

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Elizabeta BENIGAR

**VPLIV EKOTIPOV IN FEROTIPOV NA SOBIVANJE IZOLATOV
*Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF ECOTYPES AND FEROTYPES ON
COEXISTENCE OF *Bacillus subtilis* ISOLATES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorico asist. dr. Polonca Štefanič, za recenzenta pa doc. dr. Tomaž Accetto.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentorica: asist. dr. Polonca Štefanič

Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: asist. dr. Polonca Štefanič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Tomaž Accetto
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Elizabeta Benigar 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.

Elizabeta Benigar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22/26:579.852.11:577.2.083(043)=163.6
KG	<i>Bacillus subtilis</i> / ekotipi / ferotipi / zaznavanje celične gostote / komunikacija med celicami / morfologija / sobivanje sevov
AV	BENIGAR, Elizabeta
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica) / ŠTEFANIČ, Polonca (somentorica) / ACCETTO, Tomaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	VPLIV EKOTIPOV IN FEROTIPOV NA SOBIVANJE IZOLATOV <i>Bacillus subtilis</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 43 str., 1 pregl., 15 sl., 23 pril., 105 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Bakterije <i>Bacillus subtilis</i> so po Gramu pozitivne aerobne palčke. Ker le-te živijo predvsem v tleh, so izpostavljene velikim nihanjem v temperaturi, vlagi in dostopnosti hrani, zato kažejo večjo genetsko raznolikost kot bakterije, ki živijo v podobnih, vendar konstantnih okoljih. Sevi <i>B. subtilis</i>, ki naseljujejo enako ali zelo podobno ekološko nišo, spadajo v enak ekotip. Adaptivna mutanta enega ekotipa preraste vse druge seve v istem ekotipu, ne vpliva pa na seve iz drugih ekotipov. Tako prihaja do tekmovanja med sevi znotraj ekotipa, različni ekotipi pa lahko sobivajo. Pri bakterijah <i>B. subtilis</i> sistem za zaznavanje kvoruma (quorum sensing) uravnava številne adaptivne procese, kot so: sporulacija, kompetenca, rojenje, sinteza protimikrobnih peptidov, bakteriocinov in antibiotikov ter litičnih encimov. Bakterije izločajo signalne molekule (feromone), s katerimi komunicirajo; različne komunikacijske skupine, znotraj katerih bakterije učinkovito komunicirajo, pa se imenujejo ferotipi. Znotraj vrste <i>Bacillus subtilis</i> poznamo 4 ferotipske skupine. V diplomski nalogi smo proučevali vpliv ekotipov in ferotipov na sobivanje sevov <i>B. subtilis</i>. Seve smo gojili v kokulturi v tekočem gojišču LB ter na poltrdnem sintetičnem gojišču B. Rezultati gojenja sevov v kokulturi nakazujejo, da sevi enakega ekotipa tekmujejo med seboj, saj en sev sčasoma preraste drugega, medtem ko seva različnih ekotipov lahko sobivata. Na poltrdem gojišču sta dve koloniji (roja) istega seva po stiku tvorili konfluentno kolonijo, medtem ko je bila pri dveh kolonijah različnih sevov ob stiku opazna meja, kar nakazuje spremembo načina rasti ali obnašanja roja. Vsi testirani sevi ekotipa PE 32 so ob stiku z drugimi sevi enakega ali različnega ekotipa tvorili ob stiku kolonij cono lize, medtem ko so bili sevi iz ekotipa PE 10 manj »agresivni« in do lize ni prišlo. Intenzivnost lize je bila odvisna od seva. Rezultati nakazujejo, da je sobivanje sevov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B odvisno predvsem od ekotipa, ferotip pa ne igra posebne vloge.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.22/.26:579.852.11:577.2.083(043)=163.6
CX	<i>Bacillus subtilis</i> / ecotypes / ferotypes / quorum sensing / cell communication / morphology / coexistence of strains
AU	BENIGAR, Elizabeta
AA	MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor) / ŠTEFANIČ, Polonca (co-advisor) / ACCETTO, Tomaž (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2011
TI	THE INFLUENCE OF ECOTYPES AND FEROTYPES ON COEXISTENCE OF <i>Bacillus subtilis</i> ISOLATES
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 43 p., 1 tab., 15 fig., 20 ann., 105 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p><i>Bacillus subtilis</i>, a soil bacterium, is exposed to significant fluctuations in temperature, moisture content and nutrient availability. Strains of <i>B. subtilis</i> show high genetic variability and cluster into different ecotypes. These are defined as strains that inhabit the same or very similar ecological niche. It was hypothesized that an adaptive mutant from one ecotype can outcompete all the strains in the same ecotype but very rarely affects the strains from other ecotypes. In <i>B. subtilis</i>, the ComQXPA quorum sensing (QS) system regulates, through secretion and recognition of pheromones, many adaptive processes, such as sporulation, competence, swarming, production of antimicrobial peptides, bacteriocins, antibiotics and degradative enzymes. High diversity of this QS system results in different communication groups (pherotypes) within species. Members of the same pherotype can exchange signals and induce each other into various adaptive responses, whereas members of different pherotypes cannot communicate. We were investigating the influence of ecotypes and pherotypes on coexistence of <i>B. subtilis</i> isolates in cocultures grown in liquid LB medium and on synthetic semi-solid B medium. The results showed for the first time, that strains of the same ecotype outcompeted each other in the liquid coculture, while strains, belonging to two different ecotypes were able to coexist. On semisolid medium two genetically identical swarms formed a confluent colony, while two swarms of highly related but different strains formed a visible marking line at the point of contact, suggesting a strain specific discrimination mechanism. Furthermore, if a strain of the putative ecotype PE 32 was included in the coculture, the lysis zone was induced at the point of swarms contact. The lysis zone was not present if only strains of PE 10 were cocultured on the semisolid medium. Finally, no influence of pherotypes on coexistence on semisolid medium was detected.</p>

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	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN NAČRT DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EKOLOGIJA <i>B. subtilis</i>	3
2.2 EVOLUCIJA <i>B. subtilis</i>	4
2.3 EKOTIPI.....	5
2.4 GENOMIKA <i>B. subtilis</i>	8
2.5 QUORUM SENSING (QS).....	9
2.5.1 Operon <i>comQXPA</i>	9
2.5.2 Polimorfizem lokusa <i>comQXP'</i>	10
2.6 BIOFILMI	11
2.7 SURFAKTIN (OPERON <i>srfA</i>)	12
2.8 ROJENJE.....	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Bakterijski sevi.....	14
3.1.2 Kemikalije	14
3.1.3 Gojišča	14

3.1.4	Aparature	15
3.2	METODE	16
3.2.1	Morfološka raznolikost in ločevanje sevov <i>B. subtilis</i> na trdnem gojišču LB	16
3.2.2	Ugotavljanje hitrosti rasti sevov z rastno krivuljo	16
3.2.3	Ugotavljanje sobivanja sevov v kokulturah v tekočem gojišču LB	16
3.2.4	Sobivanje sevov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem agarskem gojišču.....	17
4	REZULTATI.....	18
4.1	MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST IN LOČEVANJE SEVOV <i>B. subtilis</i> NA TRDNEH GOJIŠČU LB	18
4.1.1	Ugotavljanje morfologije sevov na trdnem gojišču LB.....	18
4.1.2	Ločevanje dveh različnih sevov na trdnem gojišču LB.....	18
4.1.2.1	Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip	19
4.1.2.2	Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa	19
4.2	UGOTAVLJANJE HITROSTI RASTI SEVOV Z RASTNO KRIVULJO	20
4.3	UGOTAVLJANJE SOBIVANJA SEVOV V KOKULTURAH V TEKOČEM GOJIŠČU	22
4.3.1	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip	22
4.3.1.1	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip.....	22
4.3.1.2	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa	23
4.3.2	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa	24
4.3.2.1	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip.....	24
4.3.2.2	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa	25
4.4	SOBIVANJE SEVOV <i>B. subtilis</i> NA POLTRDNEM AGARSKEM GOJIŠČU ...	27
4.4.1	Sobivanje istih sevov.....	27
4.4.2	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip	28
4.4.2.1	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip.....	28
4.4.2.2	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa	28
4.4.3	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa	29
4.4.3.1	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip.....	29
4.4.3.2	Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa	30

5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	31
5.1	MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST IN LOČEVANJE SEVOV <i>B. subtilis</i> NA TRDNEM GOJIŠČU LB	31
5.2	SORODSTVENA DISKRIMINACIJA	31
5.3	SOBIVANJE SEVOV <i>B. subtilis</i> V KOKULTURAH V TEKOČEM GOJIŠČU	34
5.4	SKLEPI.....	34
6	POVZETEK.....	35
7	VIRI	36

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nabrežni sevi *B. subtilis*, ki pripadajo različnim ferotipom
(168, RS-D-2/NAF4, RO-B-2/RO-H-1) 14

KAZALO SLIK

Slika 1: Trije razredi mutacij in rekombinacijskih dogodkov, ki določajo ekotipsko raznolikost pri bakterijah (Cohan in Perry, 2007: 376).	6
Slika 2: Rekombinacija med nastajajočimi vrstami lahko spodbuja njihovo sobivanje (Cohan in Koeppel, 2008: 1027).	7
Slika 3: Morfologija nabrežnih sevov <i>B. subtilis</i> na trdnem gojišču LB	18
Slika 4: Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v isti ekotip (PE 32), na gojišču LB.	19
Slika 5: Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10), na gojišču LB.	20
Slika 6: Rastne krivulje dveh posameznih sevov	21
Slika 7: Sobivanje sevov PS-53 in PS-131, ki ju uvrščamo v isti ekotip in isti ferotip, v tekočem gojišču LB.	23
Slika 8: Sobivanje sevov PS-53 in PS-218, ki ju uvrščamo v isti ekotip in različna ferotipa, v tekočem gojišču LB	24
Slika 9: Sobivanje sevov PS-53 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in isti ferotip, v tekočem gojišču LB	25
Slika 10: Sobivanje sevov PS-53 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in različna ferotipa, v tekočem gojišču LB	26
Slika 11: Sobivanje istih sevov na poltrdnem gojišču B	27
Slika 12: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v isti ekotip in isti ferotip, na poltrdnem gojišču B	28
Slika 13: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v isti ekotip in različna ferotipa, na poltrdnem gojišču B	29
Slika 14: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in isti ferotip, na poltrdnem gojišču B	29
Slika 15: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in različna ferotipa, na poltrdnem gojišču B	30

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Tri ponovitve sobivanja seva PS-218 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga B:** Tri ponovitve sobivanja seva PS-261 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga C:** Tri ponovitve sobivanja seva PS-53 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga Č:** Tri ponovitve sobivanja seva PS-131 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga D:** Tri ponovitve sobivanja seva PS-11 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga E:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-31 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga F:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-168 na poltrdnem gojišču B.
- Priloga G:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-11 in PS-168, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 10) in enak ferotip (168), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga H:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-31 in PS-261, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 10) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga I:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-53 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga J:** Devet ponovitev sobivanja sevov PS-11 in PS-261, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 10) in različna ferotipa (168 in RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga K:** Devet ponovitev sobivanja sevov PS-53 in PS-218, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga L:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-218 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in različna ferotipa (RS-D-2 in RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga M:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-31 in PS-131, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 10 in PE 32) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga N:** Devet ponovitev sobivanja sevov PS-53 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.
- Priloga O:** Tri ponovitve sobivanja sevov PS-131 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.

Priloga P: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-53 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RO-H-1 in 168), na poltrdnem gojišču B.

Priloga R: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-131 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RO-H-1 in 168), na poltrdnem gojišču B.

Priloga S: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-218 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RS-D-2 in 168), na poltrdnem gojišču B.

Priloga Š: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-261 in PS-218, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 10 in PE 32) in različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2), na poltrdnem gojišču B.

Priloga T1: Število kolonij in delež sevov v prvem tednu gojenja v kokulturi.

Priloga T2: Število kolonij in delež sevov po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB.

Priloga T3: Število kolonij in delež sevov po drugi reinokulaciji v sveže gojišče LB.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
CFU	enote, ki tvorijo kolonijo (<i>angl.</i> colony forming units)
CSF	kompetenčni in sporulacijski faktor (<i>angl.</i> competence and sporulation factor)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EPS	eksopolisaharid
LB	Luria Bertani
OD	optična gostota (<i>angl.</i> optical density)
QS	quorum sensing (zaznavanje celične gostote)
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
wt	divji tip (<i>angl.</i> wild type)

1 UVOD

Bacillus subtilis je eden izmed najbolje raziskanih organizmov in pogosto služi kot modelni organizem za preučevanje mehanizmov genske regulacije, metabolizma in diferenciacije po Gramu pozitivnih bakterij (Sonenshein in sod., 2002).

Populacija je sestavljena iz organizmov iste vrste, ki živijo v bolj ali manj omejenih geografskih območjih (Sikorski, 2008; Begon in sod., 1990). Genetske analize so pokazale veliko raznolikost med sevi vrste *B. subtilis* in prav zaradi tako velike raznolikosti so študije interakcij in dinamike sevov znotraj vrste zanimive (Nakamura in sod., 1999). Ekološko podobne seve znotraj vrste *B. subtilis* lahko uvrščamo v »ekotipe«, ki pripadajo genetsko kohezivnim ter ireverzibilno ločenim evolucijskim linijam (Cohan, 2001). Adaptivna mutanta izpodrine vse seve v njej lastnem ekotipu, kar imenujemo periodična selekcija, ne izpodrine pa sevov drugih ekotipov, ker ekološke razlike med ekotipi preprečijo direktno tekmovanje. Raznolikost znotraj ekotipa narašča s kopičenjem mutacij in s sprejemanjem genov drugih ekotipov (Cohan, 2001). Bakterijski ekotipi torej nosijo vse dinamične lastnosti vrste in so ekološko različni, kar jim omogoča sobivanje (de Queiroz, 2005; Cohan in Perry, 2007).

Drugi mehanizem, ki omogoča bakterijam *B. subtilis* preživetje v spreminjačem se okolju, je zaznavanje celične gostote (quorum sensing), ki uravnava procese, kot so sporulacija, kompetenca, rojenje, produkcija protimikrobnih peptidov, bakteriocinov in antibiotikov ter litičnih encimov, ki omogočajo bakterijam boljše preživetje (Msadek, 1999). Signalna molekula, peptid ComX, se akumulira zunaj celice med eksponentno fazo rasti in po vezavi na receptor ComP sproži fosforilacijo ComA in s tem aktivacijo številnih genov zgoraj navedenih adaptivnih procesov. Bakterija sintetizira ComX kot 55 aminokislin dolg propeptid, ki ga membransko vezan ComQ razreže ter spremeni v 5 do 10 aminokislin dolg izopreniliran peptid (Magnuson in sod., 1994) in verjetno tudi prenese iz celice (Ansaldi in sod., 2002). Ferotipsko specifičnost pri *B. subtilis* določajo geni *comQ*, *comX* in *comP* ter izoprenske modifikacije na feromonu ComX (Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002). Komunikacijski sistem, ki sodeluje pri zaznavanju celične gostote pri ozkosorodnih vrstah *Bacillus*, ločuje seve v 4 ferotipske skupine (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Peptidni feromoni teh štirih ferotipskih skupin se razlikujejo med seboj v velikosti in v sekvenci (Ansaldi in sod., 2002). Bakterije so zmožne učinkovitega komuniciranja znotraj skupine, ne pa tudi med skupinami (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Genetske in fenotipske analize sevov *B. subtilis*, izoliranih iz talnega mikrookolja, so pokazale, da so predstavniki dveh ferotipov lahko ekološko različni in pripadajo različnim ekotipom, vendar pa znotraj enega ekotipa najdemo več različnih ferotipov, pri čemer je en ferotip dominanten (Štefanič in sod., Environ. Micro., v recenziji).

Sistem za zaznavanje celične gostote ComQXPA nadzoruje tudi izražanje gena *srfA*, katerega produkt (surfaktin) zmanjša površinsko napetost pri rojenju (Peypoux in sod., 1999). Rojenje je hitro, koordinirano premikanje bakterijske populacije po površini poltrdnega agarskega gojišča, značilno za naravne izolate *B. subtilis* (Harshey, 2003). Za vklop rojenja je pomembnih veliko dejavnikov, kot so celična gostota, vsebnost hranil in viskoznost gojišča (Fraser in Hughes, 1999). V odgovor na te dejavnike celice postanejo gibljive in podaljšane ter tvorijo skupine ali »splave« in se na koncu gibljejo kot mikrokolonije (Henrichsen, 1992). Rojenje bakterije *B. subtilis* nam je služilo za proučevanje sobivanja različnih sevov na sintetičnem poltrdnem gojišču B.

1.1 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen tega diplomskega dela je ovrednotiti morfologijo sevov *B. subtilis* na trdnem gojišču LB glede na pripadnost ekotipom in ferotipom, ovrednotiti sobivanje teh sevov v kokulturah v tekočem gojišču LB v odvisnosti od ekotipa in ferotipa ter ovrednotiti vlogo ekotipov in ferotipov pri »prepoznavanju« oziroma sobivanju sevov *B. subtilis* na poltrdnem agarskem gojišču. Vloga ferotipov še ni pojasnjena in to vprašanje bomo proučevali v okviru te diplomske naloge. Predvidevamo, da bo diplomsko delo prineslo pomembne rezultate, ki bodo povečali razumevanje komunikacije med različnimi sevi te bakterijske vrste.

Hipoteze:

1. V kokulti dveh sevov enakega ekotipa bo prišlo do tekmovanja med sevoma in bo en sev prevladal oziroma prerasel drugega.
2. V kokulti dveh sevov različnih ekotipov ne bo prišlo do tekmovanja, temveč bosta seva sobivala.
3. Pričakujemo, da se bosta seva z enakim ferotipom na poltrdnem gojišču prepozna (staknila oziroma sobivala), seva z različnima ferotipoma pa se bosta prepozna kot nesorodna in bo prišlo do lize.

Načrt dela:

- ugotavljanje različnih morfologij na LB,
- ugotavljanje kompeticije sevov v kokulti,
- ugotavljanje sobivanja sevov na poltrdnem agarskem gojišču.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EKOLOGIJA *B. subtilis*

Bacillus subtilis so aerobne paličaste bakterije (Harwood, 1989). Najdemo jih v tleh, morskih in sladkovodnih sedimentih, hrani (začimbah, kakavu, semenih in kruhu), gastrointestinalnem traktu živali in površini rastlinskih korenin (Harwood, 1989; Barbosa in sod., 2005).

Celice, ki so v eksponentni fazi rasti, običajno rastejo v verižicah in so negibljive. Da bi preživele ali se prilagodile neugodnim pogojem, vstopijo v stacionarno fazo rasti, v kateri nastanejo samostojne gibljive celice (Graumann, 2007). pride tudi do indukcije kemotakse, ki omogoča bakterijam plavanje proti hranilom oziroma stran od repellentov (Msadek, 1999). Celice se lahko diferencirajo v metabolno neaktivne spore ali pa postanejo kompetentne in prevzamejo DNK iz okolja (Dubnau, 1991). Velik del genoma (okoli 4 %) je namenjen tvorbi sekundarnih metabolitov. Nekatere od teh snovi so močni inhibitorji gliv in bakterij ter omogočajo populacijam *B. subtilis* tekmovanje v naravnem okolju, spodbujajo rast rastlin in služijo kot probiotiki (Nagórska in sod., 2007; Barbosa in sod., 2005; Stein, 2005).

Ker te bakterije živijo predvsem v tleh, so izpostavljeni velikim nihanjem v temperaturi, vlagi in dostopnosti hranil, zato kažejo večjo genetsko raznolikost kot bakterije, ki živijo v podobnih, vendar konstantnih okoljih (McArthur in sod., 1988). To je tudi razlog, da je njihov generacijski čas v tleh 50 do 100 ur, medtem ko je generacijski čas v laboratoriju le 20 do 30 minut (Hecker in Völker, 1990).

Osnovna strukturalna enota talnih ekosistemov je talni agregat, v katerem potekajo biogeokemični procesi. Približno 50 % talnega agregata predstavljajo odprte talne pore, preostanek pa je sestavljen iz mineralnih delcev (pesek, mulj, glina), ki jih drži skupaj organski material, na katerega je *B. subtilis* vezan (Standing in Killham, 2007; Hisset in Gray, 1976; Siala in sod., 1974). O porazdelitvi bakterij znotraj aggregata je malo znanega. Večje poznavanje prostorske organizacije na mikroskali talnega aggregata je bistveno za boljše razumevanje delovanja talnega ekosistema in mehanizmov, ki ustvarjajo in ohranjajo raznolikost (nastanek novih vrst, izumrtje, razpršenost ter interakcije znotraj vrst in med vrstami) (Crawford in sod., 2005; Martiny in sod., 2006; Grundmann, 2004; Mandić in Prosser, 2011).

Ko govorimo o geografskih povezavah, obstaja več izrazov za razmejitev vrst: simpatrične vrste imajo enake geografske porazdelitve, ne glede na to, ali zasedajo isti makrohabitat ali ne. Alopatrične vrste imajo ločene geografske porazdelitve. Sintopične vrste zasedajo isti makrohabitat, kar pomeni, da živijo na istem območju v neposredni bližini. Alotopične

vrste pa ne zasedajo istega makrohabitata, kar pomeni, da ne živijo v neposredni bližini (Rivas, 1964).

2.2 EVOLUCIJA *B. subtilis*

Mikroevolucija je sprememba fenotipov v populaciji po mnogih generacijah zaradi evolucijskih sil mutacije, rekombinacije, genetskega zdrsa, migracije in naravne selekcije (Mayr, 2004; Sikorski, 2008). Populacija je sestavljena iz organizmov iste vrste, ki živijo na bolj ali manj omejenih geografskih območjih (Sikorski, 2008; Begon in sod., 1990). Adaptacija je gibanje populacije proti fenotipu, ki najbolj ustreza trenutnim pogojem v okolju (Fisher, 1930; Orr, 2005). Ta proces se zgodi po mnogih generacijah in ne znotraj življenske dobe ene celice. Mikroevolucija se torej dogaja na populacijskem nivoju in ne na nivoju posameznih celic ali genov (ki mutirajo, rekombinirajo ali so horizontalno preneseni) (Sikorski, 2008; Mayr, 1997).

Mutagene snovi, podvojevanje in popravljanje DNK lahko sprožijo mutacije v genomu. Če je mutacija nevtralna ali predstavlja prednost za življenje v nekem okolju, se taka mutacija lahko znotraj populacije fiksira in slej ali prej postane dominantna. Vendar pa to ni primarna gonilna sila evolucije med bakterijskimi vrstami. Najpomembnejšo vlogo v evoluciji igrajo horizontalni genski prenosi: transdukcija, konjugacija in transformacija (Earl in sod., 2008).

