

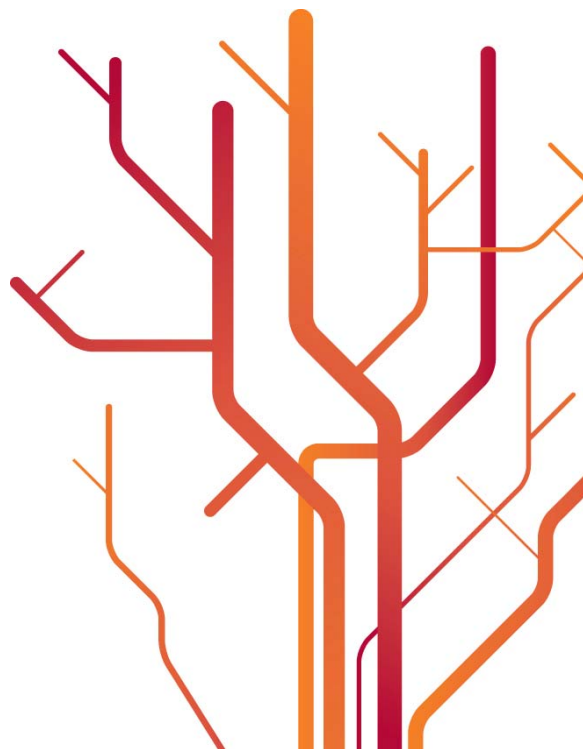
Påvisning av sekundærmetabolitter i marine bakterieisolater



Charlotte Wedø

Mastergradsoppgave i marin bioteknologi (60 stp)

Mai 2011



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt Norges fiskerihøgskole ved fakultetet for Biovitenskap, Fiskeri og Økonomi (BFE), ved Universitetet i Tromsø, perioden våren 2010 til våren 2011.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min veileder Bjarne Landfald for all den gode hjelpen, nyttige råd og eksepsjonelle veiledning gjennom dette året. Jeg vil også takke min andre veileder, Tor Haug, for god hjelp ved arbeidet på laboratoriet og ikke minst den veiledningen på analysedelen av oppgaven.

En stor takk rettes også til alle i bioprospekteringsgruppen for den fine tiden sammen med dere, og spesielt til Tan Nguyen for all hjelpen og gode råd under den fylogenetiske analysen.

Til Ida og Runar, uten dere ville nok ikke studietiden vært den samme. Takk for alle hyggelige stunder på og utenfor skolen, heftige diskusjoner og ski prat!

Tilslutt vil jeg takke min familie og mine venner i Trondheim. Spesielt vil jeg takke mine foreldre for all støtten og oppmuntringen, ikke bare det siste året, men gjennom hele studietiden. Og ikke minst for at dere alltid har hatt tro på meg.

Charlotte Wedø

Tromsø, mai 2011

Sammendrag

Bioaktive forbindelser påvist hos marine invertebrater ses ofte å ha strukturelle likheter med bakterielle sekundærmetabolitter og antas derfor å være produsert av mikrobielle symbionter. Målet med oppgaven var å screene småskala kulturfiltrater fra marine bakterieisolater fra svamper og sjøpungen *Synoicum pulmonaria* for å identifisere mulige produsenter av sekundærmetabolitter ved sammenligning av LC-MS kromatogrammer. Totalekstrakter av ti isolater fra *S. pulmonaria* ble også screenet for forbindelsene synoxazolidinon A-C, tidligere isolert fra denne arten. Ekstrakter av kulturfiltrater og bakteriekulturer ble analysert ved en kombinasjon av væskekromatografi og massespektrometri (LC-MS). Sammenligninger av resulterende spektre ble utført for å identifisere topper som kunne representere sekundærmetabolitter. For påvisning av synoxazolidinon A-C ble det utført søk etter de spesifikke m/z-verdiene for disse forbindelsene.

Ved å benytte en etablert LC-MS metode for screening av kulturfiltrater ble et stort antall m/z-ioner registrert og sammenlignet. Det ble observert store variasjoner i tilstedeværelse av m/z-ioner innen de ulike fylogenetiske gruppene som ble analysert. Av de 81 analyserte bakterieisolatene ble unike m/z-ioner påvist i kromatogrammer fra 11. Det er imidlertid usikkert om disse unike m/z-ionene faktisk representerer reelle sekundærmetabolitter. Ved oppskalering av de 11 bakterieisolatene ble det på grunn av store påvirkninger av endret mediesammensetning ikke mulig å teste reproduserbarheten til metabolittene eller gjøre videre analyse for å fastslå de enkelte metabolittenes identitet.

De spesifikke m/z-verdier for synoxazolidinon A-C ble ikke gjenfunnet ved kromatografianalysen av totalekstrakter. Da flere biologiske og miljømessige faktorer kan påvirke syntesen av sekundærmetabolitter, kunne det ikke trekkes en klar konklusjon om hvem som er den sanne produsenten av disse forbindelsene – sjøpungen selv eller mikroorganismene.

Ved molekylær-fylogenetisk basert identifisering ble ett isolat sett å tilhøre en gruppe γ -Proteobacteria som hittil ikke er etablert som eget takson. Med sikte på registrering som en ny art ville det være av stor interesse med en grundigere karakterisering både genetisk og fenotypisk av dette isolatet.

Innhold

Forord.....	1
Sammendrag.....	2
1 Introduksjon	5
1.1 Bakterielle sekundærmetabolitter.....	5
1.2 Marine bakterier og symbiose	7
1.3 Bakgrunn metoder	9
1.3.1 Fastfaseekstraksjon.....	9
1.3.2 High performance liquid chromatography	9
1.3.3 Massespektrometri	10
1.4 Formål	12
2 Material og metode.....	13
2.1 Kjemikalier og reagenser	13
2.2 Fylogenetisk analyse av isolater med ukjent taksonomi	14
2.2.1 Isolering av DNA	14
2.2.2 PCR amplifisering av 16S-rRNA genet med universelle primere	15
2.2.3 Agarose gelelektroforese.....	16
2.2.4 Rensing av PCR produkt.....	17
2.2.5 Sekvensering av PCR-produkt	17
2.2.6 Sekvensanalyse og fylogenetisk klassifisering	18
2.2.7 Konstruksjon av fylogenetisk tre.....	18
2.3 Preparering av prøvematerialet	20
2.3.1 Prøvemateriale.....	20
2.3.2 Utstrykning på 0,5 MAP plater	21
2.3.3 Oppdyrking i flytende MAP-medium og tillagning av kulturfiltrater.....	21
2.4 Løsemiddelekstraksjon.....	23
2.5 Fastfaseekstraksjon (SPE).....	24

2.6 LC-MS.....	25
3 Resultater.....	27
3.1 Fylogenetisk analyse av isolater med ukjent identitet.....	27
3.2 Totalekstraktanalyse av bakterieisolater fra <i>Synoicum pulmonaria</i>	32
3.3 Etablering av fast metodikk for LC-MS analyse av kulturfiltrater.	32
3.4 Kulturfiltratanalyse.....	36
3.5 Oppskaleringsanalyse.....	43
3.6 Vekstfaseanalyse	46
3.7 Ny analyse av isolat M09B197 ved bruk av Bacto™ pepton.	48
4 Diskusjon.....	50
4.1 Fylogenetisk tilhørighet av isolatene	50
4.2 Screening for synoxazolidinon A-C.....	52
4.3 Etablering av protokoll for LC-MS-analyse av kulturfiltrater	53
4.4 Screening for sekundærmeterolitter i kulturfiltrater	54
4.5 Effekt av endret mediesammensetning	56
4.6 Vekstfaseanalyse	57
4.7 Konklusjon	58
5 Referanser.....	60

1 Introduksjon

Det marine miljø er svært komplekst, og den biologiske diversiteten er funnet å overstige den som er funnet i den terrestriske motparten (Fenical 1993; Donia & Hamann 2003).

Verdenshavene består av både polare, tempererte og tropiske regioner, og i alle områder finnes godt tilpassede marine organismer (Donia & Hamann 2003). Det rike biologiske mangfoldet i havet har vist seg å være en unik kilde til nye kjemiske forbindelser med ulike biologiske aktiviteter. Disse kan produseres som en respons på økologisk press, som for eksempel konkurranse om plass og næring, predasjon og begroing, eller som en respons på variasjoner i en rekke abiotiske faktorer, for eksempel høyt trykk, lave temperaturer og høy salinitet. Disse kjemiske forbindelsene, også kalt sekundærmetabolitter eller "natural products", har i de siste tiår vært av stor interesse for forskere over hele verden. Forskingen har særlig vært rettet mot bunndyr, slik som svamper, tunikater og koraller (Faulkner 2002; Donia & Hamann 2003; Synnes 2007), men i de senere år er det sett en markant økning i studier av marine mikroorganismer som lever i assosiasjon med disse dyrene (Faulkner 2002; Donia & Hamann 2003).

1.1 Bakterielle sekundærmetabolitter

Sekundærmetabolitter er forbindelser som organismen selv produserer, men som ikke er essensielle for vekst og reproduksjon. Disse forbindelsene har ofte komplekse kjemiske strukturer som er svært forskjellige fra de primære metabolittene (Demain 1992). Det kan ikke settes et skarpt skille mellom de primære og sekundære metabolittene. Selv om enzymer involvert i sekundærmetabolismen er forskjellige fra de som er involvert i den primære, produseres sekundærmetabolitter også fra universelle forløpere som også er intermediater i den sentrale metabolismen (Cavalier-Smith 1992; Haslam 1995). Den strukturelle diversiteten hos sekundærmetabolittene er et resultat av hvordan disse intermediatene blir kombinert på uvanlige måter (Haslam 1995).

Mikrobiell produksjon av sekundærmetabolitter er et resultat av mikroorganismers evne til å tilpasse seg og reagere på miljøet de lever i (Knight et al. 2003). Sekundærmetabolittene produseres enten for å forbedre evnen til vekst og reproduksjon eller som kjemiske våpen mot andre organismer (Vinning 1992). De fleste faller i den sistnevnte kategorien, og produseres for å gi et fortrinn i konkurransen om ressurser eller som forsvar mot predasjon.

Polyketider og ikke-ribosomale peptider er de vanligst produserte mikrobielle sekundærmetabolittene. Disse to gruppene, produsert av henholdsvis polyketidsyntase- (PKS)

og ikke-ribosomal peptidsyntase- (NRPS) systemene, er funnet hos alle de bakterielle gruppene som er kjent for å produsere sekundærmetabolitter (Strohl 2004). Mye fokus er blitt rettet mot identifisering av PKS- og NRPS-systemer i marine mikroorganismer (Salomon et al. 2004). Marine mikroorganismer har vist en strukturell diversitet av PKS og NRPS som skiller dem klart fra det som er sett hos den terrestriske motparten. Mange av de produserte forbindelsene har også vist seg å være særdeles bioaktive.

Type I polyketidsyntase og ikke-ribosomal peptidsyntase er begge store, multifunksjonelle enzymkomplekser organisert i individuelle, lineære moduler. Hver modul består av spesifikke domener som katalyserer kondensering av henholdsvis små karboksylsyrer, vanligvis malonyl-CoA, og aminosyrer. De enkelte modulene i et spesifikt kompleks er ansvarlig for inkorporeringen av en enkelt byggestein i det voksende molekylet (Salomon et al. 2004). Aromatiske PKS (Type II) består av flere monofunksjonelle enzymer og danner aromatiske molekyler ved syklisering av den dannede polyketidkjeden.

Utover de spesifikke, katalytiske domenene i PKS- og NRPS-systemene kan også andre domener bidra under biosyntesen av de respektive forbindelsene (Salomon et al. 2004). Etter hver endte kondenseringsreaksjon kan en eller flere av disse domenene modifisere den voksende forbindelsen, for eksempel ved reduksjon av karbonylgrupper under dannelsen av polyketider og *N*-metylering, syklisering og epimerisering av ikke-ribosomale peptider. Ulike kombinasjoner av disse domenene under elongeringsprosessen bidrar til den strukturelle diversiteten. Denne diversiteten er også et resultat av inkorporeringen av alternative molekyler i den voksende forbindelsen eller bruk av uvanlige startmolekyler. Et eksempel på dette er produksjonen av de aromatiske polyketidene enterocin og wailupemycin A-D i *Streptomyces maritimus* (Piel et al. 2000; Salomon et al. 2004). I biosyntesen av disse forbindelsene benyttes benzoyl-CoA som startenheten.

Sekundær metabolisme er ikke en egenskap som er jevnt fordelt mellom de ulike klassene av bakterier. Enkelte er kjent for å være mer produktive enn andre (Vinning 1992). Spesielt aktinobakterier produserer et stort spekter av sekundærmetabolitter (Lam 2006).

Modellorganismen *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Aktinomycetes) er for eksempel funnet å ha hele 18 gen-clustere som kan knyttes opp til karakteristiske enzymer for sekundærmetabolitt-produksjon. Dette er i tillegg til produksjonen av de tre antibiotikaene den allerede var kjent for å produsere (Bentley et al. 2002).

Ved bruk av både kulturavhengige og kulturuavhengige tilnæringer er aktinobakterier også funnet i ulike marine habitater (Zhang et al. 2006; Bull & Stach 2007), og nye marine slekter av aktinobakterier er blitt isolert. En av disse slektene, *Salinospora* sp., produserer en potent anticancerforbindelse, salinosporamid A, og hele 15 sekundærmetabolitt-clustere er blitt identifisert etter sekvensering av det komplette genomet til *S. tropica* (Bull & Stach 2007).

Sekundærmetabolitt-produksjon er også påvist hos andre grupper av marine bakterier. Eksempelvis marine cyanobakterier er kjent for å produsere et stort spekter av sekundærmetabolitter (Tan 2007). Karakteristisk for cyanobakteriene er den store andelen av nitrogenholdige forbindelser. Disse er hovedsakelig et resultat av en kombinert PKS-NRPS biosyntese, hvor det dannes enten lineære eller sykliske polypeptider. *N*-metylering av aminosyrer, samt metylering og halogenering av polyketidkjeden, er vanlige strukturelle trekk i sekundærmetabolitter fra marine cyanobakterier.

Bakterier innen klassene Bacilli og γ -Proteobacteria er også funnet å produsere sekundærmetabolitter, selv om graden av produktivitet ikke kan måle seg med aktinobakterier (Strohl 2004; Bérdy 2005). *Bacillus* sp., og *Pseudomonas* sp., representerer de hyppigste produsentene av sekundærmetabolitter innenfor disse to klassene. De er funnet å produsere både modifiserte peptider og polyketider (Bérdy 2005). Sekundærmetabolitter fra andre Proteobacteria (α og β) er begrenset til noen få β -lactamer, peptider og polyketider (Strohl 2004). Martens *et al.* (2007) identifiserte nylig et PKS/NRPS-hybridkompleks i *Roseobacter* (α -Proteobacteria) isolert fra sjøvann.

1.2 Marine bakterier og symbiose

Marine bakterier har evnen til å inngå komplekse symbiotiske forhold med marine invertebrater (Fenical 1993; Jensen & Fenical 1996). Overflaten og vev hos invertebrater utgjør unike mikrohabitater som selekterer for de bakteriene som best kan tilpasse seg de gitte biologiske, kjemiske og fysiske miljøforholdene der (Jensen & Fenical 1996). Da disse miljøforholdene kan variere både mellom ulike arter av organismer og mellom organismer innenfor samme art, varierer også spekteret av bakterielle tilpasninger. I mange tilfeller involverer slike tilpasninger produksjonen av unike sekundærmetabolitter.

Kultivering av spesialiserte, symbiotiske bakterier er imidlertid vanskelig å få til ved bruk av standard laborieteknikker (Proksch et al. 2006). Diversiteten av symbiotiske bakterier i marine invertebrater er derfor ikke forstått fullt ut. Kultiverings-uavhengige metoder, spesielt bruken av 16S-rDNA biblioteker, har gjort det mulig å få et innblikk i det mikrobefunnet

som lever assosiert med invertebrater (Hentschel et al. 2006). Ved bruk av denne tilnærmingen og fylogenetiske analyser fant Hentschel *et al.* (2002) at en fylogenetisk kompleks, svamp-spesifikk mikrobiota var felles for en rekke analyserte svamper selv om disse ikke bare var fjernt beslektet, men også fra forskjellige geografiske regioner. De svamp-spesifikke 16S-rDNA-sekvensene ble funnet å tilhøre 7 ulike bakterierekker; Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Proteobacteria (α , γ og δ), Cyanobacteria, Nitrospirae og Bacteroidetes (Hentschel et al. 2002; 2006).

Rekombinante teknikker er også benyttet for identifisering av mulige gener som koder for mikrobielle sekundærmetabolitter, spesielt hos bakterier som lever i assosiasjon med invertebrater (Proksch et al. 2002). Bioaktive forbindelser isolert fra marine invertebrater ses ofte å ha strukturelle likheter med bakterielle sekundærmetabolitter (Uria & Piel 2009). Mange av disse bioaktive forbindelsene er funnet å være komplekse polyketider og strukturelt modifiserte ikke-ribosomale peptider. De biosyntetiske enzymkompleksene PKS og NRPS er svært sjeldent ansvarlig for dannelsen av sekundærmetabolitter hos høyere organismer (Uria & Piel 2009), og publiserte gensekvenser for disse to enzymesystemene fra det marine miljø skriver seg kun fra marine bakterier (Salomon et al. 2004). En studie av Kennedy *et al.* (2008) identifiserte 7 antatte PKS-gensekvenser i et metagenombibliotek laget av DNA isolert fra svampen *Haliclona simulans*. De fleste sekvensene viste seg å være nært beslektet med liknende gener påvist i Cyanobacteria og Myxobacteria, og ga en klar indikasjon på at mikrober assosiert med *H. simulans* hadde evnen til biosyntese av polyketider.

1.3 Bakgrunn metoder

1.3.1 Fastfaseekstraksjon

Fastfaseekstraksjon (SPE) er en viktig kromatografisk separasjonsteknikk, hvor separering av prøvematerialet baserer seg på de ulike forbindelsenes forskjeller i affinitet til en stasjonærfase og en mobilfase (Snyder et al. 2010). SPE benyttes hovedsakelig med det formål å rense og konsentrere prøvematerialer før videre analyse.

SPE blir ofte brukt som en forbehandling av prøvemateriale før HPLC (Snyder et al. 2010). Dette kommer av at SPE-prosedyren gjør det mulig å fjerne urenheter som, hvis de ikke fjernes, kan påvirke HPLC analysen negativt ved for eksempel overlapping av analytt-topper, som gjør det vanskelig å skille mellom topper som representerer støy og de som er av interesse i det resulterende HPLC-kromatogrammet. En annen fordel med SPE er at metoden kan benyttes for å fjerne salter i prøvematerialet. Ved bruk av en hydrofob stasjonærfase får en holdt tilbake forbindelser av upolar karakter og kan derfor vaske ut salter og andre høypolare molekyler ved bruk av vann.

1.3.2 High performance liquid chromatography

High performance liquid chromatography (HPLC) er en kromatografisk teknikk hvor enkeltforbindelser i en kompleks blanding separeres ved at en mobilfase (væske) kontinuerlig pumpes gjennom en stasjonærfase lokalisert i en kolonne (Meyer 2010; Snyder et al. 2010). Separerte forbindelser elueres ut av kolonnen og registreres av en detektor. Signaler fra detektoren registreres som topper i et kromatogram som ved analyse gir både kvalitativ og kvantitativ informasjon om forbindelsene i det opprinnelige prøvematerialet.

Kolonnematerialet er mest bestemmende for hvilken måte forbindelser holdes tilbake fra den opprinnelige løsningen. Separering kan for eksempel avgjøres av polaritet (normal- eller reversfase- kromatografi), ladning (ionebytte-kromatografi) eller molekylvekt (size-exclusion kromatografi).

Reversfase HPLC (RP-HPLC) Ved RP-HPLC separeres forbindelser i en prøve ved bruk av en mer eller mindre upolar stasjonærfase. Den mest benyttede stasjonærfasen er kjemisk modifisert silika som bærer en uforgreinet *n*-alkylkjede, som for eksempel C₈ og C₁₈ (Meyer 2010). Retensjonstiden til de enkelte forbindelsene er avhengig av deres evne til interaksjon med enten kolonnen eller mobilfasen. Mobilfasen er vanligvis en blanding av vann (mobilfase A) og et organisk løsemiddel (mobilfase B). Jo mer upolare forbindelsene er, jo sterkere holdes de tilbake i kolonnen. Retensjonstiden øker også med økende antall karbonatomer i

den stasjonære fasen ($C_{18} > C_8$). Samtidig vil polare forbindelser interagere sterkere med mobilfase A komponenten (vann) og av den grunn elueres raskere ut av kolonnen. RP-HPLC separerer på denne måten ulike forbindelser etter minkende grad av polaritet (Meyer 2010; Snyder et al. 2010).

