

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**MELNĀ PLŪŠKOKA (*SAMBUCUS NIGRA* L.)
IN VITRO ŠŪNU SUSPENSIJU KULTŪRU OPTIMIZĀCIJA
ANTIBAKTERIĀLU EKSTRAKTU IEGŪŠANAI**

BAKALaura DARBS

Autore: **Laura Balode**

Stud. apl. nr. *lb21137*

Darba vadītāja: docente, *Dr. biol.* Anete Boroduške

Darba vadītājs: pētnieks, *Mag. biol.* Māris Senkovs

RĪGA 2024

Kopsavilkums

Melnais plūškoks (*Sambucus nigra*) ir bagāts ar flavonoīdiem, kam piemīt antimikrobiāla aktivitāte. Nav zināms, vai šī īpašība piemīt *S. nigra in vitro* šūnu suspensijām.

Tika izvērtēta gaismas intensitātes un elicitēšanas ar flg22 ietekme uz šūnu suspensiju kopējo flavonoīdu (TFC) un antociānu (TAC) saturu, flavonoīdu biosintēzes gēnu ekspresiju un antibakteriālo aktivitāti pret četriem mutes dobuma mikrobiotas patogēniem.

Iegūtie rezultāti parāda, ka *S. nigra* šūnu suspensijas, kas elicitētas ar flg22 vai kultivētas 200–250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, uzrāda augstāko aktivitāti pret *B. licheniformis*. Kultivēšana 400–450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ļauj iegūt lielāku TFC un TAC, taču elicitēšana ar flg22 šo savienojumu saturu nepaaugstina. *S. nigra* suspensiju kultūras, kuras tika audzētas bioreaktoros, uzrādīja zemāku produktivitāti, salīdzinot ar kultivāciju kolbās.

Atslēgvārdi: *Sambucus nigra*, *in vitro* šūnu suspensiju kultūras, antibakteriālās īpašības, flavonoīdi, elicitori.

Summary

Optimization of black elder (*Sambucus nigra* L.) *in vitro* cell suspension cultures to obtain antibacterial extracts

Black elderberry (*Sambucus nigra*) is a rich source of flavonoids with antimicrobial activity. It is not known whether these properties are also present in *S. nigra in vitro* cell suspensions.

The influence of light intensity and elicitation with flg22 on cell suspension extracts flavonoid (TFC) and anthocyanin (TAC) content, expression of genes involved in flavonoid biosynthesis and antibacterial activity against four oral microbiota pathogens was evaluated.

The obtained results show that *S. nigra* cell suspensions elicited by flg22 or cultivated at 200–250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ are the most effective against *B. licheniformis*. Cultivation at 400–450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ result in higher TFC and TAC, but eliciting with flg22 do not increase the content of those. *S. nigra* suspension cultures grown in bioreactors showed lower productivity compared to flasks.

Keywords: *Sambucus nigra*, *in vitro* cell suspension cultures, antibacterial properties, flavonoids, elicitors.

Saturs

Apzīmējumu un saīsinājumu saraksts	5
Ievads	6
1. Literatūras apskats	7
1.1. Bioplēvju nozīme cilvēka mutes dobumā.....	7
1.2. Augi kā antimikrobiālu savienojumu avots.....	7
1.3. <i>S. nigra</i> raksturojums un bioloģiski aktīvās īpašības.....	8
1.4. <i>Sambucus</i> inhibējošā ietekme uz bioplēvju veidojošām baktērijām.....	9
1.5. Flavonoīdi.....	11
1.6. Flavonoīdu biosintēzes ceļš.....	12
1.7. Augu audu un šūnu kultūras kā izejviela vērtīgu savienojumu iegūšanai.....	13
1.8. Sekundāro metabolītu inducēšana augu <i>in vitro</i> kultūrās.....	14
1.8.1. Gaisma kā flavonoīdu sintēzes ierosinātājs.....	14
1.8.2. Flagellīna peptīds kā flavonoīdu sintēzes ierosinātājs.....	15
2. Materiāli un metodes	16
2.1. Materiāli.....	16
2.2. Metodes.....	21
2.2.1. Barotņu pagatavošana.....	22
2.2.2. Eksperimenti ar <i>S. nigra</i> šūnu suspensiju kultūrām.....	22
2.2.3. Sekundāro metabolītu noteikšana ekstraktos.....	23
2.2.4. Ekstraktu antibakteriālās aktivitātes noteikšana.....	24
2.2.5. <i>S. nigra</i> gēnu ekspresijas noteikšana.....	26
2.2.6. <i>S. nigra</i> šūnu suspensiju mērogošana bioreaktoros.....	32
2.2.7. Datu apstrāde.....	32
3. Rezultāti	33
3.1. Elicitoru ietekme uz <i>S. nigra</i> šūnu suspensiju biomamas pieaugumu.....	33
3.2. Elicitoru ietekme uz TFC un TAC <i>S. nigra</i> šūnu suspensiju ekstraktos.....	34
3.3. <i>S. nigra</i> ekstraktu antibakteriālā iedarbība.....	35
3.4. Gēnu ekspresija.....	39
3.5. <i>S. nigra</i> šūnu suspensiju produktivitāte dažādos kultivēšanas tilpumos.....	42
4. Diskusija	43
4.1. <i>S. nigra</i> ekstraktu antibakteriālā aktivitāte.....	43
4.2. <i>S. nigra</i> ekstraktu kopējais flavonoīdu un antociānu saturs.....	44
4.3. <i>S. nigra</i> gēnu ekspresija.....	45
4.4. <i>S. nigra</i> šūnu suspensiju eksperiments bioreaktoros.....	46
4.5. Turpmākie pētījumi.....	47
5. Secinājumi	48
6. Pateicības	49
7. Literatūras saraksts	50
PIELIKUMI	59

Apzīmējumu un saīsinājumu saraksts

cDNS – komplementārā DNS (*complementary DNA*)

Cyn-3-Glu – cianidīna-3-glikozīds (*cyanidin-3-O-glucoside*)

ddH₂O – dubultā destilēts ūdens (*double distilled water*)

DNS – dezoksiribonukleīnskābe (*deoxyribonucleic acid*)

DW – sausā masa (*dry weight*)

FDA – fluoresceīna diacetāts (*fluorescein diacetate*)

Flg22 – flagellīns 22 (*flagellin 22*)

FW – svaigā masa (*fresh weight*)

MBC – minimālā bakteriostatiskā koncentrācija (*minimum bacteriostatic concentration*)

MES – 2-(N-morfolino)etānsulfonskābe (*2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*)

MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija (*minimum inhibitory concentration*)

MS – barotne pēc Murashige & Skoog (1962)

NAA – 1-naftalīnetiķskābe (*1-naphthaleneacetic acid*)

NFH₂O – nukleāzes nesaturošs ūdens (*nuclease-free water*)

OD – optiskais blīvums (*optical density*)

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction*)

pH – ūdeņraža jonu koncentrācija šķīdumā

rcf – relatīvais centrālās spēks (*relative centrifugal force*)

RE – rutīns (*rutin, quercetin-3-O-rutinoside*)

RNS – ribonukleīnskābe (*ribonucleic acid*)

RT-PCR – reversās transkripcijas PCR (*reverse transcription PCR*)

RT-qPCR – reālā laika kvantitatīvā PCR (*real-time quantitative PCR*)

TAC – kopējais antociānu saturs (*total anthocyanin content*)

TDZ – tidiazurons (*thidiazuron*)

TFC – kopējais flavonoīdu saturs (*total flavonoid content*)

UV – ultravioletā gaisma

μmol m⁻² s⁻¹ jeb PPFD – gaismas intensitātes mērvienība; mikromoli sekundē uz kvadrātmetru jeb fotosintētisko fotonu plūsmas blīvums (*Micro moles per second per meter squared or Photosynthetic Photon Flux Density*)

Ievads

Pieaugošās antibiotiku rezistences dēļ baktēriju izraisītas saslimšanas ir viens no būtiskākajiem veselības aprūpes izaicinājumiem. Tādēļ ir aktuāli jaunu antibakteriālu līdzekļu meklējumi. Iedarbojoties uz mikroorganismu virulences faktoriem, ir iespējams samazināt baktēriju augšanu, vienlaikus neveicinot rezistences veidošanos pret antibakteriālo līdzekli. Augu sekundārie metabolīti, kas iedarbojas uz patogēno baktēriju virulences faktoriem, var kalpot kā profilaktiski antibakteriāli līdzekļi, jo to ilgstoša lietošana neveicina nevēlamo rezistences attīstību baktērijās. Rezultātā augu izcelsmes antimikrobiāli produkti, kas kavē bakteriālas bioplēves veidošanos, ir viens no risinājumiem, kā ierobežot antibiotiku rezistences straujo izplatību.

Melnais plūškoks (*Sambucus nigra*) ir bagāts ar flavonoīdiem un tam piemīt antimikrobiāla iedarbība, tajā skaitā – bioplēvju veidošanās inhibēšana. Bioplēvju veidošanās mutes dobumā ir viens no galvenajiem smaganu iekaisumu cēloņiem, tāpēc ir nozīmīgi izpētīt *S. nigra in vitro* šūnu suspensiju kultūru ekstraktu potenciālu ar mutes dobuma infekcijām saistīto patogēno baktēriju ierobežošanai.

S. nigra antimikrobiālā aktivitāte ir saistīta ar auga bioķīmisko sastāvu, tāpēc sagaidāms, ka, ierosinot paaugstinātu mērķsavienojumu sintēzi, būtu iespējams iegūt efektīvāku antibakteriālo aktivitāti pret mutes dobuma mikrobiotas patogēnajām baktērijām: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus licheniformis* un *Escherichia coli*. *In vitro* kultivēšanas pieeja ļauj standartizētā veidā un neatkarīgi no sezonālātes optimizēt augu šūnu bioķīmisko sastāvu, izmantojot specifiskus audzēšanas apstākļus, kā arī pielietojot elicitorus sekundāro metabolītu ierosināšanai.

Darba mērķis: optimizēt Melnā plūškoka *Sambucus nigra* šūnu suspensiju kultūras antibakteriālu ekstraktu iegūšanai.

Darba uzdevumi:

1. Noteikt, kā kultivēšana pie atšķirīgas intensitātes apgaismojuma ietekmē *S. nigra* šūnu suspensiju antibakteriālo aktivitāti, kopējo antociānu un flavonoīdu biosintēzi.
2. Noteikt, kā elicētēšana ar flg22 ietekmē *S. nigra* šūnu suspensiju antibakteriālo aktivitāti, kopējo antociānu un flavonoīdu biosintēzi.
3. Noteikt, vai *S. nigra* šūnu suspensiju mērogošana ietekmē kopējo antociānu un flavonoīdu saturu.

Hipotēze: *S. nigra in vitro* šūnu suspensiju kultūras, kas audzētas pie augstākas intensitātes apgaismojuma vai elicētētas ar flg22, būs ar spēcīgāku antibakteriālo iedarbību, nekā kontroles apstākļos audzētās šūnu suspensijas.

1. Literatūras apskats

1.1. Bioplēvju nozīme cilvēka mutes dobumā

Cilvēka mutes dobuma mikrobiotu veido vairāk nekā 700 mikroorganismu sugu (Zhao et al. 2017). Baktērijas kolonizē mutes dobuma cietos un mīkstos audus, uz kuru virsmas tās ar adhēzijas palīdzību veido sarežģītas struktūras kopienas jeb bioplēves (biofilmas). Bioplēves pilda aizsargfunkciju, kā rezultātā tās ir 10 – 1000 reizes izturīgākas pret ārējo faktoru iedarbību, piemēram, antimikrobiālajiem savienojumiem, nekā planktoniskās baktērijas (Shree et al. 2023). Komensālās sugas ir nozīmīgas mutes veselības saglabāšanā, taču labvēlīgo un patogēno sugu līdzsvaru var viegli un ātri izmainīt, neievērojot optimālu mutes dobuma higiēnu, kas rezultējas ar patogēno baktēriju skaita palielināšanos (Wade 2013). Patogēnu veidotas bioplēves nelabvēlīgi ietekmē cilvēka imūnsistēmu un var būt par iemeslu smaganu infekcijām, kuru ārstēšana ir apgrūtināta bioplēvju specifisko īpašību un sastāva dēļ (Rather et al. 2021). To struktūra inhibē antimikrobiālo savienojumu difūziju caur matriksu, palielinot baktēriju rezistenci pret mutes skalošanas līdzekļiem un antibiotikām (Kommerein et al. 2021).

1.2. Augi kā antimikrobiālu savienojumu avots

Pēdējo gadu laikā visā pasaulē baktēriju rezistence pret vairākām antibiotikām turpina pieaugt, kļūstot par arvien lielāku globālu problēmu, kas ietekmē visus dzīvos organismus (Salam et al. 2023). Tāpēc ir nepieciešams atklāt jaunus veidus, lai samazinātu bakteriālas izcelsmes infekciju gadījumus un ierobežotu antibiotiku rezistences izplatību. Mērķēti iedarbojoties uz patogēno mikroorganismu virulences faktoriem, nevis šūnas pamatprocesiem, ir iespējams ierobežot patogēnu negatīvo ietekmi, vienlaikus neradot selektīvo spiedienu, kas novestu pie antibiotiku rezistences mutāciju attīstības (Johnson and Abramovitch 2017). Viens no baktēriju virulenci veicinošiem faktoriem ir spēja veidot bioplēves (Shree et al. 2023), tāpēc ir īpaši svarīgi izvērtēt antimikrobiālo līdzekļu efektivitāti tieši pret bioplēvēm.

Strauji palielinās interese par antimikrobiāliem līdzekļiem, kas iegūti no augiem, uzskatot augus par perspektīvu risinājumu tajos esošo savienojumu dēļ (Othman et al. 2019). Augi tradicionāli ir izmantoti, lai ārstētu dažādas infekcijas, un arī 21. gadsimtā tiem ir nozīmīga loma jaunu savienojumu atklāšanā (Newman et al. 2000). Augu sekundārie metabolīti satur bioloģiski aktīvas vielas ar dažādām ķīmiskām un strukturālām īpašībām un funkcijām (Ncube and Van Staden 2015). Atšķirībā no primārajiem metabolītiem, kas iesaistīti auga fizioloģiskajos pamatprocesos, sekundārie metabolīti veicina adaptīvos un aizsardzības mehānismus, kā mikroorganismu šūnu augšanas un dzīvotspējas nomākšanu (Šovljanski et al. 2023). Savienojumu – polifenolu, flavonoīdu, alkaloīdu, tannīnu, terpēnu un citu –

antimikrobiālais un rezistenci modificējošais potenciāls ir plaši pētīts un pierādīts vairākiem augiem (Keita et al. 2022).

Atšķirībā no tradicionālajām antibiotikām, augos esošie savienojumi var kompleksi iedarboties vienlaikus uz vairākiem mikroorganismu virulences faktoriem, tādēļ augu izcelsmes savienojumi var ietekmēt mikroorganismu dzīvotspējai nozīmīgus bioķīmiskos ceļus, kurus tradicionālās antibiotikas neskar (Othman et al. 2019). Šī iemesla dēļ augu izcelsmes ekstraktu pielietojumam antibiotiku rezistences apkarošanā būtu jāpievērš lielāka uzmanība. Viens no augiem ar antimikrobiālām īpašībām un bagātīgu bioloģiski aktīvo savienojumu saturu ir *Sambucus nigra*, kas arī tika izvēlēts par šī pētījuma objektu.

1.3. *S. nigra* raksturojums un bioloģiski aktīvās īpašības

Plūškoku (*Sambucus*) ģinti veido krūmi un maza izmēra koki no Bezslavīšu dzimtas (*Adoxaceae*), kuru vietējais izplatības areāls ir mērenā vai subtropu josla gan ziemeļu, gan dienvidu puslodē. Šobrīd ir zināmas ap 10 *Sambucus* ģints sugu, kas iekļauj arī Melno plūškoku *Sambucus nigra* (Britannica 2024). *S. nigra* ir vasarzaļš krūms 2 – 7 m augstumā ar kuplu vainagu, zied jūnijā ar baltiem ziediem. Auglis ir kaulenis zilganmelnā krāsā. Suga retos gadījumos sastopama Latvijā visā teritorijā, veidojot skrajās grupas (Kļaviņš u.c. 2024).

S. nigra ziedi un ogas (1.1. attēls) tiek izmantoti pārtikas, kosmetoloģijas un farmācijas rūpniecībā tā veselību veicinošo īpašību dēļ. Augs ir bagāts ar ogļhidrātiem, olbaltumvielām, lipīdiem, organiskajām skābēm, minerālvielām, vitamīniem un ēteriskajām eļļām. Tā sastāvā dominējošie bioloģiski aktīvie savienojumi ir polifenoli, flavonoīdi un antociāni (Młynarczyk et al. 2018).



1.1. attēls. *S. nigra* (Stępień et al. 2023); A – ziedi, B – ogas.

Figure 1.1. *S. nigra* (Stępień et al. 2023); A – flowers, B – berries.

S. nigra piemīt antioksidanta, pretiekaisuma, citotoksiska, pretalerģiska, pretvīrusu, antimikrobiāla, antidepresīva, antiaterosklerozes, imūnmodulējoša, hipoglikēmiska un pret diabēta iedarbība (Stępień et al. 2023). Tradicionālajā medicīnā *S. nigra* tika izmantots kā sviedrējošs, diurētisks, pretaizcietējuma, pretdrudža, iesnu un sāpju mazinošs līdzeklis (Manganelli et al. 2005). *S. nigra* ogu ekstraktos esošajiem savienojumiem – 5,7,3',4'-tetra-O-metilkvercetinam (*5,7,3',4'-tetra-O-methylquercetin*) un cianidīna-3-glikozīdam (*cyanidin-3-glucoside*) – piemīt pretgripas īpašības, mazinot elpošanas traucējumu simptomus (Roschek et al. 2009; Torabian et al. 2019; Mahboubi 2021).

S. nigra ogām ir raksturīga augsta antioksidantu aktivitāte, pateicoties antociāniem – cianīda-3-O-glikozīdam (*cyanide-3-O-glucoside*), cianidīna sambubiosīdam (*cyanidin sambubioside*), cianidīna 3,5-diglikozīdam (*cyanidin 3,5-diglucoside*) un flavonoīdiem – rutīnam (*rutin*), kvercetinam (*quercetin*) un kvercetīna-3-O-glikozīdam (*quercetin-3-O-glucoside*) (Silva et al. 2017; Boroduske et al. 2021). Apstiprināts, ka, palielinoties antociānu koncentrācijai, palielinās arī antioksidatīvās īpašības, taču tikai līdz noteiktam līmenim, virs kura šis parametrs sāk kristies (Pliszka et al. 2005). *S. nigra* piemīt arī prebiotiska līdzekļa potenciāls (Haş et al. 2023), kā arī to varētu izmantot kā perspektīvu pārtikas konservantu (Antolak et al. 2017).

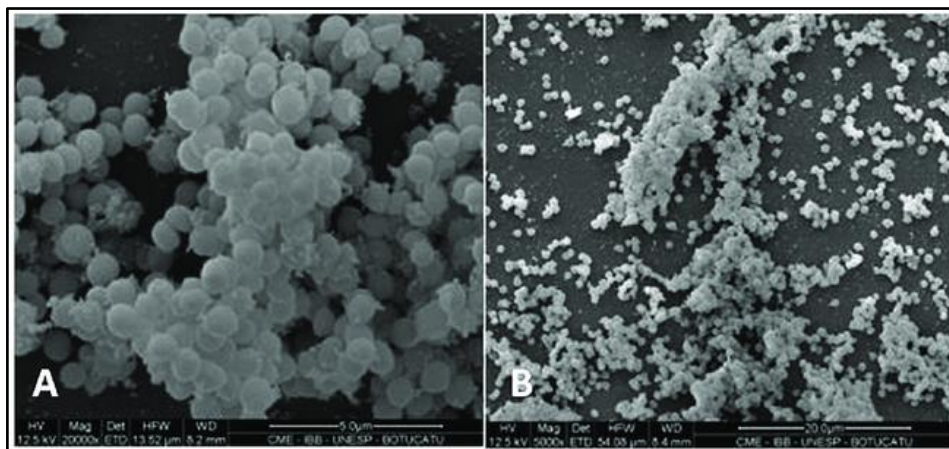
S. nigra ogu, ziedu un lapu ekstraktiem pierādītas antimikrobiālas īpašības pret nozīmīgiem patogēniem, kas izplatīti ārstniecības iestādēs (Hearst et al. 2010; Mohammadsadeghi et al. 2013).

1.4. *Sambucus* inhibējošā ietekme uz bioplēvju veidojošām baktērijām

Pie *Staphylococcus* ģints pieder gram-pozitīvas, fakultatīvi anaerobas baktērijas, kas ir komensālas un nosacīti patogēnas (Dasgupta et al. 2022). *Staphylococcus* piemīt augsta rezistence pret antibiotikām (līdz pat 90%) (Tang et al. 2020). Visizplatītākās mutes dobuma mikrobiotā esošās *Staphylococcus* ģints sugas ir *S. aureus*, *S. epidermidis* un *S. saprophyticus*.

S. epidermidis kolonizē ādu un gļotādas virsmas, mikroorganisms tiek uzskatīts par oportūnistisku patogēnu (Severn and Horswill 2023). *S. saprophyticus* veido normālu ādas, urīnceļu un dzimumorgānu mikrobiotu. Cilvēkiem ar novājinātu imūnsistēmu vai imūndeficīta sindromu baktērija var izraisīt akūtas urīnceļu infekcijas. Atklāts, ka 91% no *S. saprophyticus* izolātiem spēj veidot bioplēves (1.2. attēls) (Rafiee and Ghaemi 2023). Šī baktērija ir atrodama arī zobu bioplēvju sastāvā, dominējot veselu indivīdu smaganu paraugos (Colombo et al. 2023). S. Júnior et al. (2018) raksta, ka flavonoīdam kvercetinam piemīt antibakteriālā aktivitāte pret *S. saprophyticus* un *S. aureus*. C. Hearst et al. (2010) veica eksperimentu ar *S. nigra* ziedu, ogu un lapu ekstraktiem, pierādot, ka augam piemīt inhibējošas īpašības pret 13 patogēniem, tostarp,

pret *Staphylococcus* sugām. I.M. Haş et al. (2023) pētījums liecina par *S. aureus* augšanas inhibēšanu ar *S. nigra* ekstraktu MIC 1,95 mg/mL, taču pēc S. Mohammadsadeghi et al. (2013) rezultātiem *S. aureus* augšana tika inhibēta ar MIC 0,005 mg/mL.



1.2. attēls. *S. saprophyticus* bioplēves struktūra; A – 20 000 reižu palielinājumā; B – 5 000 reižu palielinājumā (Martins et al. 2019).

Figure 1.2. *S. saprophyticus* biofilm structure; A – 20 000 times magnification; B – 5 000 times magnification (Martins et al. 2019).

B. licheniformis ir gram-pozitīva, aeroba baktērija, kas ir nosacīti patogēna (Nithya et al. 2012). Par šīs baktērijas lomu mutes dobuma mikrobiotas sastāvā literatūrā ir atrodama pretrunīga informācija. Pēdējo gadu laikā *B. licheniformis* tiek atzīts par potenciālu probiotisku, antimikrobiālu un bioplēvju inhibējošu aģentu (Šurín Hudáková et al. 2022; Shleeva et al. 2023), tomēr šī baktērija var izraisīt smagas infekcijas, tajā skaitā – mutes dobumā (Haydushka et al. 2012). *S. nigra* ekstraktiem ir pierādīts inhibējošs efekts pret *B. cerus* (Hearst et al. 2010) un *B. subtilis* (MIC 0,005 mg/mL) (Mohammadsadeghi et al. 2013), taču līdz šim nav informācijas par *S. nigra* ekstraktu aktivitāti pret *B. licheniformis*.

E. coli ir gram-negatīva, fakultatīvi anaeroba komensāla baktērija, kas apdzīvo zarnu mikrobiotu. Tā ir nosacīti patogēna un var ierosināt dažādu infekciju izpausmes (Nataro and Kaper 1998). *E. coli* ir konstatēta arī mutes dobuma mikrobiotā, nonākot tur ar pārtiku vai saskarsmē ar dzīvniekiem, priekšmetiem. Ja *E. coli* tiek nodrošināti labvēlīgi vides apstākļi, tad tā var dominēt mutes dobuma sugu bioplēvju sastāvā (Zaatout 2021). *S. nigra* polifenolu ekstrakti uzrāda aktivitāti pret baktēriju celmiem, tajā skaitā, *E. coli*, ar MIC diapazonā no 0,5 līdz 0,05% (Przybylska-Balcerek et al. 2021), taču pēc I.M. Haş et al. (2023) rezultātiem ekstrakta MIC pret *E. coli* ir 3,91 mg/mL. Savukārt, S. Mohammadsadeghi et al. (2013) pārbaudīja, ka *S. nigra* ogu ekstraktiem piemīt spēcīga antibakteriālā aktivitāte pret *E. coli* ar MIC 0,0027 mg/mL.

