

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tadeja LUKEŽIČ

**FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA SEVOV *Bacillus subtilis*,  
IZOLIRANIH IZ TALNEGA MIKROOKOLJA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Bacillus subtilis* STRAINS,  
ISOLATED FROM THE MICROSCALE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec, za recenzenta pa prof. dr. Gorazda Avgušтина.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar,  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Ines Mandić Mulec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Tadeja Lukežič se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji. Popravki so v elektronski verziji diplomske naloge že vključeni.

Tadeja Lukežič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.22/.26:631.461:577.2.08 (043)=163.6  
KG *Bacillus subtilis* / *Bacillus mojavensis* / zaznavanje gostote celic / genetska kompetenca / morfologija / rojenje / *recA*  
AV LUKEŽIČ, Tadeja  
SA MANDIČ MULEC, Ines (mentor) / AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2009  
IN FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA SEVOV *Bacillus subtilis*, IZOLIRANIH IZ TALNEGA MIKROOKOLJA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 66 str., 12 pregl., 14 sl., 6 pril., 39 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Bakterije vrste *Bacillus subtilis* zaznavajo celično gostoto s sistemom ComQXPA, ki vključuje peptidni feromon ComX in membransko vezano histidinsko kinazo. Ta komunikacijski sistem uravnava različne procese kot npr. kompetenco, ki omogočajo adaptacijo in preživetje v stacionarni fazi. Sistem se zelo razlikuje med predstavniki iste vrste, kar omejuje izmenjavo informacij le znotraj specifične komunikacijske skupine (ferotipa), pri čemer so pri *B. subtilis* odkrili štiri ferotipe. Sevi zelo sorodnih vrst rodu *Bacillus*, izoliranih iz nabrežja Save, Slovenija (talno mikrookolje) in puščave Mojave, ZDA (talno makrookolje) smo analizirali na nivoju filogenije (gen *recA*), morfologije kolonij, rojenja in kompetence za transformacijo. Z našimi rezultati smo potrdili hipotezo, da filotipske in ferotipske skupine niso skladne, kar kaže na različno evolucijo genov za komunikacijski lokus in gospodinjskih genov, kot je *recA*. Kljub filogenetski sorodnosti med sevi je njihova morfološka raznolikost velika. Med morfologijo kolonije oziroma načinom rojenja in ferotipi oziroma filotipi ni skladnosti. Povezavo smo odkrili med geografskim izvorom seva in morfologijo. Hitrost rojenja in morfologija roja je bila odvisna tako od seva kot od razmer gojenja: vsebnosti hranil in koncentracije agarja v gojišču. Opazili smo, da obstaja določena povezava med kompetenco in ferotipom in sicer je bil največji delež kompetentnih sevov v ferotipski skupini 168. V okviru tega diplomskega tega smo izvedli tudi začetne poskuse s sevi z genom za fluorescenčni proteina vgrajenim za *srfA* promoter, ki naj bi omogočili lažje spremljanje komunikacije s feromonom ComX tudi v mešanih kulturah, ki vsebujejo več sevov *B. subtilis*. Ugotovili smo, da se testerski sev pozitivno odzove na feromone producerskega seva istega ferotipa in ta odziv opazimo kot povečanje intenzitete fluorescence.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.22/.26:631.461:577.2.08 (043)=163.6  
CX *Bacillus subtilis* / *Bacillus mojavensis* / quorum-sensing / genetic competence / morphology / swarming / *recA*  
AU LUKEŽIČ, Tadeja  
AA MANDIČ MULEC, Ines (supervisor) / AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2009  
TI PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Bacillus subtilis* STRAINS, ISOLATED FROM THE MICROSCALE  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 66 p., 12 tab., 14 fig., 6 an., 39 ref.  
LA sl  
AL sl/eng  
AB Cell density in *Bacillus subtilis* is monitored by mechanisms involving peptide pheromones and membrane-localized histidine kinases, specific for communication groups (pherotypes) and encoded by the highly polymorphic *comQXP'* loci. Survival-enhancing stationary phase adaptations (for example genetic competence) are controlled by high cell density. We have analysed *Bacillus* strains, isolated from two river bank soil aggregates, Slovenia and from desert soil environments, USA. Phylogenetic analysis of river bank and desert strains indicated that phylotype (*recA*) and pherotype clusters are not congruent, suggesting different evolution of quorum-sensing genes and housekeeping genes (*recA*). In spite of high phylogenetic relatedness among strains, we observed high diversity in colony morphology. Colony morphology or swarming phenotypes are not congruent with pherotypes or phylotypes, however we found some correlation between geographic origin of the strain and their colony morphology. Speed and morphology of swarming is strain dependent and also controlled by environmental factors such as nutrient concentration and percentage of agar in the growth medium. The highest number of strains from 168 communication group were genetically competent for transformation as compared to strains of other pherotypes. We have also carried out experiments with strains with gene for fluorescence protein inserted right after *srfA* promoter. Using this method we confirmed communication between strains of the same pherotype, which was indicated by an increased fluorescence of the reporter.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN NAČRT DELA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 EKOLOGIJA <i>B. subtilis</i>	3
<b>2.1.1 Ekotipi</b>	<b>3</b>
2.2 GENOMIKA <i>B. subtilis</i>	4
2.3 QUORUM SENSING	4
<b>2.3.1 Polimorfizem in specifičnost lokusa <i>comQXP'</i></b>	<b>5</b>
<b>2.3.2 Pomen specifičnosti</b>	<b>6</b>
2.4 BIOGEOGRAFIJA	6
2.5 <i>stfA</i> OPERON	7
2.6 NARAVNA KOMPETENCA PRI <i>B. subtilis</i>	7
<b>2.6.1 Regulacija kompetence</b>	<b>7</b>
<b>2.6.2 Razvoj kompetence preko CSF</b>	<b>8</b>
<b>2.6.3 Razvoj kompetence preko ComX</b>	<b>8</b>
2.7 TRANSFORMACIJA	9
<b>2.7.1 Potek transformacije</b>	<b>9</b>
<b>2.7.2 Vloga transformacije</b>	<b>10</b>
<b>2.7.3 Ovire pri transformaciji</b>	<b>10</b>
<b>2.7.4 Seksualna izolacija</b>	<b>11</b>

2.8	REKOMBINACIJA	11
2.9	MORFOLOGIJA	12
2.10	ROJENJE	13
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>15</b>
3.1	MATERIALI	15
3.1.1	Bakterijski sevi	15
3.1.2	Kemikalije	17
3.1.3	Encimi	18
3.1.4	Pufri in raztopine	18
3.1.5	Gojišča	19
3.2	METODE	20
3.2.1	Priprava izrabljenih gojišč	20
3.2.2	Merjenje fluorescence sevov z vgrajenim genom za izražanje fluorescečnega proteina	20
3.2.3	Izolacija kromosomske DNK divjih sevov vrst <i>Bacillus</i>	21
3.2.4	Rastna hitrost	22
3.2.5	Transformacija s kromosomsko DNK	22
3.2.6	Agarozna gelska elektroforeza	23
3.2.7	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	23
3.2.8	Sekvenciranje	24
3.2.9	Filogenetske analize	24
3.2.10	Določevanje morfotipov	24
3.2.11	Ugotavljanje gibljivosti	25
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>26</b>
4.1	FILOGENETSKA ANALIZA SEVOV <i>B. subtilis</i> IN <i>B. mojavensis</i> (SEKVENCIRANJE GENA <i>recA</i> )	26
4.2	RASTNE HITROSTI SEVOV <i>B. subtilis</i> IN <i>B. amyloliquefaciens</i>	28
4.3	TRANSFORMACIJA SEVOV <i>B. subtilis</i> IN <i>B. amyloliquefaciens</i>	30
4.4	MORFOLOGIJA SEVOV <i>B. subtilis</i> , <i>B. mojavensis</i> IN <i>B. amyloliquefaciens</i>	31
4.4.1	Morfotipi na gojišču TBAB	32
4.4.2	Morfotipi na gojišču LB	34
4.4.3	Morfotipi na gojišču R-2A	35
4.4.4	Razdelitev sevov glede na skupne lastnosti rasti na gojiščih TBAB, LB in R-2A	37
4.4.5	Povezava med morfologijo in ferotipi oziroma filotipi	38

4.5	ROJENJE SEVOV <i>B. subtilis</i> , <i>B. mojavensis</i> IN <i>B. amyloliquefaciens</i>	40
4.5.1	Rojenje na gojišču TY	41
4.5.2	Rojenje na gojišču B	42
4.5.3	Povezava med tipi rojenja in ferotipi oziroma filotipi	44
4.6	MERJENJE FLUORESCENCE SEVOV <i>B. subtilis</i> Z VGRAJENIM GENOM ZA IZRAŽANJE FLUORESČEČNEGA PROTEINA	45
4.6.1	Merjenje intenzitete fluorescenčnega proteina YFP (Yellow fluorescent protein)	46
4.6.2	Merjenje intenzitete fluorescenčnega proteina CFP (cyan fluorescent protein)	47
4.6.3	Merjenje intenzitete fluorescenčnega proteina mCherry (mCherry fluorescent protein)	49
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>50</b>
5.1	RAZPRAVA	50
5.1.1	Filogenetska analiza sevov	50
5.1.2	Transformacija sevov	50
5.1.3	Morfologija sevov	51
5.1.4	Rojenje sevov	52
5.1.5	Merjenje fluorescence sevov z vgrajenim genom za izražanje fluorescenčnega proteina	53
5.2	SKLEPI	53
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>ZAHVALA</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>PRILOGE</b>	<b>61</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Puščavski sevi vrst <i>B. subtilis</i> in <i>B. mojavensis</i> ter sevi <i>B. natto</i> , <i>B. subtilis</i> 3610, <i>B. subtilis</i> 168, ki pripadajo različnim podskupinam (168, W23, mojavensis) in ferotipom (168, RS-D-2/NAF4, RO-B-2/RO-H-1, RO-E-2) (Cohan in sod., 1991; Roberts in Cohan, 1995; Tran in sod., 2000)	15
Preglednica 2: Nabrežni sevi <i>B. subtilis</i> in <i>B. amyloliquefaciens</i> , ki pripadajo različnim ferotipom (168, RS-D-2/NAF4, RO-B-2/RO-H-1, RO-E-2) (S krepko pisavo in z * so označeni sevi iz drugega vzorca.) (Štefanič in Mandić Mulec, 2009)	16
Preglednica 3: Producentni sevi <i>B. subtilis</i> (laboratorijski sev skupine 168) (Tortosa in sod., 2001; Štefanič, 2009)	17
Preglednica 4: Testerski sevi <i>B. subtilis</i> (laboratorijski sev skupine 168) (Štefanič, 2009)	17
Preglednica 5: Povprečna rastna hitrost in generacijski čas posameznih ferotipskih skupin nabrežnih sevov <i>B. subtilis</i> in <i>B. amyloliquefaciens</i>	28
Preglednica 6: Stopnja transformacije nabrežnih sevov <i>B. subtilis</i> in <i>B. amyloliquefaciens</i> (– pomeni neuspešno transformacijo; n pomeni, da ni podatka; krepka pisava in * ponazarjata seve iz 2. vzorca)	30
Preglednica 7: Pripadnost morfotipov (glede na gojišče TBAB) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)	38
Preglednica 8: Pripadnost morfotipov (glede na gojišče LB) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)	39
Preglednica 9: Pripadnost morfotipov (glede na gojišče R-2A) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)	39
Preglednica 10: Pripadnost skupin (glede na vsa tri gojišča skupaj) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)	40
Preglednica 11: Pripadnost skupin (glede na gojišče TY) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)	44
Preglednica 12: Pripadnost skupin (glede na gojišče B) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)	45



## KAZALO SLIK

Slika 1: Razvoj kompetence pri <i>B. subtilis</i> (Lazazzera, 2000)	9
Slika 2: Filogenetska analiza puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov <i>B. subtilis</i> in <i>B. mojavensis</i> (celoten gen <i>recA</i> )	27
Slika 3: Povprečne rastne krivulje nabrežnih sevov <i>B. subtilis</i> in <i>B. amyloliquefaciens</i>	29
Slika 4: Skupna povprečna rastna krivulja za nabrežne seve <i>B. subtilis</i> in <i>B. amyloliquefaciens</i>	29
Slika 5: Morfologija kolonij nekaterih sevov <i>B. subtilis</i> iz nabrežja Save (PS-14, PS-216 in PS-218) na agarskih gojiščih TBAB, LB in R-2A (velikost slike je 5mm × 5mm)	32
Slika 6: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rast na gojišču TBAB (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))	33
Slika 7: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rast na gojišču LB (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))	34
Slika 8: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rast na gojišču R-2A (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))	36
Slika 9: Dendrogram podobnosti morfoloških značilnosti kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov, zraslih na gojiščih TBAB, LB in R-2A (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))	37
Slika 10: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rojenje na gojišču TY (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))	41
Slika 11: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rojenje na gojišču B (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))	43
Slika 12: Intenziteta fluorescence sevov <i>B. subtilis</i> , ki imajo vključen reporterski gen za fluorescenčne proteine YFP, CFP, mCherry v operon <i>stfA</i> , v različnih kombinacijah pri valovni dolžini 515 nm/530 nm (ekscitacijska/emisijska)	46
Slika 13: Intenziteta fluorescence sevov <i>B. subtilis</i> , ki imajo vključen reporterski gen za fluorescenčne proteine YFP, CFP, mCherry v operon <i>stfA</i> , v različnih kombinacijah pri valovni dolžini 445 nm/477 nm (ekscitacijska/emisijska)	48
Slika 14: Intenziteta fluorescence sevov <i>B. subtilis</i> , ki imajo vključen reporterski gen za fluorescenčne proteine YFP, CFP, mCherry v operon <i>stfA</i> , v različnih kombinacijah pri valovni dolžini 587 nm/610 nm (ekscitacijska/emisijska)	49

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečna rastna hitrost in generacijski čas nabrežnih sevov <i>B. subtilis</i> in <i>B. amyloliquefaciens</i> (S krepko pisavo in z * so označeni sevi iz drugega vzorca.)	61
Priloga B: Opis kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču TBAB	62
Priloga C: Opis kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču LB	63
Priloga D: Opis kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču R-2A	64
Priloga E: Opis rojenja in morfologije roja puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču TY	65
Priloga F: Opis rojenja puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču B	66

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

EDTA	etilen-diamino-ocetna kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi-nukleotidi
kbp	kilobazni pari
LB	Luria Bertani
OD <sub>650</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
PCR	polimerase chain reaction = verižna reakcija s polimerazo
RFU	relative fluorescence units = relativne fluorescenčne enote
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
U	units = enote

## 1 UVOD

Po Gramu pozitivna bakterija *Bacillus subtilis* je že več desetletij modelni organizem za skupino *Firmicutes*, saj ima izreden biotehnološki potencial in so predstavniki te vrste pomembni v industriji kot producenti encimov in antibiotikov ter v agronomiji kot biološko aktivni agensi (biopesticidi). Ekologija teh bakterij pa je še vedno relativno slabo poznanana. Štefanić in Mandić Mulec (2009) sta pred kratkim izolirali seve *B. subtilis* in *B. amiloliquefaciens* iz dveh talnih mikroagregatov velikosti 1 cm<sup>3</sup> z nabrežja Save, ki sta jih uvrstili v komunikacijske skupine oziroma ferotipe in filogenetsko opredelili na osnovi analize sekvenc genov *gyrA* in *rpoB*. Ferotipi in filotipi niso bili skladni. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Ansaldi in sodelavci, 2002, ki so analizirali puščavske seve vrst *B. subtilis* in *B. mojavensis*, ki so jih Cohan in sodelavci ter Roberts in Cohan (1991; 1995) izolirali iz puščave Mojave. V okviru tega diplomskega dela smo filogenijo nabrežnih in nekaterih puščavskih sevov preverjali na osnovi analize sekvenc gena *recA* ter preučili morfološko raznolikost in stopnjo genetske transformacije izbranih sevov. Znano je namreč, da so sevi *B. subtilis* naravno kompetentni (Dubnau, 1991).

Naravna kompetenca je genetsko programirano fiziološko stanje, ki dopušča uspešen prevzem visokomolekularne DNK (Dubnau, 1999). Pri po Gramu pozitivnih bakterijah mora kompetenco sprožiti okoljski dejavnik, ponavadi stradanje (Cohan, 2002). Kompetenca je eden izmed procesov, ki omogočajo adaptacije v stacionarni fazi za povečanje možnosti preživetja bakterij. Za regulacijo teh procesov je ključno zaznavanje celične gostote, ki jo bakterije vrste *B. subtilis* zaznavajo s komunikacijskimi sistemi, ki vključujejo peptidne feromone in membransko vezane histidinske kinaze (Tortosa in sod., 2001). Do razvoja kompetence pride ob visoki celični gostoti, med pozno eksponentno fazo ali po začetku stacionarne faze. Glavna signala, ki sprožita razvoj kompetence, sta peptidna feromona: ComX in CSF (kompetenčni in sporulacijski dejavnik) (Lazazzera in sod., 1999).

Populacije *B. subtilis* lahko razvijejo kolonije z dovršeno arhitekturo, ki pa je zelo odvisna od seva (prisotnost določenih genov in njihova regulacija) in okoljskih razmer: sestava gojišča, temperatura inkubacije in koncentracija agarja v trdnem gojišču. Za razvoj kompleksne arhitekture kolonij je nujna produkcija ekstracelularnega matriksa, ki je nadzorovana z zelo zapletenim regulatornim omrežjem. Če kolonija ne producira ekstracelularnega matriksa, je njen profil čisto ploščat (Aguilar in sod., 2007).

Rojenje je koordinirano, simetrično gibanje po gojišču z nižjo vsebnostjo agarja. Tako bakterije hitro kolonizirajo velike površine in ustvarijo različne vzorce: amorfne, velika konfluentna območja, enostavno radialno razvejanost, zelo kompleksno in globoko razvejanost, fraktale, ponavljajoča koncentrična območja. V regulaciji rojenja sodeluje sistem za zaznavanje gostote, za razvoj rojenja pa je pomembna prisotnost bičkov,

vključeni pa sta tudi sinteza surfaktina in ekstracelularnih proteaz (Julkowska in sod., 2004; Nakano in sod., 1991).

Geni za komunikacijski lokus se verjetno prenašajo s horizontalnim genskim prenosom znotraj vrste (Tortosa in sod., 2001) in tudi med vrstami (Ansaldi in sod., 2002), hkrati pa s svojimi produkti posredno vplivajo na morfologijo in rojenje (Aguilar in sod., 2007) ter kompetenco (Tortosa in Dubnau, 1999).

## 1.1 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen tega diplomskega dela je opredeliti povezavo med fiziološkimi značilnostmi (rojenje, kompetenca), morfologijo, ferotipi in filotipi omenjenih izolatov *B. subtilis*. Predvidevamo, da bo diplomsko delo prineslo pomembne rezultate, ki bodo povečali razumevanje diverzitete bakterije *B. subtilis* znotraj vrste in kar je še posebej zanimivo – diverzitete v mikrookolju. Študija bo omogočila vpogled v diverzitetu filotipov na nivoju genov (sekvenciranje *recA*) in diverzitetu na nivoju funkcije (kompetenca, rojenje) ter morfologije, kar do sedaj še ni bilo preučevano.

Hipoteza: Predvidevamo, da obstaja korelacija med morfologijo oziroma fiziologijo izolatov in njihovim uvrščanjem v filotope in da med morfologijo oziroma fiziologijo izolatov in njihovim uvrščanjem v ferotipe ni skladnosti.

Načrt dela:

- seve *B. subtilis*, ki so že uvrščeni v različne ferotipske skupine, natančneje filogenetsko opredeliti na osnovi analize sekvenc gena *recA*
- seve fiziološko (ugotavljanje frekvence transformacije in gibljivosti na agarškem gojišču) in morfološko okarakterizirati (fotografiranje in analiza oblike kolonij)
- razvoj alternativne metode za uvrščanje sevov v ferotipske skupine: merjenje fluorescence sevov z vgrajenim genom za fluorescenčne proteine

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 EKOLOGIJA *B. subtilis*

*B. subtilis* je zelo prilagodljiva bakterijska vrsta, sposobna rasti v različnih okoljih - od kopenskih do vodnih. Predstavniki te vrste so tudi genomsko zelo raznoliki. *B. subtilis* je tako razširjen in prilagojen ravno zaradi tega, ker so pri različnih sevih prisotni različni geni, potrebni za prilagoditev v določenem okolju. Kot ostali predstavniki rodu *Bacillus*, lahko tudi *B. subtilis* tvori zelo odporne dormantne endospore kot odgovor na pomanjkanje hranil in ostale oblike okoljskega stresa. Spore se zlahka prenašajo z vetrom, ki jih lahko raznese na dolge razdalje, vendar lahko v določenem okolju, kjer pristanejo, nikoli ne vzklijejo. Torej tradicionalne metode izolacije *B. subtilis*, ki vključujejo običajno obdelavo okoljskega vzorca z visoko temperaturo, ki omogoča preživetje le sporam, ne zagotavljajo, da ta organizem res živi in raste v določenem okolju (Earl in sod., 2008).

*B. subtilis* je talni organizem, raste tudi v tesni povezavi s površino rastlinskih korenin in pospešuje rast rastlin. Z gojitveno metodo so dokazali prisotnost *B. subtilis* v gastrointestinalnem traktu živali. *B. subtilis* uporabljajo tudi v proizvodnji fermentiranih živilskih izdelkov. Čeprav je aerobni organizem, so dokazali njegovo sposobnost anaerobne rasti v prisotnosti nitrata. Kar velik del (okoli 4 %) njegovega genoma je namenjen proizvodnji sekundarnih metabolitov (Earl in sod., 2008; Barbosa in sod., 2005).

#### 2.1.1 Ekotipi

V bakterijski sistematiki so univerzalno določene meje molekularnih razlik, ki pomagajo razločiti med vrstami; za določitev mej, ki vodijo do ekološko različnih populacij, pa še ni nobenih teoretičnih osnov. Določevanje ekološko različnih predstavnikov je izjemno težka naloga, eden izmed razlogov je ta, da zaradi horizontalnih genskih prenosov ne moremo biti prepričani, kateri geni so pomembni za razvoj v različne smeri. Problem predstavlja tudi naša nezmožnost, da bi pravilno ocenili, na kateri stopnji hierarhije v filogenetskem drevesu, ki temelji na podlagi zaporedij za 16S rRNA, se pojavijo ekološko ločene populacije (Koeppel in sod., 2008).

Nov ekotip nastane, ko adaptivna mutacija (ali rekombinacija) omogoči organizmu, da zavzame novo ekološko nišo. Zaradi ekoloških razlik med ekotipi periodična selekcija znotraj enega ekotipa ne izniči diverzitete znotraj drugih ekotipov. Bakterijski ekotipi imajo vse bistvene lastnosti vrste: so ekološko ločene skupine, ki pripadajo genetsko enotnim in ireverzibilnim evolucijskim linijam, nastanejo pa samo enkrat. Na splošno lahko z analizo več genov, ki se hitro evolucijsko razvijajo, lažje ločimo zelo sorodne sklope v različne ekotipe kot pa z uporabo genov, ki se počasneje evolucijsko razvijajo (Koeppel in sod., 2008).

## 2.2 GENOMIKA *B. subtilis*

Seve *B. subtilis* delimo na podvrsti *B. subtilis* subsp. *subtilis*, ki spada v podskupino 168 in *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, ki spada v podskupino W23 (Earl in sod., 2008; Shaver in sod., 2002). Ugotovili so, da je velik delež genomske DNK specifičen za posamezen sev. Ta genomska raznolikost je razporejena po celotnem genomu, obstaja le nekaj večjih območij genomske DNK, ki se med sevi ne razlikujejo. Med variabilnimi regijami najdemo takšne, ki kodirajo sintezo sekundarnih metabolitov, tejojske kisline in adaptivni odgovor na poškodovano DNK, pa tudi »funkcionalne« gene, ki bi lahko bili pomembni za spreminjanje sposobnosti preživetja sevov v različnih okoljih. Razvoj v različne smeri so opazili tudi pri genih, ki kodirajo proteine, vpletene v razgradnjo ogljikovih hidratov in aminokislin, ter v genih, ki kodirajo proteine na celični površini, vključno s tistimi za zaznavanje okolja. To pomeni, da določene metabolne in okoljske sposobnosti predstavnikov posameznih ekotipov ne omogočajo preživetja *B. subtilis* v vseh okoljih. Ugotovili so, da so skoraj vsi geni, ki so nujni za rast *B. subtilis* v laboratorijskih razmerah, enaki pri vseh sevih *B. subtilis*. Tudi velik del genov za sporulacijo je močno ohranjen, nasprotno pa se je veliko genov, potrebnih za klitje spor, razvilo v različne smeri. Torej so signali za ponovno rast v različnih okoljih različni. Geni za oblikovanje biofilma so zelo ohranjeni, to pa pomeni, da je življenje v večceličnih združbah, obdanih z ekstracelularnim matriksom, zelo pomembno za vse divje seve te vrste (Earl in sod., 2008). Tudi geni za kompetenco so močno ohranjeni, razen operona *comQXP*, ki je pomemben za produkcijo ekstracelularnega signala, ki se razlikuje od seva do seva. Glede na to, da je signal za kompetenco odvisen od celične gostote, sevi *B. subtilis* postanejo kompetentni le, ko so obkroženi s sebi enakimi in sprejemajo le »svojo« DNK (Tortosa in Dubnau, 1999; Ansaldi in sod., 2002).

