

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Martina ŠTAMPAR

**RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE KOMPETICIJE
MED ROJENJEM BAKTERIJE *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Martina ŠTAMPAR

**RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE KOMPETICIJE MED
ROJENJEM BAKTERIJE *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING
COMPETITION DURING SWARMING OF *Bacillus subtilis* STRAINS**

M.SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v prostorih Katedre za mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniška fakulteta. Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec, za somentorico doc. dr. Barbaro Kraigher in za recenzenta doc. dr. Mateja Butalo.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Barbara KRAIGHER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Matej BUTALA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum predstavitve:

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

Podpis kandidatke:

Martina ŠTAMPAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.26 (043.2)
KG	rojenje/bakterija/ <i>Bacillus subtilis</i> /fluorimetrija/kompeticija/sodelovanje
AV	ŠTAMPAR, Martina, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentor)/KRAIGHER, Barbara (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij Biotehnologije
LI	2016
IN	RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE KOMPETICIJE MED ROJENJEM BAKTERIJE <i>Bacillus subtilis</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XII, 56, [6] str., 7 pregl., 20 sl., 4 pril., 91 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p><i>Bacillus subtilis</i> je po Gramu pozitivna paličasta bakterija, ki je pomemben modelni organizem za preučevanje socialnih interakcij mikroorganizmov. V naravi bakterije ne živijo v monokulturah, temveč v združbah genetsko različnih mikroorganizmov, ki vstopajo v dinamične socialne interakcije. Te so, kljub njihovemu pomenu za razumevanje biologije mikroorganizmov in njihovo aplikacijo v biotehnologiji, relativno slabo poznane. Sevi bakterije vrste <i>B. subtilis</i> so sposobni rojenja, ki je primer kooperativnega gibanja celic po površini s pomočjo bičkov. Namen magistrske naloge je bil razviti metodo za površinsko in časovno sledenje rojenja mešanic sevov <i>B. subtilis</i> na površini agariziranega gojišča. Poleg tega smo žeeli ugotoviti, ali nam metoda omogoča zaznati razlike na nivoju dinamike rojenja in teritorialnosti genetsko homogene ozroma genetsko heterogene mešanice sevov. S pomočjo fluorimetrije nam je uspelo razviti novo metodo za sledenje rasti bakterije in izražanja posameznih genov med rojenjem na poltrdnem gojišču. S to metodo lahko sledimo razširjanju roja po površini agarja v času in določimo začetek ter hitrost rojenja. Rezultati nakazujejo, da mešanica genetsko različnih sevov vstopa v rojenje kasneje kot genetsko homogene kulture, kar kaže na kompeticijo med različnimi sevi. Uspešnost pri zasedanju površine je bila vedno odvisna od začetnega števila celic v mešanici sevov, vendar smo v genetsko heterogenih kulturah zaznali prevlado enega, tudi ko sta bila seva v začetnem inokulumu prisotna v razmerju 1 : 1. S pomočjo fluorescentne mikroskopije smo opazili zanimiv pojav prostorske segregacije sevov v ločene roje. To smo opazili le pri genetsko heterogenih kulturah, medtem ko so genetsko enake celice ostale v roju prostorsko blizu in so skupaj zasedle površino. To je prvi primer študije kompeticije genetsko različnih sevov med rojenjem po površini agarja pri bakteriji <i>B. subtilis</i>. Rezultati so pomembni za nadaljnje preučevanje kolonizacije površin (npr. površine korenin) ter za splošno razumevanje socialnosti mikroorganizmov.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDK 579.26 (043.2)
CX swarming/bacteria/*Bacillus subtilis*/fluorimetry/competition/cooperation
AU ŠTAMPAR, Martina
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/KRAIGHER, Barbara (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2016
TI DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING COMPETITION
DURING SWARMING OF *Bacillus subtilis* STRAINS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XII, 56, [6] p., 7 tab., 20 fig., 4 ann., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Gram positive bacterium, Bacillus subtilis* is an important model to address microbial social interactions. In natural habitats, bacteria mostly live in complex communities, composed of genetically heterogeneous microorganisms, where they engage in dynamic social interactions. These interactions are still poorly understood, despite their importance in understanding the biology of microorganisms and their biotechnological applications. *B. subtilis* is capable of swarming, which is a coordinated translocation of multicellular populations over semi-solid surfaces, by flagella. In this master thesis, we developed a new method to follow the swarming behavior of *B. subtilis* strain mixtures on a semi-solid agar. This method enabled us to detect differences in the dynamics of swarming and the territoriality of genetically homogeneous, as well as genetically heterogeneous strain mixtures. By monitoring the growth and individual gene expression in the course of swarming on a semi-solid surface by fluorimetry, the lag phase and the velocity of the swarming were determined. The results indicated a delayed swarming in mixtures of genetically heterogeneous strains compared to genetically homogeneous cultures, which points to competition among different strains. Final surface colonization patterns always depended on the initial number of cells in a particular strain mixture; however, in genetically heterogeneous cultures one strain prevailed over the other, even when the initial inoculum ratio was 1 : 1. By using fluorescence microscopy, we furthermore observed a spatial segregation of strains in genetically heterogeneous swarms, whereas in genetically homogeneous inocula cells, expressing different fluorescent reporters, remained in close proximity, forming unifying swarms. This is the first study addressing competition among genetically heterogeneous strains of *B. subtilis* during swarming on a semi-solid surface. The obtained results are important for future studies of surface colonization (e.g. root systems) and as well as sociomicrobiology in general.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ROJENJE	3
2.1.1 Morfologija roječih celic	5
2.1.2 Zahteve za pričetek rojenja	5
2.1.2.1 Vloga bičkov	5
2.1.2.2 Vloga surfaktina	5
2.1.2.3 Faza prilagajanja pri rojenju	5
2.2 SORODSTVENO PREPOZNAVANJE, TERRITORIALNOST.....	6
2.2.1 Interakcije med bakterijami	6
2.2.2 Teritorialnost	7
2.2.3 Sorodstvena diskriminacija	7
2.3 FLUORESCENTNI PROTEINI, METODOLOGIJA.....	8
2.3.1 Rumeni fluorescentni protein.....	9
2.3.2 Rdeči fluorescentni protein	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11

3.1.1 Bakterijski sevi	11
3.1.2 Antibiotiki	11
3.1.2.1 Priprava založne raztopine antibiotikov	11
3.1.3 Gojišča	12
3.1.4 Raztopine	14
3.1.5 Kemikalije in reagenti.....	15
3.1.6 Aparature.....	16
3.2 METODE.....	17
3.2.1 Konstrukcija sevov.....	17
3.2.2 Izolacija kromosomske DNA.....	17
3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza izolirane DNA	18
3.2.4 Transformacija in konstrukcija sevov <i>B. subtilis</i> z rekombinantno DNA ...	18
3.2.5 Priprava inokuluma za test rojenja na poltrdnem B-gojišču.....	19
3.2.5.1 Priprava celic v eksponentni fazi rasti	19
3.2.5.2 Priprava spor in določanje števila CFU	19
3.2.5.3 Priprava mikrotitrskih plošč	19
3.2.6 Merjenje fluorescence in optične gostote pri 650 nm med procesom rojenja	20
3.2.7 Določanje hitrosti rojenja	21
3.2.8 Določanje kompeticije med sevi <i>B. subtilis</i> s pomočjo fluorescentnega mikročitalca	21
3.2.9 Določanje kompeticije med sevi <i>B. subtilis</i> na večjih agarskih ploščah s pomočjo lupe	22
3.2.10 Analiza podatkov.....	22
4 REZULTATI.....	23
4.1 RAZVOJ METODE ZA ČASOVNO SPREMLJANJE ROJENJA NA POLTRDNEM GOJIŠČU S POMOČJO FLUORESCENTNEGA MIKROČITALCA	23
4.1.1 Prikazovanje rezultatov.....	23

4.1.2 Sledenje rojenju preko merjenja fluorescence	25
4.1.3 Sledenje rojenju preko merjenja OD₆₅₀	25
4.1.4 Sledenje izražanju genov tekom rojenja	27
4.2 DOLOČANJE HITROSTI ROJENJA	28
4.3 OPTIMIZACIJA POSKUSA ZA PREVERJANJE KOMPETICIJE MED ROJI SEVOV <i>B. subtilis</i>.....	29
 4.3.1 Vpliv vegetativnega stanja celic v inkulumu na potek rojenja (faza prilagajanja)	29
 4.3.2 Določanje faze prilagajanja (lag faze) pri rojenju	30
4.4 PREVERJANJE KOMPETICIJE MED ROJI RAZLIČNIH ALI ENAKIH SEVOV	32
 4.4.1 Preverjanje kompeticije s pomočjo mikročitalca	32
 4.4.2 Pojav podaljšane faze prilagajanja pri rojenju v mešanici različnih sevov.	36
 4.4.3 Ugotavljanje kompeticije med sevi pri rojenju na večjih ploščah	37
5 DISKUSIJA	40
 5.1 RAZVOJ METODE	40
 5.2 KOMPETICIJA MED RAZLIČNIMI SEVI V MEŠANI KULTURI ZA KOLONIZACIJO POVRŠINE	43
 5.2.1 Fenomen prostorskega izključevanja	43
 5.2.2 Pojav podaljšane faze prilagajanja pri rojenju v mešanici različnih sevov.	45
 5.3 POVEZAVA ROJENJA IN KOLONIZACIJE RASTLIN	45
6 SKLEPI	46
7 POVZETEK	47
8 VIRI	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz absorpcijskega in emisijskega spektralnega profila za pogosto uporabljeni in komercialno dostopne fluorescentne proteine.....	10
Slika 2: Na sliki (A) je prikazana mikrotitrskna plošča z 12 luknjicami. Da smo kulturo nacepili točno na sredino, smo si v vsaki posamezni luknjici označili središče. Slika (B) pa prikazuje eno od 12 luknjic	20
Slika 3: Prikaz rojenja seva PS-216 YFP v odvisnosti od časa	23
Slika 4: Površinski prikaz intenzitete fluorescence roječega seva pri določenem času po inokulaciji seva v sredino luknjice	24
Slika 5: Prikaz povprečne intenzitete fluorescence (RFU – relativne fluorescentne enote) v eni luknjici v odvisnosti od časa rasti.....	25
Slika 6: Prikaz meritev OD ₆₅₀ v odvisnosti od časa inokulacije za sev PS-216 YFP v eni luknjici v vseh merjenih točkah.....	26
Slika 7: Prikaz popvrečne vrednosti OD ₆₅₀ v eni luknjici mikrotitrskne ploščice v odvisnosti časa rasti oz. rojenja seva PS-216 YFP	26
Slika 8: Primerjava profila vrednosti OD ₆₅₀ in intenzitete fluorescence tekom rojenja seva PS-216 YFP	27
Slika 9: Sledenje izražanju gena za YFP brez lastnega promotorja, ki je pod promotorjem Phag (3610 amyE::Phag-yfp)	28
Slika 10: Hitrost rojenja izbranih sevov	29
Slika 11: Faza prilagajanja pri rojenju, če nacepimo celice v eksponentni fazi rasti	31
Slika 12: Faza prilagajanja pri rojenju, če nacepimo 100-krat redčene spore (A) in po 5-kratnem koncentriranju neredčenih spor (B)	32
Slika 13: Prisotnost sevov na plošči po testu kompeticije pri rojenju	33
Slika 14: Rojenje mešanice različnih sevov PS-218 RFP (A) in PS-216 YFP (B) po površini agarskega gojišča na mikrotitrski plošči	34
Slika 15: Rojenje mešanice enakih (različno označenih) sevov PS-218 RFP (A) in PS-218 YFP (B) po površini agarskega gojišča na mikrotitrski plošči.....	35
Slika 16: Ugotavljanje prisotnosti časovnega zamika začetka rojenja v mešanici različnih sevov.....	36
Slika 17: Segregacija različnih sevov na agarskih ploščah	37

Slika 18: Prikaz prostorskega ločevanja sevov PS-216 YFP in PS-218 RFP, posnetih pod fluorescentno lupo (na levi) ali poslikano s fotoaparatom (na desni)	37
Slika 19: Roji fluorescentno označenih sevov.....	38
Slika 20: Roji mešanic različnih sevov, označeni z različnimi fluorescentnimi proteini...	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Naravni izolati bakterije <i>B. subtilis</i>	11
Preglednica 2: Označeni sevi s fluorescentnimi proteini bakterije <i>B. subtilis</i>	11
Preglednica 3: Založne in končne koncentracije uporabljenih antibiotikov.....	12
Preglednica 4: Parametri za uporabljene fluorescentne proteine.....	21
Preglednica 5: Kombinacije sevov, ki smo jih uporabili pri preverjanju kompeticije.	22
Preglednica 6: Kombinacije sevov, ki smo jih uporabili pri poskusih s sporami.....	22
Preglednica 7: Povprečne koncentracije celic in spor v inokulumu za poskuse kompeticije pri rojenju.....	30

KAZALO PRILOG

Priloga A: Razpon dolžine faze prilagajanja pri rojenju pri izbranih sevih

Priloga A1: Spore kot inokulum

Priloga A2: Celice iz eksponentne faze rasti kot inokulum

Priloga B: Razpon hitrosti rojenja pri izbranih sevih

Priloga C: Rezultati poskusov na velikih ploščah

Priloga C1: Enaki sevi, označeni z različnimi fluorescentnimi proteini. S celicami iz eksponentne faze rasti

Priloga C2: Različni sevi, s celicami iz eksponentne faze rasti

Priloga C3: Spore kot inokulum za test rojenja

Priloga D: Ugotavljanje prisotnosti časovnega zamika začetka rojenja v mešanici različnih sevov. Prikazano je rojenje po 11 urah rasti v luknjicah pri mešanici enakih sevov PS-216 RFP + PS-216 YFP, ki so bile nacepljene v eksponentni fazri rasti.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU – enota za štetje kolonij (ang. colony-forming unit)

YFP – rumeni fluorescentni protein (ang. yellow fluorescent protein)

RFP – rdeči fluorescentni protein (ang. red fluorescent protein)

dH₂O – destilirana voda

DNA – deoksiribonukleinska kislina

LB – Luria Bertani

wt – divji tip (ang. wild type)

CM – gojišče za kompetenco (ang. competence medium)

OD – optična gostota (ang. optical density)

1 UVOD

Po Gramu pozitivna modelna bakterija *Bacillus subtilis* ima kot producent najrazličnejših encimov in antibiotikov izreden biotehnoški potencial. Genetske analize so pokazale veliko raznolikost med sevi vrste *B. subtilis* že znotraj 1cm^3 tal, kar omogoča študije interakcij in dinamike sevov znotraj vrste (Stefanic in Mandic Mulec, 2009; Stefanic in sod., 2012; Stefanic in sod., 2015). Divji izolati bakterije *Bacillus subtilis* so sposobni rojenja, to je hitrega in koordiniranega skupinskega gibanja po površini poltrdnega gojišča, kar je pomembno pri kolonizaciji različnih površin, npr. rastlinskih korenin, s čimer lahko kompetitivno preprečijo kolonizacijo rastline s patogenimi mikroorganizmi in tako delujejo kot biopesticidi (Ongena in Jacques, 2007). O rojenju kot obliki gibanja so prvič poročali že leta 1885, pri vrstah iz rodu *Proteus* (Hauser, 1885). V nadalnjih raziskavah, ki so jih izvajali na površini agarja v laboratorijih, so ugotovili, da je rojenje razširjeno med običkanimi bakterijami. V naravi se pojavlja veliko različnih načinov rojenja (Harshey in sod., 2003, 2015).

Teritorialnost kot oblika vedenja se pojavlja pri številnih organizmih. Živali na primer tekmujejo za teritorij, da bi si zagotovili dostop do omejenega vira hrani in ustrezno samico ter zatočišče za bivanje (Briffa, 2010). Podoben način vedenja so opazili tudi pri mikroorganizmih (Velicer in Plucain, 2016). Teritorialnost pri mikroorganizmih je še slabo raziskana, najverjetneje pa podobno kot pri živalih zahteva sposobnost prepoznavanja sorodnikov oz. ločevanje med bolj ali manj sorodnimi sevi. Dienes je že l. 1946 v študiji opazil, da se na stiku med različnimi roječimi sevi *Proteus mirabilis*, pojavi mejna linija. Kasnejše raziskave pa so pokazale, da so te bakterije sposobne razlikovati lastno od tujega (Gibbs, 2011). Podoben fenomen so ugotovili tudi pri sevih vrste *B. subtilis*: ko pride do stika med različnimi roječimi sevi na poltrdnem gojišču, se med njimi tvori mejna linija, ki je vidna s prostim očesom. Stefanic in sod. (2015) so pokazali, da linija nastane med roji genetsko manj sorodnih sevov *Bacillus subtilis*, zelo ozko sorodni sevi *B. subtilis* pa se med seboj zligejo (oz. združijo). Ta pojav so poimenovali sorodstvena diskriminacija (ang. 'kin discrimination') (Stefanic in sod., 2015).

V isti študiji so Stefanic in sod. (2015) preučevali, ali sorodstveno prepoznavanje, ki so ga opazili ob srečanju rojev na agarskih ploščah, vpliva tudi na kolonizacijo rastlinskih korenin, ki so jih potopili v različne mešanice sevov. Ugotovili so, da sorodni (ang. 'kin') sevi skupaj kolonizirajo korenine in lahko sobivajo, medtem ko je pri inokulaciji korenine z mešanico nesorodnih (ang. 'non-kin') sevov, korenino večinsko koloniziral en sam sev.

Tako nas je na podlagi predhodnih ugotovitev (Stefanic in sod., 2015) v magistrskem delu zanimalo, kaj se zgodi na nivoju površine, če mešanice različnih (manj sorodnih, 'non-kin') ali enakih (sorodnih, 'kin') sevov *B. subtilis* nacepimo v eno točko poltrdne agarske plošče za rojenje. Ta zasnova poskusa je bolj podobna testu, ki so ga izvedli Stefanic in sod. (2015),

da bi preverili kolonizacijo korenin z različnimi mešanicami sevov. 'Non kin' mešanice bakterij korenin niso kolonizirale skupaj, vendar pa na koreninah tudi niso opazili vidnih mejnih linij. Zanimalo nas je, ali je mešana kultura genetsko različnih sevov bolj ali manj uspešna pri kolonizaciji površin s pomočjo rojenja in ali med njimi prihaja do kompeticije oz. izključevanja.

Za raziskavo teh vprašanj je bilo potrebno razviti novo metodo, ki bi omogočala študirati teritorialnost mešanice sevov bakterij na površini agarja. Zato smo v okviru te magistrske naloge razvili metodo, ki omogoča sledenje rasti oz. rojenja posameznega seva v mešanici sevov na poltrdnem gojišču s pomočjo fluorescentnega mikročitalca in reporterskih fluorescentnih proteinov.

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil:

- razviti metodo za površinsko sledenje rasti med rojenjem na poltrdnem gojišču s pomočjo fluorimetrije;
- preveriti kompeticijo med roji različnih sevov v mešanih kulturah;
- pripraviti ustrezno označene rekombinantne seve za sledenje rasti izbranih sevov.

1.2 HIPOTEZE

1. Fluorescanca se bo z rastjo in razširjanjem (rojenjem) seva, ki je označen s konstitutivno izraženim fluorescentnim proteinom, povečevala, kar bo mogoče zaznati s pomočjo fluorimetrije.
2. Med rojenjem bo prišlo do kompeticije med različnimi sevi, v roju pa bo prevladal uspešnejši sev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROJENJE

Običkane bakterije imajo lahko več kot en način premikanja; lahko samostojno plavajo ali pa se v skupini ena zraven druge gibljejo po vlažnih površinah (rojenje) (Darnton, 2010). Rojenje bakterij je torej od bičkov odvisna socialna oblika premikanja po površini. Rojenje sta Gherardi in Daniels (2004) opisala pri različnih bakterijah: *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Azospirillum*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* in *Sinorhizobium*. Skupinskega gibanja po površini so zmožne tudi neobičkane bakterije (npr. *Myxococcus xanthus*), vendar to gibanje ne temelji na bičkih in ga v nadaljevanju ne bomo obravnavali.

Rojenje predstavlja strategijo preživetja v okoljih z nizko vsebnostjo hranil in v prostorsko strukturiranih okoljih, kot je na primer površina korenin, kjer so rastlinski izločki lahko hranila, za katera mikrobi tekmujejo (Whipps, 2001). Rojenje je prav tako pomembno za kolonizacijo rastlinskih korenin in tvorbo biofilma (Bais in sod., 2004, Rudrappa in sod., 2008). Rojenja so sposobne različne po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije (Ghelardi in sod., 2002; Senesi in sod., 2002; Kearns in Losick, 2003, Gherardi in Daniels, 2004). Število rojenja sposobnih vrst je zelo podcenjeno, saj je rojenje pogosto inhibirano s standardnimi laboratorijskimi gojišči in številni naravnii izolati izgubijo to lastnost z udomačitvijo oz. njihovo uporabo v laboratorijih skozi daljše časovno obdobje (Kearns in Losick, 2003; Patrick in Kearns, 2009). Izguba rojenja je najverjetnej posledica evolucijskih sil v nestrukturiranem laboratorijskem okolju, kjer rojenje ne predstavlja kompetitivne prednosti (Velicer in sod., 1998). Poleg tega raziskovalci za svoje poskuse ponavadi ne izberejo bakterij, ki se hitro širijo po gojišču in ne tvorijo kompaktnih kolonij, kar bi tudi lahko razložilo izgubo tega fenotipa pri sevih, ki so že dolgo časa v laboratorijski uporabi (Kearns, 2010).

Rojenje običajno zahteva energetsko bogato in trdno gojišče, vendar so posebni pogoji, ki podpirajo rojenje, odvisni od izbranega organizma. Nekatere bakterije, npr. *Bacillus subtilis*, rojijo na številnih energetsko bogatih gojiščih, medtem ko druge bakterije, kot sta *Salmonella enterica* in *Yersinia entercolitica*, zahtevajo prisotnost posebnih dodatkov (npr. glukozo) (Harshey in Matsuyama, 1994; Young in sod., 1999; Julkowska in sod., 2005). Rojenje je tudi natančno uravnavano. Najprej je sprožena biosinteza bičkov in sinteza surfaktina. Nekatere bakterije sicer rojijo na trdnem agarju (1,5 % agar ali več), vendar večina zahteva poltrdni agar v ozkem razponu koncentracij (od 0,3 % do 1 %). Gojišče z več kot 0,3 % agarja že lahko izključuje plavanje bakterij in jih usmerja v premikanje po površini, agar s koncentracijo nad 1 % pa izključuje rojenje številnih bakterijskih vrst. Obstaja verjetnost, da je bil standardni 1,5 % agar, ki se uporablja za strjevanje hranilnih medijev v laboratoriju, izbran zaradi inhibicije rojenja (Kearns, 2010).

Do zdaj so v študijah o rojenju večinoma preučevali po Gramu negativne bakterije, ki so rojile na bogatih medijih ali pa na minimalnih medijih, ki so bili obogateni s kazamino kislinami. Precej raziskav je preučevalo širjenje bakterij *Proteus mirabilis*, ki so jih opazovali na ploščah s trdnim agarjem (2 %). *Proteus mirabilis* se širi v valovih in vključuje usklajeno gibanje zelo velikih rojev, ki so sestavljeni iz zelo dolgih, bogato običkanih nitastih celic (Hamze in sod., 2011). Pri bakterijah *Escherichia coli* in *Salmonella Typhimurium* (Turner in sod., 2010; Harshey, 2003; Hamze in sod., 2011) je širjenje omejeno na mehkejši agar (okoli 0,5 %) in vključuje usklajeno gibanje manjših rojev z zmerno podaljšanimi in običkanimi celicami. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ponavadi roji v obliki nerazvezanih dendritov ali vitic, roječe celice pa so približno dvakrat večje od vegetativnih celic in imajo po večini dva bička (Caiazza in sod., 2005; Hamze in sod., 2011). Pri po Gramu pozitivnih bakterijah so rojenje največkrat preučevali pri bakteriji *B. subtilis* (Hamze in sod., 2011).

Premikanje v obliki rojenja so opazili le pri nelaboratorijskih sevih bakterije *Bacillus subtilis*. Značilnost laboratorijskih sevov je, da ne morejo sintetizirati surfaktina, a tudi dodajanje surfaktina takemu sevu še ne omogoči rojenja (Kearns in Losick, 2003). Gojenje in manipulacija bakterij v laboratoriju lahko povzročita izgubo fenotipa, ki je značilen za divje tipe naravnih izolatov. Tako sta Kearn in Losick (2003) sklepala, da je robustno rojenje značilnost nelaboratorijskih sevov *B. subtilis*. V nadaljnjih študijah so ugotovili, da laboratorijski sevi *B. subtilis* ne rojijo tudi zaradi mutacije v genu *swrA* (Zeigler in sod., 2008; Patrick in Kearn, 2009), katerega produkt je centralni regulator genov za bičke (Kearns, 2004).

