

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca ZALOŽNIK

**OSAMITEV IN IDENTIFIKACIJA SEVOV *Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Bacillus subtilis* STRAINS**

GRADUATION THESIS  
University studies

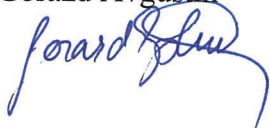
Ljubljana, 2004

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

Komisija za dodiplomski študij Enote medoddelčnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandič-Mulec, za recenzenta pa prof.dr. Gorazda Avgušтина.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandič-Mulec

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

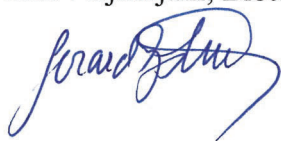


Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Ines Mandič-Mulec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo

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



Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Založnik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                        |
| DK | UDK 579. 8: 577. 2. 08: 631.461 (043)=863                                                                                                                                                                                                                 |
| KG | mikrobiologija tal / <i>Bacillus subtilis</i> / vzorci tal / Slovenija / Ljubljansko Barje /Jeprca / Tomačevo / Nabrežje Save / Himalaja / osamitev mikroorganizmov / identifikacija izolatov / molekularne tehnike / PCR / <i>16S rRNA</i> / <i>rpoB</i> |
| AV | ZALOŽNIK, Mojca                                                                                                                                                                                                                                           |
| SA | MANDIČ-MULEC, Ines (mentor)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)                                                                                                                                                                                                  |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                       |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije                                                                                                                                                                   |
| LI | 2004                                                                                                                                                                                                                                                      |
| IN | OSAMITEV IN IDENTIFIKACIJA SEVOV <i>Bacillus subtilis</i>                                                                                                                                                                                                 |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                     |
| OP | IX, 48 str., 11 pregl., 5 sl., viri                                                                                                                                                                                                                       |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                        |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                     |

AI Rod *Bacillus* sodi po navedbah raziskovalcev med najštevilnejše mikroorganizme v tleh. Iz štirih različnih lokacij Slovenije in s Himalajskega pogorja smo želeli osamiti seve vrste *Bacillus subtilis* iz talnih agregatov. Marca 2003 smo z nabrežja Save pri Tacnu osamili sporogene seve in jih fenotipsko in genotipsko opisali. Uporabili smo različne gojitvene, mikroskopske in biokemične identifikacijske metode in po analizi rezultatov izbrali sedem sevov, ki smo jih preverili še z molekularno metodo, ki temelji na tehniki PCR. Uporabili smo začetne oligonukleotide specifične za gen *16S rDNA* in za gen *rpoB* te bakterijske skupine. Na osnovi rezultatov, smo kot kandidate vrste *Bacillus subtilis* "sensu stricto" opredelili sedem sevov.

# KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 579. 8: 577. 2. 08: 631.461 (043)=863
- CX soil microbiology /*Bacillus subtilis* / soil lump /Slovenija / Ljubljansko Barje /Jeprca / Tomačevo / Nabrežje Save / Himalaja / isolation of microorganisms / identification of isolats /molecular techniques / PCR / *16S rRNA* / *rpoB*
- AU ZALOŽNIK, Mojca
- AA MANDIČ-MULEC, Ines (supervisor)/AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2004
- TI ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Bacillus subtilis* STRAINS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 48 str., 11 pregl., 5 sl., viri
- LA sl
- AL sl/en
- AB Genus *Bacillus* is cited as one of the most common microbial group in soil. We intended to isolate *Bacillus subtilis* strains from soil lumps from four different parts of Slovenia and from Himalaja mountain. A number of sporeforming isolates from soil lumps was isolated in march 2003 and subsequently characterized. On the basis of cultivating, microscopical and biochemical methods we were able to choose seven strains for further investigations with molecular techniques. These were based on technique PCR, using oligonukleotide primers specific for *16S rRNA* and *rpoB* genes of this bacterial group. On the basis of positive PCR reaction we identified all seven isolates as tentative members of *Bacillus subtilis* "sensu stricto" group.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI) z izvlečkom                                           | III       |
| Key words documentation (KWD) including abstract                                                | IV        |
| Kazalo vsebine                                                                                  | V         |
| Kazalo preglednic                                                                               | VII       |
| Kazalo slik                                                                                     | VII       |
| <br>                                                                                            |           |
| <b>1 UVOD</b>                                                                                   | <b>1</b>  |
| 1.1 NAMEN IN NAČRT DELA                                                                         | 2         |
| <br>                                                                                            |           |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                                                          | <b>3</b>  |
| 2.1 UVOD V TAKSONOMIJO PROKARIONTOV                                                             | 3         |
| 2.2 RAZVOJ TAKSONOMIJE PROKARIONTOV                                                             | 3         |
| 2.3 METODE IN PARAMETRI, UPORABLJENI PRI OPISU PROKARIONTSKE VRSTE                              | 5         |
| 2.3.1 Pridobivanje informacije o genomu                                                         | 5         |
| 2.3.2 Razmerje DNK baz (mol % G+C)                                                              | 5         |
| 2.3.3 DNK-DNK homologija                                                                        | 5         |
| 2.3.4 rRNK analize                                                                              | 6         |
| 2.3.5 Na DNK osnovane tipizacijske metode (DNK fingerprinting)                                  | 6         |
| 2.3.6 Fenotipske metode                                                                         | 7         |
| 2.3.7 Numerična taksonomija, uporabljena za namene fenotipskih analiz (fenetska ocena)          | 7         |
| 2.3.8 Kemotaksonomija                                                                           | 7         |
| 2.3.9 Fenotipske tipizacijske metode                                                            | 8         |
| 2.3.10 Identifikacijski ključi in diagnostične tabele                                           | 8         |
| 2.3.11 Mikrobní identifikacijski sistem                                                         | 11        |
| 2.4 EKOLOGIJA, TAKSONOMIJA IN IDENTIFIKACIJA RODU <i>BACILLUS</i>                               | 11        |
| 2.4.1 Ekologija                                                                                 | 11        |
| 2.4.2 Taksonomija                                                                               | 12        |
| 2.4.2.1 Tradicionalni pristopi                                                                  | 12        |
| 2.4.2.2 Numerična fenetika in kemotaksonomija                                                   | 12        |
| 2.4.4.3 Identifikacija vrst <i>Bacillus</i>                                                     | 13        |
| 2.4.4.4 Skupine osnovane na podobnosti sekvenc genov za 16S rRNK in genov, ki kodirajo proteine | 13        |
| 2.5 TAKSONOMIJA IN IDENTIFIKACIJA VRSTE <i>Bacillus subtilis</i>                                | 14        |
| 2.5.1 Zgodovina in taksonomija                                                                  | 14        |
| 2.5.1.1 Taksonomija in karakterizacija                                                          | 15        |
| 2.5.1.2 Novejši pristopi h karakterizaciji                                                      | 15        |
| <br>                                                                                            |           |
| <b>3 MATERIALI IN METODE DELA</b>                                                               | <b>16</b> |
| 3.1 MATERIALI                                                                                   | 16        |
| 3.1.1 Vzorčenje, izvor in shranjevanje sevov                                                    | 16        |
| 3.1.2 Kraji odvzema vzorcev                                                                     | 17        |
| 3.1.3 Gojišča in raztopine                                                                      | 19        |
| 3.1.4 Encimi, kemikalije in aparature                                                           | 22        |

|         |                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2     | <b>METODE</b>                                                                                                                                                                                             | 23 |
| 3.2.1   | <b>Selektivna izolacija bakterij rodu <i>Bacillus</i> iz vzorca tal</b>                                                                                                                                   | 23 |
| 3.2.2   | <b>Taksonomska analiza izbranih izolatov s tradicionalnimi fiziološko<br/>-biokemičnimi metodami</b>                                                                                                      | 23 |
| 3.2.3.  | <b>Biokemijski testi</b>                                                                                                                                                                                  | 23 |
| 3.2.3.1 | Barvanje po Gramu                                                                                                                                                                                         | 23 |
| 3.2.3.2 | Katalazni test                                                                                                                                                                                            | 23 |
| 3.2.3.3 | Test z metil rdečim                                                                                                                                                                                       | 24 |
| 3.2.3.4 | Test Voges-Proskauer                                                                                                                                                                                      | 24 |
| 3.2.3.5 | Citrat                                                                                                                                                                                                    | 25 |
| 3.2.3.6 | Razgradnje škroba                                                                                                                                                                                         | 25 |
| 3.2.3.7 | Fermentacija ogljikovih hidratov                                                                                                                                                                          | 25 |
| 3.2.4   | <b>Izolacija kromosomske DNK</b>                                                                                                                                                                          | 26 |
| 3.2.5   | <b>Agarozna gelska elektroforeza</b>                                                                                                                                                                      | 26 |
| 3.2.6   | <b>PCR (Verižna reakcija s polimerazo)</b>                                                                                                                                                                | 26 |
| 3.2.6.1 | Protokol A: reakcijska mešanica za pomnoževanje gena <i>rpoB</i>                                                                                                                                          | 27 |
| 3.2.6.2 | Temperaturni program pomnoževanja DNK s parom začetnih<br>oligonukleotidov <i>rpoBF</i> in <i>rpoBRO</i> :                                                                                                | 27 |
| 3.2.6.3 | Protokol B: reakcijske mešanice za pomnoževanje genov za <i>16S rDNK</i><br>( začetni oligonukleotidi BS1, BS2, BS3) in gena in <i>rpoB</i><br>( začetna oligonukleotida <i>rpoBF</i> in <i>rpoBRO</i> ). | 27 |
| 4       | <b>REZULTATI</b>                                                                                                                                                                                          | 28 |
| 4.1.    | <b>VZORČENJE NA PODROČJU LJUBLJANSKEGA BARJA</b>                                                                                                                                                          | 28 |
| 4.1.1   | <b>Biokemijski testi za izolate s področja Ljubljanskega Barja</b>                                                                                                                                        | 28 |
| 4.1.2   | <b>PCR(Verižna reakcija s polimerazo) z začetnimi<br/>oligonukleotidi za gen <i>rpoB</i></b>                                                                                                              | 28 |
| 4.2.    | <b>VZORČENJE NA PODROČJU JEPRCA</b>                                                                                                                                                                       | 30 |
| 4.2.1   | <b>Biokemijski testi za področje Jeprca</b>                                                                                                                                                               | 30 |
| 4.3     | <b>VZORČENJE NA PODROČJU NABREŽJA SAVE (SV) IN<br/>TOMAČEVEGA (ST)</b>                                                                                                                                    | 31 |
| 4.3.1   | <b>Biokemijski testi za izolate s področja nabrežje Save pri Tacnu<br/>in Tomačevo</b>                                                                                                                    | 31 |
| 4.3.2   | <b>PCR (Verižna reakcija s polimerazo) reakcija z začetnimi<br/>oligonukleotidi za <i>16S rRNA</i></b>                                                                                                    | 33 |
| 4.3.3   | <b>PCR (Verižna reakcija s polimerazo) z začetnimi<br/>oligonukleotidi <i>rpoBF</i> in <i>rpoBRO</i></b>                                                                                                  | 34 |
| 4.4     | <b>VZORČENJE NA PODROČJU HIMALAJASKEGA POGORJA (5600 m)</b>                                                                                                                                               | 36 |
| 4.4.1   | <b>Biokemijski testi za izolate s področja Himalaja</b>                                                                                                                                                   | 36 |
| 5       | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                                                                                                                                 | 37 |
| 6       | <b>POVZETEK</b>                                                                                                                                                                                           | 40 |
| 7       | <b>VIRI<br/>ZAHVALA</b>                                                                                                                                                                                   | 42 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Pomembne značilnosti za razlikovanje vrst rodu <i>Bacillus subtilis</i> in <i>Bacillus cereus</i>                                                        | 9  |
| Preglednica 2: Vzorci zemlje, ki smo jih obdelovali, njihove oznake, število obdelanih sevov iz enega vzorca, datum in kraj odvzema vzorca in pričetek obdelave vzorca. | 16 |
| Preglednica 3: Referenčni sevi rodu <i>Bacillus</i>                                                                                                                     | 16 |
| Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij in encimov ter proizvajalci                                                                                                | 22 |
| Preglednica 5: Imena in sekvence začetnih oligonukleotidov uporabljenih za namnoževanje genov <i>rpoB</i> in <i>16S rRNA</i>                                            | 26 |
| Preglednica 6 :Rezultati biokemijskih testov za izolate <i>Bacillus</i> s področja Ljubljanskega Barja                                                                  | 28 |
| Preglednica 7: Biokemijski testi za izolate s področja Ljubljanskega Barja (ponovno vzorčenje)                                                                          | 30 |
| Preglednica 8: Biokemijski testi za izolate z Jeprce                                                                                                                    | 31 |
| Preglednica 9: Biokemijski test za izolate s področja nabrežja Save pri Tacnu in Tomačevega                                                                             | 32 |
| Preglednica 10: Zbrani rezultati pozitivnih izolatov z območja nabrežje Save pri Tacnu(SV)                                                                              | 35 |
| Preglednica 11: Biokemijski testi za izolate s področja Himalajskega pogorja                                                                                            | 36 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1 : Zemljevid na katerem so označeni kraji odvzema vzorcev (Jeprca (P5-travnik in P6-obronek gozda), nabrežje Save pri Tacnu (SV-Sava voda in ST-Sava Tacen) in Tomačevo (TFP-Tomačevo nogometno igrišče in TT-Tomačevo travnik)). | 18 |
| Slika 2: PCR za izolate s področja Ljubljanskega Barja z oligonukleotidnimi začetniki <i>rpoBF</i> in <i>rpoBRO</i>                                                                                                                      | 29 |
| Slika 3: PCR za izolate SV(nabrežje Save pri Tacnu) z oligonukleotidnimi začetniki za <i>16S rRNA</i> , specifičnimi za <i>Bacillus subtilis</i>                                                                                         | 33 |
| Slika 4: PCR za izolate SV(nabrežje Save pri Tacnu) z oligonukleotidnimi začetniki <i>rpoBF(f)</i> in <i>rpoBRO(r)</i>                                                                                                                   | 34 |
| Slika 6: Morfološki izgled izbranih izolatov s področja SV (nabrežje Save pri Tacnu) gojenih na TBAB gojišču                                                                                                                             | 35 |

## 1. UVOD

Bakterijski sistemati in taksonomi še niso uspeli priti do popolnega soglasja o definiciji prokariotske vrste; temeljni enoti biološke raznolikosti. Zadnjega pol stoletja je bila bakterijska taksonomija usmerjena v izboljšave metod, ki omogočajo boljši fenotipski opis in identifikacijo, vendar določevanje vrst ni temeljilo na enotni splošno sprejeti definiciji vrste (Cohan, 2002). V evkariontski taksonomiji poznamo t.i. univerzalni koncept vrste: vrsta je skupina organizmov, ki jih druži kohezivna sila; divergenca med različnimi vrstami je ireverzibilna, različne vrste pa so ekološko različne. Pri prokariotih pa takšnih univerzalnih značilnosti nimajo vrste ampak ekotipi. To so populacije organizmov, ki naseljujejo isto ekološko nišo, njihova različnost pa je posledica naravne selekcije. Te ekotipe lahko odkrijemo z različnimi pristopi, ki praviloma temeljijo na preučevanju izbranih delov genomskih sekvenc. Te molekularne metode nakazujejo, da lahko vrsta vsebuje veliko ekotipov, ki imajo univerzalne lastnosti vrste. Bakterijska vrsta je torej bolj podobna rodu, kot pa vrsti (Cohan, 2002).

Rossello-Mora in Amann (2001) menita, da vrsto lahko opišemo kot monofiletsko in genomsko skladen skupek individualnih organizmov, ki kažejo visoko stopnjo podobnosti v več neodvisnih značilnostih in jih lahko prepoznamo po značilnih fenotipskih lastnostih. Predlagata, da se ta koncept imenuje filo-fenetski koncept vrste. Ta empirično ustvarjeni koncept ni zajet v nobenem od vsaj 22 konceptov, ki so opisani za evkarionte. Strinjata se, da je težko najti koncept, ki bi ustrezal temu, kar mikrobni taksonomi pojmujejo kot vrsto.

Rod *Bacillus* sestavljajo številne fiziološko precej različne paličaste Gram pozitivne bakterije, ki so aerobne in gibljive s peritrihimi flageli. Člani rodu so sposobni produkcije endospor, ki so visoko odporne na neugodne okoljske dejavnike (Claus in Berkeley, 1986). Rod sestavljajo različni fenotipsko heterogeni organizmi s širokim razponom prehranskih zahtev, fiziološke in metabolne različnosti in DNK bazne sestave. Razpon G+C je od 32 do 69 % (Claus in Berkeley, 1986), kar je dosti širše kot je običajno za rod (Norris in sod., 1981).

Razviti zanesljive metode za identifikacijo novih izolatov iz rodu *Bacillus*, ni bilo enostavno. Tradicionalne metode, ki temeljijo na morfologiji (posebno na sporah) in dihotomni ključki so bili v veliki meri opuščeni v prid računalniškim shemam, ki temeljijo na biokemijskih testih. Eden takih je API 50 CHB strip sistem (API, Planiview, N.Y.). Alternativna shema uporablja 30 tradicionalnih fenotipskih testov za identifikacijo predstavnikov 44 vrst. Numerična klasifikacija je osnovana na seriji fenetskih lastnosti uporabljenih za klasifikacijo 368 sevov *Bacillus* v 79 skupin (Priest in sod., 1988). V približno istem obdobju so se kot precej uporaben molekularni kronometer pojavile rRNK sekvence na podlagi katerih lahko ugotavljamo na filogenetske odnose, saj so prisotne v vseh organizmih. (Woese, 1987). Kmalu je bilo več vrst rodu *Bacillus* reklasificiranih na osnovi filogenetske analize sekvenc genov za 16S rRNK.

*Bacillus subtilis*, tipska vrsta rodu *Bacillus* zajema aerobne paličaste bakterije, ki tvorijo endospore. Ponavadi jih najdemo v tleh, vodnih virih ali pa v povezavi z rastlinami (Claus in Berkeley, 1986). Nakamura in sod., (1999) so seve *B. subtilis* razdelili v dve podvrsti; skupina W23 tvori podvrsto *B. subtilis* subsp. *subtilis* in skupina 168 podvrsto *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Podvrsti imata identičnih večino fenotipskih lastnosti. Razlikujeta se pri sestavi celične stene, kjer pri skupini W23 ribitol predstavlja glavno komponento celične stene,

medtem ko sevi 168 ribitola ne vsebujejo. Sorodnost zaporedij DNK, ugotovljena z metodo DNK – DNK hibridizacije, je znotraj obeh skupin 82 do 100-odstotna, medtem ko je sorodnost med skupinama 58 do 68 – odstotna (Nakamura in sod., 1999).

Identifikacija *B. subtilis* podobnih organizmov je zahtevno in dolgotrajno opravilo, saj se jih ne da ločiti z običajnimi biokemijskimi testi (Nakamura in sod., 1999). Gen za 16S rRNK je uporabljan kot ogrodje moderne bakterijske klasifikacije, vendar pogosto kaže omejitve pri ločevanju članov zelo sorodnih taksonov (Fox in sod., 1992), kot je *B. subtilis* in njemu sorodne vrste, saj imajo ti organizmi skoraj identične sekvence 16S rRNK (99,2-99,6 % podobnosti sekvenc; Ash in sod., 1991; Nakamura in sod., 1999). Po drugi strani pa geni, ki kodirajo proteine izkazujejo dosti višjo raven genetske variacije, kar lahko uporabimo za klasifikacijo in identifikacijo bolj sorodnih taksonov (Mollet in sod., 1997, Ansaldi in sod., 2002).

## 1.1 NAMEN IN NAČRT DELA

- V diplomski nalogi smo želeli osamiti aerobne sporogene seve iz rodu *Bacillus* iz talnih agregatov iz različnih mest v Sloveniji in Himalajskega pogorja.
- Sporogene izolate smo želeli identificirati s tradicionalnimi taksonomskimi metodami
- Izolate, ki bi jih na osnovi tradicionalnih taksonomskih preiskav lahko uvrstili v vrsto *B. subtilis*, smo nameravali še dodatno preučiti z molekularnimi metodami, ki temeljijo na tehniki PCR (verižna reakcija s polimerazo) in uporabi začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen *16S rDNK* oziroma za gen *rpoB* te bakterijske skupine.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 UVOD V TAKSONOMIJO PROKARIONTOV

Ena od nalog bakterijskega taksonoma je ustvariti jezik, skupen in razumljiv vsem mikrobiologom. Kljub velikemu prispevku prokariontov k biosferi je bila njihova raznolikost in pomembnost s strani ne-mikrobiologov zmeraj podcenjena. To je eden od razlogov, zakaj so do danes opisali manj kot 5000 vrst. Ta nizka številka je posledica težav, ki se pojavljajo pri izolaciji in gojenju mikroorganizmov v čisti kulturi in pri nadaljnjem opisu njihovih značilnosti. Preučevanja sestave mikrobnih združb v okoljskih vzorcih z molekularnimi metodami, ki temeljijo na 16S rRNA so pokazala, da dosedaj opisane prokariontske vrste predstavljajo le majhen delež resnične raznolikosti prokariontov (Bull in sod., 1992).