Horizontalno preneseni geni fagov se lahko vključijo v genom s transdukcijo (Dufraigne in sod., 2005). Genom bakterije *B. subtilis* vsebuje vsaj 10 profagov ali ostankov profagov, kar kaže, da je okužba z bakteriofagi igrala pomembno evolucijsko vlogo (Kunst in sod., 1997). Prisotnost genov znotraj fagnih elementov, ki kodirajo sintezo antibiotikov in encime za razstrupljanje, nakazuje na to, da fagi oblikujejo ekologijo *B. subtilis* z vključitvijo novih lokusov, ki jih bakterija lahko uporabi za raziskovanje ali bivanje v različnih okoljih (Earl in sod., 2008).

Med bakterijami prihaja tudi do prenosa plazmidov (konjugacije). Plazmide ima le okoli 10 % sevov *B. subtilis*. Vsi ti plazmidi so homologni, kar pomeni, da imajo enak osnovni replikon. Plazmidi pa ne kažejo večje koristi za bakterijo, zato se redko pojavljajo med naravnimi populacijami in so genetsko homogeni. Torej je malo verjetno, da je konjugacija pomemben dejavnik v evoluciji te vrste (Zawadzki in sod., 1996).

V evoluciji te bakterije igra pomembno vlogo transformacija. Pod laboratorijskimi pogoji lahko sevi sprejmejo in z rekombinacijo vključijo sorodno DNK iz oklice. To se lahko zgodi tudi med podvrstami, čeprav se število rekombinant zmanjšuje z zmanjševanjem sorodnosti. Temu fenomenu pravimo seksualna izolacija (Zawadzki in sod., 1995). Izgleda torej, da divje populacije *B. subtilis* v naravi rekombinirajo gene (Roberts in Cohan, 1995).

Rekombinacija pri bakterijah pa je zelo redka. Bakterije ne izmenjujejo genov tako pogosto kot rastline in živali, ko pa jih, niso niti približno tako izbirčne glede partnerja. Živalske skupine v celoti izgubijo zmožnost izmenjave genov, ko se njihove mitohondrijske DNK sekvence razlikujejo v 3 % (Avise, 2000). Nasprotno pa lahko med bakterijami pride do homologne rekombinacije tudi, če se njihove DNK sekvence razlikujejo v več kot 25 % (Duncan in sod., 1989). Vseeno pa obstajajo nekatere pomembne omejitve pri bakterijski genetski izmenjavi. Rekombinacija, ki je odvisna od vektorjev (transdukcija z bakteriofagi ali konjugacija s plazmidi), je omejena z razponom gostiteljev posameznih vektorjev. Tudi aktivnost restrikcijskih endonukleaz lahko v veliki meri zmanjša stopnjo rekombinacije, čeprav ne v primeru rekombinacije s transformacijo (Edwards in sod., 1999; Cohan in sod., 1991). Stopnja rekombinacije se eksponentno zmanjšuje z razliko sekvence donorja in recipienta (Roberts in Cohan, 1993). Rekombinacija pri bakterijah ni omejena s prenosom homolognih segmentov. Bakterije lahko »ujamejo« nov genski lokus iz drugih organizmov, včasih tudi iz organizmov, ki so daljno sorodni. To se lahko zgodi kot stranski učinek homologne rekombinacije, pri čemer je heterologni gen donorja vključen skupaj s homologno DNK (heterologna rekombinacija). Heterologni gen je lahko vključen tudi skupaj s transpozonskim elementom, ki vstopi v recipientsko celico na plazmidu ali fagu (Van Spanning in sod., 1995).

Bakterije so pridobile mnogo adaptivnih lastnosti s heterologno rekombinacijo. Na tak način so se v njihov genome vključili novi lokusi ali operoni iz druge vrste. Tipični bakterijski genom ima 5 do 10 % genov, ki izvirajo iz zelo različnih vrst (Ochman in sod., 2000). Pri prokariontih lahko horizontalni genetski prenos prenese celotno biokemično pot iz donorskega genoma v recipienta in s tem spremeni metabolizem recipientskega seva (Lawrence, 1997).

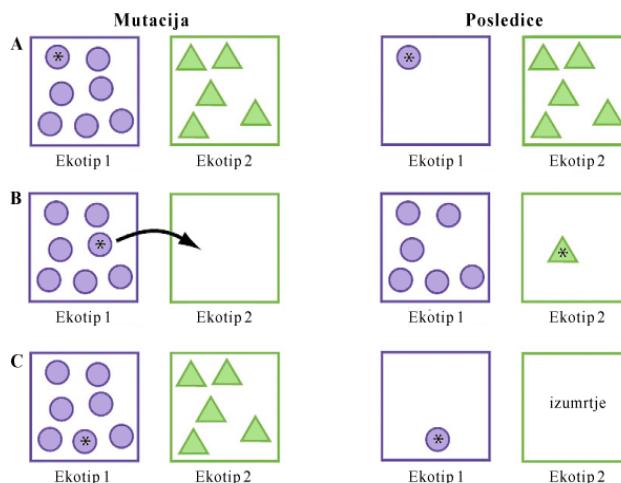
2.3 EKOTIPI

Kjer koli je življenje, tam so bakterije (Margulis in Schwartz, 1998). Prosto živeče bakterije najdemo praktično v vsakem okolju (Madigan in sod., 1999). Znotraj prokariotskega sveta torej obstaja zelo velika ekološka raznolikost, ki jo ugotavljamo na osnovi fenotipskih, ekoloških karakteristik in DNK zaporedij (Cohan, 2001).

Bakterijski ekotipi nosijo vse dinamične lastnosti vrste (de Queiroz, 2005; Cohan in Perry, 2007). Vsak ekotip je kohezivna skupina, katerega raznolikost je omejena s periodično selekcijo in/ali driftom. Ker so ekotipi zunaj dosega genetskega zdrsa in periodične selekcije drug drugega, so ireverzibilno ločene evolucijske linije. Ker bi naj bila rekombinacija preveč redka, da bi preprečila njihovo adaptivno divergenco, imajo različno evolucijo (Cohan, 2001). Ekotipi so ekološko različni, kar jim omogoča sobivanje (de Queiroz, 2005; Cohan in Perry, 2007).

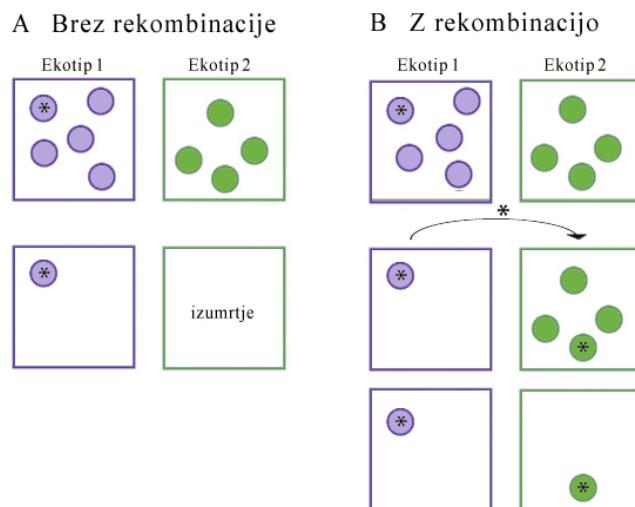
Ekotip je torej niz sevov, ki naseljujejo enako ali zelo podobno ekološko nišo. Adaptivna mutanta iz ekotipa izpodrine vse druge seve v istem ekotipu, ne izpodrine pa sevov drugih ekotipov. Ekotip lahko razširi svojo ekološko raznolikost s kopičenjem mutacij in s sprejemanjem novih genov iz drugih ekotipov. Dokler so ekološke razlike med genotipi znotraj ekotipa majhne, lahko dogodek periodične selekcije počisti ekološko in genetsko raznolikost znotraj ekotipa (Slika 1A). Divergenca bo trajna samo, če nova mutanta (ali rekombinant) uide periodični selekciji starševskega ekotipa in ustvari nov ekotip (Slika 1B). V tem primeru bo nov genotip s potomci tvoril ločen ekotip, ki ne bo več dovzeten za dogodke periodične selekcije, ki se dogajajo v starševskem ekotipu. Vsak od teh dveh ekotipov bo lahko sedaj imel svoje dogodke periodične selekcije. Periodična selekcija bo tako obdržala ekotipa različna v vseh njunih lastnostih in genih (Cohan, 2001).

Zoologi in botaniki so že davno ugotovili, da je genetska izmenjava močna sila kohezije med populacijami. Populacije, ki lahko izmenjujejo gene, ne divergirajo, medtem ko populacije, ki ne morejo izmenjevati genov, prosto divergirajo. Stopnja rekombinacije pri *B. subtilis* je 10^{-7} . V populaciji *B. subtilis*, ki je prilagojena na slana tla, lahko ena celica pridobi mutacijo, ki ji omogoča še večjo toleranco na sol. V odsotnosti rekombinacije bo izvorna adaptivna mutanta s svojimi klonskimi potomci sčasoma nadomestila druge celice populacije (Slika 1A) (Cohan, 1996).



Slika 1: Trije razredi mutacij in rekombinacijskih dogodkov, ki določajo ekotipsko raznolikost pri bakterijah. Krogci predstavljajo različne genotipe, zvezdice pa predstavljajo adaptivne mutacije. (A) Mutacije periodične selekcije. Te izboljšajo fitnes posameznika, tako da mutanta in njeni potomci izpodrino vse druge celice znotraj ekološke niše (ekotipa); te mutacije pa ne vplivajo na raznolikost znotraj drugih ekotipov, ker ekološke razlike preprečijo direktno tekmovanje. Periodična selekcija torej vodi v ločevanje ekotipov s čiščenjem raznolikosti znotraj, ne pa med ekotipi. (B) Mutacije, ki omogočijo nastanek novega ekotipa. Mutacija ali rekombinacijski dogodek omogoči celici, da zasede novo ekološko nišo in tako ustvari nov ekotip. Taka mutanta, kot tudi njeni potomci, lahko sedaj uidejo periodični selekciji ekotipa, iz katerega izhajajo. (C) Mutacija, ki prepreči speciacijo. Tudi če sta dva ekotipa utrpela preteklost ločenih dogodkov periodične selekcije, lahko izjemno adaptivni genotip mutante izpodrine drug ekotip. Izumrtje drugega ekotipa (Ekotip 2) je možno le, če vse vire, ki jih uporablja Ekotip 2, izkorišča tudi Ekotip 1 (Cohan in Perry, 2007: 376).

Po mnenju Cohan-a je vrsta v naravi evolucijska linija, ki jo skupaj drži ekotipsko specifična periodična selekcija (Cohan, 2001). Za speciacijo pri bakterijah je potrebna ekološka raznolikost (Cohan, 1994b). Zaradi zelo velikih populacij bakterij so mutacije in rekombinacijski dogodki bakterijam veliko bolj dostopni. Redka rekombinacija med nedavno ločenima ekotipoma pa lahko zmanjša njuno stopnjo izumrtja (Slika 2). Na zgodnji stopnji speciacije sta se lahko novonastali in starševski ekotip razlikovala le po razmerjih virov, ki jih izkoriščata. V tem primeru je novonastali ekotip občutljiv na periodično selekcijo, ki jo povzroči adaptivna mutacija znotraj starševskega ekotipa. Vendar pa se lahko s horizontalnim genetskim prenosom prenese adaptivna mutacija iz starševskega v novonastali ekotip in tako prepreči izumrtje novonastalega ekotipa. Ironično je, da rekombinacija med nastajajočimi vrstami, ki ovira speciacijo pri živalih in rastlinah, lahko olajša sobivanje mladih prokarjontskih vrst (Cohan, 2001).



Slika 2: Rekombinacija med nastajajočimi vrstami lahko spodbuja njihovo sobivanje. Ekotip 1 in 2 predstavlja nedavno ločena ekotipa, ki se razlikujeta le v razmerjih virov, ki jih izkoriščata. Ker ne izkoriščata nobenih posebnih virov, je lahko vsak ekotip občutljiv na tekmovalne mutante v drugem ekotipu. Krogci predstavljajo različne genotipe znotraj vsakega ekotipa, zvezdice pa predstavljajo mutacijo, ki daje tekmovalne prednosti genotipu, ki jo ima. (A) Ko se ne zgodi rekombinacija, adaptivna mutanta v Ekotipu 1 povzroči izumrtje Ekotipa 2 skupaj z vsemi ostalimi genotipi v Ekotipu 1. (B) Z rekombinacijo pa se lahko adaptivni alel prenese v Ekotip 2, kar povzroči periodično selekcijo v tem ekotipu in dovoli nadaljnje sobivanje obeh ekotipov (Cohan in Koeppel, 2008: 1027).

Bakterijske vrste so odprte za genski prenos iz mnogih, tudi daljno sorodnih taksonov (Cohan, 2001). Bakterije lahko torej pridobijo obstoječe adaptacije iz drugih bakterijskih vrst. V nekaterih primerih lahko homologna rekombinacija zamenja adaptivni alel iz druge vrste v že obstoječ gen v recipientu. Rekombinacija lahko predstavi tudi povsem nove gene in operone iz drugih vrst (Lan in Reeves, 1996; Groisman in Ochman, 1997). S sprejemom čisto nove metabolne funkcije pa lahko novonastali ekotip izkorišča vire, ki niso dostopni starševskemu ekotipu. To takoj postavi novonastali ekotip izven območja periodične selekcije starševskega ekotipa. Ta promiskuiteta bakterijske genetske izmenjave lahko

pomaga nastajajočemu ekotipu, da ga ne izpodrine adaptivna mutanta iz starševskega ekotipa (Cohan, 2001). Tudi če bi dogodek hotizontalnega genetskega prenosa (ali mutacije) zmanjšal fitnes recipientskega prokarionta, bi lahko bila rekombinantna še vedno uspešna. Razlog za to je, da nova mutacija ali rekombinacija lahko vodi celico (in njene klonske potomce) v novo ekološko nišo, kjer lahko izkoriščajo vire, ki jih starševski ekotip ne more (Cohan in Koeppel, 2008).

Ekotipe določamo z dvema računalniškima algoritmoma, ki simulirata evolucijsko dinamiko ekotipov za ločevanje ekotipov iz sekvenčnih podatkov: Ecotype Simulation in AdaptML. Vsak analizira evolucijsko preteklost določene veje in poda primerne kriterije za razmejitev ekotipov (Koeppel in sod., 2008; Hunt in sod., 2008).

Ekotipe ugotavljamo na osnovi gospodinjskih genov, npr. gena *gyrA* (Cohan in Perry, 2007). Sekvence *gyrA* zelo sorodnih sevov *Bacillus subtilis* tvorijo 2 skupini. Ena skupina vsebuje sekvence puščavskih izolatov *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, druga pa vsebuje laboratorijski sev *B. subtilis* 168, gene *gyrA* vseh nabrežnih sevov in nekaj genov *gyrA* puščavskih sevov, ki so filogenetsko umeščeni v *B. subtilis* subsp. *subtilis* (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Študije mikrobne porazdeljenosti talnih bakterij so razkrile, da sta genetska raznolikost in medsebojna oddaljenost v okolju povezani. Izolati, ki so kilometre narazen, imajo manjši delež nukleotidne podobnosti v lokusih *gyrA* kot nabrežni izolati. Podoben trend so opazili tudi v hitreje razvijajočih se lokusih *comQ* (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). ComQ kodira encim, ki procesira in modificira prekurzorsko signalno molekulo ComX (Ansaldi in sod., 2002). Velik del kromosoma je zelo variabilen pri različnih sevih *B. subtilis*, kar kaže na veliko funkcionalno raznolikost znotraj vrste (Earl in sod., 2008).

2.4 GENOMIKA *B. subtilis*

Bacillus subtilis je najbolje raziskan predstavnik po Gramu pozitivnih bakterij. Genom seva 168 z 4,214,810 bp obsega 4,100 genov, ki kodirajo proteine. Od tega jih je 53 % predstavljenih enkrat, medtem ko četrtina genoma pripada več genskim družinam, ki so razširjene z gensko duplikacijo. Največja družina vsebuje 77 ATP-vezavnih transportnih proteinov. Povprečna vsebnost GC bp je 43,5 %. Velik delež genoma je namenjen izkoriščanju ogljikovih virov, vključno z molekulami rastlinskega izvora (Kunst in sod., 1997). Nekateri od sekundarnih metabolitov so inhibitorji gliv in bakterij ter omogočajo bakteriji tekmovanje v naravnem okolju (Nagórska in sod., 2007; Barbosa in sod., 2005; Stein, 2005). Ima tudi gene, ki kodirajo respiratorno nitratno reduktazo, kar nakazuje, da lahko *B. subtilis* raste tudi anaerobno z uporabo nitrata kot elektronskega sprejemnika (Kunst in sod., 1997).

2.5 QUORUM SENSING (QS)

Medcelična komunikacija igra osrednjo vlogo v fiziologiji in razvoju organizmov. Mnogo bakterijskih vrst, za katere smo dolgo domnevali, da živijo kot samostojne celice, usklajujejo svoje fiziološke odzive na nivoju populacije. Bakterije sintetizirajo zunajcelične signalne molekule (feromone), ki se kopičijo v okolju in označujejo in obveščajo o gostoti populacije celic ter s tem sprožijo koordinirano skupinsko vedenje. Vezava signalne molekule na receptor (membranski ali citoplazemski) sproži spremembo v transkripciji tarčnih genov, kar vodi v spremembe v fiziologiji ali obnašanju populacije (England in sod., 1999; Bassler, 2002; Winans in Bassler, 2002; Miller in Bassler, 2001; Lazazzera in Grossman, 1998).

V stacionarni fazi rasti *B. subtilis* uporablja zaznavanje celične gostote (quorum sensing) za izmenjavo med dvema celičnima tipoma: kompetentne celice, ki so zmožne prevzeti DNK iz okolja, in dormantne spore, ki so zmožne preživeti neugodne okoljske pogoje, pa tudi za nadziranje gibljivosti, produkcije protimikrobnih peptidov (bakteriocinov in antibiotikov) in litičnih encimov (Dubnau, 1991).

Sistem za zaznavanje quoruma (quorum sensing, QS), ki kontrolira naravno genetsko kompetenco pri *B. subtilis*, je sestavljen iz feromona ComX ter dvokomponentnega sistema ComP/ComA (Weinrauch in sod., 1990; Dubnau in sod., 1994). Dvokomponentni sistem znotraj dveh proteinov združuje senzorične, prenašalne in transkripcijsko-aktivacijske module (Msadek, 1999). Pri *B. subtilis* so dvokomponentni sistemi posvečeni enemu odzivu, vendar imajo prekrivajoče vloge (Msadek in sod., 1995). Znotraj tega omrežja obstajajo vsaj 3 nivoji regulacije: interakcija protein-okolje, kar omogoča zaznavanje molekul ali ligandov z membranskimi proteini; interakcija protein-protein, ki zajema fosforilacijo in defosforilacijo regulatornih proteinov, inhibicijo encimov in proteolizo; interakcija protein-DNK, ki pozitivno ali negativno kontrolira izražanje genov (Msadek, 1999).

2.5.1 Operon *comQXPA*

Sistem zaznavanja celične gostote pri *B. subtilis* kodira operon *comQXPA*, ki je sestavljen iz treh polimorfnih genov (*comQ*, *comX*, *comP*) in iz enega ohranjenega gena (*comA*). Polimorfizem genov *comQ*, *comX* ter N-terminalne domene *comP* kaže njihovo koevolucijo. Ti geni določajo specifičnost QS odziva (Tortosa in sod., 2001). Poleg tega, da sistem ComQXPA nadzoruje genetsko kompetenco, sodeluje tudi pri uravnavanju transkripcije drugih lastnosti, vključno z rojenjem, produkcijo zunajceličnih litičnih encimov ter številnih zunajceličnih polimernih substanc, kot je EPS in kapsularni poli- γ -glutamat (Lazazzera in sod., 1999; Nakano in sod., 1991; Nagai in sod., 2000; Lopez in sod., 2009).

Operon *comQXPA* vključuje feromon ComX, ki se akumulira med eksponentno fazo rasti in s katerim bakterija odgovarja na povečano celično gostoto. Sintetiziran je kot protein iz 55 aminokislin, ki je nato razrezan in postranslacijsko modificiran ter sproščen v zunajcelični medij kot peptid iz 5 do 10 aminokislin (Magnuson in sod., 1994).

Za aktivnost feromona ComX je pomemben triptofanski ostanek, ki predstavlja mesto za izoprenske modifikacije (Ansaldi in sod., 2002; Bacon Schnider in sod., 2002). Izoprenske modifikacije na triptofanskem ostanku prepeptida ComX katalizira encim ComQ. Komunikacijski sistem, ki sodeluje pri zaznavanju celične gostote pri vrstah *Bacillus*, ločuje seve v 4 ferotipske skupine (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Peptidni feromoni 4 ferotipskih skupin se razlikujejo v velikosti (od 5 do 10 aminokislin) in v sekvenci (v vseh peptidih je ohranjen samo triptofanski ostanek) (Ansaldi in sod., 2002). Bakterije so zmožne učinkovitega komuniciranja znotraj skupine, ne pa med skupinami (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009).

2.5.2 Polimorfizem lokusa *comQXP'*

Med polimorfnimi geni *comX*, *comQ* in N-terminalno domeno *comP* obstaja le 56 % nukleotidna podobnost, medtem ko sta C-terminalni del *comP* in celoten gen *comA* zelo ohranjena (več kot 90 % nukleotidna podobnost). Vsak senzor ComP je specifično aktiviran s svojim feromonom in v nekaterih primerih z omejenim nizom feromonov drugih sevov. Pari ComX-ComP enakega ferotipa kažejo navzkrižno aktivacijo in so bolj sorodni na sekvenčnem nivoju. Naravni izolati, ki pripadajo isti vrsti ali izvirajo iz istega ekosistema, tvorijo različne aktivacijske skupine oziroma ferotipe, ki niso zmožni inducirati drug drugega v kompetenco (Ansaldi in sod., 2002). Pomanjkanje navzkrižne aktivacije med sevi iste vrste lahko zniža verjetnost za genetsko izmenjavo (Tortosa in Dubnau, 1999).

Pri *B. subtilis* sta ComQ in ComX edina proteina, potrebna za produkcijo kompetenčnega feromona, geni *comQ*, *comX* in *comP* pa določajo ferotipsko specifičnost. ComA in C-terminalna domena ComP, s katero se poveže, sta zelo ohranjena, zato se ComA lahko dobro poveže s katerokoli molekuljo ComP. Feromonsko specifičnost določajo razlike v C-terminalnih koncih ComX (izoprenske modifikacije). Pri sevih *B. subtilis* obstajajo vsaj 4 ferotipske specifičnosti. Eno skupino sestavljata *B. subtilis* 168 in *B. mojavensis* RO-C-2, drugo skupino sestavljata *B. subtilis* RS-B-1 in *B. mojavensis* RO-H-1 in RO-B-2. Tretjo skupino sestavlja *B. subtilis* RO-FF-1, četrta skupina pa je sestavljena iz *B. natto* NAF4 in RS-D-2 (Tortosa in sod., 2001). Navzkrižna komunikacija med ferotipi ni nikoli tako močna kot znotraj ferotipa. Navzkrižna komunikacija je lahko tudi rezultat produkcije faktorja CSF, ki inducira operon *srfA* v odsotnosti specifičnega feromona ComX (Pottathil in sod., 2008).