Rojenje pri bakteriji *B. subtilis* je odvisno od bičkov in ga zasledimo le na gojiščih, ki vsebujejo 0,7–1,0 % agarja (Kearns in Losick, 2003; Julkowska in sod., 2005; Hamze in sod., 2009). Tudi surfaktin, ki se širi 1–2 mm pred napredujučim rojem, je ključen za rojenje (Kearns in Losick, 2003; Julkowska in sod., 2004, 2005). Pri sevu *B. subtilis* 3610 je v literaturi mogoče zaslediti dva načina rojenja. Na LB agarju so pri 37 °C opazili konfluentno rojenje, s katerim so bakterije zavzele celotno površino agarja (Kearns in Losick, 2003; Julkowska in sod., 2004). Drugi tip rojenja pa lahko pripelje do nastanka hiper razvezanih dendritičnih vzorcev in ga opazimo na minimalnem gojišču B (Julkowska in sod., 2004; Hamze in sod., 2011).

Pri izvajanju eksperimentov z rojenjem je treba upoštevati določen sklop pogojev (Kearns, 2010). Vsebnost vode v gojišču je ključni dejavnik: premajhna količina vode lahko zaustavi rojenje, preveč vode pa lahko povzroči plavanje bakterij. Za čim boljšo kontrolo vsebnosti vode v mediju naj bi razlivali plošče s standardno debelino šele takrat, ko se gojišče ohladi na 50 °C. Plošče na kratko posušimo (za največ 15 min.), z odprtim pokrovom v laminariju. Laminarni pretok zraka omogoča odstranjevanje površinske vode in zmanjšuje možnost pojava plavanja (Patrick in Kearn, 2009; Kearn, 2010).

2.1.1 Morfologija roječih celic

Pri po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih bakterijah se roječe celice spremenijo tudi morfološko (Fraser in Hughes, 1999; Macfarlane s sod., 2001). Pri *B. subtilis* so lahko roječe celice hiperobičkane, daljše (filamentozne), širše in imajo tudi do trikrat povečan volumen. V središču roja imajo celice obliko dolgih, nerazčlenjenih verig, kar je popolnoma nasprotno celicam, ki jih najdemo na robu roja. Celice iz središča roja so manjše in njihova jedra so manj kompaktna (Kearns in Losick, 2003).

2.1.2 Zahteve za pričetek rojenja

2.1.2.1 Vloga bičkov

Bičke lahko opazimo s fazno kontrastno mikroskopijo vzorcev barvanih z barvilom kristal vijolično, s fluorescentnim mikroskopom z uporabo fluorescentnih barvil ali z elektronsko mikroskopijo (Kearns, 2010). Bički služijo kot motor za rojenje. Ko celica prehaja v stanje rojenja, se gostota bičkov na površini celic zelo poveča (Kearns in Losick, 2003). Večina bakterij, ki rojijo, ima veliko bičkov naključno porazdeljenih po celotni bakterijski celici (Kearns in Losick, 2003; Merino in sod., 2006).

Neobičkane mutante (pri *B. subtilis* je to mutanta v genu *hag*) rojijo slabo oz. je to neopazno (Chevance in Hughes, 2008). Nasprotno pa mutacije, ki izboljšajo izražanje genov za sintezo bička, izboljšajo rojenje (Kearns in Losick, 2005). Vzrok za to, da je za rojenje potrebno večje število bičkov na celični površini, še ni znan (Kearns, 2010).

2.1.2.2 Vloga surfaktina

Med potovanjem roja bakterij opazimo ob robu transparentno tekočino, ki potuje hitreje od celic in predstavlja surfaktante, površinsko aktivne snovi, ki zmanjšujejo površinsko napetost in olajšajo površinsko premikanje bakterij (Köhler in sod., 2000). Bakterija *Bacillus subtilis* izloča lipopetidni surfaktant, imenovan surfaktin. Mutante, ki imajo okvarjene gene v operonu *srfAA*, ki je odgovoren za sintezo surfaktina, lahko plavajo, ne morejo pa rojiti (Cosmina in sod., 1993). Prav tako ne rojijo mutante *hag*, ki nimajo bička. Zanimivo pa je, da lahko rojenje povrnemo, če zmešamo celice, ki imajo okvarjen bodisi *srfAA* ali *hag*. Neobičkana mutanta namreč proizvaja surfaktin in tako pomaga pri rojenju celicam z okvaro gena *srfAA*, ki imajo biček (Kearns in Losick, 2003).

2.1.2.3 Faza prilagajanja pri rojenju

Faza prilagajanja je obdobje prilagajanja pred začetkom rojenja, ko se bakterije prenesejo iz tekočega na poltrdno gojišče (Kearns in Losick, 2003). Faza prilagajanja rojenja je

primerljive dolžine pri enakih pogojih, lahko pa jo skrajšamo s povečanjem števila celic v inokulumu (Kearns in Losick, 2003, 2005; Chen in sod., 2009). Faza prilagajanja je slabo razumljena, znano pa je, da morajo celice skozi več sprememb, da lahko začnejo rojiti (Kearns, 2010). Prvič, za rojenje je potrebna visoka celična gostota, ki sproži sintezo surfaktina. Vendar faze prilagajanja ne skrajšamo, če celice nacepimo na agar, na katerega smo predhodno nanesli surfaktin (Kearns in Losick, 2003). Drugič, za začetek rojenja in izhod iz faze prilagajanja morajo biti celice hiperobičkane. Skladno s tem, pri celicah, ki so jim umetno ustvarili boljšo sintezo bičkov, ni bilo faze prilagajanja (Kearns, 2010). Tretjič, fazi prilagajanja se izognemo, če aktivno roječe celice poberemo s plošče in jih ponovno inokuliramo na sveže gojišče, ki vzpodbuja rojenje. Če roječe celice razredčimo in nato ponovno inokuliramo, ponovno opazimo fazo prilagajnja. Za uspešno rojenje je nujna visoka celična gostota, ki podpira nastanek nukleacijskih centrov in dinamičnih raftov (Kearns, 2010).

2.2 SORODSTVENO PREPOZNAVANJE, TERITORIALNOST

2.2.1 Interakcije med bakterijami

Bakterije se v okolju največkrat nahajajo v mešanih kulturah, kjer vstopajo v številne interakcije, komunicirajo tako da, tekmujejo ali sodelujejo (skozi sintrofične interakcije) (Jakubovics, 2010) in tako vplivajo na sestavo in delovanje mikrobnih združb (Foster, 2005; Xavier in sod., 2011). Bakterije komunicirajo preko signalnih molekul in posledično izločajo t. i. skupne dobrine, kot so številne molekule, encimi, polisaharidi, surfaktanti, antibiotiki.. Sinteza skupnih dobrin zahteva energetski vložek in je osnova kooperativnega vedenja pri mikroorganizmih (West in sod., 2007). Kooperativno vedenje je občutljivo na izkoriščanje s strani goljufov, ki ne prispevajo v skupno dobro, imajo pa korist od zunajceličnih dobrin. Hamilton je postavil teorijo o sorodstveni selekciji, v kateri predpostavi, da je kooperativno vedenje bolj stabilno med sorodniki in da obstajajo specifični mehanizmi, ki ščitijo kooperativna vedenja pred goljufi (Hamilton, 1964; Travisano in Velicer, 2004). Goljufanje mikroorganizmov so dokazali na primeru izločanja sideroforov – skupnih dobrin (Griffin et al., 2004) in na nivoju medceličnega signaliziranja pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* (Diggle in sod., 2007). Možna mehanizma, ki bi lahko vplivali na stabilnost kooperativnega vedenja sta sorodstvena diskriminacija in omejena disperzija (Strassman in sod., 2011). Nedavno so Stefanic in sod. (2015) pri *Bacillus subtilis* pokazali pojav mejne linije med dvema rojema manj sorodnih sevov, ki pa ni vidna, če na plošče nacepijo visoko sorodna seva. Podoben fenomen so opazili tudi pri bakterijah *Myxococcus xanthus* (Vos in Velicer, 2009) in *Proteus mirabilis* (Dienes, 1946).

2.2.2 Teritorialnost

Teritorij je območje v prostoru, ki ga izključno uporablja posamezen organizem ali skupina organizmov (Burt, 1943), teritorialnost pa je značilna za številne prebivalce našega planeta. Na primer, mnoge živalske vrste zaščitijo svoj teritorij z uporabo različnih hlapnih substanc – dišavnih markerjev, s katerimi omejijo in zarišejo svoj teritorij. S tem izključijo ostale osebke iste vrste, pri čemer uporabijo agresivno konfrontacijo ali tudi medsebojno soglasje (Adams, 2001). Živali so predvsem agresivne, če pride do invazije njihovega teritorija in tako skušajo vsiljivca izgnati (Harrison, 1982). Podobna oblika teritorialnosti se pojavlja tudi pri bakterijah; npr. tvorba mejnih linij med sevi *P. mirabilis* je primer teritorialnosti bakterij. Na splošno teritorialnost opredelimo kot vedenje, s katerim organizem vzpostavi določeno območje, katerega ohranja in brani (Hölldobler in Lumsden, 1980). V primeru *P. mirabilis* je en sev sposoben zavirati kolonizacijo drugega, tako da z njim tekmuje in ga izključi (Aoki in sod., 2005). Ekološka teorija pravi, da organizmi lokalno tekmujejo za prostor (ali za vire) in da a) zmaga tisti, ki prej pride (zasede nišo); b) zasede nišo ali prostor po tem, ko prvi umre (loterijsko tekmovanje) in c) pridobi prostor in vire z neposredno kompeticijo na mejah med posameznimi vrstami (Crowley in sod., 2005). Tako lahko posamezne vrste ali rodove definiramo kot 'zmagovalce' ali 'poražence' ter določimo faktorje, ki so vodili k njihovemu uspehu (ali neuspehu). Tako tekmovanje v širjenju kot tekmovanje za meje igrata pomembno vlogo pri uspešni kolonizaciji, pri tem pa je relativno pomembna tudi gostota celic (Lloyd in Allen, 2015).

2.2.3 Sorodstvena diskriminacija

Sorodstvena diskriminacija je v splošnem opredeljena kot različno obravnavanje posameznikov iste vrste glede na njihovo sorodstveno povezanost. Ta omogoča, da posamezna bakterija lahko razlikuje sorodne od nesorodnih sevov, zato je lahko sodelovanje prednostno usmerjeno proti sorodnim sevom (Hamilton, 1964). Pri različnih večceličnih evkariontih so odkrili, da je sodelovanje med celicami močno povezano z večceličnostjo in sorodstveno diskriminacijo. Sorodstvena diskriminacija se kaže v oblikovanju mej med kolonijami, ubijanju ali inhibiciji nesorodnih sevov (Strassmann in sod., 2011). Ločevanje med sorodniki ('kin') in nesorodniki ('non-kin') so opazili pri rojenju bakterije *Bacillus subtilis* (Stefanic in sod., 2015; Lyons in sod., 2016).

Pojav sorodstvene diskriminacije so v študijah že prej preučevali iz različnih zornih kotov in pri različnih organizmih, kot so živali (Waldman, 1988), rastline (Dudley, 2007), socialne žuželke (Tsutsui, 2013), amebe (Gilbert, 2007) in bakterije (Vos, 2009). Mikrobi imajo bogato in pestro družabno življenje, ki se odraža v tekmovanju, goljufanju, altruizmu in sodelovanju (Stefanic in sod., 2015).

Stefanic in sod. (2015) so na primeru 39 sevov *B. subtilis*, izoliranih iz dveh vzorcev tal (Stefanic in Mandic-Mulec, 2009; Stefanic in sod., 2012), dokazali sorodstveno diskriminacijo. Ta pojav se je odrazil v nastanku mejne linije med nesorodnimi roječimi celicami. Pogostnost mejnih linij je bila višja med sevi z nižjo filogenetsko sorodnostjo glede na 4 hišne gene *gyrA*, *rpoB*, *dnaJ*, *recA* (pod 99,5 % identičnost), nasprotno pa je bilo pri sevih, ki se združujejo, saj je bila pri njih identiteta vsaj 99,5 %. Na korenini *Arabidopsis thaliana* so sorodni sevi tvorili mešane biofilme, nesorodni pa so tekmovali in na korenini je prevladal običajno eden od dveh sevov. Nedavno so Lyons in sod. (2016) tudi pokazali, da je sorodstvena diskriminacija posledica razlik med sevi na nivoju več genov, ki kodirajo antagonistične dejavnike (toksine, antibiotike, površinske komponente) ali pa regulirajo izražanje ali sintezo teh lastnosti. Identificirali so veliko število genetskih lokusov, ki prispevajo k sorodstveni diskriminaciji, in se v sestavi ter naravi razlikujejo med sevi. Ta sistem diskriminacije so poimenovali kombinatorna sorodstvena diskriminacija (Lyons in sod., 2016).

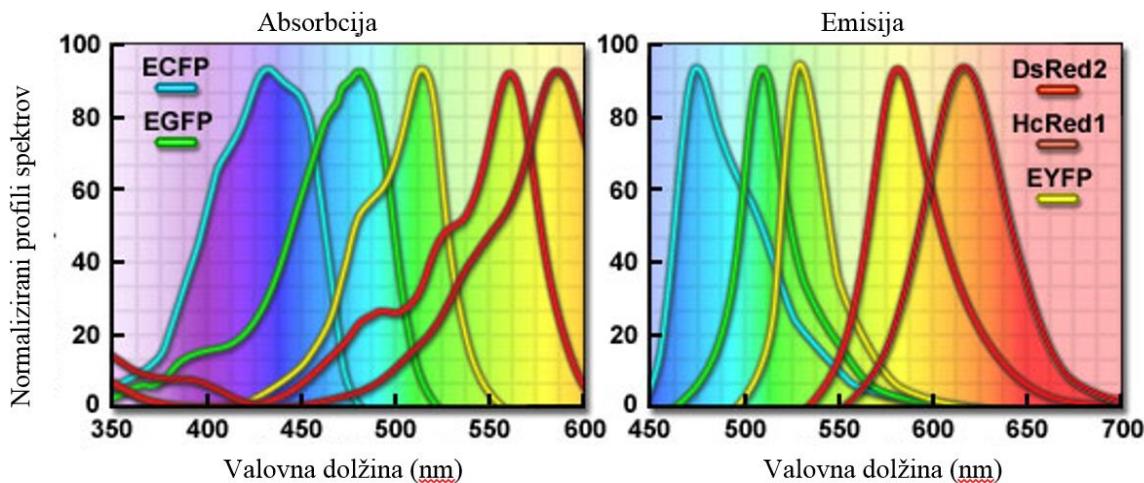
2.3 FLUORESCENTNI PROTEINI, METODOLOGIJA

Fluorescentni proteini so pomembno in razširjeno orodje v znanstvenih raziskavah. Protein GFP (ang. Green fluorescent proteins) meduze *Aequorea victoria* je prvi član družine fluroescentnih proteinov, ki so ga izolirali iz bioluminiscenčnih morskih živali (Yang in sod, 1996; povzeto po Heger in sod., 2015). Do zdaj je bilo ustvarjenih veliko derivatov originalnih fluorescentnih proteinov, ki nam zagotavljajo velik izbor barv (Schaner, 2005). V družini proteinov GFP, na primer, je na voljo 7 družin, ki emitirajo svetlobo različnih valovnih dolžin: modro (BFPs; λ_{em} = 440–470 nm), ciano (CFPs; λ_{em} = 471–500 nm), zeleno (GFPs; λ_{em} = 501–520 nm), rumeno (YFPs; λ_{em} = 521–550 nm), rdečo (RFPs; λ_{em} = 576–610 nm), daljšo rdečo (FRFPs; λ_{em} = 611–660 nm) in druge (Heger in sod., 2015). Ker lahko fluorescentne proteine gensko kombiniramo s celičnimi proteini, lahko vsaka potomka celice izraža fluorescentni protein in lahko relativno enostavno sledimo posameznim komponentam znotraj celice ali skupini celic (Chudakov, 2005). Populacija celic lahko izraža le en fluorescentni protein, lahko pa kombinacijo dveh ali več fluorescentnih proteinov, kjer vsak fluorescentni protein označuje drug sestavni del v vzorcu oz. drugo lastnost populacije, kar pomembno vpliva na konfiguracijo naših sistemov za prikazovanje (Piston in sod., 2015). V ekoloških raziskavah se fluorescenco uporablja na več načinov: npr. za genetske analize, kot je *in situ* hibridizacija »FISH« ali komperativna genomska hibridizacija »CGH«, za DNA amplifikacijo, kot sta PCR in DNA sekvenciranje, za raziskovanje lokalizacije proteinov in molekulskih interakcij. Ker se fluorescentne beljakovine sintetizirajo *in vivo*, je v biološkem sistemu postalo izvedljivo vključevanje fluorescentnih metod. Trenutno so na voljo fluorescentni蛋白 celotnega elektromagnetnega spektra. Fluorescentne tehnike se sproti razvijajo in iz odkritij na enem področju se hitro selijo na druga področja. Lastnosti fluorescence so uporabili za razvoj novih testov in načinov slikanja pod mikroskopom z izjemno ločljivostjo, ki segajo od

prenosa energije do prikazovanja molekularnih interakcij (Drumen, 2012). Glavna prednost fluorescentnih proteinov je, da so gensko kodirani in so lahko zaradi tega izraženi *in vivo* kot fuzija proteina, kar zagotavlja absolutno specifičnost označevanja. Vendar imajo fluorescentni proteini tudi veliko slabosti kot fluorofori, saj sta njihova svetlost ter fotostabilnost omejeni, prav tako pa lahko njihova velikost vpliva na funkcionalnost tarčne molekule (Kentner in Surjik, 2010). Primer uporabe fluorescentnih proteinov v ekoloških raziskavah je študija Bahatta in sod. (2006), kjer so preučevali uporabo fluorescentne spektroskopije za razlikovanje med bakterijskimi celicami in kvasovkami. Ugotovili so, da lahko s pomočjo fluorescence uspešno ločujejo med bakterijskimi in kvasnimi celicami. S fluorescentno mikroskopijo lahko preučujemo odzive posameznih celic v mikrobnih združbah. Long in sod. (2009) so uporabili gen za protein GFP brez lastnega promotorja kot poročevalec za kvantitativno sledenje aktivnosti zaznavanja kvorumu (ang. quorum sensing, QS). Sledili so odzivu na dva različna signala – autoinduktorja (AI-1 in AI-2) ter ugotovili, da lahko populacija celic loči med različnimi koncentracijami različnih autoinduktorjev, integrira informacijo in modulira odziv glede na njihovo koncentracijo.

2.3.1 Rumeni fluorescentni protein

Rumeni fluorescentni proteini so med najsvetlejšimi in med vsestransko kodiranimi sondami, ki so jih razvili do zdaj (Shanner in sod., 2007). Družino rumenih fluorescentnih proteinov (YFP) so pridobili iz morskega organizma *A. victoria* in je mutant zelenega fluorescentnega proteina (GFP) (Piston in sod., 2015). Nadaljnje izboljšave so pripeljale do razvoja okrepljenega rumenega fluorescenčnega proteina (EYFP), ki je eden od najsvetlejših in najbolj uporabljenih fluorescentnih proteinov (Shaner in sod., 2007). Svetlost in emisijski fluorescentni spekter okrepljenega rumenega fluorescentnega proteina se združita (Slika1), tako da sonda postane odličen kandidat za analize večbarvnih slik s pomočjo fluorescentnega mikroskopa. Rumeni fluorescentni protein predstavlja tudi določene težave: je zelo občutljiv na nizek pH, saj izgubi približno 50 odstotkov svoje fluorescence pri pH 6,5 (Griesbeck in sod., 2001). Protein EYFP je bolj občutljiv tudi na kloridne ione in na fotobeljenje kot zeleni fluorescentni proteini. Nadaljnji razvoj fluorescentnega proteina za rumeno emisijo je rešil več problemov z rumenimi sondami (Piston in sod., 2015).



Slika 1: Prikaz absorpcijskega in emisijskega spektralnega profila za pogosto uporabljene in komercialno dostopne fluorescentne proteine, ki zajemajo vidni spekter od modre do rdeče (povzeto po Piston in sod., 2015). ECFP – ojačan ciano fluorescentni protein, EGFP – ojačan zelen fluorescentni protein, DsRed2 – rdeči fluorescentni protein, HcRED1 – daljši rdeči fluorescentni protein, EYFP – ojačan rumeni fluorescentni protein.

2.3.2 Rdeči fluorescentni protein

Od odkritja prvega rdečega fluorescentnega proteina (RFP), imenovanega tudi DsRed, pred dvanajstimi leti, so (do zdaj) klonirali in biotehnološko razvili široko paleto rdečih fluorescentnih proteinov, ki delujejo kot monomerne fluorescentne sonde za optično mikroskopijo (Platkevich in Verkhusha, 2014). Glavni cilj razvoja fluorescentnih proteinov je postala gradnja rdeče-vzbujenega derivata, ki je enaka ali presega napredne lastnosti okrepljenega zelenega fluorescentnega proteina. Leta 1999 so klonirali šest novih fluorescentnih proteinov iz ne-bioluminiscentnih vrst koralnjakov (Platkevich in Verkhusha, 2014). Eden od proteinov, ki se imenuje drFP583, se je v svojih spektralnih lastnostih močno razlikoval od proteina GFP, saj je rdeče fluoresciral. Gen za protein drFP583 je bil optimiziran za ekspresijo v celicah sesalcev in je postal prvi komercialno dostopen in od takrat pogosto uporabljen rdeči fluorescentni protein (RFP) (Platkevich in Verkhusha, 2014). Ta protein izhaja iz korale *Discosoma striatumu* in se ponavadi navaja kot DsRed (Shaner in sod., 2004). Pred kratkim so oblikovali tudi RFP-je s širokim premikom fluorescentnih emisij (Piston in sod., 2015; Shaner, 2007), med katere sodi fluorescentni protein mKate (Pletnev in sod., 2008). Protein mKate izvira iz divjega tipa fluorescentnega proteina eqFP578 (iz morskih vetrnic *Entacmaea quadricolor*) (Gurskaya in sod., 2001; Wang in sod., 2004). Spada med fluorescentne proteine, ki bolj svetijo in so fotostabilni (Shcherbo in sod., 2009). Je monomeren protein in fluorescencija je odvisna od pH: največjo emisijo prikazujejo pri pH 8, ta pa se postopoma zmanjšuje do ničle pri pH 4. Protein mKate je primeren za opazovanje zlitih proteinov v organizmih ter uporaben za večbarvno označevanje in FRET aplikacije (Pletnev in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Lastnosti bakterijskih sevov uporabljeni v študiji so prikazani v Preglednici 1–2.

Preglednica 1: Naravni izolati bakterije *B. subtilis*

OZNAKA SEVA	GENOTIP	VIR
PS-216	<i>wt. B. Subtilis</i>	Štefanič in Mandič-Mulec, 2009
PS-218	<i>wt. B. Subtilis</i>	Štefanič in Mandič-Mulec, 2009

Preglednica 2: Označeni sevi s fluorescentnimi proteini bakterije *B. subtilis*

OZNAKA SEVA	GENOTIP	VIR
PS-216 YFP (BM1090)	<i>amyE::P_{hypercl03}-YFP (Sp)</i>	Kraigher, neobjavljen
PS-216 RFP (BM1097)	<i>amyE::P_{hyperspank-mKate} (Cm)</i>	Štefanič in sod., 2015
PS-218 YFP (BM1125)	<i>amyE::P_{hypercl03}-YFP</i>	To delo
PS-218 RFP (BM1098)	<i>amyE::P_{hyperspank-mKate} (Cm)</i>	Kraigher in Danevčič, neobjavljen
3610 (BM1222)	<i>amyE::P_{hypercl03}-YFP (Sp)</i>	Powers in sod., 2015
3610 (BM1223)	<i>amyE::P_{hyperspank-mKate2} (Cm)</i>	Chen in sod., 2012
3610 (BM1220)	<i>amyE::P_{hag-} YFP (Sp)</i>	Vlamakis in sod., 2008

3.1.2 Antibiotiki

3.1.2.1 Priprava založne raztopine antibiotikov

Antibiotike pripravimo v koncentracijah, kot so navedene v Preglednici 3. Raztopine antibiotikov, ki smo jih pripravili z destilirano vodo, smo filtrirali skozi sterilni filter (0,22 µm) in jih razdelili v sterilne epice. Antibiotikov, ki smo jih raztopili v etanolu, ne filtriramo. Pripravljene antibiotike shranimo pri temperaturi, ki je navedena v Preglednici 3.