Ir pētīts *Sambucus* ģints augu ekstraktu pielietojums mutes kopšanas līdzekļu sastāvā. Pierādīts, ka mutes skalojamais līdzeklis, kas satur *S. williamsii* ekstraktu, ir iedarbīgs pret

kariesu, pateicoties efektīvai antibakteriālai iedarbībai, it īpaši pret *S. mutans* (Kim and Nam 2022). S-H Nam (2019) pētīja *S. williamsii* ekstrakta iedarbību pret *E. faecalis*, apstiprinot, ka ekstrakts ir efektīvs līdzeklis zobu kanālu iekaisuma ārstēšanā ar MIC 20 mg/mL un MBC 30 mg/mL pēc 6 h un MIC/MBC 40 mg/mL pēc 24 h.

H. Adnan et al. (2017) atklāja, ka *S. nigra* ziedu ekstrakts pret *P. aeruginosa* bioplēvē uzrādīja 59,2% efektivitāti – tas ir pirmais pētījums, kur pārbaudīta *S. nigra* anti-bioplēvju efektivitāte. *S. nigra* ekstrakts spēj inhibēt *S. aureus* (IC₅₀ 0,688 mg/mL) un *P. aeruginosa* (IC₅₀ 0,890 mg/mL) veidotās bioplēves (Křížková et al. 2023).

Antimikrobiālā iedarbība tiek saistīta ar *S. nigra* sastāvā esošajiem flavonoīdiem un antociāniem, tanīniem un triterpēniem, kā arī peptīdiem un oligosaharīdiem (Hearst et al. 2010). Nesenā pētījumā tiek minēts, ka *S. nigra* ekstraktu antimikrobiālās īpašības ir attiecināmas uz bioloģiski aktīvo savienojumu kombināciju, nevis uz atsevišķiem savienojumiem (Przybylska-Balcerek et al. 2021).

1.5. Flavonoīdi

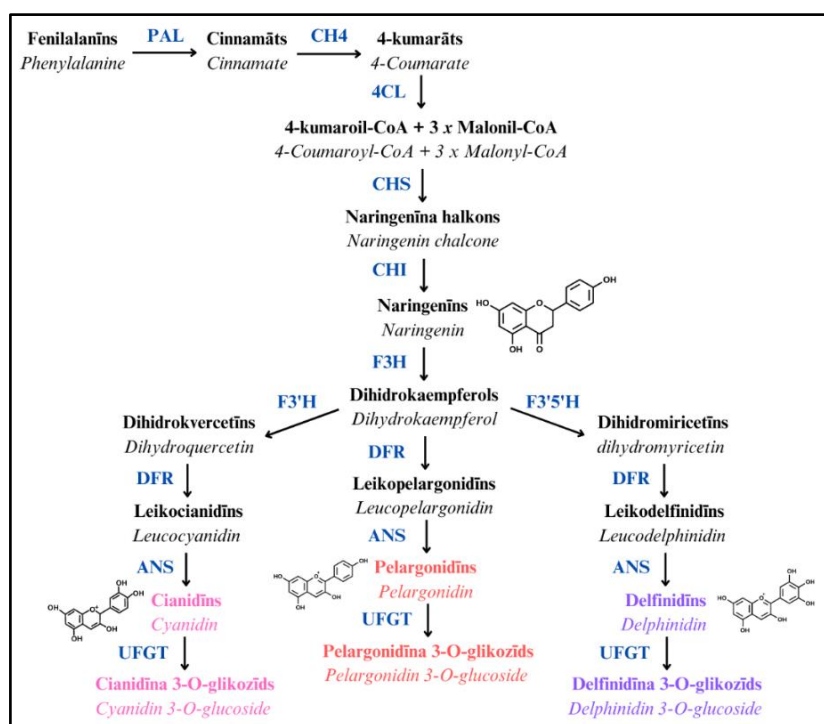
Flavonoīdi ir bioloģiski aktīvi savienojumi, kas pieder pie augu sekundāro metabolītu klases ar polifenolu struktūru. Tos klasificē dažādi atkarībā no molekulā esošajām saitēm, ķīmiskās struktūras un oksidācijas pakāpes (Panche et al. 2016; Ramesh et al. 2021; Chen et al. 2023). Pēc jaunākās klasifikācijas flavonoīdus iedala septiņās klasēs: flavanoli jeb katehīni, antociāni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, flavoni un halkoni (Chen et al. 2023).

Antociāni ir ūdenī šķīstoši pigmenti, kas veido sarkano, zilo un violeto krāsu augu audiem. Visizplatītākais antociāns ir cianidīna-3-glikozīds (Khoo et al. 2017), kas ir kvantitatīvi dominējošais antociāns arī *S. nigra* (Silva et al. 2017). Antociānu stabilitāte atkarīga no pH, temperatūras, to struktūras, kā arī no gaismas (Laleh et al. 2006). Ogās sastopamie antociāni ir spēcīgi antioksidanti, kas nodrošina aizsardzību pret brīvajiem radikāļiem. Tiem piemīt ļoti daudz dažādu bioloģiski aktīvo īpašību, tostarp, antimikrobiālā aktivitāte, tāpēc antociāniem ir potenciāls to pielietošanai farmācijā (Tena et al. 2020).

Ir veikti daudzi pētījumi par ogās esošo flavonoīdu antimikrobiālo aktivitāti (Puupponen-Pimiä et al. 2001; Nile and Park 2014). Apstiprināts, ka flavonoīdi – luteolīns (*luteolin*), morīns (*morin*), naringīns (*naringin*), kvercetīns (*quercetin*) un rutīns (*rutin*) – efektīvi kavē mutes dobuma patogēno mikroorganismu augšanu (Gutiérrez-Venegas et al. 2019). *S. nigra* ogas ir vienas no bagātākajām ar flavonoīdiem: to kopējais fenolu (104 mg/g FW), kopējais flavonoīdu (42 mg/g FW) un kopējais antociānu saturs (45 – 791 mg/g FW) ir viens no augstākajiem starp dažādu augu ģinšu ogām (Rimpapa et al. 2007; Nile and Park 2014).

1.6. Flavonoīdu biosintēzes ceļš

Flavonoīdi tiek sintezēti pa fenilpropanoīdu metabolisko ceļu (1.3. attēls). Pirmo reakciju katalizē fenilalanīna amonjaka liāze (*PAL*), kad no aminoskābes fenilalanīna iegūst cinamātu, no cinamāta – 4-kumarātu, ko katalizē cinamāta-4-hidroksilāze (*C4H*). 4-kumarāta-CoA ligāze (*4CL*) pārvērš 4-kumarātu par 4-kumaroil-CoA. Šim savienojumam reaģējot ar trīs malonil-CoA molekulām, iegūst naringenīna halkonus. Šo reakciju veic enzīms halkona sintāze (*CHS*). No halkoniem iegūst flavanonus ar enzīmu – halkona flavanona izomerāze (*CHI*). No centrālajiem starpproduktiem biosintēzes ceļš novirzās vairākos sānu zaros, radot atšķirīgus flavonoīdu klases savienojumus, iesaistoties dažādiem enzīmiem. Ar flavanona 3-hidroksilāzes (*F3H*) palīdzību iegūst dihidroflavonolus. Dihidroflavonola reduktāze (*DFR*) katalizē reducēšanos līdz leikoantociāniem, kurus antociāna sintāze (*ANS*) pārvērš par antociāniem. Glikozīdu veidošanos katalizē UDP glikozes-flavonoīda 3-o-glikoziltransferāze (*UFGT*), kas stabilizē antociānus ar 3-O-glikozilāciju (Jaakola et al 2003; Ma et al. 2021).



1.3. attēls. Flavonoīdu biosintēzes ceļš (Ma et al. 2021). *PAL* – fenilalanīna amonija liāze; *C4H* – cinamāta 4-hidroksilāze; *4CL* – 4-kumarāta CoA ligāze; *CHS* – halkona sintāze; *CHI* – halkona izomerāze; *F3H* – flavanona 3-hidroksilāze; *F3'H* – flavonoīda 3' hidroksilāze; *F3'5'H* – flavonoīda 3'5'hidroksilāze; *FLS* – flavonola sintāze; *DFR* – dihidroflavonola 4-reduktāze; *ANS* – antocianidīna sintāze; *UFGT* – UDP-galaktozes flavonoīda 3-O-galaktoziltransferāze

Figure 1.3. The pathway of flavonoid biosynthesis (Ma et al. 2021). *PAL* – phenylalanine ammonia lyase; *C4H* – cinnamate 4-hydroxylase; *4CL* – 4-coumarate CoA ligase; *CHS* – chalcone synthase; *CHI* – chalcone isomerase; *F3H* – flavanone 3-hydroxylase; *F3'H* – flavonoid 3' hydroxylase; *F3'5'H* – flavonoid 3'5'hydroxylase; *FLS* – flavonol synthase; *DFR* – dihydroflavonol 4-reductase; *ANS* – anthocyanidin synthase; *UFGT* – UDP-galactose flavonoid 3-O-galactosyltransferase.

Lai gan centrālais flavonoīdu biosintēzes ceļš augos ir konservatīvs, atkarībā no sugas var būt atšķirības, ko veic ceļā iesaistītie enzīmi. Tie regulē kopējo sintēzes ceļa efektivitāti, specifiskumu un modificē flavonoīdu pamata molekulāro struktūru, pievienojot sānu grupas, nodrošinot flavonoīdu daudzveidību augu valstī, kā arī modulējot iegūtā flavonoīda fizioloģisko aktivitāti (Falcone Ferreyra et al. 2012).

Lai notiktu antociānu sintēze, ir nepieciešami strukturālie gēni, kas ir tieši iesaistīti antociānu sintēzē, un regulējošie gēni, kas kontrolē pirmā tipa gēnu transkripciju (Jaakola et al 2002). Ar antociānu biosintēzi saistīto gēnu (*PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *UFGT*) ekspresija tiek izmantota antociānu akumulēšanās pētījumos. Gēnu ekspresija parasti korelē ar gēna kodētā proteīna sintēzi. Gēnu ekspresijas izmaiņas stresa faktora ietekmē liecina par to, ka šie gēni un to produkti ir saistīti ar stresa atbildi (Matters and Scandalios 1986; Carmo et al. 2012). Antociānu biosintēze ir pētīta *S. nigra* ogām to nogatavošanās procesā (Mikulic-Petkovsek et al. 2023), taču trūkst literatūras par flavonoīdu un antociānu regulēšanas molekulāro mehānismu *S. nigra* augā un no auga iegūtām *in vitro* kultūrām.

1.7. Augu audu un šūnu kultūras kā izejviela vērtīgu savienojumu iegūšanai

Augu kultūra ir definējama kā augu šūnu vai orgānu kultivēšana un uzturēšana sterilos, uzturvielām bagātos augšanai atbalstošos apstākļos – *in vitro* (Pierik 1997; Chawla 2003). Barotnes izvēle augu *in vitro* kultūrās ir balstīta uz kultivēto audu veidu un augu sugas prasībām pēc makroelementiem, mikroelementiem un organiskām vielām – vitamīniem, aminoskābēm, slāpekļa savienojumiem un augšanas regulatoriem jeb fitohormoniem (Saad and Elshahed 2012). Augšanas regulatori *in vitro* kultūru barotnēs ir nepieciešami mazās koncentrācijās. Tie regulē šūnu augšanu, dalīšanos un orgānu attīstību (Chawla 2003). Pārbaudīts, ka *S. nigra* kallusu inducēšanai, attīstībai un šūnu suspensiju kultūru uzturēšanai optimāla ir citokinīna tidiazurona (TDZ) un augsna 1-naftalīnētiķskābes (NAA) kombinācija koncentrācijās 2,0 mg/L (Boroduske et al. 2022).

Ar šūnu suspensiju kultūrām var veiksmīgi iegūt augstvērtīgus augu izcelsmes sekundāros metabolītus – gaistošus savienojumus, alkaloīdus, pigmentus un citas farmācijas, kosmētikas un pārtikas rūpniecības izejvielas –, kuru ķīmiskā sintezēšana ir dārga un kas dabā sastopamas zemās koncentrācijās (Eibl et al. 2018). Šūnu suspensiju kultūras var pielietot augu ekstraktu iegūšanai, kas bagātināti ar vēlamajiem sekundārajiem metabolītiem tādā daudzumā, kuru nevar iegūt ar tradicionālām metodēm. Šādā gadījumā šūnām jānodrošina tādi augšanas apstākļi, lai izraisītu konkrēto savienojumu sintēzi (Barbulova et al. 2014). Šūnu suspensiju priekšrocības ir šūnu populācijas viendabīgums, liela auga materiāla pieejamība, ātra šūnu augšana un laba apstākļu reproducējamība (Maathuis 2012).

Šūnu kultūrām, kā tehnoloģiskam risinājumam augos esošo savienojumu iegūšanā, ir izaicinājumi, kas saistīti ar kultūru optimizāciju un biomasas palielināšanu. Optimizācijai veic manipulācijas ar dažādiem faktoriem jeb abiotiskiem un biotiskiem elicitoriem: barotnes sastāvu, temperatūru, gaismas intensitāti un ķīmiskiem savienojumiem (Zhong 2001). Pēc kultūru optimizācijas augu šūnu masu var veiksmīgi palielināt, kultivēšanai izmantojot bioreaktorus, kas nodrošina sterilu, kontrolētu vidi un procesa mērogošanu. Bioreaktoru sistēmās ir daudz vienkāršāk veikt manipulācijas ar kultivēšanas apstākļiem, mainot šūnu suspensiju maisīšanas un aerācijas ātrumu, kā arī gaismas intensitāti (Xu and Zhang 2014).

S. nigra mikrodzinumu kultūras ir izstrādātas mikropavairošanai dārzkopības mērķiem (Kopper et al. 2020). Bet trūkst literatūras par *S. nigra* vai jebkuras citas *Sambucus* ģintij piederošas sugas šūnu suspensiju kultūru īpašībām un bioloģisko aktivitāti. A. Boroduske et al. (2022) veica pētījumu ar *S. nigra* šūnu suspensiju kultūrām, apstiprinot, ka kultūras veido sekundāros metabolītus un tām piemīt bioloģiskā aktivitāte, kas raksturīga visa auga audiem. Taču iepriekš nav pētīta *S. nigra* šūnu suspensiju antibakteriālā iedarbība un nav izziņāta iespēja šīs kultūras mērogot, kas būtiski varētu ietekmēt to biotehnoloģiskā pielietojuma potenciālu.

1.8. Sekundāro metabolītu inducēšana augu *in vitro* kultūrās

Lai palielinātu augu sekundāro metabolītu iegūšanu no šūnu *in vitro* kultūrām, tiek pielietoti dažādi elicitori (*elicitors*), kas var būt gan ķīmiskas vielas, gan fizikāli faktori. Tie augos ierosina atbildes reakcijas, izraisot sekundāro metabolītu pastiprinātu uzkrāšanos (Zhong 2001; Zhao et al. 2005; Vasconsuelo and Boland 2007).

1.8.1. Gaisma kā flavonoīdu sintēzes ierosinātājs

Gaisma būtiski ietekmē augu šūnu un audu attīstību, kā arī sekundāro metabolītu sintēzi. Ir zināms, ka gaisma ir vissvarīgākais ārējais faktors antociānu biosintēzē, regulējot fotosintēzi augu audos un aktivizējot gēnu ekspresiju, kas kodē antociānu sintēzes ceļa enzīmus (Rachel et al. 2001). Gaismas risinājumu pielāgošana augu *in vitro* kultūrām var prasīt papildus izpēti – ir noteikts, ka gaismas diodi (LED) var sekmīgi izmantot kultūru augšanas veicināšanai, eksperimentējot ar dažāda spektra un intensitātes gaismas pievadīšanu (Bula et al. 1991).

M. Ruiz-Rivas et al. (2022) aprakstīja, ka gaisma ietekmē kallusu attīstību, un šī ietekme atšķiras gan starpsugu, gan vienas sugas ietvaros. Tika pierādīts, ka nozīmīga ir gan apgaismojuma intensitāte, gan gaisma kombinācijā ar barotnes sastāvu, kas dod iespēju optimizēt *in vitro* kultūras biotehnoloģiskajām vajadzībām. Zināms, ka saules gaisma palielina flavonoīdu koncentrāciju un paaugstina saistīto biosintētisko gēnu ekspresiju (Matus et al. 2009). Savukārt, tumsa kavē flavonoīdu biosintēzi, pastiprinot šūnu bojāeju (galvenokārt

nekrozi) šūnu suspensiju kultūrā (Bertolini et al. 2016). Optimālā gaismas intensitāte *in vitro* augu šūnu kultūrām ir robežās no 50 līdz 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Phillips and Garda 2019).

Palielināta gaismas intensitāte var veicināt augu pigmentu veidošanos (Steyn et al. 2002), taču dažādu grupu flavonoīdu sintēze var tikt ietekmēta dažādi. Piemēram, pētījumā ar Īstā vīnkoka *Vitis vinifera* kallusiem gaismas intensitātē 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ flavonolu un antocianīnu koncentrācijas un tiem atbilstošo gēnu ekspresijas tika ietekmētas mazāk, savukārt flavan-3-ola koncentrācija palielinājās (Cheng et al. 2020).

1.8.2. Flagellīna peptīds kā flavonoīdu sintēzes ierosinātājs

Augu imunitātes spēja noteikt patogēna klātbūtni balstās uz virkni šūnu virsmas receptoriem, kas ļoti jutīgi spēj uztvert vispārējos imūnierosinātājus – molekulāros motīvus, kas ir kopīgi un raksturīgi plašām patogēnu grupām – PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). Viens no šādiem molekulāriem motīviem ir baktēriju flagellu strukturālais proteīns – flagellīns (Gómez-Gómez and Boller 2002; Muñoz-Wolf et al. 2017).

Bakteriālā flagellīna fragments – 22 aminoskābju peptīds (flg22) – tiek atpazīts augos caur plazmatiskās membrānas receptoriem (Gómez-Gómez et al. 1999). FLS2 (*second flagellin sensitive*) gēna LRR (*leucine-rich repeat*) jeb ekstracelulārajam domēnam ir tieša mijiedarbība ar flagellīnu, kas ierosina FLS2 reakciju uz flg22. Serīna/treonīna kināzes jeb iekššūnas domēna fosforilēšana katalizē proteīnkināzes kaskādi, kas noved pie atbildes reakcijas (Gómez-Gómez and Boller 2000; Shin-Han and Anthony 2001). Flg22 inducē aizsardzības gēnu ekspresiju, lai izraisītu imūnās atbildes, kas rezultējas auga attīstības un reakcijas izmaiņās, tāpēc to plaši izmanto augu imunitātes pētījumos (Gómez-Gómez and Boller 2000).

Ir veikti pētījumi, ka flg22 ierosina sekundāro metabolītu sintēzi Ēdamam tomātam (*Solanum lycopersicum*) (Felix and Boller 2003), Tabakai (*Nicotiana*) (Wang et al. 2016), Divšķautņu asinszālei (*Hypericum perforatum*) (Fürst et al. 2020), taču trūkst literatūras par flg22 iedarbību uz *Sambucus* ģints augiem.

2. Materiāli un metodes

Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā, Augu biotehnoloģiju laboratorijā no 2023. gada septembra līdz 2024. gada maijam.

2.1. Materiāli

Darbā izmantotie reāģenti, barotnes un šķīdumi uzskaitīti 2.1., 2.2. un 2.3. tabulā.

2.1. tabula.

Pētījumā izmantotie reāģenti

Table 2.1.

Reagents used in research

Nosaukums un artikuls/ Name and article	Ražotājvalsts / Country of manufacture	Ražotājs / Manufacturer
1-naftalēn-etiķskābe (NAA) Nr. N0903	Nīderlande	Duchefa Biochemie
10 x buferis ar MgCl ₂ DNāzei I	Lietuva	Fermentas
Agarozē Nr. A9539	ASV	Sigma-Aldrich
cDNS sintēzes komplekts RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Nr. K1632	ASV	Thermo Fisher Scientific
CTAB Nr: 57-09-0	ASV	Sigma-Aldrich
Destilēts ūdens DNase/RNase free 10977-035	Lielbritānija	Invitrogen
Dinātrija fosfāts (Na ₂ HPO ₄)	ASV	Sigma-Aldrich
Ditiotreitolis (DTT) Nr. R0861	ASV	Thermo Fisher Scientific
DNāze DNase, RNase-free Nr. EN0521	ASV	Thermo Fisher Scientific
EDTA 50 mM	Lietuva	Fermentas
Etanols 96%	ASV	Sigma-Aldrich
Etīdija bromīds	ASV	Sigma-Aldrich
Fenola šķīdums (pH 4.3) P4682	ASV	Sigma-Aldrich
Flagellīna fragments flg22 AS-62633	ASV	Anaspec Inc.
Fluoresceīna diacetāts	ASV	Thermo Fisher Scientific
Garuma marķieris 1 kb Plus DNA Ladder Nr:N0469S	ASV	NEB
Hloroforms	ASV	Sigma-Aldrich
Izopropanols	Vācija	ROTH
Kālija hlorīds (KCl)	Šveice	Fluka Analytical
Krāsviela 6x Gel Loading Dye, Purple Nr: B7052	Anglija	NEB
Krāsviela 6x orange loading dye Nr. R0631	ASV	Thermo Fisher Scientific
Kristalizēta saharozē Nr. S0809	Nīderlande	Duchefa Biochemie
Kristālvioletais	ASV	Sigma-Aldrich
Maisījums PCR <i>Quick-Load Taq 2X Master Mix</i> Nr: M0271L	Anglija	NEB
MES Nr: SLCG5942	Vācija	Sigma-Aldrich
Monokālija fosfāts (KH ₂ PO ₄)	ASV	Sigma-Aldrich
Murashige & Skoog barotne (MS) Nr. M0222	Nīderlande	Duchefa Biochemie
Nātrija acetāts (C ₂ H ₃ NaO ₂ / NaOAc)	Vācija	Sarstedt
Nātrija hidroksīds (NaOH)	Vācija	MERK
Nātrija hlorīds (NaCl)	Šveice	Fluka Analytical
Polivinilpirolidons (PVP) Nr: PVP40	ASV	Sigma-Aldrich
RNS izdalīšanas komplekts GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit Nr. K0802	ASV	Thermo Fisher Scientific
Rutīns Nr: 78095	ASV	Sigma-Aldrich
Sālsskābe (HCl) 100%	Polija	Centro-chem
Šķidrās slāpekļis	Latvija	Elme Messer
SYBR Green/ROX qPCR MM Nr. K0221	ASV	Thermo Fisher Scientific
TRIS GE17-1321-01	ASV	Sigma-Aldrich

2.2. tabula.

Modificēta *MS barotne *S. nigra* šūnu suspensiju kultūrām *in vitro*

Table 2.2.

Modified *MS medium for *S. nigra* cell suspension culture *in vitro*

Sastāvdaļa / Component	Daudzums, g/L / Amount, g/L
MES	0,5
MS barotne ar vitamīniem	4,4
Saharoze	30,0
NAA	0,002
TDZ	0,002
ddH ₂ O	Līdz nepieciešamajam tilpumam
1 M NaOH un 0,1 M HCl pH regulēšanai (pH 5,7 – 5,8)	

* barotne pēc Murashige and Skoog (1962) / medium according to Murashige and Skoog (1962).

2.3. tabula.

Pētījumā izmantotie šķīdumi

Table 2.3.

Solutions used in research

Nosaukums / Name	Sastāvdaļa / Component
CTAB buferis	100 mM TRIS-HCl
	20 mM EDTA
	1,2 M NaCl
	2,0% CTAB
	1,0% PVP
0,2% mekrptoetānols	
PBS buferis	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM KH ₂ PO ₄
0,1 M HCl 100 mL	Koncentrēta HCl 8,8 mL ddH ₂ O līdz 100 mL
0,4 M NaOH 500 mL	Koncentrēts NaOH 8,0 g ddH ₂ O līdz 500 mL
40% etanols 1 L	417 mL 96% etanols 583 mL ddH ₂ O
70% etanols 1 L	729 mL 96% etanols 217 mL ddH ₂ O
1x TBE buferis 1 L	TRIS 10,8 g
	Borskābe 5,5 g
	0,5 M EDTA (pH 8,0) 4 mL
	līdz 1000 mL ddH ₂ O
0,1% kristālvioletā šķīdums 200 mL	Kristālvioletā pulveris 0,2 g ddH ₂ O 200 mL
1000x NAA uzglabāšanas šķīdums 100 mL	NAA 0,1 g 1 M NaOH līdz NAA izšķīst līdz 100 mL ddH ₂ O
1000x TDZ uzglabāšanas šķīdums 100 mL	TDZ 0,1 g 1 M NaOH līdz TDZ izšķīst līdz 100 mL ddH ₂ O

Darbā izmantotās **laboratorijas iekārtas un materiāli** uzskaitīti 2.4., 2.5. tabulā.

