

# Studier av biofilmdannelse hos *Pseudomonas species* ved forskjellige dyrkingsmetoder

**Eirin Storvoll**

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Trond Ellingsen, IBT

Biveileder(e): Inga Marie Aasen, SINTEF Materialer og kjemi,  
avdeling for bioteknologi  
Anne Tøndervik, SINTEF. Materialer og kjemi, avdeling  
for bioteknologi



## Forord

Masteroppgaven ble utført på SINTEF Materialer og kjemi, avdeling for bioteknologi i samarbeid med institutt for bioteknologi, NTNU. Professor II Trond E. Ellingsen har vært ansvarlig faglærer og forskerne Inga Marie Aasen og Anne Tøndervik har vært veiledere.

I den forbindelse vil jeg rette en stor takk til Inga og Anne for god veiledning både i forhold til praktisk arbeid og i skriveprosessen. En takk rettes også til Trond for hjelp i siste del av skriveprosessen. Jeg vil også rette en takk til ansatte på SINTEF og ansatte på institutt for bioteknologi, NTNU for hjelp til diverse praktiske og teoretiske spørsmål som har dukket opp underveis. Av disse vel jeg spesielt takke Kai Vernstad for analysering av prøver på massespektrometer, Kathinka Lystad for analysering av prøver på HPLC og Vu To for hjelp under reaktorforsøket. I tillegg vil jeg takke Astrid Bjørkøy på institutt for fysikk, NTNU for assistanse under konfokalmikroskoperingen.

Til sist vil jeg rette en stor takk til mine fantastiske medstudenter, for et godt sosialt miljø og for to flotte år på NTNU.

Trondheim, 16. mai 2011

Eirin Storvoll



## Sammendrag

SINTEF har en konsernsatsing innenfor systembiologi og dette omfatter blant annet forståelse og bekjempelse av biofilmer. Biofilm kan forårsake skader innenfor medisin, matindustri, havbruk og industri. På en annen side kan biofilmer utnyttes positivt innenfor for eksempel biologisk vannrensing.

Formålet med denne oppgaven har vært å etablere relevante teknikker for å studere biofilm. Dette har omfattet utprøving av ulike dyrkingmetoder, samt studier av effekt av dyrkingsbetingelser på biofilmdannelse. *Pseudomonas aeruginosa* benyttes som modellorganisme i SINTEFs prosjekt, og arbeidet i denne oppgaven har vært utført med den samme organismen.

Biofilm ble dyrket i brønnplater og i reaktorer. I tillegg ble det etablert metode for å kvantifisere mengde biofilm, samt etablert metoder for å studere biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi og for studier av genuttrykk ved RT-PCR analyser.

Videre ble det valgt å studere produksjon av sekundærmetabolitten pyocyanin i *P. aeruginosa*. Det ble undersøkt hvilke vekstbetingelser som gir lav og høy produksjon. Disse betingelsene ble videre benyttet til å undersøke uttrykk av gener involvert i pyocyaninsyntese, både planktonisk (frie celler) og i biofilm. I tillegg har oppgaven inkludert undersøkelse av mediets effekt på biofilmdannelse, produksjon av pyocyanin og uttrykk av utvalgte gener. Disse genene involverer gener som inngår i biofilmdannelse, pyocyaninproduksjon og quorum sensing.

Det ble valgt å benytte stammene *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i oppgaven. Stammene ble sammenlignet med hensyn på pyocyaninproduksjon, planktonisk vekst og biofilmdannelse.

Etablering av teknikker for å studere *P. aeruginosa* biofilm viste at det ble mulig å studere biofilm i brønnplater og reaktor, men at forbedring og optimalisering av metodene er nødvendig. Det ble vist at *P. aeruginosa* PAO1 hadde større veksthastighet enn *P. aeruginosa* PA14. *P. aeruginosa* PA14 produserte mest pyocyanin og hadde høyest uttrykk av gener involvert i syntese av pyocyanin (*phzM* og *phzS*), både planktonisk og i biofilm. Forskjeller i biofilmdannelse ble vist ved at slimdannelse ble sett hos *P. aeruginosa* PAO1, mens hos *P. aeruginosa* PA14 ble aggregatdannelse sett.

Både forsøk med planktoniske celler (frie celler) og biofilmforsøk viste at fosfatbegrensning inntreffer tidligere ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 enn ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14. Fosfatbegrensning ga økt pyocyaninproduksjon, men nedsatt biofilmdannelse. Det ble vist at pyocyaninproduksjon initieres i tidlig stasjonærfase for vekst av planktoniske celler og i tidlig biofilm utviklingsstrinn. RT-PCR-resultater har vist at genet *phzS*, som inngår i siste trinn i syntese av pyocyanin, varierer mer med dyrkingsbetingelser, enn det *phzM*, som inngår i tidligere trinn gjør.



# Innhold

<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bakgrunn og formål med oppgaven .....	1
1.2 Biofilm .....	1
1.2.1 Biofilmdannelse og morfologi .....	1
1.2.2 Regulering av biofilmdannelse .....	4
1.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm.....	5
1.2.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i> biofilm .....	7
1.3 Praktisk betydning av biofilm.....	8
1.3.1 Klinisk relevanse.....	8
1.3.2 Antibiotikaresistens.....	8
1.3.3 Industriell relevanse .....	8
1.4 Fenaziner; sekundær metabolitter produsert av bakterier.....	9
1.4.1 Gener involvert i syntese av pyocyanin i <i>P. aeruginosa</i> .....	9
1.5 Quorum sensing; celle-celle-kommunikasjonssystem hos bakterier.....	10
1.5.1 Gener involvert i quorum sensing i <i>P. aeruginosa</i> .....	11
1.6 Andre gener relevante for biofilmdannelse .....	12
1.7 Metoder.....	13
1.7.1 Dyrking av biofilm.....	13
1.7.2 Konfokalmikroskopi .....	14
1.8 Avgrensning og mål for oppgaven .....	16
<b>2. Materialer og metoder</b> .....	<b>17</b>
2.1 Bakteriestammer .....	17
2.1.1 Tillaging av bakterieampuller .....	17
2.1.2 Tillaging av forkulturer .....	18
2.2 Medier.....	18
2.3 Agarplater .....	20
2.4 Dyrking av flytende kultur i dypbrønnsplater .....	21
2.5 Dyrking av flytende kultur i rysteflasker.....	22
2.6 Dyrking av biofilm i brønnplater.....	23
2.7 Dyrking av biofilm i minireaktor.....	23
2.8 Analyser.....	26

2.8.1 Cellevekst.....	26
2.8.2 Massespektrometri .....	27
2.8.3 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) .....	27
2.8.4 CV-farging – for kvantifisering av biofilm.....	28
2.9 Real Time PCR.....	28
2.9.1 RNA-uttak.....	29
2.9.2 Isolering av RNA .....	29
2.9.3 DNA free protokoll .....	30
2.9.4 cDNA syntese .....	30
2.9.5 Primere for RT-PCR .....	30
2.10 Gfp-merking av <i>P. aeruginosa</i> ved hjelp av mini-Tn7 merkesystem .....	32
2.10.1 PCR.....	33
2.10.2 Gelelektroforese .....	33
2.11 Confocal Scanning Laser Microscopy.....	34
<b>3. Resultater .....</b>	<b>35</b>
3.1 Etablering av metoder.....	35
3.1.1 Utvikling av <i>P. fluorescens</i> SBW25 biofilm med varierende glukosekonsentrasjoner i vekstmediet .....	35
3.1.2 CV-farging for kvantifisering av <i>P. aeruginosa</i> biofilm .....	37
3.1.3 Gfp merking av <i>P. aeruginosa</i> PA14 ved hjelp av mini-Tn7 merkesystem.....	38
3.2 Begrensende faktorer i vekstmediet .....	40
3.2.1 Undersøkelse av nitrogen- og fosfatbegrensning.....	40
3.2.2 Undersøkelse av vekst i definert medium tilsatt ny spormineralblanding “TMS-2”.....	42
3.3 Studier av pyocyaninproduksjon og genuttrykk i flytende kultur .....	48
3.3.1 Produksjon av pyocyanin relatert til bakterievekst .....	49
3.3.2 Effekt av begrensende faktorer i mediet på pyocyaninproduksjon.....	50
3.3.3 Studier av uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon i <i>P. aeruginosa</i> .....	55
3.4 Studier av pyocyaninproduksjon og genuttrykk i biofilm .....	60
3.4.1 Biofilmdannelse i <i>P. fluorescens</i> SBW25 og <i>P. aeruginosa</i> PAO1; studie av genuttrykk .....	60
3.4.2 Dyrking av biofilm i brønnplater .....	62
3.4.3 Dyrking av biofilm i reaktor .....	76
3.4.4 Biofilmutbytte .....	78



3.4.5 Studie av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi .....	79
3.4.6 Studier av uttrykk av quorum sensing gener i <i>P. aeruginosa</i> biofilm .....	84
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>87</b>
4.1 Teknikker for å studere <i>P. aeruginosa</i> biofilm.....	87
4.1.1 Dyrking av biofilm i brønnsplater.....	87
4.1.2 Dyrking av biofilm i reaktor .....	89
4.1.3 Kvantifisering av biofilm .....	90
4.2 Begrensende faktorer i vekstmediet .....	90
4.3 Studier av pyocyaninproduksjon i flytende kultur .....	91
4.3.1 Forskjeller i pyocyaninproduksjon mellom <i>P. aeruginosa</i> PAO1 og <i>P. aeruginosa</i> PA14. ....	91
4.3.2 Effekt av begrensende faktorer i mediet på pyocyaninproduksjon.....	92
4.3.3 Studier av uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon i <i>P. aeruginosa</i> .....	92
4.4 Studier av pyocyaninproduksjon i biofilm .....	93
4.4.1 Effekt av karbonbegrensning på biofilmdannelse.....	93
4.4.2 Studie av uttrykk av gener involvert i biofilmdannelse .....	93
4.4.3 Effekt av begrensende faktorer i mediet på biofilmdannelse.....	94
4.4.4 Effekt av begrensende faktorer i mediet på uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon .....	96
4.4.5 Studie av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi .....	96
4.4.6 Studier av uttrykk av quorum sensing gener i <i>P. aeruginosa</i> biofilm .....	97
4.5 Videre arbeid .....	97
<b>5. Oppsummering og konklusjoner .....</b>	<b>99</b>
<b>6. Referanser.....</b>	<b>101</b>
Vedlegg A: Tillaging av medier .....	a
Vedlegg B: Standard benyttet i gel-elektroforese.....	b
Vedlegg C: OD omregningsfaktor.....	c
Vedlegg D: Beregning av $\mu$ og doblingstider i eksponentiell vekstfase .....	d
Vedlegg E: Tørrvektskurver <i>P. aeruginosa</i> PAO1 og <i>P. aeruginosa</i> PA14 .....	e
Vedlegg F: Beregninger av celleutbytte .....	h

Vedlegg G: Beregninger av glukosekonsentrasjoner .....	i
Vedlegg H: Dyrking av <i>P. aeruginosa</i> i dypbrønnplater.....	k
Vedlegg I: Rådata for beregninger av spesifikk pyocyaninproduksjon .....	n
Vedlegg J: Logaritmiske vekstkurver for studie av genuttrykk i flytende kultur.....	p
Vedlegg K: Oversikt over mengde biofilm dannet i brønnplater, relatert til RNA-utbytte og beregninger av overflatearealer. ....	q
Vedlegg L: Beregning av konsentrasjon av komponent i spormineralblanding .....	u
Vedlegg M: Pyocyaninproduksjon i fosfatbegrenset medium .....	v

# 1. Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn og formål med oppgaven

SINTEF har en konsernsatsing innenfor systembiologi og et av temaene innenfor denne satsingen er forståelse og bekjempelse av biofilmer. Biofilm kan forårsake kontinuerlige skader og innenfor medisin har biofilm vært assosiert med blant annet bakterielle infeksjoner hos pasienter med cystisk fibrose (CF) og begroing av proteser og katetre. Biofilm forårsaker også problemer innenfor havbruk, der den medvirker til begroing av nøter og andre overflater. Innenfor industrien kan mikrobiell vekst på metalloverflater gi opphav til korrosjon. På en annen side kan biofilmer utnyttes positivt innenfor for eksempel biologisk vannrensing.

Formålet med denne oppgaven har vært å etablere relevante teknikker for å studere biofilm. Dette har omfattet utprøving av dyrkingsbetingelser og metoder for kvantifisering av mengde biofilm, samt studier av effekt av dyrkingsbetingelser på biofilmdannelse.

*Pseudomonas aeruginosa* benyttes som modellorganisme i SINTEFs prosjekt på grunn av stammens relevanse til CF og kroniske sår, og arbeidet i denne oppgaven er utført med den samme organismen.

## 1.2 Biofilm

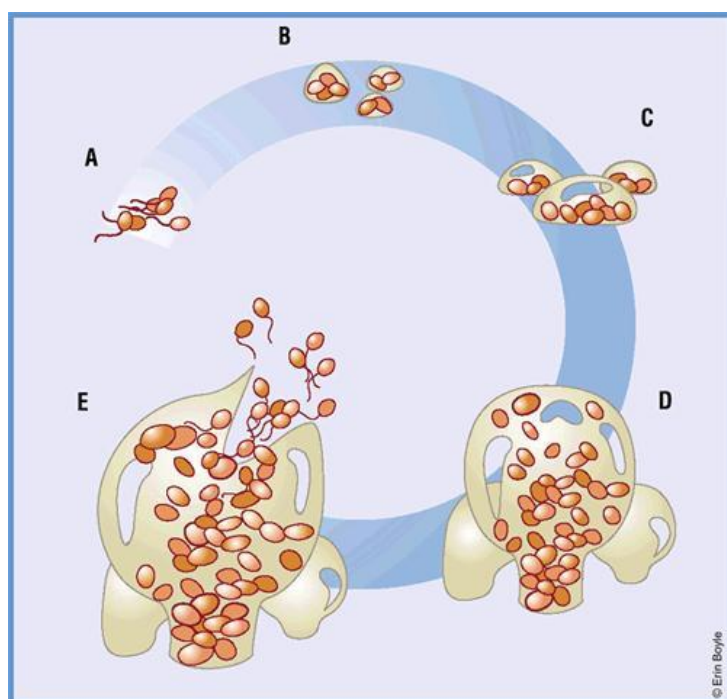
### 1.2.1 Biofilmdannelse og morfologi

En biofilm betegner et eget mikrobielt samfunn hvor mikrober er knyttet til en overflate. En biofilm er en blanding av en eller flere bakteriestammer som holdes sammen av en matrix med ekstracellulære polymeriske substanser (EPS). Disse substansene består av proteiner, DNA og polysakkarider. Bakterierceller på overflaten av en biofilm har lett tilgang til næringsstoffer og deles hurtig. Cellene som ligger lenger ned i filmen er mer passive på grunn av lavere metabolsk aktivitet. Celler i en biofilm er fysiologisk heterogene på grunn av mikronisjer som oppstår innenfor biofilmen. Denne heterogeniteten resulterer i celler med stor forskjell i mottakelighet til antibiotika (Behlau og Gilmore, 2008).

Det kan dannes biofilm på ulike overflater, som for eksempel metall, plastikk, stein eller vev (Schachter, 2003). Biofilmer som består av flere stammer dominerer i de fleste miljøer, mens biofilmer med kun en stamme finnes i diverse infeksjoner og på overflaten av medisinske implantat. Et viktig trekk for biofilmer er utvikling av antibiotikaresistens. Dette gjør at biofilmen er beskyttet mot miljøet rundt (O'Toole et al., 2000).

Utvikling av en biofilm går over fem trinn (Figur 1). Det første trinnet initieres ved at bakterieceller går over fra en frittsvømmende tilstand, hvor de betegnes planktoniske (frie) celler, til en tilstand der mikroorganismene er festet til biotiske eller abiotiske overflater (Davey og O'Toole, 2000). Denne overgangen reguleres av næringstilgangen i mediet og er reversibel. I det andre trinnet skjer en irreversibel tilknytning hvor det dannes klynger av celler. I det tredje trinnet legger celler seg lag på lag og trinnet defineres som det tidspunktet hvor celleklyngen er tykkere enn 10  $\mu\text{m}$ . Det nest siste trinnet i biofilm utvikling er nådd når biofilmen har nådd en gjennomsnittlig tykkelse på 100  $\mu\text{m}$ . I dette trinnet er biofilmceller mest forskjellig fra planktoniske celler, med hensyn på antall proteiner som er forskjellig uttrykt. I det siste trinnet vil planktoniske celler begynne å løsne fra biofilmen, noe som kommer av mangel på næringsstoffer i mediet. Grupper av celler vil da ha mangel på næringsstoffer som de trenger for å vokse (Wimpenny og Colasanti, 1997, Sauer et al., 2002, Hunt et al., 2004). Frigjøringen av celler fra en *P. aeruginosa* PAO1 biofilm induseres også av en plutselig økning i karbonkilde tilgjengelighet (Sauer et al., 2004).

I tillegg til næringstilgangen i vekstmediet har andre faktorer som temperatur, osmolalitet, pH, jern og oksygen betydning for biofilm utvikling. Det er vist at flageller, type IV pili og forandringer i lipopolysakkarider spiller viktige roller i tidlig biofilm utvikling i *P. aeruginosa* (O'Toole et al., 2000).

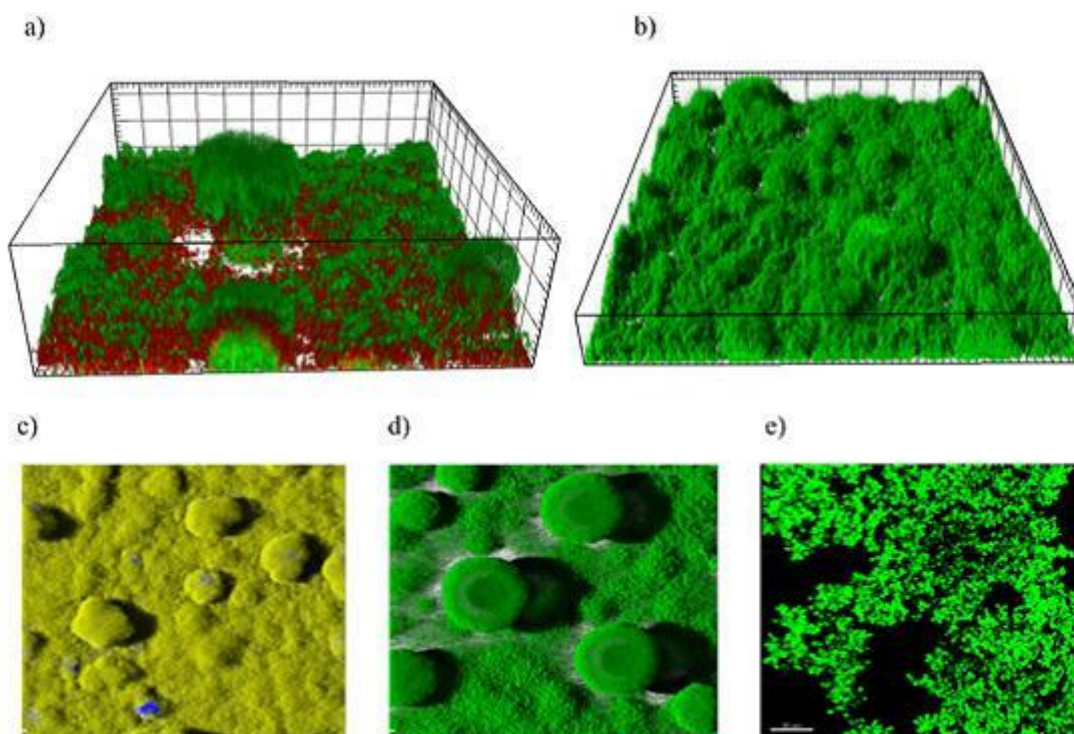


**Figur 1: Fem steg i biofilmdannelse. (A) Bakteriene knyttes reversibelt til en fast overflate (B) Bakterier blir irreversibelt festet og aggregerer til å danne en matrix. (C) Biofilmen modnes, bakteriene legger seg lagvis. (D) Maksimum tykkelse av biofilm (E) Planktoniske bakterier frigjøres fra biofilmen (Schachter, 2003).**

I tillegg til dannelse av EPS vil den faste overflatens og celleoverflatens egenskaper ha betydning for biofilmdannelse. Bindingskrefter som inngår i mikrobiell tilknytning til en overflate er hydrogenbindinger, hydrofobe interaksjoner, og ioniske interaksjoner. Kombinert effekt av hydrofobisitet og bakteriecellenes ladning har innvirkning på mikrobiell adhesjon til en overflate (Østgaard, 2004, Maier et al., 2009).

Det er vist at i tidlig utviklingstrinn kan celleklynger utvikle hulrom via lysning og løsning av biofilmceller som forårsakes av mangel på næringsstoffer i mediet. Biofilmen vil da vises som store biter eller flak som er løst forankret til underlaget. Cellene vil løsne fra underlaget og dette resulterer i frigjøring av store biter av biofilm til mediet. Denne "flassingen" av biofilm kan resultere i tap av 50 % av biofilmen. Dette vil føre til at mengde biofilm vil svinge omkring en "steady state"-verdi (Hunt et al., 2004). Det er også vist at flassing av biofilm kan skje under oksygen-begrensning (Applegate og Bryers, 1990).

Biofilmer har karakteristisk arkitektur og fenotypiske og biokjemiske egenskaper som skiller dem fra frittstående, planktoniske celler (Mah et al., 2003). Figur 2 viser tre-dimensjonale bilder av biofilm dannet av *P. aeruginosa* PAO1 vill type og *pilA* mutant, tatt ved hjelp av konfokalmikroskopi. Figuren viser i tillegg et bilde av *Saccharomyces cerevisiae* biofilm.



**Figur 2: Biofilmarkitektur.** a) *P. aeruginosa* PAO1 gfp biofilm, 4 dager gammel. b) 3D presentasjon av *P. aeruginosa* biofilm, 3 dager gammel. c) 3D bilde presentasjon av *P. aeruginosa* PAO1 *pilA* mutant (blå) med *P. aeruginosa* PAO1 vill type yfp (gult fluorescerende protein). d) 3D bilde presentasjon av *P. aeruginosa* PAO1 gfp biofilm, 5 dager gammel. e) *Saccharomyces cerevisiae* biofilm (Nielsen et al., 2011).

Når celler vokser i biofilmer uttrykker de fenotypiske trekk som er forskjellige fra de som uttrykkes hos planktoniske celler. De miljømessige forholdene og bakterienes respons til det lokale miljøet er ikke homogen gjennom filmen, da det oppstår konsentrasjonsgradienter av næringsstoffer, signalstoffer og avfallsstoffer. Bakteriene tilpasser seg disse gradientene og som et resultat utvikler biofilmen en strukturell, kjemisk og biologisk heterogenitet. Dette gjør at biofilmceller ikke bare er forskjellig fra planktoniske celler, men også forskjellig fra andre celler i samme biofilm.

Modne biofilmer inneholder metabolske substrater og produkter, for eksempel oksygen. Oksygen diffunderer lett gjennom biofilmen. Celler på overflaten av biofilmen respirerer oksygenet, slik at cellene lenger inn i filmen får for lite oksygen. Dette gjør at konsentrasjonen av oksygen og hvilket som helst annet næringsstoff som forbrukes i biofilmen synker jo lengre inn man kommer i filmen. Metabolske produkter derimot har høyere konsentrasjon i den indre delen av biofilmen enn i den ytre. I tillegg vil avfallsstoffer akkumuleres i den indre delen av biofilmen, noe som vil senke pH. Også andre elektronakseptorer, elektrondonorer, kofaktorer, signalmolekyler og metabolske produkter vil gi konsentrasjonsgradienter. Langt inne i biofilmen vil det være et område hvor både oksygen og substrat er mangelvare, og cellene vil bli inaktive og etter hvert dø (Stewart og Franklin, 2008). Biofilmen blir substratbegrenset dersom den er tykkere enn 50  $\mu\text{m}$  (Roberts og Stewart, 2003).

### 1.2.2 Regulering av biofilmdannelse

Sekundære budbringere (second messengers) er intracellulære molekyler som videreformidler ekstracellulære signaler til innsiden av cellen. En viktig sekundær budbringer som er involvert i biofilmdannelse er bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosin monophosphate (c-di-GMP) (D'Argenio og Miller, 2004). Den er involvert i biofilmdannelse ved at økt nivå av c-di-GMP resulterer i forsterket biofilmdannelse og at celler med nedsatt nivå av c-di-GMP ikke kan initiere biofilmdannelse. I tillegg vil intracellulær nivå av c-di-GMP kontrollere uttrykket av gener involvert i dannelsen av EPS i *P. aeruginosa* (Hickman et al., 2005). Også glukosebegrensning har innvirkning på overgang fra planktonisk vekst til vekst i biofilm ved at nivå av c-di-GMP synker ved glukosebegrensning og oppløsning av *P. aeruginosa* PAO1 celleaggregater (Schleheck et al., 2009).

“Pho regulon” består av flere gener som reguleres sammen. Genene i Pho regulonet reguleres av et regulatorisk system bestående av en transkripsjonsaktivator; PhoB og en sensor kinase; PhoR. Aktiviteten til PhoB reguleres av ekstracellulær konsentrasjon av fosfat. Uttrykket av Pho regulon inhiberes når det er mye fosfat tilgjengelig. Dersom det er lite fosfat vil Pho regulonet aktiveres. PhoR fungerer som en fosfatsensor i denne prosessen (Wanner, 1996). Ved fosfatbegrensning vil PhoR fosforylere PhoB som igjen aktiverer uttrykket av Pho regulonet ved å binde seg til Pho box sekvenser innenfor promoterene til Pho regulon genene. Når det ikke er fosfatbegrensning vil Pst systemet ( $P_1$ -spesifikt transportsystem) hemme PhoR i og fosforylere og aktivere PhoB (Wanner, 1995).

Uttrykket av Pho regulonet er involvert i biofilmdannelse. Aktivering av Pho regulonet under fosfatbegrensning resulterer i betinget uttrykk av en c-di-GMP fosfodiesterase (RapA) som

spalter og degraderer c-di-GMP. RapA inhiberer derved biofilmdannelse i respons til fosfatbegrensning. RapA senker nivået av c-di-GMP som igjen hemmer sekresjon av LapA. Dette gjelder for *P. fluorescens* Pf0-1. Antatte ortologer til RapA finnes i *P. aeruginosa* PAO1 (75 % aminosyreidentitet) og *P. aeruginosa* PA14 (76 % aminosyreidentitet) (Monds et al., 2007).

*P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 responderer forskjellig på fosfattilgang. Det er vist at i *P. aeruginosa* PAO1 sees en PhoB avhengig inhibering av biofilmdannelse ved lav fosfatkonsentrasjon, mens i *P. aeruginosa* PA14 sees denne inhiberingen både ved lav og høy fosfatkonsentrasjon. I *P. aeruginosa* PAO1 vil høy fosfatkonsentrasjon forsterke biofilmdannelse, mens total biofilmdannelse i *P. aeruginosa* PA14 er ikke påvirket av tilgang på fosfat i like stor grad (Haddad et al., 2009).

### 1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

*Pseudomonas aeruginosa* er en gram negativ stav-bakterie og er medlem av klassen Gamma Proteobacteria. Stammen tilfører familien Pseudomonadaceae. *P. aeruginosa* finnes naturlig i jord- og vannmiljøer, men kan også finnes på overflate til planter og på dyr. *P. aeruginosa* er en opportunistisk patogen, det vil si at den kan initiere en infeksjon når immunsystemet er svekket (Todar, 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* er den mest studerte biofilmdannende gram-negative bakteriearten, mye på grunn av dens problemer relatert til sykehusinfeksjoner. Den er en aerob bakterie, men den blir anaerob når den vokser i biofilm i lunger hos pasienter med cystisk fibrose (Yoon et al., 2002).

Tilgang på fosfat har betydning for *P. aeruginosa* virulens. Det er identifisert virulens systemer som aktiveres når *P. aeruginosa* vokser i fosfatbegrenset medium. På denne måten vil lav fosfatkonsentrasjon trigge en reversibel virulens i *P. aeruginosa*. Dette skifte fra lav til høy virulens avhenger også av quorum sensing (Punkt 1.5). Når *P. aeruginosa* PAO1 vokser i fosfatbegrenset medium vil cellene produsere mer pyocyanin og også andre gener som bidrar til virulens. Også klinisk har fosfattilgang betydning, siden fosfatkonsentrasjon går drastisk ned etter et kirurgisk inngrep (hypofosfatemi), i tillegg vil kirurgiske inngrep trigge invasjon av *P. aeruginosa* (Long et al., 2008, Potera, 2009).

Flageller, type IV pili og forandringer i lipopolysakkarider spiller viktige roller under tidlig biofilm utvikling. Det er vist at *P. aeruginosa* svømmer langs en overflate for å søke etter en plass å initiere kontakt. Når bakteriene har dannet et monolag på overflaten, vil bakteriene fortsette å forflytte seg langs overflaten. Denne forflytningen bruker "twitching motility". (O'Toole et al., 2000). Twitching motility er avhengig av type IV pili og celler kan kun forflytte seg ved hjelp av denne mekanismen kun når de er i kontakt med andre celler. (Semmler et al., 1999). Flageller bruker derimot svømming som forflytningsmekanisme (O'Toole et al., 2000).

Moden *P. aeruginosa* biofilm består av soppformede mikrokolonier av bakterier, omringet av ekstracellulære polysakkarider og separert av væskefylte kanaler (O'Toole et al., 2000). Disse

soppstrukturene består av forskjellige subpopulasjoner i “cap” og “stalk” områdene. Dannelsen av “cap”-delen er avhengig av type IV pili. (Barken et al., 2008).

Hvilken karbonkilde som benyttes i vekstmediet har betydning for biofilmdannelse i *P. aeruginosa*. Biofilmer som vokser i enten glutaminsyre eller succinat som karbonkilde er flate, mens biofilmer som vokser i medium tilsatt glukose består av tynne cellelag. Ved vekst i succinat vil quorum sensing mutante stammer, *lasRrhlR* og *lasIrhlI* danne biofilm som er strukturert forskjellig fra villtypens. Ved vekst i enten glukose eller glutaminsyre vil de muterte stammene danne biofilmer som er lik villtypens (Shrout et al., 2006).

Biofilmcellenes produksjon av polysakkarider spiller en viktig rolle for cellenes tilknytning til en overflate. På grunn av dette har det vært hypoteser om at alginat spiller en viktig rolle i en eller flere steg i *P. aeruginosa* biofilmutvikling. Det er imidlertid vist at alginat ikke er en signifikant komponent i polysakkarid matriksen i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 biofilmer (Wozniak et al., 2003).

*P. aeruginosa* PA14 genomet har to sykdomsfremkallende “genøyer” PAPI-1 og PAPI-2. Både PAPI-1 og PAPI-2 inneholder gener som gjør at stammen kan trives som patogen på evolusjonært forskjellige verter, inkludert planter og pattedyr. I løpet av evolusjonen har *P. aeruginosa* PA14 tatt opp fremmede DNA elementer fra andre bakteriearter og dette har gjort at stammen kan kolonisere flere miljøer. *P. aeruginosa* PAO1 har ikke disse “genøyene” og er derfor mindre patogen (He et al., 2003).

Som nevnt tidligere produserer *P. aeruginosa* biofilmceller polysakkarider som beskytter og gir struktur til biofilmen. *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 har to operon som er involvert i polysakkarid syntese. Pel er et operon med 7 gener som er involvert i pellikeldannelse (dannelse av biofilm på luft-væske interfase) i *P. aeruginosa* PA14. Pel locuset produserer et glukoserikt matrix polysakkarid som er nødvendig for pellikeldannelse og biofilmstruktur i hos denne stammen (Friedman og Kolter, 2004, Ryder et al., 2007). Psl er involvert i biofilmdannelse i *P. aeruginosa* PAO1. Inaktivering av Psl gen cluster fører til defekt biofilmdannelse (Jackson et al., 2004). Psl polysakkaridet er en viktig komponent i biofilm matriksen og holder cellene sammen. Psl er også involvert i tilknytning til slimdekte overflater og til epitelceller i luftveiene (Ma et al., 2006). Polysakkaridet som kodes av pel er biokjemisk og genetisk forskjellig fra Psl (Ryder et al., 2007).

Aggregatdannelse i *P. aeruginosa* karakteriseres som planktoniske biofilmer og disse biofilmene har liknende fysiologiske trekk, og de samme responsene som overflateassosierte biofilmceller. Disse responser inkluderer bl.a. løsning av celler fra filmen under begrensning. En annen likhet er at både aggregater og biofilmceller produserer EPS som består av ekstracellulær DNA. Ved dyrking i rystekolber vil 90 % av total biomasse bestå av aggregater (5-600 µm), mens 10 % representerer enkeltceller (1-5 µm) (Schleheck et al., 2009).

Det er vist at selv om glukose blir begrensende faktor for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i flytende kultur, vil OD øke. Dette kommer av at aggregatene blir oppløst til enkeltceller under karbonbegrensning. Det samme ble vist ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 som biofilm.



Ved karbon-begrensning løsnet biofilmceller og også store flak av biofilmceller fra biofilmen, OD i medium økte, mens CV-kvantifisering av biofilm viste mindre biofilm. Undersøkelser viste også at oksygenbegrensning førte til økning av OD i medium og mindre biofilm. Disse biofilmcellene som har løsnet fra biofilmen på grunn av karbon- eller oksygenbegrensning har en slimete konsistens som kommer av frigjøring av ekstracellulær DNA (Schleheck et al., 2009).

Det er vist at ved dyrking i flow celle med kontinuerlig tilførsel av næringsstoffer vil *P. aeruginosa* celler som har blitt frigjort fra biofilmen være mer lik planktoniske celler enn modne biofilmceller. Dette gjelder celler som har løsnet fra biofilmen i det siste utviklingstrinnet. 8 timer etter tilknytning til en fast overflate produserer biofilmcellene omtrent de samme proteinene som planktoniske celler. Når biofilmen blir mer moden vil forskjellene mellom planktoniske celler og biofilmceller bli større (Sauer et al., 2002).

### 1.2.4 *Pseudomonas fluorescens* biofilm

*P. fluorescens* er en gram negativ stav-bakterie og er medlem av klassen Gamma Proteobacteria. Stammen tilhører familien Pseudomonadaceae og er en ikke-patogen saprofytt som finnes naturlig i jord- og vannmiljøer. Den kan også finnes på overflaten til planter. Stammen produserer et løselig, grønnlig fluorescerende pigment, derav navnet. *P. fluorescens* er en allsidig bakterie som kan degradere ulike miljøgifter (NCBI).

*P. fluorescens* SBW25 er blant flere bakteriestammer som danner biofilm på væskeoverflaten, det vil si på overgangen mellom væske og luft. Stammen er en “wrinkly spreader”, det vil si den danner rynkede kolonier på agarplater. Stammens evne til å kolonisere væskeoverflaten er avhengig av produksjon av cellulose polymerer (Spiers et al., 2002, Allison et al., 1998).

Det er vist at *P. fluorescens* kan danne biofilm på abiotiske overflater og at protein syntese kreves for tidlig biofilmdannelse. Videre trinn i biofilmdannelse krever ikke syntese av nye proteiner. Næringsstoffer i mediet har innvirkning på biofilmdannelse i *P. fluorescens*. Glukose alene kan fremme biofilmdannelse, men tilsats av “Casamino acids” og jern vil øke biofilmdannelse. Vekst av stammen i medium med høy osmolalitet hemmer biofilmdannelse. Det er også vist at ClpP protein kreves for biofilmdannelse i *P. fluorescens*. ClpP proteinet er en subenhet av Clp protease (O'Toole og Kolter, 1998).

Siden *P. fluorescens* ikke er patogen har metodeetablering i denne opgaven blitt innledet med arbeid med *P. fluorescens* SBW25.

### 1.3 Praktisk betydning av biofilm

#### 1.3.1 Klinisk relevanse

*P. aeruginosa* kan overleve i mange naturlige miljøer, men den er mest kjent som en antibiotikaresistent patogen assosiert med sykehusinfeksjoner og er den fremste årsaken til død hos pasienter med cystisk fibrose. Stammen gir akutte eller kroniske infeksjoner hos disse pasientene (Dubern og Diggle, 2008, Lau et al., 2004). Bakterienes mulighet til å danne biofilm gir bakteriene en overlevelseshfordel i en syk eller skadet lunge. Bakterien infiserer sjelden en lunge uten at pasienten enten har svekket immunsystem eller har en svekket mekanisk barriere (Williams et al., 2010). Lungeinfeksjoner forårsakes av patogene *Pseudomonas* bakterier som knyttes til slimhinnene i luftveiene eller til epitelcellene hvor bakteriene kan vokse. Pili og flageller er adhesiner i *P. aeruginosa* som bidrar til stammens patogenitet (Kobayashi et al., 2009). Pyocyaninproduksjon (Punkt 1.4) er essensiell for enten akutt eller kronisk lungeinfeksjon i mus og full virulens til *P. aeruginosa* i løpet av en lungeinfeksjon krever syntese av pyocyanin (Lau et al., 2004).

#### 1.3.2 Antibiotikaresistens

Et viktig trekk ved biofilmceller er deres utvikling av antibiotikaresistens, som kan være opptil 1000 ganger høyere enn for planktoniske celler. En grunn til at det er vanskelig å drepe biofilmceller ved hjelp av antibiotika er at biofilmen inneholder celler som gror sakte og som beskyttes av sin egen inaktivitet (Xu et al., 2000). Dette er et stort problem for blant annet pasienter med cystisk fibrose. Hastigheten på drepingen senkes jo tykkere biofilmen er. Tiden som kreves for å oppnå en viss grad av dreping er omvendt proporsjonal med substratkonsentrasjonen i væsken. Dersom substratkonsentrasjon økes, senker tiden som trengs for å drepe biofilmen og omvendt (Roberts og Stewart, 2003). *Pseudomonas aeruginosa* infeksjoner vedvarer til tross for bruk av antibiotika. Analyse av biofilmstrukturer ved hjelp av konfokalmikroskopi har vist at de resistente bakteriene danner biofilm hurtigere og har mer biomasse enn villtypen (Drenkard og Ausubel, 2002).

#### 1.3.3 Industriell relevanse

Biofilm skaper problemer, men kan også utnyttes nyttig innenfor industrien.

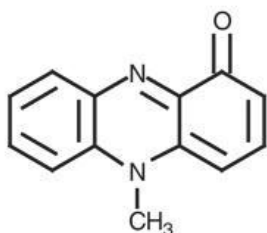
I skipsindustrien skaper biofilm problemer ved at mikroorganismer legger seg på skroget. Alger kan da feste seg på biofilmen og begynne å vokse. Dette fører til mer motstand i vannet, skipet går saktere og forbruker mer drivstoff (SABIMA, 2008). Biofilm skaper også problemer knyttet til nedbrytning av metall, ofte kalt biokorrosjon. Slik korrosjon kan ødelegge ledningsnett for drikkevann og redusere varmeoverføring. I matindustrien kan biofilmer være en kilde til smitte av råvarer og produkter med uønskede mikroorganismer (Senter for biofilmforskning, 2010).

Biofilm utnyttes positivt innen blant annet biologisk vannrensing. I biofilmanlegg blir nitrogen fjernet fra vannet i to trinn: Nitrifikasjon og denitrifikasjon. I det første trinnet blir ammonium oksidert til nitritt, som igjen blir oksidert til nitrat. I det andre trinnet blir nitrat redusert til nitrogengass. Biofilmanlegg er ofte foretrukket innenfor vannrensing på grunn av at bakterietettheten kan bli svært stor, bakteriene ligger godt beskyttet inni biofilmen og bakterieslammet blir enklere å separere fra vannet etterpå. Dette gjør biofilmsystemer robuste og enkle i drift (Østgaard, 2004).

### 1.4 Fenaziner; sekundær metabolitter produsert av bakterier

Fenaziner består av en stor gruppe nitrogenholdige heterosykliske komponenter produsert av en rekke bakterier, spesielt *Pseudomonas* stammer. Det er blitt forsket mye på disse komponentene på grunn av deres brede spektrerte antibiotiske og virulente egenskaper. Andre egenskaper utover dette inkluderer deres oksidasjon-reduksjons- (redoks) egenskaper, muligheter for å forandre farge etter pH og redox tilstand, funksjon som elektronbærere og funksjon som celle signaler som regulerer uttrykk av gener. Fenazinene bidrar i tillegg til biofilmdannelse/arkitektur og den produserende stammens overlevelse (Pierson and Pierson, 2010). Fenaziner blir utskilt i tidlig stasjonærfase i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 (Dietrich et al., 2006).

Pyocyanin (5-N-metyl-1-hydroxy-phenazin) er en type fenazin og et blå-grønt pigment som produseres av *P. aeruginosa* (Figur 3). Pyocyanin er en virulens faktor, har betydning for antimikrobiell aktivitet og er et signalmolekyl for *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 (Dietrich et al., 2006). I tidligere forsøk (SINTEF) er det vist at dette stoffet produseres i *P. aeruginosa* PA14, men ikke, eller mye mindre i *P. aeruginosa* PAO1. Dette er også vist av andre (Dietrich et al., 2006). Pyocyanin er en sekundærmetabolitt. Sekundær metabolitter er ikke direkte involvert i bakteriens vekst, utvikling og reproduksjon.



Figur 3: Strukturformel pyocyanin (Price-Whelan et al., 2006).

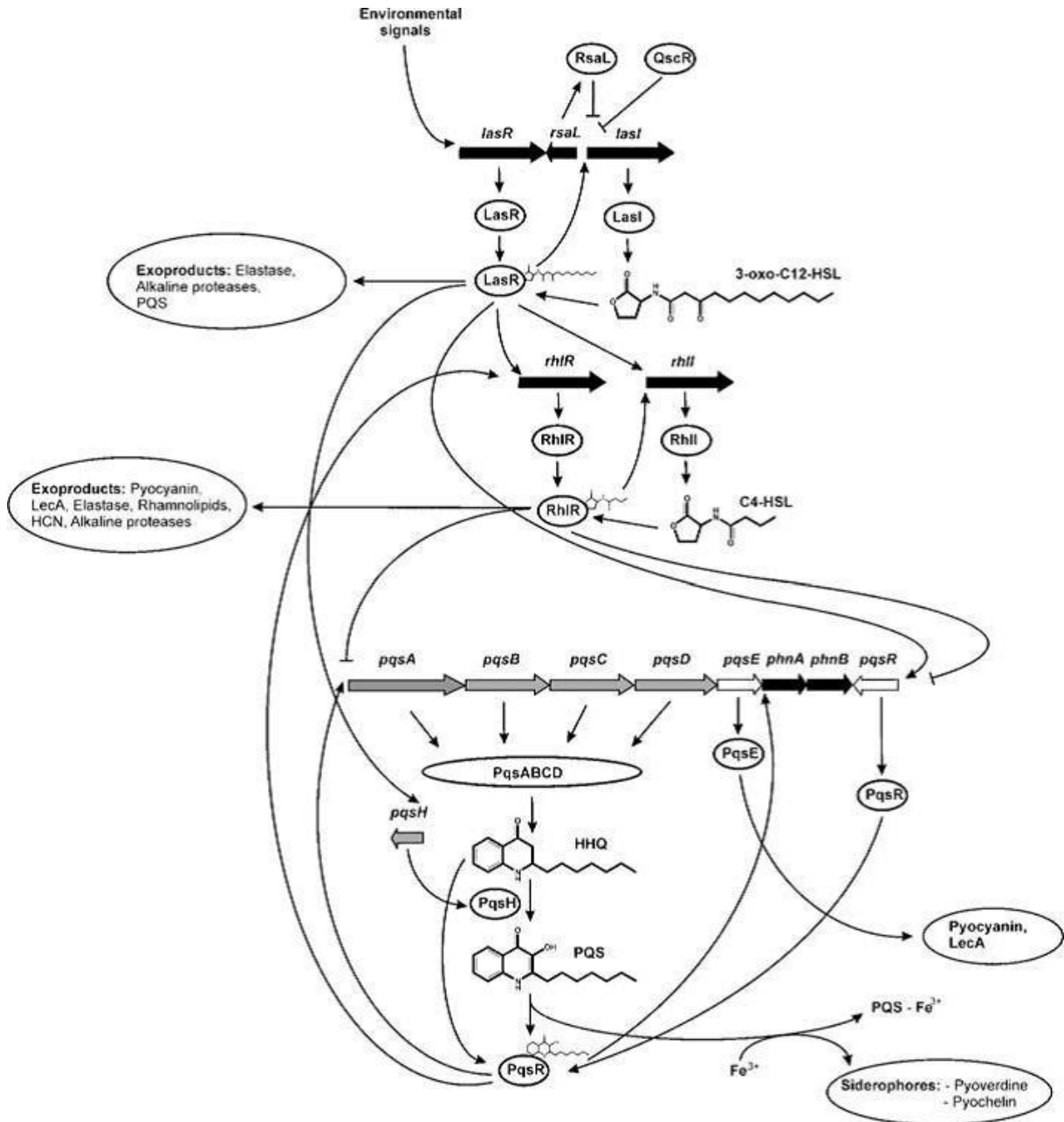
#### 1.4.1 Gener involvert i syntese av pyocyanin i *P. aeruginosa*.

*P. aeruginosa* har et fenazinsyntetisk spor som består av to homologe operon *phzA1B1C1D1E1F1G1* og *phzA2B2C2D2E2F2G2*. Disse operonene inngår i produksjonen av fenazin-1-karboksylysyre (phenazine-1-carboxylic acid), PCA. I *P. aeruginosa* blir dette stoffet omgjort til pyocyanin (PYO) ved hjelp av to fenazinmodifiserende gener, *phzM* og *phzS*. Disse genene koder for henholdsvis fenazin-spesifikk metyltransferase og flavininnholdende monooksygenase. To modifiseringer inngår i omgjøring av PCA til pyocyanin: addering av en N-metylgruppe, omgjøring av PCA til 5-metylphenazin-1-karboksylylat betain; og dekarboksylering av betain til å danne pyocyanin (Turner og Messenger, 1986). Det første trinnet katalyseres av PhzM, mens det andre trinnet katalyseres av PhzS. Genet *phzE* koder for PhzE og inngår i et tidligere trinn; dannelse av PCA fra chorismic acid. *P. aeruginosa* med mutasjon i *phzM* og *phzS* kan ikke produsere pyocyanin (Mavrodi et al., 2001). Oppstrøms av operonet *phzA1B1C1D1E1F1G1* kommer las box som er en antatt promotor element som trengs for quorum kontroll. Operonet kontrollerer på denne måten quorum sensing i *P. aeruginosa* (Whiteley et al., 1999).

### 1.5 Quorum sensing; celle-celle-kommunikasjonssystem hos bakterier

Quorum sensing (QS) er celle-celle-kommunikasjonssystemer som baserer seg på produksjon, sekresjon og deteksjon av små signal-molekyler når den bakterielle populasjonen har nådd en viss celletetthet. Når konsentrasjonen av signal molekyler når en terskel vil de “kommuniserende” bakteriene forandre sine genuttrykk. Dette fører til blant annet sekresjon av virulens faktorer, initiering av biofilmdannelse og dannelse av sekundærmetabolitter (Bassler og Losick, 2006).

I *P. aeruginosa* regulerer quorum sensing biofilmdannelse, virulens, “swarming motility” og antibiotika utstrømningspumper (Williams og Cámara, 2009). Figur 4 illustrerer relasjoner mellom de ulike quorum sensing systemene og deres kompleksitet i *P. aeruginosa*.



Figur 4: Kompleksiteten til quorum sensing systemene i *P. aeruginosa* (Dubern and Diggle, 2008).

### 1.5.1 Gener involvert i quorum sensing i *P. aeruginosa*

Quorum sensing systemene i *P. aeruginosa* omfatter las- og rhl-systemet. Disse systemene består av LasR og RhIR (R-proteiner) og deres autoinducer signalmolekyler som kodes av genene *lasI* og *rhlI*. Disse signalmolekylene omfatter N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone (3O-C<sub>12</sub>-HSL) i las systemet og N-butyryl homoserine lactone (C<sub>4</sub>-HSL) i rhl systemet. LasR og RhIR har en autoinducer-bindende domene og et DNA-bindende domene. Binding av LasR og RhIR til deres autoinducermolekyler danner et R-protein-autoinducer kompleks som påvirker genuttrykk. Kompleksene binder seg til konserverte DNA-elementer

(las bokser) oppstrøms av translasjonsstart stedet for QS-regulerte gener (Wagner og Iglewski, 2008, Choudhary og Schmidt-Dannert, 2010, Waters og Bassler, 2005). Las quorum sensing systemet aktiveres i det andre biofilmutviklingstrinnet, mens rhl systemet aktiveres i det tredje biofilmutviklingstrinnet (Sauer et al., 2002).