Uspešno pripravo antibiotika preverimo z nacepljanjem negativne kontrole (sev, ki nima gena z zapisom za odpornost proti antibiotiku) na trdno gojišče LB z dodanim antibiotikom. Antibiotike smo dodali v ohlajena, a še tekoča (50 °C) sterilna gojišča v Preglednici 3 navedenih koncentracijah.

Preglednica 3: Založne in končne koncentracije uporabljenih antibiotikov

IME	OKRAJŠAVA	ZALOŽNA KONCENTRACIJA	SHRANJEVANJE	KONCENTRACIJA V GOJIŠČU	TOPILO
Kloramfenikol	Cm	10mg/ml	-20 ° C	5µg/ml	Etanol
Spektinomicin	Sp	50mg/ml	-20 ° C	100µg/ml	Destilirana voda

3.1.3 Gojišča

Gojišče Luria-bertani (LB)

Tripton..... 10 g
 NaCl..... 5 g
 Kvasni ekstrakt..... 5 g
 dH₂O..... do 1000 ml
 (agar)..... 15 g

Pripravljeno gojišče avtoklaviramo pri 121 °C. Antibiotik vedno dodamo po avtoklaviraju v na 50 °C ohlajeno gojišče.

Gojišče za kompetenco (CM)

Glukoza (50 %)..... 5 ml
 Kvasni ekstrakt (10 %)..... 5 ml
 Kazeinski hidrolizat (2 %)..... 5 ml
 MgCl₂ (1 M)..... 1 M
 1 x SS brez Mg..... 500 ml

Raztopine predhodno pripravimo in jih avtoklaviramo. Nato raztopine sterilno dodamo avtoklavirani raztopini 1xSS brez Mg (glej spodaj). Antibiotik dodamo v že avtoklavirano gojišče.

Gojišče za sporulacijo

Nutrient broth..... 1,6 g
 KCl 0,2 g
 dH₂O..... 100 ml

Pripravljeno gojišče avtoklaviramo pri 121 °C. Pripravimo založne raztopine in jih avtoklaviramo. Po avtoklaviranju založne raztopine sterilno dodamo gojišču.

	Založna raztopina	Končna koncentracija
MgSO ₄ x 7H ₂ O.....	1 M	1 mM
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O.....	1 M	1 mM
FeSO ₄ x 7H ₂ O.....	1 mM	1 µM
MnCl ₂	0,1 M	10 µM
Glukoza.....	1 M	2,8 mM
D-riboza.....	1 M	2,8 mM

Gojišče B-medij

Tris-HCl.....	50 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O.....	8 mM
KCl.....	27 mM
Na citrat x 2H ₂ O.....	7 mM
dH ₂ O.....	1000 ml
(Uravnaj pH na 7,5)	

Dodamo založne raztopine do končnih koncentracij.

CaCl ₂ x 2H ₂ O (založna 0,2 M).....	2 mM
FeSO ₄ x 7H ₂ O (založna 0,01 M).....	1 µM
MnSO ₄ x 4H ₂ O (založna 0,1 M).....	10 µM
Na glutamat.....	4,5 mM
Triptofan.....	0,78 mM
Lizin.....	0,86 mM
Glukoza.....	0,2 % (w/v)
KH ₂ PO ₄ (založna 0,6 M).....	0,6 mM
Agar.....	0,70 %

Pripravljeno gojišče avtoklaviramo pri 110 °C.

3.1.4 Raztopine

Fiziološka raztopina

NaCl.....9 g
 dH₂O.....1000 ml

Fiziološko raztopino avtoklaviramo pri 121 °C.

Raztopina glukoze (50 %) - (w/v)

Glukoza.....50 g
 dH₂O.....dolijemo do 100 ml

Pripravljeno raztopino avtoklaviramo pri 110 °C.

Raztopina 1 x SS

KH₂PO₄.....0,04 M
 K₂HPO₄.....0,08 M
 (NH₄)₂SO₄.....15 mM
 Na-citrat x 2H₂O.....3,4 mM
 MgSO₄ x 7H₂O.....0,8 mM
 dH₂O.....do 1000 ml
 (Končni pH=7,0)

Raztopino avtoklaviramo pri 121 °C.

NaDS (10 %)

NaDS.....10 g
 dH₂O.....dolijemo do 1000 ml
 Raztopimo pri 68 °C in uravnamo pH na 7,2.

Pufer 50x TAE za gelsko elektroforezo

Tris baza.....242,0 g
 Oacetna kislina (100 %).....37,1 ml
 0,5 M EDTA (pH=8).....100 ml
 dH₂O.....do 1000 ml
 (Končni pH=8,5)

1x TAE pufer pripravimo iz založne raztopine 50x TAE.

Pufer TES

Tris-HCl (pH 7,6).....	10 mM
EDTA.....	1 mM
NaCl.....	0,1 M

3.1.5 Kemikalije in reagenti

Agar	Fluka, St. Gallen, Švica
NaCl	Riedel-de Haën, Seelze-Hannover, Danska
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt, Nemčija
Tripton	Biolife, Milano, Italija
Tris-HCl	Fluka, St. Gallen, Švica
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaska
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Kvasni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
Tris baza	Merck, Darmstadt, Nemčija
Ocetna kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kazeinski hidrolizat	BD (Difco), Franklin Lakes, ZDA
Metionin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Lizin	Sigma-Aldrich, ZDA
Na glutamat	Sigma-Aldrich, ZDA
Levcin	Merck, Darmstadt, Nemčija
Histidin	Fluka, St. Gallen, Švica
MgCl ₂	Promega, Madison, WI, ZDA
Spektinomicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Kloramfenikol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Fenol	Kemika, Zagreb, Hrvaska
SDS	Fluka, St. Gallen, Švica
Kloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Izoamilalkohol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Agaroza	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Glicerol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Etanol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Lizocim (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

Ribonukleaza »Rnase A« (20 mg/ml)	MBI Fermentas, Litva
Proteinaza K (20 mg/ml)	MBI Fermentas, Litva
Nutrient broth	Biolife, Milano, Italija
KCl	Fluka, St. Gallen, Švica
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	Fluka, St. Gallen, Švica
FeSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt, Nemčija
MnCl ₂	Fluka, St. Gallen, Švica
D-riboza	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
MnSO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

3.1.6 Aparature

Avtoklav	Kambič A-21
Laboratorijska tehnica	Mettler PM4600 DeltaRange®
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH
Fluorescentni mikročitalec	Biotek, Cytation 3 imaging reader
Termo blok	Stuart, Labortehnika GOLIAS
Elektroforezna naprava	Biorad "sub-cell® GT" in "mini-sub® cell GT"
Vortex	Wizard, VELP Scientifica
Stresalna kopel	Julabo ShakeTemp SW22
Spektrofotometer	Iskra Photometer MA9510
Fluorescentna lupa	Leica, CH9435, tip: DFC425 C
Analitska tehnica	Mettler Toledo
Centrifuga (Sigma 3K30)	DJB Labcare, Velika Britanija
Laminarij (Laminar Flow Cabinet)	ESCO
pH meter (Inolab)	WTW
Mešalnik	Rotamix SHP-10

3.2 METODE

3.2.1 Konstrukcija sevov

Da bi lahko simultano zasledovali rast oz. rojenje različnih sevov, smo pripravili seve, označene z različnimi fluorescentnimi proteini: rumen fluorescentni protein -YFP oz. rdeč fluorescentni protein – mKate. Fluorescentni proteini se izražajo pod konstitutivnim promotorjem ($P_{hypercl03}$, $P_{hyperspank}$), kar pomeni, da naj bi se izražali v celotni populaciji in tekom celotne rasti populacije. Da bi lahko preverili vpliv izbire fluorescentnega proteina na naše rezultate, smo poleg že obstoječih sevov PS-216-YFP, PS216-mKate in PS-218-mKate pripravili še sev PS-218, označen s fluorescentnim proteinom YFP pod konstitutivnim promotorjem $P_{hypercl03}$. Izolirali smo DNA iz seva 3610 $amyE::P_{hypercl03}\text{-}YFP$ in vnesli protein YFP skupaj s kaseto za odpornost proti spektinomicinu v genom seva PS-218 s pomočjo transformacije in homologne rekombinacije v lokus $amyE$.

3.2.2 Izolacija kromosomske DNA

Mutanto seva *Bacillus subtilis* smo nacepili v tekoče gojišče LB, nato smo gojišču dodali ustrezni antibiotik ter inkubirali mutante preko noči pri 30 °C. Drug dan smo 1 % prekonočne kulture precepili v sveže gojišče LB, kateremu smo dodali glukozo do končne koncentracije 1 % (da bi preprečili morebitno sporulacijo) in jih s stresanjem gojili pri 37 °C do zgodnje stacionarne faze, približno 5–6 ur. 1,5 ml kulture smo prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 min. pri 16000 x g. Nato smo odstranili supernatant in dodali 1,5 ml kulture ter ponovno centrifugirali. Skupni volumen, iz katerega smo izolirali DNA, je bil 3 ml (dvakrat po 1,5 ml). Po centrifugiranju smo supernatant spet previdno odstranili s pipeto in celice resuspendirali v 300 µl pufra TES (1/10 volumna, iz katerega izoliramo DNA). Nato smo dodali lizocim do končne koncentracije 1 mg/ml (dodamo 6 µl lizocima koncentracije 50 mg/ml) in ribonukleazo »RNase A« do končne koncentracije 60 µg/ml (dodamo 2 µl ribonukleaze koncentracije 10 mg/ml). Pripravljeno zmes smo inkubirali 30 min. pri 37 °C. Po inkubaciji smo dodali NaDS do 1 % končne koncentracije (dodamo 33 µl 10 % raztopine) in proteinazo K do končne koncentracije 120 µl/ml (dodamo 2 µl proteinaze K koncentracije 20 mg/ml). Vse skupaj smo inkubirali preko noči pri 50 °C. Naslednji dan smo v digestoriju mešanici dodali 200 µl fenola, suspenzijo smo rahlo potresli in centrifugirali 10 min. pri 16000 x g. Po centrifugiranju smo dobili dve fazи. Zgornjo fazо, ki vsebuje TES in kromosomske DNA, smo z odrezanim nastavkom za pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko, ji dodali 200 µl mešanice kloroform in izoamilnega alkohola v razmerju 24 : 1 in nato centrifugirali 10 min. pri 16000 x g. Spet smo dobili dve fazи. Zgornjo fazо smo znova prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 2,5 volumna hladnega 96 % etanola, shranjenega pri -20 °C. Mikrocentrifugirko smo počasi obračali, da smo pospešili obarjanje DNA. Nato smo centrifugirali nekaj sekund pri 16000 x g, odstranili supernatant in dodali 500 µl hladnega etanola (70 %) ter inkubirali 15 min. na ledu. Nato smo še dvakrat

centrifugirali po nekaj sekund pri 16000 x g, da smo odstranili ves supernatant. Mikrocentrifugirko smo ob ognju posušili in DNA raztopili v 100 µl sterilne destilirane vode ter jo shranili pri 4 °C.

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza izolirane DNA

Vzorce izolirane DNA smo v kapljicah nanesli na parafilm, nato pa vzorcu primešali nanašalni pufer. Nanašalni pufer omogoči, da se vzorci usedejo na dno jamic v gelu. Za pripravo gela smo uporabili 0,8 % agaroze v pufru 1 x TAE, ki je bil tudi elektrodnji pufer. Raztopino agaroze in pufra smo segreli, da se je agarosa raztopila, nato smo raztopino rahlo ohladili in vlili v modelček za gelsko elektroforezo ter naravnali glavniček. Počakali smo, da se je gel ohladil in strdil, nato pa odstranili glavniček. Gel smo prenesli v elektroforezno napravo in prelili s pufrom TAE. V luknjice agaroznega gela smo s pipeto nanesli pripravljene vzorce izolirane DNA in lestvico (GeneRuler™). Elektroforeza je potekala pri električni napetosti 80 V približno 45 min., potem smo gel 20 min. obarvali v raztopini barvila GelRed in ga nato 10 min. namakali v destilirani vodi. Koncentracijo kromosomske DNA smo izmerili s pomočjo aparature Nanodrop.

3.2.4 Transformacija in konstrukcija sevov *B. subtilis* z rekombinantno DNA

Seve *B. subtilis* smo transformirali z 10 µl kromosomske DNA izbranih sevov *B. subtilis*. Seve *B. subtilis* smo gojili preko noči v 3 ml kompetenčnega gojišča CM pri 28 °C in 200 vrt./min. Drugi dan smo 1 % prekonočne kulture dodali v 10 ml svežega kompetenčnega medija in inkubirali v erlenmajericah s pritaljeno epruveto v vodni kopeli pri 37 °C s stresanjem 200 vrt./min. Rast bakterij smo spremljali tako, da smo merili optično gostoto pri 650 nm (OD₆₅₀) na vsakih 30 min. Točka T₂ je čas, ko naj bi bila stopnja transformacije najvišja, to je 2 uri po vstopu v stacionarno rastno fazo (približno 5–6 ur inkubacije s stresanjem). V času T₂ smo v sterilne epruvete prenesli 0,5 ml kulture, ji dodali 10 µl kromosomske DNA in inkubirali s stresanjem pri temperaturi 37 °C 30 min. Nato smo dodali 0,5 ml svežega segretega gojišča LB (gojišče segrejemo tako, da ga zjutraj damo v toplo sobo na 37 °C) in inkubiramo s stresanjem pri 37°C še 60 min. Transformacijsko in kontrolno mešanico (kultura brez dodane DNA) smo nanesli na agarsko gojišče LB z dodanim antibiotikom ter inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C. Transformacijsko mešanico smo nanesli po 10 in 100 µl, preostanek (780 µl) mešanice smo centrifugirali pri 10000 x g 5 min., nato pa odlili supernatant, resuspendirali v 100 µl in nanesli na agarsko gojišče LB z antibiotikom. Negativno kontrolno mešanico smo nanesli na plošče po 100 µl in centrifugirani ostanek.

3.2.5 Priprava inokuluma za test rojenja na poltrdnem B-gojišču

3.2.5.1 Priprava celic v eksponentni fazi rasti

Izbrane fluorescentno označene seve *B. subtilis* smo iz –80 °C nacepili na plošče LB z ustreznim antibiotikom in jih inkubirali pri sobni temperaturi, da zrastejo do posameznih kolonij. Te smo nato nacepili v 3 ml gojišča LB z ustreznim antibiotikom in jih preko noči gojili pri 200 vrt./min in 37 °C. 30 µL prekonočne kulture smo precepili v 3 ml LB brez dodanega antibiotika in gojili 2 uri in 30 min. pri 200 vrt./min in 37 °C. Nato smo kulturo spet precepili v 5 ml LB brez antibiotika (1 % inokulum) v erlenmajerice s pritaljeno epruveto. Kulturo smo gojili 2 uri pri 200 vrt./min in 37 °C in s spektrofotometrom izmerili optično gostoto pri 650 nm (OD₆₅₀). Po potrebi smo optično gostoto različnih sevov izenačili tako, da smo višje vrednosti redčili z LB in ponovno izmerili OD. Ugotovili smo, da je tak način redčenja oz. izenačevanja koncentracije števila celic pri različnih sevih težaven, zato smo se odločili za pripravo spor kot inokuluma za test rojenja.

3.2.5.2 Priprava spor in določanje števila CFU

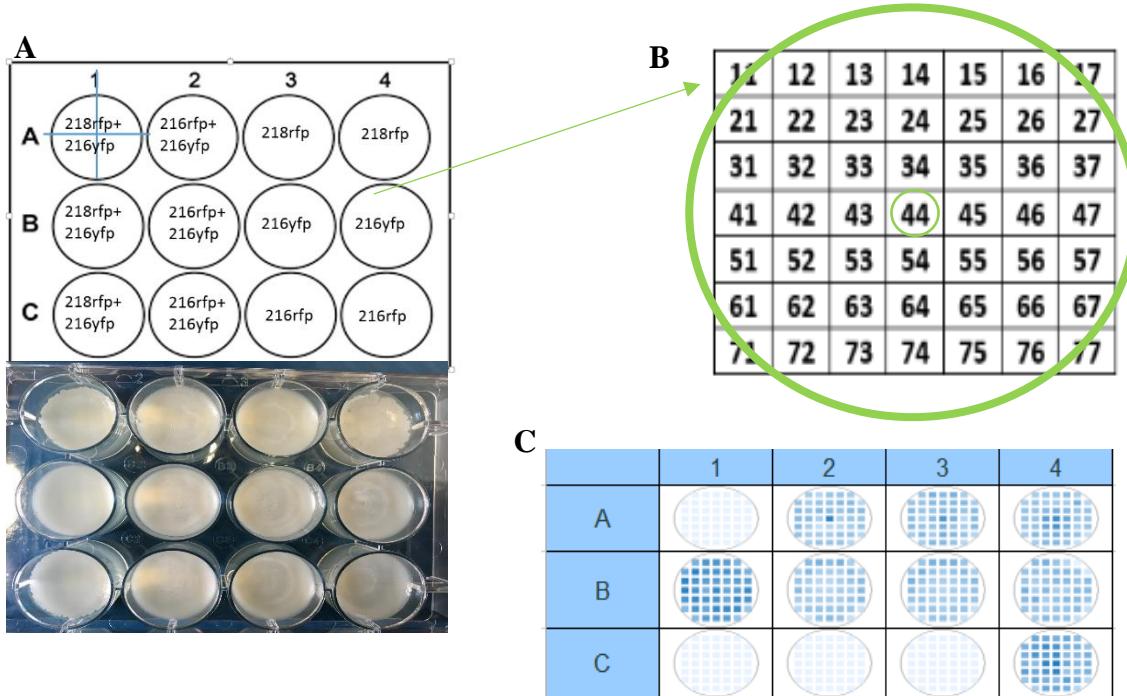
Seve *B. subtilis* smo gojili preko noči v 3 ml gojišča LB pri 200 vrt./min in 37 °C. Prekonočno kulturo smo 100 krat redčili v 5 ml sporulacijskega gojišča in inkubirali 5 dni s stresanjem 200 vrt./min in pri 37 °C. Po 5 mL kulture smo nato 30 min. inkubirali pri 80 °C, da bi uničili vse vegetativne celice. Nato smo kulturo centrifugirali pri 10000 x g 10 min., odlili supernatant in celice resuspendirali v 5 ml fiziološke raztopine. Ta postopek smo ponovili dvakrat. Spore smo razdelili v mikrocentrifugirke in jih shranili z 10–12 % glicerolom pri –20 °C. Koncentracijo tako pripravljenih spor smo določili s pomočjo metode štetja kolonij na trdnem gojišču (CFU – ang. colony-forming unit), in sicer smo po 100 µL redčitev 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ nacepili na gojišče LB z 2 % agarjem in dodanimi ustreznimi antibiotiki. Za izračun koncentracije CFU smo uporabili redčitve 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸. Na podlagi izračunane koncentracije CFU smo dobili okoli 10⁹ spor v 1 ml.

3.2.5.3 Priprava mikrotitrskih plošč

Za sledenje rojenja s fluorescenčnim mikročitalcem smo izbrali mikrotitrsko ploščo z dvanajstimi luknjicami ('12-well'). Najprej smo pripravili B gojišče in ga ohlajenega na 55 °C odpipetirali po 3 ml v vsako luknjico na 12-well mikrotitrski plošči. Ploščo smo pustili, da se je zaprta sušila vsaj 2 uri, nato smo nanesli 2 µl izbranega seva (okoli 10⁶ celic ali spor enega seva ali mešanice sevov) točno na sredino vsake luknjice, ki smo jih prej označili s pomočjo ravnila. Preden smo dali mikrotitrsko ploščo v čitalec, smo jo z vseh strani oblepili z medicinskim lepilnim trakom, da se gojišče tekom inkubacije ne bi posušilo.

3.2.6 Merjenje fluorescence in optične gostote pri 650 nm med procesom rojenja

Fluorescentni mikročitalec ima možnost površinskega skeniranja meritev po posamezni luknjici. Merili smo fluorescenco in optično gostoto sevov, kar nam je omogočilo časovno spremeljanje rojenja določenega seva (posamezno ali v mešanici) v posamezni luknjici. Meritve smo izvajali na matriki 7X7. Čitalec je za vsako luknjico ob vsakem času izmeril 45 točk po površini (4 robne točke so že izven luknjice, Slika 2). Točka 44 predstavlja srednjo točko v matriki in v to točko smo poskušali vedno nacepiti sev (ali mešanico). Interval merjenja je bil na 60 min., poskus je potekal pri 37 °C . Razdalja med dvema točkama v eni luknjici je 2761 µm (point spacing), diagonalna pa 3904,6 µm. Premer luknjice je 22098 µm. Polmer točke meritev fluorescence je 2000 µm, polmer točke meritev OD₆₅₀ pa je 1400 µm. Meritve so trajale od 23 do 30 ur, odvisno od eksperimenta. Če smo merili rojenje z inokulum celic iz eksponentne faze rasti, smo merili krajši čas (23 ur), če smo kot inokulum uporabili spore, pa smo meritve podaljšali zaradi nekoliko daljše faze prilagajanja pri rojenju. Optično gostoto smo merili pri 650 nm, fluorescenco pa smo določali pri parametrih navedenih v Preglednici 4.



Slika 2: Na sliki (A) je prikazana mikrotitrskra plošča z 12 luknjicami. Da smo kulturo nacepili točno na sredino, smo si v vsaki posamezni luknjici označili središče. Slika (B) pa prikazuje eno od 12 luknjic. Površina, na kateri fluorescentni mikročitalec odčita podatke, je v obliki kroga, zato ne zazna 4 robnih točk (11, 17, 71, 77). Luknjica je razdeljena na 45 točk in vsaka točka ima svojo oznako (npr. točka 11, točka 33...). Slika (C) je prikaz meritev v eni od časovnih točk, kot jo prikaže fluorescentni mikročitalec.

Preglednica 4: Parametri za uporabljene fluorescentne proteine.

Fluorescentni protein	RFP - mKate	YFP
Vzbujanje (excitation)	570 nm	500 nm
Emisija (emission)	620 nm	530 nm
'Gain'	100	60

Preprečevanje izsušitve gojišča smo določili eksperimentalno. Najprej smo v luknjice odpipetirali 2 ml gojišča, vendar smo ugotovili, da se je rojenje hitro ustavilo, saj se je najverjetneje gojišče prehitro posušilo. Nato smo odpipetirali po 3 ml gojišča v vsako luknjico in mikrotitsko ploščo z 12 luknjicami ovili z medicinskim trakom, da smo čim bolj preprečili izhlapevanje vode. Ugotovili smo, da moramo mikrotitske plošče z 12 luknjicami pripraviti še isti dan, maksimalno 3 ure pred pričetkom eksperimenta, kar je nekoliko drugače od poskusov, ki smo jih izvajali na večjih ploščah premera 70 mm – te smo pripravljeni en dan prej.

3.2.7 Določanje hitrosti rojenja

Hitrost rojenja smo določili tako, da smo iz dobljenih grafov pridobljenih iz mikročitalca fluorescence za vsak eksperiment posebej določili ozadje oz. pričetek premikanja po plošči. Na grafu smo odčitali minimalno intenzitetu fluorescence, pri kateri lahko zaznamo dvig vsaj dveh krivulj, ki ne pripadata sredinski točki 44 v matriki. Nato smo pri tako določenem mejnem RFU odčitali čas na različnih krivuljah. Iz dobljenih podatkov o času in znane razdalje med meritvenimi točkami v matriki (2761 µm med točkami vodoravno ali navpično oz. 3904,6 µm po diagonali) smo izračunali povprečne hitrosti (in standardno deviacijo) premikanja seva iz sredinske točke proti robu luknjice v različnih smereh (med točkami 44, 45, 46, 47; 44, 54, 64, 74; 44, 43, 42, 41 ali 44, 34, 24, 14 oz. med točkami 44, 55, 66; 44, 53, 62 ali 44, 35, 26; 44, 33, 22, Slika 2 B).

3.2.8 Določanje kompeticije med sevi *B. subtilis* s pomočjo fluorescentnega mikročitalca

Za določevanje kompeticije med sevi *B. subtilis* smo si najprej pripravili celice, kot je opisano v poglavju Priprava celic. Na dan poskusa smo si pripravili še mikrotitske plošče z B-gojiščem, kot je opisano v poglavju 3.2.5.3. Ko smo izvajali eksperiment s celicami iz eksponentne faze rasti, smo najprej izenačili OD₆₅₀ izbranih sevov, nato smo jih med sabo pomešali v razmerju 1 : 1 (v inkolumu smo imeli približno 10⁶ celic). Preverjali smo kompeticijo pri zasedanju površine pri naslednjih kombinacijah sevov: PS-216 – PS-216, PS-218 – PS-218 in PS-216 – PS-218 v obeh kombinacijah fluorescentnih označevalcev (Preglednica 5).