Hydrofil interaksjon-kromatografi (HILIC) Dette er en form for normalfase-kromatografi. Den stasjonære fasen består ofte av bar silika eller modifisert silika som bærer amidgrupper. I motsetning til RP-HPLC er den stasjonære fasen i en HILIC kolonne polar. Dette muliggjør separering av polare forbindelser som ved kjøring av RP-HPLC raskt elueres ut av en silika- C_{18} kolonne (Snyder et al. 2010). Mobilfasen består ofte av det samme som hos RP-HPLC, men ved HILIC er vann ansett som den sterkeste elueringsvæsken (mobilfase B).

Mekanismen bak retensjonen av de polare forbindelsene er trolig at det dannes et vannlag på overflaten av den stasjonære fasen. Vannlaget oppstår ved faseskille mellom det polare vannet og det mer upolare organiske løsemiddelet i den mobile fasen. Polare forbindelser vil holdes tilbake i kolonnen ved sterke hydrofile interaksjoner mellom disse og det polare vannlaget (Grumbach et al. 2004). Det er også foreslått at interaksjoner mellom polare forbindelser på silikaoverflaten og ligandene bundet til silikaoverflaten medvirker til retensjonen (Grumbach et al. 2004; Snyder et al. 2010).

1.3.3 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en teknikk som benyttes for å bestemme molekylvekten til en forbindelse og ut fra isotopmønsteret i det resulterende MS-spekteret kan molekylformelen også bestemmes (Crews et al. 2010). Prinsippet går ut på å produsere ioner fra nøytrale organiske eller uorganiske molekyler. Ionene vil så separeres i henhold til sitt masse-til-ladning-forhold (m/z) og detekteres på bakgrunn av m/z -verdi og relativ mengde (Niessen 2006; Crews et al. 2010). Et massespektrometer består generelt av fire ulike deler; et inntakssystem for å introdusere den aktuelle prøven, en ionekilde som ioniserer prøvematerialet, en masseanalysator og en detektor, alle holdt under kontrollert vakuum.

Et bredt spekter av ioniseringsteknikker er tilgjengelige for MS analyse. Avhengig av grad av fragmentering under ioniseringen kan de ulike teknikkene klassifiseres enten som hard eller myk ionisering (Niessen 2006). I denne oppgaven ble elektrospray-ionisering (ESI) benyttet.

ESI er en myk ioniseringsteknikk som foregår under atmosfærisk trykk. Metoden benyttes i stor grad ved LC-MS for analysering av ikke-flyktige, polare, bioaktive forbindelser med høy

molekylvekt (Colegate & Molyneux 1993; Crews et al. 2010). Forbindelser i løsning passerer gjennom en metallkapillær påsatt en høy spenning i enden. Et spenningspotensial på 3-6 kV mellom enden av metallkapillæren og en motelektrode danner et kraftig elektrisk felt som fører til akkumulering av ladninger på væskeoverflaten til prøvematerialet. Dette vil brytes opp ved hjelp av en ”nebuliser” basert på N_2 gass og danne aerosoler av høyt ladede dråper. Ladningen er enten positiv eller negativ, avhengig av ESI-modus som anvendes (Niessen 2006; Hoffmann & Stroobant 2007). Etterhvert som dråpene forlater metallkapillæren utsettes de for en strøm av oppvarmet N_2 gass for effektiv fordamping av løsemiddelet. Når løsemiddelet fordampes minker størrelsen på dråpene og ionene inne i dråpene vil tvinges sammen til det punkt hvor frastøtningen mellom like ladninger forårsaker at ionene støtes ut fra overflaten (Coulomb-eksplosjon) (Niessen 2006; Crews et al. 2010). Ionene vil deretter trekkes mot motelektroden (negativ ladning på motelektrode tiltrekker positive ioner og omvendt) og ionene føres inn i masseanalysatoren (Crews et al. 2010).

Etter ionisering må de genererte ionene separeres før de kan detekteres. De separeres på grunnlag av sitt m/z-forhold og det faktum at ulike ioner oppfører seg forskjellig i et elektrisk/magnetisk felt (Crews et al. 2010). Flere typer masseanalysatorer er tilgjengelige, for eksempel quadrupole, time-of-flight og magnetisk sektor, hvorav alle benytter seg av enten elektriske eller magnetiske felt (alene eller i kombinasjon). De grunnleggende forskjellene ligger i hvordan feltene brukes for å oppnå separasjon. I denne oppgaven ble det benyttet en quadrupole masseanalysator (Hoffmann & Stroobant 2007)

Quadrupole masseanalysatoren består av fire parallelle, sylindriske staver, arrangert symmetrisk rundt en ”ioneflukt”-bane (Crews et al. 2010). Motsatte staver er ladet med et negativt eller positivt likestrømspotensial, men har en overlagret vekselspenning med radiofrekvens som danner et alternerende elektrisk felt (Niessen 2006). Ioner introduseres inn i det elektriske feltet ved hjelp av et lavt akselerasjonspotensial og vil vibrere i planet vinkelrett på stavlengden på veien gjennom analysatoren. Ved en bestemt kombinasjon mellom likestrøm og radiofrekvens vil ioner med en spesifikk m/z-verdi slippes igjennom det elektriske feltet og overføres til detektoren (Niessen 2006).

Detektorens funksjon er å omdanne de separerte ionene til et elektrisk signal som kan fanges opp og prosesseres i et datasystem (Hoffmann & Stroobant 2007; Crews et al. 2010). Den mest benyttede detektoren i dag er elektronmultiplikatoren. Den består av flere dynoder påsatt en høy spenning motsatt til ladningen av ionene som skal detekteres. Når ionene treffer den

første dynoden, avgis det sekundære elektroner, som ved en kaskadeeffekt amplifiseres og slik produserer en elektrisk strøm som er proporsjonal med mengden av ioner (Hoffmann & Stroobant 2007).

1.4 Formål

Det overordnede formålet med oppgaven var å screene småskala kulturfiltrater fra marine bakterieisolater for å identifisere mulige produsenter av sekundærmetabolitter ved sammenligning av LC-MS kromatogrammer. Bakterieisolatene analysert i denne oppgaven var hovedsakelig isolert fra ulike svamper. Elleve isolater var isolert fra sjøpungen *Synoicum pulmonaria*.

Bruken av kulturfiltrater ble valgt på grunnlag av at mikroorganismer skiller ut et stort antall metabolitter, inkludert mange produkter fra både den primære og den sekundære metabolismen (Kell et al. 2005). Topper som representerte cellekomponenter kunne derfor unngås i stor grad i kromatogrammene. Ved bruk av et standard marint medium og standardiserte vekstbetingelser ble det antatt at topper som representerte produkter fra energimetabolismen, og restprodukter etter mediet ville kunne gjenkjennes og identifiseres under kromatogramanalysen. Ved sammenligning av kromatogrammer mellom de ulike isolatene, rent medium og kulturfiltrater fra kjente laboriestammer, ble det antatt å være mulig å plukke ut topper som sannsynligvis var sekundærmetabolitter. Videre ble det tatt sikte på å opparbeide et større kvantum av de aktuelle isolatene med det formål å teste reproduserbarheten til metabolittene og nærmere identifisering av enkeltmetabolitter. Et delmål for arbeidet var å se om det kunne påvises en sammenheng mellom isolatenes grad av fylogenetisk slektskap og LC-MS-profil. Av den grunn ble det også tatt sikte på å identifisere ukjente isolaters taksonomiske identitet ved partiell 16S-rDNA sekvensanalyse.

Tadesse *et al.* (2001; 2011) isolerte tre nye forbindelser, Synoxazolidinon A-C, fra sjøpungen *Synoicum pulmonaria* hentet inn utenfor kysten av Tromsø. Et annet formål med oppgaven var å undersøke om de samme forbindelsene kunne gjenfinnes i 10 bakterieisolater isolert fra den samme arten. For denne delen av oppgaven ble det tatt sikte på å screene totalekstrakter av bakterieisolatene ved bruk av LC-MS.

2 Material og metode

2.1 Kjemikalier og reagenser

Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland.
Bacto™ Pepton	Difco Laboratories, Inc., Becton, Dickinson & Company, Sparks, MD, USA.
Difco™ Marine Broth 2216	Difco Laboratories, Inc., Becton, Dickinson & Company, Sparks, MD, USA.
MilliQ vann (MQ-dH ₂ O)	Millipore Corp., MA, USA
Natrium klorid (NaCl)	Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland.
Trifluoreddiksyre (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland.
Casein Pepton	Merck, Darmstadt, Tyskland
PowerSoil® DNA isolation kit	MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA.
DNeasy® Blood and Tissue kit	Qiagen Group, Hilden, Germany
10x PCR buffer	Invitrogen™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
Deoksyribonukleotid trifosfat (dNTP)	Invitrogen™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
Magnesium (MgCl ₂)	Invitrogen™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
<i>Taq</i> polymerase	Invitrogen™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
SeaKem® LE Agarose	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA.
1kb+ ladder	Invitrogen™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
QIAquick® PCR purification kit	Qiagen Group, Hilden, Germany
Terminator BIG Dye 3,1	Applied Biosystems™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA.
5x BIG Dye reaksjonsbuffer	Applied Biosystems™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA.

2.2 Fylogenetisk analyse av isolater med ukjent taksonomi

2.2.1 Isolering av DNA

Da flere av isolatene undersøkt i denne oppgaven hadde ukjent taksonomi, ble det utført en molekylær-fylogenetisk basert identifisering. DNA ble isolert fra fryselaagrede bakteriepellets, som var tatt vare på etter tillagningen av kulturfiltrater (se punkt 2.3.3). Isoleringen ble utført ved bruk av PowerSoil[®] DNA isolation kit (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, US).

Da DNA fra fire isolater ikke lot seg isolere i tilstrekkelig konsentrasjon ved bruk av PowerSoil[®] kittet, ble DNA fra tre av disse isolert fra ferske overnattekulturer ved bruk av DNeasy[®] Blood and Tissue kit (Qiagen Group, Hilden, Tyskland). Dette kittet ble valgt ut fra gode resultater ved BFE/NFH med isolering av DNA fra melkesyrebakterier i syrna melkeprodukter (Einar Ringø, personlig meddelelse) og marine alger i renkulturer (Bjarne Landfald, personlig meddelelse).

Ved bruk av PowerSoil[®] DNA isolation kit oppnås komplett cellelysis ved en kombinasjon av kjemiske agens, dvs. SDS (natrium dodesylsulfat) og andre detergenter, og mekanisk rysting i nærvær av PowerBeads, bestående av små glasskorn. En buffer beskytter nukleinsyrer mot degradering under homogenisering og lysis. For å få mest mulig DNA-utbytte og kvalitet, renses DNA ved bruk av en patentert Inhibitor Removal Technology[®], der to løsninger bidrar til å bunnfelle ikke-DNA organisk og uorganisk materiale, inkludert cellerester og proteiner (MoBioLaboratories 2010). Ved bruk av DNeasy[®] Blood and Tissue kit blir celler lysert ved tilsetning av en enzymatisk lysisbuffer (20 mM Tris-Cl, 2 mM natrium-EDTA, 1,2% Triton[®]X-100) tilsatt 20 mg/ml lysozym og proteinase K (Qiagen 2006).

Renseprosedyren i både PowerSoil[®] og DNeasy[®] utnytter at silikamembraner selektivt binder DNA i en løsning med høy saltkonsentrasjon og eluerer DNA i en løsning med lav saltkonsentrasjon. Ved tilsetning av løsninger med høy saltkonsentrasjon bindes DNA til silikamembranen i medfølgende spinnkolonner, mens resterende kontaminanter vil passere gjennom membranen. Vask av membranen utføres ved bruk av etanolbaserte vaskeløsninger for å rense bundet DNA ytterligere, samt fjerne resterende salt og kontaminanter før eluering. Ved tilsetning av en steril elueringsløsning som ikke inneholder salt frigjøres DNA selektivt fra membranen (Qiagen 2006; MoBioLaboratories 2010).

Isolering av DNA ved bruk av begge kit ble utført fullstendig i henhold til produsentenes protokoller. Konsentrasjon og kvalitet av isolert DNA ble bestemt ved å benytte et NanoDrop spektrofotometer ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA).

2.2.2 PCR amplifisering av 16S-rRNA genet med universelle primere

Polymerase kjedereaksjon (PCR) ble utført med bruk av universelle primere for å amplifisere det partielle 16S-rRNA genet fra de enkelte prøvenes DNA. Primerne var 27F (Forward) [5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'] og 1492R (Reverse) [5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'] som gir amplifisering av nær 90% av genet (Suzuki & Giovannoni 1996).

PCR-templater ble laget ved fortyning av de enkelte prøvenes DNA til en konsentrasjon på 10 ng/μl, basert på NanoDrop målinger.

Tabell 1: Sammensetning av reagenser i de enkelte PCR-rør

Reagenser	Volum (μl pr. rør)
10x PCR buffer (÷MgCl ₂)	2,5
dNTP (2,5mM)	2,0
MgCl ₂ (50mM)	0,75
Forward primer 27F (10 pmol)	0,8
Revers primer 1492R (10 pmol)	0,8
MQ-dH ₂ O	16,85
<i>Taq</i> polymerase	0,3
Templat (10 ng/μl)	1,0
Totalt	25,0

Til 0,2 ml PCR rør ble det tilsatt 24 μl mastermiks (se tabell 1) og 1 μl PCR-templat (10 ng/μl). En prøve bestående av 1 μl fortyntet (1:100) *E. coli* suspensjon ble benyttet som positiv kontroll og en prøve med 1 μl MQ ble benyttet som negativ kontroll.

PCR ble kjørt med en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) etter følgende program;

- 94 °C i 7 min
- 30 sykluser à;
 - 94 °C i 30 sek
 - 55 °C i 30 sek
 - 72 °C i 1 minutt
- 72 °C i 7 min
- 4 °C ∞

2.2.3 Agarose gelelektroforese

For å bekrefte amplifisering av 16S-rRNA genet ved PCR-reaksjonen ble prøvene kjørt på en 1% agarosegel.

Tabell 2: Sammensetning av 1% agarosegel benyttet ved gelelektroforese

Ingredienser	Mengde til 150 ml gel
SeaKem® LE Agarose	1,5 g
1x TAE buffer	150 ml
Etidiumbromid (EtBr)	5 µl

Agarose ble løst i 1x TAE buffer ved bruk av de respektive mengder oppført i tabell 2.

Blandingen ble kokt opp for å få løst opp all agarosen, og ble deretter avkjølt til ca. 50 °C. Til blandingen ble det tilsatt 5 µl etidiumbromid og blandingen ble helt opp i et elektroforesekarmer. Formen ble satt til avkjøling i ca. 20 min for at det skulle bli dannet en fast gel. Kammeret ble så plassert i et elektroforesekar hvor 1x TAE buffer ble tilsatt til katode- og anode- siden og MQ ble tilsatt over gelen.

Til hver brønn ble det tilsatt 8 µl prøve, hvorav 5 µl PCR produkt og 3 µl gel loadingbuffer. I tillegg ble det i 2 brønner tilsatt en 1kb+ ladder for å kunne estimere om størrelsen på PCR-produktene var som forventet (ca 1450-1500 bp).

Elektroforesen ble kjørt ved 250V og 400mA i 20min. DNA-bånd i gelen ble synliggjort i UV-lys (Gene Genius Bioimaging System) med GeneSnap v7.07 (SynGene, Synoptics Group, Cambridge, UK).

2.2.4 Rensing av PCR produkt

PCR produktene påvist ved gelelektroforese ble renset fra PCR miksen ved bruk av QIAquick[®] PCR purification kit (Qiagen Group, Hilden, Tyskland) i henhold til produsentens protokoll (Qiagen 2008). NanoDrop ble benyttet for å måle konsentrasjonen av renset 16S-rDNA.

Som for de to andre kittene benyttet ved isolering og rensing av DNA, er også dette basert på silikamembranteknologi. Til PCR produktene blir det tilsatt en bindingsbuffer (PB) tilsatt en pH indikator (I) som sikrer at pH i prøven er optimal for DNA-binding til silikamembranen ($\text{pH} \leq 7,5$). Vaskebuffer med etanol fjerner rester av salter og pH indikator, primere, nukleotider og andre kontaminanter. Effektiv eluering av renset DNA oppnås ved tilsetning av en basisk elueringsbuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,4).

2.2.5 Sekvensering av PCR-produkt

De rensede PCR-produktene av 16S-rRNA-genet ble sekvensert fra 1492R-primeren ved Terminator BIG Dye teknologi. Mengde prøve og MQ tilsatt til sekvenseringsmiksen (tabell 3) ble bestemt ut fra målt konsentrasjon av renset PCR-produkt etter steg 2.2.4, for å oppnå et totalt volum sekvenseringsmiks på 10 μl og en 16S-rDNA-konsentrasjon på 5-10 ng/ μl .

Tabell 3: Sammensetning av sekvenseringsmiks for et sekvenseringsoppsett

Reagenser	# μl pr. rør
Terminator BIG Dye 3,1	0,5
5x BIG Dye reaksjonsbuffer	1,25
Revers primer 1492R (10 pmol)	0,8
Templat	x
MQ	$10 \div 2,55 \div x$
Totalt	10

Sekvenseringsreaksjonen ble kjørt etter følgende program;

- 94 °C i 5 min
- 40 sykluser à;
 - 94 °C i 10 sek
 - 50 °C i 10 sek
 - 60 °C i 4 min
- 72 °C i 5 min
- 4 °C ∞

Etter endt reaksjon ble produktene sendt til sekvenseringslaboratoriet ved Det helsevitenskapelige fakultet for sekvensbestemmelse ved kapillær-elektroforese (ABI 3130x1 Genetic Analyzer, Applied Biosystems™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA).

2.2.6 Sekvensanalyse og fylogenetisk klassifisering

Sekvenser ble lastet opp og analysert i programmet BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), hvor uspesifiserte nukleotider ved 5'- og 3'-endene og dårlige signaler ble kuttet vekk. For de fleste isolatene ble det oppnådd sekvenser på ca. 800 bp av god kvalitet.

Sekvensene ble sammenlignet med publiserte sekvenser ved bruk av søkemotoren Classifier i Ribosomal Database Project (RDP) databasen (<http://rdp.cme.msu.edu>). Ved bruk av denne funksjonen blir sekvensen klassifisert i et taksonomisk hierarki rangert fra høyest til lavest takson. En annen RDP-basert søkemotor, SeqMatch, ble også benyttet ved klassifisering av et av isolatene (M09B261). Denne lister opp de nærmest beslektede 16S-rRNA-sekvensene til den opplastede sekvensen. BLAST søk i GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) ble også utført. Her identifiseres og rangeres sekvenslikheter mellom opplastede sekvenser og elektronisk publiserte sekvenser i GenBank-databasen (Griffiths et al. 2008).

2.2.7 Konstruksjon av fylogenetisk tre

Da isolat M09B261 kun ble identifisert til klassenivå som en ikke-klassifisert γ -proteobacteria ble et fylogenetisk tre konstruert for å se hvor den plasserte seg i forhold til noen av de andre isolatene studert i denne oppgaven (tabell 4) og andre publiserte sekvenser fra karakteriserte stammer og typestammer (tabell 5).

Tabell 4: Isolater klassifisert i denne oppgaven som ble benyttet ved konstruering av fylogenetisk tre

MarBank ID	Taksonomi
M09B261	Ikke-klassifisert γ -proteobacteria
M09B263	<i>Aliivibrio</i> sp.
M09B191	<i>Colwellia</i> sp.
M09B256	<i>Moritella</i> sp.
M09B262	<i>Psychrobacter</i> sp.
M09B194	<i>Shewanella</i> sp.
M09B190	<i>Thalassomonas</i> sp.

Totalt ble 22 sekvenser, derav 7 fra denne studien, inkludert i fylogeni-analysen. Ved bruk av SeqMatch i RDP databasen og BLAST søk i GenBank ble sekvenser som skriver seg fra typestammer (T) for de aktuelle artene og sekvenser som skrev seg fra andre γ -proteobacteria, samt α -proteobacteria, lastet opp i BioEdit. For isolat M09B261 ble de to sekvensene som viste størst sekvenslikhet (merket *) også medregnet i analysen.