Det er vist at quorum sensing kontrollerer “swarming motility” og bidrar til biofilmutvikling, og dette er avhengig av næringsstoffer i miljøet. Hvilken karbonkilde som brukes i dyrkingsmediet har innvirkning på “swarming motility” og biofilmstruktur. Avhengig av hvilken karbonkilde som brukes vil stammer med quorum-sensing mutasjoner (*lasIrhII* og *lasRrhlR*) enten ha defekt biofilmdannelse eller produsere biofilmer som likner villtypens (Shrout et al., 2006).

*P. aeruginosa* PAO1 biofilmer med mutasjoner i både *lasI* og *rhlI* er tynne (omtrent 20 % av tykkelsen til villtypen) og cellene er tettere pakket. Villtypen danner biofilmer med væskefylte kanaler, mens mutanten ikke har disse kanalene.

Det er ingen forskjell i produksjon av ekstracellulære polysakkarider mellom villtypen og *lasI* mutant. I *lasI* mutant vil initielle trinn i biofilmdannelse foregå som normalt, men overgangen fra tilknyttede planktoniske celler til biofilmceller skjer ikke. Det er quorum sensing signalet 3OC<sub>12</sub>-HSL som trengs for normal biofilmdifferensiering (Davies et al., 1998).

I *P. aeruginosa* har *rhl*-systemet innvirkning på biosyntese av pyocyanin, da økt uttrykk av *rhlR* gir økt pyocyaninproduksjon. Tilgjengelighet på fosfat spiller en viktig rolle her. Ved fosfatbegrensning vil responsregulator PhoB være aktivert og fosforylert PhoB vil forsterke PhoB avhengig gen transkripsjon. Denne aktiveringen vil føre til økt pyocyaninproduksjon. Det er vist at uttrykket av *rhlR* kan forsterkes i medium med lav fosfatkonsentrasjon som virker positivt på pyocyaninproduksjon (Jensen et al., 2006).

### 1.6 Andre gener relevante for biofilmdannelse

I tillegg til gener involvert i pyocyaninproduksjon og quorum sensing har også andre gener betydning for biofilmdannelse I denne oppgaven blir genene *epsB*, *fliP*, *pilA* og *ndvB* beskrevet nærmere.

*epsB* er et eksopolysakkarid-biosyntese gen som er involvert i biofilmdannelse. Genet koder for et Mig-14 protein. Mutasjoner i *epsB* fører til mindre produksjon av EPS (ekstracellulære polysakkarider) og dermed redusert biofilmdannelse. Det er også vist at genet er involvert i motilitet (Nian et al., 2007).

FliP inngår i flagell syntese og transport av flagellaproteiner og genet det kodes av; *fliP* er i operon med andre flagella biosyntetiske gener (Malakooti et al., 1994). Ettersom *fliP* er en del av et operon for syntese av flageller og man kan derfor ikke være sikker på om det er *fliP* og/eller nedstrømsgener som er ansvarlig for defekt biofilmdannelse i muterte stammer (O'Toole og Kolter, 1998).

*pilA* mutanter kan ikke danne type IV pili. Biofilmer som inneholder en blanding av *P. aeruginosa* villtype og *P. aeruginosa* PilA mutant, vokst i glukosemedium viser at mutantene bare kan danne stilk, mens villtypen kan danne ”caps”, noe som tyder på at type IV pili er nødvendig for ”capdannelse”. Villtypen er motil og kan bruke ”twitching motility”, mens *pilA* mutantene er ikke-motile (Klausen et al., 2003). *pilA* i *P. aeruginosa* PAO1 er betydelig forskjellig fra *pilA* i *P. aeruginosa* PA14 og dette bidrar til at disse to stammene har forskjellig patogenitet (Choi et al., 2002).

*ndvB* er involvert i antibiotikaresistens. Genet koder for en glykosyltransferase som er nødvendig for syntese av periplasmatiske cyclic- $\beta$ -glukanmolekyler (Ielpi et al., 1990). Disse periplasmatiske glukanene er sirkulære glukosepolymerer som hindrer antibiotika i og nå sitt sete i bakteriecellen ved å samhandle fysisk med tobramycin. Det er tidligere gjort forsøk hvor *ndvB* er blitt mutert i både *P. aeruginosa* PAO1 og PA14. De muterte stammenes antibiotikasensitivitet ble dermed testet. Resultatene viste at den muterte stammen var mer sensitiv mot antibiotika enn villtypen ved vekst i biofilm, mens det ikke ble observert noen forskjeller for stammene som vokste planktonisk. *ndvB* uttrykkes først og fremst i biofilm framfor i planktoniske celler. Det er vist at *P. aeruginosa ndvB* mutant har økt biofilmsensitivitet til fem antibiotika fra tre forskjellige strukturelle familier. Dette forklarer at disse glukanene kan binde veldig forskjellige molekyler og gir biofilmen mulighet til å danne resistens mot ulike antibiotika (Mah et al., 2003).

## 1.7 Metoder

### 1.7.1 Dyrking av biofilm

I dette avsnittet blir ulike dyrkingsmetoder som blir benyttet for å kunne studere biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi og for å studere genuttrykk i biofilm ved hjelp av RT-PCR beskrevet nærmere.

For undersøkelse av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi har flere dyrkingsmetoder blitt brukt. I en metode ble dekkglass limt fast til bunnen av 35 × 10 mm brønner for vevskulturer med små hull i basen. Platene ble sterilisert over natt ved hjelp av UV-stråling. 3 ml LB-medium ble tilsatt og inokulert med ca.  $10^7$  cfu av kultur grodd over natt i LB-medium. Etter inkubering i 24 timer ved 37 °C ble biofilmen vasket med NaCl og farget med LIVE/DEAD BacLight farge (Molecular Probes, Eugene, OR). Mikroskopering ble utført på Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop (Yoon et al., 2002).

Ved dyrking av biofilm i flowceller for konfokalmikroskopi har biofilm blitt dyrket i romtemperatur med individuelle kanal dimensjoner på flowcellene (1 × 4 × 40 mm). Flowcellene ble inokulert ved å injisere 200-350  $\mu$ l av bakteriekultur fra log-fase ( $OD_{600}$  0,5/0,001) til hver flowcelle med en 1,0 ml sprøyte. Etter inokulering ble hver flowcelle invertert i en time for å få bakteriene til å knytte seg til dekkglassene. Etterpå ble hver flowcelle snudd og flow (0,2 mm s<sup>-1</sup>) ble startet. All mikroskopering ble utført på Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop (Klausen et al., 2003, Ma et al., 2006, Barken et al., 2008).

Følgende metode har blitt benyttet for å dyrke biofilm for RT-PCR undersøkelser: En 0,5 liter sylindrisk minireaktor laget av plastikk, ble koblet til en elektrisk pumpe for medium tilførsel. Et stativ med 6 stålplater for biofilmvækst ( $15 \times 3,5 \times 1,5$  mm) ble plassert i reaktoren. Plastikkrør med diameter 5 mm ble brukt til å sirkulere BHI mediet i reaktoren. Bioreaktoren ble koblet til en pumpe og inokulert med 40 ml av *Pseudomonas aeruginosa* kultur vokst over natt i BHI-medium ved 37 °C. Pumpen ble så skrudd ned til en pumpehastighet på  $0,1 \text{ l min}^{-1}$  og denne hastigheten ble holdt i minst 4 timer. Medium gikk ut av reaktoren og over i en avfallsdunk via en ut-slange. Biofilmen ble dyrket i 5 dager i romtemperatur. Ved prøveuttak ble platene tatt ut fra reaktoren, RNA ble isolert og RT-PCR ble kjørt for genuttrykk (Schwartz et al., 2007).

Biofilm dyrkes ved ulike metoder. Biofilm kan dyrkes i brønnplate, reaktor, flowceller etc. Dette vil si at biofilmdannelse kan skje i ulike systemer og at ulike prosesser skjer i disse systemene. Dersom biofilmdannelse skjer i et lukket system karakteriseres prosessen som en batch. Alle materialer tilsettes systemet fra start, systemet er lukket og produkter fjernes når prosessen er ferdig. Biofilmdannelse kan også skje i et kontinuerlig system. Materialer går da inn og ut av systemet. Dersom hastighet på masse som går inn og masse som går ut er lik, kan den kontinuerlige prosessen gå over ubestemt tid.

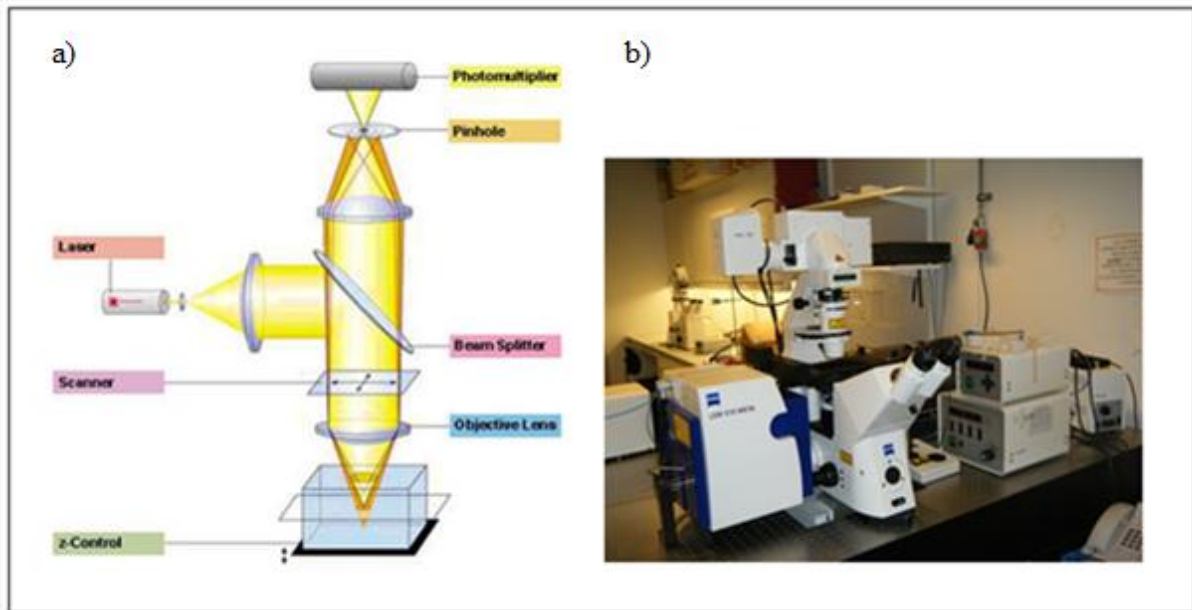
Dersom alle egenskaper til et system (temperatur, trykk, konsentrasjon av næringsstoffer og cellemasse) ikke varierer over tid har man en steady-state. Variablene i systemet vil da være uforandret over tid. Batch prosesser kan ikke operere ved steady-state. Forandringer i systemet gjør at egenskaper i systemet varierer med tid (Doran, 2008).

### 1.7.2 Konfokalmikroskopi

Konfokalmikroskopi er en teknikk som gjør det mulig å få tre-dimensjonale bilder av biologiske prøver. Teknikken benytter seg av en UV-laser som lyskilde. Når de fluorescerende molekylene i prøven blir bestrålt vil de gjennomgå en eksitasjon og dermed emittere lys. Emittert fluorescens separeres ved hjelp av såkalte “beamsplitters”.

Med konfokalmikroskopi kan man få bilder fra et tynt plan som kan være tynnere enn selve preparatet. Dette kalles optisk snitting. En “pinhole” som sitter konjugert til det fokale plan gjør at lys som ikke er i fokus filtreres bort, mens lys som er i fokus detekteres. Skanningshodet skanner punktvis over et område og samler alle pikselverdiene til et bilde som er et optisk snitting av området. Resultatet blir et bilde i x, y og z plan med høy kontrast og høy resolusjon. Gjennom forflytning av fokalt plan i z-aksen kan flere optiske snitt kombineres til et tre-dimensjonal bilde (Zeiss, Institutt for oral biologi, 2009). Prinsipp for konfokalmikroskopi og bilde av konfokalmikroskopet som ble benyttet i oppgaven er vist i figur 5.





Figur 5: a) Prinsipp for konfokalmikroskopi. Hentet fra Institutt for oral biologi (2009).  
b) Konfokalmikroskopet som ble benyttet i oppgaven, Zeiss LSM 510 Meta.

### 1.8 Avgrensning og mål for oppgaven

Formålet med denne oppgaven har vært å etablere teknikker for å studere *P. aeruginosa* biofilm. Dette har omfattet utprøving av metoder for biofilmdannelse i brønnplater og reaktorer, metode for kvantifisering av mengde biofilm, samt å etablere metoder for å studere biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi og høsting av celler for RT-PCR analyser.

Videre ble det valgt å studere pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa*, på grunn av denne sekundærmetabolittens korrelasjon til biofilmdannelse. Et delmål for oppgaven har vært å undersøke hvilke vekstbetingelser som gir lav og høy produksjon av pyocyanin og videre benytte disse betingelsene til å undersøke uttrykk av gener involvert i syntese av pyocyanin, både planktonisk og i biofilm.

I tillegg har oppgaven inkludert undersøkelse av mediets effekt på biofilmdannelse, produksjon av pyocyanin og uttrykk av utvalgte gener. Disse genene involverer gener som inngår i biofilmdannelse, pyocyaninproduksjon og quorum sensing.

I oppgaven ble det valgt å benytte stammene *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14. Siden *P. aeruginosa* PA14 produserer mer pyocyanin enn *P. aeruginosa* PAO1, er det valgt å sammenligne disse to stammene med hensyn på pyocyaninproduksjon, planktonisk vekst og biofilmdannelse.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Bakteriestammer

Tabell 1: Bakteriestammer benyttet i oppgaven

Bakteriestamme	Kilde
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	(Rainey and Bailey, 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	ATCC 15692
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	DTU Danmark
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 gfp-merket	DTU Danmark
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 gfp-merket	Merket ved hjelp av mini-Tn7, beskrevet under punkt 2.11

Stammene ble dyrket på LB-agar og fryst ned (-80 °C) som beskrevet under punkt 2.1.1.

#### 2.1.1 Tillaging av bakterieampuller

*Pseudomonas fluorescens* SBW25 ble dyrket i LB-medium (Tabell 2). Medium (100 ml) ble overført til en stor rystekolbe (Bellco, 500 ml) og inokulert med bakterier fra ampulle “*P. fluorescens* SBW25 WT 04.06.09 SHO” (100 µl). Kolben ble inkubert i rysteskap (Microtron) ved 25 °C, 200 rpm over natt (18 timer). Kultur ble blandet med steril glycerol (50 %, Sigma-Aldrich) til glycerol sluttkonsentrasjon på 15 %. Blanding ble overført til 20 cryorør, 1 ml pr. rør. Rørene ble nedfryst, -80 °C.

*P. aeruginosa* PAO1 ble dyrket i TSB-medium (Tabell 3). Medium (10 ml) ble overført til et sterilt 50 ml sentrifugerør (Sarstedt) og inokulert med bakterier fra ampulle “PaO1 ATCC 15692 (i TSB) VTO 13.11.09” (100 µl). Røret ble inkubert på skrå (45° helning) ved 37 °C, 999 rpm over natt (15 timer) i Microtron brønnplaterysteskap. OD<sub>600</sub> ble målt til 2,66 på Spectramax 384 Plus. Kultur ble blandet med steril glycerol (50 %, Sigma-Aldrich) til glycerol sluttkonsentrasjon på 15 %. Blanding ble overført til 20 cryorør, 1 ml pr. rør. Rørene ble nedfryst, -80 °C.

*P. aeruginosa* PA14 ble dyrket i LB-medium. Medium (10 ml) ble overført til et sterilt 50 ml sentrifugerør (Sarstedt). Bomullspinne med stamme “PA14” ble dyppet ned i et sterilt cryorør med medium og innholdet ble helt oppi røret. Røret ble inkubert på skrå (45° helning) ved 30 °C, 999 rpm over natt (17 timer). OD<sub>600</sub> ble målt til 2,83 på Spectramax 384 Plus. Kultur ble blandet med steril glycerol (50 %, Sigma-Aldrich) til glycerol sluttkonsentrasjon på 15 %. Blanding ble overført til 20 cryorør, 1 ml pr. rør. Rørene ble nedfryst, -80 °C.

*P. aeruginosa* PA14 gfp ble dyrket i LB-medium. Medium (10 ml) ble overført til et sterilt 50 ml sentrifugerør (Sarstedt) og tilsatt 50 µg/µl gentamicin (10 µl). Mediet ble inokulert med bakterier fra PIA plate m/gentamicin (se punkt 2.11). Røret ble inkubert på skrå (45° helning) ved 30 °C, 999 rpm over natt (16 timer). OD ble målt til 2,5 (600 nm) på Spectramax 384

Plus. Kultur ble blandet med steril glycerol (50 %, Sigma-Aldrich) til glycerol sluttkonsentrasjon på 15 %. Blanding ble overført til 20 cryorør, 1 ml pr. rør. Rørene ble nedfryst, -80 °C.

### 2.1.2 Tillaging av forkulturer

#### Forkulturer i rystekolber

Definert medium (100 ml) ble overført til ystekolbe (Bellco, 500 ml) og inokulert til 1 % med bakterier fra ampulle. Kolben ble satt i rysteskap (Termaks/Microtron), 25 °C (*P. fluorescens* SBW25)/ 37 °C (*P. aeruginosa* PAO1/PA14), 250 rpm over natt. r

#### Forkulturer i sentrifugerør

Definert medium (5/10 ml) ble overført til 50 ml sentrifugerør (Sarstedt) og inokulert til 1 % med bakterier fra ampulle. Rørene ble plassert på skrå (45 ° helning) i rysteskap (Microtron inkubatorskap for brønnplater), 37 °C, 999 rpm over natt.

## 2.2 Medier

Tabell 2: LB-medium

Komponent	Kons [g/l]	Produsent	Katalognr.
NaCl	5,0	Apotekproduksjon AS	31 41 53
Trypton	10,0	OXOID	LP 0042
Gjær ekstrakt	5,0	OXOID	LP 0021

Tabell 3: TSB-medium

Komponent	Kons [g/l]	Produsent	Katalognr.
TSB	30,0	OXOID	CM 0129

Tabell 4: Definert medium

Komponent	Kons [g/l]	ml/l	Produsent	Katalognr.
Glukose vannfri	9,0		Apotekproduksjon AS	30 92 29
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,25		Riedel-de Haën	31119
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7		Merck	1.04873.5000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O / MOPS *	5,4 /9,9		Sigma Aldrich	30435/ M1254
NaCl	2,7		Apotekproduksjon AS	31 41 53
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,0135		Sigma Aldrich	12022
MgCl <sub>2</sub>	0,18		Riedel-de Haën	31413
TMS-1/TMS-2 **		0,09 /9,8		

\*) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O ble brukt som buffer i forsøk beskrevet i punkt 3.1.1. MOPS ble brukt som buffer i resterende forsøk. \*\*) Det ble benyttet to spormineralblandinger i oppgaven, TMS-1 og TMS-2.

## Materialer og metoder

**Tabell 5: Spormineralblanding, TMS-1**

Komponent	g/l	ml/l	Kons. i mediet (g/l)	Produsent	Katalog nr.
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	5,0		5,0 * 10 <sup>-4</sup>	Riedel-de Haën	12354
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,39		3,9 * 10 <sup>-5</sup>	Riedel-de Haën	31293
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,44		4,4 * 10 <sup>-5</sup>	Merck	1.0883.0500
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,15		1,5 * 10 <sup>-5</sup>	Riedel-de Haën	31425
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,010		1,0 * 10 <sup>-6</sup>	Riedel-de Haën	31439
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,020		2,0 * 10 <sup>-6</sup>	Riedel-de Haën	31277
HCl (37 %)		50		Sigma-Aldrich	30721
IF-vann		950			

**Tabell 6: Spormineralblanding, TMS-2**

Komponent	g/l	ml/l	Kons. i mediet [g/l]	Produsent	Katalog nr.
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	0,5		5,0 * 10 <sup>-3</sup>	KEBO lab	20 296 291
FeCl <sub>2</sub>	0,0918		9,18 * 10 <sup>-4</sup>	Riedel-de Haën	12318
ZnCl <sub>2</sub>	0,005		5,0 * 10 <sup>-5</sup>	Riedel-de Haën	31650
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,003		3,0 * 10 <sup>-5</sup>	Riedel-de Haën	31422
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,003		3,0 * 10 <sup>-5</sup>	Merck	165
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,02		2,0 * 10 <sup>-4</sup>	Riedel-de Haën	31277
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,001		1,0 * 10 <sup>-5</sup>	Merck	1.02733.0250
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,002		2,0 * 10 <sup>-5</sup>	Riedel-de Haën	31462
NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,003		3,0 * 10 <sup>-5</sup>	Riedel-de Haën	31439
HCl (37 %)		950		Sigma-Aldrich	30721
IF-vann		50			

**Tabell 7: Vitaminløsning, laget av SINTEF**

Komponent	g/l i mediet	Produsent
Pyridoksin HCl	1,8 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Thiamin HCl	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Riboflavin	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Niacinamid	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
D-la-pantotenat	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
p-amino-bensosyre	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Na-liponsyre	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Biotin	1,8 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Folsyre	1,8 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
Vitamin B <sub>12</sub>	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	Sigma Aldrich
2-mercaptoetan sulfonsyre	4,5 × 10 <sup>-5</sup>	MP Bio-medicals

Tillaging av medier er beskrevet i vedlegg A.

### 2.3 Agarplater

Tabell 8: LA-plater

Komponent	Kons [g/l]	Produsent	Katalognr.
NaCl	5,0	Apotekproduksjon AS	31 41 53
Trypton	10,0	OXOID	LP 0042
Gjær ekstrakt	5,0	OXOID	LP 0021
Agar No. 1	20	OXOID	LP 0011

Tabell 9: PIA-plater

Komponent	Kons [g/l]	Produsent	Katalognr.
Difco <sup>TM</sup> Pseudomonas			
Isolation Agar	45,0	BD	292710
Glycerol, 99,5%		AnalaR	
Bidistillied	20 ml/l	NORMAPUR	24388.295

## 2.4 Dyrking av flytende kultur i dypbrønnsplater

Forkulturer ble satt som beskrevet under punkt 2.1.2. Forkulturer i sentrifugerør.

Det ble benyttet dypbrønnplater med 96 brønner i hver plate. Hver brønn ble tilsatt medium (0,5 ml) og inokulert fra oppvekst over natt (40 µl, 8 %). Konsentrasjoner av de ulike komponentene i mediet er variert som beskrevet i tabell 10. Platene ble dyrket ved henholdsvis 30 og 37 °C ved 900 rpm. Det ble tatt prøver to ganger i løpet av vekstfasen for måling av OD i medium (punkt 2.8.1) og for måling av pyocyaninkonsentrasjon i supernatant. Kultur (100 µl) ble overført til 96-brønnsplate (Nunc<sup>TM</sup>). OD ble målt ved 600 nm på Spectramax 384 Plus brønnplateleser. Etter avlesning ble platene sentrifugert (4000 rpm, 10 min) i Thermo Scientific SL40R Centrifuge og supernatanten ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (Sarstedt). Rørene ble fryst ned (-80 °C). De nedfryste prøvene ble tint på is, sentrifugert (4000 rpm, 5 min), supernatant ble avpipettert til Agilent rør (Agilent Technologies) og pyocyaninkonsentrasjonene ble målt ved hjelp av massespektrometri (Punkt 2.8.2).

**Tabell 10: Forsøksoppsett, dyrking av flytende kultur i dypbrønnsplater. Oversikt over de ulike mediene og konsentrasjoner av enkeltkomponenter, volum medium i hver brønn og pH på medium**

Medium	Variable	Glukose (g/l)	((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	O <sub>2</sub> -nivå (ml)	pH
1	pH = 5,5	9,00	2,25	2,70	0,50	5,5
2	pH = 6,4/ O <sub>2</sub> nivå 1	"	"	"	0,50	6,4
3	pH = 7,5	"	"	"	0,50	7,5
4	O <sub>2</sub> nivå 2	"	"	"	0,75	6,4
5	O <sub>2</sub> nivå 3	"	"	"	1,00	"
6	Glukose	6,75	"	"	0,50	"
7	Glukose	4,50	"	"	"	"
8	Glukose	2,25	"	"	"	"
9	Nitrogen	9,00	1,35	"	"	"
10	Nitrogen	"	0,675	"	"	"
11	Fosfat	"	2,25	0,225	"	"
12	Fosfat	"	"	0,09	"	"

### 2.5 Dyrking av flytende kultur i rysteflasker

Forkulturer ble satt som beskrevet under punkt 2.1.2. Forkulturer i rystekolber.

Det ble benyttet rystekolber (Bellco, 250/500 ml). Hver kolbe ble tilsatt medium (50/100 ml) og inokulert fra oppvekst over natt til standard 2 % ved OD 2. Konsentrasjoner av de ulike komponentene i mediene ved de ulike forsøkene er variert som beskrevet under punkt 3.2 og 3.3. Kolbene ble inkubert ved 37 °C, 200-250 rpm.

Det ble tatt prøver underveis i vekstfasen for måling av OD i medium (Punkt 2.8.1) og for måling av pyocyaninkonsentrasjoner og glukosekonsentrasjoner i supernatant. Uttak av prøver for måling av pyocyaninkonsentrasjoner ble utført på to måter. Ved den ene måten ble kultur (100 µl) overført til 96-brønnsplater (Nunc<sup>TM</sup>). Platen ble sentrifugert (4000 rpm, 10 min) og supernatant ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (Sarstedt). Rørene ble fryst ned (-80/-20 °C). De nedfryste prøvene ble ting i romtemperatur, sentrifugert (4000 rpm, 5 min) i Thermo Scientific SL40R Centrifuge, supernatant ble avpipettert og overført til Agilentrør (Agilent Technologies). Pyocyaninkonsentrasjoner ble målt ved hjelp av massespektrometri (punkt 2.4.2).

Ved den andre måten ble kultur (1 ml) ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (Sarstedt). Rørene ble sentrifugert (13 000 rpm, 2 min) i eppendorf centrifuge 5417R og supernatant ble sterilfiltrert gjennom Whatman filter (0,2 µm, 30 mm) over i nye 1,5 ml eppendorfrør. Rørene ble fryst ned (-20 °C). De nedfryste prøvene ble tint i romtemperatur og overført til Agilentrør (Agilent Technologies). Pyocyaninkonsentrasjoner ble målt ved hjelp av massespektrometri (punkt 2.8.2).

Uttak av prøver for måling av glukosekonsentrasjon ble utført ved å overføre kultur (1 ml) til 1,5 ml eppendorfrør. Rørene ble sentrifugert (13 000 rpm, 2 min) i eppendorf centrifuge 5417R og supernatant ble sterilfiltrert gjennom Whatman filter (0,2 µm, 30 mm) over i nye 1,5 ml eppendorfrør. Rørene ble fryst ned (-20 °C). De nedfryste prøvene ble ting i romtemperatur og overført til Shimadzu rør (Holger Teknologi). Glukosekonsentrasjoner ble målt ved hjelp av HPLC (punkt 2.8.3).

Uttak av prøver for RT-PCR ble utført som beskrevet under punkt 2.9.1.



### 2.6 Dyrking av biofilm i brønnplater

Dyrking av biofilm i brønnplater ble utført i en-, 6-, 24- og 96-brønnsplater (Nunc™). Platene ble dyrket statisk eller med rysting (140 rpm i Microton brønnplaterysteskap)

Forkulturer ble satt som beskrevet under punkt 2.1.2. Forkulturer i rystekolber.

*P. aeruginosa* PAO1/*P.aeruginosa* PA14 ble dyrket under forskjellige betingelser i en-brønnsplater, 6 brønnplater og 24-brønnsplater (Nunc™). Konsentrasjon av de ulike komponentene ble variert som beskrevet i resultatdelen (Punkt 3.4.2). Medium ble overført til 50 ml sentrifugerør (Sarstedt) og inokulert med *P. aeruginosa* PAO1/*P. aeruginosa* PA14 fra oppvekst over natt til  $OD_{600} = 0,08-0,1$ . Kultur (3 ml) ble overført til hver brønn. Brønnplatene ble inkubert 37 °C, statisk/140 rpm.

Det ble tatt prøver underveis i biofilmutviklingen for måling av OD i medium (se punkt 2.8.1) og for måling av pyocyaninkonsentrasjon og glukosekonsentrasjon i supernatant. Uttak av prøver for måling av pyocyaninkonsentrasjoner og glukosekonsentrasjoner ble utført på samme måte som beskrevet under punkt 2.7. Måling av glukosekonsentrasjoner ved hjelp av strips ble utført med Accu-Chek glukosestrips fra Roche.

Uttak av biofilm for RT-PCR ble utført som beskrevet under punkt 2.9.1. For konfokalmikroskopi ble biofilm dyrket i 24-brønnsplate med glassbunn (MatTek Corporation).

### 2.7 Dyrking av biofilm i minireaktor

*P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 ble dyrket i minireaktorer, utviklet av SINTEF (Figur 6). Fermentorene ble inokulert fra oppvekst over natt i definert medium til OD 0,1. Det ble benyttet en reaktor for hver stamme. Reaktorene ble plassert i vannbad, 37 °C. 24 objektglass var plassert i stativ i hver reaktor. En jevn flow av medium ga kontinuerlig tilførsel av næring som tillot biofilmvekst på objektglassene. Tabell 11 gir en oversikt over forsøksbetingelsene. For konsentrasjoner av enkeltkomponenter foruten de nevnt i tabellen, se definert medium (Tabell 4). Figur 7 viser forsøksoppsettet.



Figur 6: Minireaktor og holder for objektglass.

Tabell 11: Forsøksbetingelser for biofilmfermentering i minireaktor

Forsøksbetingelser	Verdi
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g/l
Glukose	1,0 g/l
Buffer: MOPS	9,0 g/l
pH	7,0
Flow, variasjonsområde	PAO1: 0,93-2,28 g/min. PA14: 1,37-2,52 g/min

Hver dag i tre dager ble det tatt ut prøve av biofilm for RNA-isolering, prøve for måling av OD i biofilm, samt mediumprøve for måling av OD, pH og pyocyanin.

For RNA uttak ble RNA protect (10 ml) overført til to petriskåler, en for hver stamme. 3 objektglass fra hver stamme ble tatt ut fra fermentorene ved hjelp av pinsett, dyppet i NaCl (0,9 %) for å skylle av medium og lagt i petriskål. Biofilmen på objektglassene ble skrapet av ved hjelp av spatel. Alt ble helt over i 15 ml. sentrifugerør, rørene ble sentrifugert ved 4000 rpm, 15 min. Supernatant ble helt av og pellettene ble fryst ned (-80 °C).

Uttak av prøve for måling av OD i biofilm ble utført på to måter. Ved første uttak ble NaCl (0,9 %, 15 ml) overført til to petriskåler, en for hver stamme. 2 objektglass fra hver stamme ble tatt ut fra fermentor, dyppet i NaCl (0,9 %) for å skylle av medium og lagt i petriskål. Biofilmen på objektglassene ble skrapet av ved hjelp av spatel. NaCl/biofilm ble deretter overført til kyvette og OD ble målt ved 600 nm på Spectramax 384 Plus. De to neste uttakene

ble utført ved å ta ut et objektglass og legge det i et 50 ml. sentrifugerør. NaCl (0,9 %, 1 ml) ble overført til sentrifugerøret. Pasterurpipette ble brukt for å få løsnet film fra objektglassene. NaCl/biofilm ble blandet godt, overført til kyvette og OD ble målt ved 600 nm på Spectramax 384 Plus.

For måling av OD i mediet ble medium overført til 2 ml eppendorfrør. Noen dråper medium ble dryppet på pH papir for måling av pH. pH ble i tillegg målt på pH-meter (Portable pH-meter PHM201). Medium ble overført til mikrokyvetter og OD<sub>600</sub> ble målt på Spectramax 384 Plus. Innhold i kyvetter ble overført tilbake til 2 ml eppendorfrør, rørene ble sentrifugert ved 13000 rpm, 2 min. Supernatanten ble filtrert gjennom Whatman filter (0,2 µm, 30 mm) og fryst ned (-80 °C). De nedfryste prøvene ble tint i romtemperatur og overført til Agilentrør (Holger Technologies). Pyocyaninkonsentrasjoner ble målt ved hjelp av massespektrometri (punkt 2.8.2).

For uttak av objektglass for konfokalmikroskopi ble objektglass brekt i to ved hjelp av tang og halvdelen av glass med biofilm ble plassert oppå tapestykker i en liten petriskål (Willco Dish).



**Figur 7: Oppsett for dyrking av biofilm i minireaktor. To minireaktorer, for dyrking av henholdsvis *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa*, plassert i vannbad (37 °C).**

### 2.8 Analyser

#### 2.8.1 Cellevekst

##### OD måling i kyvette

Bakteriekultur (1 ml) ble overført til mikrokvyette (Sarstedt) og OD ble målt på Spectramax Plus/Spectramax 384 Plus brønnplateleser ved 600 nm. Ved OD over 0,4 ble prøvene fortynnet i 0,9 % NaCl.

##### OD måling i brønnplateleser

Bakteriekultur (75-125 µl) ble overført til 96-brønnsplate (Nunc™) og OD ble målt på Spectramax Plus/Spectramax 384 Plus brønnplateleser ved 538, 600 og 660 nm. Se vedlegg C for omregningsfaktor mellom OD i brønn ved de ulike bølgelengdene og OD i kyvette.

##### Tørrvekt

For å få en korrelasjon mellom OD og tørrvekt ble rystekolbeforsøk utført med OD målinger og tørrvektstuttak underveis i vekstfasen. Se vedlegg E for beregning av korrelasjon mellom OD og tørrvekt.

Definert medium (100 ml) ble overført til rystekolbe (Bellco, 500 ml) og inokulert med *P. fluorescens* SBW25/*P. aeruginosa* PAO1/*P. aeruginosa* PA14 fra oppvekst over natt (1 ml, 1 %). Rystekolbene ble inkubert ved 30 °C (*P. fluorescens* SBW25) og 37 °C (*P. aeruginosa* PAO1/*P. aeruginosa* PA14), 200/250 rpm. Det ble tatt ut prøver hver time underveis i vekstfasen for måling av OD i kyvette (600 nm) på Spectramax Plus/Spectramax 384 Plus og for beregning av tørrvekt. For beregning av tørrvekt ble kultur (10/25 ml) tatt ut og overført til 15 ml sentrifugerør. Røret ble sentrifugert 15 min, 4500 rpm på Thermo Scientific SL40R Centrifuge. Supernatant ble helt av og pellett ble vasket med IF-vann. Røret ble sentrifugert på nytt i 15 min, 4500 rpm. Supernatant ble helt av og innhold i rør ble overført til forveide tørrvektsskåler. Skålene ble plassert i inkubatorskap (105 °C) i 24 +/- 1 time. For *P. aeruginosa* PAO1/*P. aeruginosa* PA14 ble metanol (Sigma Aldrich) tilsatt skålene og skålene ble satt i avtrekksskap ca. 45 min før de ble satt i inkubatorskap.

### 2.8.2 Massespektrometri

Massespektrometri er en kjemisk analysemetode som gjør det mulig å bestemme atomers og molekylers masse, identifisere kjemiske forbindelser og bestemme konsentrasjoner av grunnstoffer, isotoper og kjemiske forbindelser.

I et massespektrometer blir molekylene i prøven gitt elektrisk ladning og brutt opp i fragmenter. De dannede ionene separeres så etter forskjellige  $m/z$ -verdier ( $m$  = ionets masse,  $z$  = ionets ladning) og registreres av en detektor. Signalet fra detektoren gis vanligvis i form av et massespektrum; ionestrøm som funksjon av  $m/z$ -verdi som registreres på en dataskjerm. Ved kvantitative bestemmelser måler man ionestrømmen ved en gitt  $m/z$ -verdi for den aktuelle forbindelsen eller grunnstoffet (Holtebekk et al.).

Kvantitativ analyse av pyrocyanin ble utført på “Agilent 1290 Infinity LC” massespektrometer med “Agilent 6460 Triple Quadrupole MS” detektor. Stasjonær LC fase var en Zorbax Eclipse Plus C18, RRHD 2,1\*50 mm. med 1,8  $\mu$ m partikkelstørrelse kolonne (Agilent) og isokratisk mobilfase var 10 % metanol i 25 mM maursyre med en gjennomstrømningshastighet på 0,6 ml/min og en kolonne temperatur på 25 °C. Analysen ble utført med positiv ionisering. Pyrocyanin standard var fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### 2.8.3 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

HPLC er en væskechromatografisk metode som separerer lavmolekylære forbindelser som organiske syrer, sukker og alkoholer.

Kvantitativ analyse av glukose ble utført på følgende Shimadzu HPLC system:

Autoinjektor: Shimadzu SIL-9A

Pumpe: Shimadzu LC9A

Ovn: Shimadzu CTI6A

RI-detektor: Shimadzu RID6A

UV-detektor: Shimadzu UV SPD6A

Kolonnen som ble benyttet var Biorad HPX-87H fra Aminex. Den mobile fasen var 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Flowen var på 0,6 ml/min og temperaturen var 45 °C. Detektoren var RI + UV (210 nm). Glukosestandard (4,5 og 10 g/l) var fra Analox Instruments Ltd.

### 2.8.4 CV-farging – for kvantifisering av biofilm

96-brønnsplater ble inokulert med *P. aeruginosa* PAO1/*P. aeruginosa* PA14 fra oppvekst over natt (se punkt 2.1.2) i definert medium til OD 0,1. Fortynnet kultur ble overført til 96-brønnsplater (Nunc<sup>TM</sup>), 100 µl pr. brønn. Platene ble inkubert ved 37 °C, statisk i 5, 6, 10, 12, 24, 30 og 35 timer. Mengde biofilm dannet ble kvantifisert ved å tilsette 25 µl krystallfiolett (1 %) til hver brønn med multikanalpipette (Biohit). Platene ble inkubert i romtemperatur i 15 min. 125 µl ble pipettert ut fra brønnene. Brønnene ble rensset med IF-vann (3 x 100 µl). 96 % etanol (200 µl) ble tilsatt hver brønn for å løsne biofilmen fra veggene. 125 µl fra hver brønn ble pipettert over til en ny 96-brønnsplate (Nunc<sup>TM</sup>) og absorbans ble avlest på Spectramax 384 Plus brønnplateleser ved 600 nm.

6-brønnsplater ble inokulert med *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 fra oppvekst over natt i definert medium til OD 0,1. Fortynnet kultur ble overført til 6 brønnsplater (Nunc<sup>TM</sup>), 3 ml. pr. brønn. Platene ble inkubert ved 37 °C, 140 rpm. Mengde biofilm dannet ble kvantifisert ved å ta av medium og tilsette 3,75 ml. krystallfiolett (0,2 %) til hver brønn. Platene ble inkubert i romtemperatur i 15 min. 3,75 ml ble pipettert av og brønnene ble rensset med IF-vann (3 x 3,0 ml). 96 % etanol (6,0 ml) ble tilsatt hver brønn for å løsne biofilmen fra veggene. 125 µl fra hver brønn ble pipettert over til en 96-brønnsplate (Nunc<sup>TM</sup>) og absorbans ble avlest på Spectramax 384 Plus brønnplateleser ved 600 nm.

## 2.9 Real Time PCR

Real Time PCR er en teknikk som gjør det mulig å amplifisere og kvantifisere et PCR produkt. Det som skiller Real Time PCR fra vanlig PCR er at det amplifiserte DNA detekteres etter hvert som reaksjonen skjer, det vil si i ”real time”. RT-PCR tillater en kvantifisering av det absolutte antall amplifiserte molekyler, samt en relativ kvantifisering som viser mengde amplifiserte molekyler i forhold til en intern kontroll.

Prinsippet for RT-PCR er basert på økning av fluorescens, produsert av et ”reportermolekyl”, etter hvert som reaksjonen går. Disse fluorescerende reportermolekylene er farger som binder seg til dobbeltrådet DNA.

PCR amplifisering involverer syntese av spesifikke cDNA målsekvensene ved hjelp av to korte primere (oligonukleotider) som binder seg til cDNAet på motsatt tråd av hverandre. Oppstrøms (reverse) PCR primer vil være komplementær til 3’ enden på ”first-strand cDNA” (eller identisk med 5’ enden på mRNAet). Denne primeren vil syntetisere den andre tråden på cDNAet (”second-strand cDNA”). Nedstrøms (forward) PCR primer er komplementær til 3’ enden av second-strand cDNA (eller til 3’ enden av mRNA) og brukes til å syntetisere first-strand cDNA. Primerene er merket med et reporter molekyl (McPherson og Møller, 2006).

Real Time PCR ble utført på RT-PCR instrument fra Applied Biosystems. SYBR green (Applied Biosystems) ble benyttet som reportermolekyl og 16S rRNA ble benyttet som internkontroll.

### 2.9.1 RNA-uttak

For høsting av celler for RNA isolering ble Qiagen RNeasy Protect Bacteria Reagent benyttet.

#### **RNA-uttak fra flytende kultur**

For RNA-uttak fra flytende kultur ble to volumenheter RNA-protect tilsatt for hver volumenet bakteriekultur, for stabilisering av RNA. Blandingen ble vortexet, inkubert 5 min i romtemperatur og sentrifugert (4000 rpm, 15 min) på Thermo Scientific SL40R Centrifuge. Supernatant ble helt av og pelletten ble fryst ned (-80 °C).

#### **RNA-uttak fra biofilm**

For RNA-uttak fra biofilm ble medium i brønnplater pipettert av. Brønnene ble tilsatt RNA-protect (1 ml). Biofilmen ble skrapet av fra brønnplateveggene ved hjelp av en spatel. Innhold ble overført til sentrifugerør, vortexet og sentrifugert (4000 rpm, 15 min). Supernatant ble helt av og pelletten ble fryst ned (-80 °C).

### 2.9.2 Isolering av RNA

For isolering av RNA ble Qiagen RNeasy Mini Kit benyttet. Protokoll 1 ble benyttet for enzymatisk bakterielysering og protokoll 7 ble benyttet for isolering av total RNA fra bakterielysat.

#### **Protokoll 1:**

Celleveggen ble først enzymatisk degradert ved hjelp av det lytiske enzymet lysozym. TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ble tilsatt lysozym (1 mg/ml). TE buffer med lysozym (100-500 µl) ble tilsatt bakteriepelletten. Røret ble vortexet i 10 sek, inkubert 5 min i romtemperatur og vortexet i 10 sek. hvert 2. minutt i løpet av inkuberingen. 100 µl ble overført til eppendorfrør. 350 µl Buffer RLT (tilsatt 10 µl β-mercaptoetanol per 1 ml Buffer) ble tilsatt og røret ble vortexet godt. Etanol (96 %, 250 µl) ble tilsatt og innholdet i røret ble blandet ved å riste på røret.

#### **Protokoll 7:**

Lysat (700 µl) som var blitt dannet fra protokoll 1 ble overført til RNeasy Mini spin kolonne plassert i et 2 ml samlerør. Kolonnen ble sentrifugert 13000 rpm, 15 sek. Filtratet ble tømt ut og samlerøret ble brukt i neste trinn. Buffer RW1 (700 µl) ble tilsatt kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert 13000 rpm, 15 sek. for å vaske kolonnenmembranen. Samlerøret ble så kastet. Kolonnen ble plassert i et nytt samlerør. Buffer RPE m/4 volumenheter etanol (500 µl) ble tilsatt og kolonnen ble sentrifugert 13000 rpm, 15 sek. for å vaske kolonne membranen. Filtratet ble tømt ut og samlerøret ble brukt videre i neste trinn. Buffer RPE tilsatt 4 volumenheter etanol (500 µl) ble tilsatt og kolonnen ble sentrifugert 13000 rpm, 2 min. for å vaske kolonnenmembranen. Kolonnen ble plassert i et 1,5 ml. Eppendorfrør. RNase-fritt vann (30 µl) ble tilsatt og kolonnen ble sentrifugert 13000 rpm, 1 min. for og eluere RNA.

RNA-konsentrasjoner ble målt på NanoDrop Spectrophotometer ND-1000. Program: "Nucleic acids".

### 2.9.3 DNA free protokoll

Etter RNA-isolering ble DNA fjernet fra RNA ved hjelp av Turbo DNA-free™ kit fra Ambion.

RNA ble fortynnet med nuklease-fritt vann til RNA konsentrasjon 3 µg (totalt 25 µl). 10x DNase I buffer (2,9 µl) og DNase (1 µl) ble tilsatt. Blandingen ble inkubert ved 37 °C i 30 min. DNase inactivating Reagent (5 µl) ble tilsatt. Blandingen ble inkubert 2 min. i romtemperatur og det ble knipset på røret for å blande i løpet av inkuberingsstiden. Røret ble sentrifugert 1 min, 13 000 rpm, Supernatant ble pipettert over i et nytt eppendorfrør.

### 2.9.4 cDNA syntese

cDNA ble syntetisert fra DNA-fritt RNA ved hjelp av First-Strand cDNA Synthesis Kit fra GE Healthcare. Reagensene som ble benyttet var Bulk first-strand cDNA reaction mix, DTT (dithiotreitol) og primer (pd(N)<sub>6</sub>). Syntese av first-strand cDNA blir utført ved at primer (pd(N)<sub>6</sub>) hybridiseres til 3'-enden på RNA-tråden. Enzymet revers transkriptase i Bulk First-Strand cDNA reaction mix katalyserer så syntese av DNA-tråder som er komplementære til RNA templatene. Primer (pd(N)<sub>6</sub>) mix er en blanding av heksadeoxynukleotider som inngår i dannelsen av cDNA. Disse "festes til" 3'-enden på oligo-dT primeren (McPherson og Møller, 2006).

DNA-fritt RNA ble fortynnet 10 ganger i nukleasefritt vann. Det fortynnede RNA ble varmet i varmeblokk ved 65 °C i 10 min. Etter inkuberingsstiden ble RNA satt på is for avkjøling. 8 µl av RNA ble overført til rør med Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix (5µl), DTT (1 µl) og primer (pd(N)<sub>6</sub>) (1 µl). Blandingen ble inkubert i vannbad ved 37 °C i en time.

### 2.9.5 Primere for RT-PCR

En primer er en kort nukleotidsekvens (typisk 16-28 nukleotider) som fungerer som startpunkt for DNA-syntese. Primeren er komplementær til templat tråden og har en 3' ende hvor nukleotider "knyttes på" under DNA-syntese ved hjelp av DNA polymerase. Det er visse krav til primere. Lengden på primerene bør være såpass høy at det gir god spesifisitet til målsekvensen. En primer bør inneholde omtrent like mange av hver nukleotid, unngå repeterbare sekvenser, unngå repetisjon 3 eller flere G'er eller C'er ved 3'-enden (da det kan føre til misparing i GC-rike områder). Primerene bør i tillegg ikke kunne danne sekundære strukturer på grunn av komplementaritet innad i samme primer og ikke inneholde sekvenser på 3'-enden som basepare med seg selv (McPherson and Møller, 2006).

For å finne gensekvenser ble databasene [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) og NCBI benyttet. For design av primere ble programmet Primer express benyttet. Tabell 12 og 13 gir en oversikt over primerne som ble benyttet i oppgaven.