2.4. tabula.

Pētījumā izmantotās laboratorijas iekārtas

Table 2.4.

Laboratory equipment used in research

Nosaukums un artikuls/ Name and article	Ražotājvalsts / Country of manufacture	Ražotājs / Manufacturer
Analītiskie laboratorijas svāri ABJ-NM, max = 80 g, d = 0,1 mg	ASV	KERN
Attēlu veidošanas sistēma BioSpectrum-AC	ASV	UVP
Autoklāvs 2100 Classic	ASV	Prestige Medical
Autoklāvs MLS-2781L	Japāna	Sanyo
Automātiskā 8-kanālu pipete Finnpipette 4662030 30-300 µL	ASV	Thermo Fisher Scientific
Automātiskās pipetes (200-1000 µL, 50-200 µL, 20-100 µL, 2-10 µL, 0,2-2 µL)	ASV	Gilson
Bioreaktori BIOSTAT A 83.ECI.6340.0K.001	Vācija	Breuell & Hilgenfeldt GmbH
Blenderis NutriBullet	ASV	Capital Brands
Centrifūga MINI Spin plus	Vācija	Eppendorf
Digitālais luksometrs LX1010B	Polija	New Brand
DNS/RNS UV sterilizācijas laminārs UVC/T-M-AR	Latvija	Biosan
Elektroforēzes bloks un vanna	Lielbritānija	Cleaver Scientific Ltd
Elektroniskie svāri PS 210.X2 max = 150 g, d = 0,001 g	Polija	RADWAG
Homogenizators Mixer Mill MM 301	Vācija	Retsch GmbH
Kafijas dzirnaviņas SP-7415	Ķīna	HENSKE
Klimata kamera	Japāna	Sanyo
Laminārās plūsmas bokss Class II BSC Airstream	Polija	ESCO
LED baltās gaismas lampas Indoor graden light stand	Vācija	LEDVANCE
Liofilizators Alpha 1-4 LD plus	Vācija	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Stikla lodīšu sterilizators Ster-817	Izraēla	MRC
Magnētiskais maisītājs	Latvija	Biosan
Mikroviļņu krāsns EMS2840	Zviedrija	Electrolux
Orbitālais kratītājs Multi-shaker PSU 20i	Latvija	Biosan
PCR sistēma GeneAmp 9700	ASV	Applied Biosystems
pH metrs PH 20	Vācija	VWR Chemicals
Piesta un piestala	Vācija	Sigma-Aldrich
Pipetēšanas palīgs Accurpette	Lielbritānija	VWR
Rotators RS-60	Latvija	Biosan
Spektrofotometrs/mikroplašu lasītājs Infinite 200 PRO	Šveice	Tecan
Spektrofotometrs Ultrospec 3100 pro UV/Vis 200-900 nm	Lielbritānija	Amersham Biosciences
Spektrofotometrs Nanodrop 2000c	ASV	Thermo Fisher Scientific
Termostats SUB Aqua 34 Plus	Īrija	Granit
Ultra zemas temperatūras saldētava (-80 °C)	Dānija	Arctiko
Ultraskaņas vanna BK-9050	Ķīna	Baku
Vakuumsfiltrācijas iekārta	Vācija	Sigma-Aldrich
Vakuumsietvaicēšanas iekārta	Vācija	Eppendorf
Concentrator plus 5305000703		
Vortekss Micro Spin FV-2400	Lielbritānija	BIOSAN
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System NR. A28567	ASV	Thermo Fisher Scientific

2.5. tabula.

Pētījumā izmantotie laboratorijas materiāli

Table 2.5.

Laboratory materials used in research

Nosaukums un artikuls/ Name and article	Ražotājvalsts / Country of manufacture	Ražotājs / Manufacturer
96-lauciņu mikroplate	Vācija	Sarstedt
96-lauciņu mikroplate PCR	Vācija	Sarstedt
96-lauciņu mikroplate RT-qPCR, <i>optical</i>	Ķīna	Applied biosystems
Adhēzijas plāksnes RT-qPCR, <i>MicroAmp optical clear</i>	ASV	Thermo Fisher Scientific
Adhēzijas plāksnes PCR, <i>MicroAmp</i>	Ķīna	Applied biosystems
Agarozes gela ķemmīte, forma, gumijas	-	-
Alumīnija folija 15 µm Nr. 291-0044	Čehija	VWR
Bakterioloģiskā cilpiņa	-	-
Koniskās kolbas 250 mL, 500 mL	Vācija	Sarstedt
Laboratorijas halāts	-	-
Metāla lodītes	-	-
Metāla pincetes un skalpeļi	Vācija	Sarstedt
Mērcilindri (50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL)	Germany	Plasti brand
Pipešu uzgaļi (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Vācija	Sarstedt
Seroloģiskās pipetes (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	Vācija	Sarstedt
Sterilas Petri plates ar ventilāciju 92x16mm	Vācija	Sarstedt
Sterils filtrs (<i>non-pyrogenic Sterile-R</i>) 0,20 µm	Vācija	Sarstedt
Stobriņi (1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Vācija	Sarstedt
Uzgaļu statīvi	Polija	Eppendorf
Vienreizējās lietošanas šļirce ar uzmontētu adatu (2 mL un 5 mL)	Lielbritānija	Neoject
Vienreizlietojamie nitrila cimdi	Īrija	MERCATOR

Darbā izmantotie **baktēriju sugu celmi** tika iegūti no Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas (LMKK). Visu izmantoto celmu izcelsme saistīta ar mutes dobuma vai zobu kanālu paraugiem. **Baktēriju kultūras un to kultivēšanas barotnes** ir uzskaitītas 2.6. un 2.7. tabulā.

2.6. tabula.

Pētījumā izmantotie baktēriju celmi

Table 2.6.

Bacterial strains used in research

Sugas latīniskais nosaukums / Latin name of the species	Baktēriju celma nr. LMKK / Bacterial strain No. MSCL
<i>Bacillus licheniformis</i>	784
<i>Escherichia coli</i>	752
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	786
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	753

2.7. tabula.

Pētījumā izmantotās baktēriju kultivēšanas barotnes

Table 2.7.

Bacterial media used in research

Barotnes nosaukums / Name of the medium	Pagatavošanas instrukcija / Preparation instructions
R2A (<i>Reasoner's 2A agar</i>)	Van der Linde et al. (1999)
M-H (<i>Mueller-Hilton agar</i>)	Mueller and Hinton (1941)
NB (<i>nutrient broth</i>)	Black (1960)

Darbā izmantotie **praimerī** (2.8. tabula) *S. nigra* gēnu ekspresijas noteikšanai tika dizainēti, izmantojot NCBI Primer-BLAST rīku (Ye et al. 2012). Detalizēts apraksts praimeru izveidei atrodams 2.2.5. apakšnodaļā.

2.8. tabula

RT-qPCR izmantotie praimerī

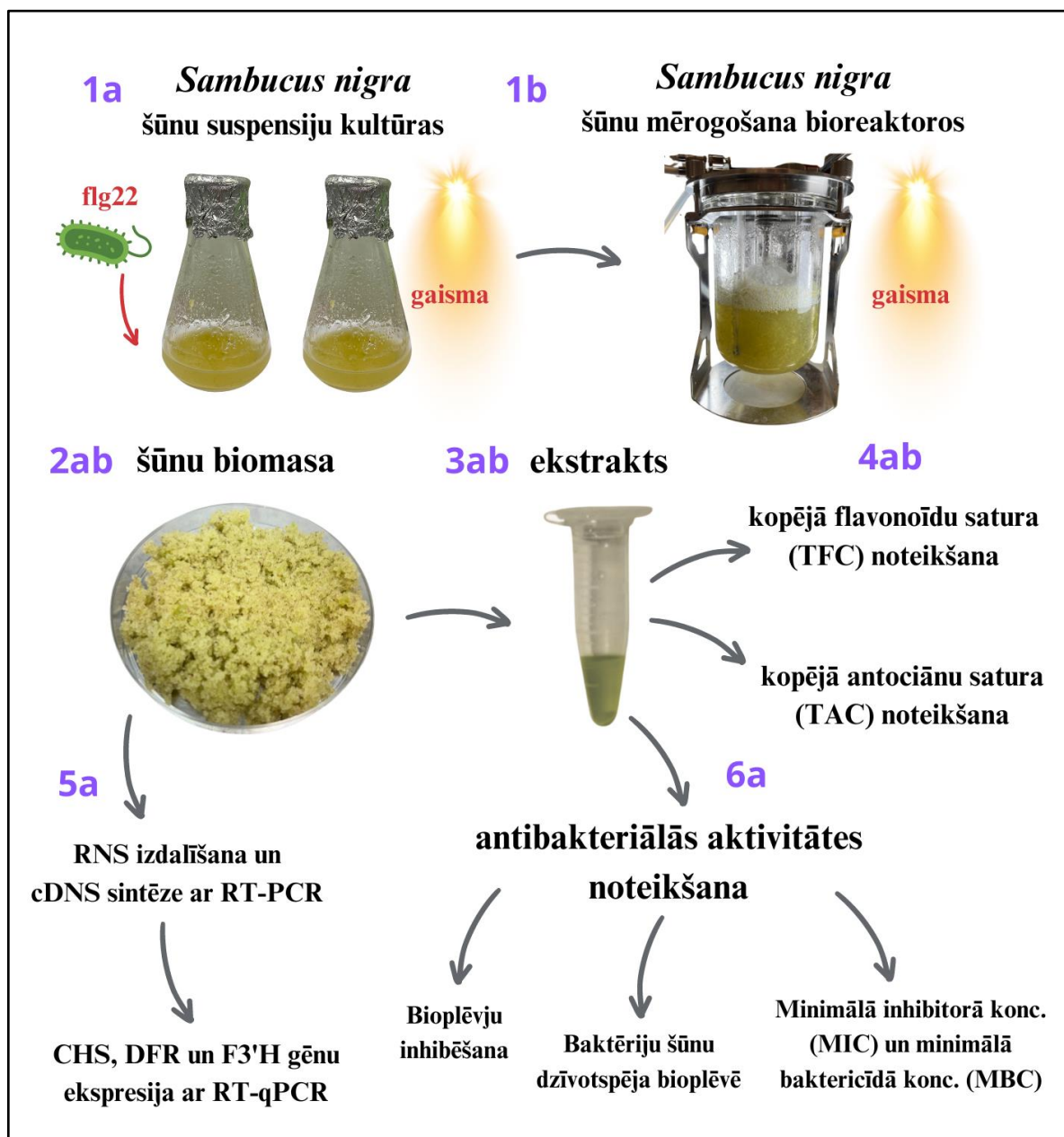
Table 2.8.

Primers used in RT-qPCR

Praimera kods / Primer code	Nukleotīdu sekvenca (5'→3') / Nucleotide sequence (5'→3')	Flavonoīdu biosintēzes ceļa enzīms / Enzyme of flavonoid biosynthesis pathway
<i>SnCHS-F</i>	GGGTGGACCCGCGATTCTTGA	Halkona sintāze / <i>Chalcone synthase</i>
<i>SnCHS-R</i>	CCGTCCCCAGTGGTGGCTTT	
<i>SnF3H-F</i>	TCGCGACCCGGATGTATGGGA	Flavonoīdu 3'-hidrolāze / <i>Flavonoid 3'-hydroxylase</i>
<i>SnF3H-R</i>	ATGCGAAGCCCAGGCTCAT	
<i>Sn3H-F</i>	AGGGATGGAAGCCGTGACAG	3'-hidrolāze / <i>3'-hydroxylase</i>
<i>Sn3H-R</i>	GATCCGGCTGAGGACACTTGGG	
<i>SnDFR-F</i>	TCGTGCTACTGTCCGCGATCC	Dihidroflavonola 4-reduktāze / <i>Dihydroflavonol-4-reductase</i>
<i>SnDFR-R</i>	GGGGTGGCAACATGAAACTCC	
<i>SnANS-F</i>	GTTGGGTACGCATTTGGCGGT	Antocianidīna sintāze / <i>Anthocyanidin synthase</i>
<i>SnANS-R</i>	ACCGGAACCTGCTCTTGGCGT	
<i>SnGAPDH-F</i>	CTTTGCCAATGGCGCGAGACAG	Glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāze / <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>SnGAPDH-R</i>	CAGGGAGGTGCAAAGAAGGTCGTTA	
<i>SnTUB-F</i>	CTGCACTGGCCTCCAAGGGT	Tubulīns / <i>Tubulin</i>
<i>SnTUB-R</i>	GTGTGTTCCAGGAGGGAATGGGT	
<i>SnACT1-F</i>	AAATGCATGGTCCCACACATGACCC	Aktīns-1 / <i>Actin-1</i>
<i>SnACT1-R</i>	CTGCAGGATATTGCCGTTGGAGA	

2.2. Metodes

S. nigra šūnu suspensiju kultūras un *S. nigra* ogas tika iegūtas projekta Izp-2022/1-0179 “Endofītiskās mikrobiotas loma Melnā plūškoka *Sambucus nigra* L. iedarbībā pret A tipa gripas vīrusu un SARS-CoV-2” ietvaros, detalizēta informācija par to iegūšanu atrodama A. Boroduske et al. (2022) publikācijā. Sterilu apstākļu nodrošināšanai darbs *S. nigra* šūnu suspensiju *in vitro* kultūrām tika veikts laminārboksā. Pētījuma shēma ir redzama 2.1. attēlā.



2.1. attēls. Pētījuma shēma. Burts “a” attēlo eksperimentus, kas attiecas uz šūnu suspensiju kultūrām kolbās. Burts “b” attēlo eksperimentus, kas attiecas uz šūnām bioreaktoros. Burtu “ab” kombinācija attēlo eksperimentus, kas tika veikti ar šūnām gan no kolbām, gan bioreaktoriem.

Figure 2.1. Scheme of the research. The letter “a” represents experiments involving cell suspension cultures in flasks. The letter “b” represents experiments involving cells in bioreactors. The letter combination “ab” represents experiments that were performed with cells from both flasks and bioreactors.

2.2.1. Barotņu pagatavošana

MS barotne tika pagatavota pēc 2.2. tabulā uzrādītajām sastāvdaļām un pH, kas tika līdzsvarots, izmantojot 1 M NaOH un 0,1 M HCl. Barotne tika autoklāvēta stikla pudelēs (121 °C 20 min). Pēc autoklāvēšanas pie barotnes ar sterilu filtru (poru izmērs: 0,20 μm) tika pievienotas vielas: TDZ un NAA. Šķidrā barotne tika uzglabāta ledusskapī pie + 4 °C ne ilgāk kā divas nedēļas.

2.2.2. Eksperimenti ar *S. nigra* šūnu suspensiju kultūrām

Lai ierosinātu sekundāro metabolītu biosintēzi, *S. nigra* šūnu suspensijas tika elicītētas ar flg22 un pakļautas dažādas intensitātes apgaismojumam.

Elicītēšanas ar flg22 eksperimentā šūnas tika iegūtas no 14 dienas vecām šķidrām suspensiju kultūrām ar vakuuma filtrēšanas metodi, izmantojot sterilu poliamīda sietu (acs izmērs: 35 μm), lai atdalītu biomasu no barotnes. Šūnu svaigā biomasa (šūnu inokuls 10% m/V; 2,5 g) tika pārnesta 25 mL MS barotnē 150 mL kolbās, kultivējot 24 °C temperatūrā pie fotoperioda 16 h/8 h gaisma/tumsa uz kratītāja ar ātrumu 120 apgr./min.

Lai noteiktu flg22 elicītēšanas ilguma ietekmi, dažādos eksperimentālos variantos flg22 tika pievienots atšķirīgā kultivēšanas dienā. Eksponeciālā fāzes beigās, kultivēšanas 11., 12. un 13. dienā pieciem paraugiem tika pievienots 1,0 μM (gala koncentrācija) flg22, kurš pirms tam tika šķīdināts dejonizētā ūdenī un filtrēts caur sterilu filtru (poru izmērs: 0,20 μm). Kultivēšanas 14. dienā ar filtrēšanu tika ievākta šūnu biomasa, iegūstot paraugus ar flg22 elicītēšanas ilgumu 72 h, 48 h un 24 h un kontroles paraugus, kuriem tika pievienots atbilstošs daudzums sterila ddH₂O (dubultā destilēta ūdens). Paraugiem tika noteikta svaigā masa (FW). Daļa šūnu masas (2,0 – 2,5 g) tika saberzta piestā ar piestalu, izmantojot šķidro slāpekli, un uzglabāta 1,5 mL stobriņos RNS izdalīšanai -80 °C temperatūrā. Tika noteikts šūnu specifiskās augšanas ātrums μ pēc formulas: $\mu = \frac{\ln FW_{beigās} / \ln FW_{sākumā}}{\text{Kultivēšanas dienu skaits}}$ un dubultošanās laiks t_d , kas ir apgriezti proporcionāls μ .

Apgaismojuma intensitātes eksperimentā šūnas tika iegūtas no 14 dienas vecām šķidrām kultūrām ar vakuuma filtru, suspendējot svaigā barotnē 20 kolbās, kā aprakstīts iepriekš. Paraugu apgaismošana tika nodrošināta gan no augšas, gan sāniem, virs kratītāja un vienā kratītāja malā novietojot baltās gaismas LED lampas, nodrošinot četras dažādas gaismas intensitātes, kas tika noteiktas ar luksometru: 400 – 450 μmol m⁻² s⁻¹, 200 – 250 μmol m⁻² s⁻¹, 50 – 100 μmol m⁻² s⁻¹ (kontroles varianta paraugi) un 0 μmol m⁻² s⁻¹ jeb tumsa (kolbas iefītas

folijā). Pēc 14 dienām ar filtrēšanu tika ievākta biomasa. Paraugiem tika noteikta svaigā masa un daļa sasaldēta RNS izdalīšanai, kā aprakstīts iepriekš.

Abos eksperimentos ekstraktu iegūšana tika veikta pēc vienāda darba protokola. Šūnu biomasa tika liofilizēta, izmantojot laboratorijas liofilizatoru šādos apstākļos: 48 h 50 °C pie 0,04 mbar, tad 0,5 h 65 °C temperatūrā un 0,0054 mbar. Pēc liofilizēšanas tika noteikta šūnu sausā masa (DW). Kā kontrole tika izmantotas sasaldētas *S. nigra* ogas. Liofilizētās šūnas tika samaltas, izmantojot kafijas dzirnaviņas, un ekstrahētas ar 40% etanolu ultraskaņas vannā 20 min. Pēc tam paraugi tika centrifugēti pie 1200 rcf 5 min un no tiem tika atdalītas nogulsnes. Iegūtais supernatants tika ietvaicēts vakuumietvaicēšanas iekārtā +40 °C temperatūrā 2 h, tad sasaldēts -80 °C un liofilizēts 72 h iepriekš norādītajos apstākļos. Liofilizētie ekstrakti tika resuspendēti 40% etanola, lai iegūtu koncentrāciju 30 mg ekstrakta DW uz mL. Ekstrakti tika izfiltrēti ar sterilu filtru un izmantoti TFC, TAC noteikšanā un antibakteriālās aktivitātes testos.

2.2.3. Sekundāro metabolītu noteikšana ekstraktos

S. nigra ekstraktiem tika noteikts kopējais flavonoīdu saturs (TFC) un kopējais antociānu saturs (TAC).

TFC noteikšana tika veikta pēc Huang et al. (2018) protokola, kas pielāgots 96-lauciņu mikroplatēm. Lai nodrošinātu mērāmās absorbcijas atbilstību standartlīknes diapazonam, pētāmie ekstrakti tika analizēti divos atšķaidījumos – 100% un 10%, attiecīgi mikroplates iedobē iepildot 20 µL ekstrakta vai 2 µL ekstrakta un 18 µL ddH₂O. Iedobēm tika pievienoti 80 µL ddH₂O, 30 µL 0,4 M NaOH un 100 µL 90% dietilēnglikola. TFC kvantificēšanai tika izmantoti rutīna seriālo atšķaidījumu (15 – 1000 mkM, $R^2 = 0,999$) standarti. Kā negatīvā kontrole tika izmantots ekstrakts bez pievienota NaOH. Mikroplates tika inkubētas 10 min 40 °C temperatūrā. Tad tās tika atdzesētas līdz istabas temperatūrai. Mikroplates tika ievietotas mikroplašu lasītājā *Infinite 200 pro*, kur tika mērīta paraugu absorbcija pie 360 nm viļņu garuma, izmantojot programmu *Tecan i-control*. Iegūtie dati tika izteikti mg rutīna (RE) ekvivalentos uz g ekstrakta sausās masas, balstoties uz RE standartlīkni.

TAC noteikšanai tika izmantots Lee et al. (2005) protokols. Tika izveidoti ekstraktu atšķaidījumi 1:4 (ekstrakts : buferšķīdums) diviem buferšķīdumiem (pH 1 un pH 4,5): 200 µL ekstrakta tika atšķaidīti ar 800 µL KCl buferšķīdumu pH 1 (0,025 M) un 800 µL NaOAc buferšķīdumu pH 4,5 (0,4 M). Paraugi tika vorteksēti un inkubēti istabas temperatūrā 20 min. Tad tika noteikta šķīdumu absorbcija pie 520 nm un 700 nm, izmantojot *NanoDrop* lasītāju un programmu *NanoDrop 2000/200c*. Iegūtie dati tika izteikti cianidīna-3-glikozīda (Cyn-3-Glu) ekvivalentos pēc formulas:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}, \text{ kur}$$

$A = (A_{520 \text{ nm pH}1} - A_{700 \text{ nm pH}1}) - (A_{520 \text{ nm pH}4,5} - A_{700 \text{ nm pH}4,5})$, MW (molmasa) cianidīna-3-glikozīdam = 449,2 g/mol, DF = atšķaidījuma pakāpe, ϵ (molekulārais absorbcijas koeficients) = 26900 L/mol, l – gaismas ceļa garums kivetē, cm (Lee et al. 2005).

2.2.4. Ekstraktu antibakteriālās aktivitātes noteikšana

Antibakteriālā aktivitāte – minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) un minimālā bakteriostatiskā koncentrācija (MBC) – tika novērtēta pēc Wiegand et al. (2008) protokola, izmantojot četrus baktēriju sugu celmus: gram-pozitīvas – *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* un gram-negatīvas – *Escherichia coli*. Kontrolei tika izmantots 40% etanols un ekstrakts, kas iegūts no *S. nigra* ogām. Ekstraktiem, kuri uzrādīja zemāko MIC un MBC, tika noteikta *B. licheniformis* bioplēvju inhibēšanas spēja, izmantojot kristālvioleto krāsvielu, un bakteriālo šūnu dzīvotspēja bioplēvē ar fluoresceīna diacetāta (FDA) hidrolīzes testu.

MIC un MBC noteikšana

Darba gaita:

1. Baktērijas tika uzsētas Petri platēs uz R2A agarizētām barotnēm (2.7. tabula) ar pH $7,2 \pm 0,2$ un inkubētas 37 °C temperatūrā 24 h.
2. Sterilā 96-lauciņu mikroplašu katrā iedobē tika ienesti 100 µL šķidrās M-H barotnes (2.7. tabula). Pirmajās plašu iedobēs tika ienesti 100 µL 30 mg/mL testējamā ekstrakta, tālāk šo iedobju saturu atšķaidot 12 soļos un iegūstot – 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,20%, 0,098%, 0,049%, 0,024%, 0,012% – atšķaidījumus. Papildus ekstraktiem testā tika iekļauta negatīvā kontrole – 10% etanola šķīdums.
3. Pēc 24 h kultivēšanas baktēriju kolonijas ar sterilu bakterioloģisko cilpu tika suspendētas autoklāvētā ūdenī, tā lai suspensijas optiskais blīvums (OD) pie 625 nm būtu intervālā no 0,08 līdz 0,1.
4. Baktēriju inokulāts tika atšķaidīts attiecībā 1:99 ar autoklāvētu ūdeni. No atšķaidītās suspensijas 100 µL tika ienesti katrā 96-lauciņu plates iedobē.
5. Mikroplates tika inkubētas 24 h 37 °C temperatūrā.
6. Pēc inkubēšanas tika noteikta MIC – testējamā ekstrakta lielākais atšķaidījums jeb zemākā koncentrācija, pie kuras baktēriju augšana netika novērota. Mikroplašu lauciņiem tika noteikts OD pie 625 nm.
7. Petri platēs uz R2A agarizētām barotnēm tika izsēti 4 µL no tām 96-lauciņu plates iedobēm, kurās augšana netika novērota. Plates tika inkubētas 24 h 37 °C temperatūrā.

