

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vanja PAPEŽ

**PRIPRAVA REKOMBINANTNIH SEVOV *Bacillus subtilis*
IN ANALIZA NJIHOVEGA SOBIVANJA TER
IZRAŽANJA SURFAKTINSKEGA OPERONA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vanja PAPEŽ

**PRIPRAVA REKOMBINANTNIH SEVOV *Bacillus subtilis*
IN ANALIZA NJIHOVEGA SOBIVANJA TER IZRAŽANJA
SURFAKTINSKEGA OPERONA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF RECOMBINANT STRAINS *Bacillus subtilis*
AND ANALYSIS OF THEIR COEXISTENCE AND THE
EXPRESSION OF THE SURFACTIN OPERON**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

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. Matej Butala.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentorica: asist. dr. Polonca Štefanič

Recenzent: doc. dr. Matej Butala

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Vanja Papež 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.

Vanja Papež

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22/.26:579.852.11:57.083.1(043)=163.6
KG	<i>Bacillus subtilis</i> / ekotipi / ferotipi / zaznavanje celične gostote / komunikacija / zaznavanje kvoruma / sobivanje sevov / surfaktinski operon / rekombinantni sevi
AV	PAPEŽ, Vanja
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/ŠTEFANIČ, Polonca (somentorica)/ BUTALA, Matej (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2014
IN	PRIPRAVA REKOMBINANTNIH SEVOV <i>Bacillus subtilis</i> IN ANALIZA NJIHOVEGA SOBIVANJA TER IZRAŽANJA SURFAKTINSKEGA OPERONA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 53 str., 10 pregl., 14 sl., 5 pril., 86 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Po Gramu pozitivna, paličasta bakterija <i>Bacillus subtilis</i> lahko raste tako v aerobnih kot anaerobnih pogojih in v raznolikih okoljskih ter raznovrstnih biotskih interakcijah. V primerjavi s tistimi vrstami bakterij, ki živijo v stabilnejših okoljih, pri bakterijah <i>B. subtilis</i> opazimo veliko genetsko raznolikost naravnih izolatov. Naravne populacije bakterijske vrste <i>B. subtilis</i> ločimo v številne ekotipe. Ekotip predstavlja populacijo celic, ki so si med seboj ekološko podobne in imajo enako ekološko nišo. Poleg tega se sevi <i>B. subtilis</i> ločijo po ferotipih oziroma komunikacijskih jezikih. Ti so zapisani v lokusu ComQXPA, ki kodira komponente za zaznavanje celične gostote ali »kvoruma« in regulira številne fiziološke odzive kot so kompetenca, sinteza antibiotikov, sinteza surfaktina in tvorba biofilma. Ta sistem sestavljajo 4 komponente, med katerimi je modifikator peptida ComQ, signalni peptid ComX, receptor ComP in odzivni regulator ComA. Prve tri molekule lokusa so visoko polimorfne znotraj vrste in posledično se sevi te vrste ločijo v 4 komunikacijske skupine (ferotipe). Sevi istega ferotipa izmenjujejo informacije, sevi različnih ferotipov pa ne. Medcelična komunikacija koordinira kooperativno vedenje v populaciji, v kateri posameznik, kljub altruizmu svoje gene posredno prenaša na hčerinske celice. V diplomskem delu smo pripravili nabor rekombinantnih sevov <i>B. subtilis</i> iz več naravnih izolatov, ki se razlikujejo po ekotipu in/ali po ferotipu in nato v kokulturi v tekočem gojišču MELASA analizirali njihovo sobivanje ter sposobnost izražanja surfaktinskega operona. Rezultati analize sobivanja sevov v kokulturi kažejo, da sevi z enakim ekotipom lahko sobivajo dlje, pri sevih z različnim ekotipom pa en sev čez čas preraste drugega (kompeticija). Glede na naša opažanja, ferotip na sobivanje sevov ne vpliva. Vsi rekombinantni sevi so po 16 urni inkubaciji v tekočem gojišču MELASA izražali operon <i>surfA</i> kot tudi sevi gojeni v kokulturah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.22/.26:579.852.11:57.083.1(043)=163.6
CX	<i>Bacillus subtilis</i> / ecotypes / ferotypes / quorum sensing / cell communication / coexistence of strains / surfactin operon / recombinants strains
AU	PAPEŽ, Vanja
AA	MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/ŠTEFANIČ, Polonca (co-advisor)/ BUTALA, Matej (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2014
TI	PREPARATION OF RECOMBINANT STRAINS <i>Bacillus subtilis</i> AND ANALYSIS OF THEIR COEXISTENCE AND THE EXPRESSION OF THE SURFACTIN OPERON
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 53 p., 10 tab., 14 fig., 5 ann., 86 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<i>Bacillus subtilis</i> is a rod-shaped Gram-positive bacterium that is most often isolated from soil, where it is exposed to dynamic abiotic and biotic interactions probably responsible for high diversity of strains within this species. Natural populations of <i>B. subtilis</i> are diversified into ecotypes, which are populations of ecologically similar cells with the same ecological niche. <i>B. subtilis</i> isolates are also separated into communication groups or pherotypes. A pherotype is encoded by the ComQXPA quorum sensing system that regulates many physiological activities: competence, antibiotics and surfactin production and biofilm formation. It consists of 4 components: the peptide modifier ComQ, the signaling peptide ComX, the receptor ComP, and the response regulator ComA. The first three are highly polymorphic within the species, and responsible for separation of natural strains into 4 pherotypes. Strains of the same pherotype exchange information, strains of different pherotypes do not. Quorum sensing is therefore considered a cooperative behavior system although its direct effect on fitness of soil isolates is not known. A set of recombinant strains of <i>B. subtilis</i> from several natural isolates, which differ in ecotype and/or pherotype were prepared within this thesis. Expression of surfactin operone and the coexistence of these recombinants in co-cultures in the liquid media MELASA was analyzed. The results indicate that strains with the same ecotype can coexist longer, and strains with different ecotype compete (one strain outgrows the other). Pherotypes, however, do not affect the coexistence. All recombinant strains and strains in co-cultures expressed <i>surfA</i> operone after 16 h incubation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN NAČRT DELA	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 EKOLOGIJA BAKTERIJE <i>B. SUBTILIS</i>	4
2.2 GENOMIKA BAKTERIJE <i>B. SUBTILIS</i>	4
2.3 EVOLUCIJA BAKTERIJE <i>B. SUBTILIS</i>	5
2.3.1 Horizontalni genski prenos s transformacijo	5
2.4 NASTANEK EKOTIPOV	7
2.5 ZAZNAVANJE KVORUMA (QUORUM SENSING (QS))	9
2.5.1 Operon <i>comQXPA</i>	10
2.5.2 Kooperacija med sevi <i>B. subtilis</i>	11
2.5.3 Operon <i>srfA</i>	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Bakterijski sevi	13
3.1.2 Antibiotiki	14
3.1.3 Gojišča	15
3.1.4 Raztopine	16
3.1.5 Kemikalije, reagenti in encimi	17
3.1.6 Aparature	18
3.1.7 Kompleti	18
3.2 METODE	18
3.2.1 Priprava založne raztopine antibiotikov	18
3.2.2 Izolacija kromosomske in plazmidne DNA	19
3.2.2.1 Izolacija plazmidne DNA	19
3.2.2.2 Izolacija kromosomske DNA	19
3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza izolirane DNA	20

3.2.4 Transformacija in konstrukcija sevov <i>B. subtilis</i> z rekombinantno DNA	20
3.2.5 Spremljanje aktivacije operona <i>srfA</i> v rekombinantnih sevih in v kokulturah sevov <i>B. subtilis</i>	20
3.2.5.1 Priprava mikroskopskih preparatov za vrednotenje izražanja operona <i>srfA</i> v rekombinantnih sevih in vseh sevih v kokulturah	21
3.2.5.2 Fluorescenčna mikroskopija	21
3.2.6 Shranjevanje rekombinantnih sevov	21
3.2.7 Analiza sobivanja sevov <i>B. subtilis</i> v kokulturah	21
3.2.7.1 Primerjava rastnih krivulj in števila CFU sevov	21
3.2.7.2 Določanje števila spor posameznih sevov	22
3.2.7.3 Analiza sobivanja sevov v kokulturah v izbranem tekočem gojišču	22
3.2.7.4 Statistična obdelava podatkov	23
4 REZULTATI	24
4.1 PRIPRAVA REKOMBINANTNIH SEVOV <i>B. SUBTILIS</i> IN ANALIZA IZRAŽANJA SURFAKTINSKEGA OPERONA	24
4.2 ANALIZA SOBIVANJA REKOMBINANTNIH SEVOV <i>B. SUBTILIS</i>	26
4.2.1 Vrednotenje rasti in sporulacije rekombinantnih sevov v monokulturi	26
4.2.1.1 Vrednotenje rasti rekombinantnih sevov v monokulturah	26
4.2.1.2 Ugotavljanje deleža spor v monokulturi rekombinantnih sevov	30
4.2.2 Analiza sobivanja rekombinantnih sevov v kokulturah v tekočem gojišču MELASA	30
4.2.2.1 Sobivanje dveh rekombinantnih izogenih sevov	31
4.2.2.2 Sobivanje rekombinantnih sevov različnih ekotipov	33
4.3 ANALIZA SOBIVANJA IZOGENIH SEVOV	36
4.3.1 Konstrukcija seva PS-1013	36
4.3.2 Analiza sobivanja izogenih sevov v kokulturah v tekočem gojišču CM	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1 RAZPRAVA	41
5.1.1 Analiza izražanja surfaktinskega operona	41
5.1.2 Analiza sobivanja sevov <i>B. subtilis</i>	42
5.2 SKLEPI	46
6 POVZETEK	47
7 VIRI	48
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Naravni izolati bakterije <i>B. subtilis</i> , ki pripadajo različnim ekotipom (PE10, PE32 in PE22) in različnim ferotipom (RO-H-1/RO-B-2 in 168).	13
Preglednica 2: Rekombinantni sevi naravnih izolatov bakterije <i>B. subtilis</i> , ki pripadajo različnim ekotipom (PE10, PE32 in PE22) in različnim ferotipom (RO-H-1/RO-B-2 in 168).	13
Preglednica 3: Sevi, katerih DNA smo uporabili pri transformaciji naravnih izolatov. Vsi sevi bakterije <i>B. subtilis</i> so nastali iz seva IS75 (enak ekotip in enak ferotip).	14
Preglednica 4: Izogeni sevi, ki smo jih uporabili za analizo vpliva ferotipa na sobivanje izogenih sevov.	14
Preglednica 5: Antibiotiki, njihove koncentracije v založnih raztopinah, končne koncentracije v izbranem gojišču, pogoji priprave in shranjevanja.	15
Preglednica 6: Pregled rezultatov priprave rekombinantnih sevov <i>B. subtilis</i> , ki pripadajo različnim ekotipom (PE10, PE32 in PE22) in ferotipom (168 in RO-H-1) ter nosijo zapis za fluorescenčni protein v operonu <i>sfA</i>	24
Preglednica 7: Deleži spor na 1 ml izhodne kulture posameznih rekombinantnih sevov v tekočem gojišču MELASA inkubiranem pri 37 °C s stresanjem.	30
Preglednica 8: Izbrane kombinacije sevov za analizo sobivanja glede na ekotip in ferotip.	30
Preglednica 9: Vrednosti CFU rekombinantnih sevov v monokulturi in v kokulturi dveh sevov po 48 urni inkubaciji v tekočem gojišču MELASA pri 37 °C.	35
Preglednica 10: Izbrane kombinacije sevov z enakim ekotipom in različnimi ferotipi za analizo sobivanja.	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Trije razredi mutacij in rekombinacij, ki določajo ekotipsko raznolikost bakterij (Cohan in Perry, 2007: 376).	8
Slika 2: Rekombinacija med nastajajočimi vrstami vpliva na njihovo sobivanje (Cohan in Koeppel, 2008: 1027).	8
Slika 3: Izražanje operona <i>srfa</i> v rekombinantnem sevu <i>B. subtilis</i> PS-216 YFP s fluorescenčno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji seva v tekočem gojišču MELASA pri 37 °C.	25
Slika 4: Izračun deleža celic posameznih rekombinantnih sevov <i>B. subtilis</i> gojenih 16 ur v tekočem gojišču MELASA, ki fluorescirajo pod mikroskopom.	25
Slika 5: Rast monokultur dveh rekombinantnih izogenih sevov PS-216 CFP in PS-216 YFP (PE10, ferotip 168) v tekočem gojišču MELASA.	27
Slika 6: Rast monokultur rekombinantnih sevov PS-210 YFP in PS-216 CFP ter PS-210 YFP in PS-31 CFP v tekočem gojišču MELASA.	28
Slika 7: Rast monokultur rekombinantnih sevov PS-209 YFP in PS-216 CFP ter PS-209 YFP in PS-31 CFP v tekočem gojišču MELASA.	29
Slika 8: Sobivanje kontrolnih rekombinantnih izogenih sevov PS-216 YFP in PS-216 CFP v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA.	31
Slika 9: Sobivanje rekombinantnih sevov z enakim ekotipom (PE10) v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA.	32
Slika 10: Sobivanje rekombinantnih sevov z različnimi ekotipi v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA.	34
Slika 11: Detekcija izražanja operona <i>srfa</i> rekombinantnih sevov PS-210 YFP in PS-31 CFP z enakim ekotipom (PE10) in ferotipom (RO-H-1) v kokulturi, s fluorescentno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji sevov v gojišču MELASA pri 37 °C.	36
Slika 12: Detekcija izražanja operona <i>srfa</i> v sevu <i>B. subtilis</i> PS-1013 s fluorescentno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji v gojišču CM pri 37 °C.	37

Slika 13: Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1009 ter PS-1011 in PS-1000 v kokulturi, v tekočem gojišču CM. **39**

Slika 14: Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1004 ter PS-1013 in PS-1000 v kokulturi, v tekočem gojišču CM. **40**

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rast monokultur izogenih sevov PS-1009 in PS-1011 ter PS-1000 in PS-1013 v tekočem gojišču CM.

Priloga B: Rast monokultur izogenih sevov PS-1000 in PS-1011 ter PS-1004 in PS-1011 v tekočem gojišču CM.

Priloga C: Deleži spor na 1 ml izhodne kulture posameznih rekombinantnih sevov v tekočem gojišču CM inkubiranem pri 37 °C s stresanjem.

Priloga D: Vrednosti CFU rekombinantnih sevov z različnimi/enakimi ekotipi in različnimi/enakimi ferotipi v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA.

Priloga E: Vrednosti CFU izogenih sevov z različnimi/enakimi ferotipi v kokulturi, v tekočem gojišču CM.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

1,00E+01	znanstveni zapis vrednosti 1×10^1
bp	bazni par
CFP	modro-zelen fluorescenčni protein (<i>angl.</i> cyan fluorescent protein)
CFU	enote, ki tvorijo kolonijo (<i>angl.</i> colony forming units)
CM	gojišče za kompetenco (<i>angl.</i> Competence Medium)
Cm^R	rezistenca (odpornost) na antibiotik kanamicin
CSF	Faktor za sporulacijo in kompetenco (<i>angl.</i> competence and sporulation factor)
C-terminalna domena	konec proteinske ali polipeptidne verige aminokislin s prosto karboksilno skupino (-COOH)
dH₂O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
LB	Luria Bertani
N-terminalni konec	začetek proteinske ali polipeptidne verige aminokislin s prosto amino skupino (-NH ₂)
OD	optična gostota (<i>angl.</i> optical density)
QS	zaznavanje celične gostote (<i>angl.</i> quorum sensing)
RNA	ribonukleinska kislina
Sp^R	rezistenca (odpornost) na antibiotik spektinomycin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
wt	divji tip (<i>angl.</i> wild type)
YFP	rumen fluorescenčni protein (yellow fluorescent protein)

1 UVOD

Bakterija *Bacillus subtilis* je najboljše preučena po Gramu pozitivna bakterija, ki jo v laboratorijskih študijah za preučevanje celične diferenciacije, metabolizma in regulatornih mehanizmov uporabljajo kot modelni organizem in ekvivalent po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* (Freyre-González in sod., 2013).

Sevi *B. subtilis* izkazujejo precejšnjo genomsko raznolikost znotraj vrste (Koeppel in sod., 2008), katere nastanek še ni pojasnjen. Raznolikost sevov je povezana z ekološkimi in s socialnimi interakcijami, ki imajo pomembno vlogo v populacijski biologiji naravnih izolatov (Cordero in Polz, 2014). Raziskave interakcij med bakterijami znotraj iste vrste so zelo pomembne, saj bi s prepoznavo ekološko specifičnih genov, katerih produkti bakteriji omogočijo prilagoditev na stresne razmere v okolju, lahko razložili, kako se bakterija *B. subtilis* prilagaja na spremembe v okolju in kaj je gonilo evolucije te vrste (Earl in sod., 2008).

Ekološko podobni sevi znotraj ene vrste bakterij spadajo v isti ekotip, ki je definiran kot populacija celic z enako ekološko nišo. Adaptivna mutanta ali rekombinanta iz te populacije, ki bi imela prednost v danih pogojih, bi lahko izpodrinila starševski sev. To imenujemo selekcijska homogenizacija (selective sweep) (Cohan, 1994; Cohan, 2001). Cohan (2001) pravi, da so si ekotipi med seboj dovolj ekološko različni, da lahko v naravnem okolju sobivajo, medtem ko med sevi istega ekotipa lahko pride do izpodrivanja. Hamilton (1964) pa je postavil teorijo sorodstvene selekcije, ki razloži altruistično sodelovanje med sorodniki, in predpostavi, da sevi v enakem ekotipu lahko sobivajo.

Sposobnost adaptacije celic *B. subtilis* na stresne dejavnike okolja uravnava mehanizem medcelične komunikacije, s katerim bakterija zaznava celično gostoto (quorum sensing oz. zaznavanje kvoruma). Z njim uravnava sintezo protimikrobnih peptidov (bakteriocinov in antibiotikov), produkcijo surfaktina, zunajceličnih litičnih encimov in eksopolimerov (npr. polisaharidov), kot tudi indukcijo kompetence (Miller in Bassler, 2001; Dubnau, 1991; Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Lopez in Kolter, 2010).

Bakterija *B. subtilis* zaznava celično gostoto ali kvorum s sistemom, ki je zapisan na lokusu *comQXPA*: gen *comQ* je vpleten v izoprensko modifikacijo in prenos signalne molekule, peptida ComX iz celice v začetku stacionarne faze rasti. Peptid ComX se veže na membransko histidin kinazo ComP in preko fosforilacije aktivira odziv regulatorja ComA, ki je odgovoren za globalno spremembo prepisa genov (Magnuson in sod., 1994; Solomon in sod., 1995; Tortosa in sod., 2001). Ta sistem je visoko polimorfen znotraj vrste. Ferotipska različnost je posledica polimorfizma genov *comQ*, *comX* in *comP*. Seve *B. subtilis* ločujemo v komunikacijske skupine (ferotipe), kjer sevi, ki pripadajo istemu

ferotipu uspešno izmenjujejo informacije, sevi različnih ferotipov pa komunikacije niso sposobni (Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandič-Mulec, 2009).

Objavljeni rezultati kažejo, da je visoka stopnja intraspecifične (kompeticije znotraj vrste) različnosti prisotna tudi med bakterijami na majhnih razdaljah v tleh. Na primer, zbirka sevov *B. subtilis* izoliranih iz dveh talnih mikroagregatov (Štefanič in Mandič-Mulec, 2009) vključuje seve, ki se med ostalim razlikujejo v specifičnosti medsebojnega prepoznavanja (različni ferotipi). Na nivoju visoko ohranjenih genov, ki nosijo zapis za proteine (npr. *rpoB*, *gyrA*) pa te seve lahko razdelimo v tri ekotipe. Sevi znotraj ekotipa so si po definiciji bolj sorodni kot sevi različnih ekotipov (Štefanič in sod., 2012).

Sistem ComQXPA uravnava izražanje operona *urfA* (Hahn in Dubnau, 1991). Ta operon kodira encime, ki katalizirajo sintezo surfaktina (Nakano, 1991). Surfaktin je ciklični bakterijski lipopeptid, ki se širi pred roječimi bakterijami in je pomemben predvsem zaradi svoje surfaktantske moči. Je tudi antibiotik, ima antibakterijske, antiviralne, antimikotične in hemolitične lastnosti ter zmanjšuje površinsko napetost in viskoznost površine (Mor, 2000; Peypoux in sod., 1999).

1.1 NAMEN IN NAČRT DELA

Predhodne raziskave (Štefanič in Mandič-Mulec - neobjavljeno) in tiste vključene v diplomsko delo Elizabete Benigar (2011) so pokazale, da nekateri naravni izolati izolirani iz 1 cm³ tal nabrežja reke Save in namnoženi v tekočem gojišču LB sobivajo, medtem ko je pri ostalih sobivanje manj stabilno. V kokulturi dveh sevov lahko tako eden od sevov tudi do 100 krat zniža frekvenco rasti drugega seva. Ker je bil razpon kvantifikacije v teh raziskavah le znotraj dveh logaritmov, je bil cilj tega diplomskega dela pripraviti nabor rekombinantnih sevov, ki bodo nosili zapis za odpornost proti antibiotiku, kar nam bo omogočilo širši razpon kvantifikacije posameznih sevov v stresanih kokulturah ter natančnejšo analizo vpliva ekotipa in ferotipa na njihovo sobivanje. Pripravljeni rekombinantni sevi bodo v operonu *urfA* nosili tudi zapis za fluorescenčni protein (CFP ali YFP), kar nam bo omogočilo analizo izražanja operona *urfA* s fluorescenčno mikroskopijo.

Predvidevamo, da bodo rezultati tega diplomskega dela doprinesli k razumevanju komunikacije in socialnih odnosov med različnimi sevi vrste *B. subtilis*.

Hipoteza:

Predpostavljamo, da bodo sevi, ki so bolj sorodni (enak ekotip) v kokulturi dveh sevov sobivali skozi več generacij, medtem ko bo pri manj sorodnih sevih (različen ekotip) prišlo do intraspecifične kompeticije v stresanih kokulturah in se bo frekvenca enega seva povečala na račun drugega.

Načrt dela:

A) Priprava rekombinantnih sevov: izolacija DNA, priprava kompetentnih celic naravnih izolatov *B. subtilis*; transformacija s kromosomsko/plazmidno DNA laboratorijskih sevov *B. subtilis* BD 2876, 1009 in 1001, ki nosijo zapis za selekcijski marker (odpornost proti antibiotiku) in/ali gensko fuzijo promotorskega področja gena *srfA* spojenega s poročevalskim genom za rumeni (Yfp) ali modri (Cfp) fluorescenčni protein brez lastnega promotorja (fuziji genov: *srf-yfp* ali *srfA-cfp*).

B) Ugotavljanje sobivanja rekombinantnih sevov v kokulturah v razmerju sevov bakterij ob inokulaciji 1:1, skozi več ciklov precepljanj kultur v sveže gojišče. Seve bomo gojili v kokulturi v hranilnem gojišču s stresanjem pri 37 °C in dnevno spremljali rast posameznih sevov z določitvijo bakterijskih enot, ki tvorijo kolonijo (CFU, *angl.* colony forming units). Selekcija sevov bo izvedena na trdnih gojiščih z antibiotikom.

C) Izražanje genskih konstruktov *srfA-cfp* ali *srfA-yfp* v rekombinantnih sevih bomo analizirali s fluorescenčno mikroskopijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EKOLOGIJA BAKTERIJE *B. subtilis*

Bakterija *B. subtilis* je zelo razširjena, paličasta, po Gramu pozitivna bakterija, ki je sposobna rasti v različnih okoljih, kot so tla, rizosfera, morski in sladkovodni ekosistemi, v/na hrani (semenih in začimbah) ter v prebavilih človeka in živali (Earl in sod., 2008; Fall in sod., 2004; Barbosa in sod., 2005; Harwood, 1989). Dolgo so smatrali, da je bakterija *B. subtilis* obligatni aerob, toda novejša raziskave so potrdile, da je bakterija sposobna tudi anaerobne rasti (Kunst in sod., 1997; Folmsbee in sod., 2004).