Preglednica 5: Kombinacije sevov, ki smo jih uporabili pri preverjanju kompeticije.

216 YFP + 216 RFP 1:1	218 YFP + 216 RFP 1:1	218 RFP + 216 YFP 1:1	218 RFP + 218 YFP 1:1
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

Pri poskusih s sporami smo seve med sabo pomešali v razmerjih 4 : 1, 1 : 1 in 1 : 4, pri čemer smo med sabo mešali vzorce spor, ki so imele najbolj podobno število CFU/mL. Po 2 µl tako pripravljenih mešanic smo nanesli na sredino luknjic na mikrotitrski plošči. V vsakem poskusu na mikrotitrski plošči z 12 luknjicami smo imeli tri tehnične ponovitve mešanic sevov, poskus pa smo ponovili s tremi različnimi vzorci spor (tri biološke ponovitve). Število spor v poskusih je bilo približno 10^6 v 2µl.

Preverili smo mešanice PS-216 – PS-216, PS-218 – PS-218 in PS-216 – PS-218 v obeh kombinacijah fluorescentnih označevalcev in v treh različnih razmerjih med sevi (Preglednica 6).

Preglednica 6: Kombinacije sevov, ki smo jih uporabili pri poskusih s sporami.

218 YFP + 216 RFP 4:1	218 YFP + 216 RFP 1:1	218 YFP + 216 RFP 1:4
216 YFP + 216 RFP 4:1	216 YFP + 216 RFP 1:1	216 YFP + 216 RFP 1:4
218 RFP + 216 YFP 4:1	218 RFP + 216 YFP 1:1	218 RFP + 216 YFP 1:4
218 YFP + 218 RFP 4:1	218 YFP + 218 RFP 1:1	218 YFP + 218 RFP 1:4

3.2.9 Določanje kompeticije med sevi *B. subtilis* na večjih agarskih ploščah s pomočjo lupe

Za določanje kompeticije med sevi na večji površini (petrijevke s premerom 70 mm) smo pripravili sveže B gojišče z 0,7 % agarjem in ga ohlajenega na 55 °C po 15 mL razlili v petrijevke, te pa smo preko noči pustili v laminariju. Po 2 µl vzorca celic ali spor (posamezni sevi ali mešanice sevov 1 : 1; v inkubaciji je bilo približno 10^6 celic ali spor) smo nanesli na sredino plošče. Petrijevke smo inkubirali v zaprti plastični posodi pri 37 °C z dodano mokro brisačko. Po približno 18 urah inkubacije smo plošče pregledali in fotografirali pod lupo z vstavljenimi fluorescentnimi seti filterov mCherry (560nm/630nm) in YFP (500nm/535nm). Na enaki povečavi (8-krat) smo slike posneli pod različnimi filtri.

3.2.10 Analiza podatkov

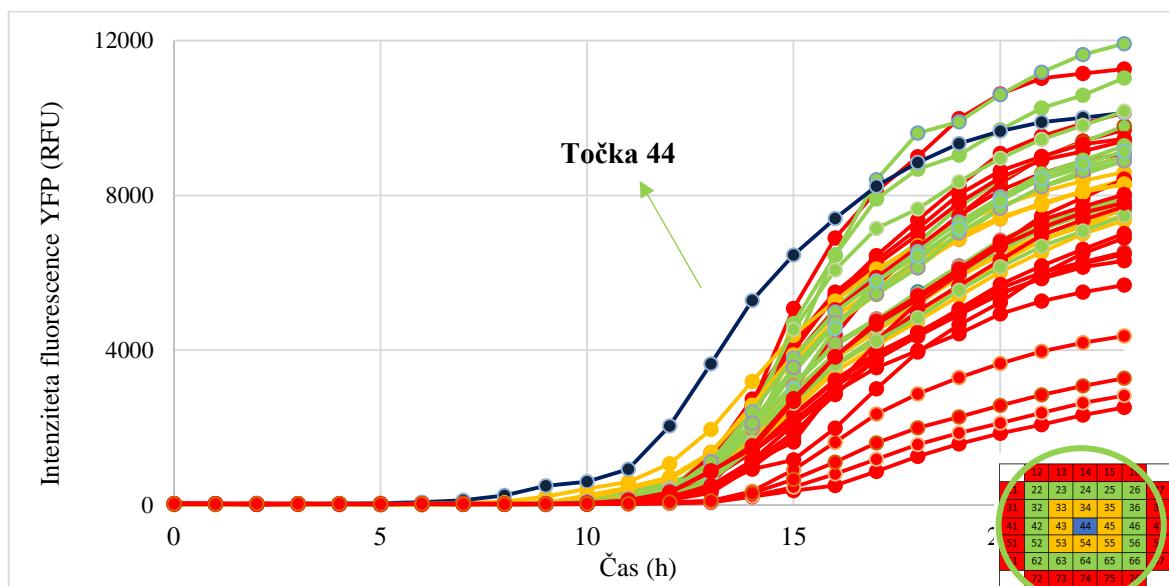
Veliko količino podatkov, pridobljenih s pomočjo mikročitalca, smo analizirali s pomočjo vrtilnih tabel v programu Excell 2013. Na ta način smo analizirali vse ponovitve poskusov, prikazali pa smo večinoma le reprezentativne poskuse. Pri določanju hitrosti (časovni interval med 0–24h) rojenja smo izračunali povprečja in standardne deviacije za posamezni sev. Slike, posnete s fluorescentno lupo, smo obdelali s pomočjo programa ImageJ.

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ METODE ZA ČASOVNO SPREMLJANJE ROJENJA NA POLTRDNEM GOJIŠČU S POMOČJO FLUORESCENTNEGA MIKROČITALCA

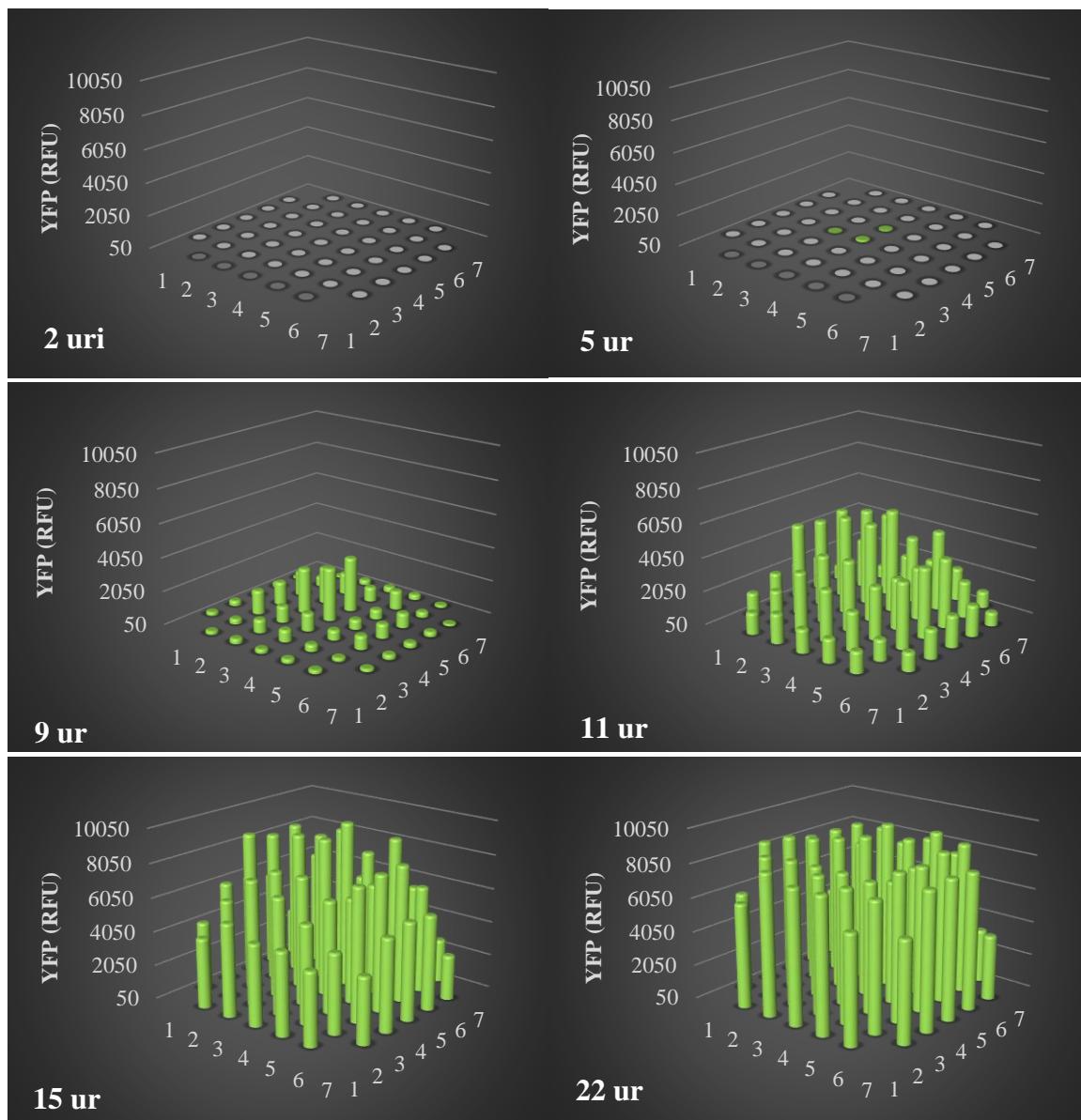
4.1.1 Prikazovanje rezultatov

Prikazovanje podatkov časovnega spremjanja rojenja, ki jih dobimo s pomočjo fluorescentnega mikročitalca, je bilo zelo težavno, saj je bilo potrebno povzeti zelo veliko podatkov. V rezultatih smo prikazali reprezentativen poskus, za vsak rezultat smo imeli vsaj tri biološke ponovitve. Najprej smo prikazovali podatke meritev v vseh točkah ene luknjice na mikrotitrski plošči (45 točk v matriki 7x7) v odvisnosti od časa rasti (Slika 3). Iz teh podatkov smo lahko ocenili, kdaj približno pride do začetka rojenja – premikanja po plošči, porast fluorescence, in določili povprečno hitrost rojenja.



Slika 3: Prikaz rojenja seva PS-216 YFP v odvisnosti od časa. Graf prikazuje intenzitete fluorescence (v relativnih fluorescentnih enotah – RFU), izmerjene vsako uro v vsaki točki v eni luknjici na mikrotitrski plošči. Na grafu je legenda obarvanosti posameznih točk znotraj ene luknjice glede na oddaljenost od sredine. Z modro barvo je označena sredinska točka (44), z oranžno barvo so označene točke, ki so najbliže sredinski točki, nato si sledijo točke, ki so obarvane zeleno, najbolj robne točke pa so pobarvane rdeče (glej shematski prikaz luknjice na desni). Sredinska točka 44 je najprej dosegla višjo vrednost, najbolj robne točke pa so večinoma dosegle nižje vrednosti in so tudi kasneje začele naraščati.

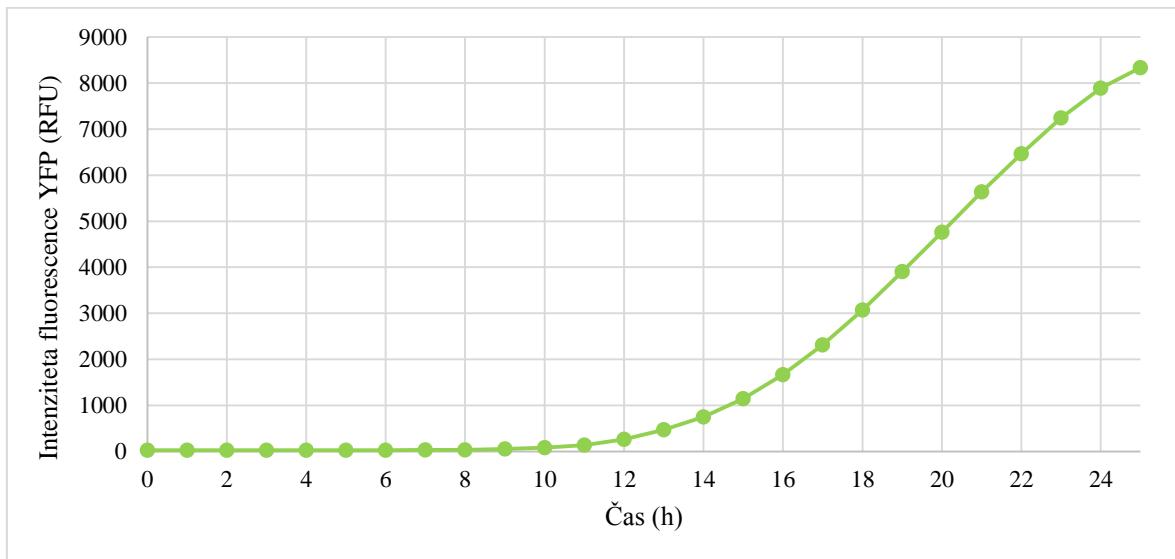
Da bi dobili boljšo prostorsko predstavo, kako raste izbrani sev v določenem času, smo naredili še 3D-prikaz podatkov meritev fluorescence v posamezni luknjici s programom (Slika 4). Tako smo lahko površinsko sledili, na katerem delu gojišča roji izbrani sev in kje ne. Ocenimo lahko tudi čas začetka rasti sevov in kje po gojišču zrastejo najprej. Kot je bilo pričakovano in smo lahko zaznali s pomočjo naše metode, sevi najprej zrastejo v sredini, nato se pomikajo proti robu luknjice (Slika 4).



Slika 4: Površinski prikaz intenzitete fluorescence roječega seva pri določenem času po inokulaciji seva v sredino luknjice. Grafi prikazujejo premikanje seva PS-218 YFP po površini gojišča znotraj ene luknjice. Naraščanje intenzitete fluorescence po času od sredinske točke (44) proti zunanjim robovom predstavlja rojenje oz. razraščanje seva po gojišču.

Ker analize in prikazi podatkov na zgoraj opisan način zahtevajo precej časa, smo skušali najti bolj enostaven in časovno manj zahteven način prikaza podatkov. Ugotovili smo, da je za potrebe preverjanja kompeticije med različnimi sevi dovolj, če prikažemo le povprečne vrednosti intenzitete fluorescence v luknjici po času, s čimer smo znatno zmanjšali število podatkov za analizo in prikazovanje (Slika 5). Na ta način smo lahko precej hitreje odčitali rezultate kompeticijskih eksperimentov (npr. kateri sev prevladuje v mešanici dveh različno

fluorescentno označenih sevov ali pogledali, če je prisoten samo en sev ali oba), vendar smo s prikazovanjem povprečij nekatere informacije izgubili.



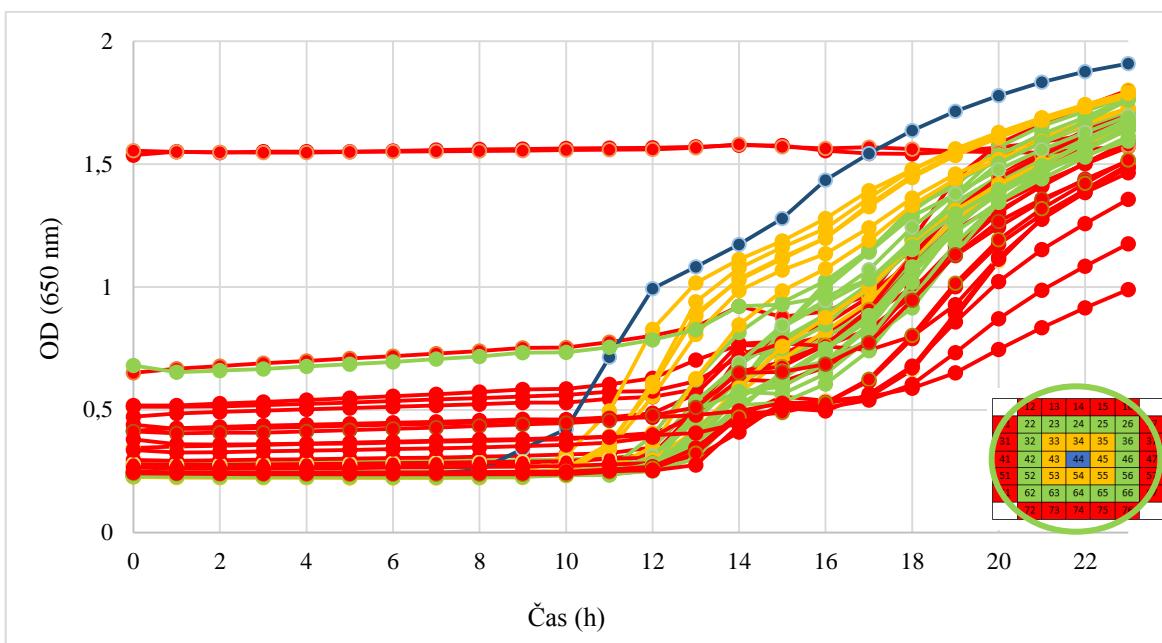
Slika 5: Prikaz povprečne intenzitete fluorescence (RFU – relativne fluorescentne enote) v eni luknjici v odvisnosti od časa rasti. Povprečja so bila izračunana iz podatkov, ki so prikazani na Sliki 3.

4.1.2 Sledenje rojenju preko merjenja fluorescence

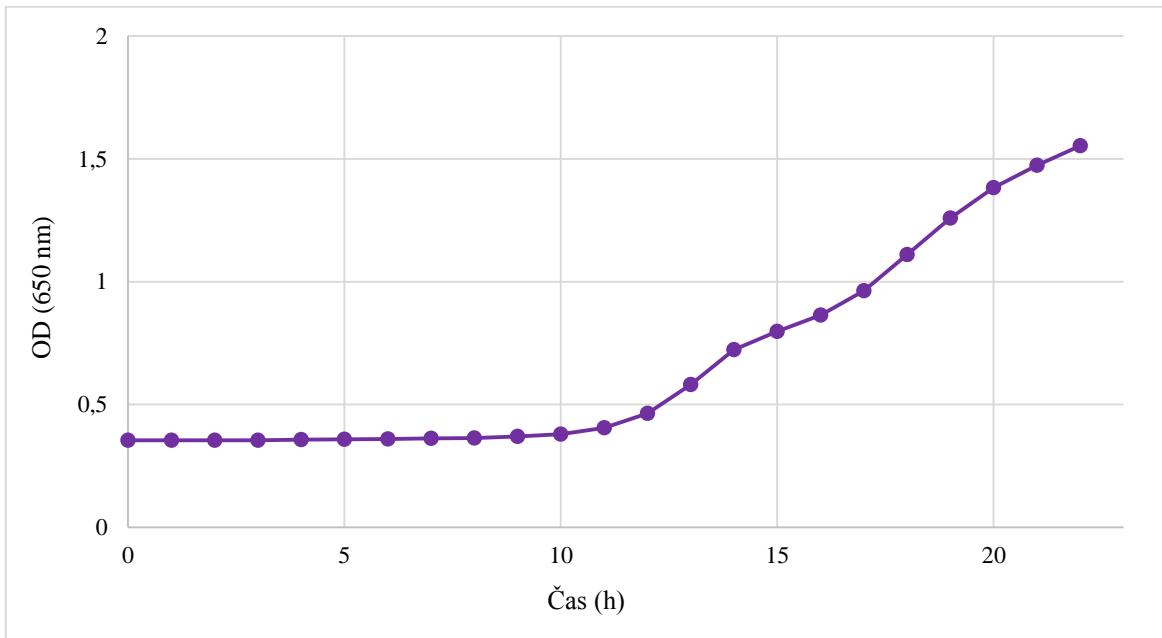
Fluorescenco je pri vseh sevih PS-216-YFP, PS-216-RFP, PS-218-YFP, PS-218-RFP s časom naraščala, in sicer smo v skoraj vseh točkah ene luknjice dobili rastne krivulje, tipične za zaprte sisteme tekočih kultur (Slika 3), ki so sestavljene iz lag faze, eksponentne faze in stacionarne faze rasti. Na podlagi teh rezultatov smo zaključili, da je preko meritev intenzitete fluorescence, površinsko po luknjici možno slediti rasti oz. tudi rojenju izbranih sevov.

4.1.3 Sledenje rojenju preko merjenja OD₆₅₀

Ugotovili smo, da lahko tudi z merjenjem OD₆₅₀ na poltrdnem gojišču sledimo rasti izbranega seva (PS-216-YFP, PS-216-RFP, PS-218-YFP, PS-218-RFP). Krivulje sledijo trendu rastne krivulje, vendar so začetne meritve že precej visoke in se razlikujejo glede na lokacijo znotraj luknjice (Slika 6). S prikazovanjem povprečnega OD₆₅₀ v luknjici v odvisnosti od časa dobimo rastno krivuljo, ki je precej bolj podobna rastni krivulji, tipični za zaprte sisteme tekočih kultur (Slika 7), se pa od nje delno razlikuje zaradi več dejavnikov. Predvidevamo, da na rezultate meritev OD₆₅₀ vpliva rahlo nagubana površina, ki nastane, ko vlijemo gojišče v mikrotitrskie luknjice. Robne točke v luknjici že pred začetkom rasti dosegajo višje vrednosti, kar je najverjetnejše posledica rahlo dvignjene površine gojišča na stiku gojišča s plastično površino.



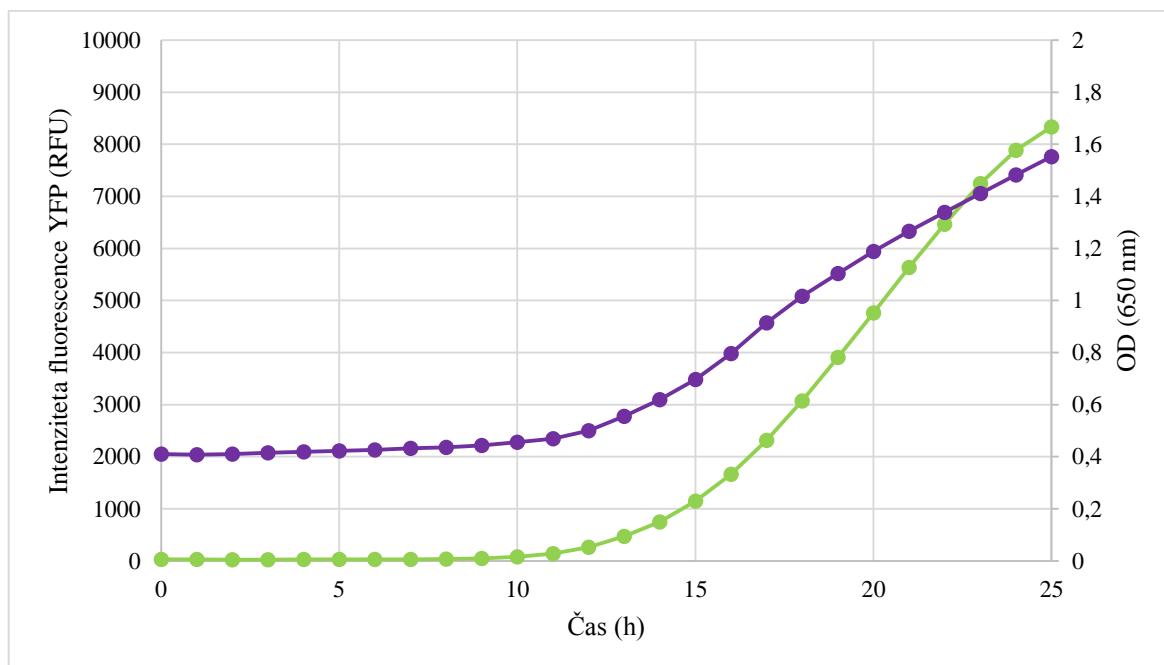
Slika 6: Prikaz meritev OD_{650} v odvisnosti od časa inokulacije za sev PS-216 YFP v eni luknjici v vseh merjenih točkah. Robne točke odstopajo od ostalih krivulj, ki večinoma sledijo trendu rastne krivulje. Včasih se zgodi (npr. točka 16 in 27), da začetna vrednost točk narste precej nad nivo kjer se meri OD_{650} . Na grafu je prikazana legenda obarvanosti posameznih točk znotraj ene luknjice glede na oddaljenost od sredine. Točke, ki so obarvane oranžno, so najblizuje sredini, točke, ki so obarvane rdeče, so najbolj oddaljene od sredine.



Slika 7: Prikaz povprečne vrednosti OD_{650} v eni luknjici mikrotitrsko ploščico v odvisnosti časa rasti oz. rojenja seva PS-216 YFP. Povprečja so bila izračunana iz podatkov, ki so prikazani na Sliki 6.

