

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jerneja PLANINC

**GENOTIPSKA IN FENOTIPSKA
KARAKTERIZACIJA NABREŽNIH IZOLATOV
*Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jerneja PLANINC

**GENOTIPSKA IN FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA NABREŽNIH
IZOLATOV *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF
Bacillus subtilis RIVERBANK ISOLATES**

M.SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorico prof. dr. Nives Ogrinc in za recenzentko doc. dr. Blagajana Herzog-Velikonja.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentorica: prof. dr. Nives Ogrinc

Recenzentka: doc. dr. Blagajana Herzog-Velikonja

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Članica: prof. dr. Nives OGRINC
Ljubljana, Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG-VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Jerneja Planinc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.22/.26:579.852.11:577.2.083(043)=163.6
KG	<i>Bacillus subtilis</i> / rojenje / medsebojno prepoznavanje / Dienesova linija / ekotipi / ferotipi / biosurfaktanti / hemolitična aktivnost / BOX-PCR
AV	PLANINC, Jerneja, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	MANDIČ-MULEC, Ines (mentorica)/OGRINC, Nives (somentorica)/HERZOG-VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	GENOTIPSKA IN FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA NABREŽNIH IZOLATOV <i>Bacillus subtilis</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 56 str., 7 pregl., 9 sl., 5 pril., 78 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Za bakterije vrste <i>Bacillus subtilis</i> je značilna velika raznolikost tako na nivoju filogenije kot tudi v fenotipskih lastnostih. Predhodni preizkusi so pokazali, da nabrežni sevi <i>B. subtilis</i> , izolirani iz talnega mikrookolja, pripadajo različnim ekotipom, komunikacijskim skupinam oziroma ferotipom ter na poltrdnem gojišču med sabo tvorijo različne vzorce prepoznavanja: zlitje, stik in prosojno mejno linijo. Namen pričujočega dela je bil bolj podrobno raziskati ali obstajajo povezave med vzorci medsebojnega prepoznavanja roječih bakterij in ostalimi lastnostmi sevov (ekotipi, ferotipi, profili BOX-PCR, relativno količino hemolitičnih biosurfaktantov). Ugotovili smo, da nabrežni izolati vključeni v to raziskavo, na poltrdnem gojišču tvorijo 4 vzorce medsebojnega prepoznavanja: zlitje, stik, širšo neprosojno mejno cono in prosojno cono, ki spominja na lizo. Ugotovili smo, da večina sevov ob stiku tvori prosojno mejno cono (v 73 od 105 kombinacij), nekateri tudi široko morfološko opazno mejno linijo in stik, medtem ko do zlitja pride predvsem med roji istega seva. Med različnimi sevi se je zlitje pojavilo le v 4 od 105 kombinacij. Vzorec medsebojnega prepoznavanja in ostale spremenljivke (ekotip/ferotip) niso korelirali. Vsi nabrežni izolati so v tekočem gojišču B imeli hemolitično aktivnost, v gojišču LB pa nobeden izmed testiranih sevov ni kazal te aktivnosti. Stopnja hemolize je bila torej odvisna od sestave gojišča. Pokazali smo tudi, da je metoda BOX-PCR primerna za ločevanje ozko sorodnih sevov <i>B. subtilis</i> , vendar skupine, ki smo jih dobili na podlagi te metode, ne korelirajo z ekotipi in z vzorci medsebojnega prepoznavanja. Tudi hemolitična aktivnost (oz. tvorba biosurfaktantov) ni bila direktno povezana z vrsto mejne linije saj sta RO-FF-1 (ni hemolize) in PS-108 (maksimalna hemoliza) tvorila z ostalimi sevi prosojno in izrazito mejno linijo.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 579.22/.26:579.852.11:577.2.083(043)=163.6

CX *Bacillus subtilis* / swarming / recognition patterns / Dienes line / ecotypes / pherotypes / biosurfactants / hemolytic activity / BOX-PCR

AU PLANINC, Jerneja

AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/OGRINC, Nives (co-advisor)/HERZOG-VELIKONJA, Blagajana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2014

TI GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Bacillus subtilis* RIVERBANK ISOLATES

DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XI, 56 p., 7 tab., 9 fig., 5 ann., 78 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Isolates of *Bacillus subtilis* are known for their high phylogenetic and phenetic diversity and even microscale *B. subtilis* strains isolated from the same soil aggregate belong to three different ecotypes and three communication groups (pherotypes). Previous experiments indicated that microscale isolates also form specific recognition patterns between two swarming colonies on semi-solid medium which were defined as a fusion (merging of the swarms), a recognisable contact line and a transparent boarder line. The aim of this work was to further investigate the recognition patterns of *B. subtilis* swarms and correlate them with other characteristics of the strains such as ecotypes, pherotypes, BOX-PCR genotypes and production of hemolytic biosurfactants, known to be important for swarming. In this work we identified 4 different recognition patterns between two swarming colonies: a fusion, a distinct contact line, a wide non-transparent boarder line and a transparent boarder line, reminiscent of the cell lysis. A majority of tested isolates formed the transparent boarder line (in 73 out of 105 combinations), while swarms of the same strain always merged into one common colony. Different isolates merged together in only 4 out of 105 combinations. The remaining pairs formed either a narrow or a broad contact line. Recognition patterns did not correlate with ecotype or pherotype groups. All riverbank isolates had hemolytic activity in liquid B medium, but we did not notice any hemolytic activity of the strains tested in LB medium. The results also revealed that BOX-PCR genotyping differentiates between highly related *B. subtilis* isolates, but the identified BOX similarity clusters did not correlate with ecotype groups or recognition patterns. Hemolytic activity (biosurfactant synthesis) was also not directly connected to recognition pattern since both, RO-FF-1 (no hemolysis) and PS-108 (maximum hemolysis) formed a transparent, well-defined line with other isolates tested.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN IN NAČRT DELA	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 CELIČNA DIFERENCIACIJA <i>B. subtilis</i>	4
2.2 DIENESOV FENOMEN	5
2.2.1 Kaj omogoča medsebojno prepoznavanje bakterij?	5
2.3 QUORUM SENSING.....	7
2.3.1 Razvoj kompetence pri <i>B. subtilis</i>	7
2.3.2 Polimorfizem lokusa <i>comQXP'</i>	8
2.4 BIOSURFAKTANTI.....	8
2.5 ROJENJE.....	9
2.6 EKOLOŠKA DIVERZITETA VRST IZ RODU <i>Bacillus</i>	10
2.6.1 Raznolikost <i>B. subtilis</i> v mikrookolju tal.....	11
2.7 DOLOČANJE SORODNOSTI BAKTERIJSKIH VRST	12
2.7.1 Metode rep-PCR.....	13
2.7.2 Zaporedja BOX kot orodje za genotipizacijo	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Bakterijski sevi.....	15
3.1.2 Kemikalije	16
3.1.3 Pufri in raztopine.....	16
3.1.4 Gojišča	17

3.1.5	Laboratorijska oprema	18
3.2	METODE.....	19
3.2.1	Fenotipska karakterizacija <i>B. subtilis</i>.....	19
3.2.1.1	Priprava prekonočnih kultur	19
3.2.1.2	Priprava poltrdnih gojišč in nanašanje sevov <i>B. subtilis</i> na plošče.....	19
3.2.1.3	Analiza medsebojnega prepoznavanja sorodnih sevov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B	20
3.2.1.4	Priprava izrabljenih gojišč B.....	21
3.2.1.5	Priprava izrabljenih gojišč LB	21
3.2.1.6	Priprava eritrocitov	22
3.2.1.7	Hemolitični test.....	22
3.2.1.8	Normalizacija optične gostote	22
3.2.1.9	Izračun hemolitične aktivnosti.....	23
3.2.2	Genotipska karakterizacija <i>B. subtilis</i>	24
3.2.2.1	DNA sevov <i>B. subtilis</i>	24
3.2.2.2	Reagenti in začetni oligonukleotidi za BOX-PCR	24
3.2.2.3	Pogoji za BOX-PCR	25
3.2.2.4	Agarozna gelska elektroforeza.....	25
3.2.2.5	Analiza slik	25
4	REZULTATI	26
4.1	FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA	26
4.1.1	Rast in medsebojno prepoznavanje sorodnih izolatov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B	26
4.1.2	Vzorci medsebojnega prepoznavanja izolatov <i>B. subtilis</i> glede na njihovo pripadnost ferotipu ali ekotipu	28
4.1.3	Delež vzorcev medsebojnega prepoznavanja izolatov <i>B. subtilis</i> glede na njihovo pripadnost ferotipom in ekotipom	30
4.1.4	Hemolitična aktivnost izolatov <i>B. subtilis</i>	32
4.1.4.1	Hemolitična aktivnost izolatov <i>B. subtilis</i> v tekočem gojišču B	32
4.1.4.2	Hemolitična aktivnost izolatov <i>B. subtilis</i> v tekočem gojišču LB.....	34
4.2	GENOTIPIZACIJA <i>B. subtilis</i> IN <i>B. amyloliquefaciens</i>	35
4.2.1	Analiza profilov BOX-PCR	35
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	39
5.1	RAZPRAVA	39
5.1.1	Vzorci medsebojnega prepoznavanja izolatov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B	39
5.1.2	Hemolitična aktivnost <i>B. subtilis</i>	40

5.1.3	Genotipizacija nabrežnih in puščavskih izolatov z BOX-PCR	42
5.1.4	Povezava med genotipskimi in fenotipskimi lastnostmi nabrežnih izolatov <i>B. subtilis</i>	43
5.2	SKLEPI.....	45
6	POVZETEK.....	46
7	VIRI.....	48

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bakterijski sevi, uporabljeni v magistrski nalogi.	15
Preglednica 2: Simboli in pripadajoči kriteriji medsebojnega prepoznavanja sevov na poltrdnem gojišču B.	20
Preglednica 3: Reagenti in njihova koncentracija v reakcijski mešanici za PCR (25 µl).	24
Preglednica 4: Vzorci medsebojnega prepoznavanja izolatov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B glede na ferotip.....	29
Preglednica 5: Vzorci medsebojnega prepoznavanja izolatov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B glede na ekotip.	29
Preglednica 6: Delež vzorcev medsebojnega prepoznavanja med sevi iz istih ali različnih ferotipov.	31
Preglednica 7: Delež vzorcev medsebojnega prepoznavanja med sevi iz istih ali različnih ekotipov.	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Celična diferenciacija <i>B. subtilis</i> (Lopez in sod., 2009).	4
Slika 2: Dienesov test, ki prikazuje tri različne seve <i>P. mirabilis</i> (A, B, C). Isti sevi se med sabo zlivajo, med različnimi pa se tvori Dienesova linija (Pfaller in sod., 2000).	5
Slika 3: Shema genotipizacije bakterijskih vrst z metodami rep-PCR (Versalovic in sod., 1994).	13
Slika 4: Shema označevanja plošč (primer za seve PS-108, PS-24 in PS-15).	19
Slika 5: Primeri rasti in vzorcev medsebojnega prepoznavanja izolatov <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B.	27
Slika 6: Mreža interakcij nabrežnih (številke) in puščavskega (FF1) seva <i>B. subtilis</i> na poltrdnem gojišču B.	30
Slika 7: Relativna hemolitična aktivnost nabrežnih (PS) in puščavskega izolata <i>B. subtilis</i> (RO-FF-1) v gojišču B.	33
Slika 8: Odstotek hemolize nabrežnih (PS) in puščavskega izolata <i>B. subtilis</i> (RO-FF-1) v gojišču LB.	34
Slika 9: Profili BOX-PCR (B) in drevo podobnosti, izrisano na podlagi profilov BOX-PCR (A).	38

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rastna krivulja sevov PS-218, PS-52 in PS-216.

Priloga B: Normalizacija optične gostote.

Priloga C: Matrika s prikazanimi odstotki podobnosti v razporeditvi ponavljajočih se zaporedij med BOX elementi.

Priloga D: Primerjava relativne hemolitične aktivnosti izrabljenih gojišč B, odvzetih 2 (T2) oziroma 4 (T4) ure po prehodu v stacionarno fazo rasti.

Priloga E: T-statistika, s katero smo preverjali signifikantnost razlik v hemolitični aktivnosti med posameznimi izolati.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S rRNA	ribonukleinska kislina male podenote ribosoma (ang. small subunit ribosomal ribonucleic acid)
AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (ang. amplified fragment length polymorphism)
ARDRA	analiza pomnožene ribosomske DNA (ang. amplified ribosomal DNA restriction analysis)
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat (ang. deoxynucleotid triphosphate)
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
ERIC	enterobakterijska ponavljajoča medgenska skupna zaporedja (ang. enterobacterial repetitive intergenic consensus)
kDa	kilodalton
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
QS	mehanizem zaznavanja celične gostote ali kvoruma (ang. quorum sensing)
RAPD	tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (ang. random amplified polymorphic DNA)
REP	ponavljajoča zunajgenska palindromska zaporedja (ang. repetitive extragenic palindromic)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. restriction fragment length polymorphism)
rpm	obrati na minuto (ang. rounds per minute)
TAE	tris baza-acetat-EDTA
tris	tris(hidroksimetil)aminometan

1 UVOD

Bacillus subtilis je eden najbolj poznanih in preučevanih po Gramu pozitivnih mikroorganizmov, ki pogosto predstavlja model za diferenciacijske, metabolne in regulacijske procese pri pokariontih (Sonensheim in sod., 2002). Je aerobna ali fakultativno anaerobna, paličasta bakterija, ki so jo osamili iz različnih, tako vodnih kot tudi kopenskih okolij (Earl in sod., 2008). Prisotnost *B. subtilis* so dokazali tudi v prebavnem traktu mnogih sesalcev (Tam in sod., 2006). Ubikvitarnost *B. subtilis* lahko razložimo s sposobnostjo tvorbe dormantnih endospor, ki se zlahka širijo z vetrom po zraku in na ta način prepotujejo dolge razdalje. Literatura največkrat opisuje *B. subtilis* kot bakterijo, izolirano iz tal (Earl in sod., 2008). Za izolate *B. subtilis* je značilna velika raznolikost tako na nivoju genoma kot tudi v sami fiziologiji. Neverjetna narava *B. subtilis* se kaže v njegovi sposobnosti diferenciacije v različne celične tipe, ki verjetno povečajo njegovo preživetje v različnih okoljskih razmerah (Lopez in sod., 2009).

Prepoznavanje med istimi ali različnimi sevi je oblika teritorialnega vedenja. Približno 60 let nazaj je Louis Dienes ugotovil, da se identični sevi roječe vrste *Proteus mirabilis* med sabo prepoznavajo, kar na gojišču opazimo kot zlitje dveh sevov, različni pa med sabo tvorijo mejno črto (Dienes, 1946). Takšno obnašanje kaže na to, da so populacije *P. mirabilis* sposobne razlikovati lastno od tujega. Črto, ki se pojavi med dvema različnima sevoma so kasneje po odkritelju poimenovali Dienesova linija, test s katerim si še danes pomagajo pri identifikaciji kliničnih izolatov *P. mirabilis* pa se imenuje Dienesov test. Za nastanek Dienesove linije je nujno potreben stik dveh sevov (Budding in sod., 2009). Pri medsebojnem prepoznavanju izolatov *P. mirabilis* igrajo glavno vlogo geni lokusov *ids*, *idr* in *tss* (Gibbs in sod., 2008; Wenren in sod., 2013). Lokus *tss* kodira aparat za izločanje tipa VI, ki omogoča transport proteinov Ids in Idr.

Predhodni poskusi v naših laboratorijih so pokazali, da so tudi sevi *B. subtilis* sposobni takšnega socialnega vedenja na poltrdnih gojiščih, po katerih se premikajo v rojih. Tako se roji nekaterih sevov med sabo prepoznavajo in zlijejo v skupen roj, drugi pa ob stiku tvorijo različne vzorce neprepoznavanja (Benigar, 2011). Ob tem se postavljajo vprašanja: kateri geni in mehanizmi so odgovorni za takšen način socialnega vedenja *B. subtilis*? Ali

sposobnost prepoznavanja med sevi predstavlja pomembno kompetitivno prednost v določenem ekosistemu? V okviru magistrske naloge smo se vprašali, ali že določene ekotipske in ferotipske lastnosti igrajo vlogo pri prepoznavanju med sevi *B. subtilis*. Za *B. subtilis* je značilen mehanizem zaznavanja celične gostote ali kvoruma (ang. quorum sensing, QS), s katerim uravnavajo številne procese, kot so kemotaksa, produkcija antibiotikov, bakteriocinov, protimikrobnih peptidov, zunajceličnih encimov, rojenje, sporulacija in kompetenca (Dogša in sod., 2014). Sistem QS, s katerim *B. subtilis* uravnava kompetenco, kodira lokus *comQXPA*. Za lokus je značilna velika stopnja polimorfizma, na podlagi katerega se sevi *B. subtilis* delijo v različne komunikacijske skupine ali ferotipe. Pripadniki istega ferotipa med sabo uspešno komunicirajo, medtem ko komunikacija med različnimi ferotipi ni mogoča ali pa je oslABLJENA (Tran in sod., 2000; Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009; Štefanič in sod., 2012). *B. subtilis* poleg kompetence z lokusom *comQXPA* uravnava tudi tvorbo cikličnega lipopeptida – surfaktina, ki ima različne biološke aktivnosti. Poleg surfaktina *B. subtilis* sintetizira še nekatere druge surfaktante, med katere spadajo fengicini in iturini, s podobnimi značilnostmi, med katerimi je tudi sposobnost razgradnje eritrocitov ali hemolitična aktivnost (Ongena in Jacques, 2007). S sintezo surfaktina sevi *B. subtilis* znižujejo površinsko napetost in si na ta način pomagajo pri rojenju in iskanju novih hranil (Kearns, 2010).

Znotraj vrste *B. subtilis* se pojavlja velika ekološka raznolikost. Štefanič in sod. (2012) so pokazali, da do ekološke diverzifikacije *B. subtilis* ne prihaja le med sevi, ki zasedajo popolnoma različne ekosisteme, temveč tudi med tistimi, ki se nahajajo v mikrookolju istega ekosistema. Na podlagi analize zaporedij gospodinjskih genov *rpoB*, *dnaJ* in *gyrA* so 39 sevov, izoliranih iz dveh vzorcev kubičnega centimetra tal nabrežja reke Save, razvrstili v tri ekološko različne skupine ali ekotipe.

1.1 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen magistrskega dela je bil fenotipsko in genotipsko okarakterizirati izolate *B. subtilis*, izolirane iz dveh vzorcev kubičnega centimetra tal nabrežja reke Save (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Nabrežne izolate so že predhodno delno analizirali in pokazali, da jih lahko

razdelimo v tri ekotipe in tri ferotipe (Štefanič in sod., 2012). Pokazali so tudi, da na poltrdnem gojišču med sabo tvorijo različne vzorce prepoznavanja (Benigar, 2011). V magistrskem delu smo nabrežne seve dodatno analizirali in sicer smo določali vzorce medsebojnega prepoznavanja rojev nabrežnih sevov na poltrdnem gojišču B, v povezavi z njihovo pripadnostjo določenemu ekotipu ali ferotipu, ugotavljali smo tudi njihovo sposobnost tvorbe biosurfaktantov, za katere je znano, da so pomembni za rojenje. Z metodo BOX-PCR smo dodatno določili genotipe izbranih izolatov. Zanimalo nas je, ali je ta metoda primerna za razlikovanje zelo ozko sorodnih nabrežnih izolatov *B. subtilis*.