Celice običajno rastejo v verižicah in so negibljive (eksponentna faza rasti), ob pomanjkanju hranil pa bakterija *B. subtilis* preneha rasti (vstop v stacionarno fazo rasti) in sproži ustrezen odziv, ki poveča fenotipsko raznolikost populacije. Med te odzive sodijo sprememba morfologije celic, ki postanejo gibljive, sproži se kemotaksa in produkcija sekundarnih metabolitov (proteaz, karbohidraz in antibiotikov). Ob vstopu v stacionarno fazo rasti pa se bakterije *B. subtilis* lahko diferencirajo v kompetentne celice, ki so sposobne prevzeti prosto DNA iz okolja (Dubnau, 1991; Dubnau in Provvedi, 2000). V kolikor ti odzivi ne morejo vzpostaviti ponovne rasti, se vegetativne celice diferencirajo v metabolno neaktivne endospore, ki bakteriji omogočajo preživeti ekstremne pogoje okolja (Stragier in Losick, 1996; Piggot in Hilbert, 2004; Nagorska in sod., 2007; Stein, 2005).

Primarni habitat bakterije *B. subtilis* so zgornje plasti tal, zato je bakterija pogosto izpostavljena širokemu spektru okoljskih sprememb, kot je pomanjkanje hranil in nihanja temperature in vlage. Bakterije te vrste zaradi teh vplivov kažejo večjo genetsko raznolikost kot bakterije, ki živijo v bolj konstantnih pogojih (Budde in sod., 2006). Temperaturne spremembe predstavljajo enega izmed glavnih faktorjev, ki vpliva na celično rast in preživetje v tleh. V laboratorijskih pogojih lahko bakterija *B. subtilis* uspeva in raste v temperaturnem razponu od približno 11 °C do 52 °C (Budde in sod., 2006; Holtmann in Bremer, 2004). Generacijski čas bakterij v naravnem okolju je 50 do 100 ur, generacijski čas v laboratoriju pa je le 20 do 30 minut (Hecker in Völker, 1990).

2.2 GENOMIKA BAKTERIJE *B. subtilis*

Bakterija *B. subtilis* je ena najbolje preučeni po Gramu pozitivnih bakterij. Bakterija ima en ciklični kromosom. Genom ima v velikosti 4,214,814 bp z zapisom za 4,100 genov. 53 % teh genov je prisotnih samo enkrat, medtem ko je 25 % genoma podobnega večim genskim družinam, ki so bile razširjene z gensko duplikacijo. Velik del genoma nosi zapis za gene katerih produkti so namenjen izkoriščanju različnih virov ogljika, vključno z molekulami rastlinskega izvora, okoli 20 % genoma pa je namenjen tvorbi sekundarnih metabolitov, ki omogočajo populacijam bakterij *B. subtilis* tekmovanje v naravnem okolju (Phelan in sod., 2012). Mednje spadajo tudi antibiotiki, ki jih bakterija v velikem številu izloča iz celice (Ara in sod., 2007). Povprečna vsebnost bp GC je 43,5 % (Kunst in sod.,

1997). Genom ima vsaj deset profagov oziroma njihovih ostankov, kar nakazuje na vlogo bakteriofagov pri evolucijskem razvoju bakterije (Kunst in sod., 1997).

Od skupno 4,100 genov je 192 genov esencialnih. Večina esencialnih genov je vpletenih v metabolizem bakterije. Polovica esencialnih genov je odgovorna za procesiranje informacij, ena petina za sintezo celične stene, delitev celice in njeno obliko, ena desetina pa je odgovorna za energetske stanje celice. Esencialnih genov z neznano funkcijo je 4 % (Kobayashi in sod., 2003).

V genomu bakterije *B. subtilis* je karakteriziranih tudi več nekodirajočih RNA molekul (Saito in sod., 2009). Genom bakterije vsebuje tudi gene, ki nosijo zapis za nitratno reduktazo, kar je v skladu s sposobnostjo anaerobne rasti v prisotnosti nitrata (Kunst in sod., 1997; Folmsbee in sod., 2004).

2.3 EVOLUCIJA BAKTERIJE *B. subtilis*

Evolucijska biodiverzitetata se prične na stopnji mikroevolucije z diferenciacijo posameznikov v populaciji in se kaže kot raznolikost fenotipov v populaciji organizmov enake vrste na pretežno omejenih geografskih območjih tekom velikega števila generacij (Sikorski, 2008; Mayr, 2004).

Sprememba fenotipa je posledica genetske adaptacije bakterije na spremembe okolja in selektivnega pritiska, ki mutacijo fiksira. Bakterije se lahko na selekcijske pritiske prilagodijo na dva glavna načina: s spremembo genoma (mutacija, rekombinacija, horizontalni genski prenos) ali z migracijo v novo, nestresno okolje. Kako se bakterija prilagodi na spremenjene pogoje (abiotske ali biotske) je odvisno od ravnotežja teh dveh sil (Vos in sod., 2013).

Analize genomov kažejo, da ima horizontalni prenos genov pomembno vlogo v evoluciji bakterij, saj ima tipični bakterijski genom 5–10 % genov od zelo različnih donorjev (Ochman in sod., 2000). Horizontalni prenos genov pri bakteriji *B. subtilis* je lahko posledica transdukcije, konjugacije ali transformacije (Earl in sod., 2008). Evolucija bakterijske vrste je tesno povezana tudi s sestavo matične mikrobne združbe, ki je ravno tako podvržena hitrim adaptivnim spremembam (O'Brien in sod., 2013).

2.3.1 Horizontalni genski prenos s transformacijo

Bakterijska transformacija je stabilna genetska sprememba, ki jo povzroči zajemanje in rekombinacija eksogene, sorodne DNA iz okolja v genom bakterije. Kompetenca pa je stanje bakterijske celice (populacije), v katerem je sposobna prevzeti eksogeno DNA iz okolja. Kompetenca je pri bakteriji *B. subtilis* časovno omejen odziv na okoljske pogoje kot sta pomanjkanje specifičnih hranil in celična gostota. Poznamo dve obliki kompetence

ustrezne za transformacijo bakterij: naravno in umetno vzpodbujeno (Chen in Dubnau, 2004).

Transformacija se v nekaterih bakterijskih vrstah dogaja naravno. Naravna transformacija je adaptacija bakterije za prenos DNA in je odvisna od izražanja mnogih bakterijskih genov in njihovih produktov. Transport eksogene DNA v celice zahteva proteine vpletene v sestavo pilov tipa IV in sistema izločanja tipa II kot tudi DNA translokacijski kompleks v citoplazmatski membrani (Chen in Dubnau, 2004; Johnsborg in sod., 2007).

V splošnem je transformacija kompleksen razvojni proces, ki je energetsko potraten. Le kompetentna bakterija se lahko poveže z eksogeno DNA, jo prevzame in rekombinira v svoj genom. Vir DNA, ki se z rekombinacijo vključi v gostiteljev genom, je z redkimi izjemami sev bakterije iste vrste, zato je DNA homologna genomu gostitelja (Solomon in Grossman, 1996). Nekatero bakterijsko vrsto ob celični smrti sprostijo svojo DNA v okolje, kjer jo lahko prevzamejo druge celice, vendar pa je transformacija najbolj uspešna z DNA iz vrst, ki so si sorodstveno zelo blizu, saj se stopnja rekombinacije eksponentno zmanjšuje z razliko v zaporedju DNA donorja in recipienta (Chen in Dubnau, 2004; Roberts in Cohan, 1993). Sevi *B. subtilis* lahko zunajcelično DNA sproščajo tudi v kratkem časovnem intervalu v pozni eksponentni fazi, ki sovпада z razvojem naravne kompetence (Zafra in sod., 2012).

V laboratorijskih pogojih je naravnega prevzema eksogene DNA sposobnih približno 1 % bakterijskih vrst. Več jih je sposobnih v njihovem naravnem okolju (Chen in Dubnau, 2004). V fazi stradanja imajo celice navadno samo eno kopijo kromosoma in povečano stopnjo poškodb DNA. Zato ena od hipotez pravi, da transformacija služi za popravilo poškodb DNA z rekombinacijo (Michod in sod., 2008).

Za razvoj kompetence pri bakteriji *B. subtilis* je potrebnih okoli 40 genov (Solomon in Grossman, 1996) in običajno se prenesejo večji odseki DNA, daljši od milijona nukleotidov (Saito in sod., 2006a). Ta pogosto predstavlja več kot tretjino celotne dolžine kromosoma (Saito in sod., 2006b). Zdi se, da okoli 7-9 % akceptorskih celic prevzame celoten kromosom donorja. Samo 10 % populacije celic *B. subtilis* pa postane kompetentnih. (Akamatsu in Taguchi, 2001) in izražajo proteine ComG in ComC (DNA vezavni aparat) ter ComE in ComF (DNA transportni mehanizem). Ti so uravnani na ravni transkripcije, njihova sinteza pa je odvisna od transkripcijskega faktorja ComK (Tortosa in Dubnau, 1999).

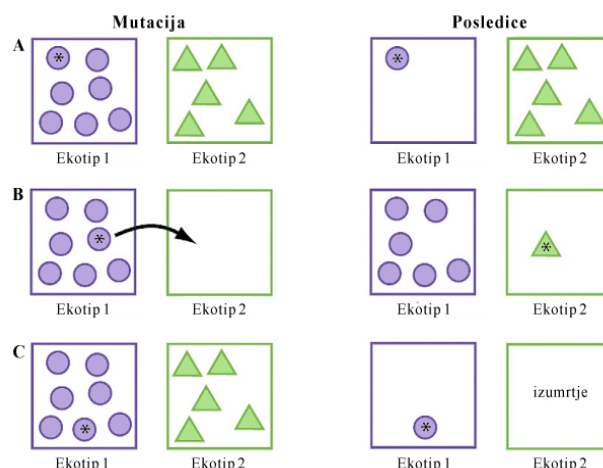
Kompetenca bakterij *B. subtilis* je sprožena ob koncu eksponentne faze rasti (Anagnostopoulos in Spizizen, 1961). Vsi do zdaj objavljeni protokoli transformacije v laboratoriju vključujejo uporabo minimalnega gojišča z glukozo in dodanimi kazaminokislinami. Čas prehoda med eksponentno in stacionarno fazo rasti je definiran kot čas T_0 . Celice so maksimalno kompetentne 2 uri po vstopu v stacionarno fazo, v času T_2 (Dubnau, 1991). Transformacija DNA pri *B. subtilis* poteka v več stopnjah: vezava

donorske DNA, fragmentacija in prevzemanje donorske DNA, kromosomska transformacija in integracija donorske DNA ter resolucija. Dvojna vijačnica DNA donorja se veže na membrano kompetentne celice. Nato nastopi fragmentacija DNA, omejena cepitev DNA z nukleazo. Nastanejo odseki dolgi 15-30 kbp. Približno polovica vezane DNA se razgradi in sprosti v okolje, v celico pa se transportira le enojna verižica. Ta interagira z DNA sprejemnika in se z rekombinacijo vključi v njegov kromosom. Produkt rekombinacije je heterodupleks DNA, v katerem sta s kovalentnimi vezmi povezani verigi donorja in sprejemnika. Heterodupleks se z replikacijo razreši in nastane homodupleks (Dubnau, 1991; Akamatsu in Taguchi, 2001).

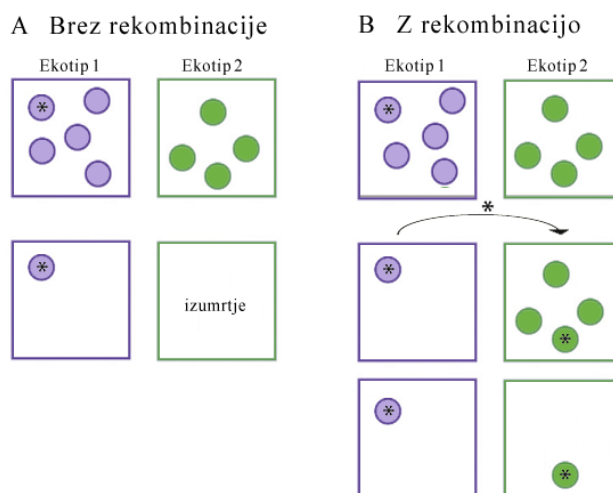
2.4 NASTANEK EKOTIPOV

Mikroorganizme uvrščamo v ločene skupine na podlagi njihovih fenotipskih značilnosti ter na podlagi podobnosti zaporedij DNA (sequence clusters), ki kodirajo gospodinjske gene, kot sta na primer gena *gyrA* in *rpoB* (Cohan, 1994; Cohan in Perry, 2007). Na podlagi teh in modela »Ecotype Simulation« lahko identificiramo domnevne ekotipe (putative ecotypes; PE). Ti so definirani kot populacije celic z enako ekološko nišo znotraj katerih lahko adaptivna mutacija s selekcijsko prednostjo v danih pogojih sproži izginotje izhodnega ekotipa (Cohan, 1994; Cohan, 2001). Ta dogodek imenujemo periodična selekcija (Cohan, 1994).

Ekotipi nosijo vse dinamične lastnosti vrste (Cohan in Perry, 2007; de Queiroz, 2005): so ekološko striktno ločeni, ker so zunaj dosega drifta in periodične selekcije drug drugega, ne glede na stopnjo spolne izolacije med njimi (Cohan, 1994) in ker je rekombinacija preveč redka, da bi preprečila njihovo homogenizacijo (Lawrence, 2002)); genetska raznovrstnost znotraj ekotipa je torej omejena s kohezijo (bodisi s periodično selekcijo in/ali driftom); različni ekotipi pa so podvrženi ločeni evoluciji. Ekotipi se tako ekološko razlikujejo, kar jim omogoča, da sobivajo (Slika 1A). Če so ekološke razlike med genotipi znotraj ekotipa majhne, periodična selekcija lahko počisti ekološko in genetsko raznolikost znotraj ekotipa. Razhajanje lahko postane trajno, ko mutacija (ali rekombinacija) postavi organizem v novo ekološko nišo in ustvari nov ekotip, saj organizem pridobi sposobnost za izrabo novega nabora virov hranil, oziroma nosi zapis za boljše preživetje v določenem okolju. Ker se nov ekotip ekološko razlikuje od starševskega ekotipa, periodična selekcija v starševskem ekotipu ne vpliva na nov ekotip in njegove potomce (Slika 1B). Nov ekotip zato lahko uide periodični selekciji starševskega ekotipa in dva nova ekotipa sta podvržena ločeni diverzifikaciji. Tako nastali ekotipi so monofiletske skupine, saj izvirajo iz enega samega osebka (Cohan in Perry, 2007; Cohan, 2001). Nov ekotip je primarno torej klon, brez raznolikosti, ki s časoma preko mutacij in rekombinacije postane genetsko raznolik izvornemu sevu (Ward in Cohan, 2005).



Slika 1: Trije razredi mutacij in rekombinacij, ki določajo ekotipsko raznolikost bakterij. Krogi in trikotniki predstavljajo različne genotipe, zvezdice pa adaptivne mutacije. (A) Periodične selekcijske mutacije izboljšajo fitness posameznika, tako da mutanta in njeni potomci izpodrinejo vse ostale celice v ekološki niši (ekotipu); Te mutacije ne vplivajo na raznolikost v drugih ekotipih, ker jim ekološke razlike preprečujejo direktno kompeticijo. Periodična selekcija vodi v ločevanje ekotipov s čiščenjem raznolikosti znotraj, ne pa med ekotipi. (B) Mutacije, ki formirajo nov ekotip. Mutacija ali rekombinacija v genomu bakteriji, omogočata sevom zasesti novo ekološko nišo in formacijo novega ekotipa. Mutanta, ki je sposobna formacije ekotipa, kot tudi njeni potomci, se lahko izognejo periodični selekciji iz njihovega predhodnega ekotipa. (C) Mutacija, ki prepreči specijacijo. Tudi če sta bila dva ekotipa v preteklosti podvržena ločeni periodični selekciji, lahko izredno prilagodljiv adaptivni genotip mutante preraste drug ekotip in povzroči njegovo izumrtje. Izumrtje drugega ekotipa s kompeticijo (Ekotip 2) je mogoče le, če vse vire Ekotipa 2 izkorišča tudi Ekotip 1 (Cohan in Perry, 2007: 376).



Slika 2: Rekombinacija med nastajajočimi vrstami vpliva na njihovo sobivanje. Ekotipa 1 in 2 predstavljata nedavno ločena ekotipa, ki se razlikujeta samo v deležu virov, ki jih izkoriščata. Ker nimata edinstvenih virov, je lahko vsak ekotip ranljiv na izjemno kompetitivne mutante drugega ekotipa. Krogi predstavljajo različne genotipe znotraj posameznega ekotipa. Zvezdice predstavljajo mutacije, ki daje konkurenčno prednost genotipu. (A) Ko ne pride do rekombinacije, adaptivna mutanta v Ekotipu 1 povzroči izumiranje Ekotipa 2, skupaj z vsemi drugimi genotipi v Ekotipu 1. (B) Z rekombinacijo se lahko adaptivni alel prenese v Ekotip 2, kar povzroči periodično selekcijo v tem ekotipu, kar omogoča nadaljnje sobivanje obeh ekotipov (Cohan in Koeppl, 2008: 1027).

Genska izmenjave v prokariontih spodbuja speciacijo, saj omogoča pridobivanje heterolognih genov iz zelo oddaljenih sorodnikov. Prokarionti pa se lahko prilagodijo novemu okolju s pridobivanjem genov ali sklopov genov tudi iz drugih organizmov (Ochman in Davalos, 2006). Rekombinantni odseki so kratki, kar omogoča prenos majhnega in z adaptacijo povezanega nabora genov, a brez sočasnega prenosa genov, ki so specifični za ekološko nišo (Zawadzki in Cohan, 1995). Tudi če je dogodek horizontalnega prenosa genov skrajno moteč za prejemnika, je rekombinanta še vedno lahko uspešna. Ni nujno, da ta izpodrine člane svojega prejšnjega ekotipa; temveč mora adaptiran organizem ohranjati le pozitivno stopnjo rasti v svoji novi niši, da se ohrani. Vendar se zdi, da so mutacije v obstoječih genih vsaj delno tudi odgovorne za razvoj novih ekotipov (Cohan in Koepfel, 2008).

2.5 ZAZNAVANJE KVORUMA (QUORUM SENSING (QS))

Zaznavanje kvoruma (QS) je mehanizem uravnavanja izražanja genov in kooperativno bakterijsko vedenje, ki temelji na izmenjavi in zaznavanju zunajceličnih signalov, ki so skupna dobrina populacije. Bakterija v okolje sprošča kemične signalne molekule (feromone), katerih koncentracija se povečuje v odvisnosti od celične gostote. Ob zaznavi kritične koncentracije signalnih molekul, ki se vežejo na membranski ali znotrajcelični receptor, se sproži adaptivni odziv bakterij v populaciji, ki vodi v spremembo izražanja genov in vedenja populacije. Po Gramu pozitivne in negativne bakterije uporabljajo medcelični komunikacijski sistem za uravnavanje raznolike palete fizioloških dejavnosti. Ti procesi vključujejo simbiozo, virulenco, kompetenco, konjugacijo, sintezo antibiotikov, gibljivost, sporulacijo in tvorbo biofilma. V splošnem velja, da po Gramu negativne bakterije pri komunikaciji za signalne molekule uporabljajo acetil homoserin lakton, po Gramu pozitivne pa procesirane oligopeptide. Posamezna bakterijska vrsta ima več signalnih molekul in/ali več sistemov za komunikacijo. Kompleksen, hierarhičen regulatorni sistem zazna in se odzove na signale okolja, katere bakterije uporabijo tudi za razlikovanje med vrstami v mikrobnih združbah (Miller in Bassler, 2001; Štefanič in sod., 2012; Henke in Bassler, 2004; Williams in sod., 2007).

Na prehodu iz logaritemske v stacionarno fazo rasti bakterije *B. subtilis*, medcelična komunikacija sproži kompleksen odziv, ki vodi v sintezo protimikrobnih peptidov (bakteriocinov in antibiotikov), produkcijo surfaktina, zunajceličnih litičnih encimov in eksopolimernih snovi, kot tudi sprožitev kompetence bakterij (Dubnau, 1991; Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Lopez in Kolter, 2010). Sinteza izločenih snovi (ne le signalnih peptidov) v zadosti visokih koncentracijah je energijsko potratna, vendar pa te molekule koristijo vsem posameznikom v lokalni skupini ali populaciji bakterij (West in sod., 2006).

Peptid (feromon) ComX bakterije *B. subtilis*, posreduje zaznavanje kvoruma (quorum sensing, QS) in z njim kontrolo kompetence. Izloča in akumulira se z večanjem celične

gostote. Procesiran peptid ComX izvira iz prekurzorskega peptida, ki je zapisan na genu *comX*. Gen *comQ* nosi zapis za encim, ki procesira in modificira prekurzorsko signalno molekulo ComX (Magnuson in sod., 1994). ComX se poveže z membransko histidin kinazo ComP in aktivira odziv regulatorja ComA, ki je odgovoren za globalno spremembo izražanja genov (Magnuson in sod., 1994; Solomon in sod., 1995; Tortosa in sod., 2001). Sproži tudi prepis operon *srfa*, (Nakano in sod., 1991) in gena *comS* (Turgay in sod., 1998). Protein ComS nato inhibira proteolitsko razgradnjo proteina ComK (Turgay in sod., 1998), ki je aktivator prepisa strukturnih genov za razvoj kompetence. (Turgay in sod., 1997). Bakterija *B. subtilis* s sistemom ComQXPA nadzoruje tudi sintezo antimikrobnih peptidov, bakteriocinov, antibiotikov in zunajceličnih polimernih substanc (EPS, poli- γ -glutamat) (Dubnau, 1991; Grossman in Losick, 1988; Lopez in sod., 2009a).

2.5.1 Operon *comQXPA*

Študije so pokazale, da so trije geni operona *comQXPA* (*comQ*, *comX*, gen za N-terminalno domeno proteina ComP) polimorfni, saj so si podobni le v ~56 % nukleotidov. Trije geni pa so močno ohranjeni (*comA*, *degQ*, gen za C-terminalno domeno ComP). C-terminalni del gena *comP* in gen *comA* imata več kot 90 % nukleotidno podobnost znotraj vrste. Polimorfizem prvih treh genov je glavni razlog za uvrščanje sevov v 3-4 komunikacijske skupine (ferotipe) z visoko specifičnostjo odziva QS znotraj ferotipa (Ansaldi in sod., 2002; Tortosa in sod., 2001, Štefanič in Mandič Mulec, 2009). Dokazani polimorfizem genov *comQXP'* korelira s štirimi komunikacijskimi skupinami (ferotipi), znotraj katerih sevi uspešno zaznavajo ComX, sevi različnih ferotipov pa ne (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandič-Mulec, 2009). Tortosa in sodelavci so seve *B. subtilis* razdelili na skupino 1 (*B. subtilis* 168 in *B. mojavensis* RO-C-2), skupino 2, ki vključuje *B. subtilis* RS-B-1 in *B. mojavensis* RO-H-1 in RO-B-2. Tretja skupina vključuje le sev *B. subtilis* RO-FF-1, četrta skupina pa *B. natto* NAF4 in RS-D-2 (Tortosa in sod., 2001).

Feromoni ComX, ki jih sintetizirajo različni ferotipi se razlikujejo v masi, velikosti in zaporedju zrelega peptida ter v izoprenski modifikaciji. S svojim C-terminalnim koncem, ki je podvržen modifikacijam, tako določajo feromonsko specifičnost. Za produkcijo feromona ComX je potrebna koekspresija genov dveh proteinov ComQ in ComX. Poleg genov *comQ* in *comX* je za ferotipsko specifičnost odgovoren tudi N-terminalni konec gena *comP*, saj se vsak polimorfen protein ComP poveže s specifičnim feromonom, razen v redkih primerih, ko lahko interagira z omejenim nizom feromonov drugih sevov (Ansaldi in sod., 2002). Posamezni pari proteinov ComX in ComP enega ferotipa izražajo navzkrižno aktivacijo. Navzkrižna komunikacija znotraj ferotipa je vedno močnejša od navzkrižne komunikacije med ferotipi (Ansaldi in sod., 2002; Mandič in sod., 2003; Štefanič in Mandič-Mulec, 2009). Verjetnost genetske izmenjave med sevi iste vrste pa se ob pomanjkanju navzkrižne komunikacije lahko zniža (Tortosa in Dubnau, 1999).