## Materialer og metoder

**Tabell 12: Primere benyttet for RT-PCR i *P. fluorescens* SBW25**

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>16 S rRNA</i>	5'-CGCGCGTAGGTGGTTTGT-3'	5'-TTTGAATGCAGTTCCCAGGTT-3'
<i>epsB</i>	5'-TGGGCTCGGTGCTGTTTC-3'	5'-TCGACGCGATACACCAACTG-3'
<i>pilA</i>	5'-TTTACCCTGATCGAGCTGTTGA-3'	5'-ATGGGCAGGCCAATGGT-3'
<i>fliP</i>	5'-GCGCCGTTGACCATCCT-3'	5'-TTTGGAACGCCGTCTTCAAT-3'
<i>ndvB</i>	5'-CGCGGTGGCAATGAAAC-3'	5'-TCACCAGTGTGCGCAGATAAA-3'

**Tabell 13: Primere benyttet for RT-PCR i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14**

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>16 S rRNA</i>	5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3'	5'-CGCGCTTTACGCCCAGTA-3'
<i>epsB</i>	5'-ACGCTGCGCCCTCAGA-3'	5'-ATAGCGGAACTTCTTGGAGAAATC-3'
<i>pilA</i>	5'-TGCGCGTTCGGAAGGT-3'	5'-CGACTCTTCAACAGTGGTCTTCA-3'
<i>fliP</i>	5'-CCAGGGCCAGCAGGAGTAT-3'	5'-AGCTCAGCGCGGTCATG-3'
<i>ndvB</i>	5'-CCTTCATCGATTTCAAGAAGCA-3'	5'-GTCGGTATGCCGCTTCATG-3'
<i>phzM</i>	5'-ATGCCGAGCGCATCCAT-3'	5'-GGTATCGCCCTGGAAGATCTC-3'
<i>phzS</i>	5'-CCGACCGCCAACAAGATC-3'	5'-GCGGCCCATTCCTCTTTT-3'
<i>phzE</i>	5'-CCTCGACAACCGCAAGGA-3'	5'-ATCCGCGCCATCATCTTC-3'
<i>lasI</i>	5'-AGCTTCTGCACGGCAAGG-3'	5'-GAAACGGCTGAGTCCCAGAT-3'
<i>rhII</i>	5'-CAGTTCGACCATCCGCAA-3'	5'-AGATGCCCTGGCGGC-3'

### 2.10 Gfp-merking av *P. aeruginosa* ved hjelp av mini-Tn7 merkesystem

For å Gfp-merke *P. aeruginosa* PA14 ble et mini-Tn7 merkesystem benyttet. Protokollen som ble brukt er utviklet av BioCentrum-DTU i Danmark. Merkesystemet baserer seg på å overflytte Tn7-transposon fra et delivery plasmid til stammen som skal merkes. Transposonet blir innsatt som en kopi. attTn7-setet for hvor transposonet settes inn er lokalisert nedstrøms for den kodende regionen til genet *glmS*. Tn7-GlmS produserer et DNA-fragment på omtrent 150 basepar. Donor plasmid HB101 pBK mini Tn7 Gfp er en pUC 19 derivat. Plasmidet har et Tn7 transposon som er lokalisert mellom transposon endene Tn7L og Tn7R. DNA mellom disse transposon endene inneholder også fluorescens gener og gener for antibiotikaresistens. I tillegg har plasmidet en *mob*-region som er nødvendig for å kunne mobilisere plasmidet fra en bakterie til en annen ved hjelp av RP4/RK2 overføringsgener på plasmid pRK600. Hjelpelasmid pUX-BF13 har Tn7 transposase gener (*tnsABCDE*). Dette plasmidet har i tillegg resistens mot ampicillin og *mob*-region.

For å merke en stamme må både donor plasmid og hjelpelasmid innføres i og være tilstede i mottakerstammen samtidig. Mini-Tn7 transposonet kan da overføres til et spesifikt sete på kromosomet ved hjelp av transposase genene. Den innsatte sekvensen vil være stabil, mens de to plasmidene vil dø, ettersom de ikke kan replikere i pseudomonas stammer.

Følgende stammer ble brukt til merking av *P. aeruginosa* PA14:

- *E. coli* pUXBF13 (hjelpelasmid med transposase gener)
- *E. coli* pBK mini Tn7 Gfp2 (donorplasmid med transposon)
- *E. coli* pRK600 (plasmid med RP4/RK2 overføringsgener)
- *P. aeruginosa* PA14

Bakterier fra bakterieampulle *P. aeruginosa* PA14 ble dyrket på PIA-plate i 3 døgn. De fire stammene ble dyrket over natt ved å overføre LB-medium (20 ml) til 125 ml rystekolbe (Pyrex) og inokulert med bakterier fra agar-plate. pUXBF13 og pBK mini Tn7 Gfp2 ble dyrket med 20 µl ampicillin (100 µg/µl) og pRK600 ble dyrket med 10 µl chloramfenicol (30 µg/µl). Stammene ble dyrket ved 37 °C, 250 rpm. Morgenen etter ble *P. aeruginosa* PA14 kultur (0,5 ml) inokulert i LB-medium (10 ml) i tett rør og inkubert 41 °C, statisk. Etter 3 timer ble *E. coli* stammene (0,5 ml fra hver) inokulert i LB-medium (10 ml) i 125 ml rystekolber og inkubert 30 °C, 250 rpm. Etter 4 timer ble 3 blandinger av 1:1:1:1 (1 ml av hver stamme) ratio blandet og overført til 3 filtre (MILLIPORE Membrane Filter, 0,45 µm, 47 mm), plassert på filteroppsats. Filtrene ble plassert på 3 forvarmede LA-plater og platene ble inkubert ved 30 °C, 37 °C og 42 °C over natt. Det samme ble gjort for en negativ kontroll for å teste vekst av bakterie som ikke er blitt merket. Neste dag ble det laget fortynningsrekke fra de tre platene ( $10^0$ ,  $10^{-1}$  og  $10^{-2}$  fortynninger). Fortyningene ble så platet ut på PIA-plater m/Gentamicin og inkubert ved 37 °C. Dagen etter ble det kun observert enkeltkolonier på plate med  $10^{-2}$  fortyning fra plate som ble inkubert 30 °C. Koloniene fra denne plata ble restryket over på 4 nye oppdelte PIA plater m/Gentamicin (til sammen 8 felt) og inkubert over natt, 37 °C.

### 2.10.1 PCR

PCR innebærer en amplifisering av DNA-molekyler *in vitro*. For å kunne kjøre PCR må man vite nukleotidsekvenser rundt den sekvensen man er interessert i å amplifisere. Syntetiske oligonukleotider som er komplementære til de kjente sekvensene brukes til å prime amplifisering av den mellomliggende sekvensen. PCR foregår i tre trinn, med 3 forskjellige temperaturer. Hvert trinn repeteres flere ganger. I det første trinnet (94-96 °C) denatureres DNA, slik at det dobbelttrådede templat DNA separeres til komplementære enkeltråder. I det andre trinnet (50-60 °C) blir templattrådene hybridisert med oligonukleotider som fungerer som primere. I det tredje trinnet (70-72 °C) foregår DNA syntese. En varmestabil DNA polymerase, *Taq polymerase* brukes til å replikere DNA sekvensen av interesse. Primerene forlenges med fire deoxynukleotider (dATP, dGTP, dCTP og dTTP). Primerene har 3'-OH ender som tillater DNA syntese. Denne prosedyren repeteres mange ganger (McPherson og Møller, 2006).

Det ble kjørt PCR for å undersøke om transposonet hadde blitt innsatt i det spesifikke attTN7 setet. PCR ble utført med en primer som binder seg til 3'-enden av *glmS*. Nukleasefritt vann (50 µl) ble tilsatt 9 stk. sterile eppendorfrør. Bakteriekolonier fra de 8 feltene fra agarplatene, samt fra en plate med *P. aeruginosa* PA14 ble resuspendert i vannet. Rørene ble satt på varmeblokk (98 °C), 10 min. PCR mixer ble laget ved å blande følgende komponenter: 10x PCR-buffer (5,0 µl), dNTP (10 mM, 1,0 µl), Primer 1: Tn7-Glms (10 pmol/µl 2,0 µl), Primer 2: Tn7-RR 109 (10 pmol/µl, 2,0 µl), Taq DNA polymerase (5 units/µl, 0,5 µl) og nuklease fritt vann (39,5 µl). PCR ble kjørt på Eppendorf Mastercycler personal fra VWR (Tabell 14). Etter PCR ble prøvene tilsatt loading buffer (6 µl) for å kunne visualisere PCR produkt ved hjelp av gel-elektroforese (Punkt 2.10.2).

**Tabell 14: PCR program.**

Temperatur (°C)	Tid	Trinn	Ant. sykluser
96	5 min		
96	30 sek	Denaturering	} 25
53	30 sek	Annealing	
72	30 sek	DNA syntese	
72	5 min	DNA syntese	

### 2.10.2 Gelelektroforese

Gel-elektroforese er en metode som brukes til å separere molekyler som proteiner og DNA, basert på deres størrelse. Prøves avsettes på en gel (vanligvis polyakrylamid eller agarose), som plasseres i et elektrisk felt. Positivt ladete molekyler vandrer mot katoden, mens negativt ladete molekyler vandrer mot anoden. Nukleinsyrer er negativt ladet og vandrer derfor mot anoden. Små molekyler vandrer raskere enn store molekyler (Snustad og Simmons, 2010).

Prøvene som ble amplifisert ved hjelp av PCR ble avsatt på Agarosegel (30 µl). Standard som ble brukt var Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl (Vedlegg B). Det ble avsatt 2 µl standard og 20 µl prøve på gel. Etter gelelektroforese ble gelen fotografert på Bio RAD Gel DOC 2000.

### 2.11 Confocal Scanning Laser Microscopy

Konfokalmikroskopi ble utført på Zeiss LSM 510 META. Det ble benyttet et 63x vannobjektiv. Bølgelengder og filter som ble benyttet var tilpasset deteksjon av gfp. Programvaren som ble brukt for 3D-bildene var "Amira" (fra Visage Imaging GmbH, Tyskland).

Ved mikroskopering ble det tatt tynne snitt i z-plan ( $< 1\mu\text{m}$ ). Det ble fokusert med scanningshodet for å finne bunnen av brønnene. Deretter ble det scannet oppover, gjennom biofilmen til mediet med bevegelige celler ble nådd.

### 3. Resultater

#### 3.1 Etablering av metoder

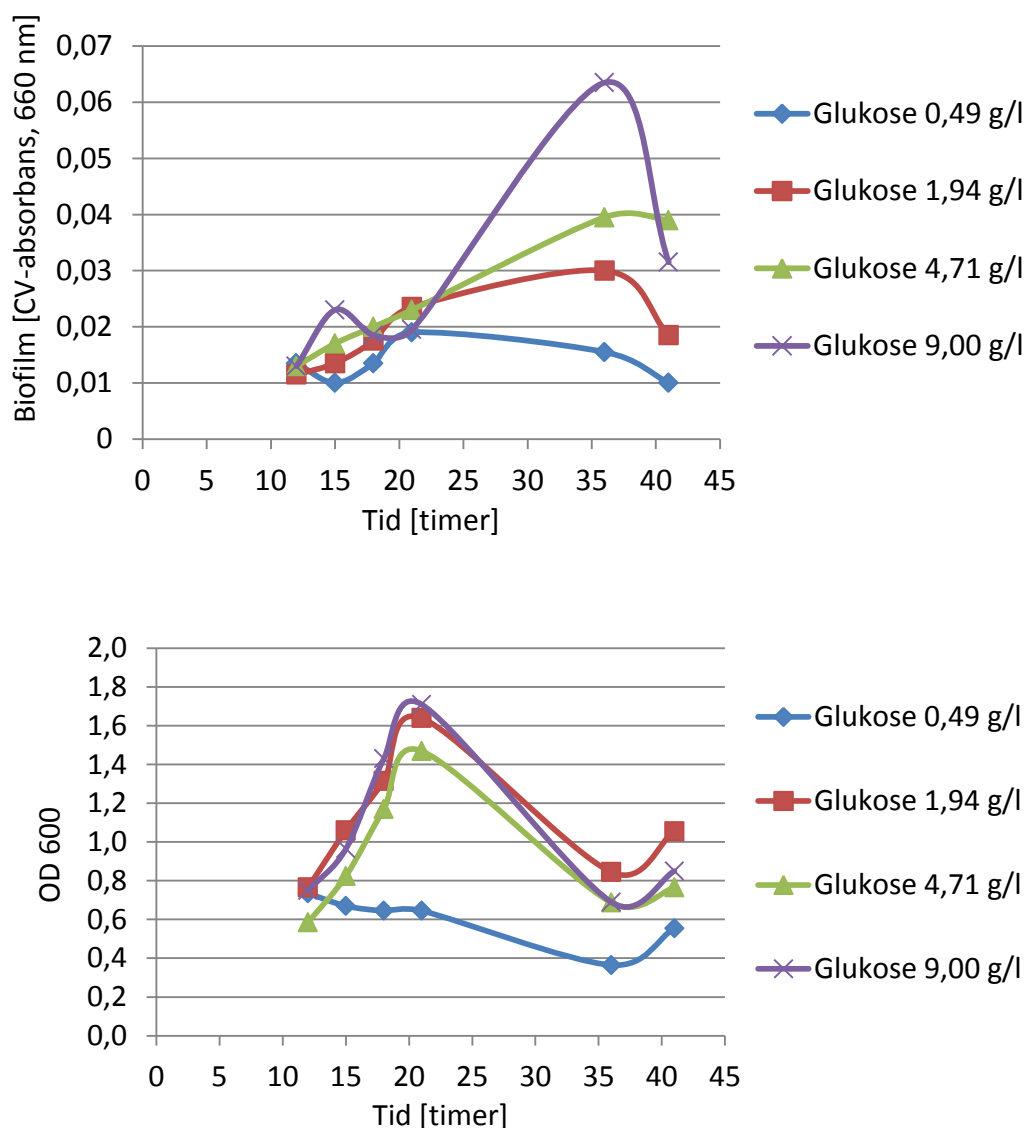
Metodeetablering i denne oppgaven har omfattet testing av metode for å kvantifisere mengde biofilm dannet i brønnplate og undersøkelse av varierende glukosekonsentrasjoners virkning på biofilmdannelse. I tillegg ble *P. aeruginosa* PA14 merket med green fluorescent protein for konfokalmikroskopering.

Metodeetablering ble innledet med arbeid med *P. fluorescens* SBW25. Denne stammen ble benyttet fordi det er en stamme innenfor smitterisikogruppe 1, det vil si stamme som ikke forårsaker alvorlige infeksjoner hos mennesker. På grunn av dette er det enklere å jobbe med denne stammen på laboratoriet.

##### 3.1.1 Utvikling av *P. fluorescens* SBW25 biofilm med varierende glukosekonsentrasjoner i vekstmediet

Undersøkelse av biofilm utvikling med varierende glukosekonsentrasjoner i mediet ble utført for å finne ut hvilken glukosekonsentrasjon som er best egnet for utvikling av biofilm, og for å se effekt av lav glukosekonsentrasjon på biofilm- og planktonisk vekst. *P. fluorescens* SBW25 ble dyrket som biofilm i 24-brønnsplater (Nunc™). Det ble benyttet 4 glukosekonsentrasjoner i det definerte mediet i området fra 0,49 – 9,0 g/l. Prøver ble tatt ut som funksjon av tid for måling av mengde glukose i mediet, OD i medium, samt mengde film kvantifisert ved farging med krystallfiolett (Figur 8).

## Resultater



**Figur 8: Vekst av biofilm og frie bakterier ved dyrking av *P. fluorescens* SBW25 biofilm i 24-brønnsplater ved varierende glukosekonsentrasjoner i det definerte mediet.**

Øverst: Mengde biofilm kvantifisert ved farging med Krystallfiolett. Absorbans ble målt i 96-brønnsplate ved 660 nm. Nederst: Vekst av frie celler. OD ble målt i mikrokyvete ved 600 nm.

Måling av glukosekonsentrasjoner i mediet ved hjelp av glukosestrips (resultater ikke vist) ble utført ved samme tidspunkt som de andre målingene. Dyrking i medium med høyest glukosekonsentrasjon (9,00 g/l) ga stabil glukosekonsentrasjonen i mediet gjennom hele forsøket. Ved dyrking i medium med glukosekonsentrasjon 4,71 g/l ble glukose i mediet tomt en gang mellom 21 og 36 timer, mens ved dyrking i 1,94 g/l ble det tomt for glukose en gang mellom 15 og 18 timer. Ved dyrking i den laveste glukosekonsentrasjonen (0,49 g/l) var all glukose glukose brukt opp allerede ved første måling.

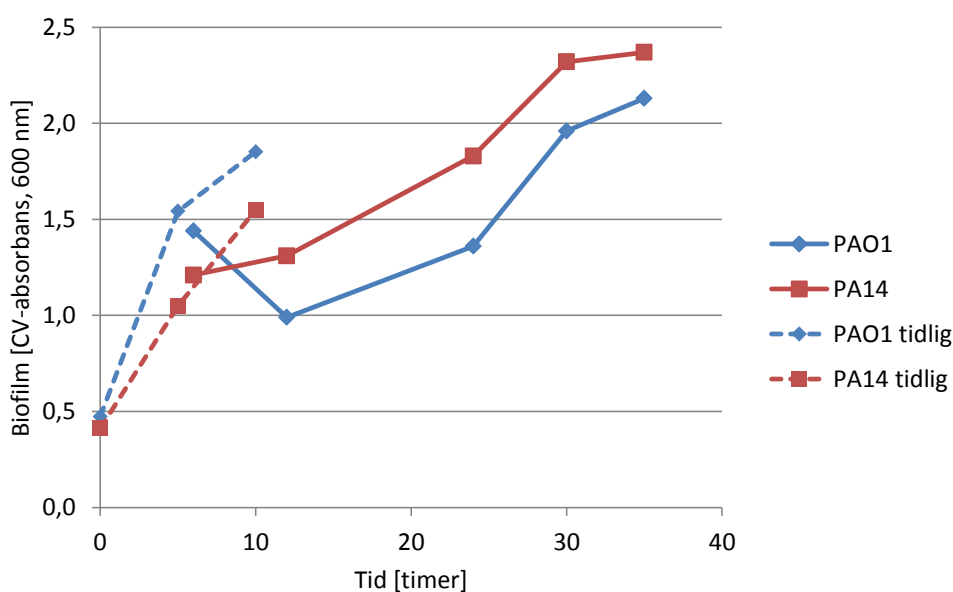
Figur 8 (øverst) viser at den høyeste glukosekonsentrasjonen ga mest biofilm. For de tre høyeste glukosekonsentrasjonene økte mengde biofilm mellom 21 og 36 timer selv om vekst i medium sank etter 21 timer (Figur 8 (nederst)). Celler fra mediet hadde da sannsynligvis festet seg og dannet film.

Etter 36 timer gikk mengde biofilm ned ved alle glukosekonsentrasjoner, mens vekst i medium økte. Dette kan tyde på at biofilmen var blitt degradert og hadde begynt å løsne fra brønn-veggene. Ved 36 og 41 timers inkubering ble det observert ”grums” i brønnene. Det ble observert spesielt mye i brønnene med de to laveste glukosekonsentrasjonene. Dette kan tyde på biofilmen løsnet i flak når det var gått tomt for glukose i mediet og glukosebegrensning hadde inntreidd. Dette kan også forklare at mengde biofilm kvantifisert ved hjelp av krystallfiolett gikk ned ved siste måling, samtidig med at OD i mediet steg.

Oppsummert viser resultatene at høyest glukosekonsentrasjon (9,0 g/l) ga mest biofilm. Denne glukosekonsentrasjonen ble derfor benyttet i videre forsøk. Resultatene viser at biofilmen vokste, selv om OD i mediet sank, noe som kan begrunnes med at celler fra mediet hadde festet seg til bunnen og dannet biofilm.

### 3.1.2 CV-farging for kvantifisering av *P. aeruginosa* biofilm

For å undersøke biofilm utvikling og kvantifisere mengde biofilm dannet i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 ble begge stammene dyrket i 96-brønnsplater (Nunc<sup>TM</sup>). Denne metoden benyttes som referansem metode for studie av biofilmdannelse. Dette forsøket ble også benyttet for å tolke RT-PCR resultater beskrevet under punkt 3.4. Det ble testet ulike inkuberingstider for å få en korrelasjon mellom mengde biofilm og inkuberingstid. Mengde biofilm ble kvantifisert ved hjelp av farging med krystallfiolett. Resultatene er vist i figur 9.



**Figur 9: Biofilm utvikling for *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i 96-brønnsplater.**

Absorbans [600 nm] ble målt i Spectramax brønnplateleser. Kurvene “PAO1”/ “PA14” og “PAO1 tidlig”/“PA14 tidlig” er fra to uavhengige forsøk utført under like betingelser.

Figur 9 viser biofilmutvikling i 96-brønnsplater over tid. Resultatene er sammensatt av data fra to uavhengige forsøk, utført under like betingelser. Kurvene viser at det sannsynligvis er noen timers forskjell på vekstforløp mellom de to separate forsøkene. Det kan se ut som at biofilmveksten hadde kommet fortere i gang i forsøket med prøveuttak 0-10 timer enn i forsøket med prøveuttak 6-35. Resultatene viser at det var mest biofilm ved 35 timer og *P. aeruginosa* PA14 dannet mer biofilm enn *P. aeruginosa* PAO1.

### 3.1.3 Gfp merking av *P. aeruginosa* PA14 ved hjelp av mini-Tn7 merkesystem

Fluorescensmerking av *P. aeruginosa* PA14 ble utført for å kunne studere stammens biofilmdannelse ved hjelp av konfokalmikroskopi. *P. aeruginosa* PAO1 var fluorescensmerket fra før (DTU Danmark). *P. aeruginosa* PA14 ble merket med et grønt fluorescerende protein "green fluorescent protein" (gfp). Dette proteinet produseres av maneten *Aequorea victoria*. Proteinene frigjør grønt lys når det absorberer blått lys som skiller ut av proteinet aequorin (Zimmer, 2011).

For å fluorescensmerke *P. aeruginosa* PA14 ble et mini-Tn7 merkesystem benyttet. Det ble dyrket kulturer av mottaker stamme (*P. aeruginosa* PA14), donorstamme (*E. coli*) og hjelpestammer (begge *E. coli*), se Materialer og metoder, punkt. 2.10. Etter konjugasjonen ble stammen dyrket på PIA-plater m/gentamicin. Dette ble gjort for å kunne selektere for bakterier med innsatt transposon. Det ble observert single kolonier på en plate. 8 enkeltkolonier ble strøket ut på nye PIA-plater m/gentamicin og dyrket over natt.

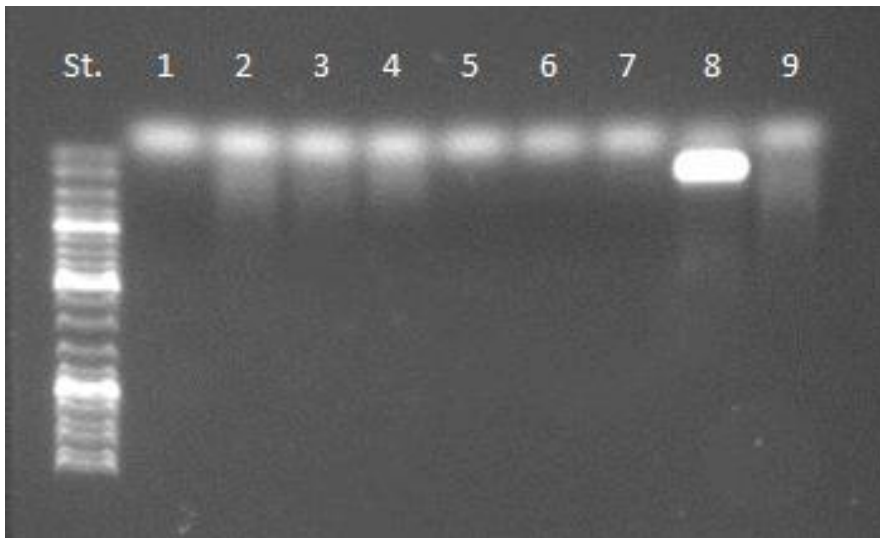
Det ble observert vekst på alle platene. PCR ble kjørt for å verifisere at mini-Tn7 transposonet hadde blitt satt inn i *P. aeruginosa* PA14. Etter PCR-amplifisering ble prøvene kjørt på gel-elektroforese. Tn7-GlmS produserer et fragment på omtrent 150 bp og man forventer et PCR-fragment på denne størrelsen dersom transposonet har blitt innsatt i stammen.

Resultatene fra gel-elektroforese (Figur 10) viser standard og de 8 prøvene fra de 8 feltene. I tillegg viser figuren et bånd (9) produsert av en negativ kontroll (*P. aeruginosa* PA14 uten innsatt transposon). Figuren viser at kun stamme nr. 8 produserte et fragment på 150 bp. Bakterier fra dette feltet hadde da fått transposonet innsatt og var dermed Gfp-merket. Standarden som ble benyttet er vist i vedlegg B.

Agarplatene ble i tillegg undersøkt for fluorescens på BioRad Gel Doc 2000. Dette viste svak fluorescens for bakterier fra felt 8. Det ble dyrket ampuller av bakterier fra felt 8 som beskrevet under punkt 2.1.1.

Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 gfp ble sammenlignet med hensyn på veksthastighet. Resultatene er vist i Figur 17. Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PAO1 gfp ga  $\mu$  på henholdsvis 0,61 og 0,0,91. Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 og *P. aeruginosa* PA14 gfp ga  $\mu$  på henholdsvis 0,56 og 0,48. For *P. aeruginosa* PAO1 vokste den gfp-merkede stammen raskest, mens for *P. aeruginosa* PA14 vokste den umerkede stammen raskest. Se vedlegg D for beregninger av  $\mu$  i eksponentiell vekstfase.





**Figur 10: Resultater fra gel-elektroforese ved Gfp-merking av *P. aeruginosa* PA14.**

St. = standard (Gene Ruler™ DNA ladder mix). De tre sterke båndene var på 500, 1000 og 3000 bp. 1-8 = prøve 1-8 (fra felt 1-8 på PIA plater m/gentamicin). 9 = negativ kontroll (*P. aeruginosa* PA14 umerket).

### 3.2 Begrensende faktorer i vekstmediet

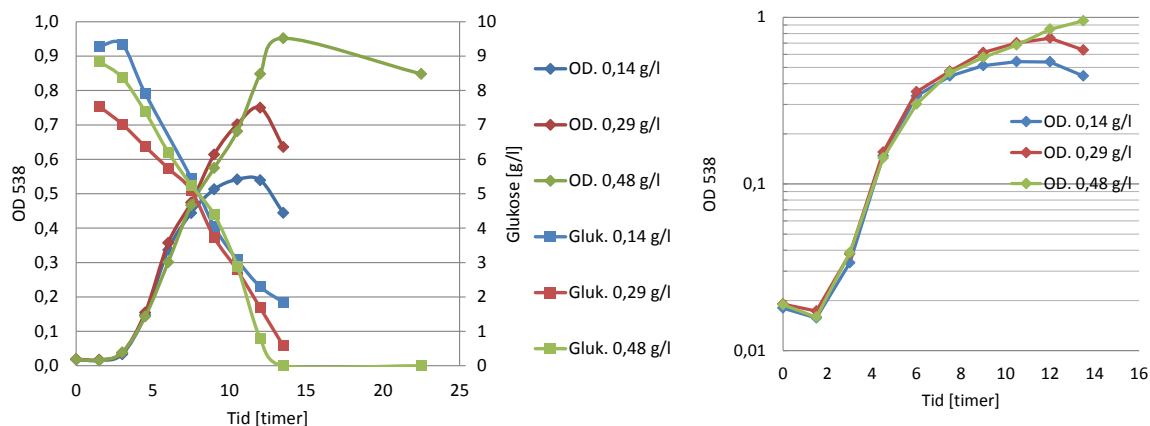
Undersøkelse av begrensende faktorer i vekstmediet ble utført ved dyrking av planktoniske celler i rystekolber, for å finne ut hvor mye konsentrasjonene av enkeltkomponenter må reduseres for å oppnå vekstbegrensning. Denne informasjonen ble brukt videre i rystekolbe- og biofilmforsøk, beskrevet under punkt 3.3 og 3.4.

Det ble tatt utgangspunkt i det definerte mediet (basismedium) med TMS-1 som spormineralblanding. Varierende nitrogen- og fosfatkonsentrasjoner ble brukt i mediet for å finne ut hvor mye konsentrasjonene av disse komponentene må reduseres for å oppnå begrensning, det vil så lav konsentrasjon at bakterievekst begrenses fullstendig.

I løpet av flere forsøk ble det funnet ut at den eksponentielle fasen varte over kort tid. For om mulig å forlenge perioden med eksponentiell vekst ble det forsøkt å tilsette vitaminer, flere spormineraler og å øke konsentrasjon av spormineraler. En ny spormineralblanding (TMS-2) ble testet. TMS-2 inneholder flere spormineraler og andre konsentrasjoner av spormineraler enn TMS-1, se Materialer og metoder, punkt 2.2.

#### 3.2.1 Undersøkelse av nitrogen- og fosfatbegrensning

For undersøkelse av nitrogen- og fosfatbegrensning ble *P. aeruginosa* PAO1 dyrket i rystekolber og OD ble målt regelmessig underveis i vekstfasen. Definert medium ble benyttet med 3 nitrogenkonsentrasjoner; 0,14 g/l, 0,29 g/l og 0,48 g/l (basismedium) og 3 fosfatkonsentrasjoner; 0,021 g/l, 0,052 g/l og 0,62 g/l (basismedium). I tillegg ble glukosekonsentrasjoner målt i supernatantprøver tatt underveis i vekstforløpet. Vekstkurvene er vist i figur 11 og 12.

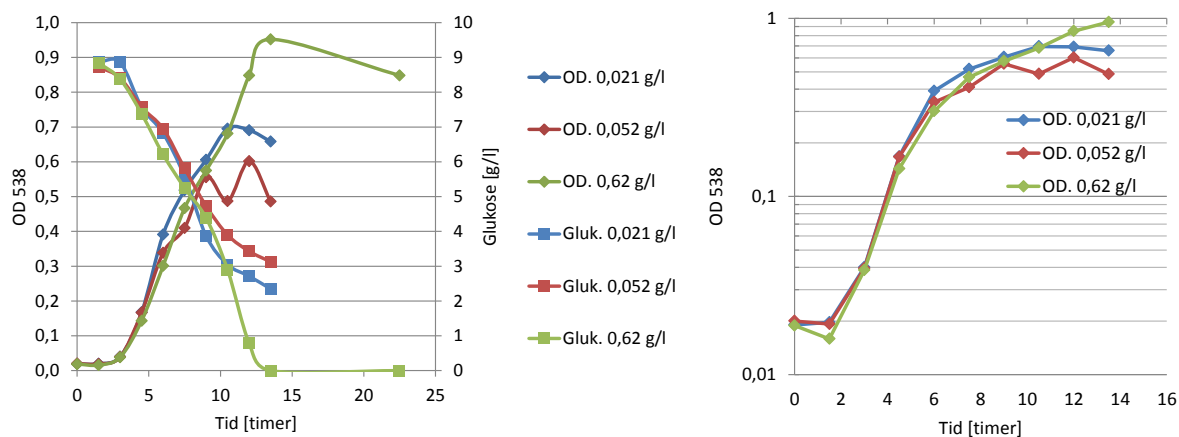


**Figur 11: OD og glukosekonsentrasjoner i medium ved vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber i definert medium med ulike nitrogenkonsentrasjoner. OD ble målt i 96-brønnsplater (100  $\mu$ l til hver brønn) ved 538 nm. Lineær fremstilling til venstre og logaritmisk fremstilling til høyre. 0,48 g/l = basismedium. Nitrogenkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,68, 1,35 og 2,25 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .**

Figur 11 viser at nitrogenkonsentrasjon 0,14 og 0,29 g/l ga maks OD på henholdsvis 0,54 og 0,75, mens basismedium ga maks OD 0,95. Bakterieveksten var eksponentiell mellom 3 og 4,5 timer, som tilsvarer OD mellom ca. 0,03 og 0,15. Disse OD-verdiene tilsvarer OD 0,14 og

## Resultater

OD 0,71 ved 600 nm i kyvette.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,87, som ga en doblingstid på 0,80 timer. Tørrvekt (g/l) og celleutbytte for nitrogen og fosfat ved vekst i de ulike mediene er vist i tabell 15. Se vedlegg C for OD omregningsfaktor, vedlegg D for beregning av  $\mu$  og doblingstid, vedlegg E for beregning av tørrvekt og vedlegg F for beregninger av celleutbytte.

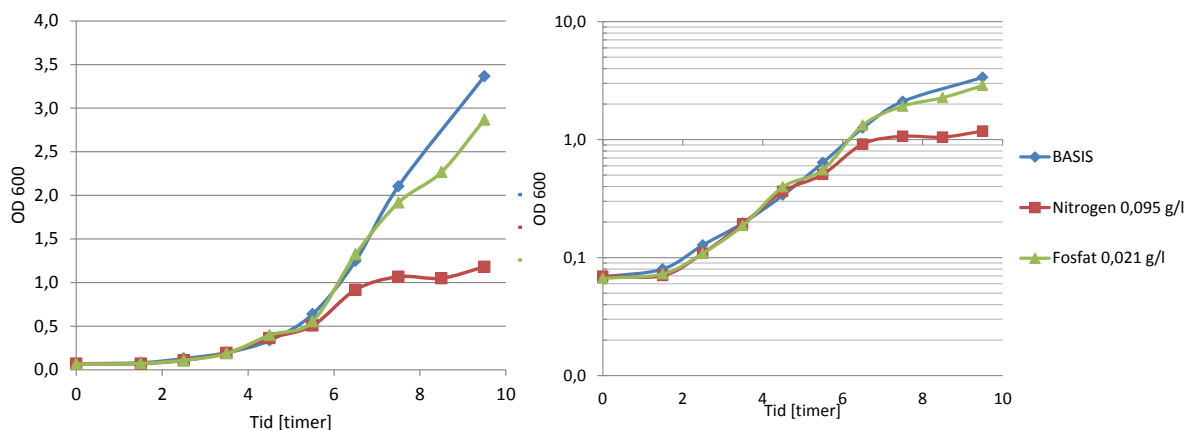


**Figur 12: OD og glukosekonsentrasjoner i medium ved vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber i definert medium med ulike fosfatkonsentrasjoner. OD ble målt i 96-brønnsplater (100  $\mu$ l til hver brønn) ved 538 nm. Lineær fremstilling til venstre og logaritmisk fremstilling til høyre. Fosfat 0,62 g/l = basismedium. Fosfatkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,09, 0,23 og 2,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .**

Figur 12 viser at at fosfatkonsentrasjon 0,021 og 0,052 g/l ga maks OD på henholdsvis 0,70 og 0,60, mens basismedium ga maks OD 0,95. Bakterieveksten var eksponentiell mellom 3 og 4,5 timer, som tilsvarer mellom OD 0,03 og 0,15. Disse OD-verdiene tilsvarer OD 0,14 og OD 0,71 ved 600 nm i kyvette.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,87, som ga en doblingstid på 0,80 timer. Tørrvekt (g/l) og celleutbytte for nitrogen og fosfat ved vekst i de ulike mediene er vist i tabell 14.

Resultatene for glukosekonsentrasjoner i supernatantprøver viser at ved total glukosebegrensning ved dyrking i basismediet stoppet vekst opp. Ved dyrking i lave konsentrasjoner av nitrogen og fosfat ble vekst begrenset før glukose ble begrensende faktor. Glukoseutbytte for dyrking i basismedium var 0,189 g. celler / g glukose. Se vedlegg G for beregninger av glukosekonsentrasjoner og vedlegg F for beregninger av celleutbytte.

I et nytt forsøk ble vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i basismedium sammenlignet med vekst i definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon; 0,095 g/l og lav fosfatkonsentrasjon; 0,021 g/l. Vekstkurver er vist i figur 13.



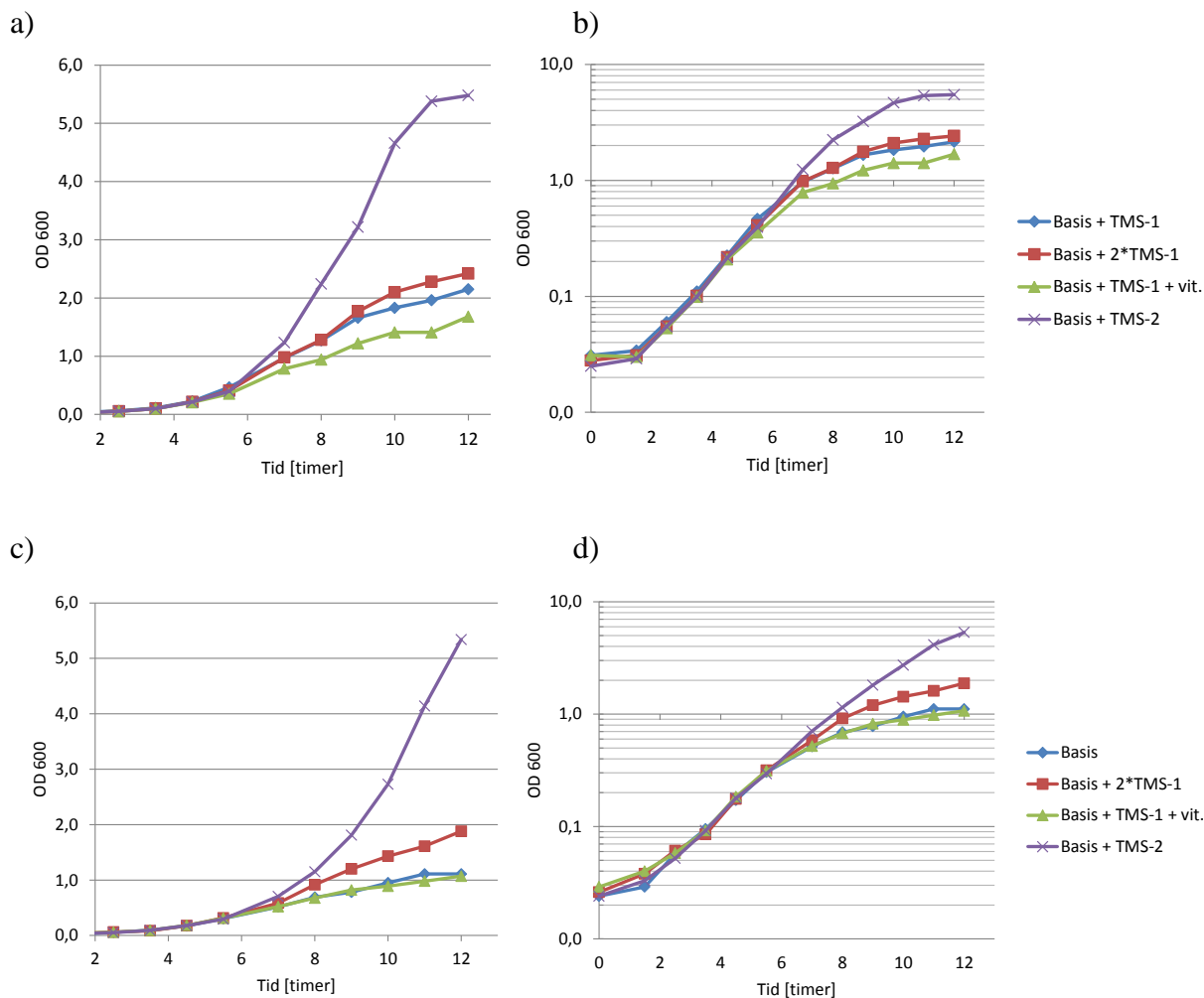
**Figur 13: OD i medium (600 nm mikrokyvette) ved vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber i definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon og definert med lav fosfatkonsentrasjon. Lineær fremstilling til venstre og logaritmisk fremstilling til høyre. Nitrogen 0,095 g/l = 0,45 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Fosfat 0,021 g/l = 0,09 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .**

Figur 13 viser at bakterievekst ble begrenset tidligst ved vekst i medium med lav nitrogenkonsentrasjon. Figuren viser at nitrogenkonsentrasjon 0,095 g/l gir maks OD 1,18. For vekst i basismedium og medium med lav fosfatkonsentrasjon ble begrensning ikke nådd i løpet av forsøket. Bakterievekst var eksponentiell mellom 1,5 og 7,5 timer som tilsvarer OD mellom 0,08 og 2,1.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,56, som ga en doblingstid på 1,24 timer. Tørrvekt (g/l) og celleutbytte for nitrogen og fosfat ved vekst i de ulike mediene er vist i tabell 15.

### 3.2.2 Undersøkelse av vekst i definert medium tilsatt ny spormineralblanding "TMS-2"

Figur 13 viser at ved dyrking i medium med TMS-1 som spormineralblanding vokste ikke bakteriene eksponentielt lenger enn til OD ca. 2,1. For å finne ut hvorfor eksponentiell vekst tok slutt ved så lav celletetthet ble det satt opp rystekolbeforsøk med dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 med variasjoner i vekstmediet. *P. aeruginosa* PA14 ble her tatt med for sammenligning og for å gi grunnlag for videre arbeid med denne stammen. En ny spormineralblanding ble testet ut. Denne ble kalt TMS-2. Spormineralblandingen ble hentet fra Schleheck et al. (2009). Denne spormineralblandingen ble testet på grunn av at den inneholder komponenter som ikke er til stede i TMS-1.

Vekst i basismedium med TMS-1 som spormineralblanding ble sammenlignet med vekst i basismedium med TMS-2. Det ble også undersøkt om tilsatt av vitaminblanding i mediet gir økt veksthastighet. Vekstkurvene er vist i figur 14.

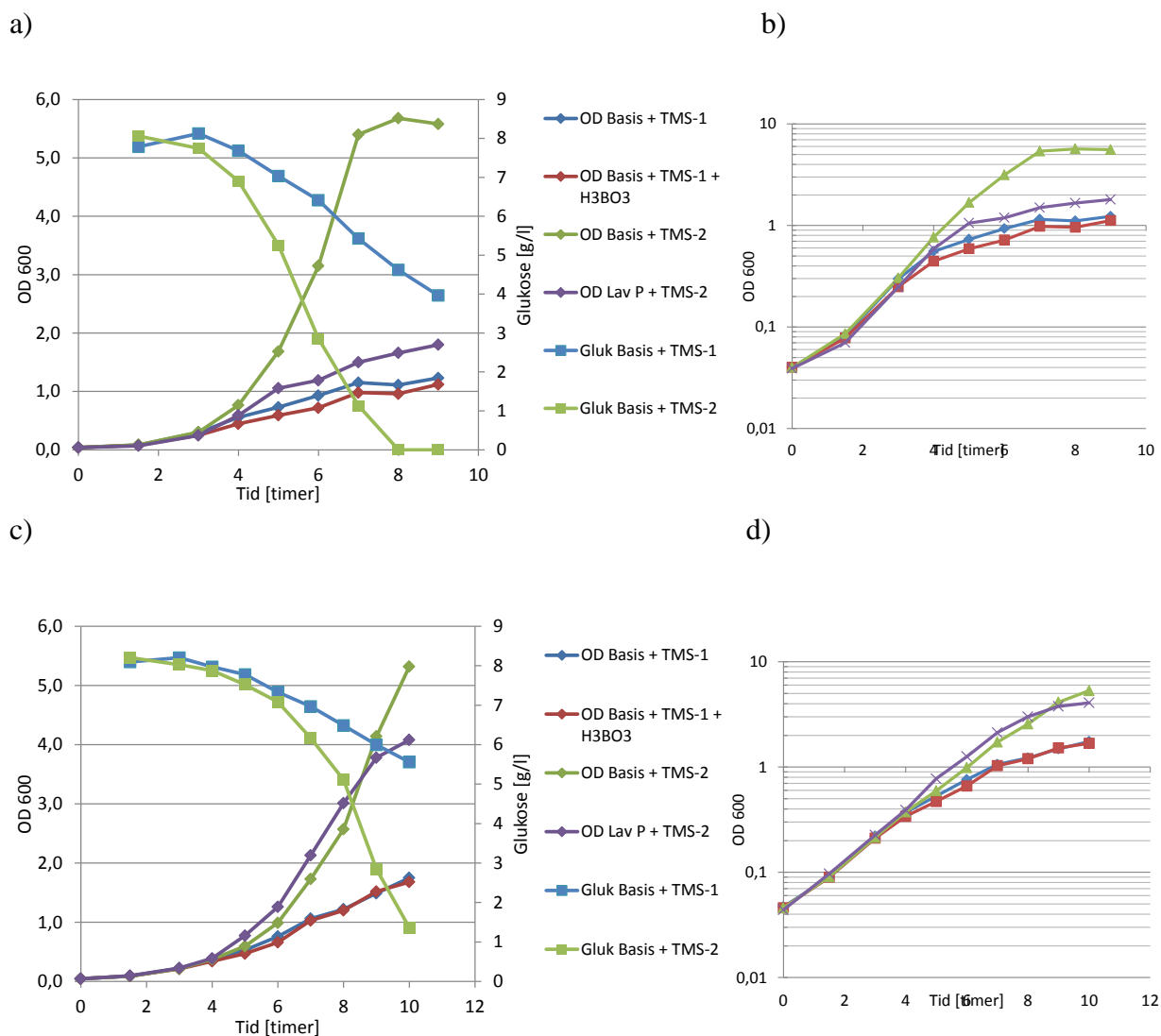


**Figur 14:** OD i medium (600 nm mikrokyvette) for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 (a, b) og *P. aeruginosa* PA14 (b, c) i rystekolber i 4 medier; basismedium tilsatt TMS-1, basismedium tilsatt dobbel mengde TMS-1, basismedium tilsatt TMS-1 og vitaminblanding og basismedium tilsatt TMS-2. a, c: Lienær fremstilling. b, d: Logaritmisk fremstilling.

Figur 14 viser at dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i basismedium tilsatt den TMS-2 ga høyest celledetthet. Logaritmiske kurver viser imidlertid at eksponentell fase ved dyrking i de ulike mediene var omtrent den samme, noe som innebærer at veksthastighet var omtrent lik. Det ga liten effekt på maksimal OD av å tilsette dobbel mengde TMS-1, mens tilsetning av vitaminblanding ga ingen effekt. Ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 var bakterieveksten eksponentiell mellom 1,5 og 8 timer, som tilsvarer OD mellom ca 0,03 og 2,2.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,68, som ga en doblingstid på 1,02 timer. Ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 var bakterieveksten eksponentiell mellom 2,5 og 11 timer, som tilsvarer OD mellom ca 0,05 og 4,1.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,52, som ga en doblingstid på 1,33 timer. Tørrvekt (g/l) og celleutbytte for nitrogen og fosfat ved vekst i de ulike mediene er vist i tabell 15.

Dette forsøket ga ingen entydig svar på hvorfor dyrking med TMS-1 ikke ga eksponentiell bakterievekst lenger enn til OD 2,1. Dyrking i medium med TMS-2 ga omtrent dobbel så høy OD som dyrking med TMS-1, men hverken dobbel mengde TMS-1 eller tilsats av vitaminblanding ga like høy OD. Sammenligning av TMS-1 og TMS-2 (Tabell 5 og 6) viser at komponentene borsyre;  $H_3BO_3$ , EDTA;  $Na_2EDTA$  og nikkel;  $NiCl_2$  er til stede i TMS-2, men ikke i TMS-1. På grunn av dette ble det valgt å utføre et nytt rystekolbeforsøk med sammenligning av vekst i basismedium tilsatt TMS-1, basismedium tilsatt TMS-1 og borsyre og basismedium tilsatt TMS-2, for å se om det er borsyra som gir den observerte effekten. I tillegg ble det inkludert et forsøk med lav fosfatkonsentrasjon, fordi tidligere forsøk har ga uklare svar med hensyn på hvor lav fosfatkonsentrasjon som må til for å oppnå begrensning. Fosfatkonsentrasjon 0,0082 g/l ble valgt fordi fosfatkonsentrasjon 0,021 ga ingen begrensning ved dyrking i rystekolbeforsøk utført tidligere (Figur 13). Glukosekonsentrasjoner ble målt i supernatantprøver underveis i vekstfasen ved dyrking i basismedium tilsatt TMS-1 og basismedium tilsatt TMS-2. Vekstkurvene er vist i figur 15.

## Resultater



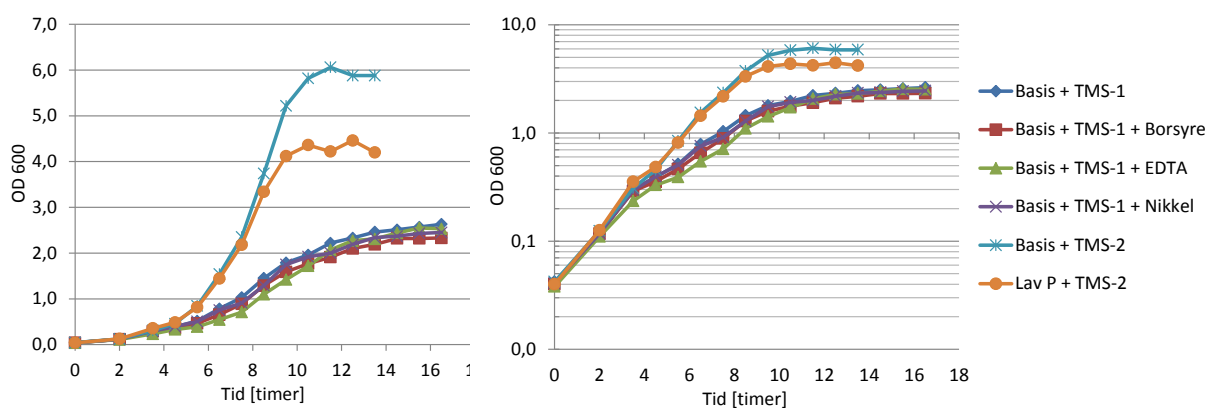
**Figur 15: OD (600 nm mikrokvyette) og glukosekonsentrasjoner i medium ved vekst av *P. aeruginosa* PAO1 (a, b) og *P. aeruginosa* PA14 (c, d) i rystekober i 4 medier; basismedium tilsatt TMS-1, basismedium tilsatt TMS-1 og borsyre, basismedium tilsatt TMS-2 og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,0082 g/l), tilsatt TMS-2. a, c: Lineær fremstilling. b, d: Logaritmisk fremstilling. Fosfat 0,0082 g/l = 0,036 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.**

Figur 15 viser at dyrking i basismedium tilsatt borsyre ga ingen effekt på hverken veksthastighet eller maks celletetthet i forhold til dyrking i basismedium tilsatt TMS-1. Ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,082 g/l begynte begrenset vekst ved OD 0,25 for *P. aeruginosa* PAO1 og ved OD 3,5 for *P. aeruginosa* PA14. Ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 var bakterieveksten eksponentiell mellom 1,5 og 5 timer, som tilsvarer OD mellom ca 0,09 og 1,7.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,86, som ga en doblingstid på 0,81 timer. Ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 var bakterieveksten eksponentiell mellom 0 og 9 timer, som tilsvarer OD mellom ca 0,05 og 4,1.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,51, som ga en doblingstid på 1,36 timer. Torrvekt (g/l) og celleutbytte for nitrogen og fosfat ved vekst i de ulike mediene er vist i tabell 15.