Tabell 5: Sekvenser lastet opp i BioEdit fra RDP databasen og GenBank. Sekvenser merket (T) skriver seg fra typestammen for den aktuelle arten

GenBank identitet	Taksonomi	GenBank identitet	Taksonomi
HQ686140	Bacterium SCSWE24*	AB038033	<i>Moritella marina</i> (T)
AB545809	γ -proteobacteria PZ-5*	AY563031	<i>Pseudoalteromonas marina</i>
AM117932	<i>Spongibacter marinus</i> (T)	HM103351	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AY576729	<i>Melitea salexigens</i> (T)	AY722804	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (T)
AJ437616	<i>Aliivibrio logei</i> (T)	FJ882056	Rhodobacteraceae bacterium
X80725	<i>Escherichia coli</i>	AB081758	<i>Shewanella marinintestina</i> (T)
AB094412	<i>Colwellia piezophila</i> (T)	AB094412	<i>Thalassomonas haliotis</i> (T)
EU939711	<i>Loktanella vestfoldensis</i>		

Etter opplastning i programmet BioEdit ble sekvensene alignet ved bruk av multiple sequence alignment funksjonen ClustalW. Alignmenten ble deretter brukt som grunnlag for å konstruere det fylogenetiske treet ved hjelp av Neighbor Joining funksjonen i programmet MEGA (<http://www.megasoftware.net>).

2.3 Preparering av prøvematerialet

2.3.1 Prøvemateriale

De fleste undersøkte bakterieisolatene skrev seg fra 10 svampprøver som ble samlet inn i perioden 14-26. mai 2009 under MabCent-SFIs tokt med FF ”Jan Mayen”. Fire av disse svampene er til nå ikke endelig identifisert ved MarBank (Tabell 6). Svampprøvene skriver seg fra sjøområdet rundt Bjørnøya, eggakanten vest for Bjørnøya og det nordlige Barentshavet. De ble overflatesterilisert med etanol og innvendig vev skåret ut aseptisk og homogenisert i steril, fosfatbufret 2% NaCl. Fortynningsserier av homogenatene ble plattet ut på 0,5 MAP (se punkt 2.3.2) og representative kolonier ble plukket for rendyrking etter inkubering ved 4 °C. Elleve isolater er fra sjøpungen *Synoicum pulmonaria*, 10 stk skriver seg fra det samme toktet, mens ett isolat (JM07-15) skriver seg fra et tilsvarende tokt i mai 2007. Prosedyren for opparbeiding av materialet og dyrking av bakterier var som for svampene (Bjarne Landfald, personlig meddelelse).

Tabell 6: De ulike isolatene analysert i denne oppgaven og taksonomien til kilden de er isolert fra

Kilde	MarBank Isolat-ID	Isolater i MarBank-samlingen	Antall isolater oppdyrket
<i>Synoicum pulmonaria</i> (Sjøpung)	M09B 194-203 + JM07-15	11	10
Kalksvamp (uidentifisert)	M09B113-122	10	10
<i>Halichondria</i> sp. (Svamp)	M09B131-138	10	7*
<i>Halichondria bowerbanki</i> (svamp)	M09B185-193	9	8*
Svamp (uidentifisert)	M09B204-213	10	9*
Svamp (uidentifisert)	M09B254-263	10	10
<i>Phakellia</i> sp. (Svamp)	M09B264-267	4	1*
Svamp (uidentifisert)	M09B268-277	10	6*
<i>Polymastia</i> sp. (Svamp)	M09B278-287	10	9*
<i>Radiella grimoldi</i> (Svamp)	M09B315-316	2	1*
<i>Thenea muricata</i> (Svamp)	M09B327-336	10	10
Totalt antall		96	81

*De resterende isolatene lot seg ikke dyrke opp etter utplating.

2.3.2 Utstrykning på 0,5 MAP plater

Bakteriestammene var lagret ved -80 °C i 15% glyserol, og som første steg ble de strøket ut på 0,5 MAP agarplater (tabell 7) delt in i seks sektorer, en bakteriestamme pr. sektor. Platene ble inkubert ved 6 °C i 72 timer. Etter endt inkubering ble vekst på platene registrert.

Tabell 7: Sammensetning av reagenser i 0,5 MAP agarplater

Ingrediens	Mengde
Difco™ Marine Broth	15 g/l
Bacto-peptone	5 g/l
Agar	15 g/l
Sjøvann	0,3 l
Destillert vann	0,7 l

2.3.3 Oppdyrking i flytende MAP-medium og tillagning av kulturfiltrater

De respektive mengdene Difco™ Marine Broth 2216, Bacto™ Pepton og NaCl (se tabell 8) ble overført til en 2000 ml Erlenmeyer-kolbe. Reagensene ble så tilsatt 1 liter MilliQ-renset vann og satt på omrøring i 30 min.

Tabell 8: Sammensetning av reagenser i flytende MAP-medium

Ingredienser	Gram pr. liter MQ
Difco™ Marine Broth 2216	18,6
Bacto™ Pepton (Casein Pepton i forsøk 3 og 4)	20,0
NaCl	10,0

Det flytende MAP-mediet ble deretter fordelt i egnede rør/kolber avhengig av volum bakteriekultur som skulle dyrkes i de enkelte forsøkene (se tabell 9) og ble deretter autoklavert. Mediet ble satt til avkjøling ved romtemperatur før det ble satt på kjølerom inntil bruk. Ved oppskaleringsanalysen av interessante isolater ble det på grunn av mangel på Bacto™ Pepton benyttet Casein Pepton ved tillagning av flytende medium.

Tabell 9: Volum bakteriekultur i de ulike forsøkene

Analyse (forsøk #)*	Volum bakteriekultur (ml)/dyrkingskolber
Kulturfiltrat analyse (2)	5 ml/reagensrør
Oppskaleringsanalyse (3)	100 ml/250 ml Erlenmeyer kolbe
Vekstfaseanalyse (4)	700 ml/2000 ml Erlenmeyer kolbe

*Ved forsøk 1 ble det benyttet allerede frysetørket materiale fra de ti isolatene.

Ved utførelse av kulturfiltratanalysen, forsøk 2, ble de forskjellige bakteriestammene overført fra petriskåler til reagensrør med 5 ml flytende MAP-medium og rørene ble deretter inkubert med rysting (IKA Vibrax rørryster) ved 6 °C i ca. 2-3 døgn, avhengig av veksthastigheten til de ulike isolatene. Samme prosess ble utført for tillagning av startkulturer under forsøk 3 og 4. For opparbeiding av kulturfiltrat ble bakteriekulturene overført til 15 ml falconrør og celler ble spunnet ned ved sentrifugering i en Multifuge 1S-R Heraeus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ved 3500 x g i 15 min. Kulturfiltratet ble pipettert over i rene reagensrør.

Startkulturer for forsøk 3 og 4 ble dyrket på lik linje med 5 ml kulturene under forsøk 2. Ved oppskaleringsanalysen, forsøk 3, ble hele startkulturene slått over i nye 250 ml Erlenmeyer kolber med 100 ml flytende MAP-medium. Kolbene ble inkubert med rysting ved 6 °C. Veksten i kolbene ble overvåket spektrofotometrisk, ved måling av OD₆₀₀ på et SPEKOL[®] 2000 UV-VIS spektrofotometer (Analytik Jena AG, Jena, Tyskland) to ganger i døgnet for å sikre at isolatene nådde en sen stasjonærfase. Ved stabilisert OD₆₀₀ ble bakteriekulturene overført til 2 x 50 ml falconrør og cellene spunnet ned ved sentrifugering; 3500 x g i 45 min. Supernatanten (kulturfiltratet) ble så overført til 1200 ml VirTis Wide Mouth Filter Seal[™] beholdere (SP Scientific, NY, USA) egnet for frysetørring og frosset ned ved -80 °C. All væske ble deretter fjernet ved hjelp av en VirTis Genesis EL35 frysetørker (SP Scientific, NY, USA).

Under vekstfaseanalysen, forsøk 4, ble startkulturen av isolat M09B197 overført til en ny kolbe bestående av 700 ml flytende MAP-medium og ble deretter inkubert med rysting ved 6 °C. På grunnlag av OD₆₀₀ verdier målt for samme isolat under forsøk 3, ble 350 ml kultur høstet ca. 1/3 inn i eksponentiell fase og 150 ml kultur tatt ut i overgangen mellom eksponentiell- og stasjonær fase. De resterende 200 ml av kulturen ble fordelt likt og tatt ut ved ulike tidspunkt under stasjonærfasen. Ved høsting ble prøvene fordelt på 50 ml falconrør

og celler spunnet ned ved 3500 x g i 45 min. Kulturfiltratet ble deretter overført til egnede beholdere for frysetørring og frosset ned ved -80 °C for etterfølgende frysetørring, som beskrevet ovenfor.

2.4 Løsemiddelekstraksjon

Totalkulturen av isolater benyttet i forsøk 1 var allerede frysetørket før oppstart av denne masteroppgaven. Som oppført i tabell 10, ble dette materialet og frysetørket materiale laget under forsøk 3 (oppskaleringsanalyse) og 4 (vekstfaseanalyse) ekstrahert med hhv 10x volum (v/w tørrstoff) 60% acetonitril (ACN) + 0,1% trifluoreddiksyre (TFA) og 10x volum (v/w tørrstoff) 30% ACN + 0,1% TFA. Blandingene ble deretter satt på omrøring i 48 timer på kjølerom. Etter endt inkubering ble prøvene overført til separate, forhåndsveide 50 ml falconrør og dampet inn vha. en ScanVac Scanspeed 40 sentrifuge med en CoolSafe™ kjølefelle (LaboGene ApS, Lyngø, Danmark) og en vakuumpumpe MD4 (Vaccubrand, Wertheim, Tyskland). Inndampede prøver ble veid og løst opp i 0,05% TFA til en konsentrasjon på 100 mg/ml.

Tabell 10: Løsemiddelekstraksjonsoppsett ved de ulike forsøkene utført

Forsøk (#)	Volum tilsatt løsemiddel
Total ekstrakt analyse (1)	10x volum (v/w tørrstoff) 60% ACN + 0,1% TFA
Kulturfiltrat analyse (2)	1x volum kulturfiltrat (v/v) 60% ACN + 0,1% TFA
Oppskaleringsanalyse (3)	10x volum (v/w tørrstoff) 30% ACN + 0,1% TFA
Vekstfase analyse (4)	10 x volum (v/w tørrstoff) 30% ACN + 0,1% TFA

Da det oppsto problemer med frysetørringen under utførelsen av forsøk 2 (kulturfiltratanalysen) ble det valgt å ekstrahere de 5 ml kulturfiltratene direkte med 5 ml 60% ACN + 0,1% TFA. Kulturene ble overført til 15 ml falconrør og celler ble spunnet ned ved 3500 x g i 15 min. Supernatanten ble overført til nye reagensrør og det ble tilsatt 5 ml 60% ACN + 0,1% TFA. Rørene ble deretter inkubert med rysting (IKA Vibrax rørryster) på kjølerom i 72 timer. Etter endt inkubering ble prøvene overført til 50 ml falconrør og dampet inn vha. vakuumsentrifugering. De inndampede prøvene ble løst opp i 0,05% TFA til en konsentrasjon på 100 mg/ml og ble så overført til eppendorfrør og sentrifugert.

2.5 Fastfaseekstraksjon (SPE)

De ulike prøvene ble fraksjonert på Waters Sep-Pak[®] Vac C-18 SPE-kolonner (Waters Corp., Milford, MA, USA). Valg av kolonnestørrelse ble basert på de enkelte prøvenes tørrvekt. De ulike kolonnestørrelsene brukt er satt inn i tabell 11.

Waters Sep-Pak[®] Vac C-18 SPE-kolonnene ble kondisjonert med 100% ACN og deretter ekvilibrert med 0,05% TFA. Prøvene ble så tilsatt og vasket med 0,05% TFA. Ikke-tilbakeholdt materiale og vask ble slått sammen i egne reagensrør. De benyttede volum av reagenser i de ulike stegene er satt inn i tabell 11.

Tabell 11: Waters Sep-Pak[®] Vac C-18 SPE-kolonner brukt ved fastfaseekstraksjon i de ulike eksperimentene, samt volum av reagenser brukt ved kondisjonering og ekvilibrering av kolonner og vask av påsatte prøver

Forsøk #	Waters Sep-Pac[®] Vac C-18 SPE-kolonne	Kondisjonering 100% ACN (ml)	Ekvilibrering 0,05% TFA (ml)	Vask 0,05% TFA (ml)
1	20cc (5g) og 35cc (10g)	30	30	50
2	1cc (0,1g)	2	2	4
3	20cc (5g)	30	30	30
4	20cc (5g) og 35cc (10g)	30	30	50

Tilbakeholdt materiale ble deretter eluert med egnet volum elueringsvæske (tabell 12). SPE-eluatene ble så overført til separate, forhåndsveide rør og dampet inn vha. vakuumsentrifuge. Inndampede SPE-eluater ble veid og løst i MQ til en konsentrasjon på 40 mg/ml.

Tabell 12: Volum av de ulike elueringsvæskene ved kjøring av fastfasteekstraksjon

Forsøk #	10% ACN + 0,05% TFA (ml)	40% ACN + 0,05% TFA (ml)	80% ACN + 0,05% TFA (ml)	100% ACN + 0,05% TFA (ml)
1	30	30	30	30
2	-	-	2	-
3	-	-	30	-
4	-	-	30	-

Som det fremgår i tabell 12 ble tilbakeholdt materiale under forsøk 1 (totalekstraktanalyse) eluert stegvis med 30 ml elueringsvæske med ulike konsentrasjoner ACN. De inndampede

10%, 40% og 80% SPE-eluatene ble overført til 50 ml falconrør og etter inndamping med vakuumsentrifuge ble de løst opp i MQ (til 40 mg/ml). 100% SPE-eluatet, som vanskelig lar seg løse i vann, ble satt til lagring på kjølerom.

Under utførelse av forsøk 2 ble retardert materiale samlet opp ved en enkelt eluering. Det ble da benyttet 80% ACN + 0,05% TFA som elueringsløsning ved dette forsøket. Da de prøvene som ble valgt for oppskalering og vekstfaseanalyse (forsøk 3 og 4) var basert på resultater oppnådd ved forsøk 2, ble det besluttet å følge samme prosedyre for fastfaseekstraksjon som i dette forsøket, dvs. ett elueringssteg ved bruk av 80% ACN + 0,05% TFA. SPE-eluatene ble vakuuminndampet og løst i MQ til en konsentrasjon på 40 mg/ml.

2.6 LC-MS

En alikvot på 100 µl fra hver av de løste SPE-eluatene ble overført til separate eppendorfrør og partikler ble spunnet ned ved 6000 rpm i 10 min. 10 µl prøver ble så overført til 0,1 ml micro-insert rør plassert i 1,5 ml LC-MS glass (Begge; VWR International, LLC, West Chester, PA, USA) og det ble tilsatt 190 µl MQ for å oppnå en konsentrasjon på 2 mg/ml (1:20 fortykning). LC-MS ble deretter utført ved med en Waters 2690 Separations module (HPLC system) koblet til en Waters Micromass ZQ (massespektrometer) med en elektrospray ionekilde (Begge; Waters Corp., Milford, MA, USA). Ved alle forsøkene ble det benyttet en mobilfase A, MQ + 0,1% TFA, og en mobilfase B, ACN. Som RP-HPLC kolonne ble en Sunfire™ C-18 MV 2,1 x 100 mm kolonne (Waters Corp., Milford, MA, USA) med 3,5 µm partikkelstørrelse benyttet. Mobilfaseflow var 0,2 ml/min. Ved analysen av totalekstrakter ble det også kjørt hydrofilisk interaksjonskromatografi (HILIC), med en TSKgel® Amide-80 2,0 x 150 mm kolonne (TOSOH Bioscience, Tokyo, Japan) med 5 µm partikkelstørrelse, og mobilfaseflow på 0,2 ml/min.

RP-HPLC-MS av de ulike SPE-eluatene laget under totalekstraktanalysen (forsøk 1) ble utført med ulike gradienter (tabell 13). Alle ble kjørt i ESI⁺ og ESI⁻ modus ved både RP-HPLC og HILIC.

Tabell 13: Gradienter kjørt ved RP-HPLC og HILIC på de ulike SPE-eluatene ved de ulike forsøkene

Forsøk	SPE-eluat	Gradient RP-HPLC ESI+/ESI-	Gradient HILIC ESI+/ESI-
1	10% SPE-eluat	7% – 90% ACN over 43 min	99% ACN – 10% ACN over 44 min
	40% SPE-eluat	10% – 90% ACN over 45 min	
	80% SPE-eluat	30% – 100% ACN over 46 min	
2-4	80% SPE-eluat	7% – 90% ACN over 43 min	Ikke benyttet

Ved kulturfiltratanalyse (forsøk 2) av de samme isolatene som ble undersøkt i forsøk 1, ble det først benyttet den samme gradienten som for 80% SPE-eluatene. Da dette viste seg å gi utilfredsstillende resultater ble LC-MS kjørt på nytt med den samme gradienten som 10% SPE-eluatene. Dette ga bedre resultater og ble videre benyttet for alle isolater under forsøk 2-4. RP-HPLC ESI⁺ ble kun kjørt på et fåtall av isolatene under forsøk 2.

Massespektrometer-innstillingene er listet opp i tabell 14. Kromatogram og spekter ble analysert ved hjelp av programvaren Mass Lynx v4.1 SCN 714 (Waters Laboratory Informatics, Waters Corp., Milford, MA, USA).

Tabell 14: Instrumentparametere benyttet ved LC-ESI-MS i positiv og negativ modus

Instrumentelle parametere	ESI positiv modus	ESI negativ modus
Flow	10 µl/min	
Nebulisation gas	Nitrogen	
Capillary (kV)	3,5	2,2
Cone (V)	30	25
Extractor (V)	3,0	3,0
RF lens (V)	0,3	1,5
Temperature source (°C)	110	120
Temperature desolvation (°C)	350	300
Cone gas flow (L/hr)	60	70
Desolvation gas flow (L/hr)	1200	1100
Resolution (LM, HM)	15,5	15,0
Scan area (m/z)	100-1800	100-1800
Ion energy	0,5	0,8
Multiplier (V)	700	650

3 Resultater

3.1 Fylogenetisk analyse av isolater med ukjent identitet

I denne masteroppgaven ble småskala kulturfiltrater fra 81 bakterieisolater analysert med det formål å se om det var mulig å identifisere mulige produsenter av sekundærmolekylarer ved sammenligning av LC-MS kromatogrammer og spekter. Flertallet av isolatene skrev seg fra diverse svamper samlet opp fra sjøområdene langs Bjørnøya. Ni bakterieisolater skrev seg fra sjøpungen *Synoicum pulmonaria* fra samme lokalitet, mens ett isolat (JM07-15) isolert fra samme sjøpung, skrev seg fra et tidligere tokt.

Opplysninger om de analyserte isolatenes taksonomiske identitet, basert på partiell 16S-rDNA sekvensanalyse, ble for de flestes vedkommende innhentet ut fra MarBank. For 15 isolater analysert i denne oppgaven manglet imidlertid slik identifisering. Det ble derfor utført en tilsvarende analyse av disse isolatene, siden det under kulturfiltratanalysen var et mål å se om det kunne påvises en sammenheng mellom isolatenes grad av fylogenetiske slektskap og LC-MS profil.

Tabell 15 viser en samlet oppstilling av alle benyttede isolater, med de respektive MarBank-identiteter og taksonomisk tilhørighet. Isolater identifisert ved partiell 16S-rDNA sekvensanalyse i denne oppgaven er merket rødt.