Povezovanje v skupine na podlagi genov QS ni v skladu s filogenijo na podlagi gospodinjjskih genov *gyrA* in *rpoB* (Ansaldi in sod., 2002; Tortosa in sod., 2001) in tudi ni povsem skladno s povezovanjem v ekotipske skupine (Štefanič in sod., 2012), kar nakazuje na to, da sta imela lokus *comQXP'* in preostali genom drugačno evolucijsko pot. Zanimivo pa je, da kljub vsemu znotraj enega ekotipa prevladuje en ferotip in so ostali ferotipi v manjšini (Štefanič in sod., 2012).

2.5.2 Kooperacija med sevi *B. subtilis*

Med mikroorganizmi obstajajo različne oblike socialnega vedenja, mednje sodijo (za to diplomsko delo pomembni) kompleksni sistemi kooperacije, sinhronizacije in komunikacije med sorodnimi mikroorganizmi (West in sod., 2006).

V splošnem velja, da se sistem za medcelično komunikacijo QS uporablja za koordinacijo kooperativnega vedenja bakterij v okviru populacije (Henke in Bassler, 2004). Vendar pa evolucijska teorija predvideva, da so posamezniki, ki med seboj sodelujejo, lahko tarče goljufov in zato je eno ključnih vprašanj socialne evolucije vezano na to, kako se kljub goljufovom kooperacija ohranja. Slednje je mogoče razložiti s teorijo sorodstvene selekcije (Diggle in sod., 2007; Hamilton, 1964). Gre za teorijo, ki razloži altruistično sodelovanje med sorodniki. Posamezen sev lahko, kljub temu da bližnjemu sorodniku nesebično pomaga pri njegovem razmnoževanju, svoje gene posredno prenaša v naslednjo generacijo in s tem indirektno vzdržuje/povečuje svoj fitness. Takšna selekcija lahko poteka preko dveh mehanizmov: a) sorodstvena diskriminacija - posameznik lahko razlikuje sorodne od nesorodnih sevov, zato je sodelovanje prednostno usmerjeno proti sorodnim sevom ter b) omejena disperzija (razpršenost) - posameznik ohranja sorodnike v prostorski bližini, kar omogoča, da je sodelovanje usmerjeno nediskriminatorno, proti vsem sosedom (ti so navadno sorodniki). Na podlagi te teorije velja, da bodo bolj sorodni sevi lažje sobivali kot manj sorodni sevi, pri katerih se lahko pojavi izključevanje. (Hamilton, 1964).

Poleg kooperacije med sorodnimi sevi so znane tudi antagonistične interakcije, kjer v odnosu med dvema organizmoma eden inhibira normalno rast in aktivnost drugega. Občasno lahko mikroorganizmi v okolje izločajo kemične snovi, ki so toksične ali inhibitorne za njihove tekmece v okolju. Te snovi ustvarjajo antagonistične interakcije med producenti in tistimi, ki teh snovi ne proizvajajo, kar povzroči izumrtje dovzetnih mikroorganizmov v tekočem mediju in sobivanje v trdnem mediju (Greig in Travisano, 2008). Med te snovi uvrščamo tudi bakteriocine, toksine z bakteriostatičnim ali bakteriocidnim delovanjem na druge bakterije (Leisner in Haaber, 2012). Raziskave so pokazale, da lahko tudi surfaktin negativno vpliva na mutante *comQ* (Oslizlo in sod., 2014).

2.5.3 Operon *surfA*

Operon *surfA* nosi zapis za encime, ki katalizirajo sintezo surfaktina (Nakano, 1991). Surfaktin je ciklični bakterijski lipopeptid, ki se širi kot vidna cona pred roječimi bakterijami in je pomemben predvsem zaradi svojih surfaktantskih lastnosti. Surfaktin zmanjšuje tudi površinsko napetost in viskoznost (Mor, 2000; Peypoux in sod., 1999). Je antibiotik, ki ga proizvaja bakterija *B. subtilis*. V okviru različnih študij njegovih lastnosti je bilo ugotovljeno, da ima surfaktin antibakterijske, antiviralne, antimikotične in hemolitične lastnosti. Struktura surfaktina je sestavljena iz peptidne zanke s sedmimi aminokislinami in verige hidrofobnih maščobnih kislin (Arima in sod., 1968).

Izražanje operona *surfA* uravnava sistem za zaznavanje celične gostote, ComQXPA (Hahn in Dubnau, 1991). Surfaktinu pripisujejo funkcijo ekstracelularne signalne molekule, ki je potrebna pri razvoju kompetence in posredno tudi sporulacije (Nakano, 1991).

V tvorbo biofilma bakterije *B. subtilis* sta vpleteni dve centralni signalni molekuli ComX in surfaktin. ComX sproži produkcijo surfaktina, ta pa vpliva na subpopulacijo celic, ki začno proizvajati ekstracelularni matriks. Celice, ki sintetizirajo surfaktin, se same nanj niso sposobne odzvati. Prav tako se celice, ki so se odzvale na surfaktin s proizvodnjo matriksa, niso več sposobne odzvati na ComX in ne morejo postati proizvajalke surfaktina. Gre za parakrino signaliziranje v bakterijski populaciji, kjer ena subpopulacija proizvaja signal, druga subpopulacija pa se nanj odzove (Lopez in sod., 2009b).

Celično rast in sintezo surfaktina lahko povečamo z izbiro primerne gojišča. Ugotovitve kažejo, da je za povečanje produkcije surfaktina pomembna izbira optimalnega vira ogljika, ki naj bi bila melasa (Abdel-Mawgoud in sod., 2008). Melasa je stranski produkt proizvodnje sladkorja in velja za enega najcenejših virov ogljikovih hidratov. Je energetsko bogat medij, ki poleg visoke koncentracije sladkorja (približno 50 %), vsebuje še dušikove spojine (do 1,5 %), vitamine kot je tiamin, riboflavin, piridoksin, folno kislino, biotin, pantotensko kislino in elemente v sledovih (CaO 0,1–1,1 %; MgO 0,03–0,1 %; K₂O 2,6–5 %). Melasa vsebuje tudi veliko rastnih faktorjev in kovinskih ionov (Crueger W. in Crueger A., 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Za pripravo rekombinantnih sevov smo uporabili naravne izolate bakterij *B. subtilis*. Izolati so bili pridobljeni iz dveh vzorcev peščenih tal z nabrežja reke Save v velikosti 1 cm³ (Tacen, Slovenija) (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Naravni izolati bakterije *B. subtilis*, ki pripadajo različnim ekotipom (PE10, PE32 in PE22) in različnim ferotipom (RO-H-1/RO-B-2 in 168).

Oznaka seva	Genotip	Ferotip	Ekotip	Vir
PS-210	wt <i>B. subtilis</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-216	wt <i>B. subtilis</i>	168	PE10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-31	wt <i>B. subtilis</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-14	wt <i>B. subtilis</i>	168	PE10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-237	wt <i>B. subtilis</i>	168	PE10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-52	wt <i>B. subtilis</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-209	wt <i>B. subtilis</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE22	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009

Pripravili smo rekombinantne seve naravnih izolatov bakterije *B. subtilis*, ki smo jih v tem delu uporabili za analizo njihovega sobivanja in izražanja surfaktinskega operona (Preglednica 2).

Preglednica 2: Rekombinantni sevi naravnih izolatov bakterije *B. subtilis*, ki pripadajo različnim ekotipom (PE10, PE32 in PE22) in različnim ferotipom (RO-H-1/RO-B-2 in 168).

Oznaka seva	Genotip	Ferotip	Ekotip	Vir
PS-210 YFP	<i>srfa-YFP (Sp)</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE10	to delo
PS-31 CFP	<i>srfa-CFP (Cm)</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE10	to delo
PS-14 CFP	<i>srfa-CFP (Cm)</i>	168	PE10	to delo
PS-237 CFP	<i>srfa-CFP (Cm)</i>	168	PE10	to delo
PS-52 CFP	<i>srfa-CFP (Cm)</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE32	to delo
PS-209 YFP	<i>srfa-YFP (Sp)</i>	RO-H-1/RO-B-2	PE22	to delo
PS-216 CFP	<i>srfa-CFP (Cm)</i>	168	PE10	to delo
PS-216 YFP	<i>srfa-YFP (Sp)</i>	168	PE10	to delo

Za pripravo rekombinantnih sevov *B. subtilis* smo uporabili kromosomsko ali plazmidno DNA sevov, katerih genotip je naveden v preglednici (Preglednica 3).

Preglednica 3: Sevi, katerih DNA smo uporabili pri transformaciji naravnih izolatov. Vsi sevi bakterije *B. subtilis* so nastali iz seva IS75 (enak ekotip in enak ferotip).

Oznaka	Genotip	Vir
PS-1001	<i>his met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (ery) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-yfp (spec)</i>	Štefanič, 2009
PS-1009	<i>his met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (ery) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-cfp (cat)</i>	Štefanič, 2009
PS-1011	<i>his met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (ery) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-MCherry (Kn)</i>	Štefanič, 2009
BD2949	<i>his met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (cat) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. subtilis</i> RS-D-2)	Ansaldi in sod., 2002
ED1092 (plazmid pED1092)	<i>srfA-cfp</i>	Štefanič, 2009
ED1093 (plazmid pED1093)	<i>srfA-yfp</i>	Štefanič, 2009
ED1094 (plazmid pED1094)	<i>srfA-Mcherry</i>	Štefanič, 2009

Za analizo vpliva ferotipa na sobivanje sevov v kokulturi smo uporabili izogene seve (Preglednica 4).

Preglednica 4: Izogeni sevi, ki smo jih uporabili za analizo vpliva ferotipa na sobivanje izogenih sevov.

Oznaka	Genotip	Ferotip	Vir
PS-1000	<i>his leu met srfA-yfp (spec)</i>	168	Štefanič, 2009
PS-1011	<i>his met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (ery) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-MCherry (Kn)</i>	RO-H-1	Štefanič, 2009
PS-1004	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (cat) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. subtilis</i> RS-D-2) <i>srfA-yfp (spec)</i>	RS-D-2	Štefanič, 2009
PS-1009	<i>his met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (ery) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. mojavensis</i> RO-H-1) <i>srfA-cfp (cat)</i>	RO-H-1	Štefanič, 2009
PS-1013	<i>his leu met srfA-lacZ (tet) amyE::xylR Pxyl-comK (cat) (comQ comX comP</i> zamenjan z geni iz <i>B. subtilis</i> RS-D-2) <i>srfA-MCherry (Kn)</i>	RS-D-2	to delo

3.1.2 Antibiotiki

Antibiotike smo dodali v že pripravljena in sterilna gojišča v navedenih koncentracijah (Preglednica 5).

Preglednica 5: Antibiotiki, njihove založne koncentracije, končne koncentracije v izbranem gojišču, pogoji priprave in shranjevanja.

Antibiotik	Kratika	Koncentracija antibiotika v založni raztopini	Končna konc. antibiotika v gojišču		Topilo	Shranjevanje
			Divji tip	Izogeni sevi		
Kanamicin	Kn	10 mg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	dH ₂ O	-20 °C
Spektinomycin	Sp	100 mg/ml	100 µg/ml	5 µg/ml	dH ₂ O	-20 °C
Kloramfenikol	Cm	10 mg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	etanol	-20 °C
Tetraciklin	Tet	20 mg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	etanol	-20 °C
Ampicilin	Amp	50 mg/ml	100 µg/ml	5 µg/ml	dH ₂ O	-20 °C

3.1.3 Gojišča

Gojišče Luria-Bertani (LB)

Tripton.....	10 g
NaCl.....	10 g
Kvasni ekstrakt.....	5 g
dH ₂ O.....	do 1000 ml
(agar).....	15 g

Pripravljeno gojišče avtoklaviramo na 121 °C. Antibiotik vedno dodamo naknadno v že avtoklavirano in na 50 stopinj ohlajeno gojišče.

Gojišče za kompetenco (CM)

Glukoza (50 %)	5 ml
Kvasni ekstrakt (10 %)	5 ml
Kazeinski hidrolizat (2 %)	5 ml
Metionin (10 mg/ml)	2,5 ml
Levcin (10 mg/ml)	2,5 ml
Histidin (10 mg/ml)	2,5 ml
MgCl ₂ (1 M)	1,25 ml
1 x SS brez Mg	500 ml

Predhodno pripravimo avtoklavirano raztopino glukoze (50 %) in vse ostale sestavine. V avtoklavirano raztopino 1x SS brez Mg po receptu sterilno dodamo vse sestavine. Antibiotik vedno dodamo naknadno v že avtoklavirano gojišče.

Gojišče MELASA (10 %)

Melasa (koncentrat 100 %)	100 ml
dH ₂ O	900 ml

Pripravljeno gojišče avtoklaviramo na 110 °C. Antibiotik vedno dodamo naknadno v že avtoklavirano gojišče.

3.1.4 Raztopine

Fiziološka raztopina (FR)

NaCl..... 9 g
dH₂O.....1000 ml

Pripravljeno 0,9 % fiziološko raztopino avtoklaviramo na 121 °C.

Raztopina glukoze (50 %)

Glukoza..... 50 g
dH₂O.....50 g

Pripravljeno raztopino avtoklaviramo na 110 °C.

Raztopina 1 x SS brez Mg

KH₂PO₄..... 6 g
K₂HPO₄..... 14 g
(NH₄)₂SO₄..... 2 g
Na-citrat x 2H₂O..... 1 g
MgSO₄ x 7H₂O..... 0,2 g
dH₂O..... do 1000 ml
(Končni pH=7,0)

Pripravljeno raztopino avtoklaviramo na 121 °C.

Raztopina ksiloze (40 %)

Ksiloza..... 12 g
dH₂O.....do 30 ml

Pripravljeno raztopino avtoklaviramo na 110 °C.

SDS (10 %)

SDS..... 100 g
dH₂O.....900 ml

Raztopimo pri 68 °C in uravnamo pH na 7,2. Dopolnimo z dH₂O do 1000 ml.

Pufer 50x TAE za gelsko elektroforezo

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

(Končni pH=8,5)

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

Pufer TES

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)

1 mM EDTA

0,1 M NaCl

3.1.5 Kemikalije, reagenti in encimi

Agar	Fluka, Španija
Ampicilin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
NaCl	Riedel-de Haën, Seelze-Hannover, Danska
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
Na-citrat x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt, Nemčija
Tripton	Biolife, Milano, Italija
Kvasni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
Tris-HCl	Fluka, St. Gallen, Švica
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, Litva
Barvilo '6 x DNA loading dye'	MBI Fermentas, Litva
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Tris baza	Merck, KgaA, Darmstadt, Nemčija
Ocetna kislina	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Kazeinski hidrolizat	BD (Difco), Franklin Lakes, ZDA
Metionin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Levcin	Merck, KgaA, Darmstadt, Nemčija
Histidin	Fluka, St. Gallen, Švica
Melasa	Tovarna sladkorja Ormož, Slovenija
MgCl ₂	Promega, Madison, WI, ZDA
Ksilosa	Fluka, St. Gallen, Švica
Spektinomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Kloramfenikol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Tetraciklin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Agarosa	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Etidijev bromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Glicerol	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Fenol	Kemika, Zagreb, Hrvaška

SDS	Fluka, St. Gallen, Švica
Kloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Izoamilalkohol	Merck, KgaA, Darmstadt, Nemčija
Etanol	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Lizocim (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Ribonukleaza »Rnase A« (20 mg/ml)	MBI Fermentas, Litva
Proteinaza K (20 mg/ml)	MBI Fermentas, Litva

3.1.6 Aparature

Avtoklav	Kambič A-21
Laboratorijska tehtnica	Mettler PM4600 DeltaRange®
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH, Tehtnica
Vortex	IKA® MS3 digital
Stresalna kopel	Julabo ShakeTemp SW22
Spektrofotometer	Iskra Photometer MA9510
Elektroforezna naprava	Biorad "sub-cell® GT" in "mini-sub® cell GT"
Čitalec mikroplošč	Thermo Multiscan Spectrum in Saffire II, Tecan
Centrifuga	Sigma 3K30, rotor 12348 in rotor 12159
Fluorescentni mikroskop	Nikon 90i, objektiv TIRF Plan Neo-Fluor 100×
Nanodrop	Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA

3.1.7 Kompleti

Za izolacijo plazmidne DNA smo uporabili pripravljen komplet »Quickclean 5M Miniprep Kit« (GenScript, Piscataway, NJ, ZDA).

3.2 METODE

3.2.1 Priprava založne raztopine antibiotikov

Antibiotike smo pripravili v razmerju kot je zapisano v Preglednici 5. Vse antibiotike, razen kloramfenikola smo raztopili v dH₂O (Preglednica 5). Raztopine antibiotikov smo filtrirali skozi sterilni filter (0,22 µm) in jih nato alikvotirali v sterilne epice. Antibiotikov, ki smo jih raztopili v etanolu, nismo filtrirali. Pripravljene antibiotike smo shranili pri temperaturi, opredeljeni v Preglednici 5.

Uspešno delovanje antibiotika smo preverili z nacepljanjem pozitivne (sev, ki nosi zapis za odpornost proti antibiotiku) in negativne kontrole (sev, ki nima gena z zapisom za odpronost proti antibiotiku) na agarno gojišče LB z dodanim antibiotikom.

3.2.2 Izolacija kromosomske in plazmidne DNA

3.2.2.1 Izolacija plazmidne DNA

Sev *E. coli* z želenim plazmidom (Preglednica 3) smo nacepili v 3 ml LB gojišča, kateremu smo dodali ustrezen antibiotik (Amp) in inkubirali s stresanjem preko noči pri 37 °C. Plazmidno DNA smo izolirali z uporabo pripravljene kompleta za izolacijo plazmidne DNA »Quickclean 5M Miniprep Kit« kot je opisano v navodilih proizvajalca. Izolirano plazmidno DNA smo shranili pri -20 °C.

3.2.2.2 Izolacija kromosomske DNA

Mutante seva *B. subtilis* (Preglednica 3) smo nacepili v tekoče gojišče LB z dodanim ustreznim antibiotikom (Preglednica 5) in jih inkubirali preko noči pri 30 °C. Prekonočno kulturo smo 100x razredčili s svežim gojiščem LB, kateremu smo dodali glukozo (do končne koncentracije 1 %), ki prepreči sporulacijo bakterij in jih gojili s stresanjem pri 37 °C do pozne eksponentne faze rasti. 1,5 ml kulture smo prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 16000 x g. Supernatant smo odstranili in ponovno centrifugirali 1,5 ml kulture iz pozne eksponentne faze rasti, tako da je znašal skupni volumen, iz katerega smo izolirali DNA, 3 ml. Po zadnjem centrifugiranju (5 minut, 16000 x g) smo supernatant previdno odstranili s pipeto in celice resuspendirali v 300 µl TES pufra (1/10 volumna iz katerega izoliramo DNA). Nato smo dodali lizocim do končne koncentracije 1 mg/ml (dodali smo 6 µl lizocima koncentracije 50 mg/ml) in ribonukleazo »Rnase A« do končne koncentracije 60 µg/ml (dodali smo 1 µl ribonukleaze koncentracije 20 mg/ml) ter inkubirali 30 minut pri 37 °C. Nato smo dodali SDS do 1 % končne koncentracije (dodali smo 33 µl 10 % raztopine) in Proteinazo K do končne koncentracije 120 µl/ml (dodali smo 2 µl Proteinaze K koncentracije 20 mg/ml) in inkubirali preko noči pri 50 °C. Naslednji dan smo v digestoriju dodali 200 µl fenola, rahlo potresli suspenzijo in centrifugirali 10 minut pri 16000 x g. Nato smo zgornjo fazo, ki vsebuje TES in kromosomsko DNA z odrezanim nastavkom za pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko, ji dodali 200 µl mešanice kloroforma in izoamilnega alkohola v razmerju 24:1 in centrifugirali 10 minut pri 16000 x g. Zgornjo fazo smo znova prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 2,5 volumna hladnega 96 % etanola (-20 °C). Z obračanjem mikrocentrifugirke smo pospešili obarvanje DNA, centrifugirali nekaj sekund pri 16000 x g, odstranili supernatant in dodali 500 µl hladnega etanola ter inkubirali na ledu 15 minut. Z dvakratnim centrifugiranjem po nekaj sekund pri 16000 x g smo odstranili ves supernatant. Po sušenju ob ognju smo DNA raztopili v 100 µl destilirane vode in jo shranili pri 4 °C.

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza izolirane DNA

Vzorci izolirane DNA smo pripravili na parafilmu, kjer smo s pomočjo pipete vzorcu primešali nanašalni pufer 'DNA loading dye' v razmerju vzorec: nanašalni pufer 5:11 μ l. Za pripravo gela smo uporabili 0,8 % agarozo v pufru 1 x TAE, ki je bil tudi elektroadni pufer. Pripravljeno raztopino agaroze smo ohladili v modelčku za gelsko elektroforezo z glavničkom. V luknjice agaroznega gela smo s pipeto nanesti pripravljene vzorce izolirane DNA in lestvico (GeneRuler™). DNA smo ločili z elektroforezo v agaroznem gelu pri električnem toku 0,80 V, 45 minut. Gel smo po končani elektroforezi barvali v raztopini etidijevega bromida koncentracije 0,5 μ g/ml 10 minut in ga nato spirali v destilirani vodi še 10 minut. Koncentracijo kromosomske in plazmidne DNA smo izmerili s pomočjo aparature Nanodrop.

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

Seve *B. subtilis* smo transformirali z 10 μ l kromosomske ali 25 μ l plazmidne DNA izbranih sevov *B. subtilis* (Preglednica 3) in kot selekcijski označevalec uporabili ustrezen antibiotik. Kot referenco za uspešnost transformacije smo uporabili referenčni laboratorijski sev IS75.

Seve *B. subtilis* smo prekončno gojili v 3 ml kompetenčnega gojišča CM pri 200 vrt./min in 37 °C. 50 μ l prekončne kulture posameznih sevov smo nacepili v 8 ml svežega gojišča za kompetenco CM in jih inkubirali v erlenmajericah s stranskim vratom v vodni kopeli s stresanjem 200 vrt./min pri 37 °C. Za sprožitev kompetence pri izogenih sevih *B. subtilis* smo v erlenmajerice dodali še 535 μ l 40 % ksiloze (končna koncentracija v gojišču 2 %).

Rast bakterij smo spremljali z merjenjem optične gostote pri 650 nm (OD_{650}) na vsakih 30 minut. V času T2, ko naj bi bila stopnja transformacije najvišja, smo v sterilne epruvete prenesli 0,5 ml kulture, ji dodali 10 μ l kromosomske ali 25 μ l plazmidne DNA in inkubirali s stresanjem pri temperaturi 37 °C 30 minut. Po 30 minutah smo dodali 0,5 ml svežega segretega gojišča LB in dodatno inkubirali s stresanjem 60 minut. Transformacijsko in kontrolno mešanico (kultura brez dodane DNA) smo razmazali na agarno gojišče LB z dodanim ustreznim antibiotikom ter inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C. Na agarno gojišče LB z dodanim antibiotikom smo nanesti po 10 in 100 μ l transformacijske mešanice, 780 μ l mešanice smo centrifugirali na 5000 x g 2 minuti, odlili supernatant, resuspendirali in nanesti na agarno gojišče LB z antibiotikom. 100 μ l negativne kontrole smo nanesti na agarno gojišče z dodanim antibiotikom.

3.2.5 Spremljanje aktivacije operona *srfA* v rekombinantnih sevih in v kokulturah sevov *B. subtilis*

Rekombinantne seve smo opazovali tudi s fluorescenčno mikroskopijo (detekcija izražanja surfaktinskega operona) in tako preverili ali je bila homologna rekombinacija gena za fluorescenčni protein v lokus *srfA* uspešna.

3.2.5.1 Priprava mikroskopskih preparatov za vrednotenje izražanja operona *srfA* v rekombinantnih sevih in vseh sevih v kokulturah

Izbrane rekombinantne seve iz agarških plošč LB z dodanim antibiotikom ali seve iz kokultur v izbranem tekočem gojišču (CM – za izogene seve ali MELASA – za rekombinantne seve) smo nacepili v epruvete s 3,5 ml tekočega gojišča ali v mikrotitersko ploščo s 150 µl tekočega gojišča, ki smo mu dodali steklene kroglice, in inkubirali s stresanjem 200 vrt./min pri 37 °C 16 ur. Nato smo iz inkubiranih sevov pripravili preparat za mikroskopijo.