Zanimivo je, da se ferotip in filogenetska klasifikacija ne ujemata. Posamezniki v prvi in drugi ferotipski skupini so bili dodeljeni različnim vrstam glede na razlike v restriktičnih mestih treh gospodinjskih lokusov, sestavi maščobnih kislin, genetski transformaciji med vrstami in v DNK hibridizacijskih poskusih (Roberts in Cohan, 1995; Roberts in sod., 1994). Lokusi QS so se verjetno premikali horizontalno med sevi s transformacijo. Ta horizontalni prenos se je mogel zgoditi bolj pogosto kot pri večini drugih genov. Zakaj bi se geni QS širili tako pogosto, je neznano. Mogoče menjava ferotipa prehodno poveča fitnes. Druga možnost pa je, da se lokus QS obnaša kot sebična DNK in da obstaja poseben mehanizem, ki se aktivira s feromonom in prenese ta lokus (Tortosa in sod., 2001).

2.6 BIOFILMI

Že dolgo je znano, da si lahko bakterije olajšajo rast s tvorbo večceličnih skupnosti, ki so najpogosteje pritrjene na podlago. Najbolj značilni tip rasti na površini imenujemo biofilm (Shapiro, 1998). Bakterija *B. subtilis* je zmožna tvorbe večceličnih skupnosti (biofilmov), ki kažejo visoko stopnjo prostorske in časovne organizacije. Tvorba biofilmov je pomembna strategija preživetja (Davey in O'Toole, 2000). Glede na hitre, stalne in ekstremne spremembe okoljskih pogojev, biofilmi ponujajo celicam zavetje ter omogočajo vzpostavitev dolgoročnih povezav z drugimi celicami in z njihovim neposrednim okoljem (Branda in sod., 2004). Laboratorijski sevi *B. subtilis* tvorijo tanke in relativno nediferencirane biofilme, divji sevi pa tvorijo večcelične skupnosti z vidnimi arhitekturnimi značilnostmi, kot so strukture, podobne plodilnim telescem, ki izraščajo iz površine biofilma. Konice teh plodilnih teles služijo kot preferenčna mesta za tvorbo spor (Branda in sod., 2001; Lopez in sod., 2009).

V minimalnem gojišču celice sprva rastejo planktonično (gibljive, posamezne celice). Celice nato migrirajo do interfaze zrak – tekočina, kjer se razmnožujejo kot dolge verige negibljivih celic. Te verige so urejene v vzporednih vzorcih in so tesno povezane z zunajceličnim matriksom, kar vse skupaj tvori plavajoči biofilm (pelikel). Rast verig se nadaljuje, nastanejo večje strukture, vključno s plodilnimi telesci. Plodilna telesca se tvorijo tudi na trdnem gojišču (Branda in sod., 2004). Za spremljanje prostorskih vzorcev celic so bile uporabljene transkripcijske fuzije s fluorescentnimi proteini. Gibljive celice se nahajajo na osnovi in na robovih biofilma, medtem ko se celice, ki proizvajajo zunajcelični polisaharidni matriks, nahajajo na odsekih po celotnem biofilmu. Zunajcelični matriks mora držati skupaj vse celice v biofilmu, ne glede na to, ali ga proizvajajo ali ne. Za nastanek biofilma so torej potrebne celice, ki proizvajajo zunajcelični matriks, vendar tudi v zrelem biofilmu obstaja populacija gibljivih celic (Vlamakis in sod., 2008).

Za začetne stopnje razvoja biofilma so potrebni geni, ki uravnavajo vstop v sporulacijsko pot (*spo0A* in *spo0H*). Geni *yveQ* in *yveR* so udeleženi v tvorbo polisaharidne komponente zunajceličnega matriksa. Ta matriks služi kot ogrodje za arhitekturo biofilma. Geni, ki

uravnavajo produkcijo surfaktina (*srfAA* in *sfp*), pa so potrebni za tvorbo plodilnih telesc (Branda in sod., 2004).

2.7 SURFAKTIN (OPERON *srfA*)

Surfaktin je neribosomsко sintetiziran ciklični lipopeptid, ki se širi pred roječimi bakterijami (Peypoux in sod., 1999; Julkowska in sod., 2004, 2005). Sestavljen je iz sedmih aminokislín in β -hidroksi maščobne kisline (Arima in sod., 1968). Za tvorbo peptidne molekule so potrebne tri podenote surfaktin sintetaze. Razdeljene so na 7 aminokislinskih aktivacijskih domen. Te domene vključujejo aminokislíne, ki sestavljajo surfaktin (Cosmina in sod., 1993). Surfaktin zmanjša površinsko napetost, trenje ali viskoznost površine agarskega gojišča (Peypoux in sod., 1999). Je tudi bioaktivna snov in lahko uničuje druge bakterije in glive (Nakano, 1991).

Operon *srfA* kodira encime, ki katalizirajo sintezo surfaktina. Velik je več kot 25 kb (Nakano, 1991). Za produkcijo surfaktina so pomembni trije geni: *sfp*, *srfA* in *comA* (Nakano in Zuber, 1988, 1989). Gen *sfp* najdemo v sevu, ki proizvaja surfaktin. Sevi, ki ne proizvajajo surfaktina, nosijo vse gene, razen delujočega gena *sfp*. V odsotnosti delujočega gena *sfp* produkti operona *srfA* sodelujejo v drugih biokemičnih procesih. Potreben je za vključitev kompetence in je pogojno potreben tudi za sporulacijo (Nakano, 1991). Mutacije v genu *comA* preprečijo razvoj kompetence v zgodnji stopnji. Take celice ne producirajo surfaktina, kljub temu da nosijo gen *sfp* (Nakano in Zuber, 1989). To nakazuje, da sta produkcija surfaktina in razvoj kompetence regulirana s skupno signalno potjo (Nakano, 1991).

Izražanje operona *srfA* nadzoruje sistem za zaznavanje quorum preko dvokomponentnega sistema ComP/ComA, ki se odziva na izločen feromon ComX, v manjšem obsegu pa tudi na drugi pentapeptidni feromon CSF (Hahn in Dubnau, 1991).

2.8 ROJENJE

Drugi primer tvorbe večceličnih skupnosti je rojenje, ki bakterijam omogoča hitro kolonizacijo podlage. Povezano je s tvorbo biofilma, odpornostjo proti antibiotikom in proizvodnjo virulenčnih faktorjev (zunajcelične proteaze) (Allison in sod., 1992). Laboratorijski sevi *B. subtilis* kažejo manj robustno tvorbo biofilma in rojenje kot divji sevi (Branda in sod., 2001).

Rojenje je hitro, koordinirano gibanje bakterijske populacije po površini agarskega gojišča z nizko koncentracijo agarja (od 0,6 do 1 %) (Harshey, 2003). *Bacillus subtilis* za rojenje potrebuje flagele, vlogo pri rojenju pa ima tudi surfaktin (lipoproteinski surfaktant), ki zmanjša površinsko napetost (Ohgiwari in sod., 1992; Peypoux in sod., 1999).

Za vklop rojenja je pomembnih veliko dejavnikov. Med najbolje definiranimi so celična gostota, vsebnost hranil in viskoznost gojišča (Fraser in Hughes, 1999). V odgovor na te dejavnike celice postanejo gibljive in podaljšane ter tvorijo skupine ali »splave« in se na koncu gibljejo kot mikrokolonije (Henrichsen, 1972). Pri *B. subtilis* je roječa diferencirana celica prilagojena na kolonizacijo površine. Ima povečano biosintezo flagel in sluzi, kar ji pomaga pri translokaciji (Connely in sod., 2004).

Vzorci rojenja so različni – od amorfnih, konfluentnih rastnih con in relativno enostavnega radialnega razvejanja do zelo kompleksnih gosto razvejanih struktur (Ben-Jacob in sod., 1994; Mendelson in Salhi, 1996; Dixit in sod., 2002). Divji sev 3610 na površini sintetičnega B-gojišča tvori dendritično razvejan vzorec. Nasprotno pa je na gojišču LB rojenje preprostejše in vzorec ni dendritičen (Julkowska in sod., 2005). Medtem ko koncentracija hranil vpliva na vzorec, pa je koncentracija agarja najpomembnejša pri določanju bakterijskega rojenja (Mendelson in Salhi, 1996). Rojenje torej potrebuje ekstrakcijo vode iz agarja ali zmanjšanje površinskega trenja (Matsuyama in sod., 1989; Matsuyama in Matsushita, 2001). Učinkovito rojenje na sintetičnem B-gojišču se kaže pri agarskih koncentracijah od 0.7 do 1 % in se ne razvije pri 1.5 % agarju, kjer je površinski film vode nezadosten za migracijo celic. Na agarju, ki je manj koncentriran, pa je rojenje celo neodvisno od flagel (Hamze in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Uporabili smo izolate vrste *Bacillus subtilis*. Izolate z oznako PS sta iz dveh vzorcev peščenih tal z nabrežja Save (Tacen, Slovenija) izolirali Štefanič in Mandič-Mulec (2009) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Nabrežni sevi *B. subtilis*, ki pripadajo različnim ferotipom (168, RS-D-2/NAF4, RO-B-2/RO-H-1).

Sev	Genotip	Ferotip	Ekotip	Vir
PS-11	wt <i>B. subtilis</i>	168 (1)	PE10	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)
PS-31	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1 (2)	PE10	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)
PS-53	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1 (2)	PE32	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)
PS-131	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1 (2)	PE32	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)
PS-168	wt <i>B. subtilis</i>	168 (1)	PE10	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)
PS-218	wt <i>B. subtilis</i>	RS-D-2/NAF4 (3)	PE32	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)
PS-261	wt <i>B. subtilis</i>	RO-B-2/RO-H-1 (2)	PE10	(Štefanič in Mandič-Mulec, 2009)

3.1.2 Kemikalije

Biolife (Milano, Italija):

tripton, kvasni ekstrakt

Kemika (Zagreb, Hrvaška):

glukoza

Riedel-de Haën (Seelze-Hannover) (Danska):

NaCl

Fluka (Španija):

agar, glutaminska kislina, lizin

Merck (Darmstadt, Nemčija):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, Na-citrat,

Tris-HCl, KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$,

$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Sigma-Aldrich (Nemčija):

KCl , $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, triptofan

3.1.3 Gojišča

Gojišče LB

tripton 10 g

NaCl 10 g

kvasni ekstrakt 5 g

H_2O do 1000 ml

agar 15 g

Gojišče B

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

zmešamo I in II, dodamo še:

agar	7 g
------	-----

Raztopino I In II pripravimo posebej. V litrsko erlenmajerico z 900 ml destilirane vode zamešamo sestavine, navedene pod točko I, v 250 mililitrsko erlenmajerico s 100 ml destilirane vode pa zamešamo sestavine, navedene pod točko II. Sestavine dodajamo po prikazanem vrstnem redu od zgoraj navzdol. Na koncu zlijemo 100 ml mešanice II v 900 ml mešanice I, dodamo agar in avtoklaviramo pri 110 °C 36 minut.

3.1.4 Aparature

Stresalna kopel	Julabo ShakeTemp SW22
Spektrofotometer	Iskra Photometer MA9510
Fotoaparat	Canon PowerShot SX120 IS
Avtoklav	Kambič A-21
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH, Tehnica
Laboratorijska tehnica	Mettler PM4600 DeltaRange®
Vortex	IKA® MS3 digital

3.2 METODE

3.2.1 Morfološka raznolikost in ločevanje sevov *B. subtilis* na trdnem gojišču LB

Na agarskem gojišču LB smo inkubirali seve *B. subtilis* z nabrežja reke Save in opazovali njihovo morfologijo med inkubacijo pri sobni temperaturi oziroma pri 37 °C. Seve smo gojili 24 do 96 ur in z opazovanjem rasti kolonij vsakih 24 ur ugotovili optimalni čas inkubacije za čim boljše prepoznavanje različnih morfologij na agarskem gojišču LB. Nato smo opisali morfologijo posameznih sevov in jih razdelili v podobnostne skupine. Za nadaljnji eksperiment – 3.2.3 Ugotavljanje sobivanja sevov v kokulturah v tekočem gojišču LB – smo izbrali tiste seve, ki spadajo v različne ekotipe in ferotipe in se jih ob sočasni inkubaciji na trdnem gojišču LB zaradi morfoloških značilnosti enostavno loči.

3.2.2 Ugotavljanje hitrosti rasti sevov z rastno krivuljo

Po 100 µl prekonočnih kultur sevov PS-53, PS-218, PS-261, PS-131 in PS-11, pripravljenih v tekočem gojišču LB, smo nacepili v 5 erlenmajeric z 10 ml tekočega gojišča LB (vsak sev v svojo erlenmajerico). Poskus smo izvedli v treh ponovitvah (15 erlenmajeric). V 30-minutnih časovnih intervalih smo 8 ur spremljali rast kultur s pomočjo merjenja absorbance v spektrofotometru pri 650 nm, dokler kulture niso dosegle stacionarne faze.

3.2.3 Ugotavljanje sobivanja sevov v kokulturah v tekočem gojišču LB

V tekoče gojišče LB smo nacepili kombinacije dveh različnih sevov *B. subtilis* glede na pripadnost ekotipu in ferotipu. Znotraj ekotipa smo proučevali sobivanje sevov, ki spadata v enak ferotip in v različna ferotipa, zanimalo pa nas je tudi sobivanje sevov, ki spadata v različna ekotipa, a pripadata istemu oziroma različnima ferotipoma.

V 5 širokih epruvet s tekočim gojiščem LB smo nacepili 5 različnih sevov (vsak sev v svojo epruveto) in jih stresali preko noči. Naslednji dan smo v 5 erlenmajeric z 10 ml tekočega gojišča LB nacepili po 100 µl prekonočnih kultur (vsak sev v svojo erlenmajerico). Gojišča s sevi smo stresali približno 2 uri pri 37 °C, dokler OD ni dosegla približno 0,4. Po potrebi smo eksponentne kulture redčili do OD natanko 0,4. Nato smo v mikrocentrifugirki zmešali 500 µl enega in 500 µl drugega seva. Iz mikrocentrifugirke smo prenesli po 200 µl tako pripravljenega inokuluma v 3 široke epruvete s 5 ml tekočega gojišča LB. Tako smo pripravili 4 kombinacije sevov: PS-53 in PS-131 (ferotip 2/ekotip PE 32), PS-53 in PS-218 (ferotip 2/ekotip PE 32; ferotip 3/ekotip PE 32), PS-53 in PS-261 (ferotip 2/ekotip PE 32; ferotip 2/ekotip PE 10), PS-53 in PS-11 (ferotip 2/ekotip PE 32; ferotip 1/ekotip PE 10) (12 epruvet). Po 2 seva smo inkubirali v kokulturi s stresanjem pri 37 °C in vsakih 24 ur, 5 dni v tednu spremljali rast posameznih sevov z metodo CFU. Seve smo prepoznali na podlagi morfoloških značilnosti kolonij na trdnih gojiščih LB.

Kokulture smo prvič precepili v sveže gojišče LB po 144 urah (šestih dneh) tako, da smo v 5 ml gojišča LB nacepili 50 µl posamezne kokulture. Nadaljnje sobivanje smo spremljali 168 ur (7 dni) po prvem precepljanju, nakar smo kulturo drugič precepili in zopet spremljali sobivanje sevov 168 ur (7 dni) po drugem precepljanju. Celoten poskus je trajal 3 tedne, izvedli pa smo ga v treh bioloških ponovitvah.

3.2.4 Sobivanje sevov *B. subtilis* na poltrdnem agarskem gojišču

Prekonočne kulture sevov, pripravljene v tekočem gojišču LB, smo redčili do redčitve 10^{-4} . Na poltrdno agarsko gojišče B (0,7 % agarja) smo nacepili 2 seva v medsebojni razdalji približno 4 cm tako, da smo z avtomatsko pipeto nanesli po 2 µl redčitve 10^{-4} vsakega seva. Kot pozitivno kontrolo smo nacepili 2 ista seva po zgoraj opisanem postopku. Rezultate smo odčitali po 48-urni inkubaciji pri 37 °C. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah.

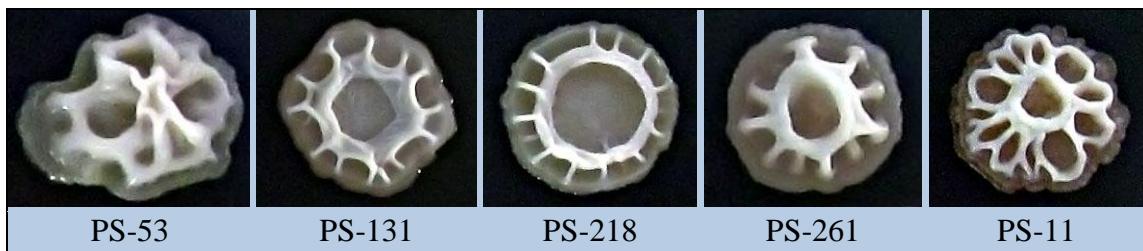
4 REZULTATI

4.1 MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST IN LOČEVANJE SEVOV *B. subtilis* NA TRDNEM GOJIŠČU LB

4.1.1 Ugotavljanje morfologije sevov na trdnem gojišču LB

Čeprav so sevi, ki smo jih uporabili v tej diplomski nalogi, filogenetsko visoko sorodni, so morfološko zelo raznoliki (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Na agarskem gojišču LB smo inkubirali različne seve *B. subtilis* z nabrežja reke Save in opazovali njihovo morfologijo med inkubacijo pri sobni temperaturi ozziroma pri 37 °C. Ugotovili smo, da se po dva izbrana seva v kokulturi morfološko ne razlikujeta, če ju gojimo pri 37 °C, če pa smo jih gojili na sobni temperaturi, so bile po štirih dneh vidne različne morfologije zraslih kolonij vsakega seva (Slika 3).

Kolonije seva PS-53 so bele barve, nepravilnih oblik, velike od 6 do 8 mm, svetleče, sluzaste, imajo valovit rob in dvignjen profil. Kolonije seva PS-131 so v nasprotju s sevom PS-53 okrogle, velike od 5 do 8 mm, nesvetleče in imajo ploščat profil. Kolonije seva PS-218 so zelo podobne kolonijam seva PS-131, le da imajo nazobčan rob in malo drugačen relief. Kolonije seva PS-261 so bele barve, okrogle, velike od 4 do 6 mm, nesvetleče, imajo valovit rob in dvignjen profil, na sredini pa so konkavne. Kolonije seva PS-11 so podobne kolonijam PS-261, le da imajo malo drugačen relief (Slika 3).



Slika 3: Morfologija nabrežnih sevov *B. subtilis* na trdnem gojišču LB

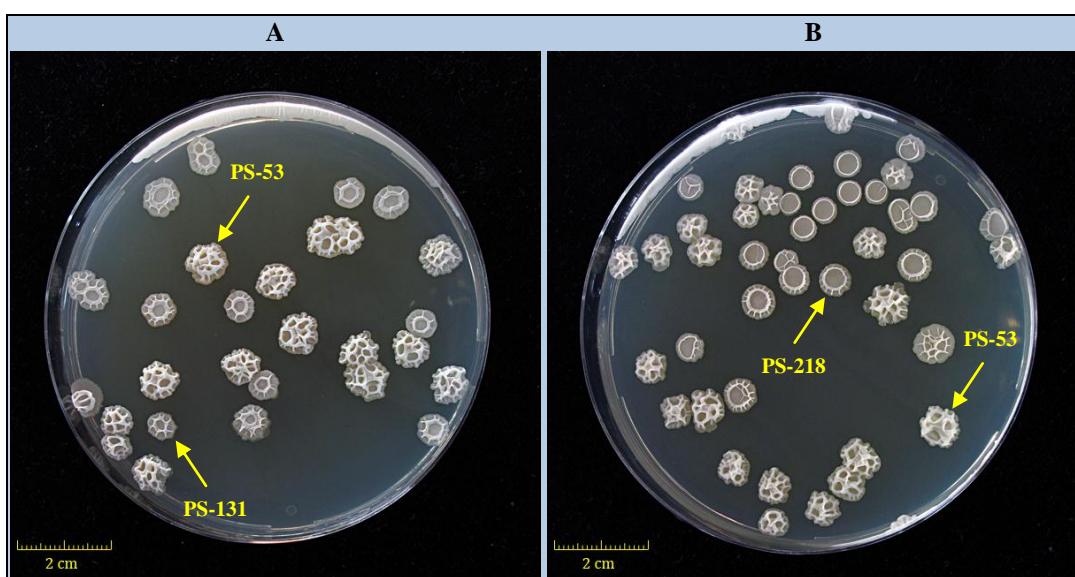
4.1.2 Ločevanje dveh različnih sevov na trdnem gojišču LB

Z ugotavljanjem morfologije sevov na trdnem gojišču LB smo ugotovili, da se sev PS-53 najbolje loči od ostalih sevov, saj so kolonije svetleče, sluzaste, nepravilnih oblik in na sredini izbočene, medtem ko so si ostali sevi po morfologiji bolj podobni. Glede na sev PS-53 smo torej izbrali ostale seve znotraj ekotipa (enak in različen ferotip) in med ekotipi (enak in različen ferotip). Po dva različna seva smo nacepili v tekoče gojišče LB, naredili redčitveno vrsto in redčitve nacepili na agarske plošče. Po štirih dneh inkubacije na sobni temperaturi smo opazili, da se vse izbrane kombinacije sevov (PS-53 in PS-131, PS-53 in PS-218, PS-53 in PS-261, PS-53 in PS-11) po morfologiji kolonij na trdnem gojišču LB med seboj dobro ločijo.

4.1.2.1 Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip

Znotraj ekotipa PE 32 smo proučevali morfologijo sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1): PS-53 in PS-131 (Slika 4A) in sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2): PS-53 in PS-218 (Slika 4B).

Kolonije seva PS-131 se od kolonij seva PS-53 ločijo po tem, da so nižje, okrogle, nesvetleče in imajo ploščat profil. (Slika 4A). Kolonije seva PS-218 se od kolonij seva PS-53 ločijo po tem, da so nižje, okrogle, nesvetleče, imajo nazobčan rob in ploščat profil (Slika 4B). Pokazali smo, da se pri sočasnem gojenju dveh sevov *B. subtilis*, ki spadata v isti ekotip, na podlagi morfoloških razlik na trdnem gojišču oba seva dobro loči.

