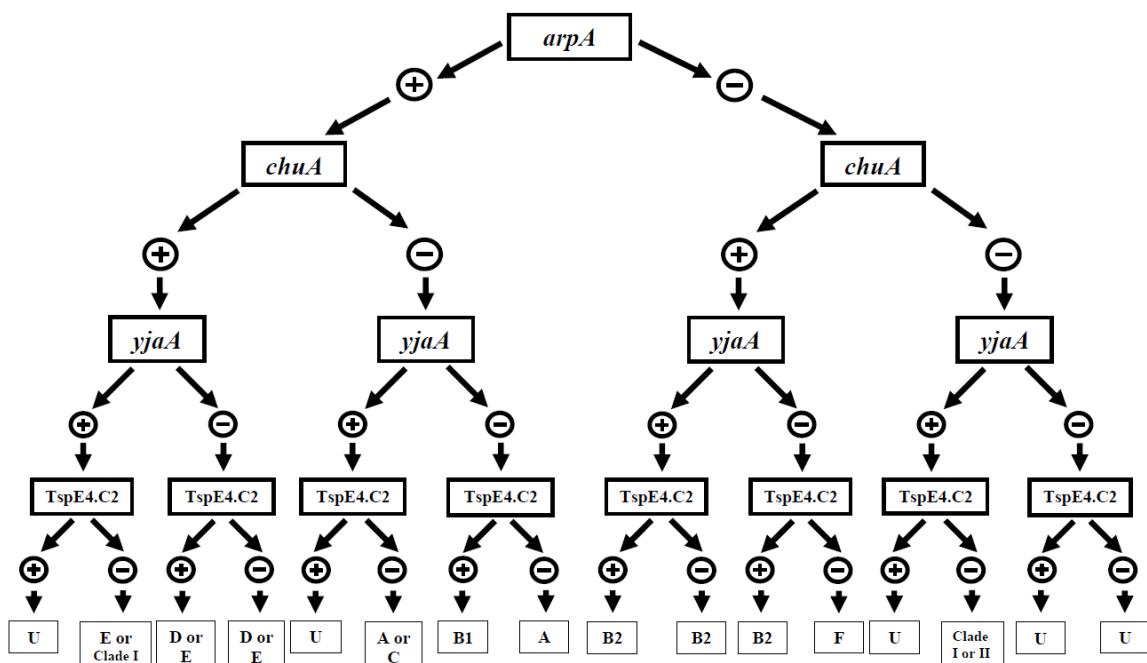
(Luo in sod., 2011). Tako danes poznamo osem filogenetskih skupin *E. coli*, od tega jih sedem uvrščamo v *E. coli* sensu stricto (A, B1, B2, C, D, E, F) in enega v klad I *Escherichia* (Clermont in sod., 2013).

Na podlagi tega so Clermont in sodelavci (2013) razvili novo različico metode PCR, ki omogoča razvrščanje sevov *E. coli* v eno od zgoraj naštetih filogenetskih skupin, in identifikacijo predstavnikov kriptičnih kladov II in V. Preko 95 % izolatom lahko tako pravilno določimo filogenetsko skupino.

Pri načrtovanju modifikacij izvirnega tripleks PCR so obdržali prvotne tarčne gene *chuA*, *yjaA* in TspE4.C2 ter podobno velikost fragmentov produkta PCR. Uporabili so nove dostopne podatke o genomu, da so modificirali *chuA*, *yjaA* in TspE4.C2 zaporedja začetnih oligonukleotidov, da bi se izognili polimorfizmu v nukleotidnem zaporedju uporabljenem za naleganje začetnega oligonukleotida, izključili pomnoževanje TspE4.C2 in *chuA* pri sevih, ki pripadajo kriptičnemu kladu I in kladih III, IV in V (Clermont in sod., 2011b). Dodali so tarčni gen *arpA*, zaradi česar je nastala nova metoda, kvadraplex PCR (ang. »quadruplex PCR«).

Pomnoževanje *arpA* ima 2 namena, deluje kot notranja kontrola kvalitete DNA, z njenim dodatkom pri vseh sevih *E. coli* in kladu I, dobimo vsaj en produkt PCR. Vključitev *arpA* omogoča sevom, pripadajočim filogenetski skupini F, ki so bili prej napačno opredeljeni kot filogenetska skupina D (*chuA* +, *yjaA* –, TspE4.C2 –), da jih razlikujemo, saj je *arpA* prisoten v vseh *E. coli* z izjemo sevov, ki pripadajo filogenetski skupini B2 in F (Clermont in sod., 2013). *arpA* je prav tako odsoten v kriptičnih kladih II, III, IV, V ter *E. albertii* in *E. fergusonii*. Da bi identificirali seve, ki pripadajo filogenetski skupini C in E so zasnovali 2 dodatna alelno specifična začetna oligonukleotida (Lescat in sod., 2012).

Nova metoda potrebuje ponavljanjoč pristop, da bi dodelili filogenetske skupine, in je bolj kompleksen kot pristop enostavnega dihotomnega ključa, ki so ga opisali Clermont in sodelavci (2000). Prvi korak je izvedba kvadrapleks PCR na izbranih izolatih. Dobimo kvadrapleks genotip, ki ustrezha prisotnosti/odsotnosti 4 genov, npr. + – + –, kar pomeni *arpA* +, *chuA* –, *yjaA* +, TspE4.C2 –. Nato glede na kvadrapleks genotip, izolat takoj uvrstimo v filogenetsko skupino ali pa so potrebna še dodatna testiranja (Clermont in sod., 2013), kot je razvidno na Sliki 2.



Slika 2: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin pri izolatih *E. coli*, ki temelji na rezultatih produktov PCR, pomnoževanju genov *arpA*, *chuA*, *yjaA* in fragmenta DNA *TspE4.C2*. U – neznan (Clermont in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

V magistrsko delo je bilo vključenih 8 izolatov bakterije *E. coli* in 8 izolatov bakterije *P. aeruginosa* (Preglednica 1), ki so bili izolirani iz tesnila pomivalnih strojev iz različnih gospodinjstev v Sloveniji. Uporabljeni sevi so trajno shranjeni in vključeni v zbirko EX, ki je del Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRICUL) in deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih izolatov *E. coli* in *P. aeruginosa*

Izolati <i>E. coli</i> ; oznaka v magistrskem delu	Izolati <i>P. aeruginosa</i>
L-396; N1	L-597
L-434; N2	L-993
L-431; N3	L-994
L-433; N4	L-995
L-429; N5	L-996
L-439; N6	L-997
L-437; N7	L-998
L-436; N8	L-999

3.1.1.1 Laboratorijski bakterijski sevi

Preglednica 2: Seznam uporabljenih laboratorijskih sevov

Sev	Genotip in fenotip	Referenca
<i>E. coli</i>		
MC4100	<i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 ptsF25 deoC1</i>	Casadaban, 1976
DL94	O21:H-;F ^r ; Cm ^s Tc ^r	M. Starčič Erjavec
RU4405	MM294::Tn1731 Tc ^r thi endA hsdR	Ubben in Schmitt, 1986
DH5α	Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1supE44 gyrA96 relA1	BRL Life Technologies
HB101 pRK100	<i>hsdR hsdM recA13 supE44 leuB6 lacZ proA2 pRK100 Ap^r, Tc^r</i>	M. Starčič Erjavec
CL173	<i>thr-1 araC14 leuB6 Δ(gpt-proA)62 lacY1 glnX44 galK2 hisG4 rfbC1 mgl-51 rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 argE3 thiE1 λ-Rac-0 malT1(λR)</i>	B. Bachmann
CSH118	<i>ara Δ(gpt-lac)5 F' kan</i>	Cold Spring Harbor Laboratories
H8	uroseptični sev	Matija Rijavec
HB101 pOX38	<i>hsdR hsdM recA13 supE44 leuB6 lacZ proA2 pOX38 Cm^r</i>	M. Starčič Erjavec

(se nadaljuje)

nadaljevanje Preglednice 2: Seznam uporabljenih laboratorijskih sevov

Sev	Genotip in fenotip	Referenca
MV10 pRK2 <i>P. aeruginosa</i>	<i>thr-1 leu-6 thi-1 lacYI tonA21 supE44 trpE5 λ- pRK2 Tc^r</i>	Banack in sod., 2000
PAO1	divji tip Pvd ⁺	Ackerley in Lamont, 2004
J3295	okoljski hipermutatorski sev	Kenna in sod., 2007

3.1.2 Plazmidi

3.1.2.1 Plazmid pRK2

Plazmid pRK2 je velik približno 60 kb in spada v inkompatibilno skupino IncP. Vključuje gene za replikacijo, konjugacijo in odpornosti proti antibiotikom (kanamicin, ampicilin, tetraciklin). Primeren je za gensko manipuliranje, predvsem zaradi svoje sposobnosti replikacije v različnih vrstah bakterij. V magistrskem delu smo uporabili pRK2:Tc, ki ima zapis za odpornost proti antibiotiku tetraciklinu.

3.1.2.2 Plazmid pOX38

pOX38 je konjugativni plazmid, velik 55 kb, derivat plazmida F. Nastal je z zaokroževanjem največjega *Hind*III-fragmenta plazmida F. Vključuje celoten operon *tra*, in replikacijsko regijo RepFIA. V magistrskem delu smo uporabili derivat pOX38:Cm, ki ima zapis za odpornost proti antibiotiku kloramfenikolu.

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočega gojišča LB smo v destilirani vodi (dH₂O) raztopili 25 g/l osnove za gojišče LB (0,5 % kvasni ekstrakt, 1 % tripton, 1 % NaCl). Gojišče smo premešali na magnetnem mešalu in ga odpipetirali po 5 oz. 10 ml v epruvete. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C.

Če je bilo potrebno, smo gojišču, ko se je ohladilo na 55 °C, preden smo ga razlili v sterilne petrijevke, dodali založno raztopino posameznega antibiotika do želene končne koncentracije (Preglednica 3).

Preglednica 3: Končne koncentracije antibiotikov v gojiščih

Antibiotik	Končna koncentracija (µg/ml)
Kloramfenikol	50
Nalidiksična kislina	25
Tetraciklin	15
Rifampicin	250

3.1.3.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah

Za pripravo trdnih gojišč LB smo v dH₂O raztopili 25 g/l osnove za gojišče LB in 15 g/l agarja. Gojišče smo premešali na magnetnem mešalu in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Po avtoklaviraju smo gojišče v topli kopeli ohladili na približno 55 °C in ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

Če je bilo potrebno smo gojišču, ko se je ohladilo na 55 °C, preden smo ga razlili v sterilne petrijevke, dodali založno raztopino posameznega antibiotika do želene končne koncentracije (Preglednica 3).

3.1.3.3 Priprava trdnih minimalnih gojišč (MG)

Za pripravo 1 l minimalnega gojišča smo ločeno sterilizirali 100 ml založne raztopine 10 × A in 200 ml dH₂O ter 700 ml dH₂O, v kateri smo raztopili 12 g agarja. Sterilizacija je potekala z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Po avtoklaviraju smo ju združili in v vodni kopeli ohladili na približno 55 °C. Pred razlivanjem v sterilne petrijevke smo dodali 2 ml 20 % MgSO₄ in 5 ml 40 % raztopine glukoze.

Založno raztopino 10 × A smo pripravili tako, da smo posamezne soli (Preglednica 4) raztopili v 500 ml dH₂O in nato redčili z dH₂O do končnega volumna 1000 ml.

Preglednica 4: Založna raztopina 10 × A

Sol	Količina (g)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
K ₂ HPO ₄	105
KH ₂ PO ₄	45
Na-citrat x 5H ₂ O	5

Če je bilo potrebno smo gojišču, ko se je ohladilo na 55 °C, preden smo ga razlili v sterilne petrijevke, dodali založno raztopino posameznega antibiotika do želene končne koncentracije (Preglednica 3).

3.1.3.4 Priprava R-mehkega agarja

Za pripravo R-mehkega agarja smo v 1 l dH₂O raztopili 10 g tritona, 8 g NaCl, 1 g kvasnega ekstrakta in 12 g agarja. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Po avtoklaviraju smo dodali 2 ml 1 M CaCl₂ in 5 ml 20 % glukoze.

3.1.3.5 Priprava R-plošč

Za pripravo R-plošč smo v 1 l dH₂O raztopili 10 g tritona, 8 g NaCl, 1 g kvasnega ekstrakta in 12 g agarja. Gojišče smo premešali na magnetnem mešalu in ga avtoklavirali

15 min pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo dodali 2 ml 1 M CaCl₂ in 5 ml 20 % glukoze ter razlili plošče.