Iz genomske sekvence *B. subtilis* 168 so ugotovili, da se je velik del genoma prenesel s horizontalnim genskim prenosom s pomočjo bakteriofagov. Skoraj polovico vseh v različnih smereh razvijajočih se genov med sevi najdemo v regijah, ki naj bi se prenesle s horizontalnim genskim prenosom. V naravnih populacijah *B. subtilis* se pojavlja tudi konjugacija, vendar ta ne prispeva toliko k evoluciji kot transformacija, za katero so opazili, da poteka tudi med različnimi vrstami (npr. *B. subtilis* in *B. licheniformis*). Vendar te trditve temeljijo na podatkih, pridobljenih z analizo laboratorijskih sevov, katerih transformacija je veliko uspešnejša kot transformacija divjih sevov (Earl in sod., 2008).

## 2.3 QUORUM SENSING

Veliko organizmov ima mehanizme za zaznavanje in odzivanje na gostoto populacije (quorum sensing) (Lazazzera in sod., 1999). Quorum sensing (QS) sistemi pri pozitivnih bakterijah vključujejo peptidne feromone in membransko vezane histidinske kinaze s kompleksnimi topologijami. Pri bakteriji *B. subtilis* visoka celična gostota sodeluje v regulaciji izražanja mnogih genov, med njimi tudi številnih, ki so vpleteni v

adaptacije za povečanje sposobnosti preživetja v stacionarni fazi (Tortosa in sod., 2001). Dva od teh različnih razvojnih procesov sta razvoj genetske kompetence (naravna sposobnost vezave in prevzema DNK) in sporulacija (tvorba okoljsko odpornih endospor). V obeh primerih akumulacija peptidnih signalnih molekul v ravnem gojišču služi kot način prenosa informacije o visoki celični gostoti populacije, ki je nujna za indukcijo obeh adaptivnih procesov. Nekateri od teh peptidnih signalov so vključeni v splošni fiziološki odgovor na visoko celično gostoto in deli tega odgovora vključujejo stimulacijo kompetence in sporulacije. Razvoj kompetence in sporulacija sta učinkovitejši v populaciji, ki doseže višjo celično gostoto. Kontrola kompetence s celično gostoto lahko služi tudi kot pokazatelj prisotnosti eksogene DNK, ki poraste ob lizi celic. Razvoj kompetence preko signaliziranja celica-celica uravnava tudi prenos genskega materiala med različnimi vrstami. Če so signali specifični za vrsto, potem se bo kompetenca razvila le, ko bodo celice obkrožene s podobnimi celicami (Lazazzera in sod., 1999).

QS sistem kontrolira tudi druge lokuse: *degQ*, *rapA* (*gsiA*) in *rapC*. *degQ* je potreben za produkcijo ekstracelularnih razgradnih encimov; *rapA* kodira odzivni regulator, aspartilno fosfatazo, ki inhibira sporulacijo; *rapC* kodira negativni regulator kompetence, najbrž fosfatazo za ComA~P (Lazazzera in sod., 1999). QS sistem sodeluje tudi v transkripcijski regulaciji rojenja, kontroli produkcije protimikrobnih peptidov, bakteriocinov, antibiotikov in kapsularnega poli-gama-glutamata. V populaciji različnih ferotipov (komunikacijske skupine) verjetno predstavlja sistem, ki uravnava več kompleksnih odgovorov znotraj ferotipa (ne vpliva pa na predstavnike drugih ferotipov), kompetitivno prednost. Predstavnika dveh ferotipov sta lahko ekološko ločena in naseljujeta različne niše. V različnih sevih *B. subtilis* so deli kromosoma lahko zelo variabilni, kar bi lahko imelo za posledico funkcionalno povečevanje raznolikosti znotraj vrste (Štefanič in Mandić Mulec, 2009; Tortosa in Dubnau, 1999).

### 2.3.1 Polimorfizem in specifičnost lokusa *comQXP'*

Razvoj genetske kompetence v *B. subtilis* je nadzorovan s QS sistemom, ki ga kodira *comQXPA* operon. *comQXPA* lokus pri *B. subtilis* sestavljajo trije zelo polimorfni geni (*comQ*, *comX*, *comP*) in en ohranjen gen (*comA*). Med zelo sorodnimi sevi *B. subtilis* so opazili visok polimorfizem *comQXP'* lokusa tako na makroskali (nekaj m do nekaj km) kot na mikroskali (1 cm<sup>3</sup>); v vzorcih tal, manjših od 1 cm<sup>3</sup>, pa je bila raznolikost nižja (Štefanič in Mandić Mulec, 2009). Polimorfizem lokusa *comQXP'* obsega 4 komunikacijske skupine (ferotipe). Sevi, ki spadajo v isti ferotip, uspešno izmenjujejo informacije; sevi iz različnih ferotipov pa ne morejo komunicirati med sabo. Določeni sevi so sicer sposobni tudi navzkrižne komunikacije, vendar ta nikoli ne doseže stopnje, ki je značilna za seve istega ferotipa. Komunikacija med ferotipi je lahko posledica večje koncentracije drugih feromonov, npr. CSF, ki je v odsotnosti specifičnega ComX feromona sposoben inducirati *srfA*. Poleg tega so znotraj nekaterih ferotipov opazili asimetričnost odzivanja, kjer je bil le



del homolognih sevov sposoben inducirati odziv v izbranem testerju, kar kaže na nenehno povečevanje raznolikosti komunikacijskega lokusa skozi evolucijo (Štefanič in Mandić Mulec, 2009). Med nekaterimi pari ferotipov lahko pride tudi do navzkrižne inhibicije zaradi inhibicije z nesorodnim ComX peptidom (Ansaldi in sod, 2002).

Del QS lokusa, ki vključuje *comQ*, *comX* in N-terminalno regijo gena *comP*, izkazuje visoko stopnjo polimorfizma. Sekvence, ki obkrožajo ta del, pa so močno ohranjene (proti 3'-koncu DNK gen *comA* in C-terminalna regija *comP* ter proti 5'-koncu DNK gen *degQ*). Glede na sekvenčne analize *comQXP'* lokusa, so seve razdelili v 4 različne skupine, ki so skladne tako s ferotipi kot z razdelitvijo glede na gene *comQ*, *comX* in N-terminalno regijo *comP*, kar kaže na koevolucijo teh treh genov. Ti geni določajo specifičnost QS odgovora. Povprečna vsebnost GC parov v polimorfni QS genih je nižja kot v gospodinjskih genih (*gyrA* in *rpoB*) oziroma v celotnem genomu *B. subtilis* 168, kar podpira idejo o prenašanju genov *comQXP'* lokusa s horizontalnim genskim prenosom (Tortosa in sod, 2001; Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić Mulec, 2009).

### 2.3.2 Pomen specifičnosti

Kompetenca omogoča celicam, da pridobijo nove genske informacije, kar lahko po eni strani poveča sposobnost preživetja, po drugi strani pa predstavlja tveganje za inaktivacijo genov ali sintezo tujih toksičnih produktov. Specifičnost tako poveča možnost, da bo kompetentna celica sprejela le DNK zelo sorodnih sevov, kar zmanjšuje razpoložljivo gensko raznolikost, zmanjša pa tudi prej omenjena tveganja. Feromone in ustrezne receptorje lahko torej obravnavamo kot mehanizem kemijske seksualne izolacije. Z neko majhno verjetnostjo pa se lahko zgodi, da »tuj« fragment DNK, ki kodira čisto nov gen, prebije to oviro specifičnosti in poveča sposobnost preživetja celice. Takšen redek dogodek predstavlja pomembno evlucijsko vlogo. Če QS vodi seksualno izolacijo, potem lahko sprememba specifičnosti (preklapljanje v nov ferotip) predstavlja mehanizem speciacije pri bakterijah. Tudi popravljanje DNK s transformacijo je uspešnejše, če gre za specifično sprejemanje okoljske DNK, saj to zahteva stik bakterije z eksogeno homologno DNK, QS pa pokaže na povečano verjetnost dostopnosti takšne DNK (Tortosa in Dubnau, 1999).

## 2.4 BIOGEOGRAFIJA

Med okoljsko heterogenostjo in naravno gensko variabilnostjo obstaja korelacija. Tako nastanejo določeni vzorci mikrogeografskih adaptacij, ki so posledica selekcije zaradi različnih okoljskih dejavnikov (McArthur in sod., 1988). Ugotovili so, da na povečevanje raznolikosti *gyrA* pomembno vplivajo okoljski dejavniki, ne pa tudi na povečevanje raznolikosti QS sistema. Hitrejše evolucijo so opazili pri proteinih, vpletenih v seksualno reprodukcijo (od rastlin do sesalcev) in enako tudi pri QS genih *comQXP*, ki so vpleteni v bakterijsko izmenjavo genov. Ugotovili so, da med gensko raznolikostjo in razdaljo obstaja

neka korelacija, saj se sevi, ki so oddaljeni na nivoju kilometrov, v *gyrA* lokusu bolj razlikujejo kot sevi, izolirani iz mikroskale. Enako so opazili tudi pri hitro evolucijsko razvijajočem se *comQ* lokusu (Štefanič in Mandić Mulec, 2009).

## 2.5 *srfA* OPERON

Produkti genov *srfA* operona sodelujejo v specializaciji in diferenciaciji celic *B. subtilis*. *srfA* operon je velik 27 kbp, kodira podenote surfaktin sintaze (katalizira neribosomsko sintezo surfaktina), potreben pa je tudi za transkripcijo poznih kompetenčnih genov in uspešno sporulacijo pri *B. subtilis* (Nakano in sod., 1991; D'Souza in sod., 1994). Produkcija surfaktina in razvoj kompetence sta regulirana s skupno signalno potjo. Za vse tri procese je potrebna intaktna 5' polovica *srfA* operona, 3' polovica je pomembna le za sporulacijo in produkcijo surfaktina (Nakano in sod., 1991). Za kompetenco je pomembna le ena od sedmih aminokislinskih aktivacijskih domen surfaktin sintetaze: valin aktivacijska domena (*srfABI*), ki kodira gen *comS* (D'Souza in sod., 1994).

## 2.6 NARAVNA KOMPETENCA PRI *B. subtilis*

Naravna kompetenca je genetsko programirano fiziološko stanje, ki dopušča uspešen prevzem visokomolekularne DNK. Takšne celice so sposobne transformacije (Dubnau, 1999). Nekatere vrste so ves čas kompetentne za transformacijo. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah (npr. *Bacillus* in *Streptococcus*) mora kompetenco sprožiti nek okoljski dejavnik, ponavadi stradanje. Pri transformaciji gre za vnos zelo majhnih segmentov proste DNK (okoli 1 % genoma) v recipienta (Cohan, 2002). Pri *B. subtilis* pride do kompetence v podpopulaciji celic, ponavadi v 1 do 10 % celic, za kar je potrebnih čez 40 genov (Lazazzera in sod., 1999). Za laboratorijski sev 168 je značilno, da proizvaja veliko večji delež kompetentnih celic kot pa divji sevi (Earl in sod., 2008). Kompetentne celice so resnično diferencirane, saj imajo nižjo gostoto kot nekompetentne celice in zmanjšano metabolno aktivnost (Lazazzera in sod., 1999). Zelo je zmanjšana sinteza visokomolekularnih snovi, tudi sinteza DNK (Dubnau, 1991).

### 2.6.1 Regulacija kompetence

Za kompetenco so pomembni trije načini regulacije: s hranili, z rastno fazo in s tipom celic. V glukoznem gojišču z minimalnimi solmi in aminokislinami se kompetenca razvije ob vstopu v stacionarno fazo, maksimalna pa je 2 uri po tem, kar označimo s T<sub>2</sub> (Dubnau, 1991). Kompetenco lahko razumemo kot odgovor na stres. Regulacija kompetence v *B. subtilis* je kompleksna, saj nanjo vpliva več dejavnikov, kontrola pa poteka tako na nivoju transkripcije kot na nivoju stabilnosti proteinov. Regulatorna pot kompetence se križa s potmi regulacije drugih odgovorov na stres: sporulacija, gibljivost, SOS odgovor, heat-shock odgovor in izločanje makromolekularnih razgradnih encimov. Te poti se križajo na

različnih točkah, le nekaj regulatornih genov je specifičnih le za en odgovor na stres (Dubnau in Turgay, 2000).

Glavni regulatorni dogodek v razvoju kompetence je aktivacija transkripcijskega faktorja, ki ga kodira *comK*. ComK aktivira izražanje vseh znanih kompetenčnih genov, ki kodirajo procesiranje DNK in mašinerijo za prevzem DNK. ComK poveča tudi ekspresijo *recA*, najbrž zaradi stimulacije rekombinacije med vstopajočo DNK in kromosomom. ComK z avtoregulatorno zanko, ki zagotavlja hiter regulatorni odgovor, neposredno aktivira svojo transkripcijo, kar prispeva k usmerjanju celic v pot kompetence. Transkripcijo *comK* nadzorujejo tudi dodatni regulatorni proteini, produkti *abrB*, *sinR*, *degU* in *codY*. Takšna kompleksna regulacija najbrž služi integraciji multiplih fizioloških signalov, ki prispevajo k odločitvi za kompetenco (Lazazzera in sod., 1999).

Pri *B. subtilis* pride do razvoja kompetence pri visoki celični gostoti, med pozno eksponentno fazo ali po začetku stacionarne faze, odvisno od gojišča. Glavna signala, ki sprožita razvoj kompetence, sta peptidna feromona: ComX in CSF (kompetenčni in sporulacijski dejavnik). Akumulirata se v supernatantu in služita kot signal za celično gostoto. Tako ComX kot CSF stimulira transkripcijo *srfA* operona. Edini del velikega *srfA* operona, potreben za razvoj kompetence, je *comS*, majhen odprt bralni okvir, ki kodira 46-aminokislinski peptid. ComS je potreben za aktivacijo transkripcijskega faktorja ComK (Lazazzera in sod., 1999).

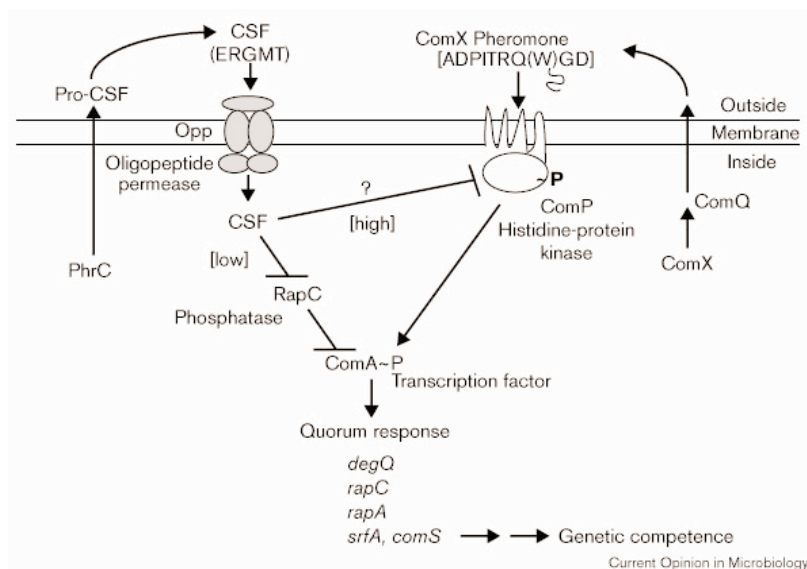
### 2.6.2 Razvoj kompetence preko CSF

CSF je indikator celične gostote in tudi pomanjkanja hranil oziroma stradanja. Ta dvojna funkcija zagotavlja, da celična gostota, pri kateri je maksimalno izražen QS, tudi resnično odraža rastni potencial okolja. Geni, ki jih regulira QS, kodirajo funkcije, ki so bolj učinkovite pri višji celični gostoti. Ob tem se poraja vprašanje, zakaj se v primeru stradanja ti geni inducirajo tudi pri nižji celični gostoti. Morda so ti geni uporabni tudi med prehodom v stacionarno fazo (Lazazzera, 2000). Vendar ima sistem, ki vključuje CSF, v primerjavi s ComX zelo majhen vpliv na QS odgovor (Tortosa in sod., 2001). CSF v bistvu le modulira QS odgovor in ga ne sproži. QS sistem in sistem za zaznavanje stradanja regulirata drug drugega, s tem pa si celice pomagajo pri odločanju za prehod v stacionarno fazo (Lazazzera, 2000).

### 2.6.3 Razvoj kompetence preko ComX

ComX se izraža kot neaktiven citoplazemski propeptid in se akumulira med eksponentno fazo. Pred izločanjem v zunajcelični prostor ga protein ComQ modificira v dekapeptid. Ko ComX doseže določeno koncentracijo, se veže na membransko histidin-kinazo ComP in sproži QS odgovor. ComP se avtofosforilira in prenese fosfatno skupino na odzivni

regulator ComA (Magnuson in sod., 1994; Bacon Schneider in sod., 2002; Weinrauch in sod., 1990). Nivo fosforiliranega ComA je kontroliran tudi z defosforilacijo, ki je odvisna od drugega QS sistema, ki vključuje CSF in RapC fosfatazo. CSF inhibira aktivnost fosfataze RapC, ki defosforilira ComA~P (Solomon in sod., 1995; Lazazzera in sod., 1999). Fosforiliran ComA neposredno kontrolira izražanje različnih genov, med drugim tudi *srfAB* operon, ki vsebuje gen *comS* (Roggiani in Dubnau, 1993; D'Souza in sod., 1994). Na sintezo ComS pozitivno vpliva regulatorni protein prehodnega stanja SinR, potrebna pa je tudi polinukleotidna fosforilaza (PnpA). Na transkripcijo *srfA* (*comS*) pa negativno vplivajo AbrB, DegU~P in CodY, ki so verjetno vsi neposredni represorji promotorja *srfA*. DegU je odzivni regulator, potreben za sintezo razgradnih encimov. AbrB je represor sporulacije, negativno je reguliran s fosforiliranim odzivnim regulatorjem SpoOA. *srfA* operon je potreben za transkripcijsko aktivacijo *comK*, ki je pomemben za transkripcijo številnih poznih kompetenčnih operonov (Dubnau in Turgay, 2000).



Slika 1: Razvoj kompetence pri *B. subtilis* (Lazazzera, 2000)

## 2.7 TRANSFORMACIJA

### 2.7.1 Potek transformacije

Prvi korak transformacije je vezava dvoverižne DNK na površino celice. Pri *B. subtilis* so ocenili približno 50 vezavnih mest na kompetentno celico. Nato pride do fragmentacije in ločitve na enoverižno DNK. Ena od verig se prenese čez membrano, druga pa razpade. Enoverižna donorska DNK skupaj z recipientsko verigo tvori heterodupleks (Dubnau, 1999), ki se lahko tudi loči v procesu replikacije ali popravljanja mest nekomplementarnih baz v DNK in tako se tvori homodupleks (Dubnau, 1991).

Za transformacijo je pomembnih več genskih produktov: zgodnji kompetenčni produkti, ki

so potrebni za regulacijo, in pozni kompetenčni proteini, ki pa so neposredno potrebni za vezavo in procesiranje DNK oziroma za sestavo kompetenčne mašinerije (Dubnau, 1991).

### 2.7.2 Vloga transformacije

DNK, ki se prenese v celico, lahko služi kot hrana, za popravilo poškodovane DNK ali pa za večanje genske raznolikosti. Morda se je kompetenca najprej razvila ravno zaradi prevzema DNK kot zaloge hrane. Vendar to verjetno ne predstavlja glavnega dejavnika selektivnega pritiska, ki bi vzdrževal obstoj mehanizma kompetence. *B. subtilis* ima namreč nespecifične nukleaze in sisteme za prevzem nukleolitskih produktov, kar zagotavlja uspešno pot za uporabo okoljskih nukleinskih kislin. Bolj verjetno selektivno prednost predstavlja transformacija, ki služi kot funkcija za popravilo DNK. Ugotovili so, da popravljalno mašinerijo *B. subtilis* inducira kompetenčni regulon. Najbolj verjeten dejavnik selektivnega pritiska pri *B. subtilis* je transformacija za večanje genske raznolikosti. Signali, ki inducirajo kompetenco, so specifični za vrsto in kompetenca lahko v različnih vrstah služi različnim potrebam (Dubnau, 1999).

### 2.7.3 Ovire pri transformaciji

Glede na to, da lahko divji izolati *B. subtilis* in *B. licheniformis* v tleh spontano izmenjujejo gene, transformacija torej nasprotuje razvoju v različne smeri med sevi *B. subtilis* in najbrž tudi med sevi različnih vrst. Cohan in sod. (1991) so ugotovili, da so vsi sevi iz populacije *B. subtilis*, ki so jih izolirali iz puščave Mojave, kompetentni. Seve so transformirali z lastno DNK, z DNK iz drugih sevov te populacije in z DNK seva 168 (Cohan in sod., 1991).

Puščavske seve so transformirali z DNK seva 168 in ugotovili, da so vsi kompetentni. Frekvenca transformacije najbolj kompetentnih puščavskih sevov je bila za 2 ali več stopenj nižja kot frekvenca, pri kateri so sev 168 transformirali z njegovo lastno DNK. Razloga za to sta lahko dva: bodisi da imajo puščavski sevi nižjo intrinzično kompetenco (stopnja, pri kateri sev transformira sam sebe) kot sev 168 ali pa obstaja seksualna izolacija med sevom 168 in puščavskimi sevi (razlike v sekvenci DNK ali razlike v restriksijsko-modifikacijskih sistemih). Da bi ločili med obema razlogoma, so vsak sev transformirali tudi z lastno DNK. Te frekvence transformacije so bile ravno tako za 2 ali več stopenj nižje kot frekvenca, pri kateri so sev 168 transformirali z lastno DNK. To pomeni, da so puščavski sevi manj kompetentni kot sev 168 (Cohan in sod., 1991).

Ugotovili so, da je frekvenca homogamne (z lastno DNK) in heterogamne (z DNK drugega organizma) transformacije med organizmi iste vrste (ob tem, da ne pride do restrikcije zaradi razlik v restriksijsko-modifikacijskem sistemu), enaka. To pomeni, da razlika na nivoju DNK med organizmi znotraj iste vrste ne vpliva na frekvenco transformacije.

Razvoj v različne smeri na nivoju DNK in razlika v restriktijsko-modifikacijskih sistemih tako kumulativno prispevata k seksualni izolaciji. K frekvenci transformacije torej neodvisno prispevata naravna kompetenca in seksualna izolacija (Cohan in sod., 1991).

Velika stopnja variabilnosti intrinzične kompetence med puščavskimi sevi najbrž pomeni, da je naravna selekcija glede stopnje rekombinacije med sevi zelo šibka. Taka selekcija bi bila prednost (ali pa slabost) pri rekombinaciji alelov med različnimi sevi ali pa prednost pri popravljanju DNK. Izgleda, da ni nobena od obeh oblik selekcije pomembna v tej populaciji. Veliko bolj pomemben način rekombinacije med sevi predstavljata transdukcija in konjugacija. Možno je, da so različna naravna okolja povezana z višjimi nivoji kompetence ali pa mogoče nižjimi variabilnostmi v kompetenci (Cohan in sod., 1991).

Med sevi *B. subtilis* obstaja šibka seksualna izolacija. Ta je posebej nizka, če so sevi v isti v isti podvrsti (npr. skupina 168 - *B. subtilis* subsp. *subtilis*) (Roberts in Cohan, 1993).