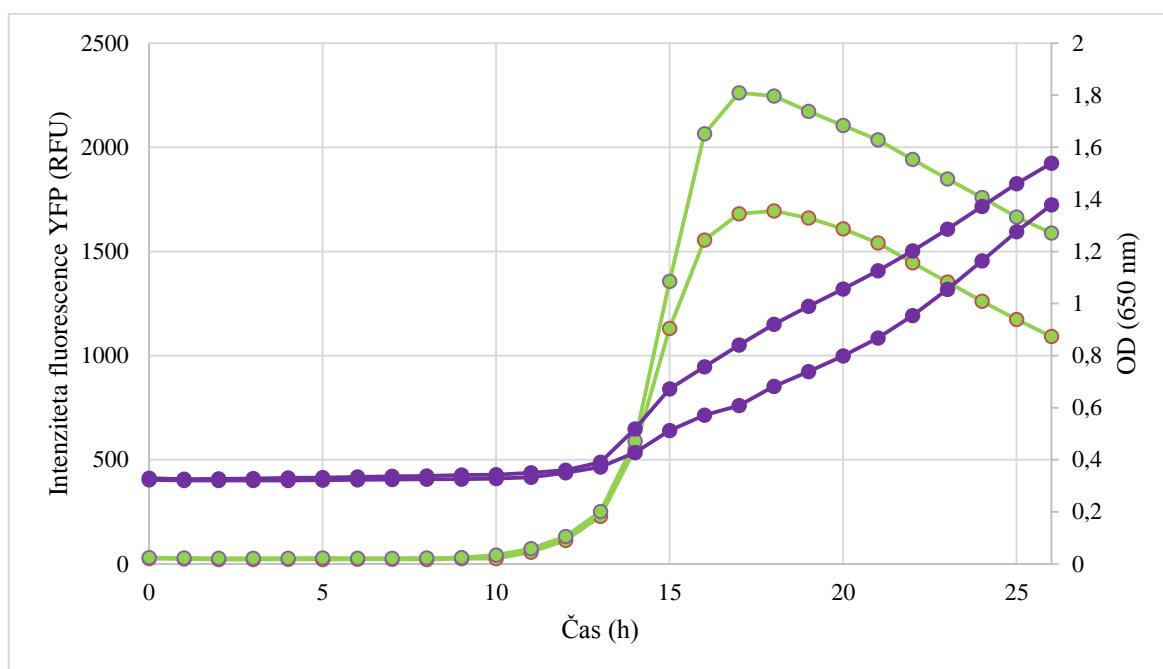
4.1.4 Sledenje izražanju genov tekom rojenja

V poskusih smo rast določali z merjenjem fluorescence proteina YFP, katerega gen se izraža konstitutivno. Zanimalo nas je, ali bo izražanje tega gena usklajeno z meritvami OD₆₅₀. Pokazali smo, da začneta OD₆₅₀ in fluorescensa simultano naraščati s časom in da preko merjenja izražanja fluorescentnih proteinov pod konstitutivnim promotorjem lahko sledimo rasti populacije (Slika 8). Vendar pa v območju naših meritev razmerje RFU/OD ni bilo konstantno.



Slika 8: Primerjava profila vrednosti OD₆₅₀ in intenzitete fluorescence tekom rojenja seva PS-216 YFP. Vijolična barva prikazuje povprečne vrednosti OD₆₅₀ v odvisnosti od časa. Zelena barva prikazuje povprečno intenziteto fluorescence, ki odraža nivo izražanja gena za fluorescentni protein YFP pod kontrolo konstitutivnega promotorja (PS-216 YFP).

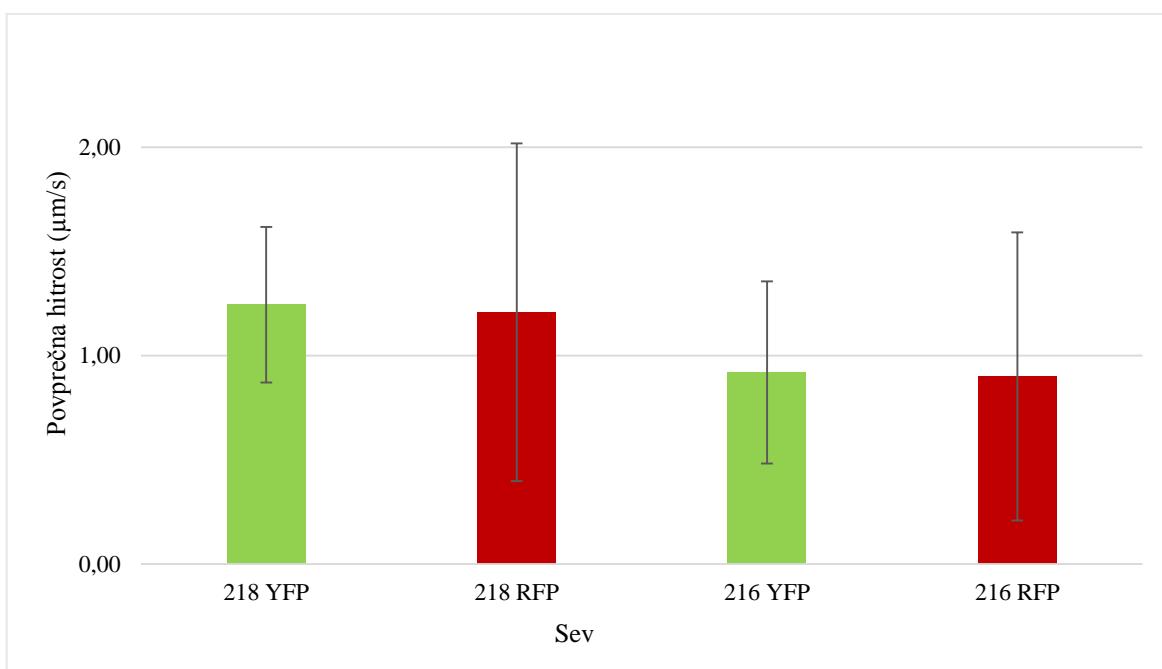
V naslednjem eksperimentu smo preverjali, ali lahko sledimo izražanju gena *hag*, ki nosi zapis za podenoto za izgradnjo bička in kdaj se ta začne izražati. Ugotovili smo, da izražanje bička preko poročevalskega proteina YFP lahko zaznamo (Slika 9), je pa intenziteta fluorescence nižja kot pri konstitutivnem promotorju (Slika 8). Rezultati nakazujejo, da se gen za biček začne sintetizirati že ob koncu faze prilagajanja rojenja, še preden se začne sev premikati navzven po površini. Glede na naše rezulata smo opazili, da ko celice prerastejo celotno površino plošče, se nivo prepisa gena *hag* zniža, kar nakazuje na nižjo sintezo komponent bička.



Slika 9: Sledenje izražanju gena za YFP brez lastnega promotorja, ki je pod promotorjem Phag (3610 amyE::Phag-yfp). Vijolična barva prikazuje povprečne vrednosti OD₆₅₀ v odvisnosti od časa. Zelena barva prikazuje povprečno intenziteto izražanja gena Phag – yfp. Na grafu sta vidni dve tehnični ponovitvi.

4.2 DOLOČANJE HITROSTI ROJENJA

Hitrost rojenja smo določili za vsak sev (PS-216-YFP, PS-216-RFP, PS-218-YFP, PS-218-RFP) posebej z merjenjem intenzitete fluorescence po točkah v luknjici mikrotitrsko ploščice (Slika 3). Na grafu smo odčitali minimalno intenziteto fluorescence, pri kateri lahko zaznamo dvig vsaj dveh krivulj, ki ne pripadata sredinski točki 44 v matriki. Ta je predstavljala mejno vrednost RFU, kjer se je sev že začel premikati oz. rasti. Preko znane razdalje med točkami meritev fluorescence in časa, potrebnega za premik seva med njimi, smo nato določili povprečne hitrosti rojenja (ugotovili smo, da se na ta način lahko enostavno in hitro določi okvirna hitrost rojenja). Pri testiranih pogojih je bila povprečna hitrost rojenja izbranih sevov (izračunana povprečna hitrost premikanja od sredinske do najbolj zunanje točke, v različnih smereh) okoli $1 \mu\text{m}/\text{s}$. Hitrosti gibanja enega seva med različnimi točkami so se med seboj precej razlikovale in so se gibale med $0,19 - 6,6 \mu\text{m}/\text{s}$ (Slika 10). Razpon hitrosti za posamezen sev smo navedli v Prilogi C.



Slika 10: Hitrost rojenja izbranih sevov. Hitrost smo določili preko merjenja intenzitete fluorescence po točkah v luknjici s pomočjo mikročitalca. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije (n=5).

4.3 OPTIMIZACIJA POSKUSA ZA PREVERJANJE KOMPETICIJE MED ROJI SEVOV *B. subtilis*

Da bi preverili kompeticijo med roji *sevov B. subtilis*, smo morali najprej doseči dobro ponovljivost poskusov in optimizirati določanje števila celic v mešanici sevov, ki jih nacepimo kot inokulum. Namesto celic v eksponentni fazi rasti smo kot inokulum uvedli spore, katerim smo že pred poskusom določili koncentracijo. Začetni poskusi rojenja z redčenimi sporami niso bili uspešni, zato smo morali protokol optimizirati. Spore smo najprej 5-krat skoncentrirali, kar je pospešilo začetek rasti in rojenja. Poleg tega smo izboljšali uspešnost poskusov s tem, da smo fiziološko raztopino, v kateri so bile shranjene na -20°C , zamenjali s svežim gojiščem LB. V nalogi smo prikazali reprezentativne rezultate, za vsak poskus pa smo imeli vsaj tri biološke biološke ponovitve in vsaj dve tehnični ponovitvi (Priloga A–C).

4.3.1 Vpliv vegetativnega stanja celic v inokulumu na potek rojenja (faza prilagajanja)

Da bi lahko pripravili izbrana razmerja sevov v mešanicah, smo morali najprej določiti približno število celic v kulturi. Koncentracijo celic v eksponentni fazi rasti smo določali preko merjenja OD₆₅₀, te pa smo nato izenačili z razredčevanjem. To izenačevanje je bilo zelo težavno in včasih dolgotrajno, zato smo se kasneje odločili za pripravo spor, ki smo jih uporabili kot inokulum za poskuse rojenja. Spore so v bolj sinhroniziranem stanju v

primerjavi z rastocimi celicami v tekoči kulturi, pred pričetkom poskusa pa smo tudi že imeli znano število celic (spor) v inokulumu, zato smo lažje in natančneje pripravili mešanice spor in tako povečali ponovljivost poskusov.

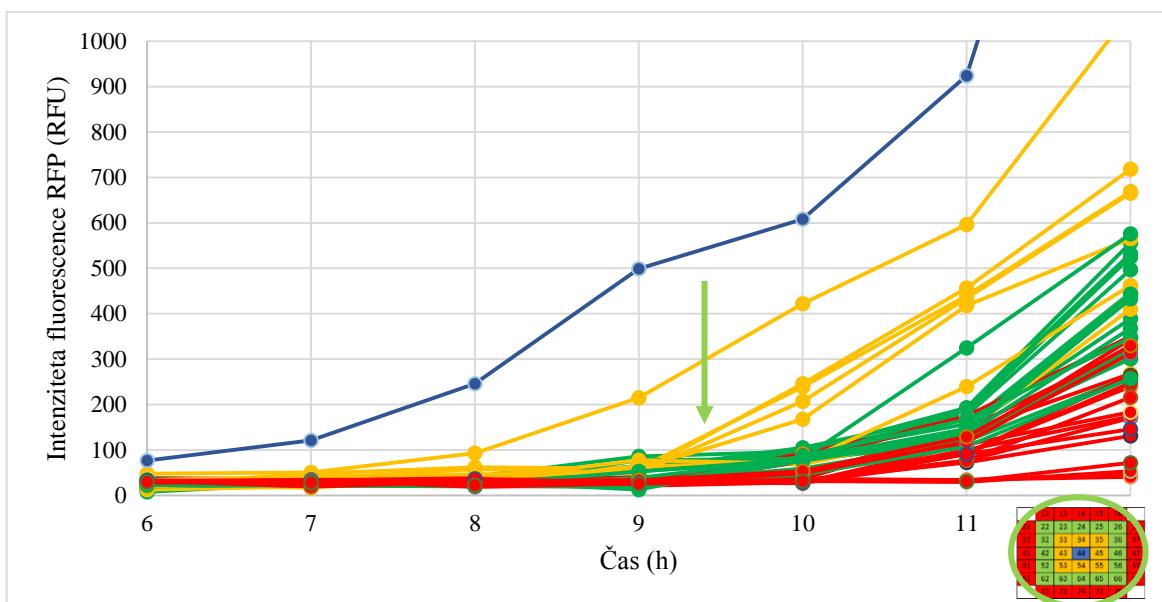
Na gojišče smo pri vseh poskusih nanesli po $2 \mu\text{l}$ kulture. Pri vsakem poskusu smo vzporedno preverjali CFU vseh sevov (Preglednica 7). Na gojišče smo v $2 \mu\text{l}$ kulture PS-216 YFP v eksponentni fazi nanesli na ploščo približno $5*10^6$ celic oz. zelo primerljivo število spor $8*10^6$.

Preglednica 7: Povprečne koncentracije celic in spor v inokulumu za poskuse kompeticije pri rojenju. Povprečne koncentracije celic in spor smo dobili tako, da smo zbrali podatke CFU od vseh bioloških in tehničnih ponovitev, ki smo jih naredili v sklopu poskusov, in za vsak posamezen sev preračunali povprečno vrednost CFU/ml in standardno deviacijo ($n=4$).

SEV	EKSPONENTNA FAZA		SPORE	
	CFU/ml	SD	CFU/ml	SD
PS-216 YFP	$2,5*10^9$	$9,5*10^8$	$4,3*10^9$	$1,9*10^9$
PS-216 RFP	$1,6*10^9$	$4,4*10^8$	$2,1*10^9$	$2,4*10^8$
PS-218 YFP	$1,9*10^9$	$6,5*10^8$	$1,9*10^9$	$3,6*10^8$
PS-218 RFP	$1,8*10^9$	$4,2*10^8$	$4*10^9$	$3,8*10^8$

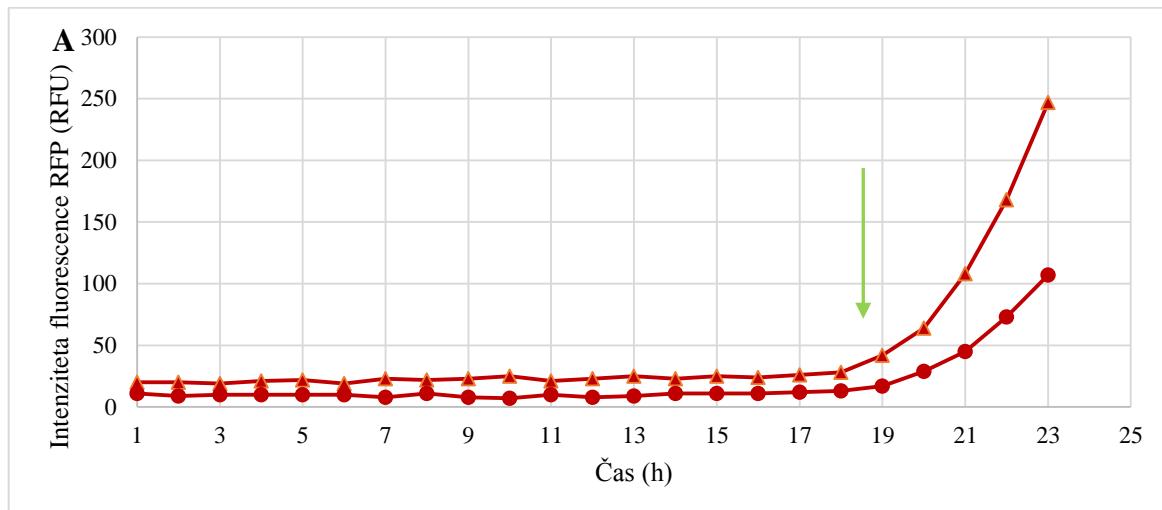
4.3.2 Določanje faze prilagajanja (lag faze) pri rojenju

Fazo prilagajanja smo določili na osnovi analize podatkov iz mikročitalca. Na grafu, ki prikazuje naraščanje intenzitete fluorescence po času v posameznih točkah ene luknjice (npr. Slika 3), smo odčitali minimalno intenzitetu fluorescence, pri kateri lahko zaznamo dvig vsaj dveh krivulj, ki ne pripadata sredinski točki 44 v matriki. Nato smo odčitali čas na različnih krivuljah (Slika 11). Kadar smo kot inokulum za rojenje uporabili celice, ki smo jih nacepili, ko so bile v eksponentni fazi rasti, je bila faza prilagajanja med 6–9 ur, včasih tudi nekoliko krajsa (Priloga A2). Dolžina faze prilagajanja nekoliko variira med biološkimi ponovitvami in med sevi. Kadar smo uporabili spore kot inokulum za test rojenja, je faza prilagajanja (po optimizaciji poskusa) trajala približno 8–10 ur (Priloga A1), kar je približno eno do dve uri več kot pri celicah v eksponentni fazi rasti in ravno tako nekoliko variira med sevi in biološkimi ponovitvami.



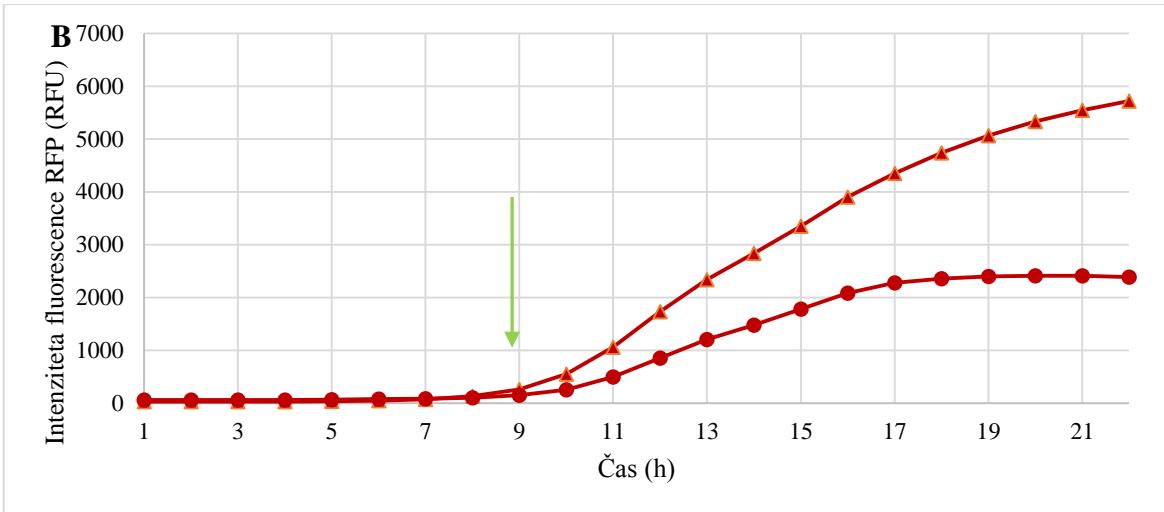
Slika 11: Faza prilagajanja pri rojenju, če nacepimo celice v eksponentni fazi rasti. Prikazan je reprezentativni poskus s sevom PS-216 RFP. Na grafu je prikazano naraščanje intenzitete fluorescence vseh točk v eni luknjiči po času in tako lahko sledimo rasti oz. rojenju seva in določimo trajanje faze prilagajanja. Fazo prilagajanja določimo tam, kjer zaznamo dvig vsaj dveh krivulj, ki ne pripadata sredinski točki 44 v matriki. S puščico je označen konec faze prilagajanja.

Dolžina faze prilagajanja je bila odvisna tudi od števila spor, ki smo jih nacepili na gojišče. Najprej smo poskusili nacepiti 100-krat redčene spore, saj smo pri poskusih na velikih ploščah ugotovili, da pri tej koncentraciji spor največkrat pride do segregacije in razvejanjih vzorcev. Na sliki 12A so prikazani rezultati meritev poskusa, kjer smo spore 100-krat redčili in določili fazo prilagajanja, ki je znašala okoli 19 ur. Nato smo neredčene spore 5-krat skoncentrirali (500x povečanje glede na prvi poskus) in s tem dosegli skrajšanje faze prilagajanja na približno 8–9 ur (Slika 12B).



Se nadaljuje

Nadaljevanje Slike 12



Slika 12: Faza prilagajanja pri rojenju, če nacepimo 100-krat redčene spore (A) in po 5-kratnem koncentriranju neredčenih spor (B). Grafa prikazujeta naraščanje povprečne intenzitete fluorescence sevov PS-216 RFP in PS-218 RFP. Faza prilagajanja se po koncentriranju spor zelo skrajša. S puščico je označen konec faze prilagajanja, povprečne vrednosti so prikazane zaradi lažje preglednosti, dolžina lag faze je bila odčitana iz rezultatov naraščanja fluorescence po točkah v posamezni luknjici, kot na sliki 11. Trikotniki predstavljajo sev PS-216 RFP, krogci pa sev PS-218 RFP.

4.4 PREVERJANJE KOMPETICIJE MED ROJI RAZLIČNIH ALI ENAKIH SEVOV

4.4.1 Preverjanje kompeticije s pomočjo mikročitalca

Pri poskusu smo vrednotili vpliv mešanja enakih ali različnih sevov *B. subtilis* v začetnem inokulumu na zasedanje površine z rojenjem. Zanimalo nas je, kaj se zgodi, če zmešamo dva različna in kaj če dva enaka seva, kateri sev bo prevladal na površini gojišča in s tem pokazal povečano teritorialnost oz. ali bosta seva tvorila skupni roj. Za te poskuse smo uporabili seve, ki so bili označeni s konstitutivno izraženimi fluorescentnimi proteini (YFP ali RFP-mKate).

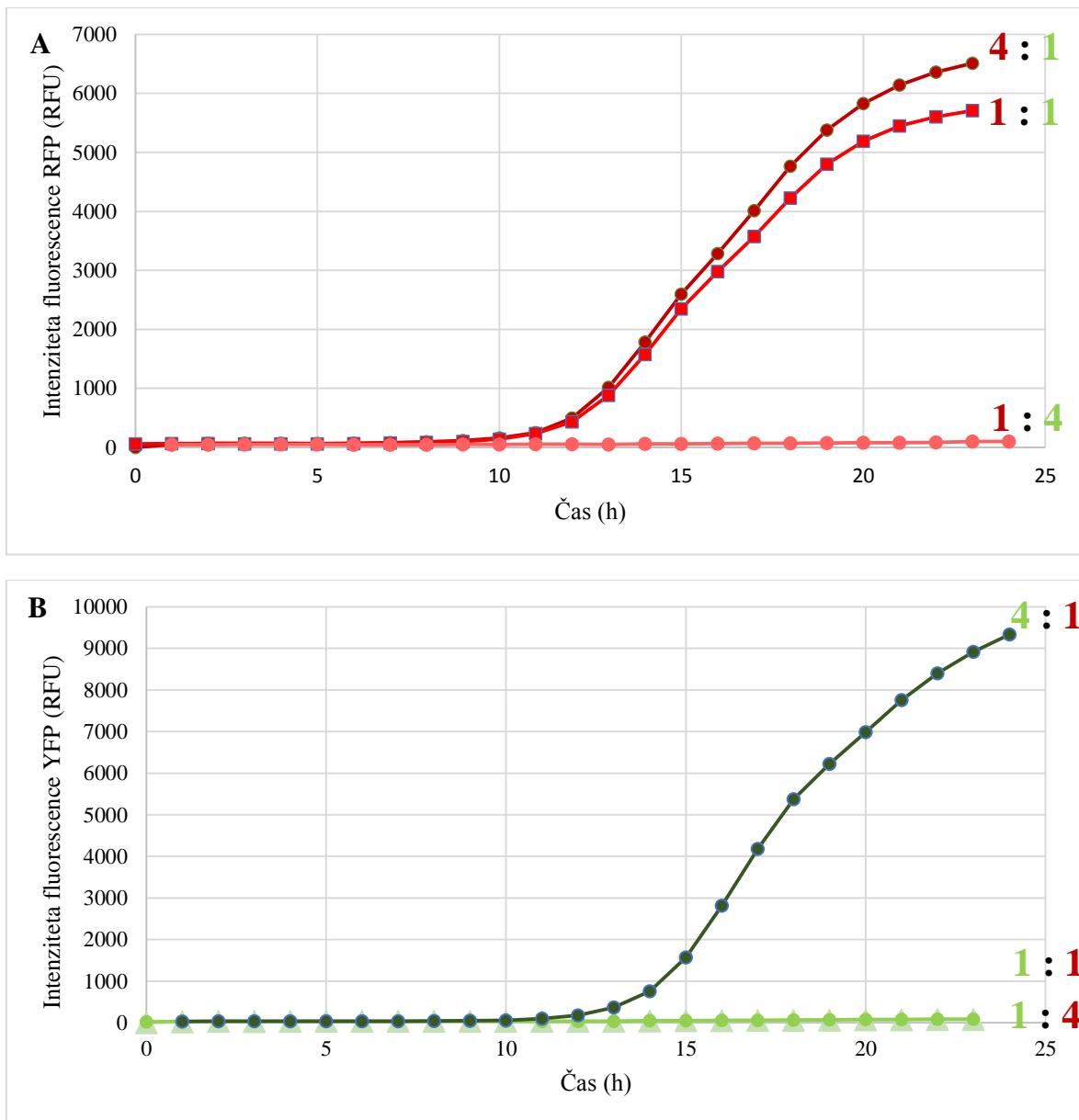
V mešanici različnih sevov smo opazili pojav teritorialnosti pri zasedanju površine. Ugotovili smo, da če zmešamo v inokulum spore dveh različnih sevov (npr. PS-216 YFP in PS-218 RFP), celotno površino agarja največkrat zasede samo en sev in pri tem drugega povsem izključi. Redko pa smo opazili zanimiv pojav prostorsko ločenega rojenja oba različnih sevov, kar smo poimenovali segregacija. Ko smo pripravili mešanice sevov v različnih razmerjih ($1 : 4$, $1 : 2$, $1 : 1$, $2 : 1$ in $4 : 1$), smo ugotovili, da že mala spremembra razmerja med sevi vpliva na izid kompeticije za površino agarja. Povzetek rezultatov vseh bioloških in tehničnih ponovitev poskusov kompeticije za površino med različnimi sevi v različnih razmerjih je prikazan na Sliki 13. Površino plošče je vedno zasedel sev, ki je bil v inokulumu številčno v prevladi. Torej je bilo začetno število celic v inokulumu pri testiranih pogojih najpomembnejši dejavnik, ki je vplival na uspešnost zasedanja površine (Slika 14).