Na objektno stekelce s teflonom smo s pipeto nanegli 25 µl 10 % Poly L-lizina. Po 20 minutah smo s sesalko odstranili Poly L-lizin, nato pa na stekelce odpipetirali 20 µl destilirane vode in jo s sesalko odstranili. Po dveh minutah sušenja smo na objektno stekelce odpipetirali 15 µl kulture in pustili stati 10 minut. Nato smo s sesalko odstranili kulturo, na stekelce pa odpipetirali 20 µl destilirane vode in jo s sesalko odstranili (z vodo smo preparat spirali 2x). Nato smo na stekelce odpipetirali sredstvo proti bledenju, pripravljen preparat pokrili s krovnikom in ga pogledali pod fluorescenčnim mikroskopom.

3.2.5.2 Fluorescenčna mikroskopija

S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo pri povečavi 1000x šteli celice, ki so izražale *srfA* združen s fluorescenčnim repotejem (CFP/YFP/MCherry) v populaciji posameznega rekombinantnega seva. Za vsak sev smo pripravili preparat v dveh paralelkah, v katerih smo v vsaki prešteli celice na 10 različnih mestih v preparatu. Delež celic, ki svetijo, smo izračunali po enačbi 1.

delež celic, ki svetijo = (št. celic, ki svetijo / št. vseh celic)

povprečni delež c., ki svetijo [%] = ((delež c., ki svetijo 1 + delež c., ki svetijo 2 + ...) / št. vseh deležev) x 100... (1)

S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo spremljali izražanje *srfA* tudi v kokulturah dveh sevov, vendar rezultatov nismo kvantificirali.

3.2.6 Shranjevanje rekombinantnih sevov

Rekombinantne seve smo nacepili v tekoče gojišče LB z antibiotikom in jih inkubirali s stresanjem 200 vrt./min pri 37 °C preko noči. Naslednji dan smo v posebne epice z 200 µl 100 % glicerola dodali 1500 µl prekonočne kulture rekombinantnih sevov v dveh paralelkah in jih shranili pri -80 °C.

3.2.7 Analiza sobivanja sevov *B. subtilis* v kokulturah

3.2.7.1 Primerjava rasti krivulj in števila CFU sevov

Izogene seve smo pripravili v tekočem gojišču CM, rekombinantne seve pa v tekočem gojišču MELASA. Po 80 µl prekonočnih kultur izbranih sevov, ki smo jih pripravili v 3 ml

izbranega tekočega gojišča z dodanim ustreznim antibiotikom, smo nacepili v treh ponovitvah v erlenmajerice s stranskim vratom z 8 ml izbranega tekočega gojišča (vsak sev v svojo erlenmajerico). Pripravljene kulture smo inkubirali s stresanjem 200 vrt./min pri 37 °C. V 30-minutnih časovnih intervalih smo spremljali rast kultur s pomočjo merjenja absorbance v spektrofotometru pri 650 nm (OD_{650}), do 6h po vstopu seva v stacionarno fazo rasti (približno 10 ur). Absorbance stresane kulture smo določili še po 24 in 48 urah inkubacije. Ker je bilo gojišče MELASA pretemno za ničlitev, smo ničlili z destilirano vodo (kot pri gojišču CM) in nato od absorbance vzorcev odšteli absorbance kontrole, ki je bilo gojišče MELASA brez kulture.

Sočasno z merjenjem absorbance smo v časovnih intervalih (ob času inokulacije, po 24 urah, po 48 urah) spremljali tudi rast kultur in število spor s pomočjo metode določanja števila CFU. Vzeli smo 30 μ l kulture in jo razredčili v 270 μ l fiziološke raztopine ter ponovno 30 μ l te redčitve v 270 μ l fiziološke raztopine, redčitev 10^{-4} . Nato smo 100 μ l prenesli v epice z 900 μ l fiziološke raztopine in dokončali redčitveno vrsto do 10^{-7} . Redčitve smo izvajali v mikrotitrskih ploščah. Po 100 μ l ustrezne redčitve (10^{-5} do 10^{-7}) smo nato nacepili na agarška gojišča LB z antibiotikom in zrasle kolonije smo ovrednotili kot število celic na 1 ml izhodne kulture. Preostanek redčitev smo kuhali 20 minut in ovrednotili stopnjo sporulacije (glej 3.2.5.2). Nacepljene plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli zrasle kolonije na agarških ploščah (CFU) vseh celic.

3.2.7.2 Določanje števila spor posameznih sevov

Po protokolu 3.2.5.1 smo preostanek redčitev kuhali 20 minut pri 80 °C. Iz vsake kuhane redčitve smo nacepili 100 μ l kulture na agarške plošče LB z antibiotikom. Nacepljene plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli zrasle kolonije na agarških ploščah (CFU) spor (redčitvene plošče s kuhanim vzorcem). Iz dobljenih podatkov smo lahko določili število spor na 1 ml izhodne kulture posameznih sevov gojenih v tekočem gojišču CM ali MELASA.

3.2.7.3 Analiza sobivanja sevov v kokulturah v izbranem tekočem gojišču

V tekoče gojišče CM (za izogene seve) ali MELASA (za rekombinantne seve) smo nacepili kombinacije dveh različnih sevov *B. subtilis* glede na pripadnost ekotipu in ferotipu.

V široke epruvete s 3 ml izbranega gojišča z antibiotiki smo iz zamrznjenih kultur pri -80 °C nacepili izbrane seve v treh ponovitvah in jih stresali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo v 10 ml izbranega tekočega gojišča v erlenmajerici nacepili 100 μ l prekonočnih kultur in stresali približno 2 uri pri 37 °C, dokler OD_{650} ni dosegla vrednosti približno 0,4. Po potrebi smo kulture v eksponentni fazi rasti redčili do OD_{650} vrednosti 0,4. Tako pripravljene kulture smo v mikrocentrifugirki zmešali v razmerju sevov 1:1 in sicer 500 μ l enega in 500 μ l drugega seva. Iz mikrocentrifugirke smo prenesli po 200 μ l tako

pripravljenega inokuluma v 3 široke epruvete s 5 ml izbranega tekočega gojišča. Kokulture smo inkubirali s stresanjem pri 37 °C. V okviru enega eksperimenta smo simultano preverjali sobivanje 4 kombinacij sevov. Kokulture smo precepljali vsakih 48 ur. Cikle smo izvedli vsaj 5 krat. Ob precepljanju smo 50 µl kokulture precepili v 5 ml svežega izbranega gojišča. Frekvenci posameznega seva znotraj kokulture smo sledili z določanjem števila CFU na selekcijskih gojiščih, saj je vsak sev nosil zapis za različen selekcijski marker (gen za antibiotično odpornost). Pri kokulturah rekombinantnih sevov smo na trdnem gojišču LB določili tudi celokupni CFU, tj. število vseh celic v kokulturi na ml.

Sočasno s sledenjem frekvence prisotnosti posameznega seva v kokulturi, smo s fluorescenčno mikroskopijo opazovali tudi izražanje surfaktinskega operona sevov v kokulturi.

3.2.7.4 Statistična obdelava podatkov

Vsi prikazani rezultati so povprečne vrednosti najmanj treh neodvisnih preizkusov (n=3) z izračunanimi standardnimi odkloni.

Za ugotavljanje ali je med biološkimi ponovitvami signifikantna razlika smo za medsebojno primerjavo rezultatov uporabili dvostransko porazdelitev, (dva neodvisna vzorca z enako varianco) Studentov t-test (angl. Student t-test), ki smo ga izvedli s programom Microsoft Office Excel 2007. Meritve so bile statistično različne, če je bila p-vrednost manjša od 0,01 ($p < 0,01$). Primerjavo smo naredili pri analizi sobivanja sevov v kokulturah.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA REKOMBINANTNIH SEVOV *B. subtilis* IN ANALIZA IZRAŽANJA SURFAKTINSKEGA OPERONA

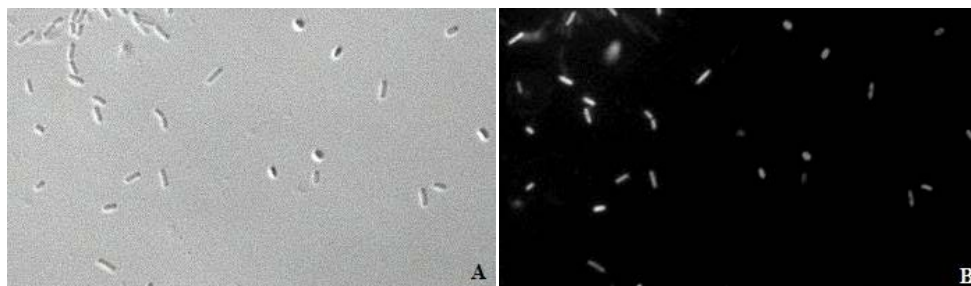
Iz nabora naravnih izolatov *B. subtilis*, ki so bili izolirani iz 1 cm³ tal in se razlikujejo v ekotipu in/ali v ferotipu (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009; Štefanič in sod., 2012), smo pripravili nabor rekombinantnih sevov *B. subtilis*. Lastnosti le teh so podane v Preglednici 6. Genotipi vseh uspešno transformiranih sevov so podani v razdelku materialu (Preglednica 2). Sevi nosijo zapis za odpornost proti antibiotiku (spektomicin ali kloramfenikol) ter imajo v operonu *srfA* za promotor vstavljen tudi zapis za modri ali rumeni fluorescenčni protein (CFP ali YFP). Ti sevi, ki smo jih pripravili v okviru tega diplomskega dela, so nova orodja, ki nam bodo omogočila preverjanje sobivanja s širšim razponom kvantifikacije posameznega seva v kokulturi. Hkrati bomo s pomočjo fluorescenčne mikroskopije preko sledenja izražanja poročevalskega gena, posledično sinteze fluorescenčnega proteina YFP ali CFP, kvantificirali aktivnosti promotorja za prepis genov operona *srfA*, kar bo nakazalo na nivo prepisa genov tega operona. Tako v nadaljevanju aktivnost promotorja operona *srfA* predstavljamo tudi kot nivo izražanja operona *srfA*.

Preglednica 6: Pregled rezultatov priprave rekombinantnih sevov *B. subtilis*, ki pripadajo različnim ekotipom (PE10, PE32 in PE22) in ferotipom (168 in RO-H-1) ter nosijo zapis za fluorescenčni protein v operonu *srfA*. V zadnjih dveh kolonah je kvalitativno podano izražanje operona *srfA* v rekombinantnih sevih s fluorescenčno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji v izbranem tekočem gojišču pri 37 °C. (+) se izraža; (-) se ne izraža. Z odebelenim tiskom so označeni sevi, ki smo jih uporabili za analizo sobivanja.

			Rekombinantni sevi		Izražanje operona <i>srfA</i> v rekombinantnih sevih	
Ekotip	Ferotip	Naravni izolati <i>B. subtilis</i>	Donor DNA: sev PS-1001 (<i>srfA</i> -YFP; Sp ^R)	Donor DNA: sev PS-1009 (<i>srfA</i> -CFP; Cm ^R)	Gojišče CM	Gojišče MELASA
PE10	RO-H-1	PS-210	PS-210 YFP		-	+
		PS-31		PS-31 CFP	+	+
	168	PS-216	PS-216 YFP	PS-216 CFP	oba +	oba +
		PS-14		PS-14 CFP	+	+
		PS-237		PS-237 CFP	+	+
PE32	RO-H-1	PS-52		PS-52 CFP	+	+
PE22	RO-H-1	PS-209	PS-209 YFP		-	+

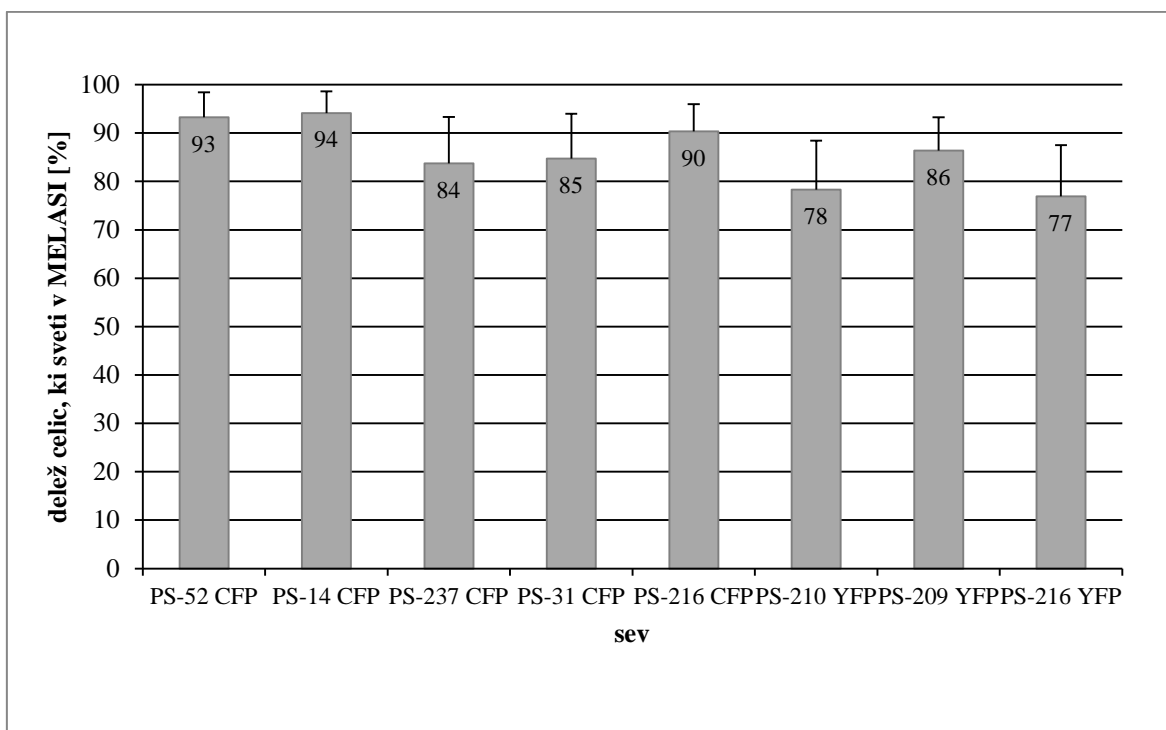
Vsi sevi so v tekočem gojišču MELASA po 16 urah inkubacije pri 37 °C izražali *srfA*-fluorescenčni protein (CFP ali YFP). V tekočem gojišču CM pa dva seva, PS-210 YFP in PS-209 YFP, nista fluorescirala (Preglednica 6).

Določili smo tudi delež celic, ki so v gojišču MELASA aktivirale promotor operona *srfA*. Rezultati kažejo, da je izražanje operona *srfA* bimodalno, kar nakazuje na to, da gene tega operona izraža le del populacije (Slika 3).



Slika 3: Izražanje operona *srfA* v rekombinantnem sevu *B. subtilis* PS-216 YFP s fluorescenčno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji seva v tekočem gojišču MELASA pri 37 °C. Celice z aktivnim promotorjem operona *srfA* fluorescirajo. 1000x povečava. (A) Bakterijska kultura opazovana s svetlobnim mikroskopom. (B) Bakterijska kultura pod fluorescenčnim mikroskopom.

Zanimivo je, da so po 16 urni inkubaciji v tekočem gojišču MELASA pri 37 °C vsi sevi kazali relativno visok delež celic, ki so izražale *srfA*. Nekoliko nižji delež celic, ki so fluorescirale sta kazala sev PS-210 YFP (78 %) in sev PS-216 YFP (77 %) (Slika 4). V gojišču CM je izražanje *srfA* pri sevu PS-216-YFP nižje in ne presega 30 % celic (Oslizlo in sod., 2014).



Slika 4: Izračun deleža celic posameznih rekombinantnih sevov *B. subtilis* gojenih 16 ur v tekočem gojišču MELASA, ki fluorescirajo pod mikroskopom. Prikazan je delež celic rekombinantnih sevov *B. subtilis*, v katerih se izraža operon *srfA*. Podane so tudi zaokrožene vrednosti deleža celic posameznih sevov, ki svetijo in standardni odkloni.

Za analizo sobivanja rekombinantnih sevov smo izbrali kombinacijo sevov, s katerimi bi lahko opazovali sobivanje dveh sevov znotraj ekotipa (enak ali različen ferotip) in med ekotipi (enak ali različen ferotip), ki so v preglednici označeni z odebeljenim tiskom (Preglednica 6).

4.2 ANALIZA SOBIVANJA REKOMBINANTNIH SEVOV *B. subtilis*

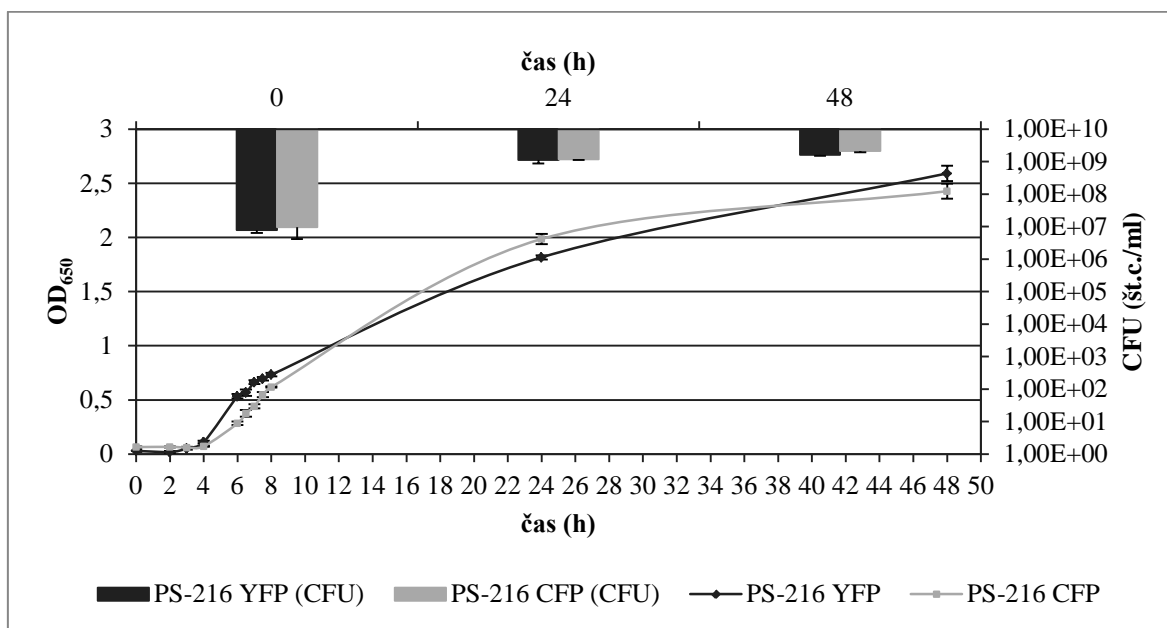
Vse več raziskav kaže na visoko stopnjo raznolikosti znotraj bakterijskih vrst, vendar ekološka vloga te raznolikosti še ni dobro pojasnjena (Kordero in Polz, 2014). Sobivanje bakterijskih sevov izoliranih iz okolja in gojenih v stabilnih laboratorijskih pogojih ter v homogenem okolju (stresanih kokulturah) je slabo preučeno. V okviru diplomske naloge smo preverjali sobivanje naravnih izolatov *B. subtilis*, ki smo jih primerno označili z geni za odpornost proti antibiotikom. Seve smo inokulirali v razmerju 1:1 in gojili v tekočem gojišču MELASA s stresanjem pri temperaturi 37 °C. Kokulturo smo precepili v sveže gojišče na vsakih 48 ur (tj. en cikel je trajal 48 ur). V gojišču MELASA se operon *srfA* izraža, saj vsi obravnavani rekombinantni sevi fluorescirajo (Slika 4). Pred temi preizkusi pa smo vsak sev gojili tudi kot monokulturo, da smo preverili ali je rast rekombinantnih sevov primerljiva.

4.2.1 Vrednotenje rasti in sporulacije rekombinantnih sevov v monokulturi

Rast stresane monokulture smo sledili z merjenjem absorbance (OD_{650}) in metodo določitve števila CFU ter sočasno merili frekvenco sporulacije teh sevov v gojišču MELASA.

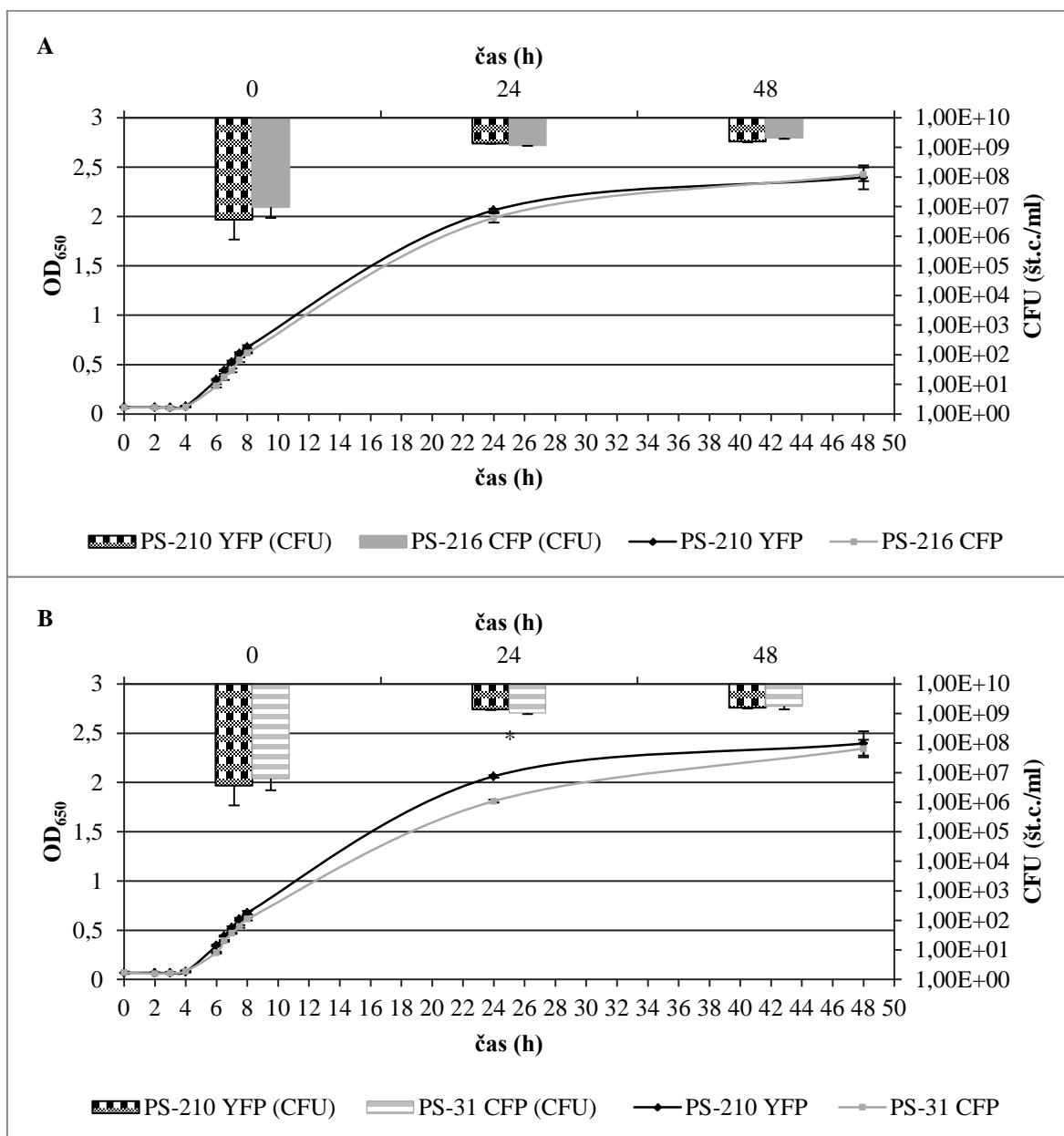
4.2.1.1 Vrednotenje rasti rekombinantnih sevov v monokulturah

Slika 5 prikazuje rast dveh izogenih sevov PS-216, ki sta označena z različnima genoma za fluorescenčna proteina (YFP in CFP) in determinantama za odpornost proti dvema antibiotikoma. Seve lahko selekcioniramo na agariziranem gojišču z antibiotikom in določimo število CFU. Tako rastna krivulja kot število CFU (stolpci – slika 5) kažejo, da izogena seva rasteta zelo podobno in dosežeta primeljivo gostoto celic po 48 urah inkubacije (Slika 5).