#### 2.7.4 Seksualna izolacija

Transformacija med taksonomsko zelo oddaljenimi sevi rodu *Bacillus* je močno zmanjšana. Glavni dejavnik, ki nasprotuje transformaciji, je razlika v sekvenci na ali ob lokusu, ki se prenese v celico. Heterospecifična (iz druge vrste) DNK vstopi v celico *B. subtilis* z enako hitrostjo kot istovrstna DNK in nato vstopi v kompleks z recipientskim kromosomom tudi s podobno hitrostjo kot istovrstna DNK. Vendar heterospecifični kompleks donor-recipient ni stabilen in ne vodi v rekombinacijo (najbrž zaradi nesparjenih baz). Transformaciji heterospecifične DNK nasprotujejo tudi restriktijsko-modifikacijski sistemi. Vendar predstavlja restrikcija le marginalni učinek na učinkovitost transformacije med sevi *B. subtilis* (Cohan in sod., 1991). Restrikcija ima omejen učinek na transformacijo po Gramu pozitivnih bakterij, ker v celico vstopa enoverižna oblika, restriktijski encimi pa napadajo le dvoverižno DNK. Do zmanjšanja transformacije pride najbrž zaradi cepitve recipientskega kromosoma, v katerem je že integrirana donorska DNK, ki pa ni zaščitena pred cepitvijo. Transformante z razcepljenim kromosomom tako propadejo (Cohan, 2002).

### 2.8 REKOMBINACIJA

Bakterije lahko izmenjujejo dedni material s tremi paraseksualnimi mehanizmi: s transdukcijo, konjugacijo in transformacijo. Noben od teh mehanizmov ni vezan na reprodukcijo, tako da je rekombinacija med bakterijami redkejša kot med rastlinami oziroma živalmi. V večini primerov se DNK vgradi v recipientski genom s homologno rekombinacijo, pri kateri donorska DNK zamenja homologni segment v recipientu. Donorski segment, ki v recipientu nima homologa, se lahko vgradi s heterologno rekombinacijo ali pa s pomočjo insercijske sekvence. V nasprotju s konjugacijo in

transdukcijo, igra pri transformaciji recipient pomembno vlogo. Poti, ki jih kodira recipientov genom, so odgovorne za prevzem proste DNK iz okolja (Cohan, 2002).

Rekombinacija pri bakterijah se dogaja dokaj poredko. Medvrstno rekombinacijo zmanjšuje kar nekaj dejavnikov: ekološka izolacija (ločene populacije v času in prostoru), vedenjska izolacija (koncentracija in specifičnost feromonov), ovire pri vstopu DNK, aktivnost restrikcijskih endonukleaz (zaščita pred tujo, potencialno škodljivo DNK), odpornost na vgradnjo v različnih smereh razvitih DNK sekvenc, uničenje rekombinacije s popravilom mest nekomplementarnih baz v DNK, funkcijska inkompatibilnost rekombiniranih segmentov. Posamezne bakterijske vrste so genetsko zelo variabilne v teh faktorjih. Tako lahko naravna selekcija spreminja nivoje seksualne izolacije, da poveča prenos uporabnih genov za recipienta in zmanjša prenos škodljivih genov. Medvrstna rekombinacija je najuspešnejša, ko gre za kratke segmente, ki so ravno prav veliki za prenos neke adaptacije, brez da bi se zraven prenesla še potencialno škodljiva DNK. Naravna selekcija vodi k zmanjšanju seksualne izolacije med bakterijskimi vrstami. Evolucija seksualne izolacije ni pomembna za speciacijo pri bakterijah, ker je bakterijska rekombinacija prerodka, da bi nasprotovala adaptivni divergenci med prvotnimi vrstami (Cohan, 2002).

## 2.9 MORFOLOGIJA

*B. subtilis* je pomemben modelni sistem za proučevanje morfogeneze, saj se pri njem zelo dobro razvijejo različne strukture. Za produkcijo ekstracelularnega matriksa obstaja zelo zapleteno regulatorno omrežje. Ta matriks je nujen za razvoj kompleksne arhitekture kolonij, za katere so značilne izbokline, ki služijo kot mesta za sporulacijo. Če kolonija ne producira ekstracelularnega matriksa, je njen profil čisto ploščat. Kolonije izražajo glede na sporulacijo visoko stopnjo organizacije tako v času kot v prostoru. Žal pa še niso raziskali, ali tudi drugi procesi (kompetenca, gibljivost, kanibalizem) v *B. subtilis* izražajo časovno-krajevno organizacijo v koloniji (Aguilar in sod., 2007).

Sevi, ki jih že dalj časa gojijo v laboratorijih, pravimo jim tudi »udomačeni«, počasi izgubijo nepotrebne socialne funkcije (npr. rojenje) in mnogo svojih mnogoceličnih značilnosti (Julkowska in sod., 2004; Aguilar in sod., 2007). Biofilmi laboratorijskih sevov so ponavadi tanki in nediferencirani, za razliko od divjih sevov *B. subtilis*, ki gradijo izpopolnjene večcelične združbe jasnih arhitekturnih značilnosti (npr. plodna telesca) (Branda in sod., 2004). Robustnost morfologije kolonij se pri laboratorijskih sevih močno zmanjša v primerjavi s sevi, ki jih v laboratorijih niso tako obsežno manipulirali. Tekoče kulture rutinsko inokuliramo in inkubiramo s stresanjem. Tekoče vzorce nato nacepimo do posameznih kolonij. In to ponavljamo iz dneva v dan. Pogosto tudi posebej izbiramo kolonije, katerih celice lahko enostavno ločimo. Tako neposredno vplivamo na izgubo večceličnosti. Pomembno je torej, da analiziramo tako »udomačene« kot »divje« seve

(Aguilar in sod., 2007).

Populacije *B. subtilis*, ki rastejo na površini agarkega gojišča, lahko razvijejo kolonije z dovršeno arhitekturo. Morfologija je zelo odvisna od seva in okoljskih pogojev. Že majhne razlike v sestavi gojišča, temperaturi inkubacije in koncentraciji agarja v trdnem gojišču imajo velik učinek na arhitekturo kolonije. Najbrž na različno morfologijo vplivajo tako razlike v vsebnosti genov kot v njihovi regulaciji (Aguilar in sod., 2007). Pri *Pseudomonas fluorescens* so opazili, da bakterije, ki so rasle v bogatem gojišču, razvijejo veliko več različnih morfotipov kot pa bakterije iz revnega gojišča, ki tvorijo večinoma kolonije z gladko površino (Buckling, 2007).

Sev 168, ki je eden od udomačenih sevov *B. subtilis*, ne producira ne lipopeptida surfaktina ne eksopolimera poli-gama-glutamata. Ta sev ne roji in niti ne oblikuje posebnih arhitekturnih značilnosti, kar kaže na to, da ima tudi sposobnost produkcije teh snovi vpliv na morfogenezo (Aguilar in sod., 2007).

## 2.10 ROJENJE

Rojenje je koordinirano, simetrično gibanje po agarškem gojišču (vsebnost agarja od 0,6 do 1,5 %). Na ta način bakterije, ki smo jih inokulirali na sredino plošče, hitro (do 1 cm h<sup>-1</sup>) kolonizirajo velike površine in ustvarijo različne vzorce: amorfne, velika konfluentna območja, enostavno radialno razvejanost, zelo kompleksno in globoko razvejanost, fraktale, ponavljajoča koncentrična območja itd. Dolgo je veljalo, da je za rojenje *B. subtilis* potrebna prisotnost bičkov, vendar so pred kratkim opisali tudi rojenje teh bakterij brez bičkov. V rojenje je vključena tudi sinteza surfaktina (peptidni antibiotični surfaktant, ciklični lipopeptid) in ekstracelularnih proteaz, vendar ni vedno nujna (Julkowska in sod., 2004; Nakano in sod., 1991). Surfaktin je sestavljen iz sedmih aminokislin in  $\beta$ -hidroksi maščobne kisline (D'Souza in sod., 1994). Le sevi, ki ne sintetizirajo nobene od ekstracelularnih proteaz in ne surfaktina, ne rojijo (Connelly in sod., 2004). Sinteza surfaktina je kontrolirana z mehanizmom zaznavanja gostote. Ugotovili so, da na obseg rojenja in intenziteto razvejanosti vpliva koncentracija agarja, na vzorec rojenja pa vsebnost hranil. Za rojenje je potrebna ekstrakcija vode iz agarkega gojišča ali pa zmanjšanje površinske napetosti, na kar najbrž vplivajo surfaktanti. Na rojenje vpliva tudi temperatura. Pri višji (37 – 42 °C) je razvejanost kompleksnejša in tesneje pakirana, periodični krogi rojenja so manj razločni. Pri nižji temperaturi (22 – 37 °C) pa so vzorci rojenja bolj jasno izraženi, saj je rast počasnejša in periodični krogi niso več tako zabrisani (Julkowska in sod., 2004).

Po površini gojišča B (Julkowska in sod., 2004) se bakterije premikajo v obliki brstov. Ti so večslojni in vsebujejo dolge filamentozne celice. Zunanji rob brsta pa vsebuje ozek monosloj bakterij, ki so v skupinah po 4 do 6 v obliki nekakšnega splava (Julkowska in



sod., 2005). Na gojišču B lahko okrog območja rojenja opazimo prosojen pas brez bakterij, ki najbrž vsebuje surfaktin. Z njegovim izločanjem si bakterije pomagajo pri premikanju po površini (Julkowska in sod., 2004), vendar ta ni pomemben le za zagotavljanje fizične poti za hitro premikanje po površini, ampak tudi za združevanje celic v dendrite in njihovo koordinacijo (Julkowska in sod., 2005). Na gojišču LB pa sinteza surfaktina ni več nujna. Morda že fizikalno-kemična sestava samega gojišča dopušča zadrževanje površinske tekočine in tako ustvari ugodne razmere za rojenje ali pa bakterije izločajo druge biosurfaktante, ki spremenijo površino (Julkowska in sod., 2005). Zanimivo je, kar so ugotovili z dodatkom eksogene proteaze na minimalno gojišče brez proteinov: do rojenja je vseeno prišlo, kar pomeni, da sama proteolitska razgradnja sestavin gojišča ne sproži rojenja. Ekstracelularne proteaze razgradijo proteine površine celic do peptidov ali drugače modificirajo površine celic in tako sodelujejo v interakcijah (bakterija-bakterija ali bakterija-površina), ki pospešujejo premikanje po površini (Connelly in sod., 2004).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

Uporabili smo izolate vrst *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, industrijski sev *B. subtilis* (*natto*) NAF4 (Tran in sod., 2000), laboratorijski sev *B. subtilis* IS75 in divji sev *B. subtilis* 3610 (Preglednica 1). Izolate z oznako PS sta iz dveh vzorcev peščenih tal z nabrežja Save (Tacen, Slovenija) izolirali Štefanič in Mandić Mulec (2009); sevi iz drugega vzorca so označeni s krepko pisavo in z \* (Preglednica 2). Seve z oznako RO, RS in DV3 so izolirali Cohan in sod. ter Roberts in Cohan (1991; 1995) iz puščave Mojave (Rosamund in Death Valley, CA, USA). Uporabili smo tudi producerske in testerske seve *B. subtilis* (Preglednici 3 in 4).

**Preglednica 1: Puščavski sevi vrst *B. subtilis* in *B. mojavensis* ter sevi *B. natto*, *B. subtilis* 3610, *B. subtilis* 168, ki pripadajo različnim podskupinam (168, W23, mojavensis) in ferotipom (168, RS-D-2/NAF4, RO-B-2/RO-H-1, RO-E-2)**

Sev	Oznaka seva	Genotip	Podskupina	Ferotip	Vir
RO-A-4	BD2919	<i>B. subtilis</i>	168	RO-E-2	(Cohan in sod., 1991)
RO-F-3	BD2920	<i>B. subtilis</i>	168	RS-D-2/NAF4	(Cohan in sod., 1991)
RO-FF-1	BD2922	<i>B. subtilis</i>	168	168	(Cohan in sod., 1991)
RO-DD-2	BD2923	<i>B. subtilis</i>	168	RO-B-2/RO-H-1	(Cohan in sod., 1991)
RS-D-2	BD2924	<i>B. subtilis</i>	168	RS-D-2/NAF4	(Cohan in sod., 1991)
DV3-E-3	-	<i>B. subtilis</i>	W23	168	(Roberts in Cohan, 1995)
DV3-D-2	-	<i>B. subtilis</i>	W23	RO-E-2	(Roberts in Cohan, 1995)
DV3-A-1	-	<i>B. subtilis</i>	W23	RO-E-2	(Roberts in Cohan, 1995)
RO-E-2	BD2925	<i>B. subtilis</i>	W23	RO-E-2	(Cohan in sod., 1991)
RO-PP-2	BD2926	<i>B. subtilis</i>	W23	RO-E-2	(Cohan in sod., 1991)
RS-B-1	BD2978	<i>B. subtilis</i>	W23	RO-B-2/RO-H-1	(Cohan in sod., 1991)
RO-B-2	BD2917	<i>B. mojavensis</i>	mojavensis	RO-B-2/RO-H-1	(Cohan in sod., 1991)
RO-C-2	BD2918	<i>B. mojavensis</i>	mojavensis	168	(Cohan in sod., 1991)
RO-H-1	BD2977	<i>B. mojavensis</i>	mojavensis	RO-B-2/RO-H-1	(Cohan in sod., 1991)
NAF4	BD2968	<i>B. subtilis</i> ( <i>natto</i> )	168	RS-D-2/NAF4	(Tran in sod., 2000)
3610	-	<i>B. subtilis</i>	168	168	-
168	-	<i>B. subtilis</i>	168	168	-

**Preglednica 2: Nabrežni sevi *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens*, ki pripadajo različnim ferotipom (168, RS-D-2/NAF4, RO-B-2/RO-H-1, RO-E-2) (S krepko pisavo in z \* so označeni sevi iz drugega vzorca.)**

Sev	Genotip	Ferotip	Vir
PS-11	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-13	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-14	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-15	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-18	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-20	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-24	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-25	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-30	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-31	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-51	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-52	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-53	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-55	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-64*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-65*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-68*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-93*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-95*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-96*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-97	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	ni določen	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-108*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-109*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-119*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-122	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	RO-E-2	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-130*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-131*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-149*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-160*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-168*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-188	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	RO-E-2	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-194*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
<b>PS-196*</b>	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-202	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	ni določen	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-207	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	RO-E-2	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-209	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-210	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-216	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-217	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-218	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-231	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	ni določen	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-233	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-237	wt <i>B. subtilis</i>	168	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-250	wt <i>B. amyloliquefaciens</i>	ni določen	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-261	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)
PS-263	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4	(Štefanič in Mandić Mulec, 2009)

**Preglednica 3: Producerski sevi *B. subtilis* (laboratorijski sev skupine 168)**

Sev (delovna oznaka)	Genotip	Vir
IS75	<i>his leu met</i>	
BD2939	<i>his leu met srfA-lacZ(tet) amyE::xylR P<sub>xyl</sub>-comK (cat)</i> (geni <i>comQXP</i> zamenjani z geni seva <i>B. subtilis</i> RO-FF-1)	(Tortosa in sod., 2001)
PS-1000 (168P YFP)	<i>his leu met srfA-lacZ(tet) srfA-yfp (spec)</i>	(Štefanič, 2009)
PS-1001 (ROH1P YFP)	<i>his met srfA-lacZ(tet) amyE::xylR P<sub>xyl</sub>-comK (ery)</i> (geni <i>comQXP</i> zamenjani z geni seva <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-yfp (spec)</i>	(Štefanič, 2009)
PS-1008 (168P CFP)	<i>his leu met srfA-cfp (cat)</i>	(Štefanič, 2009)
PS-1009 (ROH1P CFP)	<i>his met srfA-lacZ(tet) amyE::xylR P<sub>xyl</sub>-comK (ery)</i> (geni <i>comQXP</i> zamenjani z geni seva <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-cfp (cat)</i>	(Štefanič, 2009)
PS-1011 (ROH1P MCh)	<i>his met srfA-lacZ(tet) amyE::xylR P<sub>xyl</sub>-comK (ery)</i> (geni <i>comQ comX</i> zamenjani z geni seva <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-MCherry (Kn)</i>	(Štefanič, 2009)

**Preglednica 4: Testerski sevi *B. subtilis* (laboratorijski sev skupine 168)**

Sev (delovna oznaka)	Genotip	Vir
PS-1006 (168T CFP)	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) comQ::Km srfA-cfp (cat)</i>	(Štefanič, 2009)
PS-1007 (ROH1T CFP)	<i>his met srfA-lacZ(tet) amyE::xylR P<sub>xyl</sub>-comK (ery)</i> (geni <i>comQ::pED345 comX comP</i> zamenjani z geni seva <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-cfp (cat)</i>	(Štefanič, 2009)

### 3.1.2 Kemikalije

Biolife:

tripton, kvasni ekstrakt, agar, triptoza

Merck:

NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Na-citrat × 2 H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, KCl,  
Tris-HCl, Tris-base, FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, levcin,  
96-odstotni etanol, ledocetna kislina

Difco:

TBAB, triptofan

BD (Difco):

kazeinski hidrolizat

Fluka Analytical:

R-2A (gojišče za gojenje počasi rastočih bakterijskih vrst)

Kemika:

glukoza, fenol

Zorka-Šabac:

CaCl<sub>2</sub>

<u>Riedel-de Haën AG (Seelze-Hannover):</u>	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O
<u>Fluka:</u>	glutaminska kislina, lizin, histidin, SDS
<u>Sigma:</u>	metionin, agaroz, EDTA, etidijev bromid, kloroform, izoamilalkohol, kloramfenikol, kanamicin, spektinomycin
<u>Fermentas:</u>	GeneRuler™ 6 × Loading Dye Solution, GeneRuler™ DNA Ladder Mix
<u>Promega:</u>	MgCl <sub>2</sub>

### 3.1.3 Encimi

<u>Sigma:</u>	lizocim
<u>Fermentas:</u>	ribonukleaza "Rnase A", Proteinaza K
<u>Roche:</u>	Taq DNK-polimeraza

### 3.1.4 Pufri in raztopine

#### TES pufer:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

#### Pufer 50 × TAE (Tris acetatni pufer):

Tris-base	242,0 g
ledocetna kislina	57,1 ml
0,5 M EDTA (ph 8,0)	100 ml
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml

#### Raztopina etidijevega bromida

etidijev bromid (10 mg/l)	50 µl
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml

### 3.1.5 Gojišča

#### Gojišče LB

tripton	10 g
NaCl	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml
(agar	15 g)

#### Gojišče TBAB

TBAB (Tryptose Blood Agar Base)	33 g
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml

#### Gojišče R-2A

R-2A	18,12 g
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml

#### Gojišče 1 × SS

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
Na-citrat × 2 H <sub>2</sub> O	1 g
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml

#### Kompetenčno gojišče

glukoza (50-odstotna)	5 ml
kazeinski hidrolizat (2-odstotni)	5 ml
kvasni ekstrakt (10-odstotni)	5 ml
metionin (10 mg/ml)	2,5 ml
levcin (10 mg/ml)	2,5 ml
histidin (10 mg/ml)	2,5 ml
1 × SS	do 500 ml

#### Gojišče TY

triptoza	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml
agar	10 g

Gojišče B

I.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,982 g
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	1,972 g
	KCl	2,013 g
	Na-citrat × 2 H <sub>2</sub> O	2,058 g
	H <sub>2</sub> O	do 900ml
II.	Tris-HCl (pH 7,5)	7,88 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,082 g
	CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,294 g
	raztopina FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O (10 mM)	0,1 ml
	raztopina MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O (100 mM)	0,1 ml
	glutaminska kislina	0,842 g
	triptofan	0,159 g
	lizin	0,126 g
	glukoza	2 g
	H <sub>2</sub> O	do 100ml
	zmešamo I in II, dodamo še:	
	agar	7 g

Koncentracije antibiotikov v gojišču:

kloramfenikol	5 µg/ml
kanamicin	5 µg/ml
spektinomycin	100 µg/ml

## 3.2 METODE

**3.2.1 Priprava izrabljenih gojišč**

Seve smo nacepili na trdna gojišča TBAB in jih čez noč inkubirali pri 37 °C. Kulturo smo resuspendirali v 500 µl fiziološke raztopine, 50 µl te suspenzije nacepili v 7 ml kompetenčnega gojišča in stresali pri 200 rpm in 37 °C. Med tem smo do faze T2 (2 uri po vstopu v stacionarno fazo) merili optično gostoto. V točki T2 smo odstranili celice z 10 minutnim centrifugiranjem pri 10000 × g, nato pa supernatant sterilizirali s filtriranjem čez 0,22 µm filter in izrabljeno gojišče shranili pri -20 °C.

**3.2.2 Merjenje fluorescence sevov z vgrajenim genom za izražanje fluorescečnega proteina**

Seve smo nacepili v kompetenčno gojišče z ustreznim antibiotikom in 10 ur stresali pri 200 rpm in 37 °C. Nato smo v vdolbinice na mikrotitrski ploščici, ki so vsebovale 190 µl kompetenčnega gojišča (oziroma 95 µl kompetenčnega gojišča in 95 µl kondicioniranega gojišča) nacepili po 10 µl kulture (različne kombinacije različnih sevov), in dodali sterilne

steklene kroglice s premerom 3 mm. Naredili smo 4 paralelke vsake kombinacije in poskus ponovili štirikrat. Uporabili smo producerske seve (producirajo ComX, ki inducira produkcijo fluorescenčnega proteina) in testerske (ne producirajo aktivnega ComX) seve *B. subtilis* 168 in *B. subtilis* RO-H-1 z vgrajenim genom za izražanje fluorescenčnega proteina YFP, CFP oziroma mCherry. Seva 168 in RO-H-1 pripadata dvema različnima fenotipskima skupinama, zato njuna QS sistema nista kompatibilna. Mikrotitrsko ploščico smo stresali 13 ur pri 200 rpm in 37 °C in nato izmerili fluorescenco s čitalcem mikrotitrskih plošč Saffire II proizvajalca Tecan (Avstrija). Čitalec v vsaki vdolbinici 10-krat izmeri fluorescenco in izračuna povprečje, rezultati so podani v enotah RFU (relative fluorescence units). Vsako mikrotitrsko ploščo smo izmerili dvakrat. Podatke smo obdelali s programom Magellan (Tecan, Švica). Pri fluorescenčnem proteinu YFP smo za ekscitacijo uporabili svetlobo valovne dolžine 515 nm in intenziteto fluorescence merili pri 530 nm. Pri proteinu CFP smo za ekscitacijo uporabili valovno dolžino 445 nm in merili pri 477 nm, pri proteinu mCherry pa smo vzbujali s svetlobo valovne dolžine 587 nm, merili pa pri 610 nm.

### 3.2.3 Izolacija kromosomske DNK divjih sevov vrst *Bacillus*

Izolate *B. subtilis* smo nacepili v tekoče gojišče LB in jih preko noči stresali pri 200 rpm in 37 °C. Kulturo smo 100-krat razredčili s svežim gojiščem LB, ki smo mu dodali glukozo do končne koncentracije 1 %, ki prepreči sporulacijo bakterij, in jih gojili s stresanjem pri 37 °C do pozne eksponentne stopnje rasti. 1,5 mL kulture smo prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 min pri 16000 × g. Supernatant smo odstranili in ponovno centrifugirali 1,5 mL kulture iz pozne eksponentne faze rasti, tako da je znašal skupni volumen, iz katerega smo izolirali DNK, 3 mL. Po zadnjem centrifugiranju (5 min, 16000 × g) smo supernatant previdno odstranili s pipeto in celice resuspendirali v 300 µL (kar znaša 1/10 volumna, iz katerega smo izolirali DNK) pufra TES. Nato smo dodali 6 µL lizocima koncentracije 50 mg/mL (končna koncentracija 1 mg/mL) in 2 µL ribonukleaze "Rnase A" koncentracije 10 mg/mL (končna koncentracija 60 µg/mL) ter inkubirali 30 min pri 37 °C. Nato smo dodali 33 µL 10-odstotne raztopine SDS (končna koncentracija 1-odstotna) in 2 µL Proteinaze K koncentracije 20 mg/mL (končna koncentracija 120 µg/mL) in inkubirali čez noč pri 50 °C. Naslednji dan smo dodali 200 µl fenola in premešali. Nato smo centrifugirali 10 min pri 16000 × g in prenesli fazo TES v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 200 µl mešanice kloroforma in izoamilalkohola (24:1), in spet centrifugirali 10 min pri 16000 × g. Fazo TES smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 500 µl (kar znaša 2,5 volumna faze TES) hladnega 96-odstotnega etanola ter zmešali precipitat. Nato smo centrifugirali 30 s pri 16000 × g, odstranili supernatant, ponovno dodali 500 µl 96-odstotnega etanola in pustili 15 min pri 0 °C. Spet smo centrifugirali 30 s pri 16000 × g, odlili supernatant, še enkrat centrifugirali 30 s pri 16000 × g in supernatant odstranili s pipeto. Usedlino smo posušili ob ognju, dodali 150 µl vode in z obračanjem mikrocentrifugirke zmešali vsebino. Raztopljeno DNK smo shranili pri -4



°C.