Pri mešanici enakih sevov, označenih z različnimi fluorescentnimi proteini, sta površino vedno zasedla oba seva, pri čemer se začetno razmerje obeh sevov v inokulumu tudi po zasedanju površine približno ohranja (Slika 15 in Priloga C1).

Slika 13: Prisotnost sevov na plošči po testu kompeticije pri rojenju. Iz zgornjega dela preglednice je razvidno, da zmaga tisti sev, ki je že na začetku v prebitku. PS-218 YFP-zelena, PS-216 RFP-rdeča, segregacija-zelena in rdeča. V spodnjem delu tabele je prikazana prisotnost sevov z zamenjanimi fluorescentnimi proteini na plošči po kompeticiji. Barve v tabeli predstavljajo sev, ki je zmagal pri določenem poskusu. Kjer pa sta prisotni obe barvi, pa je prišlo do segregacije. Bela barva pmeni, da poskus ni bil opravljen. Iz preglednice je razvidno, da zmaga tisti sev, ki je že na začetku v prebitku. PS-216 YFP-zelena, PS-218 RFP-rdeča, segregacija-zelena in rdeča. Vsak prikazani pravokotnik predstavlja eno ponovitev poskusa, z odbeljeno črto pa so povezane tehnične ponovitve znatnoj ene biološke ponovitve.

Naredili smo tudi poskus z različnimi sevi z zamenjanimi fluorescentnimi proteini (da bi preverili morebitni vpliv proteina), sicer v manj ponovitvah (Slika 13). Tudi v tem primeru so bili rezultati podobni; segregacijo smo dobili le enkrat. Segregacija se je na ploščah z 12

luknjicami pojavljala zelo redko; v naših poskusih smo jo opazili dvakrat. V razmerju 1 : 1 je morda nekoliko večkrat prevladal sev, ki je bil označen s fluorescentnim proteinom RFP. Smo pa pri poskusu z mešanico sevov v razmerjih 1 : 2 in 2 : 1 (Slika 13) ugotovili, da že zelo majhna sprememba razmerja med sevi lahko vpliva na izid kompeticije za površino agarja.

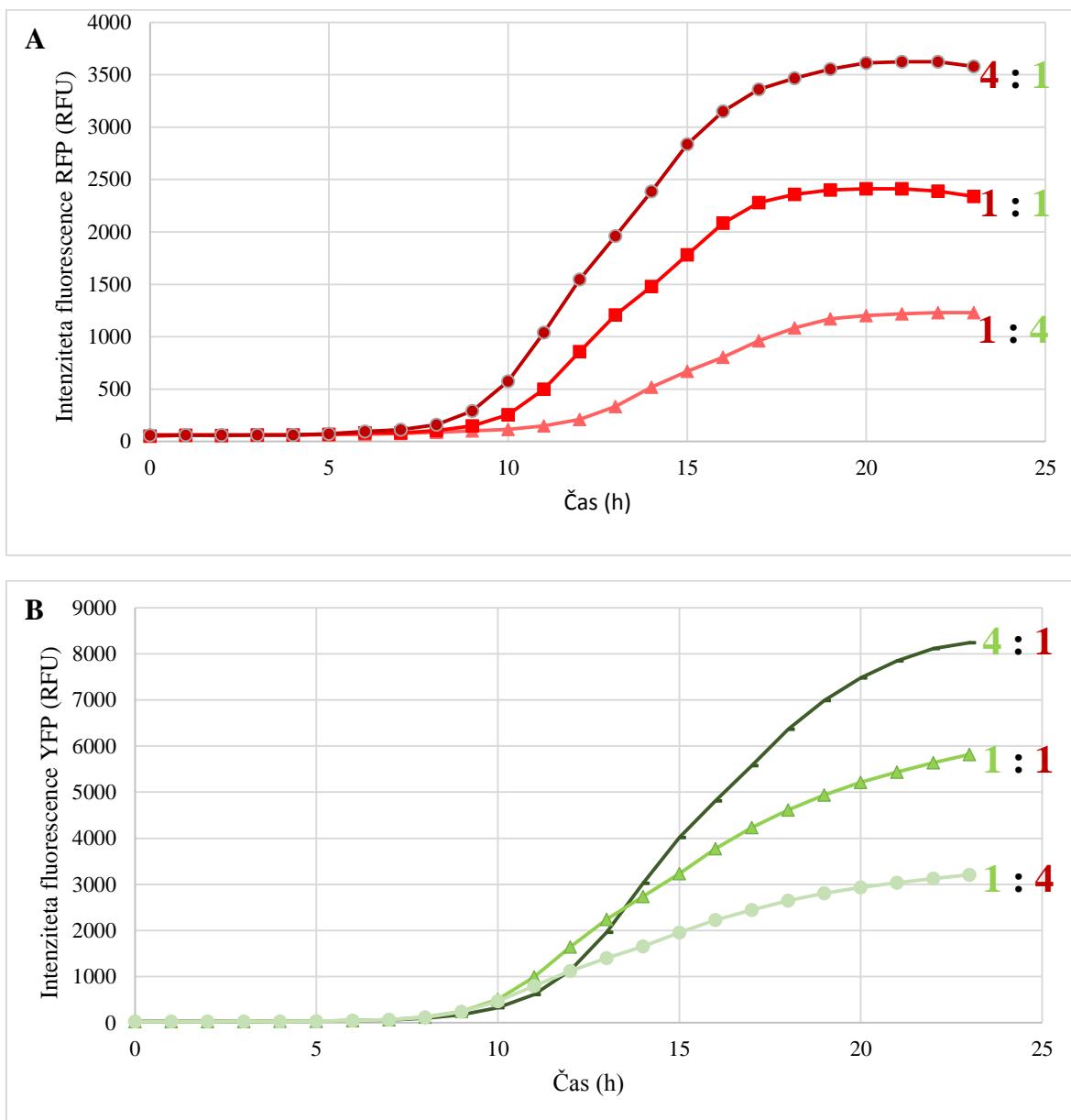


Slika 14: Rojenje mešanice različnih sevov PS-218 RFP (A) in PS-216 YFP (B) po površini agarskega gojišča na mikrotitrski plošči, prikazano kot povprečna intenziteta fluorescence v luknjici v odvisnosti od časa. Prikazan je reprezentativni poskus, kjer smo kot inokulum za test rojenja uporabili mešanico sevov **PS-218 RFP + PS-216 YFP** v razmerjih 4 : 1, 1 : 1 in 1 : 4. Graf (A) prikazuje rojenje seva **PS-218 RFP** pri treh različnih začetnih razmerjih spor v inokulumu, na grafu (B) pa je prikazano rojenje seva **PS-216 YFP** v istih razmerjih.

Se nadaljuje

Nadaljevanje Slike 14

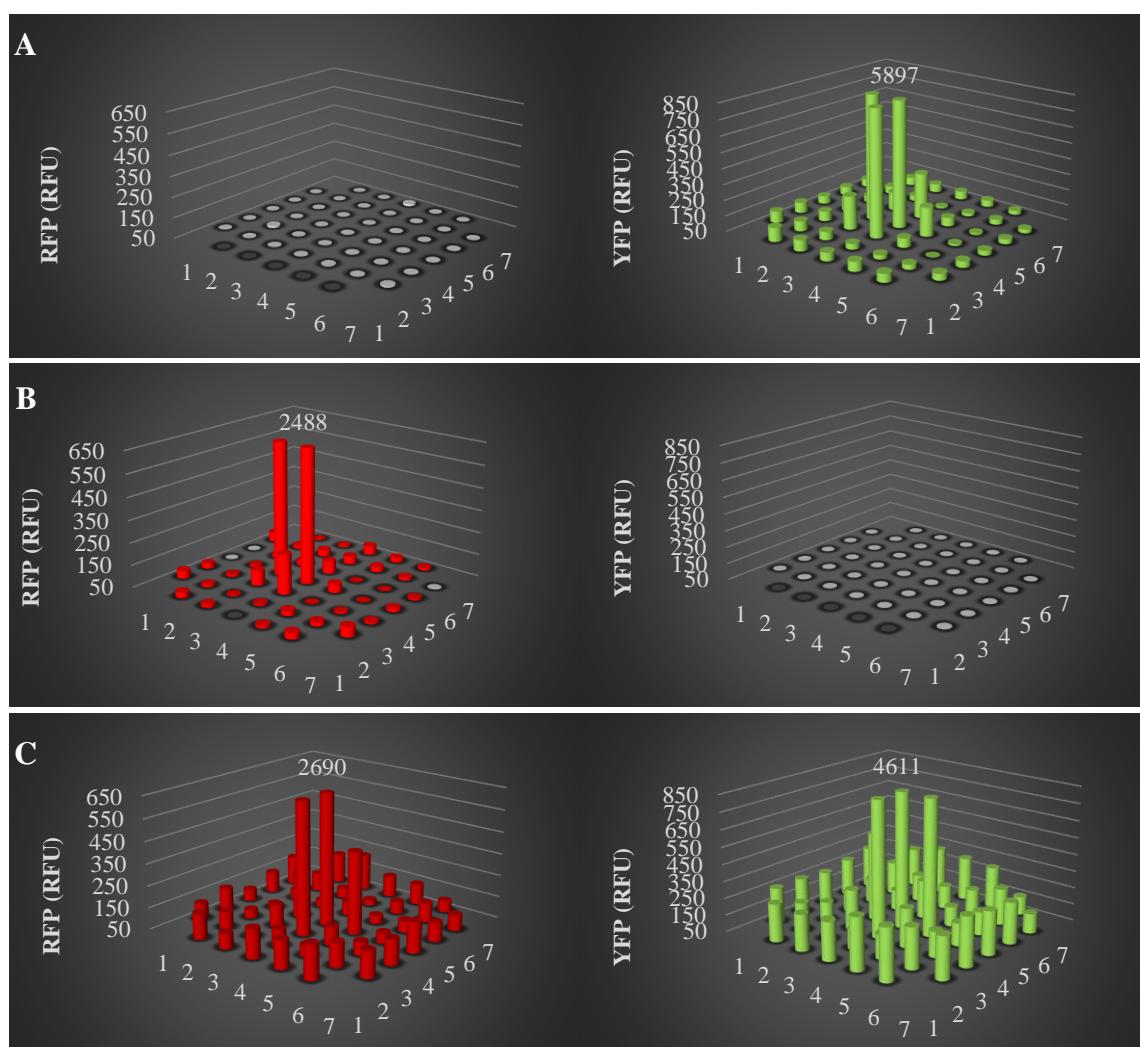
treh luknjicah z izbranimi razmerji med obema različnima sevoma v mešanici. Zelena barva v razmerju na grafu označuje, koliko je bilo seva PS-216 YFP, rdeče pa je označen sev PS-218 RFP.



Slika 15: Rojenje mešanice enakih (različno označenih) sevov PS-218 RFP (A) in PS-218 YFP (B) po površini agarskega gojišča na mikrotitrski plošči, prikazano kot povprečna intenziteta fluorescence v luknjici v odvisnosti od časa. Prikazan je reprezentativni poskus, kjer smo kot inkokulum za test rojenja uporabili mešanico sevov **PS-218 RFP + PS-218 YFP** v razmerjih 4 : 1, 1 : 1 in 1 : 4. Graf (A) prikazuje rojenje seva **PS-218 RFP** pri treh različnih začetnih razmerjih spor v inkokulumu, na grafu (B) pa je prikazano rojenje seva **PS-218 YFP** v istih treh luknjicah z izbranimi razmerji med obema sevoma v mešanici. Zelena barva v razmerju na grafu označuje, koliko je bilo seva PS-216 YFP, rdeče pa je označen sev PS-218 RFP.

4.4.2 Pojav podaljšane faze prilagajanja pri rojenju v mešanici različnih sevov

Pri poskusih z mešanico različnih sevov (v razmerju 1 : 1), ki smo jih inokulirali v eksponentni fazi rasti, smo v primerjavi z mešanicami enakih sevov opazili časovni zamik v začetku razširjanja po plošči (Slika 16). Zamik smo opazovali pri izbranem času, kjer smo pričakovali konec faze prilagajanja oz. začetek premikanja po plošči (v poskusu prikazanem na Sliki 16 je bilo to 11 ur). Če sledimo mešanicam enakih sevov z različnimi markerji, zrasteta oba približno enako in se razširita po površini (Slika 16 C), če pa pogledamo mešanicu različnih sevov z različnimi fluorescentnimi markerji pri istem času (Slika 16 A in B), vidimo, da en sev sploh ne raste (na Sliki 16 A je to sev PS-216 RFP, na 16 B pa sev PS-216 YFP), drugi sev, ki pa prevlada in začne zavzemati celotno površino, pa v enakem času še ne uspe zavzeti enako velike površine, kot jo zavzame, če je v mešanici z enakim sevom.



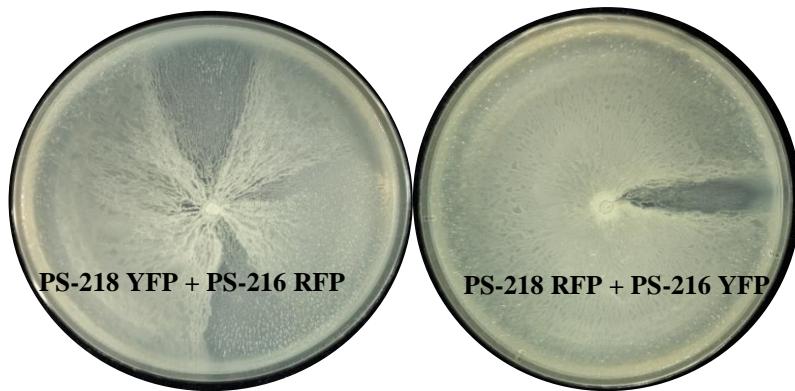
Slika 16: Ugotavljanje prisotnosti časovnega zamika začetka rojenja v mešanici različnih sevov. Prikazano je rojenje po 11 urah inkubacije v luknjicah pri različnih mešanicah sevov, ki so bile nacepljene v eksponentni fazi rasti. Prostorsko je prikazana intenziteta fluorescence poročevalskih proteinov, ki izraža rast mešanice različnih sevov PS-216 RFP + PS-218 YFP (A) ali mešanice različnih sevov PS-216 YFP + PS-218 RFP (B). Na sliki (C) je prostorsko prikazana rast mešanice enakih sevov PS-218 YFP + PS-218 RFP. Slika (C) je kontrola slik (A) in (B). Na sliki (C) oba enaka seva zrasteta in se nadaljuje

Nadaljevanje Slike 16

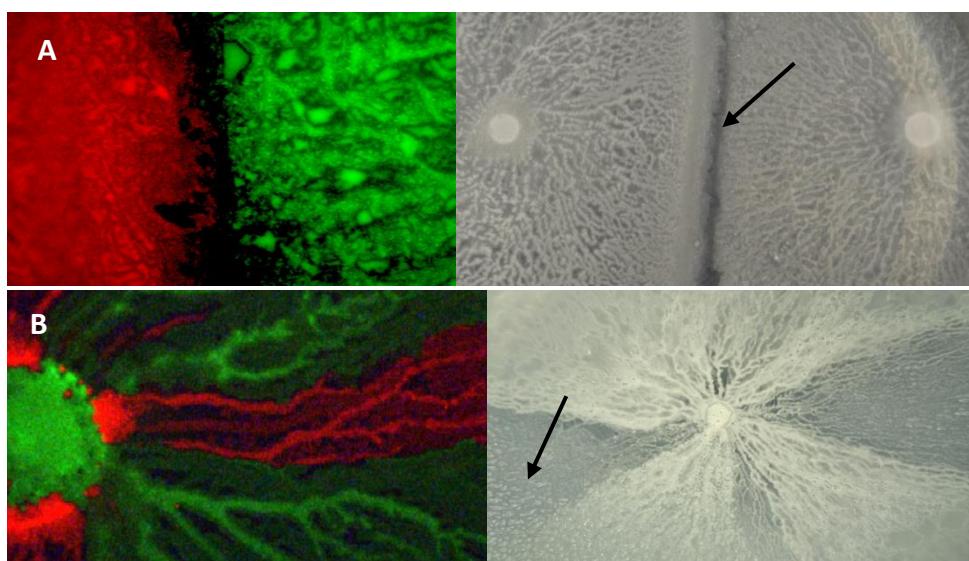
širita po površini, na sliki (A) pa imamo mešanico različnih sevov. V tem poskusu PS-216 RFP sploh ni zrastel, saj je zmagal PS-218 YFP, ki pa v istem času kot na sliki (C) ni uspel zavzeti enako velike površine, čeprav je bila nacepljena enaka količina celic iz istega inokuluma. Na sliki (B) je prikazan poskus, ki smo ga izvedli z zamenjanimi fluorescentnimi proteini. Rezultat je zelo podoben, tudi tukaj je prevladal sev PS-218 in ravno tako je prisoten zamik v začetku rojenja. Za boljši prikaz začetka rojenja smo z-os moralni prilagoditi, zato so na slikah prikazane max vrednosti intenzitete fluorescence.

4.4.3 Ugotavljanje kompeticije med sevi pri rojenju na večjih ploščah

Podobno kot pri poskusih na mikrotitrskih ploščah smo kombinacije sevov PS-218 RFP – PS-218 YFP, PS-216 RFP – PS-216 YFP, PS-216 RFP – PS-218 YFP in PS-216 YFP – PS-218 RFP, vendar le v razmerju števila celic 1 : 1, po 2 µl nacepili na sredino večje plošče premera 70 mm, ki so vsebovale 15 ml B-gojišča (Slika 17). Pri poskusu smo kot inokulum za test rojenja uporabili celice iz eksponentne faze rasti ali spore. Pod fluorescentno lupo smo opazovali zrasle plošče pri dveh različnih filtrih: za m-Cherry (oz. za protein mKate) in za YFP (Slika 18).



Slika 17: Segregacija različnih sevov na agarskih ploščah. Na plošče smo dali inokulum celic iz eksponentne faze rasti.



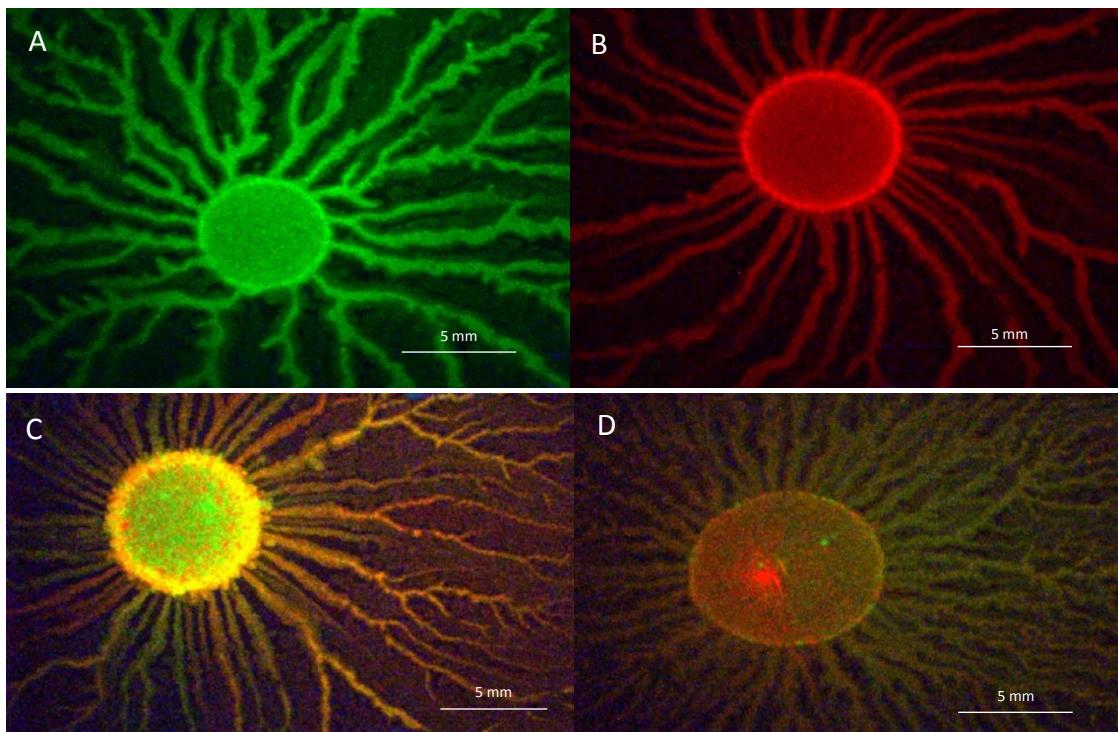
Slika 18: Prikaz prostorskega ločevanja sevov PS-216 YFP in PS-218 RFP, posnetih pod fluorescentno lupo (na levu) ali poslikano s fotoaparatom (na desnu). Slika (A) prikazuje frontalni stik sevov 216 YFP in 218 RFP, ki sta bila nacepljena

Se nadaljuje

Nadaljevanje Slike 18

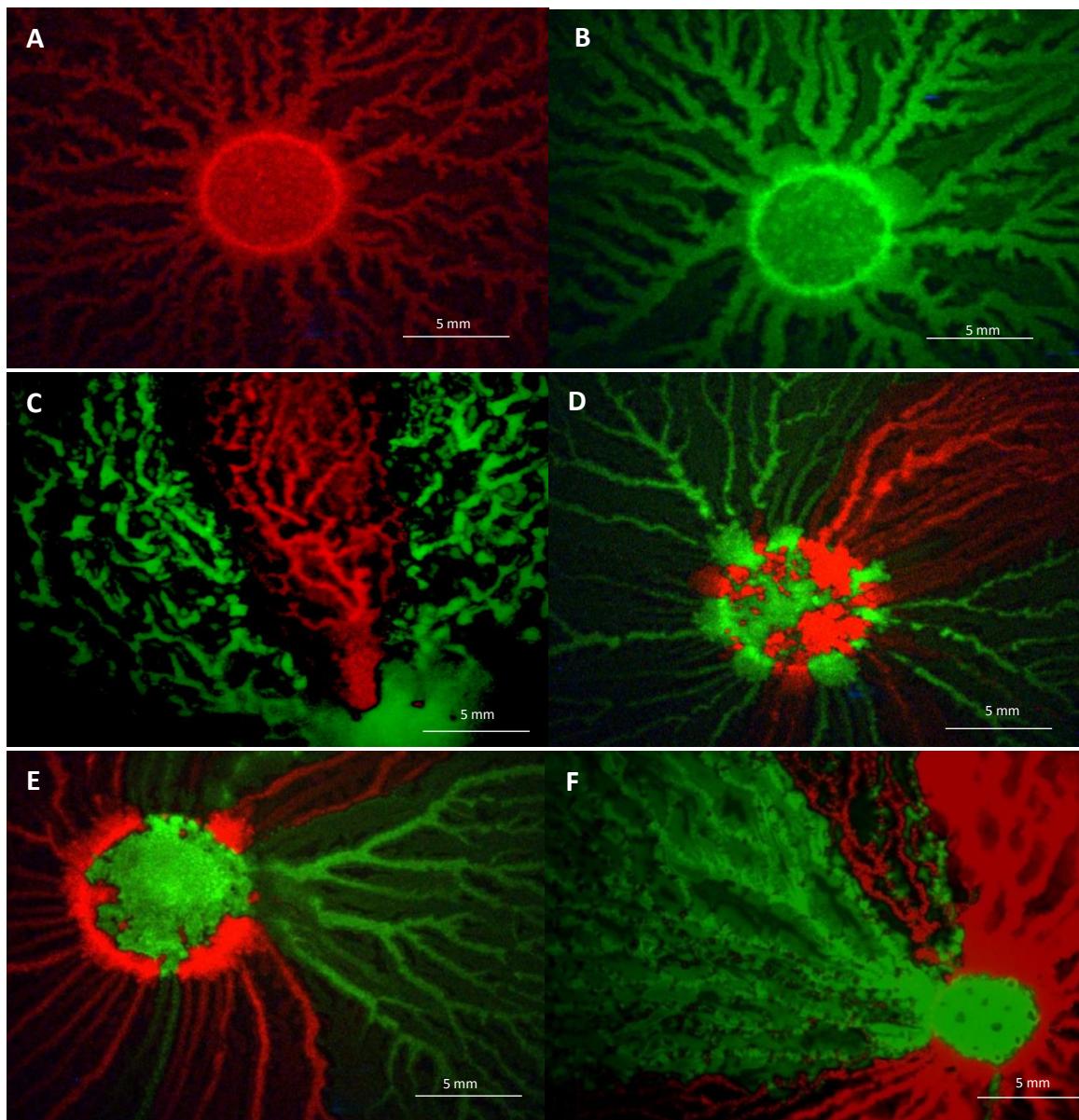
kot monokulturi vsak na svojo stran plošče. Ob stiku nastane s prostim očesom lepo vidna linija označena s puščico. Na sliki (B) je prikazana mešanica sevov 216 YFP + 218 RFP, inkulirana na sredino plošče, seva se prostorsko ločita, vendar linija med njima ni izrazita (puščica).