Hipoteze:

- Na poltrdnem gojišču se bodo med manj podobnimi sevi (razlika v ekotipu, ferotipu ali obeh lastnostih) pojavile mejne cone (Dienesove linije), med bolj podobnimi sevi pa linij ne bomo opazili, temveč se bosta dva roja združila v enoten roj.
- Vsi izolati *B. subtilis* bodo izkazovali hemolitično aktivnost, vendar bo ta različno intenzivna pri različnih sevih in v različnih gojiščih.
- Nabrežne seve bomo z metodo BOX-PCR lahko razlikovali med sabo in jih razvrstili v več ločenih skupin, ki bodo korelirale z ekotipskimi skupinami, določenimi na podlagi zaporedij gospodinjskih genov.

Načrt dela:

Z gojenjem na poltrdnem gojišču B določiti vzorce medsebojnega prepoznavanja nabrežnih izolatov.

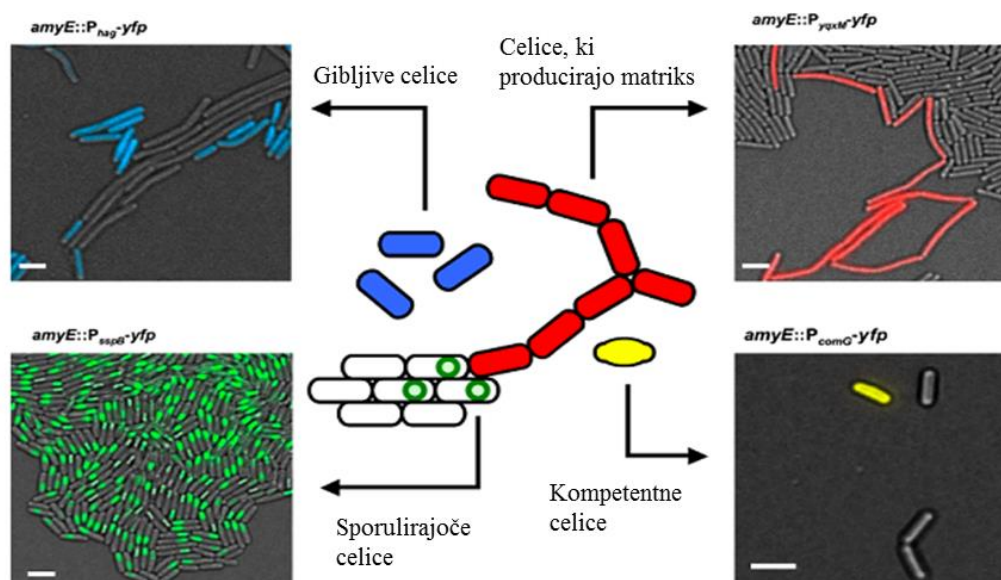
Z izvedbo hemolitičnega testa za izbrane seve ovrednotiti količino metabolitov s hemolitično aktivnostjo.

Genotipizacija nabrežnih izolatov *B. subtilis* z metodo BOX-PCR.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELIČNA DIFERENCIACIJA *B. subtilis*

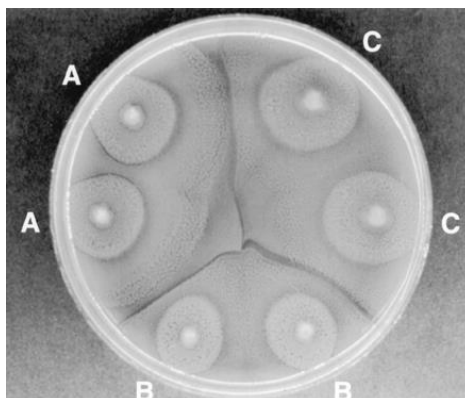
Genetsko identične celice znotraj populacije *B. subtilis* so se kot odziv na različne okoljske razmere sposobne diferencirati v različne celične tipe (Lopez in sod., 2009). Ob vstopu v stacionarno fazo rasti začnejo celice *B. subtilis* izražati gene, ki jim omogočajo preživetje ob pomanjkanju hranil (Lazzazera, 2000). Določen delež celic postane kompetentnih, del populacije pa se lahko diferencira v dormantne endospore, odporne proti stresnim okoljskim dejavnikom (Dubnau, 1991; Piggot in Hilbert, 2004). Podpopulacija celic lahko producira toksine, s katerimi uniči celice, ki še niso začele sporulirati in na ta način dobi hrano ter preloži svoj vstop v sporulacijo (Gonzalez-Pastor in sod., 2003). Četrty celični tip predstavljajo celice, ki s produkcijo zunajceličnega matrkisa tvorijo biofilm (Vlamakis in sod., 2008). *B. subtilis* je sposoben diferenciacije tudi med eksponentno fazo rasti, ko določen delež populacije tvori bičke in postane gibljiv (Kearns in sod., 2005) (slika 1).



Slika 1: Celična diferenciacija *B. subtilis*. (Lopez in sod., 2009).

2.2 DIENESOV FENOMEN

Že leta 1946 je Louis Dienes ugotovil, da različni klinični izolati roječe bakterije *P. mirabilis* na agarškem gojišču med sabo tvorijo očitno ločene meje, ki so jih kasneje po odkritelju poimenovali Dienesove linije. Metoda, s katero preverjamo takšen način obnašanja na poltrdnih gojiščih, se imenuje Dienesov test (Senior, 1977). Ta se še danes uporablja pri tipizaciji kliničnih izolatov *P. mirabilis*, predstavlja pa tudi dobro komplementarno orodje pri karakterizaciji medicinsko ravno tako pomembnih izolatov iz vrste *Pseudomonas aeruginosa* (Munson in sod., 2002). Na podlagi Dienesovega testa lahko različne seve razdelimo v tako imenovane Diene tipe. Sevi istega Dienega tipa se med sabo zlivajo, pripadniki različnih Dienih tipov pa tvorijo med sabo Dienesovo linijo (Pfaller in sod., 2000) (slika 2).



Slika 2: Dienesov test, ki prikazuje tri različne seve *P. mirabilis* (A, B, C). Isti sevi se med sabo zlivajo, med različnimi pa se tvori Dienesova linija (Pfaller in sod., 2000).

2.2.1 Kaj omogoča medsebojno prepoznavanje bakterij?

Mnogi klinični izolati *P. mirabilis* izločajo proticine, to so proteini, s katerimi uničujejo občutljive seve. Posamezen sev *P. mirabilis* lahko identificiramo glede na proticine, ki jih izloča, in na proticine, za katere so občutljivi. Dienesove linije se tvorijo med roječimi sevi, ki se razlikujejo v produkciji proticinov in občutljivosti za njih (Senior, 1977). Kljub temu se mejna linija pojavlja tudi med sevi, ki ne producirajo proticinov. Sinteza in

občutljivost za proticine torej nista odgovorna za nastanek Dienesove linije (Gibbs in sod., 2008).

Gibbs in sod. (2008) so z naključno transpozonsko mutagenozo ustvarili 3600 mutant seva *P. mirabilis* BB2000 in odkrili mutanto, ki je tvorila Dienesovo linijo s starševskim (nemutiranim) sevom, ki drugače sam s sabo ne tvori mejne linije. Zaporedje, kamor se je vstavil transpozon, so primerjali z zaporedjem seva *P. mirabilis* HI4320 in ugotovili, da je za prepoznavanje med izolati odgovoren operon *idsABCDEF*. Homologen lokus so našli tudi pri sevu BB2000. Izražanje operona *ids* je najvišje v pozni logaritemski in zgodnji stacionarni fazi rasti (Gibbs in sod., 2011).

S konstrukcijo plazmidov, ki so vsebovali DNA z okvarjenimi posameznimi geni tega lokusa, so ugotavljali, kakšna je vloga posameznih genov pri prepoznavanju istih izolatov *P. mirabilis*. Ugotovili so, da so za zlitje pomembni geni *idsB*, *idsC*, *idsD*, *idsE* in *idsF*, saj so sevi z delecijami teh genov tvorili mejno linijo z divjim tipom. Sev, ki je vseboval delecijo gena *idsA* se je zlil s starševskim sevom, kar kaže na to, da gen *idsA* ni nujen za prepoznavanje s starševskim sevom. Gena *idsD* in *idsE* nosita zapis za lastnosti, ki določajo prepoznavanje med genetsko identičnimi sevi in se med sevi iste vrste razlikujeta v zaporedju aminokislin. Med sevi z delecijo *idsD* ali *idsE* in drugače genetsko identičnim starševskim sevom je nastala Dienesova linija, ki se je tvorila tudi, če so v seve z omenjenima delecijama vstavili zapis *idsD* in/ali *idsE* tujega seva. V nasprotju pa geni *idsA*, *idsB*, *idsC* in *idsF* niso specifični za sev, saj nadomestitev teh genov z enakimi geni iz drugega seva ni vplivala na nastanek Dienesove linije. Opazili so tudi, da se med diploidnim sevom BB2000, ki vsebuje celoten lokus HI4320 *idsA-F* in diploidnim sevom HI4320, ki nosi celoten lokus BB2000 *idsA-F* tvori mejna linija. S tem so pokazali, da lokus *idsA-F* najverjetneje ni edini, ki določa nastanek Dienesove linije med različnimi sevi (Gibbs in sod., 2008). Kasneje so ugotovili, da sta poleg operona *ids* v prepoznavanje sevov *P. mirabilis* vpletena še lokusa *tss* in *idr*. Lokus *idr* kodira proteine, ki so potrebni za zlitje z genetsko identičnim sevom, v nasprotju z geni *ids* pa je lokus *idr* nepogrešljiv tudi pri prepoznavanju in kompeticiji z genetsko različnimi sevi. Lokus *tss* nosi zapis za izlivni sistem tipa VI, ki je odgovoren za transport proteinov Ids in Idr iz celice (Wenren in sod., 2013).

Predhodni poskusi v naših laboratorijih so pokazali, da so tudi ozko sorodni nabrežni sevi *B. subtilis* sposobni na poltrdnih gojiščih med sabo tvoriti različne vzorce prepoznavanja, med katerimi je tudi mejna linija, ki spominja na Dienesovo linijo (Benigar, 2006). Mehanizmi za takšen način vedenja zaenkrat še ostajajo nepoznani.

2.3 QUORUM SENSING

QS je regulatorni mehanizem, s katerim se mnoge bakterijske vrste odzivajo na spremembe v gostoti celične populacije. Bakterije v okolje izločajo majhne signalne molekule ali feromone, ki se akumulirajo ob povečani celični gostoti in tako sprožijo različne prilagoditvene procese (Lazzazera, 2000). Feromoni pri po Gramu negativnih bakterijah so v večini N-acil homoserin laktoni, pri po Gramu pozitivnih pa običajno posttranslacijsko modificirani peptidi (Miller in Bassler, 2001). *B. subtilis* s sistemom QS uravnava številne, neodvisne procese, kot so tvorba biofilma, rojenje, produkcija razgradnih encimov in produkcija protimikrobnih peptidov. S sistemom QS uravnava tudi izražanje genov, ki sodelujejo pri razvoju kompetentnih celic, sposobnih privzema proste DNA in dormantnih spor, sposobnih preživetja neugodnih okoljskih razmer (Magnuson in sod., 1994).

2.3.1 Razvoj kompetence pri *B. subtilis*

Kompetenca je sposobnost privzema proste DNA iz okolja. Bakterije *B. subtilis* so naravno kompetentne. Pomemben dejavnik za razvoj kompetence je koncentracija dostopnih hranil. Običajno kompetentne celice *B. subtilis* pripravljamo v minimalnem gojišču z glukozo kot edinim virom ogljika, kjer celice dosežejo maksimalno stopnjo kompetence 2 uri po vstopu v stacionarno fazo rasti. Zanimivo je, da le delež celic (10-20 %) populacije postane kompetentnih (Dubnau, 1991). Ta bistabilnost (dve stabilni stanji v populaciji) je posledica avtoregulacije glavnega transkripcijskega regulatorja kompetence, ComK in stohastičnosti transkripcije (Maamar in Dubnau, 2005). Pri tem ima odločilno vlogo tudi fosforiliran Spo0A, ki sproži povečano transkripcijo *comK* v začetku stacionarne faze (Mirouze in sod, 2012). Za razvoj kompetence pri *B. subtilis* je potrebno usklajeno delovanje velikega števila proteinov, ki so aktivni le, ko gostota populacije doseže kritično koncentracijo (Solomon in Grossman, 1996).

Razvoj kompetence pri *B. subtilis* je tudi uravnan s sistemom QS, ki ga kodira operon *comQXPA*. Kot odziv na povišano gostoto celične populacije med eksponentno fazo *B. subtilis* sintetizira feromon ComX, ki ga ComQ modificira v krajši peptid (Magnuson in sod., 1994). Ta se veže na membransko histidin-kinazo ComP in sproži njeno avtofosforilacijo ter prenos fosfata na odzivni regulator ComA (Piazza in sod., 1999). Fosforiliran ComA aktivira transkripcijo operona *srfA*, ki vsebuje gen *comS*. ComS aktivira transkripcijo glavnega transkripcijskega regulatorja kompetence (ComK) in poznih kompetenčnih genov (D'Souza in sod., 1994).

2.3.2 Polimorfizem lokusa *comQXP'*

Za okoljske izolate *B. subtilis* je značilna visoka stopnja polimorfizma lokusa QS. Polimorfizem obsega gene *comQ*, *comX* in N-terminalni del gena *comP*, kar kaže na njihovo koevolucijo (Tortosa in sod., 2001). Z določanjem zaporedij so pokazali, da imajo sevi *B. subtilis* manj kot 60-odstotno podobnost zaporedij teh genov (Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in sod., 2012). Na podlagi analiz zaporedij posameznih genov lokusa *comQXP'* in testiranja odziva na signalne molekule, so izolate *B. subtilis* razdelili v 4 skupine. Pokazali so, da se predstavniki iste skupine (ferotipa) lahko odzivajo na medsebojne signale, medtem ko komunikacija med pripadniki različnih ferotipov ni mogoča ali pa je izrazito šibkejša. V zelo redkih primerih namreč prihaja do navzkrižne komunikacije med pripadniki različnih ferotipov, vendar je v teh primerih odziv na signal signifikantno nižji (Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002, Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Večinoma velja, da sevi različnih ferotipov med sabo ne komunicirajo in s tem omejujejo komunikacijo med sevi ene vrste. Po drugi strani pa imajo sevi različnih vrst, recimo *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens*, lahko enak ferotip in si informacije izmenjujejo (Štefanič in sod., 2012).

2.4 BIOSURFAKTANTI

Z analizo genoma so pokazali, da približno 4 % celotnega genoma *B. subtilis* predstavljajo geni, odgovorni za sintezo sekundarnih metabolitov (Earl in sod., 2008). *B. subtilis* poleg razvoja kompetence z lokusom *comQXPA* uravnava tudi neribosomsko sintezo

pomembnega lipopeptidnega antibiotika - surfaktina (Nakano in sod., 1991). Fosforiliran ComA namreč z vezavo na promotor operona *srfA*, aktivira gene, ki nosijo zapis za surfaktin sintazo. Ta je sestavljena iz štirih podenot, ki sodelujejo pri povezavi 7 aminokislin v ciklično heptapeptidno molekulo surfaktina (Seydlová in Svobodová, 2008). Podenote SrfA (402 kDa), SrfB (401 kDa) in SrfC (144 kDa) imajo encimsko aktivnost, podenota SrfD (44 kDa) pa igra pomembno vlogo pri začetni stopnji sinteze surfaktina (Cosmina in sod., 1993; Seydlová in Svobodová, 2008).

Surfaktin kaže dober potencial uporabe v biotehnologiji in ekologiji. Pokazali so, da uspešno deluje pri bioremediaciji razlitja nafte ali onesnaženju tal s težkimi kovinami in biokontroli rastlinskih patogenov (Al-Ajlani in sod., 2007), čeprav je produkcija tega peptida cenovno previsoka, da bi ga lahko komercialno aplicirali v te namene. Surfaktin ima dober potencial uporabe tudi v medicini in farmacevtski industriji, saj so dokazali njegovo protibakterijsko, protiglivno, protivirusno in protitumorsko delovanje, poleg tega pa ima tudi hemolitično aktivnost (Seydlová in Svobodová, 2008). Prisotnost surfaktantov omogoča celicam rojenje po površinah. Surfaktin je namreč izredno dober surfaktant. *B. subtilis* sintetizira še vrsto drugih bioaktivnih cikličnih lipopeptidov. Na primer, peptidi iz družin iturinov in fengicinov so surfaktanti in imajo mnoge biološke aktivnosti, med ostalim tudi hemolitično aktivnost (Ongena in Jacques, 2007).

2.5 ROJENJE

Rojenje je definirano kot koordinirano gibanje večceličnih skupnosti po površini, največkrat s pomočjo rotirajočih se bičkov. Bakterijske celice sposobne rojenja, na gojišču tvorijo različne vzorce rasti, ki se kažejo v obliki koncentričnih krogov, konfluentne rasti, ali rasti z različnimi tipi razvejanosti (Julkowska in sod., 2004). Za rojenje je pomembnih več dejavnikov, kot so prisotnost bičkov, celične interakcije, prisotnost surfaktanta in zunajceličnih proteaz (Connelly, 2004; Kearns, 2010).