### 3.2.4 Rastna hitrost

Seve smo nacepili v 3 ml LB in stresali preko noči pri 200 rpm in 37 °C. Nato smo 50 µl prekonočne kulture nacepili v 8 ml kompetenčnega gojišča in stresali pri 200 rpm in 37 °C. Kulturi v kompetenčnem gojišču smo merili optično gostoto na vsakih 30 minut s fotometrom (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija) pri valovni dolžini 650 nm in izračunali rastno hitrost. Izvedli smo 2 oziroma 3 ponovitve.

Izračun rastne hitrosti: 
$$\mu = \frac{(\log_{10} N - \log_{10} N_0) \times \ln 10}{t - t_0}$$

Izračun generacijskega časa: 
$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

N – optična gostota pri času t

N<sub>0</sub> – optična gostota pri času t<sub>0</sub>

t – čas konca eksponentne faze rasti

t<sub>0</sub> – čas začetka eksponentne faze rasti

### 3.2.5 Transformacija s kromosomsko DNK

Seve smo nacepili v 3 ml LB in stresali preko noči pri 200 rpm in 37 °C. Nato smo 50 µl prekonočne kulture nacepili v 8 ml kompetenčnega gojišča in stresali pri 200 rpm in 37 °C. Med tem smo do faze T2 (2 uri po vstopu v stacionarno fazo) merili optično gostoto s fotometrom (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija) pri valovni dolžini 650 nm. V točki T2 smo 500 µl kulture dodali 5 µl DNK seva *B. subtilis* BD 2939, ki je odporen na kloramfenikol. Negativni kontroli (500 µl kulture) DNK nismo dodali. Transformacijsko mešanico in negativno kontrolo smo stresali pri 200 rpm in 37 °C 30 minut ter jima nato dodali 500 µl gojišča LB in stresali pri 200 rpm in 37 °C 1 uro. Po eni uri smo po 10 µl, 100 µl oziroma 790 µl transformacijske mešanice razmazali na trdno gojišče LB s kloramfenikolom (5 µg/ml). 1 ml negativne kontrole smo prav tako razmazali na trdno gojišče LB s kloramfenikolom (5 µg/ml). Na trdno gojišče LB brez antibiotika smo razmazali po 100 µl 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> redčene transformacijske mešanice. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Prešteli smo število kolonij na vsaki plošči in izračunali frekvenco transformacije.

Izračun frekvence transformacije:

A – število kolonij na plošči z 10 µl transformacijske mešanice

B – število kolonij na plošči z 100 µl transformacijske mešanice

C – število kolonij na plošči z 790 µl transformacijske mešanice

D – število kolonij na plošči z 10<sup>-6</sup> razredčeno transformacijsko mešanico

E – število kolonij na plošči z  $10^{-7}$  razredčeno transformacijsko mešanico

F – število kolonij na plošči z  $10^{-8}$  razredčeno transformacijsko mešanico

$$\frac{\text{št. transformant}}{\text{ml}} = \frac{(A \times 100 + B \times 10 + C \times \frac{1000}{790})}{3} \times 2$$

$$\frac{\text{št. vseh}}{\text{ml}} = \frac{D \times 10^6 + E \times 10^7 + F \times 10^8}{3} \times 2$$

$$\text{frekvenca transformacije} = \frac{\text{št. transformant}}{\text{št. vseh}}$$

$$\text{stopnja transformacije} = \log(\text{frekvenca transformacije})$$

### 3.2.6 Agarozna gelska elektroforeza

Za analizo molekul DNK smo uporabljali 0,8-odstotni agarozni gel. Agarozo smo raztopili v pufru  $1 \times \text{TAE}$ . Vzorce smo zmešali z barvilom GeneRuler™  $6 \times \text{Loading Dye Solution}$  (Fermentas), elektroforeza pa je običajno potekala pri stalni napetosti 80 V v elektroforetski napravi Standard Power Pack P25 (Biometra, Nemčija). Agarozni gel smo nato pobarvali v raztopini etidijevega bromida in razbarvali v vodi. Ločene fragmente DNK smo po elektroforezi opazovali pri UV svetlobi na transiluminatorju in fotografirali s polaroidnim fotoaparatom.

### 3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Gene *recA* smo pomnožili v reakcijah s končnim volumnom 50  $\mu\text{l}$ , ki so vsebovali 2 U *Taq* DNK-polimeraze (Roche), 5  $\mu\text{l}$   $10 \times$  pufra (Roche), 200  $\mu\text{M}$  mešanico dNTP-jev (Fermentas), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Promega), 400 nM začetne oligonukleotide *recAF* in *recAR* (Invitrogen). Kot matrico smo dodali 2  $\mu\text{l}$  izolirane kromosomske DNK (DNK puščavskih sevov je bila 10-krat bolj koncentrirana kot DNK nabrežnih sevov). Vse reakcije so tekle v napravi Biometra UNO-Thermoblock™ (Biometra, Nemčija).

Zaporedji para začetnih oligonukleotidov:

*recAF*: 5'- AGT GAT CGT CAG GCA GCC -3'

*recAR*: 5'- TTA TTC TTC AAA TTC GAG TTC TTC TTG TGT -3'

**Program PCR:**

94 °C	<u>3 min</u>	1 cikel
94 °C	30 s	
53 °C	60 s	30 ciklov
72 °C	<u>90 s</u>	
72 °C	10 min	1 cikel

Po končani reakciji smo produkte, ki naj bi bili veliki približno 1 kbp, preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

**3.2.8 Sekvenciranje**

Gen *recA* smo poslali na sekvenciranje na Macrogen inc. (Seul, Južna Koreja). Uporabili so začetni nukleotid *recAF* (5'- AGT GAT CGT CAG GCA GCC -3').

**3.2.9 Filogenetske analize**

Filogenetske analize smo opravili s programskim paketom MEGA4 (Tamura in sod., 2007). Za izdelavo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Bootstrap s 1500 ponovitvami in Minimal evolution ter substitucijski model Tamura-Kumar (Tamura in Kumar, 2002). Izmed danih možnosti programa smo izbrali tisto, ki odstrani vsa mesta, ki vsebujejo vrzeli oziroma nedoločen nukleotid. V bazi podatkov NCBI smo poiskali še sekvence gena *recA* drugih vrst rodu *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*) in jih vključili v analizo.

**3.2.10 Določevanje morfortipov**

Seve smo nacepili na agarska gojišča LB, TBAB in R-2A. Gojišči TBAB in LB smo nato inkubirali 24 ur pri 37 °C in nato še 24 ur pri sobni temperaturi. Gojišča R-2A pa smo inkubirali 24 ur pri 37 °C in nato še 48 ur pri sobni temperaturi. Kolonije smo slikali pod stereomikroskopom (Leica MZ-FLIII) z digitalnim fotoaparatom (Nikon Coolpix 4500) in jih opisali.

Opisali smo različne lastnosti kolonij (Priloge B, C in D):

- pravilna oziroma nepravilna oblika
- nazobčani, nenazobčani, valoviti, nabrani, popkasti, rizoidni, krpasti oziroma nitasti robovi oziroma
- prisotnost prozorne cone na robu kolonije
- hrapava oziroma gladka površina
- prisotnost pike oziroma progaste lise na površini
- radialna, nepravilna oziroma ni gubavosti

- dvignjen, gobasto dvignjen, popkasto dvignjen, kraterski, nazobčano kraterski, konkaven, konveksen oziroma ploščat profil

Vsakemu sevu smo za vsako lastnost pripisali vrednost 0 (odsotnost lastnosti) oziroma vrednost 1 (prisotnost lastnosti) in te podatke obdelali s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija), pri katerem smo uporabili metodi Jaccard in UPGMA. S programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija) smo seve razdelili v skupine glede na morfološke lastnosti. Celoten poskus smo izvedli enkrat, pred tem pa smo seve enkrat nacepili na vsa tri trdna gojišča (TBAB, LB in R-2A) in opazovali morfologijo kolonij, ki je bila podobna kakor v kasnejšem celotnem poskusu, v katerem smo podatke obdelali tudi s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija).

### 3.2.11 Ugotavljanje gibljivosti

Seve smo nacepili na agarško gojišče TY in inkubirali 4 dni pri 28 °C. Nacepili smo jih tudi na agarško gojišče B in jih inkubirali 3 dni pri 28 °C. Vmes smo jih slikali z digitalnim fotoaparatom (Canon EOS 300D) in jih opisali. Na obeh gojiščih smo merili hitrost rojenja sevov. Na gojišču TY smo hitrost določili glede na velikost območja rojenja po 96 urah, pri gojišču B pa po 40 urah. Na gojišču TY so bili razredi glede na hitrost rojenja: majhna (0-23 mm), srednja (24-49 mm), hitra (50-85 mm); na gojišču B so bili razredi enaki, le da je bila meja med majhno in srednjo hitrostjo 19mm/20mm.

Na gojišču TY smo opisali različne lastnosti rojenja (Priloga E):

- valoviti, nazobčani, puhasti oziroma brsteči robovi
- gosta, rahla, nepravilna, radialna, kraterska oziroma ni gubavosti
- kjer ni bilo gubavosti, še hrapava oziroma progasta površina
- posebne oblike (prisotnost velikih brstov, rojenje v obliki rozete)

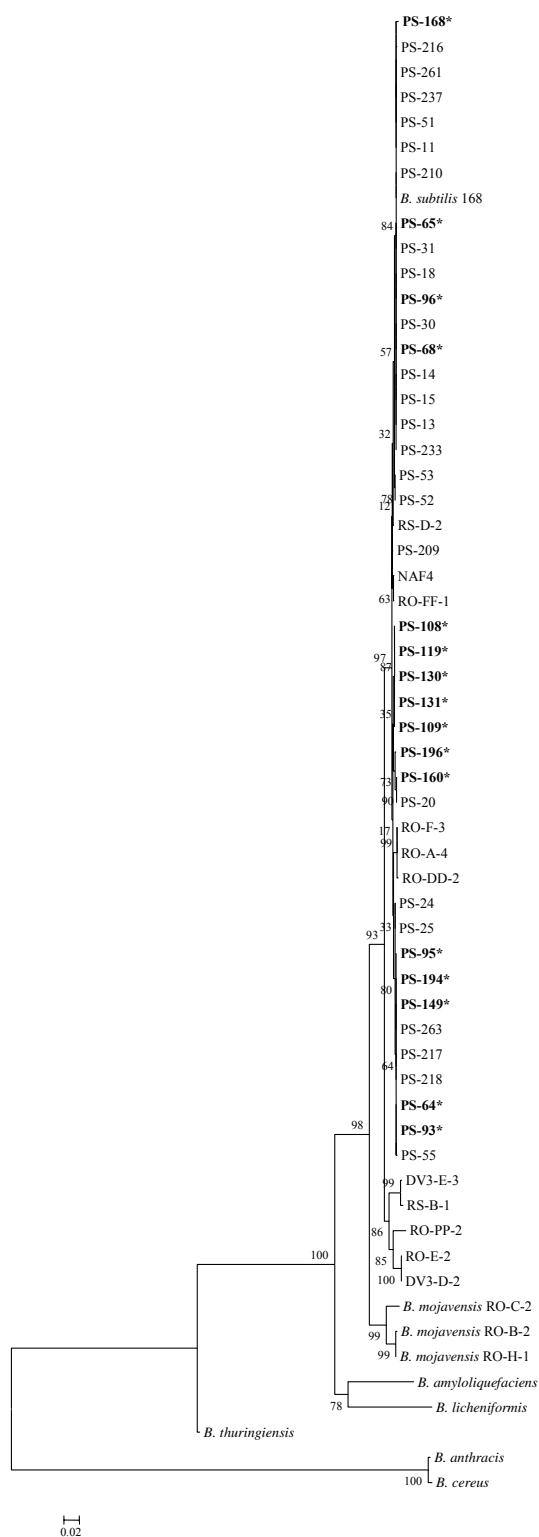
Na gojišču B smo opisali prisotnost rizoidov, kapelj, kapljic, sluzi, meglic, lovka oziroma kodrov.

Vsakemu sevu smo za vsako lastnost pripisali vrednost 0 (odsotnost lastnosti) oziroma vrednost 1 (prisotnost lastnosti) in te podatke obdelali s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija), pri katerem smo uporabili metodi Jaccard in UPGMA. S programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija) smo seve po opisu gibanja razdelili v različne skupine. Celoten preizkus smo izvedli enkrat, pred tem pa smo seve enkrat nacepili na obe gojišči (TY in B) in merili hitrost rojenja, ki je bila približno enaka kot v kasnejšem celotnem poskusu.

## 4 REZULTATI

### 4.1 FILOGENETSKA ANALIZA SEVOV *B. subtilis* IN *B. mojavensis* (SEKVENCIRANJE GENA *recA*)

Glede na podobnost sekvenc *recA* (Slika 2) se vsi izolati *B. subtilis* iz nabrežja reke Save (sevi z oznako PS) uvrščajo v podvrsto *B. subtilis* subsp. *subtilis* (podskupina 168), medtem ko se puščavski sevi uvrščajo v dve podvrsti: *B. subtilis* subsp. *subtilis* (sevi RS-D-2, RO-FF-1, RO-F-3, RO-A-4, RO-DD-2) in *B. subtilis* subsp. *spizizenii* – podskupina W23 (sevi DV3-E-3, RS-B-1, RO-PP-2, RO-E-2 in DV3-E-3) in tudi v ločeno vrsto *B. mojavensis*. Dendogram podobnosti na osnovi sekvenc *recA* se ujema z razporeditvijo sevov v filotipske skupine na osnovi delnih sekvenc *gyrA* (Štefanič in Mandić Mulec, 2009).



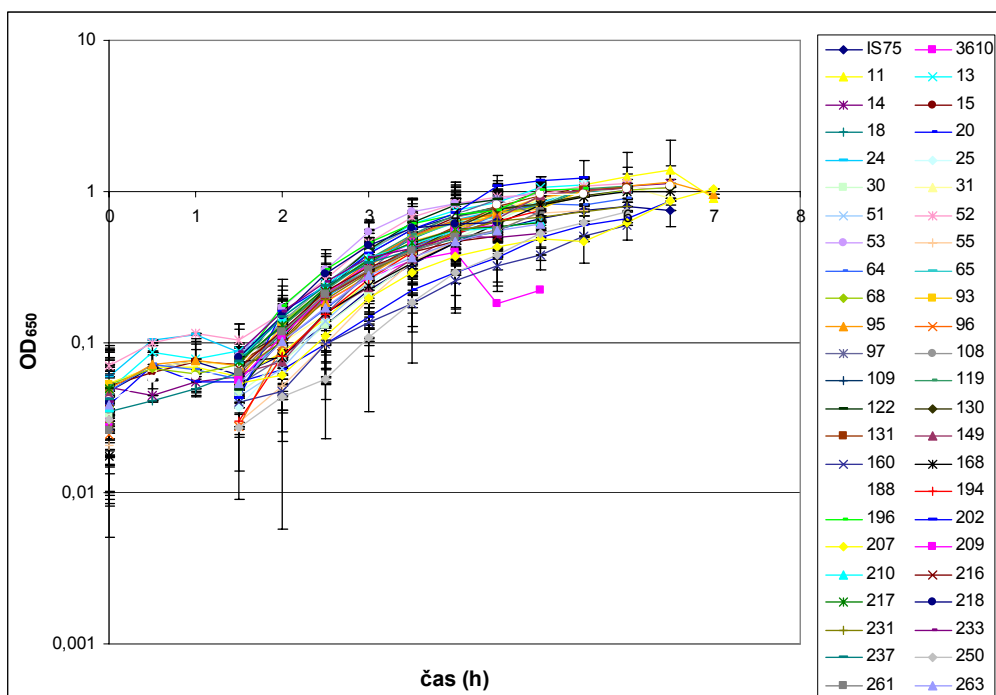
Slika 2: Filogenetska analiza puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov *B. subtilis* in *B. mojavensis* (celoten gen *recA*)

#### 4.2 RASTNE HITROSTI SEVOV *B. subtilis* IN *B. amyloliquefaciens*

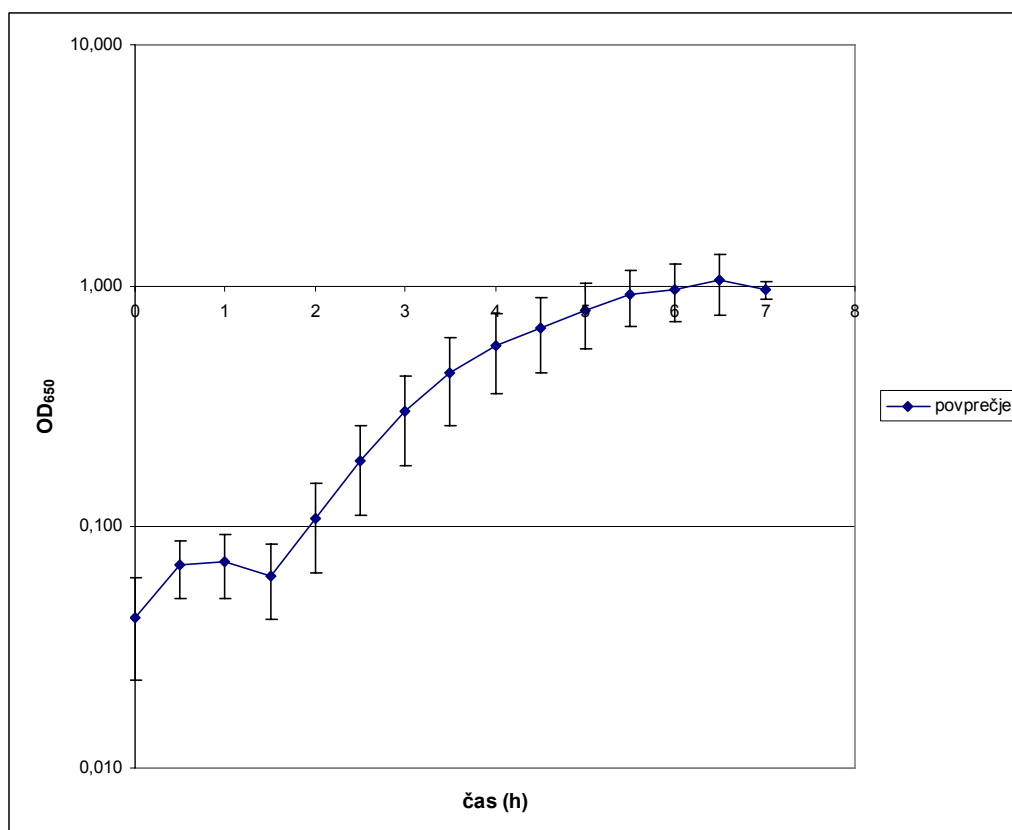
Povprečne rastne krivulje so si podobne pri vseh nabrežnih sevih, nobenih razlik ni opaziti niti med različnimi ferotipskimi skupinami (Slika 3 in 4). Pri vseh sevih je povprečna rastna hitrost okoli  $1,3 \text{ h}^{-1}$  in generacijski čas okoli 35 minut (Preglednica 5). Rastna hitrost najhitreje rastočega seva je  $1,7 \text{ h}^{-1}$  (PS-96), najpočasneje rastočega pa  $0,96 \text{ h}^{-1}$  (PS-250) (Priloga A).

**Preglednica 5: Povprečna rastna hitrost in generacijski čas posameznih ferotipskih skupin nabrežnih sevov *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens***

Ferotipske skupine	rastna hitrost $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	standardni odklon $\mu$	generacijski čas g (h)	standardni odklon g
<b>168,00</b>	1,30	0,19	0,55	0,09
<b>RS-D-2/NAF4</b>	1,26	0,15	0,56	0,07
<b>RO-B-2/RO-H-1</b>	1,27	0,16	0,56	0,07
<b>RO-E-2</b>	1,29	0,24	0,56	0,10
<b>ni določena</b>	1,21	0,34	0,63	0,20



Slika 3: Povprečne rastne krivulje nabrežnih sevov *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens*



Slika 4: Skupna povprečna rastna krivulja za nabrežne seve *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens*



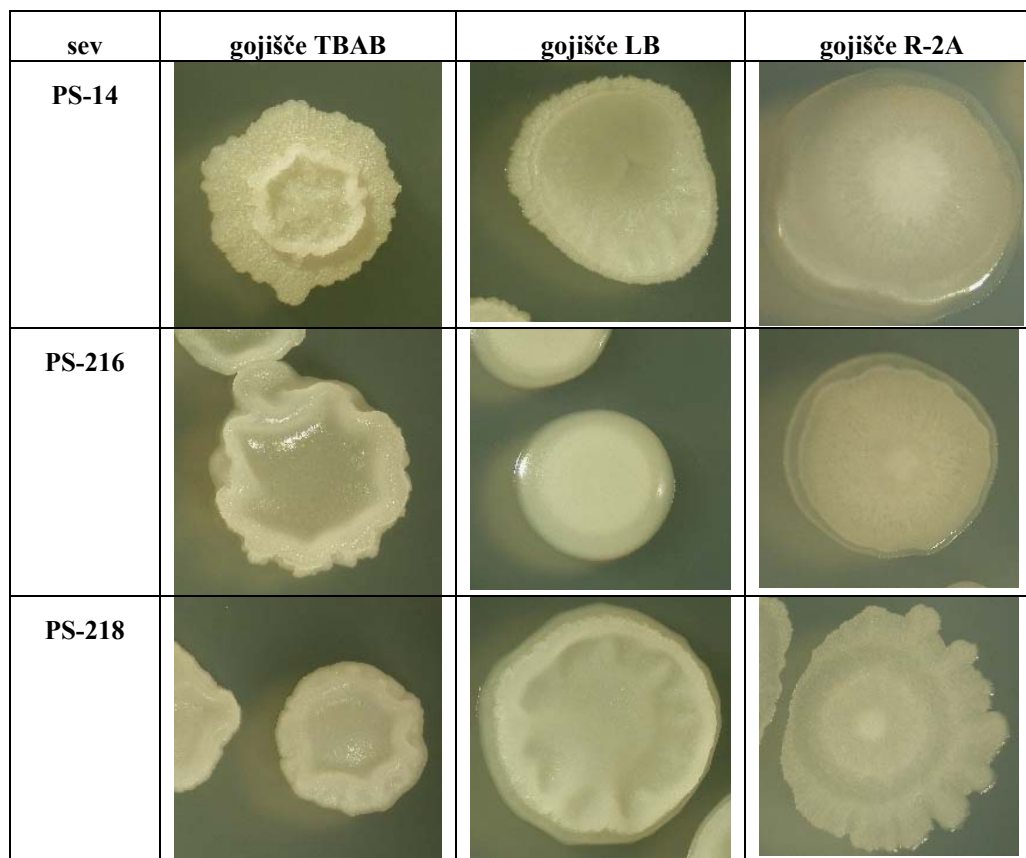
4.3 TRANSFORMACIJA SEVOV *B. subtilis* IN *B. amyloliquefaciens*Preglednica 6: Stopnja transformacije nabrežnih sevov *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens* (– pomeni neuspešno transformacijo; n pomeni, da ni podatka; krepka pisava in \* ponazarjata seve iz 2. vzorca)

Ferotipske skupine	Izolat	Stopnja transformacije			Povprečna stopnja transf.	Standardni odklon
		1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev		
Referenčni sev	IS75	n	-4,82	-5,23	-5,03	0,29
	3610	-	-	-	-	-
168 ( <i>B. subtilis</i> )	PS-11	-6,36	-5,03	n	-5,69	0,94
	PS-13	-5,48	-3,91	n	-4,69	1,11
	PS-14	-4,93	-5,11	n	-5,02	0,13
	PS-15	-	-	n	-	-
	PS-18	-5,94	-6,72	n	-6,33	0,55
	PS-30	-5,32	-4,11	n	-4,72	0,85
	PS-51	-5,00	-4,33	n	-4,67	0,48
	<b>PS-65*</b>	-5,60	-6,26	n	-5,93	0,46
	<b>PS-68*</b>	-5,27	-5,56	n	-5,41	0,20
	<b>PS-96*</b>	-5,95	-5,39	n	-5,67	0,40
	<b>PS-168*</b>	-5,19	-4,74	n	-4,97	0,31
	PS-216	-3,71	-3,74	n	-3,73	0,02
	PS-233	-	-	n	-	-
	PS-237	-4,21	-4,53	n	-4,37	0,22
RS-D-2/ NAF4 ( <i>B. subtilis</i> )	PS-20	-	-	-	-	-
	PS-24	-	-	n	-	-
	PS-25	-	-	n	-	-
	<b>PS-160*</b>	-	-	n	-	-
	PS-263	-	-	n	-	-
	<b>PS-64*</b>	-7,39	-	-	-	-
	<b>PS-194*</b>	-	-	-	-	-
	<b>PS-196*</b>	-6,42	-5,76	n	-6,09	0,47
	PS-217	-	-	n	-	-
	PS-218	-5,84	-6,08	n	-5,96	0,16
RO-B-2/ RO-H-1 ( <i>B. subtilis</i> )	PS-52	-5,73	-6,89	n	-6,31	0,81
	PS-53	-6,31	-5,90	n	-6,11	0,29
	<b>PS-93*</b>	-	-	-	-	-
	<b>PS-95*</b>	-	-	-	-	-
	<b>PS-108*</b>	-	-	n	-	-
	<b>PS-109*</b>	-	-	n	-	-
	<b>PS-119*</b>	-	-	n	-	-
	<b>PS-130*</b>	-	-	n	-	-
	<b>PS-131*</b>	-	-	n	-	-
	PS-31	-6,26	-5,95	n	-6,10	0,21
	PS-55	-	-	-	-	-
	<b>PS-149*</b>	-5,48	-4,90	n	-5,19	0,41
	PS-209	-4,84	-5,19	n	-5,01	0,25
	PS-210	-5,47	-5,25	n	-5,36	0,16
PS-261	-7,08	-	-	-	-	
RO-E-2 ( <i>B. amyloli.</i> )	PS-122	-	-	n	-	-
	PS-188	-	-	n	-	-
	PS-207	-	-	n	-	-
ferotip ni določen ( <i>B. amyloli.</i> )	PS-97	-	-	n	-	-
	PS-202	-	-	n	-	-
	PS-231	-	-	n	-	-
	PS-250	-	-	n	-	-

Stopnja transformacije (Preglednica 6) je najvišja pri sevih iz ferotipske skupine 168 (86 % sevov smo transformirali s stopnjo transformacije, ki je višja od -7), nekoliko nižja pri sevih iz skupine RO-B-2/RO-H-1 (40 % sevov s stopnjo transformacije, ki je višja od -7), najmanjša pa pri sevih iz skupine RS-D-2/NAF4 (20 % sevov s stopnjo transformacije, ki je višja od -7). Transformacija sevov *B. amyloliquefaciens* z DNK *B. subtilis* RO-FF-1 ni bila uspešna, kar je bilo pričakovati, saj je homologija donorske DNK, ki izhaja iz druge vrste lahko prenizka. Sev *B. subtilis* 3610 se ni transformiral, stopnja transformacije laboratorijskega seva IS75 pa je bila relativno visoka (-5,03) in primerljiva s stopnjo transformacije pri sevih ferotipske skupine 168 (PS-11, PS-13, PS-14, PS-18, PS-30, PS-51, PS-65, PS-68, PS-96, PS-168, PS-216, PS-237), kjer je stopnja transformacije variirala med (od -3,73 do -6,33).