Tabell 15: Alle isolater benyttet i denne oppgaven, med den respektive identiteten basert på 16S-rDNA sekvensanalyse

Isolat ID	Taksonomi	Isolat ID	Taksonomi
M09B208	<i>Algibacter</i> sp.	M09B120	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (6 isolater)
M09B263*	<i>Aliivibrio</i> sp.	M09B330	
M09B115	<i>Colwellia</i> sp. (11 isolater)	M09B331	
M09B122		M09B332	
M09B133*		M09B333	
M09B191*		M09B335	
M09B192		M09B117	<i>Psychrobacter</i> sp. (6 isolater)
M09B204		M09B257	
M09B207		M09B262*	
M09B209		M09B275*	
M09B211		M09B327	
M09B213		M09B329	
M09B270		M09B195†	<i>Psychromonas</i> sp. (8 isolater)
M09B118	Flavobacteriaceae gen.	M09B196†	
M09B135	<i>Flavobacterium</i> sp.	M09B198†	
M09B113	<i>Lacinutrix</i> sp. (3 isolater)	M09B203†	
M09B119		M09B210	
M09B334		M09B266	
M09B136	Microbacteriaceae gen.	M09B316	
M09B197†	<i>Moritella</i> sp. (12 isolater)	M09B336	
M09B255		M09B269	
M09B256*		M09B114	<i>Shewanella</i> sp. (11 isolater)
M09B279		M09B186	
M09B280*		M09B187*	
M09B281		M09B193*	
M09B282*		M09B194†	
M09B283		M09B200†	
M09B285		M09B201†	
M09B286		M09B205	
M09B287		M09B206	
M09B328		M09B254	
M09B199†		<i>Photobacterium</i> sp.	
M09B116		<i>Polaribacter</i> sp. (6 isolater)	M09B272
M09B121	M09B276		<i>Thalassomonas</i> sp. (2 isolater)
M09B131	M09B137*		
M09B132	M09B190*		
M09B134	M09B258		γ -proteobacteria (4 isolater)
M09B185*	M09B259		
M09B268	**	M09B260	
M09B189	***	M09B261*	
JM07-15†	***		

*Taksonomi bestemt ved 16S-rDNA sekvensanalyse i denne oppgaven.

**Forurensning i 16S-PCR produkt hindret bestemmelse av isolatets taksonomi.

***Ingen oppvekst av de respektive isolater etter utplating på 0,5 MAP plater.

† Isolaterne fra sjøpungen *S. pulmonaria*.

Sekvenser returnert fra sekvenseringslaboratoriet ved Det helsevitenskapelige fakultet ble kvalitetssikret og sammenlignet med sekvenser publisert i Ribosomal Database Project (RDP) databasen via søkemotoren Classifier. I likhet med taksonomien utført ved MarBanks ga dette pålitelig identitet ned til slektsnivå for de fleste isolatene, som vist i tabell 16.

Tabell 16: Resultater etter sekvensanalyse ved bruk av Classifier funksjonen i RDP databasen.

MarBank ID	Klassifisering	Pålitelighetsverdi
M09B261	Ikke klassifisert γ -proteobacteria	100%
M09B263	<i>Aliivibrio</i> sp.	100%
M09B133	<i>Colwellia</i> sp.	100%
M09B191	<i>Colwellia</i> sp.	100%
M09B280	<i>Moritella</i> sp.	100%
M09B282	<i>Moritella</i> sp.	100%
M09B256	<i>Moritella</i> sp.	100%
M09B185	<i>Polaribacter</i> sp.	100%
M09B262	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%
M09B275	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%
M09B187	<i>Shewanella</i> sp.	100%
M09B193	<i>Shewanella</i> sp.	100%
M09B137	<i>Thalassomonas</i> sp.	98%
M09B190	<i>Thalassomonas</i> sp.	99%

Tabell 15 og 16 viser en samlet oversikt over alle isolatene analysert under denne oppgaven. De fleste av isolatene skrev seg fra velkjente marine slekter innen klassen γ -proteobacteria. Her var det i hovedsak flest representanter innen slektene *Colwellia* sp., *Moritella* sp., og *Shewanella* sp. De andre isolatene tilhørte slektene *Aliivibrio* sp., *Lacinutrix* sp., *Photobacterium* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Psychromonas* sp., *Tenacibaculum* sp., og *Thalassomonas* sp. Ved siden av denne dominansen av γ -proteobakterier skrev 8 isolater seg fra klassen Flavobacteria, her inkludert et isolat identifisert kun ned til familien Flavobacteriaceae, et isolat i slekten *Flavobacterium* sp., et til slekten *Algibacter* sp., og seks isolater fra slekten *Polaribacter* sp. De tre sistnevnte tilhører også familien Flavobacteriaceae. To isolater tilhørte henholdsvis familien Microbacteriaceae (en Actinobacteria) og Rhodobacteraceae (en α -Proteobacteria).

Som det kommer frem i tabell 15, mangler det enda identitet til de tre isolatene M09B268, M09B189 og JM07-15. For de sistnevnte ble det ikke observert vekst etter senere utplating på petriskåler og det var derfor ikke mulig å identifisere disse isolatene. Ved opplasting av sekvensen til isolat M09B268 i BioEdit ble det observert at det var skjedd en forurensning av prøven. Etter en ny sekvenseringsreaksjon kom sekvensen nok engang ut med forurensning til stede. Det ble ikke foretatt noen ny isolering av DNA fra isolat M09B268 etter dette. Alle de tre isolatene ble analysert kjemisk.

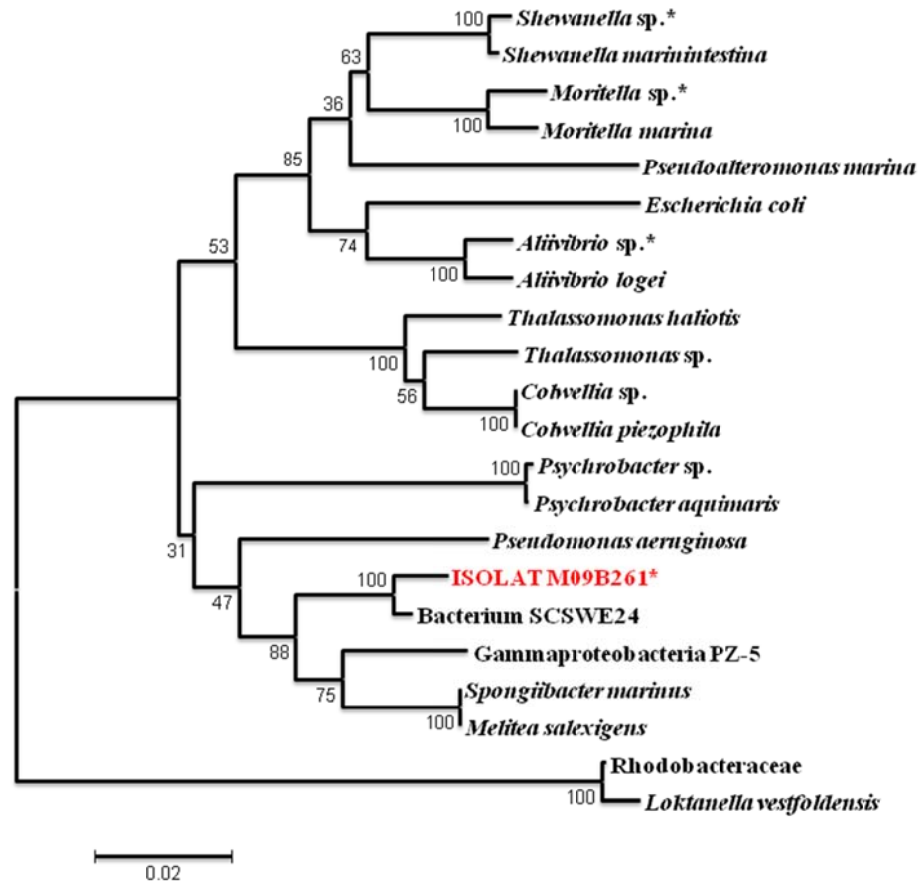
Isolat M09B261 ble kun identifisert til klassenivå som en ikke-klassifisert γ -Proteobacteria med RDP Classifier. Sekvensen til dette isolatet ble videre kjørt gjennom søkemotoren SeqMatch i RPD databasen. Et BLAST søk i GenBank ble også gjennomført for å kunne identifisere sekvenslikheter med publiserte sekvenser i denne databasen.

Tabell 17: Resultat av 16S-rRNA sekvenssøk av isolat M09B261 ved bruk av SeqMatch (RDP) og BLAST (GenBank)

Treff (ID nummer)	Likhetsindeks (SeqMatch)	Sekvensidentitet (BLAST)
SCSWE24 (HQ686140)	0,874	97%
PZ-5 (AB545809)	0,746	93%
HTCC2143 (AY386333)	0,742	93%
CL-SK8 (EF988630)	0,727	93%
SCSWD20 (FJ461970)	0,719	93%

Begge analysene pekte mot nærmest slektskap med en ikke-klassifisert γ -proteobakterie kalt stamme SCSWE24 (tabell 17). Bacterium SCSWE24 (GenBank; HQ686140) er nylig isolert fra 450 meters dyp i Sør-Kina-havet uten at ytterligere opplysninger er publisert.

For å se om det var mulig å trekke ut mer informasjon om fylogien til isolat M09B261 ble det konstruert et fylogenetisk tre. Dette for å kunne plassere isolat M09B261 i forhold til andre klassifiserte stammer, både stammer identifisert i denne oppgaven og relevante stammer der nukleotidsekvensen ble hentet fra RDP/GenBank.



Figur 1: Neighbor-joining fylogenetisk tre basert på partielle 16S-rRNA gensekvenser fra isolater identifisert i denne oppgaven og publiserte sekvenser i RDP/GenBank.

Ut fra figur 1 ser en at isolat M09B261 (merket rødt) ble gruppert sammen med *Psychrobacter* spp., og *Pseudomonas aeruginosa*. Dvs. innen ordenen Pseudomonadales av γ -proteobakteriene. Pseudomonadales som monofyletisk gruppe har imidlertid ikke pålitelig statistisk støtte gjennom bootstrap-analysen. Den fylogenetiske plasseringen av M09B261 innen Pseudomonadales er usikker. Som forventet ble isolat M09B261 gruppert sammen med γ -proteobakterien SCSWE24, som ved SeqMatch og BLAST viste størst sekvenslikhet. I tillegg ble isolatet gruppert med γ -proteobakterien PZ-5 som viste nest høyeste sekvenslikhet, og de to typestammene *Spongiibacter marinus* og *Melitea salexigens*, hvis sekvenser ble valgt ut på grunn av høyest likhet med sekvensen til M09B261 ved SeqMatch filtrert på en slik måte at sekvensanalysen kun inkluderte typestammer.

3.2 Totalekstraktanalyse av bakterieisolater fra *Synoicum pulmonaria*

Ved en studie av Tadesse *et al.* (2008) ble det screenet for antimikrobiell og antifungal aktivitet hos sekkedyret *S. pulmonaria* tatt opp utenfor kysten av Tromsø. Ekstrakter fra *S. pulmonaria* viste høy aktivitet mot både Gram positive og Gram negative bakterier, samt sopp. Videre ble det isolert tre nye brominerte guanidiner fra den samme arten, kalt synoxazolidinon A, B og C (Tadesse *et al.* 2010; Tadesse *et al.* 2011). Forbindelsene ble isolert etter preparativ reversfase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) kjørt med en lineær gradient av acetonitril og vann, hvor forbindelsene ble sett og eluere ut ved 70% acetonitril og 30% vann med nesten samme retensjonstid. High resolution elektro spray massespektrometri (HRESIMS) analyse viste at de tre forbindelsene hadde m/z-verdier $[M+H]^+$ på hhv m/z 494,94 (A), m/z 460,98 (B) og m/z 492,92 (C).

Hensikten med dette forsøket var å screene totalekstrakter fra ti bakterieisolater isolert fra *S. pulmonaria* innsamlet utenfor kysten av Bjørnøya, ved bruk av LC-MS for å se om det var mulig å gjenfinne de samme forbindelsene som funnet av Tadesse *et al.* (2010; 2011).

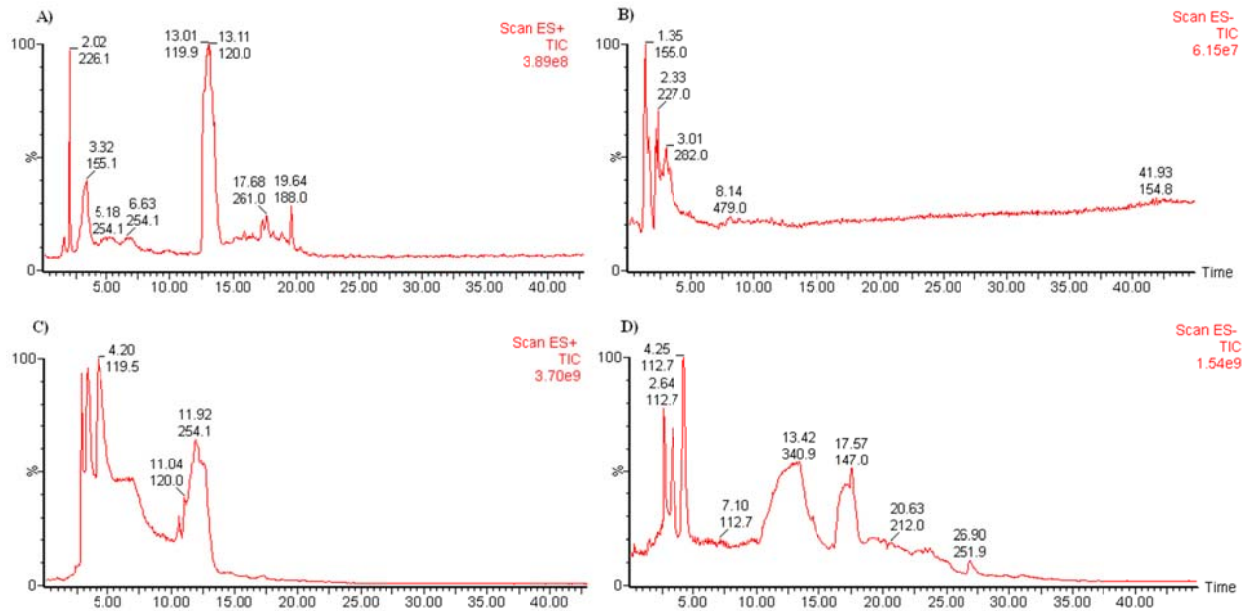
Totalekstrakter fra de ti isolatene ble ved fastfaseekstraksjon fraksjonert i 10%, 40% og 80% (acetonitril) SPE-eluatere. HPLC ble kjørt ved bruk av både reversfase (RP) og "hydrophilic interaction chromatography" (HILIC) kolonner. Massespektrometri (MS) ble kjørt i positiv og negativ ESI modus. Til sammen ble det derfor kjørt fire ulike analyser for hvert ekstrakt av alle isolater.

Ingen av de initielle kromatogrammene viste topper med utslag for de respektive m/z-verdiene til synoxazolidinon A-C ble det ved bruk av selected ion monitoring (SIM) funksjonen i Mass Lynx v4.1. Det ble derfor gjort et søk der området for m/z-verdier ble begrenset til 450-500 m/z hvor kun topper innenfor dette området kommer frem i kromatogrammet. I tillegg ble det ved bruk av den samme funksjonen gjort et søk etter de spesifikke m/z-verdiene til synoxazolidinon A, B og C på hhv m/z 494,94, 460,98 og 492,92. Ingen av de gjennomførte søkene ga utslag som kunne identifiseres som noen av de tre forbindelsene og det ble derfor konkludert at de ikke var til stede i totalekstraktene til de ti isolatene.

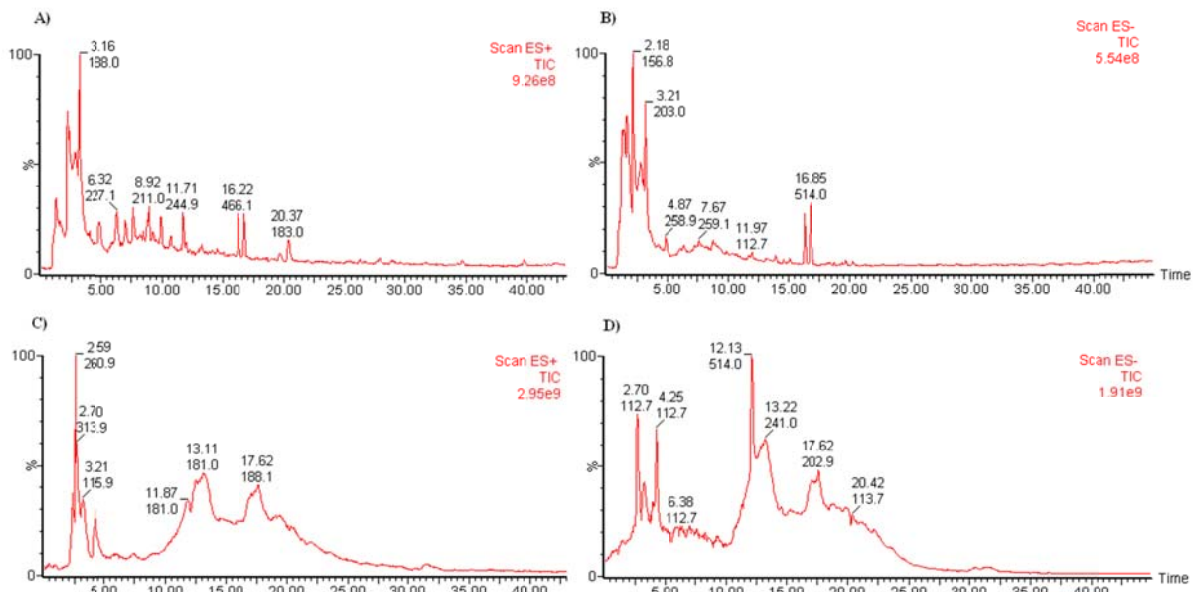
3.3 Etablering av fast metodikk for LC-MS analyse av kulturfiltrater.

En fast metodikk for LC-MS analysen av kulturfiltrater i senere forsøk ble utviklet basert på observasjoner i kromatogrammene fra 10%, 40% og 80% SPE eluatene (hhv. figur 2, 3 og 4) etter LC-MS av totalekstraktene. Formålet var å etablere en fast metode med hensyn til

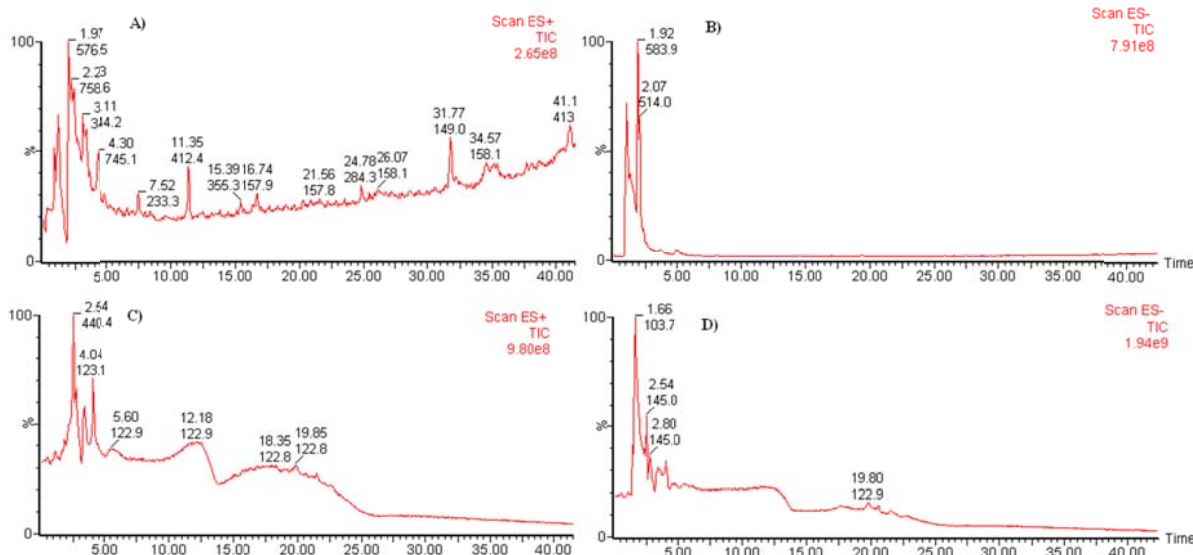
elueringsvæske ved fastfaseekstraksjonen og en separering og gradient under HPLC og elektropray modus ved MS. Målsettingen var best mulig separering og detektering av topper for et stort antall kulturfiltrater.



