

Háskólinn á Akureyri	Viðskipta- og raunvísindasvið
Námskeið:	LOK 1126 og LOK 1226
Heiti verkefnis:	Bakteríustofn af hverastrýtum í Eyjafirði. Greining og skimun eftir örveruhemjandi virkni.
Verktími:	Janúar 2015 – Apríl 2015
Nemandi:	Þórhildur Edda Eiríksdóttir
Leiðbeinandi:	Arnheiður Eypórsdóttir
Upplag:	3
Blaðsíðufjöldi:	35
Fjöldi viðauka:	2
Fylgigögn	Engin
Útgáfu og notkunarréttur	Opið verkefni. Verkefnið má ekki fjölfalda, hvorki að hluta né í heild nema með leyfi höfundar

Yfirlýsingar

„Ég undirrituð lýsi því yfir að ég ein er höfundur þessa verkefnis og að það er afrakstur eigin rannsókna”

Þórhildur Edda Eiríksdóttir

„Það staðfestist að verkefni þetta fullnægir að mínum dómi kröfum til prófs í námskeiðunum LOK 1126 og LOK 1226“

Arnheiður Eypórsdóttir, aðjúnkt, Auðlindadeild

Abstract

Pathogens have increasingly acquired antibiotic resistance. The antibiotic resistance has been increasing due to misuse of antibiotics. Therefore, the demand for new antibiotics on the market is high. When discoveries of antimicrobial activity of terrestrial microorganisms began to decrease, the ocean was the next place to search in. Because the conditions in the oceans are different than that on land, the marine microorganisms often produce interesting bioactive compounds. Great numbers of marine bacterial species have been isolated from invertebrates, plants and algae. The strain 305-18 was isolated from algae that grew on cone-structures that had geothermal activity. Primary tests indicated that the strain produced antimicrobial substances. In this project the strain was sequenced and other assays performed. There were difficulties in isolating the DNA from the strain. It was not possible to amplify the DNA using universal bacterial primers but using archaea primers was successful. The strain turned out to be gram positive, rod-shaped, catalase- and oxidative positive *Bacillus* bacteria. Antimicrobial tests were performed to confirm the previously mentioned antibiotic activity. The strain no longer showed signs of producing antibiotics with the streaking method. In the growth study there was some antimicrobial activity against *E.coli* and *E. faecalis*. The most antimicrobial activity was against *C. albicans*.

Keywords:

Marine microorganism, antimicrobial substances, antibiotics, secondary metabolites, bioactivity

Þakkarorð

Ég vil byrja á því að þakka leiðbeinanda mínum, Arnheiði Eypórsdóttur, fyrir að veita mér þetta tækifæri að taka þetta verkefni að mér. Þetta er búið vera skemmtilegt og lærdómsríkt verkefni. Ég vil einnig þakka Máneyju Sveinsdóttur, Kristni P. Magnússyni, Auði Sigurbjörnsdóttur og Oddi Vilhelmssyni fyrir veitta aðstoð og ráðleggingar þegar ég átti í vandræðum með fjölföldunarhvarf á stofni 305-18 og annað tengt því. Sean M. Scully vil ég þakka kærlega fyrir allt sem hann hefur getað hjálpað mér með en hann er einn af þeim sem ávallt er hægt að leita til ef einhver vandamál koma upp á rannsóknarstofunni. Einnig vil ég þakka samnemendum mínum í Líftækni fyrir alla þá aðstoð sem þær hafa veitt mér í náminu. Auk þess er mikilvægt að þakka vinum mínum við Háskólann á Akureyri sem hafa gert mér kleift að halda geðheilsunni í gegnum námið. Ég vil þó fyrst og fremst þakka Orra Filippussyni, kærasta mínum, og fjölskyldu minni fyrir að hlusta á mig tala um verkefnið mitt, og jafn vel tuða um það þegar lítið gekk, hugga mig þegar ég var svartsýn og hvetja mig áfram til að gera vel og standa mig.

Þórhildur Edda Eiríksdóttir
Akureyri, 20. Apríl 2015

Útdráttur

Þekkt er að sýklar mynda í vaxandi mæli þol fyrir þeim sýklalyfjum sem eru á markaðnum í dag. Eftirspurn eftir nýjum sýklalyfjum á markaðnum er því mikil. Þegar uppgötvanir á örveruhemjandi virkni örvera á landi fóru minnkandi var leitað á aðrar slóðir og hlaut þá hafið aukna athygli. Þar sem aðstæður í sjó eru aðrar en á landi þá framleiða örverur þar oft áhugaverð lífvirk efni. Fjöldinn allur af mismunandi bakteríutegundum hafa verið einangraðar í hafinu á hryggleysingum, plöntum og þörungagróðri. Stofninn 305-18 var einangraður úr þörungagróðri sem óx við hverastrýturnar í Eyjafirði. Frumprófanir sýndu að stofninn hefði örveruhemjandi virkni. Í þessu verkefni var stofninn raðgreindur og kennigreindur. Erfiðlega gekk að einangra erfðaeefni stofnsins, það tókst þó eftir nokkrar tilraunir. Ekki tókst að magna upp erfðaeefni stofnsins með altækum bakteríuvísam heldur tókst það með fornbakteríuvísam. Eftir raðgreiningu og önnur greiningarpróf reyndist stofninn vera gram jákvæð, staflaga, katalsa- og oxidasa jákvæð *Bacillus* baktería. Einnig voru gerð á stofninum örveruhemjandi próf til að sannreyna niðurstöður fyrri prófana. Stofninn sýndi ekki lengur örveruhemjandi virkni í strikunarprófunum en það er ekki óþekkt að stofnar tapi virkni ef aðstæður eru ekki til staðar sem stuðla að framleiðslu lífvirka efnisins. Í vaxartilraun sex mismunandi sýkla með útdrætti stofns 305-18 var þó einhver örveruhemjandi virkni gegn *E.coli* og *E. faecalis*, og mikil virkni var gegn *C. albicans*.

Lykilorð:

Sjávarbakteríur, örveruhemjandi efni, sýklalyf, annars stigs umbrotsefni, lífvirkni.

Efnisyfirlit

1. Inngangur.....	1
1.1 Náttúrulegar afurðir til lækninga	1
1.1.1 Örveruhemjandi efnasambönd	1
1.1.2 Sýklalyfjapól	2
1.2 Örverur úr sjó og leitin að lífvirkni.....	3
1.2.1 Lífvirk efni úr sjó	3
1.2.2 Bakteríur í sjó.....	4
1.2.3 Skimun lífvirkra efna	5
1.3 Markmið.....	6
2. Efni og aðferðir.....	7
2.1 Greiningaraðferðir.....	7
2.1.1 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun a	7
2.1.2 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun b.....	9
2.1.3 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun c	9
2.1.4 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun d.....	10
2.1.5 Einangrun á erfðaeefni með Ultra Clean™ Microbial DNA isolation Kit	10
2.1.6 Fenól-klóróform útdráttaraðferð með CTAB.....	10
2.1.7 Mögnun á 16s rRNA með fjölföldunarhvarfi	11
2.1.8 Hreinsun PCR afurða og raðgreining.....	12
2.1.9 Greining afurða eftir raðgreiningu	13
2.1.10 Önnur greiningarpróf	13
2.2 Vaxtarhraðapróf	13
2.3 Örveruhemjandi prófun.....	14
2.4 Vaxartilraun	14

3.	<i>Niðurstöður</i>	16
3.1	Greiningaraðferðir.....	16
3.1.1	Raðgreiningarniðurstöður	16
3.1.2	Niðurstöður annarra greiningarprófa	17
3.2	Vaxtarhraðapróf	18
3.3	Örveruhemjandi prófun.....	19
3.4	Vaxtartilraun	19
4.	<i>Umræða</i>	25
4.1	PCR og raðgreining.....	25
4.1.1	Útdráttur erfðaeftnis og mögnun á 16S rRNA	25
4.1.2	Raðgreining.....	26
4.1.3	<i>Bacillus</i> í sjó.....	28
4.1.4	Önnur greiningarpróf	29
4.2	Vaxtarhraðapróf	29
4.3	Örveruhemjandi prófun.....	30
4.4	Vaxtartilraun	32
5.	<i>Lokaorð</i>	35
	<i>Heimildaskrá</i>	36
	<i>Viðauki I</i>	41
	<i>Viðauki II</i>	44

Myndaskrá

Mynd 1 – Skyldleikatré með Maximum Likelihood aðferðinni.	17
Mynd 2 - Vaxtarferli 305-18. Myndin sýnir ljósgleypni við mismunandi hitastig á nokkurra klst millibili.	18
Mynd 3 - Örveruhemjandi prófun með strikunaraðferð.	19
Mynd 4 - Kontrólar, annars vegar bara æti (appelsínugula línan) og hins vegar æti með 4% EtOAc (gráa línan).	20
Mynd 5 – Vaxtarkúrfa <i>S. aureus</i> við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18.	21
Mynd 6 - Vöxtur <i>E. coli</i> við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18.	21
Mynd 7 - Vöxtur <i>E. faecalis</i> við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18.	22
Mynd 8 - Vöxtur <i>P. aeruginosa</i> við mismunandi styrk af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18.	23
Mynd 9 - Vöxtur <i>C. albicans</i> í mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18.	24
Mynd 10 - Vöxtur <i>L. monocytogenes</i> við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18.	24
Mynd 11 - Vaxtarferill stofns 305-18 við 15°C.	44
Mynd 12 - Vaxtarferill stofns 305-18 við 25°C.	44
Mynd 13 - Vaxtarferill stofns 305-18 við 30°C.	45

Töfluskrá

Tafla 1 – Hvarfefnablöndur fyrir PCR hvörf.	8
Tafla 2 - Hvarfefnablanda fyrir PCR hvarf.....	8
Tafla 3 - PCR Prógramm.	9
Tafla 4 - Fornbakteríuvísar	12
Tafla 5 - ExoSAP hvarfefnablanda	12
Tafla 6 - Sértekur vaxtarhraði og kynslóðatími við þrjú mismunandi hitastig.	18
Tafla 7 - Styrkur þurrefnis í útdrætti.....	19
Tafla 8 - Flokkunarfræði Bacillus.....	41
Tafla 9 - Niðurstöður BLAST leitar.....	42

1. Inngangur

1.1 Náttúrulegar afurðir til lækninga

Í fleiri þúsundir ára hafa mennirnir leitað til náttúrunnar eftir lækningum við hinum ýmsu kvillum. Plöntur hafa verið notaðar í smyrsl og te í þeim tilgangi að bæta heilsu og líðan, auk þess að gera að sárum. Með tímanum hafa verið búin til lyf úr þeim lífvirku efnum sem þessar plöntur framleiða (Fenical, 2006). Til að byrja með var algengast að skoða plöntur en eftir að penisillín var uppgötvað hafa örverur verið vinsælt viðfangsefni þeirra er leita að efnum með áhugaverða lífvirkni (Proksch, Edrada, og Ebel, 2002).

1.1.1 Örveruhemjandi efnasambönd

Annars stigs umbrotsefni örvera eru lífræn efnasambönd sem taka ekki beinan þátt í vexti, þroska eða fjölgun lífveru (Fraenkel, 1959). Þau eru af ýmsu tagi og hafa fjölbreytta virkni, auk þess eru ýmis efni til sem ekki hafa skilgreinda virkni (Jensen, Williams, Oh, Zeigler og Fenical, 2007). Þau efni sem hafa skilgreinda virkni eru krabbameinshindrandi efnasambönd, örveruhemjandi- og bólgueyðandi efnasambönd o.fl. (Jensen og Fenical, 2000).

Örveruhemjandi efni eru skilgreind sem lífrænar náttúrulegar afurðir sem hafa lágan sameindamassa, eru framleidd af örverum og hafa, í lágum styrk, hindrandi áhrif á vöxt annarra örvera (Demain, 1999). Sýklalyf (e. antibiotics) eru lyf sem hamla vexti örvera eða drepur örverurnar (www.oxforddictionaries.com, e.d.). Þekkt er sagan þegar Alexander Fleming uppgötvaði penisillín. Hann var að rannsaka influensu vírus þegar mygla komst í staphylococcus ræktunar skál. Í kring um mygluna var eyða í bakteríu ræktinni. Hann komst að því að þessi mygla væri af ættkvíslinni *Penicillium* og því nefndi hann efnið sem myglan framleiddi, Penisillín (Fleming, 1964).

Uppgötvun Fleming á penisillíni er oft talin vera upphafið af sýklalyfja tímabilinu sem nú ríkir (Aminov, 2010) og var það upphafið að notkun sýklalyfja eins og við þekkjum þau í dag en þau virðast hafa verið í notkun miklu lengur í annarri mynd. Leifar af sýklalyfinu tetracyclin hafa fundist í beinum manna sem voru uppi á tímabilinu 350-550 eftir Krist (Basset, Keith, Armelagos, Martin og Villanaeva, 1980). Auk þess sem ýmsar plöntur, sem

hafa verið notaðar svo öldum skiptir í hefðbundinni kínverskri læknisfræði, innihalda efnasambönd sem hafa örveruhemjandi virkni (Wong o.fl., 2010).

Frá uppgötvun á penisillíni sem meðferð gegn bakteríusýkingu hefur fjöldi annarra örvera, sem framleiða sýklalyf, verið uppgötvuð. Hraði uppgötvana á nýjum lífvirkum efnum, hefur þó minnkað verulega á undanförunum áratugum. Tæmandi rannsóknir á jarðvegsörverum hefur ítrekað skilað þeim niðurstöðum að um sömu þekktu tegundirnar er að ræða sem aftur framleiða áður þekkt efnasambönd. Það var því leitað á nýjar slóðir, hafið, í von um að uppgötva annars stigs umbrotsefni sem hafa áhugaverða virkni (Jensen og Fenical, 2000).

1.1.2 Sýklalyfjapól

Í ræðu sinni sem Alexander Fleming hélt árið 1945, þegar hann tók við Nobel verðlaununum, flutti hann varnarorð varðandi notkun sýklalyfja. Hann sagði að ekki væri erfitt fyrir örverur að öðlast þol gegn penisillíni, sérstaklega ef skammturinn væri ekki nægjanlega stór til að drepa þær (Fleming, 1964). Þróun sýklalyfjapóls örvera á sér stað vegna náttúrulegs vals. Þegar örverur komast í snertingu við sýklalyf, þá deyja þær sem ekki hafa varnarkerfi til að þola efnin. Þær örverur sem lifa af munu lifa áfram í umhverfi þar sem minni samkeppni er. Misnotkun manna á sýklalyfjum hefur hraðað þessu ferli. Skortur á sýklalyfjum sem virka hefur leitt til ýmissa vandamála í kjölfar skurðaðgerða og líffæraígræðslu, sem getur síðan leitt til aukningar í dánartíðni hjá þessum sjúklingum, auk þess sem ekki yrði lengur hægt að gefa krabbameinssjúklingum í lyfjameðferð sýklalyf (Howard, Hopwood og Davies, 2014). Þetta gerir það sem sagt að verkum að úrræðum gegn sýkingum, sem áður var auðvelt að meðhöndla, fer fækkandi. Þetta sýklalyfjapól hefur ýtt undir þörfina fyrir ný sýklalyf á markaðinn (Jensen og Fenical, 2000).