V zadnjih treh desetletjih so bakterijski taksonomi k naboru metod za določevanje vrst dodali molekularne tehnike. Z DNK – DNK hibridizacijo so taksonomi lahko ocenili genomsko podobnost organizmov in to z merjenjem deleža homologije njunih genomov. Johnson (1973) je ugotovil, da so imeli sevi iste vrste, skoraj vedno skupnih 70 ali več % njunih genomskih sekvenc in da so sevi različnih vrst imeli skupnih manj kot 70 % genomskih sekvenc. 70 % enakost genomov je torej postala pravilo za določitev ali sodita dva seva v isto vrsto ali ne (Wayne, 1987). Slednja primerjava pa je možna le, če znamo organizem gojiti v čisti kulturi (Wayne in sod., 1987).

V zadnjem času zaradi lažje izvedbe raziskovalci večinoma uporabljajo filogenetsko analizo sekvenc nekaterih delov genoma, še posebej genov, ki kodirajo 16S rRNK. Stackebrandt in Goebel (1994) sta ugotovila, da so sevi, ki se v sekvencah genov za 16S rRNK razlikujejo za več kot 3%, skoraj vedno člani različnih vrst, kot so bile določene z DNK – DNK hibridizacijo. Sevi, ki se v sekvencah genov za 16S rRNK razlikujejo manj kot 3 %, so lahko ali pa tudi ne člani iste vrste.

Bakterijska taksonomija je postala zaradi molekularnih pristopov dosti bolj učinkovita. Z molekularnimi tehnikami lahko sedaj preverimo homogenost vrst, celo če nismo prepričani o fenotipskih in ekoloških razlikah med skupinami. V primeru bakterij, ki se jih ne da gojiti, pa so molekularne tehnike edina metoda za identifikacijo in analizo raznolikosti vrst (Cohan, 2002).

### 2.2 RAZVOJ TAKSONOMIJE PROKARIONTOV

Taksonomija prokariontov je med različnimi taksonomijami najmlajša in se najhitreje spreminja. Do pred nekaj stoletji sploh niso vedeli za obstoj prokariontov in sicer zaradi njihove majhne velikosti in dejstva, da niso vidni s prostim očesom. Poleg tega je bil razvoj taksonomije nižjih organizmov zasnovan na morfoloških lastnostih, kar je pri prokariontih težavno zaradi njihove relativne strukturne preprostosti. Pomanjkanje uporabnih fosilnih ostankov je skupaj s težavami pri identifikaciji posameznih diagnostičnih značilnosti prispevalo k nestabilnosti prokariontskega taksonomskega sistema. V 17. in 18. stoletju so imeli prokarionte za eno samo vrsto, ki lahko razvije množico oblik (pleomorfizem). Eden od najpomembnejših korakov v razvoju mikrobiologije je bila izolacija mikroorganizmov v čisti kulturi (Cohn in Schroeder sta izolirala kromogene bakterije), (Logan, 1994).

Z gojenjem mikroorganizmov v čisti kulturi so znanstveniki lahko pridobili različne informacije o mikroorganizmih. Razvili so številne teste za identifikacijo bakterij in ti so tvorili osnovo za njihovo klasifikacijo (Logan in Berkeley, 1984). Iz tega je bil možen fenotipski opis bakterij. Ko pa je bil v letu 1923 objavljen prvi Bergeyev priročnik za določevalno bakteriologijo (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology); je bil s tem zagotovljen moderen identifikacijski ključ za bakterije. Do tedaj ni bilo nobene jasne opredelitve glede najpomembnejših principov bakterijske klasifikacije (Staley in Krieg, 1989). Ta priročnik in kasnejše izdaje so postale najpomembnejša referenca za bakterijsko klasifikacijo (Logan, 1994).

V poznih 50. letih prejšnjega stoletja je sledil razvoj numerične taksonomije. Še vedno je obstajala nujna po objektivnih metodah taksonomske analize z namenom uvrščanja posameznih sevov bakterij v homogene skupine, ponavlja vrste in ureditev vrst v rodove in višje taksoni (Sneath, 1989). Obdobje numerične taksonomije je sovpadlo z vzponom kemotaksonomije in aplikacijo modernih biokemijskih analitskih tehnik. Prevladovala so kromatografske in elektroforetske separacijske metode za študij porazdelitve specifičnih kemičnih sestavin v bakterijah kot so aminokisline, proteini, sladkorji in lipidi (Logan, 1994).

V zgodnjih šestdesetih letih je vedno večje razumevanje o lastnostih DNK in razvoj molekularnih bioloških tehnik omogočilo razvoj ideje, da bi bakterije lahko klasificirali s primerjavo genomov. Sledila je uporaba sestave baznih parov (mol% G+C) v klasifikacijske namene. Bakterije, ki se opazno razlikujejo v % G+C očitno ne sodijo v isto vrsto. Kasneje so razvili DNK - DNK hibridizacijo, katere prednost je, da omogoča jasnejše definicije skupin sevov kot metode, ki so osnovane le na fenotipskih lastnostih (Krieg, 1988).

V poznih sedemdesetih letih se je zgodil velik preboj v poskusih ugotavljanja sorodnosti odnosov s katalogiziranjem ribosomskih ribonukleinskih kislin (rRNA) (Stackebrandt in sod., 1985), DNK - RNA hibridizacijo (De Ley in De Smedt, 1975), in sredi osemdesetih s popolno sekvenčno analizo genov za rRNA. Sekvence rRNA so se pokazale kot zelo uporaben molekularni marker za filogenetsko analizo (Ludwig in Schleifer, 1994). Med tremi rRNA molekulami je 16S rRNA najbolj preučena in daje na voljo dovolj in za večino primerov ustrezne informacije (Maidak in sod., 1997). Sekvenčiranje genov za rRNA je postalo rutina v večini mikrobioloških laboratorijev in čeprav ni nujna za opis novih vrst, pa to informacijo vsebujejo skoraj vsi opisi na novo opisanih bakterijskih vrst. V zadnjem času se tudi vedno pogosteje dogaja, da se predlagajo nove bakterijske vrste z uporabo podatkov iz 16S rRNA sekvenčnih študij (Stackebrandt in Goebel, 1994). Na žalost pa razločevalna moč 16S rRNA ne omogoča popolne rešitve taksonomskih nejasnosti v vseh primerih (Fox in sod., 1992, Martinez-Murcia in sod., 1992). Tudi izbor ribosomskih genov kot markerja za filogenetske sklepe je pod vprašajem (Cohan, 1994; Gribaldo in sod., 1999; Gupta, 1998). Vseeno danes večina bakterijskih taksonomov sprejema, da 16S rRNA sekvenčna analiza zagotavlja stabilen in precej zadovoljujoč okvir za klasifikacijo prokariontov.

## 2.3 METODE IN PARAMETRI, UPORABLJENI PRI OPISU PROKARIONTSKE VRSTE

Danes se vsi prokariontski taksonomi strinjajo, da je možno doseči zanesljivo klasifikacijo samo z obširno raziskavo raznolikosti taksonov in to s širokim naborom tehnik, kar poznamo kot polifazni pristop (Vandamme in sod., 1996). Tak pristop pomeni, da morata biti obsežno preučena dva vira informacij; informacija o genomu in o fenotipu. Informacijo o genomu pridobimo iz podatkov o nukleinskih kislinah direktno prek sekvenciranja ali indirektno prek parametrov kot so DNK - DNK podobnost ali mol % G+C. Fenotip pa pomeni, kako se genotip izrazi; vidne ali kako drugače izmerljive fizikalne ali biokemijske karakteristike organizma, ki se izrazijo v interakciji genotipa in okolja (Sneath, 1989 b).

### 2.3.1 Pridobivanje informacije o genomu

Metode za ugotavljanje informacije o genomu so v glavnem usmerjene proti DNK ali RNK molekulam (Vandamme in sod., 1996). Za razliko od ostalih celičnih sestavin, ki jih lahko preučujemo s kemotaksonomskimi metodami, okoljski dejavniki vplivajo samo na količino in ne na sekvenco RNK ali kromosomalne DNK. Še več, nukleinske kisline so univerzalne in so zato odlične kot standardi za primerjalne študije. Najbolj popolno genetsko informacijo nam seveda da analiza celotnega bakterijskega genoma. Za pridobivanje informacij uporabljamo analizo celotne bazne sestave DNK, primerjava genomskih podobnosti s parjenjem DNK - DNK, ustvarjanje dolžinskih polimorfizmov z razgradnjo z restrikcijskimi endonukleazami (RFLP), pulzna gelska elektroforeza v električnem polju (PFGE), primerjava sekvenc izbranih genov, DNK – rRNK hibridizacija in sekvenciranje rRNK (Woese, 1992).

### 2.3.2 Razmerje DNK baz (mol % G+C)

Relativna raven  $[G+C]/[A+T]$  nukleotidnih baz se razlikuje od genoma do genoma. DNK bazno razmerje je izraženo v procentih G+C in se navadno imenuje procent G+C;  $[G+C]/[G+C+A+T] \cdot 100$ . To je bila prva metoda analize nukleinskih kislin, ki so jo uvedli v prokariontsko sistematiko (Lee in sod., 1956), in izkazalo se je, da je uporabna za razlikovanje med fenotipsko podobnimi in genomsko različnimi sevi (Goodfellow in O' Donnell, 1993). Večja kot je razlika med dvema organizmoma, manj sta sorodna. Teoretično DNK molekule, ki se razlikujejo več kot 20-30 mol % G+C nimajo nobenih skupnih sekvenc (Logan, 1994). Empirično je bilo dokazano, da organizmi, ki se razlikujejo za več kot 10 mol % G+C, ne pripadajo istemu rodu, 5 mol % G+C pa je običajna raven razlikovanja, ki jo najdemo znotraj vrste. Medtem ko morajo biti trdne meje za razpon variacije še postavljene, pa so vrednosti višje od 15 mol % G+C indikacija heterogenosti znotraj rodu (Goodfellow in sod., 1997).

### 2.2.3 DNK-DNK homologija

Ugotavljanje podobnosti celotnega genoma DNK-DNK je danes še vedno standardna tehnika za določevanje mej mikrobnih vrst (Stackebrandt in Goebel, 1994). Značilna lastnost molekul DNK in RNK je njuna zmožnost reasociacije ali hibridizacije. DNK iz različnih organizmov reasocirajo glede na podobnost njihovih nukleotidnih sekvenc in s tem omogočijo oceno stopnje sorodnosti; ponavadi so izražene kot % podobnosti ali homologije (Stackebrandt in Goebel, 1994). Večja kot je genetska podobnost med dvema organizmoma; več je skupnih nukleotidnih sekvenc in več bo hibridne formacije. Obstajata dva glavna parametra, ki ju uporabljamo za ugotavljanje stopnje sorodnosti: RBR- relative binding ratio (relativna raven vezave) in razlika v  $T_m$  (thermal denaturation midpoint).

### 2.3.4 rRNK analize

V zadnjih 25 letih so tehnike, ki vključujejo analizo rRNK ali genov, ki kodirajo rRNK, povzročile revolucijo v taksonomiji prokariontov. Zaključki na podlagi teh študij so osnovani na domnevah, da so geni rRNK visoko ohranjeni zaradi temeljne vloge, ki jo imajo ribosomi v procesu proteinske sinteze. Molekule rRNK so univerzalne in imajo konstantne in visoko specializirane funkcije, ki so bile osnovane v zgodnji fazi evolucije; tudi spremembe v okolju nanje niso vplivale. Zaradi tega in ker so to velike molekule, ki vsebujejo precej genetske informacije, so bile izbrane kot molekularna osnova za filogenetsko rekonstrukcijo vsaj na področju prokariontov (Woese, 1992). Za veljavnost tega pristopa sta potrebni še dve dodatni domnevi; namreč, da med rRNK geni ni prišlo do horizontalnega prenosa in da stopnja evolucije ali neenakosti med rRNK genskimi sekvencami dveh organizmov predstavlja variacijo, ki jo kažeta pripadajoča genoma (Goodfellow in sod., 1997). Če to drži, potem bodo variacije med primarnimi strukturami rRNK odsevale evolucijske razdalje med organizmi. Za filogenetske namene je bila uporabljena tudi 5S rRNK. Ta je bila opuščena v korist 16S rRNK zaradi različnih razlogov, vključujoč večjo vsebino informacije večje molekule. Danes je popolno sekvenciranje omenjene molekule skoraj rutina. Molekula za 23S rRNK je večja informacijska enota kot molekula za 16S rRNK in ima v mnogih primerih večjo resolucijsko moč za filogenetske rekonstrukcije kot molekula za 16S rRNK (Ludwig in sod., 1998; Ludwig in Schleifer, 1999). Vendar pa zaradi velikosti molekul za 23S rRNK sekvenciranje le teh ni bilo tako popularno in zato je število sekvenc genov za 23S rRNK v bazah podatkov precej manjše (Ludwig in sod., 1998; Ludwig, 1999). Pomembna značilnost sekvenc za 16S rRNK je relativna enostavnost poravnave (Embley in Stackebrandt, 1997). Zmeraj pa obstajajo variabilne regije, ki jih ne moremo točno poravnati in način, kako bo uredil podatke, ostaja subjektivna odločitev raziskovalca (Ludwig in sod., 1998). Sekvenciranje 16S rRNK in primerjalne analize so prikazale visoko razločevalno moč za merjenje stopnje sorodnosti med organizmi nad ravni vrste. Moč razločevanja 16S rRNK pa je tudi omejena, posebej pri zelo sorodnih organizmih (Stackebrandt in Goebel, 1994; Grimont, 1988). Zato bakterijske vrste ne moremo opredeliti samo na osnovi analize sekvenc 16S rRNK.

### 2.3.5 Na DNK osnovane tipizacijske metode (DNK fingerprinting)

Metode, osnovane na DNK ponavadi omogočajo zaznavanje znotrajvrstne raznolikosti; to je pododdelke znotraj vrste. So dodatek fenotipskim analizam, ki skušajo odkriti raznolikost v taksonih kot so vrste ali celo podvrste (Vandamme in sod., 1996). Poznamo dve osnovni tehniki: restrikcijske tehnike prve generacije, ki so osnovane na restrikcijski analizi genomskih fragmentov, in metode, osnovane na verižni reakciji s polimerazo (PCR); ki so osnovane na pomnoževanju delov genoma. Večina tehnik temelji na elektroforetski ločitvi in kasnejši vizualizaciji DNK fragmentov oziroma pomnožkov. Te tehnike so praviloma uporabne le pri razumevanju znotrajvrstne raznolikosti in niso primerne za opis prokariontskih vrst ali za opredeljevanje višjih taksonomskih enot.

### 2.3.6 Fenotipske metode

Fenotip je vidni izraz genotipa. Preden so bile molekularnim taksonomom na voljo molekularne tehnike, je bila taksonomija osnovana le na morfologiji, fiziologiji in rastnih značilnostih organizma. Te raziskave so bile neposredno povezane z nujnim obstojem čistih kultur in sposobnosti laboratorija za gojenje mikroorganizmov in analizo njihovih lastnosti. Ena od pomanjkljivosti analize fenotipa je, da celoten informacijski potencial prokariontskega genoma ni nikoli izražen. Izražanje genov je neposredno povezano z razmerami v okolju (ali ravnimi pogoji v laboratoriju). Torej je analiza fenotipa prokariontov v glavnem odvisna od nivoja eksperimentalnih tehnik, ki posredno ali neposredno testirajo različne fenotipske lastnosti, na primer encimsko aktivnost, kinetiko porabe substrata in rastne značilnosti (Rosello-Mora in Amann, 2001).

Fenotipske podatke za razliko od sekvenc genov lahko primerjamo le fenetsko; to pomeni skozi primerjavo velikega seta neodvisnih karakteristik (Sneath;1989; Sneath in Sokal: 1973). Te primerjave nam dajo rezultate, ki odražajo stopnjo podobnosti enot, ki jih analiziramo. Fenotipske analize zahtevajo veliko časa in spretnosti, tehnike pa morajo biti standardizirane, da bi se izognili subjektivnim ocenam. Za ta namen je posebno pomembno, da se izbere ustrezne referenčne organizme, ki so v raziskavo vključeni (Smibert in Krieg; 1994).

Klasične fenotipske lastnosti bakterij zajemajo morfološke, fiziološke in biokemijske lastnosti. Večina od teh značilnosti ne omogoča ocene genetske sorodnosti, kot celota pa zagotavljajo opisno informacijo, ki nam omogoča prepoznavanje taksonov. Morfologija bakterij vključuje celične značilnosti (oblika, endospora, biček, inkluzijska telesca, Gramsko barvanje...) in značilnosti kolonij (barva, velikost, oblika...). Fiziološke in biokemijske lastnosti vključujejo podatke o rasti pri različnih temperaturah, pH vrednostih, koncentracijah soli ali atmosferskih pogojih (aerobno/anaerobno), rast v prisotnosti različnih substanc, kot so protimikrobni agensi, ali aktivnosti v prisotnosti različnih encimov in metabolizem različnih sestavin. Ponovljivost rezultatov v okviru enega laboratorija, še bolj pa med različnimi laboratoriji, je velik problem, ki se mu lahko ognemo z visoko standardiziranimi postopki (Vandamme in sod., 1996).

### 2.3.7 Numerična taksonomija, uporabljena za namene fenotipskih analiz (fenetska ocena)

Numerična taksonomija je poznana tudi kot klasifikacija s pomočjo računalnika (Good fellow in O' Donnel, 1993). Sneath in Sokal (1973) sta definirala numerično taksonomijo kot uvrščanje taksonomskih enot v taksone z numeričnimi metodami na osnovi njihovih lastnosti. Metode zahtevajo prevajanje informacije o taksonomskih entitetah v numerične kvantitete. Za fenetske principe, ki so osnovani na Adansonianovi taksonomiji, velja, da naj bi preučili vse možne značilnosti sevov, jih enakovredno ocenili in pretehtali. Taksoni naj bi se določili na osnovi skupne podobnosti glede na rezultate analize.

### 2.3.8 Kemotaksonomija

Fenotipske metode zajemajo vse metode, ki niso usmerjene proti DNK ali RNK in torej vključujejo kemotaksonomske tehnike. Izraz kemotaksonomija se nanaša na aplikacijo analitskih metod o različnih kemijskih sestavinah celice z namenom klasifikacije bakterij (Vandamme in sod., 1996). Vsekakor so izmerjeni parametri direktna ekspresija genetske

informacije organizma in se jih obravnava kot fenotip (Vandamme in sod., 1996). Kemotaksonomija se ukvarja s porazdelitvijo aminokislin, lipidov, proteinov in sladkorjev in zagotavlja dobra izhodišča za posamezne podatke za klasifikacijo in identifikacijo (Goodfellow in O' Donnell; 1993). Pomembno je, da so opazovane razlike ali podobnosti v kemijski sestavi rezultat genetskih razlik in niso posledica variacij v gojitvenih razmerah (Goodfellow in O' Donnell; 1993). Rutinsko se v prokariontski taksonomiji uporablja več tehnik:

- sestava celične stene; ponavadi se uporablja pri klasifikaciji G<sup>+</sup> organizmov; analizira se tip peptidoglikana in teihojska kislina ( Schleifer in Kandler; 1972; Suzuki in sod., 1993);
- lipidi: razporeditev in relativna raven maščobnih kislin, polarni lipidi, lipopolisaharidi, izoprenoidni kinoni, so ponavadi analizirani s kromatografijo in se uspešno uporabljajo za ločevanje med taksoni različnih ravni ( Suzuki in sod., 1993; Kaempfer, 1998);
- poliamini; (polikationske sestavine s pomembno, a nejasno vlogo v prokariontski celici) njihova razporeditev in relativna raven je lahko razločevalna za taksone nad ravniyo reda (Buse in Auling; 1988).