#### 4.4 MORFOLOGIJA SEVOV *B. subtilis*, *B. mojavensis* IN *B. amyloliquefaciens*

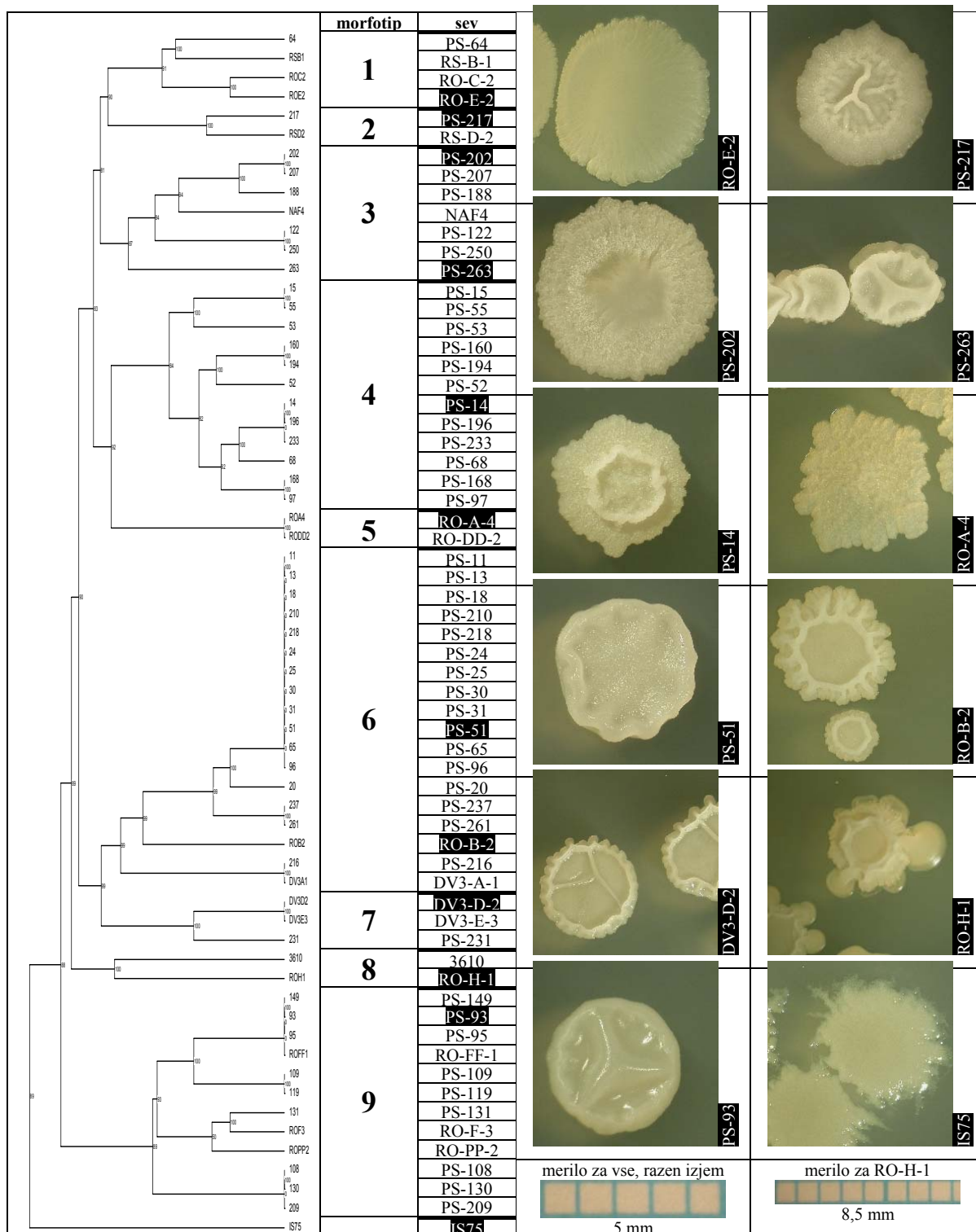
Čeprav so nabrežni in puščavski izolati vrste *Bacillus subtilis* filogenetsko zelo sorodni, tvorijo več komunikacijskih skupin ali ferotipov. V okviru te diplomske naloge smo preverjali, ali je raznolikost med temi izolati opazna tudi na nivoju morfologije kolonij in ali morfologija kolonij na trdnih gojiščih korelira s ferotipi. Rast sevov smo opazovali na treh različnih gojiščih (TBAB, LB in R-2A) in ugotovili, da so sevi zelo morfološko raznoliki (Slike 6, 7 in 8) kljub filogenetski sorodnosti. Ugotavljamo tudi, da je morfologija posameznega seva na različnih gojiščih lahko različna, kot je na primer prikazano na Sliki 5. Z računalniškim programom Bionumerics (Applied Maths NV, Belgija) smo seve razdelili v skupine glede na morfološke lastnosti in izrisali drevo podobnosti, ki ločuje seve glede na morfološke lastnosti kolonij na vseh treh gojiščih. Ugotovili smo, da morfotipi ne korelirajo s ferotipi.



Slika 5: Morfologija kolonij nekaterih sevov *B. subtilis* iz nabrežja Save (PS-14, PS-216 in PS-218) na agarških gojiščih TBAB, LB in R-2A (velikost slike je 5mm × 5mm)

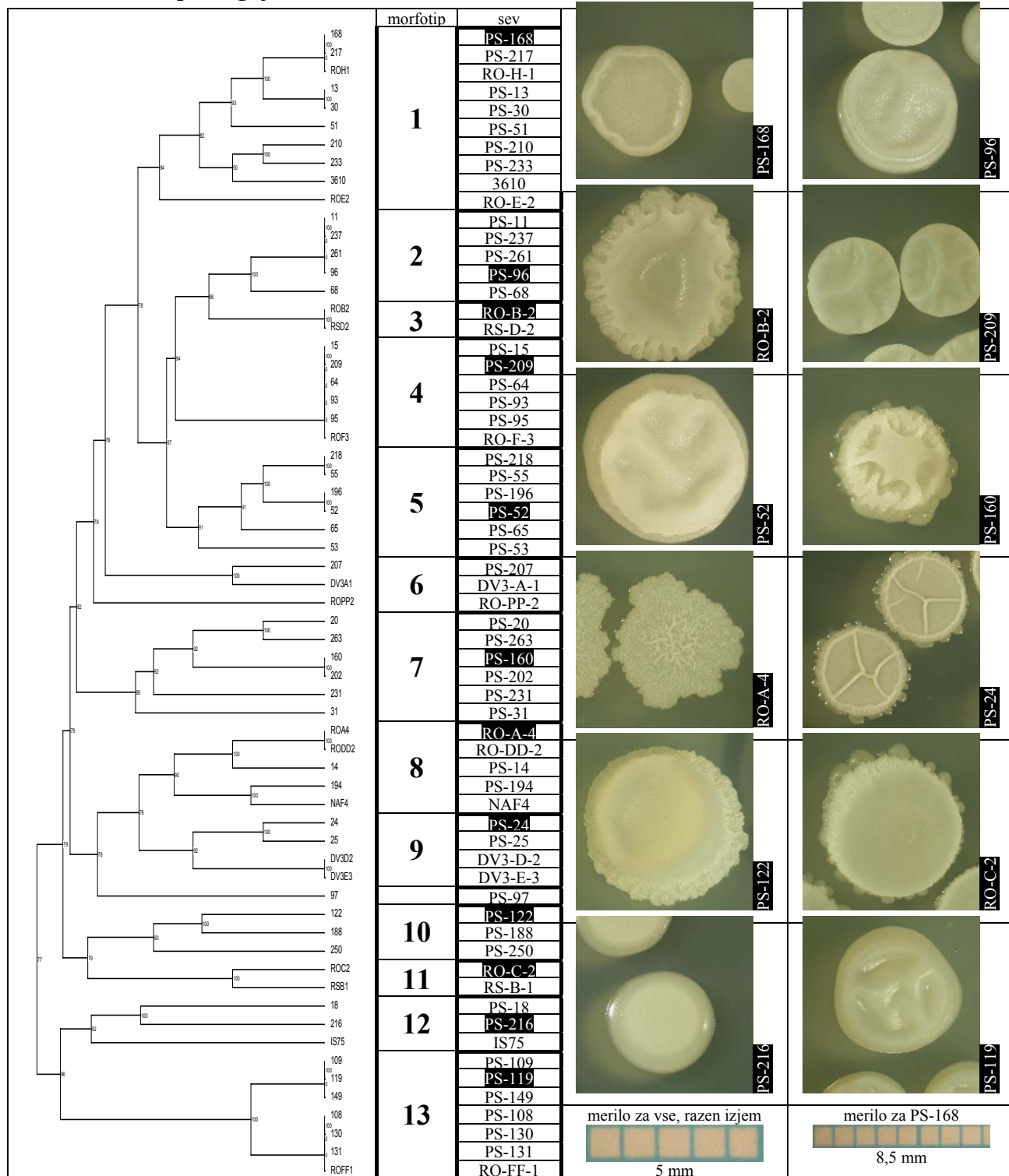
#### 4.4.1 Morfotipi na gojišču TBAB

Glede na morfologijo kolonij, ki so zrasle na gojišču TBAB smo seve razdelili v 9 morfotipov (Slika 6, Priloga B). Za morfotipe od 1 do 6 je značilna hrapava površina, za morfotipe 7, 8 in 9 pa gladek sijaj. Značilnost morfotipa 1 je nazobčan rob in dvignjen profil. Za skupino 2 so značilne nepravilno nagubane kolonije z valovitim robom in dvignjenim profilom. Morfotip 3 predstavljajo sevi, ki oblikujejo radialno nagubane kolonije pravilne oblike, ki se v sredi dvigujejo. V skupini 4 najdemo seve, katerih kolonije so večinoma nenagubane, z nazobčanimi robovi in kraterskim profilom. V skupini 5 so sevi, ki oblikujejo nenagubane kolonije z nazobčanim robom in ploščatim profilom. Morfotip 6 predstavljajo nenagubane kolonije z valovitim robom in konkavnim profilom. V skupini 7 so sevi, ki oblikujejo nepravilno nagubane kolonije z nazobčanim robom. Te kolonije so ploščate in pravilne oblike. V skupini 8 pa najdemo nenagubane kolonije s kraterskim profilom. V morfotip 9 pa spadajo kolonije s nenazobčanim robom in pravilne oblike.



Slika 6: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rast na gojišču TBAB (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))

#### 4.4.2 Morfotipi na gojišču LB

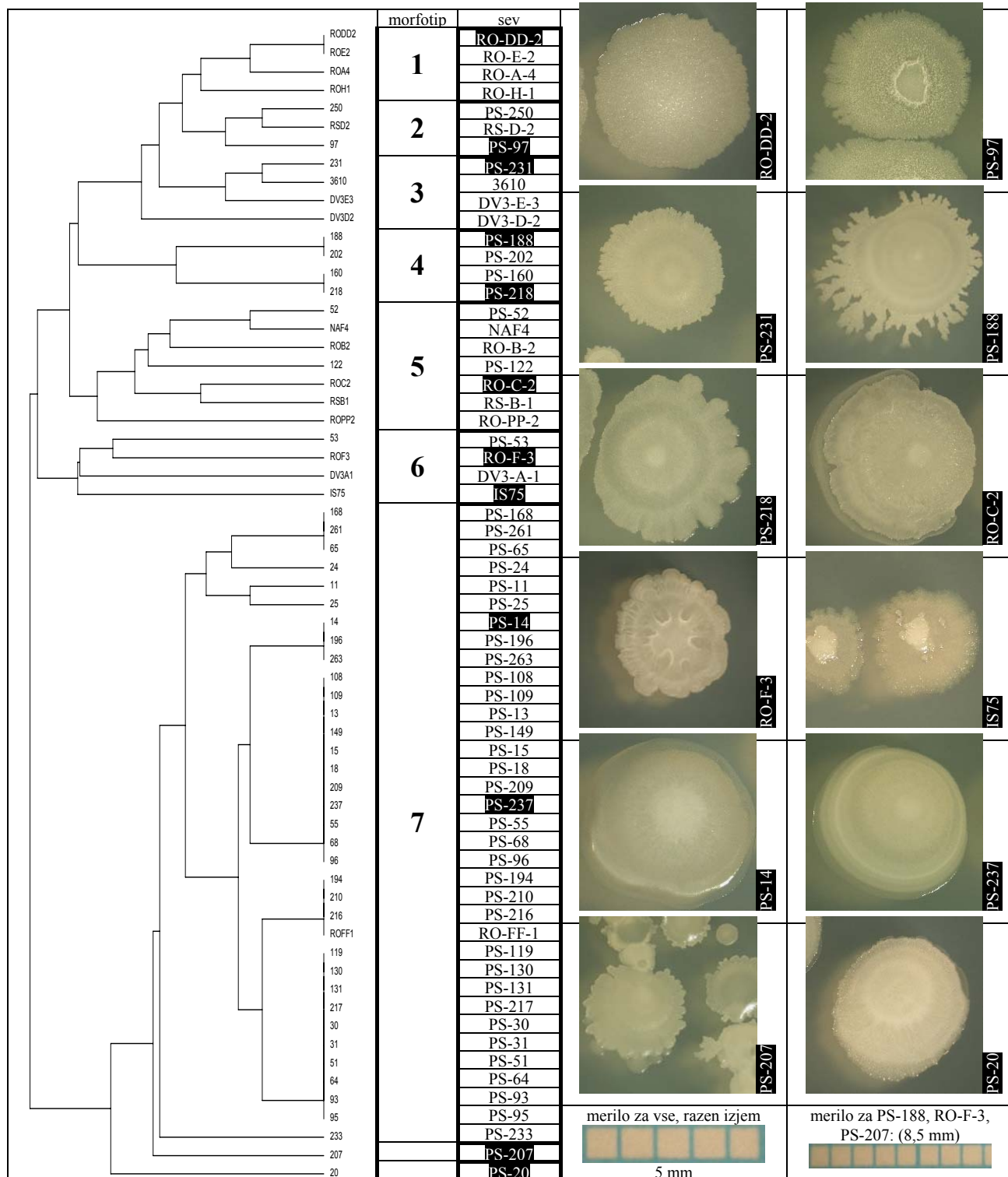


Slika 7: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rast na gojišču LB (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))

Glede na rast na gojišču LB smo seve razvrstili v 13 skupin (Slika 7, Priloga C). Za skupine od 1 do 11 je značilna hrapava površina kolonij, sa seve iz skupin 12 in 13 pa gladka površina kolonij. Za morfotip 1 je značilen še konkavno-ploščat profil, za morfotip 2 konkavno-dvignjen profil, za morfotip 3 pa nabrani robovi. V skupini 4 najdemo seve, ki oblikujejo pravilne kolonije z dvignjenim profilom in nepravilno nagubano površino. V skupini 5 so sevi, katerih kolonije so konkavne in nepravilno nagubane. Za morfotip 6 so značilni valoviti robovi, za morfotip 7 konkaven profil in popkasto dvignjene kolonije s popkastim robom, za morfotip 8 ploščate kolonije z nazobčanim robom, za morfotip 9 pa konkavno-ploščate kolonije. V skupini 10 so sevi s pravilno oblikovanimi kolonijami z nazobčanim robom. V skupini 11 so dvignjene kolonije s popkastim robom, v skupini 12 pa ploščate kolonije z nenazobčanim robom. Za skupino 13 so značilni nenazobčani robovi in dvignjen profil kolonij.

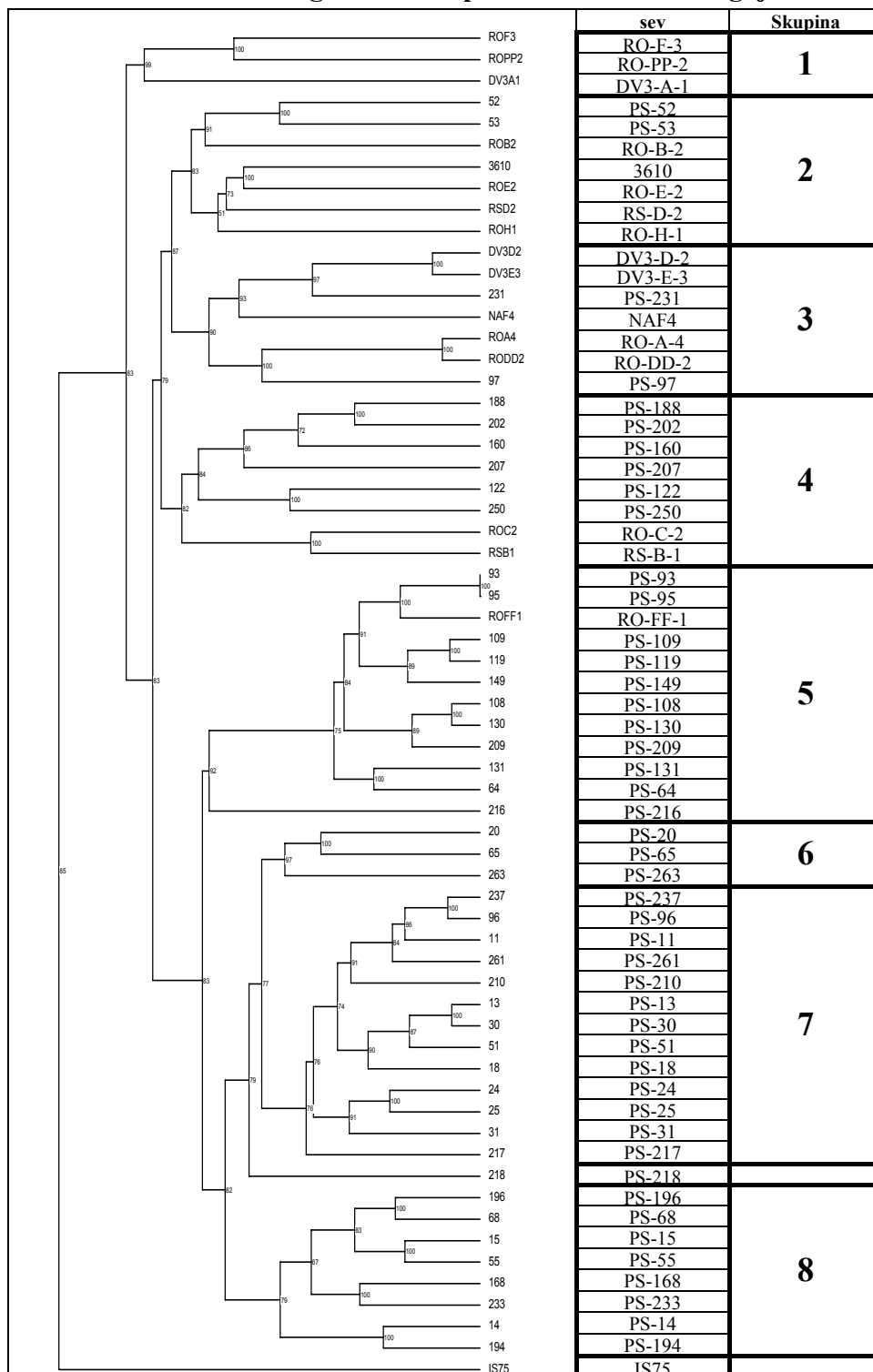
#### **4.4.3 Morfotipi na gojišču R-2A**

Glede na morfologijo kolonij izraslih na gojišču R-2A smo seve razdelili v 7 morfotipov (Slika 8, Priloga D). V morfotipe od 1 do 6 spadajo sevi s hrapavimi kolonijami, v morfotip 7 pa sevi z gladkimi kolonijami. V skupini 1 so ploščate kolonije z nazobčanim robom. V skupini 2 so tudi ploščate kolonije z nazobčanimi robovi, imajo pa tudi kraterski profil. Za morfotip 3 so značilni pravilna oblikovanost kolonij, nazobčani robovi in progasta lisa na sredi kolonije. Ta lisa je značilna tudi za morfotip 4, vendar so te kolonije nepravilne oblike. V skupini 5 so ploščate kolonije z nenazobčanim robom. V skupini 6 so kolonije z dvignjenim profilom. Skupni značilnosti velike skupine 7 pa so ploščat profil in nenazobčani robovi.



Slika 8: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rast na gojišču R-2A (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))

#### 4.4.4 Razdelitev sevov glede na skupne lastnosti rasti na gojiščih TBAB, LB in R-2A



Slika 9: Dendrogram podobnosti morfoloških značilnosti kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov, zraslih na gojiščih TBAB, LB in R-2A (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))



Glede na skupne značilnosti rasti na vseh treh gojiščih skupaj smo seve razdelili v 8 skupin (Slika 9). V prvih treh skupinah so večinoma puščavski sevi *B. subtilis* in *B. mojavensis*, v skupini 4 pa večinoma nabrežni sevi *B. amyloliquefaciens*. Ostale nabrežne izolate pa najdemo večinoma v skupinah od 5 do 8.

#### 4.4.5 Povezava med morfologijo in ferotipi oziroma filotipi

Preverili smo kako morfotipi, ferotipi in filotipi sovpadajo oziroma koliko sevov določenega morfotipa pripada izbranemu ferotipu oziroma filotipu na izbranem gojišču (Preglednice 7, 8 in 9) in na vseh treh gojiščih skupaj (Preglednica 10). Ugotovili smo, da so na gojiščih TBAB in R-2A vsi ferotipi skoraj enako raznoliki, na gojišču LB sta najbolj raznolika ferotipa 168 in RO-B-2/RO-H-1 (9 morfotipov) (Preglednice 7, 8 in 9). Na vseh treh gojiščih je najbolj raznolik filotip *B. subtilis* subsp. *subtilis*, vendar primerjava ni enakovredna, saj smo imeli iz drugih filotipov manj predstavnikov. Če pa ocenjujemo rezultate za vsa gojišča hkrati, opazimo, da je morfološko najbolj raznolik ferotip RS-D-2/NAF-4 (8 morfotipov) (Preglednica 10). Največ morfotipov smo opazili na gojišču LB (Slika 7), ki je bogato s hranili, najmanj pa na gojišču R-2A (Slika 8), ki je revnejše.