Poskus s celicami iz eksponentne faze smo ponovili petkrat z vsaj dvema tehničnima ponovitvama. Ugotovili smo, da će nacepimo mešanico enakih sevov, označenih z različnimi fluorescentnimi proteinoma, po plošči vedno skupaj rojita oba seva in tvorita skupen roj. Če smo nacepili mešanico različnih sevov, smo večkrat opazili prostorsko ločeno rojenje obeh sevov po plošči – segregacijo, ki je vidna na plošči kot kraki (Slika 17, 18 B). V slabi polovici primerov pa je celotno površino zasedel en sam sev. Nikoli nismo opazili, da bi bila na povsem isti lokaciji prisotna oba različna seva, kar so pokazale sestavljene slike, pridobljene s fluorescentno lupo pod dvema različnima filtroma. Pri kombinaciji sevov PS-216 YFP – PS-218 RFP je dvakrat zmagal PS-216 YFP, trikrat PS-218 RFP, sedemkrat pa se je pojavila segregacija. Pri kombinaciji sevov PS-216 RFP – PS-218 YFP je dvakrat zmagal PS-216 RFP, šestkrat pa se je pojavila segregacija (Priloga C2). Na Sliki 18 so prikazani različni stiki, ki nastanejo pri različnih testih kompeticije oz. teritorialnosti pri rojenju dveh različnih sevov: če nacepimo vsak sev na svojo stran plošče, med njima nastane močno opazna linija (Slika 18 A), ko pa nacepimo mešanico sevov na sredino agarja, lahko zmagata eden izmed sevov ali pa se pojavi segregacija – različni sevi so še vedno prostorsko ločeni, a je linija med njimi zabrisana (Slika 18 B).



Slika 19: Roji fluorescentno označenih sevov. Na slikah (A) in (B) sta prikazana samostojna seva PS-218 YFP in PS-218 RFP, na sliki (C) je prikazana mešanica enakih sevov PS-218 YFP + PS-218 RFP, na sliki (D) pa mešanica enakih sevov PS-216 YFP + PS-216 RFP. Poslikano s fluorescentno lupo pri 8-kratni povečavi.

Na Slikah 19 A in 19 B sta prikazana roja posameznih sevov (na prvi PS-218 YFP in na drugi PS-218 RFP). Na Sliki 19 C smo na ploščo nanesli mešanico enakih sevov, ki sintetizirata ali YFP ali RFP in roj poslikali pod obema filtroma (mCherry in YFP). Sliki smo združili v programu ImageJ. Roj je oranžno obarvan, kar pomeni, da sta oba seva prisotna ter da celice obeh sevov ostajajo skupaj in si delijo površino. Ko pa smo združili slike različnih sevov, smo opazili, da se na plošči pojavi le en sev iz kombinacije (Slika 20 A, B), ki zmaga, ali pa se pojavi segregacija (Slika 20 C, D, E, F).



Slika 20: Roji mešanic različnih sevov, označeni z različnimi fluorescentnimi proteini. Na sliki (A) je mešanica sevov PS-216 RFP + PS-218 YFP, (B) PS-216 YFP + PS-218 RFP, (C) PS-216 RFP + PS-218 YFP, (D) PS-216 RFP + PS-218 YFP, (E) PS-216 YFP + PS-218 RFP, (F) PS-216 YFP + PS-218RFP. Na slikah (A) in (B) je prevladal samo en sev iz kombinacije, drugi sev sploh ni zrastel. Na slikah (C–F) je prikazana segregacija. Poslikano s fluorescentno lupo pri 8-kratni povečavi.

5 DISKUSIJA

5.1 RAZVOJ METODE

V magistrskem delu smo razvili metodo za sledenje rasti in rojenja bakterije *Bacillus subtilis* na poltrdnem gojišču s pomočjo fluorimetrije. Fluorescentni mikročitalec nam omogoča površinsko skeniranje fluorescentno označenih celic na površini agariziranega gojišča v posamezni luknjici plošče. Površinski rasti pa lahko sledimo tudi s pomočjo merjenja optične gostote, za kar pa ni potrebno, da so celice fluorescentne. Metoda z uporabo fluorescentnega mikročitalca je zelo zanimiva, ker nam omogoča časovno spremeljanje rojenja določenega seva (posamezno ali v mešanici z drugimi sevi). Omogoča tudi zaznavanje rasti seva v prostoru oz. na določeni točki merjene površine. S pomočjo oblike rastnih krivulj oz. glede na to, kdaj se je začela fluorescencija višati, smo določili minimalno fluorescenco. Ta je predstavljala začetek rasti seva na določeni poziciji površine agariziranega gojišča.

Pri vzpostavljanju metode smo veliko časa posvetili optimizaciji preprečevanja izsušitve gojišča na mikrotitrski plošči. Rojenje bakterije *B. subtilis* je omejeno na gojišče z 0,7–1 % agarjem in je odvisno od običkanosti bakterije (Kearns in Losick, 2003; Julkowska in sod., 2005; Hamze in sod., 2009) ter sinteze surfaktina (Kearns in Losick, 2003; Julkowska in sod., 2004, 2005). Vsebnost vode v gojišču je ključni dejavnik: premalo vode upočasni rojenje, preveč vode pa omogoča plavanje bakterij, kar pa ni primerljivo z rojenjem (Patrick in Kearns, 2009; Kearns, 2010). Pri izvajanju poskusov z rojenjem moramo zato zelo paziti na vlažnost gojišča, in sicer naj bi bila relativna vlažnost v zraku pri rojenju bakterije *B. subtilis* na gojišču B med 60–70 % (Hamze in sod., 2009). V naših poskusih nismo merili vlažnosti, smo pa gojili seve v 70 mm petrijevkah v zaprtih posodah z dodano vlažno brisačko, tako smo vzdrževali vlažnost, ki naj bi bila glede na že prej opravljene meritve okoli 70 %. Pri poskusih z mikročitalcem pa smo eksperimentalno ugotovili, da sevi najbolje rojijo pri 3 ml gojišča na luknjico dimenzijs 22,1 mm, pri čemer je treba mikrotitrsko ploščo oviti z medicinskim trakom, da preprečimo izhlapevanje. Če se je luknjica posušila, smo to zaznali z mikročitalcem, saj je sev ostal v mali koloniji na sredini luknjice in ni prišlo do rojenja po celotni površini. To smo zaznali tudi s prostim očesom, zato smo pred analizo podatkov vsako mikrotitrsko ploščo pregledali. Mutante, ki niso sposobne rojenja, ostanejo v zelo majhni koloniji.

Še posebej zahtevni del razvoja metode pa je bil poiskati in optimizirati ustrezni grafični prikaz ogromnega števila podatkov, ki smo jih dobili v okviru ene eksperimentalne ponovitve rojenja. Podatke smo prikazovali na tri različne načine. Najprej smo prikazovali podatke meritev v vseh površinskih točkah ene luknjice na mikrotitrski plošči v odvisnosti od časa rasti. Pomanjkljivosti tega prikazovanja so bile, da se je na grafu pojavilo 45 krivulj in so zato bili podatki zelo nepregledni, hkrati pa je bilo težavno razbrati rezultate (Slika 3).

Naše podatke smo predstavili tudi prostorsko. S tem načinom prikazovanja smo lahko ocenili uro začetka rasti sevov in njihovo lokacijo na površini (Slika 4). S pomočjo te analize smo lahko prikazali, da pri nacepljanju mešanice dveh različnih sevov pride do podaljšanja faze prilagajanja, kar kaže na to, da med sevi verjetno poteka kompeticija. Slabost takega prikazovanja podatkov je bila dolgotrajnost analize, kar bi bilo potrebno optimizirati z dodatnimi koraki, ki bi jih avtomatizirali s pomočjo računalniških programov.

Kot tretji način smo prikazali le povprečne vrednosti intenzitete fluorescence v luknjici po času in tako zelo zmanjšali število podatkov za analizo (Slika 5). Prikazovanje in rezultate kompetičskih eksperimentov smo lahko precej hitreje odčitali, vendar pa smo s prikazovanjem povprečij izgubili nekatere informacije. Preko tega prikazovanja ne moremo določiti, kdaj sev začne rojiti, saj intenziteta fluorescence v sredinski luknjici, kamor nacepimo sev, znatno zvišuje povprečje. Povečevanje fluorescence na tem mestu ne predstavlja rojenja, ki je vezano na premikanje seva po plošči, temveč predvsem rast celic na mestu nacepitve.

Pri vseh prikazih je bilo potrebno prilagoditi višino z-osi, če smo želeli opazovati bolj specifične stvari, kot so začetek premikanja po plošči in maksimalne vrednosti, ki še ne pomenijo rasti oz. premikanja sevov.

V študiji so Keymer in sod. (2008) preučevali populacijsko dinamiko tekmovanja in prednosti rasti v stacionarni fazi med divjim tipom in mutanto bakterije *E. coli* s pomočjo epifluorescentne mikroskopije. V seve *E. coli* so vstavili fluorescentna proteina RFP ali YFP protein. Vsak sev so gojili posamično v tekočem gojišču LB pri 24 °C. Nato so tekoče kulture zmešali v razmerju 50 : 50. Podatke so prikazovali z rastnimi krivuljami kot povprečno intenziteto fluorescenc, kjer je bila intenziteta fluorescence RFP ali YFP, tako v kontrolnem kot v kompetičskem eksperimentu. To jim je omogočilo, da razlika v intenziteti kromoforjev ni vplivala na analizo. V kompetičskih poskusih so tudi z obratnimi markerji pokazali, da je izzid odvisen le od alelov *rpoS* in ne od fluorescentnih proteinov.

Sledenje rasti seva s pomočjo fluorescence je lažje v tekočih gojiščih, saj je kultura bolj homogena. Zanimalo nas je, ali bomo lahko sledili rasti na poltrdnem gojišču, saj so pogoji in način razraščanja celic drugačni. Glede na meritve fluorescence na poltrdnem gojišču, ki je s časom naraščala zelo podobno, kot če bi zasledovali rast v tekočem gojišču, smo zaključili, da lahko preko meritve intenzitete fluorescence, površinsko po luknjici sledimo rojenju izbranih sevov. Ugotovili smo tudi, da meritve OD₆₅₀ med rojenjem seva s časom naraščajo zelo podobno – v obliki rastne krivulje, vendar so bile začetne vrednosti včasih že precej visoke in odvisne od lokacije, kjer je bila meritev v luknjici izvedena. Glede na naše rezultate je torej sledenje rojenju z OD₆₅₀ manj primerno kot sledenje s fluorescenco. Določitev časa začetka rojenja po plošči je bila preko obeh meritve primerljiva: ko se začne povečevati OD₆₅₀, se začne istočasno povečevati tudi fluorescensa. Razmerje RFU/OD v

območju naših meritev ni bilo konstantno, kar pomeni, da povezava med izmerjeno intenziteto fluorescence in optično gostoto OD₆₅₀ ni linearja, zato bi bila normalizacija podatkov glede na število celic nekoliko problematična.

Faza prilagoditve je obdobje prilagajanja celic na nove razmere. Pri rojenju je to čas, ko se bakterije prilagajajo na prenos iz tekočega na poltrdno gojišče. V tem času se celice delijo in fiziološko spreminjajo v roječe celice, ki se nato začnejo širiti po površini. Eden izmed pogojev, da celice lahko zapustijo fazo prilagajanja, je hiperobičkanost. Celice, ki so jim umetno povečali sintezo bičkov, niso vstopile v fazo prilagajanja (Kearns, 2010). V študiji sta Kearns in Losick (2003) ugotovila, da je za rojenje potreben gen za flagelin (*hag*), ki nosi zapis za biosintezo bička. Na podlagi teh podatkov smo predvidevali, da se biček začne izražati, preden celice začnejo rojiti – torej še v fazi prilagajanja. V naših raziskavah nas je zanimalo, ali lahko sledimo izražanju gena *hag* za sintezo bička in kdaj se ta začne izražati glede na rast oz. rojenje celic. Ugotovili smo, da izražanje bička lahko zaznamo, saj se glede na izmerjeno intenziteto fluorescence relativno močno izraža (Slika 9). Rezultati skladno z našimi predvidevanji nakazujejo, da se gen za biček začne sintetizirati že ob koncu faze prilagajanja rojenja, še preden se začne sev premikati navzven po površini. Ko celice prerastejo celotno površino plošče, se biček glede na naše rezultate najverjetneje več ne producira. S to metodo smo želeli ugotoviti, ali se gen za biček dovolj izraža, da to lahko zaznamo s pomočjo naše metode (fluorescentni mikročitalec), in približno določiti čas začetka povečanega izražanja glede na začetek rasti oz. rojenja.

V magistrskem delu smo tudi določili hitrost rojenja za izbrane konstitutivno fluorescentno označene seve (PS-216-YFP, PS-216-RFP, PS-218-YFP, PS-218-RFP) preko rezultatov meritev intenzitete fluorescence po točkah v luknjici. Povprečna hitrost rojenja izbranih sevov je bila okoli 1 µm/s, vendar so se hitrosti gibanja enega seva med sabo precej razlikovale in so se gibale med 0,19 in 6,6 µm/s. Razlike v trenutni hitrosti sta zaznala tudi Kearns in Losick (2003) v svoji študiji, kjer so določili, da je hitrost širjenja radija roja bakterije *B. subtilis* med 2,7 in 3,8 µm/s, kar je primerljivo z našimi meritvami. Določali smo hitrost premikanja zunanjega roba roja proti robu luknjice, nismo pa merili trenutne hitrosti posameznih celic ali skupkov celic, saj bi lahko to izmerili le pod mikroskopom (Jong in sod., 2011). Bakterijski bički pri rojenju koordinirajo gibanje skupin celic po površini trdnih gojišč (Henrichsen, 1972). Bakterijske vrste so znane po tem, da se razlikujejo v številu, lokaciji in organizaciji bičkov, vendar pa biološko pomembnost teh razlik slabo razumemo. Rojenje je ena izmed lastnosti, pri kateri je število bičkov zelo pomembno (Patrick in Kearns, 2012), zato domnevamo, da do razlik v trenutni hitrosti rojev lahko pride, ker je rojenje zelo neenakomerno premikanje po agarski površini, saj se roji premikajo intervalno in lahko tudi različno hitro v različne smeri. Darton in sod. so leta 2010 preučevali rojenje bakterije *E. coli*. S fazno kontrastno mikroskopijo so posneli premikanje sedmih rojev pri 30 °C in opazovali, kako hitro bakterija roji. Ugotovili so, da znaša približna hitrost širjenja zunanjega roba bakterije 3,8 µm/s, kar je primerljivo z našimi rezultati. V

precej starejši raziskavi (Henrichsen, 1972) so hitrost bakterij merili s Carl Zeissovim fotomikroskopom s fazno kontrastno opremo. V članku so zelo nazorno opisali razliko hitrosti med posameznimi celičnimi rafti in razširjanjem prednjega dela roja. Ugotovili so, da hitrosti variirajo med sevi. Povprečna hitrost premikanja zunanjega roba roja je pri *P. mirabilis* znašala $1,25 \mu\text{m/s}$, pri *C. tetani* $0,8 \mu\text{m/s}$ in pri *B. alvei* $0,3 \mu\text{m/s}$, medtem ko so bile hitrosti premikanja posameznih celičnih raftov precej višje (okoli $1\text{--}11 \mu\text{m/s}$).

5.2 KOMPETICIJA MED RAZLIČNIMI SEVI V MEŠANI KULTURI ZA KOLONIZACIJO POVRŠINE

V drugem delu magistrskega dela smo preučevali, ali bo med rojenjem prišlo do kompeticije med različnimi sevi. Predvidevali smo, da bo v roju prevladal uspešnejši sev. Pred izvajanjem poskusov za preverjanje kompeticije smo morali najprej optimizirati protokol, doseči dobro ponovljivost poskusov in optimizirati določanje števila celic v mešanici sevov, ki smo jih nacepili kot inokulum za poskuse rojenja. Za poskuse preverjanja kompeticije med sevi pa smo namesto celic v eksponentni fazi uvedli spore, saj so spore v bolj sinhroniziranem stanju in tako smo pred začetkom poskusa že imeli znano število celic (spor) v inokulumu, zato smo lažje in natančneje pripravili mešanice spor in tako povečali ponovljivost poskusov. Na gojišče smo pri vseh poskusih nanesli po $2 \mu\text{l}$ kulture (približno 10^6 celic) in vzporedno preverjali CFU vseh sevov.

Kompeticijo smo preverjali na mikrotitrskih ploščah s pomočjo fluorescentnega mikročitalca, ki nam omogoča časovno sledenje in kvantifikacijo podatkov, ima pa manjšo resolucijo v primerjavi s fluorescentno lupo. Končno stanje po kompeticiji med rojenjem mešanice sevov na velikih 70-mm ploščah smo preverjali s pomočjo fluorescentne lupe, ki je hitrejša metoda in ima večjo ločljivost, zato dobimo lepše slike, precej težje pa je časovno sledenje in pregledovanje oz. prikazivanje celotne površine plošče.

5.2.1 Fenomen prostorskega izključevanja

V študiji so Gibbs in sod. (2008) pri bakteriji *P. mirabilis* ugotovili, da so za zlitje pomembni produkti genov *idsB*, *idsC*, *idsD*, *idsE* in *idsF*, saj so sevi, ki so imeli delečijo v teh genih, tvorili dienesovo linijo z divjim tipom. Leta 2013 so Wenren in sod. ugotovili, da sta poleg operona *ids* v prepoznavanje sevov *P. mirabilis* vključena še lokusa *ldr* in *tss*. Lyons in sod. (2016) poročajo, da celice *B. subtilis* uporabljajo kombinatorni sistem za identifikacijo 'kin' sevov, ta sistem vključuje proteine CDI, celične površinske molekule in mobilne elemente, kot so bakteriofagi.

Gestel in sod. (2014) so preučevali interakcije med lokalizacijo (prostorsko oblikovani vzorci) in sodelovanjem pri kompleksno oblikovani in površinsko pritrjeni koloniji *B. subtilis*. Eksperimentalno in z matematičnim modeliranjem so pokazali, da gostota celic

vpliva na vzorce formacij med rastjo biofilma. Pri nizkih stopnjah celične gostote se pojavlja močna prostorska lokalizacija med sevi, ko pa je začetna celična gostota visoka, pa ne pride do prostorske segregacije. Stefanic in sod. (2015) pa so preučevali interakcije med roječimi bakterijami, pri čemer so testirali seve pri kolonizaciji rastlinskih korenin. Ugotovili so, da se pri enakih sevih pojavi vzorec sobivanja dveh istih sevov, pri različnih sevih pa so opazili, da korenino zasede večinsko en sam sev.

V naših raziskavah smo prišli do podobnega zaključka kot Stefanic in sod. (2015): zmešali smo dva različna seva v razmerjih 1 : 1, 1 : 4 in 4 : 1 in ju inokulirali na sredino plošče. Kjer smo inokulirali dva enaka seva, označena z različnimi fluorescentnimi proteini, sta vedno sobivala in sta tvorila skupen roj (kar je bilo razvidno iz slik, pridobljenih z lupo). Pri opazovanju dveh različnih sevov (PS-216 in PS-218) pa je površino plošče vedno zasedel sev, ki je bil v inokulumu številčno v prevladi. Ti rezultati nakazujejo, da sta izbrana seva (PS-216 in PS-218) precej enakovredna glede hitrosti rasti in hitrosti kolonizacije, saj je v poskusih bil najpomembnejši dejavnik, ki je vplival na uspešnost zasedanja površine, začetno razmerje v inokulumu. Te ugotovitve ne moremo posplošiti na vse kombinacije različnih sevov, saj bi morali preizkusiti več kombinacij. Na podlagi naših podatkov o številu celic v vzorcu smo sklepali, da ne moremo pripraviti dovolj natančnih mešanic v razmerju 1 : 1, zato smo se odločili, da preverimo več različnih razmerij. Zanimalo nas je, kako majhna sprememba v razmerju sevov že povzroči spremembo v uspešnosti pri zasedanju površine. Ugotovili smo, da že zelo mala sprememba razmerja (iz 1 : 2 na 2 : 1) med sevi vpliva na izid kompeticije za površino agarja, kar pa je že na meji napake CFU.

Podobno, kot so opazili na koreninah, smo tudi mi na ploščah opazili, da se pri segregaciji niso pojavile očitne linije na stiku sevov. Segregacija se je večkrat pojavila pri poskusu s celicami iz eksponentne faze (okoli 60 %), kot če uporabimo spore kot inokulum (okoli 40 %). Frekvenca segregacij je tudi nižja na mikrotitrski plošči (okoli 35 %) kot na agarskem gojišču velike plošče. Predvidevamo, da že v nacepljeni mešanici sevov na sredini plošče poteka prepoznavanje oz. antagonistične interakcije med različnimi sevi. Torej, če sta zmešana dva 'kin' seva, se celice prepozna, se povežejo in rojijo v skupini ena zraven druge, takšno formacijo pa so poimenovali rafti (Kearns in Losick, 2003; Young in sod., 1999; Copeland in sod., 2010). Formacija v obliki raftov je dinamična: celice, ki so zajete v raftu, se premikajo s skupino, celica, ki se izgubi iz rafta, hitro postane negibljiva (Kearns, 2010). Če sta zmešana dva 'non-kin' seva, se ta ne prepoznata oz. celice zaznajo, da nista 'kin', posledica tega pa je, da se ne morejo povezati v skupine in premakniti skupaj po plošči. Predvidevamo, da se že v kapljici inokuluma začneta boriti, in če en sev sploh ne doseže roba kapljice, potem »zmagovalec« zavzame celotno površino. Če pa se oba seva uspeta prebiti do roba inokulirane kapljice, in če je dovolj celic vsakega seva na kupu, lahko vsak zavzame svoj del plošče in tako dobimo segregacijo. To smo opazili pod lupo: na mestu inokulirane kapljice sta bila prisotna oba seva, vendar sta bila ob koncu inkubacije že na mestu inokulacije prostorsko ločena. Ko se razraščata po plošči, sta seva sicer prostorsko

ločena, vendar pa ob stiku ne zaznamo tako močne linije, kot je linija med roji monokultur oz. je linija zabrisana. Sevi se v obeh primerih aktivno premikajo, vendar se pri opazovanju rojenja monokultur sevi srečajo frontalno, pri segregaciji pa si vsak svoj prostor izbori že na začetku, zato potujejo vsak v svojo smer.