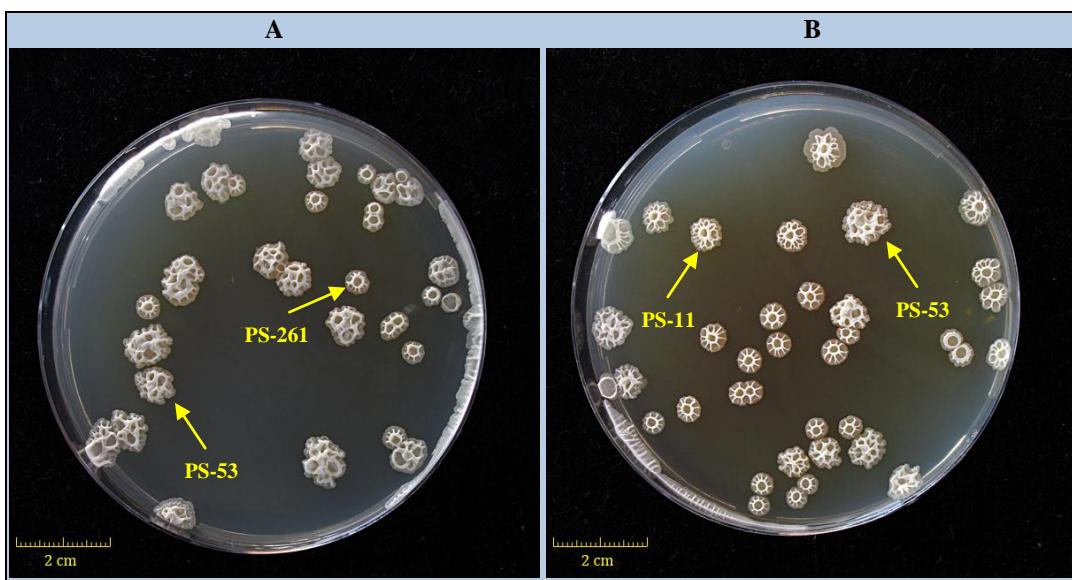


Slika 4: Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32), na gojišču LB. (A) Morfologija sevov PS-53 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1). (B) Morfologija sevov PS-53 in PS-218, ki ju uvrščamo v različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2).

4.1.2.2 Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa

Med ekotipoma PE 32 in PE 10 smo proučevali morfologijo sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1): PS-53 in PS-261 (Slika 5A) in morfologijo sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa (RO-H-1 in 168): PS-53 in PS-11 (Slika 5B).

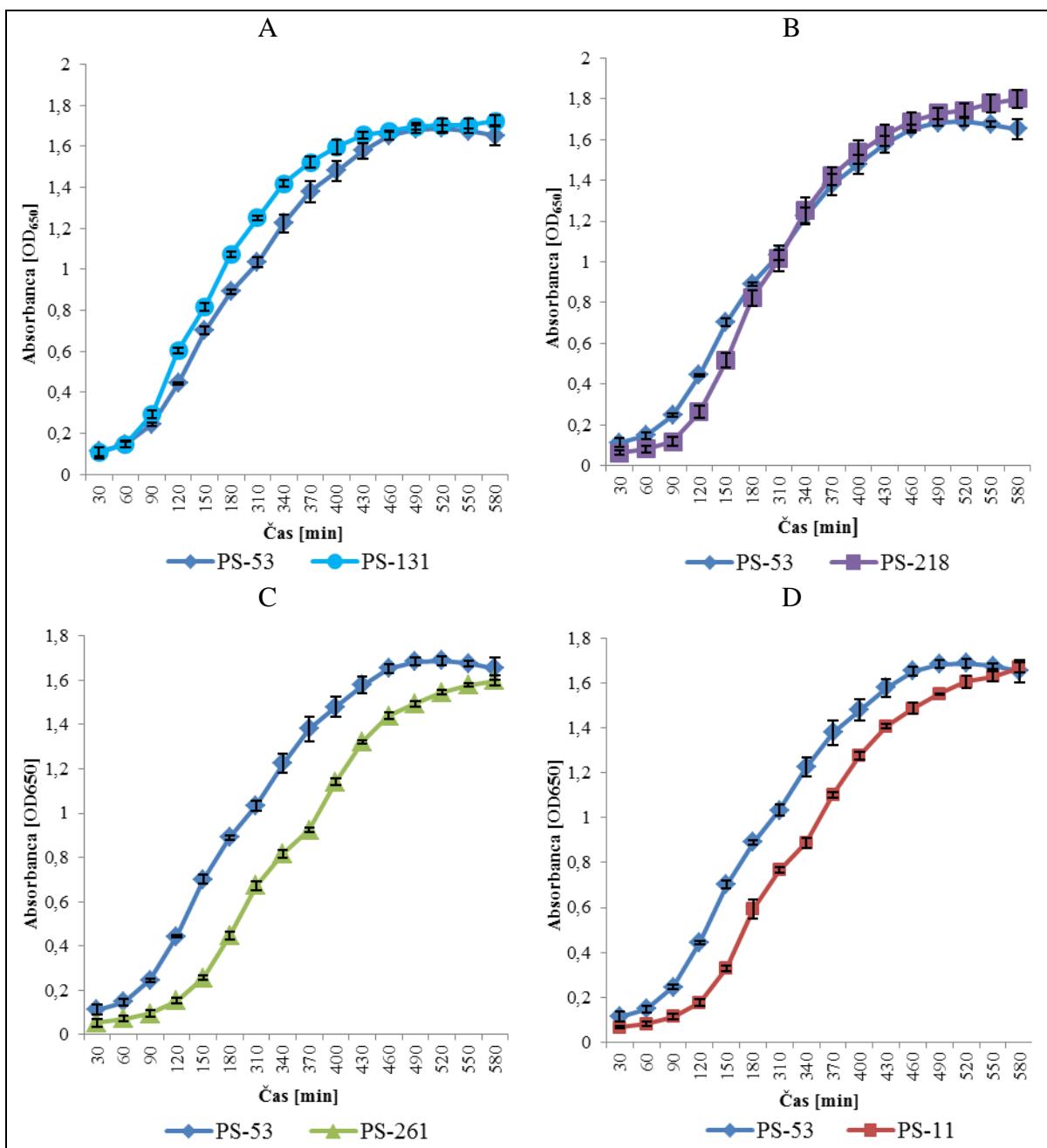
Kolonije seva PS-261 se od kolonij seva PS-53 ločijo po tem, da so nekoliko manjše, okrogle, nesvetleče, imajo nižji profil in so na sredini konkavne (Slika 5A). Kolonije seva PS-11 se od kolonij seva PS-53 ločijo po tem, da so nekoliko manjše, okrogle, nesvetleče imajo nižji profil in so na sredini konkavne (Slika 5B). Pokazali smo, da se pri sočasnem gojenju dveh sevov *B. subtilis*, ki spadata v različna ekotipa, na podlagi morfoloških razlik na trdnem gojišču oba seva dobro loči.



Slika 5: Morfološko razlikovanje dveh sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10), na gojišču LB. (A) Morfologija sevov PS-53 in PS-261, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1). (B) Morfologija sevov PS-53 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ferotipa (RO-H-1 in 168).

4.2 UGOTAVLJANJE HITROSTI RASTI SEVOV Z RASTNO KRIVULJO

Z rastno krivuljo smo hoteli preveriti hitrost rasti vseh petih sevov, saj bi lahko en sev rasel hitreje kot drugi in bi zato lahko prerasel drugi sev v kokulturi. Hitrosti rasti sevov z nabrežja Save se v gojišču LB med seboj razlikujejo (Slika 6). Ugotovili smo, da najhitreje raste sev PS-131, ki ima najkrajšo fazo prilagajanja in tudi najhitreje doseže stacionarno fazo. Naslednji sev je PS-53, ki ima prav tako kratko fazo prilagajanja, raste pa nekoliko počasneje kot sev PS-131. Seva PS-11 in PS-261 rasteta najpočasneje in imata najdaljši fazi prilagajanja (Slika 6).



Slika 6: Rastne krivulje dveh posameznih sevov. (A) Rastni krivulji sevov PS-53 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in enak ferotip (RO-H-1). (B) Rastni krivulji sevov PS-53 in PS-218, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2). (C) Rastni krivulji sevov PS-53 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in enak ferotip (RO-H-1). (D) Rastni krivulji sevov PS-53 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RO-H-1 in 168). Diamant (◆) predstavlja sev PS-53, krogec (●) sev PS-131, večji kvadrat (■) sev PS-218, trikotnik (▲) sev PS-261, manjši kvadrat (■) pa sev PS-11. Prikazani so tudi standardni odkloni. Seve smo gojili v tekočem gojišču LB.

4.3 UGOTAVLJANJE SOBIVANJA SEVOV V KOKULTURAH V TEKOČEM GOJIŠČU

V poskusu smo uporabili nabrežne seve, ki jih uvrščamo v dva ekotipa in tri različne ferotipe (Preglednica 1). V kokulturi smo gojili dva seva 3 tedne in z metodo CFU (glej Priloge T1 do T3) vsakih 24 ur spremljali rast posameznega seva. Ob inokulaciji obeh sevov v sveže gojišče ob času 0 je bil delež obeh sevov v kokulturi približno enak (Slika 7, 8, 9, 10). Vsakih 6 do 7 dni smo kulturi precepili v sveže gojišče. Seve smo na agarskem gojišču LB ločili po morfoloških lastnostih kolonij, kot je prikazano na slikah 4 in 5.

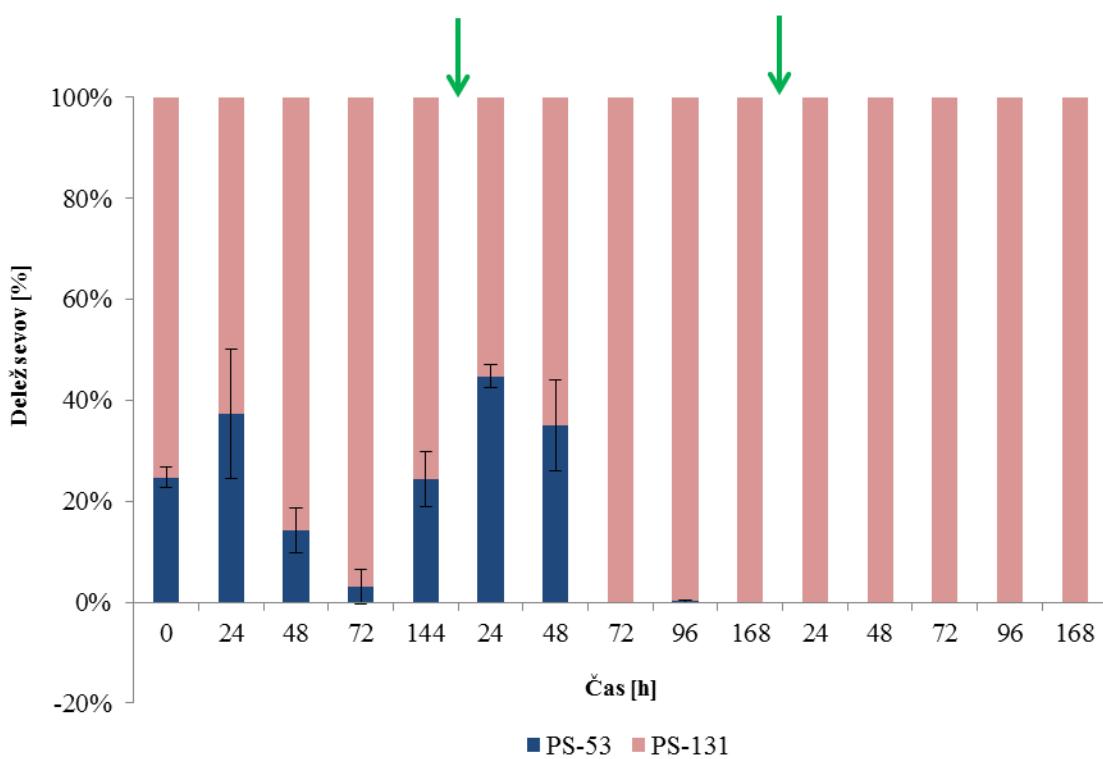
Ugotovili smo, da v kokulturi dveh sevov enakega ekotipa in ferotipa en sev preraste drugega po približno enim tednu, v kokulturi dveh sevov enakega ekotipa in različnih ferotipov pa en sev preraste drugega že takoj naslednji dan. V kokulturi dveh sevov različnih ekotipov in enakega ferotipa začneta seva sobivati po enim tednu, v kokulturi dveh sevov iz različnih ekotipov in različnih ferotipov pa začneta seva sobivati po dveh tednih. Podrobnejši opis dinamike sobivanja za proučevane kokulture je podan sodaj.

4.3.1 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip

Znotraj ekotipa PE 32 smo opazovali sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1): PS-53 in PS-131 (Slika 7), in sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2): PS-53 in PS-218 (Slika 8).

4.3.1.1 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip

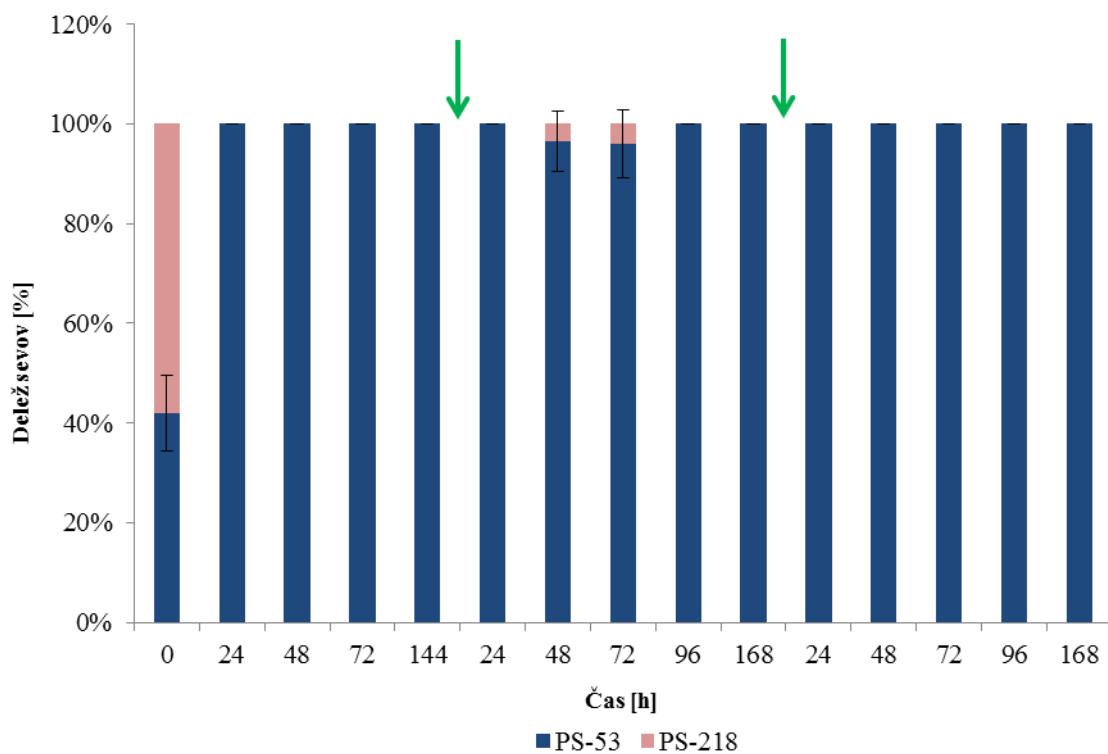
Seva PS-53 in PS-131 sta poldruži teden sobivala. Sev PS-53 je dosegel najvišji delež 24 ur po začetni inokulaciji in 24 ur po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB, 72 ur po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB pa ga je sev PS-131 prerasel in na ploščah nismo več opazili kolonij PS-53 (Slika 7).



Slika 7: Sobivanje sevov PS-53 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ekotip in enak ferotip, v tekočem gojišču LB. Temno modra barva (■) predstavlja delež seva PS-53, svetlo rdeča barva (■) pa predstavlja delež seva PS-131 v kokulturi. Na abscisni osi je čas po reinokulaciji v urah, na ordinatni osi pa delež sevov v odstotkih. Zeleni puščici prikazujeta točko reinokulacije v sveže gojišče LB. Prikazana sta tudi standardna odklona deležev obeh sevov.

4.3.1.2 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa

Sev PS-53 je že 24 ur po začetni inokulaciji prerasel sev PS-218. V sredini drugega tedna (48 in 72 ur po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB) se je sev PS-218 sicer pojavil v majhnem deležu, vendar ga je 96 ur po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB sev PS-53 zopet prerasel (Slika 8).



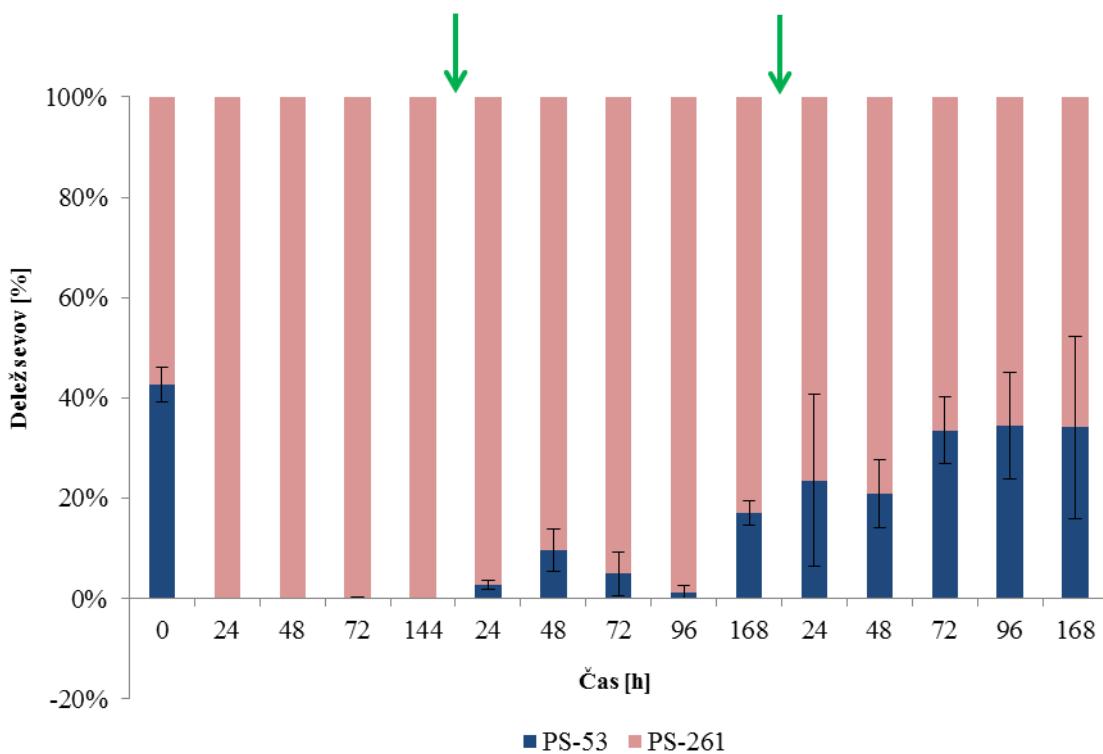
Slika 8: Sobivanje sevov PS-53 in PS-218, ki ju uvrščamo v enak ekotip in različna ferotipa, v tekočem gojišču LB. Temno modra barva (■) predstavlja delež seva PS-53, svetlo rdeča barva (■) pa predstavlja delež seva PS-218 v kokulturi. Na abscisni osi je čas po reinokulaciji v urah, na ordinatni osi pa delež sevov v odstotkih. Zeleni puščici prikazujeta točko reinokulacije v sveže gojišče LB. Prikazana sta tudi standardna odklona deležev obeh sevov.

4.3.2 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa

Med ekotipoma PE 32 in PE 10 smo opazovali sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1): PS-53 in PS-261 (Slika 9), in sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa (RO-H-1 in 168): PS-53 in PS-11 (Slika 10).

4.3.2.1 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip

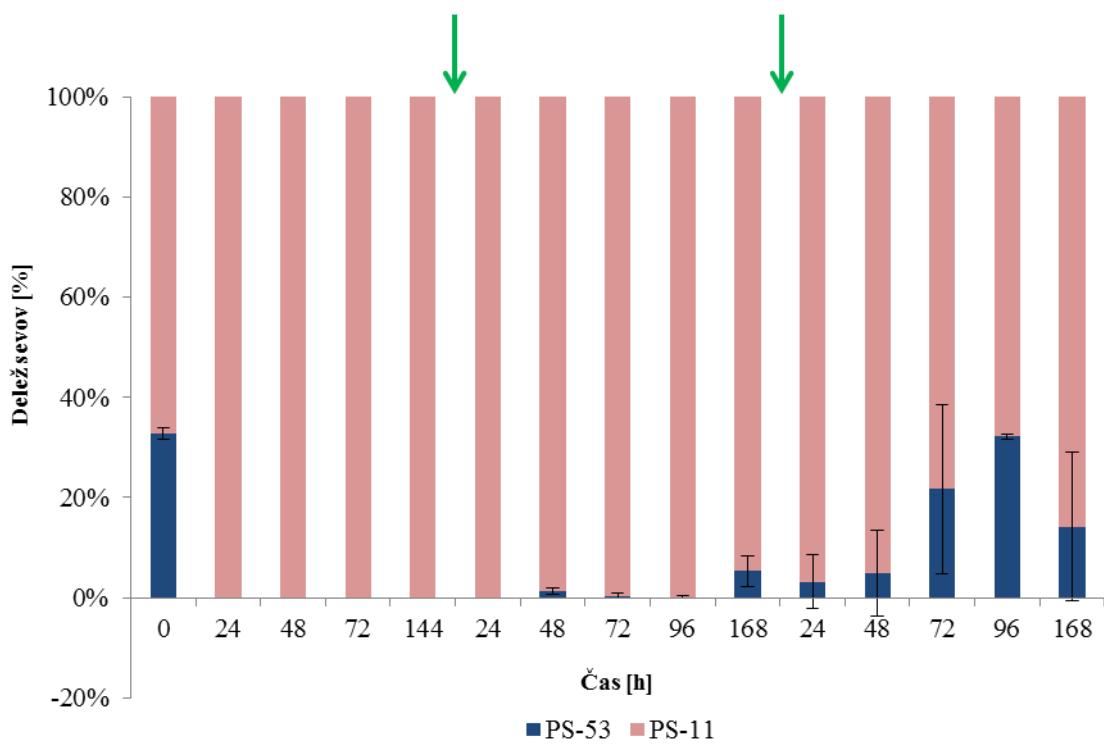
Prvi teden gojenja v kokulturi je sev PS-261 prerasel sev PS-53. Po enem tednu sta začela seva sobivati. Prvi najvišji delež seva PS-53 smo opazili 48 ur po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB, vendar je bil delež seva PS-53 še vedno zelo nizek. Naraščati je začel 168 ur po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB in dosegel najvišji delež 72 ur po drugi reinokulaciji v sveže gojišče LB (Slika 9).



Slika 9: Sobivanje sevov PS-53 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in enak ferotip, v tekočem gojišču LB. Temno modra barva (■) predstavlja delež seva PS-53, svetlo rdeča barva (■) pa predstavlja delež seva PS-261 v kokulturi. Na abscisni osi je čas po reinokulaciji v urah, na ordinatni osi pa delež sevov v odstotkih. Zeleni puščici prikazujeta točko reinokulacije v sveže gojišče LB. Prikazana sta tudi standardna odklona deležev obeh sevov.