Ár hvert koma upp um 400.000 sýkingar af völdum ónæmra sýkla í Evrópu, þar af valda þessar sýkingar um 25.000 dauðsfalla (European Centre for Disease Prevention and Control, 2014). Samkvæmt Alþjóða heilbrigðismálastofnuninni (WHO) er sýklalyfjapól grafalvarlegt alþjóðlegt vandamál og ógn við þann árangur sem náðst hefur í nútíma læknisfræði. Þetta

vandamál leiðir til hærri kostnaðar í heilbrigðiskerfinu, því ekki er lengur eins auðvelt að meðhöndla ýmsa sjúkdóma af völdum sýkla (World Health Organisation, 2014).

1.2 Örverur úr sjó og leitinn að lífvirkni

1.2.1 Lífvirk efni úr sjó

Hafið geymir fjölda leyndarmála. Margir kimar hafsins eru enn órannsakaðir og það sama má segja um lífverur þess, og þá sérstaklega örverur þess. Þessar örverur framleiða fjöldan allan af einstökum efnasamböndum sem hafa áhugaverða virkni. Sjávarlífverur eru ríkulegar uppsprettur annars stigs umbrotsefna en þær sjávarlífverur sem ekki geta varið sig með ytra varnarkerfi nýta sér þessi umbrotsefni sér til varnar og leyfir það þeim að vaxa svo til að segja óáreitt (Paul, Arthur, Ritson-Williams, Ross og Sharp, 2007).

Málþingið Drugs from the Sea markaði upphafið að leitinni af lífvirkum eignum í lífverum úr sjó en það fór fram árið 1967 (Jensen og Fenical, 2000). Algengt er að örverur, plöntur og hryggleysingjar í sjó búi í samlífi með hvort öðru. Örverur sem búa í samlífi með hryggleysingjum og plöntum í sjó eru gríðarlega fjölbreyttar. Um aldamótin 2000 höfðu fjölda mörg nýrra lífvirkra efna verið uppgötvuð og mörg þeirra verið eignuð hryggleysingjum og plöntum í sjó (Faulkner, 2002). Í dag eru margar rannsóknir sem benda til þess að þau lífvirku efni sem hafa verið uppgötvuð í hryggleysingjum úr sjó, séu í raun frá örverum sem búa í samlífi með þeim (Paul o.fl., 2007). Þrátt fyrir að einangrun lífvirkra efna, sem örverur úr sjó framleiða, krefjist sérstakra aðferða og tækni, þá er það samt sem áður auðveldara heldur en að afla lífvirkra efnasambanda frá hryggleysingjum úr sjó, þar sem erfiðara er að rækta hryggleysingja (Jensen og Fenical, 2000).

Árið 2013 birtust 379 greinar þar sem fjallað var um 1163 ný efnasambönd sem einangruð voru úr sjávarlífverum. Þetta eru 6% færri uppgötvanir heldur en árinu áður (Blunt, Copp, Keyzers, Munro og Prinsep, 2014). Þar af voru 491 ný efnasambönd úr sjávarörverum sem var 14% aukning frá árinu 2012. Miðað við framgang í þessum málum síðastliðin 50 ár þá er talið að enn eigi

eftir að uppgötva fjölda efnasambanda í meira en 200.000 tegunda sem enn á eftir að meta (Blunt, Copp, Keyzers, Munro og Prinsep, 2015). Frá árinu 1985 hafa um 13% þeirra lífvirkra efna sem uppgötvuð hafa verið úr sjó, sýnt örveruhemjandi virkni. Er þetta annar stærsti hópur efnasambanda en stærsti hópurinn er krabbameinshindrandi efnasambönd (Hu, Y. o.fl., 2015). Efnasambönd sem hafa sýnt virkni gegn methicillin-þolnum *Staphylococcus aureus* (MÓSA) eru á meðal þeirra örveruhemjandi efnasambanda sem einangruð hafa verið úr sjávarörverum (Hughes, Prieto-Davo, Jensen og Fenical, 2008).

1.2.2 Bakteríur í sjó

Sjávarstraumar geta flutt bakteríur langar vegalengdir og því kunna bakteríurnar að komast í kynni við fjölbreyttar aðstæður í sjónum. Hæfni bakteríanna til að lifa af og vaxa við svo fjölbreyttar aðstæður hefur áhrif á dreifingu þeirra í hafinu. Bakteríurnar lifa bæði á lifandi og lífvana yfirborði í hafinu, en yfirborð í sjónum eru stöðugt böðuð í samansafni ólíkra baktería (Jensen og Fenical, 1994).

Bakteríur úr sjó eru skilgreindar út frá þörf þeirra fyrir salt, eða nánar tiltekið natríum en fyrst og fremst þeirri staðreynd að þær geta lifað og vaxið í sjó. Þær eru með Na^+ háð gangvirki sem sér um að flytja hvarfefni inn í frumuna. Auk þess er þörf sjávarbaktería fyrir magnesíum eða blöndu af magnesíum og kalsíum, meiri en hjá jarðvegsbakteríum (Macleod, 1965). Svo virðist vera að margar þær bakteríur sem framleiða ný, áður óþekkt lífvirk efni geta bæði lifað í sjó og á landi (Jensen og Fenical, 2000). Bakteríur úr sjó eru efnaskiptalega séð öðruvísi en hliðstæður þeirra á landi og kunna þar af leiðandi að framleiða annars stigs umbrotsefni með aðra virkni en hliðstæðurnar. Það er hins vegar ekki útilokað að sömu stofnar sem ekki eru einangraðir úr hafinu geti framleitt sömu efni. Hins vegar ef bakterían framleiðir lífvirka efnið einungis þegar aðstæður líkjast því sem er í hafinu, þ.e.a.s. sami saltstyrkur, raki eða næringarefni og eru til staðar í hafinu, þá eru ekki miklar líkur á að hliðstæður bakteríunnar á landi geti framleitt efnið (Jensen og Fenical, 1994). Árið 2013 birtist fjöldi greina þar sem fjallað var um þær bakteríur sem voru einangraðar úr sjó og lífvirku efnasamböndin sem þær framleiddu en það eru meðal annars

tegundir *Actinomadura*, *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Enhygromyxa* o.fl. (Blunt o.fl., 2015). Stór hluti þeirra baktería sem hafa verið einangraðar af sjávarþörungum, eru gram jákvæðar. Gram jákvæðar sjávarbakteríur virðast framleiða ýmis áhugaverð efnasambönd sem hafa vakið verðskuldaða athygli vísindamanna (Jensen og Fenical, 1994).

Í hafinu er aðstæður aðrar en á landi og því eru mörg efnasambönd sem komin eru frá sjávarlífverum einstök. Þessi efnasambönd hafa mikla lífvirkni og er efnabygging þeirra óvenjuleg (Molinski, Dalsay, Lievens og Saludes, 2009). Slík efnasambönd eru mikilvæg þegar kemur að þróun nýrra lyfja gegn hinum ýmsu sjúkdómum (Newman og Cragg, 2012).

1.2.3 Skimun lífvirkra efna

Leitin af sjávarlífverum sem framleiða einstök efnasambönd, hefur leitt til nýrra aðferða við sýnatöku. Í þeirri von að finna eitthvað nýtt og áhugavert hafa fræðimenn ferðast yfir hnöttinn þveran og endilangan. Notkun djúp-köfunartækja gerir það kleift að hægt er að nálgast svæði neðansjávar sem áður voru ekki aðgengileg með hefðbundnum köfunarbúnaði. Þetta gerir það að verkum að sýni sem áður var ekki hægt að nálgast eru nú aðgengileg í nægjanlegu magni til að hægt sé að meta þau og rannsaka (Jensen og Fenical, 1994).

Skimun eftir efnum úr sjó með áhugaverða lífvirkni hefst oft með því að þynna og sá sýnum úr sjónum í þeim tilgangi að einangra bakteríur. Einangraðar bakteríur eru þá ræktaðar upp í hristiflöskum, á agarskálum eða í gerjunartönkum. Lífrænu efnasamböndin eru síðan dregin út úr bakteríunni með því að nota lífrænan leysi. Þar næst er kannað hvort að þessir útdrættir hafi einhverja lífvirkni, t.d. örveruhemjandi virkni og er það gert með hinum ýmsu prófunum. Ef slík efni finnast þá eru þau hreinsuð og uppbygging þeirra greind (Jensen og Fenical, 1994).

1.3 Markmið

Í mastersverkefni Arnheiðar Eyþórsdóttur voru sýni tekin við hverastrýturnar í Eyjafirði á árunum 2005 til 2006. Fjölmargir stofnar voru einangraðir og lífvirkni þeirra könnuð. Meðal þessara stofna var 305-18 en hann var einangraður árið 2006 úr þörungagróðri sem óx við hverastrýturnar. Upphaflega var hann ræktaður við 23°C á Anaerobe Isolation Agar (AIA), síðar ræktaður á International Streptomyces Project æti (ISP2) með 2% NaCl. Frumprófanir á örveruhemjandi virkni stofnsins sýndu mikla virkni. Markmið þessa verkefnis er að staðfesta örveruhemjandi virkni gagnvart *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM1128), *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), *Escherichia coli* (DSM 1103), *Candida albicans* (DSM 1386) og *Listeria monocytogenes* (DSM 20600), auk þess að skilgreina stofninn betur. Hefur stofninn 305-18 örveruhemjandi virkni, hvernar tegundar er hann og hver eru einkenni stofnsins?

2. Efni og aðferðir

Í upphafi verkefnisins var stofn 305-18 ræktaður upp í International Streptomyces Project æti (ISP2) með 2% NaCl en hann hafði áður verið í rækt í ISP2 + 2% NaCl í u.þ.b. 6 mánuði.

2.1 Greiningaraðferðir

2.1.1 Kóloníu fjölföldunarvarf (PCR) Tilraun a

Kólonía var tekin af skál með pípettuoddi og sett í PCR-brunnalengju. Erfðaefni stofnsins var magnað upp með 16S rRNA vísunum 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') og 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT t-3'). Í hvarfefnablöndurnar sem hér verða nefndar var notað Taq polymerase frá New England BioLabs Inc., 10x Thermopol buffer einnig frá New England BioLabs Inc. ásamt dNTP Solution Mix frá sama fyrirtæki. Magn efna í hvarfefnablöndunni má sjá í Töflu 1. Í hvern brunn fóru 25 µl af hvarfefnablöndunni. Fjölföldunarhvörf fara fram í Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200) frá MJ Research eða í MJMini™ Personal Thermal Cycler frá BIO-RAD á prógrammi sem sjá má í Töflu 3. Auk kóloníu af stofni 305-18 var neikvæður kontróll settur í fjölföldunarhvarfið en hann innihélt dH₂O í stað DNA og jákvæður kontróll sem innihélt bakteríu DNA.

Afurðir þessa fjölföldunarhvarfs og þeirra sem síðar verða nefndar voru rafdrengar á 0,8% agarósageli (UltraPure™ Agarose frá Invitrogen™ í 0,5% TBE buffer) sem innihélt 1 µl af SYBR® Safe DNA gel lit frá Invitrogen. Fimm µl af PCR afurð var blandað við 1 µL af 6x hleðslulit og sett í hvern brunn á gelinu. Auk þess voru 2 µl af Quick-Load®100 bp DNA Ladder settur í fyrsta brunn á gelinu. Rafdráttur fór fram við 100V í 45 mínútur. Að lokum var tekin mynd af gelinu undir útfjólubláu ljósi í InGenius frá Syngene og hún skoðuð í forritinu GeneSnap einnig frá Syngene.

Tafla 1 – Hvarfefnablöndur fyrir PCR hvörf. Taflan sýnir samsetningu hvarfefnablöndu í hverri tilraun til að magna upp DNA í stofni 305-18 með mismunandi aðferðum til að einangra það. Kólónía merkir að kólónía eða kólóníuhluti var tekin beint af skál og notuð sem sýni.

Aðferðir og magn (µl) per sýni						
Efni	Kólónía a	Kólónía b	Kólónía c	Kólónía d	Ultra Clean kit	Fenól/klóró- form a
10x Buffer	2,5	2,5	2,0	2,5	2,5	2,5
dNTP	2,0	2,0	0,5	2,0	2,0	2,0
27F vísir (10 µM)	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1492R vísir (10 µM)	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq polymerase	0,15	0,15	0,5	0,15	0,15	0,15
H ₂ O	19,5	18,35	14,0	15,85	18,35	18,35
	25,15	25,0	19,0	22,5	25,0	25,0

Tafla 2 - Hvarfefnablöndu fyrir PCR hvarf. Taflan sýnir hvarfefnablöndu þar sem notast var við fornbakteríuvísa í tilraun til að magna upp DNA í stofni 305-18. Notast var við Fenól-klóróform aðferðina til að einangra erfðaefnið.

Fenól-klóróform b	
Efni	Magn (µl) per sýni
10x Buffer	2,5
dNTP	2,0
A571F vísir (10 µM)	1,0
UA1204R vísir (10 µM)	1,0
A751F vísir (10 µM)	1,0
UA1406R vísir (10 µM)	1,0
Taq polymerase	0,15
H ₂ O	16,35
	25,0

Tafla 3 - PCR Prógramm. Taflan sýnir mismunandi PCR prógrömm sem notuð voru til að magna upp erfðaeftni sem fengust með mismunandi útdráttar aðferðum.

PCR prógramm	Aðferðir og hitastig (°C)								
	Kólónía a, Kólónía b, Kólónía d, Ultra Clean kit og Fenól-klóróform a		Kólónía c		Fenól-klóróform b				
Upphafleg eðlissvipting	95	3 mín		95	6 mín		94	2 mín	
Eðlissvipting	95	30 sek		95	30 sek		94	1 mín	
Þáttatenging	50	30 sek	35	55	30 sek	30	55	1 mín	30
Framlenging	68	1,30 mín		68	1,30 mín		72	1 mín	
Enda framlenging	68	7 mín		68	20 mín		72	10 mín	
Bið	4	Endalaust		4	Endalaust		4	Endalaust	

2.1.2 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun b

Þetta allt var endurtekið að því undanskildu að minna af kólóníu var tekin og sett í PCR-brunnalengju. Magn efna í hvarfefnablöndu má sjá í Töflu 1. PCR prógramm má sjá í Töflu 3. Afurðir fjölföldunarhvarfsins voru rafdrengar eins og áður hefur verið lýst.