Slika 5: Rast monokultur dveh rekombinantnih izogenih sevov PS-216 CFP in PS-216 YFP (PE10, ferotip 168) v tekočem gojišču MELASA. Vrednosti CFU so prikazane s stolpci; absorbanca pri OD₆₅₀ je prikazana s črto, za vse vrednosti so podani standardni odkloni. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote 1,00E+01, ki predstavlja 1×10^1 .

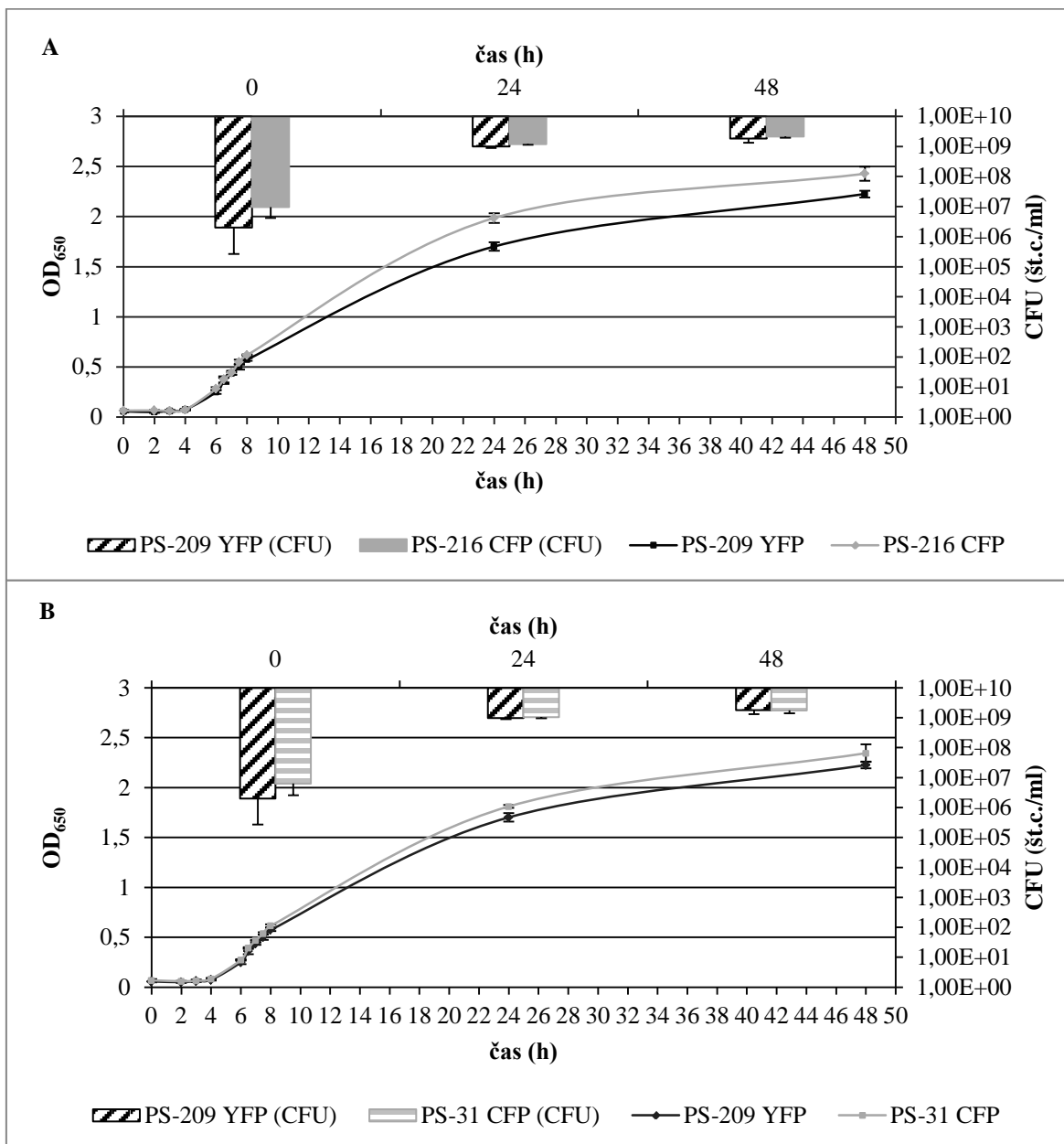
Tudi seva PS-210 YFP in PS-216 CFP imata podobno dinamiko rasti (Slika 6A). Začetek stacionarne faze oba seva dosežeta istočasno. Vrednosti CFU se ujemajo z vrednostmi OD₆₅₀. Rast sevov PS-31 CFP in PS-210 je primerljiva. Statistično različni sta bili le vrednosti CFU po 24 urni inkubaciji. Vrednosti OD₆₅₀ in vrednosti CFU se po 48 urah inkubacije ujemajo (Slika 6B).



Slika 6: Rast monokultur rekombinantnih sevov PS-210 YFP in PS-216 CFP ter PS-210 YFP in PS-31 CFP v tekočem gojišču MELASA. Vrednosti CFU so prikazane s stolpci; absorbanca pri OD₆₅₀ je prikazana s črto, za vse vrednosti so podani standardni odkloni. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote 1,00E+01, ki predstavlja 1x10¹. Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov (n=3, p<0,01). (A) PS-210 YFP (PE10, ferotip RO-H-1) in PS-216 CFP (PE10 in ferotip 168). (B) PS-210 YFP (PE10, ferotip RO-H-1) in PS-31 CFP (PE10, ferotip RO-H-1).

Dinamika rasti med sevom PS-209 YFP in PS-216 CFP je bila med preverjanimi kombinacijami najbolj različna in sev PS-209 je po 48 urah dosegel nižjo celično gostoto kot sev PS-216 (Slika 7A). Tudi v primerjavi s sevom PS-31 CFP ima sev PS-209 rate slabše, čeprav glede na čas inokulacije, začetek stacionarne faze rasti dosežeta oba seva istočasno. Vrednosti CFU se dobro ujemajo z vrednostmi OD₆₅₀ in razen ob inokulaciji v

nobeni fazi rasti vrednosti CFU ne kažejo večjih razlik med primerjanima sevoma (Slika 7B).



Slika 7: Rast monokultur rekombinantnih sevov PS-209 YFP in PS-216 CFP ter PS-209 YFP in PS-31 CFP v tekočem gojišču MELASA. Vrednosti CFU so prikazane s stolpci; absorbanca pri OD₆₅₀ je prikazana s črto, za vse vrednosti so podani standardni odkloni. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote 1,00E+01, ki predstavlja 1x10¹. (A) PS-209 YFP (PE22; ferotip ROH-1) in PS-216 CFP (PE10; ferotip 168). (B) PS-209 YFP (PE22, ferotip ROH-1) in PS-31 CFP (PE10; ferotip RO-H-1).

Zaključimo lahko, da so vsi pari sevov razen sevov PS-209 YFP in PS-216 CFP imeli podobno rast v prvih 8 urah (eksponentna rast), nato je prišlo do manjših odstopanj v

OD₆₅₀, medtem ko so bile vrednosti CFU bolj primerljive. Statistično različni sta bili le vrednosti CFU sevov PS-210 YFP in PS-31 CFP po 24 urni inkubaciji (Slika 6B).

S Student t-testom smo preverili statistično signifikantne razlike in podatke opredelili kot različne, če je bila vrednost $p < 0,01$.

4.2.1.2 Ugotavljanje deleža spor v monokulturi rekombinantnih sevov

Število spor na 1 ml izhodne kulture smo določili v tekočem gojišču MELASA pri 37 °C. Sevi prično sporulirati v stacionarni fazi rasti. Deleži sporulacije rekombinantnih sevov v tekočem gojišču MELASA (reprezentativen podatek enega eksperimenta) so podani v Preglednici 7.

Preglednica 7: Deleži spor na 1 ml izhodne kulture posameznih rekombinantnih sevov v tekočem gojišču MELASA inkubiranem pri 37 °C s stresanjem. Podan je reprezentativen podatek enega eksperimenta od treh primerljivih ponovitev.

Sev	PS-210 YFP	PS-216 CFP	PS-209 YFP	PS-31 CFP	PS-216 YFP
Delež spor / ml ob inokulaciji (%)	0	0	0	0	0
Delež spor / ml ob vstopu v stac. fazo rasti (%)	23,1	10,3	30,6	10,1	11,3
Delež spor / ml po 24 h inkub. (%)	74,3	81,9	67,9	75,4	73,5
Delež spor / ml po 48 h inkub. (%)	80,1	90,3	82,3	86,7	84,5

4.2.2 Analiza sobivanja rekombinantnih sevov v kokulturah v tekočem gojišču MELASA

Seve smo inokulirali v razmerju bakterij 1:1 v tekočem gojišču MELASA s stresanjem pri temperaturi 37 °C in precepljanjem kulture v sveže gojišče vsakih 48 ur (tj. en cikel). V kokulturi smo tako gojili seve 12 dni in z metodo štetja CFU vsakih 48 ur spremljali rast posameznega seva v kokulturi. Seve smo na selekcijskem trdnem gojišču LB z antibiotikom ločili na osnovi odpornosti proti antibiotiku. Za analizo smo izbrali sledeče kombinacije sevov: PS-210 YFP in PS-31 CFP ; PS-210 YFP in PS-216 CFP, PS-209 YFP in PS-31 CFP in PS-209 YFP in PS-216 CFP, ki so nam omogočile preveriti sobivanje med enakimi/različnimi ekotipi in ferotipi (Preglednica 8).

Preglednica 8: Izbrane kombinacije sevov za analizo sobivanja glede na ekotip in ferotip.

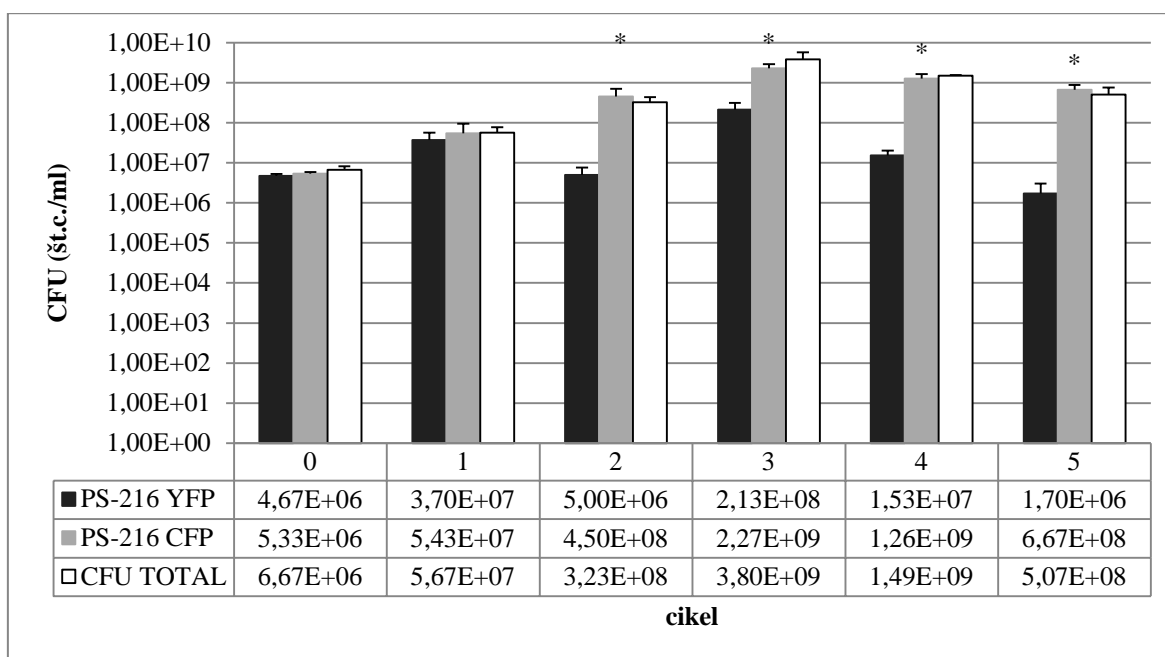
	Enak ekotip	Različen ekotip
Enak ferotip	PS-210 YFP in PS-31 CFP	PS-209 YFP in PS-31 CFP
Različen ferotip	PS-210 YFP in PS-216 CFP	PS-209 YFP in PS-216 CFP

Kot kontrolo vpliva prisotnosti genske fuzije in zapisa za odpornost proti antibiotiku v genomu rekombinante smo uporabili izogena seva PS-216 CFP in PS-216 YFP, ki sta bila na vseh genskih lokusih razen v območju vnosa rekombinatne DNA (npr. *srfa*-YFP, *Cm^R*) identična.

Ugotovili smo, da v kokulturi dveh sevov, enakega ekotipa in enakega ali različnega ferotipa, seva sobivata. V kokulturi dveh sevov različnega ekotipa in enakega ali različnega ferotipa pa četrti dan en sev preraste drugega. Podrobnejši opis dinamike sobivanja je podan spodaj. Eksperimenti so bili izvedeni v treh ponovitvah. S Student t-testom smo preverili statistično signifikantne razlike in podatke opredelili kot različne, če je bila vrednost $p < 0,01$.

4.2.2.1 Sobivanje dveh rekombinantnih izogenih sevov

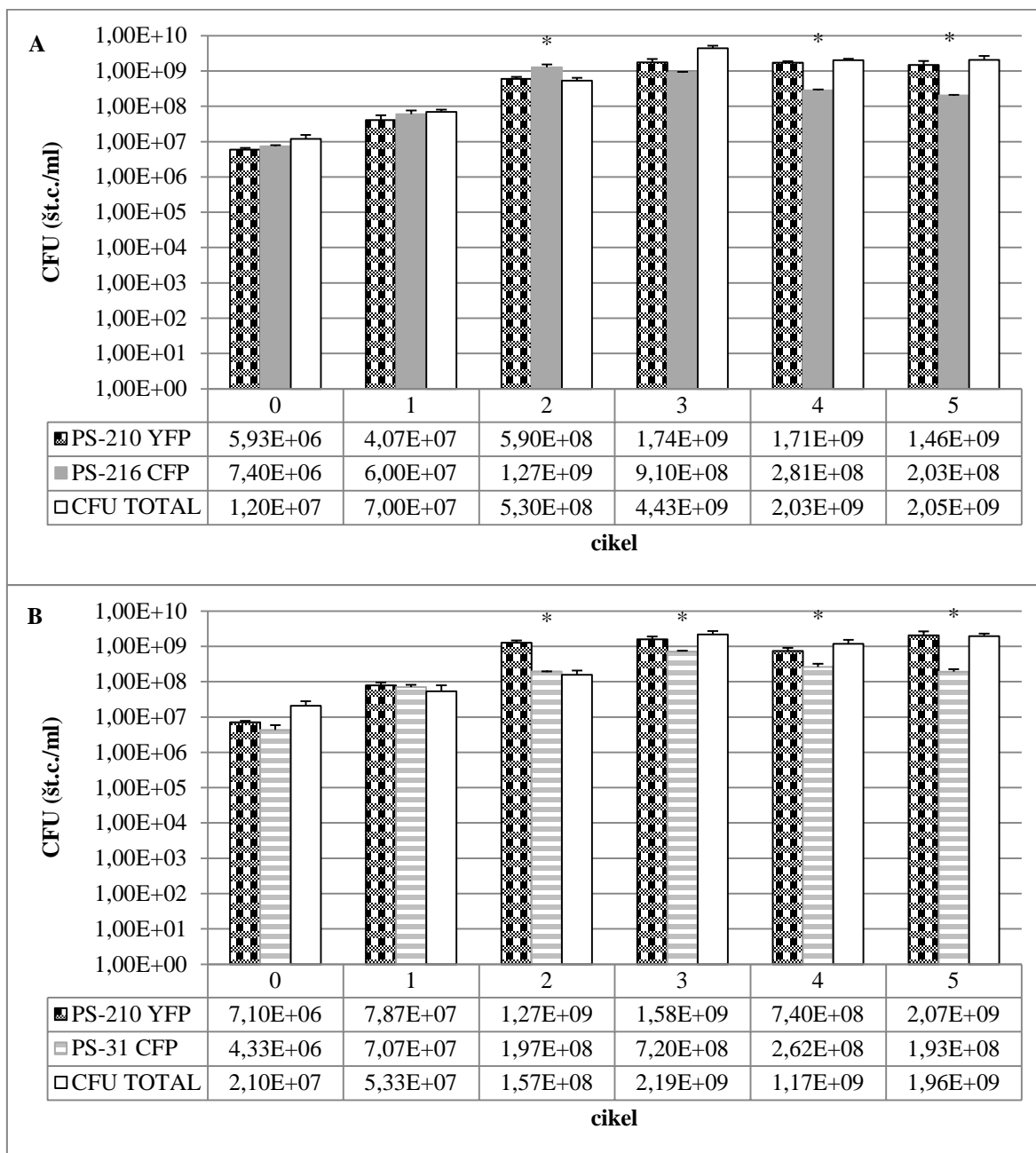
Sev PS-216 je bil uvrščen v PE10 in ferotip 168. Frekvenca vrednosti CFU sevov PS-216 YFP in PS-216 CFP je bila po prvih dveh ciklih primerljiva, nato smo opazili rahlo nihanje frekvence in upad števila seva PS-216 YFP za približno 2 logaritma (Slika 8).



Slika 8: Sobivanje kontrolnih rekombinantnih izogenih sevov PS-216 YFP in PS-216 CFP v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA. Na abscisni osi so razvidni cikli (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče MELASA po 48 urah), na ordinatni osi pa število celic v mililitru (CFU). Standardni odkloni so prikazani le grafično. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote $1,00E+01$, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$).

Znotraj ekotipa PE10 sta seva PS-210 YFP in PS-216 CFP, ki se se razlikujeta v ferotipu (RO-H-1 in 168), sobivala. Frekvenca CFU obeh sevov kaže manjše nihanje znotraj vsakega cikla. Enaka opažanja smo zabeležili tudi pri sobivanju sevov z enakim ekotipom

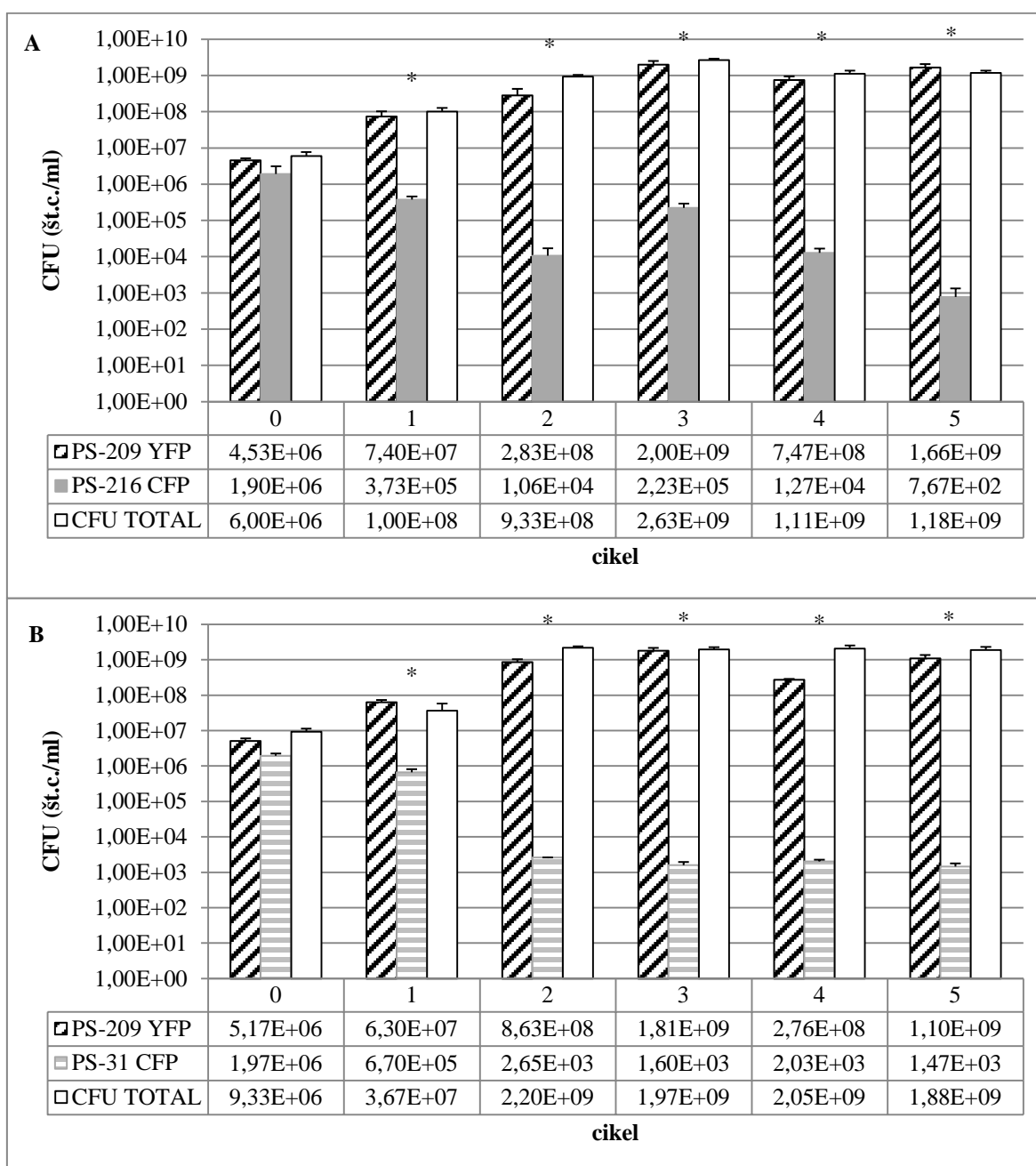
in ferotipom (RO-H-1): PS-210 YFP in PS-31 CFP (Slika 9), vendar nihanja v frekvenci ne presežejo tistih, ki smo jih opazili pri kontrolnih sevih.



Slika 9: Sobivanje rekombinantnih sevov z enakim ekotipom (PE10) v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA. Na abscisni osi so razvidni cikli (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče MELASA po 48 urah), na ordinatni osi pa število celic v mililitru (CFU). Standardni odkloni so prikazani le grafično. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote $1,00E+01$, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$). (A) Sobivanje rekombinantnih sevov PS-210 YFP in PS-216 CFP z različnim ferotipom (RO-H-1 in 168). (B) Sobivanje rekombinantnih sevov PS-210 YFP in PS-31 CFP z enakim ferotipom (RO-H-1).

4.2.2.2 Sobivanje rekombinantnih sevov različnih ekotipov

Primerjali smo sobivanje sevov različnih ekotipov PE10 in PE22, ki ju uvrščamo v enak ferotip (RO-H-1): PS-209 YFP in PS-31 CFP, in sevov, ki ju uvrščamo v različen ferotip (RO-H-1 in 168): PS-209 YFP in PS-216 CFP (Slika 10). V obeh kombinacijah smo izmerili prevlado seva PS-209 YFP že v 2. ciklu. Razlika med CFU vrednostima sevov se je stopnjevala do zadnjega cikla, kjer je razlika v frekvenci med obema sevoma dosegla 5 logaritmov (Slika 10).