### **2.3.9 Fenotipske tipizacijske metode**

Uporabne so za postavljanje odnosov znotraj vrste, vendar ponavadi nimajo resolucije nad to taksonomsko ravniyo (Rossello in sod., 1992; Rosello-Mora in sod., 1994; Vandamme, 1998). Je več metod, ki so bile uspešno uporabljene za razlikovanje sevov kot za razumevanje intraspecifične variabilnosti:

- serotipizacija (Rossello in sod., 1992; Rosello-Mora in sod., 1994; Vandamme, 1998, Henriksen, 1978);
- elektroforetski profili proteinov (Rossello in sod., 1992; Rosello-Mora in sod., 1994);
- elektroforetski profili lipopolisaharidov (Rossello in sod., 1992);
- pirolizna masna spektrometrija, Fourierjeva transformacija, infra rdeča spektroskopija in UV resonančna Ramanska spektroskopija (Magee, 1993).

### **2.3.10 Identifikacijski ključ in diagnostične tabele**

Eden od ciljev fenotipske karakterizacije je konstrukcija ogrodja za učinkovito identifikacijo organizmov. To ogrodje je lahko osnova za pripravo dihotomnih identifikacijskih ključev, s katerimi ugotavljamo identiteto izolatov po urejenih vprašanjih korak za korakom. V mikrobiologiji so bolj pogoste diagnostične tabele, ki vsebujejo več informacije kot dihotomni ključ in so dosti bolj uporabne za določevanje (Trueper in Schleifer, 1992). Te tabele so osnovane na značilnostih, ki identificirajo takson (fenotipske značilnosti vrste ) (Wayne, 1987). V diagnostičnih tabelah so zabeležene tudi variabilne značilnosti taksona, kar je dobro pokazalo znotrajvrstne raznolikosti. Uspešnost pri identifikaciji novega izolata je odvisna od tega kako točen je opis vrste; točnost pa je odvisna od števila podatkov, ki jih analiziramo. (Sneath; 1977). Navedeni sta dva dela dveh identifikacijskih tabel in identifikacijskega ključa, ki smo ju uporabili pri našem delu.

2.3.11.1 Identifikacijska tabela A za razlikovanje vrst *Bacillus subtilis* in *Bacillus cereus*

Lastnosti za razlikovanje vrst rodu *Bacillus* (Genus *Bacillus*. 1994; V: Bergey' s Manual of determinative bacteriology, stran 1122; Preglednica 13.4; Diferencialne karakteristike vrst rodu *Bacillus*). Navedene so samo značilne karakteristike za *B. subtilis* in *B. cereus*, ki smo ga uporabili kot referenčni sev za primerjavo.

Preglednica 1: Pomembne značilnosti za razlikovanje vrst *Bacillus subtilis* in *Bacillus cereus*

| ZNAČILNOST                 | <i>B. SUBTILIS</i> | <i>B. CEREUS</i> | ZNAČILNOST                                 | <i>B. SUBTILIS</i> | <i>B. CEREUS</i> |
|----------------------------|--------------------|------------------|--------------------------------------------|--------------------|------------------|
| celični premer več od 1 µm | -                  | +                | deaminacija fenilalanina                   | - <sup>i</sup>     | -                |
| okrogle spore              | -                  | -                | lecitinaza                                 | -                  | +                |
| sporangiji nabrekli        | -                  | -                | redukcija NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub> | +                  | +                |
| parasporalni kristali      | -                  | -                | proizvodnja indola                         | - <sup>i</sup>     | - <sup>k</sup>   |
| katalaza                   | +                  | +                | dihidroksiacetona                          | ND                 | ND               |
| rast v anaerobnem          | -                  | +                | zahteva po NaCl in KCl                     | -                  | -                |
| VP test                    | +                  | +                | zahteva po alantoinu in uratu              | -                  | -                |
| pH v gojišču za VP:        |                    |                  | rast pri pH                                |                    |                  |
| manj kot 6                 | +/-                | +                | 6,8 ; hranljivi agar                       | +                  | +                |
| več kot 7                  | -                  | -                | 5,7                                        | +                  | +                |
| kislina iz:                |                    |                  | rast pri NaCl                              |                    |                  |
| D-glukoze                  | +                  | +                | 2%                                         | +                  | ND               |
| L-arabinoze                | +                  | -                | 5%                                         | +                  | ND               |
| D-xylose                   | +                  | -                | 7%                                         | +                  | d                |
| D-manitola                 | +                  | -                | 10%                                        | ND                 | ND               |
| plin iz glukoze            | -                  | -                | rast pri                                   |                    |                  |
| hidroliza:                 |                    |                  | 5°C                                        | -                  | -                |
| kazeina                    | +                  | +                | 10°C                                       | d                  | d                |
| škroba                     | +                  | +                | 30°C                                       | +                  | +                |
| želatine                   | +                  | +                | 40°C                                       | +                  | d                |
| izraba citrata             | +                  | +                | 50°C                                       | d                  | -                |
| izraba propionata          | +                  | +                |                                            |                    |                  |
| razgradnja tirozina        | -                  | +                |                                            |                    |                  |

Simboli: -, 90% ali več sevov je negativnih; +, 90% ali več sevov je pozitivnih; +/-, 11-89% sevov je pozitivnih; ND, ni podatkov; NG, ni rasti; <sup>i</sup> podatki od Hanakova-Baurerova in sod. (1965); <sup>k</sup> podatki od Hanakova-Baurerova in sod (1966). (oboje je navedeno v Genus *Bacillus* ;1994)

## 2.3.11.2 Klasifikacijska shema B po Logan in Berkeley, 1984:

Uporabila in modificirala sta jo Roberts in Cohan, (1991), ki trdita, da lahko pet pozitivnih metabolnih testov loči *B. subtilis* od vseh vrst *Bacillus* (razen od *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. carotorum*): hidroliza želatine, citrat, nitrat, L-arabinoza, manitol.

2.3.11.3 Ključ C za identifikacijo sevov *Bacillus subtilis* (Norris in sod., 1981)

Testi, ki so napisani z odebeljenimi črkami, naj bi bili pozitivni za vrsto *Bacillus subtilis*

|                                                   |                                                                        |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Katalaza:</b>                               | <b>pozitivna...2</b><br>negativna...16                                 |
| <b>2. Voges-Proskauer:</b>                        | <b>pozitiven...3</b><br>negativen...9                                  |
| <b>3. Rast na anaerobnem agarju:</b>              | pozitivna...4<br><b>negativna...8</b>                                  |
| 4. Rast na 50 °C:                                 | pozitivna...5<br>negativna...6                                         |
| 5. Rast pri 7% NaCl:                              | pozitivna... <i>B.licheniformis</i><br>negativna... <i>B.coagulans</i> |
| 6. Plin in kislina iz glukoze (anorganski N):     | pozitivna... <i>B.polymyxa</i><br>negativna...7                        |
| 7. Redukcija NO <sub>3</sub> do NO <sub>2</sub> : | pozitivna... <i>B.cereus</i><br>negativna... <i>B.alvei</i>            |
| <b>8. Hidroliza škroba:</b>                       | <b>pozitivna...<i>B. subtilis</i></b><br>negativna... <i>B.pumilis</i> |
| 9. Rast na 65 °C:                                 | pozitivna... <i>B.stearothermophilus</i><br>negativna...10             |
| 10. Hidroliza škroba:                             | pozitivna...11<br>negativna...14                                       |
| 11. Kislina in plin iz glukoze (anorganski N):    | pozitivna... <i>B.macerans</i><br>negativna...13                       |
| 12. Širina 1.0µm ali več:                         | pozitivna... <i>B.megaterium</i><br>negativna...13                     |
| 13. pH v VP gojišču več kot 6:                    | pozitiven... <i>B.circulans</i><br>negativen...15                      |
| 14. Rast na anaerobnem agarju:                    | pozitivna... <i>B.laterosporus</i><br>negativna...15                   |
| 15. Kislina in plin iz glukoze (anorganski N):    | pozitivna... <i>B.brevis</i><br>negativna... <i>B.sphaericus</i>       |

|                                     |                                                                     |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 16. Rast na 65°C :                  | pozitivna... <i>B.stearothermophilus</i><br>negativna...17          |
| 17. Razgradnja kazeina:             | pozitivna... <i>B.larvae</i><br>negativna...18                      |
| 18. Parasporalno telo v sporangiju: | pozitivno... <i>B.popillae</i><br>negativno... <i>B.lentimorbus</i> |

### 2.3.12 Mikrobni identifikacijski sistem

Razvoj miniaturnih identifikacijskih sistemov je osnovanih na klasičnih metodah. Na voljo je več komercialnih sistemov (API, Analytab Products, Planiview, NY, USA; Biolog, Biolog, Inc., Hayward, CA, Usa; Vitek, Vitek Systems, Inc. Hazewood, MO, USA), ki so večinoma osnovani na modificiranih klasičnih metodah (D' Amato in sod., 1991). Te metode so izboljšali z vključitvijo računalniško vodenih baz podatkov, ki so jih za vsak sistem priredili (D' Amato in sod., 1991). Glavni problem teh metod je, da so rezultati identifikacije odvisni od kvalitete podatkovne baze. Večina računalniško vodenih sistemov je usmerjena v glavnem k identifikaciji organizmov z večjim pomenom v medicini. Zaradi tega so bili ti sistemi relativno neuspešni pri identifikaciji izolatov iz okolja; seveda tudi zaradi pomanjkanja podatkov o fenotipski raznolikosti mikroorganizmov v naravnem okolju (Klingler in sod., 1992). Za klasifikacijo in raziskavo izolatov iz okolja so bili razviti miniaturni seti z velikim številom fizioloških testov (več kot 200 različnih testov) ( Rossello-Mora in sod.,1994; Kaempfer in sod., 1991)

## 2.4 EKOLOGIJA, TAKSONOMIJA IN IDENTIFIKACIJA RODU *BACILLUS*

### 2.4.1 Ekologija

Bakterije gram pozitivnega rodu *Bacillus* (tipska vrsta *Bacillus subtilis* Marburg ATCC 6051) predstavljajo eno od najštevilnejših mikroorganizmov v vodah in predvsem tleh. Rod vključuje tudi komercialno pomembne vrste, ki tvorijo zanimive produkte; encime, fine biokemikalije, antibiotike in insekticide. Večina vrst je nenevarnih za ljudi in živali, poznanih je le nekaj patogenov. Ti vključujejo *Bacillus anthracis* povzročitelja vranječnega prisada; *Bacillus cereus*, povzročitelja zastrupitve s hrano in nekaj patogenov insektov. Bacile uporabljajo v tradicionalnih fermentacijah hrane, vključujoč produkcijo natta iz soje na Japonskem z *Bacillus subtilis* var.*natto*. Nizka raven patogenosti in razširjena uporaba njegovih produktov v prehrabeni industriji in industriji detergentov je pripomoglo k statusu GRAS (generally regarded as safe) za bakterijo *Bacillus subtilis* s strani U.S. FDA (Food and drug Administration) (Priest, 1993).

Aerobne bakterije, ki tvorijo endospore, so zelo razširjene; osamitev je možna iz skoraj vsakega okolja v biosferi. Bacile so osamili iz suhih dolin Antarktike in tudi iz vročih termalnih vrelecev. Prevladujejo v morskih in vodnih okoljih in seveda predstavljajo velik del talne mikroflore (Priest, 1993). Sporogene bacile se najlažje izolira z uničenjem vegetativnih celic; ponavadi z inkubacijo vzorcev na 80 °C približno 10 minut ali s postopki, kot je etanolna inaktivacija. Spore vzkaliijo in kolonije rastejo aerobno na ustreznem gojišču. Ta preprost postopek je specifičen za aerobne bakterije, ki tvorijo endospore. Vendar ta postopek omogoča le osamitev aerobnih sporogenih bacilov iz izbranih ekoloških niš, le malo pa pove o prispevku tega organizma v okolju, iz katerega je bil izoliran (Priest in Grigorova,1990).

Primarni rezervar za vrste iz rodu *Bacillus* so tla, v katerih izločajo različne encime za razgradnjo biopolimerov, kar jim omogoča rast na rastlinskem materialu in ostalih nutrientih. Večina talnih predstavnikov pripada skupinama *Bacillus subtilis* in *Bacillus sphaericus*, medtem ko predstavniki bolj prehransko zahtevne skupine *Bacillus polymyxa* uspevajo v tleh z višjo vsebnostjo organske snovi. Nekatere vrste tega rodu formirajo tesno povezavo s koreninami rastlin. Več vrst, npr. *Bacillus azotofixans*, *Bacillus macerans* in *Bacillus polymyxa*, fiksirajo dušik pod anaerobnimi pogoji. Nekateri sevi *Bacillus subtilis* so kategorizirani kot rhizobakterije, ki pomagajo k rasti rastline v zameno pa dobivajo nutriende v obliki rastlinskih eksudatov (Priest, 1993).

## 2.4.2 Taksonomija

### 2.4.2.1 Tradicionalni pristopi

Gram pozitivne, paličaste bakterije, ki se pod aerobnimi pogoji diferencirajo v endospore odporne na visoke temperature, spadajo v rod *Bacillus*. Od ostalih bakterij, ki tvorijo endospore, so striktni anaerobi uvrščeni v rod *Clostridium*, koki v rod *Sporosarcina* in bakterije, ki tvorijo razvejane filamentozne oblike v rod *Thermoactinomyces*. Med Gram pozitivne palčke in koke, ki tvorijo endospore spadajo še rod *Heliobacterium* (polzeče palčke) in rod *Heliobacillus* (gibljive palčke) (Priest in Grigorova, 1990). Mikroskopsko je torej dovolj preprosto prepoznati bacile in v zgodnjih letih tega stoletja je to vodilo k številnim novo opisanim vrstam. Bilo je bolj preprosto dati novemu izolatu novo vrstno ime, kot ga identificirati. Do leta 1940 so predlagali okoli 150 vrst, mnogo sinonimov in veliko slabo opisanih predstavnikov. Osnove za identifikacijo in klasifikacijo vrst *Bacillus* so takrat zapisali Tom Gibson (Edinburgh), Ruth Gordon, Frank Clark in Nathan Smith (Peoria, Illinois). Smith in kolegi so preiskali 1124 sevov, ki naj bi predstavljali 150 vrst in jih razporedili v le 19 vrst (navedel Priest, 1993). Za rod *Bacillus* so do leta 1984 predlagali tri klasifikacijske koncepte: Krasil'nikov (1949), Prevot (1961) in Gordon in sod. (1973) (navedel Gordon, 1973). Shema, ki jo je predlagal Krasil'nikov, temelji na stopnji nabreklosti materinske celice ali sporangija. Prevot je razvrstil organizme v štiri rodove: *Bacillus*, *Bacteridium*, *Inominatus* in *Clostridium*. Kasneje je Gordon (Gordon, 1973) podal opis sevov in vrst, kar je postalo osnova za osamitev in identifikacijo bacilov. Gibson in Gordon sta tudi predlagala koncept morfoloških skupin bacilov, osnovan na obliki endospor in njihovi poziciji v materinski celici ali sporangiju. Tako vrste skupine 1, ki vključujejo vrsto *B. subtilis* in še številne druge bacile, diferencirajo v ovalne spore enakega premera kot je materinska celica; vrste skupine 2 (*B. polymyxa*) vsebujejo ovalne spore, ki nabrekajo materinsko celico skupina 3 (*B. sphaericus*) pa producira okrogle spore. Ta delitev rodu je bila dokaj uporabna za identifikacijske namene, saj skrči takson v skupine bolj obvladljive velikosti. Je pa nazanesljiva in dopušča napačno identifikacijo (Gordon, 1973). Predvsem klasifikacijski pristopi ne zagotavljajo informacije o kladističnih odnosih med vrstami (Priest, 1993).

### 2.4.2.2 Numerična fenetika in kemotaksonomija

Modernejše taksonomske tehnike, kot je numerična fenetika, ugotavljanje bazne sestave DNK in ugotavljanje stopnje homologije DNK, so omogočile oceno sorodnosti med preučevanimi bacili. Postalo je očitno, da so bacili bolj heterogena skupina, kot se je poprej domnevalo. V primeru rodu *Bacillus* sega razpon vsebnosti G+C od 33 do 65%, čeprav se večina sevov giblje med 40 in 50% (Priest, 1981). To nakazuje veliko genetsko raznolikost med vrstami in Priest s sodelavci (1993) je predlagal razdelitev rodu v več bolj homogenih taksonov. Bacili so

fiziološko različni; to lahko najbolj opazimo pri numerični klasifikaciji, kjer se seve preučuje glede na številne fiziološke, biokemijske in morfološke karakteristike in združuje na osnovi podobnosti. V tem procesu se odkrijejo skupine fenotipsko podobnih sevov, ki jih pogosto lahko enačimo z vrstami (Priest in sod., 1988). Tri obsežne numerične študije sevov iz rodu *Bacillus* (Logan in Berkeley, 1984, Priest in sod., 1988, Kaempfer, 1991) so dale v osnovi podobne rezultate. Bakterije so razvrstili v šest večjih skupin ali skupkov, ki v več pogledih sovpadajo z rodом. Numerična klasifikacija je pomagala razjasniti odnose med bacili na ravni vrst, čeprav so v večini primerov za to bolj primerne študije genotipa. Pomirjujoče je, da sta v večini primerov numerična klasifikacija in reasociacija DNK dali enak ali podoben rezultat. Na več področjih je preiskovanje sevov iz vrst *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis* z omenjenimi tehnikami razkrilo, da so Gordon in sodelavci (1973) združevali seve v vrste preveč navdušeno in da vsaka od teh skupin vključuje več rodov (Priest, 1993).

#### 2.4.4.3 Identifikacija vrst rodu *Bacillus*

Tradicionalen pristop k identifikaciji je temeljil na omenjenih treh morfoloških skupinah (Gordon, 1973). Ko je bil izolat uvrščen v eno izmed teh skupin, se je bakterija identificirala s setom biokemijskih in fizioloških testov. Eden od pogosto uporabljenih testov je API 50 CHB (miniaturni seti; vsak omogoča preiskavo 50 fenotipskih testov za eno bakterijo) API50CHB hkrati vključuje običajne fiziološke in biokemijske teste, kot so hidroliza škroba in kazeina, produkcija kisline iz sladkorjev itd. Rezultate obdelamo z računalniškim programom, ki omogoča primerjavo za 44 vrst *Bacillus*. S tem sistemom lahko rutinsko identificiramo približno 50 % izolatov rodu *Bacillus*, osamljenih iz okolja. Neidentificirani izolati verjetno predstavljajo neopisane taksone, ki jih v mreži ni, ali pa so variante že opisanih vrst.

Od različnih kemotaksonomskih pristopov za identifikacijo sevov *Bacillus*, ki so na voljo, je precej obetavna pirolizna masna spektrometrija (Berkeley in sod., 1984). Ta vključuje izgorevanje vzorca v inertni atmosferi. Producirani fragmenti se potem ločijo na osnovi njihovega razmerja masa/naboj z uporabo masnega spektrofotometra. Drug kemotaksonomski pristop, ki obeta, je osnovan na profilu maščobnih kislin. Gre za analizo metilnih estrov celičnih maščobnih kislin s plinsko kromatografijo (Hewlett-Packard). Ujemanje profila s tistim iz knjižnice je ključen za identifikacijo (Priest, 1993).

#### 2.4.4.5 Skupine osnovane na analizi sekvenc genov za 16S rRNK in genov, ki kodirajo proteine

Z numerično klasifikacijo osnovano na seriji fenetskih lastnosti so Priest in sod., (1988) klasificirali 368 sevov *Bacillus* v 79 skupin. V približno istem obdobju so je kot precej uporabni molekularni kronometer za ugotavljanje filogenetskih odnosov uveljavila analiza sekvenc genov za 16S rRNK. Na takšni osnovi so Roessler in sod., (1991) razvrstili devet vrst *Bacillus* v štiri filogenetske skupine, Ash in sod., (1991) pa 51 vrst iz rodu *Bacillus* v pet filogenetsko različnih skupin. Še nadaljnja karakterizacija na genotipski in fenotipski ravni je vodila k opisu novih rodov: *Amphibacillus* (Nimura in sod., 1990), *Alicyclobacillus* (Wisotzkey in sod., 1992), *Paenibacillus* (Ash in sod., 1993), če omenimo le nekatere. Nedavno so delne sekvence 16S rDNK (Goto in sod., 2000) in restrikcijske analize sekvenc genov rRNK (Joung in Cote, 2002) uporabili tudi že za hitro identifikacijo vrst iz rodu *Bacillus* in iz sorodnih rodov.