2.1.3 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun c

Kólóníu PCR var endurtekið samkvæmt leiðbeiningum frá The International Genetically Engineered Machine (iGEM) stofnuninni (2013). Örlítið af kólóníu er þá tekin með pípettuoddi og sett í 20 µl af ddH₂O og pípettað upp og niður. Einn µl af kólóníuþynningunni var sett út í 19 µl af hvarfefnablöndu. Magn efna í hvarefnablöndu má sjá í Töflu 1. Prógramm í PCR má sjá í Töflu 3. Afurðir fjölföldunarhvarfsins voru rafdrengar eins og áður hefur verið lýst.

2.1.4 Kólóníu fjölföldunarhvarf (PCR) Tilraun d

Kólóníu PCR var aftur endurtekið og framkvæmt eins og í fyrsta skiptið. Magn efna í hvarfefnablöndu má sjá í Töflu 1, PCR prógramm má sjá í töflu 3. Afurðir fjölföldunarhvarfsins voru rafdreagnar eins og áður hefur verið lýst.

2.1.5 Einangrun á erfðaeefni með Ultra Clean™ Microbial DNA isolation Kit

Erfðaeefni stofns 205-18 var einangrað með Ultra Clean™ Microbial DNA isolation Kit frá MoBio Laboratories Inc. Leiðbeiningum frá framleiðenda var fylgt eftir. Fyrir einangrun var stofninn ræktaður á ISP2 + 2% NaCl æti, því var fyrsta skrefi í leiðbeiningum sleppt þar sem taka átti 1,8 mL af fljótandi rækt og setja í skilvindu. Í stað þess var kólónía tekin og sett beint í 300 µl af MicroBead lausn. Samkvæmt ráðleggingum frá framleiðenda var bætt við einu skrefi í sundrunarferlið þar sem lausnin var hituð við 65°C í 10 mínútur auk þess var prófað að hita við 65°C yfir nótt. Eftir það var leiðbeiningum fylgt.

Einangrað erfðaeefni stofnsins var magnað upp með 27F og 1492R vísunum. Tveir og hálfur µl af erfðaeefni var blandað við 25 µl af hvarfefnablöndu. Magn efna í hvarfefnablöndu má sjá í Töflu 1. Fjölföldunarhvarfið má sjá í Töflu 3 og var það framkvæmt tvisvar á sama prógrammi. Afurðir fjölföldunarhvarfsins voru rafdreagnar eins og áður hefur verið lýst.

Til að kanna hvort tekist hafi að draga út erfðaeefnið með Ultra Clean™ aðferðinni voru 5 µl af afurð úr útdrættinum blandað við 1µl af 6x hleðslulit. Þetta var sett í brunna á 8% agarósageli og rafdregið við 120V í 20 mín.

2.1.6 Fenól-klóróform útdráttaraðferð með CTAB

Erfðaeefni stofns 305-18 var einangrað samkvæmt Andreou (2013) og fór mest allt ferlið fram í reykhettu. Leiðbeiningum var fylgt eftir, að undanskildum fyrstu tveimur skrefum þar sem stofninn er ræktaður í 5 mL af fljótandi rækt í nokkra daga, síðan er 1,5 mL af ræktinni tekin og sett í skilvindu. Í þriðja skrefinu er botnfallið leyst upp í TE buffer en í stað þess var kólónía tekin og leyst upp í 567 µl af TE buffer í eppendorf glasi. Auk TE buffer var bætt við 30 µl af 10% SDS og 3 µl próteínasa K og látið bíða í 1 klst við 37°C. Næst voru 100 µl af 5 M NaCl lausn bætt í lausnina og blandað vandlega saman. Því

næst voru 80 µl af CTAB/NaCl lausn bætt út í eppendorf glasið, en lausnin var útbúin fersk með því að blanda 10% CTAB í 0,7 M NaCl, og látið standa við 65°C í 10 mínútur. Um það bil 0,7 til 0,8 mL af klóroform/ísoamyl alkóhól var blandað rækilega við og glasið síðan sett í skilvindu í nokkrar mínútur.

Ofanflotið var því næst fjarlægt og jafn miklu magni af fenól/klóróform/ísoamyl alkóhól blöndu, eða í hlutfallinu 1:1, var blandað því sem eftir var í eppendorf glasinu, þetta var sett í skilvindu í 5 mínútur.

Ofanflotið var tekið og blandað við ísóprópanól sem var um 60% af rúmmálinu og hrist rækilega, sett í skilvindu. Botnfallið (DNA) var síðan fjarlægt og blandað við 70% etanól í hlutfallinu 1:1. Þetta var síðan endurtekið, í síðara skiptið var ofanflotið fjarlægt og botnfallið þurrkað. Eftir það var botnfallið leyst upp í TE buffer. Til að kanna hvort útdráttur hefði tekist var afurð dregin á geli eins og áður hefur verið lýst.

2.1.7 Mögnun á 16s rRNA með fjölföldunarhvarfi

Erfðaeefnið sem fékkst með Fenól-klóróform útdráttaraðferðinni var magnað upp með 27F og 1492R vísunum. Hvarfefnablöndu má sjá í Töflu 1. Notast var við PCR prógramm sem sjá má í Töflu 3. Afurð var rafdrengin á geli eins og áður hefur verið lýst.

Erfðaeefnið var einnig magnað upp með fornbakteríuvísapörunum sem má sjá í Töflu 4. Sömu efni voru notuð í hvarfefnablönduna eins og áður. Magn efna í hvarfefnablöndunni má sjá í Töflu 1. PCR prógrammið má sjá í Töflu 2. Ekki var notast við jákvæðan kontról í þessu fjölföldunar hvarfi þar sem hann var ekki til fyrir vísapörin sem notast var við.

Tafla 4 - Fornbakteríuvísar

Vísir	Röð vísa 5' - 3'
A571F	GCYTAAAGSRICCGTAGC
UA1204R	TTMGGGGCATRCIKACCT
A751F	CCGACGGTGAGRGRYGAA
UA1406R	ACGGGCGGTGWGTRCAA

Afurðir fjölföldunarhvarfsins voru rafdrengnar eins og áður hefur verið lýst. Rafdráttur fór fram við 110V í 45 mínútur.

2.1.8 Hreinsun PCR afurða og raðgreining

Eftir fjölföldunarhvarf voru afurðirnar hreinsaðar með ExoSAP-IT hvarfi. Tíu μ l af ExoSAP blöndu (Tafla 5) voru settir út í 20 μ l PCR afurð. Hvarfið fór fram í PTC-200 frá MJ Research. Lausnin var geymd við 37°C í 60 mín til að virkja Exonuclease I til að fjarlægja einþráða vísa og ef einhverjir eru, óviðkomandi einþráða DNA sem hafði myndast við fjölföldunarhvarfið og fosfatasann til að fjarlægja dNTP sem var afgangur úr PCR hvarfefnablöndunni. Síðan var lausnin hituð við 95°C í 5 mínútur til að afvirkja ensímin (www.affymetrix.com, e.d.)

Tafla 5 - ExoSAP hvarfefnablenda

ExoSAP blanda	Magn (μ l)
Exonuclease I (20 U/ μ l)	0,025
Antarctic Shrimp Phosphatase (5 U/ μ l)	0,05
ddH ₂ O	9,925

Eftir hreinsun voru sýni undirbúin til raðgreiningar. 5 μ l af vísam (Tafla 4) var blandað við 5 μ l af hreinsaðri PCR afurð og sent til raðgreiningar hjá MacroGen í Hollandi.

2.1.9 Greining afurða eftir raðgreiningu

Niðurstöður úr raðgreiningu frá MacroGen voru skoðaðar og snyrtar til í Sequence Scanner frá Applied Biosystems. Því næst voru raðirnar keyrðar í 16S ribosomal RNA sequences gagnagrunninum í BLAST gagnagrunninum hjá National Center for Biotechnology Information (NCBI) þar sem leitað var að röðum þekktra tegunda sem sýndu einsleitni við 16S rRNA röð úr stofni 305-18. Samröðun og þróunargreining var gerð í MEGA 6 (Tamuar, Stecher, Petersson, Filipski og Kumar, 2013). Þróunarsaga stofns 305-18 var ályktuð með því að nota Maximum Likelihood aðferðina sem er byggð á Tamura-Nei módelinu (Tamura og Nei, 1993). Upphaflegu trén sem notuð voru í þreifuninni (e. heuristic search) fengust sjálfkrafa með því að beita Neighbor-Join og BioNJ algóriþma. GC hlutfall raðar sem fékkst úr raðgreiningu var reiknað með ENDMEMO GC reiknivél (www.endmemo.com, e.d.).

2.1.10 Önnur greiningarpróf

Gram litun var framkvæmd samkvæmt Hucker, G. J. (1920). Auk þess var framkvæmd oxidasa prófun samkvæmt leiðbeiningum af www.sigmaaldrich.com og katalasa próf þar sem einum dropa af 3% H₂O₂ var látinn drjúpa yfir kólóníu. Auk þess var kólóníugerðin skoðuð.

2.2 Vaxtarhraðapróf

Vaxtarferlatilraun var framkvæmd á stofninum 305-18 í fljótandi ISP2+ 2% NaCl æti í þremur mismunandi hitastigum, 15°C, 25°C og 30°C, yfir 7 daga tímabil. Ljósgeypni var mæld í ljósgeypnitækinu UV-1800 Spectrophotometer frá Shimadzu með um 5-8 klst millibili við 600 nm. Ljósgeypnin var sett upp í línurit og sértækur vaxtarhraði (e. specific growth rate) reiknaður í öllum hitastigum út frá ljósgeypni eftir 5 klst að 19 klst. Mismunurinn milli þessara tveggja punkta var fundinn og deilt með tímamismuninum þar á milli. Hámarks sértækur vaxtarhraði (e. maximum specific growth rate) var fundinn með jöfnu bestu línu á línuritinu. Í viðauka 2 má sjá línurit fyrir hvert hitastig fyrir sig með jöfnu bestu línu. Út frá hámarks sértækum vaxtarhraða var kynslóðartíminn fundinn út með jöfnu 1.

Jafna 1 - Kynslóðartími (g)

$$g = \frac{1}{\mu_{max}}$$

2.3 Örveruhemjandi prófun

Sex sýklar voru notaðir við skimun á lífvirkum efnum í stofninum. Það var *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM1128), *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), *Escherichia coli* (DSM 1103), *Candida albicans* (DSM 1386) og *Listeria monocytogenes* (DSM 20600).

Við skimun á örveruhemjandi virkni stofnsins var notast við aðlagða strikunaræðferð (Williston, Walrath og Youmans, 1947) á ISP2 agar + 2% NaCl. Byrjað var á því að strika stofni 305-18 í beinni línu á miðja agarskál. Þegar sýnilegur vöxtur var kominn á skálina var sýklunum 6 strikað lóðrétt út frá miðjulínunni. Eftir 1-2 daga var skálin skoðuð og fjarlægð milli sýklanna og stofns 305-18 metin. Var þetta gert í fimmtekningu.

2.4 Vaxartilraun

Frumuútdráttur var útbúinn fyrir tilraunina með ethyl acetate en 1 L af fljótandi rækt í ISP2 + 2% NaCl, var hrist kröftuglega í skiltrekt ásamt 1 L af ethyl acetate og látið liggja í um klst eða þar til tvö lög höfðu myndast. Var þetta gert tvisvar. Lífræna lagið var látið gufa upp í reykhettu í 2 til 3 sólarhringa við herbergishita. Eftir uppgufun var lífræna lagið leyst upp með ethyl acetate.

Vaxartilraun með útdrætti úr rækt var framkvæmd í þeim tilgangi að kanna hvort efnin í útdrættinum hefðu áhrif á vöxt nokkurra sýkla. Tilraunin var framkvæmd í Bioscreen C MBR frá Oy Growth Curves Ab Ltd. með tveimur 100 brunna míkrotíterbakka. Mismunandi styrkleikar af útdrættinum voru útbúnir í Nutrient Broth en þeir voru eftirfarandi: 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25% og 0,1%.

Ferskar ræktir í Nutrient Broth af *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM1128), *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), *Escherichia coli* (DSM 1103), *Candida albicans* (DSM 1386) og *Listeria monocytogenes* (DSM 20600) voru notaðar. 0,1 mL af þynntum ræktum var bætt við 10 mL af NB æti sem innihélt mismunandi styrkleika af útdrættinum, 400 µl af því var sett í brunna á míkrotítrunarbakka og var þetta gert í þrítekningum. Kontrólar voru ætið án baktería eða útdráttar, æti með bakteríunum en án útdráttar, æti með bakteríum og ethyl acetate en án útdráttar og svo æti án baktería með 4% ethyl acetate. Þetta var síðan mælt við 600 nm á 15 mín fresti við herbergishita í um 64 klst.

3. Niðurstöður

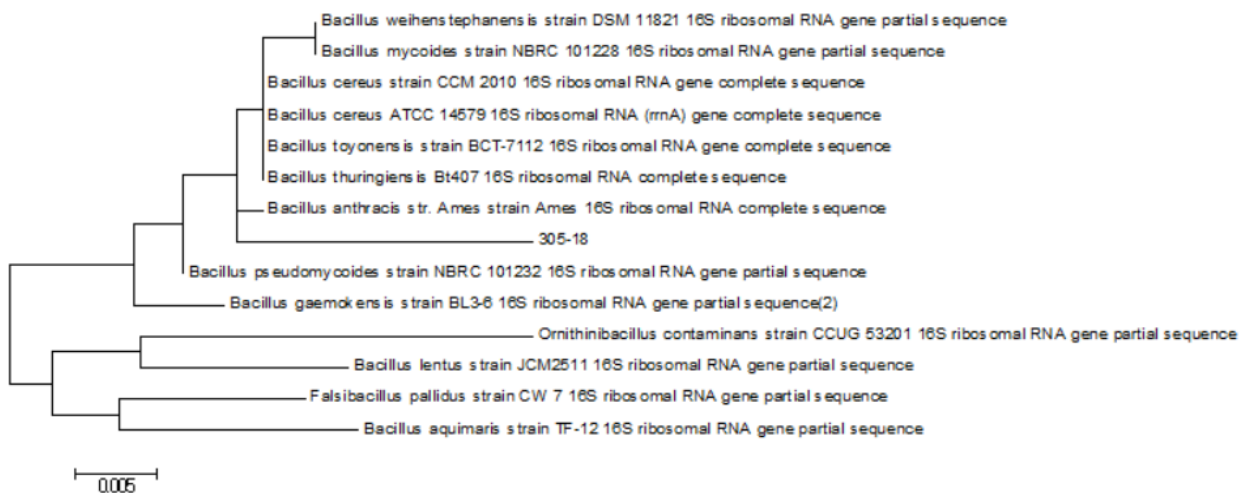
3.1 Greiningaraðferðir

3.1.1 Raðgreiningarniðurstöður

Raðgreiningar afurð á stofni 305-18 með vísinum A751F kom best út.