8. Pēc inkubēšanas tika noteikta MBC – atbilstošs lielākais atšķaidījums jeb zemākā koncentrācija, pie kuras uz agarizētām platēm augšana netika novērota.

***B. licheniformis* bioplēves veidošanās noteikšana ar kristālvioleto krāsvielu**

Darba gaita:

1. *B. licheniformis* tika kultivēts NB šķidrā barotnē (2.7. tabula) 37 °C temperatūrā 24 h (ar sēšanas blīvumu 0,16 pie 540 nm).
2. Kultivētā baktēriju suspensija tika atšķaidīta 1:99 pret NB.
3. Sterilās 96-lauciņu plates iedobēs tika ielieti 100 µL NB barotnes un pirmajā iedobē – 100 µL ekstrakta, veidojot atšķaidījumus, kā aprakstīts “MIC un MBC noteikšana” darba gaitas 2. punktā.
4. Katrā plates iedobē tika ienesti 100 µL iepriekš atšķaidītās *B. licheniformis* suspensijas.
5. Mikroplates tika inkubētas 48 h 37 °C temperatūrā.
6. Pēc 48 h no mikroplates iedobēm tika nosūkts šķīdums, kas tika pārņemts jaunās 96-lauciņu platēs un mērīts šķīduma OD pie 630 nm.
7. Iedobēs palikušais šķīdums tika skalots trīs reizes ar sterilu ddH₂O.
8. Katrā iedobē tika ielieti 100 µL 0,1% filtrēta kristālvioletā šķīduma ddH₂O.
9. Plates tika inkubētas 15 min istabas temperatūrā.
10. Kristālvioletā šķīdums tika nosūkts un paraugi tika skaloti trīs reizes ar sterilu ddH₂O.
11. Atvērtas mikroplates tika inkubētas 15 min istabas temperatūrā.
12. Katrā plates iedobē tika iepildīti 200 µL 96% etanola.
13. Plates tika inkubētas 30 min istabas temperatūrā.
14. Plates šķīdums tika nosūkts un mērīts tā OD pie 590 nm. Bioplēvju veidošanās spēja tika noteikta kā pozitīva-augsta ($OD_{590} \geq 1,0$), pozitīva-zema ($0,1 \leq OD_{590} < 1,0$) vai negatīva ($OD_{590} < 0,1$) (Noumi et al. 2018).

***B. licheniformis* dzīvotspējas noteikšana bioplēvē ar FDA hidrolīzes testu**

Darba gaita:

1. Tika veikts “*B. licheniformis* bioplēves veidošanās noteikšana ar kristālvioleto krāsvielu” darba gaitas 1. – 7. solis.
2. Katrā 96-lauciņu plates iedobē tika ielieti 200 µL 0,5% FDA reakcijas maisījuma (1:100 20 µL FDA, 10% PBS bufera).
3. Plate tika inkubēta 20 min istabas temperatūrā.
4. FDA hidrolīze tika noteikta ar fluorescenci šādos parametros: ierosināšana – 490 nm, emisija – 526 nm, pieaugums – *optimal*.

2.2.5. *S. nigra* gēnu ekspresijas noteikšana

Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijai (RT-qPCR) tika izmantoti pašdizainēti praimeru. Praimeru pārbaude tika veikta ar *S. nigra* kallusu DNS. Lai pielietotu RT-qPCR, tika izdalīta RNS un veikta tās reversā transkripcija, ar kuru no izdalītās RNS tika uzsynetēta komplementārā DNS (cDNS). RNS izdalīšana, cDNS sintēze un PCR reakciju sagatavošana tika veikti UV attīrīšanas laminārā, lai mazinātu RNS degradācijas risku.

Balstoties uz literatūras datiem, tika izvēlēti pieci mērķa gēni, kuru ekspresija informatīvi raksturo flavonoīdu un antociānu biosintēzes aktivitāti augā: *CHS*, *F3'H*, *3'H*, *DFR*, *ANS*, un trīs *housekeeping* gēni: *GAPDH*, *TUB* un *ACT1*. Lai atrastu mērķa gēnu sekvenses *S. nigra*, homologijas meklēšanā tika izmantotas mērķa gēnu translētās aminoskābju sekvenses no *Vitis vinifera* (*GAPDH* un *TUB* gadījumā pret *Lonicera* sp.), kam attiecīgie gēni ir funkcionāli labi raksturoti (1. pielikums). Homologijas meklēšana tika veikta pret *S. nigra* genomu (GeneBank nr. GCA_949130495.1). Tad tika veikta unikālo sekvenču atlase. Analīzei tika izmantotas sekvenses ar augstāko līdzību, ko ietekmē gan pārklājuma (*coverage*) vērtības, gan līdzības % (*percent identity*).

Praimeru dizains tika veikts ar rīku NCBI Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Praimeru specifiskums tika salīdzināts pret *S. nigra* genomu. Praimeru veidošana tika veikta pēc šādiem parametriem: PCR produkta izmērs (*product size*) ir no 130 līdz 250 bp un praimeru kušanas temperatūras (*melting temperatures*, T_m) ir +64/+65/+66 °C (*min/optimal/max*). Iegūtie praimeru pāri tika atlasīti pēc optimālā praimeru garuma, savstarpēji līdzīgām T_m un zemiem komplementaritātes rādītājiem praimeru pāru starpā. Pētījumā izmantotie praimeru pāri ir apkopoti 2.8. tabulā.

RNS izdalīšana

RNS tika izdalīta no *S. nigra* šūnu suspensiju biomasas, kas ievākta pēc 2.2.3. apakšnodaļā aprakstīto eksperimentu beigām. RNS izdalīšana tika veikta ar *Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit* komplektu. Darbs veikts pēc ražotāja norādītā protokola, kas paredzēts ar polifenoliem bagātam auga materiālam.

Darba gaita:

1. Pirms darba sākšanas augu šūnu biomasai tika pievienots 500 μ L *Plant lysis solution*, kam pievienots PVP (2% tilpuma), un 10 μ L 2 M DTT.
2. Šūnas tika inkubētas šķīdumā 3 min 56 °C temperatūrā un tad šķīdums tika centrifugēts 5 min pie $\geq 24\ 000$ rcf.

3. Iegūtais supernatants (450-550 μL) tika pārnesti uz jaunu stobriņu. Tam tika pievienots 250 μL 96% etanola.
4. Sagatavotais maisījums tika pārnesti uz attīršanas kolonnu. Kolonna tika centrifugēta 1 min pie 12 000 rcf. Caurplūdes šķīdums tika nolietis, saglabājot stobriņu.
5. Kolonnai tika pievienoti 700 μL mazgāšanas buferšķīduma (WB 1). Tā tika centrifugēta 1 min pie 12 000 rcf un ievietota jaunā 2 mL stobriņā.
6. Kolonnai tika pievienoti 500 μL mazgāšanas buferšķīduma (WB 2). Kolonna tika centrifugēta 1 min pie 12 000 rcf. Caurplūdes šķīdumu nolēja, saglabājot stobriņu.
7. Tika atkārtots 6. solis ar centrifugēšanu 1 min pie 20 000 rcf un kolonna tika pārnesta uz RNāzes nesaturošu 1,5 mL stobriņu.
8. Lai eluētu RNS, attīršanas kolonnas membrānas centrā tika pievienoti 50 μL NFH_2O un tā tika centrifugēta 1 min pie 12 000 rcf.
9. RNS tika uzglabāta $-20\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrā līdz tika veikta tās pārbaude: koncentrācijas noteikšana ar *Nanodrop* un kvalitātes pārbaude ar agarozes gēla elektroforēzi.

RNS koncentrācija tika noteikta, lai saprastu, vai un cik kvalitatīvi RNS ir izdalījušies, un lai noteiktu, kāds tilpums RNS ir nepieciešama RT-qPCR. Katram RNS paraugam tika veikti absorbcijas mērījumi ar *NanoDrop* spektrofotometru pie viļņa garumiem 200 – 900 nm un iegūtas A260/A280 un A260/A230 vērtības. Iegūtā RNS koncentrācija tika izteikta ng/ μL .

RNS kvalitātes pārbaude ar agarozes gēla elektroforēzi tika izmantota, lai noteiktu, vai izdalītā RNS nav fragmentēta, jo tālākai analīzei nepieciešama nedegradēta RNS. Analīzei tika izmantots 1x TBE buferis un 1,5% agarozes gēls. Process tika veikts pie 100 V 60 min. Agarozes gēla attēlošanai tika izmantota programma *VisionWorksLS*.

RNS apstrāde ar DNāzi un attīršana

Lai panāktu cDNS sintēzi specifiski no RNS un izvairītos no cDNS sintēzes uz genomiskās DNS bāzes, tika veikta RNS apstrāde ar DNāzi. Apstrāde ar DNāzi tika veikta PCR sistēmā ar 2.9. tabulā norādītajiem reaģentiem. Reakcijas apstākļi: $37\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min.

2.9. tabula.

Reakcijas maisījums RNS attīrīšanas pirmajam solim

Table 2.9.

Reaction mixture for the first step of RNA purification

Reaģents / Reagent	Tilpums, μL / Volume, μL
10x reakcijas buferis	1,0
NF _H 2O	Variē
Ribolock RNāzes inhibitors (20 U/ μL)	0,25
DNāze	1,0
RNS šķīdums	variē (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Kopējais tilpums reakcijai	10,0

DNāzes inaktivācijai pēc reakcijas tika izmantotas divas metodes: termiskās apstrādes metode (iespējama RNS degradācija) un fenola-hloroforma metode (iespējami RNS zudumi).

Darba gaita termiskās apstrādes metodei:

1. Ar DNāzi apstrādātiem paraugiem tika pievienots 1,0 μL 50 mM EDTA.
2. Tie tika atkārtoti inkubēti PCR sistēmā 65 °C 10 min.

Darba gaita fenola-hloroforma metodei:

1. Ar DNāzi apstrādātiem paraugiem tika pievienots 290 μL ddH₂O, lai kopējais tilpums būtu 300 μL . Tad tika pievienots 300 μL fenola-hloroforma (1 : 1), paraugus vorteksēja 15 s. Paraugi tika centrifugēti 10 min pie 16 000 rcf.
2. Iegūtais supernatants (200 – 250 μL) tika pārnest uz jaunu stobriņu. Tam tika pievienots 200 – 250 μL hloroforma. Paraugus vorteksēja 15 s un tie tika centrifugēti 10 min pie 16 000 rcf.
3. Iegūtais supernatants (200 – 250 μL) tika pārnest uz jaunu stobriņu. Tam tika pievienota 1/10 no tilpuma 3 M NaOAc (20 – 25 μL), 2,5 x tilpuma 96% etanola (500 – 600 μL) un 125 mM EDTA 1:1 ar NaOAc (20 – 25 μL).
4. Paraugi tika sasaldēti -20 °C 1,5 h.
5. Pēc tam paraugi tika centrifugēti +4 °C 10 min pie 16 000 rcf. No stobriņiem tika izliets šķīdums un tiem tika pievienoti 200 μL 70% etanola. Stobriņi tika vorteksēti 15 s un centrifugēti +4 °C 5 min pie 16 000 rcf.
6. No stobriņiem tika izliets šķīdums, tie tika žāvēti tīrā darba laminārā (sterilizējams ar UV), līdz etanols ir iztvaikojis. Tad tiem tika pievienots 10 μL NF_H2O.

cDNS sintēzei (RT-PCR) tika izmantots *Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* komplekts un darbs veikts pēc ražotāja norādītā protokola.

Darba gaita pirmā pavediena cDNS sintēzei: Sterilā stobriņā, kurš atrodas ledū, tika pievienoti 2.10. tabulā uzrādītie reaģenti norādītajā secībā. Stobriņi tika vorteksēti 15 s. Tad tie tika inkubēti PCR sistēmā 42 °C 1 h un pēc reakcijas uzglabāti -20 °C temperatūrā.

2.10. tabula.

Reakcijas maisījums cDNS sintēzei

Table 2.10.

Reaction mixture for the cDNA synthesis

Reaģents / Reagent	Tilpums, μL / Volume, μL
RNS šķīdums	0,1 – 5,0 μg
Praimeris oligo (dT) ₁₈	1,0
NFH ₂ O	Līdz 12,0
5x reakcijas buferis	4,0
Ribolock RNāzes inhibitors (20 U/ μL)	1,0
10 mM dNTP Mix	2,0
RevertAid H Minus M-MuLV Reversā transkriptāze (200 U/ μL)	1,0
Kopējais tilpums reakcijai	20,0

DNS izdalīšana un praimeru pārbaude

DNS tika izdalīta no *S. nigra* kallusu biomasas, izmantojot CTAB DNS izdalīšanas protokolu (Kasajima et al. 2013). DNS izdalīšanas process tika veikts velkmes skapī.

Darba gaita:

1. *S. nigra* kallusu biomasu tika ievietota sterilā 2 mL stobriņā (1/3 no stobriņa). Pie auga materiāla katrā stobriņā tika pievienoti 600 μL CTAB bufera.
2. Materiāla sasmalcināšanai tika izmantotas metāla lodītes (8 mm diametrs) un homogenizators (trīs reizes pa 30 s ar frekvenci 1/30 s).
3. Paraugi tika ievietoti termoblokā pie 60 °C temperatūras uz 45 min. Pēc inkubēšanas paraugs bez kallusa audiem tika pārņemts uz jaunu stobriņu.
4. Paraugiem tika pievienoti 250 μL hloroforma: izopropanola (24:1), tie tika vorteksēti 10 s, inkubēti 22° C 5 min un centrifugēti 10 min pie 16 000 rcf.
5. Pēc centrifugēšanas tika noņemts virsējais slānis (400 μL), kas iepildīts jaunā stobriņā.
6. Paraugiem tika pievienoti 250 μL hloroforma : fenola : izopropanola (24 : 24 : 1), vorteksējot, inkubējot, centrifugējot un pārnesot virsējo slāni, kā iepriekš.

7. Paraugiem tika pievienoti 300 μL izopropanola. Tie tika uzmanīgi samaisīti un inkubēti 22° C 1 h. Paraugi tika centrifugēti 10 min pie 16 000 rcf.
8. Pēc centrifugēšanas no stobriņiem tika noliets šķidrums, atstājot DNS nogulsnes stobriņā. Pie nogulsnēm katrā stobriņā tika pievienoti 500 μL 70% etanola, paraugus vorteksējot un centrifugējot 5 min pie 16 000 rcf.
9. No stobriņiem tika noliets etanols, atstājot DNS nogulsnes. Stobriņi tika žāvēti 40 °C temperatūrā (20 – 30 min). Pēc žāvēšanas stobriņā tika pievienoti 30 μL NFH_2O .
10. Izdalītai DNS tika noteikta koncentrācija un kvalitāte tā, kā iepriekš aprakstīts par RNS.
11. Pēc kvalitātes pārbaudes gan genomiskā DNS, gan uzsintezētā cDNS tika izmantota praimeru pārbaudei, amplificējot to ar PCR un veicot agarozes gēla elektroforēzi. Reakcijas maisījums un PCR apstākļi norādīti 2.11. tabulā un 2.12. tabulā.

2.11. tabula.

Reakcijas maisījums praimeru pārbaudei

Table 2.11.

Reaction mixture for the primer testing

Reaģents / Reagent	Tilpums, μL / Volume, μL
<i>Quick-Load Taq 2X Master Mix</i>	10,0
NFH_2O	7,0
Praimeris <i>forward</i> (F) + Praimeris <i>reverse</i> (R)	0,5 + 0,5
DNS / cDNS	2,0
Kopējais tilpums reakcijai	20,0

2.12. tabula.

PCR apstākļi

Table 2.12.

PCR conditions

Process / Process	Temperatūra, °C / Temperature, °C	Ilgums / Duration
Sākotnējā denaturācija / Initial denaturation	95	30 s
Denaturācija / Denaturation	95	20 s
Praimeru pievienošanās / Primer annealing	58	35 cikli 30 s
Elongācija / Elongation	68	30 s
Beigu elongācija / Final elongation	68	5 min
Uzglabāšana / Storage	4	∞

RT-qPCR

Pirms RT-qPCR tika veikta PCR ar visiem dizainētajiem praimeriem un ar cDNS no abiem eksperimentiem. Iegūto produktu analīze tika veikta ar agarozes gēla elektroforēzi, lai atlasītu tos mērķa gēnus, kuriem novērotas būtiskākās ekspresijas izmaiņas pētāmo audzēšanas apstākļu ietekmē – pēc elicītēšanas ar flg22 un dažādas gaismas intensitātes variantu starpā. Gēni, kuriem tika konstatētas atšķirības, tika izmantoti jau precīzākam gēnu ekspresijas raksturojumam ar RT-qPCR. PCR tika veikta tā, kā norādīts 2.11. tabulā un 2.12. tabulā (ar ciklu skaitu 25).

Mērķa gēnu relatīvās ekspresijas noteikšanai tika pielietots RT-qPCR. Katram paraugam tika izmantoti trīs mērķa gēnu *CHS*, *F3'H*, *DFR* praimeru pāri un viens references gēna *TUB* praimeru pāris. Tika veikta arī praimeru efektivitātes pārbaude ar pieciem cDNS atšķaidījumiem. Dati tika analizēti pēc Līvaka metodes (Livak and Schmittgen 2001).

Darba gaita:

1. 96-lauciņu plates iedobēs tika iepildīti 18 μ L reakcijas maisījuma (2.11. tabula; *Quick-Load Taq 2X Master Mix* vietā tika izmantots *SYBR Green/ROX qPCR 2X Master Mix*). Tad tika pievienoti 2 μ L cDNS parauga.
2. Reakcija notika RT-qPCR sistēmā 2.13. tabulā norādītajos apstākļos. Iegūtie RT-qPCR dati tika apstrādāti ar *QuantStudio 5 Real-Time PCR Design & Analysis* programmu.

2.13. tabula.

RT-qPCR apstākļi

Table 2.13.

RT-qPCR conditions

Process / Process	Temperatūra, °C / Temperature, °C		Ilgums / Duration
Sākotnējā denaturācija / Initial denaturation	95		10 s
Denaturācija / Denaturation	95		15 s
Praimeru pievienošanās / Primer annealing	58	37 cikli	30 s
Elongācija / Elongation	72		30 s
Kušanas līkne / Melt curve	95		15 s
	58		1 min
	95		15 s

3. PCR praimeru efektivitāte (*primer efficiency*, %) tika noteikta pēc formulas: $(10^{-1/slope} - 1) \times 100$, kur *slope* ir līknes, kas izveidota no pieciem secīgiem cDNS atšķaidījumiem ar atšķaidīšanas soli 10 (izteikti kā \log_{10}), slīpums (Kubista 2006). Pieņemamā praimeru efektivitāte ir intervālā no 85% līdz 110%.

4. Gēnu ekspresija tika noteikta ar normalizāciju pret references gēnu *TUB* pēc formulas:

$$2^{-\Delta Ct}, \text{ kur } \Delta Ct = Ct_{\text{mērķa gēns}} - Ct_{\text{references gēns}}.$$

2.2.6. *S. nigra* šūnu suspensiju mērogošana bioreaktoros

Tika veikta *S. nigra* šūnu suspensiju mērogošana bioreaktoros. *S. nigra* šūnas, kas kultivētas divas nedēļas un izfiltrētas ar vakuumfiltru, tika ievadītas trīs bioreaktoros, izmantojot 8% biomasas inokulu (60 g FW un 750 mL suspensiju kultivēšanas barotnes (2. pielikums)). Kultivēšanas apstākļu – skābekļa pieplūdes, apgriezīgu skaita (80 rpm) – regulēšanai bioreaktoros tika izmantota iekārta BIOSTAT A, kas konstanti mērīja arī temperatūru un pH līmeni suspendētajās šūnās. Papildus tika izveidotas arī šūnu suspensiju kultūras 500 mL kolbās (12 g FW un 120 mL suspensiju kultivēšanas barotnes), lai novērtētu *S. nigra* šūnu produktivitāti tilpumos 25 mL, 120 mL un 750 mL.

Šūnas trīs bioreaktoros tika kultivētas pie atšķirīgas intensitātes apgaismojuma: 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un 50 – 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; pēc 10 dienām šūnu biomasa tika ievākta, liofilizēta un no tās iegūti ekstrakti, kā arī noteikts šūnu dubultošanās laiks (2.2.2. apakšnodaļa). Ekstraktiem tika noteikts TFC un TAC (2.2.3. apakšnodaļa).

2.2.7. Datu apstrāde

Dati tika ievākti un apstrādāti *Microsoft Office Excel*. Iegūto rezultātu statistikas analīžu veikšanai tika izmantota viena faktora dispersiju analīze (*one-way ANOVA*), ar kuru noteica statistiski būtiskas atšķirības un *Tukey's multiple comparisons* tests, ar kuru noteica statistiski būtiskas atšķirības variantu starpā. Dati tika analizēti pie būtiskuma līmeņa $p < 0,05$. Statistikas testi tika veikti programmā *GraphPad Prism 10* (2.14. tabula).

2.14. tabula

Izmantotās datorprogrammas

Table 2.14.

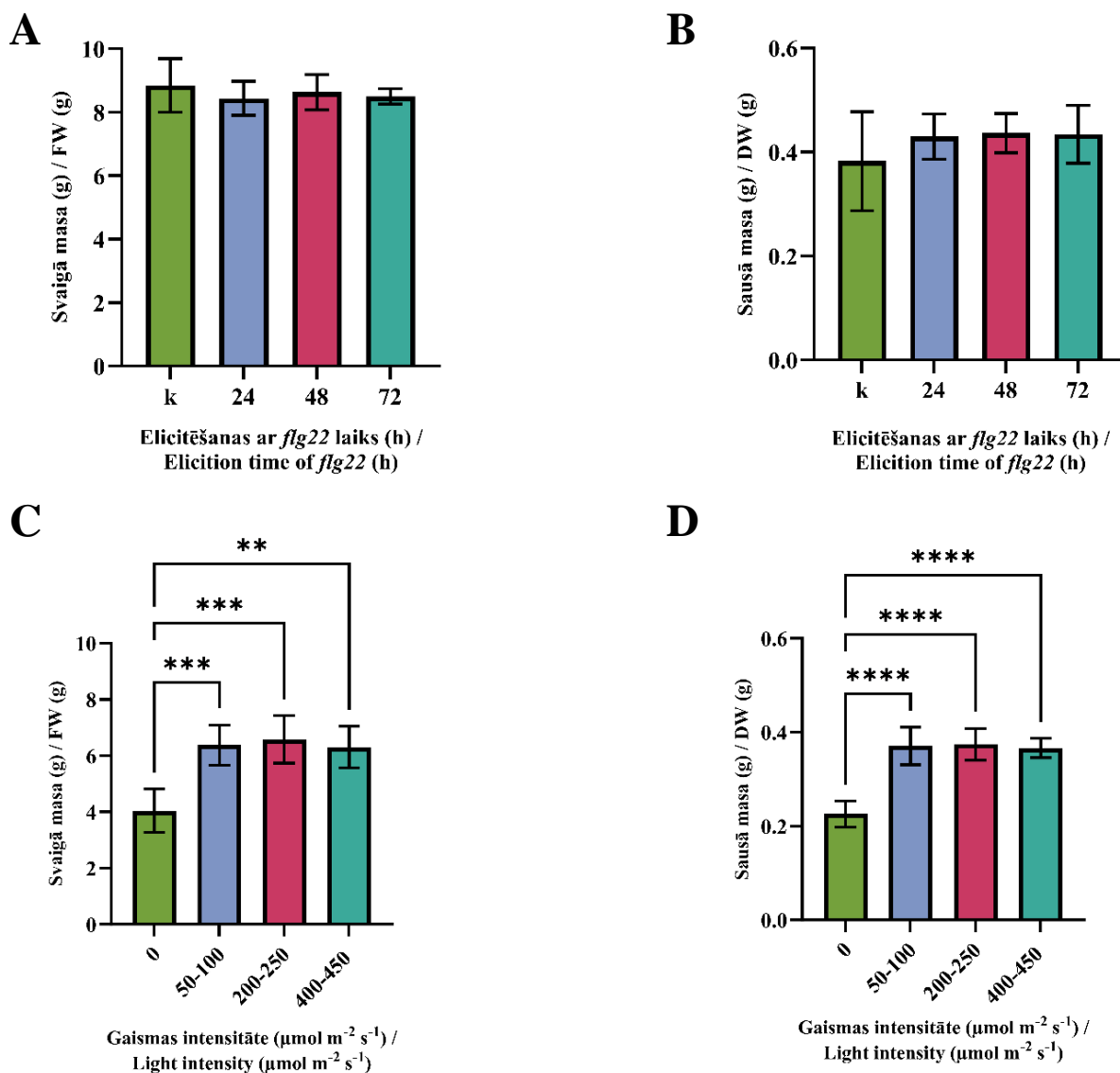
Used computer programs

Nosaukums / Name	Versija, gads / Version, year
<i>Microsoft Office Excel</i>	16.0.16130.20298, 2023
<i>NanoDrop 2000/2000c</i>	1.1.03., 2009
<i>Tecan i-control AphaScreen</i>	3.9.1.0., 2017
<i>VisionWorksLS UVP</i>	5.5.2., 2005
<i>QuantStudio 5 Real-Time PCR Design & Analysis program</i>	2.6.0., 2021
<i>GraphPad Prism</i>	10.2.1., 2024
<i>BIOSTAT A Sartorius Stedim Biotech</i>	9.1.6., 2021

3. Rezultāti

3.1. Elicitoru ietekme uz *S. nigra* šūnu suspensiju biomamas pieaugumu

Lai izvērtētu elicētēšanas apstākļu ietekmi uz *S. nigra* šūnu suspensiju augšanu, pēc abu eksperimentu beigām tika noteikta šūnu FW un pēc liofilizēšanas – DW. Eksperimentā ar flg22 FW un DW paraugu starpā statistiski būtiskas atšķirības netika konstatētas ($F_{(3;16)} = 0,4828$, $p = 0,6988$ un $F_{(3;16)} = 0,8469$, $p = 0,4883$) (3.1.A un 3.1.B attēls).