Glukosemålingene viser at bakterie vokst i medium med TMS-2 forbrukte mer glukose på grunn av økt veksthastighet.

## Resultater

Resultatene fra dette forsøket viser at det ikke var borsyra som var avgjørende for den økte oppnåelige celletettheten ved tilsats av TMS-2 som spormineralblanding. Resultatene viser også at dyrking i lav fosfatkonsentrasjon; 0,0082 g/l ga tidlig begrensning for *P. aeruginosa* PAO1, men sen begrensning for *P. aeruginosa* PA14. På grunn av dette ble det valgt å kjøre et nytt rystekolbeforsøk med sammenligning av vekst i basismedium tilsatt TMS-1, basismedium tilsatt TMS-2 og basismedium tilsatt TMS-1 og borsyre/EDTA/nikkel. Det ble samtidig undersøkt vekst i medium med en enda lavere fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l. Det ble valgt å utføre forsøket kun i *P. aeruginosa* PA14 på grunn av det faktum at vekst av *P. aeruginosa* PAO1 ble begrenset tidlig ved dyrking i 0,0082 g/l fosfat.



**Figur 16:** OD i medium (600 nm mikrokvyvette) ved vekst av *P. aeruginosa* PA14 i rystekolber med 6 medier; basismedium tilsatt TMS-1, basismedium tilsatt TMS-1 og borsyre, basismedium tilsatt TMS-1 og EDTA, basismedium tilsatt TMS-1 og Nikkel, basismedium tilsatt TMS-2 og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,0041 g/l), tilsatt TMS-2. Lineær fremstilling til venstre og logaritmisk fremstilling til høyre. Fosfat 0,0041 g/l = 0,018 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Figur 16 viser at dyrking av *P. aeruginosa* PA14 i basismedium tilsatt borsyre/EDTA/nikkel ga ingen effekt på maks OD i forhold til dyrking i basismedium tilsatt TMS-2. Nedsatt veksthastighet på grunn av fosfatbegrensning fant sted ved OD ca. 3,3 ved dyrking i basismedium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l. Bakterievekst for vekst i basismedium med TMS-2 var eksponentiell mellom 0 og 8,5 timer, som tilsvarer OD mellom 0,04 og 3,7.  $\mu$  i eksponentiell fase var 0,53 som ga en doblingstid på 1,31 timer. Tørrvekt (g/l) og celleutbytte for nitrogen og fosfat ved vekst i de ulike mediene er vist i tabell 15.

Tabell 15 viser beregnede celleutbytter ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i de ulike vekstmediene. Kolonne 4 i tabellen viser maks OD omregnet til OD [600 nm kyvette] ved hjelp av omregningsfaktor beskrevet i vedlegg C. Kolonne 5 viser tørrvekt [g/l] beregnet som beskrevet i vedlegg E. Kolonne 5 og 6 viser celleutbytte for nitrogen og fosfat beregnet som beskrevet i vedlegg F.



## Resultater

**Tabell 15: Beregnet celleutbytte nitrogen/fosfat [g/l] ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i rystekolber. Tabellen viser medium, stamme, OD ved begrensning [600 nm], tørrvekt [g/l], celleutbytte nitrogen/fosfat [g. celler/g. N/P] og hvilken figur dataene er hentet fra.**

Medium	Stamme	Maks OD [538 nm brønn]	Maks OD [600 nm kyvette]	Tørr- vekt [g/l]	Celle- utbytte nitrogen [g celler/ g N]	Celle- utbytte fosfat [g celler/ g P]	Fra figur [nr]
Basis* m/TMS-2	PAO1		5,70	2,13	4,4	3,4	15
Nitrogen 0,095 g/l	PAO1		1,18	0,44	4,6		13
Nitrogen 0,14 g/l	PAO1	0,54	2,56	0,96	6,8		11
Nitrogen 0,29 g/l	PAO1	0,75	3,55	1,33	4,6		11
Nitrogen 0,48 g/l	PAO1	0,95	4,50	1,68	3,5		11
Fosfat 0,021 g/l	PAO1	0,7	3,31	1,24		59,0	12
Fosfat 0,052 g/l	PAO1	0,6	2,84	1,06		20,4	12
Fosfat 0,62 g/l	PAO1	0,95	4,50	1,68		2,7	12
Fosfat 0,021 g/l	PAO1	**					13
Fosfat 0,0041 g/l	PA14		4,46	1,79		436,6	16
Basis* m/TMS-2	PA14		6,06	2,44	5,1	3,9	16

\*) Basismedium: nitrogen 0,48 g/l og fosfat 0,62 g/l. \*\*)Ikke oppnådd begrensning.

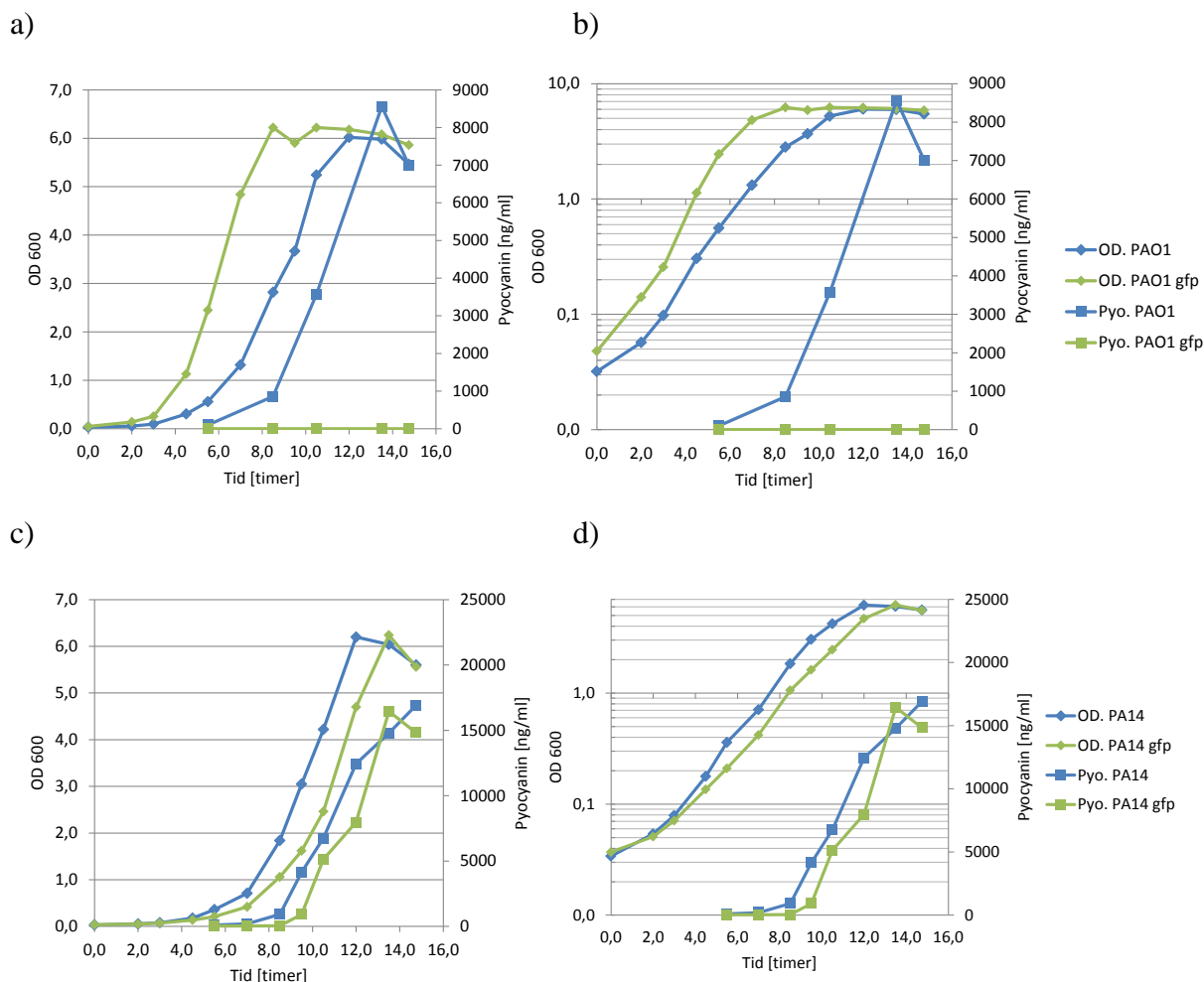
Oppsummert viser figurene 11-16 at dyrking i medium med lave nitrogen- og fosfatkonstrasjoner ga begrenset vekst. Ved dyrking i medium med TMS-2 vokste bakteriene til en høyere celletetthet enn ved dyrking med TMS-1. Forsøkene ga ingen svar på hva som skyldes økt celletetthet ved vekst i medium tilsatt TMS-2.

### 3.3 Studier av pyocyaninproduksjon og genuttrykk i flytende kultur

Pyocyanin (5-N-metyl-1-hydroxy-phenazin) er en type fenazin som produseres av *P. aeruginosa*. I tidligere forsøk (SINTEF) er det vist at dette stoffet produseres i *P. aeruginosa* PA14, men ikke, eller mye mindre i *P. aeruginosa* PAO1. For å studere pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa* ble det først gjort dyrkingsforsøk for planktoniske celler i flytende kultur. Ulike dyrkingsbetingelser ble testet for å finne ut hvilke betingelser som gir lav og høy pyocyaninproduksjon. Deretter ble disse betingelsene benyttet for å undersøke uttrykk av gener involvert i syntese av pyocyanin og deretter finne ut om pyocyaninproduksjon i mediet har betydning for biofilmdannelse.

### 3.3.1 Produksjon av pyocyanin relatert til bakterievekst

Dietrich et al. (2006) har vist at fenaziner blir utskilt i tidlig stasjonær fase i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14. For å undersøke dette ble begge stammene, både gfp-merket og umerket dyrket i basismedium for uttak av prøver til OD målinger og målinger av pyocyaninkonsentrasjoner i supernatant underveis i vekstfasen. Resultater er vist i figur 17. Figuren viser også en sammenligning av pyocyaninproduksjon i disse 4 stammene.



**Figur 17: Bakterievekst og produksjon av pyocyanin ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i rystekolber med basismedium. TMS-2 ble benyttet som spormineralblanding. a, b: Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* gfp. c, d: Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 og *P. aeruginosa* gfp. a, c: Lineær fremstilling. b, d: Logaritmisk fremstilling.**

De logaritmiske framstillingene i figur 17 viser at produksjon av pyocyanin ble initiert i begynnelsen av stasjonær fase for bakteriell vekst. *P. aeruginosa* PAO1 gfp produserte ikke detekterbare mengder av pyocyanin. Man kan se en tendens til at *P. aeruginosa* PA14 gfp produserte mindre pyocyanin enn *P. aeruginosa* PA14. Figuren viser også at *P. aeruginosa* PA14 produserte mer pyocyanin enn *P. aeruginosa* PAO1.

### 3.3.2 Effekt av begrensende faktorer i mediet på pyocyaninproduksjon

For undersøkelse av hvilke vekstbetingelser som gir lav og høy pyocyaninproduksjon ble dyrkingsforsøk utført med *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater og deretter i rystekolber.

Dyrking i dypbrønnplater ble utført under forskjellige vekstbetingelser. Ulike faktorer som ble variert var pH, O<sub>2</sub>-nivå, glukose-, nitrogen og fosfatkonsentrasjon, samt temperatur. Det ble valgt å utføre dette forsøket i dypbrønnplater på grunn av testing av mange betingelser samtidig. Basismediet ble benyttet som en kontroll. Det ble valgt å redusere konsentrasjoner av glukose, nitrogen og fosfat i mediet i forhold til basismediet for å undersøke om komponentbegrensning har betydning for produksjon av pyocyanin. For undersøkelse av effekt av pH på pyocyaninproduksjon ble det valgt å sammenligne pH 6,4 som benyttes i basismediet med en lavere og en høyere pH-verdi. For undersøkelse av O<sub>2</sub>-nivåets effekt på pyocyaninproduksjon ble det valgt å variere volum medium i brønnene.

For undersøkelse av begrensning ble følgende konsentrasjoner av enkeltkomponenter valgt: Glukose: 2.25, 4.5 og 6.75 g/l. Nitrogen: 0.14 og 0.29 g/l. Fosfat: 0.021 og 0.052 g/l. Følgende pH-verdier ble valgt: 5.5, 6.4 og 7.5. Følgende volumer medium ble brukt i brønnene: 0,5 ml (nivå 1), 0,75 ml (nivå 2) og 1,0 ml (nivå 3). Temperaturene som ble valgt var 30 °C og 37 °C.

Resultater fra forsøket ved dyrking ved 37 °C er vist i vedlegg H. Det ble valgt og ikke vise resultater fra dyrking ved 30 °C, da de viste omtrent de samme resultatene som for dyrking ved 37 °C.

Generelt viser resultatene at første måling (23 timer) ble tatt for sent, slik at veksten ved noen av betingelsene var slutt allerede ved første uttak. Dette gjaldt særlig for dyrking ved 37 °C. Konsentrasjonene av pyocyanin var lavere ved 27 timer enn ved 23 timer for alle betingelser og for begge temperaturene, noe som også indikerer at målingene ble tatt for sent. Det burde også vært tatt prøver oftere enn det som ble gjort, for å få riktig inntrykk av veksten i de ulike mediene. I tillegg burde en null-prøve vært tatt.

For alle betingelsene var det tydelig at veksten økte tidligst ved 37 °C enn ved 30 °C. 37 °C ga også høyest produksjon av pyocyanin. Det ble derfor valgt å benytte 37 °C for videre forsøk. Målinger av pyocyanin burde vært tatt tidligere på 37 °C plata, da produksjon av pyocyanin startet tidligere enn 23 timer.

Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 med ulike pH-verdier i vekstmediet (Vedlegg H, Figur H-1) viser at stammen vokste best ved pH 7,5 og ved denne pH-verdien var veksten slutt allerede ved første måling. Denne pH-verdien ga også høyest produksjon av pyocyanin. Ved pH 5,5 var det tilnærmet ingen vekst. Resultatene viser at pH-verdien på 6,4 som blir brukt i det definerte mediet var for lav og at det er hensiktsmessig å øke pH for best vekst.

Dyrking i medium med ulike nitrogen- og fosfatkonsentrasjoner (Vedlegg H, Figur H-4 og H-5) viser at lavest konsentrasjoner ga høyest produksjon av pyocyanin. Dette gjaldt både ved dyrking ved 30 °C og 37 °C.

Dyrking i medium med ulike glukosekonsentrasjoner og varierende volum medium i brønnene ga ingen entydige svar på disse betingelsenes effekt på vekst og pyocyaninproduksjon.

På grunn av at forsøk i dypbrønnplater ikke ga konkrete svar på hvilke betingelser som gir lav og høy pyocyaninproduksjon ble det valgt å kjøre forsøket på nytt med de vekstbetingelser som viste seg å være interessante å se nærmere på med hensyn på pyocyaninproduksjon. Det ble valgt å se videre på vekst og pyocyaninproduksjon i medium med varierende nitrogen- og fosfatkonsentrasjoner fordi lave konsentrasjoner ga høyest produksjon av pyocyanin. Det ble valgt å kjøre forsøket på 37 °C, da denne temperaturen ga høyere pyocyaninkonsentrasjoner, samt høyest celledetthet. pH 5,5 ble valgt bort, da den ga ingen vekst. *P. aeruginosa* PAO1 vokser best ved pH 7,0 +/- 0,2. På grunn av dette og at pH 7,5 ga høyest OD ble pH-verdiene 7,0 og 7,5 valgt. På grunn av færre betingelser i dette forsøket enn i forsøk i dypbrønnplater, ble det valgt å utføre forsøket i rystekolber. Resultater fra vekstforsøkene og målte pyocyaninkonsentrasjoner er vist i figur 18 og 19.

Følgende betingelser ble valgt:

Medium 1: Basismedium, pH 7,0

Medium 2: Basismedium, pH 7,5

Medium 3: Nitrogenbegrensning, 0,29 g/l, pH 7,0

Medium 4: Nitrogenbegrensning, 0,29 g/l, pH 7,5

Medium 5: Nitrogenbegrensning, 0,14 g/l, pH 7,0

Medium 6: Nitrogenbegrensning, 0,14 g/l, pH 7,5

Medium 7: Fosfatbegrensning, 0,052 g/l, pH 7,0

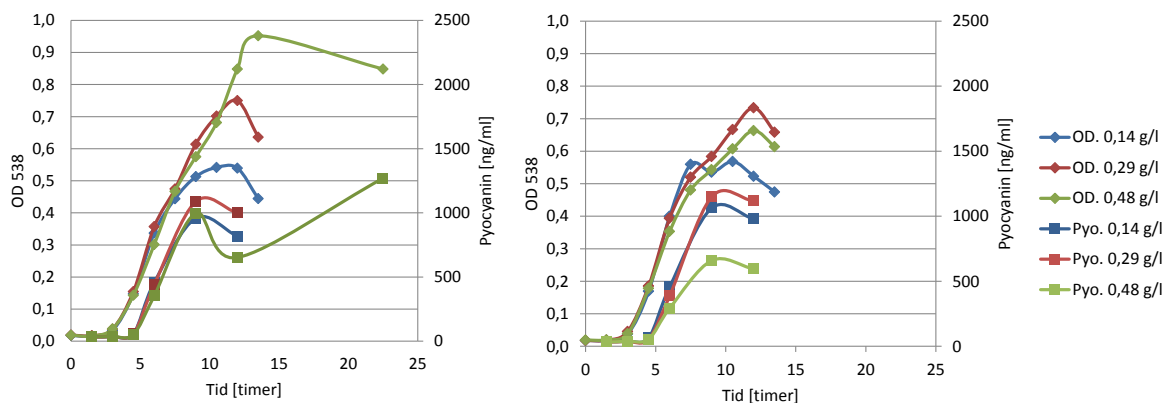
Medium 8: Fosfatbegrensning, 0,052 g/l, pH 7,5

Medium 9: Fosfatbegrensning, 0,021 g/l, pH 7,0

Medium 10: Fosfatbegrensning, 0,021 g/l, pH 7,5

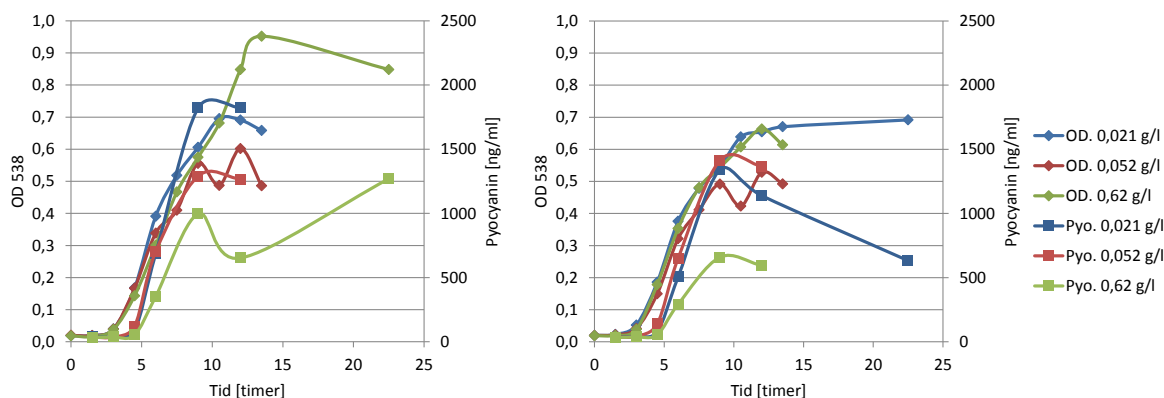
Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 med varierende nitrogenkonsentrasjoner i vekstmediet (Figur 18) viser at høyest nitrogenkonsentrasjon (0,48 g/l) ga lavest pyocyaninproduksjon. For vekst i pH 7,0 ga høyest nitrogenkonsentrasjon høyest celledetthet, mens det omvendte ble sett for la

## Resultater



**Figur 18:** OD og pyocyaninkonsentrasjoner ved vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber med definert medium med ulike nitrogenkonsentrasjoner. TMS-1 ble brukt som spormineralblanding. OD ble målt i 96-brønnsplater (100  $\mu$ l til hver brønn) ved 538 nm. pH 7,0 (til venstre) og pH 7,5 (til høyre). Nitrogen 0,48 g/l = basismedium. Nitrogenkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,68, 1,35 og 2,25 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 med varierende fosfatkonsentrasjoner i vekstmediet (Figur 19) viser at lavest fosfatkonsentrasjon (0,021 g/l) ga høyest pyocyaninproduksjon. Ved dyrking i pH 7,0 ga høyest fosfatkonsentrasjon høyest celletetthet, mens ved dyrking i pH 7,5 ga lavest fosfatkonsentrasjon høyest celletetthet.



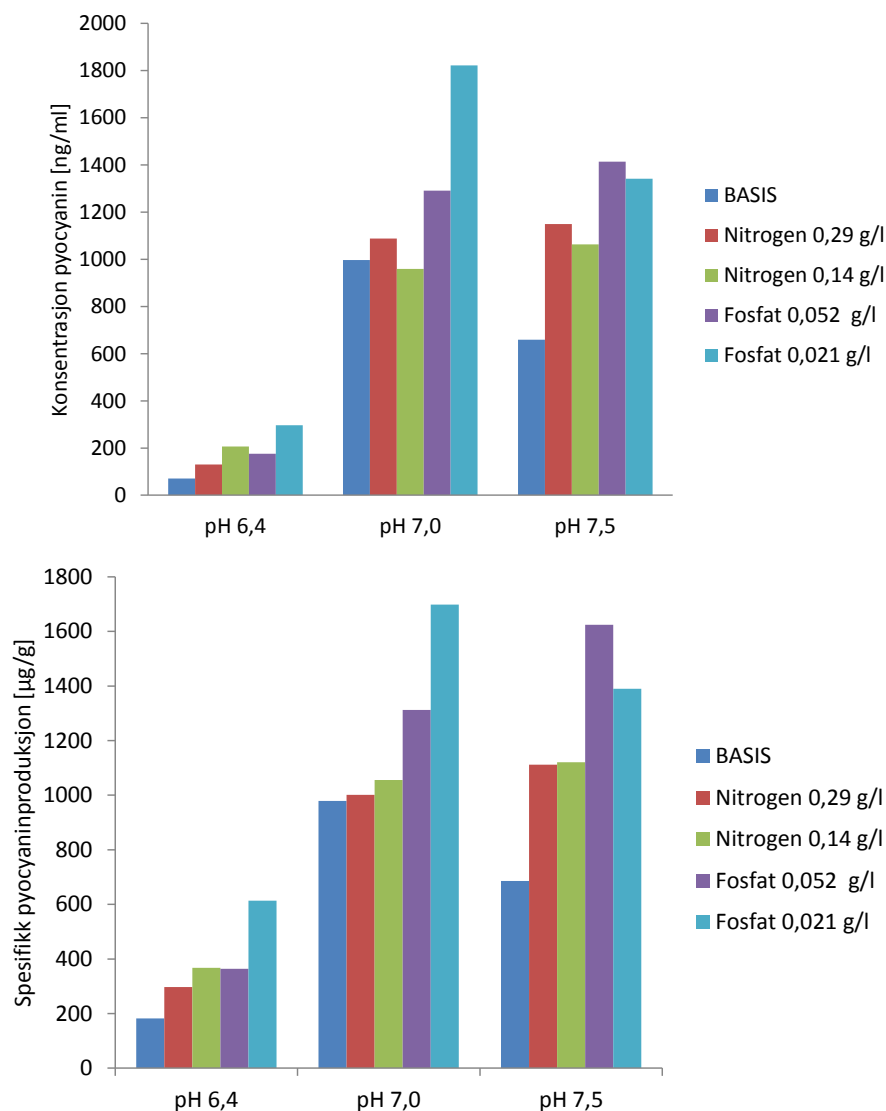
**Figur 19:** OD og pyocyaninkonsentrasjoner ved vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber med definert medium med ulike fosfatkonsentrasjoner. TMS-1 ble brukt som spormineralblanding. OD ble målt i 96-brønnsplater (100  $\mu$ l til hver brønn) ved 538 nm. pH 7,0 (til venstre) og pH 7,5 (til høyre). Fosfat 0,62 g/l = basismedium. Fosfatkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,09, 0,23 og 2,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Undersøkelse av medium med lav nitrogenkonsentrasjon viser at ulike nitrogenkonsentrasjoner ikke ga like klare effekter på produksjon av pyocyanin som ulike fosfatkonsentrasjoner gjorde. Den samme tendensen sees allikevel som for fosfatbegrensning, lavest konsentrasjon ga høyest produksjon av pyocyanin. På grunn av dette kan det se ut som at lave konsentrasjoner av komponenter i mediet har effekt på pyocyaninproduksjon

Av alle variablene ga lavest fosfatkonsentrasjon (0,021 g/l) ved pH 7,0 høyest produksjon av pyocyanin. Dyrking i basismediet ga lavest spesifikk produksjon.

### pH-optimum for pyocyaninproduksjon

Ulike pH-verdier i mediet ble undersøkt for å finne ut hvilken verdi som gir høyest pyocyaninkonsentrasjon og høyest spesifikk pyocyaninkonsentrasjon. Spesifikk pyocyaninproduksjon ble beregnet som konsentrasjon/tørrvekt. Se vedlegg I for rådata for beregninger av spesifikk pyocyaninproduksjon, samt beregningseksempel. Resultatene er presentert i figur 20.



**Figur 20: pH-optimum for pyocyaninproduksjon ved vekst i basismedium, medium med lave og høye nitrogenkonsentrasjoner og medium med lave og høye fosfatkonsentrasjoner. Øverst: Maksimum pyocyaninkonsentrasjoner. Nederst: Spesifikk pyocyaninproduksjon, beregnet som maks pyocyaninkonsentrasjoner/tørrvekt.**

## Resultater

---

Resultatene fra figur 20 er en sammenstilling av resultater hentet fra forsøk i dypbrønnplater og forsøk i rystekolber (Figur G4, G5, 17 og 18). Resultatene for pH 6,4 er maks pyocyaninverdier hentet fra forsøk i dypbrønnsplater, 37 °C/23 timer (Vedlegg H). Resultatene for pH 7,0 og 7,5 er maks pyocyaninverdier hentet fra forsøk i rystekolber, 37 °C/9 timer (Figur 18 og 19). Spesifikk pyocyaninproduksjon er beregnet som pyocyaninkonsentrasjoner/tørrvekt. Se vedlegg I for OD-verdier og pyocyaninkonsentrasjoner brukt som grunnlag for beregning av spesifikk pyocyaninproduksjon.

Figurene viser at pH 6,4 gir mye lavere pyocyaninkonsentrasjoner og spesifikk pyocyaninproduksjon enn pH 7,0 og 7,5. Verdier for pH 6,4 og pH 7,0/7,5 er hentet fra to uavhengige forsøk, noe som også kan forklare store forskjeller. Det var liten forskjell mellom pH 7,0 og pH 7,5 når det gjelder både pyocyaninkonsentrasjoner og spesifikke konsentrasjoner. Det ble valgt å kjøre videre forsøk ved pH 7,0, da denne pH-verdien er mest brukt ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1.

I disse to forsøkene ble det vist at lave konsentrasjoner av komponenter gir økt produksjon av pyocyanin. Effekten var tydeligst ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon.



### 3.3.3 Studier av uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa*

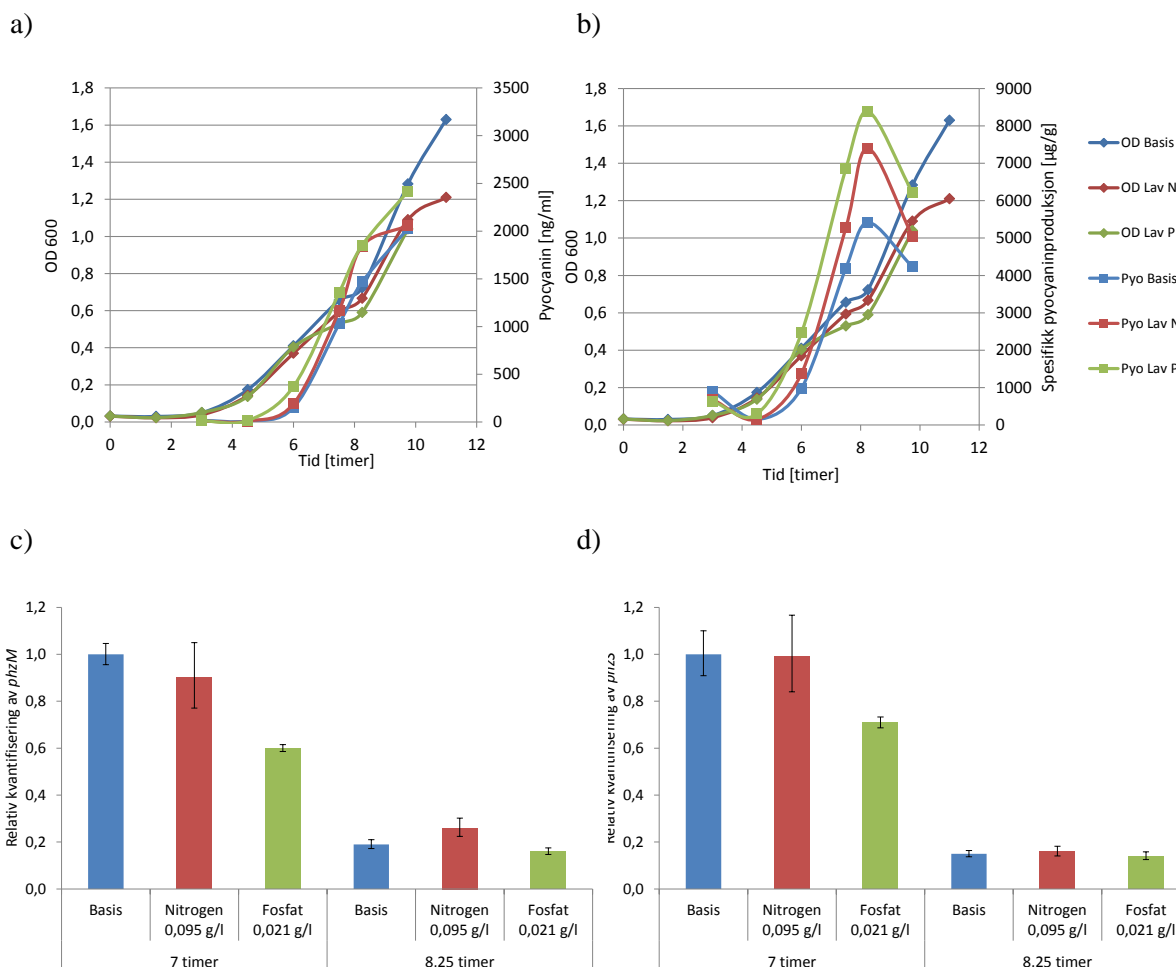
I dette forsøket ble de betingelsene som ga lave og høye pyocyaninkonsentrasjoner benyttet for å se effekten av komponentbegrensning på uttrykket av genene *phzM* og *phzS*, involvert i pyocyaninproduksjon.

Det ble kjørt et rysteflaskeforsøk med 3 ulike vekstmedier; basismedium, medium med lav nitrogenkonsentrasjon og medium med lav fosfatkonsentrasjon. Figur 19 viser at ved fosfatbegrensning ser man godt effekter når man går til lav konsentrasjon, dvs. lavest konsentrasjon ga høyest pyocyaninkonsentrasjon. For nitrogenbegrensning (Figur 18) var ikke effekten like stor, her var det liten forskjell på de konsentrasjonene som var valgt. På grunnlag av dette ble det valgt å benytte følgende konsentrasjoner for nitrogen og fosfat: 0,095 g/l og 0,021 g/l. En enda lavere nitrogenkonsentrasjon enn det som var brukt tidligere ble derfor benyttet for å bedre kunne se effekten av begrensning.

For alle de tre betingelsene ble det tatt ut prøver tre ganger i løpet av vekstforsøket, for å undersøke uttrykket av genene *phzM* og *phzS* ved hjelp av RT-PCR. Det ble satt opp en relativ kvantifisering der uttrykk av genene ved de tre betingelsene ble sammenlignet samtidig. I tillegg ble det tatt ut prøver for måling av OD og pyocyaninkonsentrasjoner regelmessig i vekstforløpet.

Forsøket ble kjørt to ganger ved like forsøksbetingelser. I det første forsøket (Figur 21) ble prøveuttak for RT-PCR tatt ved 7, 8,25 og 9,75 timer. I det andre forsøket (Figur 22) ble prøveuttak for RT-PCR tatt ved 3, 5 og 8 timer. For første forsøk ble RT-PCR utført for uttak ved 7 og 8,25 timer. For andre forsøk ble RT-PCR utført for uttak ved 3 og 5 timer og for uttak ved 3 og 8 timer. For dette forsøket ble det i tillegg utført RT-PCR for uttak ved 5 timer alene (resultater ikke vist).

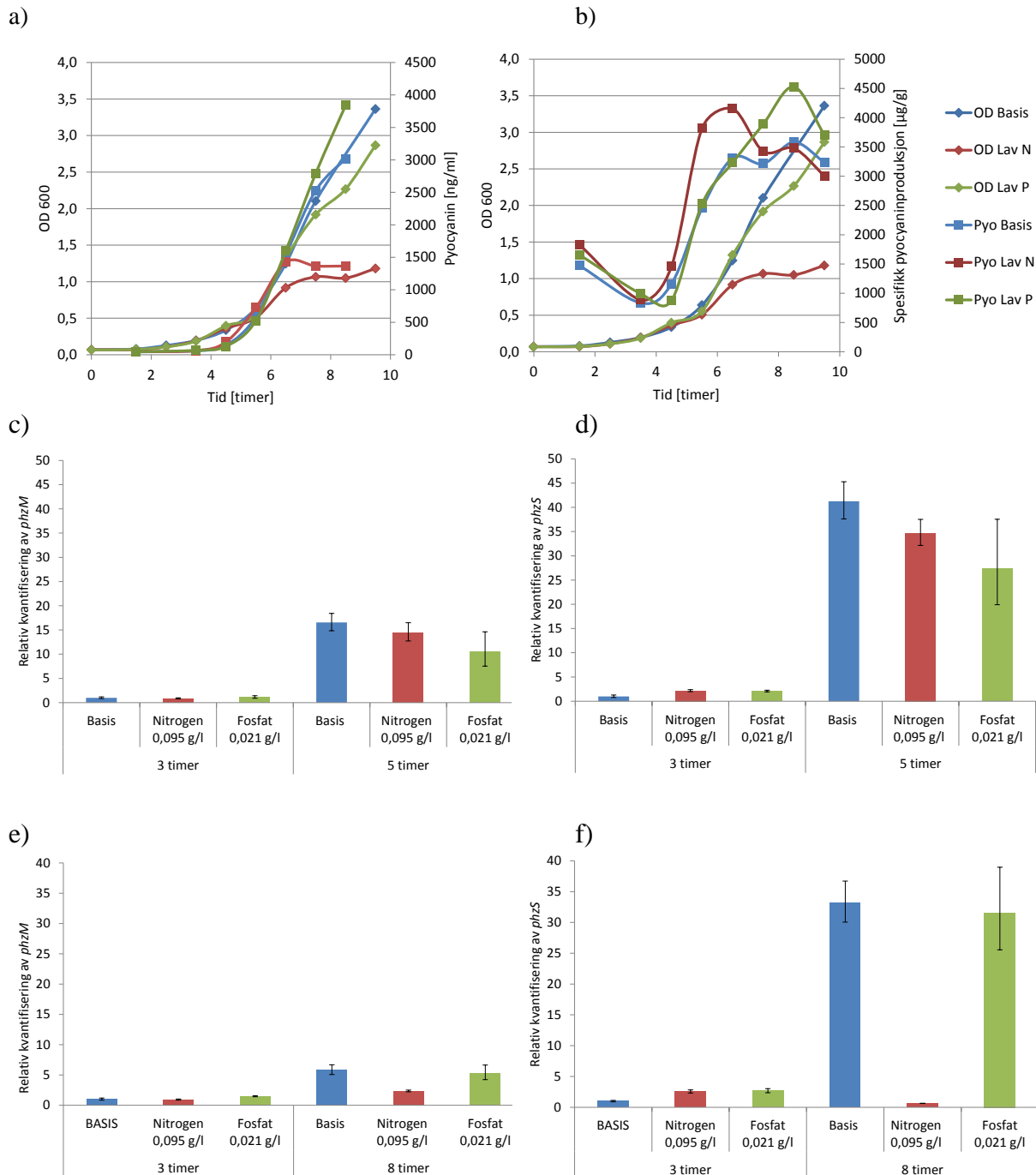
## Resultater



**Figur 21: OD, pyocyaninproduksjon og relativ kvantifisering av gener involvert i pyocyaninproduksjon ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber med 3 medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon. TMS-1 ble benyttet som spormineralblanding. 1. forsøk. Nitrogen 0,095 g/l = 0,45 g/l i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Fosfat 0,021 g/l = 0,09 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .**

a) OD (600 nm mikrokvyette) og pyocyaninkonsentrasjoner (ng/ml). b) OD og spesifikke pyocyaninkonsentrasjoner. c) Relativ kvantifisering av *phzM*. Prøveuttak ved 7 og 8,25 timer (første og andre prøveuttak). d) Relativ kvantifisering av *phzS*. Prøveuttak ved 7 og 8,25 timer (første og andre prøveuttak). Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking i basismedium, 7 timer, som ble satt til 1,0.

## Resultater



**Figur 22: OD, pyocyaninproduksjon og relativ kvantifisering av gener involvert i pyocyaninproduksjon ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber med 3 medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon. TMS-1 ble benyttet som spormineralblanding. Nitrogen 0,095 g/l = 0,45 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Fosfat 0,021 g/l = 0,09 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . 2. forsøk.**

a) OD (600 nm mikrokvyette) og pyocyaninkonsentrasjoner (ng/ml). b) OD og spesifikke pyocyaninkonsentrasjoner c) Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM*. Prøveuttak ved 3 og 5 timer (første og andre prøveuttak). d) Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzS*. Prøveuttak ved 3 og 5 timer (første og andre prøveuttak). e) Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM*. Prøveuttak ved 3 og 8 timer (første og tredje prøveuttak). f) Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzS*. Prøveuttak ved 3 og 8 timer (første og siste prøveuttak). Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking i basismedium, 3 timer, som ble satt til 1,0.

I første forsøk viser vekstkurvene at alle tre uttak ble tatt i bakterievekstens stasjonær fase og etter at pyocyaninproduksjon hadde kommet godt i gang (Figur 21). I andre forsøk viser vekstkurvene at første uttak ble tatt i eksponentiell fase for vekst i medium med lav nitrogen- og fosfatkonsentrasjon og like før eksponentiell fase ved vekst i basismedium (figur 22). Andre uttak ble tatt ca. ved slutt av eksponentiell fase for vekst i medium med lav nitrogen- og fosfatkonsentrasjon og i eksponentiell fase for vekst i basismedium. Siste uttak ble tatt i stasjonær fase for bakterievekst i alle medier. Ved første prøveuttak hadde ikke pyocyaninkonsentrasjonene begynt å øke ennå. Ved andre uttak hadde økningen startet. Ved tredje uttak hadde pyocyaninproduksjon stoppet opp ved vekst i nitrogenbegrenset medium og begynt å flate ut i basismedium. I medium med lav fosfatkonsentrasjon var pyocyaninkurven fortsatt stigende. Se vedlegg J for logaritmiske fremstillinger av bakterievekst fra begge forsøkene.

Figurene viser en klar effekt av den lave nitrogenkonsentrasjonen. I første forsøk kan man anta at “fosfatkurven” fortsetter å stige, mens “nitrogenkurven” flater ut. I andre forsøk merkes vekstbegrensning ved vekst i medium med lav nitrogenkonsentrasjon ved OD ca 0,5. I dette forsøket var det små forskjeller i både OD og pyocyaninkonsentrasjoner ved vekst i basismedium og medium med lav fosfatkonsentrasjon. OD-kurvene og konsentrasjonskurvene ved vekst i medium med lav fosfatkonsentrasjon (Figur 22) viser at det ikke var fosfat som begrenset pyocyaninproduksjon, ettersom OD-kurven krummet av, mens konsentrasjonskurven fortsatte å øke.

Relativ kvantifisering for forsøk 1, viser at begge genene var mer uttrykt ved 7 timer enn ved 8,25 timer. Vekstkurvene (Figur 21a og 21b) viser en økning i pyocyaninkonsentrasjoner etter 4,5 timer, noe som indikerer at prøveuttak ved 7, 8.25 og 9.75 timer ble tatt for sent. Resultatene viser at det var liten forskjell mellom uttrykk av genene i medium med lav nitrogen- og lav fosfatkonsentrasjon, men genene var litt mer uttrykt ved vekst i medium med lav nitrogenkonsentrasjon.

Relativ kvantifisering for forsøk 2, uttak ved 3 og 5 timer (Figur 22c og 22d) viser at uttrykket av genene var høyere i andre enn i første uttak. Økningen i genuttrykk var størst ved dyrking i basismedium og minst ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon.

Relativ kvantifisering for forsøk 2, uttak ved 3 og 8 timer (Figur 22e og 22f) viser at uttrykket av genene var høyere i tredje enn i første uttak for dyrking i basismedium og medium med lav fosfatkonsentrasjon. For nitrogenbegrenset medium var genene uttrykt lavt ved siste uttak, uttrykket av *phzS* var lavere ved siste uttak enn ved første uttak. Dette samsvarer med vekstkurven som viser at nitrogenbegrenset medium ga lavere maksimal pyocyaninkonsentrasjon enn de to andre mediene og at konsentrasjon av pyocyanin i nitrogenbegrenset medium gikk ned/flatet ut samtidig som veksten ble begrenset. At genuttrykkene var høyere ved siste uttak samsvarer med teorien om at pyocyaninproduksjon initieres sent i vekstforløpet. I stasjonær fase var uttrykk av begge gener lavere i medium med lav fosfatkonsentrasjon enn i basismedium. For *phzM* var det større forskjell på genuttrykk mellom 3 og 5 timer enn mellom 3 og 8 timer.

## Resultater

---

Relativ kvantifisering for forsøk 2, uttak ved 5 timer ga liten forskjell på genuttrykk ved vekst i de ulike mediene, men genene var mer uttrykt i vekst i medium med lav nitrogenkonsentrasjon enn i de to andre mediene (resultater ikke vist). Ved dette uttaket hadde ikke begrensning inntruffet enda.

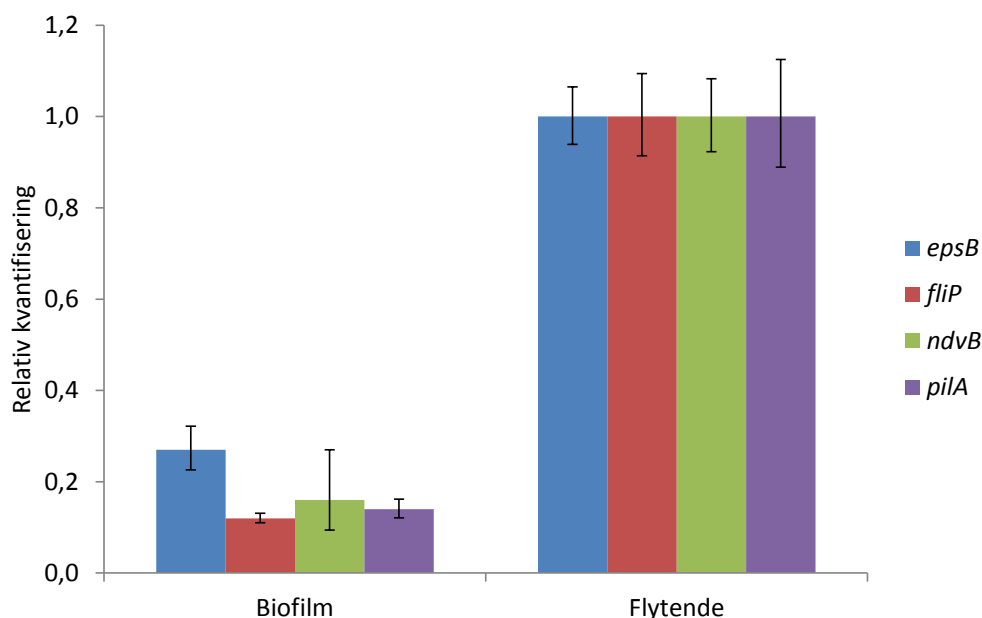
Oppsummert viser resultatene at pyocyaninproduksjon initieres i tidlig stasjonærfase. Også uttrykk av *phzM* og *phzS* var høyest i denne vekstfasen. Nitrogenbegrensning førte til lavere uttrykk av *phzS*. Resultatene viser at *phzS* varierte mer med betingelsene enn det *phzM* gjorde.

### 3.4 Studier av pyocyaninproduksjon og genuttrykk i biofilm

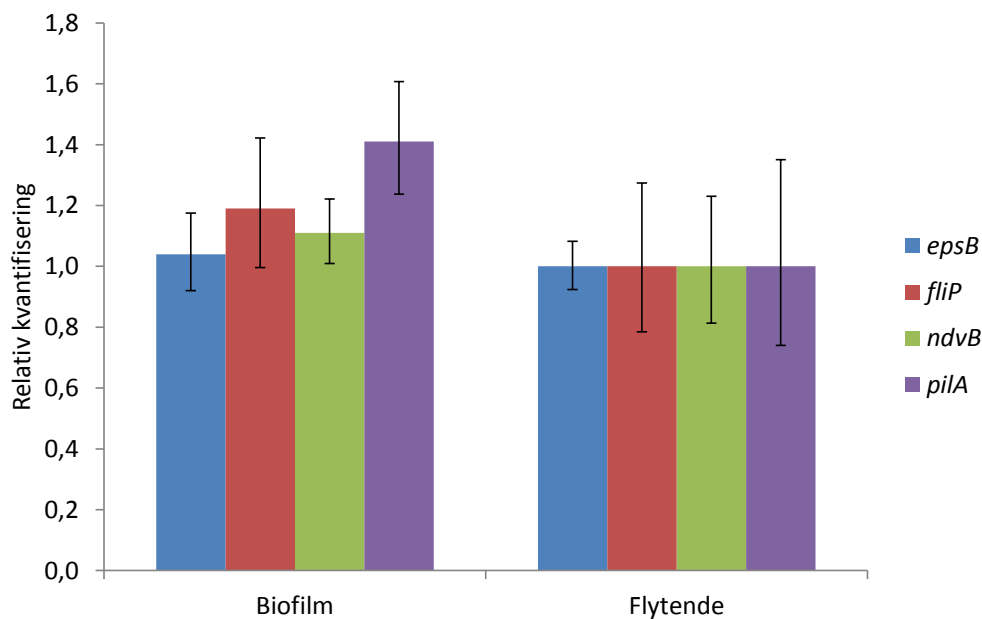
For å studere biofilmdannelse og pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa* biofilm ble ulike teknikker for å dyrke biofilm testet. Biofilm ble dyrket i 6 brønnsplater og på objektglass i reaktorer. Dyrkingsbetingelsene som ble undersøkt i flytende kultur ble benyttet videre i biofilmforsøk.