**Preglednica 7: Pripadnost morfotipov (glede na gojišče TBAB) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)**

morfotip	ferotipi				filotipi			
	168	RS-D-2/ NAF4	RO-B-2/ RO-H-1	RO-E-2	subsp. <i>subtilis</i>	subsp. <i>spizizenii</i>	<i>mojavensis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
<b>1</b>	1	1	1	1	1	2	1	0
<b>2</b>	0	2	0	0	2	0	0	0
<b>3</b>	0	2	0	3	2	0	0	5
<b>4</b>	5	3	3	0	11	0	0	1
<b>5</b>	0	0	1	1	2	0	0	0
<b>6</b>	9	4	4	1	16	1	1	0
<b>7</b>	1	0	0	1	0	2	0	1
<b>8</b>	0	0	1	0	1	0	1	0
<b>9</b>	1	1	9	1	11	1	0	0
<b>št. morfotipov</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

**Preglednica 8: Pripadnost morfotipov (glede na gojišče LB) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)**

morfotip	ferotipi				filotipi			
	168	RS-D-2/ NAF4	RO-B-2/ RO-H-1	RO-E-2	subsp. <i>subtilis</i>	subsp. <i>spizizenii</i>	<i>mojavensis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
<b>1</b>	5	1	2	1	8	1	1	0
<b>2</b>	4	0	1	0	5	0	0	0
<b>3</b>	0	1	1	0	1	0	1	0
<b>4</b>	1	2	3	0	6	0	0	0
<b>5</b>	1	2	3	0	6	0	0	0
<b>6</b>	0	0	0	3	0	2	0	1
<b>7</b>	0	3	1	0	4	0	0	2
<b>8</b>	1	2	1	1	5	0	0	0
<b>9</b>	1	2	0	1	2	2	0	0
<b>10</b>	0	0	0	2	0	0	0	3
<b>11</b>	1	0	1	0	0	1	1	0
<b>12</b>	3	0	0	0	3	0	0	0
<b>13</b>	1	0	6	0	7	0	0	0
št. morfotipov	9	7	9	5	10	4	3	3

**Preglednica 9: Pripadnost morfotipov (glede na gojišče R-2A) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)**

morfotip	ferotipi				filotipi			
	168	RS-D-2/ NAF4	RO-B-2/ RO-H-1	RO-E-2	subsp. <i>subtilis</i>	subsp. <i>spizizenii</i>	<i>mojavensis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
<b>1</b>	0	0	2	2	2	1	1	0
<b>2</b>	0	1	0	0	1	0	0	2
<b>3</b>	1	0	0	1	1	2	0	1
<b>4</b>	0	2	0	1	2	0	0	2
<b>5</b>	1	1	3	2	2	2	2	1
<b>6</b>	1	1	1	1	3	1	0	0
<b>7</b>	15	7	13	0	35	0	0	0
št. morfotipov	4	5	4	5	7	4	2	4

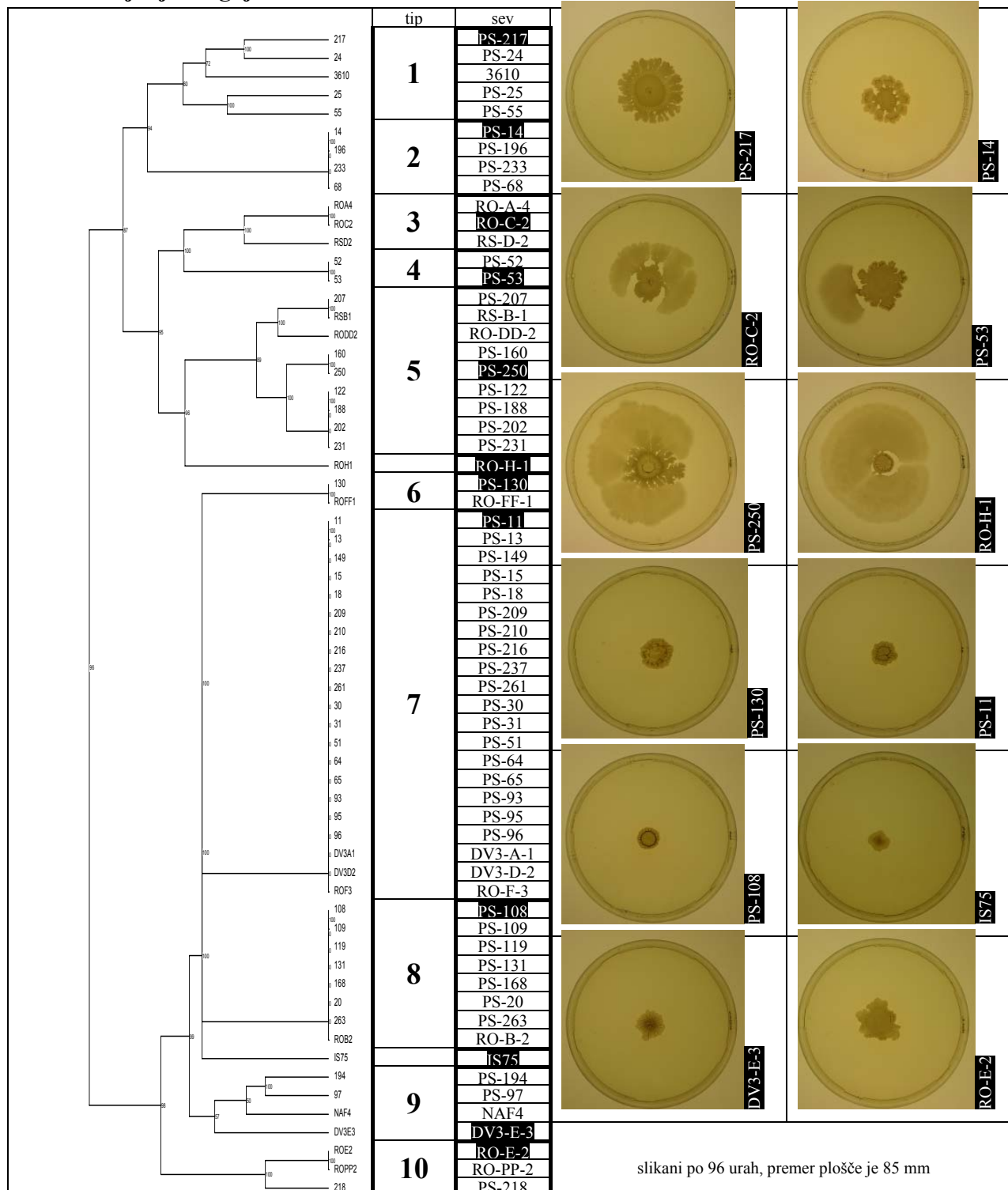
**Preglednica 10: Pripadnost skupin (glede na vsa tri gojišča skupaj) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)**

skupina	ferotipi				filotipi			
	168	RS-D-2/ NAF4	RO-B-2/ RO-H-1	RO-E-2	subsp. <i>subtilis</i>	subsp. <i>spizizenii</i>	<i>mojavensis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
<b>1</b>	0	1	0	2	1	2	0	0
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	4	1	2	0
<b>3</b>	1	1	1	2	3	2	0	2
<b>4</b>	1	1	1	3	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>
<b>5</b>	2	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>6</b>	1	2	0	0	3	0	0	0
<b>7</b>	7	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>8</b>	5	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	8	0	0	0
št. morfortipov	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

#### 4.5 ROJENJE SEVOV *B. subtilis*, *B. mojavensis* IN *B. amyloliquefaciens*

Tudi rojenje sevov na različnih gojiščih (gojišče B in gojišče TY) je bilo zelo različno tako v hitrosti kot v vzorcu, ki so ga oblikovali. Seve smo glede na tip rojenja razdelili v različne skupine, posebej za vsako gojišče. Glede na značilnosti rojenja na vsakem gojišču posebej smo izrisali drevesi, ki združujeta seve s podobno morfologijo roja (kolonije).

### 4.5.1 Rojenje na gojišču TY

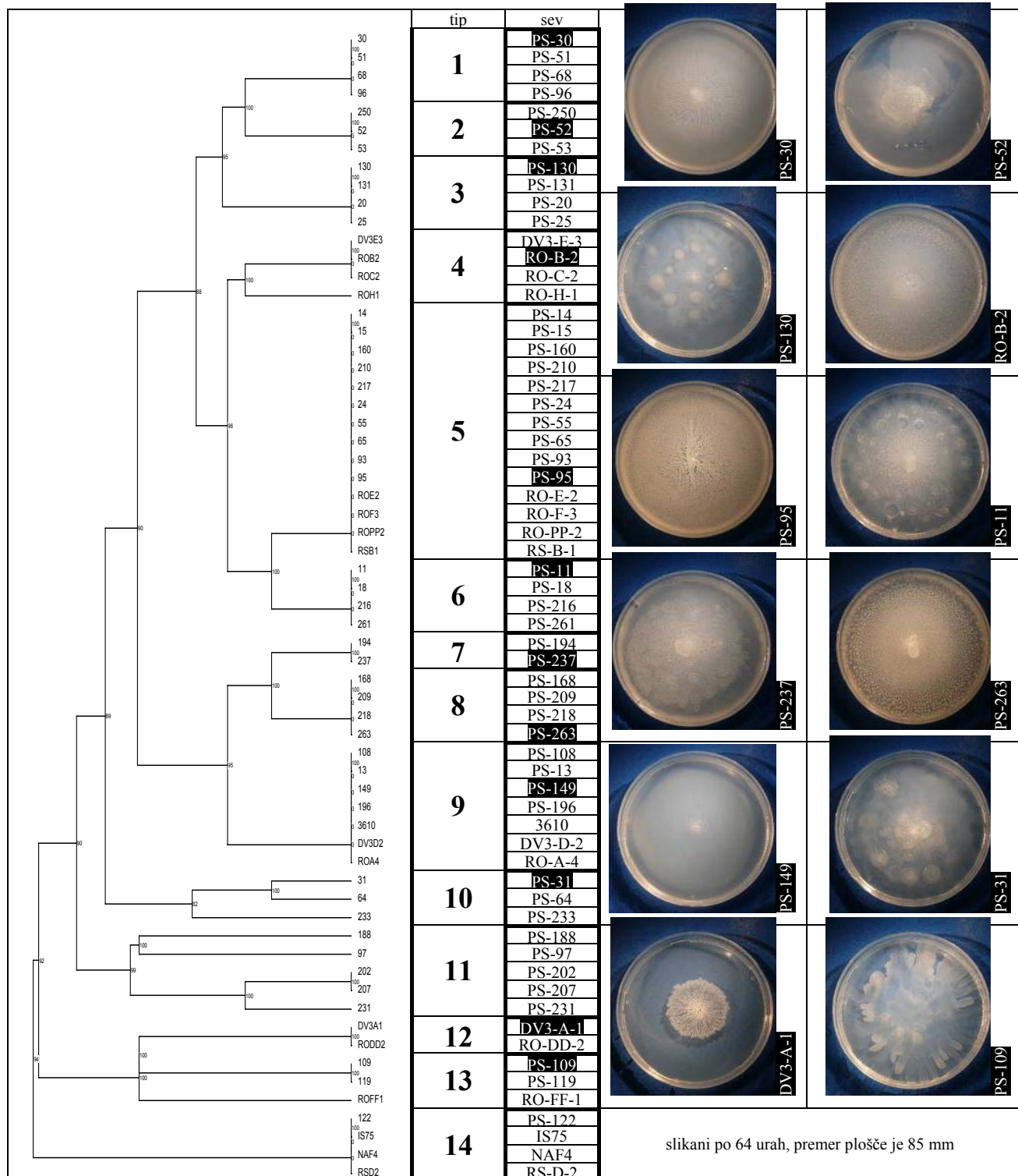


Slika 10: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rojenje na gojišču TY (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))

Glede na hitrost rojenja in morfologijo rojev na gojišču TY smo seve razvrstili v 10 skupin (Slika 10, Priloga E). V skupinah 1 do 4 in 10 so sevi, ki rojijo srednje hitro, v skupini 5 sevi, ki rojijo najhitreje, v skupinah od 6 do 9 pa sevi, ki rojijo zelo počasi oziroma ne rojijo. Za skupino 1 je značilna hrapava in nenagubana površina, za skupino 2 rahla gubavost in brsteči robovi, za skupino 3 pa valoviti in puhasti robovi ter rojenje v obliki velikih brstov. V skupini 4 so tudi sevi, ki rojijo v obliki velikih brstov, imajo pa tudi nazobčane robove in rahlo nagubano površino. Tudi za skupino 5 je značilno rojenje v obliki velikih brstov, njihova površina je hrapava in nenagubana. V skupini 6 so sevi, ki oblikujejo zelo gosto nagubano površino. Za skupino 7 so značilni valoviti robovi in nepravilno nagubana površina, za skupino 8 pa prav tako valoviti robovi in kraterski profil. Tudi sevi iz skupin 9 in 10 oblikujejo valovite robove, njihova površina pa je različno nagubana.

#### **4.5.2 Rojenje na gojišču B**

Glede na hitrost rojenja in morfologijo roja na gojišču B smo seve razvrstili v 14 skupin (Slika 11, Priloga F). V skupinah od 1 do 9 so sevi, ki rojijo najhitreje, v skupinah 10, 12 in 13 sevi, ki rojijo srednje hitro, v skupini 11 sevi, ki rojijo počasi in v skupini 14 sevi, ki sploh ne rojijo. Za skupine 1, 2 in 3 je značilno rojenje v obliki rizoidov, skupina 2 se loči po izločanju sluzi, pri skupini 3 pa se na gojišču oblikujejo kaplje. Za skupine 4, 5, 6, 7 in 8 so značilne drobne kapljice, sevi iz skupin 5 in 6 pa poleg tega oblikujejo še rizoide, za skupino 6 pa so značilne še večje kaplje. Za skupino 7 je značilno rojenje v obliki meglice in oblikovanju večjih kapelj. Za skupino 8 pa je poleg kapljic značilno še rojenje v obliki meglice, ki ga opazimo tudi pri sevih iz skupine 9. V skupini 10 najdemo seve, ki oblikujejo kaplje in kapljice. Za skupino 12 je značilno oblikovanje kodrastih robov, za skupino 13 pa rojenje v obliki nekakšnih lovč.



Slika 11: Razvrstitev puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov glede na rojenje na gojišču B (konstrukcija dendrograma s programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija))

### 4.5.3 Povezava med tipi rojenja in ferotipi oziroma filotipi

Rezultati so pokazali, da je raznolikost rojenja večja na gojišču B (14 tipov rojenja) (Slika 11) kot na gojišču TY (Slika 10), kjer smo našli le 10 skupin rojenja. Znotraj posameznega ferotipa je bilo vedno več skupin rojenja, pri čemer je bila največja raznolikost na gojišču TY znotraj ferotipa RS-D-2/NAF4 (8 skupin) (Preglednica 11), na gojišču B pa znotraj ferotipov 168 in RO-B-2/RO-H-1 (10 skupin) (Preglednica 12). Največja raznolikost na obeh gojiščih je bila spet znotraj filotipa *B. subtilis* subsp. *subtilis*, vendar primerjava tudi tukaj ni enakovredna, saj smo imeli iz drugih filotipov manj predstavnikov.

**Preglednica 11: Pripadnost skupin (glede na gojišče TY) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)**

Tip rojenja	ferotipi				filotipi			
	168	RS-D-2/ NAF4	RO-B-2/ RO-H-1	RO-E-2	subsp. <i>subtilis</i>	subsp. <i>spizizenii</i>	<i>mojavensis</i>	<i>amiloliquefaciens</i>
<b>1</b>	0	3	1	0	5	0	0	0
<b>2</b>	3	1	0	0	4	0	0	0
<b>3</b>	1	1	0	1	2	0	1	0
<b>4</b>	0	0	2	0	2	0	0	0
<b>5</b>	0	1	2	3	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>6</b>
<b>6</b>	1	0	1	0	2	0	0	0
<b>7</b>	10	2	7	2	<b>19</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	7	0	1	0
<b>9</b>	1	2	0	0	2	1	0	1
<b>10</b>	0	1	0	2	1	2	0	0
št. skupin	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

**Preglednica 12: Pripadnost skupin (glede na gojišče B) različnim ferotipom oz. filotipom. (Vrstice skupin, pri katerih je bila povezava med morfologijo in ferotipom oziroma filotipom najbolj očitna, so izpolnjene s krepko pisavo.)**

Tip rojenja	ferotipi				filotipi			
	168	RS-D-2/ NAF4	RO-B-2/ RO-H-1	RO-E-2	subsp. <i>subtilis</i>	subsp. <i>spizizenii</i>	<i>mojavensis</i>	<i>amiloliquefaciens</i>
<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	4	0	0	0
<b>2</b>	0	0	2	0	2	0	0	1
<b>3</b>	0	2	2	0	4	0	0	0
<b>4</b>	2	0	2	0	0	1	3	0
<b>5</b>	3	4	5	2	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>6</b>	3	0	1	0	4	0	0	0
<b>7</b>	1	1	0	0	2	0	0	0
<b>8</b>	1	2	1	0	4	0	0	0
<b>9</b>	1	1	2	2	6	1	0	0
<b>10</b>	1	1	1	0	3	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0	2	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<b>12</b>	0	0	1	1	1	1	0	0
<b>13</b>	1	0	2	0	3	0	0	0
<b>14</b>	1	2	0	1	3	0	0	1
<b>št. skupin</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

#### 4.6 MERJENJE FLUORESCENCE SEVOV *B. subtilis* Z VGRAJENIM GENOM ZA IZRAŽANJE FLUORESCENČNEGA PROTEINA

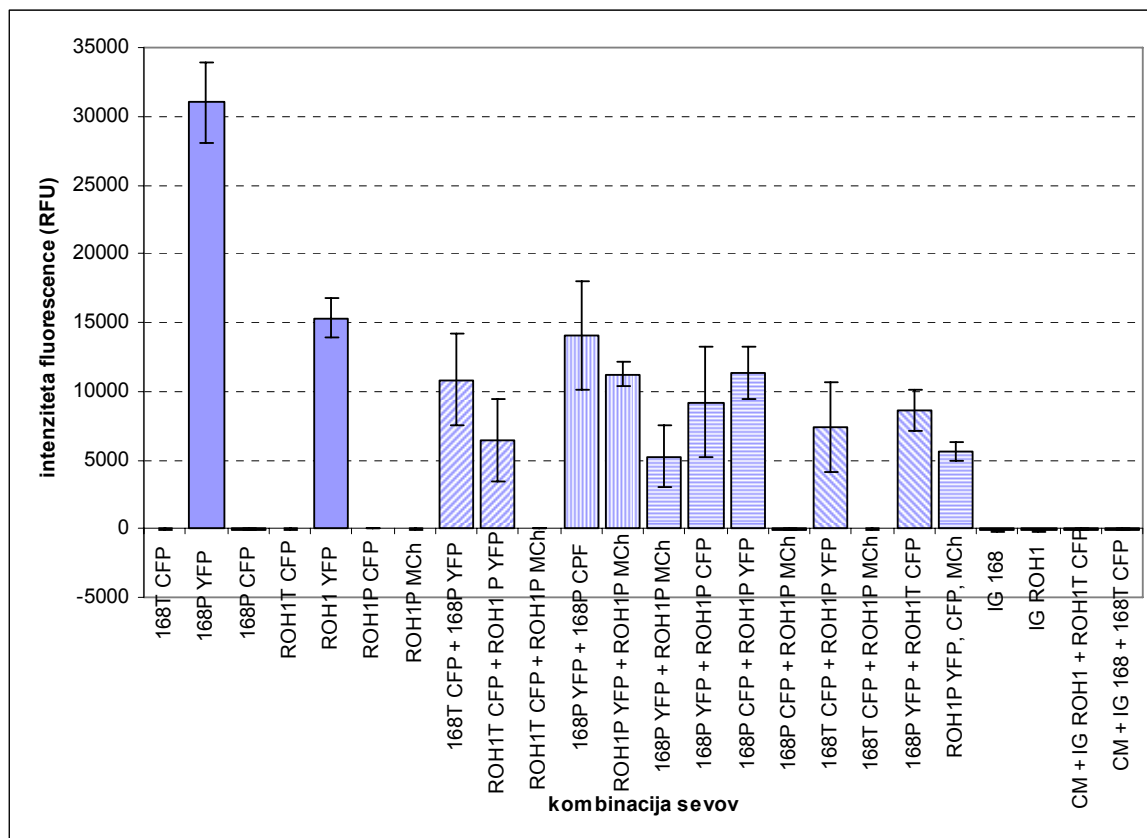
Da bi razvili alternativno metodo za uvrščanje sevov v ferotipske skupine smo seve z vgrajenimi geni za izražanje različnih fluorescenčnih proteinov gojili skupaj v določenih kombinacijah in nato merili fluorescenco posameznega izraženega fluorescenčnega proteina.

Za razvoj alternativne metode za spremljanje aktivacije operona *srfA* preko ComQXP sistema s fluorescenčnim proteinom smo uporabili 5 producentskih in 2 testerska seva iz dveh različnih ferotipskih skupin: 168 in RO-B-2/RO-H-1, ki jih je z metodami rekombinantne DNK pripravila P. Štefanič (2009). Skupino 168 sestavljajo producentski in testerski sevi *B. subtilis* 168, ki imajo fuzijo *srfA* z genom za izražanje določenega fluorescenčnega proteina. Skupino RO-B-2/RO-H-1 pa sestavljajo producentski in testerski sevi z genetskim ozadjem seva *B. subtilis* 168, ki imajo gene *comQXP* zamenjane z geni seva *B. mojavensis* RO-H-1, poleg tega pa še fuzijo *srfA* z genom za izražanje določenega fluorescenčnega proteina. Razlika med testerskimi in producentskimi sevi je v tem, da imajo testerski sevi prekinjen gen *comQ*. Posledica tega je, da feromon ComX ni prav modificiran in zato ostane nedejaven, kar pomeni, da testerski sev v medcelični prostor ne more izločiti aktivnega feromona ComX in inducirati lastnega QS sistema. Še vedno pa se lahko odzove na feromone predstavnikov iste ferotipske skupine. Ko bakterija zazna



določeno koncentracijo feromona v okolju, se sproži QS odziv, ki uravnava izražanje različnih genov. Eden izmed teh genov je tudi *srfA*, ki je v tem primeru v fuziji z genom za izražanje fluorescenčnega proteina. Zato lahko prisotnost določenih feromonov, ki so sprožili QS odziv, zaznamo zaradi povišane intenzitete fluorescence v ustreznem območju.

#### 4.6.1 Merjenje intenzitete fluorescenčnega proteina YFP (Yellow fluorescent protein)



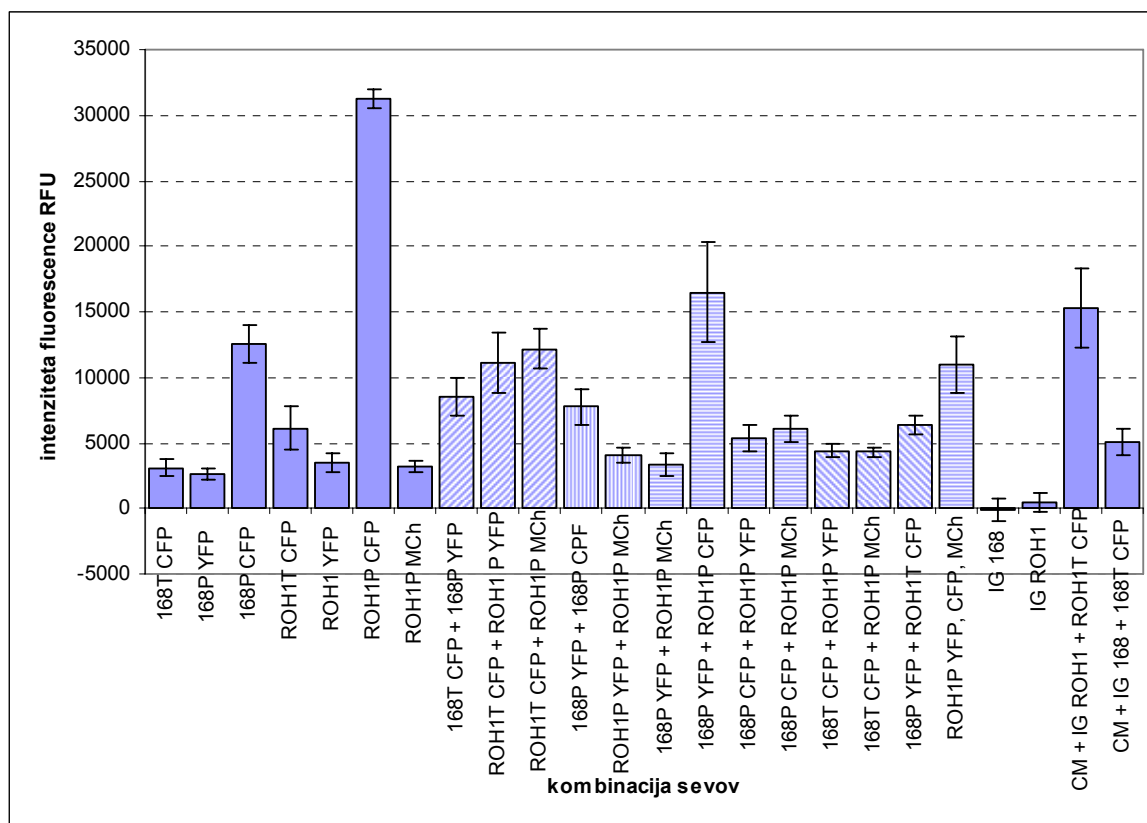
Slika 12: Intenziteta fluorescence sevov *B. subtilis*, ki imajo vključen reporterski gen za fluorescenčne proteine YFP, CFP, mCherry v operon *srfA*, v različnih kombinacijah pri valovni dolžini 515 nm/530 nm (ekscitacijska/emisijska). (Oznake sevov: 168 oziroma ROH1 pomeni ferotip seva; T pomeni testerski sev; P pomeni producentni sev; YFP, CFP oziroma MCh je oznaka fluorescenčnega proteina. IG pomeni izrabljeno gojišče; CM pomeni kompetenčno gojišče. Polni stolpci predstavljajo intenziteto fluorescence posameznih sevov, stolpci s črtami desno navzgor intenziteto fluorescence, če sta v kokulturi producentni in testerski sev istega ferotipa, stolpci z navpičnimi črtami rezultat, če sta v kokulturi producentni sev istega ferotipa, stolpci z vodoravnimi črtami rezultat producentnih sevov različnih ferotipov in stolpci s črtami desno navzdol rezultat producentnega in testerskega seva različnega ferotipa.)