3.1.4 Kemikalije

Bio-Rad, ZDA

- akril-/bisakril-amid 30 % (19 : 1)
- TEMED

Carl Roth GmbH, Nemčija

- agar
- agarozna

Invitrogen, ZDA

- UltraPure™ 10 % SDS

Merck, Nemčija

- AgNO₃
- amonijev persulfat (APS)
- borova kislina
- bromfenol modro
- CaCl₂
- citronska kislina
- DMSO
- etanol
- glicin
- glukoza
- HCl
- izoamilalkohol
- K-acetat
- K₂HPO₄
- KH₂PO₄
- kloroform
- MgSO₄
- Na-citrat × 5 H₂O
- NaCl
- NaOH
- (NH₄)₂SO₄
- NH₄OH
- ocetna kislina
- perjodova kislina
- 37 % fomaldehid
- β-merkaptoetanol

Polichimica s.r.l. socio unico, Italija

- glicerol

Sigma-Aldrich, ZDA

- antibiotiki: rifampicin, kloramfenikol, tetraciklin, ampicilin, nalidiksična kislina
- baza Tris
- EDTA
- etidijev bromid (10 mg/mL)
- kristal vijolično
- kvasni ekstrakt
- LB (gojišče Luria-Broth)
- 29,4 % NH₄OH
- triton X-100

Thermo Scientific, ZDA

- MgCl₂ (50 mM)
- mešanica dNTP-jev (10 mM)
- pufer za *Taq*-polimerazo z (NH₄)₂SO₄
- pufer za restikcijski encim EcoRI
- 6 × nanašalni elektroforezni pufer

3.1.5 Encimi in standardne DNA-lestvice

NIPPON Genetics GmbH, Nemčija

- BlueStar PLUS proteinska lestvica

Sigma-Aldrich, ZDA

- proteinaza K

ThermoScientific, ZDA

- restrikcijski encim EcoRI
- DNA-polimeraza *Taq* (5 U/µL)
- GeneRulerTM 1 kb DNA lestvica
- GeneRulerTM 100 bp Plus DNA lestvica

3.1.6 Začetni oligonukleotidi

Jena Bioscience GmbH, Nemčija

- ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3')
- ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3')
- RepFIA-f (5'-CTC ACT GAG GCG GCA TAT AGT C-3')
- RepFIA-r (5'-ATG GAA GTG ATA TCG CGG AAG G-3')
- FIC FW (5'-GTG AAC TGG CAG ATG AGG AAG G-3')

- FIC RV (5'-TTC TCC TCG TCG CCA AAC TAG AT-3')
- Sal14-a (5'-CCC TGA AGT GAC CTC CTC TG-3')
- Sal14-b (5'-GAA AGG CGG CAC TCT GTT GT-3')
- RepFIB-f (5'-TCG CTG CAA ACC TTG TCA CT-3')
- RepFIB-r (5'-GGA GAT CCT GCG TAC ACT GCC T-3')
- Inc-P1 (5'-TGA TTT TAC GCG AGT TTC CC-3')
- Inc-P2 (5'-AAA AGA CAG GTT AGC GGT GG-3')
- PTraJ-1 (5'-TCC AAA AAA TGA TGA TGA AT-3')
- PTraJ-2 (5'-ATA GGA ACC TCC TCA CAA AG-3')
- traT-1 (5'-GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG-3')
- traT-2 (5'-CAC GGT TCA GCC ATC CCT GAG-3')
- stx2F (5'-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-3')
- stx2R (5'-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G-3')
- Stx1F (5'-ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC-3')
- Stx1R (5'-AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC-3')

Macrogen, Južna Koreja

- ChuA.1 (5'-GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT-3')
- ChuA.2 (5'-TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA-3')
- YjaA.1 (5'-TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG-3')
- YjaA.2 (5'-ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC-3')
- TspE4C2.1 (5'-GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA-3')
- TspE4C2.2 (5'-CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG-3')
- AceK.f (5'-AAC GCT ATT CGC CAG CTT GC-3')
- ArpA1.r (5'-TCT CCC CAT ACC GTA CGC TA-3')

Microsynth AG, Švica

- algD-F (5'-ATG CGA ATC AGC ATC TTT GGT-3')
- algD-R (5'-CTA CCA GCA GAT GCC CTC GGC-3')
- exoS-F (5'-CTT GAA GGG ACT CGA CAA GG-3')
- exoS-R (5'-TTC AGG TCC GCG TAG TGA AT-3')
- lasB-F (5'-GGA ATG AAC GAA GCG TTC TC-3')
- lasB-R (5'-GGT CCA GTA GTA GCG GTT GG-3')
- nan1-F (5'-AGG ATG AAT ACT TAT TTT GAT-3')
- nan1-R (5'-TCA CTA AAT CCA TCT CTG ACC CGA TA-3')
- nan2-F (5'-ACA ACA ACG GGG ACG GTA T-3')
- nan2-R (5'-GTT TTG CTG ATG CTG GTT CA-3')
- plcN-F (5'-GTT ATC GCA ACC AGC CCT AC-3')
- plcN-R (5'-AGG TCG AAC ACC TGG AAC AC-3')
- rhlAB-F (5'-TCA TGG AAT TGT CAC AAC CGC-3')
- rhlAB-R (5'-ATA CGC CAA AAT CAT GGC AAC-3')
- toxA-F (5'-GGT AAC CAG CTC AGC CAC AT-3')
- toxA-R (5'-TGA TGT CCA GGT CAT GCT TC-3')
- int1-F (5'-GGG TCA AGG ATC TGG ATT TCG-3')
- int1-R (5'-ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G-3')

- int2-F (5'-CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T-3')
- int2-R (5'-GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G-3')

3.1.7 Pufri in reagenti

3.1.7.1 Ekstrakcija LPS

3.1.7.1.1 Pufer za lizo

Pufer za lizo smo pripravili iz 60 mM Tris-HCl in 1 mM EDTA, pH 6,8.

3.1.7.1.2 Pufer za lizo s SDS

Pufer za lizo s SDS smo pripravili iz 2 % SDS, 60 mM Tris-HCl in 1 mM EDTA, pH 6,8.

3.1.7.1.3 2 × nanašalni pufer

2 × nanašalni pufer smo pripravili iz 6 % SDS, 6 % β-merkaptoetanola, 46 % glicerola, 60 mM Tris-HCl pH 8,0 in 0,1 % bromfenol modrega.

3.1.7.2 Barvanje LPS s srebrom

3.1.7.2.1 Fiksacijski pufer

Fiksacijski pufer za barvanje LPS s srebrom smo pripravili iz 40 % etanola in 5 % ocetne kisline v vodi MilliQ.

3.1.7.2.2 Oksidacijski pufer

Oksidacijski pufer smo pripravili iz 40 % etanola, 5 % ocetne kisline in 0,7 % perjodove kisline v vodi MilliQ.

3.1.7.2.3 Pufer za barvanje

Pufer za barvanje LPS s srebrom smo pripravili tako, da smo 2 ml 29,4 % NH₄OH dodali k 28 ml 0,1 N NaOH. Nato smo po kapljicah dodajali 5 ml 20 % AgNO₃, da bi preprečili precipitacijo. Pufer smo nato redčili do končnega volumena 150 ml z vodo MilliQ.

3.1.7.2.4 Pufer za razvijanje barve

Pufer za razvijanje smo pripravili tako, da smo 100 ml vode MilliQ dodali 100 µl 10 % citronske kisline in 100 µl 37 % formaldehida.

3.1.7.2.5 Pufer za ustavitev razvijanja barve

Pufer za ustavitev razvijanja barve smo pripravili iz 7 % ocetne kisline v vodi MilliQ.

3.1.7.3 Tris-glicin SDS-PAGE

3.1.7.3.1 Gel za Tris-glicin SDS-PAGE

V Preglednici 5 so povzete količine uporabljenih sestavin tako za 5 % nanašalni gel kot za 10 % ločevalni gel. Gel smo pripravili tako, da smo vse naštete kemikalije zmešali skupaj v manjši stekleni čaši, jih vlili v nosilec za gel in počakali, da gel polimerizira.

Preglednica 5: Priprava nanašalnega in ločevalnega gela za Tris-glicin SDS-PAGE s 30 %, 19 : 1 akril-/bisakril-amidom

5 % nanašalni gel	10 % ločevalni gel
1,36 ml dH ₂ O	1,9 ml dH ₂ O
0,34 ml akril-/bisakril-amid (30 %, 19 : 1)	1,7 ml akril-/bisakril-amid (30 %, 19 : 1)
0,26 ml 1,0 M Tris pH 6,8	1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8
0,02 ml 10 % SDS	0,05 ml 10 % SDS
0,02 ml 10 % APS	0,05 ml 10 % APS
0,002 ml TEMED	0,002 ml TEMED

3.1.7.3.2 10 × Tris-glicin SDS-PAGE pufer

10 × Tris-glicin SDS-PAGE pufer smo pripravili z uporabo 250 mM Tris, 1,92 M glicina in 1 % SDS.

3.1.7.4 5 × pufer TBE

5 × pufer TBE smo pripravili tako, da smo 54 g Tris, 27,5 g borove kisline in 0,5 M EDTA pH 8,0 raztopili v 1 l dH₂O.

3.1.7.5 Izolacija plazmidne DNA z alkalno denaturacijo

3.1.7.5.1 Raztopina I

Raztopino I za izolacijo plazmidne DNA smo pripravili iz 50 mM glukoze, 25 mM TrisCl pH 8 in 10 mM EDTA. Raztopino smo pred uporabo avtoklavirali in do uporabe hranili pri 4 °C.

3.1.7.5.2 Raztopina II

Raztopino II za izolacijo plazmidne DNA smo pripravili iz 0,2 N NaOH in 1 % SDS, raztopino smo vedno pripravili svežo.

3.1.7.5.3 Raztopina III

Raztopino III za izolacijo plazmidne DNA smo pripravili iz 60 ml 5 M K-acetata, 11,5 ml ledocetne kisline in 28,5 ml dH₂O. Raztopino smo avtoklavirali in do uporabe hranili pri 4 °C.

3.1.8 Komercialni kompleti

QIAGEN, Nizozemska

- QIAGEN Plasmid Midi Kit

3.1.9 Oprema

Amersham Biosciences, Velika Britanija

- spektrofotometer Novaspec Plus

Balingen, Nemčija

- tehnica KERN PFB

Bio-Rad, ZDA

- DNA in proteinska elektroforeza
- PCR pomnoževalnik MyCycler™

CleanAir, ZDA

- varnostna komora

Corning, ZDA

- 15 ml in 50 ml centrifugirke

Eppendorf, Hamburg, Nemčija

- avtomatske pipete
- namizna centrifuga Eppendorf 5424
- centrifuga s hlajenjem Eppendorf 5402
- UV/VIS kivete
- mikrotitrska ploščica

Fisher Scientific, ZDA

- vodna kopel ISOTEMP 215

Hettich AG, Švica

- centrifuga Rotanta 460R

Infors HT, Švica

- rotacijski stresalnik

LKB Bormma, Švedska

- elektroforeza 2301 Macrodrive 1
- UV luč 2011 Macrovue

Perkin Elmer, Kanada

- PCR pomnoževalnik GeneAmp PCR System 2400

Tehnilab, ZDA

- termoblok Constantemp

Thermo Scientific, ZDA

- multicentrifuga 3SR+

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje izolatov

Vse izolate bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa* smo gojili na trdnih in v tekočih gojiščih LB. Trdna gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C, tekoča gojišča smo inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C.

3.2.2 Preverjanje občutljivosti za antibiotike

Občutljivost posameznega seva za antibiotike smo preverili tako, da smo sev s cepilno zanko prenesli na trdno gojišče LB z dodanim antibiotikom. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo preverili rast sevov.

3.2.3 Shranjevanje bakterijske kulture

Seve smo nacepili v tekoče gojišče LB in jih inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo 0,75 ml prekonočne kulture dodali 0,75 ml 30 % glicerola v tekočem gojišču LB. Kulturo smo dobro premešali in jo shranili pri – 80 °C.

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.4.1 Priprava celičnih lizatov

Posamezne kolonije bakterijskih izolatov smo nacepili v tekoče gojišče LB in jih inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo 1 ml prekonočne kulture odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri hitrosti 13.000 obratov/min. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v 200 µl sterilne dH₂O. Suspenzijo smo inkubirali 10 min pri 100 °C. Temu je sledilo ponovno centrifugiranje 10 min pri hitrosti 13.000 obratov/min. V svežo mikrocentrifugirko smo prenesli 150 µl supernatanta in do uporabe shranili pri – 80 °C.

3.2.4.2 ERIC-PCR

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli v 25-µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala:

- 13,375 µl dH₂O
- 2,5 µl pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂
- 2,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida ERIC1R (20 pmol/µl)
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida ERIC2 (20 pmol/µl)
- 0,5 µl mešanice dNTP-jev (10 mM)
- 0,125 µl *Taq*-polimeraze (5 U/µl)
- 5 µl celičnega lizata

Uporabili smo program:

94 °C – 4:00 min

94 °C – 0:30 min

40 °C – 0:15 min - 35 × (Versalovic in sod., 1991)

72 °C – 5:00 min

72 °C – 7:00 min

3.2.4.3 Filogenetski PCR

Verižno reakcijo s polimerazo za filogenetski »quadruplex« smo izvedli v 20-µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala:

- 3,9 µl dH₂O
- 2 µl pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl začetnega oligonukleotida chuA.1b (20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida chuA.2 (20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida yjaA.1b (20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida yjaA.2b (20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida TspE4C2.1b (20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida TspE4C2.2b (20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida AceK.f (40 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida ArpA1.r (40 pmol/µl)
- 0,6 µl mešanice dNTP-jev (10 mM)
- 0,5 µl *Taq*-polimeraze (5 U/µl)
- 3 µl celičnega lizata

Uporabili smo program:

94 °C – 4:30 min

94 °C – 0:30 min

59 °C – 0:30 min - 30 × (Clermont in sod., 2013)

72 °C – 0:30 min

72 °C – 5:00 min

3.2.4.4 PCR za preverjanje prisotnosti plazmidov

Vse verižne reakcije s polimerazo smo izvedli v 25-µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala:

- 13,375 µl dH₂O
- 2,5 µl pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂
- 2,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida 1 (20 pmol/µl)
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida 2 (20 pmol/µl)
- 0,5 µl mešanice dNTP-jev (10 mM)

- 0,125 µl *Taq*-polimeraze (5 U/µl)
- 5 µl celičnega lizata

Uporabili smo programe, ki so navedeni v Preglednici 6:

Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki in programi PCR uporabljeni pri sevih *E. coli*

Začetni oligonukleotidi	Odsek DNA in njegov produkt	Velikost produkta (bp)	Program PCR	Referenca
PCR RepFIA: RepFIA-f RepFIA-r	<i>repFIA</i> , replikacijska regija RepFIA	674	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 63 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 7:00 min	Starčič Erjavec in sod., 2003
PCR RepFIC: FIC FW FIC RV	<i>repFIC</i> , replikacijska regija RepFIC	262	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 60 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 0:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Carattoli in sod., 2005
PCR RepFIIA: Sal14-a Sal14-b	<i>repFIIA</i> , replikacijska regija RepFIIA	840	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 63 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 7:00 min	Starčič Erjavec in sod., 2003
PCR RepFIB: RepFIB-E1 RepFIB-E2	<i>repFIB</i> , replikacijska regija RepFIB	1595	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 63 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 1:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Starčič Erjavec in sod., 2003
PCR IncP: Inc-P1 Inc-P2	<i>incP</i> , plazmidi inkompatibilnostne skupine P	240	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 65 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 0:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Sobecky in sod., 1997
PCR TraJ: PTraJ-1 PTraJ-2	<i>traJ</i> , protein TraJ	210	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 60 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 0:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Starčič Erjavec in sod., 2003
PCR TraT: traT-1 traT-2	<i>traT</i> , protein TraT	288	<u>94 °C – 4:30 min</u> 94 °C – 0:30 min 63 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 0:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Johnson in Stell, 2000

(se nadaljuje)

nadaljevanje Preglednice 6: Začetni oligonukleotidi in programi PCR uporabljeni pri sevih *E. coli*

Začetni oligonukleotidi	Odsek DNA in njegov produkt	Velikost produkta (bp)	Program PCR	Referenca
PCR Stx2: stx2F stx2R	<i>stx2</i> , shiga toksin 2	255	94 °C – 4:30 min 94 °C – 0:30 min 58 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 0:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Paton in Paton, 1998
PCR Stx1: stx1F stx1R	<i>stx1</i> , shiga toksin 1	180	94 °C – 4:30 min 94 °C – 0:30 min 58 °C – 0:30 min - 30 × <u>72 °C – 0:30 min</u> 72 °C – 7:00 min	Paton in Paton, 1988

3.2.4.5 Preverjanje prisotnosti virulentnih dejavnikov in mobilnih elementov pri sevih *P. aeruginosa*

Vse verižne reakcije s polimerazo smo izvedli v 25-µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala:

- 13,375 µl dH₂O
- 2,5 µl pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂
- 2,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida 1 (20 pmol/µl)
- 0,5 µl začetnega oligonukleotida 2 (20 pmol/µl)
- 0,5 µl mešanice dNTP-jev (10 mM)
- 0,125 µl *Taq*-polimeraze (5 U/µl)
- 5 µl celičnega lizata

Po potrebi smo dodali DMSO do končne koncentracije 4 %.