Figur 2: Kromatogram etter LC-MS av 10% SPE eluater fra isolat M09B200 under forsøk 1. A) RP-HPLC-ESI⁺ B) RP-HPLC-ESI⁻ C) HILIC-ESI⁺ og D) HILIC-ESI⁻. Elueringstider (min) og m/z-verdier er angitt for utvalgte topper



Figur 3: Kromatogram etter LC-MS av 40% SPE eluater fra isolat M09B200. A) RP-HPLC-ESI⁺ B) RP-HPLC-ESI⁻ C) HILIC-ESI⁺ og D) HILIC-ESI⁻. Elueringstider (min) og m/z-verdier er angitt for utvalgte toppar



Figur 4: Kromatogram etter LC-MS av 80% SPE eluater fra isolat M09B200. A) RP-HPLC-ESI⁺ B) RP-HPLC-ESI⁻ C) HILIC-ESI⁺ og D) HILIC-ESI⁻. Elueringstider (min) og m/z-verdier er angitt for utvalgte toppar

Ved sammenlikning av kromatogrammer ved bruk av RP-HPLC-MS og HILIC-MS ble det sett at RP-HPLC kjøringene ga den beste separasjonen. Kromatogrammer fra denne kjøringen (figur 2-4, A og B) viser utslag av flere individuelle forbindelser med ulik polaritet. Dette ble spesielt sett i kromatogram fra 40% SPE eluatene (figur 3A). I kromatogrammene fra HILIC-MS kjøringene (figur 2-4, C og D) ble det kun observert et fåtall individuelle toppar helt i starten som representerer mer upolare stoffer. Toppar observert senere kan tyde på liten grad av separering av forbindelser. RP-HPLC-MS ble derfor betraktet som den beste metoden for vidare analyse.

I valg av beste ioniseringsmetode ble kromatogrammer for RP-HPLC-MS kjørt ved ESI⁺ og ESI⁻ modus sammenliknet (figur 2-4 A og B). I kromatogrammene etter kjøring ved bruk av ESI⁺ ble toppar observert hos alle SPE eluater. Denne ioniseringsmetoden viste seg å være mer fordelaktig enn ESI⁻ modus. Sistnevnte ioniseringsmetode ga kun et sammenliknbart antall toppar med ESI⁺ i 40% SPE eluatene. De få toppene som skilte seg ut fra grunnlinjen i

10% og 80% SPE eluatene ved ESI⁻ kjøringene kom ut tidlig i kromatogrammene. De representerte de mer polare forbindelsene i prøvematerialet som har gått rett igjennom RP-HPLC kolonnen.

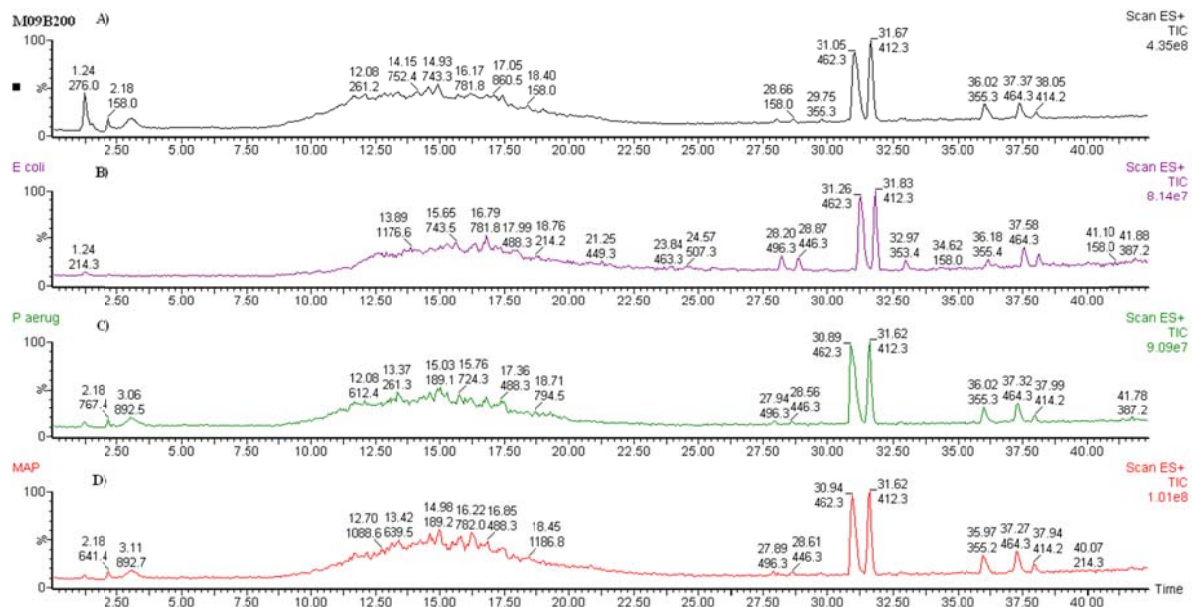
Kromatogrammer for de tre SPE eluatene kjørt ved RP-HPLC-MS-ESI⁺ (figur 2-4 A) ble videre sammenlignet for å kunne komme frem til en standard elueringsvæske ved fastfase ekstraksjon og en optimal gradient for separering av forbindelser ved HPLC. SPE eluatet med 40% ACN (figur 3A) ble sett å bestå av flest individuelle forbindelser. Separeringen av forbindelser ble også observert å være mer fullstendig i dette eluatet når det ble kjørt en gradient på 7%-90% ACN. Siden høyintensitetstopper kom frem i alle tre SPE eluatene ble det valgt å benytte kun ett elueringssteg ved fastfaseekstraksjonen, hvor forbindelser elueres ut med 80% ACN. Dette for å kunne oppnå oppsamling og analyse av flest mulig forbindelser til stede i kulturfiltratene.

Denne metodeutviklingen viste at RP-HPLC-MS-ESI⁺ ga det største mangfoldet av topper. Denne metoden ble derfor valgt som en fast prosedyre for kjøring av HPLC-MS av kulturfiltratene. Det ble videre valgt å bruke 80% ACN + 0,05% TFA som standard elueringsvæske ved fastfaseekstraksjonen av alle kulturfiltratene. Gradienten på 7%-90% ACN ble valgt da den passer alle de tre SPE eluatene og ved kulturfiltratanalysen, hvor alle forbindelser ble eluert med 80% ACN.

3.4 Kulturfiltratanalyse

LC-MS ble benyttet for å se om det er mulig å identifisere produsenter av sekundærmetabolitter ved kjøring av 80 % SPE-eluate laget av 5 ml kulturfiltrater fra 81 isolater. Sammenligning av LC-MS kromatogrammer og spekter mellom de ulike isolatene, samt sammenligning med rent MAP medium og kulturfiltrat fra laboriestammer av *E. coli* og *P. aeruginosa*, ble utført for å kunne eliminere mindre interessante m/z-ioner som måtte gå igjen i multiple isolater, i mediet og hos kontrollene som er kjent for ikke å produsere sekundærmetabolitter. Unike, høyintensitets m/z-ioner ble ansett å være av interesse, da disse muligens kunne representere sekundærmetabolitter. Det ble også tatt sikte på å teste om det kunne ses en sammenheng mellom de ulike isolatenes grad av fylogenetisk slektskap og LC-MS profil.

I henhold til metodikken etablert i forsøk 1 ble kulturfiltrater fra de 81 isolatene eluert ut med 80% ACN ved fastfaseekstraksjon og videre analysert ved kjøring av RP-HPLC-MS-ESI⁺ med en gradient på 7%-90% ACN over 43 minutter. Tilsvarende metode ble også benyttet på kulturfiltrater av kontrollene *E. coli* og *P. aeruginosa*, samt på rent medium. Alle de 81 isolatene, kontrollene og rent medium viste store likheter i kromatogramprofil, særlig i området 22-45 min. Dette er presentert i figur 5, hvor isolat M09B200 er valgt ut for å representere isolatene.



Figur 5: Kromatogramprofil oppnådd ved RP-HPLC-MS-ESI⁺ kjørt med gradienten 7-90% ACN over 43 min. Isolatene, her representert ved isolat M09B200 (A), *E. coli* (B), *P. aeruginosa* (C) og rent medium (D)

Fra alle ekstraktene kom det frem et cluster av topper i området 10-20 min (figur 5 A-D). I tillegg til clusterer kom det også frem åtte karakteristiske, godt separerte forbindelser i området 22-45 min (se tabell 18). Siden disse toppene også var til stede i kromatogrammet fra mediet (figur 5D) ble de antatt å representere forbindelser som stammer fra rent medium benyttet ved dyrking av bakterieisolatene.

De klareste forskjellene mellom de ulike isolatene ble observert for området 10-20 min og av den grunn ble det fokusert mest på dette området for identifisering av mulig interessante forbindelser. De få observerte likhetene i dette området var sju topper på 200-250 Da som viste seg å forekomme hos alle de analyserte isolatene (tabell 18).

Tabell 18: Topper med respektive m/z-verdier og retensjonstid som gikk igjen hos alle isolater i området 10-20 min og 22-45 minutter. Toppene i området 22-45 min forekom også i medieprofilen og i kromatogrammet for kontrollene

Likheter i området 10-20 min.		Likheter i området 22-45 min.	
m/z	Retensjonstid	m/z	Retensjonstid
227,1	10,26	496,3	27,89
261,1	12,13	446,3	28,61
261,2	13,48	355,3	29,7
211,2	14,10	462,3	30,94
211,1	14,88	412,3	31,57
245,1	16,12	355,3	35,97
245,1	17,42	464,3	37,27
		414,2	37,92

Da ustabilitet i retensjonstider ble sett å forekomme, særlig hos prøver som ble kjørt først i LC-MS serier, ble de sju toppene i området 10-20 minutter sammen med toppene i området 22-45 minutter (tabell 18) benyttet som referansetopper for å finne de aktuelle tidsforskyvningene i de respektive kromatogrammene.

Ved hjelp av Mass Lynx v4.1 programvaren ble alle kromatogram analysert og alle topper med en m/z-verdi over 300 Da registrert. Til sammen ble 324 m/z-verdier registrert blant de 81 isolatene. Da to/flere topper kunne være den samme forbindelsen, ble topper med lik m/z-verdi ($\pm 0,2$ Da) som var eluert ut ved tilnærmet lik retensjonstid gruppert. Referansetoppene (tabell 18) ble brukt for å plassere toppene i kromatogram med observerte tidsforskyvninger

inn i enten kjente eller nye grupper. Plasseringer inn i grupper ble verifisert ved sammenligning av MS spekter av de respektive toppene. Ut fra denne grupperingen representerte de 324 opprinnelige toppene 85 ulike forbindelser hos de 81 isolatene.

Videre ble det foretatt en grundig analyse av kromatogram fra kontrollene, *E. coli* og *P. aeruginosa*, og rent MAP medium. Dette for å kunne foreta en elimineringsprosess da topper som går igjen i rent medium og i kontrollene ikke ville være av interesse for videre analyse. Eliminering ble også foretatt av m/z-ioner sett å gå igjen i multiple isolater. Denne elimineringsprosessen gjorde det mulig å påvise unike m/z-ioner hos enkeltisolater. Resultatet er oppsummert i tabell 19.

Tabell 19: Eliminering av m/z-ioner som gikk igjen i kromatogrammer til mediet, kontrollene og multiple isolater for å kunne påvise tilstedeværelse av unike m/z-ioner

	Antall m/z-ioner	Antall isolater
Totalt	324	81
Forbindelser totalt	85	81
÷ Mediet	64	18
÷ <i>E. coli</i>	58	
÷ <i>P. aeruginosa</i>	54	
÷ Multiple isolater	28	
Høy intensitets m/z-ioner	13	11

Som tabellen viser, var det mulig å eliminere 21 forbindelser på grunn av tilstedeværelse av de samme m/z-ionene i mediet. Medregnet her er også m/z-ioner påvist i kontrollene, men som på grunn av tilstedeværelse i medieprofilen ble de ansett som rester av mediekomponenter. Eliminering av forbindelser ut fra kontrollorganismene var henholdsvis 6 fra *E. coli* og 4 fra *P. aeruginosa* på grunn av tilstedeværelse av like m/z-ioner. Av de gjenværende 53 forbindelsene, ble det sett bort ifra 26 hvor flere fylogenetisk forskjellige isolater ble sett å inneha de samme m/z-ionene. 28 forbindelser sto da igjen, og som representerte et unikt m/z-ion kun sett hos ett enkelt isolat. De 28 forbindelsene var fordelt over 18 isolater, hvorav 4 isolater ble sett å produsere mer enn en interessant topp.

Av de 18 isolatene hvor en fant interessante m/z-ioner ble 11 valgt ut til oppskalering (tabell 20). Dette for å se om en fikk reproduisert metabolittprofilen og for å produsere en større mengde av de aktuelle isolatene for mulig identifisering av de enkelte metabolittene. De 11

isolatene ble valgt på grunnlag av om de interessante m/z-ionenes relative intensitet var høy nok til at de skilte seg ut fra de mindre toppene i området 10-20 min og om søk etter den spesifikke m/z-verdien ved hjelp av Mass Lynx v4.1 kun ga resultat for kun det spesifikke isolat.

Tabell 20: Utvalgte isolater og de respektive m/z-ionene valgt ut for oppskalering.

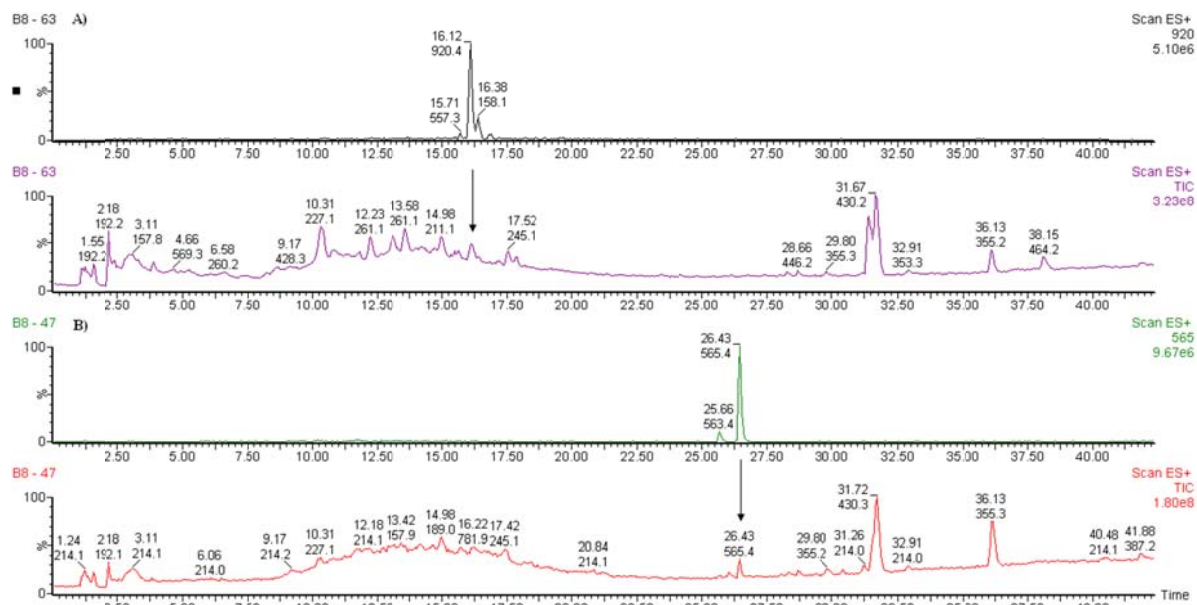
Isolat	m/z-ion	Retensjonstid	Taksonomi	Kilde
M09B118*	691,4	24,15	Flavobacteriaceae	Uidentifisert kalksvamp
M09B192	798,6	12,91	<i>Colwellia</i> sp.	<i>Halicondria bowerbanki</i> (svamp)
M09B194*	315,1	22,5	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Synoicum pulmonaria</i> (sjøpung)
M09B197	814,4	15,34	<i>Moritella</i> sp.	
JM07-15*	498,1	22,34	**	
M09B205*	691,4	24,10	<i>Shewanella</i> sp.	Uidentifisert svamp
M09B260*	563,4	25,71	γ -proteobacteria	Uidentifisert svamp
	537,4	26,02		
	565,4	26,43		
M09B268	705,9	11,92	**	Uidentifisert svamp
M09B270*	522,3	30,37	<i>Colwellia</i> sp.	
M09B276	920,4	16,12	<i>Tenacibaculum</i> sp.	
M09B282*	303,2	22,03	<i>Moritella</i> sp.	Polymastia sp. (svamp)

*Isolater hvor unike m/z-ioner ble funnet i området 22-45 min.

**Isolater hvis taksonomi ikke er fastslått

Som markert(*) i tabell 20 oppstod de interessante toppene til 7 av de utvalgte isolatene i området mellom 22-45 min, hvor en hos andre isolater kun hadde funnet de spesifikke medietoppene. Som tabell 20 viser, tilhørte 6 isolater slektene *Colwellia* sp., *Moritella* sp., og *Shewanella* sp., som var de tre dominerende slektene blant de isolatene analysert i denne oppgaven. Isolatene M09B118, M09B260 og M09B282 ble sett å tilhøre hhv familien Flavobacteriaceae, klassen γ -proteobacteria og slekten *Tenacibaculum* sp. Interessante m/z-ioner ble dermed påvist både hos isolater isolert fra ulike svamper, de fleste uidentifiserte, og fra sjøpungen *S. pulmonaria*.

Figur 6 viser et eksempel på to isolater, M09B260 og M09B276, hvor det ble funnet interessante topper i hhv området 22-45 min, nær den første observerte medietoppen, og inne i clusteret i området 10-20 minutter.



Figur 6: Isolat M09B276 (A) og M09B260 (B) hvor en fant interessante m/z-ioner på hhv 920,4 Da og 565,4 Da. Sistnevnte ble funnet i området 22-45 min sammen med to andre m/z-ioner også funnet å være unike. Kromatogram over isolatene viser resultater ved SIM søk etter den spesifikke m/z-verdien.

Grupperingen av m/z-ioner ble videre benyttet for å se om det var mulig å observere en sammenheng mellom isolatenes grad av fylogenetiske slektskap og LC-MS profil. Det totale antallet isolater innenfor en spesifikk fylogenetisk gruppe er relatert til antallet av disse isolatene der de enkelte forbindelsene ble påvist (tabell 21).

Tabellen viser at det ikke kunne påvises at tilstedeværelse av enkelte metabolitter var karakteristiske for spesifikke slekter. Foruten m/z-ioner so også var til stede i medieprofilen, begrenset de øvrige m/z-ionene seg stort sett til ett isolat innenfor de respektive slektene.

Mangelen på fylogenetisk samsvar i de observerte LC-MS profilene ble ytterligere bekreftet ved multivariat prinsipalkomponent-analyse, med de 85 gruppene gitt i tabell 21 som variable. Analysen vist ingen tendens til gruppering av de enkelte isolatene innen de forskjellige slektene i et todimensjonalt scoreplot, og generelt liten grad av forklart variasjon via de første prinsipalkomponentene. Det var med andre ord ikke noe påvisbart mønster i de variasjonene i LC-MS profil som ble observert mellom isolatene (Bjarne Landfald, personlig meddelelse).