V večini primerov je prisotnost bičkov nujna za rojenje, vendar so v nekaterih študijah pokazali, da so bakterije sposobne takšnega gibanja tudi brez njih. Rojenje je odvisno tudi od vrste gojišča in koncentracije agarja v gojišču. Za študije rojenja se uporabljajo gojišča

z največ 1 % agarja, saj običajne koncentracije agarja (1,5 %), ki jih uporabljamo pri pripravi trdnih gojišč, upočasnijo ali celo inhibirajo rojenje (Julkowska in sod., 2004). Poleg koncentracije agarja je pomemben dejavnik, ki vpliva na način rojenja *B. subtilis*, tudi sestava gojišča. Divji sev *B. subtilis* 3610 na primer, na gojišču LB raste konfluentno, na gojišču B pa raste v obliki razvejanih dendritov. Pogosto, vendar ne vedno, je za rojenje potrebna prisotnost surfaktanta ali zunajceličnih proteaz. Connelly in sod. (2004) so pokazali, da surfaktin lahko nadomestijo zunajcelične proteaze, ki omogočijo divjemu tipu *B. subtilis* 164 rojenje na gojišču LB. Proteaze morda razgradijo površinske proteine do peptidov in/ali modificirajo površino celic tako, da jim omogočijo rojenje. Laboratorijski sev *B. subtilis* 168, ki ne producira surfaktina, na sintetičnem gojišču B ni sposoben rojenja, medtem ko na bogatem gojišču LB učinkovito roji, vendar počasneje kot sev 3610. Glede na to, da sev 168 ne producira surfaktina, bi lahko bila razlog za rojenje na gojišču LB fizikalno-kemijska sestava gojišča. Morda določene komponente gojišča zmanjšajo površinsko napetost med nanešenim inokulumom bakterij in samo površino ter tako omogočijo rojenje brez prisotnosti surfaktina (Julkowska in sod., 2005). Poleg tega je znano, da *B. subtilis* sintetizira še nekatere druge lipopeptidne surfaktante, s katerimi si morebiti pomaga pri rojenju (Julkowska in sod., 2005). Rojenje je mogoče inducirati, če gojišču dodamo surfaktin ali vstavimo plazmid z zapisom *sfp*⁺ v recipientski sev (Julkowska in sod., 2005). Gen *sfp* nosi zapis za 4' fosfopanteteinil transerazo, encim potreben za aktivacijo štirih podenot surfaktin sintaze (Nakano in sod., 1992). Surfaktanti znižujejo površinsko napetost med celico in površino, kar celicam *B. subtilis* olajša gibanje po površini (Kearns, 2010). Z mikroskopsko analizo sta Kearns in Losick (2003) pokazala, da so celice seva 3610 na gojišču LB hiperflagelirane in v obliki skupkov ali raftov, kar kaže na to, da je za rojenje potrebno sodelovanje med celicami.

2.6 EKOLOŠKA DIVERZITETA VRST IZ RODU *Bacillus*

Bakterijski sistematiki se pri določanju ekološko ločenih enot srečujejo z mnogimi izzivi. Težko je predvideti, kaj določa ekološko nišo posameznega seva in tudi bakterijske vrste. Filogenetski odnosi, ki temeljijo le na nivoju podobnosti genov za 16S rRNA v večini niso dovolj, da bi razumeli tudi ekologijo posamezne vrste, še posebej pa ne raznolikost sevov

ene vrste. Določanje ekološke diverzitete znotraj bakterijskih vrst je izjemno težko, zato sta Cohan in Perry (2007) predlagala, da bi ekološko diverzitetu znotraj vrste lahko določali s pomočjo posebnega algoritma (Ecotype Simulation), ki vključuje primerjavo zaporedij več relativno evolucijsko stabilnih gospodinjskih genov.

Ekotipi so definirani kot skupine bakterij, ki so med sabo ekološko raznolike, njihova raznolikost pa je omejena s periodično selekcijo ali genetskim driftom. (Cohan in Perry, 2007). Koepfel in sod. (2008) so za določanje ekološko raznolikih skupin (ekotipov) razvili algoritem, imenovan »Ecotype Simulation« (ES), ki temelji na določanju evolucije zaporedij gospodinjskih genov znotraj bakterijskih skupin. Na takšen način so določili veliko število ekotipov znotraj vrst, kot sta *Legionella* (Cohan in sod., 2006) in *Bacillus* (Koepfel in sod., 2008, Connor in sod., 2010, Štefanič in sod., 2012). Ekološko raznolikost izolatov iz rodu *Bacillus* so v različnih študijah potrdili na različne načine: Connor in sod. (2010) so pokazali, da se pripadniki različnih ekotipov nahajajo v različno strukturiranih tleh, Koepfel in sod. (2008) so pokazali, da se ekotipi razlikujejo glede na njihovo geografsko lego in z njo povezano izpostavljenostjo svetlobi, Štefanič in sod. (2012) pa so pokazali, da se ekološko raznoliki sevi iz rečnega nabrežja razlikujejo v metabolizmu.

2.6.1 Raznolikost *B. subtilis* v mikrokolju tal

Štefanič in sod. (2012) so analizirali 39 sevov *B. subtilis* subsp. *subtilis* in en sev *B. amyloliquefaciens*, izoliranih iz dveh vzorcev velikosti 1 cm³ tal nabrežja reke Save. Določali so zaporedja gospodinjskih genov *gyrA*, *rpoB* in *dnaJ* ter seve s programom ES razdelili v tri ekotipe, ki so se med sabo razlikovali v metabolizmu različnih virov ogljika. Kot razlog za takšno diverzitetu na tako majhnem področju so navedli prostorsko heterogenost tal, neenakomerno razporeditev organskih snovi v tleh in spreminjajoče se okoljske dejavnike. Zaradi teh lastnosti tla predstavljajo primerno okolje za kompeticijo, kooperacijo, sobivanje in diverzifikacijo mikroorganizmov. Pokazali so tudi, da v vsakem ekotipu dominira različen ferotip, kar so podprli s trditvijo, da pripadniki vsakega ekotipa komunicirajo s sistemom QS pod določenimi pogoji in zato pripadniki enega ekotipa ne morejo komunicirati s pripadniki drugega ekotipa. Poleg dominantnega ferotipa pa vsak ekotip vsebuje tudi enega ali več ferotipov, ki so v manjšini in se nahajajo tudi v drugih

ekotipih. S to študijo so pokazali, da diverziteteta *B. subtilis* ni omejena le na velike razdalje, ampak je prisotna tudi znotraj mikrookolja, kot je 1 cm³ tal.

2.7 DOLOČANJE SORODNOSTI BAKTERIJSKIH VRST

Genotipizacijske metode predstavljajo pogosto orodje v ekoloških in epidemioloških študijah bakterij (Brusetti in sod., 2008). Sprva so vrste določali na podlagi fenotipskih lastnosti mikroorganizmov, v sedemdesetih letih pa so sorodnost določali s hibridizacijskimi metodami DNA-DNA. Veljalo je pravilo, da dva seva spadata v različno vrsto, če se ujemata v manj kot 70 % zaporedja v DNA (Johnson, 1973). Kasneje so za določanje sorodnosti začeli uporabljati metodo, ki temelji na določanju zaporedja gena za 16S rRNA: izolati, ki se v zaporedju gena za 16S rRNA razlikujejo v manj kot 3 %, zagotovo spadajo v isto vrsto (Stackenbrandt in Ebers, 2006). Pokazali so tudi, da kadar sta si dva seva v zaporedju gena za 16S rRNA podobna v manj kot 97 %, se nikoli ne ujemata v več kot 70 % DNA (Gevers in sod., 2005).

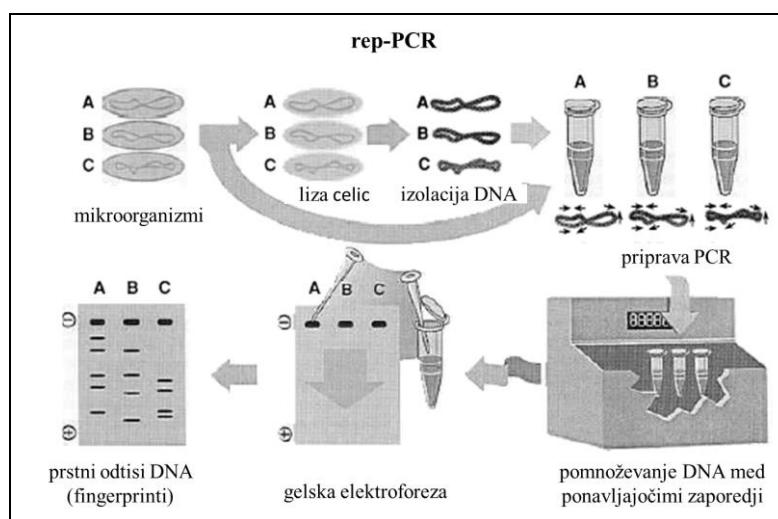
Kljub takšnemu določanju pa je analiza gena za 16S rRNA omejujoč dejavnik pri določanju sevov znotraj vrste *B. subtilis*, saj so si sevi znotraj te vrste glede na ta parameter preveč podobni, da bi jih lahko med sabo razlikovali (Nakamura in sod., 1999). Za identifikacijo ozko sorodnih izolatov *B. subtilis* so zato izbrali gospodinjske gene, ki so nujni za preživetje bakterije in so ohranjeni, vendar bolj variabilni kot geni za 16S rRNA. Pokazali so, da je za razlikovanje vrst in izolatov iz te skupine bolj primerna analiza gospodinjskih genov *rpoB* in *gyrB*, ki nosita zapis za podenoto beta RNA-polimeraze oziroma za podenoto beta DNA-giraze (Dahloff in sod., 2000).

Za ločevanje sevov znotraj vrste so pogosto v uporabi tako imenovane metode DNA prstnih odtisov (DNA fingerprinting), kot so RFLP, AFLP, ARDRA, RAPD in nekatere druge (Versalovic in sod., 1998; Brusetti in sod., 2008). Tipizacija je mogoča tudi na podlagi analize ponavljajočih zaporedij DNA. Bakterijski genom namreč vsebuje številna identična zaporedja, razporejena po celotnem genomu, katerih prisotnost lahko izkoriščamo za pridobivanje unikatnih profilov, ki določajo posamezno bakterijsko vrsto ali sev (Versalovic in sod., 1998). Metode, s katerimi izkoriščamo prisotnost ponavljajočih

se zaporedij za pridobivanje različnih profilov in razlikovanje med izolati, se imenujejo rep-PCR (Kim in sod., 2001).

2.7.1 Metode rep-PCR

Pri metodah rep-PCR za pridobivanje profilov DNA uporabljamo pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi, ki se vežejo na ohranjena, ponavljajoča zaporedja, ki so razporejena po celotnem genomu mnogih po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih bakterij (Versalovic in sod., 1998). V bakterijskem svetu obstajajo tri kategorije ponavljajočih se zaporedij: enterobakterijska ponavljajoča medgenska skupna zaporedja (ERIC), ponavljajoča zunajgenska palindromska zaporedja (REP) in elementi BOX (Tacão in sod., 2005). Rezultati rep-PCR po elektroforezi v agaroznem gelu predstavljajo DNA profile, ki se med izolati razlikujejo po številu, velikosti in intenziteti dobljenih fragmentov. Ti fragmenti predstavljajo zaporedja, ki ležijo med ohranjenimi, ponavljajočimi zaporedji, na katera se vežejo začetni oligonukleotidi. Ker sta velikost in število produktov PCR različna pri različnih bakterijskih vrstah in sevih, so omenjene metode primerne za genotipizacijo mnogih bakterijskih izolatov (Versalovic in sod., 1998). Shema genotipizacije z metodami rep-PCR je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Shema genotipizacije bakterijskih vrst z metodami rep-PCR (Versalovic in sod., 1994).

Metode rep-PCR so lahko dober pokazatelj globalne razpršenosti okoljsko pomembnih izolatov (Fajardo-Cavazos in Nicholson, 2006) in povezave specifičnih genotipov z danim okoljem (Ferris in sod., 2003). Poleg tega lahko z rep-PCR med sabo ločimo patogene bakterije oziroma razlikujemo patogene bakterijske izolate od nepatogenih (Cherif in sod., 2002; Kim in sod., 2001), ocenimo endemičnost določenih bakterijskih vrst (Bent in sod., 2003) in razlikujemo med vrstami glede na gostitelje, ki jih naseljujejo (Carson in sod., 2003).

2.7.2 Zaporedja BOX kot orodje za genotipizacijo

Elementi BOX so kratka zaporedja, razpršena po celotnem genomu mnogih bakterijskih vrst. Za različne seve je značilno različno število elementov BOX (Brusetti in sod., 2008). Ta zaporedja so najprej odkrili pri bakterijah *Streptococcus pneumoniae*. Posamezen BOX element je dolg 154 bp in je iz treh podenot različnih dolžin: *boxA* (59 bp), *boxB* (45 bp) in *boxC* (50 bp) (Martin in sod., 1992). Prisotnost elementov BOX lahko izkoriščamo za genotipizacijo bakterij z metodo BOX-PCR. Pri BOX-PCR uporabljamo le eno vrsto začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na ponavljajoča zaporedja BOX. Produkta reakcije predstavljajo fragmenti, ki se nahajajo med temi zaporedji. Zaradi prisotnosti večjega števila teh zaporedij, ki so pri različnih sevih ali vrstah različno razporejena, lahko izolate razlikujemo glede na njihove profile BOX DNA (Versalovic in sod., 1994; Brusetti in sod., 2008). Najpogosteje uporabljeni začetni oligonukleotidi pri tipizaciji z BOX-PCR so BOXA1R, ki so komplementarni zaporedju *boxA* (Versalovic in sod., 1994; Kim in sod., 2001; Cherif in sod., 2002; Brusetti in sod., 2008).

Metoda BOX-PCR je uspešna pri razlikovanju med nekaterimi ozko sorodnimi vrstami iz rodu *Bacillus*. Tako so na primer na podlagi BOX-PCR ugotovili, da se bakterije iz vrste *B. anthracis* združujejo v samostojno skupino, ločeno od tistih, v katere spadajo njim sorodne vrste, kot so *B. cereus*, *B. thuringiensis* in *B. mycooides* (Kim in sod., 2001; Cherif in sod., 2002). Freitas in sod. (2008) so z BOX-PCR določali tudi raznolikost izolatov *B. subtilis*, ki so jih izolirali iz odpadnega blata jeklarne.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Za ugotavljanje hemolitične aktivnosti in prepoznavanja sevov na poltrdnem gojišču B, smo uporabili seve vrste *B. subtilis*, izolirane iz tal nabrežja reke Save in sev RO-FF-1, izoliran iz kalifornijske puščave Mojave. Ti sevi spadajo v podvrsto *B. subtilis* subsp. *subtilis*. Z metodo BOX-PCR smo poleg profila DNA nabrežnih sevov in puščavskega seva RO-FF-1 preverjali še profil BOX-PCR puščavskega seva DV3-E-3, ki spada v podvrsto *inaquosorum* ter nabrežnega seva PS-122 iz vrste *B. amyloliquefaciens*. Izolati, ki smo jih uporabili v magistrski nalogi, so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Bakterijski sevi, uporabljeni v magistrski nalogi.

Sev	Genotip	Ferotip	Ekotip	Vir
<i>B. subtilis</i> PS-14	wt	168	PE 10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-15	wt	168	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-51	wt	168	PE 10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-68	wt	168	PE 10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-216	wt	168	PE 10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-31	wt	RO-H-1/RO-B-2	PE 10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-52	wt	RO-H-1/RO-B-2	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-55	wt	RO-H-1/RO-B-2	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-93	wt	RO-H-1/RO-B-2	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-108	wt	RO-H-1/RO-B-2	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-261	wt	RO-H-1/RO-B-2	PE 10	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-24	wt	RS-D-2/NAF4	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-196	wt	RS-D-2/NAF4	PE 22	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-217	wt	RS-D-2/NAF4	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-218	wt	RS-D-2/NAF4	PE 32	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> RO-FF-1	wt	168	PE 21	Cohan, 1991
<i>B. subtilis</i> DV3-E-3	wt	168	PE 12	Roberts in Cohan, 1995
<i>B. amyloliquefaciens</i> PS-122	wt	ni določen	ni določen	Štefanič, neobjavljeno
* <i>B. subtilis</i> PS-216	<i>comQ::Kn</i>	168	PE10	Oslizlo in sod., 2014

*v nadaljevanju magistrskega dela je sev *B. subtilis* PS-216 *comQ::Kn* označen kot PS-ΔQ216

3.1.2 Kemikalije

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali kemikalije različnih proizvajalcev:

Biolife	kvasni ekstrakt, tripton
Fluka	agar, lizin
Merck	(NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ x 7 H ₂ O, NaCl, Na-citrat x 2H ₂ O, FeSO ₄ x 7 H ₂ O, Tris-base, KH ₂ PO ₄ , NaOH
Riedel de Haën	MnSO ₄ x H ₂ O
Sigma	glutaminska kislina, CaCl ₂ x 2 H ₂ O, Tris-HCl, KCl, EDTA, etidijev bromid, glukoza, DMSO, BSA
Fermentas	nanašalni pufer DNA v agarozni gel – »GeneRuler™ 6 x Loading Dye Solution«, standardna DNA – »GeneRuler™ DNA Ladder Mix«
Promega	MgCl ₂ , 5 x reakcijski pufer za PCR, <i>GoTaq</i> polimeraza
Difco	triptofan
Thermo Scientific	dNTP
Integrated DNA Technologies	začetni oligonukleotidi BOXA1R

3.1.3 Pufri in raztopine

50 x pufer TAE

tris-baza	242,0 g
ledocetna kislina	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
dH ₂ O	do 1000 ml

Za elektroforezo smo uporabljali 1 x pufer TAE, ki smo ga pripravili tako, da smo 980 ml dH₂O dodali 20 ml pripravljenega 50 x pufra.

Pufer za pripravo eritrocitov

140 mM NaCl

20 mM tris-HCl

pH 7,4

Raztopina etidijevega bromida

etidijev bromid 0,5 mg

dH₂O do 1000 ml**3.1.4 Gojišča**Gojišče LB

tripton 10 g

NaCl 10 g

kvasni ekstrakt 5 g

dH₂O do 1000 ml

Za nacepljanje zamrznjenih izolatov z razmazom do posameznih kolonij smo v gojišče dodali agar v končni koncentraciji 1,5 %. Gojišče smo pred razlivanjem avtoklavirali 20 minut pri 121 °C.

Gojišče B

tris-HCl 7,88 g

(NH₄)₂SO₄ 1,98 gMgSO₄ x 7 H₂O 1,97 g

KCl 2,01 g

Na-citrat x 2 H₂O 2,05 gdH₂O do 900 ml

Po dodatku zgoraj naštetih sestavin smo po kapljicah dodajali 7 M NaOH, dokler se pH vrednost ni dvignila na 7,5. Nato smo po vrsti dodali še naslednje sestavine (v oklepajih so zapisane založne koncentracije posameznih raztopin):

raztopina CaCl ₂ x 2 H ₂ O (200 mM)	10 ml
raztopina FeSO ₄ x 7 H ₂ O (10 mM)	0,1 ml
raztopina MnSO ₄ x H ₂ O (100 mM)	0,1 ml
glutaminska kislina (225 mM)	
triptofan (39 mM)	*20 ml
lizin (43 mM)	
KH ₂ PO ₄ (600 mM)	1 ml
glukoza	5 g

*Aminokislina (glutaminska kislina, triptofan, lizin) smo pripravili in dodali kot skupno raztopino.

Po dodatku vseh sestavin smo dolili destilirano vodo do 1000 ml in gojišče avtoklavirali 36 min pri 110 °C. Za pripravo poltrdnega gojišča B, smo poleg naštetih sestavin pred avtoklaviranjem vanj dodali agar v končni koncentraciji 0,7 %. Gojišče smo po avtoklaviranju ohladili na 55 °C in razlili v plošče.