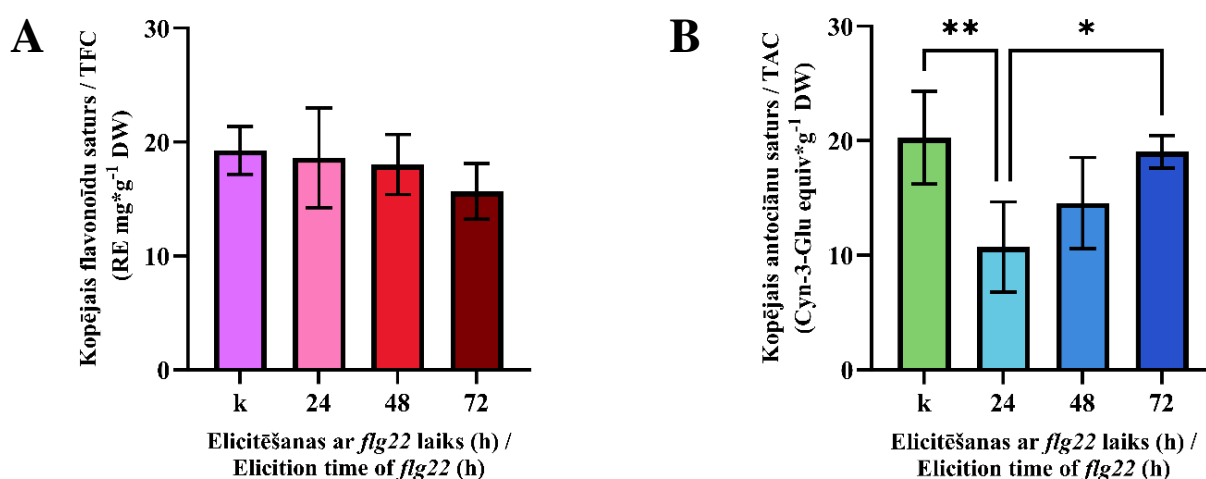
3.1. attēls. *S. nigra* šūnu suspensiju biomasas salīdzinājums. A – FW dažādos elicētēšanas ar flg22 ilgumos; B – DW dažādos elicētēšanas ar flg22 ilgumos; C – FW dažādās gaismas intensitātēs; D – DW dažādās gaismas intensitātēs. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, $n = 5$ (bioloģiskie atkārtojumi); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figure 3.1. Comparison of biomass of *S. nigra* cell suspensions. A – FW at different durations of elicitation with flg22; B – DW at different durations of elicitation with flg22; C – FW in different light intensities; D – DW at different light intensities. Error bars represent the standard deviations, $n = 5$ (biological repetitions); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Eksperimentā ar dažādām gaismas intensitātēm tika konstatēts, ka paraugiem, kas kultivēti tumsā, ir statistiski būtiski samazināta FW un DW, salīdzinot ar pārējiem eksperimenta variantiem ($F_{(3;16)} = 12,15$, $p = 0,0002$ un $F_{(3;16)} = 26,54$, $p < 0,0001$) (3.1.C un 3.1.D attēls).

3.2. Elicitoru ietekme uz TFC un TAC *S. nigra* šūnu suspensiju ekstraktos

No šūnu suspensijām iegūto ekstraktu kopējais flavonoīdu un kopējais antociānu saturs tika analizēts atkarībā no flg22 elicītēšanas ilguma un gaismas intensitātes (3.2. un 3.3. attēls). Eksperimentā ar flg22 statistiski būtiskas atšķirības TFC variantu starpā netika konstatētas ($F_{(3;16)} = 1,353$, $p = 0,2927$) (3.2.A attēls), bet TAC statistiski būtiskas atšķirības varēja konstatēt ($F_{(3;14)} = 6,397$, $p = 0,0059$) starp elicītēšanas ilgumu 24 h un 72 h ($p = 0,0255$) un 24 h un kontroles paraugiem ($p = 0,0069$) (3.2.B attēls).



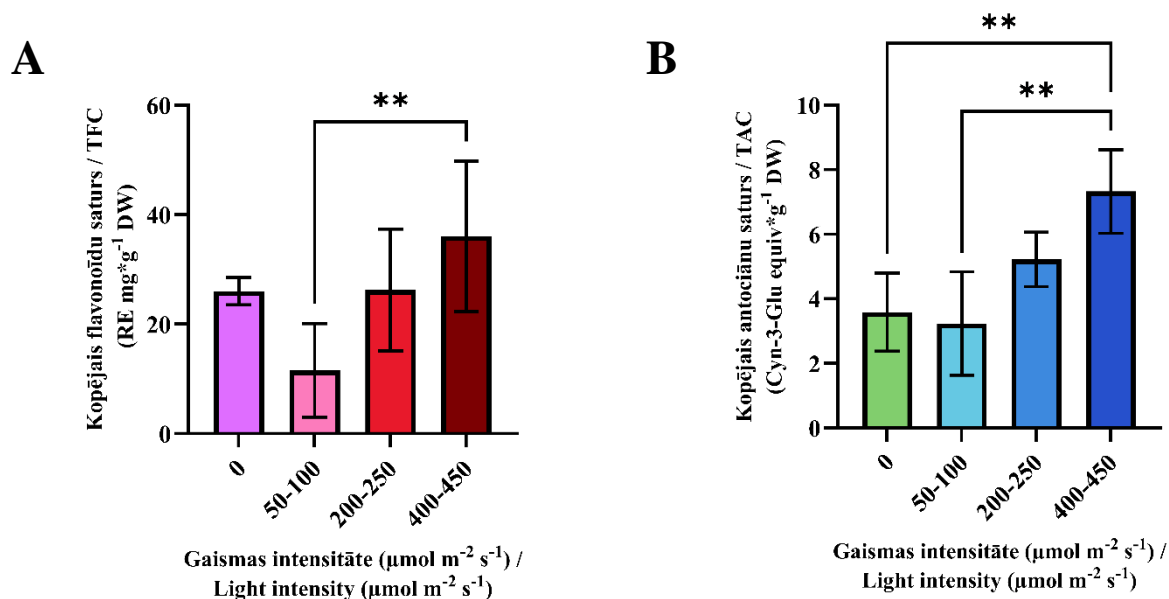
3.2. attēls. Kopējais flavonoīdu un kopējais antociānu daudzums *S. nigra* šūnu suspensiju kultūrās, kas elicētātas ar flg22 24 h, 48 h un 72 h. Kontroles paraugi apstrādāti ar ddH₂O. A – TFC; B – TAC. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, n = 5 (bioloģiskie atkārtojumi); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figure 3.2. Effect of flg22 treatment on total flavonoid and total anthocyanin content of *S. nigra* cell suspension cultures. flg22 treatment was applied at different time periods – 24 h, 48 h and 72 h. Control cells were treated with ddH₂O. A – TFC; B – TAC. Error bars represent the standard deviations, n = 5 (biological repetitions); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Eksperimentā pie dažādām gaismas intensitātēm visaugstākais TFC bija pie gaismas intensitātes 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($36,08 \pm 12,32$ RE mg* g^{-1} FW ekstrakta) ar statistiski būtiskām atšķirībām ($F_{(3;16)} = 5,174$, $p = 0,0109$) variantu starpā pie gaismas intensitātēm 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un 50 – 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($p = 0,0062$) (3.3.A attēls).

Visaugstākais TAC bija pie gaismas intensitātes 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($7,33 \pm 1,12$ Cyn-3-Glu equiv* g^{-1} FW ekstrakta) ar statistiski būtiskām atšķirībām ($F_{(3;12)} = 8,705$, $p = 0,0024$)

variantu starpā pie gaismas intensitātēm 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un 50 – 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($p = 0,0031$), kā arī 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ starpā ($p = 0,0061$) (3.3.B attēls).



3.3. attēls. *S. nigra* šūnu suspensiju kultūru kopējais flavonoīdu un kopējais antociānu saturs atkarībā no apgaismojuma intensitātes kultivēšanas laikā. A – TFC; B – TAC. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, $n = 5$ (bioloģiskie atkārtojumi); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figure 3.3. Effect of light intensity on total flavonoid and total anothocyanin content of *S. nigra* cell suspension cultures. A – TFC; B – TAC. Error bars represent the standard deviations, $n = 5$ (biological repetitions); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

No *S. nigra* liofilizētām ogām iegūto ekstraktu TFC un TAC bija ievērojami augstāks – attiecīgi 60,31 RE $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW un 148,04 Cyn-3-Glu equiv $\cdot \text{g}^{-1}$ DW.

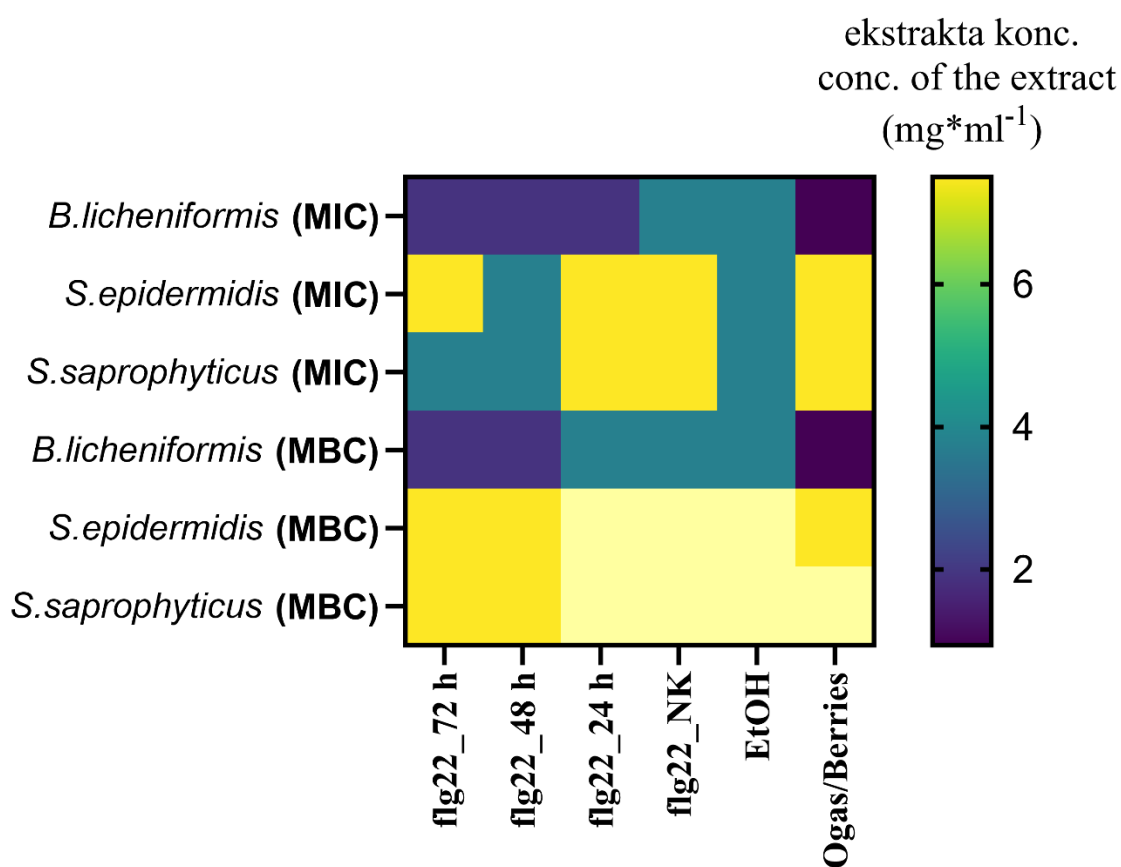
3.3. *S. nigra* ekstraktu antibakteriālā iedarbība

MIC un MBC

S. nigra ekstraktu antibakteriālās iedarbības novērtēšanai tika izmantoti četru baktēriju sugu celmi, kas izdalīti no mutes dobuma mikrobiotas vai zobu kanāla – *B. licheniformis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* un *E. coli*. MIC un MBC tika noteikta 40 *S. nigra* ekstraktiem, kas iegūti no šūnu suspensiju kultūrām, kuras elicētas ar flg22 un kuras kultivētas atšķirīgās gaismas intensitātēs.

Kopumā *S. nigra* šūnu un ogu ekstrakti uzrādīja antibakteriālu aktivitāti pret *B. licheniformis*, ka arī abām *Staphylococcus* sp., bet neietekmēja *E. coli*. Elicitēšana ar flg22 paaugstināja šūnu suspensiju antibakteriālo iedarbību pret *B. licheniformis* (3.4. attēls). Līdzīgi, *S. nigra* šūnu elicēšana ar flg22 paaugstināja antibakteriālo iedarbību pret abām *Staphylococcus* sp. Interesanti, ka *S. saprophyticus* gadījumā tika novērota elicēšanas ilguma

ietekme uz antibakteriālo iedarbību – ekastrakti no šūnu suspensijām, kuras tika elicitētas ar flg22 72 h un 48 h, uzrādīja zemāku MIC (3,75 mg/mL) pret *S. saprophyticus*, nekā ekstrakti no šūnu suspensijām, kuras tika elicitētas ar flg22 24 h un kuras netika elicitētas (MIC 7,5 mg/mL). Savukārt, pret *S. epidermidis* elicitēšanas ilgums neatstāja iespaidu. Ekstraktu MBC pret abām *Staphylococcus* sugām bija vienāda – efektivitāti ar 7,5 mg/mL uzrādīja elicitēšanas ilgums 72 h un 48 h, taču elicitēšana 24 h un negatīvā kontrole MBC ar pārbaudītajām ekstraktu koncentrācijām neuzrādīja. *S. nigra* ogu ekstrakts uzrādīja eksperimentā viszemāko MIC un MBC – 0,94 mg/mL pret *B. licheniformis*, taču pret abiem *Staphylococcus* sp. celmiem ogu ekstrakta antibakteriālā iedarbība bija vājāka nekā šūnu suspensiju ekstraktiem – to MIC un MBC bija 7,5 mg/mL.

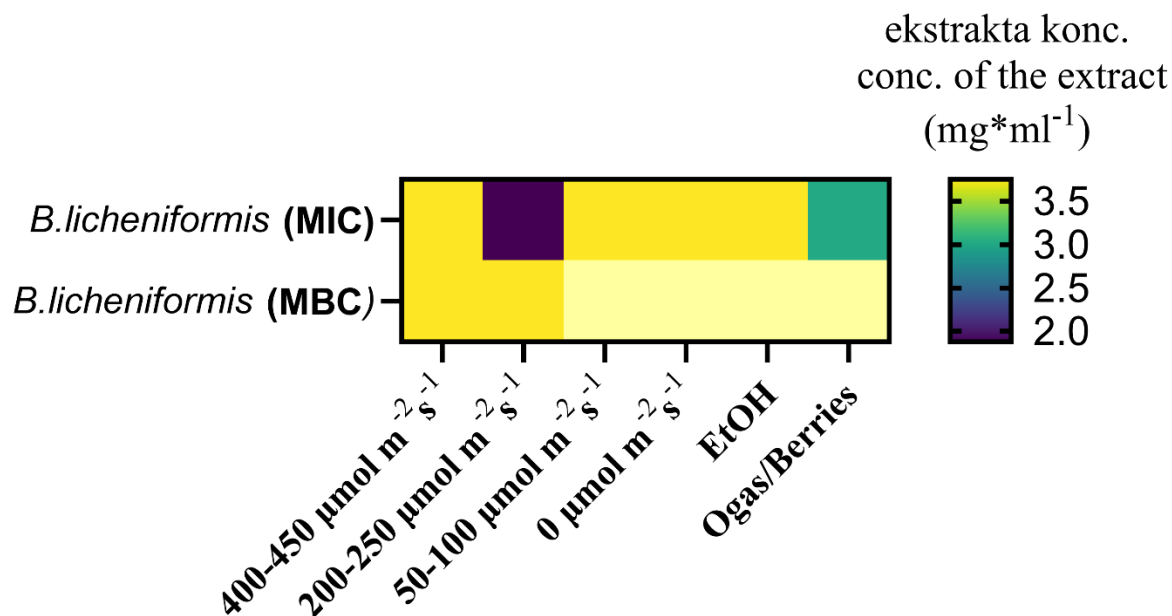


3.4. attēls. Elicitēšanas ar flg22 eksperimentā iegūto *S. nigra* ekstraktu MIC un MBC pret *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* un *B. licheniformis* sugu celmiem. EtOH – etanols. Krāsas parāda ekstrakta koncentrāciju.

Figure 3.4. MIC and MBC against *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *B. licheniformis* species of the *S. nigra* extracts obtained in the flg22 experiment. EtOH – ethanol. The colors show the concentration of the extract.

Eksperimentā, kurā šūnu suspensijas tika kultivētas pie dažādām gaismas intensitātēm, netika novērota iedarbība ne pret *E. coli*, ne pret *Staphylococcus* baktēriju sugu celmiem. Antibakteriālā iedarbība tika konstatēta pret *B. licheniformis* (3.5. attēls), taču tā nebija tik

efektīva, kā eksperimentā ar flg22. Šūnu suspensijas, kas tika kultivētas gaismas intensitātē 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, uzrādīja zemāko MIC (1,88 mg/mL). Pie pārējām gaismas intensitātēm MIC bija 3,75 mg/mL. Šūnu suspensijām, kas tika kultivētas gaismas intensitātē 50 – 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un tumsā, MBC ar pārbaudītajām ekstraktu koncentrācijām netika konstatēta.



3.5. attēls. Dažādu gaismas intensitāšu eksperimentā iegūto *S. nigra* ekstraktu MIC un MBC pret *B. licheniformis*. EtOH – etanols. Krāsas parāda ekstrakta koncentrāciju.

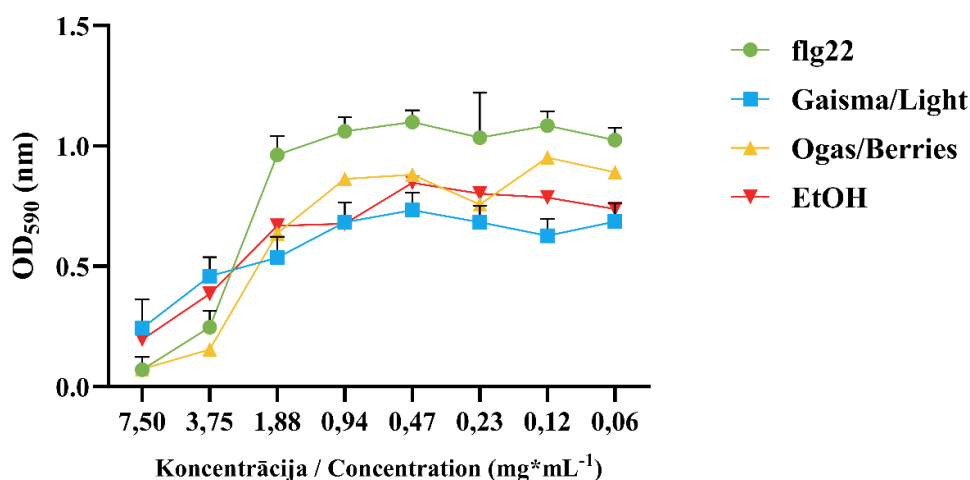
Figure 3.5. MIC and MBC against *B. licheniformis* of the *S. nigra* extracts obtained in the different light intensities experiment. EtOH – ethanol. The colors show the concentration of the extract.

B. licheniformis bioplēvju veidošanās inhibēšana

B. licheniformis bioplēvju veidošanās inhibīcijas novērtēšanai tika izmantoti *S. nigra* ekstrakti, kuri uzrādīja efektīvāko MIC un MBC rezultātu: ekstrakti, kas iegūti no šūnu suspensijām, kas elicitētas ar flg22 72 h un ekstrakti, kas iegūti no šūnu suspensijām, kas tika kultivētas gaismas intensitātē 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bioplēves eksperimentu rezultātu interpretācija tika veikta saskaņā ar Noumi et al. (2018) ieteikto vērtējuma skalu (detalizēts apraksts pieejams 2.2.4. apakšnodaļā).

Bioplēves krāsošana ar kristālvioletā krāsvielu uzrādīja, ka ar flg22 elicitēto šūnu ekstraktiem koncentrācijā 7,5 mg/mL piemīt negatīva ietekme uz bioplēves veidošanos ($\text{OD}_{590} < 0,1$). Zemākas koncentrācijas ekstrakti (3,75 mg/mL), kas iegūti no flg22 elicitētām šūnām, uzrādīja vājāku negatīvu un pat bioplēvju veidošanos veicinošu iedarbību pie koncentrācijas 1,88 mg/mL – pozitīva-zema ($\text{OD}_{590} < 0,3$), bet koncentrācijā 0,94 mg/mL un zemākā – pozitīva-augsta ($\text{OD}_{590} \geq 1$). Ekstraktiem no gaismas eksperimenta astoņās pārbaudītajās koncentrācijās (no 0,06 mg/mL līdz 7,5 mg/mL) bioplēves veidošana bija pozitīva-zema ($0,1 \leq$

OD₅₉₀ < 1,0) (3.6. attēls). Tika noteikts, ka *B. licheniformis* celma bioplēvju veidošanas spēja bez ekstrakta klātbūtnes ir pozitīva-augsta (OD₅₉₀ ≥ 1,3). OD sakarība tika novērota arī vizuāli – jo intensīvāks violets krāsojums, jo konstatēta spēcīgāka bioplēves veidošanās (3. pielikums).

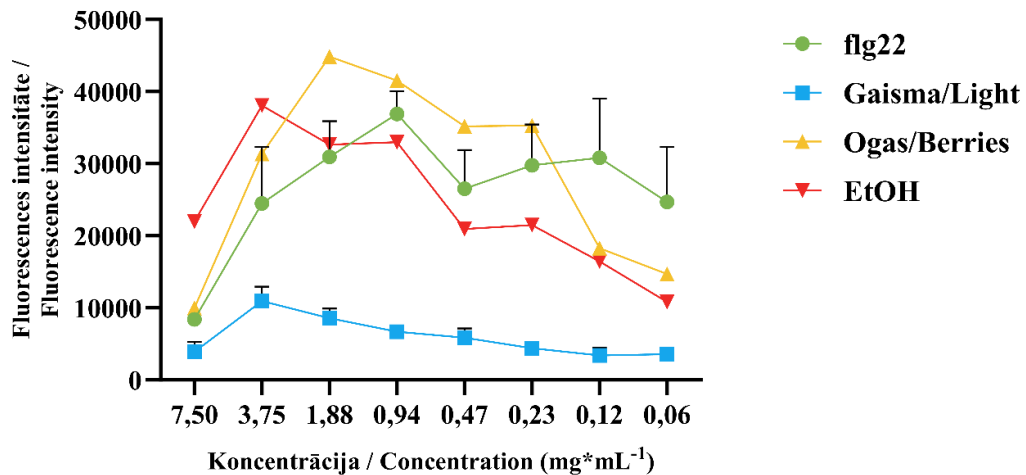


3.6. attēls. *S. nigra* šūnu suspensiju un ogu ekstraktu ietekme uz *B. licheniformis* bioplēvju veidošanos. Bioplēvju veidošanās izvērtēta kā *B. licheniformis* kultūru OD paraugā atkarībā no testējamo vielu koncentrācijas. Krāsu apzīmējumi: zaļš – *S. nigra* ekstrakti, kuri iegūti no šūnu suspensijām, kas elicitētas ar flg22 72 h; zils – *S. nigra* ekstrakti, kuri iegūti no šūnu suspensijām, kas kultivētas gaismas intensitātē 400 – 450 μmol m⁻² s⁻¹; dzeltens – *S. nigra* ogu ekstrakts; sarkans – etanols 10%. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, n = 5 (bioloģiskie atkārtojumi).