Raðirnar sem fengust með hinum vísunum voru ekki nógu góðar til að hægt væri að nota þær. Röðin með A751F vísinum er 700 bp og er GC hlutfallið samkvæmt ENDMEMO GC reiknivél, um 54%. BLAST leit sýndi 99% einsleitni með tegunda hóp *Bacillus cereus*. Telst stofn 305-18 því til *Bacillus* tegundar. Í viðauka I má sjá niðurstöður BLAST leitar, flokkunarfræði *Bacillus* auk raðarinnar sem notast var við BLAST leitina.

Á Mynd 1 sést skyldleikatré stofnsins við aðrar *Bacillus* tegundir. Tréið með mestu líkindin (-1298.1262) er sýnt hér. Tréið er teiknað í mælikvarða (e. drawn to a scale), en lengdir greina eru mældar í fjölda útskiptinga á hverjum stað. Á myndinni sést að lengd greinarinnar sem stofn 305-18 er á er mikil miðað við hinar greinarnar. Það þýðir að því lengri sem greinin er því fleiri útskiptingar eru á hverjum stað. Sem sagt *Bacillus cereus* hópurinn og *Bacillus anthracis* str. Ames stofn Ames, eru skyldari hvor öðrum heldur en *Bacillus anthracis* str. Ames stofn Ames er skyldur stofni 305-18, þrátt fyrir það að þessi tveir stofnar standi næst hver öðrum í skyldleikatrénu. Stofn 305-18 og *Bacillus anthracis* str. Ames stofn Ames eru einætta og telst stofninn sem systurhópur *Bacillus cereus*, *Bacillus toyonensis* og *Bacillus thuringiensis*.



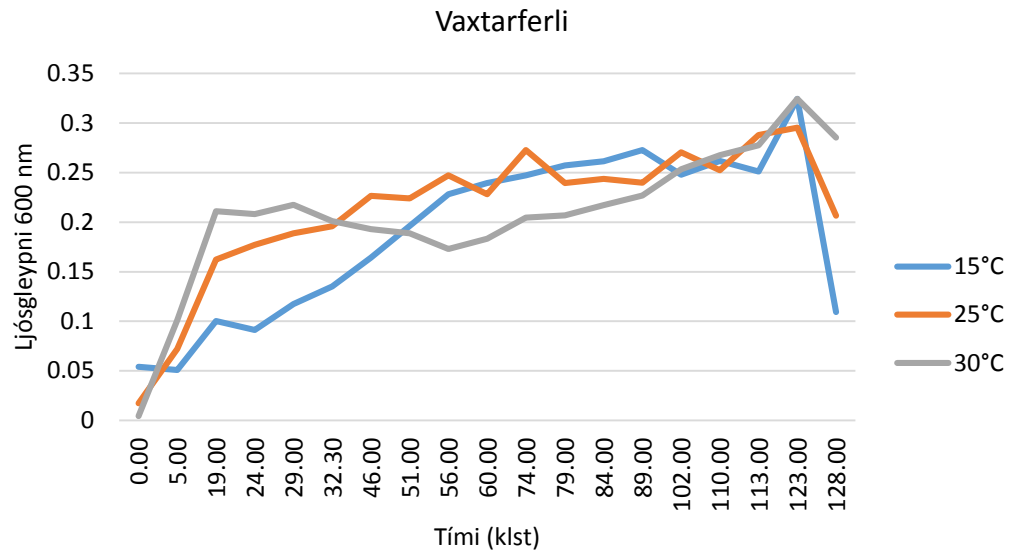
Mynd 1 – Skyldleikatré með Maximum Likelihood aðferðinni. Í greiningu skyldleikatrésins voru innifaldar 14 núkleótíða raðir. Allir staðir innan samröðunarinnar sem innihéldu göt eða óaðgengilegar upplýsingar voru felldar út. Samtals voru 612 staðir í loka gagnasafninu.

3.1.2 Niðurstöður annarra greiningarprófa

Stofninn 305-18 er gram jákvæð, stutt staflaga baktería sem er oxidasa og katalasa jákvæð. Kólónían var gul-hvítleit og sökk niður í ætið og framleiðir stofninn hvít gró.

3.2 Vaxtarhraðapróf

Stofn 305-18 reyndist vaxa við öll 3 hitastigin, sjá Mynd 2. Lagfasi er þó lengri í 15°C heldur en í hinum hitastigunum. Vöxtur í 25°C og 30°C er svipaður.



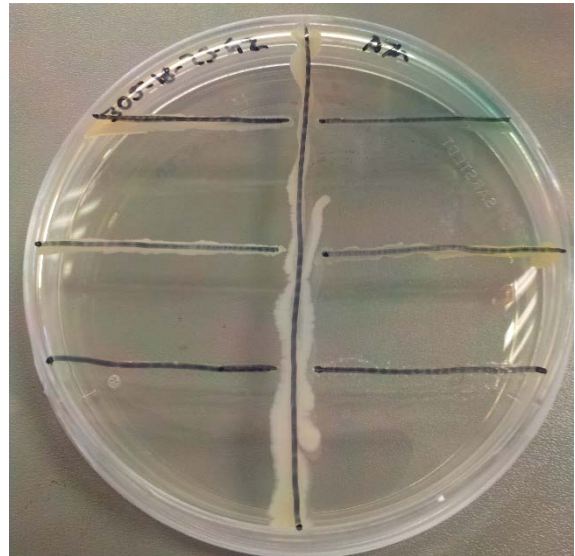
Mynd 2 - Vaxtarferli 305-18. Myndin sýnir ljósgeypni við mismunandi hitastig á nokkurra klst millibili.

Tafla 6 - Sértekur vaxtarhraði og kynslóðartími við þrjú mismunandi hitastig.

Hitastig	Sértækur vaxtarhraði μ (klst ⁻¹)	Hámarks sértækur vaxtarhraði μ max (klst ⁻¹)	Kynslóðartími g (klst)
15°C	$3,52 \cdot 10^{-3}$	$9,59 \cdot 10^{-3}$	10,4
25°C	$6,44 \cdot 10^{-3}$	$8,65 \cdot 10^{-3}$	11,6
30°C	$7,84 \cdot 10^{-3}$	$9,77 \cdot 10^{-3}$	10,2

3.3 Örveruhemjandi prófun

Stofn 305-18 sýndi ekki sjáanlega hamlandi áhrif á vöxt þeirra örvera sem prófað var á. Á Mynd 3 má sjá vöxt sýklanna lóðrétt út frá miðlínunni þar sem stofn 305-18 vex. Það er ekki auðsjáanlegt á myndinni en vöxtur var góður hjá öllum sýklum alveg upp að miðlínunni.



Mynd 3 - Örveruhemjandi prófun með strikunaraðferð. Miðjustrikið er stofn 305-18. Strikin sem eru hornrétt út frá miðjustrikinu eru lesin frá hægri til vinstri og niður: *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *C. albicans*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* og *E. faecalis*. Ekki eru merki um hemjandi áhrif.

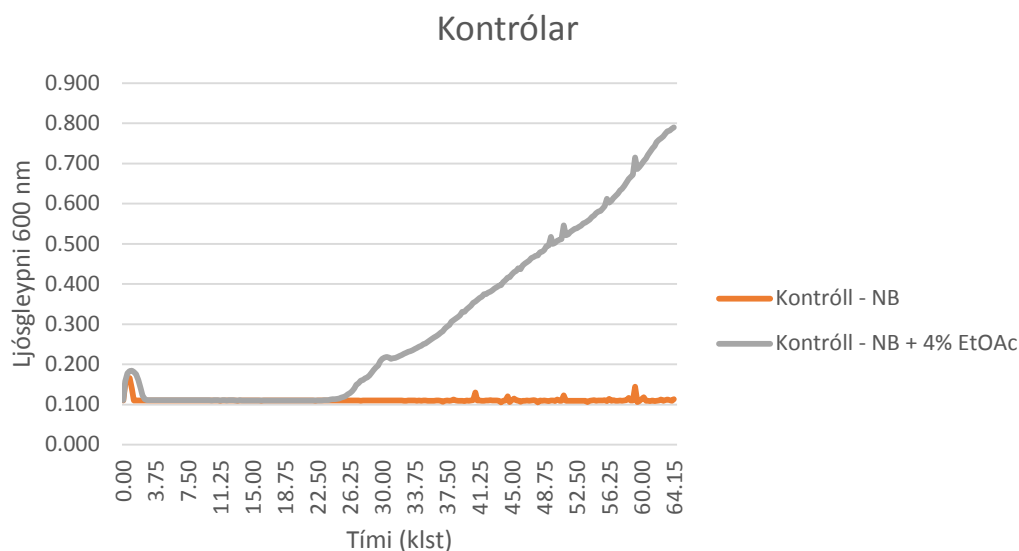
3.4 Vaxtartilraun

Þurrvigt útdráttar var 0,510 g.

Tafla 7 - Styrkur þurrefnis í útdrætti

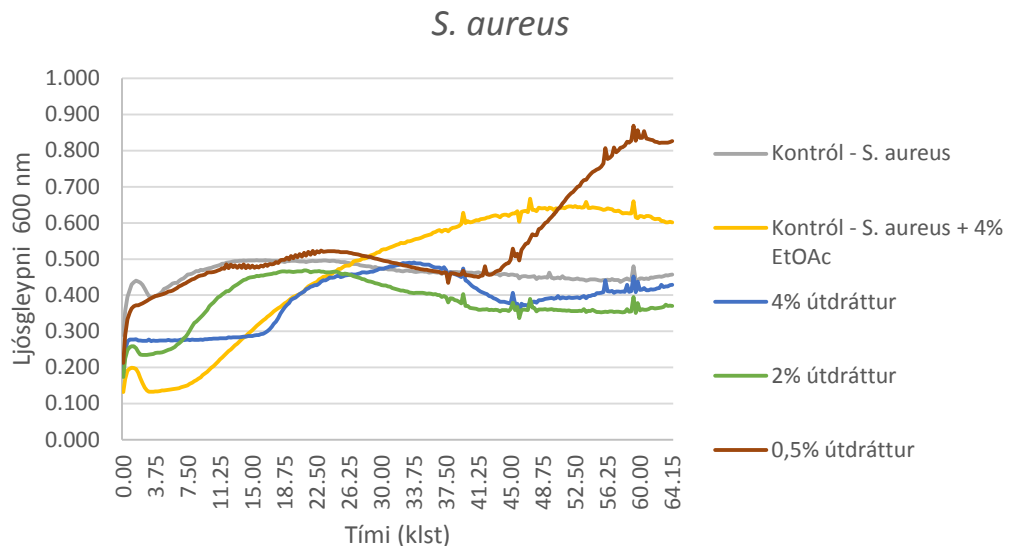
Styrkur útdráttar (%)	Styrkur þurrefnis (g/mL)
4	$3,3 \cdot 10^{-3}$
2	$1,6 \cdot 10^{-3}$
1	$8,2 \cdot 10^{-4}$
0,5	$4,1 \cdot 10^{-4}$
0,25	$2,0 \cdot 10^{-4}$
0,1	$8,2 \cdot 10^{-5}$

Kontrólar sem notast var við í tilrauninni fyrir alla 6 stofnana má sjá á Mynd 4. Ljósgeypni kontróls sem innihélt NB æti og 4% ethyl acetate (EtOAc) var eins og kontróll sem innihélt einungis æti en eftir um 24 klst byrjaði ljósgeypnin að aukast.



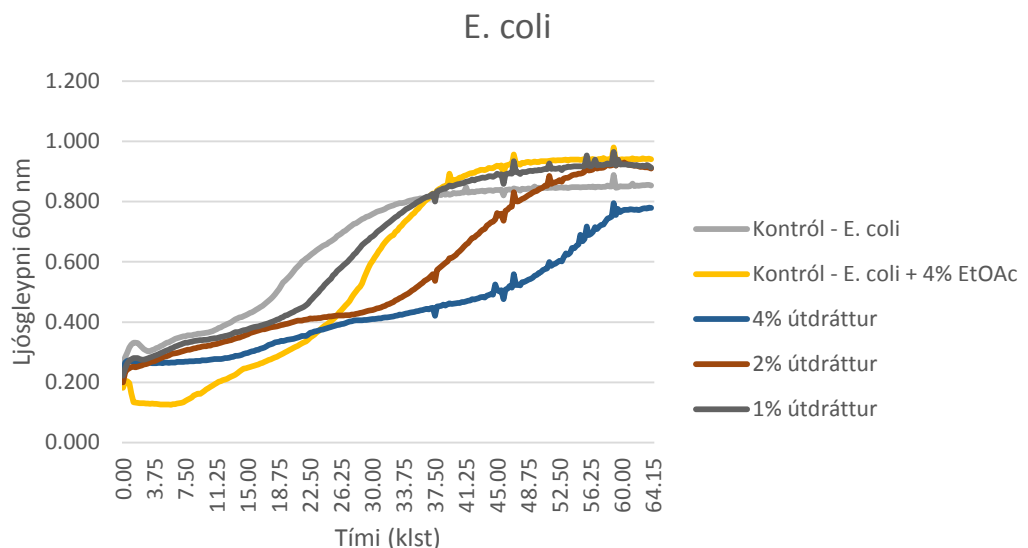
Mynd 4 - Kontrólar, annars vegar bara æti (appelsínugula línan) og hins vegar æti með 4% EtOAc (gráa línan).

Áhrif ethyl acetate útdráttar á vöxt *S. aureus* í Nutrient Broth við herbergishita má sjá á Mynd 5. Lagfasa lauk eftir u.þ.b. 7 klst og í flestum tilvikum var hámarksljósgeypni náð eftir um 35 klst, fyrir utan ræktina sem innihélt 0,5% ethyl acetate útdrátt. Viðvera útdráttar lengdi lagfasa örlítið í öllum tilvikum en þó mest í 4% útdrætti. Skyndileg aukin ljósgeypni mældist hjá 0,5% útdrætti eftir um 44 klst.