Uporabili smo programe, ki so navedeni v Preglednici 7:

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi in programi PCR uporabljeni pri sevih *P. aeruginosa*

Začetni oligonukleotidi	Odsek DNA in njegov produkt	Velikost produkta (bp)	Program PCR	Referenca
PCR <i>algD</i>: algD-F algD-R	<i>algD</i> , alginat	1310	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004
PCR <i>exoS</i>: exoS-F exoS-R	<i>exoS</i> , eksoencim S	504	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004
PCR <i>lasB</i>: lasB-F lasB-R	<i>lasB</i> , elastaza LasB	300	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004
PCR <i>nan1</i>: nan1-F nan1-R	<i>nan1</i> , nevraminidaza 1	1316	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004
PCR <i>nan2</i>: nan2-F nan2-R	<i>nan2</i> , nevraminidaza 2	1161	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004
PCR <i>plcN</i>: plcN-F plcN-R	<i>plcN</i> , nehemolitična fosfolipaza C	466	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004
PCR <i>rhlAB</i>: rhlAB-F rhlAB-R	<i>rhlAB</i> , rammolipidi	151	94 °C – 3:00 min 94 °C – 1:00 min 52 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:30 min</u> 72 °C – 5:00 min	Zhu in sod., 2004
PCR <i>toxA</i>: toxA-F toxA-R	<i>toxA</i> , eksotoksin A	352	94 °C – 3:00 min 94 °C – 0:30 min 55 °C – 1:00 min - 30 × <u>72 °C – 1:00 min</u> 72 °C – 5:00 min	Lanotte in sod., 2004

(se nadaljuje)

nadaljevanje Preglednice 7: Začetni oligonukleotidi in programi PCR uporabljeni pri sevih *P. aeruginosa*

Začetni oligonukleotidi	Odsek DNA in njegov produkt	Velikost produkta (bp)	Program PCR	Referenca
PCR <i>int1</i>:	<i>int1</i> , integroni	457	94 °C – 4:00 min 94 °C – 0:45 min 55 °C – 0:45 min - 30 × <u>72 °C – 0:55 min</u> 72 °C – 8:00 min	Ruiz-Martínez in sod., 2011
int1-F	integroni			
int1-R	razreda 1			
PCR <i>int2</i>:	<i>int2</i> , integroni	789	94 °C – 4:00 min 94 °C – 0:45 min 55 °C – 0:45 min - 30 × <u>72 °C – 0:55 min</u> 72 °C – 8:00 min	Ruiz-Martínez in sod., 2011
int2-F	integroni			
int2-R	razreda 2			

3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli v $0,5 \times$ pufru TBE. Agarozni gel smo pripravili iz $0,7 \mu\text{g}/\text{ml}$ etidijevega bromida in $0,5\text{--}2,0 \%$ agaroze, odvisno od dolžine fragmenta DNA, ki smo ga analizirali. Vzorcem DNA smo dodali $6 \times$ nanašalni pufer in vzorce nanesli na agarozni gel. Odvisno od dolžine fragmenta, ki smo ga analizirali, je elektroforeza tekla pri $80\text{--}120 \text{ V}$.

3.2.6 LPS-profiliranje z metodo SDS-PAGE**3.2.6.1 Ekstrakcija LPS in elektroforeza**

Seve *E. coli* smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB in inkubirali na stresalniku preko noči pri 37°C . Naslednji dan smo 3 ml prekonočne kulture centrifugirali in odstranili ves supernatant. $3 \times$ smo spirali z $0,9 \%$ NaCl in nato resuspendirali v $125 \mu\text{l}$ pufra za lizo s SDS. Temu je sledila 5 min inkubacija pri 100°C . Lizirane celice smo resuspendirali v $75 \mu\text{l}$ pufra za lizo brez SDS, dodali $5,2 \mu\text{l}$ K proteinaze in 2 uri inkubirali pri 65°C . Do uporabe smo ekstrahirani LPS shranili pri 4°C .

Naslednji dan smo $50 \mu\text{l}$ LPS dodali enak volumen nanašalnega pufra z β -merkaptoetanolom in inkubirali 5 min pri 100°C . Po inkubaciji smo $10 \mu\text{l}$ vsakega vzorca analizirali s Tris-glicin SDS-PAGE pri 90 V .

3.2.6.2 Barvanje LPS s srebrom

SDS-PAGE gel smo 30 min inkubirali v pufru za fiksacijo in 5 min v oksidacijskem pufru. Po oksidaciji smo gel $3 \times$ spirali 10 min z MiliQ vodo. Gel smo nato 10 min barvali v pufru s srebrovim nitratom in ponovno $3 \times$ spirali 10 min z MiliQ vodo. Gel smo inkubirali

v pufru za razvijanje barve do želenega rezultata in z dodatkom pufra za ustavitev razvijanja barve ustavili razvijanje gela.

3.2.7 Izolacija plazmidne DNA z metodo alkalne denaturacije

Posamezne seve *E. coli* smo nacepili v tekoče gojišče LB in inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. 2 ml prekonočne kulture smo 2 min centrifugirali pri hitrosti 13.000 obratov/min in odstranili supernatant. Bakterijske celice smo resuspendirali v 100 µl ledeno hladne raztopine I. Suspenziji smo dodali 200 µl sveže pripravljene raztopine II in inkubirali 5 min na ledu. Suspenziji smo dodali 150 µl ledeno hladne raztopine III, takoj premešali z obračanjem in inkubirali še 15 min na ledu. Po inkubaciji smo 10 min centrifugirali pri hitrosti 13.000 obratov/min in 4 °C, prenesli 400 µl supernatanta v novo mikrocentrifugirko ter dodali enak volumen zmesi fenol/kloroform/izoamil alkohola. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri hitrosti 13.000 obratov/min. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali enak volumen zmesi kloroform/izoamil alkohola in centrifugirali 5 min pri hitrosti 13.000 obratov/min. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in plazmidno DNA oborili z dodatkom 2,5 × volumna 96 % etanola. Centrifugirali 10 min pri hitrosti 13.000 obratov/min in 4 °C. Odlili smo supernatant in oborini dodali 1 ml 80 % etanola. Zopet smo centrifugirali 5 min pri hitrosti 13.000 obratov/min in sobni temperaturi. Odstranili smo ves etanol in oborino osušili do suhega. Izolirani plazmidni DNA smo dodali 25 µl pufra TE in jo preverili z gelsko elektroforezo.

3.2.8 Izolacija plazmidne DNA s komercialnim kompletom QIAGEN Plasmid Midi Kit

Seve *E. coli* smo nacepili v 25 ml tekočega gojišča LB in inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo prekonočno kulturo centrifugirali 15 min pri hitrosti 6.000 obratov/min in 4 °C. Pelet smo resuspendirali v 4 ml pufra P1, dodali 4 ml pufra P2, vsebino premešali z obračanjem centrifugirke in nato 5 min inkubirali pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 4 ml predhodno ohljenega pufra P3, premešali in 15 min inkubirali na ledu. Nato smo vsebino 30 min centrifugirali pri hitrosti 6.000 obratov/min in 4 °C. Supernatant smo filtrirali preko sterilne gaze v svežo centrifugirko. Na kolono za izolacijo plazmidne DNA, ki je priložena komercialnemu kompletu, smo nanesli 4 ml pufra QBT in počakali, da se je kolona spraznila zaradi sile gravitacije, nato smo nanesli supernatant. Tako se je plazmidna DNA vezala na kolono, katero smo nato 2 × spirali z 10 ml pufra QC in DNA eluirali z 5 ml pufra QF v svežo centrifugirko. DNA smo precipitirali z dodatkom 3,5 ml izopropanola pri sobni temperaturi in takoj 30 min centrifugirali pri hitrosti 13.000 obratov/min in 4 °C. Pelet smo spirali z 70 % etanolom in centrifugirali še 10 minut pri hitrosti 13.000 obratov/min. Pazljivo smo odstranili supernatant, pelet posušili pri sobni temperaturi in ga raztopili v pufru TE. Izolirane plazmidne DNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.9 Restrikcija izoliranih plazmidov z restriktijskim encimom EcoRI

Izolirano plazmidno DNA smo rezali z restriktijskim encimom *EcoRI*, tako da smo najprej pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala:

- 7 µl plazmidne DNA
- 1 µl 10 × pufra za *EcoRI*
- 1,8 µl sterilne dH2O
- 0,2 µl restriktijske endonukleaze *EcoRI* (10 U/µl)

Reakcijsko zmes smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

Produkt restrikcije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.10 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi *E. coli* (recipient) × *E. coli* HB101 pOX38:Cm (donor)

Posamezne kolonije donorskega in recipientskih sevov smo nacepili v tekoče gojišče LB in inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. Če je bilo potrebno smo dodali antibiotik do želene končne koncentracije (Preglednica 3). Prekonočne kulture smo precepili v sveže tekoče gojišče LB v razmerju 1 : 100 in inkubirali na stresalniku 2 uri pri 37 °C. En ml kulture recipientskega seva smo centrifugirali 2 min pri hitrosti 13.000 obratov/min in odstranili gojišče. Pelet smo resuspendirali v 0,4 ml kulture donorskoga seva in celoten volumen razmazali na ploščo LB. Plošče smo inkubirali 4 ure pri 37 °C. Nato smo na ploščo dodali 1 ml 0,9 % NaCl in v njem resuspendirali kokulturo ter jo prenesli v mikrocentrifugirko. Pripravili smo 10 × redčitveno vrsto in jo nacepili na selekcijsko gojišče za recipientski sev (MG) ter za transkonjugante (MG Cm). Plošče smo inkubirali 2 dni pri 37 °C in nato prešteli CFU. Iz dobljenih podatkov smo izračunali frekvenco konjugacije. Poskus smo izvedli v najmanj 3 ponovitvah za vsak recipientski sev.

$$\text{frekvenca} = \frac{\text{št. CFU transkonjugant}}{\text{št. CFU recipienta}} \quad \dots(1)$$

3.2.11 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi *E. coli* (recipient) × *E. coli* MV10 pRK2:Tc (donor)

Postopek je enak opisanemu pri poglavju 3.2.10 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi *E. coli* (recipient) × *E. coli* HB101 pOX38:Cm (donor), le da smo tu kot donor uporabili sev *E. coli* MV10 pRK2:Tc.

3.2.12 Indukcija lizogenih fagov z UV

Seve *E. coli* za preverjanje lizogenih fagov in indikatorski sev CL173 smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB in preko noči inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Naslednji dan smo prekonočno kulturo prelili v sterilno stekleno petrijevko in celice med mešanjem izpostavili UV za 70 s. Po obsevanju smo celice inkubirali 1 uro pri 37 °C. En ml

obsevanih celic smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri hitrosti 13.000 obratov/min. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in do uporabe hranili pri 4 °C. Plošče LB smo predgreli pri 37 °C. V epruvete smo odpipetirali 3,5 ml segretega in raztopljenega mehkega agarja in inkubirali 10 min pri 46 °C. Vsaki epruveti z mehkim agarjem smo dodali po 200 µl prekonočne indikatorske kulture CL173 in 100 µl neredčenega supernatanta s fagi. Vsebino epruvete smo prelimi čez celotno površino plošče LB in jih inkubirali preko noči pri 37 °C. Kot kontrolo števila bakterij v supernatantu smo iz supernatanta prenesli 100 µl na ploščo LB. Naslednji dan smo pregledali plošče.

3.2.13 Določanje občutljivosti seva za bakteriofag P1

Seve *E. coli* smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB + 5 mM CaCl₂ in inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. K na 46 °C ohlajenemu R-mehkemu agarju smo dodali 0,1 ml neredčene bakterijske kulture *E. coli*, premešali in prelimi na predgredte R-plošče. Na ohlajene R-plošče s strjenim mehkim agarjem z bakterijsko kulturo smo nakapljali 10 µl fagne kulture P1 na sredino plošče in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo plošče pregledali.

3.2.14 Določanje kolicinogenosti sevov *E. coli*

Kolonije posameznih sevov smo s sterilnim zobotrebcem prepikirali na ploščo LB in jo inkubirali preko noči pri 37 °C. Hkrati smo v tekoče gojišče LB nacepili indikatorski sev CL173 in ga inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo kolonije na plošči 15 min izpostavljeni hlapom kloroforma na staničevini. Lizirane bakterije smo še nadaljnjih 15 min pustili v digestoriju, da je kloroform popolnoma izhlapel. S segrevanjem smo raztopili mehki agar in ga odpipetirali po 3,5 ml epruveto, ki smo jo nato inkubirali 10 min pri 46 °C. Mehkemu agarju smo dodali 200 µl prekonočne kulture indikatorskega seva CL173, ki je občutljiv za kolicine, ga prelimi preko liziranih kolonij in inkubirali preko noči pri 37°C. Naslednji dan smo pregledali ploščo, kjer so bile vidne cone zbistritve indikatorskega seva CL173 okoli kolonij, ki so sintetizirale kolin.