3.1.5 Laboratorijska oprema

termoblok za PCR	Biometra
spektrofotometer	Iskra Photometer MA9510
centrifuga	Sigma 3K30 (rotor 19776-H)
centrifuga	Centric 322 A, Tehnica
mešalo	Vibromix 114 EV, Tehnica
stresalna kopel	Julabo ShakeTemp SW22
fotoapar	Canon PowerShot SX120 IS
avtoklav	Kambič A-21
pH meter	Inolab WTW series 720, MikroPolo
tehnica	Shinko Denshi AJH-4200 CE, Vibra
magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH, Tehnica
stresalnik	Vibromix

3.2 METODE

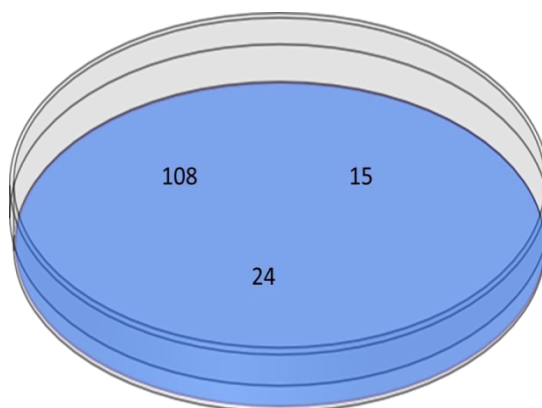
3.2.1 Fenotipska karakterizacija *B. subtilis*

3.2.1.1 Priprava prekonočnih kultur

Seve iz zamrzovalnika (-80 °C) smo v laminariju nacepili na plošče LB (1,5 % agar) in jih inkubirali pri 37 °C preko noči. Po prekonočni inkubaciji smo po eno kolonijo posameznega seva nacepili v široke epruvete, ki so vsebovale 3 ml tekočega gojišča LB in jih inkubirali preko noči na stresalniku pri 200 rpm in 28 °C. Za pripravo prekonočnih kultur v gojišču B smo nacepili eno kolonijo posameznega seva s plošče LB v epruveto s 3 ml tekočega gojišča B in jih inkubirali preko noči na stresalniku pri 200 rpm in 37 °C.

3.2.1.2 Priprava poltrdnih gojišč in nanašanje sevov *B. subtilis* na plošče

Za ugotavljanje prepoznavanja sevov smo pripravili poltrdno gojišče B (0,7 % agar). Plošče smo pripravili en dan pred nacepljanjem sevov in jih označili s številkami, ki so predstavljale pripadajoč nabrežni ali puščavski izolat.



Slika 4: Shema označevanja plošč (primer za seve PS-108, PS-24 in PS-15).

Prekonočne kulture smo redčili do redčitve 10^{-4} in na označena mesta na ploščah z gojiščem B nacepili po 2 μ l pripravljenih redčitev. Na posamezno ploščo smo nanesli tri izolate *B. subtilis*, ki so bili med sabo približno enako oddaljeni (slika 4). Vsako kombinacijo dveh sevov smo na plošče nacepili v vsaj dveh ponovitvah. Po nanašanju smo plošče sušili 5 minut, nato pa jih navzgor obrnjene zložili v plastične škatle, ki smo jih pokrili s pokrovom, da bi zmanjšali izhlapevanje. Plošče smo inkubirali 48 ur pri 37 °C.

3.2.1.3 Analiza medsebojnega prepoznavanja sorodnih sevov *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B

Po inkubaciji smo primerno osvetljene plošče slikali na temni podlagi in slike prenesli v računalnik ter jih analizirali. Različne vzorce medsebojnega prepoznavanja oziroma neprepoznavanja sevov na poltrdnem gojišču B smo prikazali z različnimi simboli (preglednica 2). Vsako kombinacijo prepoznavanja smo preverili vsaj dvakrat. Na podlagi rezultatov smo naredili 2 preglednici, v katerih smo prikazali pogostnost prepoznavanja sevov znotraj istih in med različnimi ferotipi in ekotipi.

Preglednica 2: Simboli in pripadajoči kriteriji medsebojnega prepoznavanja sevov na poltrdnem gojišču B.

Simbol	Vzorec medsebojnega prepoznavanja
+	Med sevoma ni bilo prepoznavanja, pojavila se je prosojna mejna linija.
o	Med sevoma se je pojavil širši mejni pas celic, ni prosojne mejne linije.
-/o	Seva tvorita različne kolonije, se ne zlijeta in ne tvorita prosojne mejne linije, med sabo se stikata.
-	Med sevoma je prišlo do prepoznavanja, seva sta se med sabo zlila.

3.2.1.4 Priprava izrabljenih gojišč B

Tvorbo sekundarnih metabolitov, sposobnih razgradnje eritrocitov, smo spremljali preko hemolitične aktivnosti izrabljenih gojišč. Poleg tega smo opazovali tudi, ali se hemolitična aktivnost v gojišču LB in gojišču B razlikuje.

Prekonočne kulture, zrasle v gojišču B, smo v razmerju 1:50 nacepili v 250-mililitrske erlenmajerice s 50 ml svežega gojišča B in jih inkubirali v vodni kopeli pri 200 rpm in 37 °C. Po 12 in 14 urah rasti (2 in 4 ure po prehodu v stacionarno fazo rasti) smo izmerili OD₆₅₀ in kulture centrifugirali 12 minut pri 4 °C in 10 000 rpm (Sigma 3K30). Supernatant smo aseptično prefiltrirali v mikrocentrifugirke skozi filtre s porami premera 0,2 µm. Izrabljena gojišča smo shranili na -20 °C do nadaljnjih analiz.

Da smo dobili vpogled v rast izolatov *B. subtilis* v tekočem gojišču B, smo 3 prekonočne kulture nabrežnih sevov (PS-218, PS-52, PS-216), ki pripadajo različnim ferotipom in ekotipom, v razmerju 1:50 nacepili v 250 ml svežega gojišča B in jih stresali v vodni kopeli pri 37 °C. Ob različnih časovnih točkah smo merili OD₆₅₀, dokler sevi niso prišli v stacionarno fazo rasti. Ta je nastopila po približno 10 urah (priloga A). Na podlagi rastnih krivulj omenjenih sevov smo določili čas filtracije gojišča oziroma pridobivanja izrabljenega gojišča vseh testiranih izolatov: gojišča smo filtrirali v točkah T2 in T4 (2 oziroma 4 ure po prehodu v stacionarno fazo rasti).

3.2.1.5 Priprava izrabljenih gojišč LB

Prekonočne kulture, zrasle v gojišču LB, smo v razmerju 1:100 nacepili v erlenmajerice s 50 ml svežega gojišča LB, in jih gojili v vodni kopeli pri 200 rpm in 37 °C ter z merjenjem OD₆₅₀ ob različnih časovnih točkah spremljali rast posameznih izolatov *B. subtilis*. V točki T2 (dve uri po vstopu v stacionarno fazo rasti) smo kulture centrifugirali 12 min pri 4 °C in 10 000 rpm (Sigma 3K30). Supernatant smo aseptično prefiltrirali v mikrocentrifugirke skozi filtre s porami premera 0,2 µm. Tako pripravljena izrabljena gojišča smo shranili zamrznjena pri -20 °C do nadaljnjih analiz.

3.2.1.6 Priprava eritrocitov

Goveje eritrocite smo resuspendirali v 10 ml pufra za pripravo eritrocitov in jih centrifugirali v centrifugi (Centric 322 A) brez končnega zaviranja (s tem smo preprečili lizo eritrocitov) 7 minut pri 2000 x g. Supernatant smo odlili in postopek ponavljali, doker supernatant ni postal prozoren. Eritrocite smo nato resuspendirali v 10 ml fiziološke raztopine ter suspenzijo zopet centrifugirali 7 minut pri 2000 x g v centrifugi brez končnega zaviranja (Centric 322 A). Supernatant smo odlili in s fiziološko raztopino pripravili suspenzijo eritrocitov z vrednostjo OD₆₅₀ približno 0,7. Sveže pripravljene eritrocite smo uporabili za izvedbo hemolitičnega testa, s katerim smo ugotavljali prisotnost spojin s hemolitično aktivnostjo.

3.2.1.7 Hemolitični test

Zamrznjena izrabljena gojišča LB in B smo odmrznili pri sobni temperaturi. V mikrotitrške ploščice smo odpipetirali po 100 µl izrabljenih gojišč posameznih sevov. Izrabljena gojišča LB vsakega seva smo odpipetirali v dveh ponovitvah, izrabljena gojišča B pa v treh. Tik pred meritvami smo izrabljenim gojiščem dodali 100 µl sveže pripravljenih eritrocitov. Napolnjene mikrotitrške ploščice smo vstavili v mikročitalec, ki je meril OD₆₅₀ v 30 polminutnih intervalih. Za izračun hemolitične aktivnosti smo uporabili vrednosti OD₆₅₀ v času 0 (1. meritev) in 10 minut (21. meritev).

3.2.1.8 Normalizacija optične gostote

Ker s spektrofotometrom izmerjene vrednosti OD₆₅₀, višje od 0,7 niso natančne (niso v linearnem merilnem območju), smo 7 različnih prekonočnih kultur (nekatero v dveh ali treh ponovitvah) redčili 2-krat, 4-krat, 8-krat, 16-krat in 32-krat z gojiščem B in pripravljenim redčitvam izmerili OD₆₅₀. Izmerjene vrednosti OD₆₅₀ smo preračunali v dejanske tako, da smo jih pomnožili z redčitvenim faktorjem. Vrednosti smo grafično prikazali: na abscisno os smo nanesli izmerjene vrednosti OD₆₅₀, na ordinatno pa preračunane vrednosti OD₆₅₀. Točkam na grafu smo priredili krivuljo in prikazali njeno enačbo in vrednost R². Iz enačb, ki smo jih dobili, smo za vsak sev izrazili vrednost y, ki

predstavlja dejansko vrednost OD₆₅₀. Za posamezen sev smo dobili enajst vrednosti OD₆₅₀, ki smo jih povprečili (ker so bila odstopanja med sevi in med paralelkami podobna ter se signifikantno niso razlikovala) in dobljeno vrednost uporabili pri izračunu relativne hemolitične aktivnosti v gojišču B. Grafi, pripadajoče enačbe in vrednosti R² za izbrane izolate so prikazani v prilogi B.

3.2.1.9 Izračun hemolitične aktivnosti

Hemolitično aktivnost izrabljenih gojišč B smo izrazili z enačbo 1:

$$\% \text{ hemolize} = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \times 100 \quad \dots(1)$$

kjer A₀ predstavlja vrednost OD₆₅₀ ob času 0 minut, A₁₀ pa vrednost OD₆₅₀ ob času 10 minut. Hemolitično aktivnost vsakega seva v gojišču B smo normalizirali na gostoto celic tako, da smo % hemolize delili z dejanskim OD₆₅₀ (preračunan glede na redčitvene krivulje). Dobljeno vrednost smo poimenovali relativna hemolitična aktivnost. Za vsako vrednost smo izračunali pripadajoč standardni odklon in s t-testom preverili, ali so razlike v relativni hemolitični aktivnosti med posameznimi sevi signifikantne.

Hemolitično aktivnost v gojišču LB smo izračunali po enačbi 1. V tem primeru dobljenih vrednosti (% hemolize) nismo normalizirali glede na gostoto celic, saj je bila hemolitična aktivnost pri vseh sevih približno enaka tisti pri sevu PS-ΔQ216, ki nima hemolitične aktivnosti.

3.2.2 Genotipska karakterizacija *B. subtilis*

3.2.2.1 DNA sevov *B. subtilis*

Uporabili smo že izolirano DNA nabrežnih in puščavskih sevov. Postopek izolacije DNA je opisan v objavljeni literaturi (Cohan, 1991; Štefanič in Mandić Mulec, 2009). DNA različnih sevov rodu *Bacillus* (preglednica 1) smo 10-krat redčili in redčitve uporabili za genotipizacijo z metodo BOX-PCR.

3.2.2.2 Reagenti in začetni oligonukleotidi za BOX-PCR

Za genotipizacijo z BOX-PCR smo uporabili začetne oligonukleotide BOXA1R z zaporedjem 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', ki se vežejo na ohranjena, ponavljajoča zaporedja DNA (elemente BOXA1) v genomu preučevanih sevov. Volumen ene reakcijske mešanice je znašal 25 μ l. V preglednici 3 so zapisani reagenti, ki smo jih uporabili pri PCR in njihova koncentracija oziroma volumen v eni reakcijski mešanici. K 23 μ l reakcijske mešanice smo na koncu dodali 2 μ l 10-krat redčene matrične DNA.

Preglednica 3: Reagenti in njihova koncentracija v reakcijski mešanici za PCR (25 μ l).

Reagent	Končna koncentracija
dNTP-ji	1,25 mM
5 x reakcijski pufer	1 x
DMSO	10 %
BSA	0,2 mg/ml
MgCl ₂	4,85 mM
BOXA1R	6 μ M
GoTaq polimeraza	0,04 U/ μ l
dH ₂ O	do 23 μ l

3.2.2.3 Pogoji za BOX-PCR

Za vsak sev smo pripravili reakcijsko mešanico v dveh ponovitvah. Obe ponovitvi sta vsebovali DNA, odvzeto iz iste mikrocentrifugirke. Potek PCR:

- začetna denaturacija - 5 minut pri 95 °C,
- denaturacija - 1 minuta pri 94 °C,
- vezava začetnih oligonukleotidov - 1 minuta pri 50 °C,
- podaljševanje z *GoTaq* polimerazo - 5 minut pri 72 °C,
- končno podaljševanje 15 minut pri 72 °C.

Cikel denaturacije, vezave in podaljševanja - 35 ponovitev.

3.2.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Produce verižne reakcije s polimerazo smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. V 250 ml erlenmajerici smo pripravili 2-odstotni agarozni gel tako, da smo v mikrovalovni pečici raztopili 2,4 g agaroze v 120 ml 1-kratnega pufra TAE. Erlenmajerico z raztopljeno agarozo smo pri sobni temperaturi ohladili na približno 60 °C in ohlajen gel vlili v nosilec z glavničkom ter počakali, da se strdi. Nato smo odstranili glavniček in nosilec z gelom predstavili v elektroforezno komoro ter vanjo dodali toliko 1-kratnega pufra TAE, da je prekril gel. V luknjice smo dodali po 5 µl vzorca skupaj z 1 µl 6-kratnega nanašalnega pufra oziroma 3 µl elektroforeznega standarda. Po dodatku vseh vzorcev smo zagnali elektroforezo, ki je tekla 4 ure pri napetosti 75 V. Po elektroforezi smo gel barvali v raztopini etidijevega bromida 20 minut in razbarvali v destilirani vodi 5 minut. Gel smo slikali in slike obdelali s programom GeneSnap Syngene.

3.2.2.5 Analiza slik

Na podlagi profilov DNA, ki smo jih dobili kot produkte BOX-PCR po gelski elektroforezi, smo slike gelov analizirali s programom Bionumerics 6.6. Za izris drevesa podobnosti smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije in metodo UPGMA (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

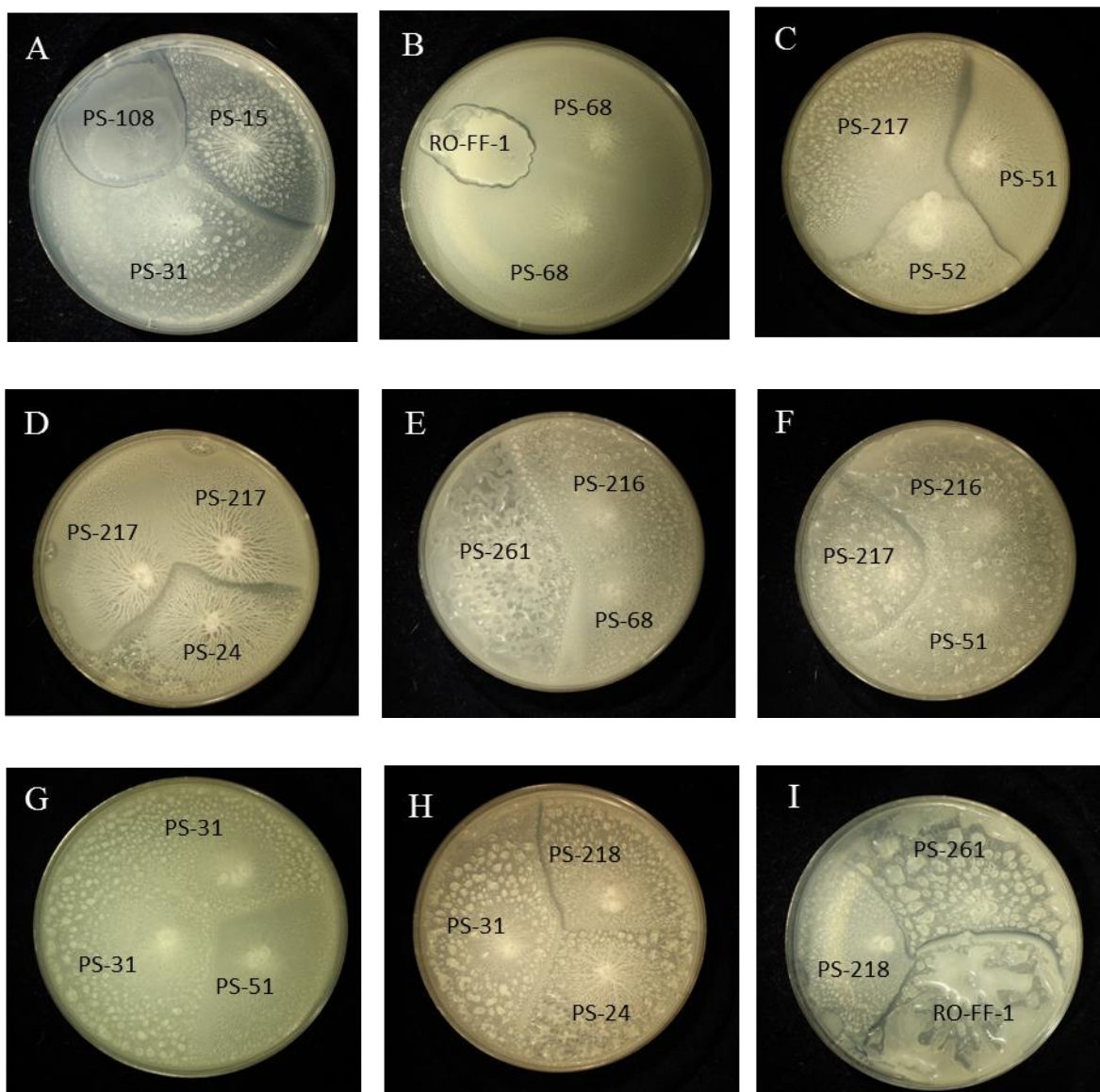
4 REZULTATI

4.1 FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA

4.1.1 Rast in medsebojno prepoznavanje sorodnih izolatov *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B

Za ugotavljanje prepoznavanja med sorodnimi sevi, smo redčitve (10^{-4}) prekonočnih kultur nacepili na poltrdno gojišče B v različnih kombinacijah. Sevi so med sabo na poltrdnem gojišču B tvorili različne vzorce prepoznavanja: med sabo so se zlili, tvorili opazen pas med dvema rojema, tvorili stik ali pa se je med rojema dveh sevov pojavila mejna transparentna cona. Omenjene vzorce prepoznavanja smo prikazali z različnimi simboli (preglednica 2). Prepoznavanje smo definirali kot zlitje dveh sevov, neprepoznavanje pa kot vidno mejo med dvema sevoma.