5.2.2 Pojav podaljšane faze prilagajanja pri rojenju v mešanici različnih sevov

Pri poskusih sledenja kompeticije mešanice dveh različnih sevov (PS-216 in PS-218) v razmerju 1 : 1, ki smo jih inokulirali v eksponentni fazi rasti, smo v primerjavi z mešanicami enakih sevov opazili pojav podaljšane faze prilagajanja. Ta podatek lahko nakazuje na to, da se seva v mešanici »borita« za prevlado in to jima lahko podaljša fazo prilagajanja. Pri *B. subtilis* je faza prilaganja na rojenje slabo razumljena, vendar pa pojavljanje faze pomeni, da morajo plavalne celice skozi več sprememb, da lahko začnejo rojiti.

5.3 POVEZAVA ROJENJA IN KOLONIZACIJE RASTLIN

Pri bakterijah, ki so povezane z rastlinami, lahko sposobnost rojenja igra pomembno vlogo pri kolonizaciji notranjosti in površine rastlin, pri formaciji biofilmov in pri virulentni in zaščitni funkciji (Xu et al., 2012). Rastlinske površine so habitati za kompleksno in konkurenčno mikrobioto. Površina korenine in okoliška rizosfera sta pomembna vira ogljika, ki se proizvaja v rastlini (Compant et al., 2005). Vzdolž površine korenine tudi obstajajo niše, polne različnih hranil, ki pritegnejo veliko raznolikih mikroorganizmov, vključno s fitopatogeni (Nelson et al., 2004). Tekmovanje za hranilne niše je temeljni mehanizem, s katerim lahko biološki kontrolni agensi (določene bakterije) zaščitijo rastlino pred fitopatogeni. Tako lahko površinska gibljivost zagotavlja konkurenčno prednost roječim bakterijam, ki kolonizirajo podobno hranilno nišo na rastlini pred invazivnimi bakterijskimi populacijami tako, da jih prestrežejo ali ubijejo oz. se z njimi združijo (Venieraki in sod., 2016).

Za naša raziskovanja o določanju kompeticije med sevi bi lahko bili rezultati, pridobljeni z lupo, dovolj. Vendar pa nam je fluorescentni mikročitalec omogočil, da smo lahko poteku eksperimenta sledili časovno in tako določili fazo prilagajanja pri rojenju, sledili izražanju gena za biček ter detektirali pojav podaljšne faze prilagajanja. V nadaljnjih raziskavah bi lahko to metodo še izboljšali in se posvetili raziskovanju različnih faktorjev, ki vplivajo na fazo prilagajanja, saj je o tem, kaj se dogaja v fazi prilagajanja, le malo znanega.

6 SKLEPI

- V vseh merjenih točkah na površini agarja ene luknjice se je intenziteta fluorescence sevov, ki konstitutivno sintetizirajo fluorescentne proteine, povečevala s časom v obliki krivulj, ki spominjajo na rastne krivulje za tekoče zaprte kulture. Na podlagi tega sklepamo, da lahko preko fluorescence sledimo rasti in rojenju seva.
- Hitrost premikanja zunanjega roba roja je bila okoli $1 \mu\text{m/s}$ in je primerljiva pri vseh testiranih sevih.
- Če pri kompeticijskih testih zmešamo dva enaka seva, bosta skupaj zasedla površino – na istem mestu smo detektirali oba seva hkrati, ki najverjetneje tvorita skupen roj.
- Če pri kompeticijskih testih zmešamo dva različna seva, pride do prostorskega izključevanja med sevi: ali površino zasede en sam sev ali pa pride do segregacije, to je prostorsko ločenega rojenja obeh sevov po površini gojišča.
- Uspešnost seva pri zasedanju površine je bila odvisna od začetnega števila celic v mešanici sevov.
- V mešanici dveh različnih sevov, nacepljenih v eksponentni fazi rasti v razmerju $1 : 1$, smo v primerjavi z mešanico enakih sevov opazili pojav podaljšane faze prilagajanja, kar je najverjetneje posledica antagonističnih interakcij med sevi v inokulumu.
- Ko je prišlo do segregacije med različnimi sevi, na stiku med sevi nismo opazili tako izrazite mejne linije kot pri frontalnem stiku rojev dveh različnih sevov v monokulturah.

7 POVZETEK

Rojenje bakterij je z bički usmerjeno skupinsko premikanje po površini (Whipps, 2011) in primer kooperativne oblike vedenja, saj je odvisno od zunajceličnega surfaktanta in proteaze (Connelly, 2004; Kearns, 2010). Roječe bakterije tvorijo od gojišča odvisne vzorce in tako lahko opazimo, npr. konfluentno rast, rast z različnimi tipi razvejanosti ali rast v obliki koncentričnih krogov (Julkowska in sod., 2004). Bakterije uporabljajo rojenje kot obliko preživetja v okoljih z nizko vsebnostjo hrani in v prostorsko strukturiranih okoljih, kot je rizosfera, kjer so rastlinski izločki vir hrane (Whipps, 2011). Pri inokuliranju vzorca bakterij na agarsko gojišče opazimo fazo prilagajanja pred začetkom rojenja, katere dolžina je odvisna od koncentracije celic v inokulumu (Kearns in Losick, 2003), vendar pa je faza prilagajanja slabo raziskana (Kearns, 2010).

V pričujoči magistrski nalogi smo pozornost namenili sorodstveni diskriminaciji, ki omogoča, da posamezna bakterija lahko razlikuje sorodne seve od nesorodnih (Stefanic in sod., 2015) in kako je le ta povezana s teritorialnostjo. Teritorialnost je lastnost številnih bioloških vrst in je mehanizem, ki omogoča zavzemanje habitata in z njim povezanih ekoloških niš (Burt, 1943; Strassman, 2011).

Cilj te magistrske naloge je bil razviti metodo, ki nam s pomočjo fluorescentnega mikročitalca omogoča površinsko in časovno sledenje rojenju bakterij po površini agarja v posamezni luknjici mikrotitrsko plošče. Metoda je zanimiva zato, ker smo lahko časovno spremljali rojenje določenega seva (posamezno ali v mešanici), zaznavanje širjenja (teritorialnosti) fluorescentno označenega seva po površini ter posledično vrednotili tip vedenja (sobivanje-kooperacija-kompeticija) med genetsko različnimi oz. enakimi populacijami bakterij. Z uporabo vpeljane metode smo lahko relativno enostavno določili hitrost premikanja zunanjega roba roja, ki je znašala približno $1 \mu\text{m}/\text{s}$. Poleg fluorescentnega mikročitalca smo za vrednotenje teritorialnosti uporabili tudi fluorescentno lupo. Ugotovili smo, da če zmešamo dva enaka seva (ang. kin), bosta skupaj zasedla površino ter tvorila skupni roj, če pa zmešamo dva različna seva (ang. non-kin), pride do prostorskega izključevanja med sevi. V naših poskusih je bila uspešnost zasedanja površine predvsem odvisna od začetnega števila celic v inokulumu. Pri mešanju dveh različnih sevov smo opazili tudi pojav prostorskega ločevanja sevov oz. segregacije. Rezultati kažejo na to, da pri prostorski segregaciji med različnimi sevi, na stiku med sevi ni mogoče zaslediti tako očitne linije kot pri stiku rojev dveh sevov v monokulturah, vendar do mešanja ni prišlo. Opazili smo tudi, da med interakcijami različnih sevov pride do pojava podaljšane faze prilagajanja pri rojenju, kar lahko nakazuje na to, da se seva v mešanici »borita« za prevlado, kar je najverjetneje posledica antagonističnih interakcij med sevi v inokulumu.

V nadaljnjih raziskavah bi lahko novo metodo s fluorescentnim mikročitalcem še izboljšali in se posvetili raziskovanju različnih faktorjev, ki vplivajo na fazo prilagajanja, saj je o tem,

kaj se dogaja v fazì prilagajanja, le malo znanega. Pridobljene rezultate o kompeticiji in sodelovanju pa bi lahko aplicirali na rastline pri preučevanju kolonizacije koreninskih sistemov.

8 VIRI

- Adams J. C. 2001. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 1: 25–51
- Aoki S. K., Pamma R., Hernday A. D., Bickham J. E., Braaten B. A., Low D. A. 2005. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, 309, 5738: 1245–1248
- Bais H. P., Fall R., Vivanco J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134: 307–319
- Bhatta H., Goldys E. M., Learmonth R. P. 2006. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 1: 121–126
- Briffa M. 2010. Territoriality and aggression. *Nature Education Knowledge*, 1, 8: 19
- Burt W. H. 1943. Territoriality and home range concepts as applied to mammals. *Journal of Mammalogy*, 24, 3: 346–352
- Caiazza N. C. Shanks, R. M. O'Toole G. A. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187: 7351–7361
- Chen Y., Cao S., Chai Y., Clardy J., Kolter R., Guo, J. H., Losick R. 2012. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology*, 85, 3: 418–430
- Chevance F. F. V. Hughes K. T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Review Microbiology*, 6: 455–465
- Chudakov D. M., Lukyanov S., Lukyanov K. A. 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends in Biotechnology*, 23, 12: 605–613
- Compani S., Duff y B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951–4959

- Connelly M. B., Young G. M., Sloma A. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186, 13: 4159–4167
- Copeland M. F., Flickinger S. T., Tuson H. H., Weibel D. B. 2010. Studying the dynamics of flagella in multicellular communities of *Escherichia coli* by using biarsenical dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 1241–1250
- Cosmina P., Rodriguez F., Ferra F., Grandi G., Perego M., Venema G., Sinderen D. 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 8, 5: 821–831
- Crowley P. H., Davis H. M., Ensminger A. L., Fuselier L. C., Kasi Jackson J., Nicholas McLetchie D. 2005. A general model of local competition for space. *Ecology Letters*, 8, 2: 176–188
- Darnton N. C., Turner L., Rojevsky S., Berg H. C. 2010. Dynamics of bacterial swarming. *Biophysical Journal*, 98, 10: 2082–2090
- de Jong I. G., Beilharz K., Kuipers O. P., Veening J. W. 2011. Live cell imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using automated time-lapse microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 53: e3145–e3145, doi: 10.3791/3145: 6 str.
- Dienes G. J., Klemm H. F. 1946. Theory and application of the parallel plate plastometer. *Journal of Applied Physics*, 17, 6: 458–471
- Diggle S., Griffin A., Campbell G., West S. (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450: 411–414
- Drummen G. P. 2012. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques—illuminating biological and biomedical research. *Molecules*, 17, 12: 14067–14090
- Dudley S. A., File A. L. 2007. Kin recognition in an annual plant. *Biology Letters*, 3, 4: 435–438
- Foster K. R., Wenseleers, Ratnieks F. L. W. 2005. Kin selection is the key to altruism. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 2: 57–60
- Fraser G. M. Hughes C. 1999. Swarming motility. *Current Opinion Microbiology*, 2: 630–635

- Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Beecher D. J., Gominet M., Lereclus D., Wong A. C. L., Senesi S. 2002. Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 23: 6424–6433
- Gherardi F., Daniels W. H. 2004. Agonism and shelter competition between invasive and indigenous crayfish species. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 12: 1923–1932
- Gibbs K. A., Greenberg E. P. 2010. Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression. *Chemical Reviews*, 111, 1: 188–194
- Gibbs K. A., Urbanowski M. L., Greenberg E. P. 2008. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science*, 321, 5886: 256–259
- Gilbert O. M., Foster K. R., Mehdiabadi N. J., Strassmann J. E., Queller D. C. 2007. High relatedness maintains multicellular cooperation in a social amoeba by controlling cheater mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 21: 8913–8917
- Griesbeck O., Baird G. S., Campbell R. E., Zacharias D. A., Tsien R. Y. 2001. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein mechanism and applications. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31: 29188–29194
- Griffin A. S., West S. A., Buckling A. 2004. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature*, 430, 7003: 1024–1027
- Gurskaya N. G., Fradkov A. F., Terskikh A., Matz M. V., Labas Y. A., Martynov V. I., Yanushevich Y. G., Lukyanov K. A., Lukyanov S. A. 2001. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Letters*, 507, 1: 16–20.
- Hamilton W. D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 1: 17–52
- Hamze K., Julkowska D., Autret S., Hinc K., Nagorska K., Sekowska A., Holland I. B., Séror S. J. 2009. Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for phrC. *Microbiology*, 155, 2: 398–412
- Harrison, G. A. 1982. Human territoriality. Survey of behavioural territories in man with preliminary analysis and discussion of meaning. Berlin, Walter de Gruyter: 346 str.
- Harshey R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57, 1: 249–273

Harshey R. M., Matsuyama T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 18: 8631–8635

Harshey R.M., Partridge J.D. 2015. Shelter in a Swarm. *Journal of Molecular Biology*, 427, 23: 3683–94

Heger Z., Zitka O., Fohlerova Z., Merlos Rodrigo M. A., Hubalek J., Kizek R., Adam V. 2015. Use of green fluorescent proteins for in vitro biosensing. *Chemical Papers*, 69, 1: 54–61

Henrichsen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews*, 36, 4: 478

Holldobler B., Lumsden C. J. 1980. Territorial strategies in ants. *Science*, 210, 4471: 732–739

Hauser G. 1885. Ueber Fäulnissbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie. Ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze. Leipzig, Verlag F.C.W. Vogel: 94 str. https://www.forgottenbooks.com/en/readbook/UberFaulnissbakterienundDerenBeziehungenzurSepticamie_10332867#0 (1. sept. 2016)

Jakubovics N. S. 2010. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. *Molecular Oral Microbiology*, 25: 4–14

Julkowska D., Obuchowski M., Holland I. B., Séror S. J. 2004. Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology*, 150, 6: 1839–1849

Julkowska D., Obuchowski M., Holland I. B., Séror S. J. 2005. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *Journal of Bacteriology*, 187, 1: 65–76

Kearns D. B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 9: 634–644

Kearns D. B., Losick R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49, 3: 581–590

- Kearns D. B., Losick R. 2005. Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 19: 3083–3094
- Kentner D., Sourjik V. 2010. Use of fluorescence microscopy to study intracellular signaling in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 64: 373–390
- Keymer J. E., Galajda P., Lambert G., Liao D., Austin R. H. 2008. Computation of mutual fitness by competing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 51: 20269–20273
- Köhler T., Curty L. K., Barja F., Van Delden C., PecheRe J. C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182, 21: 5990–5996
- Köhler T., Curty L. K., Barja F., Van Delden C., PecheRe J. C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182, 21: 5990–5996
- Lloyd D. P., Allen R. J. 2015. Competition for space during bacterial colonization of a surface. *Journal of The Royal Society Interface*, 12, 110: 20150608, doi: 10.1098/rsif.2015.0608: 15 str.
- Long T., Tu K. C., Wang Y., Mehta P., Ong N. P., Bassler B. L., Wingreen N. S. 2009. Quantifying the integration of quorum-sensing signals with single-cell resolution. *PLoS Biology*, 7, 3: e1000068, doi: 10.1371/journal.pbio.1000068: 10 str.
- Lyons N. A., Kraigher B., Stefanic P., Mandic-Mulec I., Kolter R. 2016. A combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis*. *Current Biology*, 26, 6: 733–742
- Macfarlane S., Hopkins M. J., Macfarlane G. T. 2001. Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infect Immun*, 69: 1120–1126
- Merino S., Shaw J. G., Tomás J. M. 2006. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiology Letters*, 263: 127–135
- Nelson E.B. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 271–309

- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9, 4: 1084–1090
- Patrick J. E., Kearns D. B. 2009. Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *Journal of Bacteriology*, 191, 22: 7129–7133
- Piatkevich K. D., Verkhusha V. V. 2011. Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods in Cell Biology*, 102: 431
- Piston D. W., Patterson G. H., Claxton N. S. 2015. Introduction to Fluorescent Proteins. <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html> (20. jul. 2016)
- Pletnev S., Shcherbo D., Chudakov D. M., Pletneva N., Merzlyak E. M., Wlodawer A., Dauter A., Pletnev V. 2008. A crystallographic study of bright far-red fluorescent protein mKate reveals pH-induced cis-trans isomerization of the chromophore. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 43: 28980–28987
- Powers M. J., Sanabria-Valentín E., Bowers A. A., Shank E. A. 2015. Inhibition of Cell Differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas* protegens. *Journal of Bacteriology*, 197, 13: 2129–2138
- Rudrappa T., Czymbek K. J., Pare P. W., Bais H. P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148: 1547–1556
- Senesi S., Celadroni F., Salvetti S., Beecher D. J., Wong A. C., Ghelardi E. 2002. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a fliY mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, 148, 6: 1785–1794
- Shaner N. C., Campbell R. E., Steinbach P. A., Giepmans B. N., Palmer A. E., Tsien R. Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22, 12: 1567–1572
- Shaner N. C., Patterson G. H., Davidson M. W. 2007. Advances in fluorescent protein technology. *Journal of Cell Science*, 120, 24: 4247–4260
- Shcherbo D., Murphy C. S., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Chepurnykh T. V., Shcheglov A. S., Murphy C. S., Verkhusha V. V., Pletnev V. Z., Hazelwood K. L., Roche P. M., Zaraisky A. G., Davidson M. W., Chudakov D., Lukyanov, S. 2009. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochemical Journal*, 418, 3: 567–574

- Stefanic P., Decorosi F., Vit C., Petito J., Cohan F. M., Mandic-Mulec I. 2012. The quorum sensing diversity within and between ecotypes of *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*, 14, 6: 1378–1389
- Stefanic P., Kraigher B., Lyons N. A., Kolter R., Mandic-Mulec I. 2015. Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 45: 14042–14047
- Stefanic P., Mandic-Mulec. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* pherotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756–1764
- Strassmann J. E., Gilbert O. M., Queller D. C. 2011. Kin discrimination and cooperation in microbes. *Annual Review of Microbiology*, 65: 349–367
- Travisano M., Velicer G. J. 2004. Strategies of microbial cheater control. *Trends in Microbiology*, 12, 2: 72–78
- Tsutsui N. D. 2013. Dissecting ant recognition systems in the age of genomics. *Biology Letters*, 9, 6: 20130416
- Turner L., Zhang R., Darnton N. C. Berg H. C. 2010. Visualization of flagella during bacterial swarming. *Journal of Bacteriology*, 192: 3259–3267
- Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter, R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Development*, 22, 7: 945–953
- van Gestel J., Weissing F. J., Kuipers O. P., Kovács A. T. 2014. Density of founder cells affects spatial pattern formation and cooperation in *Bacillus subtilis* biofilms. *The ISME Journal*, 8, 10: 2069–2079
- Velicer G. J., Kroos L., Lenski R. E. 1998. Loss of social behaviors by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 21: 12376–12380
- Velicer G. J., Plucain J. 2016. Evolution: Bacterial Territoriality as a Byproduct of Kin Discriminatory Warfare. *Current Biology*, 26, 9: R364–R366, doi: 10.1016/j.cub.2016.03.033: 3 str.
- Venieraki A., Tsalgatidou P. C., Georgakopoulos D. G., Dimou M., Katinakis P. 2016. Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9, 1: 16–27

- Vos M., Velicer G. J. 2009. Social conflict in centimeter-and global-scale populations of the bacterium *Myxococcus xanthus*. Current Biology, 19, 20: 1763–1767
- Waldman B., Frumhoff P. C., Sherman P. W. 1988. Problems of kin recognition. Trends in Ecology & Evolution, 3, 1: 8–13
- Wang L., Jackson W. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. 2004. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 48: 16745–16749
- Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L., Septer A.N., Gibbs K.A. 2013. Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. MBio, 4: e00374, doi: 10.1128/mBio.00374-13: 10 str.
- West S. A., Griffin A. S., Gardner A. 2007. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. Journal of Evolutionary Biology, 20, 2: 415–432
- Westers L., Westers H., Quax W. J. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1694, 1: 299–310
- Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52, suppl 1: 487–511
- Xavier J. B., Kim W., Foster K. R. 2011. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology, 79, 1: 166–179
- Xu J., Plat T. G., Fuqua C. 2012. Regulatory Linkages between Flagella and Surfactant during Swarming Behavior: Lubricating the Flagellar Propeller? Journal of Bacteriology, 194: 1283–86
- Yang F., Moss L. G., Phillips G. N. Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. Journal of Nature Biotechnology, 14, 10: 1246–51
- Young G. M., Smith M. J., Minnich S. A., Miller V. L. 1999. The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, flhDC, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. Journal of Bacteriology, 181: 2823–2833

ZAHVALA

Za vse strokovne nasvete in vsestransko pomoč pri izdelavi magistrskega dela se iskreno zahvaljujem prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Posebna zahvala gre somentorici doc. dr. Barbari Kraigher za strokovne razprave, nasvete, podajanje znanja, motivacijo, neomajno pomoč in dobro družbo.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Mateju Butali za strokovni pregled dela in hiter odziv ter predsednici komisije prof. dr. Branki Javornik.

Hvala tudi doc. dr. Tjaši Danevčič za prijaznost, nasvete, spodbudo, pomoč in družbo.

Za preživljanje prijetnega časa na Katedri za mikrobiologijo se zahvaljujem Simoni Leskovec, vsem zaposlenim in študentom.

Hvala tudi družini, ki mi je ves čas študija stala ob strani in me podpirala.

Hvala Mihu za podporo, za lepe trenutke in dobra kosila.

Hvala tudi vsem prijateljem za preživete nepozabne trenutke.

PRILOGA A

Razpon dolžine faze prilagajanja pri rojenju pri izbranih sevih

Priloga A1: Spore kot inokulum

Sev	Faza prilagajanja
PS-216 RFP	9-10 ur
PS-216 YFP	8-9 ur
PS-218 RFP	8-10 ur
PS-218 YFP	8-9 ur

Priloga A2: Celice iz eksponentne faze rasti kot inokulum

Sev	Faza prilagajanja
PS-216 RFP	7-9 ur
PS-216 YFP	7-9 ur
PS-218 RFP	7-8 ur
PS-218 YFP	6 ur

PRILOGA B

Razpon hitrosti rojenja pri izbranih sevih.

Sev	razpon hitrosti ($\mu\text{m/s}$)
PS-218 YFP	0,23 - 5,11
PS-218 RFP	1,9 - 6,6
PS-216 YFP	0,19 - 4,50
PS-216 RFP	0,23 - 4,41

PRILOGA C

Rezultati poskusov na velikih ploščah

Priloga C1: Enaki sevi, označeni z različnimi fluorescentnimi proteini. S celicami iz eksponentne faze rasti.

KOMBINACIJA PS-216 RFP + PS- 216 YFP	1:4	1:2	1:1	2:1	4:1
Število bioloških ponovitev	5	1	6	1	5
Število tehničnih ponovitev	16	4	20	4	16
rezultat	Vedno prisotna oba seva				
KOMBINACIJA PS-218 RFP + PS- 218 YFP					
Število bioloških ponovitev	2	0	2	0	2
Število tehničnih ponovitev	4	0	4	0	4
rezultat	Vedno prisotna oba seva				

Priloga C2: Različni sevi, s celicami iz eksponentne faze rasti.

EKSPONENTNA FAZA	Število bioloških ponovitev	Število tehničnih ponovitev	Rezultati			
enaki sevi						
PS-216 YFP – PS-216 RFP	5	13	V vseh primerih prisotna oba seva (seva si delita površino)			
PS-218 YFP – PS-218 RFP	3	8	V vseh primerih prisotna oba seva (seva si delita površino)			
različni sevi						
PS-216 YFP – PS-218 RFP		13	PS-216 YFP	PS-218 RFP	segre	gacija
			2	3	7	
PS-218 YFP – PS-216 RFP		8	PS-216 YFP	PS-218 RFP	segre	gacija
			2	0	6	

Priloga C3: Spore kot inkokulum za test rojenja.

EKSPONENTNA FAZA	Število bioloških ponovitev	Število tehničnih ponovitev	Rezultati			
enaki						
PS-216 YFP – PS-216 RFP	4	8	V vseh primerih prisotna oba seva (seva si delita površino)			
PS-218 YFP – PS-218 RFP	2	4	V vseh primerih prisotna oba seva (seva si delita površino)			
različni						
PS-216 YFP – PS-218 RFP (Neredčeno)	4	8	PS-216 YFP	PS-218 RFP	segre	gacija
			4	0	4	
PS-216 YFP – PS-218 RFP (10x redčeno)	4	8	PS-216 YFP	PS-218 RFP	segre	gacija
			3	2	3	
PS-218 YFP – PS-216 RFP (Neredčeno)	3	4	PS-216 RFP		PS-218 YFP	segre
			4		0	gacija
PS-218 YFP – PS-216 RFP (10x redčeno)	3	4	PS-216 RFP		PS-218 YFP	segre
			2		0	gacija

PRILOGA D

Ugotavljanje prisotnosti časovnega zamika začetka rojenja v mešanici različnih sevov.
Prikazano je rojenje po 11 urah rasti v luknjicah pri mešanici enakih sevov PS-216 RFP +
PS-216 YFP, ki so bile nacepljene v eksponentni fazi rasti.