3.2.15 Preverjanje frekvence mutacij bakterij *P. aeruginosa* z antibiotikom rifampicinom

Pripravili smo plošče LB z dodanim antibiotikom rifampicinom (250 µg/ml) na katerih smo preverjali frekvence mutacij. Iz prekonočne kulture sevov *P. aeruginosa* smo pripravili redčitveno vrsto, ter po 100 µl vsake redčitve razmazali na plošče LB in plošče LB Rif. Plošče smo nato inkubirali preko noči pri 37 °C in naslednji dan prešteli zrastle kolonije. Iz določenih titrov na ploščah LB in LB Rif smo izračunali frekvenco mutacije. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah.

3.2.16 Določanje sposobnosti tvorbe biofilma in kvantifikacija na polistirenski mikrotitrski ploščici (a) in v epruvetah (b)

- a) Seve *P. aeruginosa* smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB in preko noči inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Naslednji dan smo odpipetirali 100 µl prekonočne kulture v polistirensko mikrotitrsko ploščo in inkubirali 24 ur pri 37 °C brez stresanja. Po 24 urah smo odstranili vse gojišče iz luknjic mikrotitrsko plošče. Bakterije, ki se niso pritrdile, smo tako odstranili. Biofilm smo barvali z 0,2 % raztopino kristal vijoličnega in inkubirali 15 min, da so se celice obarvale. Po 15 min smo odstranili barvilo in 3 × spirali s sterilno dH₂O. Po spiranju smo dodali 200 µl 95 % etanola. 125 µl vzorca smo prenesli v novo luknjico na mikrotitrski plošči in izmerili absorbanco pri 595 nm z mikročitalcem. Poskus smo izvedli v treh paralelkah.
- b) Seve *P. aeruginosa* smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB in preko noči inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Po 24 urah smo odlili gojišče in z njim nepritrjene bakterije. Nato smo bakterije 3 × sprali z dH₂O, jih 1 dan sušili pri 37 °C ter nato odčitali rezultate.

3.2.17 Določanje produkциje bakterijskega pigmenta piocianina pri sevih *P. aeruginosa*

Piocianinski test, ki smo ga uporabili, temelji na absorbanci piocianina izmerjeni pri 520 nm v kisli raztopini.

Seve *P. aeruginosa* smo nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB in inkubirali s stresanjem preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo 1 ml prekonočne kulture centrifugirali pri hitrosti 13.000 obratov/min in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Supernatant, ki je vseboval piocianin smo najprej ekstrahirali z 0,6 ml kloroform, temu je sledila ekstrakcija z 1 ml 0,2 M HCl. Izmerili smo absorbanco pri 520 nm. Koncentracijo piocianina v supernatantu smo izrazili tako, da smo izmerjeno absorbanco pomnožili s faktorjem značilnim za kisle raztopine – 17,072, ter rezultat zapisali v µg/ml. Poskus smo izvedli v treh paralelkah.

3.2.18 Preverjanje frekvence konjugacije z dvema sevoma *P. aeruginosa* (recipienta) in *E. coli* MV10 pRK2:Tc (donor)

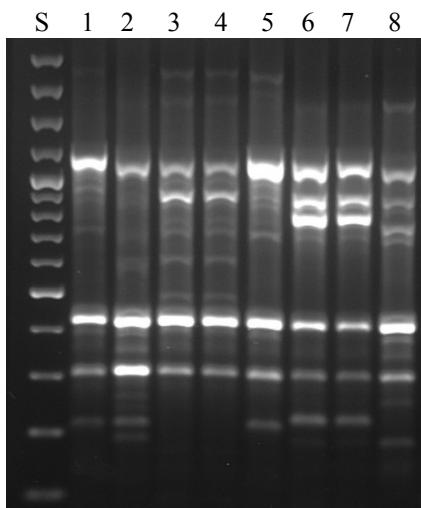
Poskusili smo izvesti konjugacijo s sevoma *P. aeruginosa* L-995 in L-996 kot recipientoma in donorjem *E. coli* MV10 pRK2. Za selekcijo transkonjugant smo uporabili plošče z minimalnim gojiščem in dodanim antibiotikom tetraciklinom (Tc). Pri koncentraciji Tc 40 µg/ml recipienti niso rasli, donor pa je rasel normalno.

Postopek je enak opisanemu pri poglavju 3.2.10 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi *E. coli* (recipient) × *E. coli* HB101 pOX38:Cm (donor).

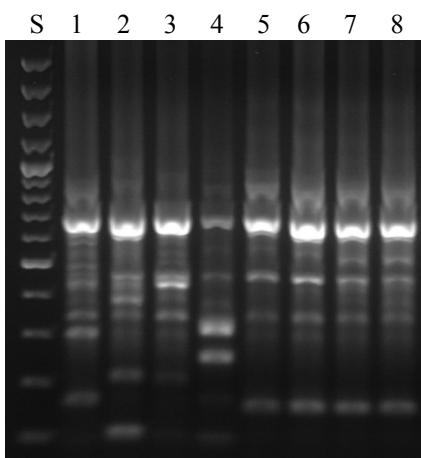
4 REZULTATI

4.1 ERIC-PCR

Z metodo ERIC-PCR smo preverili vse izolate bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa* izoliranih iz pomivalnih strojev. Med 8-imi izolati *E. coli* smo razlikovali 6 različnih sevov, ter med 8-imi izolati *P. aeruginosa* 7 različnih sevov. Rezultati ERIC-PCR izolatov *E. coli* so predstavljeni na Sliki 3, kjer je razvidno, da sta bila profila ERIC-PCR izolata N3 in N4 ter N6 in N7 enaka, zato smo sklepali, da gre za isti sev. Rezultati izolatov *P. aeruginosa* so predstavljeni na Sliki 4, iz katere je razvidno, da sta imela izolata L-998 in L-999 enak profil ERIC-PCR.



Slika 3: Prikaz elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR izolatov *E. coli*. Uporabili smo lestvico GeneRuler™ 100 bp Plus DNA (100, 200, 300, 400, **500**, 600, 700, 800, 900, **1000**, 1200, 1500, 2000, 3000 bp) (nanesen v jamico S). 1 – izolat *E. coli* N1, 2 – izolat *E. coli* N2, 3 – izolat *E. coli* N3, 4 – izolat *E. coli* N4, 5 – izolat *E. coli* N5, 6 – izolat *E. coli* N6, 7 – izolat *E. coli* N7, 8 – izolat *E. coli* N8.



Slika 4: Prikaz elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR izolatov *P. aeruginosa*. Uporabili smo lestvico GeneRuler™ 100 bp Plus DNA (100, 200, 300, 400, **500**, 600, 700, 800, 900, **1000**, 1200, 1500, 2000, 3000 bp) (nanesen v jamico S). 1 – izolat *P. aeruginosa* L-597, 2 – izolat *P. aeruginosa* L-993, 3 – izolat *P. aeruginosa* L-994, 4 – izolat *P. aeruginosa* L-995, 5 – izolat *P. aeruginosa* L-996, 6 – izolat *P. aeruginosa* L-997, 7 – izolat *P. aeruginosa* L-998, 8 – izolat *P. aeruginosa* L-999.

4.2 FILOGENETSKE SKUPINE

Vse seve bakterije *E. coli* smo s pomočjo metode filogenetskega PCR uvrstili v filogenetsko skupino A (100 %), kar vidimo v Preglednici 8.

Preglednica 8: Filogenetske skupine sevov *E. coli*

Sev	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	Filogenetska skupina
N1	+	-	-	-	A
N2	+	-	-	-	A
N3	+	-	-	-	A
N5	+	-	-	-	A
N6	+	-	-	-	A
N8	+	-	-	-	A

4.3 PRISOTNOST PLAZMIDOV

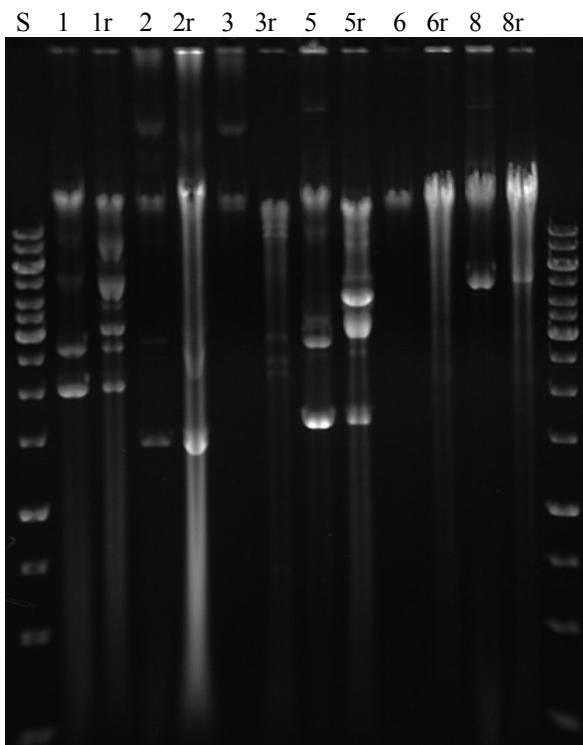
Prisotnost plazmidov pri sevih *E. coli* smo preverjali tako z metodo PCR, kot tudi s poskušanjem izolacije plazmidov iz sevov z uporabo dveh metod, in sicer z metodo alkalne denaturacije in s pomočjo komercialnega kompleta za izolacijo plazmidne DNA QIAGEN Plasmid Midi Kit. Z metodo PCR smo preverjali prisotnost replikacijskih regij, genov odgovornih za konjugacijo ter zapisa za 2 virulentna dejavnika, katera se lahko nahajata tudi na plazmidu, rezultati so prikazani v Preglednici 9.

Preglednica 9: Rezultati metode PCR za preverjanje prisotnosti plazmidov pri sevih *E. coli*.

Sev	RepFIA	RepFIC	RepFIIA	RepFIB	IncP	<i>traJ</i>	<i>traT</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
N1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N5	-	-	-	-	-	+	+	-	-
N6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N8	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Iz Preglednice 9 je razvidno, da zapise za RepFIC, RepFIB, IncP, *stx2* in *stx1* ni imel nobeden od testiranih sevov (0 %), zapis za RepFIIA, *traJ* in *traT* je imel 1 od 6 sevov (17 %), zapis za RepFIA so imeli 3 sevi (50 %). Sev N6 ni imel nobenega zapisa, ki bi kazal na prisotnost plazmida.

Nato smo z metodo alkalne denaturacije in s pomočjo komercialnega kompleta izolirali različno velike plazmide iz posameznih sevov, ter jih rezali z restriktičnim encimom *EcoRI*. Rezanje smo uporabili, da bi iz pridobljenih podatkov o dolžinah fragmentov po rezanju lažje določili približno velikost plazmidov. Kot je razvidno iz Slike 5 smo pri sevih N1 in N5 izolirali 2 manjša plazmida, pri sevih N2 in N3 smo izolirali 1 večji plazmid, pri sevu N8 smo izolirali 1 manjši plazmid. Sev N6 ni imel nobenega plazmida, kar se ujema tudi z rezultati metode PCR.

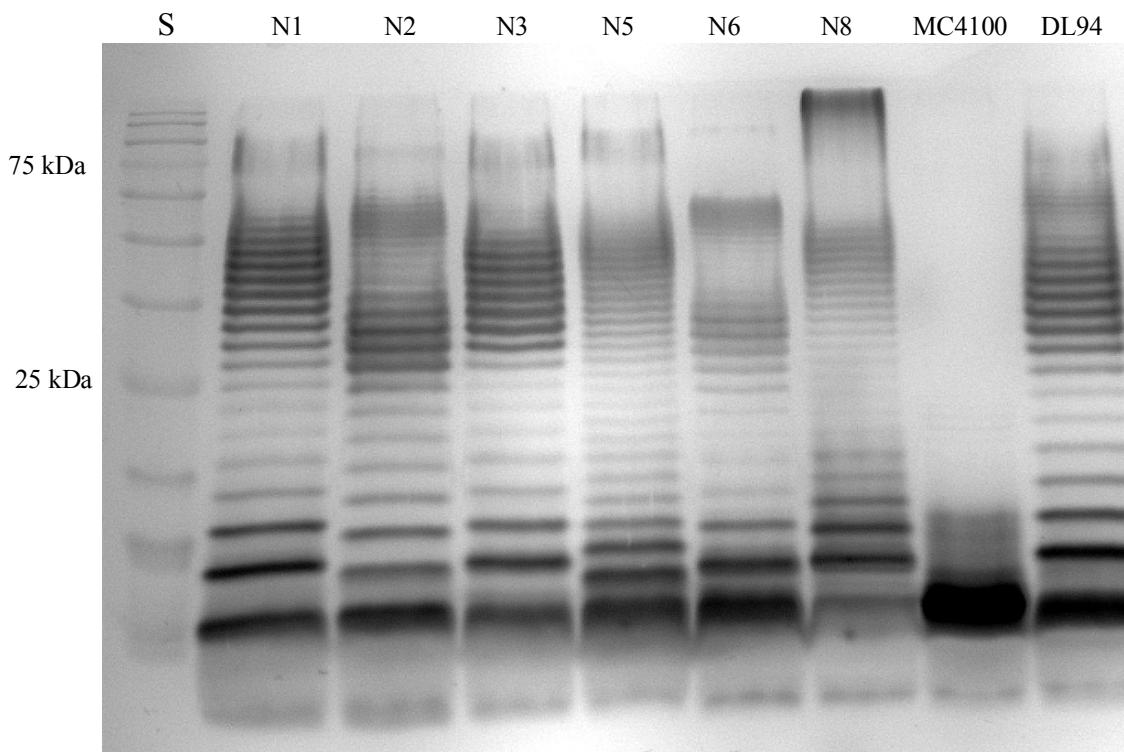


Slika 5: Prikaz izoliranih plazmidov sevov *E. coli*. Uporabili smo lestvico GeneRulerTM 1 kb DNA (250, 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp) (nanesen v jamico S).

1 – N1, 1r – N1 rezan z EcoRI, 2 – N2, 2r – N2 rezan z EcoRI, 3 – N3, 3r – N3 rezan z EcoRI, 5 – N5, 5r – N5 rezan z EcoRI, 6 – N6, 6r – N6 rezan z EcoRI, 8 – N8, 8r – N8 rezan z EcoRI.