Primeri različnih vzorcev prepoznavanja med nabrežnimi sevi in puščavskim sevom RO-FF-1 na gojišču B so prikazani na sliki 5. Vsi sevi, razen PS-108 in RO-FF-1, so na ploščah z gojiščem B tvorili vzorce v obliki razvejanih dendritov, kar je tipičen vzorec rasti *B. subtilis* na tovrstnem gojišču (Julkowska in sod., 2004). Seva PS-108 in RO-FF-1 nista tvorila dendritov in sta vedno zrasla v nepravilno kolonijo, prekrito s sluzjo (slike 5A, 5B in 5I). Pri vseh preučevanih sevih smo opazili, da v kombinaciji s samim sabo ne tvorijo mejne linije, ampak se med seboj vedno zlijejo (slike 5B, 5D in 5G).

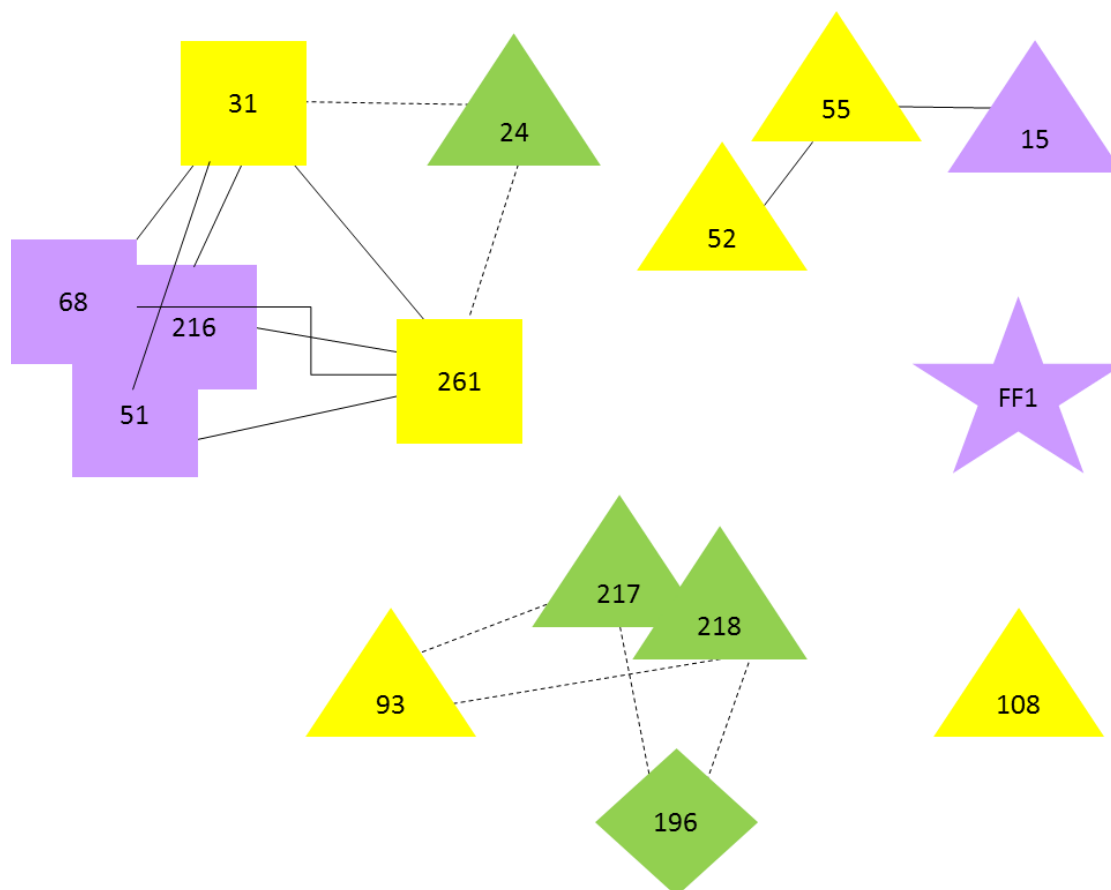


Slika 5: Primeri rasti in vzorcev medsebojnega prepoznavanja izolatov *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B. Slika prikazuje različne kombinacije sevov, ki so med sabo tvorili prosojne mejne cone (A, C, D, I). Sevi so se v kombinaciji s samim seboj prepoznali kot enaki in se zlili v enako kolonijo. Primeri zlitja so prikazani za seve PS-68 (B), PS-217 (D) in PS-31 (G). Prepoznavanje smo opazili tudi pri nekaterih sevih, ki si delijo isti ekotip (PE 10) in hkrati ferotip (168). Takšni primeri so prikazani za seve PS-68 in PS-216 (E) ter PS-51 in PS-216 (F). Sev RO-FF-1 z nabrežnimi sevi vedno tvori mejno linijo (B in I). Seva PS-31 in PS-24 tvorita med sabo viden mejni pas (H). Med sevoma PS-31 in PS-51 je prišlo do stika (G).

4.1.2 Vzorci medsebojnega prepoznavanja izolatov *B. subtilis* glede na njihovo pripadnost ferotipu ali ekotipu

Za lažje iskanje morebitnih povezav med vzorcem prepoznavanja in pripadnostjo sevov ferotipu ali ekotipu, smo rezultate prikazali na dva načina: preglednici 4 in 5 prikazujeta vzorce prepoznavanja za seve, ki smo jih po barvah razdelili v ferotipe in ekotipe.

Vzorec prepoznavanja, ki se najpogosteje pojavlja med izbranimi izolati, je prosojna mejna linija, ki spominja na lizo celic. Ta se pojavlja tako med sevi različnih ferotipov kot tudi med sevi istega ferotipa. Enako velja za ekotipe, z izjemo ekotipa PE 10, kjer med sevi prihaja do zlitja ali pa do stika, nikoli pa do tvorbe prosojne mejne linije. Do zlitja oziroma prepoznavanja je prišlo le med pari istih sevov in med nekaterimi sevi istega ekotipa in ferotipa. Ti sevi so PS-216, PS-51 in PS-68 iz ekotipa PE 10 in ferotipa 168 ter PS-217 in PS-218 iz ekotipa PE 32 in ferotipa RS-D-2/NAF4. Seva PS-31 in PS-261, ki spadata v isti ekotip (PE 10) in ferotip (RO-H-1/RO-B-2), sta med sabo in z vsemi ostalimi sevi iz istega ekotipa tvorila stik. V splošnem lahko zaključimo, da je do zlitja prišlo le med istimi sevi in nekaterimi sevi istega ekotipa in ferotipa. Do opazne mejne linije (stik) je prišlo, če so se sevi razlikovali vsaj v eni lastnosti (ferotipu) imeli pa so isti ekotip. Širšo morfološko različno mejno linijo smo opazili med sevi, ki so se razlikovali vsaj v eni lastnosti. Med sevi, ki so se razlikovali v dveh lastnostih (ekotipu in ferotipu) je vedno prišlo do opazne in robustne mejne linije (širokega morfološko različnega pasu ali prosojne linije). Seva PS-108 in RO-FF-1 sta z vsemi ostalimi sevi tvorila prosojno mejno linijo. Od ostalih sevov sta se razlikovala le v eni lastnosti (ekotipu ali ferotipu). V celoti smo določili pet skupin sevov med katerimi je prišlo do nastanka prosojne mejne linije. Če pa upoštevamo tudi široke morfološko različne meje in tanjše, a opazne stike je diverziteta nesorodnih sevov še večja: med 15 sevi *B. subtilis* opazimo 12 sorodstvenih skupin. Torej je skoraj vsak sev drugačen od drugega (slika 6).



Slika 6: Mreža interakcij nabrežnih (številke) in puščavskega (FF1) seva *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B. Barve simbolov predstavljajo ferotip (vijolična: 168; zelena: RS-D-2/NAF4; rumena: RO-H-1/RO-B-2), oblike pa ekotip (kvadrat: PE 10, trikotnik: PE 32, karo: PE 22, zvezdica: PE 22). Zlitje sevov je prikazano s prekrivanjem simbolov, stik z neprekinjeno črto in širši mejni pas s prekinjeno črto. Simboli, ki se ne prekrivajo ali se ne povezujejo s prekinjeno ali neprekinjeno črto, predstavljajo izolate, ki so med sabo tvorili prosojno mejno linijo.

4.1.3 Delež vzorcev medsebojnega prepoznavanja izolatov *B. subtilis* glede na njihovo pripadnost ferotipom in ekotipom

Iz frekvenc različnih tipov prepoznavanja smo izračunali deleže vzorcev prepoznavanja med sevi znotraj istih ali med različnimi ferotipi in ekotipi (preglednici 6 in 7). V izračunu deležev nismo upoštevali simbolov, ki predstavljajo prepoznavanje sevov s samim sabo.

Najpogosteje smo opazili prosojno mejno linijo, ki se je pojavila med pripadniki različnih ferotipov (79,8 %) in ekotipov (88,0 %). To linijo so tvorili tudi sevi, ki so imeli isti ferotip (74,2 %) ali ekotip (60,5 %) in so se med sabo razlikovali vsaj v eni lastnosti. Ti se med sabo nikoli niso prepoznavali kot sorodni in so poleg prosojne linije tvorili bodisi stik bodisi morfološko drugačen pas. Delež prepoznavanja (zlitje) izolatov istega ferotipa je 12,9 %, če pa izolate razvrstimo v ekotipe, je ta delež 10,5 %. Tipičnega vzorca prepoznavanja, ki bi se pojavljal med sevi iz istih ali različnih ferotipov oziroma ekotipov ni, saj se med sevi iz različnih in istih ferotipov ali ekotipov pojavljajo tako vzorci neprepoznavanja kot tudi prepoznavanja. Na podlagi rezultatov lahko trdimo le, da kadar seva spadata v različen ferotip in/ali ekotip, med njima vedno pride do neprepoznavanja, linija pa lahko nastane tudi med sevoma, ki si delita isti ferotip in/ali ekotip. Do zlitja dveh sevov pride le, kadar spadata v isti ferotip in ekotip.

Preglednica 6: Delež vzorcev medsebojnega prepoznavanja med sevi iz istih ali različnih ferotipov. Simboli predstavljajo različne vzorce medsebojnega prepoznavanja: prozorna mejna linija, seva se prepoznata kot drugačna (+); neprosojni mejni pas celic med dvema sevoma (o); seva tvorita kolonije različnih velikosti in se stikata z opazno mejo (-/o); seva se prepoznata kot sorodna in se zlijeta (-).

Vzorec prepoznavanja	ISTI FEROTIP	RAZLIČEN FEROTIP
+	74,2 %	79,8 %
o	3,2 %	9,5 %
-/o	9,7 %	10,7 %
-	12,9 %	0 %

Preglednica 7: Delež vzorcev medsebojnega prepoznavanja med sevi iz istih ali različnih ekotipov. Simboli predstavljajo različne vzorce medsebojnega prepoznavanja: prozorna mejna linija, seva se prepoznata kot drugačna (+); neprosojni mejni pas celic med dvema sevoma (o); seva tvorita kolonije različnih velikosti in se stikata z opazno mejo (-/o); seva se prepoznata kot sorodna in se zlijeta (-).

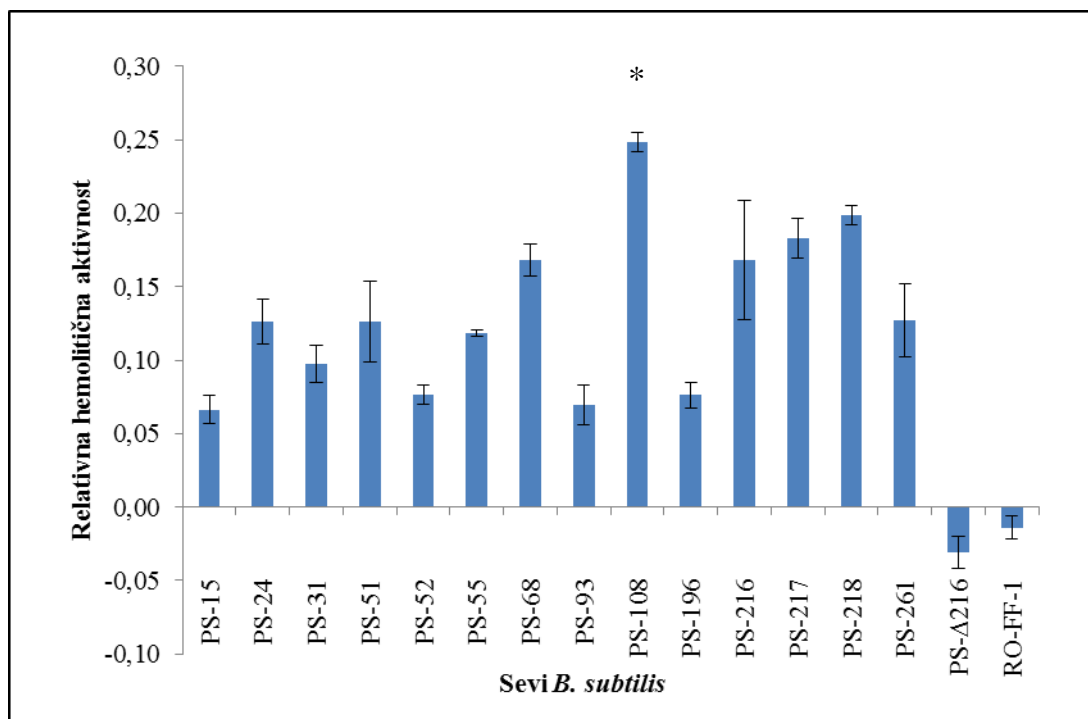
Vzorec prepoznavanja	ISTI EKOTIP	RAZLIČEN EKOTIP
+	60,5 %	88,0 %
o	5,3 %	9,0 %
-/o	23,7 %	3,0 %
-	10,5 %	0,0 %

4.1.4 Hemolitična aktivnost izolatov *B. subtilis*

Za večino sevov *B. subtilis* je značilna tvorba lipopeptidnih biosurfaktantov, med katerimi so največkrat omenjeni tisti iz družine surfaktinov. Poleg njih v literaturi v povezavi z *B. subtilis* pogosto navajajo tudi biosurfaktante, ki spadajo v družine iturinov in fengicinov (Ongena in Jacques, 2007). Za vse omenjene družine biosurfaktantov je značilna sposobnost razgradnje eritrocitov ali hemolitična aktivnost (Morán in sod., 2002; Aranda in sod., 2005; Deleu in sod., 2008). To smo s hemolitičnim testom preverjali tudi v okviru tega magistrskega dela.

4.1.4.1 Hemolitična aktivnost izolatov *B. subtilis* v tekočem gojišču B

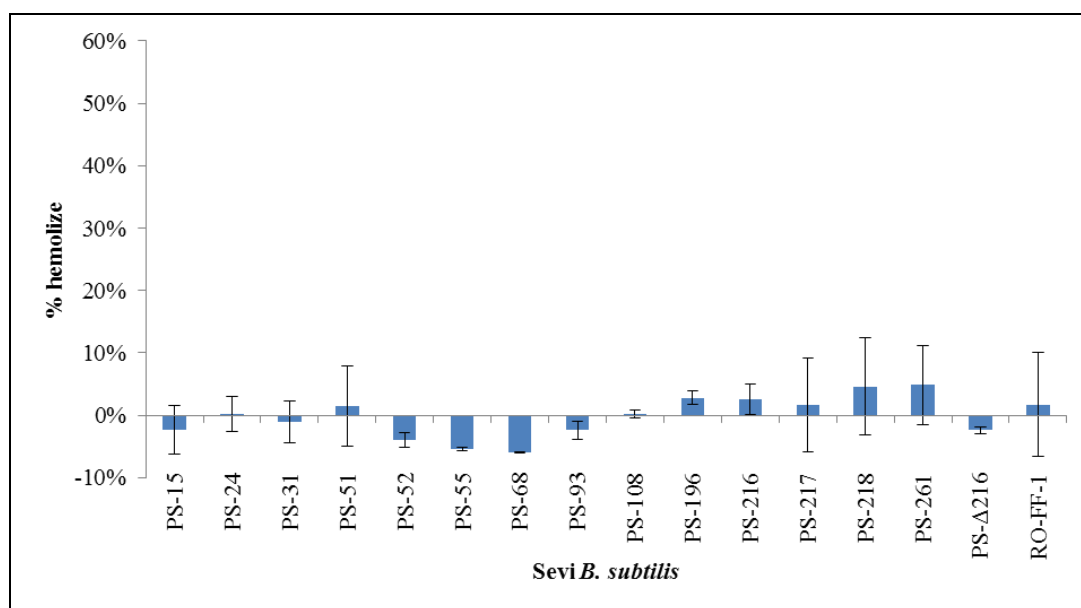
Tvorbo sekundarnih metabolitov s sposobnostjo razgradnje eritrocitov smo ugotavljali z računanjem relativne hemolitične aktivnosti izrabljenih gojišč B. Izrabljena gojišča nabrežnih (PS) in puščavskega (RO-FF-1) izolata *B. subtilis* smo pridobili 2 (T2) in 4 (T4) ure po prehodu v stacionarno fazo rasti bakterij v gojišču B. S tem smo želeli preveriti, ali so ob različnih časovnih točkah v stacionarni fazi rasti prisotne razlike v količini nastalih biosurfaktantov. Med časovnimima točkama, ki smo ju določili, so bile signifikantne razlike v hemolitični aktivnosti prisotne le pri sevih PS-15 in PS-52, druge razlik v relativni hemolitični aktivnosti istega seva med izbranimi točkama ni bilo (priloga D). Na sliki 7 je prikazana relativna hemolitična aktivnost izrabljenih gojišč B v točki T2. Za vse nabrežne seve je značilna določena stopnja hemolitične aktivnosti. Najvišjo relativno hemolitično aktivnost ima sev PS-108. Stopnja hemolitične aktivnosti seva PS-108 (0,25) je signifikantno višja kot pri ostalih izolatih, razen pri PS-218, PS-216, PS-68 in PS-217. Hemolitične aktivnosti nismo zaznali v izrabljenih gojiščih sevov PS-ΔQ216 in RO-FF-1. Spojina, ki najbrž igra največjo vlogo pri razgradnji eritrocitov, je surfaktin, saj sev PS-216 ima hemolitično aktivnost, sev PS-ΔQ216, ki ne nosi zapisa za ComQ pa ne, saj ne more sintetizirati surfaktina v izbranem gojišču. Rezultati t-statistike, s katero smo preverjali signifikantnost razlik v hemolitični aktivnosti med posameznimi izolati, so prikazani v prilogi E.