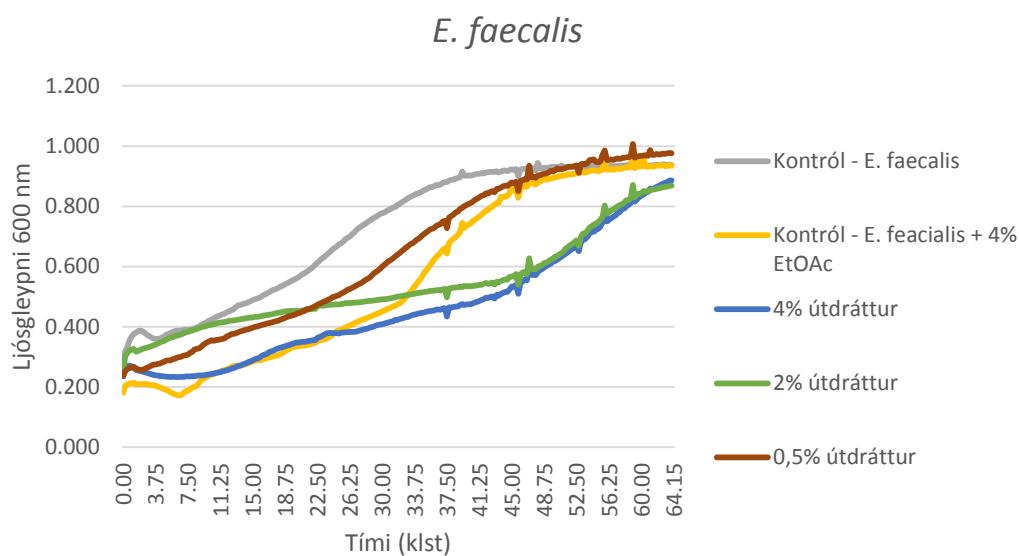
Mynd 5 – Vaxtarkúrfa *S. aureus* við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18. Önnur kontról ræktin (grá) inniheldur einungis *S. aureus* í NB æti, hin inniheldur *S. aureus* í viðurvist 4% EtOAc. Vöxtur í þeim styrkleikum útdráttar sem ekki sést á myndinni, þ.e.a.s. 1%, 0,25% og 0,1%, var svipaður og þeim sem sést á myndinni, nema í 0,5% styrk. Þetta var gert til að einfalda myndina.

Áhrif ethyl acetate útdráttar á vöxt *E. coli* í Nutrient Broth við herbergishita má sjá á Mynd 6. Hámarks ljósgeypni mældist hjá kontról *E. coli* ræktinni eftir um 40 klst. Vöxtur í mismunandi styrkleika var svipaður fyrir utan í 4% styrk útdráttar þar sem lagfasinn var mjög langur og hámarksljósgeypni var mæld eftir um 60 klst. Lagfasinn lengist við hærri styrk útdráttarins.



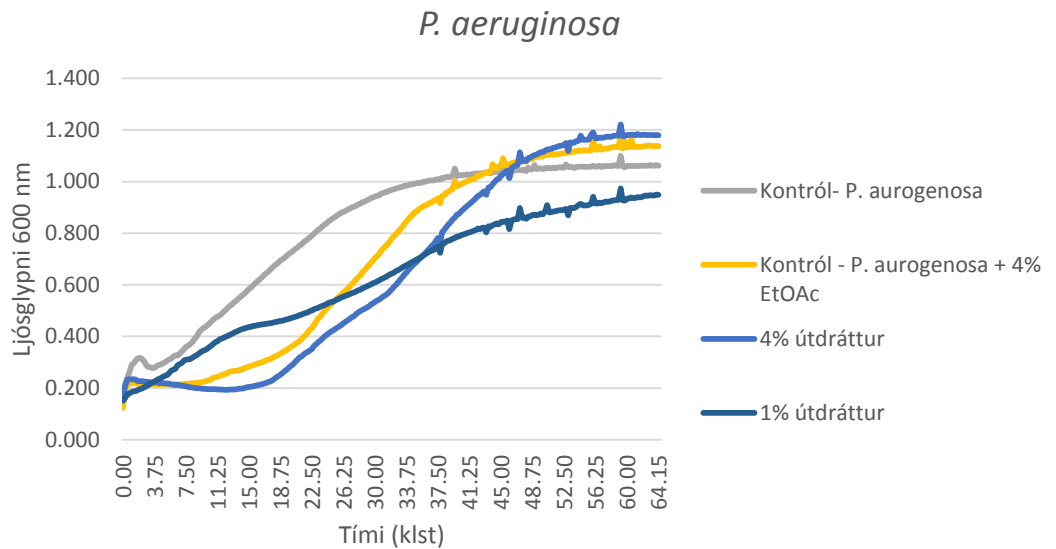
Mynd 6 - Vöxtur *E. coli* við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18. Önnur kontról ræktin inniheldur bara *E. coli* í NB æti (grá), hin inniheldur *E. coli* ásamt 4% EtOAc (gul). Vöxtur í þeim styrkleikum sem ekki sést á myndinn, þ.e.a.s. 0,5%, 0,25% og 0,1%, var svipaður og þeim sem sýnt er á myndinni. Þetta var gert til að einfalda myndina.

Áhrif ethyl acetate útdráttar á vöxt *E. faecalis* í Nutrient Broth við herbergishita má sjá á Mynd 7. Kontról *E. faecalis* ræktin hafði stuttan lagfasa og náði hámarks ljósgleypni eftir um 40 klst. Lagfasi í 4% og 2% útdráttar var langur og lauk eftir um 45 klst, en þá tók vaxtarfasinn við. Vöxtur í 0,5% útdrætti var svipaður og hjá kontról *E. faecalis* í 4% EtOAc, þar var lagfasinn í um 30 klst. Hámarks ljósgleypni í mismunandi styrkleika af útdrætti mældist ekki fyrr en í lok tilraunarinnar eða eftir um 64 klst.



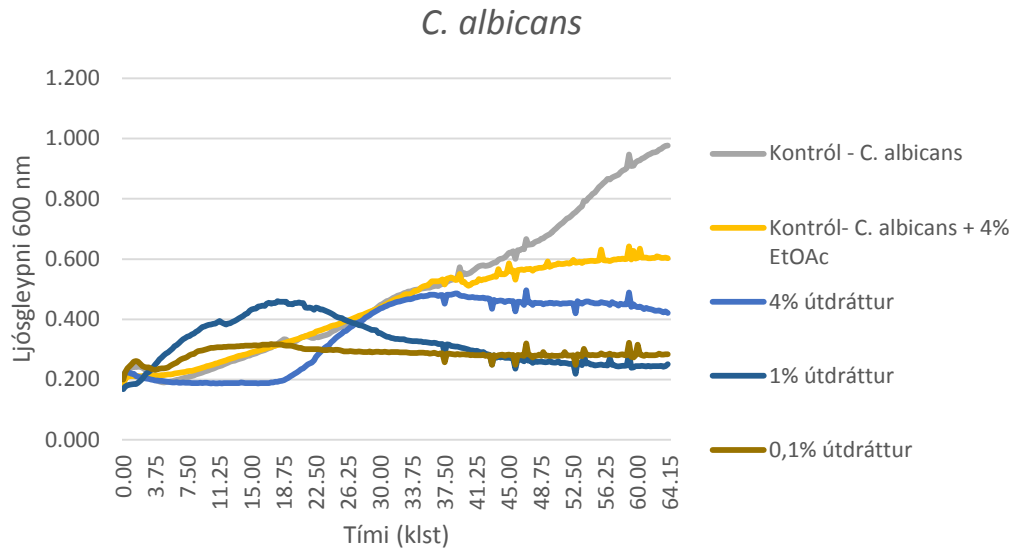
Mynd 7 - Vöxtur *E. faecalis* við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18. Vöxtur *E. faecalis* í þeim styrkleika af útdrætti sem ekki sést á myndinni, þ.e.a.s. 1%, 0,25% og 0,1%, var svipaður kontról *E. faecalis* (grá). Þetta var gert til að einfalda myndina.

Áhrif ethyl acetate útdráttar á vöxt *P. aeruginosa* í Nutrient Broth við herbergishita má sjá á Mynd 8. Hámarks ljósgleypni mældist í kontról rækt eftir um 55 klst. en vaxarfasa lauk eftir um 35 klst. Vaxtarfasa hjá kontról rækt sem innihélt 4% EtOAc var lengri eða lauk eftir um 50 klst. Lagfasi hjá 4% útdrætti var lengri en hjá kontról rækt og náði hámarks ljósgleypni eftir um 55 klst. Í 1% útdrætti var vöxturinn örlítið hægari.



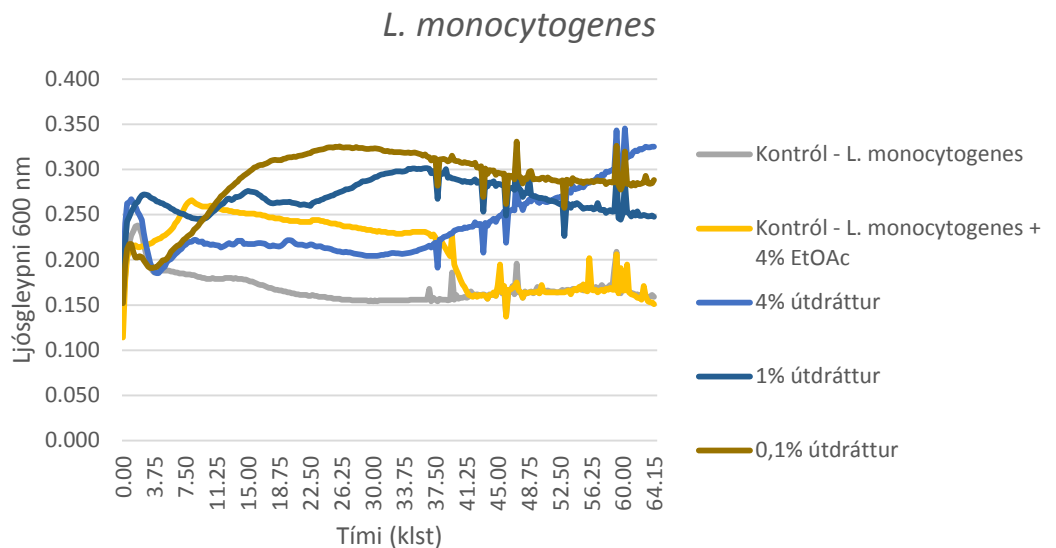
Mynd 8 - Vöxtur *P. aeruginosa* við mismunandi styrk af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18. Vöxtur *P. aeruginosa* í þeim styrkleik af útdrætti sem ekki sést á myndinni, þ.e.a.s. 2%, 0,5%, 0,25% og 0,1%, er svipaður eða eins og kontról - *P. aeruginosa* (grá). Þetta var gert í þeim tilgangi að einfalda myndina.

Áhrif ethyl acetate útdráttar á vöxt *C. albicans* í Nutrient Broth við herbergishita má sjá á Mynd 9. Logfasi kontról ræktar *C. albicans* var frekar langur en vaxtarfasi tók ekki við fyrr en eftir um 45 klst. Hámarks ljósgeypni mældist við lok tilraunar eða eftir um 64 klst. Kontról rækt *C. albicans* sem innihélt 4% EtOAc óx fyrstu 37 klukkutímanna eins og hin kontról ræktin en síðan dró úr vextinum. Lagfasi 4% útdráttar var langur eða um 20 klst, hámarks ljósgeypni mældist eftir um 35 klst. Hámarks ljósgeypni hjá 0,1% útdrætti mældist eftir um 15 klst en hjá 1% útdrætti eftir um 20 klst. Miðað við kontról þá er vöxtur í öllum tilvikum minni.



Mynd 9 - Vöxtur *C. albicans* í mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18. Vöxtur *C. albicans* í þeim styrkleika af útdrætti sem ekki sést á myndinni, þ.e.a.s. 2%, 0,5% og 0,25%, er svipaður 1% (dökk blá) og 0,1% (brún). Þetta var gert til að einfalda myndina. Kontról er *C. albicans* í NB æti (grá) og *C. albicans* í 4% EtOAc (gul).

Áhrif ethyl acetate útdráttar á vöxt *L. monocytogenes* í Nutrient Broth við herbergishita má sjá á Mynd 10. Ekki eru sjáanleg áhrif útdráttar á vöxt *L. monocytogenes*, miðað við kontról rækt *L. monocytogenes*. Í öllum tilvikum er ljósgeypni hærrí í mismunandi styrkleika útdráttar miðað við báðar kontról ræktirnar.



Mynd 10 - Vöxtur *L. monocytogenes* við mismunandi styrkleika af ethyl acetate útdrætti stofnsins 305-18. Vöxtur *L. monocytogenes* í þeim styrkleika af útdrætti sem ekki sést á myndinni, þ.e.a.s. 2%, 0,5% og 0,25%, var svipað og í hinum styrkleikunum sem sjást á myndinni. Þetta var gert til að einfalda myndina.

4. Umræða

4.1 PCR og raðgreining.

4.1.1 Útdráttur erfðaeftnis og mögnun á 16S rRNA

Í upphafi verkefnisins var lagt upp með að reyna að gera kólóníu PCR. Kólóníu PCR krefst ekki útdráttar á erfðaeftni áður en fjölföldunarhvarf er framkvæmt og er það því ákveðinn sparnaður, bæði hvað varðar tíma og efniskostnað. Kólónía, eða hluti kólóníu er þá tekin og sett beint í fjölföldunarhvarfið. Þetta var reynt í fjögur skipti, í hvert skipti var reynt að laga og bæta það sem hægt var, þ.e.a.s. magn efna í hvarfefnablöndum, aðstæður sem fjölföldunarhvarfið fór fram við, magn af kólóníu sem var notuð í fjölföldunarhvarfið, en án árangurs. Þegar ljóst var að kólóníu PCR myndi ekki ganga upp var reynt að framkvæma útdrátt á erfðaeftni með Ultra Clean™ Microbial DNA isolation Kit frá MoBio Laboratories Inc þar sem sýnið var meðal annars hrist með örperlum og hitunarskref notuð til að sundra frumunum. Þessi aðferð var prófuð tvisvar, í seinna skiptið var sundrunar ferli frumnanna lengt til muna. Þegar kannað var hvort útdráttur hefði tekist þá var erfðaeftnið rafdreigið á 0,8% agarósageli og að loknum rafdrætti var gelið skoðað undir útfjólubláu ljósi en ekki komu nein bönd í agarósagel eftir rafdrátt, þá var ljóst að einangrun erfðaeftnis hefði ekki tekist. Þá var ljóst að ekki dygðu nein vettlingatök og reynt var við fenól-klóróform útdráttaraðferð með CTAB, þar sem sterk frumusundrandi efni og hitunarskref voru notuð til að sundra frumunum, en sú aðferð virkaði til að draga út erfðaeftni stofns 305-18.

Því næst tók við að framkvæmd fjölföldunarhvarfs (PCR). Fyrst voru alhliða bakteríuvísarnir 27F og 1492R notaðir. Það reyndist ekki bera árangur þar sem ekki tókst að magna upp erfðaeftni stofnsins. Þá kom upp sú hugmynd að stofn 305-18 gæti verið fornbaktería og því var notast við alhliða fornbakteríuvísana A571F/UA1204R og A751F/UA1406R sem Baker, Smith og Cowan (2003), hönnuðu. Fornbakteríur eru dreifkjörnungar líkt og bakteríur en eru taldar vera eldri en bakteríur. Fornbakteríur finnast oft í umhverfi þar sem aðstæður eru öfgakenndar, til dæmis þar sem mikill hiti er, í mjög súru eða mjög basísku umhverfi eða þar sem magn af salti er mjög mikið (Jón Már Halldórsson,

2004). Með fornbakteríuvísunum tókst að magna upp erfðæfni 305-18 og var það sent út til raðgreiningar.