4.4 PROFIL LPS

Profiliranje LPS smo izvedli pri sevih *E. coli* in za primerjavo dveh kontrolnih sevih *E. coli* MC4100 in DL94, kot je opisano v poglavju 3.2.6 LPS-profiliranje z metodo SDS-PAGE, rezultati so predstavljeni na Sliki 6.



Slika 6: Profili LPS sevov *E. coli*. Izoliran LPS smo ločili s SDS-PAGE in obarvali s srebrom. Uporabili smo proteinsko lestvico BlueStar PLUS (11, 17, 20, **25**, 35, 48, 63, **75**, 100, 135, 180, 245 kDa) (nanesen v jamicu S).

Laboratorijski sev MC4100 je primer seva, ki ima značilen »rough« LPS (R-LPS), kar pomeni, da ne vsebuje variabilnih O-antigenov. R-LPS sestavlja le lipid A in oligosaharidno jedro, zato na gelu ne vidimo več posameznih pasov pri večji molekularni teži. Sev DL94 in prav tako vsi sevi *E. coli* izolirani iz pomivalnih strojev so imeli značilen »smooth« LPS (S-LPS), z 10 – 18 enot O, ki sestavljajo O-antigen, kar je značilno za večino sevov *E. coli* s S-LPS. Iz SDS-PAGE gela je razvidno, da so imeli vsi sevi med seboj različne O-antigene. Podobnost lahko opazimo med sevoma N1 in N3, ki sta imela 16 različno dolgih enot O, ter N2 in N6 z okoli 12 različno dolgih enot O. Podobno je bilo tudi število enot pri posamezni dolžini, kar nam kaže intenziteta barve pasov. Največje število pasov pri različnih dolzinah sta imela seva N5 in N8, to je med 18 in 20. Za bolj podrobne rezultate, bi morali SDS-PAGE izvesti na večjem poliakrilamidnem gelu. Glede na razmik med pasovi v profilu pri S-LPS sevih lahko ocenimo, da je sev N5 imel enoto O z najmanjšo molekularno težo, med vsemi analiziranimi sevi. Pri molekularni teži med 50 in 100 kDa že lahko opazimo, da ni prisotnih več nobenih za LPS specifičnih pasov.

4.5 OCENA FREKVENCE KONJUGATIVNEGA PRENOSA

Ocenili smo frekvenco konjugativnega prenosa dveh plazmidov, pOX38:Cm in pRK2:Tc v seve izolirane iz pomivalnih strojev, ki smo jih uporabili kot recipientske seve. Za primerjavo smo kot recipientska seva uporabili tudi 2 laboratorijska seva *E. coli* RU4405 in DH5 α . Kot donorska seva smo uporabili *E. coli* HB101 pOX38 in *E. coli* MV10 pRK2. Rezultati, ki smo jih pridobili s protokolom opisanem v poglavju 3.2.10 Določanje frekvence konjugacije na trdnem gojišču: sevi *E. coli* (recipient) \times *E. coli* HB101 pOX38:Cm (donor) so predstavljeni v Preglednici 10. Poskuse smo izvedli v treh ponovitvah in za predstavitev variabilnosti rezultatov uporabili standardni odklon.

Preglednica 10: Frekvence konjugacij 2 donorskih sevov v recipientske seve *E. coli*

Recipient	Donor	
	HB101 pOX38	MV10 pRK2
N1	$(6,8 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	$(1,6 \pm 0,6) \times 10^{-5}$
N2	$(7,5 \pm 4,3) \times 10^{-2}$	$(5,4 \pm 2,0) \times 10^{-3}$
N3	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(2,2 \pm 1,8) \times 10^{-3}$
N5	$(5,4 \pm 3,4) \times 10^{-6}$	$(1,5 \pm 0,7) \times 10^{-6}$
N6	$(7,2 \pm 4,5) \times 10^{-2}$	$(6,5 \pm 3,2) \times 10^{-2}$
N8	$(1,1 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(2,2 \pm 1,7) \times 10^{-3}$
RU4405	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	/
DH5 α	/	$(2,0 \pm 1,1) \times 10^{-1}$

Iz rezultatov lahko vidimo, da so bile frekvence konjugativnega prenosa zelo različne, variirale so od 10^{-7} do 10^{-2} , ko smo izvedli konjugacijo z donorjem HB101 pOX38 in od 10^{-2} do 10^{-6} , ko smo uporabili donor MV10 pRK2. V vseh primerih so bile frekvence konjugativnega prenosa manjše od frekvence prenosa plazmida v laboratorijska kontrolna seva. Izmed sevov *E. coli*, izoliranih iz pomivalnih strojev, sta bila seva N2 in N6 najbolj sposobna sprejema tuje DNA, ne glede na to kateri donorski sev smo uporabili pri izvedbi konjugativnega prenosa. Pri posameznem recipientu smo opazili tudi precejšnje razlike v sprejemu tuje DNA, ko smo uporabili različne donorske seve, edini, ki je izstopal, je sev N6, pri katerem so bile frekvence prenosa zelo podobne, ne glede na donorski sev.

Prav tako smo želeli oceniti frekvenco konjugativnega prenosa med donorjem *E. coli* MV10 pRK2 in 2 recipientskima sevoma *P. aeruginosa*, vendar do prenosa plazmida pRK2 v seva *P. aeruginosa* v nobeni od treh ponovitev ni prišlo.

4.6 PRISOTNOST LIZOGENIH FAGOV

Pri sevih *E. coli* smo preverjali prisotnost lizogenih fagov tako, da smo jih poskušali inducirati z UV svetlobo. Cone lize nismo opazili pri nobenem sevu, zato sklepamo, da nimajo lizogenih fagov, kar pomeni 0 % vseh izoliranih sevov *E. coli* iz pomivalnih strojev.

4.7 OBČUTLJIVOST ZA BAKTERIOFAG P1

Seve *E. coli* smo testirali za občutljivost na fagno kulturo P1. Pri nobenem sevu nismo okoli nakapljane fagne kulture P1 opazili cone zbistritve. Noben sev ni bil občutljiv za fagno kulturo P1, kar pomeni 0 % vseh izoliranih sevov *E. coli* iz pomivalnih strojev.

4.8 KOLICINOGENOST

Pri sevih *E. coli* smo s kloroformiranjem preverjali sposobnost sinteze kolicinov. Okoli nobenega seva nismo opazili zbistritvene cone, zato sklepamo, da noben sev *E. coli* izoliran iz pomivalnega stroja ni sposoben sintetizirati kakršnega koli kolicina, kar pomeni 0 % vseh izoliranih *E. coli* iz pomivalnih strojev.

4.9 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN MOBILNI ELEMENTI SEVOV *P. aeruginosa*

Pri sevih *P. aeruginosa* smo preverjali prisotnost nukleotidnih zaporedij genov za virulentne dejavnike in 2 mobilnih elementov z metodo PCR. Rezultati so predstavljeni v Preglednici 11.

Preglednica 11: Prisotnost virulentnih dejavnikov in mobilnih elementov pri sevih *P. aeruginosa*

Sev	Virulentni dejavniki							Mobilni elementi		
	<i>algD</i>	<i>exoS</i>	<i>lasB</i>	<i>nan1</i>	<i>nan2</i>	<i>plcN</i>	<i>rhlAB</i>	<i>toxA</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>
L-597	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
L-993	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-994	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-995	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L-996	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-997	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-998	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
J3295	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
PAO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Iz rezultatov vidimo, da sta bila zapisa za elastazo LasB (*lasB*), domnevno nevraminidazo 2 (*nan2*) in ramlolipide (*rhlAB*) prisotna pri vseh sevih izoliranih iz pomivalnih strojev, kot tudi pri obeh kontrolnih sevih. Zapisi za alginat (*algD*), eksoencim S (*exoS*) in nehemolitično fosfolipido C (*plcN*) so se pojavili pri 8 od 9 sevov, prevalenca teh treh dejavnikov je znašala 89 %. Domnevni nevraminidazni gen 1 (*nan1*) se je pojavil pri 6 od 9 sevov, prevalenca je znašala 67 %, zapis za eksotoksin A (*toxA*) se je pojavil pri 7 od 9 sevov, prevalenca je znašala 78 %.

Pri sevih L-993, L-994, L-996, L-997, L-998 in PAO1 so bili prisotni vsi testirani zapisi za virulentne dejavnike.

Mobilna elementa, ki smo ju preverjali, nista bila prisotna pri nobenem sevu *P. aeruginosa*.

4.10 FREKVENCA MUTACIJ SEVOV *P. aeruginosa* Z RIFAMPICINOM

Pri sevih *P. aeruginosa* smo določali frekvence mutacij na podlagi pojava odpornosti proti antibiotiku Rif, saj nas je zanimalo kakšne so razlike v mutabilnosti posameznih sevov. Že dokaj nizka koncentracija Rif inducira SOS-odziv, kar privede do indukcije »error-prone« DNA polimeraz in posledično se poveča število mutacij. Rezultati, ki smo jih pridobili s protokolom opisanem v poglavju 3.2.15 Preverjanje frekvence mutacij bakterij *P. aeruginosa* z antibiotikom rifampicinom, so predstavljeni v Preglednici 12. Poskuse smo izvedli v treh ponovitvah in za predstavitev variabilnosti rezultatov uporabili standardni odklon.

Preglednica 12: Frekvence mutacij z Rif pri sevih *P. aeruginosa*

Sev	Frekvenca mutacij z Rif
L-597	$(2,8 \pm 0,9) \times 10^{-8}$
L-993	$(6,3 \pm 0,7) \times 10^{-9}$
L-994	$(4,6 \pm 0,9) \times 10^{-9}$
L-995	$(3,2 \pm 0,7) \times 10^{-8}$
L-996	$(6,7 \pm 0,7) \times 10^{-9}$
L-997	$(5,4 \pm 3,8) \times 10^{-9}$
L-998	$(4,8 \pm 2,4) \times 10^{-9}$
J3295	$(4,8 \pm 0,7) \times 10^{-6}$
PAO1	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-8}$

Za lažjo primerjavo rezultatov, smo frekvence mutacij z Rif preverili tudi na sevu divjega tipa PAO1 in hipermutatorskem sevu J3295.

Iz rezultatov je razvidno, da je bila frekvenca mutacij seva J3295 od približno 100 do 1000 × višja kot pri sevih *P. aeruginosa* izoliranih iz pomivalnih strojev in seva PAO1. Frekvence mutacij so variirale med 10^{-8} in 10^{-9} in prav tako niso bile višje od frekvence mutacij pri sevu divjega tipa PAO1. Najvišji frekvenci (približno 10 × višji) smo opazili pri sevih L-597 in L-995.

4.11 SPOSOBNOST TVORBE BIOFILMA SEVOV *P. aeruginosa*

Sposobnost tvorbe biofilma pri sevih *P. aeruginosa* smo določali z dvema metodama, s pomočjo polistirenske mikrotitrirske ploščice in merjenjem absorbance pri 595 nm smo biofilm kvantificirali, metodo z uporabo epruvet pa smo uporabili kot kontrolo za tvorbo biofilma v mikrotitrski ploščici. Rezultati izmerjene absorbance pri 595 nm so podani v Preglednici 13.

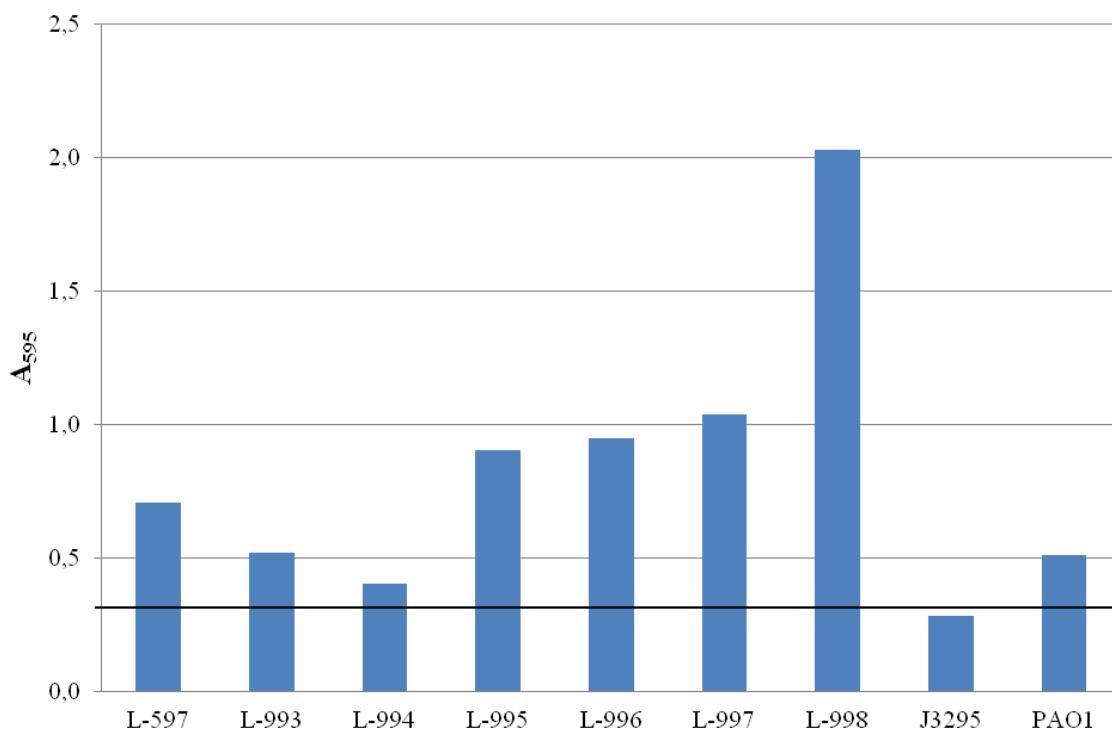
Z izračunanim zgornjim intervalom zaupanja iz aritmetične sredine, pri stopnji tveganja 1 % smo določili spodnjo mejo sposobnosti tvorbe biofilma z 1-odstotnim tveganjem, ki znaša 0,31.