Slika 7: Relativna hemolitična aktivnost nabrežnih (PS) in puščavskega izolata *B. subtilis* (RO-FF-1) v gojišču B. Graf prikazuje relativno hemolitično aktivnost izrabljenih gojišč, ki smo jih pridobili 2 uri po vstopu v stacionarno fazo rasti (T2). Prikazani so pripadajoči standardni odkloni. Sev PS-108 ima najvišjo relativno hemolitično aktivnost (označeno z zvezdico nad stolpcem), ki se signifikantno razlikuje od ostalih sevov, razen PS-216, PS-218 in PS-68 in PS-217.

4.1.4.2 Hemolitična aktivnost izolatov *B. subtilis* v tekočem gojišču LB

Hemolitična aktivnost nabrežnih in puščavskega izolata v bogatem gojišču LB je prikazana na sliki 8. V gojišču LB nobeden izmed preučevanih sevov ni imel hemolitične aktivnosti. Razlike v hemolizi med izbranimi izolati niso bile signifikantne. Ker so bile izmerjene vrednosti hemolitične aktivnosti v gojišču LB pri vseh sevih zelo nizke, dobljenih vrednosti nismo normalizirali na gostoto celic in rezultata nismo prikazali v obliki relativne hemolitične aktivnosti, kot smo to storili pri izračunu hemolitične aktivnosti v gojišču B. Tako kot v gojišču B, seva RO-FF-1 in PS- Δ 216 tudi v gojišču LB nimata sposobnosti sinteze surfaktantov s hemolitično aktivnostjo.



Slika 8: Odstotek hemolize nabrežnih (PS) in puščavskega izolata *B. subtilis* (RO-FF-1) v gojišču LB. Pri vsakem stolpcu so prikazani pripadajoči standardni odkloni.

4.2 GENOTIPIZACIJA *B. subtilis* IN *B. amyloliquefaciens*

Preučevani nabrežni izolati *B. subtilis* pripadajo različnim ekotipom in ferotipom (Štefanič in sod., 2012). Pripadnost seva nekemu ekotipu je določena na podlagi podobnosti zaporedij gospodinjskih genov in algoritma »Ecotype Simulation« ter potrjena s testiranjem fenotipskih lastnosti (Koeppel in sod., 2008; Connor in sod. 2010; Štefanič in sod., 2012). Pripadnost ferotipu pa je določena s sposobnostjo medsebojnega komuniciranja in odzivanja na feromone (v primeru *B. subtilis* je to odziv na feromon ComX) (Tran in sod., 2000; Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in Mandić-Mulec, 2009; Štefanič in sod., 2012). Na podlagi slike profilov BOX-PCR in dendrograma, izrisanega na podlagi teh profilov, smo skušali ugotoviti, ali lahko z metodo BOX-PCR razlikujemo med zelo podobnimi nabrežnimi sevi vrste *Bacillus subtilis* in na podlagi tega morda določimo povezave z vzorci prepoznavanja. Nekateri nabrežni sevi *B. subtilis* imajo zaporedja gospodinjskih genov *rpoB*, *dnaJ* in *gyrA* zelo podobna ali celo identična (Štefanič, 2009). Ti, med sabo podobni sevi spadajo tudi v isti ekotip. Stoodstotna podobnost v zaporedju omenjenih genov se npr. pojavlja med sevi PS-51, PS-68 in PS-261, sev PS-216 pa jim je podoben v 99,9 %. Stoodstotno podobna v naštetih gospodinjskih genih sta tudi seva PS-218 in PS-217, seva PS-24 in PS-93 pa sta podobna v 99,9 % (Štefanič, 2009). Predpostavili smo, da bodo sevi PS-68, PS-216 in PS-51 imeli enak profil BOX-PCR, enako bi naj veljalo za PS-217 in PS-218. Poleg tega smo predpostavili, da imajo sevi, ki na poltrdnem gojišču tvorijo prosojno mejno linijo, drugačen profil BOX-PCR.

4.2.1 Analiza profilov BOX-PCR

Da smo določili primerne pogoje za BOX-PCR, smo metodo najprej optimizirali. Sprva smo za vezavo začetnih oligonukleotidov izbrali temperaturo 53 °C in 30 reakcijskih ciklov BOX-PCR. Takšni pogoji niso bili primerni, saj smo po pomnoževanju za posamezen sev dobili le po dva ali tri fragmente DNA. Glede na pretekle študije BOX-PCR v povezavi z vrstami iz rodu *Bacillus* smo pričakovali, da bo število fragmentov za posamezen sev večje (Kim in sod., 2001; Brusetti in sod., 2008). Primerljive rezultate

(večje število fragmentov) smo dobili, ko smo znižali temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov na 50 °C in povečali število ciklov reakcije na 35.

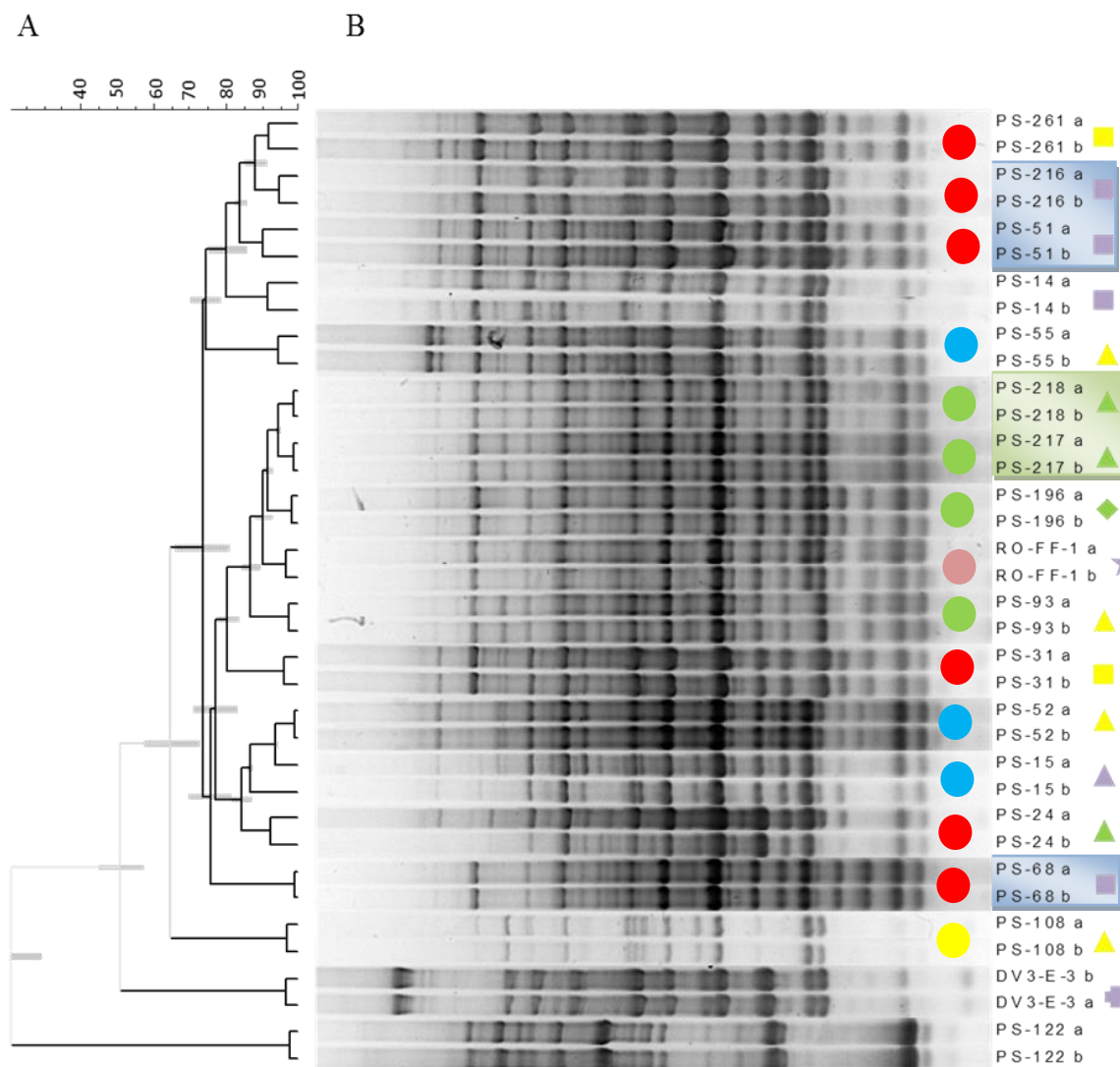
Profili BOX-PCR in dendrogram, izrisan na podlagi profilov, so prikazani na sliki 9. Na podlagi rezultatov BOX-PCR smo ugotavljali, kako se sevi med sabo razlikujejo profilih DNA. Za primerjavo smo v poskus vključili še precej različna seva *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DV3-E-3 ter *B. amyloliquefaciens* PS-122, ki spadata v drugo podvrsto oziroma vrsto.

Slika s profili BOX-PCR kaže, da so pri večini sevov pri obeh ponovitvah v paru istega seva, prisotni enaki fragmenti, vendar so ponekod posamezni fragmenti slabše vidni pri eni od ponovitev. Pri sevih PS-15, PS-24 in PS-261 je pri eni od ponovitev prisotnih manj fragmentov, kot pri drugi ponovitvi, kar pomeni, da bi bilo treba metodo v prihodnosti še natančneje optimizirati. Med nabrežnimi sevi in puščavskim sevom RO-FF-1 na sliki ne opazimo večjih razlik, ki bi omenjen puščavski sev ločile od nabrežnih. Seva PS-122 iz vrste *B. amyloliquefaciens* in sev DV3-E-3 iz vrste *B. subtilis* in podvrste *inaquosorum* se v profilu BOX-PCR po pričakovanju močno razlikujeta od ostalih sevov. Vsebujeta manjše število fragmentov, ki so tudi drugačnih dolžin kot pri ostalih izolatih. Očitno manjše število fragmentov kot ostali nabrežni izolati ima tudi sev PS-108, ki z vsemi sevi tvori prosojno linijo. Manjše število dobljenih fragmentov pri tem sevu je lahko tudi posledica manjše količine DNA v vzorcu. Kljub temu je BOX profil pri tem sevu bolj podoben tistemu iz *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* kot sevoma, ki sta iz druge podvrste in vrste: DV3-E-3 in PS-122.

Na podlagi profilov, ki smo jih dobili z agarozno gelsko elektroforezo produktov BOX-PCR (slika 9B), smo s programom Bionumerics 6.6 izrisali dendrogram (slika 9A). Za izračun podobnosti med izolati smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije, za izris dendrograma pa metodo UPGMA. Odstotki podobnosti med pari izolatov so prikazani v prilogi C. Dendrogram kaže, da so si ponovitve sevov (a in b) med sabo najbolj podobne – 90-odstotna podobnost v profilu BOX-PCR. Izjema je le sev PS-15, pri katerem ponovitvi sevov kažeta 89 % podobnosti in je ena od ponovitev (PS-15 a) bolj podobna sevu PS-52, kot drugi ponovitvi istega seva (PS-15 b). Testirane seve lahko glede na njihove profile

BOX-PCR razdelimo v 5 skupin. Puščavski sev RO-FF-1 in vsi nabrežni sevi, razen PS-108, se delijo v dve skupini, ki med sabo kažeta 74 % podobnosti. V prvi skupini so sevi PS-261, PS-216, PS-51 in PS-14, ki spadajo v ekotip PE 10 in sev PS-55, ki spada v ekotip PE 32 in se najbolj razlikuje od ostalih znotraj te skupine. V drugi skupini lahko izolate razdelimo v tri podskupine: v prvi podskupini so sevi PS-218, PS-217, PS-196, RO-FF-1, PS-93 in PS-31. Trije sevi spadajo v ekotip PE 32 (PS-218, PS-217 in PS-93), sev RO-FF-1 sodi v ekotip PE 12, sev PS-31 pa v ekotip PE 10. V drugi podskupini so izolati PS-52, PS-15 in PS-24, ki spadajo v ekotip PE 32, v tretji pa sev PS-68 iz ekotipa PE 10, ki se najbolj razlikuje od ostalih dveh podskupin. Omenjenima skupinama je najbolj podoben sev PS-108 (65 % podobnosti). Sev DV3-E-3, ki spada v drugo podvrsto kaže 51 % podobnosti z nabrežnimi in puščavskim izolatom RO-FF-1, sev *B. amyloliquefaciens* 122 (PS-122) pa je, glede na velikost fragmentov med BOX elementi, ostalim najmanj podoben (21 % podobnosti z ostalimi testiranimi sevi).

Postavljeni predpostavki z omenjeno metodo nismo mogli v popolnosti potrditi. Kot smo predpostavili, seva PS-217 in PS-218 pokažeta visoko podobnost v profilu BOX-PCR. Podobno velja za seva PS-216 in PS-51, vendar iz slednje skupine izpade profil BOX-PCR seva PS-68, ki se tudi zlije s tema dvema sevoma, a tvori drugačen profil. Med BOX-PCR in pojavom prosojne linije ne opazimo nobene korelacije, saj se profili BOX-PCR med sabo izrazito razlikujejo.



Slika 9: Profili BOX-PCR (B) in drevo podobnosti, izrisano na podlagi profilov BOX-PCR (A). Za vsak sev smo izvedli PCR v dveh ponovitvah (a in b). V analizo smo poleg nabrežnih sevov (PS) vključili še puščavska seva RO-FF-1 in DV3-E-3. Seva PS-122 in DV3-E-3 spadata v drugo vrsto oziroma podvrsto (*B. amyloliquefaciens* oziroma *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*). Barve simbolov ob imenih izolatov predstavljajo ferotip (vijolična: 168; zelena: RS-D-2/NAF4; rumena: RO-H-1/RO-B-2), oblike pa ekotip (kvadrat: PE 10, trikotnik: PE 32, karo: PE 22, zvezdica: PE 22, križ: PE 12). Za sev PS-122 pripadnost ekotipu oziroma ferotipu ni določena. Prosojni kvadrati nad imeni sevov označujejo tiste seve, za katere smo predpostavili, da bodo med sabo izrazito podobni (zlitje). Obarvani krogi znotraj profilov BOX-PCR predstavljajo 5 skupin, ki med sabo tvorijo prosojne mejne linije. Vsaka barva označuje profil BOX-PCR ene ločene skupine.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vzorci medsebojnega prepoznavanja izolatov *B. subtilis* na poltrdnem gojišču B

Za seve *B. subtilis* je značilno rojenje, večcelično gibanje po površinah, pri katerem pomembno vlogo igrajo bički, medcelične interakcije in prisotnost surfaktanta, čeprav je ta način vedenja še vedno zelo slabo razumljen (Kearns, 2010). Surfaktanti znižujejo površinsko napetost med celico in substratom ter tako omogočajo premikanje sevov po površinah (Kearns in Losick, 2003). Vzorci rojenja so različni na različnih gojiščih. Na rojenje vplivata tudi koncentracija agarja in temperatura inkubacije (Julkowska, 2004). V magistrskem delu smo preverjali vzorce medsebojnega prepoznavanja nabrežnih izolatov in puščavskega izolata na gojišču B (0,7 % agar), kjer so vsi nabrežni izolati, razen PS-108 tvorili razvejane dendrite, kar je na tovrstnem gojišču značilen vzorec rasti tudi za naravni sev *B. subtilis* 3610 (Julkowska in sod., 2004). Seva PS-108 in RO-FF-1 sta zrasla v sluzavi obliki in sta na gojišču tvorila nesimetričen vzorec rasti.

Ko se na agarški plošči med sabo srečata dva različna roječa seva, se med njima tvori vidna meja z nižjo gostoto celic (Budding in sod., 2009). To so poimenovali Dienesova linija, po Louisu Dienesu, ki je leta 1946 preučeval kompatibilnost izolatov po Gramu negativne vrste *P. mirabilis* in opazil, da se med različnimi sevi tvori mejna linija, med kolonijami istega seva pa prihaja do zlitja (Dienes, 1946). Dienesov test se še danes uporablja v diagnostičnih laboratorijih za tipizacijo kliničnih izolatov *P. mirabilis* in *P. aeruginosa* (Budding in sod., 2009; Munson in sod., 2002), nedavne raziskave na Katedri za mikrobiologijo pa so pokazale, da se prosojna mejna linija, ki spominja na Dienesovo linijo, tvori tudi med izolati *B. subtilis* (Benigar, 2011).

V pričujoči raziskavi smo opazili, da se na gojišču B z 0,7 % agarja na mestu srečanja dveh roječih sevov *B. subtilis* tvorijo različni vzorci. Sevi so se med sabo zlili, tvorili prosojno Dienesovo linijo, tvorili mejni pas z opazno drugačno morfologijo kolonij ali pa je med

dvema sevoma prišlo do vidnega stika. V okviru te magistrske naloge smo preverjali, ali so določeni vzorci medsebojnega prepoznavanja vezani na ferotip ali ekotip. Ugotovili smo, da je Dienesova linija najpogostejši fenotip med dvema različnima sevoma, najredkeje pa opazimo zlitje sevov. In sicer, od 105 kombinacij smo zlitje med različnimi sevi zaznali le 4 krat, med kolonijami istega seva pa vedno. Prosojna linija je nastala pri 73 od 105 testiranih kombinacij različnih sevov. V preostalih 28 kombinacijah pa smo opazili široko morfološko drugačno mejo ali pa stik. Do zlitja ni nikoli prišlo pri sevih ki so imeli različen ferotip in ekotip. Kljub temu, da so se sevi istih ferotipov sposobni odzivati na medsebojne signale oziroma imajo sevi enakega ekotipa bolj podobna zaporedja gospodinjskih genov, te lastnosti najverjetneje ne igrajo dominantne oziroma neposredne vloge pri njihovem prepoznavanju na poltrdnih gojiščih. Tukaj imajo ključno vlogo druge, pri *B. subtilis* še nepoznane genetske determinante, ki jih bo potrebno še identificirati. Gibbs in sod. (2008) so z naključno transpozonsko mutagenezo našli mutanto seva *P. mirabilis* BB2000, ki je s starševskim, nemutiranim sevom tvorila Dienesovo linijo, ki se med dvema kolonijama istega, nemutiranega seva BB2000 ne tvori. Odkrili so, da je za nastanek linije med mutanto in starševskim sevom odgovoren operon *idsABCDEF*, iz 6 genov. Kasneje so ugotovili, da sta poleg operona *ids* v prepoznavanje genetsko identičnih sevov *P. mirabilis* vpletena še lokusa *tss* in *idr*. Lokus *idr* kodira proteine, ki so potrebni za zlitje s starševskim sevom BB2000, lokus *tss* pa nosi zapis za izlivni sistem tipa VI, ki je odgovoren za transport proteinov *Ids* in *Idr* iz celice (Wenren in sod., 2013). Te ugotovitve kažejo, da je mehanizem prepoznavanja med bakterijami zelo zapleten, in da je verjetno tudi za nastanek meje med sevi *B. subtilis* odgovoren kompleksen mehanizem, ki nam je zaenkrat še nepoznan.