Vendar pa z analizo sekvenc genov za *16S rRNA* ni bilo mogoče razlikovati zelo sorodnimi, a ekološko različnimi skupinami bakterij (npr. *B. subtilis* in *B. atrophaeus*; preglednica 2; Palys in sod., 1997). Ena od možnih razlag je, da so se te populacije ločile šele pred nedavnim in tako ni bilo dovolj časa, da bi se poznal vpliv nevtralne divergenca na lokusu za *16S rRNA*. Po drugi strani so te populacije imele čas, da se je ta nevtralna divergenca vsidrala na lokusu, ki se je evolucijsko hitreje spreminjal (Avise, 1994). To hipotezo lahko preverimo s podatki o sekvenci raznolikosti na lokusih, ki kodirajo proteine, saj se ti evolucijsko spreminjajo dosti hitreje kot lokusi *16S rRNA* (Avise, 1994).

Težave, ki so lastne analizi osredotočeni na *16S rRNA* (močna ohranjenost in posledično nezmožnost ločevanja organizmov na nivoju sevov, in tudi vrst; heterogenost na nivoju celice; tvorjenje heterodupleksov med verižno reakcijo s polimerazo) lahko rešimo z uporabo markerjev, ki so v genomu v eni kopiji, ohranjeni, ubikvitarni in delujejo kot evolucijska ura. Tem zahtevam ustrezajo gospodinjski geni; npr. gen za *rpoB*, ki kodira  $\beta$  podenoto RNA polimeraze. So nujni za obstoj celice in zato vedno prisotni. So bolj variabilni od gena za *16S rRNA*, še vedno pa dovolj ohranjeni (Dahllöf in sod., 2000; Chun in Bae, 2000).

Raziskave sekvenc gospodinjskih genov so skoraj soglasno pokazale, da sodijo zelo sorodne vrste in podvrste v različne skupine. Sekvenciranje gospodinjskih genov jasno razločuje ekološko različne populacije, ki že imajo status vrste ali podvrste. Še več, te genske sekvence so zmožne odkriti ekološko različne populacije, ki jih niso mogli odkriti z drugimi molekularnimi tehnikami (Roberts in Cohan, 1995; Roberts in sod., 1994, 1996). Nekaj redkih poročil o DNK sondah in sorodnih tehnologijah za identifikacijo in tipizacijo bacilov se osredotoča na specifične skupine okoljskega in biotehnološkega pomena. Največ pozornosti je bilo posvečeno patogenu insektov *B. thuringiensis*. Oligonukleotidne sonde so specifične za gene, ki kodirajo toksin in so jih uspešno uporabili pri detekciji in identifikaciji predstavnikov vrste *B. thuringiensis* (Priest in Grigoriou, 1990).

## 2.5 TAKSONOMIJA IN IDENTIFIKACIJA VRSTE *BACILLUS SUBTILIS*

### 2.5.1 Zgodovina in taksonomija

Leta 1872 je Ferdinand Cohn, študent Roberta Kocha prepoznal in poimenoval bakterijo *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872 navedel Skerman in sod., 1980). Organizem je bil izbran kot predstavnik velikega in raznolikega bakterijskega rodu *Bacillus* in je bil uvrščen v družino *Bacillaceae*. Značilna lastnost družine je produkcija endospor, mirujočih struktur, ki se diferencirajo znotraj celice (Priest, 1993).

Taksonomsko sodi *B. subtilis* med Bakterije (*Bacteria*), bolj natančno k G + bakterijam z nizko vsebnostjo G + C (*Firmicutes*) (Claus in Berkeley, 1986).. Spada v razred *Bacilli*, red *Bacillales*, ki vključuje družino *Bacillaceae* z rodom *Bacillus*. Rod *Bacillus* vključuje 136 vrst. Tipična vrsta rodu pa je *Bacillus subtilis subspecies subtilis* (Cohn, 1872; navedel Skerman) in *Bacillus subtilis subspecies spizizenii* (Garrity in sod., 2003).

*B. subtilis* je ubikvitarna talna bakterija, ki s svojo biološko aktivnostjo prispeva h kroženju nutrientov. *B. subtilis* proizvaja veliko različnih proteaz in ostalih encimov, ki mu omogočajo razgradnjo različnih substratov in prispevajo h kroženju hranil. Čeprav natančne številke o številu teh bakterij v okolju niso bile ugotovljene, se bacili pojavljajo v približno  $10^6$  do  $10^7$

celic na gram zemlje (Alexander, 1977). Kot večina članov rodu je tudi *B. subtilis* aeroben, v prisotnosti nitrata in glukoze pa se lahko pojavi tudi anaerobna rast (Claus in Berkeley, 1986).

#### 2.5.1.1 Taksonomija in karakterizacija

*B. subtilis* je tipska vrsta rodu. Zgodovinsko gledano glede na monografije (Smith, 1946 in 1952; navedel Gordon 1973) je bil izraz *B. subtilis* uporabljan za vse aerobne sporulirajoče bacile (Logan, 1994). Številne vrste, ki so jih v zgodnji literaturi opisali niso uvrščene na listo odobrenih bakterijskih imen in nimajo statusa veljavnih vrst. Številni sevi *B. subtilis* so nekoč predstavljali samostojno vrsto npr.: *B. atterimus*, *B. mesentericus*, *B. niger*, *B. panis*, *B. vulgaris*, *B. nigrificans* and *B. natto* (Gibson, 1944 in Smith in sod., 1946; navedel Gordon 1973). *B. amyloliquefaciens* Bergeyev priročnik za sistematično bakteriologijo" (Claus in Berkeley, 1986) navaja kot člana vrste *B. subtilis*, vendar je kmalu zatem dosegel status samostojne vrste (Priest in sod., 1987). Vrste *B. subtilis*, *B. licheniformis* in *B. pumilis* so zelo sorodne in jih je težko ločiti; včasih so jih uvrščali skupaj v t.i. skupino subtilis (Gordon, 1973). Ta glavni sklop vsebuje štiri podsklope, ki jih lahko identificiramo kot *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilis* in *B. amyloliquefaciens*. Najnovejši podatki v literaturi nakazujejo, da je možno ločiti *B. subtilis* in *B. pumilis* z uporabo plinske pirolizne kromatografije (O'Donnell in sod., 1980) ali z uporabo API testov (Logan in Berkeley, 1981). Tudi *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens* kažeta relativno nizko homologijo DNK (Priest, 1981) in se ju prav tako lahko loči med seboj s pomočjo plinske pirolizne kromatografije (O'Donnell in sod., 1980) in na osnovi nekaterih fenotipskih lastnosti (produkciji kisline iz laktoze) (Priest in sod., 1988).

#### 2.5.1.2 Novejši pristopi h karakterizaciji

Vrste, ki so najbolj sorodne *Bacillus subtilis*, so si nenavadno podobne na fenotipski ravni. Na primer: sestava maščobnih kislin je edina fenotipska lastnost, ki razlikuje *B. mojavensis* od *B. valismortis* ali od *B. subtilis* (Roberts in sod., 1994, 1996). *B. atrophaeus* pa se razlikuje od *B. subtilis* le po razlikah v pigmentaciji (Nakamura, 1999). V razlikovanju vrst sorodnih *B. subtilis*, so se kot najbolj učinkovite izkazale molekularne metode. Dve vrsti, sorodne *B. subtilis* sta bili odkriti z restriksijsko analizo PCR pomnoženih genov [*B. subtilis* subsp. *spizizenii*, prej W23 skupina *B. subtilis* (Nakamura in sod., 1999) in *B. mojavensis* (Roberts in sod., 1996)]. Te študije tudi kažejo, da sevi vrste *B. subtilis* tvorijo dve skupini. Skupini sevov W23 in 168 sta identični skoraj za vse fenotipske lastnosti. Vendar so znanstveniki pokazali različnost v sestavi njune celične stene; celična stena prvega vsebuje ribitol in glicerol teihojsko kislino; drugi pa le glicerol teihojsko kislino (Fox in sod., 1992). Roberts in Cohan (1995) sta študirala filogenetske odnose *B. subtilis* in sorodnih organizmov na osnovi ugotovljenih sekvenc genov, ki kodirajo nekatere proteine (*polC*, *rpoB* in *gyrA*). Njuni rezultati so pokazali, da se sevi *B. subtilis* združujejo v skupino, ki je ločena od *B. vallismortis*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens* in *B. licheniformis*. Še več, *B. subtilis* se deli v dve podvrsti; ena zajema sev 168, druga pa sev W23. To nakazuje na prisotnost dveh sorodnih taksonov: eden vsebuje laboratorijski sev 168, drugi pa laboratorijski sev W23. Reasociacija DNK med dvema skupina je bila od 58 do 69 %; znotraj skupinska sorodnost pa od 82-100 %. Med geni za *16S rRNA* je bila opažena približno 99,5 % enakost sekvenc med sevi 168 in sevi W23. Za seve 168 in W23 so predlagali razdelitev na podvrsti z imenom *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. in *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov (Nakamura, 1999). Ta razdelitev je že potrjena in vključena v najnovejšo izdajo Bergeyeva priročnika za sistematično bakteriologijo (Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology ; Garrity in sod., 2003).

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorčenje, izvor in shranjevanje sevov

Vzorci zemlje, iz katerih smo s selektivno izolacijo skušali osamiti seve iz rodu *Bacillus*, smo odvzeli na različnih lokacijah po Sloveniji in v enem primeru Himalajskega pogorja (lokacije so podane v Preglednica 2 in označene na zemljevidih, pod 3.1.2 pa je naveden opis lokacije, čas, oseba, ki je vzorčila in način shranjevanja vzorca do prihoda v laboratorij).

Preglednica 2: Vzorci zemlje, ki smo jih obdelovali, njihove oznake, število obdelanih sevov iz enega vzorca, datum in kraj odvzema vzorca in pričetek obdelave vzorca.

| Oznaka vzorca | Število obdelanih izolatov in oznake s tega področja | Datum odvzema vzorca | Kraj                      | Obdelava |
|---------------|------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------|
| P7            | P7/1-P7/16 (16)                                      | okt.2002             | Barje                     | okt.2002 |
| P9            | P9/1-P9/16 ( 16)                                     | okt.2002             | Barje                     | okt.2002 |
| P7            | P7A/1-P7A/8, P7B/1-P7B/8, P7C/1-P7C/8 ;(24)          | okt.2002             | Barje                     | jan.2003 |
| P9            | P9A/1-P9A/8, P9B/1-P9B/8, P9C/1-P9C/8 ;(24)          | okt.2002             | Barje                     | jan.2003 |
| P5            | P5A/1-P5A/8, P5B/1-P5B/8, P5C/1-P5C/8 ;(24)          | feb.2003             | Jeprca                    | feb.2003 |
| P6            | P6A/1-P6A/8, P6B/1-P6B/8, P6C/1-P6C/8 ;(24)          | feb.2003             | Jeprca                    | feb.2003 |
| ST            | ST1/1-ST/81/8, ST2/1-ST2/8, ST3/1-ST3/8 ;(24)        | mar.2003             | Sava Tacen                | mar.2003 |
| SV            | SV1/1-SV1/8, SV2/1-SV2/8, SV3/1-SV3/8 ;(24)          | mar.2003             | Nabrežje Save             | mar.2003 |
| TFP           | TFP1/1-TFP1/8, TFP2/1-TFP2/8, TFP3/1-TFP3/8 ;(24)    | mar.2003             | Tomačevo                  | mar.2003 |
| TT            | TT1/1-TT1/8, TT2/1-TT2/8, TT3/1-TT3/8 ;(24)          | mar.2003             | Tomačevo                  | mar.2003 |
|               |                                                      |                      |                           |          |
| H             | H1/1-H1/8, H2/1-H2/8, H3/1-H3/8 ;(24)                | 2003                 | Himalajsko pogorje 5600 m | mar.2003 |

Preglednica 3: Referenčni sevi rodu *Bacillus*

| SEV                                   | GENOTIP                                            | VIR             |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|
| <i>Bacillus cereus</i>                |                                                    | Buh-Gantar,2003 |
| <i>Bacillus subtilis</i> -168 (IS75)  | leu met his                                        | Darilo D.Dubnau |
| <i>Bacillus subtilis</i> -168 RO-FF-1 | wt                                                 | Roberts, 1995   |
| <i>Bacillus subtilis</i> BD 2611      | hlm abrB:: (kan) codY::ery amyE::comK-lacZ: [Spec) | Kraigher, 2001  |
| <i>Bacillus subtilis</i> BD 3084      | hlm amyE ::comK-lacZ (tet)                         | Kraigher, 2001  |

### 3.1.2. Kraji odvzema vzorcev

Kraji odvzema vzorcev (Jeprca, Sava in Tomačevo) so označeni na zemljevidu (Slika 1) in za vsak vzorec navedeni v Preglednici 1.

-Kraj odvzema (Ljubljansko Barje) z oznakama P7 in P9 (poplavljen) je vzorčil J. Hacin oktobra 2002.

-Kraj odvzema (Jeprca) z oznakama P5-njiva in P6-obronek gozda ob cesti od Medvod do Kranja sta vzorčila M. Lešnjak in M. Založnik februarja 2003. Vzorci so bili do prihoda v laboratorij hranjeni v hladnem prostoru.

-Kraj odvzema vzorcev nabrežje Save pri Tacnu; SV (Sava voda); peščena naplavina pod drevesom blizu mostu, oddaljena 10 m od reke Save. Kraj odvzema vzorcev ST (Sava, Tacen); vzorčeno na peščenem travniku, oddaljenem 100 m od reke Save. Oba vzorca sta odvzela M. Lešnjak in M. Založnik marca 2003. Vzorci so bili do prihoda v laboratorij hranjeni v hladnem prostoru.

-Kraj odvzema vzorcev TFP (Tomačevo, nogometno igrišče v Tomačevem; oddaljeno 70 m od reke Save (lokacije so podane v Preglednica 2 in označene na zemljevidu). Kraj odvzema TT (Tomačevo, travnik); odvzeto na travniku izven naselja Tomačevo (lokacije so podane v Preglednici 2 in označene na zemljevidu). Oba vzorca sta odvzela M. Lešnjak in M. Založnik marca 2003. Vzorci so bili en dan izpostavljeni sobni temperaturi.

Vsi vzorci so bili odvzeti s sterilnim orodjem v sterilno plastično posodico iz zgornje 5-10 cm globoke plasti zemlje.

-Vzorci z oznako H (Himalaja) je odvzel B. Stres v Himalaji na višini 5600 m. Zemlja je precej peščena.

Slika 1 : Zemljevid na katerem so označeni kraji odvzema vzorcev (Jeprca (P5-travnik in P6-obronek gozda), nabrežje Save pri Tacnu (SV-Sava voda in ST-Sava Tacen) in Tomačevo (TFP-Tomačevo nogometno igrišče in TT-Tomačevo travnik)).



### 3.1.3. Gojišča in raztopine

#### 3.1.3.1 Raztopine za barvanje po Gramu

1. Kristal vijolično:

raztopina A:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| kristal vijolično | 10 g   |
| etanol, 95%       | 100 ml |

raztopina B:

|                  |       |
|------------------|-------|
| amonijev oksalat | 0,8 g |
| H <sub>2</sub> O | 80 ml |

Za pripravo delovne raztopine zmešaj 20 ml raztopine A in 80 ml raztopine B.

2. Lugol

|                  |        |
|------------------|--------|
| jod              | 5 g    |
| kalijev jodid    | 10 g   |
| H <sub>2</sub> O | 100 ml |

3. Safranin

|                  |        |
|------------------|--------|
| safranin         | 0,5 g  |
| H <sub>2</sub> O | 100 ml |

#### 3.1.3.2 Gojišče LB

|                   |            |
|-------------------|------------|
| Trypton           | 10 g       |
| NaCl              | 10 g       |
| Kvasni ekstrakt   | 5 g        |
| dH <sub>2</sub> O | do 1000 ml |
| agar              | 15 g       |

#### 3.1.3.3 Gojišče TBAB

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| TBAB (Tryptose Blood Agar Base) | 3,05 g |
| H <sub>2</sub> O                | 100 ml |

Po avtoklaviranju dodamo:

|                                           |          |
|-------------------------------------------|----------|
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M) | 0,5 ml   |
| MnCl <sub>2</sub> (0,1M)                  | 0,025 ml |

#### 3.1.3.4 NO<sub>3</sub> gojišče

|                   |            |
|-------------------|------------|
| Pepton            | 5 g        |
| Kvasni ekstrakt   | 3 g        |
| KNO <sub>3</sub>  | 1 g        |
| dH <sub>2</sub> O | do 1000 ml |

3.1.3.4 Rast na 7% NaCl:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| nutrient broth    | 8 g        |
| NaCl              | 14 g       |
| dH <sub>2</sub> O | do 1000 ml |

3.1.3.5 VP gojišče

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> | 0,5 g     |
| Pepton                           | 0,5 g     |
| Glukoza                          | 0,5 g     |
| dH <sub>2</sub> O                | do 100 ml |

pH uravnaj z 7,5 s HCl

Indikator: 5% á naftol v 96% etanolu

3.1.3.6 Metil rdeče

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| metil rdeče       | 0,04 g    |
| etanol            | 40 ml     |
| dH <sub>2</sub> O | do 100 ml |

3.1.3.7 Manitol, ksiloza, arabinoza-gojišče za produkcijo kisline iz ogljikovih hidratov

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| (NH <sub>2</sub> )HPO <sub>4</sub> | 1 g        |
| CaCl <sub>2</sub>                  | 0,2 g      |
| MgSO <sub>4</sub>                  | 0,2 g      |
| Kvasni ekstrakt                    | 0,2 g      |
| Agar                               | 15 g       |
| dH <sub>2</sub> O                  | do 1000 ml |

Po avtoklaviranju dodaj 0,5% raztopino (posebej sterilizirano) ustreznega ogljikovega hidrata.