#### 3.4.1 Biofilmdannelse i *P. fluorescens* SBW25 og *P. aeruginosa* PAO1; studie av genuttrykk

Som et innledende forsøk ble genuttrykk for utvalgte gener involvert i biofilmdannelse undersøkt i *P. fluorescens* SBW25 og *P. aeruginosa* PAO1. De to stammene ble sammenlignet med hensyn på genuttrykk for gener involvert i biofilmdannelse. Det ble valgt ut fire gener som har betydning for biofilmdannelse; *epsB*, *fliP*, *ndvB* og *pilA*. Funksjonen til disse genene er beskrevet under punkt 1.6. RT-PCR, relativ kvantifisering ble utført for å undersøke uttrykket av genene i prøver tatt fra biofilm dyrket i en-brønnsplate (Omnitray) og flytende medium (rystekolber). Resultatene er vist i figur 23 og 24.



**Figur 23:** Relativ kvantifisering av uttrykk av genene *epsB*, *fliP*, *ndvB* og *pilA* i *P. fluorescens* SBW25 ved dyrking i omnitray, basismedium. 2 betingelser: biofilm og flytende (planktonisk vekst). Prøveuttak biofilm: 24 timer. Prøveuttak fra flytende kultur ved  $OD_{600} = 4,2$ .



**Figur 24: Relativ kvantifisering av uttrykk av genene *epsB*, *fliP*, *ndvB* og *pilA* i *P. aeruginosa* PAO1 ved dyrking i omnitray, basismedium. 2 betingelser: biofilm og flytende (planktonisk vekst). Prøveuttak biofilm: 19 timer. Prøveuttak fra flytende kultur ved  $OD_{600} = 5,5$ .**

Figur 24 viser at for *P. aeruginosa* PAO1 var det ikke signifikante forskjeller mellom uttrykk av de fire genene i biofilm og i flytende medium. For *P. fluorescens* SBW25 (Figur 23) var derimot uttrykket av de fire genene større i flytende medium enn i biofilm.

At genene var mindre uttrykt i biofilm enn i medium for *P. fluorescens* SBW25 kan tyde på at de utvalgte genene ikke har like stor betydning for biofilmutvikling i denne stammen.

### 3.4.2 Dyrking av biofilm i brønnplater

Dyrking av *P. aeruginosa* biofilm i brønnplater ble utført med basismedium og medier med lave konsentrasjoner av enkeltkomponenter. Dette ble gjort for å undersøke komponentbegrensings effekt på biofilmdannelse og produksjon av pyocyanin i biofilm.

Dyrkingen ble utført på 3 måter; dyrking i 6-brønnsplater uten rysting (statisk), dyrking i 6 brønnsplater med rysting og dyrking i 6 brønnsplater med rysting og regelmessig utskifting av medium.

#### Undersøkelse av pyocyaninproduksjon ved dyrking av biofilm i brønnplater uten rysting

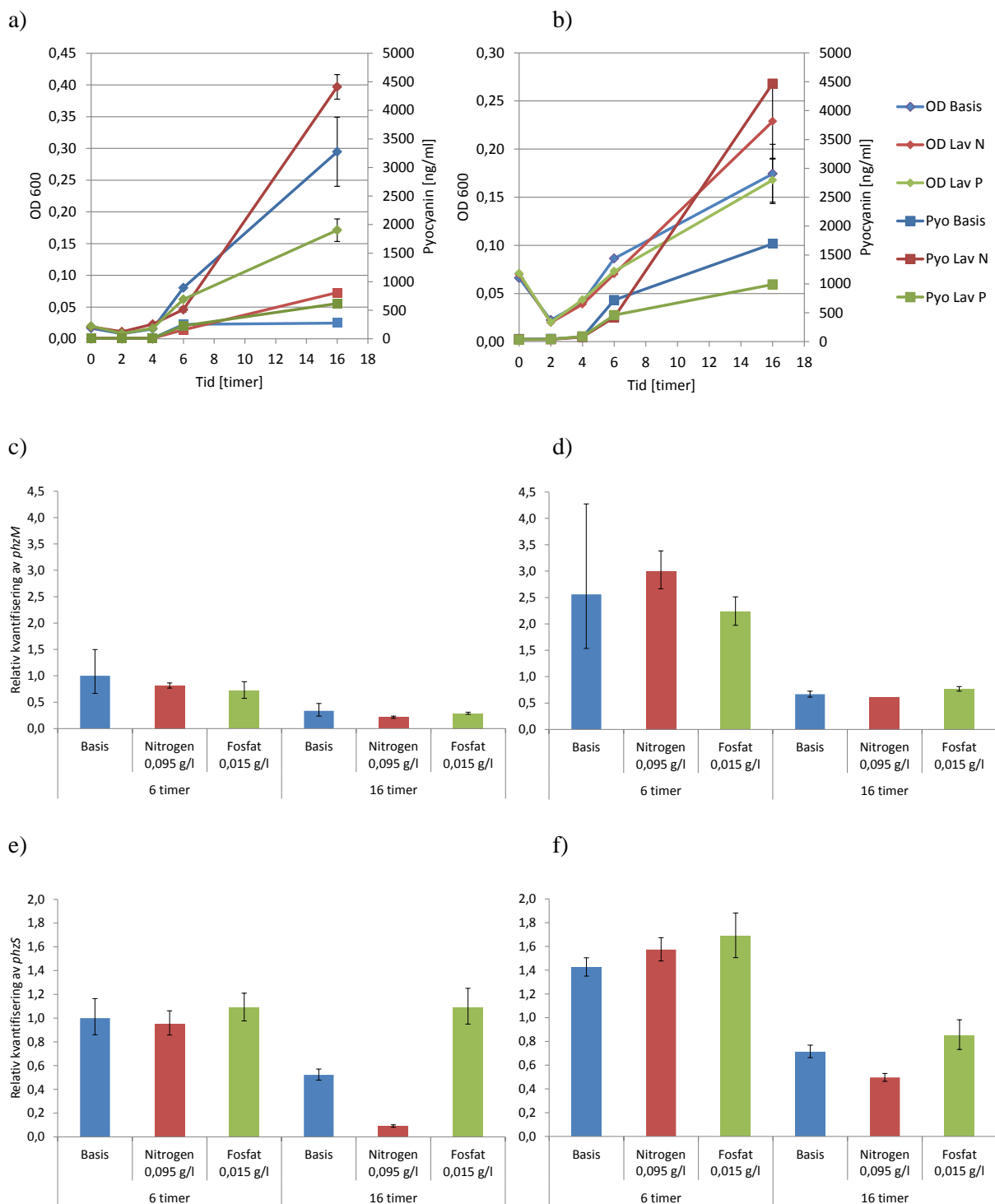
*P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 ble dyrket som biofilm i 6-brønnsplater. Det ble benyttet tre medier; definert medium (basismedium), medium med lav nitrogenkonsentrasjon og medium med lav fosfatkonsentrasjon. Det ble tatt prøver av biofilm for RT-PCR og relativ kvantifisering av gener involvert i syntese av pyocyanin (*phzM* og *phzS*) ved tidlig og sen biofilm. Det ble tatt utgangspunkt i resultater fra forsøk i rystekolber (punkt 3.3.3) for valg av konsentrasjon av enkeltkomponentene.

Biofilmforsøket ble utført to ganger. I første forsøk (Figur 26) ble *P. aeruginosa* PAO1 dyrket i brønnplater og det ble tatt prøver av biofilm ved 8 og 24 timer. Det ble brukt de samme konsentrasjonene av nitrogen og fosfat (0,095 g/l og 0,021 g/l) som ved dyrking i rystekolber (Punkt 3.3.3), for å kunne sammenligne uttrykk av genene i frie celler i medium og i biofilm ved de samme dyrkingsbetingelsene.

I det andre forsøket (Figur 25) ble i tillegg *P. aeruginosa* PA14 studert for å kunne sammenligne de to stammenes biofilmdannelse og uttrykk av genene ved de ulike betingelsene. I dette forsøket ble det valgt å gå enda lavere i fosfatkonsentrasjon, på grunn av liten forskjell på basismediet og medium med lav fosfatkonsentrasjon med hensyn på både vekst og produksjon av pyocyanin ved dyrking i rystekolber (Figur 22). Fosfatkonsentrasjon 0,015 g/l ble derfor valgt. Prøver av biofilm ble tatt ved 6 og 16 timer. Det ble tatt prøver av medium i brønner for OD målinger og analysering av pyocyanin i supernatantprøver ved 0-16 timer. I tillegg ble uttrykket av genene *fliP*, *phzE*, *lasI* og *rhII* undersøkt i tidlig biofilm (6 timer). Relativ kvantifisering av *fliP* og *phzE* er ikke vist. Relativ kvantifisering av *lasI* og *rhII* er vist i figur 42.

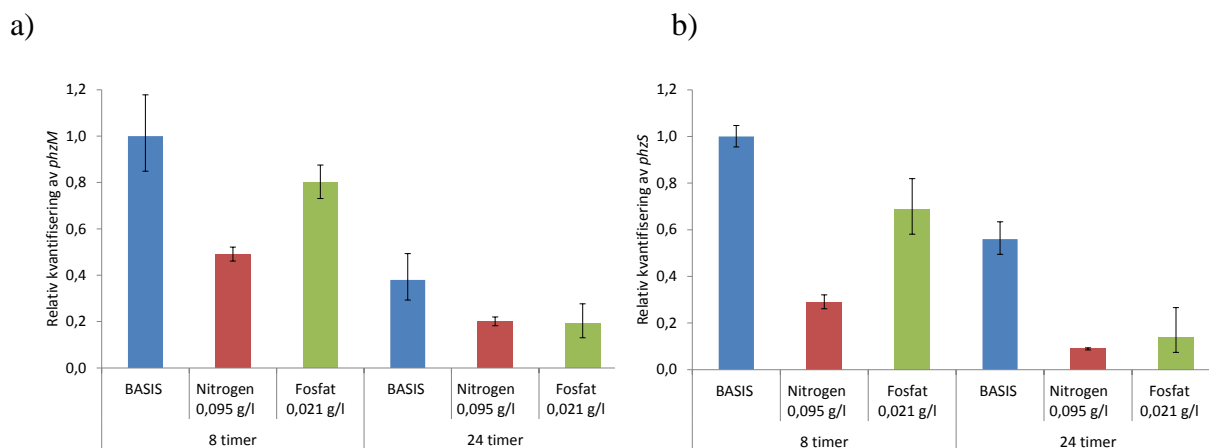


## Resultater



**Figur 25: OD, pyocyaninkonsentrasjoner og genuttrykk ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 (a, c, e) og *P. aeruginosa* PA14 (b, d, f) biofilm i 3 medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon. Nitrogen 0,095 g/l = 0,45 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Fosfat 0,015 g/l = 0,068 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .**

a, b) OD målt i 96-brønnsplate og pyocyaninkonsentrasjoner i mediet. c, d) Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM*. Prøveuttak 6 og 16 timer. e, f) Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzS*. Prøveuttak 6 og 16 timer. Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM* for begge stammer (c, d) ble kjørt i samme RT-PCR oppsett. Det samme gjelder for *phzS* (e, f). Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking i basismedium, 6 timer, som ble satt til 1,0.



**Figur 26: Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM* (a) og *phzS* (b) ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 biofilm i 6-brønnsplater med tre medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon; og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon. Prøveuttak ved 8 og 24 timers inkubering. Nitrogen 0,095 g/l = 0,45 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fosfat 0,021 g/l = 0,09 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking i basismedium, 8 timer, som ble satt til 1,0.**

Ved 16 og 24 timers inkubering ble det observert frittflytende celleflak i brønnene, tilsvarende som vist i figur 31. Disse flakene kan ha blitt med i filmprøvene og gitt feil RT-PCR resultater.

Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 ga gul farge på mediet, mens dyrking av *P. aeruginosa* PA14 ga grønn farge på mediet. Dette gjenspeiles i figur 25, som viser at *P. aeruginosa* PA14 produserte mer pyocyanin enn *P. aeruginosa* PAO1. I tillegg viser RT-PCR resultatene at det var jevnt høyere uttrykk av genene i *P. aeruginosa* PA14 biofilm enn i *P. aeruginosa* PAO1 biofilm.

Figur 25 viser at ved 16 timers inkubering var OD høyest i medium med lav nitrogenkonsentrasjon. Dette gjaldt begge stammene. Dette kan skyldes at biofilmen hadde løsnet og gitt falskt for høye OD-verdier. Det ble også ved dette uttaket visuelt observert minst biofilm i brønnene med lav nitrogenkonsentrasjon og mest biofilm i brønnene med basismedium, ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1. Dette gjenspeiles i RT-PCR resultatene som viser at for *P. aeruginosa* PAO1, 16 timer, var genene minst uttrykt i dette mediet. Feilefeltene for OD-målingene ved 6 og 16 timer viser at det var store avvik mellom de 4 parallellene som ble målt.

Figurene viser at begge genene var mest uttrykt i tidlig biofilm (6 og 8 timer). Forskjell på genuttrykk mellom tidlig og sen biofilm var tydeligst for *P. aeruginosa* PA14. Ved å korrelere RT-PCR resultatene med biofilmutvikling i 96-brønnsplater (Figur 9) kan man anta at pyocyaninproduksjon i biofilm initieres i tidlig steg i biofilmutvikling.

I det første forsøket (Figur 26) ble fosfatkonsentrasjon 0,021 g/l benyttet. Relativ kvantifisering viser at for tidlig biofilm var genene mer uttrykt ved dyrking i lav fosfatkonsentrasjon enn i lav nitrogenkonsentrasjon. Ved sen biofilm var det ikke signifikante forskjeller mellom genuttrykkene i disse to mediene. I det andre forsøket (Figur 25) var fosfatkonsentrasjonen lavere. Her ser man at ved sen biofilm var det ingen signifikante

## Resultater

---

forskjeller for uttrykk av *phzM* ved vekst i de ulike mediene, men for *phzS* var forskjellene signifikante. Fosfatbegrensning kan da ha blitt inntruffet og gitt effekt på uttrykk av *phzS*.

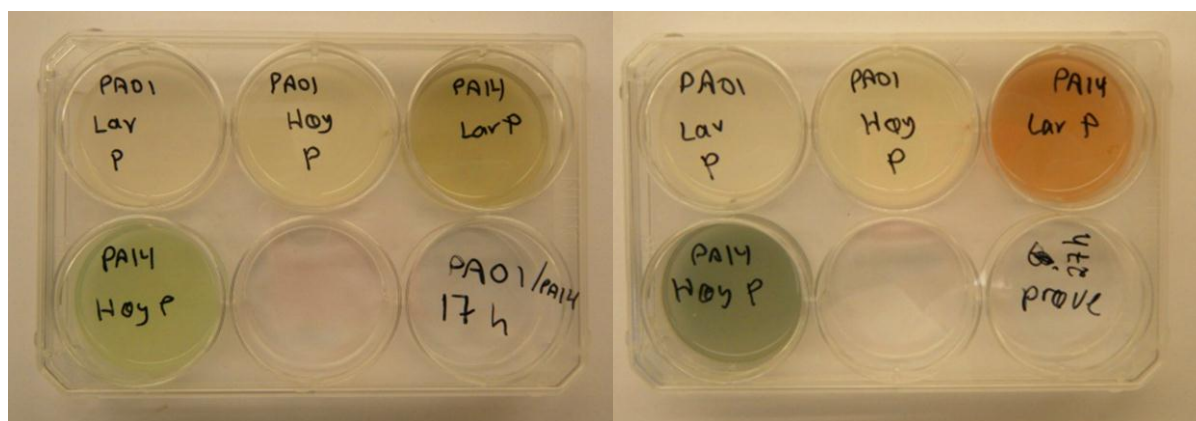
Resultatene for uttrykk av *lasI* og *rhlI* er presentert under punkt 3.4.5. Relativ kvantifisering av *fliP* (resultater ikke vist) viste at genet var mer uttrykt i *P. aeruginosa* PAO1 enn i *P. aeruginosa* PA14. Forskjellene på genuttrykk i de ulike betingelsene var ikke signifikante. Relativ kvantifisering av *phzE* (resultater ikke vist), viste ingen signifikante forskjeller mellom hverken stammer eller betingelser.

### Undersøkelse av pyocyaninproduksjon ved dyrking av biofilm i brønnplater med rysting

Undersøkelse av biofilmdannelse og uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon i biofilm ble videreført med dyrking i brønnplater med rysting. I dette forsøket videreføre studie av fosfatbegrensings effekt på biofilmdannelse og uttrykk av gener involvert i syntese av pyocyanin, da det er kjent fra litteraturen at lav fosfatkonsentrasjon hemmer biofilmdannelse, men virker positivt på pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa* (Jensen et al., 2006, Hinsa and O'Toole, 2006, Haddad et al., 2009).

*P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp ble dyrket i 6-brønnsplater i definert medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0082 g/l og høy fosfatkonsentrasjon; 0,62 g/l (basismedium). Det ble utført CV-farging av biofilm og uttak av medium for pyocyanin-, glukoseanalyser og OD-målinger i perioden 5-28 timer. Tidspunkt for prøveuttak ble vurdert ut i fra resultater fra kvantifisering av mengde biofilm (Figur 9). I tillegg ble det tatt ut prøver av medium og biofilm for RT-PCR og relativ kvantifisering av genene *phzM* og *phzS* ved 5,25 og 12 timer. Stammene ble i tillegg dyrket i en 24-brønnsplate med glassbunn (1 brønn for hvert medium) for konfokalmikroskopi. Konfokalmikroskopi ble utført ved 27 timer for begge stammer i begge medier.

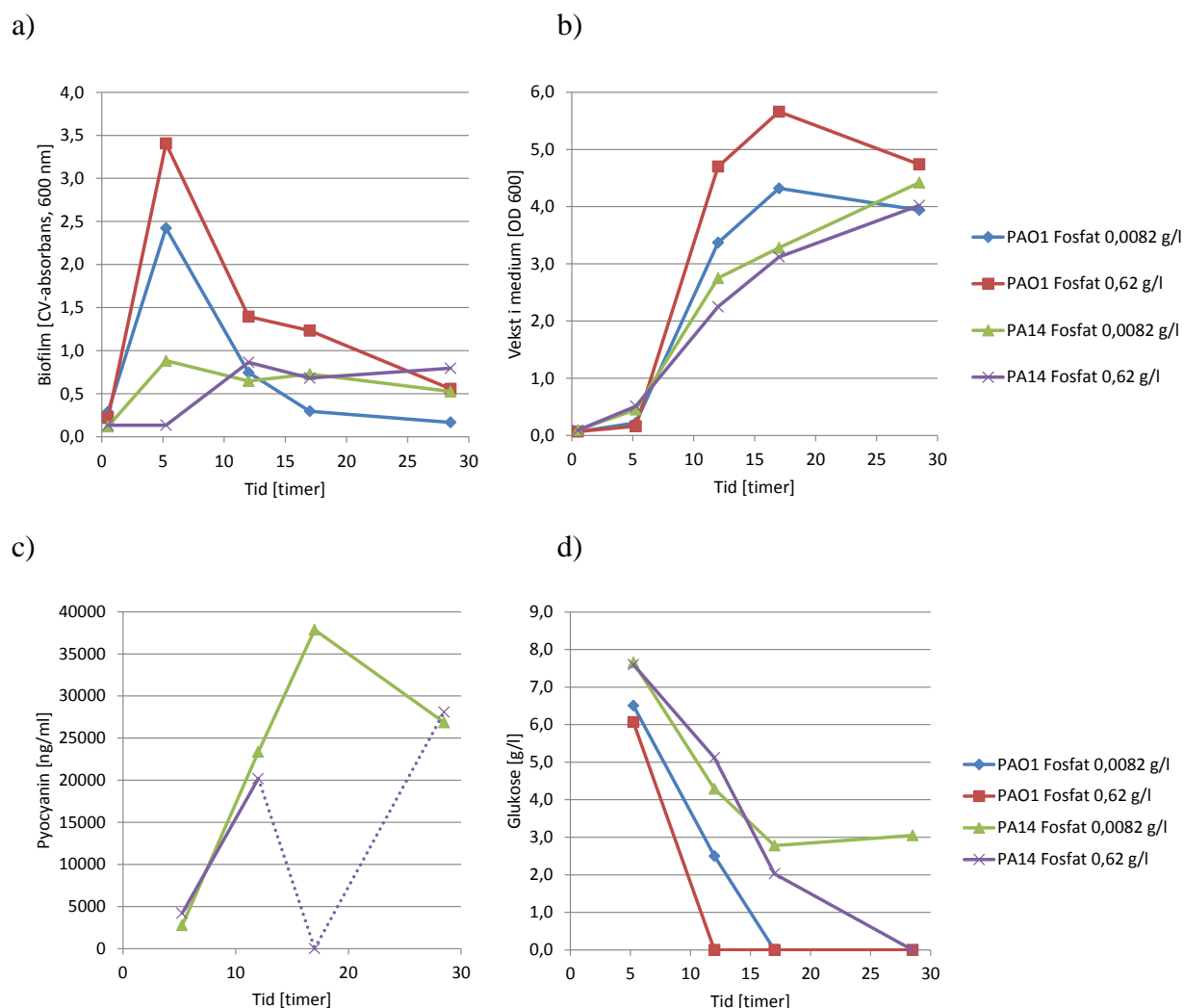
Figur 27 viser bilder tatt av brønnplaten ved dyrking av begge stammene. Figur 28 viser biofilm utvikling, vekst i medium samt pyocyanin- og glukosekonsentrasjoner i supernatantprøver. Figur 29 viser relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM* og *phzS* i medium og biofilm for begge stammene.



**Figur 27:** Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P.aeruginosa* PA14 gfp i 6-brønnsplater med 2 medier; basismedium med lav fosfatkonsentrasjon (0,0082 g/l) og basismedium med høy fosfatkonsentrasjon (0,62 g/l). Bildet til venstre viser plate inkubert 17 timer og bildet til høyre viser plate inkubert 28 timer. Fosfatkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,036 og 0,62 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

## Resultater

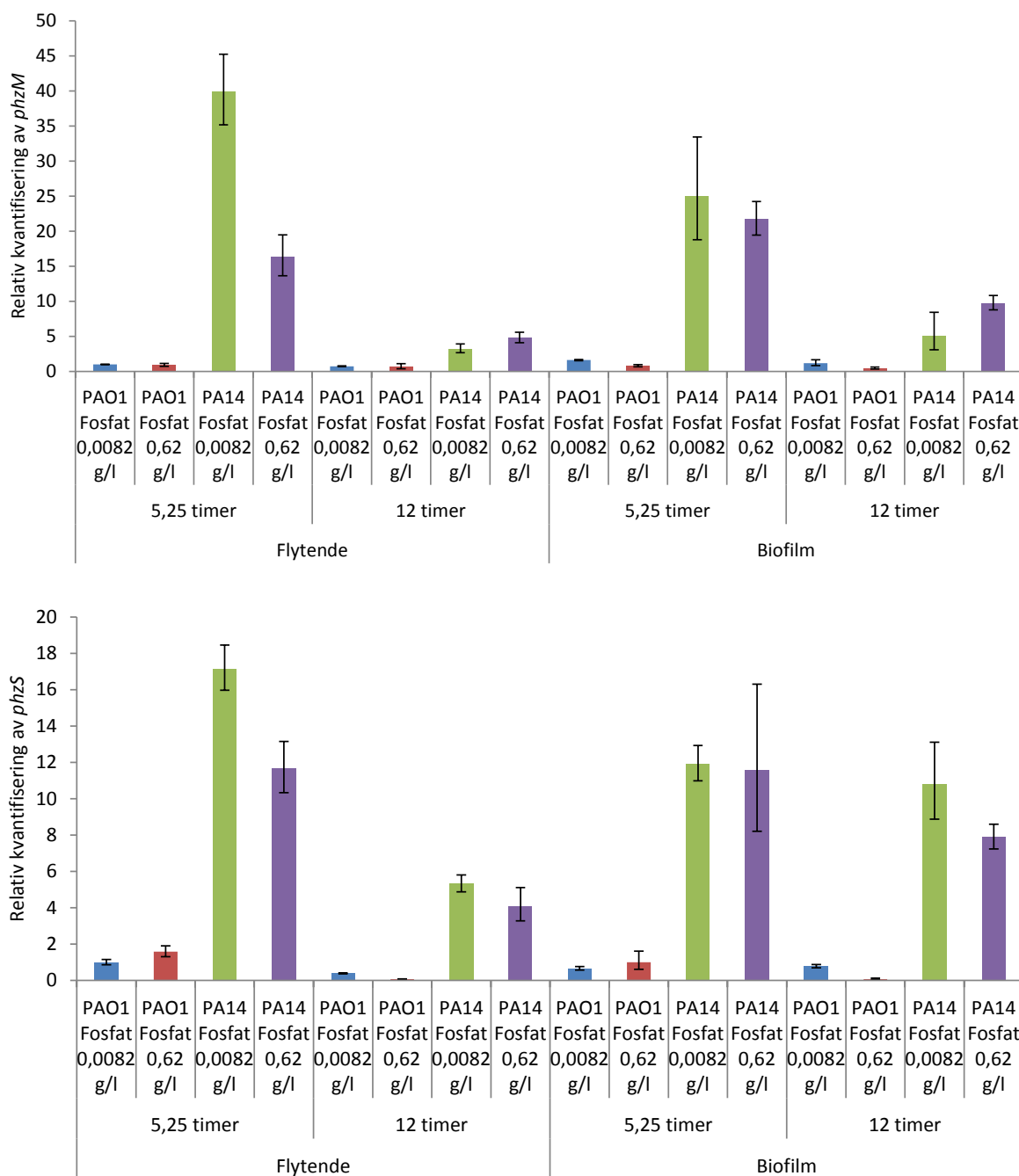
Figur 27 viser brønnplater dyrket 17 og 28 timer. Bildene viser at de ulike stammene dyrket i de ulike mediene ga forskjellig fargeutvikling. Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 ga gul farge på mediet, mens dyrking av *P. aeruginosa* PA14 ga grønnlig farge på mediet. Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 i medium med lav fosfatkonsentrasjon ga rødlig farge i mediet. Fargene i medium relateres til pyocyaninproduksjon i disse to stammene. Pyocyanin er et blå-grønt pigment som gir grønnlig farge på mediet ved dyrking av bakterier som produserer sekundærmetabolitten. Det er vist i denne oppgaven (Figur 17 og 25), i forsøk utført ved SINTEF og av andre (Dietrich et al., 2006) at *P. aeruginosa* PA14 produserer mer pyocyanin enn *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* PAO1 gfp produserte ikke pyocyanin.



**Figur 28: Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i 6-brønnsplater med to medier; definert medium med lav fosfatkonsentrasjon og definert medium med høy fosfatkonsentrasjon. Fosfatkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,036 og 2,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .**

a) CV-kvantifisering av mengde biofilm dannet. b) OD (600 nm mikroskopy) i medium. c) Pyocyaninkonsentrasjoner i supernatantprøver. Konsentrasjon ved 17 timer for dyrking i medium med høy fosfatkonsentrasjon var sannsynligvis en feilmåling og på grunn av dette er linjene i kurven striplet. d) Glukosekonsentrasjoner i supernatantprøver.

## Resultater



**Figur 29: Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM* (øverst) og *phzS* (nederst) ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i 6-brønnsplater med to medier; definert medium med lav fosfatkonsentrasjon og definert medium med høy fosfatkonsentrasjon. Fosfatkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,036 og 2,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Prøveuttak ved 5,25 og 12 timer ved to betingelser; flytende (planktonisk) og biofilm. Relativ kvantifisering av *phzM* for alle prøver ble kjørt i samme RT-PCR oppsett. Det samme gjelder for relativ kvantifisering for *phzS*. Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 ved lav fosfatkonsentrasjon, 5,25 timer (flytende) som ble satt til 1,0.**

Ved 5,25 ble det visuelt observert et tykt, slimaktig lag i *P. aeruginosa* PAO1 brønner som løsnet lett ved resning med vann. Ved 12 timer ble det observert mer biofilm for *P. aeruginosa* PAO1 enn for *P. aeruginosa* PA14. For *P. aeruginosa* PA14 ble det observert mer biofilm ved 12 timer enn ved 5,25 timer og ca. like mye biofilm ved dyrking i medium med lav og høy fosfatkonsentrasjon. For *P. aeruginosa* PAO1 ble det ved 12 timer observert mer biofilm ved dyrking i medium med høy fosfatkonsentrasjon enn i medium med lav fosfatkonsentrasjon. Ved 12 timer samlet det seg, for begge stammer, små celleflak i midten av brønnen på grunn av rysting, og biofilmen løsnet lettere ved rensing med vann ved dette uttaket enn ved første uttak.

Ved 17 timer var det nesten ikke synlig biofilm da medium ble tatt av. Biofilmen løsnet lett ved rensing med vann og ble lett med da vann ble pipettert av under rensing. For *P. aeruginosa* PAO1 vokst i høy fosfatkonsentrasjon var det mye biofilm i flak som ikke løsnet like lett.

Ved 28,5 timer ble det observert små “grums”/frittflytende aggregater i begge *P. aeruginosa* PAO1 brønner og større “grums”/frittflytende aggregater i *P. aeruginosa* PA14 vokst i lav fosfatkonsentrasjon. I *P. aeruginosa* PA14 vokst i høy fosfatkonsentrasjon ble det observert en stor klump som ble farget og kvantifisert. Denne kan muligens ha gitt falskt for høy absorbanse.

Mengde biofilm dannet ble kvantifisert ved farging med krystallfiolett (Figur 28a) viser at for *P. aeruginosa* PAO1 var det mest biofilm ved 5,25 timer, deretter gikk mengde biofilm ned. Dette samsvarer med målte glukosekonsentrasjoner i mediet (Figur 28d) som viser at for vekst i høy fosfatkonsentrasjon var all glukose brukt opp allerede ved 12 timer og for vekst i lav fosfatkonsentrasjon var all glukose brukt opp ved 17 timer. For *P. aeruginosa* PA14 vokst i medium med lav fosfatkonsentrasjon var det glukose igjen i mediet ved 28 timer. Mengde biofilm økte allikevel ikke etter 5,25 timer, og dette kan skyldes fosfatbegrensning. Figur 28a viser at biofilmdannelse sannsynligvis initieres tidligere i *P. aeruginosa* PAO1 enn i *P. aeruginosa* PA14.

Vekst av frie celler i medium (Figur 28b) viser at OD nådde høyest for *P. aeruginosa* PAO1 vokst i basismediet med høy fosfatkonsentrasjon. For *P. aeruginosa* PAO1 var det klar forskjell på vekst i medium med lav og høy fosfatkonsentrasjon. For *P. aeruginosa* PA14 var forskjellen mindre.

Figur 28c viser pyocyaninkonsentrasjoner fra supernatantprøver. Kun *P. aeruginosa* PA14 gfp produserte pyocyanin. Konsentrasjon ved 17 timer for dyrking i medium med høy fosfatkonsentrasjon er sannsynligvis en feilmåling og på grunn av dette er linjene i kurven striplet.

Resultater fra RT-PCR (Figur 29) viser at genene *phzM* og *phzS* var mer uttrykt i *P. aeruginosa* PA14 enn i *P. aeruginosa* PAO1. Genene var mer uttrykt i tidlig enn i sent uttak, både for biofilm og i medium. For *P. aeruginosa* PA14 kan det tyde på at medium med lav fosfatkonsentrasjon ga høyere uttrykk av *phzS*, noe som samsvarer med tidligere forsøk (figur 25). For *P. aeruginosa* PAO1 var det ingen signifikant forskjell på uttrykk av *phzM* i lav og

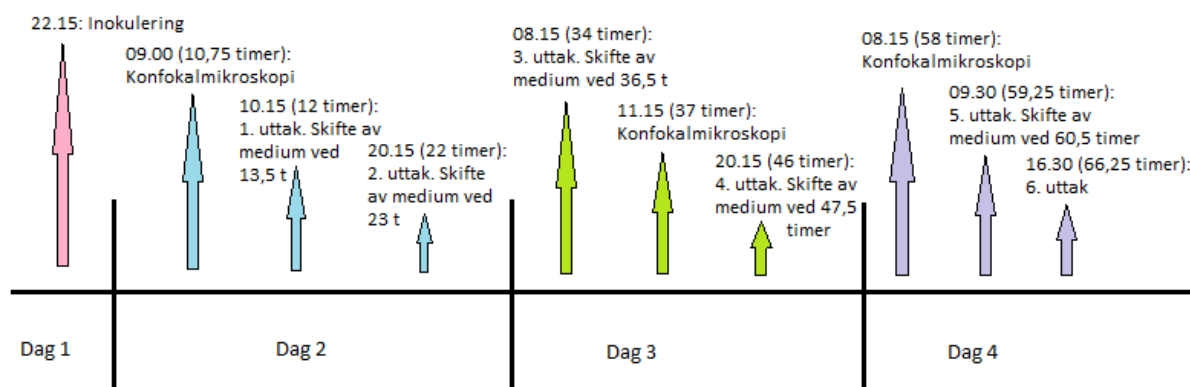
høy fosfatkonsentrasjon. Uttrykk av *phzS* var for denne stammen høyere i høy fosfatkonsentrasjon enn i lav ved 5,25 timer, mens ved 12 timer var uttrykket av *phzS* høyere i lav fosfatkonsentrasjon enn i høy. Dette gjelder for både medium og biofilm.

Resultater fra konfokalmikroskopi utført ved 27 timer er beskrevet under punkt 3.4.5.

### Undersøkelse av pyocyaninproduksjon ved dyrking av biofilm i brønnplater med rysting og utskifting av medium

I et nytt biofilmforsøk ble *P. aeruginosa* PA14 dyrket i 6-brønnsplater og 24-brønnsplater over 3 døgn med utskifting av medium regelmessig i vekstfasen, for å unngå begrensninger i mediet. Undersøkelse av fosfatbegrensings effekt på biofilmdannelse og pyocyaninproduksjon ble videreført samtidig som undersøkelse av glukosebegrensning ble inkludert. 3 medier ble benyttet: basismedium, basismedium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l og basismedium med lav glukosekonsentrasjon; 6,4 g/l. Det ble valgt å bruke en glukosekonsentrasjon som teoretisk ville gi samme maks OD som fosfatkonsentrasjon 0,0041 g/l, basert på figur 15c og 16. Det ble foretatt CV-farging av biofilm i 24-brønnsplater og uttak av medium for måling av pyocyanin, glukose og OD i 6-brønnsplater i perioden 12-59,25 timer (Figur 32 og 33). I tillegg ble det tatt ut prøver av medium og biofilm for RT-PCR og relativ kvantifisering av uttrykk av genene *phzM* og *phzS* ved 12, 34 og 59,25 timer (Figur 34). I tillegg til dyrking i 6- og 24-brønnsplater ble stammen dyrket i en 24-brønnsplate med glassbunn (1 brønn for hvert medium) for konfokalmikroskopi. Konfokalmikroskopi ble utført ved 10,75, 37 og 58 timer. Medium ble skiftet etter hvert prøveuttak ved 13,5, 23, 36,5, 47,5 og 60,5 timer.

Figur 30 viser en tidslinje for biofilmforsøket. Tidspunkt for inokulering, konfokalmikroskopering, prøveuttak og utskifting av medium er markert på tidslinja. Forsøket gikk over ca. 3 døgn.



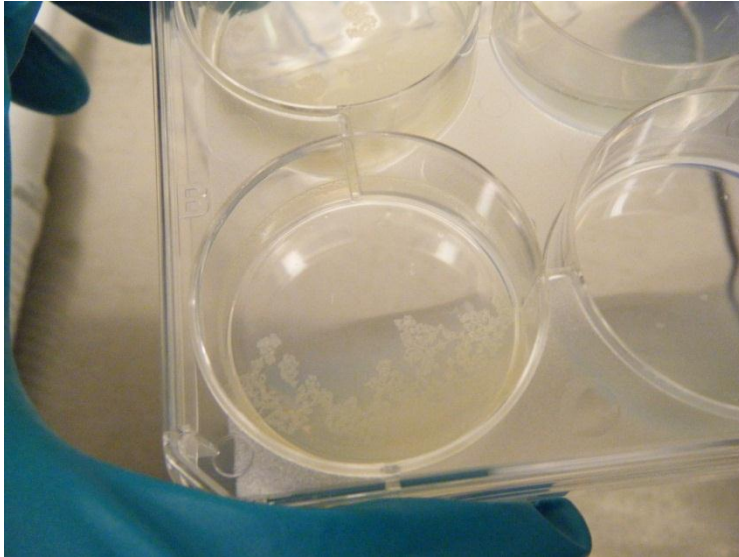
Figur 30: Tidslinje for biofilmforsøk i 6-brønnsplater og 24-brønnsplater med regelmessig utskifting av medium. RNA uttak av medium og biofilm ble utført ved uttak 1, 3 og 5.



## Resultater

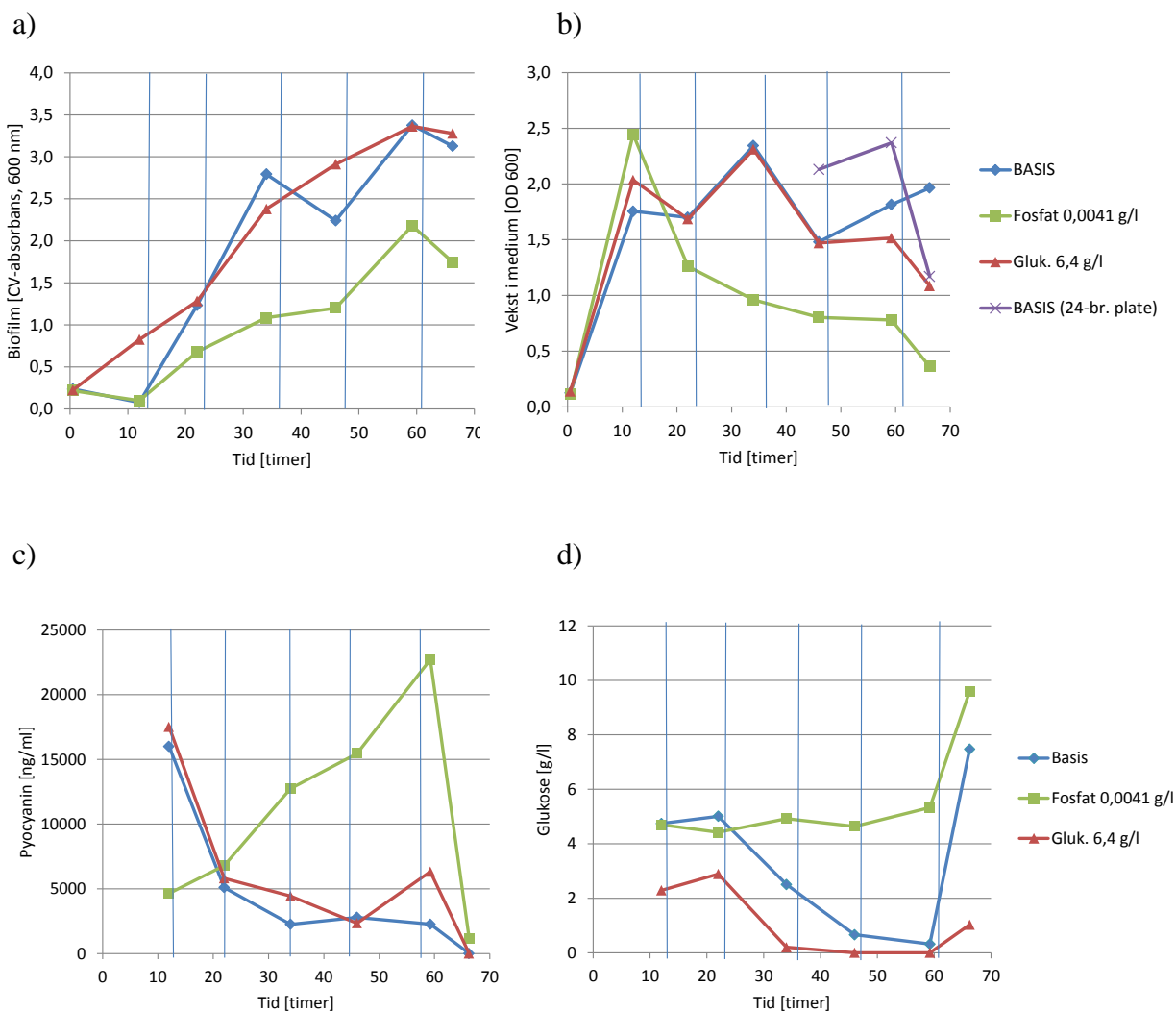
---

Det ble underveis i forsøket observert små flytende celleflak i mediet, som påvirket prøveuttakene (Figur 31). Flakene ble observert allerede ved 22 timer og mengde flak økte med inkuberingstid. Det ble observert mindre flak i brønnplata som ble benyttet for konfokalmikroskopi. Figur 31 viser bakterieflak ved dyrking i basismedium ved 47 timer.



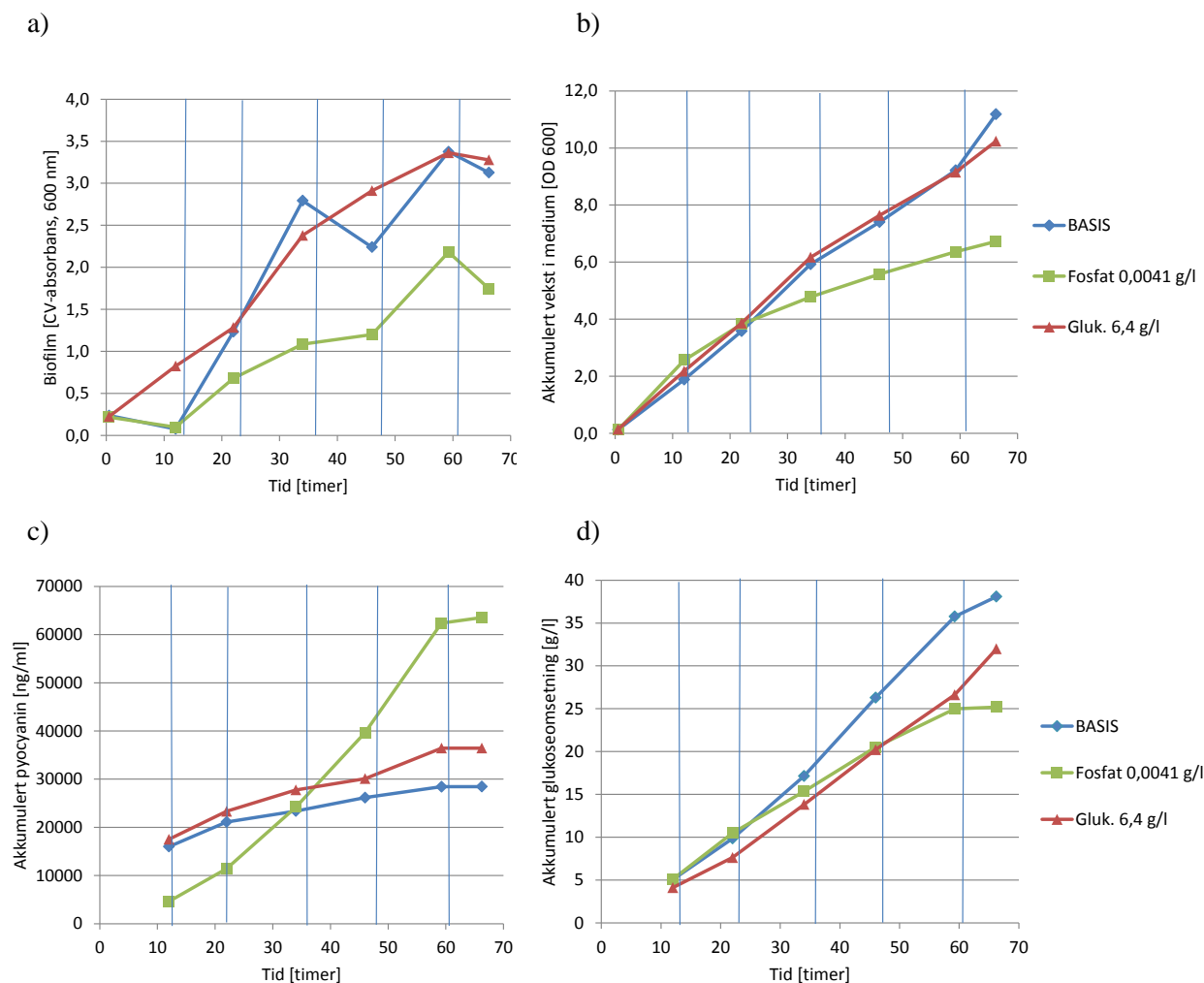
**Figur 31: Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i 6-brønnsplater. Brønnen på bildet viser dyrking i basismedium ved 47 timer.**

## Resultater



**Figur 32: Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i 6-brønnsplater og 24-brønnsplater med tre medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav fosfatkonsentrasjon og definert medium med lav glukosekonsentrasjon. Fosfat 0,0041 g/l = 0,018 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . De vertikale linjene i diagrammene markerer tidspunkt for utskifting av medium. Basismedium = 8,9 g/l glukose og 0,62 g/l fosfat.**

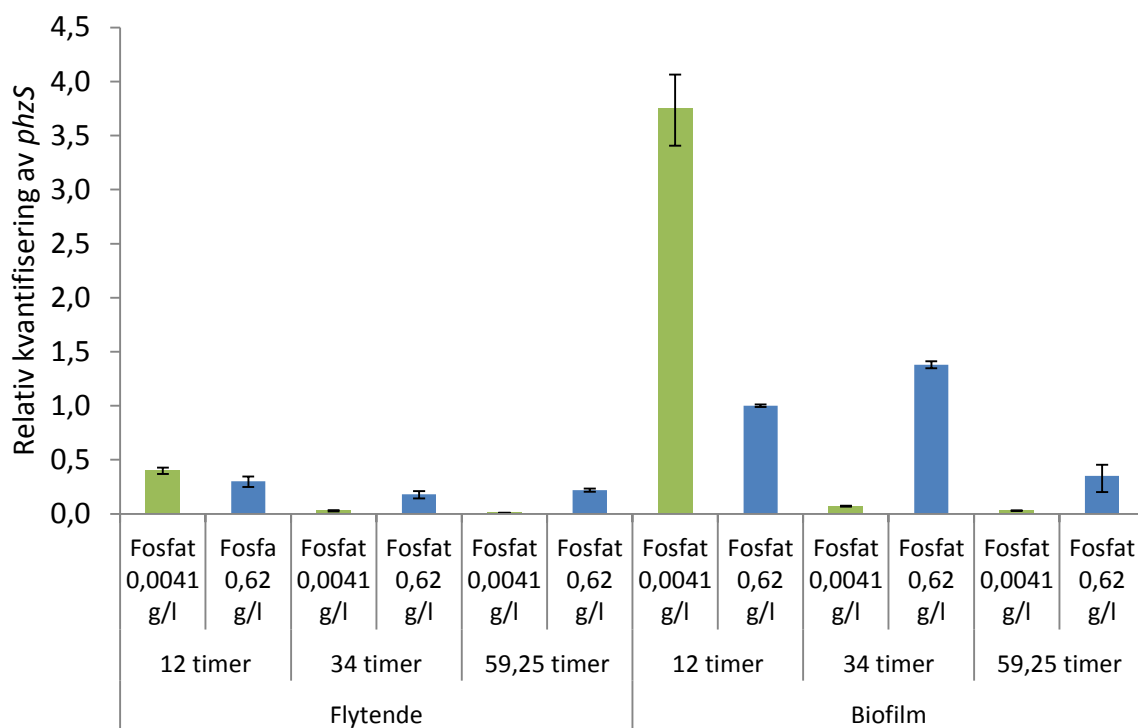
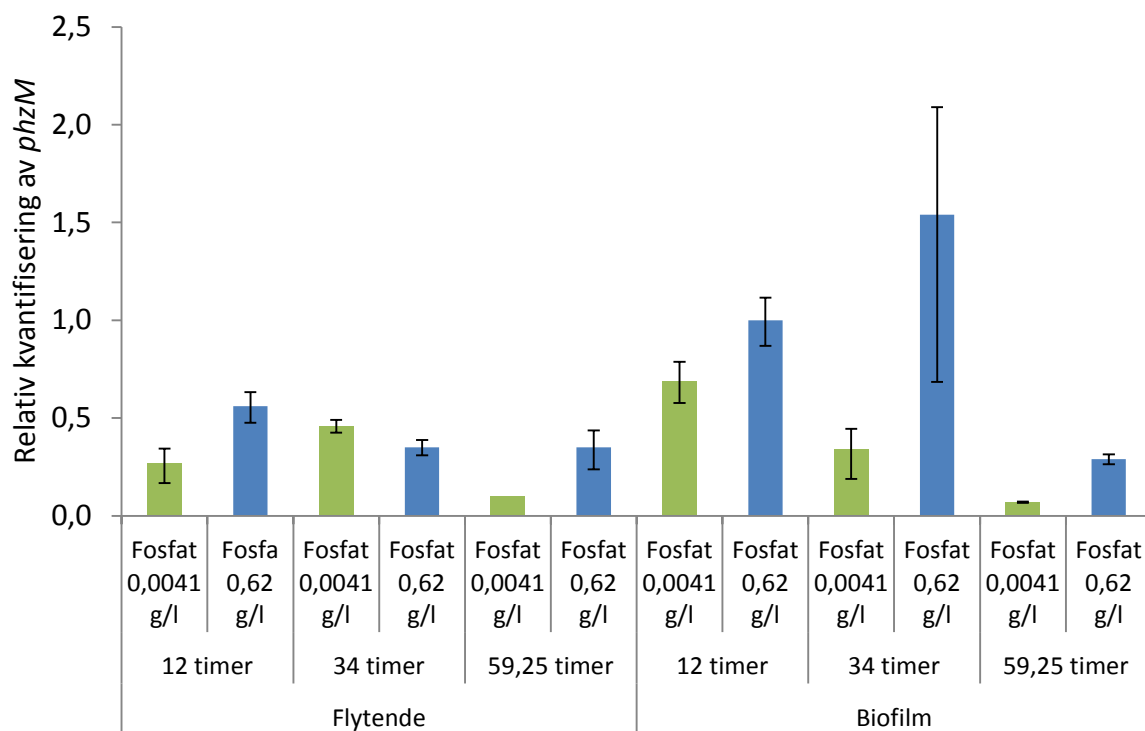
a) Mengde biofilm kvantifisert ved farging med Krystallfiolett, dyrking i 24-brønnsplater. b) OD i medium ved dyrking i 6-brønnsplater og 24-brønnsplater. c) Pyocyaninkonsentrasjoner i supernatantprøver. d) Glukosekonsentrasjoner i supernatantprøver.