Figure 3.6. The effect of extracts derived from *S. nigra* cell suspensions and berries on *B. licheniformis* biofilm formation. Biofilm formation was assessed as OD of *B. licheniformis* culture in the presence of the tested extracts. Color codes: green – *S. nigra* extracts obtained from cell suspensions elicited with flg22 for 72 h; blue – *S. nigra* extracts obtained from cell suspensions cultured at a light intensity of 400 – 450 μmol m⁻² s⁻¹; yellow – *S. nigra* berry extract; red – ethanol 10%. Error bars represent the standard deviations, n = 5 (biological repetitions).

***B. licheniformis* šūnu dzīvotspējas noteikšana bioplēvē**

B. licheniformis šūnu dzīvotspēja bioplēvē tika novērtēta pēc šūnu enzimatiskās aktivitātes (ja šūna spēj hidrolizēt FDA, tad tā ir dzīvotspējīga). Fluorescences dati uzrādīja, ka viszemākā šūnu dzīvotspēja piemīt bioplēves paraugiem, kas apstrādāti ar ekstraktiem no gaismas eksperimenta (3.7. attēls). Ekstraktos no flg22 eksperimenta, ekstraktā no *S. nigra* ogām un etanolā dzīvo šūnu skaits bija lielāks, taču vērtības bija variablas. Varēja arī novērot negatīvu binomālu sakarību jeb tendenci, ka dzīvo šūnu skaits ir mazāks paraugos ar ekstraktiem visaugstākajā un zemākajās koncentrācijās.



3.7. attēls. *B. licheniformis* dzīvo šūnu skaits paraugā atkarībā no testējamo vielu koncentrācijas. Krāsu apzīmējumi: zaļš – *S. nigra* ekstrakti, kuri iegūti no šūnu suspensijām, kas elicitētas ar flg22 72 h; zils – *S. nigra* ekstrakti, kuri iegūti no šūnu suspensijām, kas kultivētas gaismas intensitātē 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; dzeltens – *S. nigra* ogu ekstrakts; sarkans – etanols 10%. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, n = 5 (bioloģiskie atkārtojumi).

Figure 3.7. The effect of extracts derived from *S. nigra* cell suspensions and berries on the cell viability of *B. licheniformis* biofilms. Color codes: green – *S. nigra* extracts obtained from cell suspensions elicited with flg22 for 72 h; blue – *S. nigra* extracts obtained from cell suspensions cultured at a light intensity of 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; yellow – *S. nigra* berry extract; red – ethanol 10%. Error bars represent the standard deviations, n = 5 (biological repetitions).

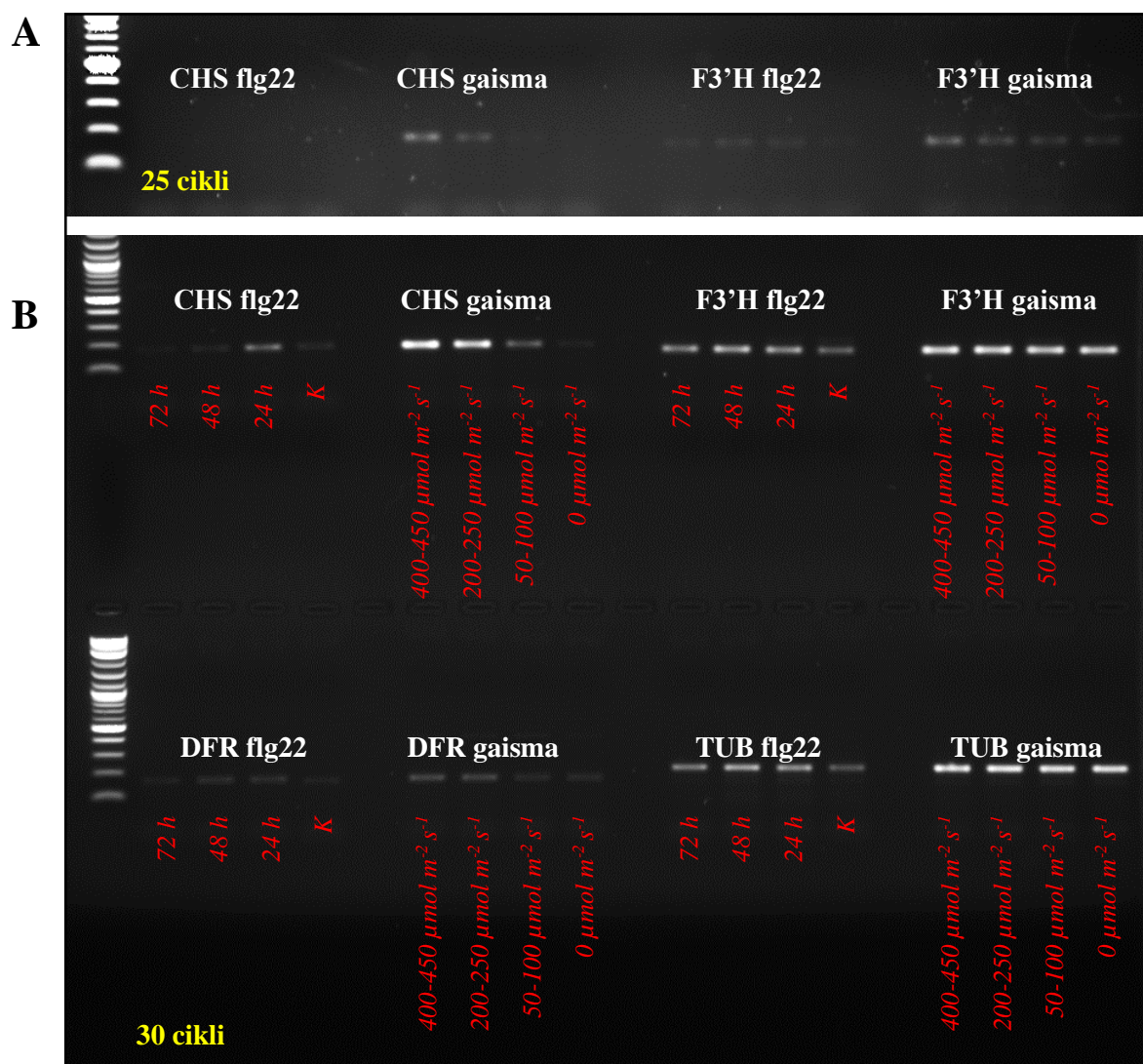
3.4. Gēnu ekspresija

No abām DNāzes inaktivācijas metodēm – termiskās apstrādes un fenola-hloroforma – par veiksmīgāko cDNS sintēzes izmantošanai tika atzīta termiskās apstrādes metode, jo RNS saglabāja sākotnējo koncentrāciju un netika degradēta (4. pielikums).

Praimeru pārbaude

Tā kā pētījumā izmantotie praimeri tika veidoti šī darba ietvaros, tika veikta praimeru darbības pārbaude, lai pārliecinātos, ka izveidotie praimeri ir specifiski un amplificē plānotā garuma fragmentus. Mērķa fragmentu amplifikācija no *S. nigra* sekvencēm sākotnēji tika pārbaudīta ar *S. nigra* DNS un sintezēto cDNS vienam paraugam ar abām DNāzes inaktivācijas metodēm. Agarozes gēla attēlā (4. pielikums) var redzēt, ka visi praimeri piesaistījās gan *S. nigra* genomiskai DNS, gan cDNS.

Lai resursu taupības nolūkā sašaurinātu ar RT-qPCR pārbaudāmo mērķa gēnu loku, sākotnējā PCR ar visu astoņu gēnu amplifikāciju no 40 cDNS paraugiem tika analizēta agarozes gēla elektroforēzē. Atšķirīgu joslu spilgtumu, tātad arī sagaidāmas būtiskas gēnu ekspresijas atšķirības uzrādīja *CHS*, *F3'H*, *DFR* (3.8. attēls), tāpēc tie tika izmantoti relatīvai gēnu ekspresijai RT-qPCR.

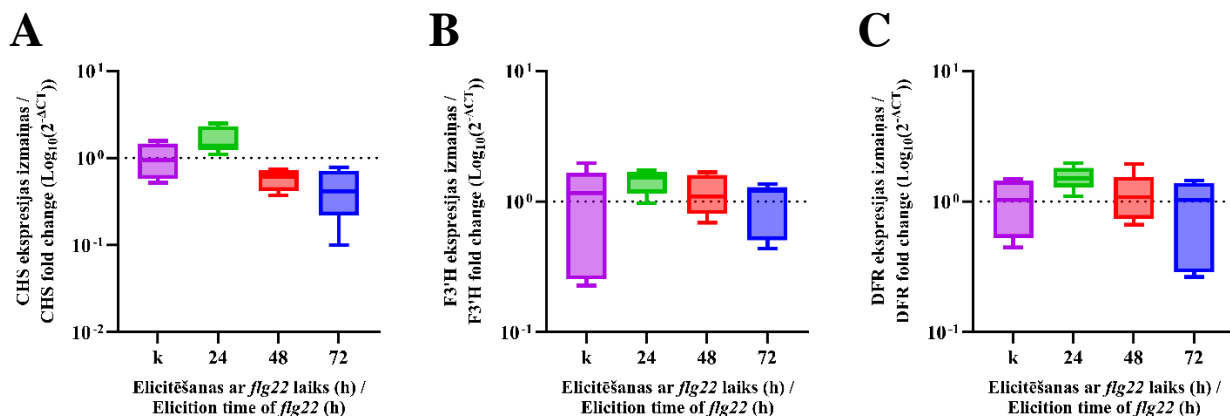


3.8. attēls. Gēnu *CHS*, *F3'H* un *DFR* ekspresijas atšķirību kvalitatīva noteikšana pēc joslu spilgtuma ar agarozes gēla elektroforēzi. A – 25 ciklu PCR ar gēniem *CHS* un *F3'H*; B – 30 ciklu reakcija ar gēniem *CHS*, *F3'H*, *DFR* un *TUB*.

Figure 3.8. Qualitative detection of differences in *CHS*, *F3'H* and *DFR* gene expression by fragment brightness by agarose gel electrophoresis. A – 25-cycle PCR with genes *CHS* and *F3'H*; B – 30 cycle reaction with genes *CHS*, *F3'H*, *DFR* and *TUB*.

RT-qPCR

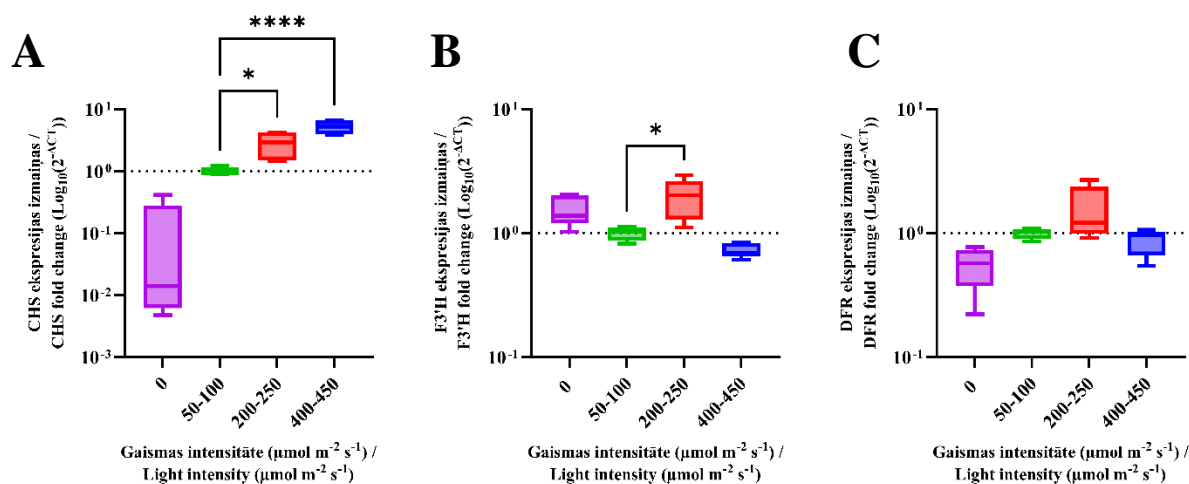
Tika noteikta *S. nigra* gēnu – *CHS*, *F3'H*, *DFR* – relatīvā ekspresija pret *housekeeping* gēnu *TUB*. *CHS* gēna ekspresijas modelis uzrādīja statistisku būtiskumu elicītēšanas ar flg22 eksperimentā ($F_{(3;15)} = 9,577$, $p < 0,0009$), taču variantu starpā netika novērotas būtiskas atšķirības. *F3'H* un *DFR* gēnu ekspresijā būtiskas atšķirības netika konstatētas. Varēja novērot tendenci, ka elicītēšana 24 h palielināja *CHS*, *F3'H* un *DFR* ekspresiju un elicītēšanas ilgums 72 h supresēja gēnu ekspresiju, salīdzinot ar kontroli (3.9.A, 3.9.B, 3.9.C attēls).



3.9. attēls. *S. nigra* gēnu ekspresijas izmaiņas dažādiem elicītēšanas ar flg22 ilgumiem. A – *CHS* ekspresijas izmaiņas; B – *F3'H* ekspresijas izmaiņas; C – *DFR* ekspresijas izmaiņas. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, n = 5 (bioloģiskie atkārtojumi).

Figure 3.9. Gene expression fold changes of *S. nigra* in different durations of elicitation with flg22. A – *CHS* fold change; B – *F3'H* fold change; C – *DFR* fold change. Error bars represent the standard deviations, n = 5 (biological repetitions).

Gaismas intensitātes eksperimenta *CHS* gēna ekspresijas modelis bija statistiski būtisks ($F_{(3;14)} = 24,62$, $p < 0,0001$). Gaismas intensitāte 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ būtiski palielināja *CHS* ekspresiju ($p < 0,0001$ un $p = 0,0486$), salīdzinot ar gaismas intensitāti 50 – 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *F3'H* gēna ekspresijas modelis bija statistiski būtisks ($F_{(3;15)} = 7,858$, $p = 0,0022$). Gaismas intensitāte 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ būtiski ($p = 0,0126$) palielināja *F3'H* ekspresiju, kas bija par 92,85% lielāka nekā *TUB* gēnam. Arī *DFR* gēna ekspresijas modelis bija statistiski būtisks ($F_{(3;15)} = 5,269$, $p = 0,0111$), taču atšķirības paraugu starpā, salīdzinot ar kontroli, netika konstatētas (3.10.A, 3.10.B, 3.10.C attēls).



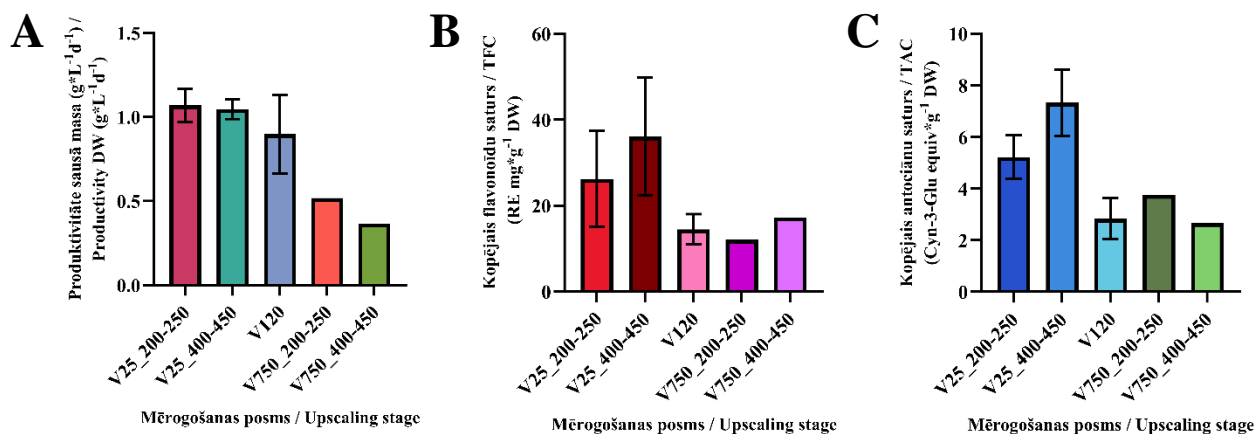
3.10. attēls. *S. nigra* gēnu ekspresijas izmaiņas pie dažādām gaismas intensitātēm. A – *CHS* ekspresijas izmaiņas; B – *F3'H* ekspresijas izmaiņas; C – *DFR* ekspresijas izmaiņas. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, n = 5 (bioloģiskie atkārtojumi); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figure 3.10. Gene expression fold changes of *S. nigra* in different light intensities. A – *CHS* fold change; B – *F3'H* fold change; C – *DFR* fold change. Error bars represent the standard deviations, n = 5 (biological repetitions); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.5. *S. nigra* šūnu suspensiju produktivitāte dažādos kultivēšanas tilpumos

Lai izvērtētu *S. nigra* šūnu suspensiju mērogošanas iespējas, šūnas tika audzētas trīs atšķirīgos darba tilpumos – 25 mL (125 mL kolbās), 150 mL (500 mL kolbās) un 750 mL (bioreaktors). *S. nigra* šūnas visos trīs bioreaktors pirmajās dienās vizuāli izskatījās zaļas. Pēc 10 dienām tika konstatēta infekcija šūnām (5. pielikums), kuras tika kultivētas zemākajā gaismas intensitātē ($50 - 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tāpēc tās liofilizēšanai un ekstrahēšanai netika izmantotas. Tika konstatēts, ka, audzējot *S. nigra* šūnu suspensijas 750 mL tilpumā – bioreaktorā, kultūru dubultošanās laiks vidēji ir 8,5 dienas. Salīdzinājumam, šūnu kultūru dubultošanās laiks 500 mL kolbās sasniedza vidēji 7,9 dienas un 125 mL kolbās – 6,9 dienas.

Salīdzinot gaismas eksperimentā iegūtos biomasas produktivitātes rezultātus no šūnām kolbās ar šūnām bioreaktors (3.11.A attēls), šūnu DW bija tendence samazināties, šūnu kultivēšanas tilpumam pieaugot. Gaismas intensitātē $400 - 450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ TFC bija tendence būt lielākam, salīdzinot ar kultivēšanu gaismas intensitātē $200 - 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (3.11.B attēls), un abās gaismas intensitātēs rādītāji vidēji bija par 2,2 reizēm lielāki kolbās ar tilpumu 25 mL, salīdzinot ar bioreaktoriem. TAC rādījumos tendence daļēji saglabājās – gaismas intensitātē $400 - 450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ TAC bija par 2,8 reizēm lielāks kolbās ar tilpumu 25 mL, bet gaismas intensitātē $200 - 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – par 1,4 reizēm lielāks, salīdzinot ar bioreaktoriem (3.11.C attēls). Lai iegūtu statistiski būtiskus rezultātus, nepieciešams veikt bioreaktoru eksperimentu ar vairākiem atkārtojumiem.



3.11. attēls. *S. nigra* šūnu suspensiju kultūru parametru salīdzināšana dažādos mērogošanas tilpumos. A – produktivitāte DW; B – TFC; C – TAC. Kļūdu nogriežņi attēlo standartnovirzes, $n_{V25} = 5$; $n_{V120} = 3$; $n_{V750} = 1$ (bioloģiskie atkārtojumi).

Figure 3.11. Comparison of *S. nigra* cell suspension culture parameters at different scaling volumes. A – productivity DW; B – TFC; C – TAC. Error bars represent the standard deviations, $n_{V25} = 5$; $n_{V120} = 3$; $n_{V750} = 1$ (biological replicates).

4. Diskusija

S. nigra ir tradicionāli pielietots dažādu infekciju slimību ārstēšanai, pateicoties tā veselību veicinošajām īpašībām (Manganelli et al. 2005). Viena no tām ir antimikrobiālā aktivitāte (Haş et al. 2023; Stepień et al. 2023), ko var izmantot bakteriālas izcelsmes mutes dobuma infekciju apkarošanā (Adnan et al. 2017; Křížkovská et al. 2023). Flavonoīdi un antociāni ir izplatītākie sekundārie metabolīti, kas *S. nigra* sastāvā ir augstās koncentrācijās (Nile and Park 2014). Auga antibakteriālās īpašības varētu būt saistītas ar šiem bioloģiski aktīviem savienojumiem (Puupponen-Pimiä et al. 2001; Hearst et al. 2010; Mohammadsadeghi et al. 2013).

S. nigra ekstraktu izmantošana mutes dobuma mikrobiotas patogēnu apkarošanai ir salīdzinoši maz pētīta un trūkst informācijas par *S. nigra* šūnu *in vitro* kultūru pielietojumu un optimizāciju vērtīgu savienojumu iegūšanai. Šajā pētījumā tika apskatītas *S. nigra* šūnu suspensiju kultūru kopējā flavonoīdu un antociānu satura, antibakteriālās aktivitātes un gēnu ekspresijas izmaiņas atkarībā no diviem faktoriem – šūnu suspensiju kultūru elicitēšanas ar flg22 un kultivēšanas dažādās gaismas intensitātēs.

4.1. *S. nigra* ekstraktu antibakteriālā aktivitāte

S. nigra ekstraktu antibakteriālās īpašības ir pierādītas pret gram-pozitīviem un gram-negatīviem baktēriju sugu celmiem no ģintīm: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* (Hearst et al. 2010; Przybylska-Balcerek et al. 2021; Haş et al. 2023). Šī brīža pieejamajā zinātniskajā literatūrā netika konstatēti dati par *S. nigra* antibakteriālu iedarbību pret *B. licheniformis*, *S. epidermidis* un *S. saprophyticus*, kas izolēti no mutes dobuma. Iegūtie rezultāti parāda *S. nigra* šūnu suspensiju ekstraktu inhibējošo potenciālu koncentrācijā no 1,88 mg/mL pret *B. licheniformis* un no 3,75 mg/mL pret *Staphylococcus* sugu celmiem. Literatūrā minētās MIC vērtības no *S. nigra* ogām un ziediem iegūtajiem ekstraktiem pret ārstniecības iestāžu patogēniem baktēriju sugu celmiem variēja no 0,0027 līdz 3,91 mg/mL (Mohammadsadeghi et al. 2013; Haş et al. 2023), kā rezultātā *S. nigra* šūnu suspensiju kultūru ekstrakti ir līdzvērtīgi efektīvi.

S. nigra ekstrakti neuzrādīja antibakteriālu aktivitāti pret *E. coli*. Viens no iemesliem varētu būt ekstraktu salīdzinoši zemā izejas koncentrācija (7,5 mg/mL) – iespējams, ka *E. coli* augšana varēja tikt inhibēta koncentrācijā, kas augstāka par 7,5 mg/mL. Gram-negatīvās baktērijas ir izturīgākas pret antibakteriāliem savienojumiem to šūnapvalka struktūras dēļ. Tām ir ārējais membrānas slānis, kas satur lipopolisaharīdus un proteīnus, aizurot antibakteriālu savienojumu difūziju. Gram-pozitīvām baktērijām šāda slāņa nav (Breijyeh et al. 2020).

B. licheniformis bioplēvju veidošanās bija negatīva, pielietojot *S. nigra* ekstraktus koncentrācijā 7,5 mg/mL. Bioplēvju struktūra kavēja antibakteriālu savienojumu difūziju caur baktēriju šūnapvalku (Bi et al. 2021), tāpēc bioplēvju augšanas nomākšanai ir nepieciešama augstāka ekstraktu koncentrācija. Lai arī šūnu suspensijas, kas elicītas ar flg22, uzrādīja salīdzinoši augstāku bioplēvju inhibēšanas spēju koncentrācijās 3,75 un 7,5 mg/mL, un zemākos atšķaidījumos attiecīgi bioplēvju veidošana netika inhibēta, šūnu suspensiju ekstrakti no gaismas eksperimenta visos atšķaidījumos uzrādīja zemu bioplēvju inhibēšanas spēju, bet netika sasniegts sliekšnis, kad bioplēvju veidošana nebūtu inhibēta.