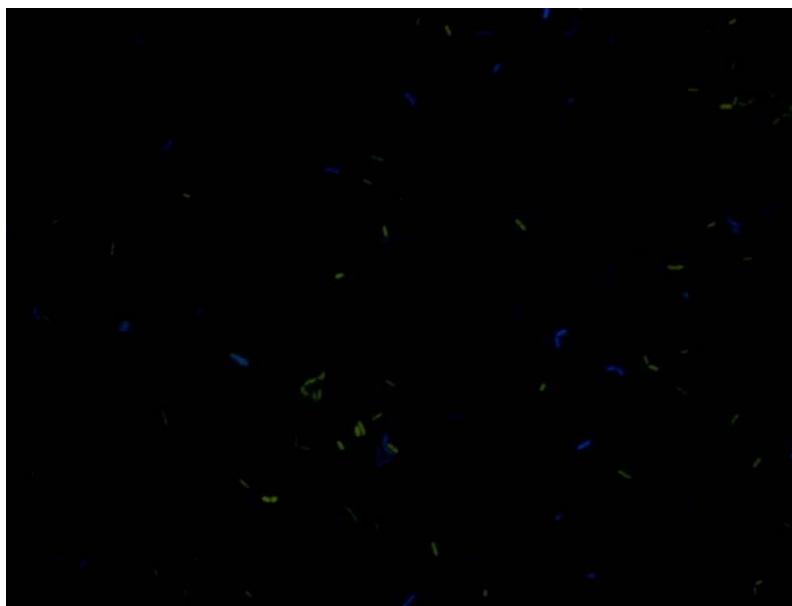
Slika 10: Sobivanje rekombinantnih sevov z različnimi ekotipi v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA. Na abscisni osi so razvidni cikli (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče MELASA po 48 urah), na ordinatni osi pa število celic v mililitru (CFU). Standardni odkloni so prikazani le grafično. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote $1,00E+01$, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$). (A) Sobivanje rekombinantnih sevov PS-209 YFP in PS-216 CFP z različnim ekotipom (PE22 in PE10) in različnim ferotipom (RO-H-1 in 168). (B) Sobivanje rekombinantnih sevov PS-209 YFP in PS-31 CFP z različnim ekotipom (PE22 in PE10) in enakim ferotipom (RO-H-1).

Po 48 urni inkubaciji v tekočem gojišču MELASA so povprečne vrednosti CFU monokultur večje od povprečnih vrednosti CFU dveh sevov v kokulturi (Preglednica 9).

Preglednica 9: Vrednosti CFU rekombinantnih sevov v monokulturi in v kokulturi dveh sevov po 48 urni inkubaciji v tekočem gojišču MELASA pri 37 °C. Podane so vrednosti CFU sevov v monokulturi: povprečne vrednosti (tri ponovitve) monokultur in njihovi standardni odkloni ter izračunana povprečna vrednost dveh monokultur. Podane so tudi vrednosti CFU v kokulturi dveh sevov: povprečna vrednost obeh sevov v kokulturi in njen standardni odklon.

sevi	monokultura			kokultura	
	povprečni CFU monokulture (št.c./ml)	STDEV monokulture	povprečni CFU dveh monokultur (št.c./ml)	povprečni CFU sevov v kokulturi (št.c./ml)	STDEV sevov v kokulturi
PS-216 CFP	2,12E+09	1,69E+08	1,88E+09	5,67E+07	2,08E+07
PS-216 YFP	1,64E+09	1,36E+08			
PS-216 CFP	2,12E+09	1,69E+08	1,85E+09	7,00E+07	1,00E+07
PS-210 YFP	1,57E+09	8,89E+07			
PS-31 CFP	1,76E+09	3,67E+08	1,66E+09	5,33E+07	2,52E+07
PS-210 YFP	1,57E+09	8,89E+07			
PS-216 CFP	2,12E+09	1,69E+08	1,96E+09	1,00E+08	2,65E+07
PS-209 YFP	1,80E+09	4,80E+08			
PS-31 CFP	1,76E+09	3,67E+08	1,78E+09	3,67E+07	2,08E+07
PS-209 YFP	1,80E+09	4,80E+08			

Izražanje operona *surfA* v kokulturah kažejo vsi izbrani rekombinantni sevi v tekočem gojišču MELASA po 16 urni inkubaciji (Slika 11). Izražanje operona *surfA* po drugem ciklu nismo več zaznali.



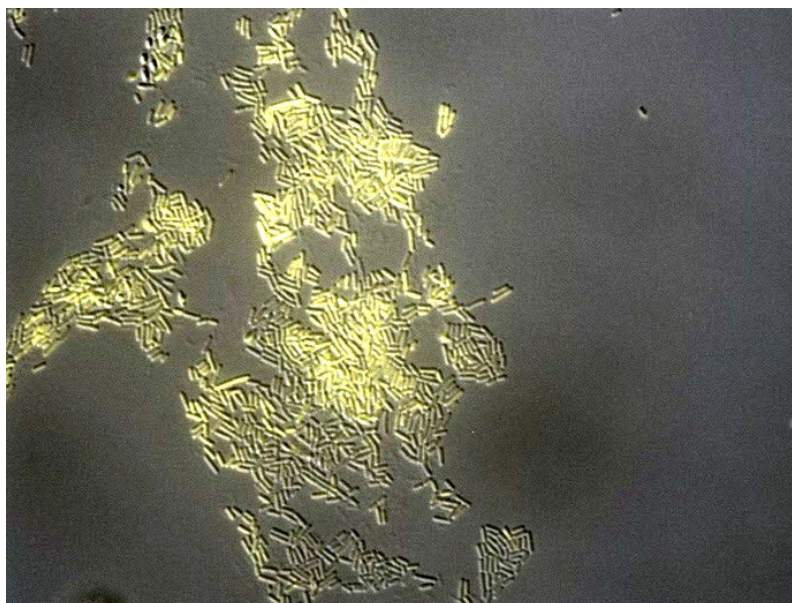
Slika 11: Detekcija izražanja operona *srfA* rekombinantnih sevov PS-210 YFP in PS-31 CFP z enakim ekotipom (PE10) in ferotipom (RO-H-1) v kokulturi, s fluorescentno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji sevov v gojišču MELASA pri 37 °C. V kokulturi pod fluorescenčnim mikroskopom so vidne celice z izraženim operonom *srfA*, ki fluorescirajo. Sev PS-210 YFP izraža rumeni fluorescenčni protein (modre celice), sev PS-31 CFP pa izraža modrozeleni fluorescenčni protein (zelene celice).

4.3 ANALIZA SOBIVANJA IZOGENIH SEVOV

Naravni izolati, četudi pripadajo isti bakterijski vrsti, se najverjetneje genotipsko razlikujejo, na kar nakazuje že dejstvo, da jih lahko uvrstimo v različne ekotipe (Štefanič in sod., 2012). Zato smo v diplomski nalogi želeli preveriti sobivanje izogenih sevov, ki se razlikujejo le v eni lastnosti – to je v ferotipih. Večina teh je bila že pripravljena, v okviru te naloge smo pripravili še sev PS-1013 (genotip podan v Preglednici 4).

4.3.1 Konstrukcija seva PS-1013

Sev smo pripravili s transformacijo udomačenega seva *B. subtilis* BD2949 (ferotip RS-D-2, odporsnot proti kanamicinu) s plazmidom pED1094, ki smo ga namnožili v bakterijskem sevu *E. coli* ED1094 (genotip: *srfA-Mcherry*) (Preglednica 3). Transformirani izogeni sev je odporen proti kanamicinu, je rasel na agarškem gojišču LB z dodanim antibiotikom in približno polovica celic je v gojišču CM je izražala operon *srfA* označen z Mcherry (Slika 12).



Slika 12: Detekcija izražanja operona *srfA* v sevu *B. subtilis* PS-1013 s fluorescentno mikroskopijo po 16 urni inkubaciji v gojišču CM pri 37 °C. Celice z izraženim operonom *srfA* fluorescirajo. Računalniško obdelana slika, kjer se prekrivata sliki fluorescenčne in svetlobne mikroskopije (vidne so rumene celice, ki svetijo in sive celice, ki ne svetijo).

V analizo sobivanja smo vključili nabor izogenih sevov (Preglednica 4), ki smo jih najprej gojili s stresanjem v monokulturah in spremljali rast s pomočjo optične gostote (OD_{650}) in z CFU ter hkrati določili tudi število spor (Priloga A, B in C). V nadaljevanju smo testirali sobivanje teh sevov v kokulturah, ki smo jih nacepili v razmerju 1:1 v tekoče gojišče CM ter stresali pri 37 °C, 48 ur (tj. en cikel) in nato zraslo kokulturo precepili v sveže gojišče.

4.3.2 Analiza sobivanja izogenih sevov v kokulturah v tekočem gojišču CM

Predhodni preizkusi so nakazali, da ferotip nima vpliva na sobivanje dveh sevov, zato smo v nadaljevanju za preverjanje teh opažanj uporabili nabor laboratorijskih izogenih sevov *B. subtilis*, ki se razlikujejo le v ComQXPA lokusu, ki določa pripadnost ferotipu. Seve smo nacepili v razmerju 1:1, v tekoče gojišče CM s stresanjem pri temperaturi 37 °C in kulturo precepili v sveže gojišče na vsakih 48 ur (tj. en cikel). V kokulturi smo gojili dva seva 12 dni in vsakih 48 ur in s štetjem CFU spremljali rast posameznega seva v kokulturi. Seve smo na trdnem gojišču LB ločili po odpornosti proti izbranemu antibiotiku. Za analizo smo izbrali sledeče kombinacije sevov: PS-1013 in PS-1000, PS-1011 in PS-1000, PS-1011 in PS-1004 (Preglednica 9). Kot kontrolo smo uporabili kombinacijo sevov PS-1011 in PS-1009, ki imata enak ferotip, a sta odporna proti istemu antibiotiku.

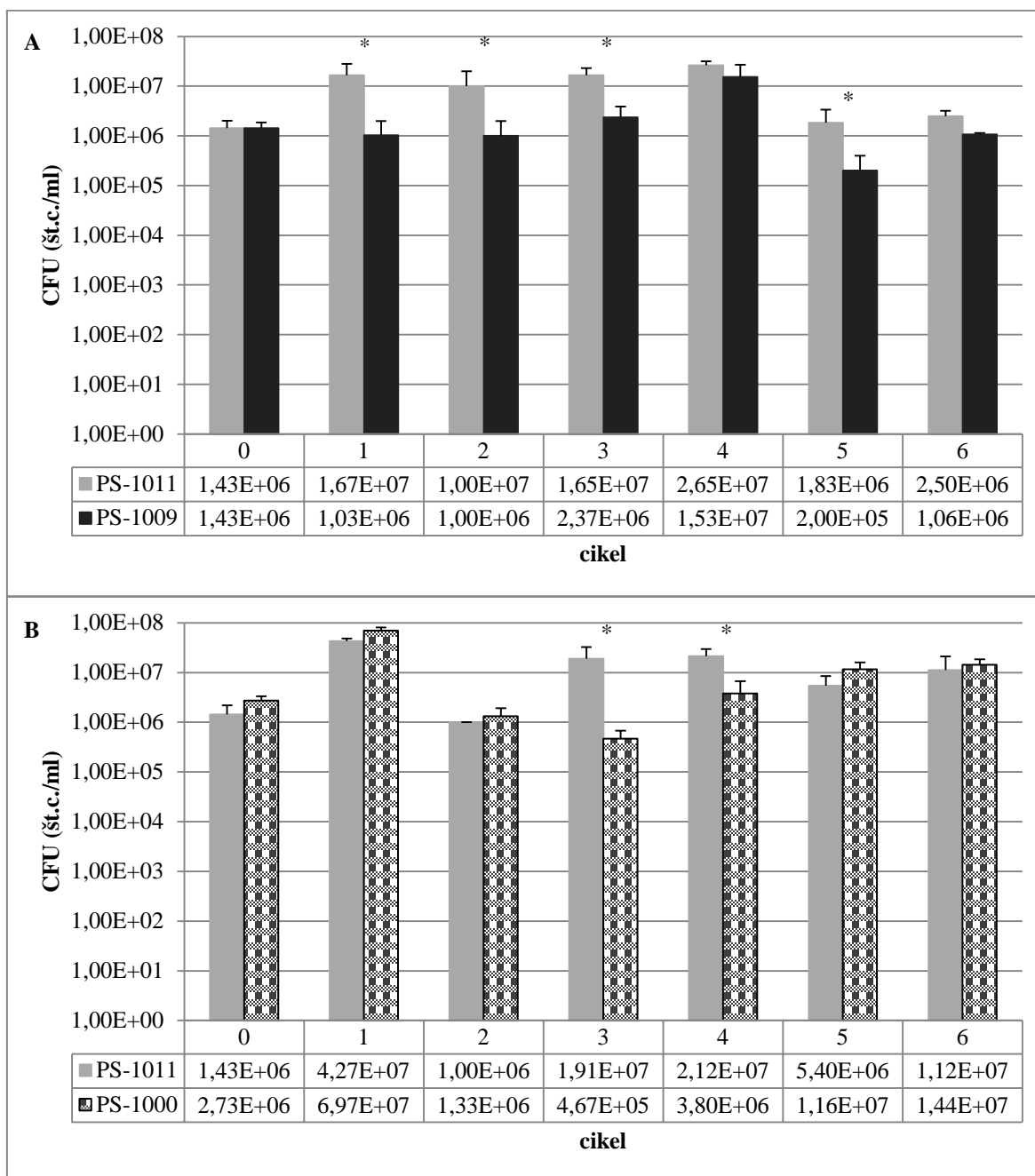
Preglednica 10: Izbrane kombinacije sevov z enakim ekotipom in različnimi ferotipi za analizo sobivanja.

	Ferotip 168	Ferotip RS-D-2
Ferotip RS-D-2	PS-1013 in PS-1000	
Ferotip RO-H-1	PS-1011 in PS-1000	PS-1011 in PS-1004

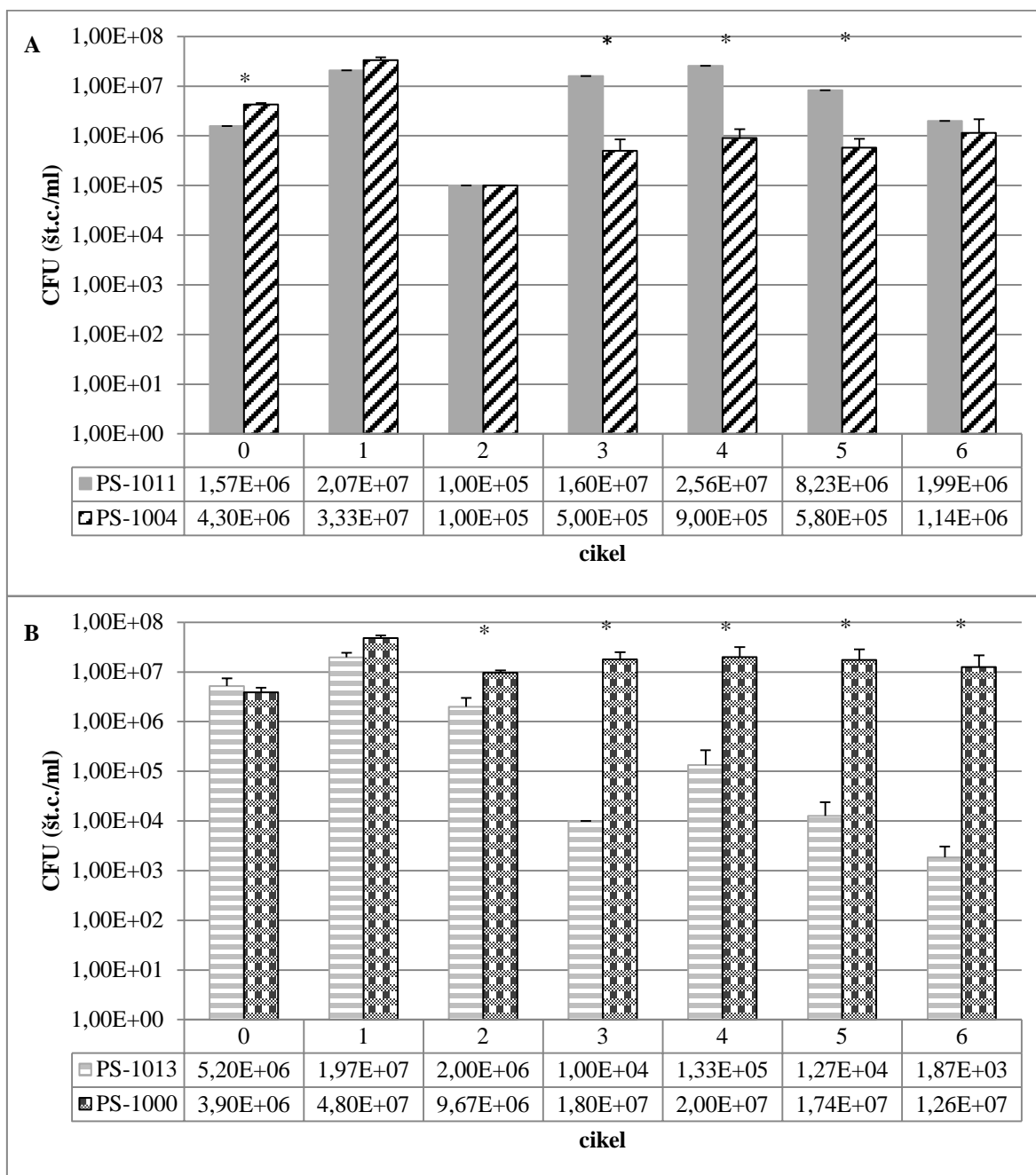
S Student t-testom smo preverili ali gre pri analizi sobivanja sevov v kokulturah med posameznimi neodvisnimi vzorci ($n = 3$) za statistično signifikantne. Ko je bila vrednost $p < 0,01$, sta bili vrednosti statistično različni.

Identična izogena seva PS-1011 in PS-1009 (ferotip RO-H-1), ki se razlikujeta v različnih determinantah odpornosti proti antibiotikom in fluorescenčnem reporterju, sobivata v kokulturi (Slika 13A). Frekvenca celic obeh sevov se skozi 6 ciklov nekoliko spreminja, vendar razlike v frekvenci, čeprav signifikantne ($p < 0,01$, stolpca v posameznem ciklu označeno z *), ne presežejo enega logaritma.

Pri sobivanju dveh izogenih sevov z različnim ferotipom (PS-1011/PS-1004 ter PS-1011/PS-1000) je bila frekvenca celic obeh sevov skozi 6 ciklov variabilna, razlike rasti so bile pri dveh kombinacijah v vrednosti 1-2 logaritmov (Slika 13, 14). V kombinaciji sevov PS-1013 in PS-1000 je prišlo do signifikantnih razlik v vrednosti CFU že v 2. ciklu in po 5. ciklu so bile razlike v CFU med PS-1000 in PS-1013 v območju 3-4 logaritmov v korist seva PS-1000 (Slika 14B).



Slika 13: Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1009 ter PS-1011 in PS-1000 v kokulturi, v tekočem gojišču CM. Na abscisni osi so razvidni cikli (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče CM po 48 urah), na ordinatni osi pa število celic v mililitru (CFU). Standardni odkloni so prikazani le grafično. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote $1,00E+01$, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$). (A) Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1009 z enakim ferotipom (RO-H-1), kontrola. (B) Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1000 z različnim ferotipom (RO-H-1 in 168).



Slika 14: Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1004 ter PS-1013 in PS-1000 v kokulturi, v tekočem gojišču CM. Na abscisni osi so razvidni cikli (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče CM po 48 urah), na ordinatni osi pa število celic v mililitru (CFU). Standardni odkloni so prikazani le grafično. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote $1,00E+01$, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$). (A) Sobivanje izogenih sevov PS-1011 in PS-1004 z različnim ferotipom (RO-H-1 in RS-D-2). (B) Sobivanje izogenih sevov PS-1013 in PS-1000 z različnim ferotipom (RS-D-2 in 168).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomskem delu smo želeli preveriti hipotezo:

Sevi, ki so bolj sorodni (enak ekotip) bodo v kokulturi dveh sevov sobivali skozi več generacij, medtem ko bo pri manj sorodnih sevih (različen ekotip) prišlo do intraspecifične kompeticije (kompeticije znotraj vrste) v stresanih kokulturah in se bo frekvenca enega seva povečala na račun drugega.

5.1 RAZPRAVA

Socialne interakcije so neločljivi del življenja v skupnosti in so pogoste na vseh življenjskih ravneh, tudi v svetu mikrobov (West in sod., 2006). Te interakcije so lahko v bioloških združbah tako koristne kot škodljive za vse udeležence (West in sod., 2011), vendar najnovejša poročila kažejo, da so koristne vedenjske oblike sodelovanja družbena norma v mikrobnih združbah (Xavier in sod., 2011). Bakterije, ki sodelujejo, izločajo in si delijo zelo različne spojine. Izločanje skupnih dobrin običajno uravnava sistem za zaznavanje gostote (QS), ki v odvisnosti od celične gostote koordinira sintezo skupnih dobrin in druge kooperativne funkcije na ravni populacije (West in sod., 2006). Naše razumevanje kooperativnih intraspecifičnih kot tudi interspecifičnih odnosov je izredno slabo poznano. Na drugi strani pa poteka med mikrobi tudi intenzivna kompeticija, tako znotraj vrste, kot tudi med vrstami. V tekmi za hranila igrajo zelo pomembno vlogo protimikrobne učinkovine, kot so bakteriocini in antibiotiki, ki jih mikroorganizmi izločajo v okolje (Hibbing in sod., 2009). Nedavno so postavili hipotezo, da je kompeticija tesno povezana z medceličnimi interakcijami, ki omogočajo mikrobom, da se odzovejo na prisotnost drugih mikrobov v njihovem okolju (Cornforth in Foster, 2013).

5.1.1 Analiza izražanja surfaktinskega operona

Feromon ComX uravnava prepis genov surfaktinskega operona, ki nosijo zapis za encime za sintezo surfaktina, ki ima vlogo signalne molekule, antibiotika in surfaktanta. Vloga tega lipopetida pri intraspecifičnih interakcijah še ni bila preučena, nedavni rezultati pa so pokazali, da surfaktin zniža fitnes sevov *B. subtilis*, ki ne sintetizirajo ComX (Oslizlo in sod., 2014). V tej diplomski nalogi smo raziskali izražanje surfaktinskega operona pri naravnih izolatih bakterije *B. subtilis*. Pripravili smo rekombinantne seve naravnih izolatov s fuzijo *srfA-yfp* ali *srfA-cfp* in zapisom za selekcijski marker (odpornost proti antibiotiku) in aktivnost promotorja za izražanje genov operona *srfA* analizirali s pomočjo fluorescenčne mikroskopije. Lopez in sod. (2009b) so ugotovili, da v biofilmu vse celice v populaciji seva *B. subtilis* 3610 sintetizirajo feromon ComX, le manjši del te populacije pa se na feromon odzove s sintezo surfaktina. V stresanih kulturah, ki jih gojimo v gojišču CM pa po 8 urah inkubacije fluorescira približno 30 % celic stresane kulture *B. subtilis* PS-216 (Oslizlo in sod., 2014). Naši rezultati kažejo, da je v gojišču MELASA po 16h urah inkubacije fluorescira najmanj 77 % celic (npr. sev PS-210 YFP; 78 % in sev PS-216 YFP; 77 %). Razlog za tako visok delež celic z aktivnim promotorjem *srfA*, ki nakazuje na

zvečano izražanje genov za sintezo surfaktina, pripisujemo energijsko bogatemu gojišču MELASA, saj ugotovitve kažejo, da je za povečanje produkcije surfaktina pomembna izbira optimalnega vira ogljika (Abdel-Mawgoud in sod., 2008). Melasa je energijsko bogato gojišče, kar zmanjša verjetnost, da bo produkcija surfaktina omejena s pomanjkanjem hranil. Xavier in sod (2011) so ugotovili, da je izražanje surfaktanta rhamnolipida pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* uravnavano z razmerjem C:N in inducirano ob pomanjkanju dušika ter prebitku ogljika. Tudi MELASA je bogata z ogljikom in revna z dušikom, kar bi lahko imelo vpliv na povečano indukcijo promotorja operona *surfA*. Izražanje tega operona v gojišču MELASA je bilo primerljivo pri vseh sevih, kar pa ne velja za gojišče CM, kjer dva seva (PS-210, PS-209) nista izražala tega operona. Vzroka za to različnost ne poznamo, verjetno pa je posledica genetskih razlik med naravnimi izolati, ki so vidne že na nivoju visoko ohranjenih gospodinjskih genov (Štefanič in sod., 2012) in so zagotovo prisotne tudi na ostalih, bolj variabilnih predelih genoma naravnih izolatov. V kokulturi dveh rekombinantnih sevov so fluorescirale celice obeh sevov, vendar pa izražanja operona *surfA* po dveh ciklih nismo več zaznali. Razlog za to je najverjetneje časovni interval, v katerem smo opazovali izražanje surfaktina. Vzorce za mikroskopijo smo vzeli tik pred precepljanjem kokultur v sveže gojišče (ciklanje). Rekombinantni sevi v gojišču MELASA sporulirajo že po 24 urah, kokulturo pa smo precepljali po 48 urni inkubaciji in tako so ob odvzemu vzorca sevi že sporulirali, dormantne spore pa ne izražajo operona *surfA*.