Tabell 21: Tilstedeværelse av m/z-ioner hos isolater innenfor de ulike fylogenetiske gruppene

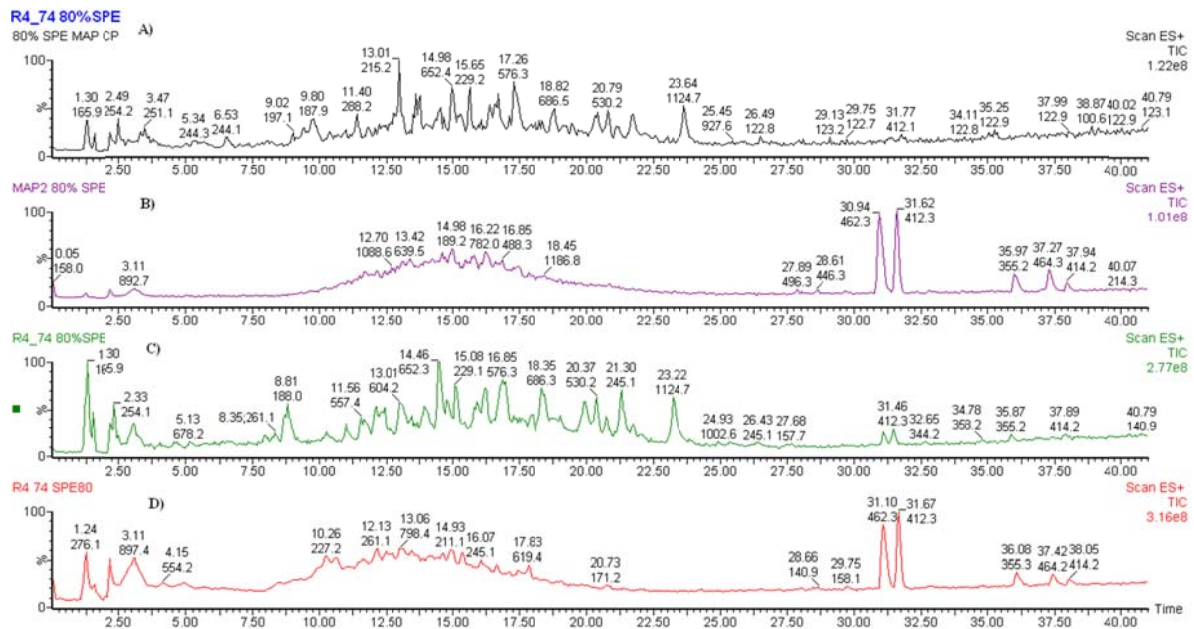
Gruppe #	m/z-ion ($\pm 0,2$ Da)	Ret. Tid	<i>Colwellia</i> sp.	<i>Thalassomonas</i> sp.	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Polaribacter</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Tenacibaculum</i> sp.	<i>Lacinutrix</i> sp.	γ -proteobacteria	<i>Psychrobacter</i> sp.	<i>Psychromonas</i> sp.	<i>Moritella</i> sp.	<i>Algibacter</i> sp.	Rhodobacteraceae gen.	Flavobacteriaceae gen.	<i>Flavobacterium</i> sp.	Microbacteriaceae gen.	<i>Photobacterium</i> sp.	<i>Aliivibrio</i> sp.	Ukjent	Kontroller	MAP medium
Antall isolater			11	2	11	6	6	2	3	4	6	8	12	1	1	1	1	1	1	1	3	4	1
1	146	20,16	1																				
2	171	20,7-20,8					2	1															
3	219	21,15	1																				
4	219,1	26,54										1											
5	233,1	24,78					2																
6	265,3	51,47				1																	
7	303,2	22,03											1										
8	315,1	22,5			1																		
9	320,2	13,2-13,8					1	1					1										
10	352,3	53,5-53,9			1								1										
11	354,3	53,5-53,8			1							3	4									1	
12	391,2	14,5-14,6	1				1																
13	405,1	20,68																			1	1	
14	413,4	51,3-51,4			1				1	1	1									1	1	1	
15	427,3	54,7-54,8	1				1																
16	430,1	19-19,2			1							2							1				
17	440,2	10,6-11,7	1		2	2	1	1	1	1	3											2	1
18	442,4	11-11,9											1						1				
19	442,6	12,4-13			2							1	3										
20	449,2	15,5-15,9					1					1	1										
21	457,4	50,5-50,6	1		1						1	1	3	1						1	1		1
22	471,4	53,5-53,8	1				2	2	4	4	1	7	1							1	1	3	1
23	485,4	52,5-52,7	1						1	1													
24	488,1	16,8-18			1		1	4	4	3	4									1	1	3	1
25	493,1	22,34																			1		
26	511,3	11,3-12	1				1					1	1								1		
27	515,5	52,8-53,1	1						2	3	1	5	1							1	1	3	1
28	522,3	30,37	1																				
29	537,4	26,02							1														
30	540,7	12,13									1		2							1			
31	544,2	13,06					1																
32	545	13,06											1										
33	546,2	18,4					1															1	
34	557,3	15,7-16,6						1					1										
35	562,4	17,21					1																
36	563,4	25,71							1														
37	565,4	26,43							1														
38	569,3	10,78			1																		
39	575,4	11,77											1										
40	581,6	12,9-13,6	1		3	3	2	1	2	4	4	4	5		1					1	1	1	1
41	582,2	13,37											1										
42	582,3	10,99											1										
43	596,4	13,6-14,1	1				1	1	1	1	3											2	1
44	596,9	13,74					1																

Gruppe #	m/z-ion ($\pm 0,2$ Da)	Ret. Tid	<i>Colwellia</i> sp.	<i>Thalassomonas</i> sp.	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Polaribacter</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Tenacibaculum</i> sp.	<i>Lacinutrix</i> sp.	γ -proteobacteria	<i>Psychrobacter</i> sp.	<i>Psychromonas</i> sp.	<i>Moritella</i> sp.	<i>Algibacter</i> sp.	Rhodobacteraceae gen.	Flavobacteriaceae gen.	<i>Flavobacterium</i> sp.	Microbacteriaceae gen.	<i>Photobacterium</i> sp.	<i>Aliivibrio</i> sp.	Ukjent	Kontroller	MAP medium
Antall isolater			11	2	11	6	6	2	3	4	6	8	12	1	1	1	1	1	1	1	3	4	1
45	602,2	14,67											1										
46	612,2	12,03										1											1 1
47	614,4	14,5-15,3	1		4			1		2	4	6	7		1				1	1		1	1
48	619,3	17,7-17,8	2		1	1	1	1	1	1		1	1								1		
49	626,3	9,95			1																		
50	626,4	14					1					1											1
51	639,4	13,4-14,2			1	1	2	1	1	2	1	2	3			1				1	1	1	1
52	639,9	13,5-13,8								1			1								1		
53	654,5	9,9-11,5	4		5			1					2										
54	664,4	11,71					1																
55	665,3	13,3-13,4					3																1
56	667,5	14,51											1										
57	669,2	14,62					2															1	
58	669,9	12,49			1																		
59	691,4	24,1			1											1							
60	695,6	9,8-10	1				1																
61	696,3	10					2																
62	705,9	11,92																			1		
63	724,3	15,7-16,4	1		4	2	2		2	1	1	3	3							1	1	3	1
64	724,8	15,7-15,8									1	1											
65	743,3	14,9-15,1			3						2	1							1				1
66	751,5	14,2-14,9			2	2		1	1	2	3	3	9							1	1	1	1
67	752,2	14,2-14,3			1	1				1	3	3	1						1			1	1
68	752,6	52,51				1																	
69	759,7	11,7-12,1			3				1	2	2	3	5							1		1	1
70	760,2	11,6-12,2					1					2	2						1				1
71	764,4	10,8-11,3											2										
72	773,5	18,3-18,4			1	2			1								1					1	1
73	776	15,8-15,9								1	1									1			
74	778,5	13,3					2																1
75	781,8	16,2-16,7	1		2		1		1	3	1	1	3		1	1				1		4	1
76	782,2	16,2-16,5			1				1		1		2									1	
77	798,4	12,9-13,1	1					1				1	1										
78	800,6	13,17								1													
79	814,4	15,34																					
80	853,5	16,3-16,8								1	3		1										1
81	853,9	16,3-16,4			1					1	1		1							1			1
82	860,4	17-17,7			2							1									1	1	
83	871,7	14,4-14,5				1			1		2		3							1		1	1
84	879,6	12,2-12,3	1				2																
85	920,4	16,12						1															

3.5 Oppskaleringsanalyse

Et antall på 11 isolater ble valgt ut til oppskalering for å teste reproducerbarheten til de interessante m/z ionene funnet under kulturfiltratanalysen. Videre var målet å opparbeide et større kvantum av de respektive isolatene for mulig å identifisere enkeltmetabolitter. For å oppnå best mulig reproducerbarhet ble den samme metoden for fastfase ekstraksjon og LC-MS som etablert under kulturfiltratanalysen benyttet.

LC-MS analysene viste at kromatogramprofilen til de respektive isolatene var forandret sett i forhold til den opprinnelige kulturfiltratanalysen. Siden det under dette forsøket og forsøk 4 ble benyttet Casein pepton fra Merck i stede for Bacto™ pepton ved tilleggning av flytende medium, ble det foretatt en ny LC-MS kjøring av rent medium med Casein pepton (figur 7).



Figur 7: Sammenligning av kromatogrammer fra kulturfiltratanalysen og oppskaleringsanalysen. A) rent medium med Casein pepton, B) rent medium med Bacto™ pepton, C) isolat M09B197 etter oppskalering og D) isolat M09B197 etter kulturfiltratanalysen.

Figur 7A-D viser sammenligningen av kromatogrammer oppnådd etter LC-MS av rent medium som inneholder Casein pepton (A) og Bacto™ pepton (B), samt kromatogrammer for isolat M09B197 ved oppskaleringsanalysen (C) og kulturfiltratanalysen (D). Clusteret av topper i området 10 til 20 minutter var blitt forskjøvet, slik at de nye kromatogrammene har et tilsvarende cluster ved ca. 9-25 minutter.

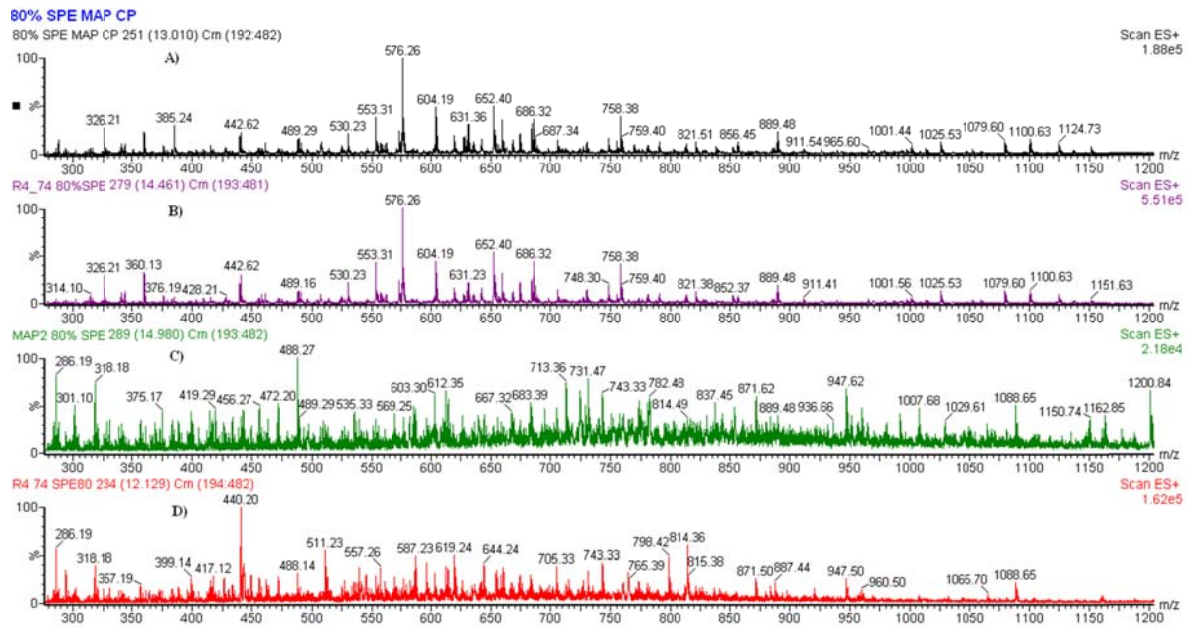
Registrering og gruppering av topper som var kommet frem i kromatogrammene ble utført på lik linje som under kulturfiltratanalysen. Totalt ble det registrert 187 m/z-ioner fordelt på de 11 isolatene. Etter gruppering ble m/z-ionene funnet å gjenspeile 57 ulike forbindelser. En eliminering ble også her foretatt av topper som gikk igjen i mediet og hos multiple isolater, for å se om en kunne finne igjen de unike m/z-ionene som ble påvist under kulturfiltratanalysen.

Tabell 22: Eliminering av m/z-ioner som gikk igjen i kromatogrammer til mediet og multiple isolater under oppskaleringsprosessen

	Antall m/z-ioner	Antall isolater
Totalt	187	11
Forbindelser totalt	57	11
÷ Mediet	24	4
÷ Multiple isolater	6	
Høy intensitets m/z-ioner	2	1

Som tabell 22 viser, ble 33 forbindelser eliminert på grunn av tilstedeværelse av de respektive m/z-ionene i medieprofilen. Etter elimineringen av enda 18 m/z-ioner med ut fra tilstedeværelse i multiple isolater og 4 på grunn av lav intensitet, sto en igjen med ett isolat, M09B270, som hadde to unike, høyintensitets m/z-ioner. Ingen av de 57 forbindelsene ble sett å korrespondere med noen av de forbindelsene funnet under kulturfiltratanalysen. Søk i kromatogrammene fra oppskaleringen etter de unike m/z-ionene fra kulturfiltratene ga heller ikke noen resultater.

Ved sammenligning av MS spekter mellom rent medium og de 11 isolatene ble det også observert store likheter. En tilsvarende sammenligning av rent medium med Casein pepton og Bacto™ pepton, samt isolater fra oppskaleringen og kulturfiltratanalysen ble også utført (figur 8).



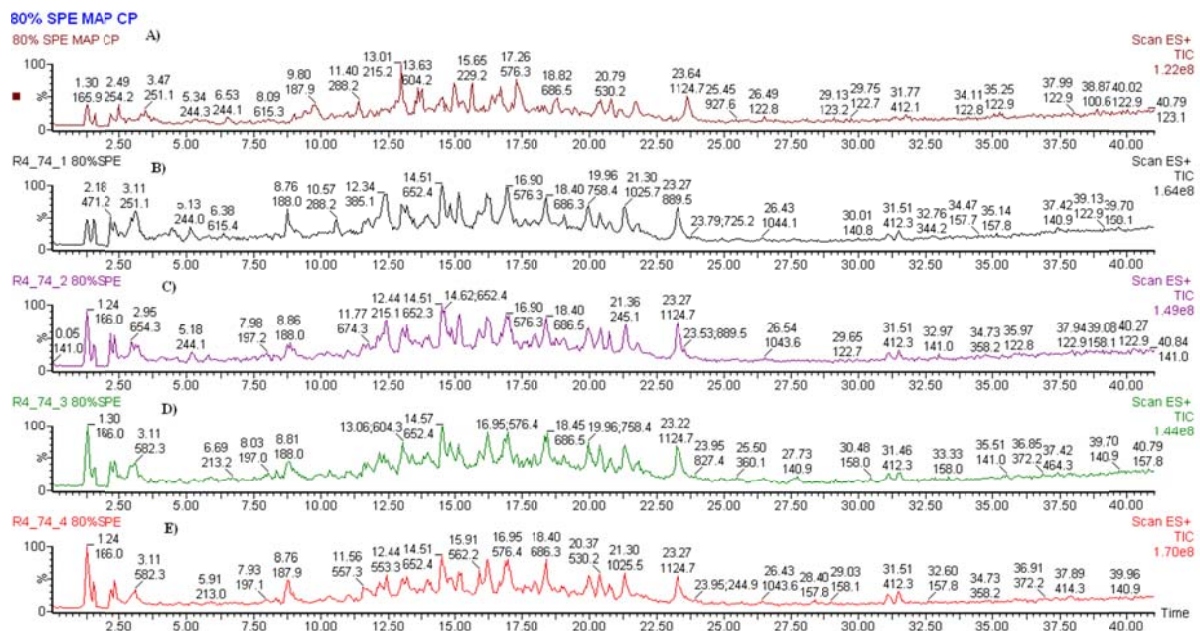
Figur 8: Sammenligning av MS spekter fra rent medium med Casein pepton (A) og isolat M09B197 (B) fra oppskaleringsanalysen, samt rent medium med Bacto™ pepton (C) og isolat M09B197 (D) fra kulturfiltratanalysen. Spekteret er hentet ut fra området 9-25 minutter.

MS spekter for rent medium med Casein pepton (8A) og isolat M09B197 var nær sammenfallende. De få observerte forskjellene gjaldt den relative intensiteten til noen av toppene som kom frem i spektrene. Dette sto i stor kontrast til spektrene for rent medium med Bacto™ pepton (figur 8C) og isolat M09B197 fra kulturfiltratanalysen (8D), hvor kun få topper korresponderte med hverandre. Figur 8 gjenspeiler også observasjonen at m/z-ioner funnet i oppskaleringsanalysen ikke samsvarte med dem funnet under den foregående kulturfiltratanalysen.

3.6 Vekstfaseanalyse

Hensikten med denne delen av oppgaven var å se om det var mulig å observere forskjeller i LC-MS profil hos prøver fra samme isolat høstet ved ulike tidspunkt i vekstfasen, og på denne måten se om det var mulig å anslå når i vekstfasen den interessante forbindelsen ble produsert. Valg av isolat M09B197 ble basert på den observerte veksthastigheten ved forsøk 2 og 3, der dette isolatet ble sett å nå en sen stasjonærfase etter to døgn

Antakelsen om at det skulle være mulig å observere tydelige forskjeller i tilstedeværelse i LC-MS profilene hos prøver høstet ved ulike tidspunkt av vekstsyklusen ble ikke bekreftet. Figur 9 viser kromatogrammer av rent medium og de fire prøvene som ble tatt ut i eksponentiellfasen, overgangen mellom eksponentiell/stasjonærfase og ved to tidspunkt senere i stasjonærfasen.

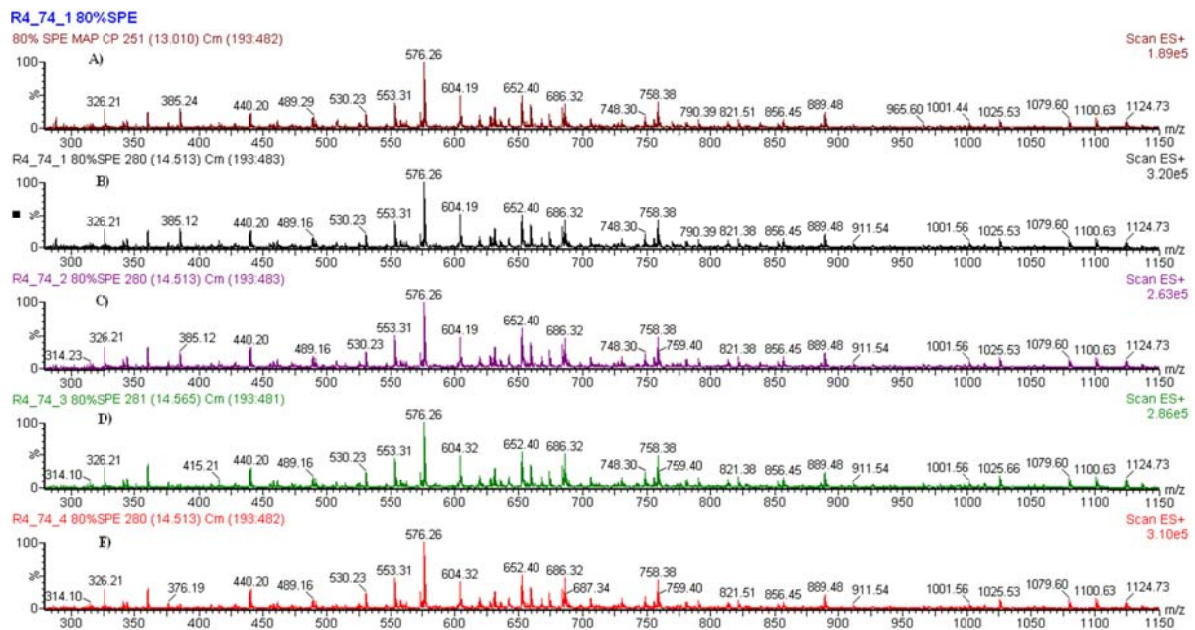


Figur 9: Kromatogrammer for rent medium (A) og for de fire prøvene tatt ut ved ulike tidspunkt i vekstsyklusen til isolat M09B197. B) prøve høstet under eksponentiell fase, C) overgangen til stasjonærfase, D) og E) tatt ut ved ulike tidspunkt under stasjonærfase.

De fire prøvene fra de ulike høstningstidspunktene B-E viser store likheter i kromatogramprofil og tilstedeværelse av de samme m/z-ionene. Ved sammenligning med rent medium (A) ble denne profilen sett å samsvare med den funnet for de ulike isolatene under oppskaleringanalysen. Årsak til dette var trolig at vekstfaseanalysen ble utført parallelt med oppskaleringen av isolater av interesse under forsøk 3. Av den grunn ble det også under dette

forsøket benyttet medium tilsatt pepton av kaseinopprinnelse for oppdyrking av isolat M09B197 i større skala.

Ved sammenligning av MS spekter (figur 10) ble det sett at clusteret i området 9-25 min besto av de samme toppene og at disse toppene var å finne igjen i MS spekteret til rent medium (A). Dette samsvarer med observasjoner etter sammenligning av MS spekter under oppskaleringanalysen (figur 8).



Figur 10: Sammenligning av MS spekter mellom rent medium (A) og de ulike prøvene tatt ut ved ulike tidspunkt i vekstfasen (B-E).