4.3.2.2 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa

Prvi teden gojenja v kokulturi je sev PS-11 prerasel sev PS-53, saj že po 24 urah nismo na agarskih ploščah opazili niti ene kolonije seva PS-53. Po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB (v drugem tednu gojenja) pa se je sev PS-53 pojavit v zelo nizkih deležih, in sicer po 24 urah, nato je po 96 urah izginil in se spet pojavit po 168 urah gojenja v kokulturi. Po drugi reinokulaciji v sveže gojišče LB (v tretjem tednu) pa sta seva začela sobivati. Sev PS-53 je dosegel najvišji delež po 96 urah (Slika 10).



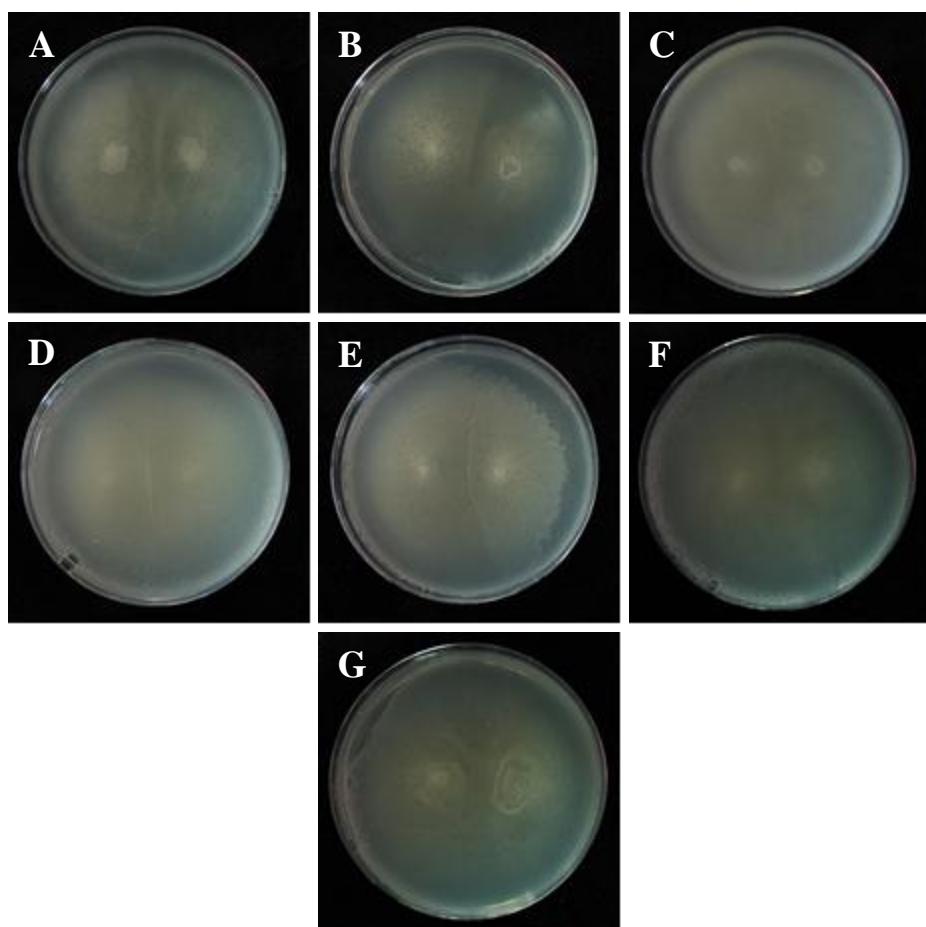
Slika 10: Sobivanje sevov PS-53 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in različna ferotipa, v tekočem gojišču LB. Temno modra barva (■) predstavlja delež seva PS-53, svetlo rdeča barva (■) pa predstavlja delež seva PS-11 v kokulturi. Na abscisni osi je čas po reinokulaciji v urah, na ordinatni osi pa delež sevov v odstotkih. Zeleni puščici prikazujeta točko reinokulacije v sveže gojišče LB. Prikazana sta tudi standardna odklona deležev obeh sevov.

4.4 SOBIVANJE SEVOV *B. subtilis* NA POLTRDNEM AGARSKEM GOJIŠČU

Prekonočne kulture sevov, pripravljene v tekočem gojišču LB, smo redčili do redčitve 10^{-4} in na sintetično gojišče B v treh do devetih ponovitvah (Priloga A do Š) nacepili 2 seva v medsebojni razdalji približno 4 cm in opazovali rojenje obeh sevov. Po 24-urni inkubaciji pri 37°C rast še ni bila vidna. Po 48-urni inkubaciji, ko sta se roja združila, smo odčitali rezultate.

4.4.1 Sobivanje istih sevov

Gojenje dveh enakih sevov nam je služilo kot pozitivna kontrola, kjer smo predpostavili, da se bosta seva »prepozna« kot enaka in bosta sobivala, kar bo vidno kot združena kolonija (stik). Pri sobivanju vseh sedmih istih sevov je prišlo do stika rojev, ne glede na to, ali je sev pripadal ekotipu PE 32 ali ekotipu PE 10 (Slika 11).

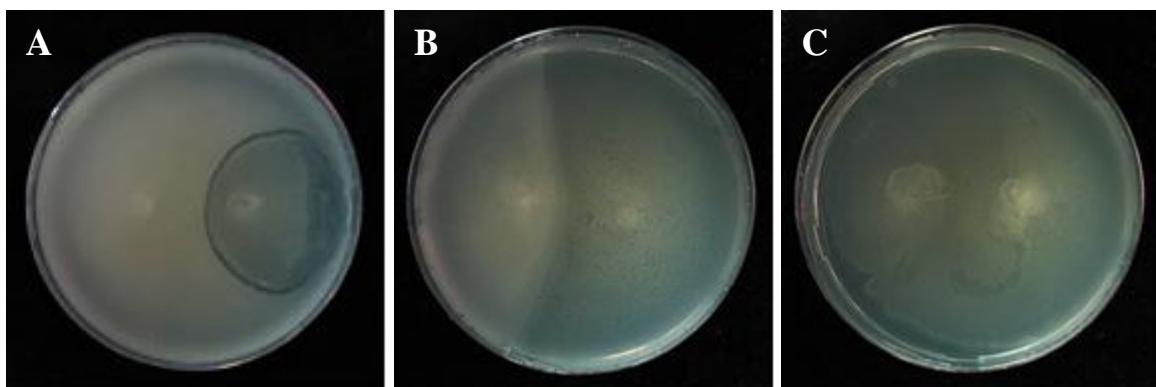


Slika 11: Sobivanje istih sevov na poltrdnem gojišču B. (A) Sobivanje seva PS-218. (B) Sobivanje seva PS-261. (C) Sobivanje seva PS-53. (D) Sobivanje seva PS-131. (E) Sobivanje seva PS-11. (F) Sobivanje seva PS-31. (G) Sobivanje seva PS-168. Pri vseh sedmih sevih je prišlo do stika rojev. Na slikah je prikazana ena od treh ponovitev (glej Priloge A do F).

4.4.2 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip

4.4.2.1 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip

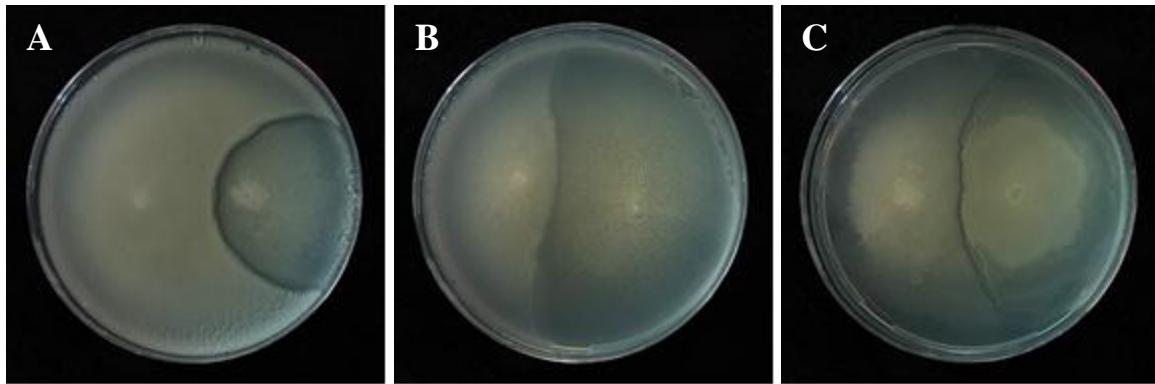
Pri opazovanju sobivanja sevov, ki ju uvrščamo v ekotip PE 32 in ekotip PE 10, smo izbrali seve enakega ferotipa: PS-53 in PS-131 (ferotip RO-H-1/ekotip PE 32), PS-31 in PS-261 (ferotip RO-H-1/ekotip PE 10), PS-11 in PS-168 (ferotip 168/ekotip PE 10). Med sevoma PS-53 in PS-131, ki sta iz ekotipa PE 32, je prišlo do izrazite lize, medtem ko smo med sevi PS-31 in PS-261 ter PS-11 in PS-168, ki so iz ekotipa PE 10, opazili stik. Rezultati podpirajo hipotezo, da lahko sevi enakega ekotipa in ferotipa začasno sobivajo, vendar to ni absolutno pravilo (Slika 12).



Slika 12: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip in enak ferotip, na poltrdnem gojišču B. (A) Sobivanje sevov PS-53 in PS-131. Seva sta iz ekotipa PE 32. Med rojemama pride do izrazite lize. (B) Sobivanje sevov PS-31 in PS-261. Seva sta iz ekotipa PE 10. Med rojemama pride do stika. (C) Sobivanje sevov PS-11 in PS-168. Seva sta iz ekotipa PE 10. Med rojemama pride do stika. Na slikah je prikazana ena od treh ponovitev (glej Priloge G do I).

4.4.2.2 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa

Za preverjanje sobivanja sevov iz različnih ferotipov smo zopet izbrali različne kombinacije sevov iz ekotipa P10 in P32: PS-53 in PS-218 (ferotip RO-H-1/ekotip PE 32; ferotip RS-D-2/ekotip PE 32), PS-11 in PS-261 (ferotip 168/ekotip PE 10; ferotip RO-H-1/ekotip PE 10), PS-218 in PS-131 (ferotip RS-D-2/ekotip PE 32; ferotip RO-H-1/ekotip PE 32). Med sevi PS-53 in PS-218 ter PS-218 in PS-131, ki so iz ekotipa PE 32, smo opazili lizo. Še posebej izrazito lizo smo opazili med rojemama sevov PS-53 in PS-218. Med sevoma PS-11 in PS-261, ki sta iz ekotipa PE 10, pa je prišlo do stika rojev (Slika 13).

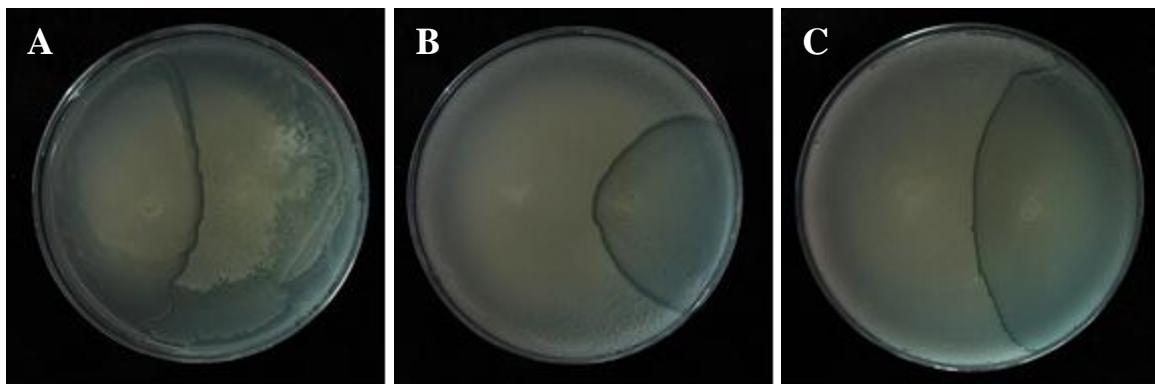


Slika 13: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ekotip in različna ferotipa, na poltrdnem gojišču B.
 (A) Sobivanje sevov PS-53 in PS-218. Seva sta iz ekotipa PE 32. Med rojemama pride do izrazite lize. Na sliki je prikazana ena od devetih ponovitev (glej Prilogo K). (B) Sobivanje sevov PS-11 in PS-261. Seva sta iz ekotipa PE 10. Med rojemama pride do stika. Na sliki je prikazana ena od devetih ponovitev (glej Prilogo J). (C) Sobivanje sevov PS-218 in PS-131. Seva sta iz ekotipa PE 32. Med rojemama pride do lize. Na sliki je prikazana ena od treh ponovitev (glej Prilogo L).

4.4.3 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa

4.4.3.1 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v enak ferotip

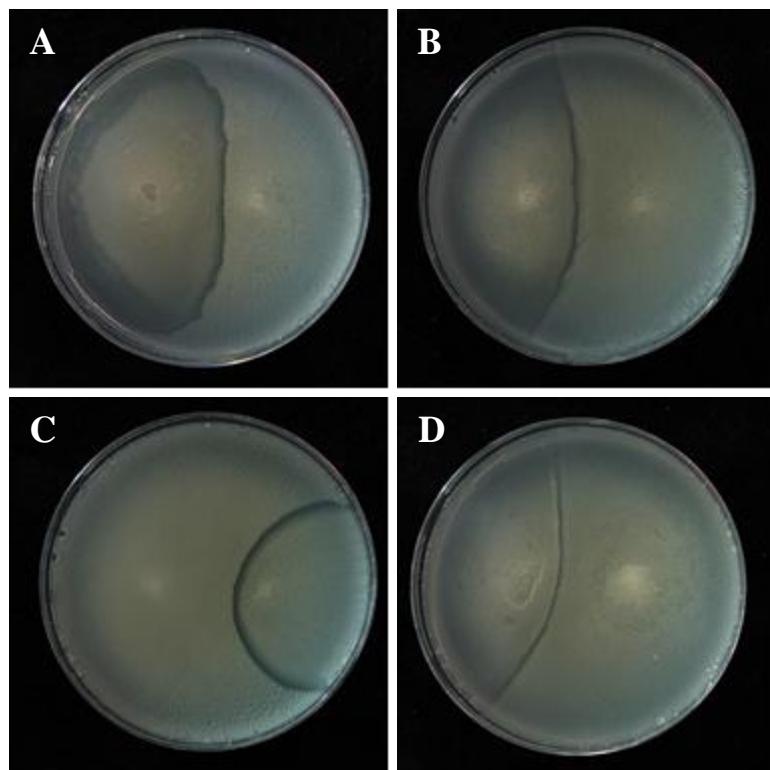
Pri opazovanju sobivanja sevov, ki ju uvrščamo v dva različna ekotipa (PE 32 in PE 10) smo izbrali seve iz enakega ferotipa: PS-131 in PS-261 (ferotip RO-H-1/ekotip PE 32; ferotip RO-H-1/ekotip PE 10), PS-53 in PS-261 (ferotip RO-H-1/ekotip PE 32; ferotip RO-H-1/ekotip PE 10), PS-131 in PS-31 (ferotip RO-H-1/ekotip PE 32; ferotip RO-H-1/ekotip PE 10). Pri vseh treh kombinacijah sevov je prišlo do lize med rojemama, še posebej izrazito lizo smo opazili med sevoma PS-53 in PS-261 (Slika 14).



Slika 14: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in enak ferotip, na poltrdnem gojišču B.
 (A) Sobivanje sevov PS-131 in PS-261. Med rojemama pride do lize. Na sliki je prikazana ena od treh ponovitev (glej Prilogo O). (B) Sobivanje sevov PS-53 in PS-261. Med rojemama pride do izrazite lize. Na sliki je prikazana ena od devetih ponovitev (glej Prilogo N). (C) Sobivanje sevov PS-31 in PS-131. Med rojemama pride do lize. Na sliki je prikazana ena od treh ponovitev (glej Prilogo M).

4.4.3.2 Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ferotipa

Pri opazovanju sobivanja sevov, ki ju uvrščamo v dva različna ekotipa (PE 32 in PE 10), smo izbrali seve iz različnih ferotipov: PS-131 in PS-11 (ferotip RO-H-1/ekotip PE32; ferotip 168/ekotip PE10), PS-218 in PS-11 (ferotip RS-D-2 in 168), PS-53 in PS-11 (ferotip RO-H-1 in 168), PS-261 in PS-218 (ferotip RO-H-1 in RS-D-2). Pri vseh štirih kombinacijah je prišlo do lize med rojemama, še posebej izrazito lizo pa smo opazili med sevoma PS-53 in PS-11 (Slika 15).



Slika 15: Sobivanje sevov, ki ju uvrščamo v različna ekotipa in različna ferotipa, na poltrdnem gojišču
B. (A) Sobivanje sevov PS-131 in PS-11. Med rojema pride do lize. (B) Sobivanje sevov PS-218 in PS-11. Med rojema pride do lize. (C) Sobivanje sevov PS-53 in PS-11. Med rojema pride do izrazite lize. (D) Sobivanje sevov PS-261 in PS-218. Med rojema pride do lize. Na slikah je prikazana ena od treh ponovitev (glej Priloge P do Š).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomski nalogi smo želeli pokazati,

- da pride v kokulturi dveh sevov enakega ekotipa do tekmovanja med sevoma in da en sev prevlada oziroma preraste drugega,
- da v kokulturi dveh sevov različnih ekotipov ne pride do tekmovanja, temveč seva sobivata in
- da se seva z enakim ferotipom na poltrdnem gojišču prepoznata (se stakneta), pri sevih z različnima ferotipoma pa pride do lize.

5.1 MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST IN LOČEVANJE SEVOV *B. subtilis* NA TRDNEM GOJIŠČU LB

Kot sta že ugotovili Štefanič (2009) in Lukežič (2009), smo opazili, da kljub filogenetski sorodnosti obstaja med sevi *B. subtilis* velika morfološka raznolikost. Morfologija kolonij je bila odvisna od seva in od okoljskih pogojev (npr. temperature), in sicer so bile kolonije morfološko različne le pri sobni temperaturi, ne pa pri 37 °C. Morda je vzrok v različnosti proizvodnje zunajceličnega polisaharidnega matriksa (EPS), katerega produkcijo uravnava QS sistem (Lopez in sod., 2009). Temperatura bi lahko vplivala tudi na celično delitev. V našem poskusu smo ugotovili, da so se pri 37°C bakterije delile hitreje, saj so bile kolonije vidne že po 24 urah, pri sobni temperaturi pa je bila delitev celic počasnejša, saj se je morfologija razvila šele po 4 dneh. Pri različnih temperaturah verjetno pride do različne razporeditve celic, ki tvorijo kolonijo.

5.2 SORODSTVENA DISKRIMINACIJA

Pretekle raziskave so pokazale, da med mikrobi obstaja veliko socialnih vedenj, ki vključujejo zapletene sisteme sodelovanja, komunikacije in sinhronizacije (West in sod, 2007). Teorija sorodstvene selekcije razloži altruistično sodelovanje med sorodniki. Posamezen sev »pomaga« bližnjemu sorodniku pri njegovem razmnoževanju, še vedno pa »prenaša« svoje gene na naslednjo generacijo, čeprav posredno (Hamilton, 1964). Hamilton (1964) je poudaril, da se sorodstvena selekcija lahko zgodi preko dveh mehanizmov: a) sorodstvena diskriminacija, ko posameznik lahko razlikuje sorodne od nesorodnih sevov in je sodelovanje prednostno usmerjeno proti sorodnim sevom ter b) omejena razpršenost (populacijska viskoznost), ki ohranja sorodnike v prostorski bližini in omogoča, da je sodelovanje usmerjeno nediskriminatorno proti vsem sosedom (ki so ponavadi sorodniki).

Med rojenjem v tleh se različni genotipi *B. subtilis* srečajo. Da bi ugotovili, ali se roji različnih sevov ob stiku zlijejo ali ostanejo ločeni skozi nek mehanizem sorodstvene diskriminacije, smo beležili prisotnost in odsotnost mej med rojema dveh istih sevov (pozitivne kontrole) in dveh različnih sevov. Ugotovili smo, da je isti sev ob stiku rojev

tvoril konfluentno kolonijo, medtem ko sta različna seva ob stiku tvorila mejno črto, kar kaže, da verjetno obstaja nek mehanizem prepoznavanja. Sevi prepoznaajo lastne in/ali druge osebke iste vrste in pri tem pride do spremembe načina rasti ali obnašanja kolonije. Tudi Vos in Velicer (2009) sta pokazala, da genetsko visoko podobni talni izolati bakterije *Myxococcus xanthus* kažejo močne antagonizme, ko jih gojimo skupaj, medtem ko se roja istega seva *M. xanthus* zlijeta.

Preverjali smo tudi vpliv ekotipov in ferotipov na stik med rojema. Ansaldi in sodelavci (2002) so ugotovili, da so bakterije zmožne učinkovitega komuniciranja znotraj ferotipa, ne pa med ferotipi. Domnevali smo, da se bosta roja sevov istega ferotipa »prepozna« in staknila in da bomo med rojema sevov različnih ferotipov opazili antagonizem. Ugotovili smo, da različni ferotipi znotraj ekotipa PE 10 dovolijo sobivanje (stik), znotraj ekotipa PE 32 pa ne (cona lize). Znotraj ekotipa PE 10 enak ferotip sobiva (stik), znotraj ekotipa PE 32 pa tudi enak ferotip ne sobiva (cona lize). Vsi testirani sevi ekotipa PE 32 so ob stiku z drugimi sevi enakega ali različnega ekotipa tvorili ob stiku kolonij cono lize. Verjetno imajo sevi ekotipa PE 32 boljše mehanizme prepoznavanja kot sevi ekotipa PE 10 oziroma so morda sevi ekotipa PE 32 bolj »agresivni«. Še posebej izrazito lizo smo opazili, ko smo gojili sev PS-53 s katerim koli drugim sevom. To nakazuje, da sev PS-53 izloča neznano protimikrobnou snov, ki inhibira širjenje kolonije ostalih sevov. Intenzivnost lize je torej odvisna od posameznega seva. Izgleda torej, da je pri sobivanju sevov *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B pomemben predvsem ekotip, ferotip pa ne igrat posebne vloge.

Sorodstveno diskriminacijo so Gibbs in sodelavci (2008) opazili tudi med genetsko različnimi roji γ -proteobakterije *Proteus mirabilis*, Munson in sodelavci (2002) pa med genetsko različnimi roji *Pseudomonas aeruginosa*. Ostrowski in sodelavci (2008) so odkrili sorodstveno diskriminacijo tudi pri predatorski amebi *Dictyostelium discoideum*, katerega celice se združujejo in tvorijo večcelična plodilna telesca. Ta plodilna telesca lahko vsebujejo amebe z različnimi genotipi. Sevi iz različnih genotipov pa se lahko ločijo med seboj med večceličnem razvojem. Ugotovili so, da stopnja ločevanja narašča z genetsko razdaljo med sevi. To pa je v nasprotju z našimi odkritji pri *B. subtilis* in z odkritji Vos-a in Velicer-ja (2009) pri *M. xanthus*, kjer tudi zelo sorodni sevi lahko diskriminirajo in izključujejo drug drugega.