3.1.3.8 Gojišče za razgradnjo škroba

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Pepton            | 5 g     |
| Mesni ekstrakt    | 3 g     |
| NaCl              | 5 g     |
| Škrob             | 20 g    |
| Agar              | 20 g    |
| dH <sub>2</sub> O | 1000 ml |

3.1.3.9 Citratni agar

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| Trinatrijev citrat x 2H <sub>2</sub> O | 1 g        |
| (NH <sub>2</sub> )HPO <sub>4</sub>     | 0,5 g      |
| MgSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O  | 1,2 g      |
| CaCl <sub>2</sub>                      | 1 g        |
| Raz. elementov v sledovih              | 40 ml      |
| Agar                                   | 15 g       |
| raz. Fenol rdečega                     | 0,04 %     |
| dH <sub>2</sub> O                      | do 1000 ml |

3.1.3.10 10% SDS

H<sub>2</sub>O 900 ml  
SDS 100 g  
Segrej na 68 °C, da se lažje raztopi  
Uravnaj pH na 7,2 (nekaj kapljic koncentrirane HCl)  
H<sub>2</sub>O do 1000 ml  
10%SDS ni potrebno sterilizirati

3.1.3.11 5 x TBE pufer za gelsko elektroforezo

pH 8  
Tris base 54 g  
Borova kislina 27,5 g  
0,5M EDTA 20 ml  
H<sub>2</sub>O do 1000 ml

Delovni TBE=0,5 x TBE

45 mM Tris borat

1 mM EDTA

3.1.3.12 Agarozni gel (0,8%)

Agaroz 0,24 g  
Pufer (0,5 x TBE) 30 ml  
Raztopi v mikrovalovni pečici (srednja moč 1 min)  
EtBr končna koncentracija 0,1 µg/ml do 0,5µg/ml 1,5µl

Za PCR produkte uporabimo 1% gel 0,3 g agaroze (ostalo po zgornjem receptu)

3.1.3.13 Lizocim

Za 50 mg/ml dodaj

100 mg lizocima k 2 ml TEN pufra

### 3.1.4 Encimi, kemikalije in aparature

#### 3.2.4.1 Encimi, kemikalije

Preglednica 4: seznam uporabljenih kemikalij in encimov ter proizvajalci

| Kemikalija ali encim                 | Proizvajalec    | Kemikalija ali encim                      | Proizvajalec |
|--------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|--------------|
| agar                                 | Biolife, Difco  | lizocim                                   | Fluka        |
| agaroza                              | Sigma           | manitol                                   | Kemika       |
| alfa naftol                          | Kemika          | Metil rdeče                               | Torlak       |
| CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | Podnart         | MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O      | Alkaloid     |
| citratni agar                        | Difco           | MnCl <sub>2</sub>                         | Kemika       |
| destilirana H <sub>2</sub> O         | Fluka           | NaCl                                      | Laphoma      |
| D-glukoza                            | Kemika          | NaOH                                      | Erba         |
| dNTP(2mM)                            | Fermentas       | pepton                                    | Biolife      |
| etidijev bromid                      | Bio-Rad         | PKE gojišče                               | Difco        |
| fenol                                | Kemika          | Pronaza                                   | Sigma        |
| fruktoza                             | Kemika          | Proteinaza K                              | Sigma        |
| glicerol                             | Riedel          | pufer za PCR                              | Fermentas    |
| GL-pufer                             | Kemika          | ribonukleaza                              | Rnase        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | Kemika          | ONEtm                                     | Promega      |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | Podnart         | Safranin                                  | Kemika       |
| hranljivi agar                       | Torlak          | SDS                                       | Kemika       |
| imerzijsko olje                      | Laphoma         | standardna DNK "Lambda<br>BsteII Digest"  | Sigma        |
| jod                                  | Galenika        | standardna DNK 100bp<br>Low Ladder        | Sigma        |
| kloroform                            | Podnart, Kemika | škrob                                     | Kemika       |
| KNO <sub>3</sub>                     | Kemika          | Taq polimeraza                            | Fermentas    |
| KOH                                  | Riedel          | TBAB gojišče                              | Oxoid        |
| kristal vijolično                    | Kemika          | Trypton                                   | Biolife      |
| ksiloza                              | Difco           | začetni oligonukleotidi za<br>16S rRNK    | Invitrogen   |
| kvasni ekstrakt                      | Difco           | začetni oligonukleotidi za<br><i>rpoB</i> | IDT DNK      |
| lakmus                               | Difco           |                                           |              |
| L-arabinoza                          | Kemika          |                                           |              |
| LB broth                             | Merck           |                                           |              |

#### 3.2.4.2 Aparature:

Centrifuga; Beckman J2-21M/E (rotor JA20) in Tehtnica Centric 150

Ciklični termostat: Biometra UNO-Thermoblock™

Elektroforezna naprava; Biorad "sub cell® GT" in "mini -sub® cell GT"

Digitalni fotoaparati: Canon G 2

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Selektivna izolacija bakterij rodu *Bacillus* iz tal

Grudico, odvzeto iz talnega vzorca, smo sterilno prenesli v mikrocentrifugirko in resuspendirali v 1 ml sterilne fiziološke raztopine. Vzorec, resuspendiran v epici, smo segrevali 15 min pri 80°C. Po končanem segrevanju smo 100 µl suspenzije prenesli na TBAB agarsko gojišče in ga razmazali s pomočjo sterilnerazmazovalne paličice, ki smo jo predtem sterilizirali z etanolom in ožgali. Plošče smo inkubirali 24 h pri 37°C. Posamezne kolonije smo s cepilno zanko precepili na sveže agarsko gojišče. Izolate za nadaljnjo taksonomsko analizo smo izbirali glede na obliko kolonij, ki naj bi bila značilna za seve ozkosorodne *B. subtilis* (kolonije so bele do krem barve za nepravilnim robom in hrapavo površino; premer take kolonije je od 2-3 mm). Precepljanje do čiste kulture smo še enkrat, po potrebi tudi dvakrat ponovili. Tako očiščene izolate smo shranili pri 4°C za nadaljnje analize.

### 3.2.2 Analiza izolatov s tradicionalnimi fiziološko-biokemičnimi metodami

Izolate smo analizirali podveh identifikacijskih tabelah in enem ključu, ki so v celoti navedeni v pregledu objav 2.3.11.

#### 3.2.2.1 Identifikacijska tabela A za identifikacijo vrste *Bacillus subtilis* (Genus *Bacillus*, 1994)

Iz te identifikacijske sheme smo mi izbrali naslednjih sedem testov:- katalazo, VP, redukcijo NO<sub>3</sub> do NO<sub>2</sub>, anaerobno rast, škrob, citrat in G barvanje

#### 3.2.2.2. Identifikacijska shema B po Logan in Berkeley, (1984):

Zajema teste: hidroliza želatine, citrat, nitrat, L-arabinoza in manitol. Namesto na hidrolizo želatine smo izolate testirali za hidrolizo škroba. Slednji test je krajši, saj lahko rezultate odčitamo že po enem dnevu, na rezultate za hidrolizo želatine pa je potrebno čakati šest tednov. Poleg tega je tudi več vrst *Bacillus* pozitivnih na hidrolizo želatine kot na hidrolizo škroba, torej je slednji tudi bolj selektiven. Dodali smo še test za L-arabinozo in katalazo, nitrat pa opustili, saj je nanj pozitivnih večina vrst *Bacillus*.

#### 3.2.2.3 Ključ za identifikacijo sevov *Bacillus subtilis* (Norris in sod., 1981):

-katalaza, VP, anaerobna rast in škrob. Poleg teh testov smo tiste, ki so bili VP pozitivni testirali še na citrat in nekatere na manitol.

### 3.2.3. Biokemijski testi

#### 3.2.3.1 Barvanje po Gramu

Je diferencialno barvanje s katerim razlikujemo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Mikroskopski preparat smo fiksirali nad plamenom in nato barvali 1 minuto pri sobni temperaturi z 10 % raztopino kristal vijoličnega. Odvečno barvilo smo sprali pod tekočo vodo, nato na preparat nanесли lugol in inkubirali pri sobni temperaturi eno minuto. Preparat smo rahlo sprali pod tekočo vodo in razbarvali v etanolu, nato smo na preparat nanесли 0,5%

raztopino safranina in barvali eno minuto pri sobni temperaturi. Nato smo ga spet sprali pod tekočo vodo, posušili in ga pogledali pod mikroskopom.

Bakterije, ki so se obarvale rdeče, smo določili kot po Gramu negativne. Bakterije, ki so se obarvale modro do temnovijolično, smo določili kot po Gramu pozitivne (Rupnik in Zec-Pirnat, 2000).

### 3.2.3.2 Katalazni test

S katalaznim testom smo ugotavljali prisotnost encima katalaze. Encim katalizira pretvorbo dveh molekul vodikovega peroksida do vode. Na objektnik smo kanili kapljico 3 % vodikovega peroksida. S sterilno zanko smo odvzeli kulturo s plošče in jo pomešali s peroksidom. Rezultat smo opredelili kot pozitiven, če smo opazili nastanek mehurčkov in kot negativen, če mehurčkov ni bilo. Kulture ne smemo odvzeti iz gojišč, ki vsebujejo evkariontske celice, npr. iz krvnega agarja. Celice vsebujejo katalazo, zaradi katere bo rezultat lažno pozitiven. Reagent mora biti svež. (Rupnik in Zec-Pirnat, 2000).

### 3.2.3.3 Test z metil rdečim

Ugotavljali smo nastanek kislih produktov pri fermentaciji glukoze. Z dodajanjem indikatorja metil rdeče smo ugotavljali koncentracijo vodikovih ionov, ki je odvisna od tipa fermentacije. Indikator spremeni barvo pri pH 4,4. Mikroorganizmi, ki dajo pozitivno reakcijo, producirajo veliko količino stabilnih kislin,  $H_2$  in  $CO_2$ . Pri mikroorganizmih, ki dajo negativno reakcijo, se začetni kisli produkti fermentacije razgradijo najprej do acetoina, zaradi česar se pH gojišča dvigne.

Test smo izvedli v tekočem gojišču (5ml), katerega sestava je bila enaka kot pri testu Voges-Proskauer (materiali in metode 3.1.3.5). Po 2-5 dnevni inkubaciji smo v gojišče dodali 1 do dve kaplji indikatorja (metil rdeče (0,25% v etanolu) in opazovali spremembo barve. Rezultat smo opredelili kot pozitiven, če je barva indikatorja ostala rdeča, in kot negativen, če je barva indikatorja postala rumena. (Če se je indikator obarval oranžno, je bilo test potrebno ponoviti in podaljšati inkubacijo.) (Rupnik in Zec-Pirnat, 2000).

### 3.2.3.4 Test Voges-Proskauer

Ugotavljali smo nastajanje nevtrálnih produktov (acetoina) pri fermentaciji glukoze. Acetoin je prekursor pri tvorbi 2,3 butandiola, ki je glavni produkt pri butandiolski fermentaciji. Njegovo prisotnost ugotavljamo z dodatkom indikatorja po inkubaciji. V alkalnem mediju ob prisotnosti naftola in kisika acetoin oksidira in nastane diacetil, ki reagira z dušikovimi spojinami v gojišču, zaradi česar nastane rdeča barva. Test smo izvajali v 5 ml epruveti v katero smo dali 1,6 ml tekočega gojišča. Po inkubaciji smo dodali najprej štiri kapljice 5%  $\alpha$  naftola in nato dve kapljici 40% KOH. Rezultat smo opredelili kot pozitiven, če se je po dodatku reagentov v zgornjem delu gojišča razvila rožnato rdeča barva. Odčitati smo po največ 1 uri. Rezultat smo opredelili kot negativen, če spremembe barve ni bilo. Lahko se je pojavila bakrena barva zaradi medsebojne reakcije reagentov med seboj (preveč KOH). (Rupnik in Zec-pirnat, 2000).

### 3.2.3.5 Citrat

Ugotavljali smo sposobnost mikroorganizma, da uporabi citrat kot edini vir ogljika. Na poševnik z agarским gojiščem s citratom (materiali in metode 3.1.3.9) smo nacepili testni sev in poševnik inkubirali na 28 °C 24 do 72 ur (toliko časa, da je bila opazna sprememba barve). Cepili smo po poševni ploskvi. Pazili smo, da pri cepljenju nismo prenašali hranil iz drugih gojišč. Vcepek ni smel biti prebogat. Mikroorganizem, ki lahko uporablja citrat, bo uporabljal amonijevo sol kot vir dušika. Pri tem se bo sproščal amonijak, gojišče bo postalo alkalno in barva indikatorja se bo spremenila. Rezultat smo odčitali kot pozitiven, če se je pojavila sprememba barve iz zelene v modro in je bila bakterijska rast vidna s prostim očesom. Kot negativen rezultat smo opredelili tiste kulture, ki na poševniku niso povzročile spremembe barve gojišča in na njem niso rasle. (Rupnik in Zec-Pirnat, 2000).

### 3.2.3.6 Razgradnja škroba

Ugotavljali smo sposobnost mikroorganizma, da razgrajuje škrob. Pripravili smo plošče osnovnega gojišča s škrobom. Cepili smo v ravni liniji, običajno več kultur na eno ploščo. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 28°C in jih po inkubaciji prelili z lugolovo raztopino (materiali in metode; 3.1.3.8). Jod se bo vezal s škrobom in ga obarval. Bistre cone okrog kolonij so kazale na razgradnjo škroba. Rezultat smo opredelili kot pozitiven, če so se pojavile bistre cone ob kolonijah. Rezultat smo odčitali kot negativen, če se je gojišče ob kolonijah obarvalo modro. Če je gojišče obarvalo vijolično rdeče, je bila hidroliza delna. Potrebno je bilo podaljšati inkubacijo. Nekateri bacili delajo samo ozke cone hidrolize in je potrebno odstraniti kulturo, da jih lahko opazimo. (Rupnik in Zec-Pirnat, 2000).

### 3.2.3.7 Fermentacija ogljikovih hidratov

S tem testom smo ugotavljali, katere sladkorje bakterija razgrajuje in ali se pri tem tvori samo kislina. Kot substrat smo uporabljali naslednje ogljikove hidrate: monosaharida L-arabinozo in ksilozo in alkohol manitol. Uporabljali smo osnovno tekoče gojišče, ki smo mu po avtoklaviranju dodali ogljikov hidrat do 1% končne koncentracije substrata (materiali in metode 3.1.3.7). Pri razgradnji sladkorja nastajajo kisli produkti, spremeni se pH gojišča in barva indikatorja. Osnovno gojišče vsebuje peptone kot vir dušika in ti se razgrajujejo do alkalnih produktov. Produkcijo kislin bomo ugotovili, če bo kislih produktov več kot bazičnih. Reakcija je odvisna tudi od (a). puferske sposobnosti gojišča in (b). indikatorja (bromtimol modro spremeni barvo pri pH 6, bromkrezol rdeče pa pri pH 5). Rezultat smo odčitali kot pozitiven, če je bila opazna sprememba barve gojišča iz vijolične v rumeno. Rezultat smo odčitali kot negativen, če ni bilo spremembe barve gojišča. (Rupnik in Zec-Pirnat, 2000).

### 3.2.4. Izolacija kromosomske DNK

Naravne izolate *Bacillus sp.* (Preglednica 2) smo nacepili v tekoče gojišče LB in jih inkubirali s stresanjem preko noči pri 37°C. Zrasle kulture smo stokrat redčili v svežem gojišču LB z 1 odstotno glukozo (glukoza prepreči sporulacijo) ter jih gojili s stresanjem pri 37°C do pozne eksponentne stopnje rasti. Dva ml kulture smo centrifugirali dvakrat po 5 minut pri 16000 obratov, odstranili supernatant in celice resuspendirali v 200 µl pufra TES. Suspenziji celic smo dodali lizocim do končne koncentracije 4 mg/ml in 3 µl ribonukleaze "RNase ONE" ter inkubirali 30 min pri 37°C. Nato smo dodali SDS do 1-odstotne končne koncentracije in pronazo do končne koncentracije 0,5 mg/ml ter inkubirali pri temperaturi 37°C 2 uri. Po dodatku 200 µl fenola smo centrifugirali 10 minut pri 16000 obratov in zgornjo fazo, ki se je ločila (pufer TES s kromosomsko DNK) prenesli v novo mikrocentrifugirko, ji dodali 200 µl mešanice kloroforma in izoamilnega alkohola v razmerju 24:1 in centrifugirali 10 minut pri 16000 obratov. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 2,5 volumna hladnega etanola. Z obračanjem epice smo pospešili obarjanje DNK, centrifugirali nekaj sekund pri 16000 obratov, odstranili supernatant in znova dodali 2,5 volumna hladnega etanola in inkubirali 15 minut v ledeni kopeli. Po sušenju ob gorilniku smo DNK raztopili v 150 µl destilirane vode in jo shranili pri 4°C (Sabotič, 2002).

### 3.2.5. Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabljali za analizo produktov izolacije DNK in produktov verižne reakcije s polimerazo. Za pripravo gela smo uporabili 0,8-odstotno agarozo v pufru 0,5 x TBE (Tris-boratni pufer), kateri smo pred vlivanjem v horizontalni model dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,2 µg/ml. Elektrodni pufer je bil prav tako Tris-boratni pufer (TBE). Pred nanosom smo vzorcem primešali nanašalni pufer (GL-gel loading) v razmerju vzorec : nanašalni pufer = 3:1 za PCR produkte in 2:1 za preverjanje produktov izolacije DNK. Elektroforeza je tekla pri sobni temperaturi, in sicer pri stalni napetosti 75 V, približno 70 minut. Primerjava s standardno DNK ("Lambda *Bste*II Digest" oziroma "PCR 100 bp Low Ladder") nam je omogočala določanje velikosti in približno oceno koncentracije DNK (Sabotič, 2002).

### 3.2.6 PCR (Verižna reakcija s polimerazo)

Preglednica 5: Imena in sekvence začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za namnoževanje genov *rpoB* in *16S rRNK*.

| Ime začetnega oligonukleotida | Dolžina (nt) | Sekvenca začetnega oligonukleotida      | Tačno mesto naleganja zač. oligonukleotida |
|-------------------------------|--------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>rpoBF</i>                  | 24           | 5'-agg tca act agt tca gta tgg acg -3'  |                                            |
| <i>rpoBR0</i>                 | 24           | 5'-gtc cta cat tgg caa gat cgt atc - 3' |                                            |
| BS1                           | 18           | 5'-ccg gat gst tgt ttg aac - 3'         | 173                                        |
| BS2                           | 20           | 5'-tca aac ata raa ggt ggc tt -3'       | 193                                        |
| BS3                           | 19           | 5'-cga agg gga cgt cct atc t - 3'       | 1013                                       |

800 bp dolgi PCR pomnožki začetnega dela gena *rpoB* so bili namnoženi s parom začetnih oligonukleotidov *rpoBF* (navzdol; forward 5'→3' obrnjen) (f) in *rpoBR0* (navzgor; reverse 3'→5' obrnjen) (r) (Štebe, 2003; diplomsko delo) (Preglednica 5).

810 bp (BS2 – BS3) ali 830bp (BS1 –BS3) dolgi PCR pomnožki gena za *16S rRNK* so bili namnoženi s parom začetnih oligonukleotidov BS1, BS2 (f) in BS3 (r) (Liu in sod., 2001); (Preglednica 5).

### 3.2.6.1 Protokol A: reakcijska mešanica za pomnoževanje gena *rpoB*

DNK izolirano iz sevov P7/2- P7/14 (LjubljanskoBarje)in *B. subtilis* 168-(IS75) (kontrola) smo pomnoževali po protokolu:

Za reakcijske mešanice s končnim volumnom 50 µl je bilo uporabljeno:

- 25 µl Ready Mix™ Taq with MgCl<sub>2</sub>, Sigma (že vsebuje mešanico pufra, magnezija, dNTP in polimeraze Taq DNK).
- 1µl 10 µM *rpoBF*,(f)
- 1µl 10µM *rpoBRO*,(r)
- 1µl matrične DNK(izolirana kromosomska DNK 13 sevov vrste *Bacillus*)
- 22µl destilirane H<sub>2</sub>O.

### 3.2.6.2 Temperaturni program pomnoževanja DNK s parom začetnih oligonukleotidov *rpoBF* in *rpoBRO*:

Začetna denaturacija: 5 min pri 94°C

30 ciklov:            30 s    pri 94°C (denaturacija)  
                         30 s    pri 57°C (prileganje začetnih oligonukleotidov)  
                         50 s    pri 72°C (pomnoževanje)

podaljševanje:    5 min pri 72°C

shranjevanje:        pri 4°C

Uspešnost pomnoževanja zelenih PCR pomnožkov smo preverili z gelsko elektroforezo.

### 3.2.6.3 Protokol B: reakcijske mešanice za pomnoževanje genov za 16S rDNK (začetni oligonukleotidi BS1, BS2, BS3) in gena in *rpoB* ( začetna oligonukleotida *rpoBF* in *rpoBRO*).

DNK izolirano iz sevov s področja nabrežje Save - SV in Himalaje - H smo pomnoževali po naslednjem protokolu B:

Za reakcijske mešanice s končnim volumnom 20 µl smo uporabili:

9,3 µl destilirane dH<sub>2</sub>O

2µl pufra za Taq polimerazo

4µl dNTP

2µl MgCl<sub>2</sub>

0,5µl 10 µM (BS1) (f)

0,5µl 10 µM (BS2) (f)

1µl 10 µM (BS3) (r)

1 µl matrične DNK

Začetne oligonukleotide *rpoBF* in *rpoBRO* smo dali v reakcijsko mešanico vsakega po 1µl. BS1 in BS2 smo dali 0,5 µl (oba sta forward začetna oligonukleotida).

Temperaturni program pomnoževanja je bil enak tistemu, ki smo ga uporabili že za pomnoževanje gena *rpoB* (materiali in metode 3.2.6.2).

## 4 REZULTATI

### 4.1. VZORČENJE NA PODROČJU LJUBLJANSKEGA BARJA

#### 4.1.1 Biokemijski testi za izolate z področja Ljubljanskega Barja

Z biokemijskimi testi izbranimi po ključu in klasifikacijski shemi po Bergeyu (*Genus Bacillus*, 1994) (pregled objav; 2.3.10.1; Identifikacijska tabela ; Pomembne značilnosti za razlikovanje vrst *Bacillus subtilis* in *Bacillus cereus*), smo testirali 32 sporogenih izolatov odvzetih na dveh lokacijah Ljubljanskega Barja. Iz vsake lokacije smo na vse navedene teste testirali 16 sporogenih izolatov (P7/1- P7/16 in P9/1-P9/16; Preglednica 6).