3.7 Ny analyse av isolat M09B197 ved bruk av Bacto™ pepton.

For å kunne se om utbytting av peptonkilden var årsaken til de avvikende resultatene under oppskaleringsanalysen og vekstfaseanalysen, ble isolat M09B197 på ny dyrket opp i flytende MAP-medium med Bacto™ pepton, som benyttet ved småskala kulturfiltratanalysen. Det ble utført to parallelle forsøk, ett som etterlignet kulturfiltratanalysen ved opparbeidelse av 5 ml småskalakultur og ett som simulerte oppskaleringsanalysen ved oppdyrking i 100 ml kultur og høsting ved sen stasjonærfase i henhold til OD₆₀₀ målinger. Samtidig ble også rent medium med Bacto™ pepton undersøkt på nytt.

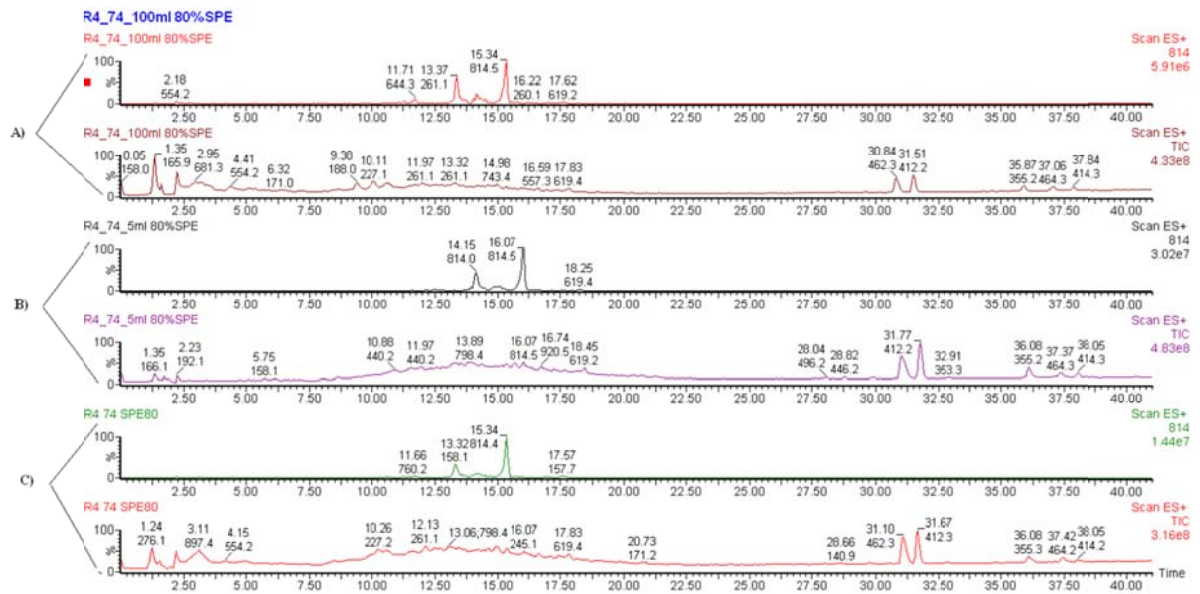
Etter høsting og tillagning av kulturfiltrater ble pH i de respektive prøvene målt (tabell 23). Dette for å få en indikasjon på om det kunne foregått en ulik grad av fermenteringsprosesser i de to dyrkingsvolumene som hadde resultert i ulik kulturfiltratprofil.

Tabell 23: pH verdier målt i de ulike prøvene etter høsting og tillagning av kulturfiltrater.

Prøve	pH
Medium med Bacto™ Peptone	7,1
M09B197 5 ml kultur	≈ 8
M09B197 100 ml kultur	≈7,7

pH målt i de to prøvene var noe høyere enn den målt i rent medium, men forskjellene mellom dyrkingsvolumene var ubetydelige. Det ble konkludert at veksten av isolat M09B197 ikke utviklet vesentlig forskjellig i reagensrøret og Erlenmeyer-kolben.

Kromatogram etter LC-MS av de to prøvene er oppstilt i figur 11.



Figur 11: Kromatogram av isolat M09B197 etter ny oppdyrking i flytende MAP medium med tilsatt Bacto™ pepton. A) kromatogram oppnådd etter simulering av forsøk 3 og B) etter simulering av forsøk 2. C) Kromatogram oppnådd etter den første kulturfiltratanalysen (forsøk 2) av isolat M09B197. Over de respektive kromatogram ser en det spesifikke søk etter m/z-ionet av interesse på 814 Da.

Figur 11 viser at ved å gå tilbake til bruk av Bacto™ pepton ble den samme kromatogramprofilen som oppnådd under kulturfiltratanalysen (forsøk 1) observert i de nye prøvene. Søk etter den spesifikke m/z-verdien til det interessante m/z-ionet på 814 Da viste at en også hadde fått reproduisert denne forbindelsen.

4 Diskusjon

4.1 Fylogenetisk tilhørighet av isolatene

Det store flertallet av isolater analysert i denne oppgaven skrev seg fra diverse svamper. Innhentede identitet opplysninger fra MarBank viste at de fleste isolatene tilhørte velkjente slekter innenfor ordenen γ -Proteobacteria. Spesielt ble slektene *Colwellia* sp., *Moritella* sp., og *Shewanella* sp., sett å være sterkt representert. Relativt få isolater som skrev seg fra andre klasser/rekker, hvorav de fleste ble sett å tilhøre klassen Flavobacteria (Bacteroidetes), mens de resterende representerte hhv familiene Microbacteriaceae (Actinobacteria) og Rhodobacteraceae (α -Proteobacteria), ett isolat fra hver familie. Alle isolatene fra sjøpungen *S. pulmonaria* tilhørte γ -proteobacteria, innen slekten *Psychromonas* sp., (4 isolater), *Shewanella* sp., (3 isolater), *Moritella* sp., og *Photobacterium* sp., (ett isolat i hver av de to sistnevnte).

Flere studier er utført for å identifisere bakteriesamfunn assosiert med ulike svamper, fra ulike geografiske regioner (Hentschel et al. 2002; Hill et al. 2006; Thiel et al. 2007; Kennedy et al. 2008; Meyer & Kuever 2008; Turque et al. 2008). Studiene har vist at representanter fra γ -Proteobacteria utgjør en stor del av det svamp-spesifikke bakteriesamfunnet. Det store flertall av γ -proteobacterieisolater fra svamper i denne studien samsvarer med disse funnene. I tidligere studier er det også funnet at svamp-spesifikke mikrobefund har en høy diversitet av Actinobacteria og α -Proteobacteria. Den lave andelen av isolater fra disse klassene i denne studien (ett isolat fra hver klasse), kan muligens forklares ved at det ble fokusert på isolater som var lett å kultivere, mens de tidligere studiene baserer seg på kultur-uavhengige tilnærminger. Bacteroidetes er også blitt sett å forekomme i mikrobefund i svamper fra ulike geografiske regioner (Hentschel et al. 2002; Hill et al. 2006; Thiel et al. 2007; Kennedy et al. 2008). Tilstedeværelsen av et fåtall isolater av denne klassen i denne studien samsvarer med resultater fra studiene av Hentschel *et. al.* (2002) og Kennedy *et. al.* (2008) hvor Bacteroidetes kun ble sett å representere en liten andel av det totale bakteriesamfunnet.

Isolater fra *S. pulmonaria* skrev seg kun fra slekter innen klassen γ -Proteobacteria. En studie utført av Riesenfeld *et. al.* (2008) fant at bakteriesamfunnet assosiert med *Synoicum adareanum* (antarktisk sjøpung) var særlig rikt på representanter for α - og γ -Proteobacteria. Noe som samsvarer med isolatene i denne oppgaven. Derimot viser andre studier at γ -Proteobacteria ikke er så godt representert i andre tunikater (Martínes-García et al. 2007; Tait

et al. 2007). Schuett *et. al.* (2005) fant i tråd med dette ingen γ -Proteobacteria til stede i vev, embryo eller larver fra *Diplosoma migras*.

De 12 isolatene identifisert i denne studien viste seg å samsvare med de påviste fylogenetiske gruppene i MarBank-samlingen. Flertallet viste seg å tilhøre slekter innen klassen γ -proteobakteriene, henholdsvis slektene *Colwellia* sp., *Shewanella* sp., *Moritella* sp., *Psychrobacter* sp., og *Aliivibrio* sp. Ett isolat ble sett å tilhøre familien Flavobacteria, og ble identifisert som en *Polaribacter* sp. Det ble også identifisert to isolater som tilhørte slekten *Thalassomonas* sp. Dette er en også en γ -proteobakterie fra ordenen Alteromonadales.

Classifier-funksjonen ved The Ribosomal Database Project viste seg å være pålitelig for å klassifisere 11 av isolatene ned til slektsnivå. Dette var gjennomgående samme taksonomiske rang som var bestemt ved MarBank ved hjelp av BLAST-søk for de øvrige isolatene som ble benyttet i denne oppgaven. Sikker identifisering på artsnivå vil normalt kreve fenotypiske tester i tillegg til 16S-rDNA-data (Bjarne Landfald, personlig meddelelse.), og ble ikke prioritert i dette arbeidet.

Fire isolater, derav ett som ble 16S-rDNA-sekvensert i dette arbeidet, viste seg ut fra Classifier-søk å tilhøre en gruppe γ -proteobakterier som hittil ikke er etablert som eget takson. Ut fra alignment i BLAST var høyeste sekvensidentitet 97% med en marin bakterie (stamme SCSWE24) isolert fra sjøvann i Sør-Kina-havet. Heller ikke de øvrige av de nærmest beslektede bakteriene ser ut til å være isolert fra invertebrate dyr (GenBank 2004; GenBank 2007; GenBank 2008; GenBank 2010; GenBank 2010). Dersom sekvenslikheten på 97% med SCSWE24 er representativ for hele 16S-rRNA-genet, indikerer dette at de to bakteriene bør plasseres i samme slekt, og muligens også samme art. Et mye benyttet kriterium for å kunne si at to 16S-rRNA sekvenser skriver seg fra samme art er en sekvensidentitet på minimum 97%, mens den tilsvarende verdien på slektsnivå ofte settes til 95% (Mardigan & Martinko 2006).

Da det ikke var mulig å plassere isolat M09B261 fylogenetisk lavere enn på klassenivå via RDP Classifier, ble det bestemt å konstruere et fylogenetisk tre for å se om det var mulig å oppnå en nærmere tilhørighet. Et utvalg av sekvensene med høyest identitet med M09B261, samt representanter for viktige ordner av marine γ -proteobakterier, ble inkludert i analysen. Antallet og lengden av sekvensene som ble benyttet i denne analysen (ca. 800 bp), er ikke tilstrekkelig for å kunne trekke en sikker konklusjon om plasseringen av M09B261 og SCSWE24 i forhold til de kjente fylogenetiske gruppene av γ -proteobakterier. Videre burde robustheten av den foreslåtte, neighbor-joining-baserte fylogenen også vært bekreftet med

alternative metoder, som eksempelvis maximum likelihood og maximum parsimony (Hall 2001). Til tross for disse svakhetene peker fylogeni-analysen mot at stamme M09B261 (og dermed også stammene M09B258-260) tilhører eller er nært beslektet med ordenen Pseudomonadales, som omfatter slekter som *Pseudomonas*, *Moraxella* og *Psychrobacter*, som også inkluderer mange marine stammer. *Psychrobacter* er representert med 6 isolater i denne studien. Stammene M09B258 til M09B261 ser derfor ut til å utgjøre et nytt takson som det ville vært interessant å karakterisere grundigere både genetisk og fenotypisk med sikte på registrering som en ny art.

4.2 Screening for synoxazolidinon A-C

Total ekstrakter av ti isolater fra *S. pulmonaria* ble screenet ved bruk av RP-HPLC- og HILIC-ESI-MS i positiv og negativ modus. Hensikt var å se om det var mulig å påvise noen av forbindelsene synoxazolidinon A, B og C isolert av Tadesse *et al.* (2010; 2011) fra vev av *S. pulmonaria*. Ingen av kromatogrammene som ble oppnådd etter de fire ulike HPLC-MS metodene ble funnet å inneha de spesifikke m/z-verdiene for de tre forbindelsene synoxazolidinon-forbindelsene A-C på hhv m/z 494,94, 260,98 og 492,92.

Fraværet av topper som svarte til synoxazolidinon A-C kan indikere at det er *S. pulmonaria* som er den faktiske produsenten av forbindelsene. På en annen side er bakterier som lever tett assosiert med invertebrate dyr særdeles spesialiserte til å nyttiggjøre seg ressursene fra det mikrohabitatet som verten tilbyr (Jensen & Fenical 1996) og de er godt tilpasset de fysiologiske forholdene inne i verten (Proksch *et al.* 2006). Kultivering av slike symbionter har derfor vist seg å være vanskelig, da ukjente vekstfaktorer, eller kopiering av vekstmiljøet for øvrig, kreves (Battershill *et al.* 2005; Proksch *et al.* 2006). De ti isolatene fra *S. pulmonaria* analysert i dette forsøket representerte stammer som var lett å kultivere og utgjorde sannsynligvis kun en liten andel av mikrofloraen i denne arten. Ut fra totalekstraktene fra de ti isolater som ble analysert i denne oppgaven kan det derfor ikke trekkes noen klar konklusjon om hvem som er den sanne produsenten – dyret selv eller mikroorganismene.

En kan heller ikke avskrive muligheten for at en av de ti isolatene som ble screenet produserte disse forbindelsene eller forbindelser som var metabolske forløpere for dem. Flere faktorer kontrollerer produksjonen av sekundærmetabolitter og hvilke faktorer som setter i gang syntesen, varierer fra mikrobe til mikrobe. Eksempler på regulerende faktorer er

veksthastighet, næringstilgang og enzyminduksjon (Demain 1992; 1998). Dette kan indikere at fraværet av m/z-ioner som svarte til synoxazolidinon A-C var et resultat av at isolatene var dyrket under forhold som ikke favoriserte produksjonen av eventuelle sekundær-metabolitter. Innenfor mikrobielle samfunn kan også kommunikasjon mellom bakterier indusere dannelsen av spesielle forbindelser (Knight et al. 2003). Det kan derfor tenkes at eventuell mikrobiell produksjon av synoxazolidinon A-C er avhengig av signalstoffer og/eller enzymindusorer som er tilstede i mikrohabitatet verten tilbyr. Det kan også tenkes at signalisering mellom mikrober og verten kan spille inn på produksjonen av synoxazolidinon A-C.

Sesongvariasjoner og variasjoner mellom ulike vekstmiljø kan påvirke på den kjemiske sammensetningen i organismer. Problemer knyttet til repetering av analyser eller ny opprensing av en tidligere isolert forbindelse kan derfor oppstå (Li & Vederas 2009). Prøven av *S. pulmonaria* som isolatene analysert i denne oppgaven var hentet fra (kysten av Bjørnøya, mai 2009), var fra en lang nordligere lokalitet enn materialet analysert av Tadesse *et. al.* (2008) (kysten utenfor Tromsø, i perioden november 2005 til april 2006). Det kan tenkes at evnen til produksjon av synoxazolidinon A-C viser en grad av geografisk og/eller sesongmessig variasjon, enten det gjelder invertebraten eller mikrobene. Synoxazolidinon A-C ble heller ikke påvist i ekstrakter av *S. pulmonaria* samlet fra kysten av Bjørnøya (Tor Haug, personlig meddelelse). Dersom synoxazolidinon A-C er mikrobielt produsert, kan fraværet av forbindelsene i totalekstraktene til de ti isolatene også være et resultat av at sammensetningen av symbiotiske mikroorganismer varierte mellom de to lokalitetene.

4.3 Etablering av protokoll for LC-MS-analyse av kulturfiltrater

Ut fra kromatogrammene fra totalekstraktanalysen ble en fast metodikk utviklet for analyser av kulturfiltrater i forsøk 2-5. Målet var å oppnå best mulig separering og detektering av forbindelser. RP-HPLC-MS-ESI⁺ ble ansett for å være den beste metoden for videre analyse.

RP-HPLC ble sett å gi en bedre separering av forbindelser enn HILIC. Den utilfredsstillende separeringen av polare forbindelser ved bruk av HILIC kolonnen kan være en effekt av mobilfasebetingelsene. På grunn av den spesielle retensjonsmekanismen i HILIC-kolonner anbefales det at mobilfasen består av minimum 5% av den polare komponenten (vann) (Grumbach et al. 2004). I denne oppgaven besto den initielle mobilfasen ved gradient-elueringen av kun 1% vann. Dette har kunnet hindre optimal retensjon av de polare forbindelsene i prøvematerialet, slik at flere forbindelser er eluert ut av kolonnen til noenlunde samme retensjonstid og resultert i de brede toppene som ble observert i

kromatogrammene. Bruken av TFA som ionepars-reagens i mobilfasen kan også ha påvirket retensjonen. I en studie av Strege (1998), ble HILIC i kombinasjon med ESI-MS benyttet for analyse av naturstoffekstrakter. Det ble her observert at TFA ga svak retensjon av naturstoffene, sannsynligvis på grunn av ioneparings effekter som minker den hydrofile karakteren til forbindelsene. Ved HILIC, hvor mobilfasen har en høy prosentandel organisk løsemiddel, bør prøvematerialet være løst opp i det tilsvarende organiske løsemiddelet så langt det lar seg gjøre (Grumbach et al. 2004). Grumbach *et. al.* (2004) fant at formen på topper ble forbedret dersom prøvematerialer ble løst i den svakere elueringsvæsken. I denne oppgaven ble prøvematerialet løst opp i vann, som i tilfellet for HILIC er den sterke elueringsvæsken. Dette kan være en mulig årsak til den uregelmessige formen på toppene observert i HILIC kromatogrammene.

Detektering av topper ble sett å være bedre ved bruk av ESI⁺ modus under RP-HPLC-MS. Dette var derfor den ioniseringsmetoden som ble valgt å benytte videre. Liten grad av detektering av ioner under ESI⁻ kan komme av at mobilfasen var tilsatt TFA. TFA benyttes ofte ved separering av peptider, og tilsettes for sin egenskap som ionepars-reagens og for å hindre at det oppstår sekundære retensjonseffekter av peptider til stasjonærefasen i RP-HPLC-kolonner (Niessen 2006). Tilsetting av TFA danner sur pH i løsninger, som vil føre til dannelse av positive ioner av prøvematerialet. Det kan derfor tenkes at en hadde fått bedre detektering av ioner under ESI⁻ dersom en hadde tilsatt et annet hjelpemiddel til løsningen som dannet negative ioner i prøvematerialet.

4.4 Screening for sekundærmetabolitter i kulturfiltrater

Kulturfiltrater fra 81 isolater fra ulike svamper og sjøpungen *S. pulmonaria* ble screenet ved kjøring av RP-HPLC-MS-ESI⁺. Hensikten var å se om en kunne identifisere isolater som var mulige produsenter av sekundærmetabolitter ved å sammenligne LC-MS profiler.

Kromatogrammer oppnådd for de enkelte isolater ble sammenlignet seg i mellom, og med kromatogrammer for rent medium og kontrollstammene *E. coli* og *P. aeruginosa*.

Laborierstammer av de to sistnevnte har ikke dokumentert produksjon av sekundærmetabolitter.

Gruppering av de 324 opprinnelig detekterte m/z-ionene med høyest intensitet indikerte tilstedeværelse av 85 ulike forbindelser i de 81 isolatene, derav 72 forbindelser som var til stede i to eller flere isolater. Det var ikke mulig å påvise at bestemte metabolitter var karakteristiske for stammer klassifisert til samme slekt. Fordelingen var derimot ganske ujevn

ved at enkelte isolater innenfor en spesifikk slekt viste større grad av mangfold av forbindelser enn andre innenfor samme slekten. Det ble også observert isolater som ikke inneholdt noen m/z-ioner over m/z 300.

En mulig årsak til den ujevne fordelingen av m/z-ioner er at en ikke hadde kjennskap til de ulike stammenes krav til vekstbetingelser på forhånd. Isolatene, også innenfor samme slekt, viste stor variasjon i veksthastighet ved oppdyrking i standard marint medium. Dette har kunnet resultere i at bakteriekulturer er blitt høstet i ulike vekstfaser av sine respektive vekstsykluser. Dette kan ha hatt innvirkning på kromatogramprofilen til enkelt isolater.