5.3 SOBIVANJE SEVOV *B. subtilis* V KOKULTURAH V TEKOČEM GOJIŠČU

V kokulturi smo gojili dva seva in dnevno spremljali rast posameznega seva. Vos in Velicer (2009) sta ugotovila, da zelo sorodni sevi *M. xanthus*, ki naseljujejo isto geografsko območje, kažejo visoke nivoje socialnega konflikta, ko jih gojimo skupaj. To smo ugotovili tudi v našem poskusu, saj je v kokulturi dveh sevov enakega ekotipa in enakega ferotipa ter v kokulturi dveh sevov enakega ekotipa in različnih ferotipov prišlo do tekmovanja in je en sev prerasel drugega. Pri sobivanju sevov *B. subtilis* enakega ekotipa vpliva ferotipa nismo zaznali.

Ugotovili smo tudi, da v kokulturi dveh sevov različnih ekotipov in enakega ferotipa ter v kokulturi dveh sevov različnih ekotipov in različnih ferotipov seva sobivata. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami Cohan-a (2001), ki je postavil hipotezo, da sevi iz različnih ekotipov sobivajo, saj izkoriščajo različne vire hrani. Seva *B. subtilis* različnih ekotipov lahko sobivata neodvisno od ferotipa.

Rastne krivulje vseh petih testiranih sevov so bile podobne, kar kaže na to, da rezultati niso posledica hitrejše rasti enega izmed sevov.

Zanimivo je, da je bilo v tekočem gojišču LB in na poltrdnem gojišču B sobivanje in kompetitivna prednost sevov *B. subtilis* drugačna. Sev PS-53 je na poltrdnem gojišču B s katerim koli drugim sevom sprožil izrazito lizo in zaobjel drugi sev. V kokulturi v tekočem gojišču LB pa ga je v treh od štirih primerov prerasel drugi sev. Seva PS-53 in PS-131 pripadata enakemu ekotipu (PE 32) in enakemu ferotipu (RO-H-1). V tekočem gojišču LB je sev PS-131 prerasel sev PS-53 (Slika 6), obratno pa opazimo na poltrdnem gojišču B, kjer je sev PS-53 zaobjel sev PS-131 (Slika 12A). Enako smo opazili tudi pri kombinaciji sevov PS-53 in PS-261, ki pripadata različnima ekotipoma (PE 32 in PE 10) in enakemu ferotipu (RO-H-1) (Slika 8 in 14B) ter pri kombinaciji sevov PS-53 in PS-11, ki pripadata različnima ekotipoma (PE 32 in PE 10) in različnima ferotipoma (RO-H-1 in 168) (Slika 9 in 15C). Le pri kombinaciji sevov PS-53 in PS-218, ki pripadata enakemu ekotipu (PE 32) in različnima ferotipoma (RO-H-1 in RS-D-2) smo opazili v tekočem gojišču LB in na poltrdnem gojišču B prevlado seva PS-53 (Slika 7 in 13A). Na poltrdnem gojišču B je torej vedno prevladal sev PS-53. Do teh razlik bi lahko prišlo zato, ker sta bila tekoče in poltrdno gojišče po sestavi različna. Izgleda, da je sev PS-53 imel na poltrdnem gojišču B kompetitivne prednosti pred ostalimi sevi, tekoče gojišče LB pa je v kokulturi bolj ustrezalo drugim testiranim sevom. Gojišči sta se razlikovali tudi po agregatnem stanju: na poltrdnem gojišču B sta seva zasedla svoj delež gojišča in do mešanja sevov ni prišlo, medtem ko sta bila v tekočem gojišču LB seva razporejena po celotnem gojišču. Sev PS-53 verjetno izloča neznano protimikrobnou snov, ki pa je lahko v tekočem gojišču razredčena, zato ne kaže tako agresivne narave kot na poltrdnem gojišču. Za drugačne rezultate sobivanja na poltrdnem in v tekočem gojišču bi bil lahko odgovoren tudi drugačen način rasti: na poltrdnem gojišču B pride do rojenja, pri čemer sevi v okolje izločajo surfaktin, v tekočem gojišču pa celice rastejo planktonično.

5.4 SKLEPI

- Rezultati nakazujejo, da v LB gojišču seva *B. subtilis* enakega ekotipa tekmujeta, pri čemer en sev preraste drugega v 9 do 10 dneh. Vpliva ferotipa nismo zaznali. S tem smo potrdili hipotezo 1.
- Rezultati nakazujejo, da v LB gojišču seva *B. subtilis* različnih ekotipov lahko sobivata neodvisno od ferotipa. S tem smo potrdili hipotezo 2.
- Na poltrdnem gojišču B dve koloniji istega seva *B. subtilis* po stiku tvorita konfluentno kolonijo, medtem ko je pri dveh kolonijah različnih sevov ob stiku opazna meja in včasih tudi liza, kar nakazuje na obstoj mehanizma/mehanizmov sorodstvene diskriminacije.
- Vsi testirani sevi ekotipa PE 32 ob stiku z drugimi sevi enakega ali različnega ekotipa tvorijo ob stiku kolonij cono lize, medtem ko so sevi ekotipa PE 10 manj »agresivni«. Intenzivnost lize je odvisna od seva. Izgleda torej, da je pri sobivanju sevov *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B pomemben predvsem ekotip, ferotip pa ne igra posebne vloge. S tem smo ovrgli hipotezo 3.

6 POVZETEK

Znotraj prokariotskega sveta obstaja zelo velika ekološka raznolikost. Sevi ene vrste lahko naseljujejo različne ekološke niše in tako spadajo v različne ekotipe. Adaptivna mutanta enega ekotipa preraste vse seve v istem ekotipu, ne preraste pa sevov iz drugih ekotipov (Cohan, 2001). Ekotipi so ekološko različni in izkoriščajo različne vire, kar jim omogoča sobivanje (de Queiroz, 2005; Cohan in Perry, 2007). Osrednjo vlogo v fiziologiji in razvoju *B. subtilis* igra medcelična komunikacija (England in sod., 1999). Bakterije sintetizirajo zunajcelične signalne molekule (feromone), ki se kopičijo v okolju ter s tem sprožijo koordinirano skupinsko vedenje (Magnuson in sod., 1994). Sevi *B. subtilis* spadajo v različne komunikacijske skupine oziroma ferotipe. Komunikacijski sistem, ki sodeluje pri zaznavanju celične gostote pri vrstah *Bacillus*, ločuje seve v 4 ferotipske skupine. Bakterije se lahko sporazumevajo znotraj skupine, ne pa med skupinami (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Genetske in fenotipske analize sevov *B. subtilis*, izoliranih iz talnega mikrookolja, so pokazale, da so predstavniki dveh ferotipov lahko ekološko različni in pripadajo različnim ekotipom, vendar pa znotraj enega ekotipa najdemo več različnih ferotipov, pri čemer je en ferotip dominanten (Štefanič in sod., Environ. Micro., v recenziji).

Dva seva smo gojili v kokulturi pri 37 °C tri tedne in na podlagi morfoloških značilnosti njihovih kolonij ugotovili delež posameznega seva v kokulturi. Rezultati nakazujejo, da seva iz istega ekotipa tekmujeta med seboj in na koncu en sev prevlada, seva iz različnih ekotipov pa sobivata. Vpliva ferotipa nismo zaznali.

Dva seva smo nacepili tudi na poltrdno gojišče B in opazovali, kaj se zgodi po stiku oba kolonij. Dve koloniji istega seva *B. subtilis* sta po stiku tvorili konfluentno kolonijo, medtem ko je bila pri dveh kolonijah različnih sevov ob stiku opazna meja in včasih tudi liza, kar nakazuje na obstoj mehanizma/mehanizmov sorodstvene diskriminacije.

Vsi testirani sevi ekotipa PE 32 so ob stiku z drugimi sevi enakega ali različnega ekotipa tvorili ob stiku kolonij cono lize, medtem ko so sevi ekotipa PE 10 manj »agresivni«. Intenzivnost lize je bila odvisna od ekotipa in ne od ferotipa.

Opazili smo tudi, da se sevi obnašajo drugače v tekoči kulturi in na poltrdnem gojišču, saj na poltrdnem gojišču prevlada sev PS-53, v tekočem LB gojišču pa večinoma prevlada drugi sev v kokulturi.

7 VIRI

Allison C., Lai H. C., Hughes C. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, 6: 1583–1591

Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Molecular Microbiology*, 44, 6: 1561–1573

Arima K., Kakinuma A., Tamura G. 1968. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 3: 488–494

Avise J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Massachusetts, Cambridge Press: 453 str.

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

Bassler B. L. 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, 109, 4: 421–424

Begon M., Harper J. L., Townsend C. R. 1990. *Ecology: individuals, populations and communities*. Cambridge, Blackwell: 1079 str.

Ben-Jacob E., Schochet O., Tenenbaum A., Cohen I., Czirók A., Vicsek T. 1994. *Nature*, 368: 46–49

Branda S. S., González-Pastor J. E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 20: 11621–11626

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

Cohan F. M. 2001. Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*, 50, 4: 513–524

Cohan F. M. 1994. The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary divergence in prokaryotes. *American Naturalist*, 143: 965–986

Cohan F. M. 1996. The role of genetic exchange in bacterial evolution. *American Society For Microbiology News*, 62, 12: 631–636

Cohan F. M., Koeppel A. F. 2008. The origins of ecological diversity in prokaryotes. *Current Biology*, 18: 1024–1034

Cohan F. M., Perry E. B. 2007. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology*, 17: 373–386

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: 1383–1421

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

Cosmina P., Rodriguez F., de Ferra F., Grandi G., Perego M., Venema G., van Sinderen D. 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 8, 5: 821–831

Crawford J. W., Harris A., Ritz K., Young I. M. 2005. Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 81–87

Davey M. E., O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 4: 847–867

de Queiroz K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1: 6600–6607

Dixit M., Murudkar C. S., Krishnamurthy Rao K. 2002. *epr* is transcribed from a ζ^D promoter and is involved in swarming of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 2: 596–599

Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 395–424

Dubnau D., Hahn J., Roggiani M., Piazza F., Weinrauch Y. 1994. Two-component regulators and genetic competence in *Bacillus subtilis*. Research in Microbiology, 145, 5-6: 403–411

Dufraigne C., Fertil B., Lespinats S., Giron A., Deschavanne P. 2005. Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. Nucleic Acids Research, 33, 1: doi: 10.1093/nar/gni004: 12 str.

Duncan K. E., Istock C. A., Graham J. B., Ferguson N. 1989. Genetic exchange between *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: Variable hybrid stability and the nature of species. Evolution, 43: 1585–1609

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

Edwards R. A., Helm R. A., Maloy S. R. 1999. Increasing DNA transfer efficiency by temporary inactivation of host restriction. BioTechniques, 26: 892–898

England R., Hobbs G., Bainton N. J., Roberts D. M. 1999. Microbial signaling and communication. Cambridge, Cambridge University Press: 365 str.

Fisher R. A. 1930. The genetical theory of natural selection. Oxford, Oxford University Press: 321 str.

Fraser G. M., Hughes C. 1999. Swarming motility. Current Opinion in Microbiology, 2: 630–635

Gibbs K. A., Urbanowski M. L., Greenberg E. P. 2008. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. Science, 321: 256–259

Graumann P. 2007. *Bacillus*: cellular and molecular biology. Wymondham, Caister Academic Press: 455 str.

Groisman A., Ochman H. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. Trends in Microbiology, 5, 9: 343–349

Grundmann G. L. 2004. Spatial scales of soil bacterial diversity – the size of a clone. FEMS Microbiology Ecology, 48: 119–127

Hahn J., Dubnau D. 1991. Growth stage signal transduction and the requirements for *srfA* induction in development of competence. Journal of Bacteriology, 173, 22: 7275–7282

Hamilton W. D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology*, 7: 1–52

Hamze K., Julkowska D., Autret S., Hinc K., Nagorska K., Sekowska A., Holland B., Séror S. 2009. Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for *phrC*. *Microbiology*, 155: 398–412

Harshey R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57: 249–273

Harwood C. R. 1989. *Bacillus*. V: Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. Priest F. G. (ed.). New York, Plenum Press: 27–56

Hecker M., Völker U. 1990. General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 74: 197–213

Henrichsen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews*, 36: 478–503

Hisset R., Gray T. R. G. 1976. Microsites and time changes in soil microbe ecology. V: The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition process. Anderson J. M., Macfadyen A. (eds.). Oxford, Blackwell: 23–39

Hunt D. E., David L. A., Gevers D., Preheim S. P., Alm E. J., Polz M. F. 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science*, 320: 1081–1085

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

Koeppel 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 Science of the United States of America, 105, 7: 2504–2509

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriis R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C. V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S. K., Codani J. J., Connerton I. F., Danchin A. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature, 390: 249–256

Lan R., Reeves P. R. 1996. Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. Molecular Biology and Evolution, 13, 1: 47–55

Lawrence J. G. 1997. Selfish operons and speciation by gene transfer. Trends in Microbiology, 5: 355–359

Lazazzera B. A., Grossman A. D. 1998. The ins and outs of peptide signaling. Trends in Microbiology, 6: 288–294

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, American Society for Microbiology: 27–46

Lopez D., Vlamakis H., Kolter R. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews, 33: 152–163

Lukežič T. 2009. Fenotipska karakterizacija sevov *Bacillus subtilis*, izoliranih iz talnega mikrookolja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 66 str.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 1999. Brock's biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey, Prentice Hall: 992 str.

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

Mandić-Mulec I., Prosser J. I. 2011. Diversity of endospore-forming bacteria in soil: Characterization and driving mechanisms. V: Endospore-forming soil bacteria. Logan N. A., De Vos P. (eds.). Berlin, Springer: 31–60

Margulis L., Schwartz K. V. 1998. Five kingdoms: An illustrated guide to the phyla of life on earth. New York, Freeman: 658 str.

Martiny J. B. H., Bohannan B. J. M., Brown J. H., Colwell R. K., Fuhrman J. A., Green J. L., Horner-Devine M. C., Kane M., Krumins J. A., Kuske C. R., Morin P. J., Naeem S., Ovreas L., Reysenbach A.-L., Smith V. H., Staley J. T. 2006. Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 102–112

Matsuyama T., Matsushita M. 2001. Population morphogenesis by cooperative bacteria. *Forma*, 16: 307–326

Matsuyama T., Sogawa M., Nakagawa Y. 1989. Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. *FEMS Microbiology Letters*, 52: 243–246

Mayr E. 1997. The objects of selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 6: 2091–2094

Mayr E. 2004. What makes biology unique? Considerations of the autonomy of a scientific discipline. New York, Cambridge University Press: 235 str.

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

Mendelson N. H., Salhi B. 1996. Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. *Journal of Bacteriology*, 178, 7: 1980–1989

Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review in Microbiology*, 55: 165–199

Msadek T., Kunst F., Rapoport G. 1995. A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems. V: Two-component signal transduction. Hoch J. A., Silhavy T. J. (eds.). Herndon, ASM Press: 447–471

- Msadek T. 1999. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology, 7, 5: 201–207
- Munson E. L., Pfaller M. A., Doern G. V. 2002. Modification of dienes mutual inhibition test for epidemiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 40: 4285–4288
- Nagai T., Tran L. S. P., Inatsu Y., Itoh Y. 2000. A new IS4 family insertion sequence, IS4Bsu1, responsible for genetic instability of poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 182, 9: 2387–2392
- Nagórska K., Bikowski M., Obuchowski M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica, 54, 3: 495–508
- Nakamura L. K., Roberts M. S., Cohan F. M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 1211–1215
- Nakano M. M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A. D., Zuber P. 1991. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 173, 5: 1770–1778
- Nakano M. M., Marahiel M. A., Zuber P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 170, 12: 5662–5668
- Nakano M. M., Zuber P. 1989. Cloning and characterization of *srfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 171, 10: 5347–5353
- Ochman H., Lawrence J. G., Groisman E. A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature, 405: 299–304
- Ohgiwari M., Matsushita M., Matsuyama T. 1992. Morphological changes in growth phenomena of bacterial colony patterns. Journal of the Physical Society of Japan, 61: 816–822
- Orr H. A. 2005. The genetic theory of adaptation. Nature Reviews Genetics, 6: 119–127

Ostrowski E. A., Katoh M., Shaulsky G., Queller D. C., Strassmann J. E. 2008. Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba. *PloS Biology*, 6,11: doi:10.1371/journal.pbio.0060287: 7 str.

Peypoux F., Bonmatin J. M., Wallach J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 553–563

Pottathil M., Jung A., Lazazzera B. A. 2008. CSF, a species-specific extracellular signaling peptide for communication among strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology*, 190, 11: 4095–4099

Rivas L. R. 1964. A reinterpretation of the concepts »sympatric« and »allopatric« with proposal of the additional terms »syntopic« and »allotopic«. *Systematic Zoology*, 13, 1: 42–43

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

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., Nakamura L. K., Cohan F. M. 1994. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 2: 256–264

Shapiro J. A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*, 52: 81–104

Siala A., Hill I. R., Gray T. R. G. 1974. Populations of spore-forming bacteria in an acid forest soil, with special reference to *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 8: 183–190

Sikorski J. 2008. Populations under microevolutionary scrutiny: what will we gain? *Archives of Microbiology*, 189: 1–5

Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. 2002. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, American Society for Microbiology: 643 str.

Standing D., Killham K. 2007. The soil environment. V: Modern soil microbiology. 2nd ed. van Elsas J. D., Jansson J. K., Trevors J. T. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 1–22

Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 4: 845–857

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

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

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., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 183, 2: 451–460

Van Spanning R. J. M., Reijnders W. N. M., Stouthamer A. H. 1995. Integration of heterologous DNA into the genome of *Paracoccus denitrificans* is mediated by a family of IS1248-related elements and a second type of integrative recombination event. *Journal of Bacteriology*, 177, 16: 4772–4778

Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes and Development*, 22: 945–953

Vos M., Velicer G. J. 2009. Social conflict in centimeter- and global-scale populations of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Current Biology*, 19: 1763–1767

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: 860–872

West S. A., Diggle S. P., Buckling A., Gardner A., Griffin A. S. 2007. The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38: 53–77

Winans S. C., Bassler B. L. 2002. Mob psychology. *Journal of Bacteriology*, 184, 4: 873–883

Zawadzki P., Riley M. A., Cohan F. M. 1996. Homology among nearly all plasmids infecting three *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 178, 1: 191–198

Zawadzki P., Roberts M. S., Cohan F. M. 1995. The log-linear relationship between sexual isolation and sequence divergence in *Bacillus* transformation is robust. *Genetics*, 140, 3: 917–932

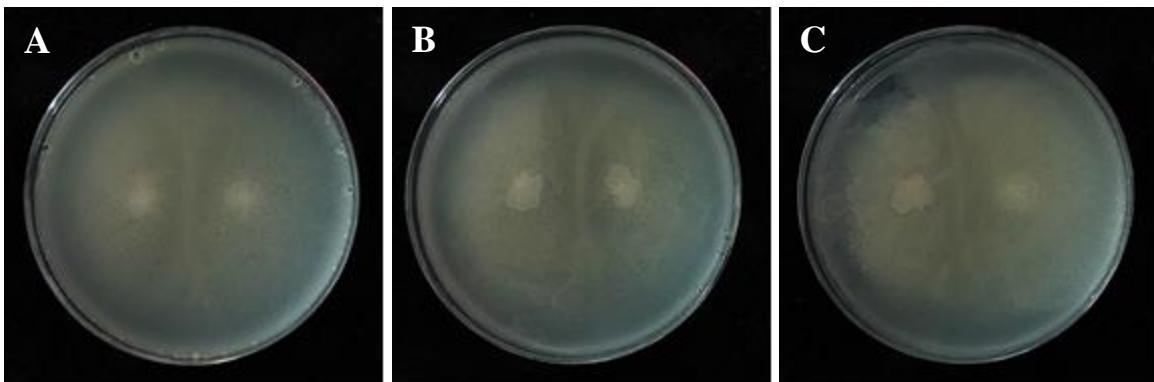
ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem svoji mentorici, profesorici dr. Ines Mandić-Mulec, ki me je spretno vodila do cilja. Velika zahvala gre tudi moji somentorici, asist. dr. Polonci Štefanič, za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi recenzentu doc. dr. Tomažu Accettu in vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo, ki so mi pomagali pri izvedbi poskusov.

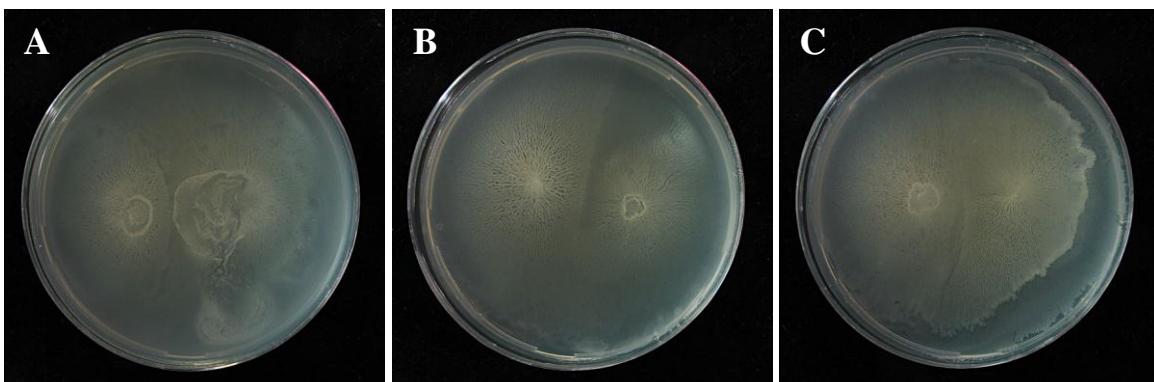
Posebna zahvala gre tudi mojemu Nejcu in njegovim staršem ter vsem prijateljem, ki so me vselej podpirali in me spodbujali, mi pomagali in mi svetovali.

In še posebej iskrena hvala dragima mami in očetu za vso podporo in finančno pomoč pri študiju. Hvala, da sta verjela vame.