Preglednica 6 ; Rezultati biokemijskih testov za izolate *Bacillus* s področja Ljubljanskega Barja

| št. seva  | katalazni test |    | VP |    | redukcija NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub> |    | rast anaerobno |    | škrobni test |    | MR | citrati |    | 7% NaCl |    | G barvanje |    |
|-----------|----------------|----|----|----|--------------------------------------------|----|----------------|----|--------------|----|----|---------|----|---------|----|------------|----|
|           | P7             | P9 | P7 | P9 | P7                                         | P9 | P7             | P9 | P7           | P9 | P7 | P7      | P9 | P7      | P9 | P7         | P9 |
| <u>1</u>  | +              | +  | +  | +  | +                                          | +  | +              | +  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | +  | G+         | G+ |
| <u>2</u>  | +              | +  | +  | +  | +                                          | +  | +              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | +  | G+         | G+ |
| <u>3</u>  | +              | +  | +  | -  | +                                          | +  | +              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | -  | G+         | G+ |
| <u>4</u>  | +              | +  | +  | -  | +                                          | -  | +              | -  | +            | +  | -  | -       | +  | +       | +  | G+         | G+ |
| <u>5</u>  | +              | +  | +  | -  | +                                          | +  | -              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | -       | -  | G+         | G+ |
| <u>6</u>  | +              | +  | +  | +  | +                                          | +  | -              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | +  | G+         | G+ |
| <u>7</u>  | +              | +  | +  | +  | +                                          | +  | -              | +  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | -  | G+         | G+ |
| <u>8</u>  | +              | +  | +  | -  | +                                          | +  | -              | +  | +            | -  | -  | -       | -  | -       | -  | G+         | G+ |
| <u>9</u>  | +              | +  | +  | -  | +                                          | -  | +              | +  | +            | +  | +  | -       | -  | -       | +  | G+         | G+ |
| 10        | +              | +  | -  | -  | +                                          | -  | +              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | -       | -  | G+         | G+ |
| 11        | +              | +  | +  | /  | +                                          | /  | +              | +  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | -  | G+         | G+ |
| <u>12</u> | +              | +  | +  | /  | +                                          | +  | -              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | -       | -  | G+         | G+ |
| <u>13</u> | +              | +  | +  | /  | +                                          | +  | +              | +  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | -  | G+         | G+ |
| <u>14</u> | +              | +  | +  | /  | +                                          | +  | +              | -  | +            | -  | -  | -       | +  | -       | +  | G+         | G+ |
| 15        | +              | +  | +  | /  | +                                          | +  | +              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | -       | +  | G+         | G+ |
| 16        | +              | +  | +  | /  | +                                          | +  | -              | -  | +            | +  | -  | -       | -  | +       | -  | G+         | G+ |

Legenda: + ; izolat je na test dal pozitivno reakcijo, - ; izolat je na test dal negativno reakcijo, / ; test za izolat ni bil izveden, G+, izolat je Gram pozitiven, P7; izolati s področja Ljubljanskega Barja; P9; izolati s poplavljenega področja Ljubljanskega Barja; referenčnih sevov za to področje nismo imeli

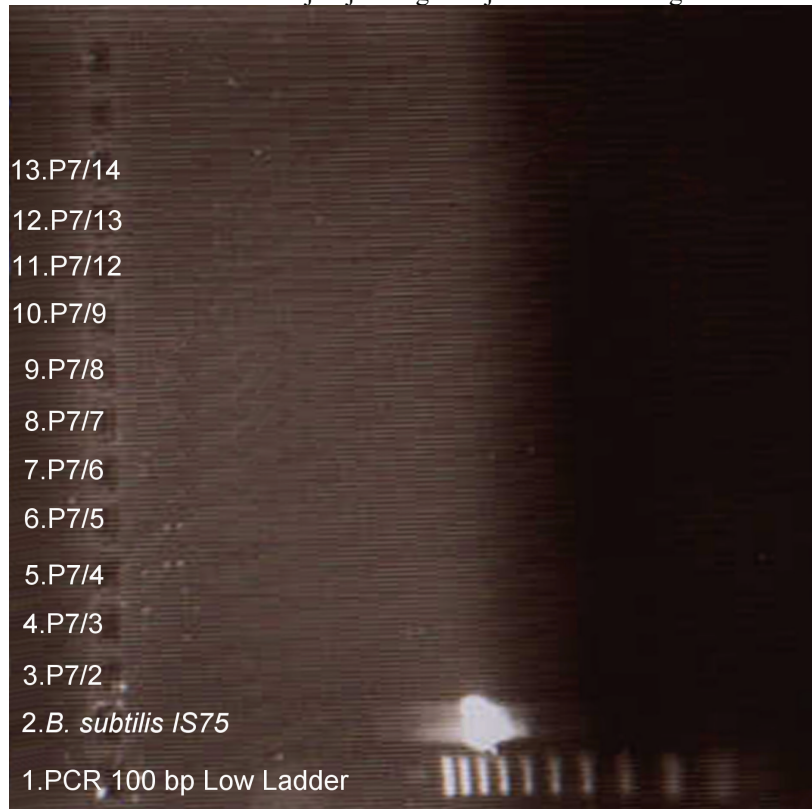
Nobeden od testiranih izolatov ni zadovoljil vseh kriterijev za uvrstitev v vrsto *B. subtilis*. Izpostavili bi test na citrat, ki je bil za vse razen dveh izolatov negativen; pozitivna pa sta bila izolata (P9/4 in P9/14). Skupno smo več pozitivnih izolatov dobili pri pri izolatih skupine P7, ki so bili vsi G+, vsi so razgrajevali škrob in bili pozitivni na katalazo. Večina je bila tudi VP pozitivnih. Med 16 izolati skupine P7 smo za nadaljno obdelavo z molekularnimi metodami izbrali 12 predstavnikov, ki so skupno dali največ pozitivnih biokemijskih testov (Preglednica 6; podčrtani in povdarjeni s krepkim tiskom P7 in Slika 2). Iz omenjenih izolatov (Preglednica 6; Slika 2) smo izolirali DNK in z začetnimi oligonukleotidi *rpoBF* in *rpoBRO* specifičnimi

za rod *Bacillus* izvedli PCR (verižna reakcija s polimerazo) (materiali in metode 3.6; protokol A).

Kot pozitivno referenco smo uporabili DNK laboratorijskega seva *Bacillus subtilis* 168-(IS75). Vrstni red in število sevov (11), ki smo jih pomnoževali je razvidno s slike 2; sev P7/1 smo pomnoževali v prejšnji reakciji (rezultati niso prikazani). Referenčni sev *Bacillus subtilis* 168-(IS75) je dal pozitivno reakcijo (PCR pomnožek dolg približno 800 bp), medtem ko se DNK ostalih sevov ni pomnožila.

#### 4.1.2 PCR (verižna reakcija s polimerazo) z začetnimi oligonukleotidi za gen *rpoB*

Slika 2: PCR za izolate iz Ljubljanskega Barja z začetnimi oligonukleotidi *rpoBF* (f), *rpoBRO* (r)



Legenda: PCR 100 bp Low Ladder: standardna DNK 100bp Low Ladder, *B.subtilis* 168-(IS75); referenčni sev; P7/2-P7/14; oznake izolatov, katerih sekvence za gen *rpoB* smo pomnoževali.

Za standard smo nanesti 3 $\mu$ l standarda 100 bp Low Ladder in 1 $\mu$ l GL pufra; v vzorčkih pa mešanico 5  $\mu$ l vzorca DNK in 1 $\mu$ l GL pufra.

Iz vzorca Barjanskih tal smo ponovno izolirali sporogene izolate. Z biokemijskimi testi po ključu in klasifikacijski shemi za določevanje vrst *Bacillus* (Logan in Berkeley, 1984), ki sta ga priredila (Roberts in Cohan, 1991) (pregled objav 2.3.10.2), smo analizirali 48 sporogenih izolatov (P7A/1-P7A/8, P7B/1-P7B/8, P7C/1-P7C/8, P9A/1-P9A/8, P9B/1-P9B/8 in P9C/1-P9C/8). Kot pozitivno referenco smo uporabili laboratorijski sev *Bacillus subtilis* 168-(IS75) in naravni izolat *Bacillus subtilis*-168 RO-FF-1, kot negativno referenco pa *Bacillus cereus* (negativen na sladkorje). Vseh 48 izolatov je bilo pozitivnih na katalazo (podatki niso prikazani), na citrat so dali pozitivno reakcijo le trije od 48 sevov. Te tri izolate smo testirali še na rast na manitolu, ksilozi in L-arabinozi. Vsi trije so dali pozitivne reakcije. Nobeden od

treh sevov ni bil pozitiven na VP. Referenčni sevi so dali pričakovano reakcijo; vsi trije so bili pozitivni na citrat, na sladkorje je bil *Bacillus cereus* negativen (Preglednica 7). Torej nam tudi v drugem poskusu iz barjanskih tal ni uspelo osamiti izolatov, ki bi jih glede na izbran identifikacijski ključ potencialno lahko uvrstili v vrsto *Bacillus subtilis*.

Preglednica 7: Biokemijski testi za izolate iz Ljubljanskega Barja (ponovno vzorčenje)

| TEST SLADKORJEV             |           | KSILOZA |         | MANITOL |         | L-ARABINOZA |         | VP |
|-----------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|-------------|---------|----|
|                             |           | rast    | kislina | rast    | kislina | rast        | kislina |    |
| <b>B.subtilis 168 ROFF1</b> | referenca | +       | +       | +       | +       | +           | +       | +  |
| <b>B.subtilis IS75</b>      | referenca | +       | -       | +       | -       | +           | -       | +  |
| <b>B.cereus</b>             | referenca | +       | -       | +       | -       | +           | -       | -  |
| <b>P7A/4</b>                |           | +       | -       | +       | -       | +           | -       | -  |
| <b>P9C/4</b>                |           | +       | +       | +       | -       | +           | +       | -  |
| <b>P9C/7</b>                |           | +       | +       | +       | +       | +           | +       | -  |

Legenda: + ; izolat je na test dal pozitivno reakcijo, - ; izolat je na test dal negativno reakcijo, / ; test za izolat ni bil izveden ; P7; izolati s področja Ljubljanskega Barja; P9; izolati s poplavljenega področja Ljubljanskega Barja; referenčni sevi: *Bacillus subtilis* 168-(IS75) *Bacillus subtilis*-168 RO-FF-1 (pozitivna referenčna seva), *Bacillus cereus* (negativna referenčni sev).

## 4.2. VZORČENJE NA PODROČJU JEPRCA

### 4.2.1 Biokemijski testi za področje Jeprca

Med sporogenimi izolati pridobljenimi iz vzorcev tal z Jeprce smo glede na morfologijo izbrali 48 predstavnikov (P5A1-P5A/8, P5B/1-P5B/8, P5C/1-P5C/8, P6A/1-P6B/8, P6B/1-P6B/8 in P6C/1-P6C/8) in jih testirali po ključu Logan in Berkeley (1984), ki sta ga priredila Roberts in Cohan (1991). Kot referenčne seve smo spet uporabili *B. subtilis* 168-(IS75), *B. subtilis* 168 RO-FF-1 in *B. cereus*. Pri tem eksperimentu je vseh 48 sevov dalo pozitivno reakcijo na katalazo; tudi referenčni. Na citrat je bilo pozitivnih pet sevov (P5A/8, P5B/8, P5C/7, P6A/6, P6A/8) in referenčni sev *B. cereus*, *B. subtilis* 168-(IS75) in *B. subtilis* 168 RO-FF-1 sta bila na citrat negativna, čeprav bi bilo pričakovati pozitivno reakcijo. Na teste za manitol, L-arabinozo in ksilozo sta bila pozitivna le P5B/7 in P5C/7; od referenčnih sevov je bil pozitiven le *B. subtilis* RO-FF-1, *B. subtilis* 168-(IS75) pa ni bil pozitiven, čeprav smo to pričakovali. *B. cereus* je bil negativen, kar je bilo pričakovano. Seve, pozitivne na citrat, smo testirali še na VP; pozitivna sta bila P5A/8 in P6A/8 in vsi referenčni sevi. (Preglednica 8). Ker referenčni sevi niso dali pričakovanih rezultatov, kakor tudi novi izolati, slednjih nismo testirali z molekularnimi metodami.

Preglednica 8 ;Biokemijski testi za izolate s področja Jeprca

| št.seva              | Katalazni test |     |     | CITRAT |     |     | manitol |     |     | ksiloza |     |     | arabinoza |     |     | VP  |     |     |
|----------------------|----------------|-----|-----|--------|-----|-----|---------|-----|-----|---------|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                      | P5A            | P5B | P5C | P5A    | P5B | P5C | P5A     | P5B | P5C | P5A     | P5B | P5C | P5A       | P5B | P5C | P5A | P5B | P5C |
| 1                    |                |     |     |        |     |     |         |     |     |         |     |     |           |     |     |     |     |     |
| 2                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 3                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 4                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 5                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 6                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 7                    | +              | +   | +   | -      | -   | +   | /       | /   | +   | /       | /   | +   | /         | /   | +   | /   | /   | /   |
| 8                    | +              | +   | +   | +      | +   | -   | -       | +   | /   | -       | +   |     | -         | +   |     | +   | -   | -   |
|                      | P6A            | P6B | P6C | P6A    | P6B | P6C | P6A     | P6B | P6C | P6A     | P6B | P6C | P6A       | P6B | P6C | P6A | P6B | P6C |
| 1                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 2                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 3                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 4                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 5                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   | /   | /   | /   |
| 6                    | +              | +   | +   | +      | -   | -   | +       | /   | /   | +       | /   | /   | -         | /   | /   | -   | /   | /   |
| 7                    | +              | +   | +   | -      | -   | -   | /       | /   | /   | /       | /   | /   | /         | /   | /   |     | /   | /   |
| 8                    | +              | +   | +   | +      | -   | -   | +       | /   | /   | +       | /   | /   | -         | /   | /   | +   | /   | /   |
| <i>B.s.-IS75</i>     | +              |     |     | -      |     |     | -       |     |     | -       |     |     | -         |     |     | +   |     |     |
| <i>B.s 168 ROFF1</i> | +              |     |     | -      |     |     | +       |     |     | +       |     |     | +         |     |     | +   |     |     |
| <i>B.cereus</i>      | +              |     |     | +      |     |     | -       |     |     | -       |     |     | -         |     |     | +   |     |     |

Legenda: + ; izolat je na test dal pozitivno reakcijo, - ; izolat je na test dal negativno reakcijo, / ; test za izolat ni bil izveden; P5 vzorčenje na področju Jeprca travnik, P6; vzorčenje na področju Jeprca obronek gozda; referenčni sevi: *Bacillus subtilis* 168-(IS75) *Bacillus subtilis*-168 RO-FF-1 (pozitivna referenčna seva), *Bacillus cereus* (negativen referenčni sev).

#### 4.3 VZORČENJE NA PODROČJU NABREŽJE SAVA PRI TACNU IN TOMAČEVO

##### 4.3.1 Biokemijski testi za izolate s področja nabrežja Save pri Tacnu in Tomačevo

Dva vzorca tal smo odvzeli v Tomačevem (TNI- Tomačevo nogometno igrišče in TT- Tomačevo travnik) in dva vzorca z nabrežja Save (ST-Sava Tacen in SV- nabrežje Save). Iz talnih vzorcev smo izolirali sporogene izolate in iz vsakega področja izbrali 24 izolatov glede na morfologijo kolonij. 96 sporogenih izolatov (SV1/1-SV1/8, SV2/1-SV2/8, SV3/1-SV3/8, ST1/1-ST1/8, ST2/1-ST2/8, ST3/1-ST3/8 in ST3/1-ST3/8, TT1/1-TT1/8, TT2/1-TT2/8, TT3/1-TT3/8, TNI1/1-TNI1/8, TNI2/1-TNI2/8, TNI3/1-TNI3/8), smo testirali po ključu in klasifikacijski shemi C (Norris in sod.,1981), po katerem mora biti sev, da ustreza kriterijem za *B. subtilis* pozitiven na katalazo, VP, škrob in ne sme (ali pa zelo šibko) rasti anaerobno. Seve smo dodatno testirali še na citrat in nekatere na manitol. Kot referenčni sev smo uporabili *Bacillus subtilis* 168-RO-FF-1. Na katalazo je bilo pozitivnih vseh 96 izbranih izolatov. V naslednjem koraku smo vseh 96 izolatov testirali na VP in dobili 8 pozitivnih rezultatov in pozitiven referenčni sev (SV1/6, SV2/3, SV2/4, SV2/5, SV2/7, SV3/4, SV3/5, SV3/6; SV3/3) (Preglednica 9). Zato smo vseh 24 izolatov z nabrežja Save dodatno testirali na citrat, ki smo ga uporabili kot potrditveni in ne kot izločitveni test. Pozitivno reakcijo je dalo 8 izolatov (SV1/3, SV1/5, SV1/6, SV2/4, SV2/5, SV3/3, SV3/5; SV2/3) in referenčni sev *Bacillus subtilis* 168-RO-FF-1. 9 izolatov, ki so dali pozitivno reakcijo na VP ali na citrat smo testirali še na anaerobno rast, razgradnjo škroba in nekatere za razgradnjo manitola. Vsi

izbrani izolati (Preglednica 9; krepkeje natisnjeni) so dali pozitivne reakcije, prav tako referenčni sev.

Preglednica 9 ;Biokemijski test za izolate s področja nabrežje Save pri Tacnu in Tomačevega

| VZOREC                        | Citrat   | VP | Anaerobna rast | škrob | manitol | katalaza |
|-------------------------------|----------|----|----------------|-------|---------|----------|
| SV1/1                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| SV1/2                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| <b>SV1/3</b>                  | +        | -  | -              | +     | /       | +        |
| SV1/4                         | -        | -  | -              | +     | /       | +        |
| <b>SV1/5</b>                  | +        | -  | -              | +     | /       | +        |
| <b>SV1/6</b>                  | +        | +  | šibko          | +     | /       | +        |
| SV1/7                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| SV1/8                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| SV2/1                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| SV2/2                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| <b>SV2/3</b>                  | ?        | +  | /              | +     | +       | +        |
| <b>SV2/4</b>                  | +        | +  | -              | +     | +       | +        |
| <b>SV2/5</b>                  | +        | +  | /              | +     | +       | +        |
| <b>SV2/7</b>                  | -        | +  | -              | /     | /       | +        |
| SV2/8                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| SV3/1                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| SV3/2                         | -        | -  | /              | /     | /       | /        |
| <b>SV3/3</b>                  | +        | +  | -              | +     | +       | +        |
| SV3/4                         | ni rasti | +  | /              | /     | /       | +        |
| <b>SV3/5</b>                  | +        | +  | -              | +     | +       | +        |
| SV3/6                         | -        | -  | /              | /     | /       | +        |
| SV3/7                         | -        | -  | /              | /     | /       | +        |
| SV3/8                         | -        | -  | /              | /     | /       | +        |
| ST2/1                         | +        | -  | -              |       |         |          |
| <b>B.subtillis 168 ROFF1.</b> | +        | +  | šibko          | +     | +       | +        |
| B.subtillis 168-(IS75)        | +        | /  | šibko          | +     | /       | +        |
| B.cereus.                     | +        | /  | šibko          | +     | /       | +        |

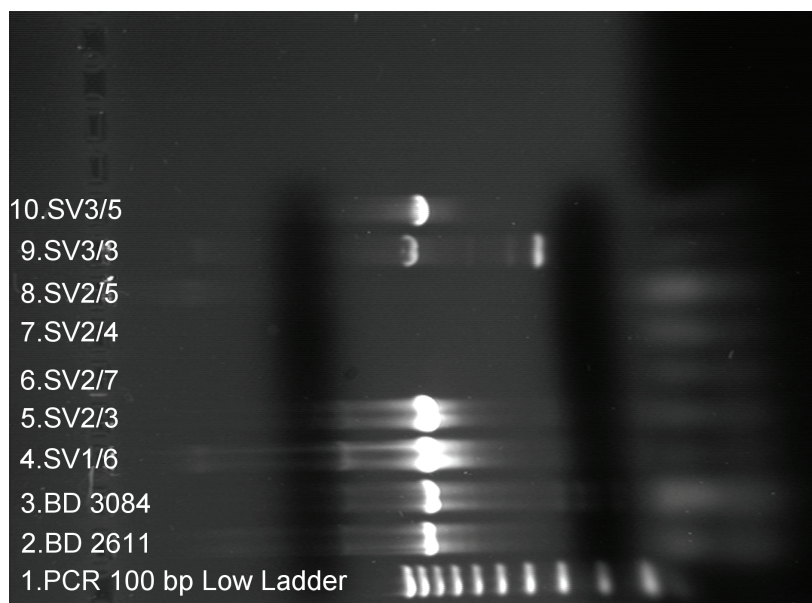
Legenda: + ; izolat je na test dal pozitivno reakcijo, - ; izolat je na test dal negativno reakcijo, / ; test za izolat ni bil izveden; SV;oznaka za izolate s področja nabrežje Save pri Tacnu, ST; oznaka za izolate s področja Save pri Tacnu, referenčni sevi: *B.subtillis*168 RO-FF-1, *B.subtillis* 168-(IS75 (pozitivna referenčna seva)), *B.cereus* (negativen referenčni sev) ;Šibko; pomeni zelo slabo rast na izbranem gojišču. Krepkejši tisk: izolati, ki smo jih izbrali za nadaljno obdelavo z molekularnimi metodami .