Najnižjo intenziteto fluorescence (oziroma šum) smo zaznali pri sevih, ki ne producirajo

fluorescenčnega proteina, najvišjo pa pri sevu *B. subtilis* 168P YFP. Pri sevu *B. subtilis* ROH1P YFP je bila intenziteta nižja kot pri prejšnjem (168P YFP), verjetno zaradi nižje produkcije fluorescenčnega proteina. V mešani kulturi, ki je vsebovala sev 168P YFP v kombinaciji z *B. subtilis* 168P CFP, je bila intenziteta fluorescence po pričakovanju nižja, verjetno zaradi tega, ker je predstavljal sev 168P YFP le delež celotne populacije (optična gostota posameznih sevov in mešanih kultur je bila približno enaka: od 0,6 do 0,8 pri 650 nm). Podobno je bila intenziteta fluorescence nižja v mešani kulturi producenta in testerja (168P YFP in *B. subtilis* 168T CFP) predvidoma zopet zaradi manjše gostote producenta. Še nižjo intenziteto fluorescence smo izmerili v primeru, ko smo sev 168P YFP kombinirali s sevi, ki pripadajo drugi ferotipski skupini (RO-H-1). Tu je morda prišlo še do inhibicije QS sistema seva 168P YFP. Podobne ugotovitve smo opazili tudi pri sevu ROH1P YFP: v mešani kulturi, kjer imajo producenti različne reporterske fluorokrome (npr. *B. subtilis* ROH1P mCherry v kombinaciji z ROH1P YFP), smo izmerili nižjo intenziteto fluorescence v primerjavi z intenziteto fluorescence pri posameznem producentu. V kombinaciji s sevi iz druge ferotipske skupine (168) pa nismo opazili inhibicije QS sistema ROH1P YFP. S producentskimi sevi iz ferotipske skupine RO-H-1 smo naredili še en poskus, kjer smo kombinirali vse tri skupaj. V primerjavi z vzorcem, kjer smo kombinirali le dva od teh sevov, je bila intenziteta fluorescence tu nižja, saj je ROH1P YFP predstavljal še manjši delež populacije.

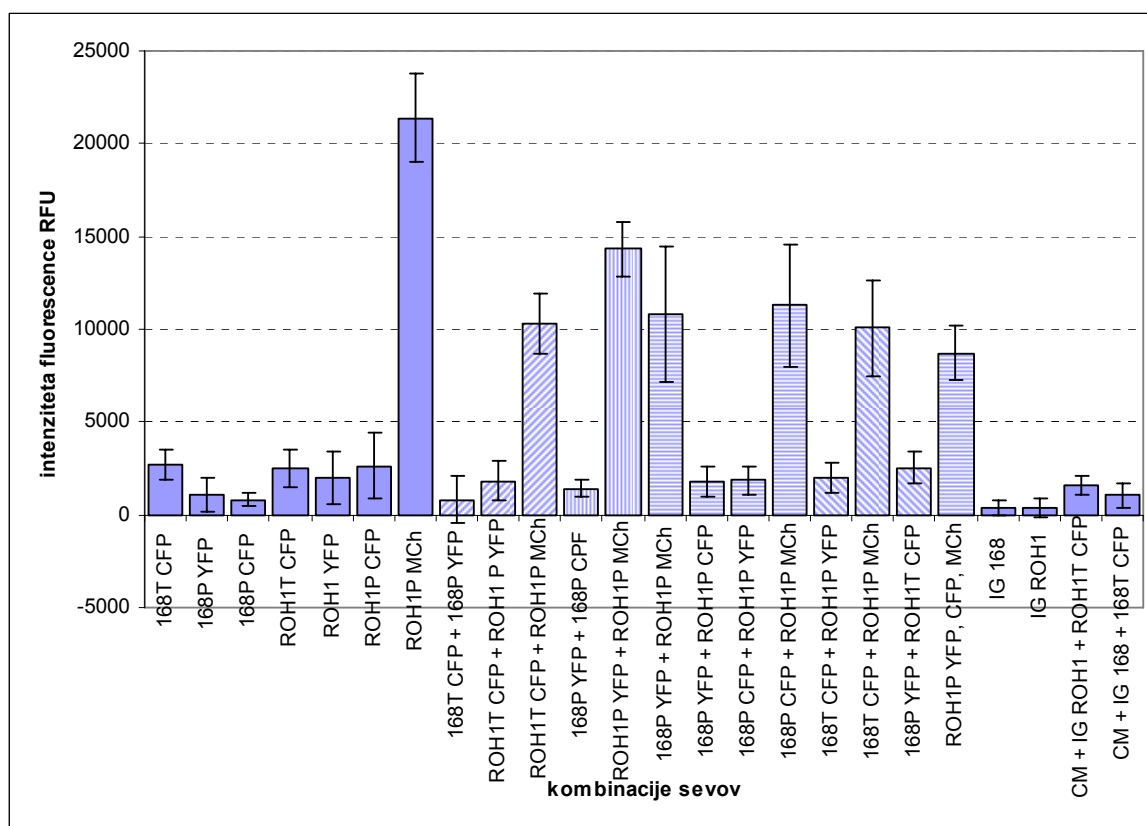
#### **4.6.2 Merjenje intenzitete fluorescenčnega proteina CFP (cyan fluorescent protein)**

Najnižjo intenziteto fluorescence (oziroma šum) smo zaznali pri sevih, ki ne producirajo fluorescenčnega proteina, najvišjo pa pri sevu *B. subtilis* ROH1P CFP. Intenziteta fluorescence je bila v primeru seva 168P CFP nižja zaradi nižje produkcije fluorescenčnega proteina. V mešanih kulturah je bila intenziteta nižja, saj sta oba seva predstavljala le delež populacije. Ko smo testerski sev 168T CFP kombinirali s sevom 168P YFP, ki pripada isti ferotipski skupini, smo opazili povišano intenziteto fluorescence v primerjavi z izmerjeno fluorescenco pri samem testerskem sevu 168T CFP, saj je feromon ComX iz producentskega seva induciral sintezo fluorescenčnega proteina v testerskem sevu. Enako smo opazili pri kombinacijah testerskega seva *B. subtilis* ROH1T CFP s sevoma ROH1P YFP oziroma ROH1P mCherry. Ko pa smo kombinirali testerske seve s producentskimi sevi drugih ferotipskih skupin, nismo opazili povišane intenzitete fluorescence, kar pomeni, da ni prišlo do indukcije produkcije fluorescenčnih proteinov. Naredili smo tudi poskus z izrabljenim gojiščem, ki vsebuje feromone ComX. V primeru, ko smo v izrabljeno gojišče seva ROH1 nacepili testerski sev ROH1T CFP, smo opazili povišano intenziteto fluorescence v primerjavi z vzorcem, kjer je testerski sev ROH1T CFP zrasel v normalnem kompetenčnem gojišču. Enako smo opazili pri testerskem sevu 168T CFP, ki smo ga nacepili v izrabljeno gojišče seva 168.



Slika 13: Intenziteta fluorescence sevov *B. subtilis*, ki imajo vključen reporterski gen za fluorescenčne proteine YFP, CFP, mCherry v operon *sfA*, v različnih kombinacijah pri valovni dolžini 445 nm/477 nm (ekscitacijska/emisijska). (Oznake sevov: 168 oziroma ROH1 pomeni ferotip seva; T pomeni testerski sev; P pomeni producerski sev; YFP, CFP oziroma MCh je oznaka fluorescenčnega proteina. IG pomeni izrabljeno gojišče; CM pomeni kompetenčno gojišče. Polni stolpci predstavljajo intenziteto fluorescence posameznih sevov, stolpci s črtami desno navzgor intenziteto fluorescence, če sta v kokulturi producerski in testerski sev istega ferotipa, stolpci z navpičnimi črtami rezultat, če sta v kokulturi producerska seva istega ferotipa, stolpci z vodoravnimi črtami rezultat producerskih sevov različnih ferotipov in stolpci s črtami desno navzdol rezultat producerskega in testerskega seva različnega ferotipa.)

### 4.6.3 Merjenje intenzitete fluorescenčnega proteina mCherry (mCherry fluorescent protein)



Slika 14: Intenziteta fluorescence sevov *B. subtilis*, ki imajo vključen reporterski gen za fluorescenčne proteine YFP, CFP, mCherry v operon *srfA*, v različnih kombinacijah pri valovni dolžini 587 nm/610 nm (ekscitacijska/emisijska). (Oznake sevov: 168 oziroma ROH1 pomeni ferotip seva; T pomeni testerski sev; P pomeni producerski sev; YFP, CFP oziroma MCh je oznaka fluorescenčnega proteina. IG pomeni izrabljeno gojišče; CM pomeni kompetenčno gojišče. Polni stolpci predstavljajo intenziteto fluorescence posameznih sevov, stolpci s črtami desno navzgor intenziteto fluorescence, če sta v kokulturi producerski in testerski sev istega ferotipa, stolpci z navpičnimi črtami rezultat, če sta v kokulturi producerska seva istega ferotipa, stolpci z vodoravnimi črtami rezultat producerskih sevov različnih ferotipov in stolpci s črtami desno navzdol rezultat producerskega in testerskega seva različnega ferotipa.)

Najnižjo intenziteto fluorescence (oziroma šum) smo zaznali pri vzorcih sevov, ki ne producirajo fluorescenčnega proteina, najvišjo pa pri sevu ROH1P mCherry. Tako kot v primeru merjenja intenzitete YFP in CFP, je bila tudi tu v mešanih kulturah zaradi znižanja deleža populacije izmerjena znižana intenziteta fluorescence.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Filogenetska analiza sevov

Za razvrščanje sevov v filotipske skupine smo uporabili gospodinjski gen *recA*. Gospodinjski geni se počasi evolucijsko razvijajo, ker so eni izmed esencialnih genov. Še vedno pa je njihova evolucija hitrejša kot je evolucija gena za 16S rRNA, katerega se najpogosteje uporablja za razvrščanje organizmov na nivoju vrste (Woese, 1987). Štefanič in Mandić Mulec (2009) sta nabrežne seve *Bacillus* filogenetsko razvrstili glede na dva gospodinjska gena: *rpoB* in *gyrA*. Sekvence *recA* so se v filogenetskem drevesu razvrstile podobno kot *rpoB* in *gyrA*, pri čemer je bila raznolikost večja kot pri *rpoB*, vendar manjša kot pri genu *gyrA*, ki je dal najboljšo resolucijo med filotipskimi skupinami.

Razvrstitev nabrežnih in puščavskih sevov *B. subtilis* in *B. mojavensis* glede na gen *recA* nam je dala le tri glavne skupine: skupino *B. subtilis* subsp. *subtilis*, skupino *B. subtilis* subsp. *spizizenii* in skupino *B. mojavensis*. Nižje na hierarhični lestvici bi težje govorili o različnih skupinah, saj se sekvence teh genov razlikujejo le v nekaj nukleotidih, kar bi lahko bila tudi posledica napak pri sekvenciranju. Enake tri skupine in veliko podobnost sekvenc znotraj teh treh skupin smo opazili tudi pri filogenetskih drevesih, konstruiranih glede na gena *rpoB* in *gyrA*.

Če primerjamo filotipske skupine s ferotipskimi, ne opazimo kongruence. To lahko pripišemo dejstvu, da se lokus *comQXP'* prenaša s horizontalnimi genskimi prenosi (Tortosa in sod., 2001).

#### 5.1.2 Transformacija sevov

V različnih časih smo merili optično gostoto bakterijskih kultur in iz tega določili rastno hitrost in čas vstopa v stacionarno fazo. Povprečne rastne krivulje so bile pri vseh sevih podobne (tudi med ferotipskimi skupinami). Dve uri po vstopu v stacionarno fazo smo začeli s postopkom transformacije. Najbolj uspešna je bila transformacija sevov iz ferotipske skupine 168, nato sevov iz skupine RO-B-2/RO-H-1, najmanj upešna pa je bila transformacija sevov iz skupine RS-D-2/NAF4. Razlog za nižjo stopnjo transformacije je bil najbrž v tem, da so sevi različno kompetentni. Glede na to, da smo seve transformirali z DNK seva iste podvrste (*B. subtilis* subsp. *subtilis*), seksualna izolacija verjetno ni predstavljala razloga za znižano stopnjo transformacije, vendar tega ne moremo izključiti. Med sevi *B. subtilis* naj ne bi bilo velikih razlik v restriksijsko-modifikacijskih sistemih (Cohan in sod., 1991).

Pri transformaciji sevov *B. amyloliquefaciens* z DNK *B. subtilis* RO-FF-1 ni bilo pozitivnih rezultatov, kar je razumljivo, saj so ti sevi filogenetsko bolj oddaljeni od

donorskega seva. Razlog za neuspelo transformacijo pa so bile poleg možne nižje intrinzične kompetence morda še razlike v sekvencah in razlike v restrikcijsko-modifikacijskih sistemih.

Kot referenčna seva smo pri transformaciji uporabili seva *B. subtilis* 3610 in *B. subtilis* IS75, ki oba spadata v podskupino 168. Sev 3610 je predstavljal negativno kontrolo, saj je za ta sev splošno znano, da ni kompetenten. Sev IS75 pa je znan kot zelo kompetenten. Vendar so bili nekateri nabrežni sevi še bolj kompetentni kot sev IS75.

Med kompetenco sevov in njihovim uvrščanjem v ferotipske skupine smo opazili določeno povezavo, saj produkti genov za komunikacijski lokus med drugim vplivajo tudi na kompetenco. V vseh treh primerljivih ferotipskih skupinah so prisotni tako kompetentni kot nekompetentni sevi, vendar so sevi v ferotipski skupini 168 večinoma zelo kompetentni, sevi iz skupine RS-D-2/NAF4 pa večinoma nekompetentni. Če ferotipno skupino RO-B-2/RO-H-1 obravnavamo kot dve ločeni skupini, pa lahko rečemo, da so sevi iz skupine RO-B-2 večinoma nekompetentni, sevi iz skupine RO-H-1 pa kompetentni.

### 5.1.3 Morfologija sevov

Pri poskusu razvrščanja sevov v različne morfotipe smo opisali obliko, robove, površino in profil kolonij ter te podatke obdelali z računalniškim programom BioNumerics (Applied Maths NV, Belgija), ki je izrisal drevo, na katerem so sevi razporejeni v različne skupine. Na gojišču TBAB smo opisali 9 različnih morfotipov, na gojišču LB 13, na gojišču R-2A pa 7. Med morfotipi na različnih gojiščih in ferotipi oziroma filotipi nismo opazili prave povezave. Povezavo pa smo opazili med geografskim izvorom seva in morfologijo, saj so skupine puščavskih in skupine nabrežnih sevov na drevesu, izrisanem iz podatkov o rasti na vseh treh gojiščih in na gojišču R-2A, ločene.

Na gojiščih TBAB in LB so bile kolonije večinoma izbokle oziroma dvignjene, kar pomeni, da bakterije producirajo ekstracelularni matriks, za njegovo produkcijo pa je potrebno zelo zapleteno regulatorno omrežje. Eden izmed pomembnih eksopolimerov je poli-gama-glutamat, katerega sinteza je pod kontrolo QS sistema. Morfologija je odvisna od seva in okoljskih razmer. Tako kot je že opisal Buckling (2007), smo tudi mi opazili, da razvijejo bakterije na bogatem gojišču, ki sta ga v našem primeru predstavljali gojišči TBAB in LB, veliko več različnih morfotipov, kot pa bakterije na revnih gojiščih, npr. R-2A. Na gojišču R-2A smo opazili večinoma ploščate in gladke kolonije z ravnim robom. Na morfologijo vplivajo tako razlike v prisotnosti določenih genov kot v njihovi regulaciji, ki pa je odvisna od zunanjega okolja. Ugotovili smo, da je za ustrezno uvrščanje sevov v različne morfotipe potrebno zbrati čim več podatkov o rasti na različnih gojiščih, saj šele tako dobimo popolnejšo sliko o lastnostih sevov.

Podatkov o korelaciji med morfologijo kolonij in ferotipi do sedaj v literaturi še nismo opazili. Obstajajo pa medicinske raziskave o korelaciji med morfologijo kolonij in virulenco oziroma med morfologijo kolonij in genotipom. Ugotavljajo, da lahko natančno opazovanje morfologije kolonij pomaga pri razlikovanju med infekcijo krvnega obtoka in kontaminacijo vzorca (Bearson in sod., 1999; Simpson in sod., 1987).

#### 5.1.4 Rojenje sevov

Glede na tip rojenja smo seve razdelili v več skupin. Te skupine so se na različnih gojiščih zelo razlikovale, tako da analiza skupne razvrstitve sevov v skupine glede na tip rojenja na obeh gojiščih skupaj ni dala smiselnih rezultatov. Lastnosti gojišča so imele velik vpliv na tip rojenja. Na obseg rojenja in intenziteto razvejanosti je najbrž vplivala vsebnost agarja, ki je bila v našem primeru v gojišču TY večja kot v gojišču B. Najhitrejši sevi so se razširili po celotnem gojišču TY v približno štirih dneh, za prekritje gojišča B pa so najhitrejši sevi potrebovali en dan manj. Na gojišču TY smo opazili drugačne vzorce rojenja kot na gojišču B, saj na vzorec rojenja vpliva različna sestava in koncentracija hranil. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami Julkowske in sod. (2004): Potrdili smo, da je bilo rojenje hitrejše v gojišču z manjšo vsebnostjo agarja, prav tako pa smo tudi mi na gojiščih različnih sestav opazili različne vzorce rojenja. Na gojišču TY smo opisali 10 različnih tipov rojenja, na gojišču B pa 14. Tudi pri analizi rojenja nismo opazili povezave med načinom rojenja in ferotipom oziroma filotipom.

Opazili smo, da so sevi *B. amyloliquefaciens* na gojišču B zelo počasni v rojenju. Na gojišču TY pa glede na hitrost rojenja opazimo skoraj obraten pojav: pripadniki sevov *B. amyloliquefaciens* so izmed vseh najhitrejši v rojenju. Razlog lahko morda najdemo v tem, da je gojišče TY po sestavi zelo podobno gojišču LB. Na gojišču LB lahko sevi s sintezo ekstracelularnih proteaz zaobidejo potrebo po sintezi surfaktina, ki na gojišču B igra pomembno vlogo v rojenju, saj zmanjšuje površinsko napetost (Julkowska in sod., 2004). Julkowska in sodelavci (2005) so ugotovili, da sev, ki ne proizvaja surfaktina, ne roji na gojišču B, kljub temu pa uspešno roji na gojišču LB, ki je po sestavi podobno gojišču TY. Iz tega lahko sklepamo, da obstaja verjetnost, da imajo nabrežni sevi *B. amyloliquefaciens* moteno produkcijo surfaktina.

Ugotovili smo, da je med sevi istega ferotipa velika raznolikost v morfologiji kolonij in tipu rojenja. Odsotnost korelacije med ferotipi in morfologijo oziroma rojenjem nam pove, da so se geni za komunikacijski lokus razvijali in prenašali ločeno od genov, ki vplivajo na morfologijo kolonije in rojenje.

### 5.1.5 Merjenje fluorescence sevov z vgrajenim genom za izražanje fluorescenčnega proteina

Spremljanje aktivacije *srfA* operona preko fluorescenčnih markerjev omogoča preverjanje komunikacije med sevi v mešanih kulturah.

Najnižje intenzitete fluorescence (oziroma šum) smo zaznali pri sevih, ki ne producirajo fluorescenčnega proteina, najvišje pa pri vzorcih, v katere smo inokulirali producerske seve *B. subtilis* z ustrezno fuzijo *srfA* z genom za izražanje fluorescenčnega proteina. Pri vzorcih, v katerih smo kombinirali producerske seve istih ferotipskih skupin, ki imajo gene za različne fluorescenčne proteine, je bila intenziteta fluorescence v območju posameznega proteina znižana, ker je vsak sev predstavljal le delež celotne populacije. Rezultat kombinacije producerskega in testerskega seva istega ferotipa je bilo še večje znižanje intenzitete fluorescence, saj je bilo v tem primeru tudi feromona ComX manj, ker ga je hipotetično producirala le polovica populacije, čeprav slednjega z gotovostjo ne moremo trditi, ker nismo prešteli števila producerskih in testerskih celic v kokulturi.

Če smo producerski sev kombinirali s producerskim oziroma testerskim sevom drugega ferotipa, je bila intenziteta fluorescence podobna ali celo nižja kot v zgornjih primerih. Razlog za nižjo fluorescenco v mešani kulturi je lahko nižja produkcija za ferotip specifičnega feromona ComX, ali pa celo inhibicija QS sistema s feromoni ComX druge ferotipske skupine. Opazili smo, da je ta inhibicija v primeru ferotipov 168 in RO-B-2/RO-H-1 enosmerna. ComX, ki ga producira sev RO-H-1, inhibira QS sistem seva 168, obratno pa ne, kar so ugotovili tudi Ansaldi in sod. (2002). Potrdili smo tudi sposobnost, da feromon iz producerskega seva inducira QS sistem v testerskem sevu, ki pripada isti ferotipski skupini in odsotnost tega »sodelovanja« med sevi iz različnih ferotipskih skupin.

Ugotovili smo, da obstajajo razlike v uporabnosti različnih fluorescenčnih proteinov za alternativno določanje ferotipskih skupin. Najmanj šuma smo opazili pri uporabi proteina YFP, najvč pa pri proteinu CFP. Razlog je morda v tem, da merimo fluorescenco proteina CFP v območju, v katerem fluorescirajo tudi drugi proteini oziroma ostali metaboliti, ki v tem primeru predstavljajo šum. Lahko pa je razlog tudi v tem, da protein CFP oddaja svetlobo nižje intenzitete (CFP je eden izmed šibkejših fluoroforov), ki jo čitalec mikrotitrskih plošč težje loči od ozadja (Willemsse in Wezel, 2009).

## 5.2 SKLEPI

- Glede na sekvence gena *recA* lahko nabrežne in puščavske seve *B. subtilis* in *B. mojavensis* razdelimo v 3 filotipske skupine, ki pa se ne ujemajo s ferotipskimi skupinami.
- Največji delež kompetentnih sevov je iz komunikacijske skupine 168.
- Med morfologijo kolonij oziroma načinom rojenja in ferotipskimi oziroma filotipskimi



skupinami nismo opazili skladnosti.

- Povezavo smo našli med geografskim izvorom seva in morfologijo kolonije, ki jo tvori na agarškem gojišču: na drevesu, skonstruiranem iz podatkov o rasti na vseh treh gojiščih opazimo v treh skupinah večinoma puščavske seve *B. subtilis* in *B. mojavensis*, v eni pa večinoma nabrežne seve *B. amyloliquefaciens*. Ostale nabrežne izolate najdemo večinoma v ostalih štirih skupinah.
- Z alternativno metodo za uvrščanje sevov v fenotipske skupine smo potrdili možnost preverjanja komunikacije med sevi v mešanih kulturah.