**Figur 33: Akkumulert vekst i medium, pyocyaninproduksjon og glukoseomsetning ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i 6-brønnsplater og 24-brønnsplater med tre medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav fosfatkonsentrasjon og definert medium med lav glukosekonsentrasjon. Fosfat 0,0041 g/l = 0,018 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . De vertikale linjene i diagrammene markerer tidspunkt for utskifting av medium. Basismedium = 8,9 g/l glukose og 0,62 g/l fosfat.**

a) Mengde biofilm kvantifisert ved farging med Krystallfiolett, dyrking i 24-brønnsplater. b) Akkumulert vekst i medium (OD [600 nm]) ved dyrking i 6-brønnsplater. c) Akkumulerte pyocyaninkonsentrasjoner i supernatantprøver. d) Akkumulert glukoseomsetning i supernatantprøver.

## Resultater



**Figur 34:** Relativ kvantifisering av uttrykk av *phzM* (øverst) og *phzS* (nederst) ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i 6-brønnsplater med to medier; definert medium med lav fosfatkonsentrasjon og definert medium med høy fosfatkonsentrasjon (basismedium). Fosfatkonsentrasjonene tilsvarer henholdsvis 0,018 og 2,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Prøveuttak ved 12, 34 og 59,25 timer ved to betingelser; flytende og biofilm. Relativ kvantifisering av *phzM* for alle prøver ble kjørt i samme RT-PCR oppsett. Det samme gjelder for relativ kvantifisering av *phzS*. Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking ved høy fosfatkonsentrasjon, 12 timer, biofilm, som ble satt til 1,0.

Figur 32a viser at det ble dannet omtrent like mye biofilm i medium med lav glukosekonsentrasjon som i basismediumet. Dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon ga minst biofilm. Mengde biofilm nådde sin topp ved 58,25 timer, for deretter å avta. Kurven for mengde biofilm dannet i basismedium gikk ned etter 34 timer.

Figur 32b viser vekst av frie celler i medium. I tillegg viser figuren OD i medium ved dyrking i basismedium i 24-brønnsplate (3 siste uttak). Dette ble inkludert for å sammenligne OD-utvikling i 6- og 24-brønnsplate. Figuren viser at OD i medium gikk ned allerede etter 12 timer ved vekst i medium med lav fosfatkonsentrasjon. Stammen vokste omtrent like godt i medium med lav glukosekonsentrasjon som i basismedium.

Figur 32c viser at pyocyaninkonsentrasjoner i mediet økte ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon. For basismedium og medium med lav glukosekonsentrasjon var det høyest konsentrasjon av pyocyanin ved første prøveuttak, men utskifting av medium ga ingen økt pyocyaninproduksjon.

Figur 32d viser målte glukosekonsentrasjoner i supernatantprøver fra mediet. For vekst i basismedium og medium med lav glukosekonsentrasjon økte OD i mediet og mengde biofilm selv om glukosekonsentrasjoner i mediet gikk ned. All glukose var brukt opp i mediet ved 46 og 59,25 timer, mens mengde biofilm økte i dette tidsrommet. For vekst i medium med lav fosfatkonsentrasjon holdt glukosekonsentrasjonene i mediet seg stabile. For dyrking i dette mediet gikk OD i mediet ned, mens mengde biofilm økte i løpet av forsøket.

På grunn av regelmessig utskifting av medium viser ikke konsentrasjoner målt i medium et reelt tidsforløp. Lav vekst og pyocyaninkonsentrasjoner og høy glukosekonsentrasjoner i siste prøveuttak kan derfor skyldes kort tid siden forrige mediumskifte. På grunn av dette er akkumulert vekst i medium, akkumulert pyocyaninproduksjon og glukoseomsetning vist i figur 33. Figuren viser at celler dyrket i basismedium hadde høyest glukoseomsetning, men også mest biofilmvekst og vekst av frie celler.

RT-PCR ble utført for medium- og biofilmprøver fra dyrking i basismedium og medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,0041 g/l). Det ble valgt å ikke utføre RT-PCR på prøver fra bakterier vokst i lav glukosekonsentrasjon på grunn av at det ikke ble plass til alle prøvene i et oppsett og siden biofilmdannelse var omtrent lik som for basismediumet (Figur 32a).

Resultatene fra relativ kvantifisering av *phzM* og *phzS* (Figur 34) viser at begge genene hadde generelt høyere uttrykk i biofilm enn i medium. I mediet hadde *phzM* høyere uttrykk enn *phzS*. For vekst i medium med lav fosfatkonsentrasjon var uttrykk av begge gener høyt ved første uttak, deretter ble genuttrykkene avtagende. For vekst i medium med høy fosfatkonsentrasjon var uttrykk av begge gener i biofilm høyt ved både første og andre uttak, men lavt ved siste uttak.

Resultater fra konfokalmikroskopering er beskrevet i punkt 3.4.5.

### 3.4.3 Dyrking av biofilm i reaktor

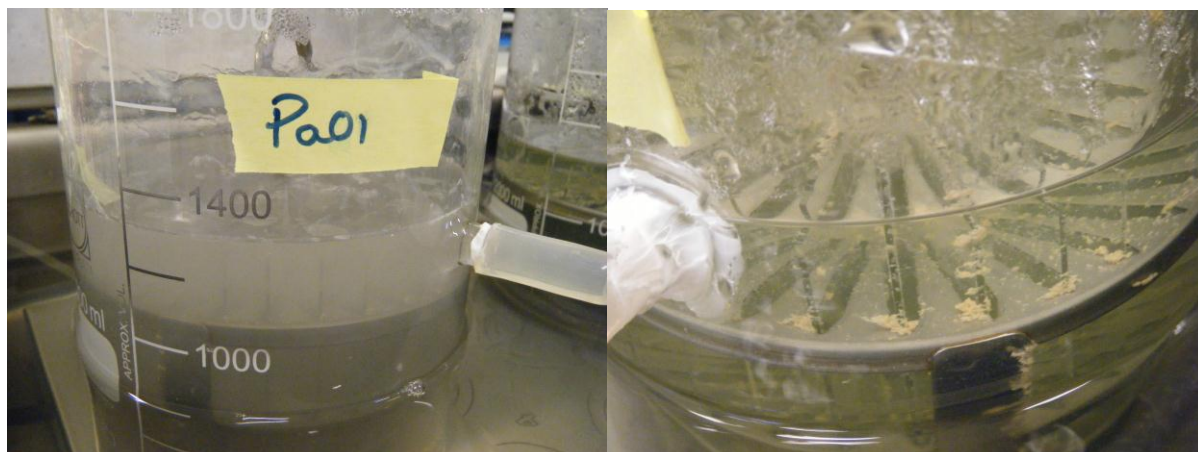
I tillegg til dyrking av biofilm i brønnplater ble dyrking av biofilm testet i minireaktorer med kontinuerlig tilførsel av friskt medium. Hensikten med dette var å oppnå en kontinuerlig steady state prosess. *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp ble dyrket med definert medium. Se tabell 11 for forsøksbetingelser. 24 objektglass var plassert i stativ i hver reaktor, og en jevn flow av medium tillot vekst av biofilm på objektglassene. Forsøket ble kjørt kontinuerlig over ca. 3 døgn, og det ble tatt ut prøver hver dag for måling av pH (Tabell 16), OD og pyocyanin i medium samt måling av OD i biofilm (Figur 37) og prøve av biofilm for RT-PCR og relativ kvantifisering av genene *lasI* og *rhlI*. Resultatene fra RT-PCR er beskrevet i punkt 3.4.5. Konfokalmikroskopi ble utført for *P. aeruginosa* PA14 ved ca 49 timers inkubering (Figur 38b).

Figur 35 viser minireaktorene sett ovenfra. Bildet til venstre viser at det ble dannet en film på toppen av mediet i reaktoren ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1. Bildet til høyre viser at *P. aeruginosa* PA14 ikke dannet en slik film.



**Figur 35: Minireaktor for dyrking av biofilm sett ovenfra. Til venstre sees minireaktor med dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp, 69 timer. Til høyre sees minireaktorer med dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp, 48 timer.**

Figur 36 viser minireaktorene sett fra siden. Bildet til venstre viser at det var mye vekst av frie celler i mediet i reaktor med *P. aeruginosa* PAO1. Bildet til høyre viser at dyrking av *P. aeruginosa* PA14 i minireaktor ga lite vekst i mediet, men aggregatdannelse på objektglass. Biofilm på objektglass i *P. aeruginosa* PAO1 reaktor ble observert som store, flate flak som gled lett av ved skylling. For *P. aeruginosa* PA14 ble biofilmen observert som små aggregat som la seg mot kantene på objektglasset. Disse aggregatene gled ikke like lett av ved skylling.



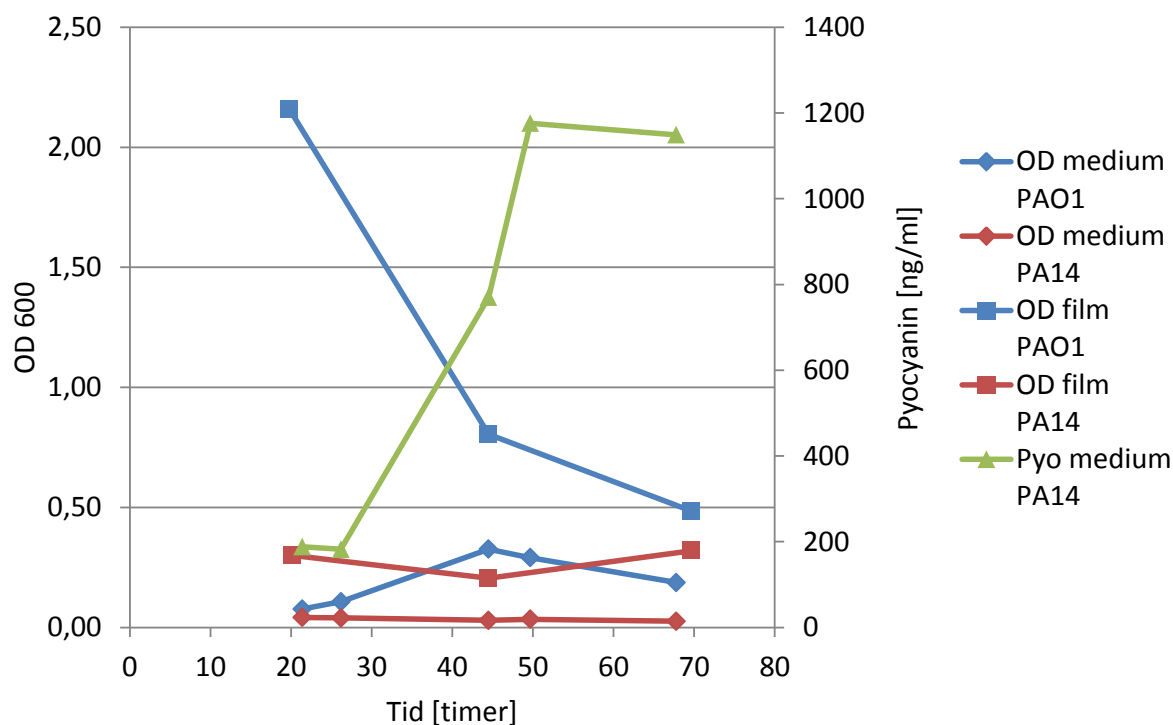
Figur 36: Minireaktor for dyrking av biofilm sett fra siden av. Til venstre sees minireaktor med dyrking av *P. aeruginosa* PA01 gfp, 48 timer. Til høyre sees minireaktorer med dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp, 48 timer.

Tabell 16 gir en oversikt over pH i medium i reaktorene. pH-verdiene er målt med både pH-strips og pH-meter. Tabellen viser at pH-verdiene i reaktorene økte fra 7,0 – 7,0-7,5 etter 26 timer.

Tabell 16: Målte pH verdier (pH-strips og pH-meter) i medium ved dyrking av *P. aeruginosa* PA01 og *P. aeruginosa* PA14 i minireaktorer.

Tid [timer]	<i>P. aeruginosa</i> PA01		<i>P. aeruginosa</i> PA14	
	pH-strips	pH-meter	pH-strips	pH-meter
21	7,0		7,0	
26	7,0		7,0	
44,5	7,0-7,5		7,0-7,5	
48		6,89		6,9
50	7,0-7,5		7,0-7,5	
68	7,0-7,5	6,86	7,0-7,5	6,87

## Resultater



Figur 37: OD målinger i medium og biofilm (600 nm mikrokyvette) og pyocyaninkonsentrasjoner ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 på objektglass i minireaktor.

For måling av OD i biofilm ble objektglass tatt opp fra reaktor og skylt NaCl for å fjerne overflødig medium. Deretter ble filmen løstnet ved hjelp av NaCl. Det forbindes en del usikkerhet rundt denne målingen av OD i biofilm, da en del biofilm løsnet da glass ble tatt opp og skylt i NaCl, noe som kan ha gitt falskt for lave resultater.

Figur 37 viser at *P. aeruginosa* PAO1 dannet mest biofilm og at mengde biofilm var størst ved første prøveuttak. Ved de neste uttakene var det mindre biofilm på objektglassene, mens det ble observert mer vekst i mediet. For *P. aeruginosa* PA14 var mengde biofilm og OD i mediet stabil i løpet av reaktorforsøket. Vekst i medium var høyere for *P. aeruginosa* PAO1 enn for *P. aeruginosa* PA14, noe som samsvarer med observasjonene. Pyocyaninkonsentrasjoner i mediet ble målt for begge stammer. *P. aeruginosa* PAO1 gfp produserte ikke detekterbare mengder av pyocyanin. Pyocyaninkonsentrasjoner i supernatantprøver ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 er plottet inn i sekundær akse i figur 37.

### 3.4.4 Biofilmutbytte

Å etablere metoder for å studere biofilm innebærer blant annet å undersøke RNA-utbytter korrelert til mengde biofilm dannet. Dette avsnittet gir en oversikt over biofilmdannelse i 6-brønnsplater, og RNA-utbytter som ble oppnådd ved RNA-isolering av biofilm fra visse inkuberingstider og overflatearealer, se vedlegg K. En korrelasjon mellom biofilmutbytte og overflateareal ved dyrking i reaktor har vært vanskelig å oppnå, og på grunn av dette har det ikke blitt beregnet RNA-utbytter for denne dyrkingsmetoden. Ved dyrking i reaktor var det nødvendig å ta ut minst 3 glass for å få nok RNA til RT-PCR.



### 3.4.5 Studie av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi

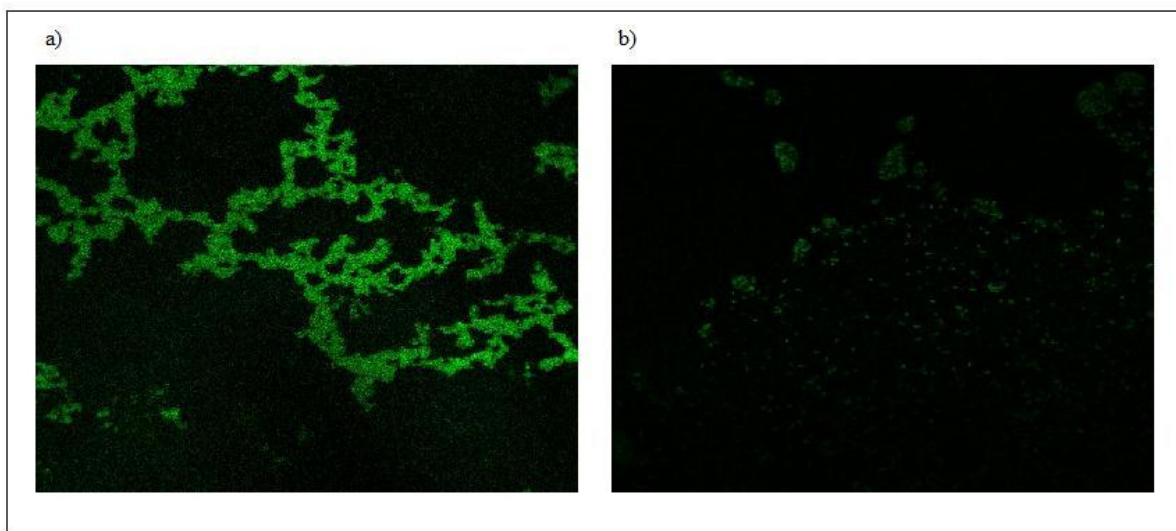
Hovedmålet for oppgaven var å etablere teknikker for å studere *P. aeruginosa* biofilm der i blant ved hjelp av konfokalmikroskopi. Her ble *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 dyrket i reaktorer og i 6-brønnsplater.

Undersøkelse av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi ble innledet med dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp i 6-brønnsplater uten rysting og med tre medier; basismedium, medium med lav nitrogenkonsentrasjon; 0,095 g/l og lav fosfatkonsentrasjon; 0,015 g/l. Figur 38a viser konfokalmikroskopi *P. aeruginosa* PA14 dyrket i medium med lav fosfatkonsentrasjon ved 12,5 timer.

For reaktorforsøket ble konfokalmikroskopi utført for *P. aeruginosa* PA14 ved 49 timer (Figur 38b).

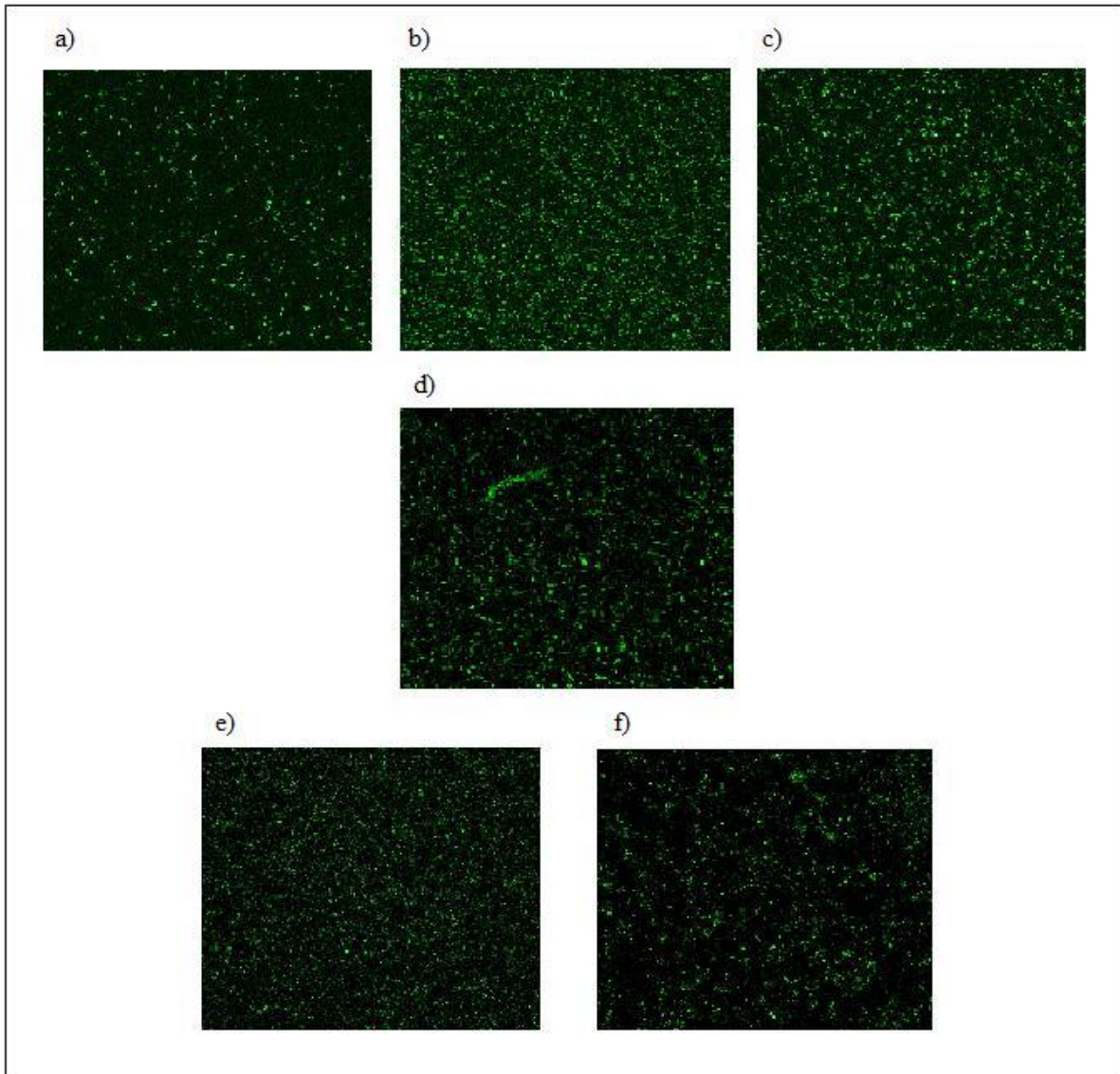
Videre ble konfokalmikroskopi utført ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i 6-brønnsplater uten rysting og med to medier; definert medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0082 g/l og definert medium med høy fosfatkonsentrasjon; 0,62 g/l (basismedium). Konfokalmikroskopi ble utført ved 27 timers inkubering og viste fluorescerende enkeltceller for *P. aeruginosa* PA14 dyrket i basismedium. For *P. aeruginosa* PAO1 dyrket i begge medier og *P. aeruginosa* PA14 dyrket i definert medium med 0,0082 g/l fosfat ble det ikke funnet noen fluorescerende celler. Resultater fra denne mikroskoperingen er ikke vist.

Biofilm ble så undersøkt i et nytt forsøk med dyrking av *P. aeruginosa* PA14 i 6-brønnsplater med rysting og med tre medier; basismedium, definert medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l, og definert medium med lav glukosekonsentrasjon; 6,4 g/l. Medium ble skiftet regelmessig i løpet av forsøket. Konfokalmikroskopering ble utført ved 10,75, 37 og 58 timer (Figur 39-41).



**Figur 38: Studie av *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi.**

a) Biofilm dyrket i 6-brønnsplate i medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,015 g/l = 0,068 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . 12,5 timer. b) Biofilm dyrket på objektglass i minireaktor, basismedium. 49 timer.

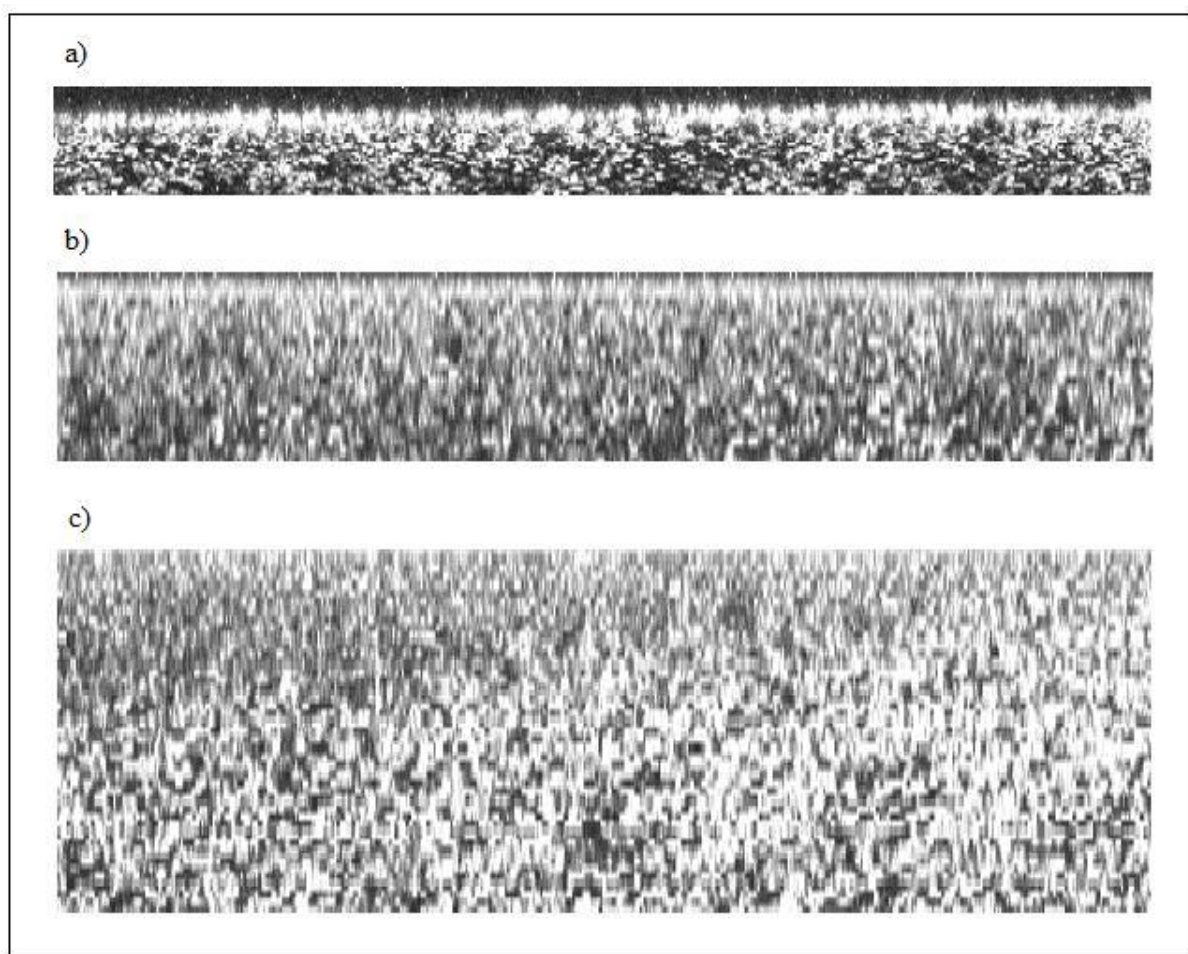


**Figur 39: Studier av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi. Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp i 24-brønns glassplater med regelmessig utskifting av medium. Cellene har blitt farget grønne ved hjelp av Microsoft Office Picture Manager, for å få et omtrent reellt bilde av fluorescens. Bildene ble tatt i områdene med tettest film.**

a) Dyrking i basismedium, 11 timers inkubering. b) Dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l, 11 timers inkubering. c) Dyrking i medium med lav glukosekonsentrasjon; 6,4 g/l, 11 timers inkubering. d) Dyrking i basismedium, 37 timers inkubering/1,5 timer etter forrige mediumutskifting. e) Dyrking i basismedium, 58 timer/12 timer etter forrige mediumutskifting. f) Dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l, 58 timer/10,5 timer etter forrige mediumutskifting.

## Resultater

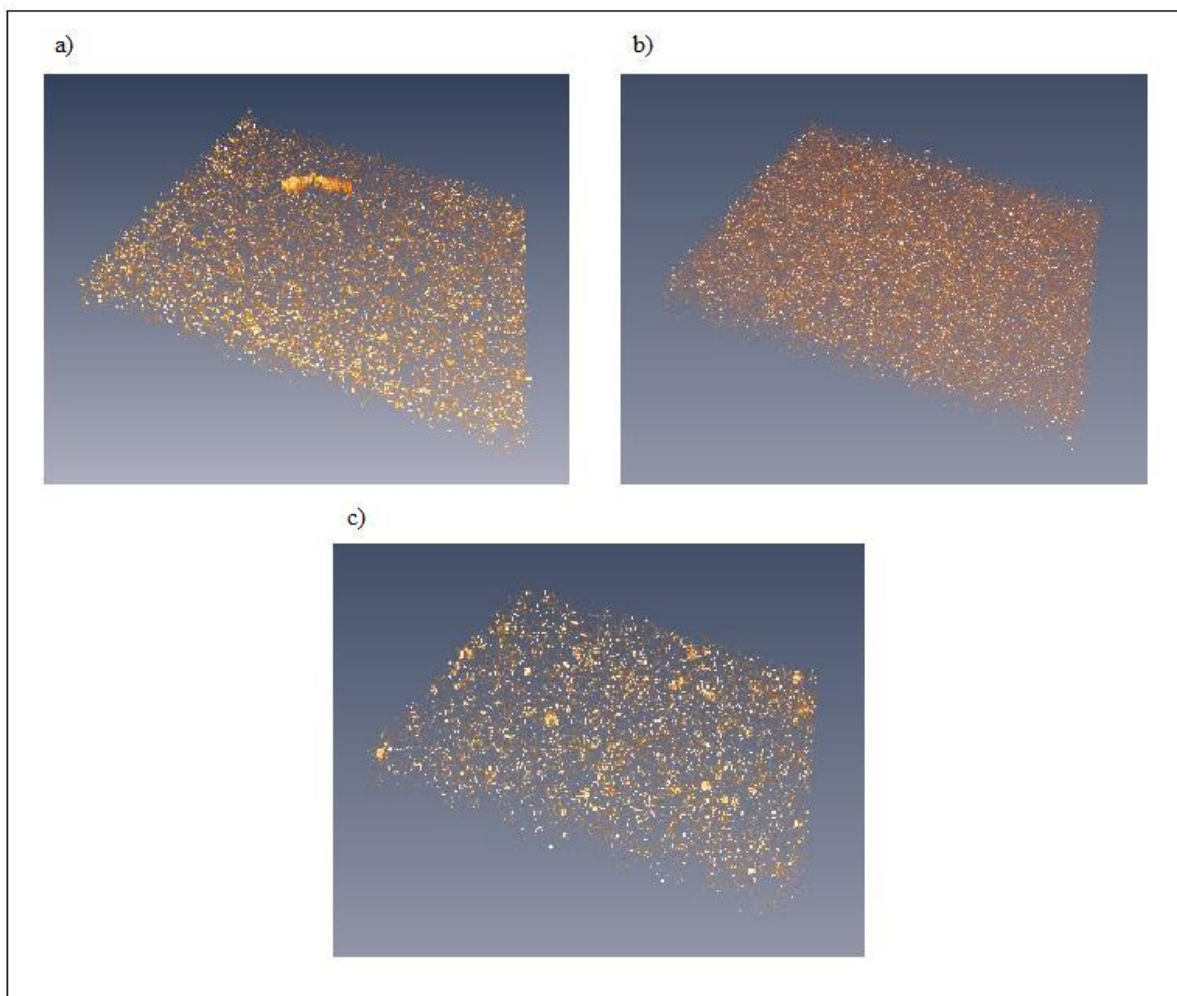
Figur 39 viser konfokalmikroskopi fra biofilmforsøk med utskifting av medium. Bildene ble tatt fra områdene med tette biofilm. Mikroskopering av biofilm er beskrevet i punkt 2.11. Mikroskopering ved 11 timer viser jevnest biofilm ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon og minst biofilm ved dyrking i basismedium. Ved 37 timer viste mikroskopering et veldig tynt lag av enkeltstående bakterier ved vekst i medium med lav fosfatkonsentrasjon (resultat ikke vist), og tykkere biofilm i basismedium. Ved 58 timer viste mikroskoperingen tett og homogen film ved vekst i basismedium og minst biofilm ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon. Fosfatbegrensning hadde inntruffet og ga en ujevn og mer “kupert” biofilm.



**Figur 40: Studier av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi. Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp i 24-brønnsplater med regelmessig utskifting av medium, mikroskopering ved 11 timer. Snitt av biofilm sett fra siden.**

a) Dyrking i basismedium. b) Dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l. c) Dyrking i medium med lav glukosekonsentrasjon; 6,4 g/l.

Figur 40 viser snitt av biofilm sett fra siden. Snitt av biofilm dyrket i basismedium (Figur 40a) ble tatt med lengre avstand mellom hvert bilde enn snitt i biofilm dyrket i medium med lav fosfat- og glukosekonsentrasjoner (Figur 40b og c). For dyrking i medium med lav glukosekonsentrasjon (Figur 40c) ble snittet tatt lenger opp i kulturen enn for de to andre snittene.



**Figur 41: Studier av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi, 3D-bilder. Dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp i 24-brønnsplater med regelmessig utskifting av medium.**

a) Dyrking i basismedium, 37 timers inkubering/1,5 timer etter forrige mediumutskifting. b) Dyrking i basismedium, 58 timer/10,5 timer etter forrige mediumutskifting. c) Dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,0041 g/l, 58 timer/10,5 timer etter forrige mediumutskifting.

Figur 41 viser tre-dimensjonale bilder av *P. aeruginosa* PA14 biofilm. De svakeste pikslene ble tatt bort, slik at bare klare strukturer har kommet fram.

## Resultater

Tabell 17 gir en oversikt over høydene [ $\mu\text{m}$ ] for start og slutt av optiske snitt som ble tatt av de ulike biofilmene ved dyrking i brønnplater med jevnlig tilførsel av næring. Nederste rad viser verdiene for *P. aeruginosa* PA14 biofilm fra reaktorforsøk. Tykkelse er angitt som differanse mellom høyeste og laveste høyde i z-plan. Tabellen viser at biofilm dyrket i lav fosfatkonsentrasjon ved 11 timer ga tettest biofilm, noe som samsvarer med figur 39. Ved dyrking i reaktor ble *P. aeruginosa* PA14 biofilm tykk og ble derfor klemt i petriskåla. Den beregnede tykkelsen av biofilmen kan derfor være feil.

**Tabell 17: Z-plan (høyder) for start og slutt av optiske snitt. Konfokalmikroskopi av biofilm fra forsøk med utskifting av medium og fra reaktorforsøk. Lav høyde i z-plan vil si nærmest dekkglass.**

Betingelse	Tid [timer]	Tid [timer] etter mediumskifte	z-plan [ $\mu\text{m}$ ]	Tykkelse [ $\mu\text{m}$ ]
PA14 Basis	11		1106 – 1117	11
PA14 Lav P (0,0041 g/l)	11		1155 - 1173	18
PA14 Lav gluk (6,4 g/l)	11		1097 – 1135	38
PA14 Basis	37	1,5	1918 – 1930	12
PA14 Lav P (0,0041 g/l) *	37	1,5		
PA14 Lav gluk (6,4 g/l)	37	1,5	1779 – 1797	18
PA14 Basis	58	10,5	1749 – 1767	18
PA14 Lav P (0,0041 g/l)	58	10,5	1688 – 1705	17
PA14 Lav gluk (6,4 g/l)	58	10,5	1565 – 1580	15
PA14 Basis**	49	-	2412 - 2497	85

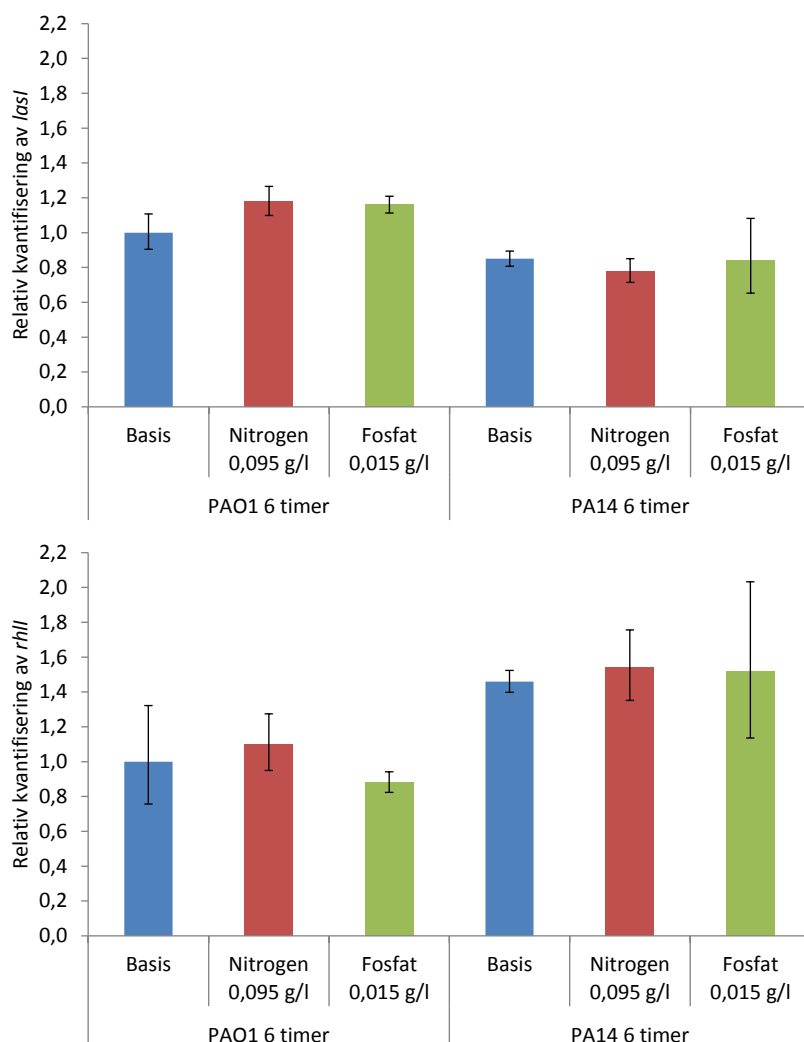
\*) Ikke lagret bilde. \*\*) Fra reaktorforsøk

### 3.4.6 Studier av uttrykk av quorum sensing gener i *P. aeruginosa* biofilm

Quorum sensing hos bakterier bidrar til biofilmdannelse og produksjon av sekundærmetabolitter og på grunn av dette ble det valgt å undersøke uttrykk av QS gener i *P. aeruginosa* biofilm. Relativ kvantifisering av QS genene *lasI* og *rhlI* ble utført ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 biofilm dyrket i både brønnplater og reaktor.

#### Uttrykk av QS gener i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 ved dyrking av biofilm i brønnplater

*P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 ble dyrket som biofilm i 6-brønnsplater (Punkt 3.4.2). Det ble benyttet tre medier; basismedium, medium med lav nitrogenkonsentrasjon; 0,095 g/l og medium med lav fosfatkonsentrasjon; 0,015 g/l. Det ble tatt prøveuttak for RT-PCR og relativ kvantifisering av quorum sensing genene *lasI* og *rhlI* ved tidlig biofilm (6 timer), som vist i figur 42.

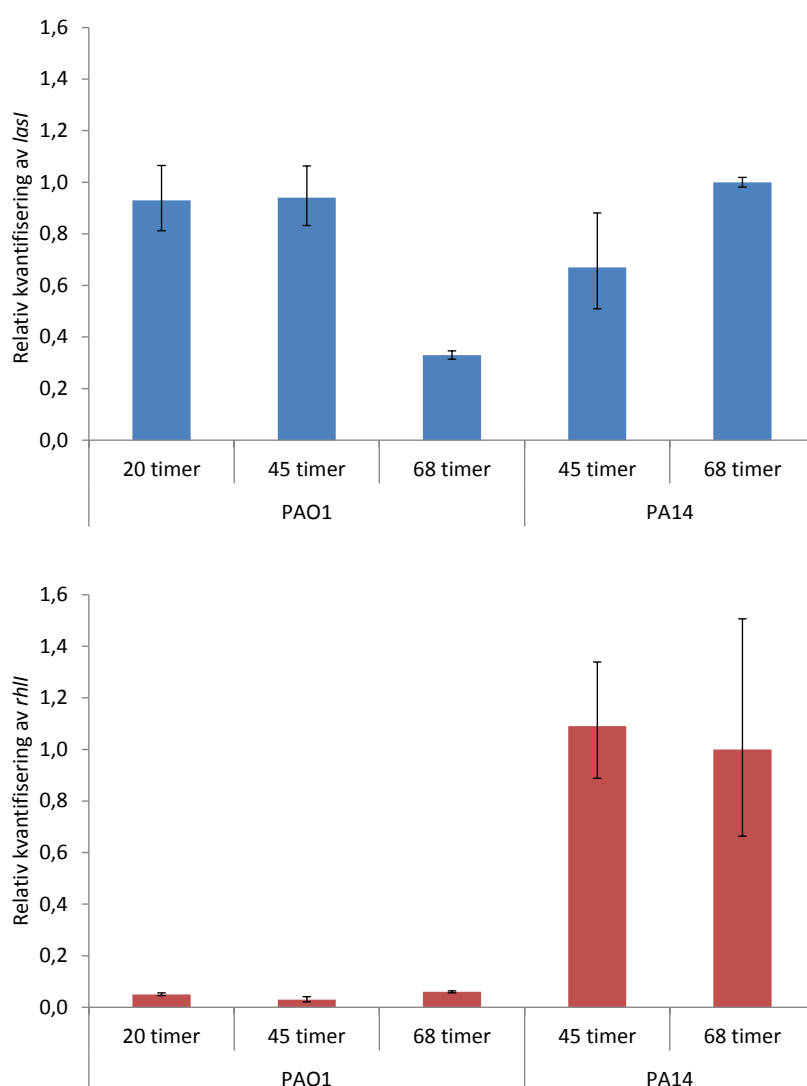


**Figur 42:** Relativ kvantifisering av uttrykk av *lasI* (øverst) og *rhlI* (nederst) ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 biofilm i 6-brønnsplater med tre medier; definert medium (basismedium), medium med lav nitrogenkonsentrasjon og medium med lav fosfatkonsentrasjon. Nitrogen 0,095 g/l = 0,45 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Fosfat 0,015 g/l = 0,068 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Tidlig biofilm (6 timer). Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i basismediet, som ble satt til 1,0.

Resultatene i figur 42 viser at uttrykket av *lasI* var høyere i *P. aeruginosa* PAO1, mens *rhlI* var mer uttrykt i *P. aeruginosa* PA14. For *P. aeruginosa* PAO1 var uttrykket av *lasI* signifikant lavere i basismidiet enn i medier med lav nitrogen- og fosfatkonsentrasjon. Det var ingen signifikante forskjeller for uttrykk av *rhlI* i de ulike betingelsene. For *P. aeruginosa* PA14 var det ingen signifikant forskjell mellom hverken *lasI* eller *rhlI* i de ulike betingelsene.

### Uttrykk av QS gener i *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 ved dyrking av biofilm i reaktor

*P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp ble dyrket i minireaktorer med definert medium, som beskrevet under punkt 3.4.3. 24 objektglass var plassert i stativ i hver reaktor, og en jevn flow av medium tillot vekst av biofilm på objektglassene. Forsøket ble kjørt over ca 3 døgn, og det ble tatt ut prøver hver dag av biofilm for undersøkelse av genuttrykk for QS genene *lasI* og *rhlI* (Figur 43).



**Figur 43: Relativ kvantifisering av uttrykk av *lasI* (øverst) og *rhlI* (nederst) ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp biofilm i minireaktorer. Prøveuttak ved 20, 45 og 68 timer. Genuttrykkene ble relatert til genuttrykk ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14, 68 timer, som ble satt til 1,0.**

Resultatene fra relativ kvantifisering av genene *lasI* og *rhII* (Figur 43) viser at det var liten forskjell på de to stammene når det gjelder uttrykk av genet *lasI*. For *rhII* var forskjellene derimot større mellom stammene, men forskjellene mellom prøveuttakene for en og samme stamme var ikke signifikant. *rhII* var mer uttrykt i *P. aeruginosa* PA14 enn i *P. aeruginosa* PAO1. Dette samsvarer med RT-PCR resultatene for dyrking av biofilm i 6-brønnsplater (figur 42).

Uttrykket av *lasI* var høyest ved de to første prøveuttakene for *P. aeruginosa* PAO1, deretter gikk uttrykket ned. Det omvendte sees for *P. aeruginosa* PA14; genuttrykket var høyere ved siste prøveuttak enn ved andre prøveuttak.

Oppsummert har dyrking av *P. aeruginosa* biofilm vist at *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 danner visuelt forskjellige biofilmer. Uttrykk av gener involvert i syntese av pyocyanin har vist seg å være høyest for *P. aeruginosa* PA14 og for begge stammer høyest ved tidlig biofilm.



### 4. Diskusjon

#### 4.1 Teknikker for å studere *P. aeruginosa* biofilm

I denne oppgaven ble det etablert ulike teknikker for å studere biofilm. Biofilm har blitt dyrket i ulike brønnplater og i reaktor. Biofilm har blitt studert ved hjelp av konfokalmikroskopi og RT-PCR har blitt utført for å studere uttrykk av gener involvert i biofilmdannelse, syntese av pyocyanin og quorum sensing.

##### 4.1.1 Dyrking av biofilm i brønnsplater

Dyrking av biofilm i brønnplater ble utført i en-, 6-, 24- og 96-brønnsplater. Fordelen med brønnplater framfor reaktorer er at utskifting av medium og prøveuttak kan automatiseres ved hjelp av roboter. Dette ble ikke utført i oppgaven. Dersom medium skiftes i løpet av inkuberingsperioden kan en kontinuerlig prosess etableres, men steady state kan ikke oppnås.

Det har vist seg å være utfordringer med å dyrke biofilm i brønnplater for uttak av biofilm til RT-PCR undersøkelser. For å få nok cellemengde for RT-PCR undersøkelser var det nødvendig å ta uttak av biofilm fra minst 3 brønner. Antall brønner nødvendig for å få nok cellemateriale varierer nødvendigvis med mengde biofilm dannet. Et biofilmoppsett uten bruk av roboter og med mange betingelser og prøveuttak krever derfor mange brønnplater, som igjen innebærer store kostnader og stor arbeidsmengde.

I løpet av inkuberingsperioden ble det dannet flak av celler i mediet i brønnene (Figur 31), og det har vært usikkerhet i om disse celleflakene representerer biofilmceller, planktoniske celler eller en mellomting. Dette har også gitt usikkerheter rundt RT-PCR resultatene. Ved uttak av mediumprøver ble det forsøkt å unngå å få med disse flakene. Ved utskifting av medium ble ikke alle flakene fjernet. I tillegg ble det forsøkt å unngå å få med disse celleflakene ved uttak av biofilm for RT-PCR undersøkelser for de fleste biofilmforsøk. I løpet av forsøkene burde det vært diskutert og reflektert mer grundig over disse celleflakene, enn det som ble gjort.

Studier av Applegate og Bryers (1990) og Hunt et al. (2004) og har vist at “flassing” av biofilm kan skje i løpet av tidlig biofilm utviklingstrinn. Dette forårsakes av mangel på næringsstoffer og/eller oksygen og resulterer i store biter eller flak av biofilm som flyter fritt i mediet. Her kan det tenkes at de observerte celleflakene skyldes slike vekstbegrensninger. Da celleflakene ble observert også i forsøk med jevnlig utskifting av medium, er oksygenbegrensning mest sannsynlig årsaken. Det ble observert økende mengde celleflak underveis i forsøket og dette er også med på å indikere at oksygenbegrensning kan ha vært en mulig forklaring. Det ble observert mer celleflak ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 enn ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1. Schleheck et al. (2009) har vist at oksygenbegrensning i *P. aeruginosa* PAO1 kulturer fører til økt skumdannelse. Ved dyrking i rystekolber ble det observert mer skum i kolber med *P. aeruginosa* PAO1 enn i kolber med *P. aeruginosa* PA14.