Z 1-odstotnim tveganjem trdimo, da je pri optični gostoti (OD_{595}) 0,31 ali več, prišlo do tvorbe biofilma glede na celotno populacijo *P. aeruginosa*. Glede na naše rezultate lahko trdimo, da so vsi sevi izolirani iz pomivalnih strojev tvorili biofilm. Edini, ki biofilma ni

tvoril je bil hipermutatorski sev J3295. Med posameznimi sevi so bile velike razlike v količini biofilma. Največ biofilma je tvoril sev L-998, približno 2 × več kot sevi L-995, L-996 in L-997. Najmanj biofilma sta tvorila seva L-993 in L-994. Vsi sevi izolirani iz pomivalnih strojev, razen L-994, so tvorili večjo količino biofilma kot divji tip PAO1.

Preglednica 13: Rezultati merjenj absorbance pri 595 nm in povprečje meritev pri sevih *P. aeruginosa*

	L-597	L-993	L-994	L-995	L-996	L-997	L-998	J3295	PAO1
OD ₅₉₅ 1. ponovitev	0,803	0,575	0,565	0,956	0,783	1,297	2,094	0,191	0,717
OD ₅₉₅ 2. ponovitev	0,675	0,541	0,348	1,019	0,887	0,944	1,890	0,578	0,594
OD ₅₉₅ 3. ponovitev	0,778	0,574	0,434	0,874	1,317	1,015	2,240	0,219	0,362
povprečje OD₅₉₅	0,71	0,52	0,40	0,90	0,95	1,04	2,03	0,28	0,51



Slika 7: Sposobnost tvorbe biofilma pri sevih *P. aeruginosa*. Prikazane so povprečne vrednosti A₅₉₅ pri posameznem sevu *P. aeruginosa*. Črta na grafu označuje spodnjo mejo, pri kateri lahko trdimo, da je prišlo do tvorbe biofilma.

Tvorbo biofilma v epruvetah smo prav tako zasledili pri vseh sevih, razen pri hipermutatorskem sevu J3295. Rezultati obeh metod se tako ujemajo.



Slika 8: Prikaz negativega in 2 pozitivnih rezultatov tvorbe biofilma v epruvetah. a – negativni sev J3295, b – pozitivni sev L-998 z največjo tvorbo biofilma, c – pozitivni sev L-994 z najmanjšo tvorbo biofilma med testiranimi sevi.

4.12 PRODUKCIJA PIGMENTA PIOCIANINA

Pri sevih *P. aeruginosa* smo kvantificirali produkcijo piocianina z merjenjem absorbance pri 520 nm v kisli raztopini, ter nato dobljene rezultate pomnožili s faktorjem značilnim za kisle raztopine – 17,072. S tem smo izrazili koncentracijo piocianina v µg/ml. Povpreče treh meritev absorbance pri 520 nm in končna koncentracija sta podani v Preglednici 14.

Preglednica 14: Producija piocianina pri sevih *P. aeruginosa*

	L-597	L-993	L-994	L-995	L-996	L-997	L-998	J3295	PAO1
povprečje A_{520}	0,065	0,030	0,021	0,072	0,023	0,026	0,030	0,007	0,069
koncentracija piocianina (µg/ml)	1,118	0,511	0,360	1,221	0,401	0,435	0,507	0,125	1,178

Iz rezultatov vidimo, da so bile podobno kot pri tvorbi biofilma, tudi pri produkciji piocianina velike razlike v količini med posameznimi sevi *P. aeruginosa*. Koncentracija piocianina je variirala med 0,360 in 1,221 µg/ml. Vsi sevi izolirani iz pomivalnih strojev so proizvajali večjo količino piocianina kot hipermutatorski sev J3295 in manj kot divji tip PAO1, z izjemo seva L-995, ki je proizvajal največ piocianina izmed vseh testiranih sevov.

5 RAZPRAVA

Analiza bakterijskih sevov iz ekstremnih okolij pridobiva na pomenu, saj se je odkrilo, da se tudi v ekstremnih okoljih lahko nahajajo za zdravje človeka potencialno patogeni mikroorganizmi. Tako smo v tem delu preučevali 6 sevov *E. coli* in 7 sevov *P. aeruginosa*, določenimi z metodo ERIC-PCR.

Komenzalni sevi *E. coli* so glede na filogenetske skupine običajno uvrščeni v skupino A ali B1, sevi, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe v skupino B2, enteropatogeni sevi pa v skupino D. Pri ljudeh prevladujejo predstavniki filogenetske skupine A in B2. V našem primeru smo vseh 6 sevov *E. coli* uvrstili v filogenetsko skupino A, kar bi lahko pomenilo, da so preučevani sevi *E. coli*, izolirani iz pomivalnih strojev, najverjetneje nepatogeni.

Prisotnost plazmidov je bila potrjena pri 5 sevih (83 %) *E. coli*. Zapis za replikacijsko regijo RepFIA so imeli 3 sevi (50 %), zapis za RepFIIA 1 sev (17 %). Drugi replikacijski regiji (RepFIC in RepFIB) in zapis za IncP niso bili prisotni pri nobenem od preučevanih sevov *E. coli*. Plazmidi, ki imajo zapise za virulentne dejavnike, imajo tudi zapise za replikacijske regije RepFIIA, RepFIB ali RepFIC (Johnson in Nolan, 2009). Rezultati nakazujejo, da sevi *E. coli* izolirani iz pomivalnega stroja nimajo visokega patogenega potenciala, izjema bi lahko bil sev, pri katerem je prisoten zapis za RepFIIA.

Zapisi za konjugacijo konjugativnih plazmidov so znotraj regije *tra*. Poleg lastnega prenosa lahko konjugativni plazmidi posredujejo prenos tudi drugih plazmidov v druge bakterijske celice. Takšni plazmidi so pomemben dejavnik razširjanja odpornosti proti antibiotikom in virulentnih dejavnikov bakterij (Starčič Erjavec in sod., 2003). Zapisa za TraJ in TraT smo dokazali le pri 1 sevu (17 %) *E. coli*, iz katerega smo sicer izolirali 2 manjša plazmida. Pri sevu *E. coli* N6 (17 %) nismo dokazali nobenega zapisa, ki bi kazal na prisotnost plazmida in nismo izolirali nobenega plazmida. Prav tako sevi niso bili odporni proti kloramfenikolu in tetraciklinu, zato sklepamo, da ti sevi ne igrajo pomembne vloge pri razširjanju odpornosti proti testiranim antibiotikom.

Frekvence konjugativnega prenosa pri sevih *E. coli* so se medsebojno zelo razlikovale ne glede na uporabljen donorski sev. Variirale so med 10^{-2} in 10^{-7} , vendar so bile v vseh primerih manjše od frekvence prenosa plazmida v laboratorijska seva. Glede na manjšo sposobnost sprejema tuje DNA, bi preučevani sevi lahko bili manj dovezni za širjenje odpornosti proti antibiotikom in virulentnih dejavnikov. Pri sevu N6 smo opazili najvišje frekvence konjugativnega prenosa in, ker ni imel plazmidov sklepamo, da je frekvenca konjugativnega prenosa poleg ostalih dejavnikov odvisna tudi od prisotnosti plazmidov v recipientskem sevu. Do konjugativnega prenosa plazmidov v recipientske celice *P. aeruginosa* ni prišlo, kljub temu pa so bili vsi sevi *P. aeruginosa* odporni proti večim antibiotikom, in sicer proti ampicilinu, kloramfenikolu, tetraciklinu, kanamicinu, streptomycinu, nekateri tudi proti gentamicinu. Zaradi prisotnosti odpornosti proti antibiotikom, lahko sklepamo, da so ti sevi potencialno patogeni, ne glede na to, da niso bili sposobni sprejemanja tuje DNA.

Sevi *E. coli* s S-LPS imajo običajno osnovno O-antagensko verigo dolgo od 10 do 18 enot O, prav tako je bilo tudi pri sevih *E. coli* izoliranih iz pomivalnih strojev. Dva seva (33 %)

sta vsebovala 12, 2 seva (33 %) 16 in 2 seva (33 %) okoli 18 enot O. LPS je nujno potreben za preživetje po Gramu negativnih bakterij, je toplotno stabilen kompleks, ki predstavlja prepustno pregrado številnim molekulam kot so detergenti. V pomivalnem stroju so prisotne tako visoke temperature kot tudi različni detergenti, zato smo pri naših sevih pričakovali kompleksen LPS, ki bi omogočil lažje preživetje v skrajnih razmerah in posledično vplival tudi na večjo patogenezo sevov *E. coli*. Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je bil pri vseh sevih značilen S-LPS z večjim številom verig O. Večje število verig O omogoča boljšo adherenco bakterij na gostiteljevo celico. Prav tako je dostopnost do površine za MAC (ang. »Membrane attack complex«) in druge komponente imunskega sistema otežena zaradi večje kompleksnosti LPS. Kljub temu, da naj bi dolžina O-antgenske verige LPS vplivala tudi na frekvence konjugativnega prenosa genetskega materiala med bakterijskimi celicami, tovrstne povezave pri sevih *E. coli*, izoliranih iz pomivalnih strojev, nismo zasledili.

Pri nobenem sevu *E. coli* nismo potrdili lizogenih fagov, kar bi bila lahko posledica občutljivosti fagov za visoke temperature in alkalno okolje. Prav tako ni bil noben sev občutljiv za bakteriofag P1 kar nakazuje, da sevi *E. coli* v ekstremnih okoljih, kot so pomivalni stroji, niso dovetni za prenos odpornostnih genov s transdukcijo, saj so profagni virioni občutljivi za ekstremne razmere v pomivalnih strojih in tako nimajo visokega patogenega potenciala.

Bakterije si s produkcijo kolicinov zagotovijo selektivno prednost pred drugimi bakterijami. V ekstremnem okolju kot je pomivalni stroj to ni potrebno, saj že samo okolje predstavlja dovolj velik selektivni pritisk. Noben preučevani sev *E. coli* iz pomivalnih strojev, ni bil sposoben sinteze kolicinov, zato sklepamo, da tudi izolirani plazmidi niso kolicinogeni, kar je v pričakovanju z našimi domnevami, saj bi produkcija kolicinov v takšnem okolju, kjer to ni potrebno, predstavljal nepotrebitno energetsko breme za bakterije.

Najpogosteje prisotni zapisi za virulentne dejavnike pri sevih *P. aeruginosa* so bili: *lasB*, odgovoren za elastolitično aktivnost, *nan2*, domnevna nevraminidaza, ki lahko spremeni epiteljsko površino, *plcN* odgovoren za hidrolizo fosfatov in *rhlAB*, ki uravnava izražanje nekaterih drugih virulentnih dejavnikov. Te 4 zapise za virulentne dejavnike smo našli pri vseh preučevanih sevih *P. aeruginosa* (100 %) izoliranih iz pomivalnih strojev. Močno vplivajo na nastanek poškodb pljučnega tkiva. Zaradi spremembe strukture se lahko na epiteljsko površino veže še več bakterij, zato so ti dejavniki zelo pomembni pri razvoju okužbe. Zapise za *algD*, odgovoren za sintezo alginata, *exoS* s citotoksično aktivnostjo in *toxA*, ki inhibira biosintezo proteinov smo našli pri 6 sevih (86 %). Virulentni dejavnik z najmanjšo pojavnostjo je bil *nan1*, in sicer pri 5 sevih (71 %). Pri 5 sevih (71 %) *P. aeruginosa* smo potrdili prisotnost zapisov za vse preiskovane virulentne dejavnike. Prav tako, se je zapis za vse virulentne dejavnike pojavil pri kontrolnem sevu PAO1, zato lahko sklepamo, da so sevi *P. aeruginosa* izolirani iz pomivalnih strojev sposobni okužbe pri ljudeh v enaki meri kot sev PAO1, ki je do sedaj že dobro raziskan. Zapisa za mobilna elementa, *int1* in *int2*, nismo uspeli potrditi pri nobenem sevu *P. aeruginosa*. Glede na dobljene rezultate sklepamo, da imajo sevi *P. aeruginosa* visok patogeni potencial, saj je bilo pri vseh sevih prisotnih več zapisov za virulentne dejavnike.

Pri vseh *P. aeruginosa* iz pomivalnih strojev smo opredelili tudi frekvence mutacij, inducirane z antibiotikom Rif. Gre za znan induktor odziva SOS, ki vodi v povišano frekvenco mutacij. Pričakovali smo, da bodo imeli izolati iz pomivalnih strojev višjo frekvenco mutacij od divjega tipa PAO1, saj izvirajo iz okolja, ki zagotavlja določen selektivni pritisk in od njih zahteva, da so sposobni prilagoditve. Pri vseh sevih je bila frekvence mutacij nižja kot pri divjem tipu PAO1 in je variirala med 10^{-8} in 10^{-9} , kar jih uvršča med normo-mutatorje. Predpostavljamo, da ekstremno okolje, iz katerega so bili sevi izolirani, tako ne vpliva na povečano sposobnost mutacij.

Sposobnost tvorbe biofilma je pomembna preživetvena strategija bakterij, ki jim omogoča boljše preživetje, kar je v okolju kot je pomivalni stroj še posebej pomembno. Vsi sevi *P. aeruginosa* so bili sposobni tvoriti biofilm. Kljub temu, da smo ugotovili velike razlike v količini biofilma med posameznimi sevi, so vsi razen enega tvorili večje količine biofilma kot divji tip PAO1. Iz rezultatov lahko sklepamo, da so vsi sevi *P. aeruginosa* izolirani iz pomivalnega stroja sposobni tvoriti biofilm, na različnih površinah, vključno z ranami ter tudi v pljučih bolnikov s cistično fibrozo in tako možen vir okužbe. Zaradi povišane tvorbe biofilma menimo, da imajo preučevani sevi *P. aeruginosa* visok patogeni potencial.

Piocianin je pomemben virulentni dejavnik pri okužbi s *P. aeruginosa*, ki lahko na več načinov vpliva na gostiteljev imunski sistem, privede do nastanka kronične okužbe in poškodb pljučnega tkiva. Prav tako deluje tudi kot signalna molekula za zaznavo kvorum. Ugotovili smo, da sevi *P. aeruginosa* izolirani iz pomivalnega stroja proizvajajo različne količine piocianina, razlike so tudi do $4 \times$. Pri vseh je bila količina manjša od količine piocianina, ki ga je proizvedel divji tip PAO1, z izjemo enega seva.