## 6 POVZETEK

Bakterije vrste *B. subtilis* zaznavajo celično gostoto s sistemi, ki vključujejo peptidne feromone in membransko vezane histidinske kinaze, ki so specifični za komunikacijske skupine. Povečana celična gostota sproži procese (npr. kompetenco), ki omogočajo adaptacije v stacionarni fazi za povečanje preživetja bakterij. Pred leti so Cohan in sod. ter Roberts in Cohan (1991; 1995) iz puščave Mojave na lokacijah, oddaljenih nekaj kilometrov, izolirali seve *B. subtilis* in *B. mojavensis*, ter ugotovili, da sevi spadajo v različne komunikacijske skupine oziroma ferotipe. Štefanič in Mandić Mulec (2009) sta pred kratkim izolirali seve *B. subtilis* iz dveh talnih mikroagregatov velikosti 1 cm<sup>3</sup> z nabrežja Save in jih uvrstili v enake komunikacijske skupine, kot so jih omenili Cohan in sod. (1991). Ugotovili sta, da ferotipi in filotipi niso skladni, kar smo potrdili tudi s filogenetsko analizo po sekvenciranju gena *recA* nabrežnih in puščavskih sevov *B. subtilis* in *B. mojavensis*, saj se geni za komunikacijski lokus prenašajo s horizontalnim genskim prenosom. Hkrati pa ti geni s svojimi produkti posredno vplivajo na morfologijo, kompetenco in rojenje.

Po transformaciji sevov smo ugotovili, da so v določenih ferotipskih skupinah večinoma vsi sevi bodisi kompetentni bodisi nekompetentni. Kar pomeni, da določena povezava med ferotipskimi skupinami in kompetenco sevov obstaja.

Seve smo nacepili na hranilno bogata agarjska gojišča (TBAB in LB) in na revnejše gojišče R-2A. Opazili smo, da bakterije na bogatejših gojiščih oblikujejo kolonije zelo raznolikih morfologij, na revnejših gojiščih pa se ta raznolikost zelo zmanjša. Med morfotipi kolonij in ferotipi oziroma filotipi nismo opazili povezave.

Tudi med tipom rojenja in ferotipskimi oziroma filotipskimi skupinami nismo opazili povezave. Rojenje je odvisno tako od seva kot od okoljskih razmer (temperatura, vsebnost hranil in koncentracija agarja v gojišču).

Začeli smo razvijati alternativno metodo za uvrščanje sevov *B. subtilis* v ferotipske skupine. Uporabili smo producentne in testne seve, ki imajo vgrajen gen za izražanje fluorescenčnega proteina. Pozitiven rezultat komunikacije se tako kaže v povišani intenziteti fluorescence. Uspelo nam je kultivirati seve v mešanih kulturah in preveriti komunikacijo med njimi.

## 7 VIRI

Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 6: 638-643

Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandic-Mulec I., Dubnau D. 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Molecular Microbiology*, 44, 6: 1561-73

Bacon Schneider K., Palmer T.M., Grossman A. D. 2002. Characterization of comQ and comX, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 2: 410-419

Barbosa T. M., Serra C. R., La Ragione R. M., Woodward M. J., Henriques A. O. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2: 968-978

Bearson B. L., Labarca J., Cohen M., Brankovic L., Pegues D. A., Bruckner D. A. 1999. Correlation of colony morphology and PFGE type for coagulase-negative staphylococcus species from patients with multiple positive blood cultures. V: The 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, September 26-29, 1999. Abstract of Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Los Angeles, California, UCLA Medical Center, 192: no. 217

Branda S. S., González-Pastor J. E., Dervyn E., Ehrlich S. D., Losick R., Kolter R. 2004. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186, 12: 3970-3979

Buckling A., Brockhurst M. A., Travisano M., Rainey P. B. 2007. Experimental adaptation to high and low quality environments under different scales of temporal variation. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 1: 296-300

Cohan F. M. 2002. Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica*, 116, 2-3: 359-370

Cohan F. M., Roberts M. S., King E. C. 1991. The potential for genetic exchange by transformation within a natural population of *Bacillus subtilis*. *Evolution*, 45, 6: 1393-1421

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

D'Souza C., Nakano M. M., Zuber P. 1994. Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 20: 9397–9401

Dubnau D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 53: 217-244

Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55, 3: 395-424

Dubnau D., Turgay K. 2000. The regulation of competence in *Bacillus subtilis* and its relation to stress response. V: *Bacterial stress responses*. Storz G., Hengge-Aronis R. (eds.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 249-260

Earl A. M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269-275

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

Koeppl A., Perry E. B., Sikorski J., Krizanc D., Warner A., Ward D. M., Rooney A. P., Brambilla E., Connor N., Ratcliff R. M., Nevo E., Cohan F. M. 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7: 2504-2509

Lazazzera B. A. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 2: 177-182

Lazazzera B. A., Palmer T., Quisel J., Grossman A. D. 1999. Cell density control of gene expression and development in *Bacillus subtilis*. V: *Cell-cell signaling in bacteria*. Dunny G. M., Winans S. C. (eds.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 27–46

Magnuson R., Solomon J., Grossman A. D. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, 77, 2: 207-216

McArthur J. V., Kovacic D. A., Smith M. H. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 24: 9621–9624

Nakano M. M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A. D., Zuber P. 1991. *urfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173, 5: 1770-1778

Roberts M. S., Cohan F. M. 1993. The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics*, 134, 2: 401-408

Roberts M. S., Cohan F. M. 1995. Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution*, 49, 6: 1081-1094

Roggiani M., Dubnau D. 1993. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *urfA*. *Journal of Bacteriology*, 175, 10: 3182-3187

Shaver Y. J., Nagpal M. L., Rudner R., Nakamura L. K., Fox K. F., Fox A. 2002. Restriction fragment length polymorphism of rRNA operons for discrimination and intergenic spacer sequences for cataloging of *Bacillus subtilis* sub-groups. *Journal of Microbiological Methods*, 50, 2: 215-223

Simpson L. M., White V. K., Zane S. F., Oliver J. D. 1987. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity*, 55, 1: 269–272

Solomon J. M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A.D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 9, 5: 547-558

Štefanič P. 2009. Polimorfizem in specifičnost sistema za zaznavanje kvoruma bakterije *Bacillus subtilis* v talnem mikrohabitat. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 190 str. (v recenziji)

Štefanič P., Mandić Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at the microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756-1764

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics

analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8: 1596-1599

Tamura K., Kumar S. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 10: 1727-1736

Tortosa P., Dubnau D. 1999. Competence for transformation: a matter of taste. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 6: 588-592

Tortosa P., Logsdon L., Kraigher B., Itoh Y., Mandic-Mulec I., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 183, 2: 451-460

Tran L. S., Nagai T., Itoh Y. 2000. Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 37, 5: 1159-1171

Weinrauch Y., Penchev R., Dubnau E., Smith I., Dubnau D. 1990. A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes and Development*, 4, 5: 860-872

Willemsse J., van Wezel G. P. 2009. Imaging of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with reduced autofluorescence reveals a novel stage of FtsZ localization. *PLoS ONE*, 4, 1: e4242, doi: 10.1371/journal.pone.0004242

Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 2: 221-271

## 8 ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem zaposlenim in diplomantom na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo, ki so mi z nasveti in tudi drugače pomagali pri izvedbi poskusov za diplomsko delo. Posebej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ines Mandić Mulec, delovni mentorici Polonci Štefanič, prof. dr. Gorazdu Avguštinu, doc. dr. Poloni Jamnik iz Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddeleka za živilstvo za pomoč pri uporabi čitalca mikrotitrskih plošč, doc. dr. Roku Kostanjšku iz Katedre za zoologijo Oddeleka za biologijo in Janku Rakuši za pomoč pri slikanju kolonij.

## 9 PRILOGE

Priloga A: Povprečna rastna hitrost in generacijski čas nabrežnih sevov *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens* (S krepko pisavo in z \* so označeni sevi iz drugega vzorca.)

Ferotipske skupine	Izolati	rastna hitrost $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	standardni odklon $\mu$	generacijski čas g (h)	standardni odklon g
Referenčni sev	IS75	1,19	0,19	0,59	0,09
	3610	1,24	0,41	0,61	0,25
168 ( <i>B. subtilis</i> )	PS-11	1,25	0,22	0,56	0,1
	PS-13	1,36	0,05	0,51	0,02
	PS-14	1,09	0,12	0,64	0,07
	PS-15	1,13	0,32	0,66	0,22
	PS-18	1,18	0,01	0,59	0,01
	PS-30	1,43	0,08	0,49	0,03
	PS-51	1,41	0,05	0,49	0,02
	<b>PS-65*</b>	1,31	0,06	0,53	0,03
	<b>PS-68*</b>	1,31	0,1	0,53	0,04
	<b>PS-96*</b>	1,71	0,25	0,41	0,06
	<b>PS-168*</b>	1,4	0,38	0,52	0,14
	PS-216	1,14	0,07	0,61	0,04
	PS-233	1,23	0,29	0,58	0,14
	PS-237	1,34	0,43	0,54	0,17
<b>skupno povprečje</b>	<b>1,3</b>	<b>0,19</b>	<b>0,55</b>	<b>0,09</b>	
RS-D-2/NAF4 ( <i>B. subtilis</i> )	PS-20	1,25	0,2	0,57	0,1
	PS-24	1,2	0,2	0,58	0,1
	PS-25	1,28	0,26	0,55	0,11
	<b>PS-160*</b>	1,44	0,17	0,48	0,06
	PS-263	1,19	0,16	0,59	0,08
	<b>PS-64*</b>	1,36	0,07	0,51	0,03
	<b>PS-194*</b>	1,2	0,08	0,58	0,04
	<b>PS-196*</b>	1,12	0,05	0,62	0,03
	PS-217	1,17	0,27	0,61	0,14
	PS-218	1,36	0,1	0,51	0,04
<b>skupno povprečje</b>	<b>1,26</b>	<b>0,15</b>	<b>0,56</b>	<b>0,07</b>	
RO-B-2/RO-H-1 ( <i>B. subtilis</i> )	PS-52	1,32	0,15	0,53	0,06
	PS-53	1,36	0,11	0,51	0,04
	<b>PS-93*</b>	1,23	0,29	0,59	0,14
	<b>PS-95*</b>	1,3	0,32	0,56	0,14
	<b>PS-108*</b>	1,15	0,11	0,61	0,06
	<b>PS-109*</b>	1,19	0,11	0,58	0,05
	<b>PS-119*</b>	1,08	0,19	0,65	0,11
	<b>PS-130*</b>	1,21	0,02	0,57	0,01
	<b>PS-131*</b>	1,34	0,14	0,52	0,05
	PS-31	1,45	0,15	0,48	0,05
	PS-55	1,33	0,14	0,53	0,06
	<b>PS-149*</b>	1,15	0,01	0,6	0
	PS-209	1,53	0,3	0,46	0,09
	PS-210	1,23	0,3	0,58	0,14
PS-261	1,24	0,1	0,56	0,04	
<b>skupno povprečje</b>	<b>1,27</b>	<b>0,16</b>	<b>0,56</b>	<b>0,07</b>	
RO-E-2 ( <i>B. amyloliquefaciens</i> )	PS-122	1,49	0,23	0,47	0,07
	PS-188	1,17	0,13	0,59	0,07
	PS-207	1,21	0,36	0,6	0,15
	<b>skupno povprečje</b>	<b>1,29</b>	<b>0,24</b>	<b>0,56</b>	<b>0,1</b>
ni določena ( <i>B. amyloliquefaciens</i> )	PS-97	1,53	0,1	0,45	0,03
	PS-202	1,15	0,41	0,64	0,23
	PS-231	1,2	0,57	0,65	0,31
	PS-250	0,96	0,3	0,76	0,24
	<b>skupno povprečje</b>	<b>1,21</b>	<b>0,34</b>	<b>0,63</b>	<b>0,2</b>



**Priloga B: Opis kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču TBAB**

morfortip	sev	površina	gubavost	robovi	oblika	profil																																			
<b>1</b>	PS-64	hrapava	ni	nazobčani	pravilna	dvignjen																																			
	RS-B-1		ni		nepravilna																																				
	RO-C-2		radialna		pravilna																																				
	RO-E-2		ni		pravilna																																				
<b>2</b>	PS-217		hrapava	nepravilna	valoviti	nenaz.	popk. dvig																																		
	RS-D-2			nepravilna	nenaz.	nepravilna																																			
<b>3</b>	PS-202			hrapava	radialna	nazobčani	pravilna	goba																																	
	PS-207								ni	valoviti	popk. dvig.																														
	PS-188				radialna	popkasti		goba																																	
	NAF4								ni	popkasti	konkaven																														
	PS-122	radialna			popkasti	popk. dvig.																																			
	PS-250							ni	popkasti	popk. dvig.																															
	PS-263	ni			popkasti	popk. dvig.																																			
<b>4</b>	PS-15						hrapava	glad.	nazobčani	pravilna	krater																														
	PS-55	glad.	nazobčani		pravilna	krater																																			
	PS-53											glad.	nazobčani	nepravilna	nazobč. krater																										
	PS-160			glad.												nazobčani	pravilna	nazobč. krater																							
	PS-194																		glad.	nazobčani	nepravilna	nazobč. krater																			
	PS-52																						glad.	nazobčani	pravilna	nazobč. krater															
	PS-14																										glad.	nazobčani	nepravilna	nazobč. krater											
	PS-196																														glad.	nazobčani	pravilna	nazobč. krater							
	PS-233																																		glad.	nazobčani	nepravilna	nazobč. krater			
	PS-68																																						glad.	nazobčani	pravilna
	PS-168						glad.	nazobčani	nepravilna	nazobč. krater																															
PS-97	glad.	nazobčani	pravilna		nazobč. krater																																				
<b>5</b>						RO-A-4					gladka	ni	valoviti	pravilna	konkaven																										
				RO-DD-2		ni										valoviti	pravilna	konkaven																							
<b>6</b>				PS-11															gladka	ni	valoviti	pravilna																			
				PS-13																			ni	valoviti	pravilna	konkaven															
				PS-18																							ni	valoviti	pravilna	konkaven											
				PS-210																											ni	valoviti	pravilna	konkaven							
				PS-218																															ni	valoviti	pravilna	konkaven			
				PS-24																																			ni	valoviti	pravilna
				PS-25			ni	valoviti	pravilna	konkaven																															
	PS-30	ni	valoviti	pravilna	konkaven																																				
	PS-31										ni	valoviti	pravilna	konkaven																											
	PS-51					ni									valoviti	pravilna	konkaven																								
	PS-65																	ni	valoviti	pravilna	konkaven																				
	PS-96																					ni	valoviti	pravilna	konkaven																
	PS-20																									ni	valoviti	pravilna	konkaven												
	PS-237																													ni	valoviti	pravilna	konkaven								
PS-261	ni																																	valoviti	pravilna	konkaven					
RO-B-2																																					ni	valoviti	pravilna	konkaven	
PS-216							ni	valoviti	pravilna	konkaven																															
DV3-A-1		ni	valoviti	pravilna	konkaven																																				
<b>7</b>											DV3-D-2	gladka	ni	valoviti																											pravilna
						DV3-E-3					ni				valoviti	pravilna	konkaven																								
PS-231						gladka												ni	valoviti	pravilna	konkaven																				
<b>8</b>																						3610	gladka	ni	valoviti																
																						RO-H-1				ni	valoviti	pravilna	konkaven												
<b>9</b>																						PS-149								gladka	ni	nenazobčani	pravilna								
	PS-93																					ni												nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen					
	PS-95																																				ni	nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen	
	RO-FF-1						ni	nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen																															
	PS-109	ni	nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen																																				
	PS-119											ni	nenazobčani	pravilna																											popk. dvignjen
	PS-131										ni				nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen																								
	RO-F-3					ni												nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen																					
	RO-PP-2																				ni		nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen																
	PS-108																									ni	nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen												
PS-130	ni																													nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen									
PS-209																						ni											nenazobčani	pravilna	popk. dvignjen						
IS75																																				gladka	ni	nitasti	nepravilna	ploščat	
							ni	nitasti	nepravilna	ploščat																															

**Priloga C: Opis kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču LB**

morfortip	sev	površina	robovi	oblika	profil	gubavost					
1	PS-168	hrapava	nenazobčani	pravilna	konkaven	ploščat	ni				
	PS-217						radialna				
	RO-H-1						valoviti	nepravilna	ploščat	ni	
	PS-13									radialna	
	PS-30									ploščat, kraterski	radialna
	PS-51										ni
	PS-210										ni
	PS-233										ni
	3610										ni
RO-E-2	ni										
2	PS-11	hrapava	nenazobčani	pravilna	konkaven	dvignjen	ni				
	PS-237						ni				
	PS-261						ni				
	PS-96						ni				
	PS-68						ni				
3	RO-B-2	hrapava	nenazobčani	valoviti, nabrani	pravilna	dvignjen	ni				
	RS-D-2						ni				
4	PS-15	hrapava	nenazobčani	pravilna	konkaven	dvignjen	ni				
	PS-209						ni				
	PS-64						ni				
	PS-93						ni				
	PS-95						ni				
	RO-F-3						ni				
5	PS-218	hrapava	nenazobčani	valoviti	konkaven	popk. dvignjen	ni				
	PS-55						ni				
	PS-196						ni				
	PS-52						ni				
	PS-65						ni				
	PS-53						ni				
6	PS-207	hrapava	nenazobčani	valoviti	nepravilna	dvignjen	ni				
	DV3-A-						ni				
	RO-PP-2						ni				
7	PS-20	hrapava	popkasti	pravilna	konkaven	popk. dvignjen	ni				
	PS-263						ni				
	PS-160						ni				
	PS-202						ni				
	PS-231						ni				
	PS-31						ni				
8	RO-A-4	hrapava	nazobčani	nepravilna	popk.	ploščat	ni				
	RO-DD-						ni				
	PS-14						ni				
	PS-194						ni				
	NAF4						ni				
9	PS-24	hrapava	popkasti	pravilna	konkaven	ploščat	ni				
	PS-25						ni				
	DV3-D-						ni				
	DV3-E-3						ni				
10	PS-97	hrapava	nazobčani	nepravilna	kraterski	dvignjen	ni				
	PS-122						ni				
	PS-188						ni				
	PS-250						ni				
11	RO-C-2	hrapava	popkasti	nepravilna	dvignjen	ploščat	ni				
	RS-B-1						ni				
12	PS-18	gladka	nenazobčani	pravilna	ploščat	dvignjen	ni				
	PS-216	hrapava, gladka	nenazobčani	valoviti							
	IS75		nitasti	nepravilna							
13	PS-109	gladka	nenazobčani	pravilna	konkaven	dvignjen	nepravilna				
	PS-119										
	PS-149										
	PS-108										
	PS-130										
	PS-131										
RO-FE-1											

**Priloga D: Opis kolonij puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču R-2A**

morfortip	sev	površina	profil	robovi	oblika	gubavost
1	RO-DD-2	pika	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	RO-E-2				neprav.	
	RO-A-4				prav.	
2	PS-250	pika	kraterski	nazobčani	prav.	radialna
	RS-D-2				neprav.	
3	PS-97	lisa	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	PS-231				prav.	
	3610				prav.	
4	DV3-E-3	lisa	ploščat	nazobčani	prav.	radialna
	DV3-D-2				prav.	
	PS-188				prav.	
5	PS-202	lisa	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	PS-160				prav.	
	PS-218				prav.	
6	PS-52	pika	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	NAF4				prav.	
	RO-B-2				prav.	
7	PS-122	pika	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	RO-C-2				prav.	
	RS-B-1				prav.	
8	RO-PP-2	pika	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	PS-53				prav.	
	RO-F-3				prav.	
9	DV3-A-1	pika	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	IS75				prav.	
	PS-168				prav.	
10	PS-261	lisa	ploščat	nazobčani	prav.	ni
	PS-65				prav.	
	PS-24				prav.	
	PS-11				prav.	
	PS-25				prav.	
	PS-14				prav.	
	PS-196				prav.	
	PS-263				prav.	
	PS-108				prav.	
	PS-109				prav.	
	PS-13				prav.	
	PS-149				prav.	
	PS-15				prav.	
	PS-18				prav.	
	PS-209				prav.	
	PS-237				prav.	
	PS-55				prav.	
	PS-68				prav.	
	PS-96				prav.	
	PS-194				prav.	
	PS-210				prav.	
	PS-216				prav.	
	RO-FF-1				prav.	
	PS-119				prav.	
	PS-130				prav.	
	PS-131				prav.	
	PS-217				prav.	
	PS-30				prav.	
	PS-31				prav.	
	PS-51				prav.	
PS-64	prav.					
PS-93	prav.					
PS-95	prav.					
PS-233	prav.					
PS-207	lisa	ploščat	krpasti	nazob.	neprav.	nepravilna
PS-20	lisa	ploščat	krpasti	nazob.	neprav.	nepravilna

**Priloga E: Opis rojenja in morfologije roja puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču TY**

tip	sev	hitrost	robovi		gubavost	površina	posebna oblika		
1	PS-217	srednja	brsteči	puhasti	ni	hrapava, progasta	brsti		
	PS-24								
	3610		valoviti						
	PS-25		nazobčani		rahlo	progasta			
	PS-55			ni	hrapava, progasta				
2	PS-14	srednja	brsteči		rahlo				
	PS-196								
	PS-233								
	PS-68								
3	RO-A-4	srednja	valoviti	puhasti	ni	hrapava	brsti		
	RO-C-2								
	RS-D-2								
4	PS-52	srednja	puhasti	nazobčani	rahlo		brsti		
	PS-53								
5	PS-207	velika		puhasti	ni	hrapava	brsti, rozeta		
	RS-B-1								
	RO-DD-2					brsteči	hrapava, progasta	brsti	
	PS-160								
	PS-250								
	PS-122								
	PS-188								
	PS-202								
PS-231									
6	RO-H-1	srednja	valoviti		kraterska				
	PS-130								
	RO-FF-1								
7	PS-11	majhna	valoviti		nepravilno				
	PS-13								
	PS-149								
	PS-15								
	PS-18								
	PS-209								
	PS-210								
	PS-216								
	PS-237								
	PS-261								
	PS-30								
	PS-31								
	PS-51								
	PS-64								
	PS-65								
	PS-93								
	PS-95								
	PS-96								
	DV3-A-1								
	DV3-D-2								
RO-F-3									
8	PS-108	srednja	valoviti		kraterska				
	PS-109								
	PS-119								
	PS-131								
	PS-168								
	PS-20								
	PS-263								
RO-B-2									
	IS75			ni	hrapava				
9	PS-194	srednja	valoviti		rahlo				
	PS-97								
	NAF4							rahlo, radialno	
	DV3-E-3							rahlo	gladka
10	RO-E-2	srednja	valoviti		nepravilno, rahlo				
	RO-PP-2								
	PS-218							nepravilno	

**Priloga F: Opis rojenja puščavskih (RO, RS in DV3) in nabrežnih (PS) sevov na gojišču B**

tip	sev	hitrost	rizoidi/meglica	kapljice	posebnosti		
1	PS-30	velika	rizoidi				
	PS-51						
	PS-68						
	PS-96						
2	PS-250					sluz	
	PS-52						
	PS-53						
3	PS-130					kaplje	
	PS-131						
	PS-20						
	PS-25						
4	DV3-E-3				kapljice		
	RO-B-2						
	RO-C-2						
	RO-H-1			kaplje			
5	PS-14			rizoidi		kapljice	
	PS-15						
	PS-160						
	PS-210						
	PS-217						
	PS-24						
	PS-55						
	PS-65						
	PS-93						
	PS-95						
	RO-E-2						
	RO-F-3						
	RO-PP-2						
RS-B-1							
6	PS-11			kaplje			
	PS-18						
	PS-216						
	PS-261						
7	PS-194		meglica	kapljice			
	PS-237						
8	PS-168						
	PS-209						
	PS-218						
	PS-263						
9	PS-108						
	PS-13						
	PS-149						
	PS-196						
	3610						
	DV3-D-2						
10	RO-A-4						
	PS-31	srednja	rizoidi	kapljice	kaplje		
	PS-64						
PS-233	meglica						
11	PS-188	majhna			kodri		
	PS-97						
	PS-202		rizoidi				
	PS-207						
	PS-231			kapljice			
12	DV3-A-1	srednja			kodri		
	RO-DD-2						
13	PS-109	srednja			lovke		
	PS-119						
	RO-FF-1			sluz			
14	PS-122	ni rojenja					
	IS75						
	NAF4						
	RS-D-2						