På grunn av dette kan man anta at *P. aeruginosa* PAO1 blir tidligere oksygenbegrenset, det vil si krever mer oksygen enn *P. aeruginosa* PA14. Dette støtter ikke forklaring på at økt dannelse av celle-flak ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 skyldes oksygenbegrensning.

Biofilmforsøk med regelmessig tilførsel av næring ble kun utført for *P. aeruginosa* PA14. Det er vist at frigjøring av celler fra en *P. aeruginosa* PAO1 biofilm induseres av en plutselig økning i tilgjengelighet på karbonkilder (Sauer et al., 2004), og dette kan forklare hvorfor det ble observert mer flak i medium ved dyrking av biofilm i brønnplater med regelmessig utskifting av medium, enn dyrking uten utskifting. Mer celleflak ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 kan også indikere at denne stammen krever mer oksygen enn *P. aeruginosa* PAO1.

Sauer et al. (2002) har vist at ved dyrking av biofilm i flow-celler med kontinuerlig tilførsel av næring, vil *P. aeruginosa* celler som frigjøres fra biofilmen være mer lik planktoniske celler enn biofilmceller. Dette gjelder imidlertid biofilmceller i siste utviklingstrinn hvor cellene løsner fra filmen på grunn av næringsbegrensning, men også tidlig i biofilmutviklingen (8 timer) hvor cellene danner omtrent de samme proteinene som planktoniske celler. Når biofilmen blir mer moden (6 dager) vil forskjellen mellom biofilm- og planktoniske celler være større. Biofilmforsøk utført i denne oppgaven har gått over relativt kort tid, det lengste forsøket ble utført over omtrent 3 døgn. På grunn av dette er det lite sannsynlig at celleflakene representerer løsning av enkeltceller fra moden biofilm. Ut i fra denne teorien vil celleflakene ligne mer på planktoniske celler enn biofilmceller.

Schleheck et al. (2009) har vist at ved dyrking i rystekolber vil omtrent 90 % av total biomasse bestå av aggregater (5-600  $\mu\text{m}$ ). Aggregatene karakteriseres som planktoniske biofilmer. Disse biofilmene har liknende egenskaper som overflateassosierte biofilmceller. Både planktoniske og overflateassosierede biofilmceller produserer EPS som består av ekstracellulær DNA. Figur 31 viser at celleflakene observert i biofilmforsøkene er større enn 600  $\mu\text{m}$  og på grunn av dette er det usannsynlig at celleflakene kan karakteriseres som aggregater. Det ble heller ikke observert hverken celleflak eller aggregater ved dyrking i rystekolber, noe som støtter denne antagelsen.

For dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 ble det observert slimlag i brønner etter kun 5,25 timers inkubering. Dette slimlaget løsnest lett. Biofilmcellenes produksjon av EPS spiller viktig rolle i tidlig biofilmdannelse. Det kan antas at filmen som ble observert er polysakkarider, proteiner eller DNA og ikke bakterieceller som har festet seg til overflaten. Da denne filmen ble kvantifisert ved hjelp av farging med krystallfiolett, kan den ha feil inntrykk av mengde biofilm i tidlig fase.

Å etablere metode for å studere biofilm i brønnplater har innebært å teste hvor stort overflateareal i brønner som var nødvendig for å få nok RNA til RT-PCR. Måling av RNA-konsentrasjoner ga store avvik mellom paralleller, som vist i tabell J-2. Dette har ført til at relasjon mellom RNA-utbytte og overflateareal har blitt uklar.

Det er flere faktorer enn overflateareal og inkuberingstider som er avgjørende for RNA-utbytte. I første trinn i RNA isoleringa ble cellepellett tilsatt TE buffer m/lysozym (Punkt

2.9.2). Dette ga en fortynningsfaktor som det ble tatt hensyn til i forhold til utregning av RNA-utbytter. Mengde buffer tilsatt og mengde brukt videre i isoleringa ble justert visuelt etter størrelse på cellepellett. Dette har også vært med på å gi usikkerheter i beregninger av RNA-utbytte.

### 4.1.2 Dyrking av biofilm i reaktor

I tillegg til dyrking i brønnplater ble biofilm dyrket i reaktor. Hensikten med dyrking i reaktor var å oppnå en kontinuerlig prosess med flow av medium inn og ut av systemet. Hensikten var å oppnå en steady state, det vil si en tilstand hvor alle betingelser i systemet, som temperatur, konsentrasjon av næringsstoffer og volum ikke varierer med tid. Reaktorforsøket ble kjørt over kort tid (3 dager). I løpet av denne tiden ble steady state ikke oppnådd.

Det viste seg å være svakheter ved dyrking av biofilm i minireaktorer. I reaktor med dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 ble det observert store, flate flak på objektglass som gled lett av ved skylling. Flakene liknet på filmen som ble observert ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i brønnplater, og man kan derfor anta at dette er det samme. Det ble også for denne stammen observert en tykk film på toppen av mediet ved dyrking av denne stammen. Et viktig trekk for biofilmer er at de produserer ekstracellulære polysakkarider (O'Toole et al., 2000). Psl operonet i *P. aeruginosa* PAO1 er involvert i biofilmdannelse. Psl polysakkaridet er en viktig komponent i biofilmmatrixen og holder cellene sammen (Jackson et al., 2004). På grunn av dette ble det antatt at denne filmen kunne være polysakkarider. Siden det ikke ble observert noen film på objektglassene foruten de nevnte flakene, kan man anta at det ikke hadde blitt dannet noen biofilm på objektglassene og at de observerte flakene ikke representerer polysakkarider dannet av biofilm, men at dette er en egenskap hos planktoniske celler. Ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 ble det observert aggregater på objektglassene og disse løsnet lett da objektglassene ble tatt opp fra reaktoren (Figur 36). På grunn av alle disse observasjonene forbindes det stor usikkerhet for vekst og pyocyanindata presentert i figur 37 og RT-PCR resultater, presentert i figur 43.

Ved dyrking av reaktor dannes biofilm på glass, mens i brønnplater dannes biofilm på plast. Mikrobiell binding til overflater avgjøres av om overflaten er hydrofil eller hydrofob. Polymerer som dannes av bakteriecellene påvirker også mikrobiell adhesjon. Adhesjon vil typisk senkes dersom overflate eller bakterieceller har nedsatt hydrofobisitet (Maier et al., 2009). Brønnplater er av materialet polystyren, mens objektglass er av materialet glass. Polystyren er hydrofob og glass er hydrofil. Lavere hydrofobisitet senkes typisk og dette kan være en faktor som kan forklare at biofilm som ble observert på objektglass løsnet lett.

I reaktorforsøket ble ikke betingelsene optimalisert. Reaktorene ble ikke forsynt med luft, oksygenbegrensning fant derved sted og gjorde biofilmdannelse umulig. I forsøk utført av SINTEF i ettertid ble oksygen tilført. Oksygenbegrensning ble da unngått og en tykk og jevn biofilm ble dannet i reaktoren.

På grunnlag av diskusjonen ovenfor vil oksygenbegrensning være den sannsynlige årsaken til dannelse av celleflak i brønnplater og manglende biofilmdannelse i reaktor.

### 4.1.3 Kvantifisering av biofilm

I tillegg til dyrking av biofilm i brønnplater og i minireaktorer har mengde biofilm blitt kvantifisert. Dette ble utført i 96-brønnsplater. Denne metoden har blitt benyttet som referanse for biofilmdannelse. Under vaskeprosessen ble frie celler fjernet, mens de fastsittende cellene på brønneveggene representerte biofilmceller. Dyrking av biofilm med prøveuttak for RT-PCR undersøkelser (Figur 25 og 26) viser at ved 16 og 24 timer hadde biofilmen vokst for lenge og uttrykk av genene *phzM* og *phzS* hadde gått ned. Kvantifisering av biofilm ved hjelp av CV-kvantifisering (Figur 9) viser biofilmdannelsen ikke hadde nådd sin topp ved 24 timer. Dette kan tyde på at dyrking av biofilm er mer gunstig i 96-brønnsplater enn i 6 brønnplater, ved at biofilmen kan gro lengre i disse platene. Biofilmen løsnet lettere ved dyrking i 6-brønnsplater enn ved dyrking i 96-brønnsplater. Dette kan muligens forklares av at oksygenbegrensning inntreffer lettere ved dyrking i 6-brønnsplater enn i 96-brønnsplater. Vedlegg K gir en oversikt over overflatearealer i 6- og 96-brønnsplater dekt av film. Beregningene viser at det har vært større volum medium pr cm<sup>2</sup> i 6-brønnsplater enn i 96-brønnsplater, noe som har hindret oksygenoverføring til biofilmen. Man kan derfor anta at biofilm i 6-brønnsplater blir tidligere oksygenbegrenset enn biofilm i 96-brønnsplater. Som nevnt tidligere burde derfor dyrking med lavere volum medium vært prøvd ut ved dyrking i 6-brønnsplater.

### 4.2 Begrensende faktorer i vekstmediet

Undersøkelse av begrensende faktorer i vekstmediet ble utført for å undersøke hvor mye konsentrasjon av enkeltkomponenter på reduseres for å oppnå vekstbegrensning. Denne informasjonen ble videre brukt for å undersøke biofilmutvikling og uttrykk av pyocyaninproduserende gener ved begrensning. Dette er viktig siden pyocyaninproduksjon er korrelert til biofilmdannelse. Undersøkelse av begrensende faktorer ble utført ved dyrking av planktoniske celler i rystekolber. Dette ble gjort fordi effekt av begrensning kan undersøkes som nedgang i veksthastighet eller stoppet vekst. Undersøkelse av dette er mulig i biofilmforsøk (kvantifisering av film ved hjelp av CV-farging), men vanskeligere.

Resultater i figur 11 og 12 viser at høyest konsentrasjoner av nitrogen og fosfat gir høyest OD. Vekst i lavere konsentrasjoner gir tidligere begrenset veksthastighet og lavere maks celledetthet. Dette relateres til Liebigs lov som sier at i en kultur vil begrensende faktor bestemme den maksimale celledettheten som kan oppnås (Kovárová-Kovar og Egli, 1998). Sammenligning av  $\mu$  og doblingstider i vekstforsøk utført for *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 viste at *P. aeruginosa* PAO1 hadde høyest veksthastighet.

Undersøkelse av fosfatbegrensning (Figur 15) viser at fosfatbegrensning fant sted tidligere ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 enn ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14. Potera (2009) og Long et al. (2008) beskriver at virulens systemer aktiveres når *P. aeruginosa* vokser i fosfatbegrenset medium. *P. aeruginosa* PA14 vokste lengre i medium med lav fosfat enn *P. aeruginosa* PAO1. Dette motstrider med det faktum at *P. aeruginosa* PA14 er mer patogen enn *P. aeruginosa* PAO1.

Tabell 14 viser at dyrking i medier med lave komponentkonsentrasjoner ga høyest celleutbytte. Dette viser at for *P. aeruginosa* har begrensning ført til en tilpasning til det nye miljøet. Stammene har evne til å ta opp og metabolisere næringsstoffer, i dette tilfellet nitrogen og fosfat, selv om konsentrasjonene av substratene er lave. Genotypiske og fenotypiske forandringer har da gjort stammene tilpasningsdyktige til miljøet. Når det er overskudd på næringsstoffer, f.eks nitrogen og fosfat vil cellene lagre disse næringsstoffene. Når tilgang på næringsstoffer blir nedsatt, vil cellene spare næringsstoffer mest mulig og utnytte substratene maksimalt.

I denne oppgaven ble det vist at dyrking i basismedium tilsatt TMS-2 som spormineralblanding ga litt eksponentiell fase og høyere celledensitet enn vekst i basismedium med TMS-1 som spormineralblanding. Figur 16 viser imidlertid at tilsatt av hver enkelt av de komponentene som er til stede i TMS-2, men ikke i TMS-1, ikke ga utslag på veksten. Dette gjelder komponentene nikkel, EDTA og borsyre. Her kan det tenkes at synergieffekter mellom to eller alle disse komponentene kan ha gitt den observerte effekten. Ved å sammenligne TMS-1 og TMS-2 finner man at medium tilsatt TMS-2 inneholder 100 ganger mer kobolt og 30 ganger mer molybden enn medium tilsatt TMS-1 (se vedlegg L for beregninger av mengde av komponenter). På grunn av dette kunne det vært interessant å undersøke nærmere vekst i medium tilsatt TMS-2 med tilsvarende mengde av disse to komponentene og samtidig undersøkt tilsatt av komponentene nikkel, EDTA og borsyre.

### 4.3 Studier av pyocyaninproduksjon i flytende kultur

#### 4.3.1 Forskjeller i pyocyaninproduksjon mellom *P. aeruginosa* PA01 og *P. aeruginosa* PA14.

Pyocyanin er en virulens faktor og et signalmolekyl i *P. aeruginosa*. I oppgaven ble det vist at produksjon av pyocyanin initieres i tidlig stasjonærfase/nedgangsfase for bakterievekst ved dyrking av *P. aeruginosa* (Figur 17), noe som støttes av litteraturen (Dietrich et al., 2006).

De samme referansene har også vist at *P. aeruginosa* PA14 produserer mer pyocyanin enn *P. aeruginosa* PA01. Dette ble vist i denne oppgaven (Figur 17 og 25). Siden pyocyanin er et signalmolekyl som bidrar til stammens patogenitet, er dette en faktor som er med på å forklare stammens patogenitet. I tillegg har *P. aeruginosa* PA14 sykdomsfremkallende "genøyer" PAPI-1 og PAPI-2 som også er med på å forklare stammens virulens (He et al., 2003).

Forsøk i denne oppgaven har i tillegg vist at *P. aeruginosa* PA01 gfp ikke produserer detekterbare mengder av pyocyanin (Figur 17). Siden stammen ikke er gfp-merket på SINTEF er det vanskelig å anta en årsak til dette. Under gfp-merking blir Tn7-transposonet satt inn nedstrøms for den kodende regionen til genet *glmS*. Man kan anta at det kan ha skjedd noe under merkingen som kan ha forstyrret det genetiske materialet og på denne måten gitt endrede egenskaper.

### 4.3.2 Effekt av begrensende faktorer i mediet på pyocyaninproduksjon

Jensen et al. (2006) har vist at rhl-systemet har innvirkning på biosyntese av pyocyanin i *P. aeruginosa*. PhoB aktivering ved fosfatbegrensning påvirker produksjon av pyocyanin positivt. I denne oppgaven ble undersøkelse av pyocyaninproduksjon undersøkt ved vekst i medium med komponentbegrensninger. Vekst i basismedium og medier med lave nitrogen- og fosfatkonsentrasjoner (Figur 18, 19, 21 og 22) viser at lavest fosfatkonsentrasjon ga høyere produksjon av pyocyanin enn både basismedium og lav nitrogenkonsentrasjon. Dette samsvarer med teorien. Resultatene viser imidlertid at konsentrasjon av pyocyanin økte selv om bakterievekst i medium med lav fosfatkonsentrasjon begynte å flate ut på grunn av begrenset konsentrasjon av substrat i mediet og bakteriene ikke lenger vokste med maksimal hastighet (Figur 22). Dette samsvarer med teori om at fosfatbegrensning ikke begrenser produksjon av pyocyanin. På grunn av dette ble et kontrollforsøk utført og vekst og pyocyaninproduksjon i medium med lav fosfatkonsentrasjon ble undersøkt på nytt for både *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp. *P. aeruginosa* PAO1 gfp produserte ikke detekterbare mengder av pyocyanin. Resultatene for *P. aeruginosa* PA14 er vist i vedlegg M. Disse resultatene kan imidlertid ikke brukes til å konkludere om fosfatbegrensning hemmer pyocyaninproduksjon eller ikke.

For kontrollforsøket vist i vedlegg M ble enkelte punkt på pyocyaninkurve kjørt to ganger (7,5 og 9,5 timer). Resultatene viser uoverstemmelser mellom kjøringene. Dette kan tyde på at pyocyaninkonsentrasjonene i supernatantprøver forandrer seg over tid eller at tining av prøver påvirker analysesvar.

At lav fosfatkonsentrasjon gir økt produksjon av pyocyanin er en av flere faktorer som er med på å forklare stammens patogenitet. Dette støttes også av forskning av andre (Jensen et al. 2006, Long et al. 2008) som har vist at vekst av *P. aeruginosa* i fosfatbegrenset medium øker virulens ved økt pyocyaninproduksjon og økt uttrykk av gener involvert i virulens. Dette kan igjen relateres til medisinske problemsstillinger, siden hypofosfatemi inntreffer etter et kirurgisk inngrep, i tillegg til at kirurgiske inngrep trigger invasjon av *P. aeruginosa* (Potera et al., 2009). Pyocyanin har også antimikrobiell aktivitet (Dietrich et al. 2006) og dette gir *P. aeruginosa* konkurransefordel i en syk eller skadet lunge.

### 4.3.3 Studier av uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa*

Det er vist i denne oppgaven at initiering av pyocyaninproduksjon skjer i tidlig stasjonær fase/nedgangsfase for bakterievekst. Dette gjenspeiles i RT-PCR resutater (Figur 21 og 22) som viser at *phzM* og *phzS* var mer uttrykt i slutt av eksponentiell vekstfase enn i tidlig eksponentiell vekstfase. Siden fosfatbegrensning ikke hadde blitt inntruffet gir disse forsøkene derimot liten informasjon om fosfatbegrensnings effekt på uttrykk av genene. Forsøket gir imidlertid indikasjon på nitrogenbegrensnings effekt på pyocyaninproduksjon. Resultatene viser at nitrogenbegrensning gir lavere uttrykk av *phzS*. På grunn av dette kan man anta at ved planktonisk vekst vil komponentbegrensning skruer av uttrykk gener involvert i pyocyaninproduksjon. I dette forsøket burde fosfatkonsentrasjonen vært lavere for å kunne se effekt av begrensning, eventuelt kunne forsøket gått lengre for å kunne ta prøver ved begrensning. I det første forsøket (Figur 21) kunne det vært interessant å undersøke uttrykk av genene også for det siste uttaket (9,75 timer). I biofilmforsøk med utskifting av medium viser

derimot RT-PCR resultatene effekt av fosfatbegrensning på uttrykk av genene for frie celler ved at fosfatbegrensning ga lavere uttrykk av *phzS* enn i basismedium (Figur 34).

Studier av uttrykk av *phzM* og *phzS* har ikke blitt utført tidligere. Litteraturen kan derfor ikke støtte antagelsene om at uttrykk av disse genene går ned ved begrensninger i mediet.

### 4.4 Studier av pyocyaninproduksjon i biofilm

#### 4.4.1 Effekt av karbonbegrensning på biofilmdannelse

Som et innledende forsøk for studier av pyocyaninproduksjon i biofilm ble det utført et biofilmforsøk i 24-brønnsplater med varierende glukosekonsentrasjoner i mediet. Dette forsøket ble utført for *P. fluorescens* SBW25. Forsøket ble gjort for å undersøke effekt av karbonbegrensning og for å finne ut hvilken glukosekonsentrasjon som er best egnet for utvikling av biofilm.

Resultater fra figur 8 viser at mengde biofilm økte selv om vekst i medium gikk ned. Dette gjaldt både ved dyrking ved glukosebegrensning og for medier hvor begrensning ikke hadde funnet sted. Denne økningen i biofilmmengde representerer sannsynligvis celler fra mediet som hadde festet seg på bunnen av brønnene.

Ved dyrking med den nest laveste glukosekonsentrasjonen (1,94 g/l) var all glukose brukt opp ved 18 timer. OD økte allikevel fram til 21 timer. Cellevekst kan ikke skje uten næring tilstede. Økning i OD kan derfor skyldes løst biofilm og ikke representere vekst i mediet.

Ved slutten av forsøket ble det observert celle-flak i brønnene. I tillegg økte OD i medium, mens det ble sett en kraftig nedgang i mengde biofilm. Dette kan tyde på at biofilmen hadde blitt degradert og begynt å løsne fra brønnene.

Degradering og løsning av biofilm ved begrensning er i samsvar med forskning utført av Schleheck et al. (2009) som har vist at store flak løsnet fra biofilmen, OD i medium økte, mens CV-kvantifisering av biofilm viste at det ble dannet mindre biofilm ved karbonbegrensning. Dette gjaldt også ved oksygenbegrensning, slik at oksygenbegrensning kan være med på å forklare dannelse av celle-flak i mediet i dette forsøket. Dette samsvarer også med diskusjonen i punkt 4.1.1.

#### 4.4.2 Studie av uttrykk av gener involvert i biofilmdannelse

For studie av biofilm utvikling ble det utført et forsøk for å undersøke uttrykk av gener involvert i biofilmdannelse; *epsB*, *fliP*, *ndvB* og *pilA*. For dette forsøket ble *P. aeruginosa* PAO1 og *P. fluorescens* SBW25 sammenlignet, med hensyn på uttrykk av genene både planktonisk og i biofilm.

Resultatene viser at for *P. aeruginosa* PAO1 var det ingen signifikante forskjeller mellom uttrykk av genene planktonisk og i biofilm (Figur 24). Uttak av biofilm for RT-PCR ble utført ved omtrent 24 timer for *P. fluorescens* SBW25 og ved 19 timer for *P. aeruginosa* PAO1. Resultater fra biofilmforsøk i 6-brønnsplater med uttak for undersøkelse av *phzM* og *phzS* (Figur 26) viste at uttrykk av genene var lavere ved 24 timer enn ved 8 timer, og at biofilmen hadde vokst for lenge ved 24 timer. Man kan derfor anta at det ville vært større forskjell på

uttrykk av biofilmrelaterte gener mellom planktoniske prøver og biofilm dersom biofilmuttaket hadde vært tatt tidligere. Ved dyrking av *P. fluorescens* SBW25 viser resultatene at forskjell i uttrykk av genene planktonisk og i biofilm var signifikante og at uttrykkene var høyere planktonisk enn i biofilm. Det kan på grunn av dette tyde på at de utvalgte genene ikke har betydning for biofilmdannelse hos denne stammen. Det er ikke funnet noe i litteraturen som kan støtte denne teorien.

Dyrking av biofilm for disse to stammene ble utført av to personer. Forskjell på disse to stammene med hensyn på genuttrykk planktonisk og i biofilm kan også være en sammenheng med dette.

### 4.4.3 Effekt av begrensende faktorer i mediet på biofilmdannelse

Undersøkelse av pyocyaninproduksjon i biofilm ble utført ved å dyrke *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i 6-brønnsplater. Biofilm ble dyrket i flere uavhengige forsøk, med ulike betingelser. Forsøkene viser at gener involvert i pyocyaninproduksjon var mer uttrykt i *P. aeruginosa* PA14 enn i *P. aeruginosa* PAO1 biofilm (Figur 25 og 29). Dette gjenspeiles i målte pyocyaninkonsentrasjoner i medium som viser at *P. aeruginosa* PA14 produserer mer pyocyanin enn *P. aeruginosa* PAO1. Tidligere har gener involvert i pyocyaninproduksjon blitt klonet og karakterisert (Mavrodi et al., 2001), men det er ikke blitt forsket på uttrykk av disse genene.

Monds et al. (2007) har vist at uttrykket av Pho regulonet er involvert i biofilmdannelse i *P. fluorescens* Pf0-1. Ved fosfatbegrensning aktiveres Pho regulonet, og påfølgende uttrykk av av RapA fører til inhibering av biofilmdannelse. Denne påvirkningen gjelder for *P. aeruginosa* PAO1, men ikke for *P. aeruginosa* PA14. Det finnes antatte ortologer til RapA hos *P. aeruginosa* PAO1, det vil si at RapA i disse to stammene har utviklet seg fra et felles gen via evolusjonen. Ortologer beholder ofte samme funksjon i løpet av evolusjonen. Ved å blaste gensekvens RapA fra *P. fluorescens* Pf0-1 med *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 finner man ca. 84 % likhet. Som en regel har man at dersom en DNA sekvens som er lengre enn 100 basepar vil en likhet på >70 % gir en indikasjon på at RapA i disse stammene har samme biologiske funksjon (Pearson, 2001). På grunnlag av dette kan man anta at denne teorien gjelder for *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 så vel som for *P. fluorescens* Pf0-1.

Fosfatbegrensnings effekt på biofilmdannelse ble for *P. aeruginosa* PA14 vist i oppgaven. Figur 32 viser at dersom fosfatkonsentrasjonen ble senket til 0,0041 g/l ble biofilmdannelse begrenset allerede etter ca 12 timer, selv om biofilmen fikk tilført næring regelmessig. Figur 28a viser at fosfatkonsentrasjon 0,0082 g/l ikke ga hemmet biofilmdannelse, dette viser at det er nødvendig å gå langt ned i fosfatkonsentrasjon for å oppnå begrenset biofilmvekst ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14.

Figur 32 viser at ved fosfatkonsentrasjon 0,0041 g/l ble ikke bare biofilmdannelse begrenset, men også planktonisk vekst. Figur 32c viser at pyocyaninproduksjon økte selv om både planktonisk vekst og biofilmdannelse ble begrenset. Dette er i samsvar med teorien om at



fosfatbegrensning fører til økt produksjon av pyocyanin, men nedsatt biofilmdannelse. Figur 28b viser at ved fosfatkonsentrasjon 0,0082 ble ikke planktonisk vekst begrenset ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14. Dette samsvarer med dyrking i rystekolber som viste at man måtte lavere ned i fosfatkonsentrasjon for å oppnå begrensning for *P. aeruginosa* PA14 enn for *P. aeruginosa* PAO1. For *P. aeruginosa* PAO1 ga derimot fosfatkonsentrasjon 0,0082 g/l antydning til hemmet biofilmdannelse (Figur 28). Dette viser forskjell på de to stammene med hensyn på fosfatbegrensings effekt på biofilmdannelse.

Det er vist at *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 responderer forskjellig på fosfattilgang (Haddad et al., 2009). Inhibering av biofilmdannelse vil hos *P. aeruginosa* PAO1 skje i medium med lav fosfatkonsentrasjon. Biofilmdannelse hos *P. aeruginosa* PA14 blir ikke like lett påvirket lav fosfatkonsentrasjon. Både visuelle observasjoner av mengde biofilm og kvantifisering av mengde biofilm ved hjelp av farging med krystallfiolett viste at fosfatbegrensning ga mindre biofilm hos *P. aeruginosa* PA14, men det faktum at lavere fosfatkonsentrasjon var nødvendig for begrensning hos denne stammen gjør at resultatene stemmer overens med teorien.

I brønnplateforsøkene ble glukosekonsentrasjoner målt i medium i brønnene (Figur 28d og 32d). Figur 29 viser at for dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i medium med høy fosfatkonsentrasjon økte OD i medium selv om glukosemålingene viste at all glukose var brukt opp. Dette er i samsvar med resultater vist ved dyrking av biofilm med varierende glukosekonsentrasjoner i mediet (Figur 8) og kan gi en indikasjon på at noe annet enn glukose er begrensende faktor. Dette samsvarer også med forskning utført av Schleheck et al. (2009) som viser at OD i medium øker ved karbonbegrensning på grunn av oppløsning av celler fra biofilm. Figur 32 viser at også mengde biofilm økte selv om det var tomt for glukose i mediet. Biofilmdannelse kan ikke skje uten karbonkilde tilstede. Schleheck et al. (2009) har vist at biofilmceller som løsner fra biofilm på grunn av karbon- eller oksygenbegrensning har en slimete konsistens på grunn av frigjøring av ekstracellulær DNA. Økt absorbans kan derfor skyldes at biofilmen hadde løsnet og celler hadde festet seg lett til bunnen, noe som har ført til økt absorbans i CV-farget biofilm.

I tillegg til fosfatbegrensning er det vist at også glukosebegrensning har innvirkning på biofilmdannelse i *P. aeruginosa* ved at nivå av c-di-GMP synker (Schleheck et al., 2009). Dette fører igjen til redusert biofilmdannelse. Fosfatbegrensning og glukosebegrensning har derfor samme effekt på biofilmdannelse. Redusert biofilmdannelse ved dyrking i medium med lav glukosekonsentrasjon ble ikke sett i biofilmforsøket med utskifting av medium. Figur 32d viser at selv om glukosekonsentrasjon i medium ble tomt en gang mellom 34 og 46 timer ble ikke biofilmdannelsen påvirket av begrensningen. Glukosekonsentrasjonen burde her vært lavere enn 6,4 g/l, for og mulig kunne se effekt av glukosebegrensning.

Figur 32d viser at ved dyrking i lav glukosekonsentrasjon glukose i mediet tomt etter 46 timer. Dette viser at biofilmen hadde et stort forbruk av glukose. Akkumulert glukoseforbruk i figur 33d viser derimot at biofilm dyrket i basismediet hadde størst forbruk av glukose.

### 4.4.4 Effekt av begrensende faktorer i mediet på uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon

Figur 25 og 26 viser at uttrykk av gener som er involvert i syntese av pyocyanin (*phzM* og *phzS*) var høyere i tidlig biofilm (6 og 8 timer) enn i sen biofilm (16 og 24 timer). Ved å relatere disse resultatene til figur 9 som viser biofilmutvikling i 96-brønnsplater kan man anta at pyocyaninproduksjon initieres i tidlig biofilm utviklingsstrinn.

Undersøkelse av komponentbegrensings effekt på uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa* viser at fosfatbegrensning har effekt på det siste syntesetrinnet, som katalyseres av PhzS (Figur 25e og Figur 30). Når biofilmvekst blir fosfatbegrenset øker uttrykket av *phzS*. Dette samsvarer med teorien om at lav fosfatkonsentrasjon i mediet gir økt pyocyaninproduksjon. Figur 34 viser at *phzS* var høyt uttrykt i biofilm dyrket i lav fosfatkonsentrasjon ved 12 timer. Siden biofilmdannelsen ikke var fosfatbegrenset enda ved 12 timer, kan man ikke si at høyt uttrykk av *phzS* her var grunnet fosfatbegrensning.

Undersøkelse av pyocyaninproduksjon i flytende medium (Figur 22) viste at uttrykket av *phzS* skrus av ved nitrogenbegrensning. Den samme tendensen kan sees i biofilm (Figur 25), som viser at for *P. aeruginosa* PAO1 gikk uttrykket av *phzS* drastisk ned fra 6 til 16 timer. Om biofilmdannelsen er nitrogenbegrenset her er vanskelig å si, siden mengde biofilm ikke ble kvantifisert.

Dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 biofilm i reaktorer ga mange feilkilder, som beskrevet i punkt 3.4.3. Dette gir store usikkerheter i resultater presentert i Figur 37 og også stor usikkerhet i relativ kvantifisering av *lasI* og *rhlI* (Figur 43). De visuelle observasjonene av vekst på objektglass og i medium i reaktorene (Figur 35 og 36) gir derfor mer informasjon om forskjellene i stammene evne til å danne biofilm.

### 4.4.5 Studie av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi

Et av målene i oppgaven var å etablere teknikker for å kunne studere biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi. Dette har innebært å finne ut hvilke vekstbetingelser og hvilke inkuberingsstider som gir biofilm som kan studeres i mikroskopet. I biofilmforsøk med rysting og uten utskifting av medium ble konfokalmikroskopi utført ved 27 timer. Mikroskoperingen viste fluorescerende enkeltceller kun for *P. aeruginosa* PA14 dyrket i medium med høy fosfatkonsentrasjon (basismedium). Dette indikerer at biofilmen hadde grodd for lenge, og at fluorescensen hadde blitt for svak for bakteriene i de andre brønnene.

Biofilmforsøk med regelmessig utskifting av medium (Figur 39) viser at konfokalmikroskopi ved 11 timer ga tette og jevne filmer ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon. Figur 32a viser at biofilmen ikke var fosfatbegrenset enda ved 11 timer, noe som kan forklare hvorfor biofilmdannelsen ikke var hemmet. Ved 58 timer viste konfokalmikroskoperingen tette og mest homogent fordelte celler ved dyrking i basismedium. Fosfatbegrenset biofilm ga mindre og en mer ujevn biofilm, noe som støttes av litteraturen.

Det forbindes usikkerhet ved måling av biofilmtykkelse ved konfokalmikroskopering. Celler (både planktoniske og løsnede biofilmceller) fløt fritt i mediet noe som gjorde scanning av biofilm fra bunn til topp vanskelig.

### 4.4.6 Studier av uttrykk av quorum sensing gener i *P. aeruginosa* biofilm

I *P. aeruginosa* har rhl-systemet innvirkning på pyocyaninproduksjon ved at fosfatbegrensning i mediet gir økt uttrykk av *rhlR*, men reduserte AHL-nivåer, det vil si redusert nivå av *lasI* og *rhlI* (Jensen et al., 2006). Figur 42 viser at det var ingen signifikant forskjell i uttrykk av *rhlI* i biofilm vokst i medium med lav fosfatkonsentrasjon i forhold til biofilm vokst i basismediet. Resultatene i figuren gjelder for biofilm vokst 6 timer. Figur 32a viser at dyrking av biofilmvekst ikke var begrenset så tidlig som 6 timer, ved dyrking i medium med lav fosfatkonsentrasjon. Det burde vært undersøkt uttrykk av genene *lasI* og *rhlI* for biofilmuttak ved 16 timer, for og mulig kunne sett fosfatbegrensningens innvirkning på QS i biofilm.

Både relativ kvantifisering av QS-gener i reaktorforsøk og brønnplateforsøk (Figur 42 og 43) viser at *rhlI* er mest uttrykt i *P. aeruginosa* PA14. Jensen et al. (2006) har vist at økt uttrykk av *rhlR* gir økt produksjon. Resultater i oppgaven har derfor vist at det er en sammenheng mellom quorum sensing og pyocyanin i *P. aeruginosa*.

## 4.5 Videre arbeid

Ved dyrking av biofilm i brønnplater viste dannelse av celleflak i mediet seg å være et stort problem. Celleflakene skyldes mest sannsynlig oksygenbegrensning. Dyrking av biofilm med denne metoden bør derfor testes med mindre volum (< 3 ml) medium i brønnene. Da kan man anta at denne feilkilden vil unngås. For å unngå interferens med celleflak med hensyn til prøveuttak bør flakene skylles bort med friskt medium ved hver utskifting. I tillegg bør et slikt forsøk gå over lengre tid for å være sikker på at biofilm blir dannet på brønnevegg/bunn.

Ved dyrking av biofilm i reaktorer ble ikke betingelsene optimalisert. En forbedring i denne metoden er derfor nødvendig. For å kunne dyrke biofilm i reaktor over tid og få dannet en tykk og jevn biofilm på objektglass, trengs oksygentilførsel. Dette bør inngås i fremtidige forsøk.

Biofilm ble kvantifisert ved hjelp av farging med krystallfiolett. Det ble ikke foretatt noe forsøk for å gi en korrelasjon mellom biofilmvekst kvantifisert ved hjelp av krystallfiolett og cellevekst i flytende medium. På grunn av dette har det ikke vært mulig å gi en direkte sammenligning mellom planktonisk vekst i denne oppgaven. Dette bør inngås i videre arbeid.

I oppgaven ble det vist at uttrykk av *phzS* gikk ned ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i nitrogenbegrenset medium. Forsøk i rystekolber ga imidlertid ikke svar på fosfatbegrensningens effekt på genuttrykk. På grunn av dette kunne det vært interessant å gått lavere ned i fosfatkonsentrasjon for om mulig å se fosfatbegrensningens effekt på genuttrykk.

I følge forskning utført av Shroul et al. (2006) vil type karbonkilde som benyttes i mediet ved dyrking av *P. aeruginosa* ha betydning for biofilmens arkitektur. På grunn av dette kunne det vært interessant å undersøke nærmere utvikling av biofilm i medium med ulike karbonkilder e. g succinat, glutamate, både med tanke på kvantifisering av mengde biofilm dannet og biofilm-morfologi (konfokalmikroskopi).

Schleheck et al. (2009) har vist at glukosebegrensning også har innvirkning på biofilmdannelse ved at nivå av c-di-GMP synker og biofilmdannelse derved ikke kan skje. Undersøkelse av biofilmdannelse og biofilmmorfologi ved glukosebegrensning kunne derfor vært inngått i videre arbeid.

### 5. Oppsummering og konklusjoner

Etablering av teknikker for å studere *P. aeruginosa* biofilm viste at det var mulig å studere biofilm dyrket i brønnplater og reaktor, men at forbedring av metodene er nødvendig. Ved dyrking av biofilm i 6-brønnsplater var det mulig å høste celler for RT-PCR, men dannelse av flak i mediet gjorde prøveuttak vanskelig. Studie av biofilm ved hjelp av konfokalmikroskopi viste at ved dyrking av biofilm i brønnplater med kontinuerlig tilførsel av næring ble det etablert en tydelig biofilm som økte i tykkelse over tre døgn. Ved dyrking av biofilm i reaktor ble ikke betingelsene optimalisert. Dette førte til dannelse av flak og aggreater som løsnet lett, og som ga usikre resultater.

Det ble vist flere forskjeller mellom *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14 i oppgaven. *P. aeruginosa* PAO1 hadde størst veksthastighet. *P. aeruginosa* PA14 produserte derimot mer pyocyanin og hadde høyest uttrykk av gener involvert i syntese av pyocyanin (*phzM* og *phzS*), både planktonisk og i biofilm. Quorum sensing genene *lasI* og *rhlI* er involvert i biofilmdannelse og pyocyaninproduksjon. Uttrykk av quorum sensing genet *rhlI* var høyere for *P. aeruginosa* PA14 enn for *P. aeruginosa* PAO1, for *lasI* var det ikke mulig å trekke konklusjoner. Forskjeller i biofilmdannelse ble vist ved at slimdannelse ble sett hos *P. aeruginosa* PAO1, mens hos *P. aeruginosa* PA14 ble aggregatdannelse sett.

Opgaven har gitt svar på mediets effekt på bakterievekst, biofilmdannelse og pyocyaninproduksjon i *P. aeruginosa*. Både rystekolbeforsøk og biofilmforsøk har vist fosfatbegrensning inntreffer tidligere ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 enn ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14. Resultatene har vist at fosfatbegrensning gir økt pyocyaninproduksjon, men nedsatt biofilmdannelse.

Undersøkelse av pyocyaninproduksjon i flytende kultur og uttrykk av gener involvert i pyocyaninproduksjon har vist at pyocyaninproduksjon initieres i tidlig stasjonærfase for planktonisk vekst og tidlig i biofilmdannelsen. RT-PCR resultater fra flytende medium har vist at både nitrogen- og fosfatbegrensning skrur av genet *phzS* som katalyserer siste trinn i syntese av pyocyanin.

Undersøkelse av uttrykk av gener for pyocyaninproduksjon i biofilm gir en indikasjon på at fosfatbegrensning gir økt uttrykk av *phzS*. I følge RT-PCR resultater kan man anta at uttrykk av *phzS* varierer mer med betingelsene enn det *phzM* gjør. Dette gjelder både planktonisk og i biofilm.



## 6. Referanser

- ALLISON, D. G., RUIZ, B., SANJOSE, C., JASPE, A. & GILBERT, P. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 179-184.
- APPLEGATE, D. H. & BRYERS, J. D. 1990. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 17-25.
- BARKEN, K. B., PAMP, S. J., YANG, L., GJERMENSEN, M., BERTRAND, J. J., KLAUSEN, M., GIVSKOV, M., WHITCHURCH, C. B., ENGEL, J. N. & TOLKER-NIELSEN, T. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10, 2331-2343.
- BASSLER, B. L. & LOSICK, R. 2006. Bacterially speaking. *Cell*, 125, 237-246.
- BEHLAU, I. & GILMORE, M. S. 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, 126, 1572-1581.
- CHOI, J. Y., SIFRI, C. D., GOUMNEROV, B. C., RAHME, L. G., AUSUBEL, F. M. & CALDERWOOD, S. B. 2002. Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *Journal of Bacteriology*, 184, 952-961.
- CHOUDHARY, S. & SCHMIDT-DANNERT, C. 2010. Applications of quorum sensing in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1267-1279.
- D'ARGENIO, D. A. & MILLER, S. I. 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology*, 2497-2502.
- DAVEY, M. E. & O'TOOLE, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W. & GREENBERG, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 295-298.
- DIETRICH, L. E. P., PRICE-WHELAN, A., PETERSEN, A., WHITELEY, M. & NEWMAN, D. K. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biosystems*, 61, 1308-1321.
- DORAN, P. M. 2008. *Bioprocess engineering principles*, New York, Academic Press.
- DRENKARD, E. & AUSUBEL, F. M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Letters to nature*, 416, 740-743.
- DUBERN, J.-F. & DIGGLE, S. P. 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular Biosystems*, 882-888.
- FRIEDMAN, L. & KOLTER, R. 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51, 675-690.
- HADDAD, A., JENSEN, V., BECKER, T. & HÄUSSLER, S. 2009. The Pho regulon influences biofilm formation and type three secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 488-494.
- HE, J., BALDINI, R. L., DÉZIEL, E., SAUCIER, M., ZHANG, Q., LIBERATI, N. T., LEE, D., URBACH, J., GOODMAN, H. M. & RAHME, L. G. 2003. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2530-2535.

- HICKMAN, J. W., TIFREA, D. F. & HARWOOD, C. S. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14422-14427.
- HINSA, S. M. & O'TOOLE, G. A. 2006. Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD. *Microbiology*, 152, 1375-1383.
- HOLTEBEKK, T., UGGERUD, E. & WIBETOE, G. *Massespektrometer* [Online]. Store norske leksikon. Available: <http://www.snl.no/massespektrometer> [Accessed 10.09.10].
- HUNT, S. M., WERNER, E. M., HUANG, B., HAMILTON, M. A. & STEWART, P. S. 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied microbiology and biotechnology*, 70, 7418-7425.
- IELPI, L., DYLAN, T., DITTA, G. S., HELINSKI, D. R. & STANFIELD, S. W. 1990. The ndvB locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein Involved in the production of beta-(1->2)-glucan. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 2843-2851.
- INSTITUTT FOR ORAL BIOLOGI. 2009. *Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop* [Online]. Universitetet i Oslo. Available: <http://www.odont.uio.no/iob/om/organisasjon/fagavd/cellebiologi/rutiner-metoder/konfomik.html> [Accessed 10.04.11].
- JACKSON, K. D., STARKEY, M., KREMER, S., PARSEK, M. R. & WOZNIAC, D. J. 2004. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186, 4466-4475.
- JENSEN, V., LÖNS, D., ZAOUI, C., BREDENBRUCH, F., MEISSNER, A., DIETERICH, G., MÜNCH, R. & HÄUSSLER, S. 2006. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *Journal of Bacteriology*, 188, 8601-8606.
- KLAUSEN, M., AAES-JØRGENSEN, A., MOLIN, S. & TOLKER-NIELSEN, T. 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*, 50, 61-68.
- KOBAYASHI, H., KOBAYASHI, O. & KAWAI, S. 2009. Pathogenesis and clinical manifestations of chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilms in the airway tract. *Journal of infection and chemotherapy*, 15, 125-142.
- KOVÁROVÁ-KOVAR, K. & EGLI, T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 646-666.
- LAU, G. W. L., RAN, H., KONG, F., HASSETT, D. J. & MAVRODI, D. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and Immunity*, 72, 4275-4278.
- LONG, J., ZABORINA, O., HOLBROOK, C., ZABORIN, A. & ALVERDY, J. 2008. Depletion of intestinal phosphate after injury activates the virulence of *P. aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery*, 144, 189-197.
- MA, L., JACKSON, K. D., LANDRY, R. M., PARSEK, M. R. & WOZNIAC, D. J. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188, 8213-8221.
- MAH, T.-F., PITTS, B., PELLOCK, B., WALKER, G. C., STEWART, P. S. & O'TOOLE, G. A. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Letters to nature*, 426, 306-310.



- MAIER, R. M., PEPPER, I. L. & GERBA, C. P. 2009. *Environmental microbiology*, New York, Academic Press.
- MALAKOOTI, J., ELY, B. & MATSUMURA, P. 1994. Molecular characterization, nucleotide sequence, and expression of the *fliO*, *fliP*, *fliQ* and *fliR* genes of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189-197.
- MAVRODI, D. V., BONSTALL, 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, 6454-6465.
- MCPHERSON, M. & MØLLER, S. 2006. *PCR*, New York, Taylor & Francis Group.
- MONDS, R. D., NEWELL, P. D., GROSS, R. H. & O'TOOLE, G. 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Molecular Microbiology*, 63, 656-679.
- NCBI. *Pseudomonas fluorescens* [Online]. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=12300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=12300) [Accessed 26.03.11].
- NIAN, H., ZHANG, J., SONG, F., FAN, L. & HUANG, D. 2007. Isolation of transposon mutants and characterization of genes involved in biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* TC222. 205-213.
- NIELSEN, M. W., STERNBERG, C., MOLIN, S. & REGENBERG, B. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *Journal of Visualized Experiments*.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*, 54, 49-79.
- O'TOOLE, G. A. & KOLTER, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28, 449-461.
- PEARSON, W. R. 2001. *Sequence similarity - Protein sequence comparison and protein evolution* [Online]. Cold Spring Harbor Laboratory. [Accessed 18.04.11].
- PIERSON, L. S. & PIERSON, E. A. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1659-1670.
- POTERA, C. 2009. *Low phosphate triggers reversible virulence in Pseudomonas* [Online]. American society for microbiology. Available: <http://www.microbemagazine.org/index.php/11-2009-current-topics/1034-low-phosphate-triggers-reversible-virulence-in-pseudomonas> [Accessed 30.04.11].
- PRICE-WHELAN, A., DIETRICH, L. E. P. & NEWMAN, D. K. 2006. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, 2, 71-78.
- RAINEY, P. B. & BAILEY, M. J. 1996. Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. *Molecular Microbiology*, 19, 521-533.
- ROBERTS, M. E. & STEWART, P. S. 2003. Modeling antibiotic tolerance in biofilms by accounting for nutrient limitation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 48-52.
- RYDER, C., BYRD, M. & WOZNIAK, D. J. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 644-648.
- SABIMA. 2008. *Alger gir raskere skip og renere tenner* [Online]. Available: <http://www.sabima.no/sider/tekst.asp?side=567> [Accessed 07.04.11].

- SAUER, K., CAMPER, A. K., EHRLICH, G. D., COSTERTON, J. W. & DAVIES, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184, 1140-1154.
- SAUER, K., CULLEN, M. C., RICKARD, A. H., ZEEF, L. A. H., DAVIES, D. G. & GILBERT, P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*, 186, 7312-7326.
- SCHACHTER, B. 2003. Slimy business—the biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology*, 21, 361-365.
- SCHLEHECK, D., BARRAUD, N., KLEBENSBERGER, J., WEBB, J. S., MCDUGALD, D., RICE, S. A. & KJELLEBERG, S. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch culture and disperses upon starvation. *PLoS ONE*, 4.
- SCHWARTZ, T., WALTER, S., MARTEN, S. M., KIRSTCHHÖFER, F., NUSSER, M. & U., O. 2007. Use of quantitative real-time RT-PCR to analyse the expression of some quorum-sensing regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 513-521.
- SEMMLER, A. B. T., WHITCHURCH, C. B. & MATTICK, J. S. 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 145, 2863-2873.
- SENER FOR BIOFILMFORSKNING. 2010. *Biofilm i matindustrien* [Online]. Available: <http://biofilmforskning.wordpress.com/biofilm-i-matproduksjon/> [Accessed 06.04.11].
- SHROUT, J. D., CHOPP, D. L., JUST, C. L., HENTZER, M., GIVSKOV, M. & PARSEK, M. R. 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, 62, 1264-1277.
- SNUSTAD, D. P. & SIMMONS, M. J. 2010. *Principles of genetics*, Singapore, John Wiley & Sons.
- SPIERS, A. J., KAHN, S. G., BOHANNON, J., TRAVISANO, M. & RAINEY, P. B. 2002. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. 1. Genetic and phenotypic bases of Wrinkly Spreader fitness. *Genetics Society of America*, 161, 33-46.
- STEWART, P. S. & FRANKLIN, M. J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 199-210.
- TODAR, K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* [Online]. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Available: <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> [Accessed 26.03.11].
- TURNER, J. M. & MESSENGER, A. J. 1986. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances in Microbial Physiology*, 27, 211-275.
- WAGNER, V. E. & IGLEWSKI, B. H. 2008. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 35, 124-34.
- WANNER, B. L. 1995. Signal transduction and cross regulation in the *Escherichia coli* phosphate regulon by PhoR, CreC, and acetyl phosphate. In: HOCH, J. A. & SILHAVY, T. J. (eds.) *Two-component signal transduction*. Washington DC: ASM Press.
- WANNER, B. L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: NEIDHARDT, F. C. (ed.) *Escherichia coli and Salmonella - Cellular and Molecular Biology*. Washington DC: American Society for Microbiology.
- WATERS, C. M. & BASSLER, B. L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319-346.