Möguleg ástæða þess að illa gekk að draga út erfðæfni stofnsins er meðal annars sú að stofninn er gram jákvæður auk þess voru kólóníurnar „slímugar“. Gram jákvæðar bakteríur hafa í frumuvegg sínum peptídóglýkan. Dæmi um það er *B. subtilis* sem inniheldur peptídóglýkan í frumuvegg sínum, en hann er seigfjaðrandi fjölliða sem hagar sér eins og gler fjölliða við lágt rakastig. Við rakastig meira en 60% þá haga fjölliðurnar sér eins og gúmmíkenndar fjölliður (Thwaites, Surana og Jones, 1991). Þetta svið sveigjanleika gerir frumuveggi gram jákvæðra baktería sveigjanlegri og gerir þeim kleift að standast meira álag. Því þarf oft aðrar aðferðir til að einangra erfðæfni gram jákvæðra baktería heldur en gram neikvæðra baktería, en almennt er talið erfiðara að draga út erfðæfni gram jákvæðra baktería.

Eins og komið verður að hér neðar þá reyndist stofn 305-18 vera *Bacillus* tegund. Það kann að vera að stofn 305-18 sé með þykkari og seigari frumuvegg en *B. subtilis* og því hafi gengið erfiðlega að draga út erfðæfnið. Það kæmi ekki á óvart ef almennt gengi illa að draga út erfðæfni *Bacillus* tegunda þar sem tegundin lifir og vex á mjög fjölbreyttu svæði við mjög svo fjölbreyttar aðstæður, og því ekki ólíklegt að frumveggurinn sé harðgerðari en gengur og gerist hjá gram jákvæðum bakteríum.

4.1.2 Raðgreining

Niðurstöður raðgreiningar greindu frá að um *Bacillus* stofn væri að ræða en ekki fornbaktería. GC hlutfall í stofni 305-18 var um 54% en *Bacillus* tegundir hafa GC hlutfall á bilinu 32-69% (Widdel, Boetius og Rabus, 2006).

Á mynd 1 sést skyldleikatré stofnsins við aðrar *Bacillus* tegundir. Stofn 305-18 og *Bacillus anthracis* str. Ames stofn Ames eru einætta og er hann náskyldur *Bacillus cereus*, *Bacillus toyonensis* og *Bacillus thuringiens* en stofninn telst sem systurhópur þeirra.

Fornbakteríuvísarnir (A571F/UA1204R og A751F/UA1406R) voru hannaðir til að samfallast að vel vernduðu svæði í erfðamengi fornbaktería og með það í huga að hámarka fyllingar (e. complementarity) á 3'endanum. Vísarnir voru

einnig hannaðir út frá því að þáttatenging (e. annealing) væri milli 50-60°C. Inósín leyfum var bætt við þar sem þrír mismunandi basar voru á ákveðnum stað. Ekki meira en 25% heildar úrættun (e. degeneracy) og minna en 10% inósín leifar voru leyfðar á hvern vísi. Samkvæmt Baker et al. (2003) þá eru þeir vísar sem innihalda inósín leifar með breiðari sérhæfni, en of mikil notkun þess gæti leitt til mögnunar á þeim hópum sem ekki er markmiðið að magna upp (e. non-target groups).

Við mat á vísunum var prófað að magna upp erfðaeftni úr tveimur Euryarchaeote stofnum, tveimur Crenarchaeote stofnum, *E. coli* og tveimur sýnum þar sem annað var tekið úr setlagi á vatnshitasvæði og hitt á hitauppstreymissvæði, bæði í Nýja Sjálandi. Ekki tókst að magna upp erfðamengi *E. coli* en það virkaði að magna upp erfðaeftni fornbaktería (Baker o.fl., 2003).

Til að sannreyna sértækni fornbakteríuvísana sem notast var við, þá voru þeir keyrðir í gegnum gagnagrunn sem nefnist Ribosomal Database Project (RDP). Könnuð var sértækni þeirra við fornbakteríur annars vegar og bakteríur hins vegar. Þegar leitað var að fornbakteríu samsvörunum komu 35.675 af 140.758 og þegar leitað var að samsvörunum við bakteríur voru 78 samsvaranir af 2.879.170 en þar af var ekki nein samsvörun við Firmicutes en það er fylkingin sem *Bacillus* tilheyrir. Samkvæmt RDP gagnagrunninum er þó mögulegt að magna upp erfðamengi baktería með þessum fornbakteríuvísunum en það er það sem gerðist hér.

Þegar Baker og félagar hönnuðu fornbakteríuvísana þá prófuðu þau þá gagnvart fornbakteríum og gram neikvæðri bakteríu. Í þessu verkefni tókst að magna upp erfðamengi og raðgreina hjá gram jákvæðri bakteríu sem reyndist vera *Bacillus*, með þessum vísunum. Ef til vill hefðu þau einnig átt að prófa vísana sem þeir voru að hanna gagnvart gram jákvæðum bakteríum líka. Það er þó ljós að 16S rRNA gen í *Bacillus* 305-18 inniheldur svæði sem er líkt svæði 16S rRNA gens í fornbakteríum. Það væri áhugavert að raðgreina stofninn aftur og bera 16S rRNA betur saman við fornbakteríuvísana.

Þar sem prófað var að magna upp erfðaeftni stofnsins með bæði altækum vísunum fyrir bakteríur og svo fornbakteríur, með mismunandi PCR prógrömmum, má velta fyrir sér hvort að vísarnir hafi skipt hér máli til að magna upp erfðaeftnið

eða PCR prógrammið. Það kann að vera að PCR prógrammið sem notast var við þegar fornbakteríuvísarnir voru notaðir, hafi skipt sköpum. Í fornbakteríu PCR prógramminu, sem sjá má í töflu 3, er hitastig eðlissviptingar 1°C lægra, þáttatenging fer fram við 55°C í stað 50°C og stendur enda framlenging við 68°C yfir í 20 mínútur í stað 7 mínútna. Einhver þessara atriða kann að hafa skipt máli til að hægt væri að magna upp erfðaeftni stofnsins, eða jafnvel öll þeirra. Einnig er mögulegt að hitastig þáttatengingar með altæku bakteríuvísinum hafi verið örlítið of hátt en samkvæmt Sipos o.fl. (2007) hefur hærra hitastig í þáttatengingu þau áhrif að meiri misþörun á sér stað. Það hefði því ef til vill virkað að magna upp erfðaeftni stofns 305-18 með altæku bakteríuvísunum ef hitastig þáttatengingar hefði verið aðeins lægra.

4.1.3 *Bacillus* í sjó

Ættkvíslin *Bacillus* er svipgerðarlega mjög fjölbreytt og er þekktur gríðarlegur fjöldi tegunda innan þessarar ættkvíslar. Samkvæmt Taxonomy gagnagrunninum á vefsíðu National Center for Biotechnology Information (e.d.), eru um 24.932 tegundir baktería sem flokkast í ættkvíslina *Bacillus*. Ættkvíslin hefur oftast verið kennd við jarðveginn en þó finnast *Bacillus* tegundir í sjó (Farrow, Wallbanks, og Collins, 1994). Meðal *Bacillus* tegunda þá hafa *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B.adius*, *B. pumilus*, *B. lentus* og *B. myccides* verið greind í sjávarumhverfi. Þá eru stofnarnir *B. subtilis* og *B. pumilus* algengastir í sýnum úr sjó, svömpum og mjúukum kóröllum, auk þess hafa stofnar sem tilheyra *B. horti* verið greindir í sjó. Allir þessir stofnar gátu nýtt sér fjölda lífrænna efnasambanda til vaxtar og eru jafnframt salt- og basapólnir, sem kann að endurspegla efnaskiptalega sveigjanleika þeirra (Ivanova o.fl., 1999). Meðal þeirra örvera sem einangraðar hafa verið af sjávarhryggleysingjum þá eru *Bacillus* tegundir algengastar og þá sérstaklega á svömpum (Kennedy o.fl., 2009). Einnig hafa *Bacillus* tegundir verið einangraðar af þörungum í sjó, ásamt öðrum tegundum (Susilowati, Sabdonog og Widowati, 2015). Útbreiðsla gróa með lofti gæti útskýrt viðveru *Bacillus* tegunda í þeim umhverfum sem skoðuð hafa verið (Widdel o.fl., 2006).

Af þeim *Bacillus* tegundum sem eru skyldastar stofni 305-18 samkvæmt skyldleikatrénu (Mynd 1), þá hafa *B. cereus* tegundir, *B. toyonensis* tegundir og *B. thuringiensis* tegundir verið einangraðar úr sjó (Ivanova et al., 1999; Maeda, Mizuki, Nakamura, Hatano, & Ohba, 2000; Okaiyeto, Nwodo, Mabinya, & Okoh, 2015).

4.1.4 Önnur greiningarpróf

Stofn 305-18 litaðist gram jákvæður og voru kólóníurnar gul-hvítar á litin, sökkva niður í æti og myndar stofninn hvít gró, en *Bacillus* stofnar eru gram jákvæðar, staflaga, grómyndandi bakteríur (Widdel o.fl., 2006). Stofninn er einnig oxidasa og katalasa jákvæður, sem á einmitt við aðrar *Bacillus* tegundir (Floriştean, Cretu og Carp-Cărare, 2007; Todorova og Kozhuharova, 2010). Tilgangur oxidasa prófs er að kanna hvort stofn framleiði ensímið cytochrome oxidasa en þá hvarfast N,N-dímeþýl-p-fenýlnedíamíne oxalat og α -nappól við indofenól blátt (www.sigmaaldrich.com, e.d.). Þær bakteríur sem eru oxidasa jákvæðar geta notað súrefni í orkuframleiðslu í gegnum rafeindaflutningskeðju (Li, Park, Deng, og Bai, 2006). Þegar stofn er katalasa jákvæður þá þýðir það að hann inniheldur ensímið katalasi, sem kallast öðru nafni hýdróperoxídasi. Katalasi umbreytir hýdrógen peroxíði í vatn og súrefni, það gegnir því hlutverki að vernda frumurnar fyrir oxunarsundrun (Goodsell, 2004).

4.2 Vaxtarhraðapróf

Stofn 305-18 reyndist vaxa við öll 3 hitastigin (Mynd 2) og álíka vel í þeim öllum. Logfasinn var þó lengri í 15°C heldur en í hinum tveimur hitastigunum, en vöxturinn náði sér á strik í lok tilraunarinnar. Minni munur var á milli 25°C og 30°C. Stofninn var upphaflega einangraður við 23°C en eins og áður hefur komið fram þá var hann einangraður í þörungagróðri á hverastrýtunum í Eyjafirði. *Bacillus* stofnar geta aðlagast mismunandi hitastigum og geta vaxið við 15°C en hámarkshitastigið er á bilinu 31-76°C (Budde, Steil, Scharf, Völker og Bremer, 2006; Warth, 1978).

Sértækur vaxtarhraði (e. specific growth rate) var reiknaður út með því að finna mismun milli tveggja punkta á vaxtarferlinum og deila því með

tímamismuninum þar á milli. Sértekur vaxtarhraði stofnsins var lágur við öll hitastigin en samkvæmt Pakula, Salonen, Uusitalo og Penttilä (2005), þá er lágur vaxtarhraði 0,022-0,033 klst⁻¹ og hár er á bilinu 0,045-0,066 klst⁻¹. Framleiðsla annars stigs umbrotsefna eru stundum tengd við lágan sértækan vaxtarhraða (Shapiro, 1989). Hins vegar var hámarks sértækur vaxtarhraði á bilinu 0,086 - 0,098 klst⁻¹, sem gæti gefið til kynna að á meðan á tilrauninni stóð, þá var stofninn ekki að nýta næringuna í framleiðslu annars stigs umbrotsefna, heldur í að skipta sér. Kynslóðatími var á bilinu 10 til 11,6 klst. Lægstur var hann í 30°C eða um 10,2 klst, sem þýðir að stofn 305-18 skiptir sér örlítið hraðar í 30°C en hinum hitastiginum. Kynslóðartíminn var hæstur í 25°C, eða um 11,6 klst.

4.3 Örveruhemjandi prófun

Stofninn 305-18 er eins og fyrr segir *Bacillus* tegund. *Bacillus* tegundir framleiða fjöldan allan af annars stigs umbrotsefnum sem hafa mismunandi virkni, meðal annars örveruhemjandi- og krabbameinshindrandi virkni (Hamdache, Lamarti, Aleu og Collado, 2011). *Bacillus* tegundir úr hafinu framleiða lípópeptíð, fitusýrur, fjölpeptíð, polyketides, lípóamíð, karótenóíðar o.fl. Slík efni hafa meðal annars örveruhemjandi virkni (Mondol, Shin og Islam, 2013).

Samkvæmt Kunst o.fl. (1997) eru um 4% gena í erfðamengi *B. subtilis* sem þýða fyrir ensím sem eru svipuð þeim sem taka þátt í framleiðslu örveruhemjandi efna í öðrum gram jákvæðum örverum. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b var einangraður úr sjó og er náskyldur *B. subtilis* 168 og *B. subtilis* subsp. *natto* og hefur hann um 59 gen sem tengjast framleiðslu annars stigs umbrotsefna, þar af voru nokkur sem tengjast framleiðslu örveruhemjandi efna (Fan o.fl., 2011). *Bacillus subtilis* er almennt notuð sem viðmiðsbaktería fyrir aðrar gram jákvæðar, gró myndandi bakteríur (Moszer, Jones, Moreira, Fabry og Danchin, 2002). Það er því hægt að yfirfæra upplýsingar um *B. subtilis* yfir á aðrar *Bacillus* tegundir og áætla að u.þ.b. 4% af erfðamengi þeirra eru gen sem þýða fyrir prótein sem hafa örveruhemjandi virkni.

Fyrstu örveruhemjandi próf sem framkvæmd voru á stofninum lofuðu mjög góðu. Þegar prófin voru endurtekin u.þ.b. 8 árum seinna í þessu verkefni reyndist stofninn ekki sýna örveruhemjandi virkni. Þegar byrjað var að vinna með stofninn þá hafði hann verið í fljótandi ISP2 + 2% salt rækt við herbergishita í um 6 mánuði. Það er ekki óþekkt að bakteríur missi örveruhemjandi virkni sína en samkvæmt Muscholl-Silberhorn, Thiel, og Imhoff (2008) þá tapaðist örveruhemjandi virkni í örveru sem þau voru að vinna með eftir endurtekinn flutning yfir í ferskt æti. Auk þess sem geymslu aðferð skiptir mál en það er best að geyma ræktir í frosti í glýceról æti í lengri tíma til að koma í veg fyrir skaða á frumunum eða tap á virkni á meðan á geymslu stendur (Filippova, Surgucheva, Kuznetsov, El'-Registan og Gal'chenko, 2007).