#### 4.3.2 PCR (verižna reakcija s polimerazo) z začetnimi oligonukleotidi za *16S rRNA*

Seve SV1/6, SV2/3, SV2/4, SV2/5, SV2/7, SV3/3 in SV3/5 smo preučili še z molekularnimi metodami, saj so bili vsi pozitivni na na začetku določen ključ (katalaza, VP, anaerobna rast in škrob).

Iz izolatov smo izolirali kromosomsko DNK (materiali in metode 3.5). Z metodo PCR in začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za *B. subtilis* gen za *16S rRNA* (BS1, BS2, BS3) smo preverili sorodnost sevov s referenčnim sevom *B. subtilis* 168-(IS75).

Slika 3: PCR za izolate SV (nabrežje Save pri Tacnu) z začetnimi oligonukleotidi za *16S rRNA*, specifičnimi za *Bacillus subtilis*



Legenda: PCR 100 bp Low Ladder: standardna DNK 100bp Low Ladder, referenčna seva BD2611, BD3084; *B. subtilis* 168-(IS75), materiali in metode Preglednica 2; SV; oznaka za izolate s področja nabrežje Save.

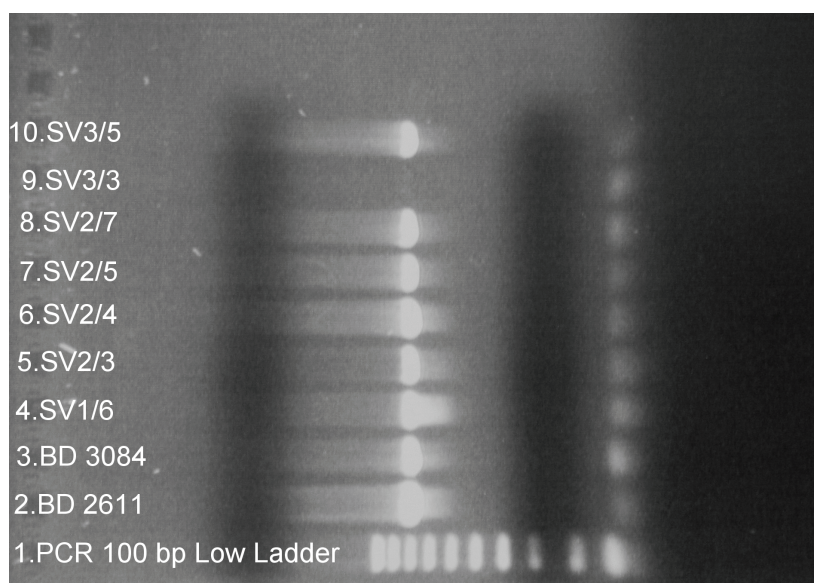
Med sedmimi novimi izolati smo pozitivne rezultate dobili pri naslednjih izolatih: SV1/6, SV2/3, SV3/3, SV3/5. Pozitivna sta bila tudi oba referenčna seva BD2611, BD3084. Dolžina PCR pomnožka je bila približno 800 bp, kar ustreza velikosti PCR pomnožka, ki ga dobimo ob pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi BS1-BS3 (830 bp) in BS2-BS3 (810 BP). Negativne rezultate smo pri tej reakciji dobili za izolate SV2/4, SV2/5, SV2/7 (Slika 3). PCR reakcijo smo ponovili. V tem poskusu smo dobili pozitivno PCR reakcijo še za izolat SV2/5, medtem ko je bil SV2/4 še vedno negativen (podatki niso prikazani). Pri ostalih izvedenih PCR reakcijah so bili pozitivni; referenčni sev *B. subtilis* RO-FF-1, SV2/3, SV2/7, SV1/6, SV3/3 in SV3/5.; Negativne rezultate pa smo dobili za izolate: SV1/3, SV3/6, SV1, SV2, SV3 (DNK, izolirana iz vseh kolonij pobranih iz plošč, kjer smo našli pozitivne izolate *B. subtilis*).

#### 4.3.3. PCR (verižna reakcija s polimerazo) z začetnimi oligonukleotidi *rpoBF* in *rpoBRO*

DNK izolirano iz sevov SV1/6, SV2/3, SV2/4, SV2/5, SV2/7, SV3/3 in SV3/5 smo testirali tudi za prisotnost gena *rpoB* in to z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za *Bacillus*.

Med sedmimi izolati smo vsaj enkrat dobili pozitivno reakcijo za: SV1/6, SV2/3, SV2/4, SV2/5, SV2/7, SV3/5 in SV3/3 in oba referenčna seva BD2611, BD3084 (Preglednica 3), (Slika 4). Za izolat SV3/3, ki je na sliki 4 negativen smo pozitivno reakcijo dobili pri naslednji PCR reakciji. (podatki niso prikazani).

Slika 4: PCR za vzorce SV (nabrežje Save pri Tacnu) z začetnimi oligonukleotidi *rpoBF*(f) in *rpoBRO*(r)



Legenda: PCR 100 bp Low Ladder: standardna DNK 100bp Low Ladder ; referenčna seva BD2611, BD3084; *B. subtilis* 168-(IS75), materiali in metode Preglednica 3; SV; oznaka za izolate s področja nabrežje Save.

Vse pozitivne seve smo uredili v tabelo in poleg biokemijskih testov navedli še rezultat pri reakciji PCR in število, kolikokrat je bil sev pozitiven pri posamezni reakciji PCR. Vzorci pozitivni na oligonukleotidna začetnika za *16S rRNA* (BS1, BS2, BS3) in *rpoBF* in *rpoBRO* SV1/6, SV2/3, SV2/4 (pozitiven le na *rpoBF* in *rpoBRO* oligonukleotidna začetnika), SV2/5, SV2/7, SV3/3, SV3/5.

Preglednica 10: Zbrani rezultati pozitivnih izolatov z območja nabrežje Save pri Tacnu (SV-Sava voda)

| VZOREC                           | CITRAT | VP | rast<br>anaerobno | škrob | manitol | katalaza | rpoBRO<br>rpoBF |     | 16 S rDNK |     |
|----------------------------------|--------|----|-------------------|-------|---------|----------|-----------------|-----|-----------|-----|
|                                  |        |    |                   |       |         |          | +               | -   | +         | -   |
| SV1/6                            | +      | +  | šibka             | +     | /       | +        | 2/2             |     | 3/3       |     |
| SV2/3                            | ?      | +  | /                 | +     | +       | +        | 2/2             |     | 2/2       |     |
| SV2/4                            | +      | +  | -                 | +     | +       | +        | 1/2             | 1/2 | 0         | 2/2 |
| SV2/5                            | +      | +  | /                 | +     | +       | +        | 1/1             |     | 1/2       | 1/2 |
| SV2/7                            | -      | +  | /                 |       | /       | +        | 2/2             |     | 2/3       | 1/3 |
| SV3/3                            | +      | ?  | -                 | +     | +       | +        | 1/2             | 1/2 | 4/4       |     |
| SV3/5                            | +      | +  | -                 | +     | +       | +        | 1/2             | 1/2 | 3/3       |     |
| REFERENČNI<br>SEVI               |        |    |                   |       |         |          |                 |     |           |     |
| <i>B.subtilis</i><br>RO-FF-1..   | +      | +  | šibka             | +     | +       | +        | 1/2             | 1/2 |           |     |
| <i>B.subtilis</i> 168<br>-(IS75) | +      |    | šibka             | +     | /       | +        |                 |     |           |     |
| <i>B.cereus</i>                  | +      |    | šibka             | +     | /       | +        | /               | /   | /         | /   |

Legenda: + ; izolat je na test dal pozitivno reakcijo, - ; izolat je na test dal negativno reakcijo, / ; test za izolat ni bil izveden; prazno okence; pomeni, da za test nismo dobili negativnega rezultata pri PCR reakciji, SV;oznaka za izolate s področja nabrežje Save pri Tacnu, ST; oznaka za izolate s področja Save pri Tacnu, referenčni sevi: *B.subtilis* RO-FF-1, *B.subtilis* 168-(IS75), *B.cereus*. ?; nejasni rezultati testa

Slika 5: Morfološki izgled izbranih izolatov gojenih na TBAB gojišču



Legenda: SV1/6, SV2/3, SV2/4, SV2/5, SV2/7, SV3/3, SV3/5; oznake pripadajo pozitivnim izolatom ( vsaj enkrat pozitiven rezultat pri PCR reakciji) ob katerih so napisane.

#### 4.4 VZORČENJE S PODROČJA HIMALAJSKEGA POGORJA (5600 m).

##### 4.4.1 Biokemijski testi za izolate s področja Himalajskega pogorja (5600 m)

Iz vzorcev peščenih tal s Himalajskega pogorja (5600 m), ki nam jih je dal na razpolago Blaž Stres, smo osamili 17 sporogenih predstavnikov (po morfologiji in taksonomskih testih enaki, zato so v preglednici navedeni skupaj) in jih identificirali po enakem protokolu (C; Norris in sod., 1981), kot izolate vzorčenja nabrežje Save pri Tacnu in Tomačevo. Izolati so dali pozitivne rezultate na vse izvajane teste (Preglednica 11), razen na test za VP. Kljub temu smo sev H1/2-1 preverili še z začetnimi oligonukleotidi za gen *16S rRNK* in dobili negativne rezultate (niso prikazani).

Preglednica 11: Biokemijski testi za izolate s področja Himalajskega pogorja

| VZOREC                           | Citrat | VP | Anaerobna rast | škrob | manitol | katalaza |
|----------------------------------|--------|----|----------------|-------|---------|----------|
| <i>B.subtillis</i> 168- RO-FF-1. | +      | +  | šibko          | +     | +       | +        |
| <i>B.subtillis</i> 168 (IS75)    | +      | /  | šibko          | +     | /       | +        |
| <i>B.cereus</i> .                | +      | /  | šibko          | +     | /       | +        |
| H1/2..1-8                        | +      | -  | šibko          | +     | /       | +        |
| H1/2..9-15                       | +      | -  | šibko          | +     | /       | +        |
| H3/1                             | +      | -  | šibko          | +     | /       | +        |

Legenda: + ; izolat je na test dal pozitivno reakcijo, - ; izolat je na test dal negativno reakcijo, / ; test za izolat ni bil izveden, H; oznaka za izolate s Himalajskega pogorja; referenčni sevi: *B.subtillis* 168 RO-FF-1, *B.subtillis* 168-(IS75), *B.cereus*

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Rod *Bacillus* sestavljajo fenotipsko precej različne paličaste Gram pozitivne bakterije, ki so aerobne in gibljive s peritrihimi flageli. Člani rodu so sposobni produkcije endospor, ki so zelo odporne na neugodne pogoje okolja (Claus in Berkeley, 1986). Rod vključuje organizme s širokim razponom prehranskih zahtev, fiziološke in metabolne različnosti in DNK bazne sestave.

Tipska vrsta rodu *Bacillus*, *B. subtilis* zajema aerobne paličaste bakterije, ki tvorijo endospore. Ponavadi jih najdemo v tleh, vodnih virih ali v povezavi z rastlinami (Claus in Berkeley, 1986).

V pričujočem delu smo želeli osamiti in identificirati seve *B. subtilis* iz talnih agregatov. Odvzeli smo vzorce na različnih štirih različnih področjih Slovenije, analizirali pa smo tudi vzorec s Himalajskega pogorja.

Osamitve in identifikacije sevov rodu *Bacillus* smo se lotili tako, da smo izolate najprej osamili z uničenjem vegetativnih celic z inkubacijo vzorcev na 80 °C približno 10 minut. Spore so vskalile v kolonije in zrastle aerobno na ustreznem gojišču. S tem postopkom smo dobili le aerobne sporogene bacile, med katerimi smo potem izolate za nadaljnjo taksonomsko analizo izbirali glede na obliko kolonij, ki naj bi bila značilna za seve sorodne *B. subtilis* (kolonije so bele do krem barve za nepravilnim robom in hrapavo površino; premer take kolonije je od 2-3 mm).

Izolate smo nato analizirali z mikrobiološkimi, fiziološkimi in biokemičnimi testi. Sporogene izolate smo pridobili iz talnih vzorcev štirih geografsko ločenih področij Slovenije (Ljubljansko Barje, Jeprca, nabrežje Save blizu Tacna in Tomačevo). Sporogene seve smo osamili tudi iz vzorcev Himalajskega pogorja (5600 m višine), ki nam jih je dal na razpolago Blaž Stres. Pri nadaljnji taksonomski analizi smo uporabili 3 različne ključe in klasifikacijske sheme

Sporogene izolate iz tal Ljubljanskega Barja smo identificirali po identifikacijski tabeli A (32 izolatov) in po identifikacijski shemi B (48 izolatov), vendar izolatov, ki bi jih lahko zanesljivo uvrstili v vrsto *B. subtilis* nismo našli med njimi. Izolate osamljene iz talnega vzorca pridobljenega na Jeprci smo analizirali po identifikacijski shemi B. Nobeden od izbranih sporogenih izolatov ni ustrezal kriteriju B za vrsto *B. subtilis*. Vendar tudi referenčni sevi niso dali vedno pričakovanih rezultatov. Izolate pridobljene iz talnih vzorcev Tomačevega (2 vzorčenji po 24 izolatov) in nabrežja Save pri Tacnu (2 vzorčenji po 24 izolatov) in izolate iz tal Himalajskega pogorja smo analizirali po ključu C. Izolate, ki jih na osnovi morfoloških, fiziološko-biokemijskih in molekularno-bioloških testov lahko uvrstimo v vrsto *B. subtilis*, smo dobili le v vzorcu nabrežje Save pri Tacnu, in sicer sedem. Kakšni so lahko razlogi, da v ostalih vzorcih nismo odkrili izolatov, ki bi jih lahko uvrstili v vrsto *B. subtilis*?

Najbolj očiten je seveda, da *B. subtilis* v vzorcih ni bilo. Vendar ne moremo trditi, da na omenjenih območjih vzorčenj predstavnikov te vrste ni, saj smo odvzeli le po dva vzorca tal z izbranega področja.

Drugi možen razlog je, da smo testirali premajhno število sporogenih izolatov (32 sevov, Ljubljansko Barje prvo vzorčenje; Ljubljansko Barje drugo vzorčenje 48, Jeprca 48 in zadnje vzorčenje 96, vzorec smo vzeli na štirih različnih koncih, na vsakem kraju 24 vzorcev). Razlog, ki govori v prid naši trditvi je, da ne poznamo deleža *B. subtilis* glede na ostale sporogene predstavnike rodu *Bacillus*. Z vključitvijo večjega števila sporogenih izolatov v nadaljevanju, bi povečali možnost osamitve izolatov, ki bi jih lahko uvrščali v vrsto *B. subtilis*, kljub morebitno nižji zastopanosti v primerjavi z ostalimi sporogenimi predstavniki rodu *Bacillus*. To trditev podpirajo tudi navedbe v literaturi, da je *B. subtilis* ubikvitarna bakterija (Claus in Berkeley, 1986) in bi jo morali osamiti iz skoraj vsakega okolja, čeprav v manjšem številu

Tretja možnost je vpliv kvalitete in strukture tal. V podporo tej hipotezi je dejstvo, da so tla na vseh področjih vzorčenj razen nabrežja Save relativno bogata z organskimi materialom, saj je bila to zemlja namenjena pridelavi (Ljubljansko Barje in Jeprca) ali pa je bilo področje preraslo s travo (Tomačevo). Področje vzorčenja z Ljubljanskega Barja P9 je bilo tudi poplavljenno. Vzorec, kjer smo našli pozitivne izolate, je bil precej suha peščena naplavina na bregu reke Save, ki ni bila preraščena z rastlinjem. Verjetno je *B. subtilis* v suhih tleh, ki so aerobna in revna s hranili prisoten v večjem številu in se ga lahko lažje osami iz tal, ki so s hranili bogatejša. Večino dosedaj opisanih sevov *B. subtilis* so našli v puščajevskem okolju (Cohan, 1999), kar bi lahko nakazovalo, da *B. subtilis* bolj uspešno raste v bolj suhih, celo peščenih tleh oziroma v okoljih, ki so bolj revna s hranili (morje) (Ivanova in sod., 1999).

Četrty možen razlog bi lahko bil, da nismo uporabili ustreznega ključa za identifikacijo. Ključ C (Norris in sod., 1981) po katerem mora biti sev pozitiven na katalazo, VP, škrob in ne raste ali pa raste le slabo anaerobno se je izkazal kot najbolj selektiven in zanesljiv, saj smo po njem tudi dobili pozitivne rezultate. Slabost identifikacijske tabele A (Genus *Bacillus*, 1994) je, da nam ne pove kateri testi ločijo *B. subtilis* od ostalih sporogenih predstavnikov rodu *Bacillus*. Ključ B (Logan in Berkeley, 1984) pa vsebuje test za citrat kot glavni selekcijski test. Po navedbah iz literature so test za citrat izločili iz klasifikacijske sheme (Norris in sod., 1981), saj je slednji povzročil neujemanja tudi pri drugih raziskovalnih skupinah. Izbira pravega ključa je seveda povezana tudi z napredkom pri izolaciji in taksonomiji rodu *Bacillus* (glej pregled objav) in problematiko nekaterih ključev, ki so bili do nedavnega osnova za identifikacijo, zdaj pa stopajo bolj v ozadje, oziroma so le preveritveni korak.

Peti možen razlog za majhno število izoliranih predstavnikov vrste *B. subtilis* v 5 od 6 talnih vzorcev je, da so druge sporogene vrste v talnih vzorcih hitreje rasle na ploščah kot izolati vrste *B. subtilis*. Na primer sevi *B. mycoides*, ki imajo značilno spiralasto in pahljačasto razrast, so prekrili skoraj celotno površino plošč. Večina ostalih kolonij je bila tako prekrita s temi bakterijami, saj so bile vse plošče, iz katerih smo delali izolacijo, precej gosto preraščene (po oceni okrog 500 kolonij) in je bilo težko izbrati morfološko ustrezne kolonije. Tej tezi v prid govori tudi majhno število kolonij na ploščah vzorca Sava voda (SV1-56 kolonij, SV2-135 kolonij, SV3-78 kolonij). Pri drugih ploščah (razen Sava Tacen, kjer je bilo število kolonij v enakem območju kot pri vzorcu Sava voda) je številka kolonij na ploščah variirala od 300-500. Na osnovi teh števil bi lahko sklepali, da smo lahko zgrešili predstavnike *B. subtilis* tudi zaradi velikega števila ostalih sporogenih vrst rodu *Bacillus*. Pri teh vzorcih bi bilo po selekcijski obdelavi na 80° C potrebno redčenje pred nanosom na ploščo s hranilnim agarjem.

Šesti možen razlog, da predstavnikov vrste *B. subtilis* iz navedenih področij vzorčenj nismo uspeli osamiti je, da je bil del populacije *B. subtilis* v obliki vegetativnih celic in smo jih s toplotno obdelavo vzorca pobili. To hipotezo podpirajo ugotovitve Wattiau in sod., (2001), ki so pokazali, da se delež predstavnikov vrste *B. subtilis* po toplotni obdelavi vzorca zniža.

Da bi preverili, ali katera od kolonij na izhodnih ploščah s sporogenimi kolonijami morda vsebuje bakterije vrste *B. subtilis* in smo jo zaradi premajhnega števila pregledanih izolatov spregledali, smo iz treh plošč (SV1, SV2, SV3) postrgali vse kolonije, izolirali DNK in z začetnimi oligonukleotidi za *16S rRNA* izvedli PCR. Pozitivnih rezultatov nismo dobili, čeprav so bile med njimi plošče, kjer smo prej našli pozitivne izolate. Podobno izkušnjo opisuje Wattiau in sod., (2001) ki so uporabili test za *16S rRNA*, ki dovoljuje hitro in semi-specifično detekcijo bakterij iz skupine *B. subtilis* v okoljskih vzorcih. V nasprotju z visoko občutljivostjo, ko gre za posamezne kolonije, se je direktno odkrivanje bakterijskih celic iz vrst *Bacillus* iz mikrobne združbe izkazalo za manj učinkovito, saj je zahtevalo precejšnje količine vzorca. To je verjetno razlog, zakaj nismo zaznali *B. subtilis* na vzorcu iz celotne plošče (čeprav je tam bil), saj je bilo število tarčnih molekul za PCR prenizko. Podatek, ki ga navaja Wattiau in sod. (2001) je, da je spodnja meja detekcije  $10^{-6}$  (1 kolonija/10<sup>6</sup> kolonij).