5.1.2 Hemolitična aktivnost *B. subtilis*

Sevi iz rodu *Bacillus* predstavljajo mikrobnne tovarne, ki proizvajajo vrsto biološko aktivnih molekul. Štiri do pet odstotkov genoma *B. subtilis* predstavljajo geni, odgovorni za sintezo več kot 20 strukturno različnih protimikrobnih spojin (Stein, 2005). Med njimi so tudi ciklični lipopeptidi z lastnostmi surfaktantov. Najbolj znan biosurfaktant, ki ga sintetizira *B. subtilis* je surfaktin, poleg njega pa so za *B. subtilis* značilni tudi redkeje omenjeni

biosurfaktanti iz družin iturinov in fengicinov. Vse tri družine biosurfaktantov kažejo različne biološke aktivnosti, med katerimi je tudi hemolitična aktivnost. Tvorbo biosurfaktantov nabrežnih sevov in puščavskega seva RO-FF-1 smo spremljali z merjenjem hemolitične aktivnosti izrabljenih gojišč B in LB. Najvišjo hemolitično aktivnost med lipopeptidnimi biosurfaktanti, ki jih sintetizirajo sevi iz rodu *Bacillus*, ima surfaktin (Ongena in Jacques, 2007). Surfaktin se sintetizira v stacionarni fazi rasti, ko v rastnem gojišču začne primanjkovati hranil (Seydlová in Svobodová, 2008). Za merjenje hemolize v gojišču LB smo uporabili izrabljena gojišča, pridobljena 2 uri po vstopu v stacionarno fazo rasti, za merjenje hemolitične aktivnosti v gojišču B pa smo uporabili izrabljena gojišča sevov, ki smo jih pridobili 2 in 4 ure po vstopu v stacionarno fazo rasti. Med izbranimi časovnim točkama, z izjemo sevov PS-15 in PS-52, ni bilo signifikantnih razlik v relativni hemolitični aktivnosti. Intenziteta hemolitične aktivnosti se je med sevi razlikovala in ni bila vezana na fenotip ali ekotip.

Seva PS-Δ216 in RO-FF-1 v gojišču B nista izločala spojin s hemolitično aktivnostjo. Vzorec za odsotnost te aktivnosti pri RO-FF-1 ni poznan, sev PS-Δ216 pa ne sintetizira surfaktina, ker ima okvarjen zapis za encim ComQ, odgovoren za modifikacijo ComX v dekapeptid. Znano je, da je ta potreben za aktivacijo genov za sintezo surfaktina (D'Souza in sod., 1994). Fengicini imajo 40-krat nižjo hemolitično aktivnost kot surfaktini, zaradi česar je morda hemolitična aktivnost fengicina pod mejo detekcije (Deleu in sod., 2008). Tudi Morán in sod. (2002) so opazovali hemolitično aktivnost izolatov *B. subtilis* in kot glavni vzrok za hemolitično aktivnost seva *B. subtilis* O9 navedli surfaktin in zanemarili sintezo drugih surfaktantov, sposobnih hemolize.

V nasprotju z gojiščem B, kjer so vsi nabrežni sevi izločali snovi, ki so povzročile hemolizo eritrocitov, v gojišču LB nobeden izmed njih ni tvoril hemolitičnih spojin. To kaže na to, da je pomemben dejavnik, ki vpliva na sintezo surfaktina, tudi vrsta gojišča. Gojišče LB je kompleksno gojišče in predstavlja bogat vir hranil, gojišče B pa je revno in vsebuje le nujne komponente za rast *B. subtilis*.

5.1.3 Genotipizacija nabrežnih in puščavskih izolatov z BOX-PCR

BOX-PCR je ena izmed genotipizacijskih metod rep-PCR, ki temelji na pomnoževanju zaporedij med ponavljajočimi elementi BOX in se je mnogokrat izkazala za uspešno pri razlikovanju med vrstami in celo med sevi, ki pripadajo isti vrsti (Kim in sod., 2001; Tacão in sod., 2005; Brusetti in sod., 2008). Za BOX-PCR se najpogosteje uporabljajo začetni oligonukleotidi BOXA1R, ki se vežejo na elemente *boxA*. V magistrski nalogi smo z metodo BOX-PCR ugotavljali, ali lahko s pomočjo te metode ločimo ozko sorodne nabrežne seve znotraj vrste *B. subtilis*. Za kontrolo občutljivosti metode smo v analizo vključili še izolata iz podvrste *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* in vrste *B. amyloliquefaciens*. Nabrežni izolati in puščavski izolat RO-FF-1 se na podlagi analize zaporedij gospodinjskih genov *rpoB*, *dnaJ* in *gyrA* delijo v štiri ekotipe (Štefanič in sod., 2012). Zanimalo nas je, ali ekotipi in profili BOX-PCR sovpadajo.

Puščavska seva (RO in DV) in nabrežne seve smo na podlagi profilov BOX-PCR razdelili v 5 skupin. Sevi PS-108, DV3-E-3 in PS-122 se na dendrogramu ločijo med sabo in od ostalih nabrežnih sevov, ki se združujejo v dve večji skupini, znotraj katerih so izolati, ki pripadajo različnim ekotipom. V eno izmed omenjenih skupin spada tudi puščavski sev RO-FF-1. Glede na to, da so si pari istih sevov med sabo najbolj podobni, lahko iz naših rezultatov trdimo, da je BOX-PCR primerna metoda za razlikovanje med sevi, vendar naš dendrogram ni v skladu s filogenetsko pripadnostjo sevov, določeno na podlagi zaporedij gospodinjskih genov *rpoB*, *dnaJ* in *gyrA*. Ker so znotraj omenjenih dveh skupin prisotni izolati iz različnih ekotipov, na podlagi rezultatov tudi ne moremo trditi, da je BOX-PCR primerna metoda za razlikovanje sevov na podlagi njihove pripadnosti ekotipom. Vzroki za razporeditev v takšne skupine bi lahko bili tudi metodološki. Morda DNA naših sevov vsebuje večje število fragmentov, ki jih z našimi pogoji izvedbe BOX-PCR in gelske elektroforeze nismo zaznali in bi morebiti z izboljšavo metode dobili skupine, ki bi korelirale s pripadnostjo ekotipom. Brusetti in sod. (2008) so namreč opazili, da je bilo prisotnih več fragmentov, ko so pri BOX-PCR uporabili fluorescentno označene začetne oligonukleotide in produkte reakcije pregledali s kapilarno elektroforezo. To so pokazali pri sevih *B. cereus*, *Escherichia coli* in pri sevih iz rodov *Modestobacter* in *Blastococcus*. Z uporabo fluorescentno označenih začetnih oligonukleotidov pri BOX-PCR so 29 sevov

M. multiseptatus, izoliranih iz 3 mikrookolij iste karbonatne kamnine, razdelili v skupine, ki so korelirale z mestom njihove izolacije, medtem ko običajna metoda BOX-PCR v kombinaciji z gelsko elektroforezo ni bila primerna za ločevanje v takšne skupine. V isti študiji so tudi pokazali, da se sevi vrste *Streptococcus thermophilus*, izolirani iz jogurta, ki ga proizvajajo farme različnih geografskih območij, na podlagi F-BOX-PCR združujejo v skupine, ki korelirajo z geografskim poreklom produkta. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na uspešnost BOX-PCR in število pomnoženih fragmenotv, so tudi temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov, število ciklov PCR in izbira polimeraze ter primerne pufra za njeno delovanje (Cherif in sod., 2002; van Belkum in sod., 1996). Tudi mi smo imeli precej težav z optimizacijo BOX-PCR. Če smo uporabili previsoko temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov (53 °C) in premalo število ciklov (30), smo za posamezen sev dobili BOX profil z le dvema ali tremi fragmenti. Šele ko smo znižali temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov na 50 °C in zvišali število ciklov na 35 smo dobili rezultate z večjim številom dobljenih fragmentov. Takšne rezultate (profile BOX-PCR) smo nato lahko med sabo primerjali in jih analizirali. Poudariti pa je potrebno, da smo s takšno spremembo pogojev tudi znižali specifičnost vezave začetnih oligonukleotidov in s tem PCR, zaradi česar so naši rezultati morda manj zanesljivi.

Kljub zgoraj omenjenim potencialnim razlogom, zaradi katerih z BOX-PCR naših sevov nismo razdelili v skupine, ki bi korelirale s filogenetskimi skupinami, lahko na podlagi rezultatov trdimo, da je BOX-PCR primerna metoda za razlikovanje med vrstami in podvrstami. Profila BOX-PCR sevov *B. amyloliquefaciens* (PS-122) in *B. subtilis* subsp. *subtilis* (DV3-E-3) se namreč na dendrogramu ločujeta od ostalih preučevanih sevov, ki spadajo v podvrsto *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*. Da bi lahko vendarle z gotovostjo trdili, da BOX-PCR omogoča takšno razlikovanje, bi morali v analizo vključiti še seve iz drugih podvrst ali vrst ter več predstavnikov zgoraj omenjene vrste in podvrste.

5.1.4 Povezava med genotipskimi in fenotipskimi lastnostmi nabrežnih izolatov *B. subtilis*

Opazovali smo, ali obstaja povezava med vrsto stika roječih kolonij in genotipi, določenimi z BOX-PCR. Očitne povezave nismo opazili, saj je znotraj posameznih BOX-

skupin več sevov, ki ne kažejo sorodstvenega vzorca medsebojnega prepoznavanja. Le seva PS-217 in PS-218, ki se prepoznavata kot sorodna, sta tudi glede na profil BOX-PCR med sabo najbolj podobna. V nasprotju pa se sev PS-68, ki se medsebojno prepoznavava s sevoma PS-216 in PS-51, glede na profil BOX-PCR od njiju močno razlikuje. Med sevoma PS-93 in PS-52, ki sta si glede na profil BOX-PCR zelo podobna, pa nastane prosojna Dienesova linija. Zanimive lastnosti kaže sev PS-108, ki se glede na profil BOX-PCR najbolj razlikuje od ostalih nabrežnih izolatov, s katerimi na poltrdnem gojišču B tudi zmeraj tvori prosojno linijo. Tudi vzorec rasti tega seva je drugačen, saj raste nepravilno in izloča veliko sluzi. Sev PS-108 ima tudi najvišjo relativno hemolitično aktivnost v gojišču B, ki se signifikantno razlikuje od hemolitične aktivnosti skoraj vseh ostalih nabrežnih sevov. Puščavski sev RO-FF-1 glede na profil BOX-PCR sovпада z nabrežnimi izolati, vendar s temi na poltrdnem gojišču B tvori mejno linijo. Glede na to, da sev RO-FF-1 spada v drug ekotip in izhaja iz popolnoma drugačnega okolja kot nabrežni sevi, menimo, da metoda BOX-PCR ni primerna za ločevanje med sevi različnih ekotipov.

Iz naših rezultatov lahko tudi zaključimo, da surfaktin ni (edina) determinanta, ki določa tvorbo Dienesove linije, saj tako sev PS-108, ki kaže visoko hemolitično aktivnost in s tem tvorbo surfaktina, kot tudi sev RO-FF-1, ki nima hemolitične aktivnosti, tvorita na poltrdnem gojišču B prosojno mejno linijo z ostalimi sevi. Testirani sevi so med sabo precej različni in na podlagi naših rezultatov ne najdemo povezav med genotipi, določenimi z BOX-PCR in fenotipskimi lastnostmi, kot sta hemolitična aktivnost ali vzorec medsebojnega prepoznavanja na gojišču B.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov magistrskega dela lahko zaključimo naslednje:

- Med nabrežnimi sevi in puščavskim sevom se na poltrdnem gojišču B tvorijo različni vzorci medsebojnega prepoznavanja, med katerimi se najbolj pogosto pojavi prosojna mejna linija, podobna Dienesovi liniji.
- Vzorec medsebojnega prepoznavanja ne korelira z ekotipi ali ferotipi.
- Sevi se med sabo razlikujejo v intenziteti hemolitične aktivnosti. Najvišjo relativno hemolitično aktivnost v gojišču B ima sev PS-108, sev RO-FF-1 pa ne kaže hemolitične aktivnosti. Oba seva tvorita na poltrdnem gojišču prosojno linijo z ostalimi sevi.
- Sestava gojišča je pomemben dejavnik pri sintezi hemolitičnih spojin, saj so vsi nabrežni sevi kazali določeno stopnjo hemolize v gojišču B, medtem ko v gojišču LB nobeden izmed sevov ni tvoril metabolitov s hemolitično aktivnostjo.
- Metoda BOX-PCR je primerna za ločevanje ozko sorodnih sevov, vendar skupine, določene z BOX-PCR niso v skladu s skupinami, določenimi na podlagi nukleotidnih zaporedij gospodinjskih genov *rpoB*, *dnaJ* in *gyrA*.

6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo analizirali ozko sorodne nabrežne izolate *B. subtilis* pri čemer smo iskali povezave med filogenetsko sorodnostjo (ekotipi), ferotipi in vzorcem medsebojnega prepoznavanja na poltrdnem gojišču B. Poleg tega smo seve dodatno fenotipsko okarakterizirali tako, da smo določali hemolitično aktivnost izolatov v gojišču B in LB, ki korelira s sintezo biosurfaktantov. Hkrati nas je tudi zanimalo, ali lahko ozko sorodne seve razlikujemo z metodo BOX-PCR in ali se ta genotipizacija sklada s tisto, določeno na podlagi nukleotidnih zaporedij gospodinjskih genov *rpoB*, *dnaJ* in *gyrA*. Zanimalo nas je tudi, ali tako imenovani BOX-tipi korelirajo z vzorci medsebojnega prepoznavanja roječih kolonij.

Ugotovili smo, da imajo testirani sevi na poltrdnem gojišču štiri različne vzorce medsebojnega prepoznavanja, vendar se najpogosteje med njimi pojavlja prosojna mejna linija, ki spominja na Dienesovo linijo. Ta se pojavlja tako med pripadniki istih kot tudi med pripadniki različnih ekotipov ali ferotipov. Kolonije istih sevov se vedno zlijejo. Izjema je ekotip PE 10, znotraj katerega med tremi različnimi sevi prihaja do zlitja, ostala dva pa se s temi le stikata. Poleg tega do zlitja pride v primeru sevov PS-217 in PS-218, ki pripadata ekotipu PE32. Tipičnega vzorca medsebojnega prepoznavanja, značilnega za določen ekotip ali ferotip, nismo opazili. Tvorbo biosurfaktantov, sposobnih razgradnje eritrocitov, smo spremljali preko merjenja hemolitične aktivnosti izbranih izolatov. Rezultati kažejo, da so vsi nabrežni sevi sposobni hemolize v gojišču B, medtem ko puščavski sev RO-FF-1 ni kazal hemolitične aktivnosti. Vzroka ne poznamo. Sev PS-108 je imel najvišjo hemolitično aktivnost. V gojišču LB nobeden izmed preučevanih sevov ni tvoril hemolitičnih spojin. Tudi sinteza biosurfaktantov (najverjetneje surfaktina) ni lastnost, ki bi bila edini parameter, odgovoren za medsebojno prepoznavanje med sevi na poltrdnem gojišču, saj sta tako sev PS-108, ki je imel najvišjo hemolitično aktivnost, kot tudi sev RO-FF-1, ki ni sposoben hemolize, na poltrdnem gojišču B z vsemi ostalimi sevi tvorila Dienesovo linijo. Pokazali smo tudi, da je metoda BOX-PCR primerna za razlikovanje med ozko sorodnimi nabrežnimi sevi, vendar pa ta metoda ne korelira z

algoritmom simulacije ekotipov na podlagi gospodinjskih genov. Profili BOX-PCR tudi ne korelirajo z vrsto stika med roječimi kolonijami.

Najpomembnejši rezultat te magistrske naloge je, da smo pokazali, da se pri večini rojev ozkosorodnih sevov pojavi opazna mejna cona (v 101 kombinaciji od 105), kar pomeni, da so ti sevi verjetno genetsko različni. Morfološka raznolikost mejnih linij pa kaže, da je prepoznavanje med sevi posledica kompleksnih interakcij za katere je verjetno odgovorno večje število genov. Mutageneza le teh s transpozoni bi lahko prinesla boljši vpogled v molekularne mehanizme prepoznavanja med roječimi kolonijami.