5.1.2 Analiza sobivanja sevov *B. subtilis*

Pri *B. subtilis* dinamiko sistema zaznavanja celične gostote kontrolira lokus *comQXPA*. Ferotipska različnost sevov je posledica polimorfizma genov *comQ*, *comX* in *comP* na lokusu *comQXP'* ter izoprenske modifikacije feromona ComX. Ozkosorodne seve vrste *Bacillus* tako ločujemo v komunikacijske skupine (ferotipe), kjer sevi, ki pripadajo istemu ferotipu uspešno izmenjujejo informacije, sevi različnih ferotipov pa komunikacije niso sposobni (Tortosa in sod., 2001; Ansaldo in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). V kakšnih medsebojnih odnosih so sevi z različnimi/enakimi ferotipi znotraj ekotipa in zunaj ekotipa je v veliki meri neznano.

Cohan (2001) je postavil teorijo, da ekotipi, ki so med seboj dovolj ekološko različni, lahko sobivajo, saj so prilagojeni na različne ekološke niše. Hamilton (1964) pa je postavil teorijo sorodstvene selekcije, ki izpostavlja sodelovanje med sorodnimi sevi. Sevi v enakem ekotipu bi po teoriji Hamiltona lahko sobivali, saj si z nesebično pomočjo večajo fitnes (altruistično vedenje) in posredno prenašajo gene v naslednjo generacijo. V tem diplomskem smo predpostavili, da bodo sevi, ki so bolj sorodni (enak ekotip) v kokulturi dveh sevov sobivali skozi več generacij, medtem ko bo pri manj sorodnih sevih (različen ekotip) prišlo do intraspecifične kompeticije v stresanih kokulturah in se bo frekvenca enega seva povečala na račun drugega. Naši rezultati so v skladu s to predpostavko, saj so sevi *B. subtilis* z enakim ekotipom sobivali v stresanih kulturah skozi več generacij med

sevi različnega ekotipa pa je bila kompeticija močnejša. Opazili smo tudi, da je sev PS-209 YFP vedno prerastel ostale seve in je bil bolj »agresiven« od ostalih. Čeprav vzroka za to ne poznamo, je možno, da agresivni sev izloča neznano protimikrobno snov, ki inhibira drugi sev. Lahko pa tudi počasnejši sev vlaga več v skupne dobrine in zato raste počasneje. Za preverjanje teh predpostavk bodo potrebne nadaljnje raziskave. V kontrolni kokulturi sevov PS-216 CFP in PS-216 YFP smo v zadnjih dveh ciklih opazili nekoliko večje nihanje števila CFU v prid seva PS-216 CFP. Vzrok temu bi lahko bil tudi v neznani mutaciji, ki se zaradi učinka ozkega grla (angl. bottleneck) povezanega z majhnim inokulumom, ki smo ga precepili v sveže gojišče, lahko hitro uveljavi.

V splošnem lahko zaključimo, da so vsi pari sevov razen sevov PS-209 YFP in PS-216 CFP imeli podobno rast v monokulturi v prvih 8 urah (eksponentna rast), nato je prišlo do manjših odstopanj v OD_{650} , medtem ko so bile vrednosti CFU bolj primerljive skozi celoten čas inkubacije. Statistično različni sta bili le vrednosti CFU sevov PS-210 YFP in PS-31 CFP v monokulturi po 24 urni inkubaciji. V tej fazi so celice v stacionarni fazi, za katero je značilna fenotipska diferenciacija populacije v različne tipe celic (Fraeser in Kaern, 2009). Ta diferenciacija je stohastična in morda vzrok opaženi različnosti v številu CFU. Rast posameznih sevov je bila sicer v večini primerljiva in kot taka naj ne bi vplivala na rezultate v kokulturah, vendar pa se je treba zavedati, da lahko že majhna razlika v vrednosti CFU posameznega seva v kokulturi po večih precepljanjih v sveže gojišče poveča. V splošnem so rezultati analize sobivanja rekombinantnih sevov *B. subtilis* bližje hipotezi, da je sobivanje značilno za seve, ki so med sabo bolj sorodni. Vsekakor pa bi za potrditev tega sklepa morali v prihodnosti preveriti večje število kombinacij naravnih izolatov.

Primerjava vrednosti CFU monokultur in CFU v kokulturah po 48 urni inkubaciji v tekočem gojišču MELASA (Preglednica 9) pokaže, da so vrednosti CFU monokultur večje od povprečnih vrednosti CFU v kokulturi. Na podlagi te primerjave sklepamo, da je v kokulturi prišlo do kompeticije med sevi in je učinkovitost izrabe hranil slabša, kot če gojimo sev v monokulturi. Končna vrednosti CFU v kokulturi se približa tisti v monokulturi ($\sim 10^9$) šele po nekaj ciklih v kokulturi, kot da bi se različna seva morala »navaditi« eden na drugega in sinhronizirati sobivanje. V kokulturah sevov različnega ekotipa pa je bila kompeticija močnejša in v dveh primerih je po nekaj ciklih en sev prevladal nad drugim. Raziskave sobivanja naravnih izolatov *B. subtilis* na Katedri za mikrobiologijo so bile vključene tudi v diplomsko delo Elizabete Benigar (2011). Te so pokazale, da nekateri naravni izolati *B. subtilis* z različnim ekotipom v tekočem gojišču LB v kokulturi sobivajo, medtem ko je bilo sobivanje sevov istega ekotipa manj stabilno. Vendar pa so imeli ti preizkusi zelo omejeno moč resolucije, saj je bila kvantifikacija sevov vezana na morfologijo kolonij in tako je bilo mogoče opazovati le razlike v območju dveh logaritmov. Naši rezultati so pokazali, da lahko podobne razlike v frekvenci izmerimo tudi v kokulturah dveh izogenih sevov. Razlogi za razhajanje med rezultati Benigarjeve in

rezultati tega diplomskega bi lahko bili tudi v izbiri gojišča, saj je sobivanje in kompetitivna prednost sevov *B. subtilis* odvisna od sestave medija. Tako ima lahko sev v enem gojišču kompetitivne prednosti pred ostalimi, v drugem gojišču pa ne. Tudi rezultati tega diplomskega dela zahtevajo nadaljnje preverjanje, saj bi z večjim številom ponovitev lahko lažje izključili stohastično komponento sobivanja. Poleg tega bi bilo nujno sobivanje preveriti pri večjem številu parov sevov z različnim ekotipom in tako potrditi, da opažena kompeticija ni le posledica naključnih mutacij, ki se pojavijo v začetnih ciklih in prinesejo prednost enemu sevu v nadaljnjih ciklih. Glede na to, da so bila precepljanja izvajana po 48 urah, ko je že prišlo do sporulacije, kar vnaša v preizkuse dodatno spremenljivko, bi bilo priporočljivo v ponovljenem preizkusu kokulturo precepljati v sveže gojišče, ko so celice v logaritemski fazi rasti oziroma za preverjanje sobivanja uporabiti kemostat.

Sobivanje naravnih sevov v stresanih kulturah je slabo proučeno, nekoliko več raziskav je bilo usmerjenih v interakcije sorodnih sevov, ki rastejo na površini. Gibbs in sodelavci (2008) so tako pokazali, da med genetsko različnimi roji γ -proteobakterije *Proteus mirabilis* pride do izgube prepoznavanja in tvorbe mejne linije, kar pomeni, da se manj sorodni sevi prepoznajo kot drugačni. Mehanizem sorodstvene diskriminacije so odkrili tudi pri predatorski amebi *Dictyostelium discoideum*. Pri tej amebi celice tvorijo večcelična plodna telesca, ki lahko vsebujejo amebe z različnimi genotipim vendar stopnja ločevanja narašča z genetsko oddaljenostjo med sevi (Ostrowski in sod., 2008). Vos in Velicer (2009) pa sta pokazala, da lahko pride do socialnega konflikta celo med zelo sorodni sevi *M. xanthus* izoliranimi iz istega geografskega območja. Sevi, ki so imeli identične vzdrževalne gene so tvorili vidno ločeni koloniji in je do sobivanja (zlitja kolonij) prišlo le na agariziranem gojišču. Podobno opažamo tudi v domačem laboratoriju, kjer manj sorodni sevi bolj pogosto tvorijo mejne linije nad roji kot bolj sorodni (Štefanič, Kraigher, Mandič-Mulec – neobjavljeni rezultati).

V tem diplomskem delu smo želeli dodatno preveriti ali različnost v ferotipu vpliva na sobivanje. V ta namen smo uporabili nabor izogenih sevov. Rezultati so pokazali, da seva PS-1011 in PS-1009 (enak ferotip in genotip) sobivata. Pri drugih parih z različnimi ferotipi sta dva para sobivala, en par pa je pokazal kompetitivni odnos. Vzroka za opažene razlike ne poznamo, vendar so v splošnem naši rezultati bolj v skladu z zaključkom, da je sobivanje v gojišču CM neodvisno od ferotipa – saj je od treh kombinacij sevov z različnimi ferotipi prišlo do sobivanja v dveh kombinacijah. Rastne krivulje izogenih sevov so izrazito varilale v OD_{650} v območju stacionarne faze rasti (Priloga A, B), kar je lahko tudi posledica stohastičnosti izražanja adaptacij in diferenciacije populacije v fenotipsko različne celice (Fraser in Kærn, 2009) in lahko vpliva na rezultate v režimu precepljanja, ki smo ga uporabili. Zanimivo je, da je prišlo do izrazitih odstopanj v vrednosti CFU v monokulturah po 48 urah le pri dveh sevih (PS-1009 in PS-1013), pri katerih vrednosti CFU po 48 urah zelo upadejo (na $\sim 10^3$ - 10^4). Oba seva v monokulturi kažeta tudi zgodnejšo sporulacijo. V kokulturi pa PS-1009 ne kaže znižanega fitnes-a, medtem ko ima

PS-1013 tudi v kokulturi s PS-1000 izrazito nižji fitness (Priloga A). Vzroka za ta odstopanja v okviru te diplomske naloge nismo preučevali in bi lahko bil posledica mutacij, ki so nastale med pripravo rekombinantnega seva PS-1013, kar bo zahtevalo nadalnje preverjanje v prihodnosti.

5.2 SKLEPI

- Uspešno smo pripravili nabor rekombinantnih sevov iz naravnih izolatov *B. subtilis*, ki nosijo zapis za selekcijski marker (odpornost na antibiotik) in/ali gensko fuzijo *srfA-yfp* oziroma *srfA-cfp*.
- Rezultati analize izražanja *srfA-cfp* in *srfA-yfp* v pridobljenih rekombinantnih sevih, ki smo jih pridobili s fluorescenčno mikroskopijo, so pokazali, da v tekočem gojišču MELASA sveti relativno visok delež celic, ki izražajo *srfA*. Najnižji delež celic, ki so fluorescirale, sta kazala sev PS-210 YFP (78 %) in sev PS-216 YFP (77 %). V kokulturi dveh sevov so fluorescirale celice obeh sevov, vendar pa izražanje operona *srfA* po dveh ciklih nismo več zaznali.
- Rezultati analize sobivanja rekombinantnih sevov *B. subtilis* v tekočem gojišču MELASA nakazujejo, da rekombinantna seva z enakim ekotipom v kokulturi sobivata, neodvisno od ferotipa. Iz rezultatov je razvidno tudi, da se frekvenca enega seva v kokulturah dveh ekotipov poveča na račun drugega, kar kaže na tekmovanje. Ti rezultati potrjujejo našo hipotezo, vendar direktno ne nakazujejo obstoja mehanizma sorodstvene diskriminacije, kjer je sodelovanje prednostno usmerjeno proti sorodnim sevom.
- Rezultati analize sobivanja izogenih sevov v tekočem gojišču CM kažejo, da ferotip verjetno ne vpliva na sobivanje sevov *B. subtilis* v gojišču CM.

6 POVZETEK

Bakterija *B. subtilis* kaže izredno genetsko in fenotipsko raznolikost. Raznolikost omogoča adaptacije celic *B. subtilis* na pritiske okolja in njihovo preživetje. Sevi zasedajo zelo različne ekološke niše in jih zaradi ekološke ločenosti uvrščamo v različne ekotipe. Cohan (2001) pravi, da so si ekotipi med seboj dovolj ekološko različni, da lahko v naravnih okoljih sobivajo (izraba različnih virov hranil, prilagojenost na različne parametre okolja), medtem ko med sevi v enakem ekotipu lahko pride do izpodrivanja. Tudi sevi *B. subtilis* izolirani iz talnega mikrookolja se ločijo po ekotipih. (Štefanič in sod., 2012). Ti sevi se razlikujejo tudi v komunikacijskih jeziki ali ferotipih (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Ferotip je vezan na mehanizem medcelične komunikacije bakterij. Bakterija v splošnem zaznava celično gostoto (quorum sensing) s posebnimi komunikacijskimi sistemi, ki temeljijo na izločanju signalnih molekul v okolje in njihovemu zaznavanju (Miller in Bassler, 2001). Pri bakteriji *B. subtilis* zunajcelični signalni peptid (feromon ComX) sproži globalno spremembo genske transkripcije (Magnuson in sod., 1994), ki vpliva na fosforilacijo transkripcijskega dejavnika ComA (Weinrauch in sod., 1990). Sevi vrste *B. subtilis* se razlikujejo v feromonih ComX in receptorjih ComP, ki le te zaznavajo in jih na podlagi tega delimo v štiri komunikacijske skupine (ferotipe). Sevi znotraj ferotipa uspešno komunicirajo, sevi z različnimi ferotipi pa komunikacije niso sposobni. Znotraj enega ekotipa najdemo seve različnih ferotipov, med katerimi je eden dominanten (Štefanič in sod., 2012). V okviru te diplomske naloge smo pripravili rekombinantne seve *B. subtilis*, ki so nam omogočili testiranje izražanja operona *srfA*, ki ga uravnava ComX in sobivanje sevov enakih/različnih ekotipov/ferotipov.

Pripravili smo nabor rekombinantnih sevov iz naravnih izolatov *B. subtilis*, ki nosijo zapis za selekcijski marker in/ali gensko fuzijo *srfA-yfp* oziroma *srfA-cfp*. Rezultate analize izražanja *srfA-cfp* in *srfA-yfp* smo pridobili s fluorescenčno mikroskopijo. Vsi rekombinantni sevi izražajo operon *srfA* tako v monokulturi kot v kokulturi dveh sevov.

V kokulturi smo gojili dva seva, inokulirana v razmerju 1:1 v hranilnem gojišču s stresanjem pri 37 °C, 12 dni in s spremljanjem rasti posameznih sevov določijo števila CFU (colony forming units) in selekcijo na agariziranih gojiščih z antibiotikom izračunali koncentracijo posameznega seva v kokulturi. Rezultati kažejo, da sevi sobivajo neodvisno od ferotipa. Rekombinantna seva *B. subtilis* z enakim ekotipom v kokulturi sobivata dlje, seva z različnim ekotipom pa v kokulturi tekujeta. Frekvenca enega seva se poveča na račun drugega. V splošnem pa sevi po 48h inkubacije v kokulturi dosežejo nižje vrednosti CFU, kot če jih gojimo v monokulturi, kar kaže, da je vsaj v začetnih ciklih rasti odnos med različnimi sevi kompetitiven.

7 VIRI

- Abdel-Mawgoud A. M., Aboulwafa M. M., Abdel-Haleem Hassouna N. 2008. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 15, 3: 305-325
- Anagnostopoulos C., Spizizen J. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology*, 81, 5: 741-746
- 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
- Ara K., Ozaki K., Nakamura K., Yamane K., Sekiguchi J., Ogasawara N. 2007. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 46, 3: 169-178
- 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
- Akamatsu T., Taguchi H. 2001. Incorporation of the whole chromosomal DNA in protoplast lysates into competent cells of *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 4: 823-829
- 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
- Budde I., Steil L., Scharf C., Volker U., Bremer E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*, 152: 831-853
- Benigar E. 2011. Vpliv ekotipov in ferotipov na sobivanje izolatov *Bacillus subtilis*. Diplomaska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 45 str.
- Chen I., Dubnau D. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 241-249
- 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., Koeppl 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
- Cordero O. X., Polz M. F. 2014. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 263-273
- Cornforth D. M., Foster K. R. 2013. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Review Microbiology*, 11: 285-293

- Crueger W., Crueger A. 2000. Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. New Delhi, Panima Publishing Corporation: 59–62
- 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
- Diggle S. P., Griffin A. S., Campbell G. S., West S. A. 2007. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450: 411–414
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 395–424
- Dubnau D., Provvedi R. 2000. Internalizing DNA. *Research in Microbiology*, 151: 475–480
- Earl A. M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269–275
- Fall R., Kinsinger R. F., Wheeler K. A. 2004. A simple method to isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 372–379
- Folmsbee M. J., McInerney M. J., Nagle D. P. 2004. Anaerobic growth of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* requires deoxyribonucleosides or DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5252–5257
- Fraser D., Kærn M. 2009. A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies. *Molecular Microbiology*, 71, 6: 1333–1340
- Freyre-González J. A., Manjarrez-Casas A. M., Merino E., Martinez-Nuñez M., Perez-Rueda E., Gutiérrez-Ríos R.-M. 2013. Lessons from the modular organization of the transcriptional regulatory network of *Bacillus subtilis*. *BMC Systems Biology*, 7: 127, doi:10.1186/1752-0509-7-127: 14 str.
- Gibbs K. A., Urbanowski M. L., Greenberg E. P. 2008. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science*, 321: 256–259
- Greig D., Travisano M. 2008. Density-dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution, the International Journal of Organic Evolution*, 62, 3: 521–527
- Grossman A. D., Losick R. 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 4369–4373
- 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
- Harwood C. R. 1989. *Bacillus*. V: Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. Priest F. G. (ed.). New York, Plenum Press: 27–56
- Hibbing M. E., Fuqua C., Parsek M. R., Peterson S. B. 2009. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 15–25

- Holtmann G., Bremer E. 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: Involvement of Opu transporters. *Journal of Bacteriology*, 186, 6: 1683-1693
- Hecker M., Völker U. 1990. General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 74: 197–213
- Henke J. M., Bassler B. L. 2004. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, 14: 648-656
- Johnsborg O., Eldholm V., Havarstein L. S. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158, 10: 767-778
- 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
- Kobayashi K., Ehrlich S. D., Albertini A., Amati G., Andersen K. K., Arnaud M., Asai K., Ashikaga S., Aymerich S., Bessieres P., Boland F., Brignell S. C., Bron S., Bunai K., Chapuis J., Christiansen L. C., Danchin A., Débarbouillé M., Dervyn E., Deuerling E., Devine K., Devine S. K., Dreesen O., Errington J., Fillinger S., Foster S. J., Fujita Y., Galizzi A., Gardan R., Eschevins C., Fukushima T., Haga K., Harwood C. R., Hecker M., Hosoya D., Hullo M. F., Kakeshita H., Karamata D., Kasahara Y., Kawamura F., Koga K., Koski P., Kuwana R., Imamura D., Ishimaru M., Ishikawa S., Ishio I., Le Coq D., Masson A., Mauël C., Meima R., Mellado R. P., Moir A., Moriya S., Nagakawa E., Nanamiya H., Nakai S., Nygaard P., Ogura M., Ohanan T., O'Reilly M., O'Rourke M., Pragai Z., Pooley H. M., Rapoport G., Rawlins J. P., Rivas L. A., Rivolta C., Sadaie A., Sadaie Y., Sarvas M., Sato T., Saxild H. H., Scanlan E., Schumann W., Seegers J. F. M. L., Sekiguchi J., Sekowska A., Séror S. J., Simon M., Stragier P., Studer R., Takamatsu H., Tanaka T., Takeuchi M., Thomaidis H. B., Vagner V., van Dijl J. M., Watabe K., Wipat A., Yamamoto H., Yamamoto M., Yamamoto Y., Yamane K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H., Zuber U., Ogasawara N. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8: 4678–4683
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss 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
- Lawrence J. G. 2002. Gene transfer in bacteria: speciation without species? *Theoretical Population Biology*, 61, 4: 449-60
- Leisner J. J., Haaber J. 2012. Intraguild predation provides a selection mechanism for bacterial antagonistic compounds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279, 1747: 4513-4521

- Lopez D., Kotler R. 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 134-149
- Lopez D., Vlamakis H., Kolter R. 2009a. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33: 152–163
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009b. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development*, 23: 1631-1638
- Lopez D., Fischbach M. A., Chu F., Losick R., Kolter R. 2009c. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 280-285
- Magnuson R., Solomon J., Grossman A. D. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell*, 77: 207–216
- Mayr E. 2004. What makes biology unique? Considerations of the autonomy of a scientific discipline. New York, Cambridge University Press: 235 str
- Michod R. E., Bernstein H., Nedelcu A. M. 2008. Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 3: 267–285
- Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review in Microbiology*, 55: 165–199
- Mor A. 2000. Peptide-based antibiotics: A potential answer to raging antimicrobial resistance. *Drug Development Research*, 50: 440–447
- 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
- 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
- O'Brien S., Hodgson D. J., Buckling A. 2013. The interplay between microevolution and community structure in microbial populations. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 4: 821-825
- Ochman H., Lawrence J. G., Groisman E. A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405: 299–304
- Ochman H., Davalos L. M. 2006. The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science*, 311: 1730–1733
- Oslizlo A., Štefanič P., Dogša I., Mandić-Mulec I. 2014. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 4: 1586-1591
- 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

- Phelan V. V., Liu W. T., Pogliano K., Dorrestein P. C. 2012. Microbial metabolic exchange—the chemotype-to-phenotype link. *Nature Chemical Biology*, 8: 26–35
- Piggot P. J., Hilbert D. W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 579-586
- Roberts M. S., Cohan F. M. 1993. The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics*, 134, 2: 401–408
- Saito Y., Taguchi H., Akamatsu T. 2006a. Fate of transforming bacterial genome following incorporation into competent cells of *Bacillus subtilis*: a continuous length of incorporated DNA. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 3: 257-262
- Saito Y., Taguchi H., Akamatsu T. 2006b. DNA taken into *Bacillus subtilis* competent cells by lysea – protoplast transformation is not ssDNA but dsDNA. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 4: 334-339
- Saito S., Kakeshita H., Nakamura K. 2009. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 428, 1–2: 2–8
- Sikorski J. 2008. Populations under microevolutionary scrutiny: what will we gain? *Archives of Microbiology*, 189: 1–5
- Solomon J. M., Grossman A. D. 1996. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, 12, 4: 150-155
- Solomon J. M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A. D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 9: 547-58
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 4: 845–857
- Stragier P., Losick R. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*. 30: 297–341
- Štefanič P., Decorosi F., Viti C., Petito J., Cohan F. M., Mandič-Mulec I. 2012. The quorum sensing diversity within and between ecotypes of *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*, 14, 6: 1378–1389
- Štefanič P., Mandič-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes 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 mikrohabitat. 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., Mandič-Mulec I., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 183, 2: 451–460
- Turgay K., Hahn J., Burghoorn J., Dubnau D. 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *The EMBO Journal*, 17: 6730-6738

- Turgay K., Hamoen L. W., Venema G., Dubnau D. 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 11: 119-128
- Vos M., Wolf A. B., Jennings S. J., Kowalchuk G. A. 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiology Review*, 37: 936-954
- Vos M., Velicer G. J. 2009. Social conflict in centimeter- and global-scale populations of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Current Biology*, 19: 1763–1767
- Ward D. M., Cohan F. M. 2005. Microbial diversity in hot spring cyanobacterial mats: pattern and prediction. V: *Geothermal biology and geochemistry in Yellowstone National Park*. Inskip W. P., McDermott T. (eds.). Bozeman, Thermal Biology Institute: 185–202
- West S. A., Griffin A. S., Gardner A., Diggle S. P. 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 597-607
- West S. A., Mouden C. E., Gardner A. 2011. Sixteen common misconceptions about the evolution of cooperation in humans. *Evolution and Human Behavior*, 32: 231-262
- Williams P., Winzer K., Chan W. C., Camara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 362: 1119-1134
- Xavier B., Kim W., Foster K. R. 2011. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 79: 166-179
- Zafra O., Lamprecht-Grandío M., González de Figueras C., González-Pastor J. E. 2012. Extracellular DNA release by undomesticated *Bacillus subtilis* is regulated by early competence. *PLoS ONE*, 7, 11: e48716, doi: 10.1371/journal.pone.0048716: 15 str.
- Zawadzki P., Cohan F. M. 1995. The size and continuity of DNA segments integrated in *Bacillus* transformation. *Genetics*, 141: 1231–1243

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec za prijaznost, razumevanje, oporo in za vse strokovne nasvete.