Da preučevani sevi *E. coli* nimajo visokega patogenega potenciala nakazujejo naslednji rezultati: vse seve *E. coli* smo uvrstili v filogenetsko skupino A, le 1 izmed sevov je imel zapis za replikacijsko regijo, ki je povezana z virulentnimi dejavniki, in 1 zapis za konjugacijo. Noben sev *E. coli* ni bil odporen proti kloramfenikolu ali tetraciklinu in tako nima pomembne vloge pri razširjanju odpornosti proti testiranim antibiotikom. Vsi sevi *E. coli* so imeli manjšo sposobnost sprejema tuje DNA, kot laboratorijska seva. Noben sev *E. coli* ni imel lizogenih fagov in ni bil občutljiv za bakteriofag P1, prav tako noben sev ni proizvajal kolicinov. Da pa so preučevani sevi *E. coli* vendarle imeli določen patogeni potencial, kažejo rezultati o dolžini O-antigenske verige, saj je bil pri vseh sevih značilen S-LPS z večjim številom verig O, ki med drugim omogoča tudi boljšo adherenco in preprečuje dostop komponentam imunskega sistema do bakterije. Na drugi strani so preučevani sevi *P. aeruginosa* izkazovali bolj izrazit patogeni potencial, saj smo dokazali zapise za večino preiskovanih virulentnih dejavnikov in, da so odporni proti večim antibiotikom. Prav tako, smo pri vseh sevih *P. aeruginosa* dokazali relativno visoko sposobnost spontanih mutacij, tvorbe pigmenta piocianina in povišane tvorbe biofilma. Naši rezultati nakazujejo, da so vsi sevi izolirani iz pomivalnih strojev sposobni povzročiti okužbo pri ljudeh, vendar pa imajo sevi *P. aeruginosa* večji patogeni potencial od sevov *E. coli*.

6 SKLEPI

- Vse seve *E. coli* (100 %) smo uvrstili v filogenetsko skupino A in pri 5 sevih (83 %) potrdili prisotnost plazmidov. Zapis za RepFIA plazmidov so imeli 3 sevi *E. coli* (50 %), zapise za RepFIIA, *traJ* in *traT* je imel 1 sev *E. coli* (17 %). Frekvence konjugativnega prenosa so variirale med 10^{-2} in 10^{-7} . Osnovna O-antigenska veriga je bila dolga od 10 do 18 enot O. Lizogenih fagov nismo potrdili pri nobenem sevu *E. coli*, prav tako noben sev *E. coli* ni bil občutljiv za bakteriofag P1. Noben sev *E. coli* ni bil sposoben sinteze kolicinov.
- Pri sevih *P. aeruginosa* so bili najpogosteji (100 %) zapisi za virulentne dejavnike *lasB* (elastolitična aktivnost), *nan2* (domnevna nevraminidaza 2), *plcN* (nehemolitična fosfolipaza C) in *rhlAB* (ramnolipidi). Zapise *algD* (alginat), *exoS* (eksoencim S) in *toxA* (eksotoksin A) je imelo 6 sevov *P. aeruginosa* (86 %). Zapis za virulentni dejavnik *nan1* (nevraminidaza 1) je imelo 5 sevov *P. aeruginosa* (71 %). Frekvanca spontanih mutacij sevov *P. aeruginosa* je variirala med 10^{-8} in 10^{-9} , kar jih uvršča med normo-mutatorje. Vsi sevi *P. aeruginosa* so tvorili biofilm, razlike v količini biofilma med posameznimi sevi so bile velike. Sklepamo, da so vsi sevi *P. aeruginosa*, izolirani iz pomivalnega stroja, sposobni tvoriti biofilm tudi na drugih površinah, tudi v pljučih bolnikov s cistično fibrozo. Sevi *P. aeruginosa* so proizvajali različne količine piocianina, razlike so bile tudi do $4 \times$. Glede na razlike v frekvencah mutacij, tvorbi biofilma in koncentracijah produciranega biofilma, se sevi *P. aeruginosa* razlikujejo v stopnji patogenega potenciala.
- Glede na rezultate analiz tega magistrskega dela lahko potrdimo hipotezo, da v pomivalnih strojih nastajajo biofilmi, iz katerih izoliramo za človeka potencialno patogene seve bakterijskih vrst *E. coli* in *P. aeruginosa*. Drugo delovno hipotezo lahko potrdimo le delno, saj so imeli le preučevani sevi *E. coli* genetske mobilne elemente, ki omogočajo horizontalno širjenje determinant virulence in odpornosti proti antibiotikom, medtem ko pri sevih *P. aeruginosa* mobilnih elementov nismo dokazali.

7 POVZETEK

Analiza bakterijskih sevov iz ekstremnih okolij pridobiva na pomenu, saj novejše raziskave razkrivajo, da se tudi v ekstremnih okoljih lahko nahajajo za zdravje človeka potencialno patogeni mikroorganizmi.

Glede na rezultate raziskovalnega dela in predhodno pridobljenega znanja lahko povzamemo, da so sevi *E. coli* in *P. aeruginosa*, ki so znani po svoji ubikvitarnosti, sposobni preživeti tudi v tako neugodnem okolju, kot je pomivalni stroj, v katerem prihaja do dnevnih nihanj temperature, vrednosti pH, vsebnosti vlage in hranil. Da bi ugotovili, ali pomivalni stroj predstavlja možen rezervoar potencialno patogenih sevov *E. coli* in *P. aeruginosa*, smo preučili 6 izolatov vrste *E. coli* in 7 izolatov vrste *P. aeruginosa* pridobljenih iz pomivalnih strojev po Sloveniji. Med seboj smo jih razlikovali s pomočjo metode ERIC-PCR.

Seve *E. coli* smo uvrstili v filogenetske skupine in z metodo PCR določili prisotnost replikacijskih regij plazmidov RepFIA, RepFIC, RepFIIA, RepFIB, IncP, dveh zapisov iz regije *tra*, *traJ* in *traT*, ki sta značilna za konjugativne F-plazmidu podobne plazmide in dveh zapisov za toksina *stx1* in *stx2*. Plazmide smo prav tako izolirali z dvema metodama. Opredelili smo dolžino LPS, ocenili frekvenco konjugativnega prenosa, preverili prisotnost lizogenih fagov, kolicinov in občutljivost za bakteriofag P1. Rezultati kažejo, da se je 6 sevov *E. coli* (100 %) uvrstilo v filogenetsko skupino A. Zapis za RepFIA smo dokazali pri 3 sevih (50 %), zapise RepFIIA, TraT in TraJ pri 1 sevu (17 %). Pri 5 sevih (83 %) smo izolirali plazmide. Zapisa za Stx1 in Stx2 nismo dokazali pri nobenem sevu. Vsi sevi *E. coli* so imeli O-antgensko verigo srednjih dolžin, dolgo od 10–18 enot O. Frekvence konjugativnega prenosa so variirale med 10^{-2} in 10^{-7} ter so bile manjše kot pri kontrolnem sevu. Pri nobenem sevu (0 %) nismo dokazali kolicinov, lizogenih fagov ali občutljivosti za bakteriofag P1.

Z metodo PCR smo pri sevih *P. aeruginosa* določili prisotnost genetskih zapisov za virulentne dejavnike. Preverjali smo prisotnost zapisov *algD*, *exoS*, *lasB*, *nan1*, *nan2*, *plcN*, *rhlAB* in *toxA* in zapisov za mobilna elementa *int1* in *int2*. Prav tako smo pri sevih *P. aeruginosa* določili frekvenco spontanih mutacij, sposobnost tvorbe biofilma, frekvenco konjugativnega prenosa in produkcijo piocianina. Zapise *lasB*, *nan2*, *plcN* in *rhlAB* smo dokazali pri 7 sevih (100 %), zapise *algD*, *exoS* in *toxA* pri 6 sevih (86 %), zapis *nan1* pri 5 sevih (71 %). Zapisa za mobilna elementa nismo dokazali pri nobenem sevu. Vse seve *P. aeruginosa* smo uvrstili med normo-mutatorje, saj je pri vseh frekvanca spontanih mutacij variirala med 10^{-8} in 10^{-9} . Vsi sevi so bili sposobni tvorbe biofilma in produkcije piocianina, njihove količine pa so se medseboj močno razlikovale. Pri nobenem sevu ni prišlo do konjugativnega prenosa.

Sposobnost bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa* za povzročitev bolezni je odvisna od sposobnosti privzema tuje DNA in genskih zapisov za različne virulentne dejavnike, ki jim omogočajo vdor, kolonizacijo, preživetje in izločanje toksinov. Poleg tega, zaradi sposobnosti tvorbe biofilma predstavljajo morebiten vir okužbe, še posebej pri imunsко oslabljenih ljudeh. Predvsem velja opozoriti na prisotnost virulentnih dejavnikov, ki so značilni za izolate pri poteku okužb s težjim izidom, kot je cistična fibroza.

8 VIRI

- Ackerley D.F., Lamont I.L. 2004. Characterization and genetic manipulation of peptide synthetases in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in order to generate novel pyoverdines. Cell Press, 11, 7: 971-980.
- Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Molecular Microbiology, 59, 4: 1114-1128.
- Aminov R. I. 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. Frontiers in Microbiology, 2: 158, doi: 10.3389/fmicb.2011.00158: 19 str.
- Anthony K.G., Sherburne C., Sherburne R., Frost L. S. 1994. The role of the pilus recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. Molecular Microbiology, 13, 6: 939-953.
- Boyd E.F., Brüssow H. 2002. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. Trends in Microbiology, 10, 11: 521-529.
- Banack T., Kim P.D., Firshein W. 2000. TrfA-dependent inner membrane-associated plasmid RK2 DNA synthesis and association of TrfA with membranes of different Gram-negative hosts. Journal of Bacteriology, 182, 16: 4380-4383.
- Barsoumian A.E., Mende K., Sanchez C.J., Beckius M.L., Wenke J.C., Murray C.K., Akers K.S. 2015. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. BMC Infectious Diseases, 15: 223, doi: 10.1186/s12879-015-0972-2: 7 str.
- Brantl S. 2004. Plasmid replication control by antisense RNA. V: Plasmid biology. Phillips G., Funnell B. (eds.). Washington DC, ASM Press: 47-62.
- Burns J.L., Gibson R.L., McNamara S., Yim D., Emerso J., Rosenfeld M., Hiatt P., McCoy K., Castile R., Smith A.L., Ramsey B.W. 2001. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. Journal of Infectious Disease, 183, 3: 444-452.
- Cacalano G., Kays M., Saiman L., Prince A. 1992. Production of the *Pseudomonas aeruginosa* neuraminidase is increased under hyperosmolar conditions and is regulated by genes involved in alginate expression. Journal of Clinical Investigation, 89, 6: 1866-1874.
- Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennouf S., Dillmann M.L., Brüssow H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. Current Opinion in Microbiology, 6, 4: 417-424.

- Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V, Hopkins K.L., Threlfall E.J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 3: 219-228.
- Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 6: 2227-2238.
- Caroff M., Karibian D., Cavaillon J.M., Haeffner-Cavaillon N. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4, 9: 915-926.
- Caroff M., Karibian D. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338, 23: 2431-2447.
- Casadaban M.J. 1976. Transposition and fusion of lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage-lambda and bacteriophage-Mu. *Journal of Molecular Biology*, 104, 3: 541-555.
- Cascales E., Buchanan S.K., Duché D., Kleanthous C., Lloubés R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. 2007. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 1: 158-229.
- Chieda Y., Iiyama K., Lee J.M., Kusakabe T., Yasunaga-Aoki C., Shimizu S. 2011. Virulence of an exotoxin A-deficient strain of *Pseudomonas aeruginosa* toward the silkworm, *Bombyx mori*. *Microbial Pathogenesis*, 51, 6: 407-414.
- Chopra I., O'Neill A.J., Miller K. 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistant Updates*, 6, 3: 137-145.
- Chulain M.N., Morris D., Cormican M. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus – polymerase chain reaction for typing of uropathogenic *Escherichia coli* is not what it seems. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 12: 1805-1806.
- Ciofu O., Riis B., Pressler T., Poulsen H.E., Hoiby N. 2005. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 6: 2276-2282.
- Ciofu O., Mandsberg L.F., Bjarnsholt T., Wassermann T., Høiby N. 2010. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology*, 156, 4: 1108-1119.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558.

Clermont O., Olier M., Hoede C., Diancourt L., Brisse S., Keroudean M., Glodt J., Picard B., Oswald E., Denamur E. 2011a. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 3: 654-662.

Clermont O., Gordon D.M., Brisse S., Walk S.T., Denamur E. 2011b. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental Microbiology*, 13, 9: 2468-2477.

Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 1: 58-65.

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 5418: 1318-1322.

Cursino L., Šmarda J., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A. 2002. Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 3: 185-195.

Davies J., Dewar A., Bush A., Pitt T., Gruenert D., Geddes D.M., Alton E.W. 1999. Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis epithelium with anti-asialoGM1 antibody and neuraminidase inhibition. *Eurupean Respiratory Journal*, 13, 3: 565-570.

del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J., Espinosa M., Diaz-Orejas R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 2: 434-464.

Driscoll J.A., Brody S.L., Kollef M.H. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67, 3: 351-368.

Duchaud E., Rusniok C., Frangeul L., Buchrieser C., Givaudan A., Taourit S., Bocs S., Boursaux-Eude C., Chandler M., Charles J.L., Dassa E., Deroze R., Derzelle S., Freyssinet G., Gaudriault S., Médigue C., Lanois A., Powell K., Siguier P., Vincent R., Wingate V., Zouine M., Glaser P., Boemare N., Danchin A., Kunst F. 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 21, 11: 1307-1313.

Fernandez-Gonzalez E., de Paz H.D., Alperi A., Agúndez L., Faustmann M., Sangari F.J., Dehio C., Llosa M. 2011. Transfer of R388 derivatives by a pathogenesis-associated type IV secretion system into both bacteria and human cells. *Journal of Bacteriology*, 193, 22: 6257-6265.

Flemming H.C., Wingender J. 2002. Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. V: *Encyclopedia of environmental microbiology*. Vol. 3. Bitton G. (ed.). New York, Wiley: 1223-1231.

- Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J. 2007. The EPS matrix: the »house of biofilm cells«. *Journal of Bacteriology*, 189, 22: 7945-7947.
- Fothergill J.L., Panagea S., Hart C.A., Walshaw M.J., Pitt T.L., Winstanley C. 2007. Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiology*, 7: 45, doi: 10.1186/1471-2180-7-45: 10 str.
- Franco A.V., Liu D., Reeves P.R. 1998. The wzz (cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain lenght specificity. *Journal of Bacteriology*, 180, 10: 2670-2675.
- Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R. 2011. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews*, 111, 1: 28-67.
- Garcillán-Barcia M.P., Alvarado A., de la Cruz F. 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 5: 936-956.
- Ghorbel-Bellaaj O., Hayet B.K., Bayoudh A., Younes I., Hmidet N., Jellouli K., Nasri M. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: purification, characterization and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 3: 679-686.
- Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168, 8: 918-951.
- Gillings M., Holley M. 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 1: 17-21.
- Gillings M.R. 2014. Integrons: past, present and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78, 2: 257-277.
- Gordon D.M., Clermont O., Tolley H., Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 10, 10: 2484-2496.
- Hacker J., Carniel E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: a Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*, 2, 5: 376-381.
- Haeffner-Cavaillon N., Carreno M.P., Aussel L., Caroff M. 1998. Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological functions. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14, 4: 853-860.

- Hay I.D., Schmidt O., Filitcheva J., Rehm B.H. 2012. Identification of a periplasmic AlgK–AlgX–MucD multiprotein complex in *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis and regulation of alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1: 215-227.
- Hauser A.R., Jain M., Bar-Meir M., McColley S.A. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 1: 29-70.
- Hausner M., Wuertz S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in-situ* analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 8: 3710-3713.
- Hedges R.W., Datta N. 1971. $\beta\text{-}i^-$ R factors giving chloramphenicol resistance. *Nature*, 234, 5326: 220-221.
- Herman G.E., Modrich P. 1981. *Escherichia coli* K12 clones that overproduce dammethylase are hypermutable. *Journal of Bacteriology*, 145, 1: 644-646.
- Hogardt M., Heesemann J. 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 8: 557–562.
- Holst O., Molinaro A. 2009. Core oligosaccharide and lipid A components of lipopolysaccharides. V: *Microbial glycobiology: structures, relevance and applications*. Moran A., Brennan P., Holst O., von Itszstein M. (eds.). San Diego, Elsevier: 29-56.
- Ho Sui S.J., Lo R., Fernandes A.R., Caulfield M.D.G., Lerman J.A., Xie L., Bourne P.E., Baillie D.L., Brinkman S.L. 2012. Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 3: 246-251.
- Ilangovan A., Connery S., Waksman G. 2015. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends in Microbiology*, 23, 5: 301-310.
- James R., Penfold C.N., Moore G.R., Kleanthous C. 2002. Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie*, 84, 5-6: 381-389.
- Jaureguy F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur E., Picard B., Nassif X., Brisson S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9: 560, doi: 10.1186/1471-2164-9-560: 14 str.
- Johnson J.R., Stell A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 1: 261-272.

- Johnson T.J., Nolan L.K. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 4: 750-774.
- Kado C.I. 1998. Origin and evolution of plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71, 1: 117-126.
- Kaper J.B., Nataro J.P, Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, 2, 2: 123-140.
- Kenna D.T., Doherty C.J., Foweraker J., Macaskill L., Barcus V.A., Govan J.R.W. 2007. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology*, 153, 6: 1852-1859.
- Konig B., Vasil M.L., Konig W. 1997. Role of haemolytic and nonhaemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes. *Journal of Medical Microbiology*, 46, 6: 471-478.
- Kung V.L., Ozer E.A., Hauser A.R. 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 4: 621-641.
- Lanotte P., Watt S., Mereghetti L., Dartiguelongue N., Rastegar-Lari A., Goudeau A. 2004. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patient compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 1: 73-81.
- Lau G.W., Hassett D.J., Ran H., Kong F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10, 12: 599-606.
- Lawley T.D., Klimke W.A., Gubbins M.J., Frost L.S. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiology Letters*, 224, 1: 1-15.
- Lerouge I., Vanderleyden J. 2001. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 1: 17-47.
- Lescat M., Clermont O., Woerther P.L., Glodt J., Dion S., Skurnik D., Djossou F., Dupont C., Perroz G., Picard B., Catzeflis F., Andremont A., Denamur E. 2012. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with hostdependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 1: 49-57.
- Luo C., Walk S.T., Gordon D.M., Feldgarden M., Tiedje J.M., Konstantinidis K.T. 2011. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17: 7200-7205.

- Lutz L., Leão R.S., Ferreira A.G., Pereira D.C., Raupp C., Pitt T., Marques E.A., Barth A.L. 2013. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients from two brazilian cities. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 3: 927-930.
- Maciá M.D., Borrell N., Perez J.L., Oliver A. 2004. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the E test and disk diffusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 7: 2665-2672.
- Maciá M.D., Blanquer D., Togores B., Sauleda J., Perez J.L., Oliver A. 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 8: 3382-3386.
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 992 str.
- Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152, 1-2: 2-12.
- Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M.J., Phillips G., Thomashow L.S. 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 183, 21: 6454-6465.
- Meacham K.J., Zhang L., Foxman B., Bauer R.J., Marrs C.F. 2003. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 11: 5224-5226.
- Mena A., Smith E.E., Burns J.L., Speert D.P., Moskowitz S.M., Perez J.L., Oliver A. 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *Journal of Bacteriology*, 190, 24: 7910-7917.
- Miller J.H. 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annual Review of Microbiology*, 50: 625- 643.
- Moissenet D., Salauze B., Clermont O., Bingen E., Arlet G., Denamur E., Mérens A., Mitánchez D., Vu-Thien H. 2010. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 7: 2459-2463.
- Nair C.G., Chao C., Ryall B., Williams H.D. 2012. Sub-lethal concentrations of antibiotics increase mutation frequency in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 2: 149-154.

Nataro J.P., Bopp C.A., Fields P.I., Kaper J.B., Strockbine N.A. 2011. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. V: Manual of clinical microbiology. Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (eds.). 10th ed. Washington DC, ASM Press: 603-626.

Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blazquez J. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science, 288, 5469: 1251-1254.

Oliver A., Baquero F., Blazquez J. 2002. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. Molecular Microbiology, 43, 6: 1641-1650.

Olson J.C., McGuffie E.M., Frank D.W. 1997. Effects of differential expression of the 49-kilodalton exoenzyme S by *Pseudomonas aeruginosa* on cultured eukaryotic cells. Infection and Immunity, 65, 1: 248-256.

Paterson D.L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. American Journal of Infection Control, 34, 5 Suppl. 1: S20-S28.

Paton J.C., Paton A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Microbiology Reviews, 11, 3: 450-479.

Pereira S.G., Cardoso O. 2014. Mobile genetic elements of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hydrotherapy facility and respiratory infections. Clinical Microbiology and Infection, 20, 3: O203-O206.

Picard B., Sevali Garcia J., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extra-intestinal infection. Infection and Immunity, 67, 2: 546-553.

Pier G.B. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. International Journal of Medical Microbiology, 297, 5: 277-295.

Popat R., Crusz S.A., Diggle S.P. 2008. The social behaviours of bacterial pathogens. British Medical Bulletin, 87: 63-75.

Raetz C.R., Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry, 71: 635-700.

Rehm B.H. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature Reviews Microbiology, 8: 578-592.

Ruiz-Martínez L., López-Jiménez L., Fusté E., Vinuesa T., Martínez J.P., Vinas M. 2011. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents, 38, 5: 398-402.

Russel P.J. 2006. iGenetics. A Mendelian approach. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 850 str.

Shintani M., Sanchez Z.K., Kimbara K. 2015. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 6: 242, doi: 10.3389/fmicb.2015.00242: 16 str.

Siegel R.E. 2008. Emerging Gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities and dire consequences. *Respiratory Care*, 53, 4: 471-479.

Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A.C., Levy S.B., Jackson R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 4: 652-680.

Silipo A., Molinaro A. 2010. The diversity of the core oligosaccharide in lipopolysaccharides. *Subcellular Biochemistry*, 53: 69-99.

Smillie C., Garcillán-Barcia M.P., Francia M.V., Rocha E.P., de la Cruz F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 3: 434-452.

Smith E.E., Buckley D.G., Wu Z., Saenphimmachak C., Hoffman L.R., D'Argenio D.A., Miller S.I., Ramsey B.W., Speert D.P., Moskowitz S.M., Burns J.L., Kaul R., Olson M.V. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 22: 8487-8492.

Snyder L., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria. 2nd ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology Press: 566 str.

Sobecky P.A., Mincer T.J., Chang M.C., Helinski D.R. 1997. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3: 888-895.

Sota M., Top E. 2008. Horizontal gene transfer mediated by plasmids. V: Plasmids: Current research and future trends. Lipps G. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press, Horizon Scientific Press: 111-181.

Starčič Erjavec M., Gaastra W., van Putten J., Žgur-Bertok D. 2003. Identification of the origin of replications and partial characterization of plasmid pRK100. *Plasmid*, 50, 2: 102-112.

Strauss J., Burnham N.A., Camesano T.A. 2009. Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of *E. coli*. *Journal of Molecular Recognition*, 22, 5: 347-355.

- Sun Y., Karmakar M., Taylor P.R., Rietsch A., Pearlman E. 2012. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *Journal of Immunology*, 188, 4: 1884-1895.
- Takeuchi O., Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell Press*, 140, 6: 805-820.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 207-217.
- Tobes R., Ramos J.L. 2005. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environmental Microbiology*, 7, 2: 225-228.
- Ubben D., Schmitt R. 1986. Tn1721 derivatives for transposon mutagenesis, restriction mapping and nucleotide sequence analysis. *Gene*, 41, 2-3: 145-152.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, 24: 6823-6831.
- Waldor M.K., Friedman D.I. 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Currnet Opinion in Microbiology*, 8, 4: 459-465.
- Walk S.T., Alm E.W., Gordon D.M., Ram J.L., Toranzos G.A., Tiedje J.M., Whittam T.S. 2009. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 20: 6534-6544.
- Wilson L.A., Sharp P.M. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 6: 1156-1168.
- Winstanley C., Fothergill J.L. 2008. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiology Letters*, 290, 1: 1-9.
- Yang L., Barken K.B., Skindersoe M.E., Christensen A.B., Givskov M., Tolker-Nielsen T. 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 5: 1318-1328.
- Zalar P., Novak M., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, 115, 10: 997-1007.
- Zähringer U., Lindner B., Rietschel E.T. 1994. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 50: 211-276.

Zhu H., Bandara R., Conibear T.C.R., Thuruthiyil S.J., Rice S.A., Kjelleberg S., Givskov M., Willcox M.D.P. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* with *lasI* quorum-sensing deficiency during corneal infection. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 45, 6: 1897-1903.

Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. 2009. Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu Mikrobna genetika. Ljubljana, Študentska založba: 116 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok in somentorici prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za vodenje, nasvete in pomoč pri nastajanju magistrskega dela. Iskrena hvala tudi prof. dr. Katji Seme za hitro recenzijo.

Hvala tehnikoma Gregorju in Barbari, za vso pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu.

Hvala vsem mojim kolegom, Petri, Matevžu, Daši, Aleksandri, Patriciji in Katji. Zaradi vas je moj čas v laboratoriju minil izredno hitro in bil poln zabave.

Kate, najlepša hvala za vso pomoč in podporo. Hvala za vse vzpodbudne besede, ko se jih najbolj potrebovala.

Boki, hvala za vso pomoč in koristne nasvete, entuziastično razkazovanje laboratorijske opreme in dobljenih rezultatov, »nepotrebno komplikiranje« in nalezljiv smeh.

Najlepše se zahvaljujem družini, za vso pomoč, podporo in ljubezen skozi ves čas izdelave magistrskega dela.

In na koncu še iskrena hvala mojemu Srđanu, brez tebe mi ne bi uspelo!

PRILOGE

Priloga A: Preglednica vseh rezultatov analize sevov *E. coli*.

Sev	Filogenetska skupina	Produkti PCR								Frekvenca konjugacije	Prisotnost lizogenih fagov	Občutljivost za bakteriofag P1	Kolicinogenost
		RepFIA	RepFIC	RepFIIA	RepFIB	IncP	traJ	traT	stxI				
N1	A	+	+	-	-	-	-	-	-	(6,8 ± 1,0) × 10 ⁻⁴	(1,6 ± 0,6) × 10 ⁻⁵	-	-
N2	A	-	+	-	-	-	-	-	-	(7,5 ± 4,3) × 10 ⁻²	(5,4 ± 2,0) × 10 ⁻³	-	-
N3	A	-	-	-	-	-	-	-	-	(1,7 ± 0,5) × 10 ⁻⁵	(2,2 ± 1,8) × 10 ⁻³	-	-
N5	A	-	-	-	-	-	-	-	-	2	18	(5,4 ± 3,4) × 10 ⁻⁶	(1,5 ± 0,7) × 10 ⁻⁶
N6	A	-	-	-	-	-	-	-	-	1	12	(7,2 ± 4,5) × 10 ⁻²	(6,5 ± 3,2) × 10 ⁻²
N8	A	-	-	+	-	-	-	-	-	1	18	(1,1 ± 0,9) × 10 ⁻⁷	(2,2 ± 1,7) × 10 ⁻³

Priloga B: Preglednica vseh rezultatov analize sevov *P. aeruginosa*.

Sev	Produkti PCR										Frekvenca spontanih mutacij	Količina proizvedenega biofilma (OD ₅₉₅)	Koncentracija proizvedenega piocianinu (µg/ml)	Frekvenca konjugacije, donor <i>E. coli</i> MV10 pRK2
	algD	exoS	lasB	nan1	nan2	plicN	rhlAB	toxA	intI	int2				
L-597	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	(2,8 ± 0,9) × 10 ⁻⁸	0,71	1,118	/
L-993	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(6,3 ± 0,7) × 10 ⁻⁹	0,52	0,511	/
L-994	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(4,6 ± 0,9) × 10 ⁻⁹	0,40	0,360	/
L-995	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(3,2 ± 0,7) × 10 ⁻⁸	0,90	1,221	/
L-996	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(6,7 ± 0,7) × 10 ⁻⁹	0,95	0,401	/
L-997	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(5,4 ± 3,8) × 10 ⁻⁹	1,04	0,435	/
L-998	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(4,8 ± 2,4) × 10 ⁻⁹	2,03	0,507	/