Í byrjun þessa verkefnis var bæði endursáð úr gamalli rækt auk þess sem reynt var að endurvekja stofn 305-18 úr frysti. Í fyrstu virtist sem að það hefði tekist en þegar sýni voru send út til raðgreiningar kom í ljós að um *Staphylococcus* mengun væri að ræða. Hafði mengunin líklegast komist í ræktina strax í byrjun þegar verið var að sá í ræktina úr frysti, þrátt fyrir að gætt hefði verið að vönduðum og dauðhreinsuðum vinnubrögðum.

Umhverfi örvera hefur áhrif á framleiðslu annars stigs umbrotsefna. Hægt er að virkja framleiðslu lífvirkra efna hjá örverum úr sjó með því að rækta þær við mismunandi aðstæður, þ.e.a.s. við mismunandi sýrustig, saltstyrk, næringarefnastyrk og hitastig (Mondol o.fl., 2013).

Annars stigs umbrotsefni myndast vanalega seint í vaxtarfasa bakteríu. Framleiðsla þeirra er oft framkölluð þegar skortur er á næringarefnum en það skapar aðstæður innan frumunnar sem leiða til þess að boð fer af stað sem veldur röð atburða sem leiða af sér efnahvörf. Auk þess skiptir kolefnagjafi máli en stjórnun á myndun annars stigs umbrotsefna veltur á því hvaða kolefnisgjafi bakterían nýtir best (Ruiz o.fl, 2010). Einnig er hægt er að nota fásykrur til að framkalla aukna framleiðslu örveruhemjandi efna en þær hafa aukið framleiðslu á efnum með örveruhemjandi virkni um 16-29% (Murphy o.fl, 2007)

Til að endurvekja örveruhemjandi virkni á stofni 305-18 þyrfti að prófa eitthvað af þessum aðferðum. Það þyrfti að finna út hvaða kolefnagjafi það er

sem hentar stofninum best, hvaða saltstyrkur, hitastig o.fl. er best til að örva framleiðslu örveruhemjandi efna. Einnig mætti prófa að bæta fásykrum út í ætið.

4.4 Vaxartilraun

Í vaxartilrauninni var notast við ethyl acetate (EtOAc) sem lífrænan leysi. Ethyl acetate hefur áður verið notað í rannsóknum þar sem skimað er eftir örveruhemjandi virkni (Anand o.fl., 2006; Zheng, Chen, Han, Lin og Yan, 2005) en í öðrum rannsóknum er notast við önnur efni ásamt ethyl acetate (Lippert, Brinkmeyer, Mülhaupt og Iken, 2003; Valgas, de Souza, Smânia og Smânia Jr, 2007). Tilraunin var framkvæmd við herbergishita en eftir á að hyggja hefði verði betra að framkvæma hana við 35-37°C, hitastig sem hentar sýklunum betur. Auk þess myndi það endurspegla betur raunverulegar aðstæður. Hitastigið hefði vel getað haft áhrif á vöxt sýklanna í þessari tilraun, þ.e.a.s. aðstæður hefðu geta verið of kaldar til að vöxtur gæti komist á almennilegt skrið. Auk þess getur hitastigið hafa haft áhrif á hversu hratt sýklarnir skiptu sér. Það virðist þó ekki hafa verið tilfellið hér þar sem sýklarnir uxu í flestum tilfellum ágætlega.

Niðurstöður vaxartilraunarinnar sýndu litla örveruhemjandi virkni útdráttar úr stofni 305-18. Í nokkrum tilfellum, hjá *E.coli* og *E. faecalis*, var lagfasinn lengri fyrir tilstillan útdráttarins. Það eru því til staðar einhver örveruhemjandi áhrif en það mætti reyna að fá meiri virkni, t.d. með þeim aðferðum sem nefndar hafa verið, þ.e.a.s. næring, hitastig og annað sem gæti stuðlað að aukinni framleiðslu annars stigs umbrotsefna hjá stofni 305-18. Það væri mjög gott að reyna það sérstaklega með tilliti til þess að styrkur þurrefnis í mismunandi styrkleika útdráttar var frekar lágur, og má gera ráð fyrir að styrkur virka efnisins væri enn lægri. Með því að reyna að auka framleiðslu annars stigs umbrotsefna, fengist ef til vill meira magn af virka efninu í útdrættina og þannig mætti mögulega fá meiri örveruhemjandi virkni gegn *E.coli* og *E. faecalis*.

Útdrátturinn virðist þó hafa haft áhrif á vöxt *C. albicans*. Á mynd 8 sést hvernig vöxtur *C. albicans* í mismunandi styrkleika útdráttar stofns 305-18 er í öllum tilvikum minni en vöxtur kontról ræktar sem innihélt einungis *C.*

albicans í NB æti. Vöxtur kontról ræktar sem innihélt *C. albicans* auk 4% EtOAc var fyrstu 38 klst eins og kontról ræktin sem innihélt einungis *C. albicans* í NB æti, en eftir það dró úr vextinum þannig að 4% EtOAc virðist hafa haft áhrif á vöxtinn. Vöxtur í 4% útdrætti fór ekki af stað fyrr en eftir u.þ.b. 18 klst en náði ekki sama vexti og kontról ræktin með 4% EtOAc. Sem þýðir að þó að EtOAc hefur haft áhrif á vöxtinn þá hefur útdrátturinn haft meiri áhrif á vöxtinn. Minnstur vöxtur var í 0,1% útdrætti en það má segja að vöxturinn hafi í raun ekki komist á neitt skrið. Það þarf því ekki mikinn styrk af útdrætti til að hafa hamlandi áhrif á vöxt *C. albicans*. Til að staðfesta hvort um sé að ræða örveruhemjandi virkni gegn *C. albicans* þyrfti að endurtaka tilraunina og framkvæma hana við kjörhitastig sveppsins. Auk þess væri áhugavert að endurtaka tilraunina og reyna að auka framleiðslu annars stigs umbrotsefna hjá stofni 305-18, eins og komið var inn á hér á undan, í þeirri von að meira magn af virka efninu kæmi með í útdrættinum og sjá þá hver áhrifin á vöxtinn væru.

Það virðist ekki rökrétt að minni styrkur af útdrætti hafi meiri hemjandi áhrif á vöxt heldur en meiri styrkur af útdrætti. Ástæða fyrir þessu er mögulega sú að í 0,1% útdrættinum var fyrir tilviljun, óvenjulega mikið magn af virka efninu, miðað við hina útdrættina. Líkurnar á því eru hins vegar ekki miklar þar sem vel var gætt að því að hrista vel í útdráttar lausninni áður en tekið var úr henni og sett í Nutrient Broth. Ef til vill á orðatiltækið „minna er meira“ vel við hér.

Samkvæmt Niisawa o.fl. (2008) þá var *Bacillus* tegund einangruð úr sjó sem framleiddi efnasamband sem kallast iturin A en það er sveppaeyðandi lípópeptíð. Samkvæmt Shankarrao, o.fl. (2014) þá framleiðir *Bacillus subtilis* KFSB5 efnasamband af fjölskyldu isocoumarin efna sem hefur sveppaeyðandi virkni. Besta virkni gegn *C. albicans* fékkst með ethyl acetate útdrætti á *B. subtilis* KFSB5. Aðrar útdráttar aðferðir voru prófaðar en sýndu ekki jafn góðar niðurstöður og útdráttur með ethyl acetate. Það má því velta fyrir sér hvort að ethyl acetate þurfi sérstaklega til að ná út lífvirka efninu sem hefur virkni gegn sveppum, eða hvort að ethyl acetate sjálft hafi áhrif á vöxtinn. Samkvæmt niðurstöðum þessa verkefnis þá hefur 4% ethyl acetate áhrif á vöxt *C. albicans*, hins vegar hefur útdráttur 305-18 meiri áhrif á vöxtinn. Það er því ekki óþekkt að bæði *Bacillus* á landi og úr sjó framleiði sveppaeyðandi efnasambönd.

Á mynd 4 sést ljósgleypni kontrólana sem notaðir voru fyrir alla sýklana. Kontróllinn sem inniheldur einungis Nutrient Broth heldur sér í svipaðri ljósgleypni alla tilraunina. Sérstakt er að kontróllinn sem inniheldur Nutrient Broth auk 4% ethyl acetate, rýkur upp í ljósgleypni eftir um 24 klst. Þar sem ekki er nein baktería í kontrólnum ætti þetta ekki að gerast. Líklegast er að mengun hafi komist í brunnin sem kontróllinn var í á míkrotíterbakkanum. Hvers vegna mengunin kemur upp eftir 24 klst er erfitt að segja til um en gæti verið að mengunin hafi orðið þegar verið var að setja sýnin í brunnana en mengunin hafi bara verið svo lengi að taka við sér í návist 4% ethyl acetate. Þetta gefur tilefni til að vantageysta þessu sýni sem kontról.

5. Lokaorð

Tilgangur þessa verkefnis var að staðfesta örveruhemjandi virkni hjá stofni 305-18 gagnvart 6 mismunandi sýklum. Auk þess átti að skilgreina stofninn betur. Það var leitast við að svara eftirfarandi spurningum:

Af hvaða tegund er stofninn?

Hver eru einkenni stofnsins?

Hefur stofninn 305-18 örveruhemjandi virkni?

Við mögnun og raðgreining á 16S rRNA kom í ljós að stofninn var af *Bacillus* tegund. Það er ekki óþekkt að *Bacillus* finnist í sjó, og er það í raun algengt. Niðurstöður annarra greiningarprófa studdu einnig það að stofninn væri af *Bacillus* tegund en stofninn er gram jákvæð, katalasa- og oxidasa jákvæð, staflaga baktería sem framleiðir gró.

Þegar staðfesta átti örveruhemjandi virkni stofnsins með aðlagðri strikunar aðferð, þá var hún ekki lengur til staðar. Það er ekki óþekkt staðreynd að virkni tapast stundum hjá örverum þegar þær eru ekki að vaxa við ákjósanlegar aðstæður til framleiðslu annars stigs umbrotsefna. Það er hægt að endurvekja örveruhemjandi virkni með ýmsum aðferðum og er það verkefni í aðra rannsókn. Hins vegar kom fram einhver örveruhemjandi virkni í vaxartilraun á sex mismunandi sýklum, þar sem notast var við ethyl acetate útdrátt á stofninum. Sú virkni var alls ekki mikil en einhverja hemjandi virkni mátti merkja gagnvart *E. coli* og *E. faecalis*. Örveruhemjandi virkni var þó mest gagnvart sveppnum *C. albicans*. Það væri áhugavert að endurtaka vaxartilraunina gagnvart sýklunum 6 og þá sérstaklega gagnvart *C. albicans* en virknin gegn honum lofar bestu. Betra færi að hafa hitastig sem hentar sýklunum betur. Áhugavert væri að greina hvaða efni það er sem stofninn 305-18 framleiðir sem hefur örveruhemjandi virkni. Auk þess þyrfti að finna út hvaða umhverfisaðstæður henta stofni 305-18 best til framleiðslu á annars stigs umbrotsefnum sem hafa örveruhemjandi virkni.

Heimildaskrá

- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, *1*, 134. doi:10.3389/fmicb.2010.00134
- Anand, T. P., Bhat, A. W., Shouche, Y. S., Roy, U., Siddharth, J. og Sarma, S. P. (2006). Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, *161*(3), 252–62. doi:10.1016/j.micres.2005.09.002
- Andreou, L. V. (2013). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Methods in Enzymology*, *529*, 143–151. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00011-2
- Baker, G. C., Smith, J. J. og Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(3), 541–555. doi:10.1016/j.mimet.2003.08.009
- Basset, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L. og Villanaeva, A. R. (1980). Tetracycline-Labeled Human Bone from Ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*, *209*, 1532–1534.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. og Prinsep, M. R. (2014). Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep*, *32*(2), 160–258. doi:10.1039/c3np70117d
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. og Prinsep, M. R. (2015). Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep*, *32*, 116–211. doi:10.1039/c4np00144c
- Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Völker, U. og Bremer, E. (2006). Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology (Reading, England)*, *152*(Pt 3), 831–53. doi:10.1099/mic.0.28530-0
- Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *52*, 455–463.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2011*. Stockholm. doi:10.2900/16577
- Fan, L., Bo, S., Chen, H., Ye, W., Kleinschmidt, K., Baumann, H. I. o.fl. (2011). Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii gtP20b, isolated from the Indian ocean. *Journal of Bacteriology*, *193*(5), 1276–7. doi:10.1128/JB.01351-10
- Farrow, J. A., Wallbanks, S. og Collins, M. D. (1994). Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *44*(1), 74–82. doi:10.1099/00207713-44-2-377
- Faulkner, D. J. (2002). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *19*(1), 1–48. doi:10.1039/b009029h
- Fenical, W. (2006). Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. *Oceanography*. doi:10.5670/oceanog.2006.74

- Filippova, S. N., Surgucheva, N. A., Kuznetsov, V. D., El'-Registan, G. I. og Gal'chenko, V. F. (2007). Optimization of Protective Media for Actinomycetes Storage in Liquid Nitrogen. *Microbiology*, 4, 506–509. doi:10.1134/S0026261707040194
- Fleming, A. (1964). *Nobel Lecture*. (E. P. Company, Ed.). Amsterdam: Elsevier Publishing Company. Sótt 20. mars 2015, af http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf
- Floriştean, V., Cretu, C. og Carp-Cărare, M. (2007). Bacteriological Characteristics of Bacillus Cereus Isolates from poultry. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine.*, 64, 1–2. Sótt 20. apríl 2015, af <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/viewFile/2458/2288>
- Fraenkel, G. S. (1959). The Raison d'Être of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science*, 129(3361), 1466–1470. doi:10.1126/science.129.3361.1466
- Goodsell, D. S. (2004). Catalase. *RCSB Protein Data Bank*. doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_9
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J. og Collado, I. G. (2011). Non-peptide Metabolites from the Genus Bacillus. *Journal of Natural Products*, 74(4), 893–899. doi:10.1021/np100853e
- Howard, S. J., Hopwood, S. og Davies, S. C. (2014). Antimicrobial Resistance: A Global Challenge. *Sci. Transl. Med.*, 6(236), 1–2. doi:10.1126/scitranslmed.3009315
- Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y. o.fl. (2015). Statistical Research on the Bioactivity of New Marine Natural Products Discovered during the 28 Years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*, 13(1), 202–221. doi:10.3390/md13010202
- Hucker, G. J. (1920). A new modification and application of. *Journal of Bacteriology*, 6(4), 395–397.
- Hughes, C. C., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R. og Fenical, W. (2008). The Marinopyrroles, Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine Streptomyces sp. *Organic Letters*, 10(4), 629–631. doi:10.1021/ol702952n
- iGEM, P. og Glantz, S. (2013). Colony PCR. Sótt 9. apríl 2015, af http://2013.igem.org/wiki/images/6/66/Colony_PCR.pdf
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V. o.fl. (1999). Characterization of Bacillus strains of marine origin. *International Microbiology*, 2(4), 267–271.
- Jensen, P. R. og Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annual Review of Microbiology*, 48, 559–584. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.003015
- Jensen, P. R. og Fenical, W. (2000). *Drugs from the sea*. (N. Fusetani, ritstjóri). Basel: S. Karger AG.