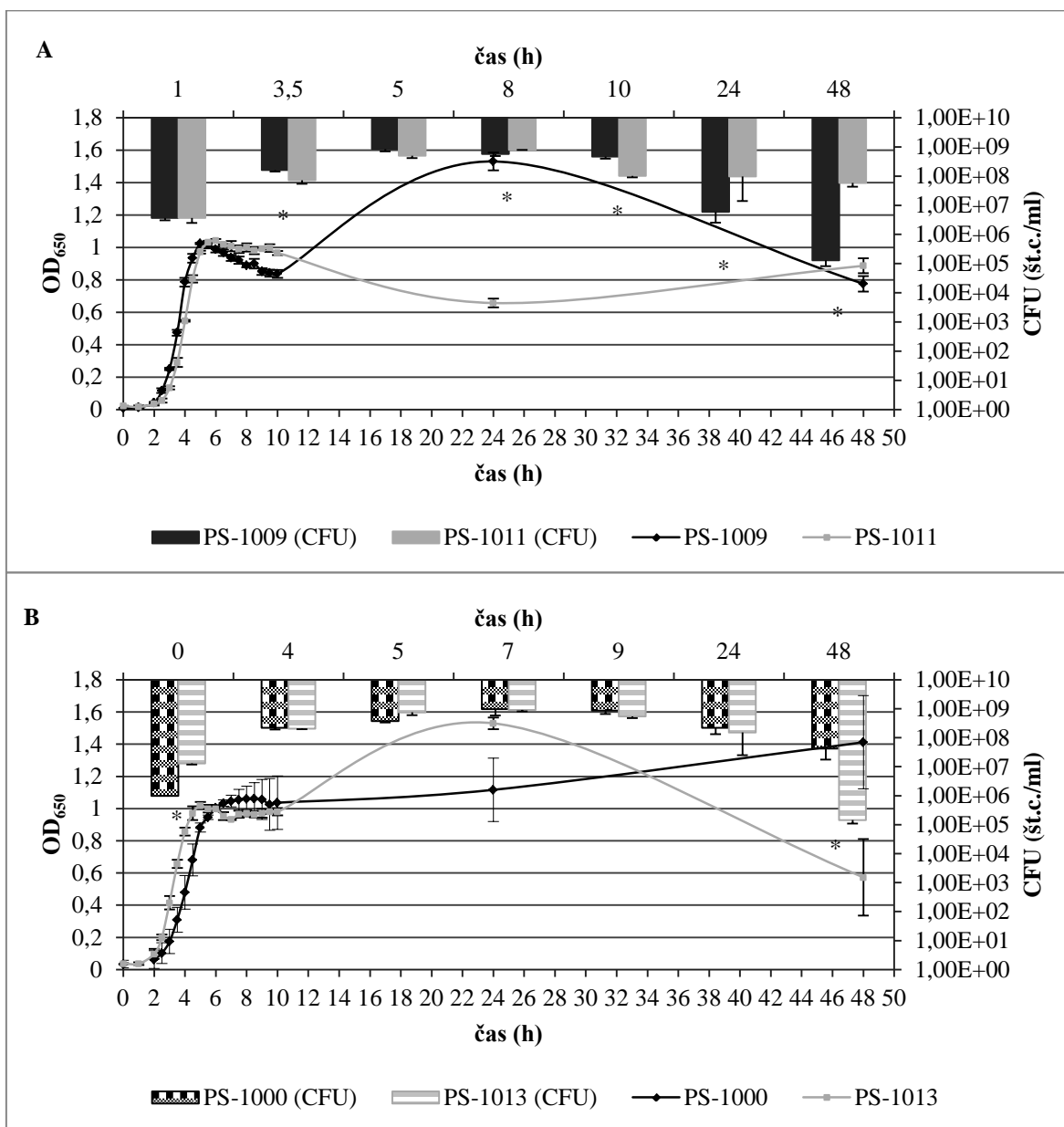
Posebna zahvala gre delovni mentorici asist. dr. Polonci Štefanič za organizacijo eksperimentalnega dela. Iskrena hvala za spodbudo in strokovno svetovanje pri izvedbi in nastajanju diplomskega dela ter za pripravo prekonočnih kultur ob nedeljah.

Zahvaljujem se tudi recenzentu doc. dr. Mateju Butali in vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo za vso pomoč, angažiranost in prijaznost. Zahvala gre tudi tehnični sodelavki Simoni Leskovec za potrpežljivost in za ves izposojen sterilen inventar. Bila je pravo zdravilo za mojo pozabljivost.

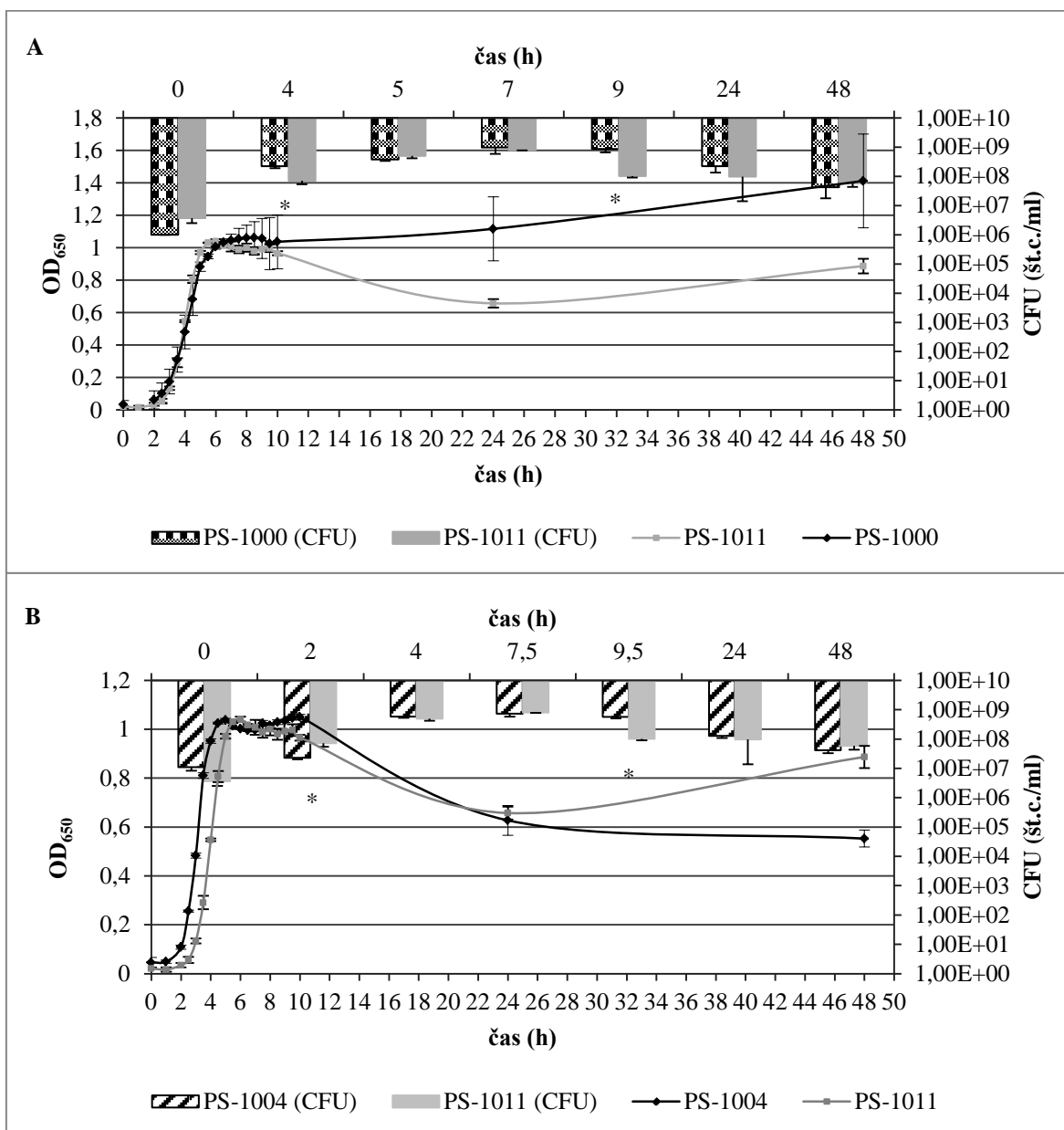
Zahvaljujem se tudi prijateljem in sošolcem, s katerimi so bili stresni trenutki študija še vedno čudoviti.

Posebna zahvala pa gre mojima dragima staršema ter mojemu Mihi, ki so me vselej podpirali in verjeli vame takrat, ko sem to najbolj potrebovala. Iskrena hvala.

PRILOGE



Priloga A: Rast monokultur izogenih sevov PS-1009 in PS-1011 ter PS-1000 in PS-1013 v tekočem gojišču CM. Vrednosti CFU so prikazane s stolpci; absorbanca pri OD₆₅₀ je prikazana s črto, za vse vrednosti so podani standardni odkloni. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote 1,00E+01, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$). (A) PS-1009 in PS-1011 (ferotip RO-H-1). (B) PS-1000 (ferotip 168) in PS-1013 (ferotip RS-D-2).



Priloga B: Rast monokultur izogenih sevov PS-1000 in PS-1011 ter PS-1004 in PS-1011 v tekočem gojišču CM. Vrednosti CFU so prikazane s stolpci; absorbanca pri OD₆₅₀ je prikazana s črto, za vse vrednosti so podani standardni odkloni. Podatki so predstavljeni kot povprečje treh ločenih bioloških preizkusov. Vrednosti CFU so predstavljene z znanstvenim zapisom enote 1,00E+01, ki predstavlja 1×10^1 . Podatki označeni z zvezdico (*) predstavljajo signifikantno razliko med CFU vrednostmi sevov ($n=3$, $p<0,01$). (A) PS-1000 (ferotip 168) in PS-1011 (ferotip RO-H-1). (B) PS-1004 (ferotip RS-D-2) in PS-1011 (ferotip RO-H-1).

Priloga C: Deleži spor na 1 ml izhodne kulture posameznih rekombinantnih sevov v tekočem gojišču CM inkubiranem pri 37 °C s stresanjem. Podan je reprezentativen podatek enega eksperimenta od treh primerljivih ponovitev.

Sev	PS-1009	PS-1004	PS-1011	PS-1013	PS-1000
Delež spor / ml ob vstopu v stac. fazo rasti (%)	0	0	0	0	0
Delež spor / ml po 24 h inkub. (%)	0	0	0	0	0
Delež spor / ml po 48 h inkub. (%)	35,1	0,19	0,79	43,7	0,20

Priloga D: Vrednosti CFU rekombinantnih sevov z različnimi/enakimi ekotipi in različnimi/enakimi ferotipi v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA. Podane so vrednosti CFU posameznih sevov v kokulturi v določenem ciklu. V prvem stolpcu so podane kombinacije sevov v kokulturi v posameznem ciklu (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče CM po 48 urah), v drugem sklopu stolpcev so podane vrednosti CFU: posameznih sevov v kokulturi v treh bioloških ponovitvah (A, B, C), povprečna vrednost bioloških ponovitev in pripadajoči standardni odklon.

CFU (št.c./ml)					
inokulum	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
216 CFP	5,10E+06	4,90E+06	6,00E+06	5,33E+06	5,86E+05
216 YFP	4,30E+06	5,30E+06	4,40E+06	4,67E+06	5,51E+05
216 CFP	7,10E+06	8,10E+06	7,00E+06	7,40E+06	6,08E+05
210 YFP	6,70E+06	5,60E+06	5,50E+06	5,93E+06	6,66E+05
31 CFP	6,00E+06	3,00E+06	4,00E+06	4,33E+06	1,53E+06
210 YFP	7,20E+06	7,80E+06	6,30E+06	7,10E+06	7,55E+05
216 CFP	1,40E+06	3,30E+06	1,00E+06	1,90E+06	1,23E+06
209 YFP	4,90E+06	3,80E+06	4,90E+06	4,53E+06	6,35E+05
31 CFP	2,20E+06	1,60E+06	2,10E+06	1,97E+06	3,21E+05
209 YFP	4,20E+06	5,90E+06	5,40E+06	5,17E+06	8,74E+05
cikel 1	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
216 CFP	1,01E+08	2,60E+07	3,60E+07	5,43E+07	4,07E+07
216 YFP	4,00E+07	5,50E+07	1,60E+07	3,70E+07	1,97E+07
216 CFP	7,00E+07	4,10E+07	6,90E+07	6,00E+07	1,65E+07
210 YFP	5,50E+07	4,10E+07	2,60E+07	4,07E+07	1,45E+07
31 CFP	6,80E+07	8,30E+07	6,10E+07	7,07E+07	1,12E+07
210 YFP	9,70E+07	7,60E+07	6,30E+07	7,87E+07	1,72E+07
216 CFP	4,10E+05	2,80E+05	4,30E+05	3,73E+05	8,14E+04
209 YFP	1,03E+08	4,70E+07	7,20E+07	7,40E+07	2,81E+07
31 CFP	8,10E+05	6,90E+05	5,10E+05	6,70E+05	1,51E+05
209 YFP	5,10E+07	7,20E+07	6,60E+07	6,30E+07	1,08E+07
cikel 2	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
216 CFP	2,10E+08	4,30E+08	7,10E+08	4,50E+08	2,51E+08
216 YFP	4,00E+06	8,00E+06	3,00E+06	5,00E+06	2,65E+06
216 CFP	1,00E+09	1,50E+09	1,30E+09	1,27E+09	2,52E+08
210 YFP	5,00E+08	6,00E+08	6,70E+08	5,90E+08	8,54E+07
31 CFP	2,00E+08	1,89E+08	2,01E+08	1,97E+08	6,66E+06
210 YFP	1,11E+09	1,20E+09	1,50E+09	1,27E+09	2,04E+08
216 CFP	3,50E+03	1,61E+04	1,23E+04	1,06E+04	6,46E+03
209 YFP	4,00E+08	1,20E+08	3,30E+08	2,83E+08	1,46E+08
31 CFP	2,70E+03	2,60E+03	1,65E+04	7,27E+03	8,00E+03
209 YFP	8,10E+08	7,30E+08	1,05E+09	8,63E+08	1,67E+08

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga E: Vrednosti CFU rekombinantnih sevov z različnimi/enakimi ekotipi in različnimi/enakimi ferotipi v kokulturi, v tekočem gojišču MELASA. Podane so vrednosti CFU posameznih sevov v kokulturi v določenem ciklu. V prvem stolpcu so podane kombinacije sevov v kokulturi v posameznem ciklu (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče CM po 48 urah), v drugem sklopu stolpcev so podane vrednosti CFU: posameznih sevov v kokulturi v treh bioloških ponovitvah (A, B, C), povprečna vrednost bioloških ponovitev in pripadajoči standardni odklon.

	CFU (št.c./ml)				
cikel 3	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
216 CFP	2,00E+09	1,80E+09	3,00E+09	2,27E+09	6,43E+08
216 YFP	2,00E+08	1,20E+08	3,20E+08	2,13E+08	1,01E+08
216 CFP	9,60E+08	8,90E+08	8,80E+08	9,10E+08	4,36E+07
210 YFP	1,39E+09	1,60E+09	2,22E+09	1,74E+09	4,32E+08
31 CFP	6,70E+08	7,40E+08	7,50E+08	7,20E+08	4,36E+07
210 YFP	1,61E+09	1,21E+09	1,91E+09	1,58E+09	3,51E+08
216 CFP	3,00E+05	1,90E+05	1,80E+05	2,23E+05	6,66E+04
209 YFP	1,48E+09	2,01E+09	2,50E+09	2,00E+09	5,10E+08
31 CFP	1,70E+03	1,90E+03	1,20E+03	1,60E+03	3,61E+02
209 YFP	1,72E+09	2,21E+09	1,50E+09	1,81E+09	3,63E+08
cikel 4	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
216 CFP	1,35E+09	8,60E+08	1,58E+09	1,26E+09	3,68E+08
216 YFP	1,61E+07	1,01E+07	1,96E+07	1,53E+07	4,80E+06
216 CFP	2,98E+08	2,61E+08	2,84E+08	2,81E+08	1,87E+07
210 YFP	1,87E+09	1,54E+09	1,72E+09	1,71E+09	1,65E+08
31 CFP	2,93E+08	1,96E+08	2,98E+08	2,62E+08	5,75E+07
210 YFP	8,30E+08	5,50E+08	8,40E+08	7,40E+08	1,65E+08
216 CFP	8,00E+03	1,60E+04	1,40E+04	1,27E+04	4,16E+03
209 YFP	8,90E+08	5,10E+08	8,40E+08	7,47E+08	2,06E+08
31 CFP	2,00E+03	2,30E+03	1,80E+03	2,03E+03	2,52E+02
209 YFP	2,79E+08	2,90E+08	2,58E+08	2,76E+08	1,63E+07
cikel 5	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
216 CFP	4,80E+08	6,30E+08	8,90E+08	6,67E+08	2,07E+08
216 YFP	1,70E+06	4,00E+05	3,00E+06	1,70E+06	1,30E+06
216 CFP	2,11E+08	1,92E+08	2,05E+08	2,03E+08	9,71E+06
210 YFP	9,90E+08	1,85E+09	1,55E+09	1,46E+09	4,37E+08
31 CFP	2,33E+08	1,79E+08	1,68E+08	1,93E+08	3,48E+07
210 YFP	2,20E+09	2,60E+09	1,40E+09	2,07E+09	6,11E+08
216 CFP	2,00E+02	8,00E+02	1,30E+03	7,67E+02	5,51E+02
209 YFP	1,77E+09	2,00E+09	1,22E+09	1,66E+09	4,01E+08
31 CFP	1,70E+03	1,10E+03	1,60E+03	1,47E+03	3,21E+02
209 YFP	1,20E+09	1,32E+09	7,90E+08	1,10E+09	2,78E+08

Priloga F: Vrednosti CFU izogenih sevov z različnimi/enakimi ferotipi v kokulturi, v tekočem gojišču CM. Podane so vrednosti CFU posameznih sevov v kokulturi v določenem ciklu. V prvem stolpcu so podane kombinacije sevov v kokulturi v posameznem ciklu (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče CM po 48 urah), v drugem sklopu stolpcev so podane vrednosti CFU: posameznih sevov v kokulturi v treh bioloških ponovitvah (A, B, C), povprečna vrednost bioloških ponovitev in pripadajoči standardni odklon.

CFU (št.c./ml)					
inokulum	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	1,00E+06	1,20E+06	2,10E+06	1,43E+06	5,86E+05
1009	1,90E+06	1,30E+06	1,10E+06	1,43E+06	4,16E+05
1011	1,90E+06	1,20E+06	1,60E+06	1,57E+06	3,51E+05
1004	4,60E+06	4,20E+06	4,10E+06	4,30E+06	2,65E+05
1011	6,00E+05	1,60E+06	2,10E+06	1,43E+06	7,64E+05
1000	2,40E+06	3,40E+06	2,40E+06	2,73E+06	5,77E+05
1013	4,70E+06	3,30E+06	7,60E+06	5,20E+06	2,19E+06
1000	4,90E+06	3,10E+06	3,70E+06	3,90E+06	9,17E+05
cikel 1	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	1,00E+07	3,00E+07	1,00E+07	1,67E+07	1,15E+07
1009	1,00E+05	1,00E+06	2,00E+06	1,03E+06	9,50E+05
1011	1,50E+07	1,90E+07	2,80E+07	2,07E+07	6,66E+06
1004	3,90E+07	3,00E+07	3,10E+07	3,33E+07	4,93E+06
1011	4,10E+07	4,90E+07	3,80E+07	4,27E+07	5,69E+06
1000	8,20E+07	6,50E+07	6,20E+07	6,97E+07	1,08E+07
1013	2,50E+07	1,70E+07	1,70E+07	1,97E+07	4,62E+06
1000	5,20E+07	4,10E+07	5,10E+07	4,80E+07	6,08E+06
cikel 2	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	1,00E+06	2,00E+06	2,70E+07	1,00E+07	1,47E+07
1009	1,00E+06	0,00E+00	2,00E+06	1,00E+06	1,00E+06
1011	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	0,00E+00
1004	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	0,00E+00
1011	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	0,00E+00
1000	2,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,33E+06	5,77E+05
1013	2,00E+06	1,00E+06	3,00E+06	2,00E+06	1,00E+06
1000	1,10E+07	9,00E+06	9,00E+06	9,67E+06	1,15E+06
cikel 3	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	1,01E+07	2,34E+07	1,60E+07	1,65E+07	6,66E+06
1009	1,00E+06	4,00E+06	2,10E+06	2,37E+06	1,52E+06
1011	7,80E+06	3,00E+07	1,01E+07	1,60E+07	1,22E+07
1004	7,00E+05	1,00E+05	7,00E+05	5,00E+05	3,46E+05
1011	3,90E+06	2,33E+07	3,00E+07	1,91E+07	1,36E+07
1000	3,00E+05	7,00E+05	4,00E+05	4,67E+05	2,08E+05
1013	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	0,00E+00
1000	1,67E+07	1,16E+07	2,57E+07	1,80E+07	7,14E+06

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga G: Vrednosti CFU izogenih sevov z različnimi/enakimi ferotipi v kokulturi, v tekočem gojišču CM. Podane so vrednosti CFU posameznih sevov v kokulturi v določenem ciklu. V prvem stolpcu so podane kombinacije sevov v kokulturi v posameznem ciklu (vsak cikel predstavlja točko reinokulacije v sveže gojišče CM po 48 urah), v drugem sklopu stolpcev so podane vrednosti CFU: posameznih sevov v kokulturi v treh bioloških ponovitvah (A, B, C), povprečna vrednost bioloških ponovitev in pripadajoči standardni odklon.

CFU (št.c./ml)					
cikel 4	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	2,90E+07	3,00E+07	2,04E+07	2,65E+07	5,28E+06
1009	6,80E+06	2,89E+07	1,01E+07	1,53E+07	1,19E+07
1011	2,15E+07	2,54E+07	3,00E+07	2,56E+07	4,25E+06
1004	1,40E+06	5,00E+05	8,00E+05	9,00E+05	4,58E+05
1011	1,36E+07	3,00E+07	2,00E+07	2,12E+07	8,27E+06
1000	7,00E+06	3,10E+06	1,30E+06	3,80E+06	2,91E+06
1013	4,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,33E+05	2,31E+05
1000	2,30E+07	7,00E+06	3,00E+07	2,00E+07	1,18E+07
cikel 5	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	3,10E+06	1,00E+05	2,30E+06	1,83E+06	1,55E+06
1009	4,00E+05	0,00E+00	2,00E+05	2,00E+05	2,00E+05
1011	1,04E+07	6,30E+06	8,00E+06	8,23E+06	2,06E+06
1004	3,20E+05	9,00E+05	5,20E+05	5,80E+05	2,95E+05
1011	2,40E+06	8,60E+06	5,20E+06	5,40E+06	3,10E+06
1000	1,31E+07	1,50E+07	6,60E+06	1,16E+07	4,40E+06
1013	2,50E+04	1,00E+04	3,00E+03	1,27E+04	1,12E+04
1000	1,08E+07	1,15E+07	3,00E+07	1,74E+07	1,09E+07
cikel 6	A	B	C	POVPREČJE A, B, C	STDEV
1011	2,81E+06	1,70E+06	3,00E+06	2,50E+06	7,02E+05
1009	9,80E+05	1,06E+06	1,15E+06	1,06E+06	8,50E+04
1011	2,50E+06	2,80E+06	6,70E+05	1,99E+06	1,15E+06
1004	2,70E+04	3,90E+05	3,00E+06	1,14E+06	1,62E+06
1011	1,00E+06	1,18E+07	2,08E+07	1,12E+07	9,91E+06
1000	1,68E+07	1,68E+07	9,70E+06	1,44E+07	4,10E+06
1013	3,00E+03	2,01E+03	5,90E+02	1,87E+03	1,21E+03
1000	2,30E+07	6,60E+06	8,20E+06	1,26E+07	9,04E+06