- WHITELEY, M., LEE, K. M. & GREENBERG, E. P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13904-13909.
- WILLIAMS, B. J., DEHNBOSTEL, J. & BLACKWELL, T. S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology*, 15, 1037-1056.
- WILLIAMS, P. & CÁMARA, M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 182-191.
- WIMPENNY, J. W. T. & COLASANTI, R. 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 1-16.
- WOZNIAK, D. J., WYCKOFF, T. J. O., STARKEY, M., KEYSER, R., AZADI, P., O'TOOLE, G. A. & PARSEK, M. R. 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7907-7912.
- XU, K. D., MCFETERS, G. A. & STEWART, P. S. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 146, 547-549.
- YOON, S. S., HENNIGAN, R. F., HILLIARD, G. M., OCHSNER, U. A., PARVATIYAR, K., KAMANI, M. C., ALLEN, H. L., DEKIEVIT, T. R., GARDNER, P. R., SCHWAB, U., ROWE, J. J., IGLEWSKI, B. H., MCDERMOTT, T. R., MASON, R. P., WOZNIAK, D. J., HANCOCK, R. E. W., PARSEK, M. R., NOAH, T. L., BOUCHER, R. C. & HASSETT, D. J. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell*, 3, 593-603.
- ZEISS, C. *LSM 510 Meta Laser scanning microscope* [Online]. Carl Zeiss - Advanced Imaging Microscopy. Available: [http://imaging.berkeley.edu/PDFS/zeiss\\_lsm\\_meta\\_microscope.pdf](http://imaging.berkeley.edu/PDFS/zeiss_lsm_meta_microscope.pdf) [Accessed 24.03.11].
- ZIMMER, M. 2011. *GFP - Green Fluorescent Protein* [Online]. Available: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm> [Accessed 12.04.2011].
- ØSTGAARD, K. 2004. *Miljøbioteknologi. Del 2: Biologisk vannrensing*, Trondheim, Institutt for bioteknologi, NTNU.



### **Vedlegg A: Tillaging av medier**

LB- og TSB-medium: Komponentene løst i IF-vann og autoklavert (121 °C, 20 min).

Definert medium: Komponentene ble løst i IF-vann, pH ble justert til 6,4 (Standard pH-meter, PHM 210 MeterLab) og mediet ble autoklavert (121 °C, 20 min). Glukose- og MgCl<sub>2</sub>-løsning ble laget separat og tilsatt i medium etter autoklaving til sluttkonsentrasjoner oppgitt i Tabell 4.

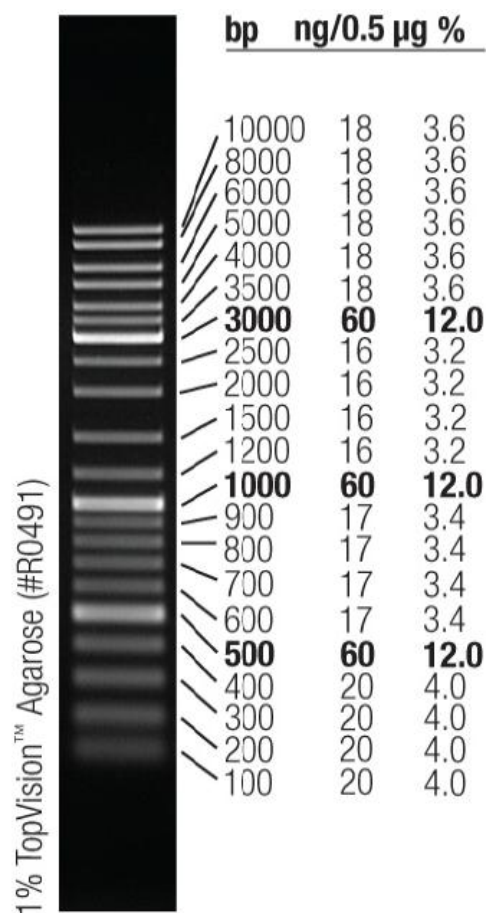
TMS-1 og vitaminløsning var ferdiglaget av SINTEF.

TMS-2: Komponentene ble løst i IF-vann.

LA- og PIA-plater: Komponentene ble løst i IF-vann og autoklavert. Agar-løsningene ble fordelt i 9 cm petriskåler. Skålene ble satt på kjølerom.

**Vedlegg B: Standard benyttet i gel-elektroforese**

Figur B-1 viser standard benyttet i gel-elektroforese; Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, 0,5 µg/µl fra Fermentas. # SM 0331.



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,  
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

**Figur B-1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Størrelse på båndene (bp) er markert til høyre for båndene.**

### Vedlegg C: OD omregningsfaktor

OD målinger for beregning av omregningsfaktorer *P. aeruginosa* PAO1:

- 600 nm kyvette:  $0,181 \cdot 20 = 3,62$
- 600 nm. 100  $\mu$ l pr. brønn (96-brønnsplate) : 0,630
- 538 nm, 100  $\mu$ l pr. brønn (96-brønnsplate): 0,765
- 660 nm, 75  $\mu$ l pr. brønn (96-brønnsplate): 0,421

Omregningsfaktorer

538 nm, 100  $\mu$ l brønn  $\rightarrow$  600 nm, 100  $\mu$ l brønn =  $0,765/0,630 = 1,214$

600 nm. 100  $\mu$ l brønn  $\rightarrow$  600 nm kyvette =  $0,630/3,62 = 0,174$

Eksempel på beregning av omregningsfaktor:

Hva tilsvarer OD = 0,5 (538 nm, 100  $\mu$ l brønn) i 600 nm kyvette?

$0,5/1,21 = 0,413$

$0,413/0,174 = \underline{2,37}$

### Vedlegg D: Beregning av $\mu$ og doblingstider i eksponentiell vekstfase

$\mu$  ble funnet i Microsoft Excel ved å trekke logaritmisk trendlinje gjennom målpunktene i eksponentiell fase, og hake av for “vis formel i diagrammet”. Ligningen som da ble generert var av følgende formel:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

hvor  $x_0$  tilsvarer cellekonsentrasjon ved tid = 0.

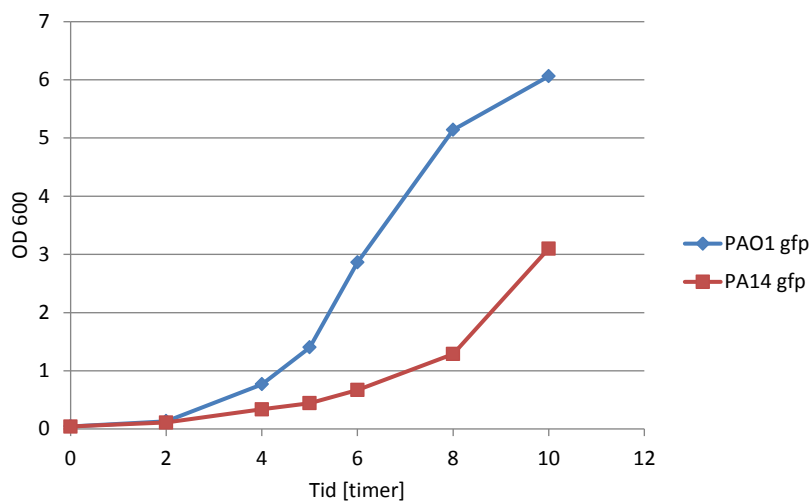
Beregning av doblingstid (timer):

$$t(d) = \frac{\ln(2)}{\mu}$$



## Vedlegg E: Tørrvektskurver *P. aeruginosa* PAO1 og *P. aeruginosa* PA14

Figur E-1 viser vekstkurvene fra tørrvektforsøket. Tabell E-1 og E-2 gir oversikt over rådataene for beregning av tørrvekt. Figur E-2 viser tørrvektskurve for *P. aeruginosa* PAO1. Figur E-3 viser tørrvektskurve for *P. aeruginosa* PA14.



Figur E-1: Vekstkurve for *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp

Tabell E-1: Rådata for beregning av tørrvekt for *P. aeruginosa* PAO1

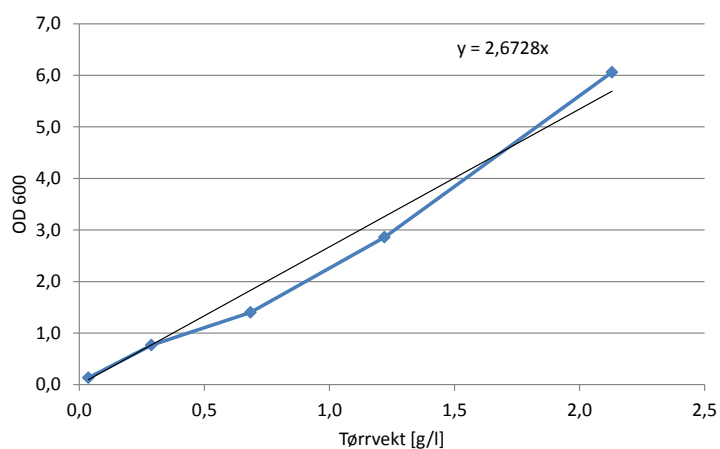
Tid [timer]	OD [600 nm]	Volum kultur [ml]	Mengde celler [g]	Tørrvekt [g/l]
2	0,133	25	0,0009	0,36
4	$0,383 \cdot 2 = 0,766$	25	0,0072	0,288
5	$0,280 \cdot 5 = 1,4$	25	0,0171	0,684
6	$0,286 \cdot 10 = 2,86$	25	0,0305	1,22
8*	$0,257 \cdot 20 = 5,14$	10		
10,25	$0,303 \cdot 20 = 6,06$	10	0,0213	2,13

\*) Celler ble "blåst" bort fra tørrvektsskåla i avtrekkskapet

Tabell E-2: Rådata for beregning av tørrvekt for *P. aeruginosa* PA14

Tid [timer]	OD [600 nm]	Volum kultur [ml]	Mengde celler [g]	Tørrvekt [g/l]
2	0,112	25	0,0008	0,032
4	0,339	25	0,0032	0,128
5	0,089*5 = 0,445	25	0,0054	0,2116
6	0,134*5 = 0,67	25	0,007	0,28
8*	0,129*10 = 1,29	10		
10,25	0,155*20 = 3,1	10	0,0124	1,24

\*) Celler ble "blåst" bort fra tørrvektsskåla i avtrekkskapet

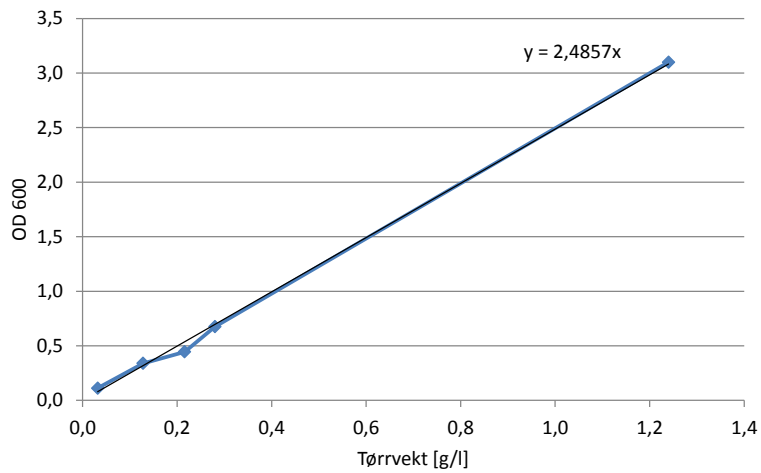


Figur E-2: Tørrvektskurve for *P. aeruginosa* PA01. OD 600 på y-akse plottet mot tørrvekt [g/l] på x-akse.

Stigningstallet til den lineært tilpassede grafen i figur A-2 er 2,6728. Grafen stiger med en faktor på 0,374 ( $1/2,6728 = 0,374$ ).

Eksempel på beregning av tørrvekt ut i fra gitt OD:

$$OD_{600} = 1,5 \rightarrow \text{tørrvekt} = 1,5/2,6728 = \underline{\underline{0,56 \text{ g/l}}}$$



**Figur E-3: Tørrvektskurve for *P. aeruginosa* PA14. OD 600 på y-akse plottet mot tørrvekt [g/l] på x-akse.**

Stigningstallet til den lineært tilpassede grafen i figur E-3 er 2,4857. Grafen stiger med en faktor på 0,402 ( $1/2,4857 = 0,402$ ).

Eksempel på beregning av tørrvekt ut i fra gitt OD:

$$OD_{600} = 1,5 \rightarrow \text{tørrvekt} = 1,5/2,4857 = \underline{\underline{0,60 \text{ g/l}}}$$

### Vedlegg F: Beregninger av celleutbytte

Beregning av celleutbytte (g. celler/g. nitrogen/fosfat) ble gjort på følgende måte:

F.eks maks OD ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i medium med nitrogenkonsentrasjon 0,14 g/l sees ved OD 2,56 (600 nm kyvette). Denne OD verdien tilsvarer tørrvekt på  $2,56/2,6728 = 0,96$  g celler/l (Vedlegg E).

$$\text{Celleutbytte} \left( \frac{\text{g. celler}}{\text{g. nitrogen}} \right) = \frac{0,96 \text{ g} \frac{\text{celler}}{\text{l}}}{0,14 \text{ g} \frac{\text{nitrogen}}{\text{l}}} = 6,86$$

Beregning av celleutbytte (g. celler/g. glukose omsatt) ble gjort på følgende måte:

Fra figur 10: Celleutbytte glukose ved dyrking i basismedium (0,48 g/l nitrogen):

Forskjell i OD<sub>538</sub> mellom 4,5 og 12 timer:  $0,8479 - 0,14315 = 0,70475$ .

Denne OD-verdien tilsvarer 3,33 i 600 nm kyvette (Vedlegg C).

Glukoseomsetning mellom 4,5 og 12 timer:  $(7,38 - 0,79) \text{ g/l} = 6,59 \text{ g/l}$

OD<sub>600</sub> = 3,33 tilsvarer tørrvekt på 1,25 g/l. (Vedlegg E).

$$\text{Celleutbytte} \left( \frac{\text{g. celler}}{\text{g. glukose}} \right) = \frac{1,25 \text{ g} \frac{\text{celler}}{\text{l}}}{6,59 \text{ g} \frac{\text{glukose}}{\text{l}}} = 0,19$$

## Vedlegg G: Beregninger av glukosekonsentrasjoner

Tabell G-1 – G-4 viser arealer av glukosetopper ved HPLC. Beregningseksempel for beregning av glukosekonsentrasjoner er vist under tabellene.

**Tabell G-1: Arealer av glukosetoppene i kromatogrammene brukt for beregninger av glukosekonsentrasjoner i figur 11 og 12.**

Tid [timer]	Basis	Nitrogen 0,14 g/l	Nitrogen 0,29 g/l	Fosfat 0,021 g/l	Fosfat 0,052 g/l
1,5	2987,4	3137	2546,37	2995,4	2947,89
3,0	2829,24	3153,83	2371,44	2990,98	2840,24
4,5	2492,27	2674,19	2150,94	2558,64	2556,46
6,0	2097,1		1938,12	2302,88	2348,04
7,5	1771,39	1842,51	1720,33	1882,3	1962,13
9,0	1481,1	1365,81	1259,32	1306,98	1596,92
10,5	976,87	1039,05	938,35	1028,27	1316,35
12,0	266,51	775,74	567,59	916,7	1158,41
13,5	0	623,38	196,62	792,9	1055,81

Glukosestandard (10 g/l) hadde følgende arealer: 3450,54, 3353,79, 3471,84, 3773,92 og 2836,72.

Middelverdi av arealene på glukosestandard:  $(3450,54 + 3353,79 + 3471,84 + 3773,92 + 2836,72)/5 = 3377,36$

**Tabell G-2: Arealer av glukosetoppene i kromatogrammene brukt for beregninger av glukosekonsentrasjoner i figur 15.**

Tid [timer]	PA01		PA14	
	Basis + TMS-1	Basis + TMS-2	Basis + TMS-1	Basis + TMS-2
<b>1,5</b>	2595,84	2688,15	2698,84	2735,86
<b>3,0</b>	2709,98	2583,33	2735,61	2675,57
<b>4,0</b>	2562,42	2301,54	2657,43	2626,37
<b>5,0</b>	2345,45	1753,63	2593,13	2507,82
<b>6,0</b>	2137,85	951	2443,79	2362,28
<b>7,0</b>	1809,72	378,11	2322,91	2057,44
<b>8,0</b>	1540,51	0	2162,39	1704,06
<b>9,0</b>	1321,66	0	1998,23	947,28
<b>10,0</b>	-	-	1852,99	453,73

Glukosestandard (10 g/l) hadde følgende arealer: 3341,12, 3320,73 og 3342,00.

## Vedlegg

Middelverdi av arealene på glukosestandard:  $(3341,12 + 3320,73 + 3342,00)/3 = \underline{3334,62}$

**Tabell G-3: Arealer av glukasetoppene i kromatogrammene brukt for beregninger av glukosekonsentrasjoner i figur 28.**

Tid [timer]	PA01		PA14	
	Fosfat 0,0082 g/l	Fosfat 0,62 g/l	Fosfat 0,0082 g/l	Fosfat 0,62 g/l
<b>5,25</b>	1928,18	1799,98	2268,71	2253,34
<b>12</b>	730,06	0	1269,78	1516,34
<b>17</b>	0	0	822,96	602,05
<b>28,5</b>	0	0	904,06	0

Glukosestandard (10 g/l) hadde følgende arealer: 2859,54, 2924,50 og 3105,42.

Middelverdi av arealene på glukosestandard:  $(2859,54 + 2924,50 + 3105,42)/3 = \underline{2963,15}$

**Tabell G-4: Arealer av glukasetoppene i kromatogrammene brukt for beregninger av glukosekonsentrasjoner i figur 32.**

Tid [timer]	Basis	Fosfat 0,0041 g/l	Glukose 6,4 g/l
<b>12</b>	1291,675	1280,075	623,5875
<b>22</b>	1364,05	1203,9125	787,0125
<b>34</b>	682,0375	1340,05	54,325
<b>46</b>	179,7625	1264,2	0
<b>59,25</b>	86,4625	1452,05	0
<b>66,25</b>	2036,1625	2614,3875	280,05

Glukosestandard (4,5 g/l) hadde følgende arealer: 1245,22, 1211,15 og 1220,68

Middelverdi av arealene på glukosestandard:  $(1245,22 + 1211,15 + 1220,68)/3 = \underline{1225,68}$

Beregning av glukosekonsentrasjon:

$$\text{Glukosekonsentrasjon } \left(\frac{g}{l}\right) = \frac{\text{Kons. standard } \left(\frac{g}{l}\right) * \text{areal prøve}}{\text{areal standard}}$$

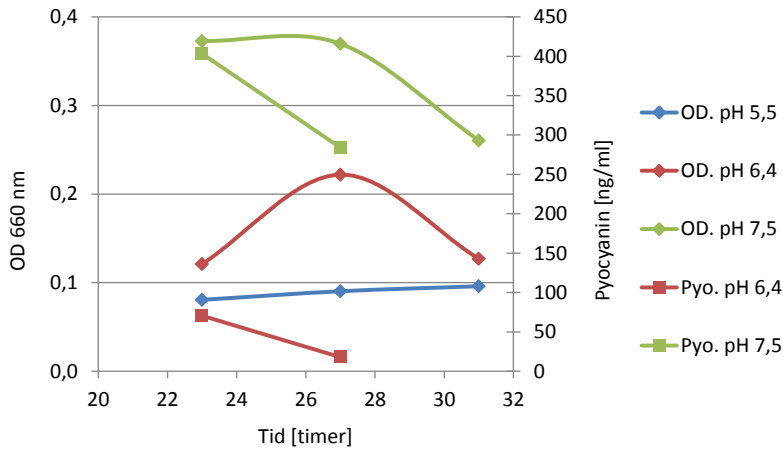
Eksempel på beregning av glukosekonsentrasjon:

Tabell G-1, Prøve Basis, 1,5 timer:

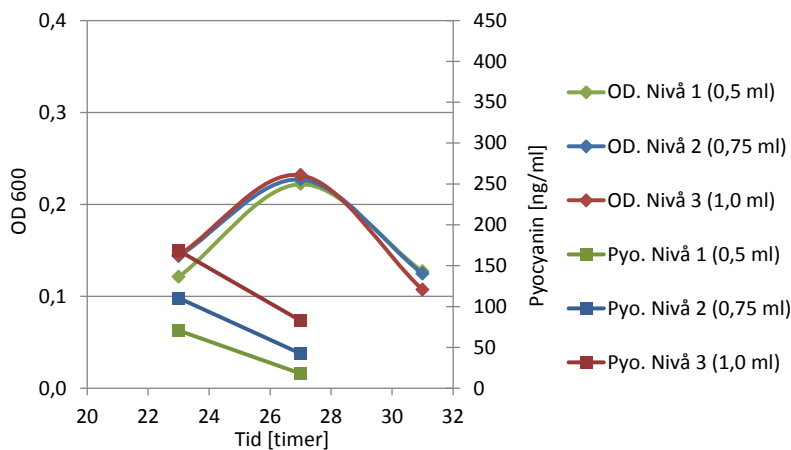
$$\text{Glukosekonsentrasjon } \left(\frac{g}{l}\right) = \frac{10 \left(\frac{g}{l}\right) * 2987,4}{3377,36} = 8,85$$

## Vedlegg H: Dyrking av *P. aeruginosa* i dypbrønnplater

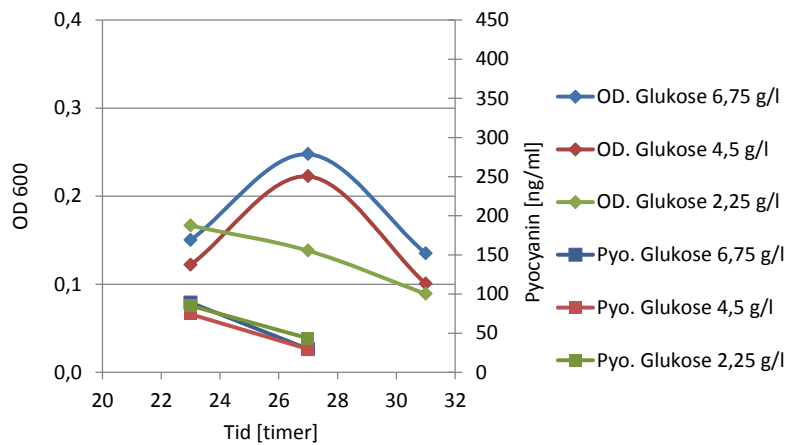
Figur H-1 – H-5 viser OD målinger og pyocyaninkonsentrasjoner ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater med varierende dyrkingsbetingelser, 37 °C.



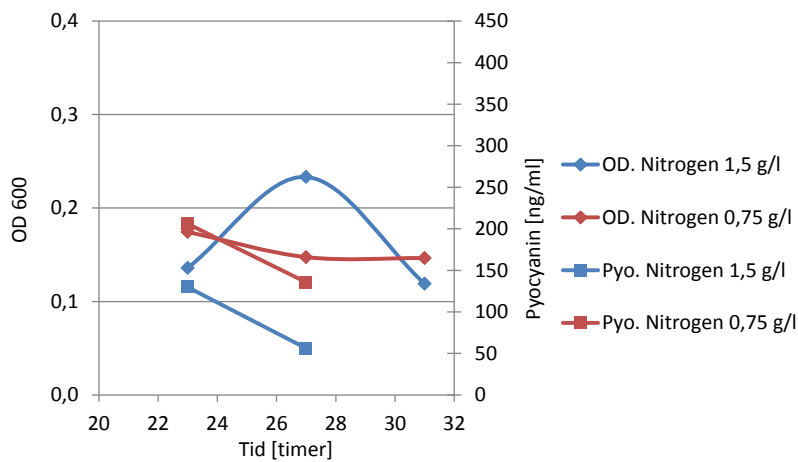
**Figur H-1:** OD og pyocyaninkonsentrasjoner i medium for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater med ulike pH-verdier. 37 °C. OD [660 nm] på primær y-akse og spesifikk pyocyaninproduksjon på sekundær y-akse er plottet mot tid [timer].



**Figur H-2:** OD og pyocyaninkonsentrasjoner i medium for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater med varierende volum medium i brønnene. 37 °C. OD [660 nm] på primær y-akse og spesifikk pyocyaninproduksjon på sekundær y-akse er plottet mot tid [timer].

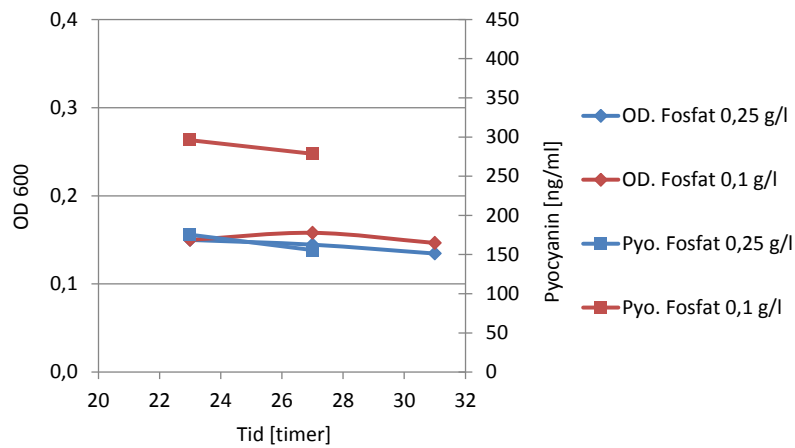


Figur H-3: OD og pyocyaninkonsentrasjoner i medium for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater med ulike glukosekonsentrasjoner i mediet. 37 °C. OD [660 nm] på primær y-akse og spesifikk pyocyaninproduksjon på sekundær y-akse er plottet mot tid [timer].



Figur H-4: OD og pyocyaninkonsentrasjoner i medium for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater med ulike nitrogenkonsentrasjoner i mediet. 37 °C. OD [660 nm] på primær y-akse og spesifikk pyocyaninproduksjon på sekundær y-akse er plottet mot tid [timer].





Figur H-5: OD og pyocyaninkonsentrasjoner i medium for vekst av *P. aeruginosa* PAO1 i dypbrønnsplater med ulike fosfatkonsentrasjoner i mediet. 37 °C. OD [660 nm] på primær y-akse og spesifikk pyocyaninproduksjon på sekundær y-akse er plottet mot tid [timer].

## Vedlegg I: Rådata for beregninger av spesifikk pyocyaninproduksjon

Tabell I-1 - I-3 gir en oversikt over OD-verdier og pyocyaninkonsentrasjoner som har blitt brukt som grunnlag for beregning av spesifikk pyocyaninproduksjon (konsentrasjon/tørrvekt).

**Tabell I-1: OD-verdier og pyocyaninkonsentrasjoner brukt som grunnlag for utregning av spesifikk pyocyaninproduksjon (konsentrasjon/tørrvekt) i Figur 20.**

Betingelser	OD	Kons. [ng/ml]	Kommentarer
Basis	0,121	70,65	pH 6,4. OD <sub>660</sub> (75 µl pr. brønn, 96-br.pl)
Nitrogen 0,29 g/l	0,136	129,83	“
Nitrogen 0,14 g/l	0,174	206,23	“
Fosfat 0,052 g/l	0,150	175,36	“
Fosfat 0,021 g/l	0,150	296,08	“
Basis	0,574767	996,57	pH 7,0. OD <sub>538</sub> (100 µl pr. brønn, 96-br.pl)
Nitrogen 0,29 g/l	0,613933	1088,21	“
Nitrogen 0,14 g/l	0,512867	958,67	“
Fosfat 0,052 g/l	0,5557	1290,29	“
Fosfat 0,021 g/l	0,605767	1821,21	“
Basis	0,5433	659,37	pH 7,5. OD <sub>538</sub> (100 µl pr. brønn, 96-br.pl)
Nitrogen 0,29 g/l	0,583767	1148,77	“
Nitrogen 0,14 g/l	0,535267	1062,57	“
Fosfat 0,052 g/l	0,4917	1413,39	“
Fosfat 0,021 g/l	0,5451	1341,67	“

**Tabell I-2: Pyocyaninkonsentrasjoner brukt som grunnlag for utregning av spesifikk pyocyaninproduksjon (konsentrasjon/tørrvekt) i Figur 21. OD ble målt ved 600 nm i mikrokvyette.**

Betingelser	Tid [timer]	OD	Kons. [ng/ml]
Basis	3,0	0,050333	17
	4,5	0,174	10
	6,0	0,410	150
	7,5	0,657	1030
	8,25	0,723	1466
	9,75	1,283	2028
	Nitrogen 0,095 g/l	3,0	0,039
4,5		0,143	8
6,0		0,370	190
7,5		0,593	1171
8,25		0,667	1843
9,75		1,090	2058
Fosfat 0,021 g/l		3,0	0,051
	4,5	0,137333	15
	6,0	0,403	371
	7,5	0,530	1359
	8,25	0,590	1852
	9,75	1,040	2417

**Tabell I-3: Pyocyaninkonsentrasjoner brukt som grunnlag for utregning av spesifikk pyocyaninproduksjon (konsentrasjon/tørrvekt) i Figur 22. OD ble målt ved 600 nm i mikrokvyette.**

Betingelser	Tid [timer]	OD	Kons. [ng/ml]
Basis	1,5	0,080	44
	3,5	0,193	61
	4,5	0,337	146
	5,5	0,637	584
	6,5	1,247	1544
	7,5	2,103	2528
	8,5	2,250	3014
	9,5	3,363	4072
	Nitrogen 0,095 g/l	1,5	0,070
3,5		0,193	64
4,5		0,363	198
5,5		0,507	724
6,5		0,917	1425
7,5		1,067	1367
8,5		1,050	1366
9,5		1,180	1327
Fosfat 0,021 g/l		1,5	0,073
	3,5	0,186	69
	4,5	0,397	130
	5,5	0,553	523
	6,5	1,323	1600
	7,5	1,917	2790
	8,5	2,267	3838
	9,5	2,867	3971

Eksempel på beregning av spesifikk pyocyaninproduksjon:

Tabell I-1, øverste rad:

OD = 0,121 (660 nm, 96-brønnsplate) tilsvarer OD = 1,04 (600 nm kyvette).  
(Omregningsfaktor fra 660 nm brønn til 600 nm kyvette = 8,599 (Vedlegg B)).

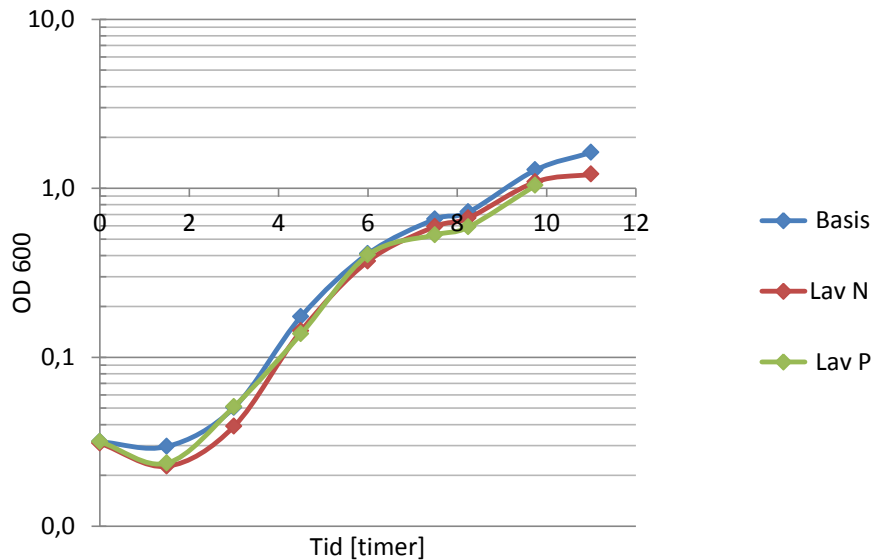
OD 1,04 tilsvarer tørrvekt  $1,0/2,6728 \text{ g/l} = 0,389$ .

(Tørrvektsfaktor = 2,6728 (Vedlegg E))

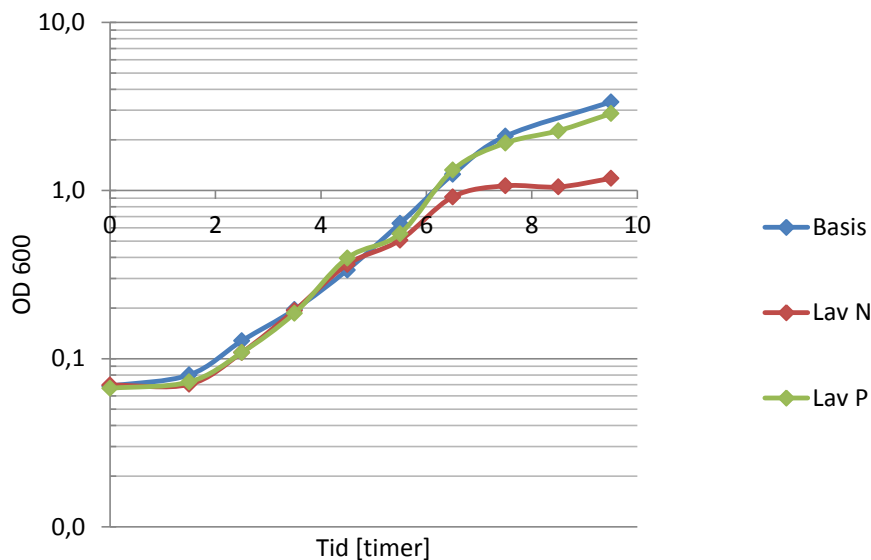
$70,65 \text{ ng/ml} / 0,389 \text{ g/l} = 70,65 \text{ } \mu\text{g/l} / 0,389 \text{ g/l} = \underline{181,6 \text{ } \mu\text{g/g}}$

## Vedlegg J: Logaritmiske vekstkurver for studie av genuttrykk i flytende kultur

Figur J-1 og J-2 viser logaritmiske fremstillinger fra forsøk med dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i rystekolber med uttak av prøver for målinger av OD, pyocyaninkonsentrasjoner og for RT-PCR av *phzM* og *phzS* (Figur 21 og 22).



Figur J-1: Logaritmisk fremstilling av OD i medium (600 nm mikrokyvette) ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i 3 medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon (0,095 g/l) og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,021 g/l). 1. forsøk, fra figur 21.



Figur J-2: Logaritmisk fremstilling av OD i medium (600 nm mikrokyvette) ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 i 3 medier; definert medium (basismedium), definert medium med lav nitrogenkonsentrasjon (0,095 g/l) og definert medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,021 g/l). 2. forsøk, fra figur 22.

## Vedlegg K: Oversikt over mengde biofilm dannet i brønnplater, relatert til RNA-utbytte og beregninger av overflatearealer.

**Tabell K-1: Oversikt over RNA-utbytte (ng/μl) korrelert til mengde biofilm dannet ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp i 6-brønnsplater. TMS-2 ble benyttet som spormineralblanding i mediet. Tabellen viser stamme, dyrkingsbetingelse, inkuberingstid [timer], antall brønner for prøveuttak, total overflateareal i brønner, målte RNA-konsentrasjoner og kommentarer. Grått skille i tabellen markerer skille mellom to uavhengige forsøk.**

Stamme	Betingelse	Tid [timer]	Antall brønner	Overflateareal brønner [cm <sup>2</sup> ]	RNA-kons [ng/μl]	RNA-utbytte [ng/cm <sup>3</sup> ]	Kommentar
PAO1 gfp	Lav P (0,0082 g/l)	5,25	5	65	770	888	Statisk
PAO1 gfp	Høy P (0,62 g/l)	5,25	5	65	1350	1869	Statisk
PA14 gfp	Lav P (0,0082 g/l)	5,25	5	65	740		Statisk
PA14 gfp	Høy P (0,62 g/l)	5,25	5	65	300	138	Statisk
PAO1 gfp	Lav P (0,0082 g/l)	12	5	65	500		Statisk
PAO1 gfp	Høy P (0,62 g/l)	12	5	65	550	381	Statisk
PA14 gfp	Lav P (0,0082 g/l)	12	5	65	360	249	Statisk
PA14 gfp	Høy P (0,62 g/l)	12	5	65	390	270	Statisk
PA14 gfp	Lav P (0,0041 g/l)	12	3	39	190	219	140 rpm
PA14 gfp	Høy P (0,62 g/l)	12	3	39	500	577	140 rpm
PA14 gfp	Lav P (0,0041 g/l)	34	3	39	120	138	140 rpm.
PA14 gfp	Høy P (0,62 g/l)	34	3	39	350	1615	140 rpm.
PA14 gfp	Lav P (0,0041 g/l)	59,25	3	39	130	200	140 rpm.
PA14 gfp	Høy P	59,25	3	39	130	1600	140 rpm.

## Vedlegg

**Tabell K-2: Oversikt over RNA-utbytte (ng/ $\mu$ l) korrelert til mengde biofilm dannet ved dyrking av *P. aeruginosa* PAO1 gfp og *P. aeruginosa* PA14 gfp i 6-brønnsplater. TMS-1 ble benyttet som spormineralblanding i mediet. Tabellen viser stamme, dyrkingsbetingelse, inkuberingstid [timer], antall brønner for prøveuttak, total overflateareal i brønner, målte RNA-konsentrasjoner og kommentarer. Grått skille i tabellen markerer skille mellom to uavhengige forsøk.**

Stamme	Betingelse	Tid [timer]	Antall brønner	Overflateareal i brønner [ $\text{cm}^2$ ]	RNA-kons [ng/ $\mu$ l]	RNA-utbytte [ng/ $\text{cm}^2$ ]	Kommentar
PAO1	Basis*	8	3	39	300/ 600**	462/923	Statisk
PAO1	Lav N (0,095 g/l)	8	3	39	160	246	Statisk
PAO1	Lav P 0,021 g/l	8	3	39	250/ 400**	385/615	Statisk
PAO1	Basis	24	1	13	130	300	Statisk
PAO1	Lav N (0,095 g/l)	24	2	26	200	231	Statisk
PAO1	Lav P 0,021 g/l	24	1	13	200	462	Statisk
PAO1	Basis*	6	4	52	450		Statisk
PAO1	Lav N (0,095 g/l)	6	4	52	300		Statisk
PAO1	Lav P (0,015 g/l)	6	4	52	370		Statisk
PA14	Basis*	6	4	52	60		Statisk
PA14	Lav N (0,095 g/l)	6	4	52	100		Statisk
PA14	Lav P (0,015 g/l)	6	4	52	100		Statisk
PAO1	Basis*	16	4	52	800	923	Statisk
PAO1	Lav N (0,095 g/l)	16	4	52	650	750	Statisk
PAO1	Lav P (0,015 g/l)	16	4	52	700	1212	Statisk
PA14	Basis*	16	4	52	270	312	Statisk
PA14	Lav N (0,095 g/l)	16	4	52	240	277	Statisk
PA14	Lav P (0,015 g/l)	16	4	52	170	294	Statisk

\*) Basismedium: Nitrogen = 0,48 g/l, fosfat: 0,62 g/l, \*\*) RNA-kons målt i to paralleller.

### Utregning av overflateareal 6-brønnsplater:

Areal bunn:  $9,6 \text{ cm}^2$  pr. brønn (oppgitt i produktkatalog).

3 ml medium pr. brønn

Høyde dekt av film = volum/areal =  $3 \text{ cm}^3 / 9,6 \text{ cm}^2 = 0,3125 \text{ cm}$

Areal =  $\pi * r^2 \rightarrow r = \sqrt{(\text{areal}/\pi)} = \sqrt{(9,6 \text{ cm}^2/\pi)} = 1,748 \text{ cm}$

Diameter =  $2 \times 1,748 \text{ cm} = 3,496 \text{ cm}$

Omkrets = diameter  $\times \pi = 3,496 \times \pi = 10,98 \text{ cm}$

Areal vegg dekt av film: omkrets  $\times$  høyde =  $10,98 \text{ cm} * 0,3125 \text{ cm} = 3,43 \text{ cm}^2$

Overflateareal dekt av film (bunn + vegg) =  $9,6 \text{ cm}^2 + 3,43 \text{ cm}^2 = 13,03 \approx \underline{\underline{13 \text{ cm}^2}}$

### Beregning av RNA-utbytte:

Tabell J-1, PAO1 gfp lav P, 5,25 timer:

Biofilm dannet på overflateareal  $65 \text{ cm}^2$  ga RNA-konsentrasjon  $770 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

Tilsats av TE buffer m/lysozym:  $250 \mu\text{l}$ . Mengde av løsning for videre isolering:  $100 \mu\text{l}$ .

Mengde RNase-fritt vann for eluering av RNA:  $30 \mu\text{l}$ .

$100 \mu\text{l} / 250 \mu\text{l} = 0,4$ .

$0,4 \times$  cellemateriale inngikk i RNA-isolering.

$65 \text{ cm}^2 \times 0,4 = 26 \text{ cm}^2$ .

$770 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 30 \mu\text{l} = 23100 \mu\text{g RNA}$

$23,1 \mu\text{g RNA} / 26 \text{ cm}^2 = 888 \mu\text{g RNA}/\text{cm}^2$ .

### Beregning av RNA-konsentrasjon nødvendig for DNA free protokoll:

Etter RNA-isolering ble DNA fjernet ved hjelp av Turbo DNA-free<sup>TM</sup> kit, som beskrevet under punkt 2.9.3. I dette trinnet ble RNA først fortynt med nuklease-fritt vann til RNA konsentrasjon  $3 \mu\text{g}$  (totalt  $25 \mu\text{l}$ ). Minste RNA-konsentrasjon som var nødvendig i dette trinnet uten å oppkonsentrere:  $120 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

$3 \mu\text{g}/25 \mu\text{l} = 0,12 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 120 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

### Utregning av overflateareal 96-brønnsplater:

100 µl medium pr. brønn

Diameter brønn = 0,6 cm (målt ved hjelp av linjal)

Radius brønn: Diameter / 2 = 0,6 cm / 2 = 0,3 cm

Areal bunn:  $\pi \times r^2 = \pi \times 0,3 \text{ cm}^2 = 0,2827 \text{ cm}^2$

Omkrets = diameter  $\times \pi = 0,6 \times \pi = 1,885 \text{ cm}$

Høyde dekt av film = volum/areal =  $0,1 \text{ cm}^3 / 0,2827 \text{ cm}^2 = 0,3537 \text{ cm}$

Areal vegg dekt av film: omkrets  $\times$  høyde =  $1,885 \text{ cm} * 0,3537 \text{ cm} = 0,6668 \text{ cm}^2$

Overflateareal dekt av film (bunn + vegg) =  $0,2827 \text{ cm}^2 + 0,6668 \text{ cm}^2 = 0,9495 \approx \underline{\underline{0,95 \text{ cm}^2}}$

### Sammenligning 6- og 96-brønnsplater:

6-brønnsplate: 3 ml medium på overflateareal  $13 \text{ cm}^2 \rightarrow 3 \text{ ml} / 13 \text{ cm}^2 = 0,23 \text{ ml pr cm}^2$

96-brønnsplate: 0,1 ml medium på overflateareal  $0,95 \text{ cm}^2 \rightarrow 0,1 \text{ ml} / 0,95 \text{ cm}^2 = 0,105 \text{ ml pr cm}^2$



## Vedlegg L: Beregning av konsentrasjon av komponent i spormineralblanding

Eksempel på beregning av konsentrasjon kobolt i medier med TMS-1 og TMS-2:

Medium med TMS-1:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ :  $2,0 \times 10^{-6} \text{ g/l}$

Medium med TMS-2:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ :  $2,0 \times 10^{-4} \text{ g/l}$

Mw (Co): 58,9 g/mol

Fw ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ):  $(58,9 + (2 * 35,5) + (12 * 1,0) + (6 * 16,0)) = \underline{237,9 \text{ g/mol}}$

- Konsentrasjon kobolt i medium tilsatt TMS-1:

$$\text{Konsentrasjon (g/l)} = \frac{\left(\frac{59 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2,0 \times 10^{-6} \text{ g/l})\right)}{\frac{237 \text{ g}}{\text{mol}}} = 4,98 \times 10^{-7}$$

- Konsentrasjon kobolt I medium tilsatt TMS-2

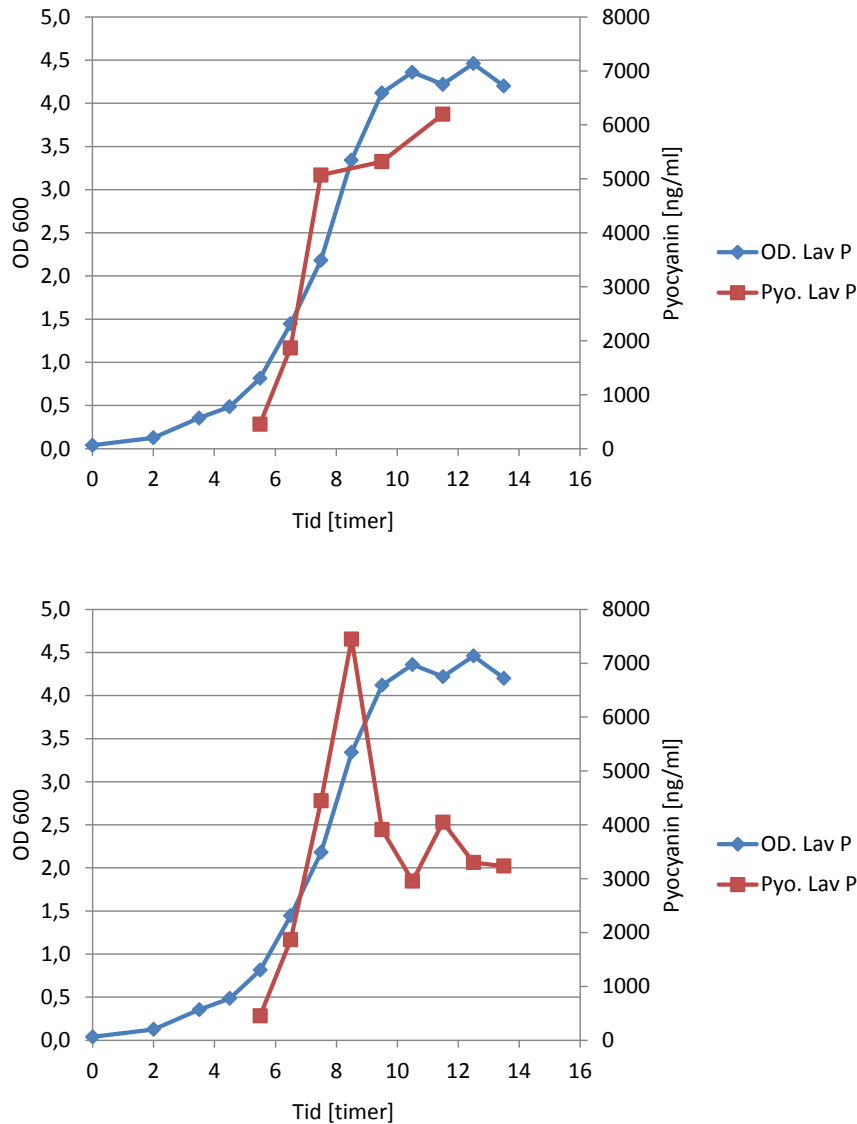
$$\text{Konsentrasjon (g/l)} = \frac{\left(\frac{59 \text{ g}}{\text{mol}} \times (2,0 \times 10^{-4} \text{ g/l})\right)}{\frac{237 \text{ g}}{\text{mol}}} = 4,98 \times 10^{-5}$$

$$\frac{4,98 \times 10^{-5}}{4,98 \times 10^{-7}} = 100$$

Beregningene viser at det er 100x mer kobolt i medium tilsatt TMS-2 enn i medium tilsatt TMS-1

## Vedlegg M: Pyocyaninproduksjon i fosfatbegrenset medium

Figur M-1 viser bakterievekst og pyocyaninproduksjon ved dyrking av *P. aeruginosa* PA14 gfp i definert medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,0041 g/l). Tilsvarende forsøk ble utført for *P. aeruginosa* PAO1 gfp, men stammen produserte ikke detekterbare mengder av pyocyanin.



**Figur M-1: OD (600 nm mikrokvyette) og pyocyaninkonsentrasjoner for vekst av *P. aeruginosa* PA14 gfp i definert medium med lav fosfatkonsentrasjon (0,0041 g/l). TMS-2 ble benyttet som spormineralblanding. Fosfat 0,0041 g/l = 0,018 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Øverste og nederste graf viser samme forsøk, men analyse av pyocyanin ble for prøver ved 7,5 og 9,5 utført i to uavhengige analysebatcher.**