- Jensen, P. R., Williams, P. G., Oh, D.-C., Zeigler, L. og Fenical, W. (2007). Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1146–52. doi:10.1128/AEM.01891-06
- Jón Már Halldórsson. (2004). Hvað getið þið sagt mér um fornbakteríur? Sótt 23. apríl 2015, af <http://www.visindavefur.is/svar.php?id=4456>
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J. o.fl. (2009). Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Marine Biotechnology*, 11, 384–396. doi:10.1007/s10126-008-9154-1
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V. o.fl. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–56. doi:10.1038/36786
- Li, Y., Park, J.-S., Deng, J.-H. og Bai, Y. (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(5-6), 283–91. doi:10.1007/s10863-006-9052-z
- Lippert, H., Brinkmeyer, R., Mülhaupt, T. og Iken, K. (2003). Antimicrobial activity in sub-Arctic marine invertebrates. *Polar Biology*, 26(9), 591–600. doi:10.1007/s00300-003-0525-9
- Macleod, R. A. (1965). The Question of the Existence of Specific Marine Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 29(1), 9–23.
- Maeda, M., Mizuki, E., Nakamura, Y., Hatano, T. og Ohba, M. (2000). Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Current Microbiology*, 40(6), 418–422. doi:10.1007/s002840010080
- Molinski, T. F., Dalsay, D. S., Lievens, S. L. og Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(1), 69–85. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrd2487
- Mondol, M. A. M., Shin, H. J. og Islam, M. T. (2013). Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine Drugs*, 11(8), 2846–72. doi:10.3390/md11082846
- Moszer, I., Jones, L. M., Moreira, S., Fabry, C. og Danchin, A. (2002). SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 62–65.
- Murphy, T., Parra, R., Radman, R., Roy, I., Harrop, A., Dixon, K. og Keshavarz, T. (2007). Novel application of oligosaccharides as elicitors for the enhancement of bacitracin A production in cultures of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1518–1523. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.10.030
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V. og Imhoff, J. F. (2008). Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 55(1), 94–106. doi:10.1007/s00248-007-9255-9
- National Center for Biotechnology Information. (e.d.). Taxonomy browser (*Bacillus*). Sótt 22. apríl 2015, af <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1386&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

- Newman, D. J. og Cragg, G. M. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335. doi:10.1021/np200906s
- Niisawa, C., Oka, S., Kodama, H., Hirai, M., Kumagai, Y., Mori, K. o.fl. (2008). Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost. *Journal of Genetic and Applied Microbiology*, 54, 149–158.
- Okaiyeto, K., Nwodo, U. U., Mabinya, L. V. og Okoh, A. I. (2015). *Bacillus toyonensis* Strain AEMREG6, a Bacterium Isolated from South African Marine Environment Sediment Samples Produces a Glycoprotein Bioflocculant. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(3), 5239–59. doi:10.3390/molecules20035239
- Pakula, T. M., Salonen, K., Uusitalo, J. og Penttilä, M. (2005). The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*, 151(1), 135–143. doi:10.1099/mic.0.27458-0
- Paul, V. J., Arthur, K. E., Ritson-Williams, R., Ross, C. og Sharp, K. (2007). Chemical Defenses: From Compounds to Communities. *Biol. Bull.*, 213(3), 226–251. Sótt 12. apríl, af <http://www.biolbull.org/content/213/3/226.long>
- Proksch, P., Edrada, R. A. og Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - Current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 125–134. doi:10.1007/s00253-002-1006-8
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M. o.fl. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167. doi:10.3109/10408410903489576
- Shankarrao, K. O., Angadrao, K. T. og Vasudha, D. K. (2014). Partial identification of antimicrobial compound produced by thermotolerant *Bacillus subtilis* KFSB5 isolated from compost soil. *Research Journal of Biotechnology*, 9(2), 23–28.
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M. o.fl. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2), 341–50. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x
- Susilowati, R., Sabdono, A. og Widowati, I. (2015). Isolation and Characterization of Bacteria Associated with Brown Algae *Sargassum* spp. from Panjang Island and their Antibacterial Activities. *Procedia Environmental Sciences*, 23, 240–246. doi:10.1016/j.proenv.2015.01.036
- Tamuar, K., Stecher, G., Petersson, D., Filipski, A. og Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Tamura, K. og Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526.

- Thwaites, J. J., Surana, U. C. og Jones, A. M. (1991). Mechanical properties of *Bacillus subtilis* cell walls: effects of ions and lysozyme. *Journal of Bacteriology*, 173(1), 204–10.
- Todorova, S. og Kozhuharova, L. (2010). Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1207–1216. doi:10.1007/s11274-009-0290-1
- Valgas, C., de Souza, S. M., Smânia, E. F. A. og Smânia Jr, A. (2007). Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369–380.
- Warth, A. D. (1978). Relationship Between the Heat Resistance of Spores and the Optimum and Maximum Growth Temperatures of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology*, 134(3), 699–705.
- Widdel, F., Boetius, A. og Rabus, R. (2006). *The Prokaryotes* (Third.). doi:10.1007/0-387-30742-7
- Williston, E. H., Walrath, P. Z. og Youmans, G. P. (1947). Plate Methods for Testing Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Virulent Human Type Tubercle Bacilli. *Journal of Bacteriology*, 54, 563–568.
- Wong, R. W. K., Hägg, U., Samaranayake, L., Yuen, M. K. Z., Seneviratne, C. J. og Kao, R. (2010). Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 39(6), 599–605. doi:10.1016/j.ijom.2010.02.024
- World Health Organisation. (2014). *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. Geneva. Sótt 7. apríl 2015, af http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
- www.affymetrix.com. (e.d.). ExoSAP-IT For PCR Product Cleanup | Affymetrix. Sótt 10. apríl 2015, af http://www.affymetrix.com/catalog/131310/USB/ExoSAP-IT+For+PCR+Product+Cleanup#1_2
- www.endmemo.com. (e.d.). Endmemo GC calculator. Sótt 13. apríl 2015, af <http://www.endmemo.com/bio/gc.php>
- www.oxforddictionaries.com. (e.d.). Antibiotic - definition of antibiotic in English from the Oxford dictionary. Sótt 17. apríl 2015, af <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/antibiotic>
- www.sigmaaldrich.com. (e.d.). 70439 Oxidase Test. Sótt 13. apríl 2015, af <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Datasheet/70439dat.pdf>
- Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W., & Yan, X. (2005). Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(2), 201–206. doi:10.1007/s11274-004-3318-6

Viðauki I

Röð stofns 305-18-23 raðgreindur með vísinum A751F:

>1743ZAD043.ab1

```
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAG
TTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATT
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTG
GAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA
CTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTCGCACACACCCGGCCCGTAAG
GTTGTCGTCAGCTCGCTGTCGCGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAA
CGGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTATGCCATCATTAAAGTTGGGCA
CTCTAAGGTGACT
```

Tafla 8 - Flokkunarfræði *Bacillus*

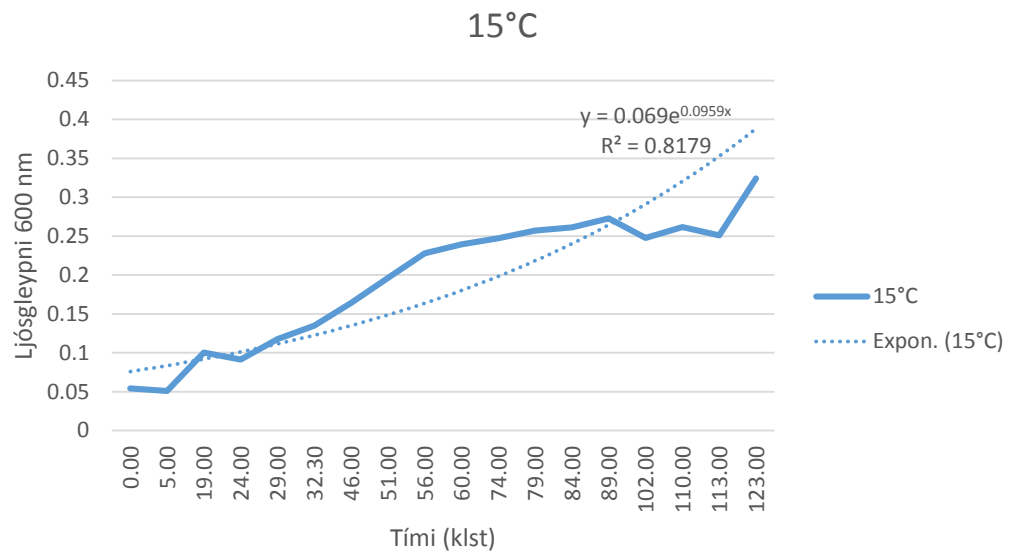
Ríki	Bacteria
Fylking	Firmicutes
Flokkur	Bacilli
Ættbálkur	Bacillales
Ætt	Bacillaceae
Ættkvísl	Bacillus
Tegunda hópur	<i>Bacillus cereus</i> hópur

Tafla 9 - Niðurstöður BLAST leitar

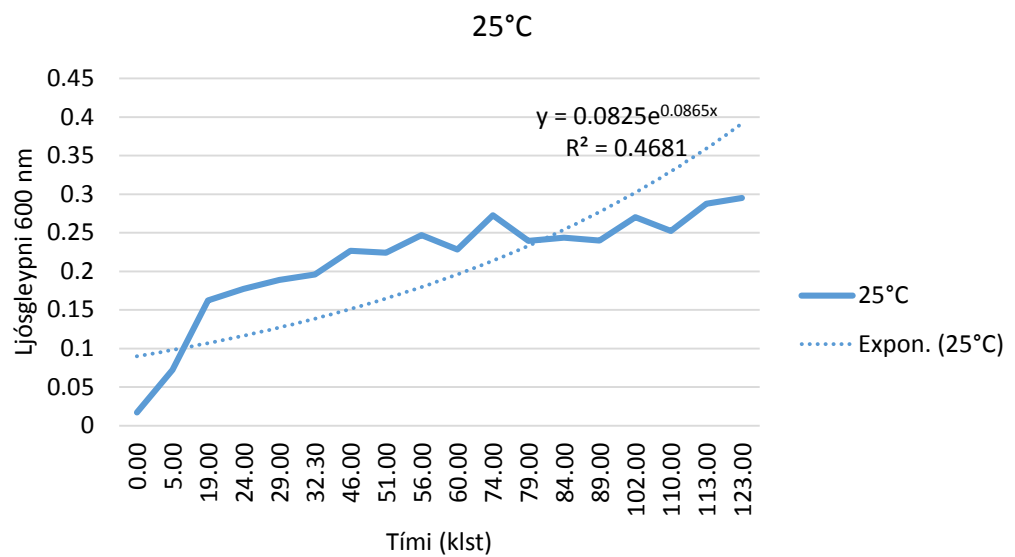
Aðgangsnr.	Stofnaheiti	Hámarks skor	Heildar skor	Þekja	E-gildi	Einsleitni
NR_121761.1	Bacillus toyonensis strain BCT-7112	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_102506.1	Bacillus thuringiensis Bt407	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_074453.1	Bacillus anthraxis str. Ames strain Ames	1104	1235	98%	0,0	99%
NR_074540.1	Bacillus cerus ATCC 14579	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_113266.1	Bacillus cereus strain JCM 2152	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_112780.1	Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_115714.1	Bacillus cereus strain CCM 2010	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_112630.1	Bacillus cereus strain NBRC 15305	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_114582.1	Bacillus cereus strain ATCC 14579	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_114581.1	Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_043403.1	Bacillus thuringiensis strain IAM 12077	1104	1241	98%	0,0	99%
NR_115526.1	Bacillus cereus strain IAM 12605	1104	1241	98%	0,0	99%

NR_113991.1	Bacillus pseudomycoides strain NBRC 101232	1098	1235	98%	0,0	99%
NR_074926.1	Bacillus weihenstephanensis KBAB4 strain KBAB4	1092	1229	98%	0,0	99%
NR_113990.1	Bacillus mycoides strain NBRC 101228	1092	1229	98%	0,0	99%
NR_115993.1	Bacillus mycoides strain ATCC6462	1092	1229	98%	0,0	99%
NR_024697.1	Bacillus weihenstephanensis strain DSM 11821	1092	1229	98%	0,0	99%
NR_036880.1	Bacillus mycoides strain 273	1092	1229	98%	0,0	99%
NR_074914.1	Bacillus cytotoxicus strain NVH391-98	1075	1206	98%	0,0	99%

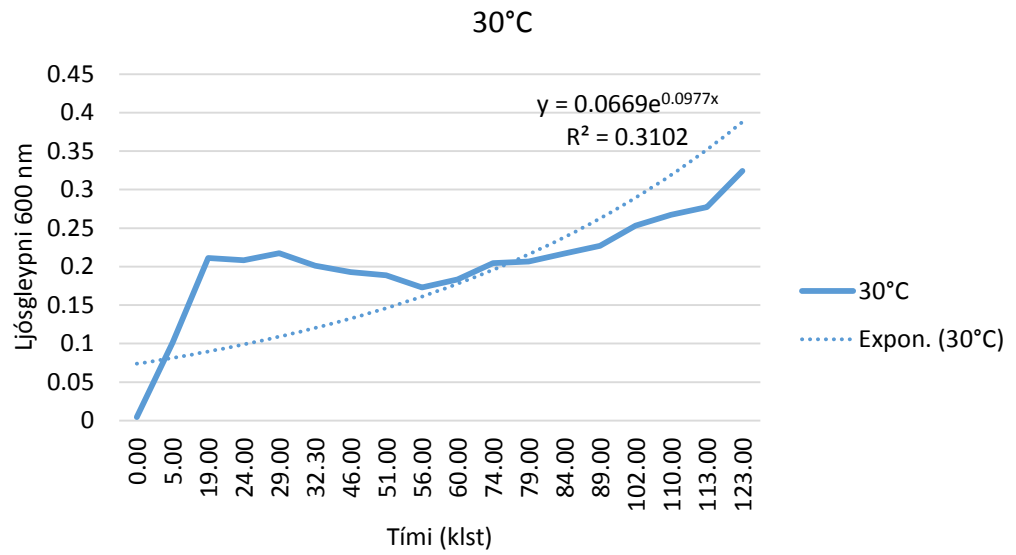
Viðauki II



Mynd 11 - Vaxtarferill stofns 305-18 við 15°C



Mynd 12 - Vaxtarferill stofns 305-18 við 25°C



Mynd 13 - Vaxtarferill stofns 305-18 við 30°C