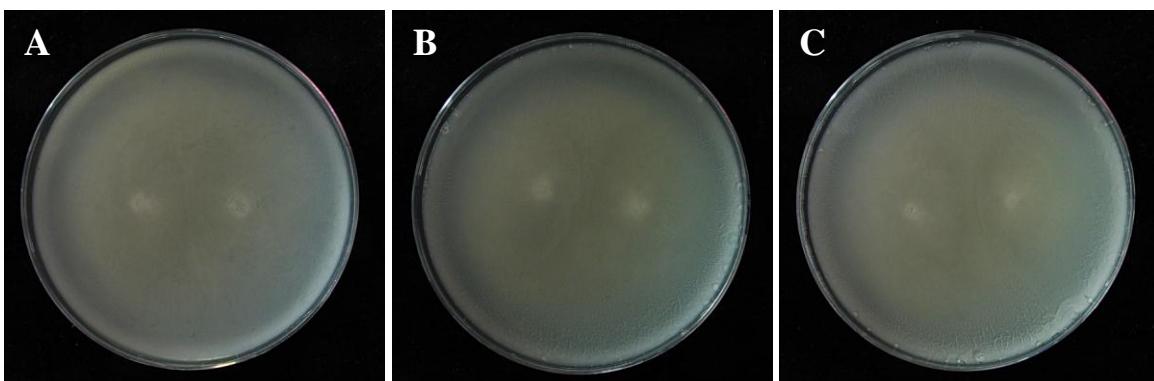
PRILOGE



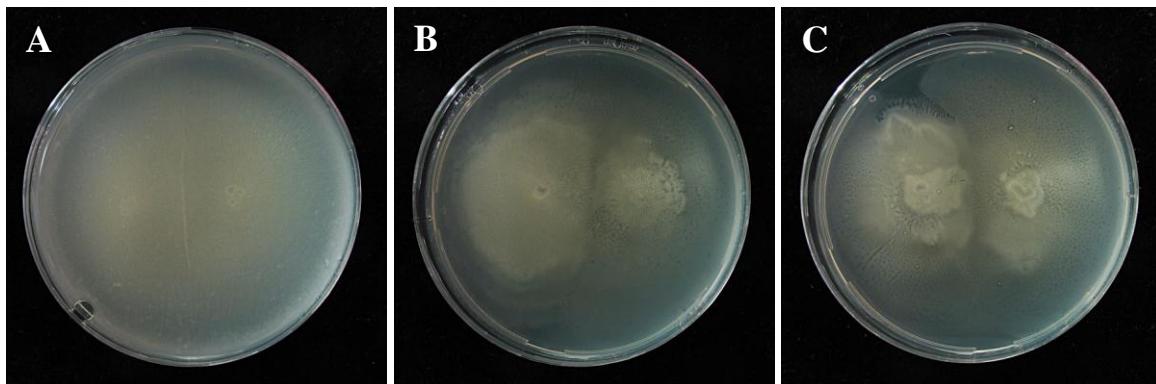
Priloga A: Tri ponovitve sobivanja seva PS-218 na poltrdnem gojišču B.



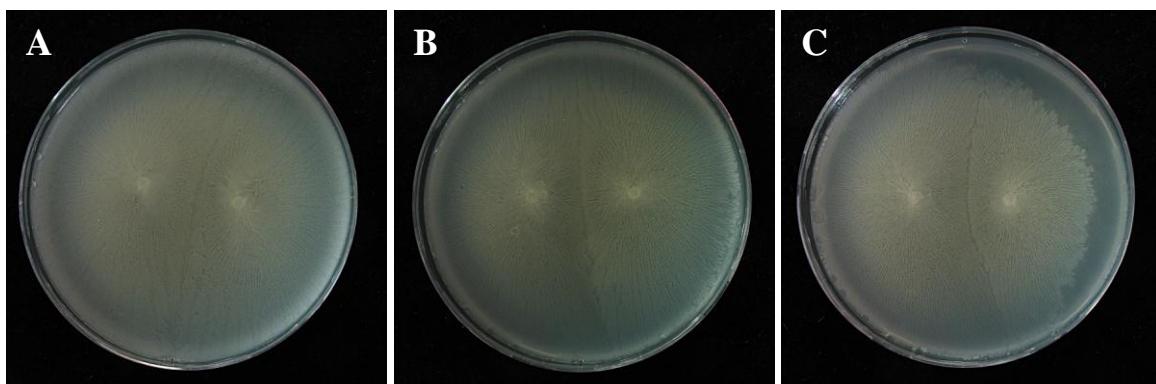
Priloga B: Tri ponovitve sobivanja seva PS-261 na poltrdnem gojišču B.



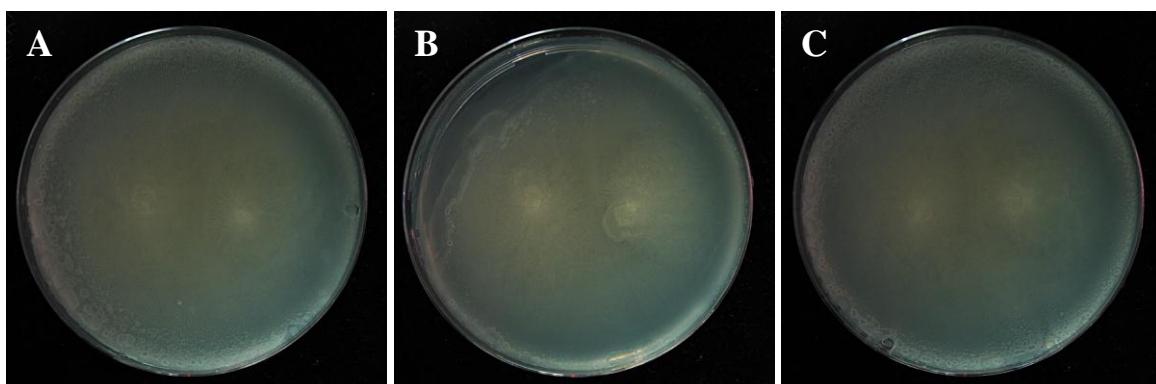
Priloga C: Tri ponovitve sobivanja seva PS-53 na poltrdnem gojišču B.



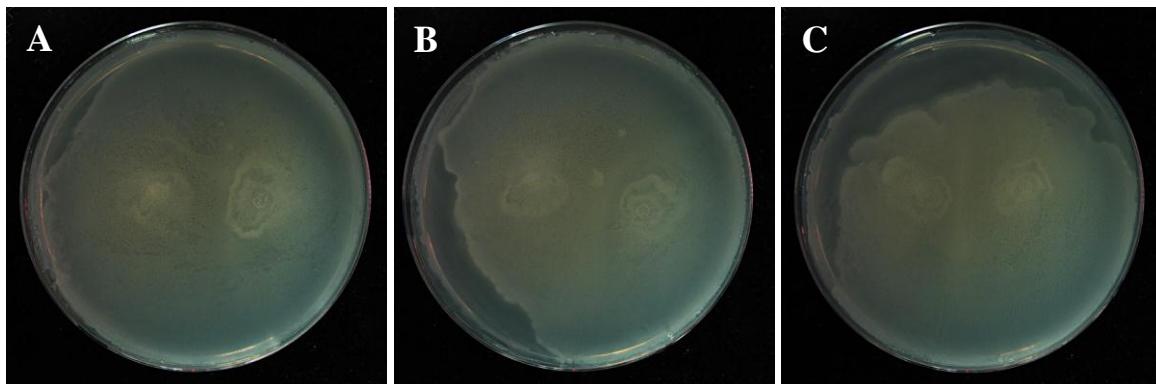
Priloga Č: Tri ponovitve sobivanja seva PS-131 na poltrdnem gojišču B.



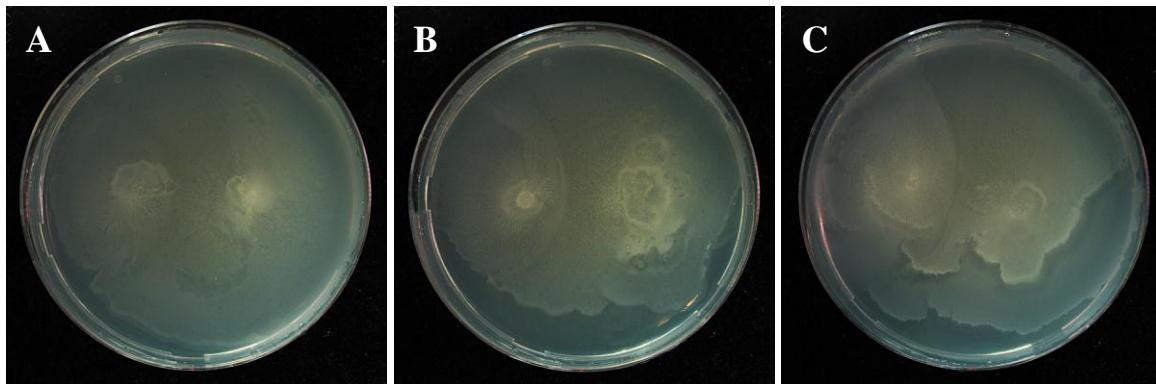
Priloga D: Tri ponovitve sobivanja seva PS-11 na poltrdnem gojišču B.



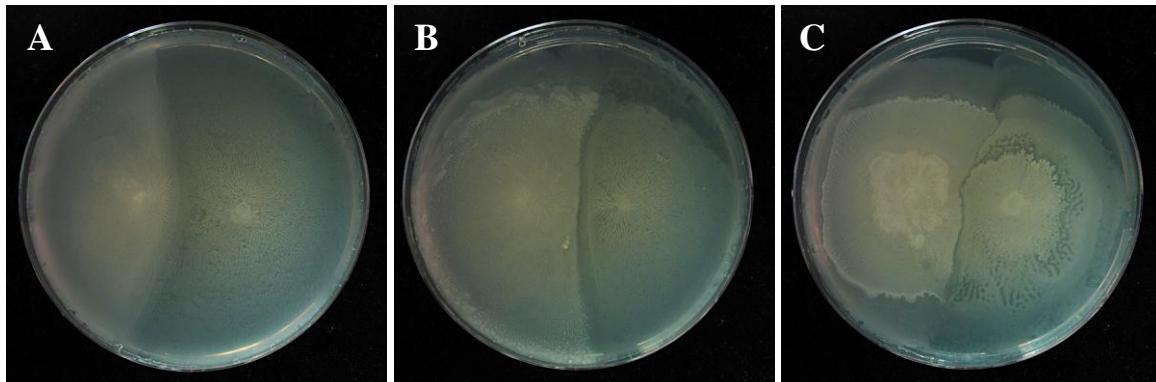
Priloga E: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-31 na poltrdnem gojišču B.



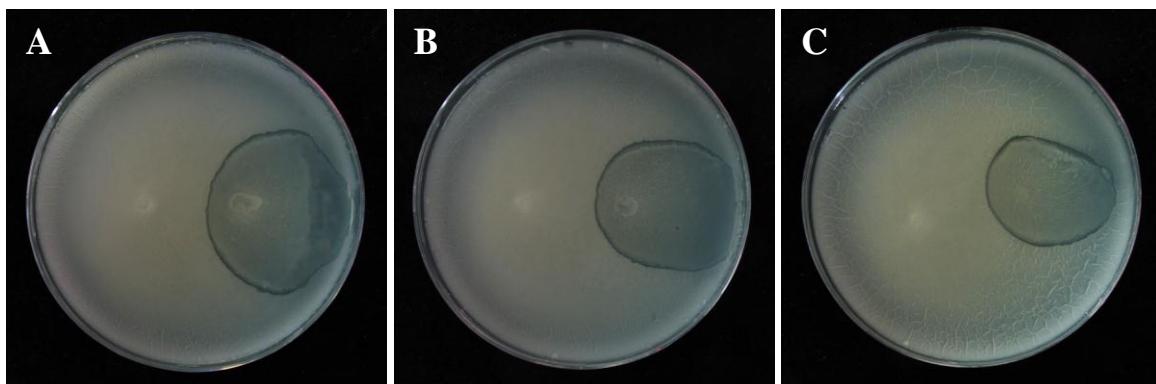
Priloga F: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-168 na poltrdnem gojišču B.



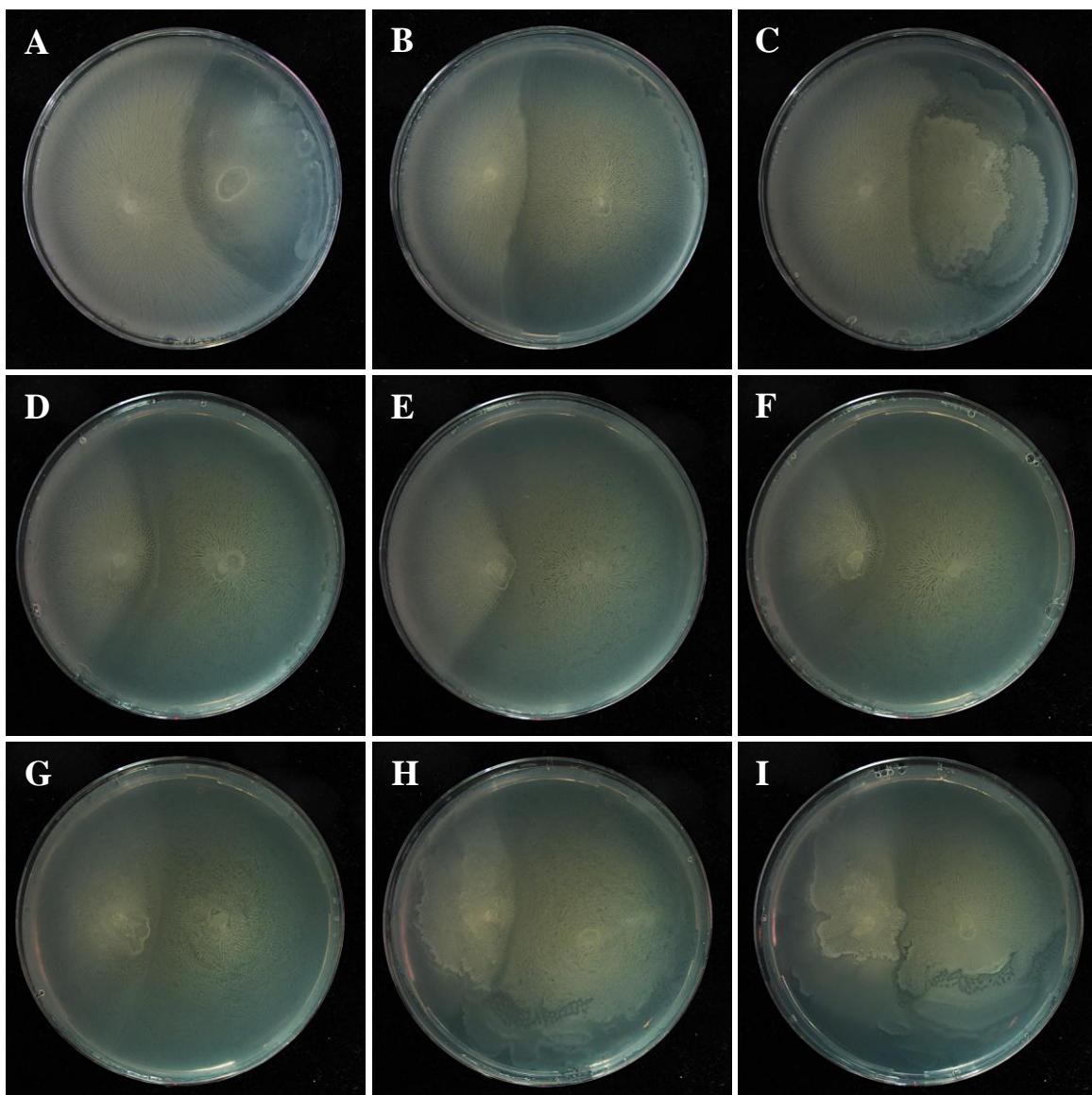
Priloga G: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-11 in PS-168, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 10) in enak ferotip (168), na poltrdnem gojišču B.



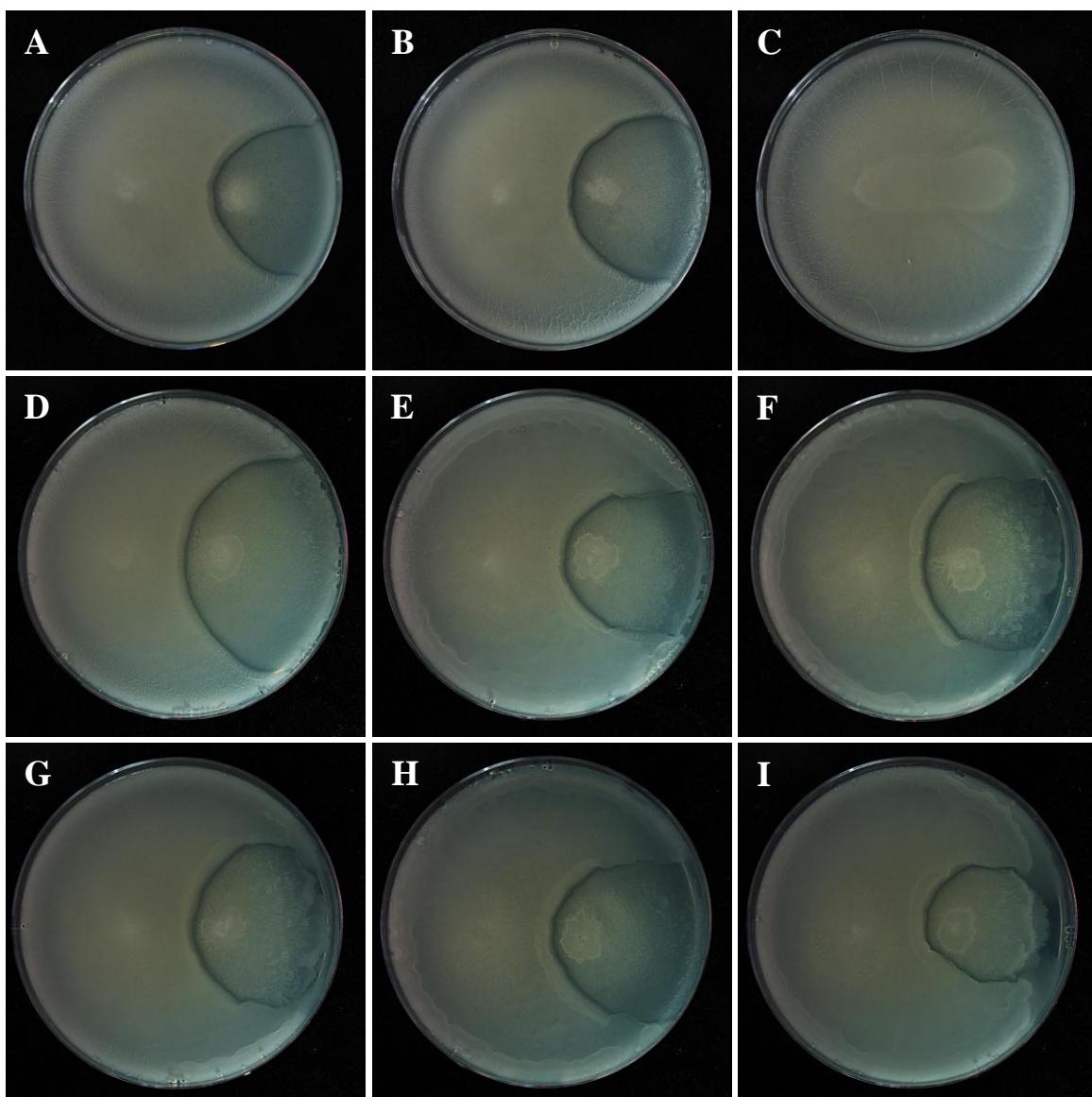
Priloga H: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-31 in PS-261, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 10) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



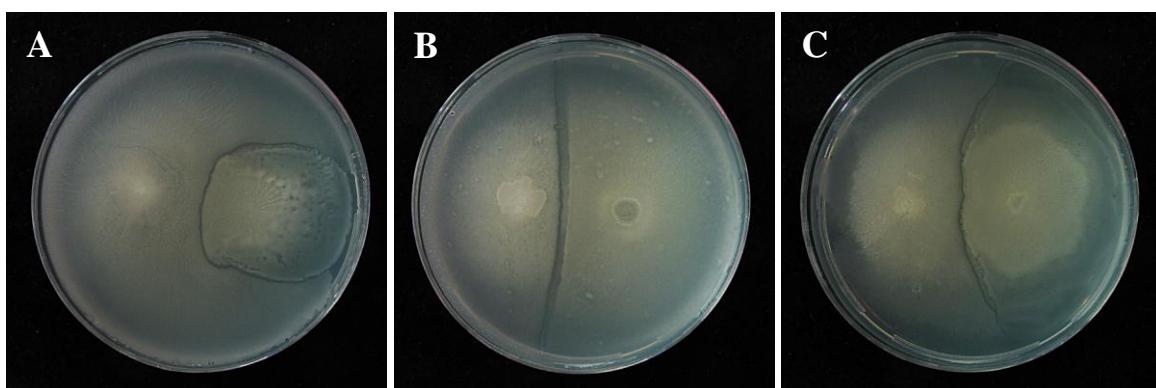
Priloga I: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-53 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



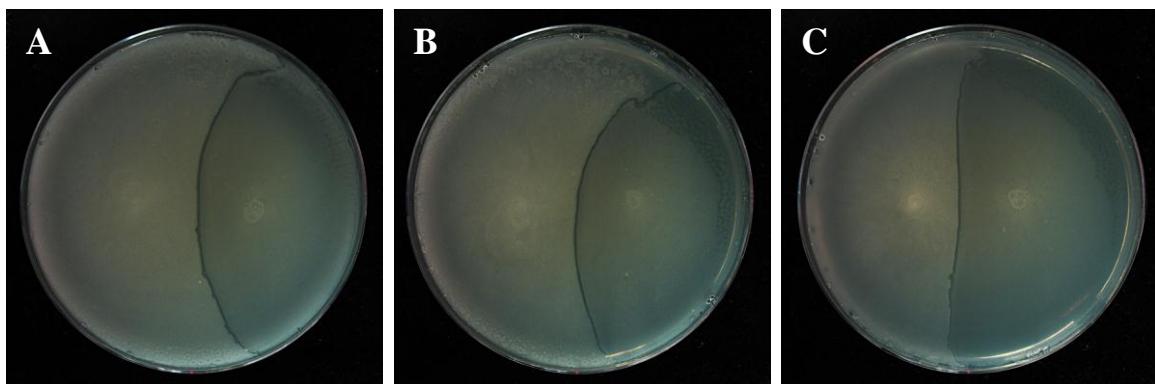
Priloga J: Devet ponovitev sobivanja sevov PS-11 in PS-261, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 10) in različna ferotipa (168 in RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



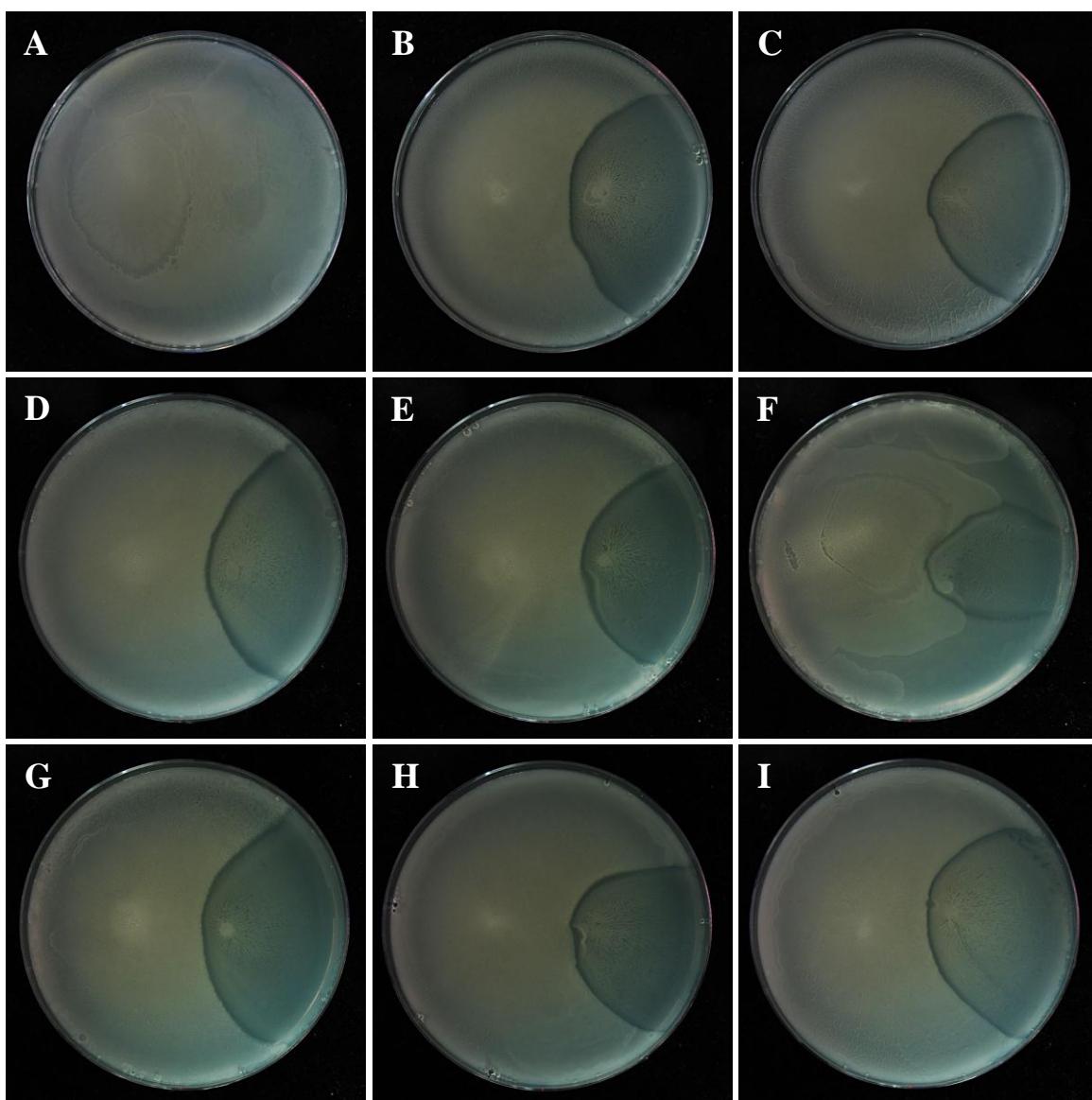
Priloga K: Devet ponovitev sobivanja sevov PS-53 in PS-218, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2), na poltrdnem gojišču B.