7 VIRI

- Al-Ajlani M.M., Sheikh M.A., Ahmad Z., Hasnain S. 2007. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, 6: 17, doi:10.1186/1475-2859-6-17: 17 str.
- 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
- Bacon Schneider K., Palmer T.M., Grossman A.D. 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184, 2: 410-419
- Benigar E. 2011. Vpliv ekotipov in ferotipov na sobivanje izolatov *Bacillus subtilis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45 str.
- Bent S.J., Gucker S.L., Oda Y., Forney L.J. 2003. Spatial distribution of *Rhodopseudomonas palustris* ecotypes on a local scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5192-5197
- Brusetti L., Malkhazova I., Gtari M., Tamagnini I., Borin S., Merabishvili M., Chanishvili N., Mora D., Cappitelli F., Daffonchio D. 2008. Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC Microbiology*, 8: 220, doi:10.1186/1471-2180-8-220: 13 str.
- Budding A.E., Ingham C.J., Bitter W., Vandenbroucke-Grauls C.M., Schneeberger P.M. 2009. The Dienes phenomenon: competition and territoriality in swarming *Proteus mirabilis*. *Journal of Bacteriology*, 191, 12: 3892-3900
- Carson C.A., Shear B.L., Eilersieck M.R., Schnell J.D. 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3: 1836-1839

- Cherif A., Borin S., Rizzi A., Ouzari H., Boudabous A., Daffonchio D. 2002. Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 3: 456-462
- Chun J., Kyung S.B. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 2: 123-127
- Cohan F.M., Roberts M.S., King E.C. 1991. The potential for genetic exchange by transformation within a natural population of *Bacillus subtilis*. *Evolution*, 45, 6: 1383–1421
- Cohan M.F., Koeppl A.F., Krizanc D. 2006. Sequence-based discovery of ecological diversity within *Legionella*. V: *Legionella* state of the art 30 years after its recognition. Cianciotto N.P., Abu Kwaik Y., Edelstein P.H., Fields B.S., Geary D.F., Harrison T.G., Joseph C.A., Ratcliff R., Stout J., Swanson M.S. (eds.). Washington, ASM Press: 367-376.
- Cohan M.F., Perry E.B. 2007. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology*, 17, 10: 373-386
- Connelly M.B., Young G.M., Sloma A. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186, 13: 4159-4167
- Connor N., Sikorski J., Rooney A.P., Kopac S., Koeppl A.F., Burger A., Cole S.G., Perry E.B., Krizanc D., Feld N C., Slaton M., Cohan F.M. 2010. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5: 1349-1358
- Cosmina P., Rodriguez F., de Ferra F., Grandi G., Perego M., Venema G., van Sinderen D. 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 8, 5: 821-831

- Cvitkovitch D.G., Li Y., Ellen R.P. 2003 Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 11: 1626-1632
- Dahloff I., Baillie H., Kjelleberg S. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8: 3376-3380
- Deleu M., Paquot M., Nylander T. 2008. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 94, 7: 2667-2679
- Dienes L. 1946. Reproductive processes in *Proteus* cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 63: 265-270
- Dogša I., Choudhary K.S., Marsetič Ž., Hudaiberdiev S., Vera R., Pongor S., Mandić-Mulec I. 2014. ComQXPA quorum sensing systems may not be unique to *Bacillus subtilis*: a census in prokaryotic genomes. *PLoS ONE*, 9, 5: e96122, doi: 10.1371/journal.pone.0096122: 8 str.
- D'Souza C., Nakano M.M., Zuber P. 1994. Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 20: 9397-9401
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55, 3: 395-424
- Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269-275
- Fajardo-Cavazos P., Nicholson W. 2006. *Bacillus* endospores isolated from granite; close molecular relationship to globally distributed *Bacillus* spp. from endolithic and extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4: 2856-2863
- Ferris M.J., Kuhl M., Wieland A., Ward D.M. 2003. Cyanobacterial ecotypes in different optical microenvironments of a 68 degrees C hot spring mat community revealed by

- 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2893-2898
- Freitas D.B., Reis M.P., Lima-Bittencourt C.I., Costa P.S., Assis P.S., Chartone-Souza E., Nascimento A. MA. 2008. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. Isolated from steel plant waste. *BMC Research Notes*, 1: 92, doi: 10.1186/1756-0500-1-92: 11 str.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review in Microbiology*, 50: 727-751
- Gevers D., Cohan D.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackenbrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., Swings J. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 9: 733-739
- Gibbs K.A., Urbanowski M.L., Greenberg E.P. 2008. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science*, 321, 5886: 256-259
- Gibbs K.A., Wenren L.M., Greenberg E.P. 2011. Identity gene expression in *Proteus mirabilis*. *Journal of Bacteriology*, 193, 13: 3286-3292
- Gonzalez-Pastor J.E., Hobbs E.C., Losick R. 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301: 510-513
- Hamoen L.W., Venema G., Kuipers O. P. 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 194: 9-17
- Johnson J. 1973. Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 4: 308- 315
- Julkowska D., Obuchowski M., Holland I.B., Séror S.J. 2004. Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology*, 150, 6: 1839-1894

- Julkowska D., Obuchowski M., Holland I.B., Séror S.J. 2005. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *Journal of Bacteriology*, 187, 1: 65-76
- Kearns D.B., Losick R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49, 3: 581-590
- Kearns D.B., Losick R. 2005. Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Development*, 24, 19 : 3083-3094
- Kearns D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 9: 634-644
- Kim W., Hong Y., Yoo J., Lee W., Choi C., Chung S. 2001. Genetic relationship of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters*, 207, 1: 21-27
- Koeppel A.F., 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 to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7: 2504-2509
- Lazzazera B.A. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 2: 177-182
- Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C., Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 332: 1-16
- Lopez D., Vlamakis H.C, Kolter R. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 1: 152-163

- Magnuson R., Solomon J., Grossman A.D. 1994. Biochemical and genetical characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell*, 77, 2: 207-216
- Maamar H., Dubnau D. 2005. Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Molecular Microbiology*, 56, 3: 615-624
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Haekenbeck R. Morrison D.A., Boulnois G.J., Claverys J. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 20, 13: 3479-3483
- Miller M.B., Bassler B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria.. *Annual Review of Microbiology*, 55, 1: 165-199
- Mirouze N., Desai Y., Dubnau D. 2012. Spo0A~P imposes a temporal gate for the bimodal expression of competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics*, 8, 3: e1002586, doi: 10.1371/journal.pgen.1002586: 18 str.
- Morán A.C., Martínez M.A., Siñeriz F. 2002. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotechnology Letters*, 24, 3: 177-180
- Munson E., Pfaller M.A., Doern G.V. 2002 Modification of Dienes inhibition test for epidemiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 11: 4285-4288
- Nakamura L.K., Roberts M.S., Cohan F.M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1211-1215
- Nakano M.M., Corbell N., Besson J., Zuber P. 1992. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 232, 2: 313-321

- Nakano M.M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A., 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
- Ongena M., Jacques P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16, 3: 115-125
- 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
- Pfaller M.A., Mujeeb I., Hollis R.J., Jones R.N., Doern G.V. 2000. Evaluation of the discriminatory powers of the Dienes test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3: 1077-1080
- Piazza F., Tortosa P., Dubnau D. 1999. Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. *Journal of Bacteriology*, 181, 15: 4540-4548
- Piggot P.J., Hillbert D.W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 6: 579-586
- Roberts M.S., Cohan F.M. 1995. Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution*, 49, 6: 1081-1094
- Senior B.W. 1977. The Dienes phenomenon: Identification of the determinants of compatibility. *Journal of General Microbiology*, 102, 2: 235-244
- Seydlová G., Svobodová J. 2008. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, 3, 2: 123-133
- 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., Lazzazera B.A., Grossman A.D. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Development*, 10, 16: 2014–2024
- Sonensheim A.L., Hoch J.A., Losick R. 2002. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, ASM Press: 629 str.
- Stackenbrandt E., Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33, 4: 152-155
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 4: 845-857
- 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.
- Štefanič P., Decorosi F., Viti C., Petito J., Cohan F.M., Mandić-Mulec I. 2012. The quorum sensing diversity within and between ecotypes of *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*, 14; 6: 1378-1389
- Štefanič P., Mandić-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756-1764
- Tacão M., Alves A., Saavedra M.J., Correia A. 2005. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 2: 173-179
- Tam N.M.K., Uyen N.K., Hong H.A., Duc L.H., Hoa T.T., Serra C.R., Henriques A.O., Cutting S.M. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, 188, 7: 2692-2700
- Tortosa P., Logsdon L., Kraigher B., Itoh Y., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 183, 2: 451-460

- Tran L.S.P., Nagai T., Itoh Y. 2000. Divergent structure of the ComQXPA quorum sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 37, 5: 1159-1171
- Versalovic J., De Bruijn F.J., Lupski R.J. 1998. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. V: *Bacterial genomes*. de Bruijn F.J., Lupski J.R., Weinstock G. M. (eds.). New York, Kluwer Academic Publishers: 437-452
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski R.J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40
- Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Development*, 22, 7: 945-953
- Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L., Septer A.N., Gibbs K.A. 2013. Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *mBio*, 4, 4: e00374-13, doi: 10.1128/mBio.00374-13: 10 str.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec in somentorici prof. dr. Nives Ogrinc za mentorstvo in somentorstvo magistrskega dela ter prijaznost in spodbudo tekom celotnega procesa izdelave naloge.

Doc. dr. Blagajani Herzog-Velikonja za kritičen pregled dela in predsedniku komisije doc. dr. Mateju Butali za hiter odziv.

Lini Burkan Makivić za hiter odziv in strokovni pregled oblikovne ustreznosti magistrskega dela.

Barbari Kraigher za usmerjanje pri laboratorijskem delu, nasvete, spodbudo, motivacijo, družbo pri kosilih...in prijateljstvo.

Polonci Štefanič in vsem ostalim zaposlenim ter diplomantom na Katedri za mikrobiologijo: za pomoč, koristne nasvete in krajšanje časa med avtoklaviranjem, PCR-ji, inkubacijami, meritvami...Hvala vsem, ker ste mi lepšali dneve na Katedri.

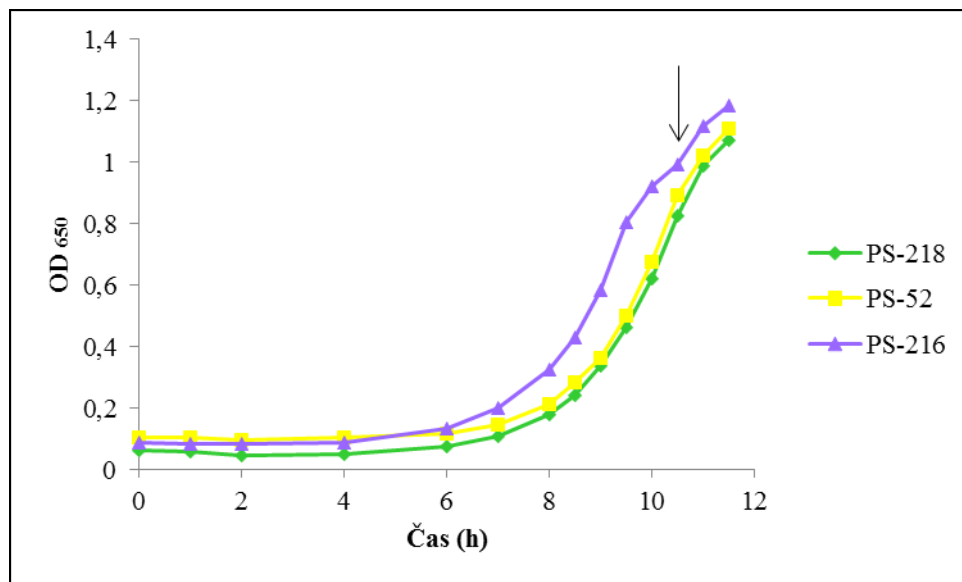
Mamici, očiju, sestri Anji in mami Faniki: ker ste me vseskozi podpirali, verjeli vame, se smejali z mano ob lepih in me bodrili v »kriznih« trenutkih.

Aleksandru za potrpežljivost in pomoč pri urejanju kazala.

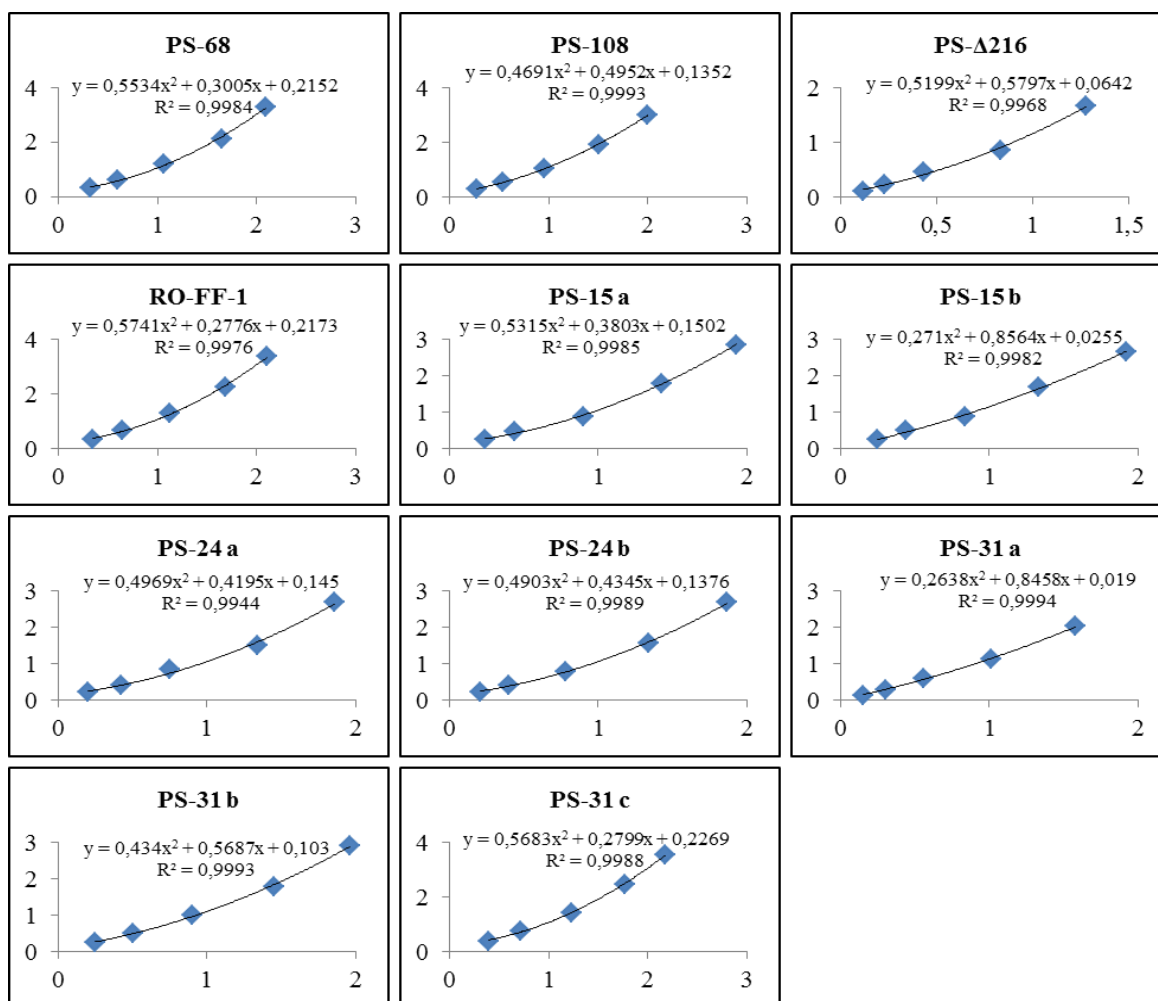
Prijateljicam Tjaši, Kamili in Ani, ker ste...Prijateljice.

Ostalim prijateljem in sošolcem, ker ste poskrbeli, da mi bodo študijska leta ostala v prečudovitem spominu.

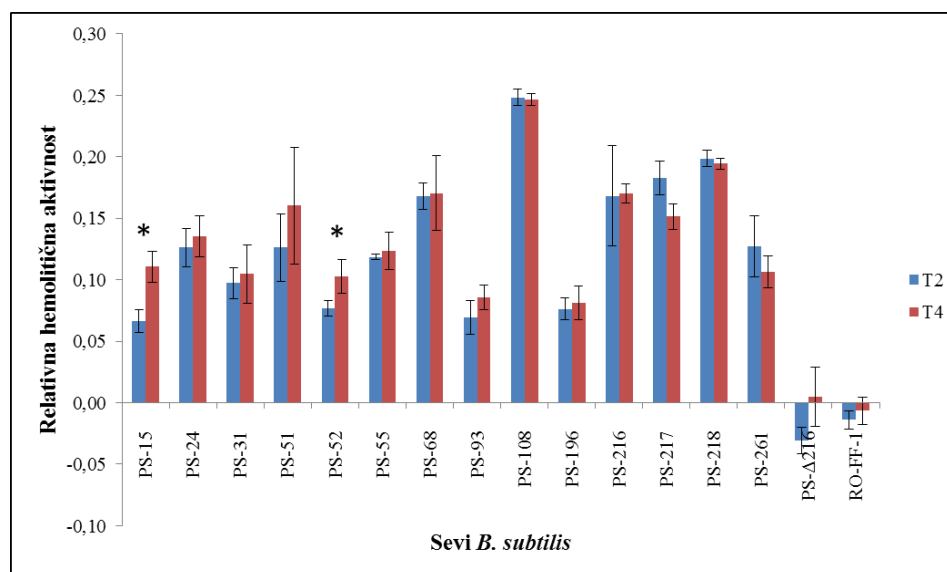
PRILOGE



Priloga A: Rastna krivulja sevov PS-218, PS-52 in PS-216. Na podlagi rastihijskih krivulj smo določili točki T2 in T4 (2 oziroma 4 ure po vstopu izolatov v stacionarno fazo rasti). Vsi trije sevi so v stacionarno fazo rasti vstopili po 10 urah (točke, označene s črno puščico). Sevi spadajo v različne fenotipe in ekotipe.



Priloga B: Normalizacija optične gostote. Na grafih so prikazane enačbe pripadajočih krivulj in vrednosti R^2 . Za izračun dejanske vrednosti OD_{650} (y) smo izmerjeno vrednost OD_{650} prekonočne kulture posameznega seva kot neznanke x vstavili v dobljene enačbe. Tako smo dobili 11 vrednosti y za posamezen sev, ki smo jih povprečili in končno (povprečeno) vrednost uporabili pri izračunu relativne hemolitične aktivnosti izrabljenih gojišč B. Na horizontalni osi so prikazane vrednosti izmerjene vrednosti, na vertikalni pa preračunane (dejanske) vrednosti.



Priloga D: Primerjava relativne hemolitične aktivnosti izbranih gojišč B, odvzetih 2 (T2) oziroma 4 (T4) ure po prehodu v stacionarno fazo rasti. Z izjemo sevov PS-15 in PS-52 (označeno z zvezdico nad stolpcem) med izbranimi časovnimima točkama ni signifikantnih razlik v relativni hemolitični aktivnosti.

	108	93	52	55	31	261	196	218	217	24	15	68	51	216	ROFF1	Δ216
108																
93	0,0047															
52	0,0048	0,5072														
55	0,0126	0,0060	0,0004													
31	0,0082	0,0757	0,0646	0,0465												
261	0,0221	0,0278	0,0274	0,5921	0,1408											
196	0,0049	0,5420	0,9766	0,0013	0,0790	0,0295										
218	0,1771	0,0002	0,0000	0,0000	0,0003	0,0085	0,0000									
217	0,1025	0,1366	0,0002	0,0012	0,0013	0,0271	0,0003	0,1366								
24	0,0176	0,0111	0,0066	0,4446	0,0666	0,9626	0,0082	0,0016	0,0085							
15	0,0040	0,7893	0,1940	0,0007	0,0274	0,0169	0,2500	0,0000	0,0002	0,0045						
68	0,0598	0,0009	0,0002	0,0014	0,0018	0,0583	0,0003	0,0138	0,2181	0,0177	0,0002					
51	0,0229	0,0360	0,0378	0,6606	0,1745	0,9684	0,0401	0,0111	0,0323	0,9977	0,0232	0,0682				
216	0,2107	0,0082	0,0083	0,0357	0,0184	0,0785	0,0086	0,7782	0,7386	0,0591	0,0064	0,3901	0,0813			
ROFF1	0,0010	0,0012	0,0001	0,0000	0,0002	0,0007	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001	0,0003	0,0000	0,0010	0,0010		
Δ216	0,0008	0,0008	0,0001	0,0000	0,0002	0,0006	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001	0,0003	0,0000	0,0008	0,0008	0,0940	

Priloga E: T-statistika, s katero smo preverjali signifikantnost razlik v hemolitični aktivnosti med posameznimi izolati. Vrednosti, nižje od 0,05 pomenijo, da so razlike v relativni hemolitični aktivnosti med izbranimi izolatom signifikantne, vrednosti nad 0,05 pa pomenijo, da med izolatom ni signifikantnih razlik v relativni hemolitični aktivnosti (obarvani kvadrati).