En kan derimot ikke utelukke at noen av de 85 forbindelsene ble produsert av flere isolater enn det som ble registrert ved kromatografianalysen, sidenkun høyintensitets m/z-ioner ble medregnet under registreringen av de opprinnelige 324 m/z-ionene. En kan derfor ha oversett tilsvarende lavintensitets m/z-ioner i enkelte kromatogrammer. En annen mulig årsak er at høyintensitets m/z-ioner som tilsvarte mediekomponenter har kamuflert tilstedeværelsen av forbindelser i lave konsentrasjoner. Basert på kromatogrammene ble ingen m/z-ioner registrert ved senere retensjonstid enn m/z-ionene i mediet ved ca. 45 min. En mulig måte for å få en bedre separasjon og oppløsning av m/z-ioner i clusteret som eluerte ut mellom 10-20 min hadde vært å prøve en annen, slakkere gradient.

Til tross for den store variasjonen av m/z-ioner innen de ulike fylogenetiske gruppene, var den etablerte metoden gjennomførbar, siden likheter i kromatogramprofiler muliggjorde sammenligning og registrering av m/z-ioner med høy intensitet. Metoden gjorde det også mulig å identifisere 11 isolater som ble påvist å ha unike m/z-ioner som kun var tilstede i de respektive isolatenes kromatogram. Av disse isolatene tilhørte 6 slektene *Colwellia* sp., *Moritella* sp., og *Shewanella* sp. Psykrofile stammer fra disse slektene kjent for å produsere flerumettede fettsyrer (Fang & Kato 2007). Et isolat som skrev seg fra slekten *Tenacibaculum* sp., ble også sett å inneha et unikt, høyintensitets m/z-ion. Jang *et. al.* (2007) isolerte fire hydroxamat siderophorer, kalt Tenacibactin A-D, fra en uidentifisert stamme innen slekten *Tenacibaculum* sp. Spesielt *T. maritimus* forårsaker tenacibaculose som er et sykdomsproblem innen akvakultur over hele verden. I tillegg ble interessante ioner funnet hos et isolat som skrev seg fra familien Flavobacteriaceae og et isolat fra klassen γ -Proteobacteria.

Hvorvidt de unike m/z-ionene som ble detektert er reelle sekundærmetabolitter er ennå ukjent. På grunn av den store variasjonen av m/z-ioner innen de respektive slektene kan en ikke se

bort fra muligheten for at de m/z-ionene som ble registrert som unike egentlig representerte metabolitter som også ble produsert av en eller flere av de andre fylogenetiske gruppene ved de rette vekstbetingelsene. For å teste dette kunne en utført flere parallelle forsøk, hvor det ble lagt til rette for mer kontrollert vekst. Dette kunne også vært utført for å teste reproduserbarheten til metabolittprofilene. Videre kunne det vært interessant å fastslå hvilke metabolitter som er detektert. Dette kunne for eksempel blitt utført ved bruk av høyoppløsnings MS. Denne teknologien gjør det mulig å bestemme den nøyaktige massen til protonerte molekyler, og ut fra det bestemme elementsammensetningen til ukjente forbindelser (Russell & Edmondson 1997; Koehn & Carter 2005). Søk på elementsammensetning opp mot ulike kjemiske databaser kan så gi informasjon om metabolittene er nye (Koehn & Carter 2005). For endelig å fastslå strukturen på metabolittene må man imidlertid også utføre analyser som tandem massespektrometri (MS/MS), kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi, infrarød spektroskopi (IR), UV-spektroskopi og liknende (Koehn & Carter 2005; Crews et al. 2010).

4.5 Effekt av endret mediesammensetning

For å opparbeide større kvanta av de interessante m/z-ionene funnet ved småskala kulturfiltratanalysen ble 11 isolater dyrket opp i 100 ml kulturer. Det ble tatt sikte på best mulig reproduserbarhet fra småskalaforsøkene ved å holde betingelsene for SPE-elueringen (80% ACN) og LC-MS-analysen (RP-HPLC-MS-ESI⁺) uforandret.

De oppskalerte dyrkingene ga imidlertid radikale forandringer i kromatogramprofilene. En rekke topper som ikke korresponderte med noen av m/z-ionene funnet under småskala kulturfiltratanalysen dukket opp.

Utenom volumendringene var eneste åpenbare forandring at Bacto™ pepton, som ble benyttet som nitrogenkilde under småskala kulturfiltratanalysen ble byttet ut med Casein pepton. Den avgjørende betydningen av dette ble støttet av at LC-MS profilen for rent medium også ble sterkt endret. Videre ble det observert at de fleste m/z-ionene i kulturfiltrat med Casein pepton som også var til stede i medieprofilen, mens andelen medietopper var langt lavere med Bacto™ pepton.

De mest interessante m/z-ionene fra småskala kulturfiltratanalysen ble ikke funnet igjen etter oppskaleringen. Dette kommer mest sannsynlig av forandringen i mediesammensetningen. Komplekse naturlige nitrogenkilder, som peptoner, er gode kilder til sekundærmetabolittproduksjon, men sammensetningen av peptider og aminosyrer kan være avgjørende (Demain

1992; Knight et al. 2003). Det kan synes som om produksjonen av de interessante m/z-ionene ble negativt påvirket av aminosyresammensetningen i Casein pepton.

Både Bacto™ pepton og Casein pepton benyttet under forsøket er basert på enzymatisk hydrolyse av proteiner. Forskjellen mellom dem er at proteinkilden og bruken av henholdsvis pepsin ved tillagning av Bacto™ pepton fra animalsk protein og trypsin for produksjon av Casein pepton fra melkeproteiner (Merck 2007; Zimbro et al. 2009) De to produktene representerer derfor en kilder til ulike frie aminosyrer og løselige peptider av varierende lengde. I hvilken grad isolatene var i stand til å benytte de forskjellige aminosyrene eller peptidene er uavklart. Alternativt kan isolatene ha benyttet seg av pepton og gjærekstrakt som alternativ nitrogenkilde, da dette er ingredienser i Difco™ Marine Broth som også inngikk i mediene (Zimbro et al. 2009).

For å kunne bekrefte årsaken til endringene i LC-MS profilene, ble ett isolat dyrket opp på nytt i flytende MAP-medium med Bacto™ pepton. Et forsøk ble satt opp for å simulere småskala kulturfiltratanalysen, og ett for å simulere oppskaleringen. Det ble for de to parallelle forsøkene sett at LC-MS profilen observert etter småskala kulturfiltratanalysen var blitt gjenopprettet. Dette bekreftet at endringen av mediasammensetningen var den avgjørende faktoren for endringene i LC-MS profilene, og at selve oppskaleringen var av minimal betydning. Ut fra pH målinger i de respektive prøvene ble det også konkludert med at endringer i LC-MS profil ikke var et resultat av at det hadde foregått ulik grad av fermenteringsprosesser i de to dyrkingsvolumene.

4.6 Vekstfaseanalyse

For å se om det var mulig å observere forskjeller i LC-MS-profil hos prøver tatt ut ved ulike tidspunkt under veksten, ble fire prøver av isolat M09B197 tatt ut ved ulike tidspunkt i vekstsyklusen, dvs. i eksponentialfasen, ved overgangen til stasjonærfase og på to til ulike tidspunkt i stasjonærfasen. Casein pepton ble brukt som peptonkilde også i dette forsøket.

I likhet med oppskaleringsforsøket ble det observert store likheter i kromatogramprofil mellom de ulike prøvene, samt tilstedeværelse av de samme m/z-ionene. Ved sammenligning med medieprofilen ble det klart det også her var en klar dominans av medietopper.

De overraskende store likhetene i LC-MS profilene mellom prøveuttakene i denne analysen indikerte det samme som oppskaleringsforsøket, at Casein pepton påvirket profilen til

kulturfiltratprøvene i mindre grad enn Bacto™ pepton. Casein pepton synes derfor mindre egnet til bruk i et generelt screening-medium for sekundærmetabolitter enn Bacto™ pepton.

Den klare dominansen av mediekomponenter i LC-MS spektrene, som var særlig markant med Casein pepton som ingrediens, indikerte at en stor andel av det organiske materialet i mediet ikke var omsatt til produkter i energimetabolismen, selv i fullt utvokste bakteriekulturer. Siden dette fenomenet var gjennomgående, til tross for den fylogenetiske variasjonen i forsøksmaterialet, tyder det på at en essensiell vekstkomponent var universelt begrensende. Det er imidlertid ikke gitt at den samme komponenten var begrensende med de to pepton-produktene, siden LC-MS-profilene til kulturfiltratene ble såpass forskjellige

I likhet med resultater etter oppskaleringsanalysen, ble ikke target-toppen på 814 Da funnet hos isolat M09B197 gjenkjent under vekstfaseanalysen. Dette kan komme av en negativ påvirkning av aminosyrekomponenter i Casein pepton.

4.7 Konklusjon

I arbeidet med denne oppgaven ble småskala kulturfiltrater fra bakterieisolater hentet fra ulike svamper og sjøpungen *S. pulmonaria*, screenet for å se om det var mulig å påvise produsenter av sekundærmetabolitter ved sammenligning av LC-MS kromatogrammer.

Den etablerte LC-MS metoden for screening av et stort antall kulturfiltrater gjorde det mulig å sammenligne og registrere ett stort antall høyintensitets m/z-ioner. Mangelen på kunnskap om de enkelte isolatenes krav til vekstbetingelser var trolig en av årsakene til den observerte variasjonen av m/z-ioner innen de ulike fylogenetiske gruppene. For videre å benytte denne metoden bør det legges til rette for å bedre å møte isolatenes krav til vekstbetingelser, spesielt tilrettelegge for mer kontrollert vekst og høsting av bakteriekulturer ved samme tidspunkt i isolatenes vekstsykluser.

Av de 81 dyrkbare bakterieisolatene ble det påvist 13 unike m/z-ioner produsert av 11 ulike isolater. Basert på variasjonen av m/z-ioner innen de ulike slektene var det ikke mulig å trekke en klar konklusjon om disse m/z-ionene faktisk representerte sekundærmetabolitter, eller metabolitter som også ble produsert av andre isolater i mindre kvanta. Grunnet den store påvirkningen av endret mediesammensetning ved oppskaleringen kunne ikke reproduserbarheten eller identiteten til de unike m/z-ionene fastslås.

Det var også et mål med oppgaven å se om forbindelsene synoxazolidinon A-C, isolert fra sjøpungen *S. pulmonaria*, kunne gjenfinnes i kromatogrammer av totalekstrakter fra ti isolater

som skrev seg fra den samme arten, hentet ut ved en annen lokalitet. Ingen av kromatogrammene fra de ti totalekstraktene ble sett å inneha de spesifikke m/z-verdiene for synoxazolidinon A-C. Hvem som er den sanne produsentene av disse forbindelsene ble derfor ikke avklart. Produksjonen av sekundærmetabolitter er kontrollert av flere faktorer som muligens ikke ble møtt ved oppdyrkingen av isolatene. Samtidig kan geografiske og/eller sesongmessige variasjoner ha påvirket produksjonen av de tre forbindelsene, enten i invertebraten selv eller i bakteriene.

5 Referanser

- Battershill, C., Jaspars M., et al. (2005). Marine biodiscovery: new drugs from the ocean depths. *Biologist* **52**(2): 107-114.
- Bentley, S. D., Chater K. F., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics* **58**(1): 1-26.
- Bull, A. T. & Stach J. E. M. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TRENDS in Microbiology* **15**(11): 491-499.
- Cavalier-Smith, T. (1992). Origins of secondary metabolism. *Secondary metabolites: their function and evolution*. D. J. Chadwick and J. Whelan (Eds). London, John Wiley & Sons, Ltd. . **171**: 64-87.
- Colegate, S. M. & Molyneux R. J., Eds. (1993). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. Boca Raton, FL., CRC Press.
- Crews, P., Rodriguez J., et al. (2010). *Organic structure analysis*. New York. ,2nd ed., Oxford University Press.
- Demain, A. L. (1992). Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Secondary metabolites: their function and evolution*. D. J. Chadwick and J. Whelan (Eds). London, John Wiley & Sons Ltd. . **171**: 3-23.
- Demain, A. L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *Intenatl Mikrobiol* **1**: 259-264.
- Donia, M. & Hamann M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis* **3**: 338-348.
- Fang, J. & Kato C. (2007). FAS or PKS, lipid biosynthesis and stable carbon isotope fractionation in deep-sea piezophilic bacteria. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Eds), Formatex 190-200.
- Faulkner, D. J. (2002). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **19**: 1-48.
- Fenical, W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Chem. Rev.* **93**: 1673-1683.
- GenBank (2004). "Marine gamma proteobacterium HTCC2143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession number AY386333." Retrieved 13.05, 2011, from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/37528791?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=10&RID=WTV4ZS7D016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/37528791?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=10&RID=WTV4ZS7D016).

GenBank (2007). "Gamma proteobacterium CL-SK8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession number EF988630." Retrieved 13.05, 2011, from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/152014437?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=11&RID=WTV4ZS7D016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/152014437?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=11&RID=WTV4ZS7D016).

GenBank (2008). "Gamma proteobacterium SCSWD20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession number FJ461470." Retrieved 13.05, 2011, from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/218203808?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=15&RID=WTV4ZS7D016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/218203808?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=15&RID=WTV4ZS7D016).

GenBank (2010). "Bacterium SCSWE24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession number HQ686140." Retrieved 13.05, 2011, from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HQ686140.1?report=genbank&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HQ686140.1?report=genbank&log$=seqview).

GenBank (2010). "Gamma proteobacteria PZ-5 gene for 16S rRNA, partial sequence. Accession number AB545809." Retrieved 13.05, 2011, from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/307133510?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=13&RID=WTV4ZS7D016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/307133510?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=13&RID=WTV4ZS7D016).

Griffiths, A. J. F., Wessler S. R., et al. (2008). *Introduction to genetic analysis*. New York, 9th ed., Freeman & Company.

Grumbach, E. S., Wagrowski-Diehl D. M., et al. (2004). Hydrophilic Interaction Chromatography using silica columns for the retention of polar analytes and enhanced ESI-MS sensitivity. *LCGC North America* **22**: 1010-1023.

Hall, B. G. (2001). *Phylogenetic trees made easy: a how to manual for molecular biologists*. Massachusetts, USA. ed., Sinauer Associates, Inc. .

Haslam, E. (1995). Secondary metabolism - evolution and function: products or processes? *Chemoecology* **2**: 89-95.

Hentschel, U., Hopke J., et al. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(9): 4431-4440.

Hentschel, U., Usher K. M., et al. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 167-177.

Hill, M., Hill A., et al. (2006). Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). *Marine Biology* **148**: 1221-1230.

Hoffmann, E. & Stroobant V. (2007). *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Ltd. .

Jang, J.-H., Kanoh K., et al. (2007). Tenacibactins A-D, Hydroxamate Siderophores from a Marine-Derived Bacterium, *Tenacibaculum* sp. A4K-17. *J. Nat. Prod.* **70**: 563-566.

Jensen, R. P. & Fenical W. (1996). Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *Journal of industrial microbiology* **17**: 346-351.

- Kell, D. B., Brown M., et al. (2005). Metabolic Footprinting and Systems Biology: the Medium is the Message. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 557-565.
- Kennedy, J., Codling C. E., et al. (2008). Diversity of microbes associated with the marine sponge, *Haliclona simulans*, isolated from Irish waters and identification of polyketide synthase genes from the sponge metagenome. *Environmental Microbiology* **10**(7): 1888-1902.
- Knight, V., Sanglier J. J., et al. (2003). Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 446-458.
- Koehn, F. E. & Carter G. T. (2005). The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery. *Nature* **4**: 206-220.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 245-251.
- Li, J. W. H. & Vederas J. C. (2009). Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* **325**: 161-165.
- Mardigan, M. T. & Martinko J. M. (2006). *Brock biology of microorganisms*, 11th ed., Pearson Education, Inc. .
- Martens, T., Gram L., et al. (2007). Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microb Ecol* **54**: 31-42.
- Martínez-García, M., Díaz-Valdés M., et al. (2007). Cytotoxicity of the Ascidian *Cystodytes dellechiajei* against tumor cells and the study of the involvement of associated microbiota in the production of cytotoxic compounds. *Marine Drugs* **5**: 52-70.
- Merck (2007). "Peptone from Casein , pancreatic, granulated " Merck Microbiology Manual 12th Edition. from http://www.merck-chemicals.com/norway/peptone-from-casein/MDA_CHEM-107213/p_kG2b.s1LLdkAAAEWVOEfVhTl;sid=k1MlkRVE7G8jkViJl14wxr2EQFCgit1QVHwbtrqFtmPIYAVYkIrYqTxDsqc81UXH0R0EZQwAQFCgisZHFkwbtqF?attachments=APL.
- Meyer, B. & Kuever J. (2008). Phylogenetic diversity and spatial distribution of the microbial community associated with the Caribbean deep-water sponge *Polymastia* cf. *corticata* by 16S rRNA, *AprA*, and *amoA* gene analysis. *Microb Ecol* **56**: 306-321.
- Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed., John Wiley and Sons, Ltd. Publication.
- MoBioLaboratories (2010). "PowerSoil DNA Isolation Kit. Version 08202010." Retrieved 14.05, 2011, from <http://www.mobio.com/soil-dna-isolation/powersoil-dna-isolation-kit.html>.
- Niessen, W. M. A. (2006). *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*. Boca Raton, FL, 3rd ed., Taylor & Francis Group.

- Piel, J., Hertweck C., et al. (2000). Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate '*Streptomyces maritimus*': evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase. *Chemistry & Biology* **7**: 943-955.
- Proksch, P., Edrada R., et al. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 125-134.
- Proksch, P., Edrada R., et al. (2006). Implications of Marine Biotechnology on Drug Discovery. *Frontiers in Marine Biotechnology*. P. Proksch and W. E. G. Müller (Eds). England, Horizon Bioscience: 1-19.
- Qiagen (2006). "DNeasy Blood & Tissue Handbook." Retrieved 14.05, 2011, from <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissuesystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t2>.
- Qiagen (2008). "Qiaquick Spin Handbook." Retrieved 14.05, 2011, from <http://www.qiagen.com/Products/DnaCleanup/GelPcrSiCleanupSystems/QIAquickPCRpurificationKit.aspx?r=926>.
- Riesenfeld, C. S., Murray A. E., et al. (2008). Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the Palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*. *J. Nat. Prod.* **71**: 1812-1818.
- Russell, D. H. & Edmondson R. D. (1997). High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **32**: 263-276.
- Salomon, C. E., Magarvey N. A., et al. (2004). Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **21**: 105-121.
- Schuett, C., Doepke H., et al. (2005). Diversity of intratunical bacteria in the tunic matrix of the colonial ascidian *Diplosoma migrans*. *Helgol Mar Res* **59**: 136-140.
- Snyder, L. R., Kirkland J. J., et al. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Publication
- Strege, M. A. (1998). Hydrophilic interaction chromatography - elektrospray mass spectrometry analysis of polar compounds for natural products drug discovery. *Anal. Chem.* **70**: 2439-2445.
- Strohl, W. R. (2004). Antimicrobials. *Microbial Diversity and Bioprospecting*. A. T. Bull (Eds). Washington D.C., ASM Press: 336-355.
- Suzuki, M. T. & Giovannoni S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(2): 625-630.

- Synnes, M. (2007). Bioprospecting of organisms from the deep sea: scientific and environmental aspects. *Clean Techn Environ Policy* **4**: 53-59.
- Tadesse, M., Gulliksen B., et al. (2008). Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *J. Invertebr. Pathol.* **99**: 286-293.
- Tadesse, M., Strøm M., et al. (2010). Synoxazolidinones A and B: Novel bioactive alkaloids from the Ascidian *Synoicum pulmonaria*. *Organic Letters* **12**(21): 4752-4755.
- Tadesse, M., Svenson J., et al. (2011). Synoxazolidinone C: a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. *Tetrahedron Letters* **52**(15): 1804-1806.
- Tait, E., Carman M., et al. (2007). Phylogenetic diversity of bacteria associated with ascidians in Eel Pond (Woods Hole, Massachusetts, USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **342**: 138-146.
- Tan, L. T. (2007). Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* **68**: 954-979.
- Thiel, V., Neulinger S. C., et al. (2007). Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 47-63.
- Turque, A. S., Cardoso A. M., et al. (2008). Bacterial communities of the marine sponge *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology* **155**: 135-146.
- Uria, A. & Piel J. (2009). Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. *Phytochem. Rev* **8**: 401-414.
- Vinning, L. C. (1992). Roles of microbial secondary metabolites from microbes. *Secondary metabolites: Their function and evolution*. D. J. Chadwick and J. Whelan (Eds). London, John Wiley & Sons, Ltd. **171**: 184-198.
- Zhang, H., Lee Y. K., et al. (2006). Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**: 159-169.
- Zimbro, M. J., Power D. A., et al. (2009). Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media D. a. C. Becto. Sparks, Maryland, USA.