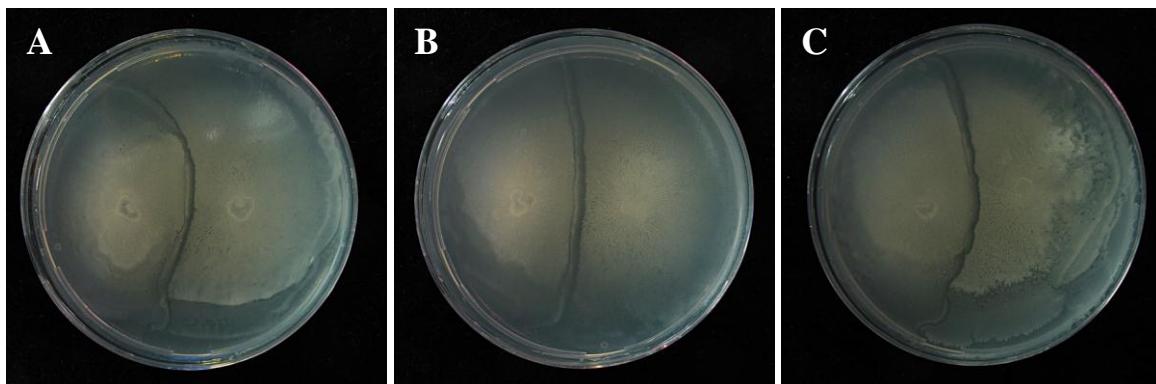
Priloga L: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-218 in PS-131, ki ju uvrščamo v enak ekotip (PE 32) in različna ferotipa (RS-D-2 in RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



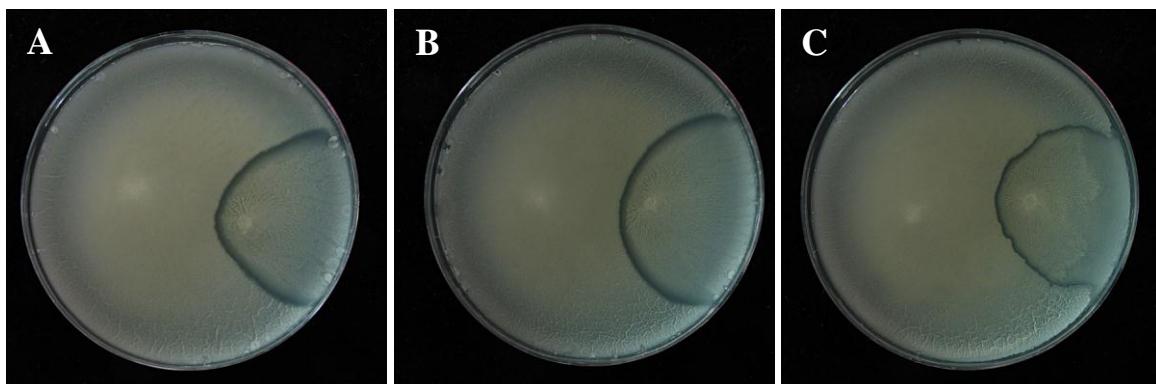
Priloga M: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-31 in PS-131, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 10 in PE 32) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



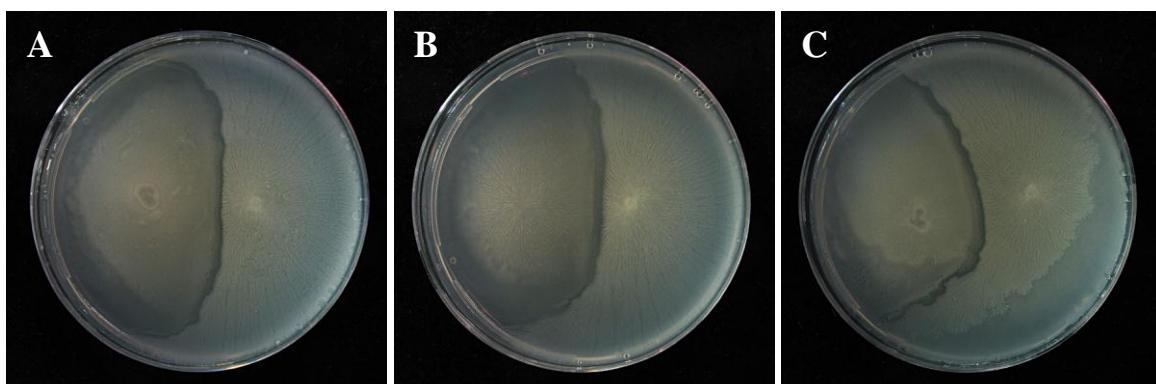
Priloga N: Devet ponovitev sobivanja sevov PS-53 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



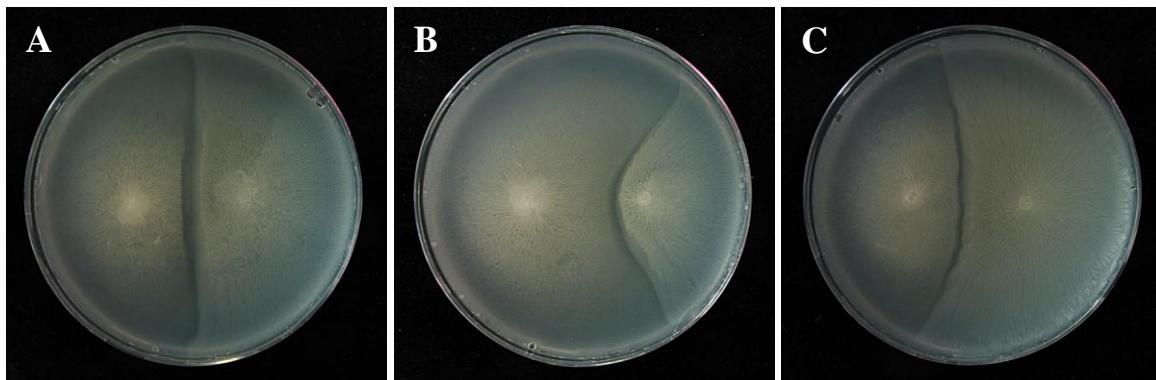
Priloga O: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-131 in PS-261, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in enak ferotip (RO-H-1), na poltrdnem gojišču B.



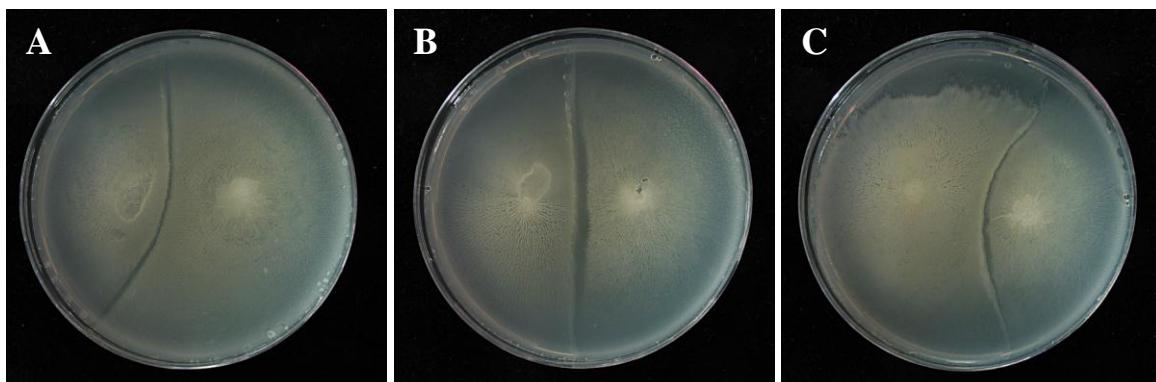
Priloga P: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-53 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RO-H-1 in 168), na poltrdnem gojišču B.



Priloga R: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-131 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RO-H-1 in 168), na poltrdnem gojišču B.



Priloga S: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-218 in PS-11, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 32 in PE 10) in različna ferotipa (RS-D-2 in 168), na poltrdnem gojišču B.



Priloga Š: Tri ponovitve sobivanja sevov PS-261 in PS-218, ki ju uvrščamo v različna ekotipa (PE 10 in PE 32) in različna ferotipa (RO-H-1 in RS-D-2), na poltrdnem gojišču B.

Priloga T1: Število kolonij in delež sevov v prvem tednu gojenja v kokulturi.

0 ur	CFU			DELEŽI				povprečje A, B, C	STDEV
	A	B	C	A	B	C			
53	7,40E+05	1,03E+06	8,80E+05	3,43E+01	4,93E+01	4,25E+01	4,20E+01	7,5237017	
218	1,42E+06	1,06E+06	1,19E+06	6,57E+01	5,07E+01	5,75E+01	5,80E+01	7,5237017	
53	5,50E+05	5,90E+05	6,30E+05	2,24E+01	2,61E+01	2,56E+01	2,47E+01	1,9837751	
131	1,90E+06	1,67E+06	1,83E+06	7,76E+01	7,39E+01	7,44E+01	7,53E+01	1,9837751	
53	9,20E+05	9,00E+05	9,40E+05	3,39E+01	3,19E+01	3,23E+01	3,27E+01	1,0796733	
11	1,79E+06	1,92E+06	1,97E+06	6,61E+01	6,81E+01	6,77E+01	6,73E+01	1,0796733	
53	1,17E+06	1,31E+06	1,13E+06	3,94E+01	4,61E+01	4,23E+01	4,26E+01	3,3759061	
261	1,80E+06	1,53E+06	1,54E+06	6,06E+01	5,39E+01	5,77E+01	5,74E+01	3,3759061	
24 ur									
53	1,69E+08	1,53E+08	1,54E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	7,80E+07	1,03E+08	7,00E+07	2,24E+01	4,52E+01	4,43E+01	3,73E+01	12,897187	
131	2,70E+08	1,25E+08	8,80E+07	7,76E+01	5,48E+01	5,57E+01	6,27E+01	12,897187	
53	0,00E+00	0							
11	3,19E+08	2,73E+08	2,60E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	0,00E+00	0							
261	2,90E+08	2,71E+08	2,95E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
48 ur									
53	1,36E+08	1,42E+08	1,35E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	1,80E+07	2,60E+07	3,40E+07	9,63E+00	1,44E+01	1,87E+01	1,42E+01	4,5294659	
131	1,69E+08	1,55E+08	1,48E+08	9,04E+01	8,56E+01	8,13E+01	8,58E+01	4,5294659	
53	0,00E+00	0							
11	2,77E+08	2,59E+08	2,80E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	0,00E+00	0							
261	1,99E+08	1,69E+08	1,84E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
72 ur									
53	1,11E+08	1,10E+08	1,09E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	3,00E+06	0,00E+00	8,00E+06	2,61E+00	0,00E+00	6,78E+00	3,13E+00	3,419699	
131	1,12E+08	7,70E+07	1,10E+08	9,74E+01	1,00E+02	9,32E+01	9,69E+01	3,419699	
53	0,00E+00	0							
11	1,13E+08	1,11E+08	7,00E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	2,49E-01	8,31E-02	0,1439776	
261	3,82E+07	5,13E+07	4,00E+07	1,00E+02	1,00E+02	9,98E+01	9,99E+01	0,1439776	
144 ur									
53	1,69E+07	1,75E+07	2,02E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	3,80E+07	2,80E+07	3,70E+07	3,06E+01	2,26E+01	2,02E+01	2,45E+01	5,467013	
131	8,60E+07	9,60E+07	1,46E+08	6,94E+01	7,74E+01	7,98E+01	7,55E+01	5,467013	
53	0,00E+00	0							
11	7,20E+07	1,02E+08	1,05E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	0,00E+00	0							
261	6,00E+06	6,00E+06	9,00E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	

Priloga T2: Število kolonij in delež sevov po prvi reinokulaciji v sveže gojišče LB.

	CFU			DELEŽI					
	24 ur	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV
53	1,62E+08	1,96E+08	2,03E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	1,90E+08	1,60E+08	1,60E+08	4,63E+01	4,21E+01	4,57E+01	4,47E+01	2,2863285	
131	2,20E+08	2,20E+08	1,90E+08	5,37E+01	5,79E+01	5,43E+01	5,53E+01	2,2863285	
53	0,00E+00	0							
11	3,10E+08	2,93E+08	3,44E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	4,00E+06	7,00E+06	9,00E+06	1,87E+00	2,69E+00	3,53E+00	2,70E+00	0,8301362	
261	2,10E+08	2,53E+08	2,46E+08	9,81E+01	9,73E+01	9,65E+01	9,73E+01	0,8301362	
48 ur	CFU			DELEŽI					
	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	1,36E+08	1,30E+08	1,20E+08	8,95E+01	1,00E+02	1,00E+02	9,65E+01	6,0773713	
218	1,60E+07	0,00E+00	0,00E+00	1,05E+01	0,00E+00	0,00E+00	3,51E+00	6,0773713	
53	5,70E+07	6,70E+07	5,10E+07	3,33E+01	4,47E+01	2,71E+01	3,50E+01	8,893552	
131	1,14E+08	8,30E+07	1,37E+08	6,67E+01	5,53E+01	7,29E+01	6,50E+01	8,893552	
53	1,00E+06	2,00E+06	2,00E+06	5,95E-01	1,52E+00	1,87E+00	1,33E+00	0,6575759	
11	1,67E+08	1,30E+08	1,05E+08	9,94E+01	9,85E+01	9,81E+01	9,87E+01	0,6575759	
53	1,30E+07	1,50E+07	2,10E+07	6,28E+00	8,24E+00	1,44E+01	9,64E+00	4,2275696	
261	1,94E+08	1,67E+08	1,25E+08	9,37E+01	9,18E+01	8,56E+01	9,04E+01	4,2275696	
72 ur	CFU			DELEŽI					
	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	1,03E+07	9,20E+06	5,80E+06	8,80E+01	1,00E+02	1,00E+02	9,60E+01	6,9084648	
218	1,40E+06	0,00E+00	0,00E+00	1,20E+01	0,00E+00	0,00E+00	3,99E+00	6,9084648	
53	0,00E+00	0							
131	4,00E+06	7,00E+06	3,00E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	8,77E-01	0,00E+00	0,00E+00	2,92E-01	0,5064476	
11	1,13E+07	7,40E+06	6,10E+06	9,91E+01	1,00E+02	1,00E+02	9,97E+01	0,5064476	
53	0,00E+00	4,00E+05	3,00E+05	0,00E+00	8,33E+00	6,52E+00	4,95E+00	4,38291	
261	3,90E+06	4,40E+06	4,30E+06	1,00E+02	9,17E+01	9,35E+01	9,50E+01	4,38291	
96 ur	CFU			DELEŽI					
	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	2,77E+07	1,66E+07	1,20E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	5,10E-01	1,70E-01	0,2945665	
131	6,90E+06	3,02E+07	1,95E+07	1,00E+02	1,00E+02	9,95E+01	9,98E+01	0,2945665	
53	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	2,98E-01	9,92E-02	0,1718304	
11	6,21E+07	5,98E+07	3,35E+07	1,00E+02	1,00E+02	9,97E+01	9,99E+01	0,1718304	
53	0,00E+00	5,00E+05	9,00E+05	0,00E+00	1,40E+00	2,43E+00	1,28E+00	1,2210643	
261	3,20E+07	3,51E+07	3,61E+07	1,00E+02	9,86E+01	9,76E+01	9,87E+01	1,2210643	
168 ur	CFU			DELEŽI					
	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	1,58E+08	1,54E+08	1,45E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0							
131	9,40E+07	3,30E+07	4,20E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	1,50E+07	1,10E+07	4,00E+06	7,65E+00	6,47E+00	1,77E+00	5,30E+00	3,1119676	
11	1,81E+08	1,59E+08	2,22E+08	9,23E+01	9,35E+01	9,82E+01	9,47E+01	3,1119676	
53	5,40E+06	8,50E+06	7,20E+06	1,45E+01	1,94E+01	1,74E+01	1,71E+01	2,4370504	
261	3,18E+07	3,54E+07	3,42E+07	8,55E+01	8,06E+01	8,26E+01	8,29E+01	2,4370504	

Priloga T3: Število kolonij in delež sevov po drugi reinokulaciji v sveže gojišče LB.

24 ur	CFU			DELEŽI				povprečje A, B, C	STDEV
	A	B	C	A	B	C			
53	2,94E+08	2,30E+08	2,87E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0							
131	2,18E+08	3,02E+08	1,85E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	2,10E+07	0,00E+00	0,00E+00	9,38E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,13E+00	5,4126588	
11	2,03E+08	2,04E+08	2,70E+08	9,06E+01	1,00E+02	1,00E+02	9,69E+01	5,4126588	
53	1,10E+07	5,30E+07	2,20E+07	5,58E+00	3,98E+01	2,53E+01	2,36E+01	17,197099	
261	1,86E+08	8,00E+07	6,50E+07	9,44E+01	6,02E+01	7,47E+01	7,64E+01	17,197099	
48 ur	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	1,48E+08	1,51E+08	1,52E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0							
131	2,03E+08	1,94E+08	1,31E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	1,60E+07	0,00E+00	0,00E+00	1,48E+01	0,00E+00	0,00E+00	4,94E+00	8,5533373	
11	9,20E+07	1,44E+08	2,12E+08	8,52E+01	1,00E+02	1,00E+02	9,51E+01	8,5533373	
53	1,20E+07	2,90E+07	2,20E+07	1,52E+01	2,84E+01	1,93E+01	2,10E+01	6,7777827	
261	6,70E+07	7,30E+07	9,20E+07	8,48E+01	7,16E+01	8,07E+01	7,90E+01	6,7777827	
72 ur	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	7,40E+07	6,00E+07	8,80E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0							
131	1,34E+08	9,70E+07	1,15E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	3,60E+07	4,00E+06	9,00E+06	4,09E+01	8,89E+00	1,53E+01	2,17E+01	16,950824	
11	5,20E+07	4,10E+07	5,00E+07	5,91E+01	9,11E+01	8,47E+01	7,83E+01	16,950824	
53	7,00E+06	2,10E+07	1,10E+07	2,59E+01	3,68E+01	3,79E+01	3,36E+01	6,6391687	
261	2,00E+07	3,60E+07	1,80E+07	7,41E+01	6,32E+01	6,21E+01	6,64E+01	6,6391687	
96 ur	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	2,09E+07	1,96E+07	2,69E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0							
131	2,44E+07	1,33E+07	2,47E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	3,10E+07	2,00E+07	4,00E+07	3,26E+01	3,17E+01	3,20E+01	3,21E+01	0,4559945	
11	6,40E+07	4,30E+07	8,50E+07	6,74E+01	6,83E+01	6,80E+01	6,79E+01	0,4559945	
53	7,50E+06	9,80E+06	8,00E+06	3,00E+01	4,64E+01	2,68E+01	3,44E+01	10,55668	
261	1,75E+07	1,13E+07	2,19E+07	7,00E+01	5,36E+01	7,32E+01	6,56E+01	10,55668	
168 ur	A	B	C	A	B	C	povprečje A, B, C	STDEV	
53	8,50E+07	7,10E+07	7,50E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
218	0,00E+00	0							
53	0,00E+00	0							
131	1,03E+08	7,00E+07	1,49E+08	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0	
53	3,80E+07	6,00E+06	1,30E+07	3,11E+01	4,32E+00	7,14E+00	1,42E+01	14,74288	
11	8,40E+07	1,33E+08	1,69E+08	6,89E+01	9,57E+01	9,29E+01	8,58E+01	14,74288	
53	2,00E+07	2,10E+07	1,40E+07	5,41E+01	3,00E+01	1,82E+01	3,41E+01	18,28061	
261	1,70E+07	4,90E+07	6,30E+07	4,59E+01	7,00E+01	8,18E+01	6,59E+01	18,28061	