Šo sakarību papildina *B. licheniformis* bioplēvē esošo šūnu dzīvotspējas rezultāti: ekstraktiem no flg22 eksperimenta koncentrācijā 7,5 mg/mL novēroja spēcīgāku negatīvu iedarbību uz baktēriju dzīvotspēju, nekā flg22 eksperimenta paraugiem zemākās koncentrācijās. Savukārt, ekstraktiem no gaismas eksperimenta visos atšķaidījumos novēroja līdzīgu negatīvu iedarbību uz *B. licheniformis* dzīvotspēju, turklāt šī iedarbība bija spēcīgāka nekā ekstraktiem no flg22 eksperimenta. Tas apstiprina, ka kultivēšana pie paaugstinātas intensitātes apgaismojuma *S. nigra* šūnās ierosina sekundāro metabolītu, domājams, flavonoīdu, sintēzi, kam ir inhibējošs efekts uz bakteriālo šūnu dzīvotspēju bioplēvē un šī negatīvā ietekme novērojama vismaz 48 h ilgā inkubācijas periodā ar *S. nigra* ekstraktu.

Iemesls, kāpēc dzīvo šūnu skaitam bija tendence būt mazākam tieši zemākās ekstraktu koncentrācijās, varētu būt saistīts ar šūnu bojāeju nobriedušā bioplēvē – barības vielu trūkuma un mikrovides pārāpdzīvotības dēļ. Šo sakarību varētu ietekmēt arī līdzsvars starp barības vielām un antimikrobiālām vielām, ko satur ekstrakts – pie zemām koncentrācijām ekstrakts baktēriju nenodrošināja pietiekami daudz barības vielu, bet antimikrobiālās vielas ekstraktā ir pietiekamā daudzumā, lai palielinātu šūnu mirstību.

4.2. *S. nigra* ekstraktu kopējais flavonoīdu un antociānu saturs

Pētījumā visspēcīgāko antibakteriālo aktivitāti pret *B. licheniformis* uzrādīja ekstrakti, kuri iegūti no šūnu suspensiju kultūrām, kas elicītas ar flg22 (1,8 mg/mL). Šo ekstraktu TFC bija viszemākais un TAC – palielinājās, elicīšanas ilgumam pieaugot. Spēcīga antibakteriālā aktivitāte tika konstatēta arī ekstraktiem no šūnu kultūrām, kas kultivētas gaismas intensitātē: 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (3,75 mg/mL). Šo ekstraktu TFC un TAC bija otrs augstākais gaismas eksperimenta ietvaros. Šūnu suspensiju elicīšana ar flg22 rezultējās ar antibakteriālās aktivitātes paaugstināšanos, bet flg22 nepaaugstināja mērķsavienojumu daudzumu šūnās. Tieši pretēji – elicīšanas ietekmē antociānu un flavonoīdu saturs būtiski samazinājās, salīdzinot ar šūnu suspensijām, kas netika elicītas ar flg22. Iespējams, elicīšana ar flg22 kavē antociānu veidošanos, izlīdzinot resursu izlietojumu par labu citiem sekundāriem metabolītiem, kas tiešā

veidā iesaistīti antimikrobiālā rezistencē. Antociānu koncentrācijas pakāpenisku pieaugumu līdz ar elicētēšanas laika pieaugumu varētu interpretēt kā šūnu suspensiju adaptāciju nelabvēlīgiem apstākļiem – jo ilgāk šūnu suspensijas tika pakļautas flg22 klātbūtnei, jo vairāk laika tām tika atvēlēts pielāgoties jaunajiem apstākļiem un atjaunot biosintēzes ceļu, kurš ir aktīvs normālos apstākļos. Šūnu suspensiju kultivēšana augstākā gaismas intensitātē arī rezultējās ar antibakteriālās aktivitātes pieaugumu, un gaisma inducēja flavonoīdu un antociānu sintēzi, kā tas bija paredzams (Rachel et al. 2001; Steyn et al. 2002; Matus et al. 2009). Lielākā gaismas intensitāte veicināja flavonoīdu un antociānu sintēzi, taču neizraisīja ievērojamu antibakteriālās aktivitātes pieaugumu.

Šie rezultāti ļauj spekulēt, ka flavonoīdi – antociāni ir iesaistīti *S. nigra* ekstraktu antibakteriālo īpašību nodrošināšanā, bet varētu būt arī citi savienojumi, kas *S. nigra* šūnu suspensijām nodrošina spēcīgākas antibakteriālās īpašības mutes dobuma mikrobiotas patogēnu augšanas palēnināšanā un baktēriju šūnu nonāvēšanā, un to sintēze pieaug elicētēšanas ar flg22 rezultātā. Tie, piemēram, varētu būt triterpēnu (saponīnu) vai oligosaharīdu klases pārstāvji (Hearst et al. 2010).

4.3. *S. nigra* gēnu ekspresija

S. nigra gēnu ekspresijas rezultāti parādīja, ka gaismas intensitāte $400 - 450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un $200 - 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ būtiski palielina *CHS* ekspresiju, kas ir flavonoīdu biosintēzes ceļa sākumā (1.2. attēls). *CHS* ekspresija netika novērota šūnās, kas kultivētas tumsā. Nākamais pārbaudītais flavonoīdu biosintēzes ceļa gēns bija *F3'H*, kura sintēzi palielināja gaismas intensitāte $200 - 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, taču augstāka un zemāka gaismas intensitāte *F3'H* ekspresiju samazināja. *DFR* bija kā pēdējais no pārbaudītajiem biosintēzes ceļa enzīmiem, kura ekspresija bija vismazākā visu gaismas intensitātes variantu starpā. Elicētēšana ar flg22 24 h uzrādīja visaugstāko ekspresiju visiem pārbaudītajiem gēniem (taču ne statistiski būtisku un ne tik augstu kā gaismas eksperimentam), tāpēc, domājams, ka optimāls elicētēšanas ilgums varētu ierosināt šo gēnu ekspresiju.

Vislielākais TFC un TAC bija pie visaugstākās gaismas intensitātes, taču gēnu ekspresija šim variantam bija visaugstākā tikai flavonoīdu sintēzes ceļa sākumā *CHS* gēnam. Šo rezultātu var skaidrot ar negatīvās atgriezeniskās saites cilpas principu (*negative feedback loop*), kas iekļauj regulējošus mehānismus, ar kuru palīdzību, sasniedzot konkrētu sliekšni, biosintēzes ceļa gēnu pārekspressija (*overexpression*) tiek ierobežota, lai šūna saglabātu homeostāzi, novēršot pārmērīgu sekundāro metabolītu uzkrāšanos (kas varētu izraisīt nelabvēlīgus efektus uz pašu šūnu), un samazinātu resursu patēriņu (Liu et al. 2023).

Gēnu ekspresijas rezultātos ir salīdzinoši liela bioloģiskā variabilitāte par flavonoīdu sintēzi atbildīgo gēnu ekspresijā, gan *housekeeping* gēnu ekspresijā. Iespējams, tas skaidrojams ar faktu, ka gēnu ekspresiju ietekmē ļoti daudz citu faktoru šūnas līmenī, kurus ir grūti standartizēti kontrolēt (Mohanty et al. 2023). Gēnu ekspresijas eksperimentu vēlams atkārtot ar pēc iespējas lielāku paraugu skaitu, lai iegūtu patiesāku rezultātu. Jāpiemin, ka dizainējot praimerus, nebija iespējams izvēlēties sekvences, kas atbilstu tikai mērķagēniem, bet vienlaikus nesaturētu nekādu līdzību ar citiem lokusiem *S. nigra* genomā. Lai gan tika izvēlētas praimeru sekvences, kas satur iespējami maz līdzību ar citiem lokusiem, tomēr teorētiski pastāv iespēja, ka izmantotie praimeri nelielā intensitātē amplificēja produktus arī no papildus lokusiem. Svarīgi, ka ne visu gēnu ekspresija RNS līmenī noved pie funkcionāla galaprodukta – korelācija ir aptuveni 40 – 60% (Vogel and Marcotte 2012), tāpēc precīzāki dati tiktu iegūti ar analīzi proteīnu līmenī.

Izmaiņas *S. nigra* šūnu antibakteriālajā efektivitātē varētu būt saistītas ar sekundāro metabolītu biosintēzes ceļa gēnu ekspresijas aktivāciju vai nomākšanu kāda elicitora ietekmē. Tas attiecīgi rezultējas ar konkrētajā ceļā sintezēto produktu, kuri atbild par antibakteriālajām īpašībām, pieaugumu vai samazināšanos.

4.4. *S. nigra* šūnu suspensiju eksperiments bioreaktoros

S. nigra šūnu suspensiju mērogošana bioreaktoros bija veiksmīga, kas nozīmē, ka *S. nigra* šūnu suspensijas ir robustas un ātri pielāgojas jauniem apstākļiem. Tā kā šūnu inokuls visiem trīs bioreaktoriem bija vienāds gan pēc masas, gan šūnu izcelsmes un kultivēšanas ilguma, infekcija vienā no bioreaktoriem varēja rasties ārēju faktoru ietekmē mērogošanas procesa uzsākšanā, neievērojot sterilitātes prasības. Jāņem vērā, ka bioreaktors, kurā šūnas tika inficētas, bija pakļauts zemākajai gaismas intensitātei ($50 - 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tas varēja šūnām izraisīt lielāku stresu papildus tam, ka jāpielāgojas jauniem kultivēšanas apstākļiem, kas varēja būt par pamatu mikroorganismu infekcijas uzņēmībai.

Viens no iespējamiem skaidrojumiem, kāpēc šūnas bioreaktoros auga lēnāk, salīdzinot ar šūnām kolbās, varētu būt gaismas intensitātes nevienmērīgums. Bioreaktoros esošās šūnas tika apgaismotas no divām pusēm, kas nozīmē, ka šūnas saņēma konkrēto gaismas daudzumu tikai pusi laika, jo tās visu laiku atradās nepārtrauktā rotācijas kustībā. Šis iemesls varēja negatīvi ietekmēt TFC un TAC bioreaktoros audzētās šūnas.

Šūnu augšanu un metabolismu (gan primāro, gan sekundāro) nelabvēlīgi varēja ietekmēt arī adaptēšanās jaunajiem apstākļiem: šūnu mehāniska maisīšana jeb berzes stress varēja izraisīt šūnu dzīvotspējas samazināšanos, šūnu augšanas palēnināšanos un šūnapvalka bojājumus, kas

var novest pie vērtīgo savienojumu zuduma, kā arī šūnu agregātu veidošanās, kas neļauj uzņemt nepieciešamās barības vielas katrai šūnai individuāli (Motolinía-Alcántara et al. 2021).

4.5. Turpmākie pētījumi

Turpmākie pētījuma virzieni ar *S. nigra* šūnu suspensiju kultūrām varētu ietvert eksperimentus ar detalizētāku bioķīmiskā sastāva analīžu veikšanu, dažādu optimizācijas metožu ietekmi uz *S. nigra* antibakteriālajām īpašībām un šūnu kultūru produktivitātes pieaugumu, kā arī kultūru optimizēšanu bioreaktoros. Bioķīmiskā sastāva analīzei jāizmanto kvalitatīvas metodes, piemēram, hromatogrāfija un masspektrometrija, kas ļautu ekstraktos noteikt konkrētus savienojumus un to saturu. Tādējādi būtu iespējams noskaidrot, kuri savienojumi atbild par antibakteriālās aktivitātes izmaiņām.

S. nigra šūnu suspensiju kultūru optimizēšanai varētu pielietot gan abiotiskos elicitorus, kā temperatūras izmaiņas un padziļinātu izpēti ar dažādām gaismas intensitātēm, gan biotiskos elicitorus, kā enzīmus un hormonus (piemēram, metiljasmonātu (Boroduske et al. 2022)), gan arī abiotisko un biotisko elicitoru kombināciju. Būtu nozīmīgi noskaidrot, kā saharozes koncentrācijas izmaiņas suspensiju kultūru barotnē ietekmē šūnu attīstību, produktivitāti, vielisko sastāvu un īpašības (Larronde et al. 1998; Murthy et al. 2024). Kultūru optimizāciju bioreaktoros varētu nodrošināt ar vienmērīgāku gaismas intensitāti, optimālu šūnu maisīšanas ātrumu, temperatūru un skābekļa padevi.

S. nigra ekstrakti ir potenciālas sastāvdaļas mutes dobuma higiēnas līdzekļu izstrādē (Nam 2019; Kim and Nam 2022), tāpēc būtu nozīmīgi veikt papildus antimikrobiālās aktivitātes testus ar citām mutes dobuma patogēnām baktērijām un arī mikroskopiskām sēnēm. Jāveic klīniskie pētījumi ar *B. licheniformis*, ņemot vērā faktu, ka literatūrā atrodama pretrunīga informācija par šīs baktērijas patogenitāti un potenciālo ietekmi uz cilvēka mutes mikrobiotas sastāvu. Svarīgi noskaidrot *S. nigra* ekstraktu efektivitāti pret patogēniem, ņemot vērā ne tikai ekstraktu koncentrāciju, bet arī iedarbības ilgumu.

Rezumējot, *S. nigra* šūnu suspensiju ekstraktiem piemīt antibakteriālā aktivitāte pret mutes dobuma patogēniem, kuras paaugstināšanā var pielietot kultūru elicītēšanu ar flg22 vai audzēšanu pie paaugstinātas intensitātes apgaismojuma. Perspektīvākais virziens pret bakteriālas izcelsmes bioplēvēm būtu gaismas intensitātes pielāgošana *S. nigra* šūnu kultūrām.

5. Secinājumi

1. *S. nigra* šūnu suspensiju elicītēšana ar flg22 paaugstina to antibakteriālo iedarbību pret *B. licheniformis*, *S. epidermidis* un *S. saprophyticus*, tomēr šī ietekme ir atkarīga no elicītēšanas ilguma; iedarbība pret *E. coli* nav konstatēta.
2. *S. nigra* šūnu suspensiju kultivēšana pie 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ paaugstina antibakteriālo aktivitāti pret *B. licheniformis*, bet neietekmē iedarbību pret *Staphylococcus* sp. un *E. coli*.
3. *S. nigra* ekstrakti, kas tika iegūti pēc 72 h elicītēšanas ar flg22, inhibē *B. licheniformis* bioplēvju veidošanos.
4. *S. nigra* šūnu suspensiju elicītēšana ar flg22 nepalielina TFC un TAC – visticamāk flavonoīdu biosintēzes ceļu transkripcijas inhibēšanas dēļ.
5. *S. nigra* šūnu suspensiju kultivēšana pie apgaismojuma ar intensitāti 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sekmīgāk ļauj palielināt TFC un TAC, visticamāk caur flavonoīdu biosintēzes ceļu transkripcijas aktivāciju.
6. *S. nigra* šūnu suspensiju mērogošana bioreaktoros ir veiksmīga, taču jāveic kultūru optimizācija, lai palielinātu iegūto šūnu biomasu un ierosinātu vēlamo sekundāro metabolītu sintēzi.
7. Iegūtie rezultāti daļēji apstiprināja izvirzīto hipotēzi par elicitoru pozitīvo ietekmi uz *S. nigra* šūnu suspensiju antibakteriālo iedarbību, jo elicītēšana ar flg22 un kultivēšana apgaismojumā pie 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ paaugstināja iedarbību tikai pret daļu no pētījumā iekļautajiem baktēriju sugu celmiem.

6. Pateicības

Izsaku lielu pateicību darba vadītājam *Dr. biol.* Anetei Boroduškei par iespēju ņemt dalību projektā “Endofītiskās mikrobiotas loma Melnā plūškoka *Sambucus nigra* L. iedarbībā pret A tipa gripas vīrusu un SARS-CoV-2” un izstrādāt pētījumu Augu biotehnoloģiju laboratorijā. Paldies par ieguldīto laiku, izturību, iegūtajām zināšanām, prasmīgo pētījuma izstrādes procesu, kā arī par nenovērtējamo atbalstu visa studiju gada garumā.

Paldies *Mg. biol.* Mārim Seņkovam un *Dr. biol.* Vizmai Nikolajevai par palīdzību metožu apgūvē un konsultēšanu ar mikrobioloģiju saistītos jautājumos.

Paldies Matīsam Ričardam Baumanim un Elzai Kaktiņai par palīdzību ar *S. nigra* šūnu suspensiju mērogošanu bioreaktoros.

Paldies *Dr. biol.* Jevgenijai Nečajevai par darba recenzēšanu.

Vēlos pateikties visam laboratorijas kolektīvam par draudzīgo atmosfēru, sniegtajiem padomiem un klātesamību darba izstrādes procesā, kā arī par iespēju būt daļai no jums, augu un mikroorganismu biotehnologiem!

7. Literatūras saraksts

Adnan H., Seidel V., Tucker N. 2017. Natural Antibiofilm Agents and the Need for Antibiofilm Drug Leads. – *Educatum Journal of Science, Mathematics and Technology*, 4:1–8.

Antolak H., Czyzowska A., Kregiel D. 2017. Antibacterial and Antiadhesive Activities of Extracts from Edible Plants against Soft Drink Spoilage by *Asaia* spp. – *Journal of Food Protection*, 80(1): 25–34.

Barbulova A., Apone F., Colucci G. 2014. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 1(2): 94–104.

Bertolini A., Petrusa E., Patui S., Zancani M., Peresson C., Casolo V., Vianello A., Braidot E. 2016. Flavonoids and darkness lower PCD in senescing *Vitis vinifera* suspension cell cultures. – *BMC Plant Biology*, 16(1): 233.

Bi Y., Xia G., Shi C., Wan J., Liu L., Chen Y., Wu Y., Zhang W., Zhou M., He H., Liu R. 2021. Therapeutic strategies against bacterial biofilms. – *Fundamental Research*, 1(2): 193–212.

Black L.A. 1960. Standard methods for the examination of dairy products. – *Journal of Food Protection*, 23(8): 246–248.

Boroduske A., Balode-Sausina M., Nakurte I., Berga M, Jekabsons K., Muceniece R., Rischer H. 2022. *Sambucus nigra* cell cultures produce main species-specific phytochemicals with anti-inflammatory properties and *in vitro* ACE2 binding inhibition to SARS-CoV2. – *Industrial Crops and Products*, 186(1): 115236.

Boroduske A., Jekabsons K., Riekstina U., Muceniece R., Rostoks N., Nakurte I. 2021. Wild *Sambucus nigra* L. from north-east edge of the species range: A valuable germplasm with inhibitory capacity against SARS-CoV2 S-protein RBD and hACE2 binding *in vitro*. – *Industrial Crops and Products*, 165: 113438.

Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6): 1340.

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia Britannica. 2024. Elderberry. Encyclopaedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/elder-plant>. Skatīts 26.01.2024.

Bula R.J., Morrow R.C., Tibbitts T.W., Ignatius R.W., Martin T.S., Barta D. 1991. Light-emitting diodes as a radiation source of plants. – *Horticultural Science*, 26(2): 203–205.

Carmo B., Zanelato F., de Almei A.A.F. 2012. Regulation of gene expression in response to abiotic stress in plants [Internet]. *Cell Metabolism – Cell Homeostasis and Stress Response*. In Tech; <http://dx.doi.org/10.5772/26636>. Skatīts 13.02.2024.

Chawla H. S. 2003. Plant Biotechnology: A Practical Approach. Enfield, NH: Science Publishers, 302 p.

Chen S., Wang X., Cheng Y., Gao H., Chen X. 2023. A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. – *Molecules*, 28(13): 4982.

Cheng J., Yu K., Zhang M., Shi Y., Duan C., Wang J. 2020. The effect of light intensity on the expression of *Leucoanthocyanidin reductase* in grapevine calluses and analysis of its promoter activity. – *Genes (Basel)*, 11(10): 1156.

Colombo A.P.V., do Souto R.M., Araújo L.L., Espíndola L.C.P., Hartenbach A.R.R., Magalhães C.B., Alves G., Lourenço T.G.B., Silva-Boghossian C.M. 2023. Antimicrobial resistance and virulence of subgingival *Staphylococci* isolated from periodontal health and diseases. – *Sci Rep.*, 13: 11613.

Dasgupta D., Varadaraj M.C., Bourke P. 2022. Capacity building: building analytical capacity for microbial food safety, Chapter 28. In: *Ensuring Global Food Safety (Second Edition)*. Academic Press, 503–523.

Eibl R., Meier P., Stutz I., Schildberger D., Hühn T., Eibl D. 2018. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. – *Applied microbiology and biotechnology*, 102: 8661–8675.

Falcone Ferreyra M.L., Rius S.P., Casati P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. – *Frontiers in Plant Science*, 3: 222.

Felix G., Boller T. 2003. Molecular sensing of bacteria in plants the highly conserved RNA-BINDING MOTIF RNP-1 OF bacterial cold SHOCK proteins IS recognized as an elicitor signal IN tobacco. – *Journal of Biological Chemistry*, 278: 6201– 6208.

Fürst U., Zeng Y., Albert M., Witte A.K., Fliegmann J., Felix G. 2020. Perception of *Agrobacterium tumefaciens* flagellin by FLS2^{XL} confers resistance to crown gall disease. – *Nature Plants*, 6: 22–27.

Gómez-Gómez L., Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. – *Molecular Cell*, 5(6): 1003–11.

Gómez-Gómez L., Boller T. 2002. Flagellin perception: A paradigm for innate immunity. – *Trends in Plant Science*, 7(6): 251–256.

Gómez-Gómez L., Felix G. and Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. – *The Plant Journal*, 18: 277–284.

Gutiérrez-Venegas G., Gómez-Mora J.A., Meraz-Rodríguez M.A., Flores-Sánchez M.A., Ortiz-Miranda L.F. 2019. Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque. – *Helvion*, 5(12): e03013.

Haş I.M., Teleky B-E., Szabo K., Simon E., Ranga F., Diaconeasa Z.M., Purza A.L., Vodnar D-C., Tit D.M., Nişescu M. 2023. Bioactive potential of Elderberry (*Sambucus nigra*): antioxidant, antimicrobial activity, bioaccessibility and prebiotic potential. – *Molecules*, 28(7): 3099.

Haydushka I.A., Markova N., Kirina V., Atanassova M. 2012. Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. – *Journal of Global Infectious Diseases*, 4(1): 82–3.

Hearst C., Mccollum G., Nelson D., Ballard L., Millar C., Goldsmith C., Rooney P., Loughrey A., Moore J., Rao J. 2010. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. – *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 1805–1809.

Huang R., Wu W., Shen S., Fan J., Chang Y., Chen S., Ye X., 2018. Evaluation of colorimetric methods for quantification of citrus flavonoids to avoid misuse. – *Analytical methods*, 10(22): 2575–2587.

Jaakola L., Hohtola A., Riihinen K., Törrönen S., Kärenlampi S. 2003. Flavonoid biosynthesis in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). – *Acta Horticulturae*, 618: 415–419.

Jaakola L., Maatta K., Pirttila A.M., Torronen R., Karenlampi S., Hohtola A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. – *Plant Physiology*, 130: 729–739.

Johnson B.K., Abramovitch R.B. 2017. Small molecules that sabotage bacterial virulence. – *Trends in pharmacological sciences*, 38(4): 339–362.

Júnior S., Santos J., Campos L, Pereira M. A., Magalhães N., Cavalcanti I. 2018. Antibacterial and antibiofilm activities of quercetin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* with resistance profile. – *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology*, 3(5): 1948–1958.

Kasajima I., Sasaki K., Tanaka Y., Terakawa T., Ohtsubo N., 2013. Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). – *Scientia horticulturae*, 164: 65–72.

Keita K., Darkoh C., Okafor F. 2022. Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. – *SN Applied science*, 4(8): 209.

Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. – *Food Nutrition Research*, 13;61(1): 1361779.

Kim Y-R., Nam S-H. 2022. Anti-caries effect of a mouthwash containing *Sambucus williamsii* var. *coreana* extract: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. – *Antibiotics*, 11(4): 488.

Kļaviņš A., SIA "Gandrs" un autori. 2024. Enciklopēdija "Latvijas Daba". <https://www.latvijasdaba.lv/augi/sambucus-nigra-l/>. Skatīts 26.01.2024.

Kommerein N., Weigel A. J., Stiesch M., Doll K. 2021. Plant-based oral care product exhibits antibacterial effects on different stages of oral multispecies biofilm development *in vitro*. – BMC Oral Health, 21(1): 170.