Za končno taksonomsko uvrstitev je pogosto potrebno izolate preveriti še z molekularnimi metodami. Zato smo poleg začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen *16S rDNA* uporabili začetne oligonukleotide za *rpoB* gen iz bakterijske skupine *B. subtilis*. Gen *rpoB*, ki kodira ohranjeno  $\beta$  podenoto bakterijske RNA polimeraze, se je izkazal kot primeren tarčni gen za identifikacijo in klasifikacijo bakterij iz rodov *Enterobacteriaceae*, *Spirochaeta*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Staphylococcus*, *Mycobacteriaceae* in *Bacillus*. Variabilnost sekvenc je lahko do 30 %, gen je v genomu v eni kopiji, heterogenosti in pojava heteroduplexov pri namnoževanju ni, njegove mutante pa kodirajo odpornost na rifampin, zaradi česar je tudi fenotipski marker (Mollet in sod., 1997; Dahllöf in sod., 2000).

V okviru te diplomske naloge smo izolate SV, ki smo jih na osnovi klasičnih taksonomskih metod uvrstili v vrsto *B. subtilis* testirali še z molekularnimi metodami. Izvedli smo reakcijo PCR z začetnimi oligonukleotidi za gen *16S rRNA* in gen *rpoB*. Od sedmih izolatov se je pri šestih vsaj v enem od dveh poskusov pomnožil gen za *16S rRNA*. Gen za *rpoB* pa smo uspeli vsaj enkrat pomnožiti pri vseh sedmih izolatih. Teh sedem izolatov smo opredelili kot zelo verjetno pripadnike vrste *B. subtilis*. Za natančnejšo filogenetsko uvrstitev je gene *16S rRNA* in *rpoB* potrebno še sekvencirati (Jerončič, dipl. delo v pripravi).

## 5.1 SKLEPI

Na podlagi podanih rezultatov lahko ugotovimo:

- Iz talnih vzorcev iz štirih področij Slovenije in s Himalajskega pogorja (5600 m) smo uspešno osamili aerobne sporogene heterotrofne bakterije.
- Izolate, ki jih lahko uvrščamo v vrsto *B. subtilis* smo našli le v vzorcu tal nabrežja Save pri Tacnu, medtem ko jih v ostalih vzorcih nismo našli.
- Med vzroki za ta rezultat so lahko: premajhno število odvzetih vzorcev, vpliv same strukture tal, izbira nepravilnega taksonomskega ključa in prerast izolatov vrste *B. subtilis* s strani ostalih sporogenih predstavnikov rodu *Bacillus*.
- Naši rezultati podpirajo hipotezo, da je bakterija vrste *B. subtilis* bolj pogosta v s hranili revnejših peščenih tleh.
- Priporočamo, da se test za citrat ne uporabi kot izključitveni test pri identifikaciji bakterij v vrsto *B. subtilis*, temveč kot eden preveritvenih testov.

## 6 POVZETEK

Rod *Bacillus* je sestavljen iz dokaj različnih paličastih Gram pozitivnih bakterij, ki so aerobne in gibljive s peritrihimi flageli. Člani rodu so sposobni produkcije endospor, ki so zelo odporne na neugodne okoljske dejavnike (Claus in Berkeley, 1986). Rod sestavljajo fenotipsko heterogeni organizmi s širokim razponom prehranskih zahtev, fiziološke in metabolne različnosti in DNK bazne sestave.

Tipska vrsta rodu *Bacillus* je *B. subtilis*, ki zajema aerobne paličaste bakterije, ki tvorijo endospore. Ponavadi jih najdemo v tleh, vodnih virih ali v povezavi z rastlinami (Claus in Berkeley, 1986).

Naše delo je bilo osamiti in identificirati seve *Bacillus subtilis* iz talnih agregatov. Odvzeli smo vzorce na štirih različnih področjih Slovenije, analizirali pa smo tudi vzorce tal s Himalajskega pogorja.

Osamitve in identifikacije sevov rodu *Bacillus* smo se lotili tako, da smo izolate najprej osamili z uničenjem vegetativnih celic z inkubacijo vzorcev na 80 °C približno 10 minut. Spore so vskalile in zrastle v kolonije, aerobno na ustreznem gojišču. S tem postopkom smo dobili le aerobne sporogene bacile, med katerimi smo potem izolate za nadaljnjo taksonomsko analizo izbirali glede na obliko kolonij, ki naj bi bila značilna za seve sorodne *B. subtilis* (kolonije so bele do krem barve za nepravilnim robom in hrapavo površino; premer take kolonije je od 2-3 mm).

Pri izbiri zanesljivih in selektivnih biokemijskih testov, pa smo naleteli na nekaj omejitev. Tradicionalne metode za identifikacijo rodu *Bacillus* so učinkovite, če se jih pravilno izvede, vendar so dolgotrajne, tudi ponovljivost nekaterih testov je pogosto slaba (Berkeley in sod., 1984). Pri izbiri pravega taksonomskega ključa smo se najprej naslonili na Bergeyev priročnik za določevalno bakteriologijo (Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology Genus *Bacillus*, 1994, stran 1122; Preglednica 13.4

Preizkusili smo še ključ, ki sta ga navedla Logan in Berkeley (1984), posodobila pa Roberts in Cohan (1991). Kasneje smo iz taksonomskega ključa izločili test za citrat, saj smo dobili precej variabilne rezultate tudi pri referenčnih sevih, pri večini izolatov pa v glavnem negativne. Kot navaja tudi Norris in sod. (1981) je ta test pokazal neujemanja tudi v rokah drugih raziskovalnih skupin. Kot najbolj zanesljiv in uporaben taksonomski ključ, po katerem smo tudi dobili pozitivne rezultate, se je izkazal ključ, ki ga je predlagal Norris s sod. (1981) po katerem mora biti sev pozitiven na naslednje štiri biokemijske teste: katalaza, Voges-Proskauer, rast anaerobno in škrob, da ga lahko uvrščamo v vrsto *B. subtilis*. Sedem sevov, ki so bili na te biokemijske teste pozitivni smo potem preverili še z molekularnimi metodami.

Najprej smo pomnoževali 810 oziroma 830 bp dolg fragment z začetnimi oligonukleotidi za *16S rRNK* za *Bacillus subtilis* (BS1, BS2, BS3). Šest od sedmih izolatov je bilo pri PCR reakciji na začetna oligonukleotida za *16S rRNK* pozitivnih.

Identifikacija in klasifikacija sevov vrste *Bacillus subtilis* in njej sorodnih vrst je precej zahtevna, saj jih med seboj ne moremo ločiti na osnovi klasičnih fenotipskih testov. Poleg tega so sekvence njihovih genov za *16S rRNK* skoraj identične (99,1- 99,6 %) (Nakamura in

sod., 1999; Chun in Bae, 2000). Težave, ki so lastne *16S rRNA* lahko rešimo z uporabo takšnih markerjev za diferenciacijo vrst, ki so v genomu v eni kopiji, ohranjeni, ubikvitarni in delujejo kot evolucijska ura. Tem zahtevam ustrezajo gospodinjski geni; v našem primeru smo izbrali gen za *rpoB*. So nujni za obstoj celice in zato vedno prisotni. So bolj variabilni od gena za *16S rRNA* še vedno pa ohranjeni (Dahllöf in sod., 2000; Chun in Bae, 2000).

Zaradi zgoraj omenjenih razlogov smo dobljenih sedem sevov preverili še z začetnimi oligonukleotidi *rpoBF* in *rpoBRO*. Vsi sevi so bili pri reakciji z začetnimi oligonukleotidi pozitivni.

Za dokončno potrditev ali izolirani sevi v resnici sodijo v vrsto *Bacillus subtilis* je najverjetneje smiselno sekvenciranje dobljenih pomnoženih pomnožkov gena za *rpoB* in gena za *16S rRNA*. To je izvedla Jerončič (2004; diplomsko delo; v pripravi) in dobila pozitivne rezultate za pet od sedmih sevov.

## 7 VIRI

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

Alexander M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley and sons, Inc.: 467 str.

Ash. C., Farrow J. A. E., Wallbanks S., Collins M. D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* as revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters of Applied Microbiology*, 13: 202-206

Ash C., Priest F. G., Collins D. 1993. Molecular identification of rRNA group of 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64: 253-260

Avise J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York, Chapman and Hall, N.Y. : 104 str.

Berkeley R.C.W., Logan N.A., Shute L.A., Capey A.G. 1984. Identification of *Bacillus* species. *Methods in Microbiology*, 16: 291-327

Bull A. T., Goodfellow M., Slater J. H. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*, 46: 219-252

Busse J., Auling G. 1988. Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 11: 1-8

Chun J., Sook Bae K. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 123-127

Claus D., Berkeley R. C. W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. V: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Vol. 2. 8<sup>th</sup> ed. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. (eds.). Baltimore, Wilkins and Wilkins Co. 13, 2 :1105-1139

Cohan F. M. 1994. Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 175-180

Cohan F. M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*, 56: 457-487

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

Cohn F. 1875. Untersuchungen ueber Bakterien. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, 1: 127-224, navedel Skerman V. B. D., McGowan V. and Sneath P. H. A. 1980. Approved list of bacterial names. *International Journal Systematic Bacteriology*, 30: 225-420

D' Amato E. E., Taylor R. H., Blannon J. C., Reasoner D. J. 1991. Substrate profile systems for identification of bacteria and yeasts by rapid and automated approaches. V: Manual of clinical microbiology. Balows A., Hausler W. J. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. Shadomy H. J. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 128-136

Dahllöf 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

De Lay J. De Smedt J. 1975. Improvements of the membrane filter method for DNA-rRNA hybridization. Antoine van Leeuwenhoek, 41: 287-307

Embley T. M. Stackebrandt E. 1997. Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. V: Species: The units of biodiversity. Claridge M. F. Dawah H. A., Wilson M. R. (eds.). London, Chapman and Hall: 61-81

Fox G. E., Wisotzkey J. D. Jurtshuk Jr. P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 166-170

Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. G. 2003. Taxonomic outline of the prokaryotes. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed., New York, Springer-Verlag: 397 str.

Genus *Bacillus*. 1994. V: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins: 559-559

Goodfellow M. O' Donnell A. G. 1993. Roots of bacterial systematics. V: Handbook of new bacterial systematics. Goodfellow M., O' Donnell A. G. (eds.). London, Academic Press Ltd.: 3-54

Goodfellow M., Manfio G. P., Chun J. 1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. V: Species: the units of biodiversity. Claridge M. F., Dawah H. A., (eds.). London, Chapman and Hall: 25-59

Gordon R. E. 1973. The genus *Bacillus*. Washington, U. S. Department of Agriculture, Agricultural handbook, 427: 283 str.

Gordon R. E. 1977. Some taxonomic observations on the genus *Bacillus*. V: Biological regulations of vectors: The saprophytic and aerobic bacteria and fungi. Briggs JB (ed). Washington, DC, US Department of Health, Education and Welfare (Publication NIH 77-1180): 67-82

Goto K., Omura T., Hara Y. Sadaie Y. 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. Journal of General and Applied Microbiology, 46: 1-8

Gribaldo S., Lumia V., Creti R., Conway de Macario E., Sangelatoni A., Cammarano P. 1999, Discontinuous occurrence of the *hsp70 dnaK* gene among *Archaea* and sequence features of

HSP70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein. *Journal of Bacteriology*, 181: 434-443

Grimont P. 1988. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 541-546

Gupta R. S. 1998. What are archeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Molecular Microbiology*, 29: 695-707

Henriksen S. D. 1978. Serotyping of bacteria. *Methods in Microbiology*, 12: 1-13

Ivanova E.P., Vysotskii M.V., Svetashev V.I., Nedashovskaya O.I., Gorskova N.M., Mikhailov V.V., Yumoto N., Shigeri Y., Taguchi T., Yoshikawa S. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International Microbiology*, 2: 267-271

Jerončič B. 2004. Ugotavljanje filogenije šestih naravnih izolatov *Bacillus* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: v pripravi

Joung K. B., Cote J. C. 2002. Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 92: 97-108

Kaempfer P., 1998. Some chemotaxonomic and physiological properties of the genus *Sphaerotilus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 245-250

Kaempfer P., Kroppenstedt R. M. and Dott W., 1991. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *Journal of General and Applied Microbiology*, 137: 1831- 1891

Klingler J. M., Stowe R. P., Obenhuber D. C., Groves T. O., Mishra S. K., Pierson D. L. 1992. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2089-2092

Krieg N. R. 1988. Bacterial classification: an overview. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 536-540

Liu W.-T, Mirzabekov A. D., Stahl D.A. 2001. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non –equilibrium dissociation approach. *Environmental Microbiology*, 3: 619-629

Lee K. Y., Wahl R., Barbu E. 1956. Contenu en bases purique et pyrimidiques des acides deoxyribonucleiques des bacteries. *Annales l'Institute Pasteur*, 91: 212-224

Logan N. A., Berkeley R. C. W. 1981. Classification and identification of the genus *Bacillus* using API testts. V: The aerobic endospore forming bacteria: Clasification and identification. Berkeley R. C.W., Goodfellow M.(eds.). London, Academic Press Inc.:106 -140

Logan N. A., 1994. Bacterial systematics. London, Blackwell Scientific Publications: 263 str.

Ludwig W. Schleifer K. H. 1994. Bacterial pylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiological Reviews, 15: 155-173

Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumeier J., Bachleitner M., Schleifer K. H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis, 19; 554-568

Ludwig W. Schleifer K. H. 1999. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. ASM News, 65: 752-757

Ludwig W. 1999. The role of rRNA as a phylogenetic marker in the context of genomics. USFCC Newsletter, 29: 2-6.

Maidak B. L., Olsen G. J., Larsen N., Overbeek R., McCaughey M. J., and Woese C. R. 1997. The RDP (Ribosomal database project). Nucleic Acids Research., 25: 109-110

Magge J., 1993. Whole organism fingerprinting.V: Handbook of new bacterial systematics. Goodfellow. M., O' D onnell A. G. (eds.). London, Academic Press Ltd.:383-419

Martinez-Murciaa A. J., Benlloch S., Collins M. D. 1992. Phylogenetic interrelationship of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 412-421

Mollet C., Drancourt M., Raoult D. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Molecular Microbiology, 26, 5:1005-1011

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

Niimura Y., Koh E., Yanagida F., Suzuki K. I., Komagata K., Kozaki M. 1990. *Amphibibacillus xylanus* gen. Nov., sp. Nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan digesting bacterium whic lacks cytochrome, quinone and catalase. International Journal of Systematic Bacteriology, 40: 297-301

Norris J. R., Berkeley R. C. W., Logan N. A., O'Donnell A. G. 1981. The genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. V: The Prokaryotes: Vol. 2. Starr M. P. Stolp H., Truper H. G. Balows A., Schlegel H. G. (eds.). Berlin, Springer-Verlag:1711-1742

O'Donnell A. G., Norris J. R., Berkeley R. C. W., Claus D., Kaneko T., Logan N. A. 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography and by deoxyribonucleic acid DNA-DNA hybridization, biochemical tests and API systems. International Journal of Systematic Bacteriology, 30: 448-459

Palys T., Berger E., Mitrica I., Nakamura L. K., Cohan F. M., 2000. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1021-1028

Priest F.G. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus* V: *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. Sonnenschein J. A., Hoch Losick R. (eds.). Washington, D. C., American Society for Microbiology, 11: 368-373

Priest F. G., Grigorova R. 1990. Methods for studying the ecology for endospore forming bacteria. *Methods in Microbiology*, 22: 565-591

Priest F. G., Goodfellow M., Todd C., 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 134: 1847-1882

Priest F. G., Goodfellow M., Todd C., 1981. The genus *Bacillus*: A numerical analysis. V: The aerobic endospore forming bacteria: classification and identification. Berkeley R. C.W., Goodfellow M. (eds.). London, Academic Press, Inc.: 91-103

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

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

Roberts M. S., Nakamura L. N., Cohan F. M. 1996. *Bacillus vallismortis* sp.nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 2: 470-475

Rossello R., Garcia-Valdes E., Macario A. J. L., Lalucat J. Conway de Macario E. 1992. Antigenic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars. *Journal of General and Applied Microbiology*, 15: 617-623

Rossello-Mora R. A., Lalucat J., Dott W., Kaempfer P. 1994. Biochemical and chemotaxonomic characterization of *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic and Applied Bacteriology*, 76: 226-233

Rossello-Mora R., Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 39-67

Roessler D., Ludwig W., Schleifer K., H., Lin C., McGill T. J., Wisotzkey J. D., Jurtshuk P., Jr Fox G. E. 1991. Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies. *Systematic and Applied Microbiology*, 14: 266-269

Rupnik M., Zec-Pirnat I., 2000. Taksonomija in identifikacija; navodila za vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 63 str.

Sabotič J. 2002. Variabilnost sistema za zaznavanje gostote pri *Bacillus* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 94 str.

Schleifer K.-H. Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacteria cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36: 143-187

Smibert R. M. Krieg N. R. 1994. Phenotypic characterization. V: *Methods for general and molecular bacteriology*. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (eds.). Washington, D. C., American Society for Microbiology: 607-654

Sneath, P. H. A. 1977. The maintenance of large numbers of strains of microorganisms and the implication for culture collections. *FEMS Microbiological Letters*, 1: 333-334.

Sneath P. H. A. 1989. Numerical taxonomy. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*: Vol. 4. Williams S. T., Sharpe M.E., Holt J. G. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins: 2303-2305

Sneath, P. H. A. 1989. Analysis and interpretation of sequence data for bacterial systematics: the view of a numerical taxonomist. *Systematic and Applied Microbiology*, 12: 15-31

Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W. H. Freeman and Company, 147-157

Stackebrandt E., Goebel B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic and Applied Bacteriology*, 44: 846-849.

Stackebrandt E., Ludwig W., Fox G. E. 1985. 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloging. *Methods in Microbiology*, 18: 75-107

Staley J. T., Krieg N.R. 1989. Classification of procariotic organisms: an overview. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol: 4. Williams S. F., Sharpe M. E. Holt J. G. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins; 2299-2302

Suzuki K., Goodfellow M., O' Donnell A. G. 1993. Cell envelopes and classification. V: *Handbook of new bacterial systematics*. Goodfellow M., O' Donnell A. G. (eds.). London, Academic Press Ltd.: 195-250

Štebe T. 2003. Primerjava ferotipov in filotipov naravnih izolatov *Bacillus subtilis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 50 str.

Tanner M.A., Coleman W.J., Everett C.L., Robles S.J., Dilworth M.R., Yang M.M., Youvan D.C. 2000 Multispectral bacterial identification. *Biotechnology et alia*, 6: 1-9

Trueper H. G., Schleifer K.-H., 1992. Prokaryote characterization and identification. V: *The prokaryotes*. 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 1. Balows A., Trueper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.). Berlin, Springer- Verlag: 126-148.

Ueda K., Seki T., Kudo T., Yoshida T., Kataoka M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *Journal of Bacteriology*, 181, 1: 78-82

Vandamme P., Segres P., Ryll M., Homme J., Vancanneyt M., Coopman R., De Baere R., Van de Peer Y., Kersters K., De Wachter R., Hinz K. H. 1998. *Pelistega europaea* gen. Nov., sp. Nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons taxonomic structure and phylogenetic allocation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 431-440

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60: 407-438

Wattiau P., Renard M.-E., Ledent P., Debois V., Blackman G., Agathos S. N. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiological Biotechnology*, 56: 816-819

Wayne L. G., Brenner D. J., Collwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P., Truper H. G. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 463-464

Wisotzkey J. D., Jurtshuk P., Jr, Fox. G.E., Deinhard G., and Poralla K. 1992. Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus *Alycyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 263-269

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

Woese C. R. 1992. Prokaryote systematics: the evolution of a science. V: The prokaryotes: Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Balows A., Trueper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H., (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 3-18