Kopper E., Granilshchikova M., Leichtfried T., Reisenzein H. 2020. Micropropagation and pathogen elimination in elderberry (*Sambucus nigra* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult – 142, 647–652.

Křížkovská B., Hoang L., Brdová D., Klementová K., Szemerédi N., Loučková A., Kronusová O., Spengler G., Kaštánek P., Hajšlová J., Viktorová J., Lipov J. 2023. Modulation of the bacterial virulence and resistance by well-known European medicinal herbs. – Journal of Ethnopharmacology, 312: 116484.

Kubista M. 2006. The real-time polymerase chain reaction. – Molecular Aspects of Medicine, 27(2–3): 95–125.

Laleh G. H., Frydoonfar H., Heidary R., Jameei R., Zare S. 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. – Pakistan Journal of Nutrition, 5(1): 90 – 92.

Larronde F., Krisa S., Decendit A., Chèze C., Deffieux G., Mérillon J.M. 1998 Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. – Plant Cell Reports, 17: 946–950.

Lee J., Durst R. W., Wrolstad R.E., Collaborators: Eisele T., Giusti M.M., Hach J., Hofsommer H., Koswig S., Krueger D.A., Kupina S., Martin S.K., Martinsen B.K., Miller T.C., Paquette F., Ryabkova A., Skrede G., Trenn U., Wightman J.D. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. – Journal of AOAC international, 88(5): 1269–1278.

Liu W., Mu H., Yuan L., Li Y., Li Y., Li S., Ren C., Duan W., Fan P., Dai Z., Zhou Y., Liang Z., Li S., Wang L. 2023. VvBBX44 and VvMYBA1 form a regulatory feedback loop to balance anthocyanin biosynthesis in grape. – Horticulture Research, 10(10): uhad176.

Livak K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. – Methods, 25(4): 402–408.

Ma Y., Ma X., Gao X., Wu W., Zhou B. 2021. Light Induced Regulation Pathway of Anthocyanin Biosynthesis in Plants. – International Journal of Molecular Sciences, 22(20): 11116.

- Maathuis F. 2012. Plant Mineral Nutrients: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 308 p.
- Mahboubi M. 2021. *Sambucus nigra* (black elder) as alternative treatment for cold and flu. – *Advances in Traditional Medicine*, 21(3): 405–14.
- Manganelli R.E.U., Zaccaro L., Tomei P.E. 2005. Antiviral activity *in vitro* of *Urtica dioica*, *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. – *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3): 323–7.
- Martins K., Ferreira A., Pereira V., Pinheiro-Hubinger L., Oliveira A., Ribeiro de Souza da Cunha M.L. 2019. *In vitro* Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus saprophyticus* Isolated From Patients With Urinary Tract Infections. – *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Matters G.L., Scandalios J.G. 1986. Changes in plant gene expression during stress. *Developmental Genetics*, 7(4): 167–75.
- Matus J.T., Loyola R., Vega A., Pena-Neira A., Bordeu E., Arce-Johnson P., Alcalde J.A. 2009. Post-veraison sunlight exposure induces myb-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. – *J. Exp. Bot.* 60: 853–867.
- Mikulic-Petkovsek M., Ivancic A., Gacnik S., Veberic R., Hudina M., Marinovic S., Molitor C., Halbwrith H. 2023. Biochemical characterization of black and green mutant elderberry during fruit ripening. – *Plants (Basel)*, 12(3): 504.
- Młynarczyk K., Walkowiak-Tomczak D., Łysiak G.P. 2018. Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. – *Journal of Functional Foods*, 40: 377–390.
- Mohammadsadeghi S., Malekpour A., Zahedi S., Eskandari F. 2013. The antimicrobial activity of elderberry (*Sambucus nigra* L.) extract against gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. – *Research Journal of Applied Sciences*, 8: 240–243.
- Mohanty S., Mahapatra S., Dasgupta M., Panigrahy M., Swain D., Rout G. 2023. Regulation of gene expression in plant growth and metabolism: A review. – *Trends in Horticulture*, 6(2): 1.
- Motolinía-Alcántara E.A., Castillo-Araiza C.O., Rodríguez-Monroy M., Román-Guerrero A., Cruz-Sosa F. 2021. Engineering considerations to produce bioactive compounds from plant cell suspension culture in bioreactors. – *Plants (Basel)*, 10(12): 2762.
- Mueller J.H., Hinton J. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. – *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 48(1): 330–333.

Muñoz-Wolf N., McCluskey S., Lavelle E.C. 2017. The role of inflammasomes in adjuvant-driven humoral and cellular immune responses, Chapter 2. In: Immunopotentiators in Modern Vaccines (Second Edition). Academic Press, 23–42.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.

Murthy H.N., Joseph K.S., Paek K.Y., Park S-Y. 2024. Anthocyanin production from plant cell and organ cultures *in vitro*. – *Plants*, 13(1): 117.

Nam S-H. 2019. Antibacterial effect of *Sambucus williamsii* var. *coreana* NAKAI (*S. williamsii*) against *Enterococcus faecalis* for the traditional treatment of oral diseases. – *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(5): 1098.

Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142–201.

Ncube B., Van Staden J. 2015. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. – *Molecules*, 20(7): 12698–731.

Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. – *Natural Product Reports*, 17: 215–234.

Nile S., Park S.W. 2014. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. – *Nutrition*, 30(2): 134–144.

Nithya V., Muthukumar S.P., Halami P.M. 2012. Safety assessment of *Bacillus licheniformis* Me1 isolated from milk for probiotic application. – *International Journal of Toxicology*, 31: 228–237.

Noumi E., Merghni A., Alreshidi M., Haddad O., Akmadar G., De Martino L., Mastouri M., Ceylan O., Snoussi M., Al-Sieni A., De Feo V. 2018. *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Models for evaluating anti-quorum sensing activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol. – *Molecules*, 23(10): 2672.

Othman L., Sleiman A., Abdel-Massih R.M. 2019. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. – *Frontiers in Microbiology*, 10: 911.

Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. 2016. Flavonoids: an overview. – *Journal of Nutritional Science*, 5: e47.

Phillips G. C., Garda M. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. – *in vitro* cellular & developmental biology – *Plant*, 55: 242–257.

Pierik R.L.M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Springer Science Business Media Dordrecht. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 348 p.

Pliszka B., Ważbińska J., Puczel U., Huszcza-Ciołkowska G. 2005. Biologicznie czynne związki polifenolowe zawarte w owocach różnych odmian hodowlanych i dziko rosnącego bzu czarnego. – Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 507: 443–449.

Przybylska-Balcerek A., Szablewski T., Szwajkowska-Michałek L., Świerk D., Cegielska-Radziejewska R., Krejpcio Z., Suchowilska E., Tomczyk Ł., Stuper-Szablewska K. 2021. *Sambucus nigra* extracts – natural antioxidants and antimicrobial compounds. – Molecules, 26(10): 2910.

Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. – Journal of applied microbiology, 90: 494–507.

Rachel G., Sharon F., Avihai P. 2001. Regulation of the leucoanthocyanidin dioxygenase gene expression in *Vitis vinifera*. – Plant Science, 161: 579–588.

Rafiee M., Ghaemi E.A. 2023. Detection of virulence genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with urinary tract infections: first report from Iran. – BMC Research Notes, 16: 206.

Ramesh P., Jagadeesan R., Sekaran S., Dhanasekaran A., Vimalraj S. 2021. Flavonoids: classification, function, and molecular mechanisms involved in bone remodelling. – Frontiers in Endocrinology, 12: 779638.

Rather M.A., Gupta K., Mandal M. 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. – Brazilian Journal of Microbiology, 52(4): 1701–1718.

Rimpapa Z., Toromanovic J., Tahirovic I., Šapčanin A., Sofic E. 2007. Total content of phenols and anthocyanins in edible fruits from Bosnia. – Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 7(2): 119–22.

Roschek B., Fink R., McMichael M., Li D., Alberte R. 2009. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection *in vitro*. – Phytochemistry, 70: 1255–61.

Ruiz-Rivas M., Téllez-Valerio C.E., Martínez-Núñez M., Vera-Hernández P.F., Martínez-Romero E., Rosas-Cárdenas F.F. 2022. Influence of light on callus generation and *in vitro* plant culture. – Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 13(27): 11–21.

Saad A.I.M., Elshahed A.M. 2012. Plant tissue culture media. Recent advances in plant *in vitro* culture, Winchester: InTech, 2: 29–40.

Salam M.A., Al-Amin M.Y., Salam M.T., Pawar J.S., Akhter N., Rabaan A.A., Alqumber M.A.A. 2023. Antimicrobial Resistance: A growing serious threat for global public health. – Healthcare, 11(13): 1946.

Severn M.M., Horswill A.R. 2023. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. – Nature Reviews Microbiology, 21: 97–111.

Shin-Han S., Anthony B.B. 2001. Plant receptor-like kinase gene family: Diversity, function, and signalling. – Science's STKE, 113: 22.

Shleeva M.O., Kondratieva D.A., Kaprelyants A.S. 2023. *Bacillus licheniformis*: A producer of antimicrobial substances, including antimycobacterials, which are feasible for medical applications. – Pharmaceutics, 15(7): 1893.

Shree P., Singh C.K., Sodhi K.K., Surya J.N., Singh D.K. 2023. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. – Medicine in Microecology, 16: 100084.

Silva P., Ferreira S., Nunes F.M. 2017. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins and antioxidant polyphenols. – Industrial Crops and Products, 95: 227–234.

Stępień A.E., Trojniak J., Tabarkiewicz J. 2023. Health-Promoting Properties: Anti-Inflammatory and Anticancer Properties of *Sambucus nigra* L. flowers and fruits. – Molecules, 28(17): 6235.

Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. – New Phytologist, 155(3): 349–361.

Šovljanski O., Kljakić A.C., Tomić A. 2023. . Antibacterial and antifungal potential of plant secondary metabolites. In: Mérillon J.M., Ramawat K.G. (eds) Plant specialized metabolites. Reference series in phytochemistry. Springer, Cham. 1–43.

Šurín Hudáková N, Kačírová J, Sendorová M, Šelianová S, Mucha R, Maďar M. 2002. Inhibitory effect of *Bacillus licheniformis* strains isolated from canine oral cavity. – Life, 12(8): 1238.

Tang B., Gong T., Cui Y., Wang L., He C., Lu M., Chen J., Jing M., Zhang A., Li Y. 2020. Characteristics of oral methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from dental plaque. – International Journal of Oral Science, 12(1): 15.

Tena N., Martín J., Asuero A.G. 2020. State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. – Antioxidants, 9(5): 451.

Torabian G., Valtchev P., Adil Q., Dehghani F. 2019. Anti-influenza activity of elderberry (*Sambucus nigra*). Journal of Functional Foods, 54: 353–360.

Van der Linde K., Lim B.T., Rondeel J.M., Antonissen L.P., de Jong G.M. 1999. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. – Nephrology Dialysis Transplantation, 14(10): 2433–2437.

Vasconsuelo A., Boland R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. – *Plant Science*, 172: 861–875.

Vogel C., Marcotte E.M. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. – *Nature Reviews Genetics*, 13(4): 227–32.

Wade W.G. 2013. The oral microbiome in health and disease. – *Pharmacological Research*, 69(1): 137–43.

Wang N., Liu M., Guo L., Yang X., Qiu D. 2016. A novel protein elicitor (PeBA1) from *Bacillus amyloliquefaciens* NC6 induces systemic resistance in tobacco. – *International Journal of Biological Sciences*, 12: 757–767.

Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. – *Nature Protocols*, 3(2): 163–75.

Xu J., Zhang N. 2014. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect. – *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1;2(6): 499–518.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. – *BMC Bioinformatics*, 13: 134.

Zaatout N. 2021. Presence of non-oral bacteria in the oral cavity. – *Archives of Microbiology*, 203: 2747–2760.

Zhao H., Chu M., Huang Z., Yang X., Ran S., Hu B., Zhang C., Liang J. 2017. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. – *Scientific Reports*, 7(1): 11773.

Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. – *Biotechnology Advances*, (4):283–333.

Zhong J.J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In: Zhong J.J., et al. *Plant Cells. Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol 72. Berlin, Heidelberg: Springer, 1–26.

PIELIKUMI

S. nigra mērķa gēnu noteikšanai izmantotās *V. vinifera* un *Lonicera* sp. sekvences

Appendix 1

Sequences of *V. vinifera* and *Lonicera* sp. used to determine *S. nigra* target genes

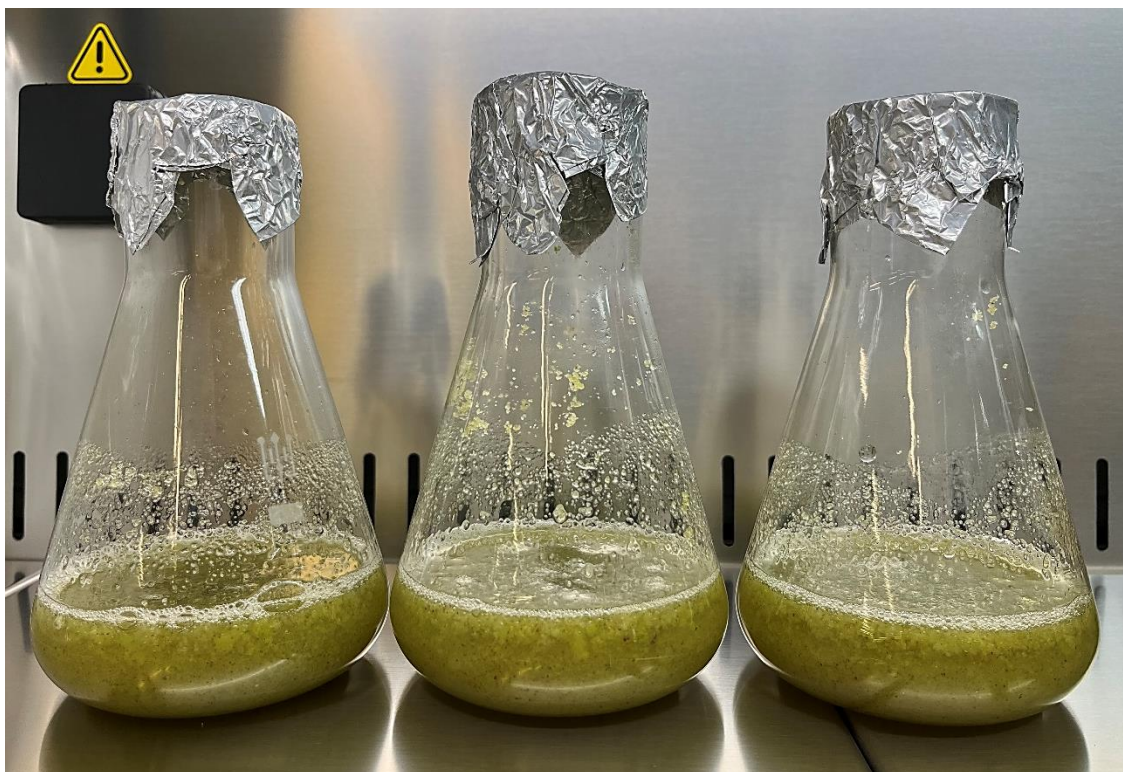
Gēna kodētā aminoskābju sekvenču nosaukums / The amino acid sequence encoded by the gene from a model organism	Sekvenču homoloģija <i>S. nigra</i> genomā / Sequence homology in the <i>S. nigra</i> genome
<p>NP_001267879.1 chalcone synthase [<i>Vitis vinifera</i>]</p>	<p>OX422220.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 14 Query cover: 98% Per. Ident.: 86,02%</p>
<p>NP_001267916.1 flavonoid 3' hydroxylase [<i>Vitis vinifera</i>]</p>	<p>OX422212.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 6 Query cover: 99% Per. Ident.: 82,94%</p>
<p>NP_001268034.1 naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase [<i>Vitis vinifera</i>]</p>	<p>OX422207.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 1 Query cover: 90% Per. Ident.: 89,73%</p>
<p>NP_001268144.1 dihydroflavonol 4-reductase [<i>Vitis vinifera</i>]</p>	<p>OX422220.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 14 Query cover: 94% Per. Ident.: 81,61%</p>
<p>NP_001268147.1 leucoanthocyanidin dioxygenase [<i>Vitis vinifera</i>]</p>	<p>OX422208.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 2 Query cover: 99% Per. Ident.: 73,37%</p>
<p>AIW60902.1 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Lonicera maackii</i>]</p>	<p>OX422215.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 9 Query cover: 99% Per. Ident.: 47,62%</p>
<p>ALJ56100.1 Tubulin, partial [<i>Lonicera macranthoides</i>]</p>	<p>OX422207.1 <i>Sambucus nigra</i> genome assembly, chromosome: 1 Query cover: 100% Per. Ident.: 84,92%</p>

2. pielikums

S. nigra šūnu inokuli bioreaktoriem

Appendix 2

S. nigra cell inoculum for bioreactors

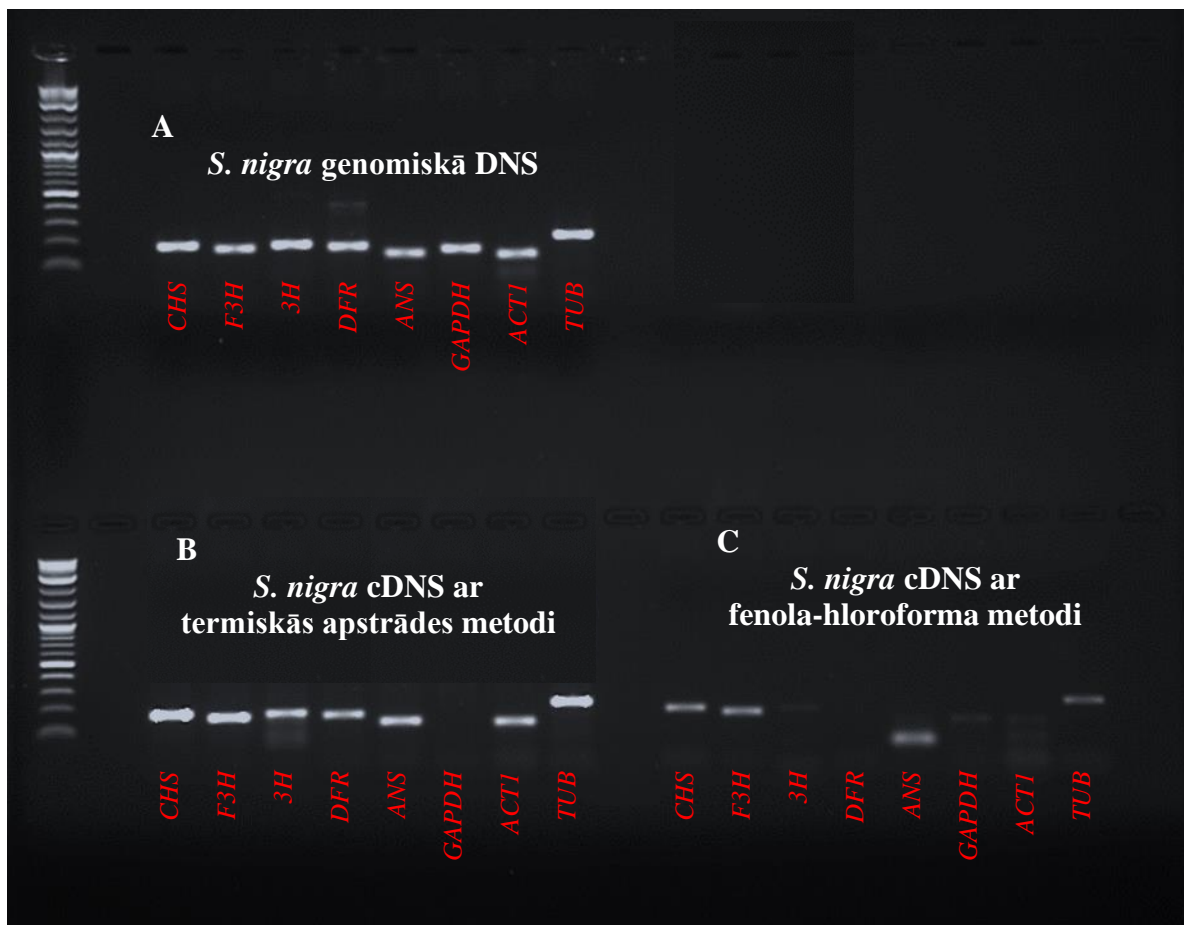


4. pielikums

Praimeru piesaistīšanās attēls no agarozes gēla; A – piesaistīšanās pie *S. nigra* genomiskās DNS, B – piesaistīšanās pie *S. nigra* cDNS ar termiskās apstrādes metodi; C – piesaistīšanās pie cDNS ar fenola-hloroforma metodi

Appendix 4

Primer binding image from agarose gel; A – attachment to *S. nigra* genomic DNA, B – attachment to *S. nigra* cDNA by heat treatment method; C – attachment to cDNA by the phenol-chloroform method

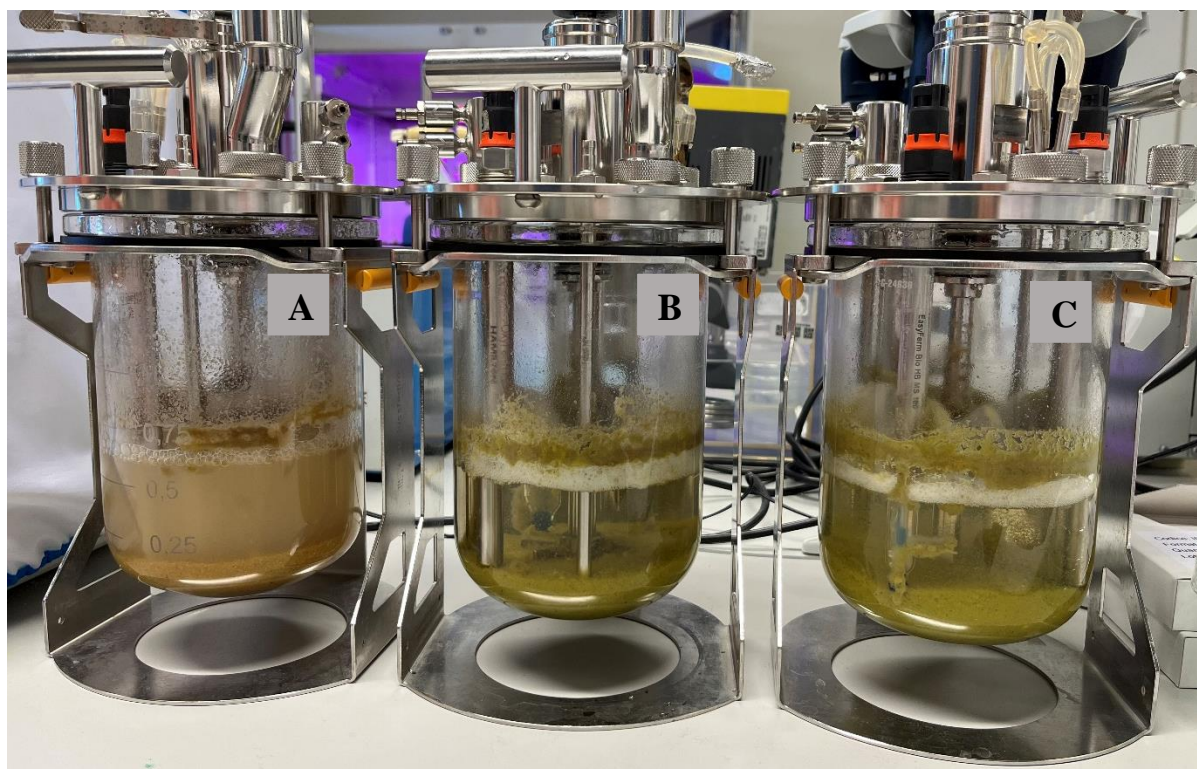


5. pielikums

S. nigra šūnas bioreaktoros pēc 12 kultivēšanas dienām; Gaismas intensitāte:
A – 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; B – 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; C – 50 – 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Appendix 5

S. nigra cells in bioreactors after 12 days of cultivation; Light intensity:
A – 400 – 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; B – 200 – 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; C – 50 – 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



Bakalaura darbs “**Melnā plūškoka *Sambucus nigra* L. *in vitro* šūnu suspensiju kultūru optimizācija antibakteriālu ekstraktu iegūšanai**” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai e-studijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autore: Laura Balode

datums 24.05.2024.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Anete Boroduške

datums 24.05.2024.

Recenzents: Jevgenija Nečajeva

datums

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

Studiju metodiķe:

datums 24.05.2024.

Darbs aizstāvēts Bioloģijas kursa darbu komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: