Razvoj eksperimentalnog sustava za proučavanje utjecaja oblića Caenorhabditis elegans na miješanu populaciju bakterija Escherichia coli i Bacillus subtilis

Dubravčić, Darja

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:896242

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Darja Dubravčić

Razvoj eksperimentalnog sustava za proučavanje utjecaja oblića *Caenorhabditis elegans* na miješanu populaciju bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za evolucijsku i medicinsku genetiku, INSERM U571, Medicinski Fakultet – Necker u Parizu, pod stručnim vodstvom dr. sc. Ivana Matića (Paris Descartes, Medicinski fakultet Paris Descartes) i suvoditeljstvom doc.dr.sc. Krunoslava Brčića-Kostića (Institut Ruđer Bošković, Zagreb) predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvaljujem se dr.sc. Ivanu Matiću i mr.sc. Xavieru Manieru na ukazanom povjerenju i savjetima koje su mi pružili tijekom izrade ovog rada.

Svim članovima Laboratorija za evolucijsku i medicinsku genetiku, INSERM U571 zahvaljujem se na pomoći, savjetima, strpljenju i čavrljanju.

Zahvaljujem Dei Slade, Tamari Milošević, Ivanu Krešimiru Svetcu i Anamariji Štafi na velikoj stručnoj i osobnoj podršci i savjetima tokom izrade ovog rada.

Cecile Pagan i Francescu Collona Romano bih se zahvalila na ukazano prijateljstvu i gostoprimstvu bez koje ne bih ovaj rad mogla izvesti u Parizu.

Ponajviše bi se zahvalila svojoj obitelji i Mathieu na beskrajnoj ljubavi, strpljenju, potpori, savjetima i optimizmu koje su mi pružili tokom studija, a posebno tokom izrade ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Razvoj eksperimentalnog sustava za proučavanje utjecaja oblića *Caenorhabditis elegans* na miješanu populaciju bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*

Darja Dubravčić

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu,
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Kompeticija i predacija među najvažnijim su silama u oblikovanju organizama i ekosistema. Oba proces snažno utječu na bioraznolikost, diferencijaciju niše i stjecanje novih adaptacija. U većini slučajeva njihov utjecaj na organizme proučavan je odvojeno. U kojoj mjeri i pod kojim uvijetima pojedini proces ima prevladavajuću ulogu često je nepoznato ili nedovoljno razjašnjeno. Tijekom ovog istraživanja razvila sam eksperimentalni sustav za laboratorijsko proučavanje zajedničkog djelovanja kompeticije i predacije na dobro poznatim modelnim organizmima; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Caenorhabditis elegans*. Optimalni uvjeti za praćenje interakcija pokazali su se oni s bakterijskim sojevima *B. subtilis* ATCC 21332 (*sfp+)* i JH642 (*sfp*-) i *E. coli* MG1665 na krutoj NGM podlozi, pri temperaturi od 28°C, te β-galaktozidaza test za praćenje bakterijske dinamike. Ishod kompeticije ovisio je o početnom omjeru *E.coli : B. subtilis,* pri čemu je u 1:1 omjeru *E. coli* pokazao inhibitorni učinaka na ATCC 1332 soj, dok su omjeri 1:13, 1:40 i 1:180 pokazali inhibicijsko djelovanje ATCC 21332 na MG1665. Neovisno o omjeru u kojem su se nalazili JH642 i MG1665 nisu pokazali kompetitivan odnos. Predacijska stopa od jednog *C. elegans* pokazala se preniskom da bi djelovala na dinamiku sustava i na broj bakterija u sustavu.

(75 stranice, 31 slika, 6 tablica, 88 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: predacija, kompeticija, surfaktin, *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Caenorhabditis elegans*

Voditelj: Dr.sc. Ivan Matić

Suvoditelj: Dr.sc. Krunoslav Brčić-Kostić, doc.

Ocjenitelji:
1. Dr. sc. Krunoslav Brčić - Kostić, doc
2. Dr. sc. Dubravka Hranilović, doc
3. Dr. sc. Željka Vidaković - Cifrek , doc

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

GraduationThesis

Development of experimental system for studying effect of nematode *Caenorhabtiditis elegans* on mixed population of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Darja Dubravčić

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Competition and predation are among the most important types of interactions between species and are strong forces that shape ecological communities. Both processes have a major impact on biodiversity, niche differentiation and promote new adaptations. In most cases their impact has been studied separately. To what extent and under which conditions one of these interactions has greater impact on the system is often unknown or not clear enough. During this study I have developed an experimental system for studies of interactions between predation and competition on well known model organisms; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Caenorhabditis elegans.* I have found that the optimal conditions for measurements were achieved by using *B. subtilis* ATCC 21332 (*sfp+)* and JH642 (*sfp*-) and *E.coli* MG1665 bacterial strains on NGM agar plates and 28°C temperature. Outcome of the competition depended on the initial ratio of *E. coli : B. subtilis* as 1:1 ratio showed inhibitory effects of *E. coli* MG1665 on *B. subtilis* ATCC 21332, while initial rations of 1:13, 1:40 and 1:180 showed inhibitory effect of *B. subtilis* ATCC 21332 on *E. coli* MG1665. *B. subtilis* JH642 and *E. coli* MG1665, independent of initial ratios, did not exibit competitive interactions. Predation rate of one *C. elegans* has proven to be too low and did not influence the population dynamics and the number of bacteria in the system.

(75 pages, 31 figures, 6 tables, 88 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: predation, competition, surfactin, *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Caenorhabditis elegans* ,

Supervisor: Dr. sc. Ivan Matić, Prof.Assis

Co-supervisor: Dr.sc.Krunoslav Brčić-Kostić, Prof.Assis

Reviewers:
1. Dr. sc. Krunoslav Brčić - Kostić, Prof.Assis
2. Dr. sc. Dubravka Hranilović, Prof.Assis
3. Dr. sc. Željka Vidaković - Cifrek , Prof.Assis

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod 1

1.2. Biološke interakcije 1

1.2. Kompeticija 3

1.2.1. Vrste kompeticije 3

1.2.2. Posljedice kompeticije 4

1.3. Predacija 7

1.3.1. Tipovi predatora 7

1.3.2. Posljedice predacije 9

1.4. Matematički modeli kompeticije i predacije 12

1.5. Interakcija kompeticije i predacije 15

1.6. Bakterije i biološke interakcije 18

1.6.1. Kompeticija među bakterijama 19

1.6.2. Predacija nad bakterijama 20

1.6.3. Interakcija kompeticije i predacije na bakterijskim sustavima 22

1.7. *Bacillus subtilis* 24

1.8. *Escherichia coli* 27

1.9. *Caenorhabditis elegans* 28

1.10. Cilj istraživanja 31

1.10.1. Generalni cilj 31

1.10.2. Specifični cilj 31

2. Materijali i metode 33

2.1. Materijali 33

2.1.1. Bakterijski sojevi....33
2.1.2. *Caenorhabditis elegans*....33
2.1.3. Hranidbene podloge....34
2.1.4. Osnovne kemikalije....35
2.2. Metode....36
2.2.1. Inhibitorni učinak *Bacillus subtillis* na *Escherichia coli*....36
2.2.2. Produkcija surfaktina....37
2.2.3. Mjerenje krivulje rasta....38
2.2.4. Korelacija stanične gustoće bakterijske kulture i broja bakterija u tekućem LB-u....38
2.2.6. Eksperiment kompeticije....39
2.2.7. Eksperimant s kompeticijom i predacijom....40
2.2.8. Mjerenje kompetitivnog reproduktivnog uspjeha....41
3. Rezultati....43
3.1. Inhibitorni učinak *B.subtilis* na *E.coli*....43
3.2. Proizvodnja surfaktina....45
3.3. Krivulja rasta....46
3.4. Ovisnost staniče gustoće bakterijske kulture i broja bakterija u tekućem LB-u....47
3.5. Selektivne podloge....47
3.6. Eksperiment kompeticije....49
3.7. Utjecaj kompeticije na redukciju rasta na MacConkey podlozi....53
3.8. Eksperiment s kompeticijom i predacijom....54
4. Rasprava....55
4.1. Inhibicija rasta i proizvodnja surfaktina....55
4.2. Krivulja rasta....57
4.3. Selecijske podloge....58
4.4. Eksperiment kompeticije....59

4.5. Utjecaj kompeticije na redukciju rasta na MacConkey podlozi 61

4.6. Eksperiment s kompeticijom i predacijom 63

5. Zaključak 65

6. Prijedlozi za daljnja istraživanja 67

7. Literatura 68

1. Uvod

1.2. Biološke interakcije

Ekološki sustav definiran je kao skup biotičkih i abiotički čimbenika na određenom prostoru (Begon 2006). Interakcije među komponentama sustava glavne su sile koje određuju karakteristike i specifičnosti određenog ekosustava. U svakom ekosustavu postoje tri glavne vrste ekoloških interakcija: biotičke - između živih dijelova sustava, abiotičke - između neživih dijelova sustava, i one između živih i neživih dijelova sustava (Lidicker 1979). U okviru ovog diplomskog rada usredotočit ćemo se na biotičke interakcije.

a)  b)  c) 

Slika 1 Primjeri različitih vrsta interakcije: a) vretence jede svoj plijen (http://tiee.ecoed.net/vol/v4/experiments/insect_predation/img/dragonfly%5BHR%5D.jpg), b) mutualizam između mrava i Hemiptera koji proizvode medenu rosu (http://bio1100.nicerweb.net/Locked/media/ch32/3214_mutualism_ants_a.jpg), c) kompeticija između dva mužjaka tuljana (http://www.alaska-in-pictures.com/data/media/1/sea-lions-fighting_6489.jpg)

O organizmima u interakciji govorimo kada svojstva ili radnja jednog organizma dovodi do promjena jednog ili više svojstava drugog organizma (Abrams 1987). S obzirom na posljedice koje interakcija može imati na jedinke, interakcije mogu biti pozitivne (+), negativne (-) i neutralne (0). Interakcije se tako dijele na: neutralizam, amenalizam, komenzalizam, kompeticija, mutualizam te predacija i parazitizam (Tablica 1, Slika 1). Rezultat interakcija može se vrednovati na osnovu različitih parametara, što ovisi o pitanjima koja postavljamo i uzorku s kojim radimo. Ako interakcije promatramo na razini pojedinca mjerila koje uzimamo u obzir su (1) reproduktivni uspjeh, (2) preživljenje, (3) zdravlje i (4) promjene u masi. Na razini populacije prati se (1) reproduktivni uspjeh, (2) veličina populacije (broj jedinki, gustoća ili biomasa) (3)

stopa rasta, (4) prostorna distribucija, (5) prosječno zdravstveno stanje populacije (Lidicker 1979, Abrams 1987).

Tablica 1 Klasifikacija interakcija među organizmima prema utjecaju jednog organizma na drugi. ˝0˝ bez utjecaja, ˝+˝ pozitivan utjecaj i ˝-˝ negativan utjecaj .

Utjecaj na organizam A	Utjecaj na organizam B	Vrsta interakcije
0	0	Neutralizam
-	0	Amenzalizam
+	0	Komenzalizam
-	-	Kompeticija
+	+	Mutualizam
+	-	Antagonizam (predacija i parazitizam)

Svaka od navedenih vrsta interakcija može se proučavati na više razina. Interakcije se mogu promatrati među jedinkama iste vrste (intraspecijske interakcije) ili među jednkama različitih vrsta (interspecijske interakcije). Uslijed visokog stupnja povezanosti među jedinkama u ekološkim sustavima, osim izravnim interakcijama (npr. borba za teritorij) organizmi mogu utjecati jedni na druge i neizravno (slučaju korištenja zajedničkih resurs ili dijeljenja zajedničkog predatora (Begon 2006)). Poznavanje ovih interakcija osnove su ekologije kao znanosti i preduvjet za razumijevanje i predviđanje ekoloških fenomena. Tijekom svog diplomskog rada usredotočila sam se na interakcije kompeticije i predacije te ću, u daljnjem tekstu govorit o ovim interakcijama.

1.2. Kompeticija

Kompeticiju definiramo kao recipročan negativan utjecaj jednog organizma na drugi, pri čemu se negativan utjecaj najčešće odražava i prati na razini-broja jedinki, stope raste ili reproduktivnog uspjeha. Kompeticija je posljedica ograničene količine barem jednog resurs (hrana, voda, teritorij) potrebnog za opstanak vrste (Abrams 1987, Begon 2006) te je definirana biotičkim i abiotičkim čimbenicima ekosustava. Kako u prirodi rijetko nalazimo idealne uvijete za život, kompeticija je jedna od glavnih proces koji definiraju strukturu živih ekosustava (Chase i sur. i sur. 2002). Tijekom svog života svaka jedinka je na izravan ili neizravan način u neprestanoj kompeticiji s jedinkama iste vrste (intraspecijska kompeticija) i jedinkama različitih vrsta (interspecijska kompeticija). Na primjer, borba za ženku ili teritorij izravna je intraspecijska kompeticija dok je dijeljenje zajedničkog izvora hrane primjer neizravne intra- i interspecijske kompeticije (Slika 2).

1.2.1. Vrste kompeticije

S obzirom na mehanizam djelovanja kompeticiju možemo podijeliti na više različitih vrsta. Navedene vrste kompeticije općenito se mogu svrstati u izravne i neizravne odnose među vrstama i jednako vrijede za intraspecijske i interspecijske odnose.

Interferencija: kada postoji izravni kontakt ili sukob između jedinki u borbi za hranu, teritorij, razmnožavanje i dr. (Slika 2 a.). Ovakva vrsta kompeticije javlja se kada je traženje novog resurs energetski skupa opcija, kada je trenutačni resurs jako profitabilan, te kada trošak ulaganja u interferenciju nije previsok, dok je korist od interferencije značajan (Case i Giplin 1974). Interferencija se često navodi kao jedan od bitnih čimbenika u uspostavljanju ekoloških niša jedinki (Case i Giplin 1974).

Eksploatacija: kada jedinke indirektno utječu jedna na drugu preko zajedničkog intermedijernog resurs, kao što je dijeljenje hrane, svjetlosti i prirodnog skloništa. Korištenje resurs od strane jednog organizma umanjuje dostupnost tog resurs za drugi organizama (Chase i sur. i sur. 2002) (Slika 2 b.).

Kompeticija preko zajedničkog predatora javlja se kada dva organizma dijele zajedničkog predatora ili parazita. Organizmi ne uspostavljaju izravnu interakciju, već neizravno

preko predatora ili parazita utječu na populaciju vrsta (Holt i Lawton 1994). Jedan od tipičnih primjera je slučaj kada povećanje broja jednog organizma ima za posljedicu povećanje broja predatora, što zatim može utjecati na smanjenje broja drugog organizma.

a) 

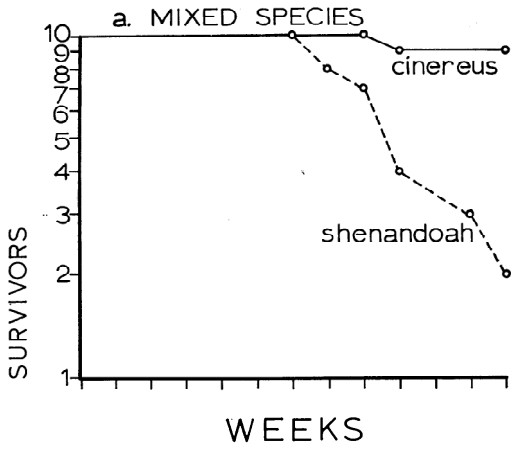
b) 

Slika 2 Prikaz vrsta kompeticije a) interferencija: borba između dva mužjaka vodenkonja (http://i.dailymail.co.uk/i/pix/2008/11/22/article-1088537-028C59BB000005DC-556_468x422.jpg), b) eksploatacija: u gustim šumama drveće je u kompeticiji za svjetlo (http://environment.nationalgeographic.com/staticfiles/NGS/Shared/StaticFiles/Environment/Images/Habitat/rainforestcanopy-102098-ga.jpg

1.2.2. Posljedice kompeticije

(1) Kompetitivna ekskluzija

Princip kompetitivne ekskluzije, također poznat i kao Gausov zakon, nalaže da dvije vrste koje su u kompeticiji za isti resurs ne mogu koegzistirati u slučaju da su ostali ekološki faktori konstantni. Kompetitor koji pokazuje veću sposobnost iskorištavanja zajedničkog resurs će uvijek prevladati, što će dovesti do ekstinkcije slabijeg kompetitora (Hardin 1960). Jaeger i sur. (1971) su pokazali kompetitivnu ekskluziju između 2 populacije slamandera (Slika 3). Ipak, u prirodi gdje evolucija igra veliku ulogu i gdje nalazimo prostornu heterogenost, varijabilnost okoliša, kompeticiju za više od jednog resurs i mogućnost migracija, često ne dolazi do ekskluzije, te slabiji kompetitor ima mogućnost prilagodbe ili prebacivanja na drugu ekološku nišu (Case i Giplin 1974).



Slika 3 Kompetitvna ekskluzija između populacija daždevnjaka P.cinereus i P.r.shenandoah (Jaeger 1971)

(2) Diferencijacija niše i povećanje biološke raznolikosti

Kompeticija je jedan od glavnih čimbenika koji dovode do ekološke segregacije. Naime, izravna kompeticija putem interferencije postavlja veliki pritisak na slabije jedinke za promjenom niše migracijom ili prijelazom na nove resurse. Treba napomenuti da i ostale vrste kompeticije mogu za svoju posljedicu imati diferencijaciju niše (Case i Giplin 1974). Rezultat diferencijacije niše putem kompeticije često dovodi do koegzistencije dviju kompetitivnih vrsta i povećanje raznolikosti u okolišu. Mnoga istraživanja pokazuju da bogatstvo resurs u okolišu utječe na biološku raznolikosti, pri čemu u okolišu bogatom resursima, kompeticija češće rezultira prijelazom jednog organizma na iskorištavanje novog resurs, dok u siromašnim okolišima kompetitivna ekskluzija je češći ishod (Hall i Colegrace 2007, Abrams 1995).

(3) Nove adaptacije

Kompeticija djeluje kao jak selekcijski pritisak koji vrlo često dovodi do propagacije i isplativosti ulaganja u nove adaptacije, koje ne nalazimo u istih jedinki koje nisu u kompeticiji. Rezultat može biti koegzistencija vrsta ili prilagodba na novu nišu. Teorija crvene kraljice (Red Queen`s Effect) jedna je od osnovnih bioloških teorija koja se temelje na kompeticiji među organizmima. Ova teorija počiva na činjenici da se u evoluirajućem sustavu jedinke moraju neprestano razvijati kako bi išle u „korak“ s okolnim sustavima. U slučaju kompeticije ova teorija se manifestira kroz primjere utrke u naoružanju (arms race). Ova teorija pretpostavlja da u konstantno evoluirajućem sustavu jedinka koja prva stekne prednost u iskorištavanju resurs će imati bolje preživljenje i bolji reproduktivni uspjeh. Ostale jedinke zatim moraju steći bolje

„oružje“ kako bi ostale kompetitivne, što rezultira ponovnom pozitivnom indukcijom za prvotnu vrstu (Dawkins i Krebs 1979).

Uslijed velike složenosti i povezanosti različitih čimbenika u ekološkim sustavima teško je predvidjeti ishod kompeticije. Premda navedeni primjeri govore o važnosti kompeticije još uvijek postoje mnoge nepoznanice o biološkim uvjetima pod kojima kompeticija ima jači ili slabiji utjecaj na karakteristike vrste, gustoću populacije i strukturu zajednice (Chase i sur. i sur. 2002).

1.3. Predacija

Predacija je definirana kao +/- interakcija među organizmima. Predacijom jedan organizam ostvaruje dobit na s izravnim negativnim učinkom na drugi organizama (smanjenje preživljenja i/ili reproduktivnog uspjeha) (Abrams 1987). Jednostavnije rečeno predacije je interakcija u kojoj jedan organizam (predator) konzumira drugi organizam (plijen) (Begon 2006).

1.3.1. Tipovi predatora

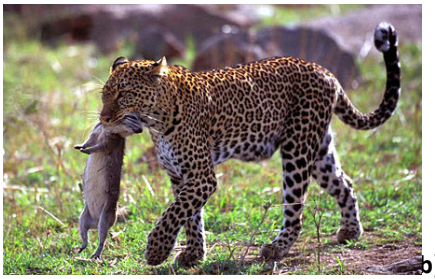
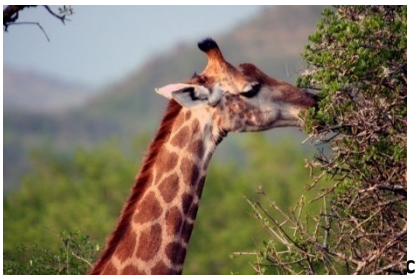
U literaturi nalazimo više načina klasifikacije predatora, ovisno o interakciji s plijenom, specijalizaciji i tipu prehrane. Prema specijalizaciji predatore dijelimo na generaliste, koji koriste više vrsta plijena u svojoj prehrani, i specijaliste, koji se hrane smo uskim spektrom plijena (često i smo jednom vrstom). Prema tipu prehrane predatore možemo ugrubo podijeliti u karnivore, koji se hrane životinjskim organizmima, herbivore, koji se hrane biljnim organizmima i omnivore koji se mogu hraniti i životinjskim i biljnim organizmima. Obzirom na vrstu interakcije koju predator ostvaruje s plijenom predatore dijelimo na prave predatore, brstioce i strugače, parazite i parazitoide.

Pravi predatori ubiju plijen odmah ili vrlo brzo nakon interakcije, nakon čega slijedi konzumacija plijen u svrhu ishrane. Predatori mogu aktivno loviti svoj plijen (Slika 4 a.) ili čekaju iz zaklona (ličinka vretenaca). Predatori mogu ubiti plijen i probaviti ga direktnim žvakanjem, dok drugi gutaju plijen i probavljaju ga cijeloga tokom dužeg vremenskog perioda (zmije). Pauci ubacuju otrov u plijen koji ubija plijen i pomaže u njegovoj razgradnji. Predacija nad sjemenkama kod mrava i glodavaca i konzumiranje planktona u kitova također su oblici pravog predatorstva (Begon 2006).

Brstioci i strugači obično za hranu koriste smo dio svog plijena pri čemu u većini slučajeva ne dolazi do smrti plijena već mu je smo nanesena šteta. Smrt može nastupiti, ali kao posljedica nanesene štete, a ne kao direktna namjera predatora. Najbolji primjer brstioca su herbivorrni organizmi kao što su koza, srna, ali i komarci koji sišu krv spadaju u ovu kategoriju (Slika 4 b.). Naziv strugači koristi su za fungivorne i bakteriovorne organizme u tlu i vodi (Begon 2006).

U slučaju **parazita** (plijen zovemo domaćin) konzumira se smo dio domaćina i obično je posljedica interakcije nanesena šteta, što neposredno za posljedicu može imati smrt organizma. Tijekom života paraziti najčešće stupaju u interakciju s malim brojem organizama, pri čemu se ostvaruje bliska asocijacija između dva organizma, karakteristike koju ne nalazimo u prethodna dva tipa predacije. Parazitski organizmi sežu od mikroorganizama kao što su bakterije i gljivice koji su uzročnici mnogih bolesti, do složenijih organizama kao što su parazitske biljke, mnoge skupine kukaca ili riba.

Parazitoidi su grupa kukaca, većinom pripadaju redu Hymenoptera, ali također uključuju i mnoge Diptera. Slobodno živući adultni oblici polažu jaja u ili na svog domaćina, gdje se ona razvijaju u larve koje se hrane na domaćinu, što na kraju dovodi do smrti domaćina. Najpoznatiji primjer je pčela iz porodice Ichneumonoidea, koja polaže svoja jaja u druge kukce (posebice gusjenice) (Slika 4 c.). Neki parazitoidi polažu jaja na listove biljaka koje njihovi domaćini koriste u prehrane. Jedenjem listova, jaja dospijevaju u probavilo domaćina gdje se nastanjuju i nastavljaju svoj razvoj (Tachinide, Trogonalidae). Premda ograničeni na svijet kukaca, parazitoidi predstavljaju 10% svih svjetskih vrsta (Begon 2006).

a)  b)  c 

Slika 4 Vrste predatorstva a) pravi predator: leopard s uhvaćenim plijenom (http://www.photographytips.com/images/6leopard-prey-mara.jpg), b) brstioc: žirafa u afričkoj svani (http://jessicaek.typepad.com/photos/uncategorized/2008/12/03/giraffe_grazing.jpghttp://jessicaek.typepad.com/photos/uncategorized/2008/12/03/giraffe_grazing.jpg), c) parazitoidna pčela (*Peristenus digoneutis*) poliježe jaja u kukca (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c4/Parasitic_wasp.jpg /240px-Parasitic_wasp .jpg)

1.3.2. Posljedice predacije

Na prvi pogled se može činiti da, budući da predator uvijek ima negativnu posljedicu na plijen, utjecaj predatora na populaciju plijena mora također biti negativan. Ipak, u mnogo primjera to nije slučaj. Mnogi predatori ciljaju na najslabiji plijen u populaciji (budući da je potrebno manje energije da se taj plijen ulovi). Ove jedinke mogu biti također i one koje najslabije doprinose reproduktivnom uspjehu populacije. Plijen može pokazivati kompenzacijske karakteristike, kao što su promjene u rastu, preživljenju, reprodukciji, također predacija može uzrokovati smanjenu kompeticiju s drugim jednkama (Bogeon 2006). Dakle, premda predator imati negativan utjecaj na individualni plijen, utjecaj na populaciju i druge vrste u ekosustavu može biti raznolik, a često i pozitivan.

(1) **Bioraznolikost**

Predatorstvo može smanjiti ili povećati broj vrsta u sustavu. Povećanje bioraznolikosti većinom je posljedica predacije nad dominantnom vrstom u sustavu. Takvi predatori spadaju u kategoriju ključnih vrsta za sustav, budući da imaju snažan utjecaj na ravnotežu sustava. Unos ili eliminacija ovakvog predatora iz sustava ili promjene u njegovoj gustoći populacije mogu imati jake utjecaje na ravnotežu ostalih populacija u sustavu. Kompleksnost i velik opseg mogućih promjena nalazimo u primjeru Nacionalnog parka Yellowstone. U tom parku 1920-tih dolazi do redukcije broja vukova (*Anus lupu*) koja traje sve do ponovnog unos 1995. Rippel i Beschta (2004) pokazuju kako je nestanak vukova i predacijskog pritiska na populacije jelena i ostalih herbivora imalo direktan utjecaj na smanjenje biljnih vrsta. Također predacija vukova radila je pritisak nad brstiocima u riječnim područjima, što je omogućilo manju kompeticiju za hranu dabrovima. Nestanak vukova imao je stoga neizravan utjecaj na populacije dabrova, budući da je njihov teritorij postao mjesto intenzivnog bršćenja. Povećano bršćenje riječnih biljaka, radi smanjenog predacijskog pritiska nad brstiocima, smanjilo je populacije ovih biljaka što je za posljedicu imalo promjenu vodenog toka, a time i velik utjecaj na mnoge riječne vrste (Slika 5).

(2) **Diferencijacija niše i povećanje biološke raznolikosti**

Navedeni primjer pokazuje ne smo kako predacija može utjecati na broj vrsta, već i na njihovu nišu. Također, vrlo često pod jakim predacijskim pritiskom predatora, mnoge vrste su

prisiljene napustiti svoju nišu (Case i Giplin 1974). U slučaju predatorstva plijen ima dvije opcije: bježati ili se boriti za opstanak. U slučaju borbe nove adaptacije plijena, ali i predatora, česti su evolucijski ishod.



Slika 5 Dolina pored Blacktail Creek u NP Yellowsone u proljeće 1966. (lijevo) i ljeto 2002 (desno). Lijevo: nakon gotovog nestanka vukova zapažamo jako bršćenje bilja i smanjenu vegetaciju. Desno: 7 godina nakon oporavka populacije vukova radi predacijskog pritiska vukova nad brstiocima dolazi do oporavka vegetacije (preuzeto iz Rippel i Beschta 2004)

(3) **Nove adaptacije**

Utrka u naoružanju jedan je od primjera kako nove adaptacije mogu rezultirati koegzistencijom i već smo ga spomenuli kao jednu od posljedica kompeticije. Biološki gledano u slučaju koegzistencije dva organizma čija interakcija ima negativnu posljedicu na barem jedan organizam zahtjeva koevoluciju novih adptacija koje se protive negativnom učinku. U biologiji takav proces nazivamo evolucijska utrka u naoružanju (Dawkins i Krebs 1979). Primjere često nalazimo u odnosima između predatora i plijena, te parazita i domaćina. Jedan od poznatih primjera je adaptacija zmije *Thamnopis sirtalis* na smrtonosni otrov svog plijena vodenjaka roda *Taricha.* Vodenjaci roda *Taricha* u svojoj koži sadrže za zmiju smrtonosan nervni otrov terodoksin. U područjima koegzistencije ovih dviju vrsta zmije su kao odgovor razvile genetsku prilagodbu u ionskim kanalima živčanih stanica što ih čini otpornima na otrov (Brodie i sur. 1997).

Posljedice predacije i kompeticije vrlo su slične. Obje interakcije su jak selekcijski pritisak i imaju jedan od najjačih utjecaja na oblikovanje sustava. U daljnjem tekstu nastojat ću prikazati utjecaj ovih interakcija kada istovremeno djeluju na organizme.

1.4. Matematički modeli kompeticije i predacije

Budući da su matematički modeli predacije i kompeticije jedni od najstarijih u ekologiji i velik broj spoznaja dolazi upravo iz područja teorijske biologije, ukratko ću se osvrnuti na temeljni model koji opisuje ove interakcije.

Lotka-Volterra model najjednostavniji je model koji opisuje dinamiku dviju vrsta u interakciji. Premda prvotno razvijen kao model za opis interakcija između predatora i plijena, male modifikacije napravile su da se danas jednako koristi i u opisu kompeticije organizama za resurse. Model su nezavisno predložili Alfred J. Lotka 1925. i Vito Volterra 1926. Model je nelinearna, diferencijalna jednadžbe koja opisuje promjenu broja jedinki, predatora (y) i plijena (x), u vremenskom razdoblju t, pod utjecajem određenih interakcijskih parametara (α, β, γ i δ), pri čemu dx/dt i dy/dt predstavljaju promjenu broja jedinki u vremenu (Murray 2002).

plijen: $\frac{\mathrm{dx}}{\mathrm{dt}} = \alpha x - \beta xy$

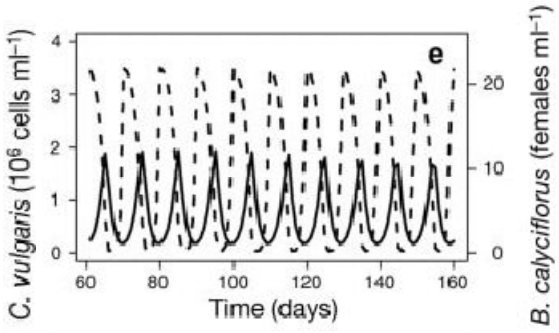
predator: $\frac{dy}{dt} = \delta xy - \gamma y$

Ako analiziramo jednadžbu plijena i predatora zasebno jednadžba plijena pretpostavlja da plijen ima neograničenu količinu hrane i da raste eksponencijalno, što je prikazano αx parametrima. Izraz βyx predstavlja negativan učinak predatora na plijen pri čemu je pretpostavlja da je predacije proporcionalna stopi interakcije predatora i plijena. Gornja jednadžba nam stoga govori da je promjena broja plijena dana stopom rasta plijena umanjenom za stopu predacije nad plijenom. U jednadžba predatora δxy predstavlja stopu rasta, a γy stopu mortaliteta predatora. Budući da je plijen hrana predatora stopa rasta predatora direktno ovisi o broju plijena, x u δxy. Dakle, jednadžba kaže da je promjena broja predatora dana stopom rasta umanjenom za stopu smrtnosti.

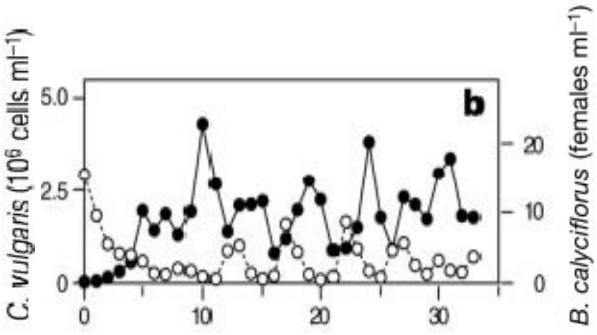
Jednostavno rješenje jednadžbe je harmonijsko gibanje populacijom, pri čemu populacija predatora slijedi plijen za 90°. Ovakvu populacijsku dinamiku Yaushida i sur. (2003)

pokazuju eksperimentalno i teoretski na primjeru predatora rotifere *Brachionus calyciflorus* i plijena zelene alge *Chlorella vulgaris* (Slika 6).

model



b) eksperiment



Slika 6 Oscilacije u populacijama plijena i predatora a) predviđen Lotka Volterra modelom i b) dobivene eksperimentalnim istraživanjem na primjeru predatora rotifere *Brachionus calyciflorus* i plijena zelene alge *Chlorella vulgaris* (preuzeto iz Yushida i sur.2003)

U većini slučajeva Lotka-Volterra model nije realističan. Radi svoje jednostavnosti model pretpostavlja neograničen rast plijena i neograničenu količinu resurs, stopa predacije je neograničena i proporcionalna gustoći plijena, ne uključuje adaptivnu prehranu, i mnoge druge karakteristike koje nalazimo u prirodnim sustavima. Mnoge modifikacije i nadogradnje ovog modela do danas su napravljene i čine ga mnogo realističnijim (Murray 2002).

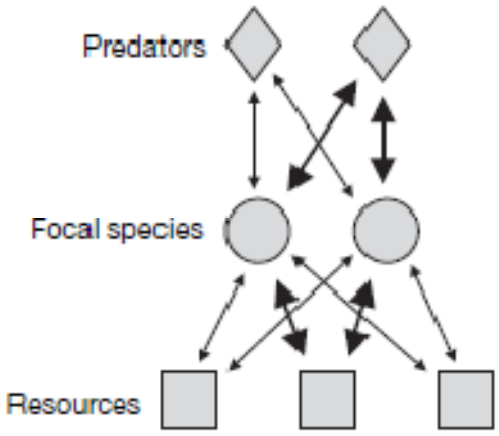
U kompeticiji model zauzima malo drugačiju formu:

$$\frac{dx}{dt} = rx(\frac{K-x}{K})$$

pri čemu je x veličina populacije u vremenu t, r je stopa rasta, a K kapacitet okoliša (resurs). Kao i u slučaju predacije, ovaj model je vrlo jednostavan, pa su za realističnu sliku sustava potrebne brojne modifikacije, kojima se danas bave mnoga teoretska istraživanja (Murray 2002).

1.5. Interakcija kompeticije i predacije

Jedan od glavnih izazova ekologije povezati je pojave s procesima. Ovo je posebno teško u ekologiji zajednice, gdje više proces interreagira u oblikovanju raznolikosti, napučenosti i strukture sustava. Kroz povijest ekolozi su se većinom koncentrirali na smo jedan proces, kao što su kompeticija ili predacija, kako bi objasnili pojave u sustavu. U zadnje vrijeme sve se više prepoznaje važnost proučavanja interakcija između različitih proces i uloga koju svaki od tih proces igra (Chase i sur. i sur. 2002). Kompeticija i predacija dva su proces s vrlo snažnim utjecajem na sustav. Poznato je oba proces snažno utječu na biološku raznolikost, diferencijaciju niša i stjecanje novih adaptacija. U kojoj mjeri i pod kojim uvijetima pojedini proces ima prevladavajuću ulogu često je nepoznato ili nedovoljno razjašnjeno. Radi kompleksnosti interakcija ovo područje postalo je od velikog interes kako za eksperimentalna istraživanja tako i za teorijske i matematičke modele, pomoću kojih pokušavamo objasniti i predvidjeti pojave, ali i potvrditi rezultat istraživanja. Slika 7 daje pojednostavljen prikaz interakcija između predatora, plijena i resusrsa.



Slika 7 Pojednostavljen prikaz interakcija između predatora, plijena i resursa (preuzeto iz Chesson i Kuang 2008)

Kako bi bolje predočili problematiku, kompleksnost tematike, različitost mogućih ishoda i potrebu za daljnjim proučavanjem ovog područja, te samim time opravdali cilj ovog istraživanja, podrobnije ćemo ući u teoretska i empirijska istraživanja na ovom području.

Jedan od privih primjera koji govori o utjecaju predacije na kompeticiju onaj je Painea (1969). Paine (1969) je pokazao da uklanjanje predatora morske zvijezde *Pisster ochraceus* iz ekosustava rezultira kompetitivnom ekskluzijom većine rakova vitičara na kojima se morska zvijezda hranila. Dakle, koegzistencija rakova vitičara je bila posredovana prisustvom predatora. Jedno od objašnjenja ove pojave je da predator drži kompetitivno dominantnu vrstu pri maloj gustoći, što umanjuje interspecijsku kompeticiju (Paine 1969). Gurevitch i sur. (2002) iznose ekstenzivan pregled 39 eksperimentalnih istraživanja o utjecaju predacije na kompeticiju, te zaključuju da je u većini slučajeva predator smanjio efekt kompeticije.

Premda navedeni primjeri lijepo ilustriraju interakciju između kompeticije i predacije podrobniji pregled literature daje nam manje jasnu sliku, s različitim ishodima i utjecajima ovih sila na sustav. Istraživanja pokazuju da predacija može povećati, smanjiti ili pokazati neutralan utjecaj na interspecijsku kompeticiju (Chase i sur. 2002). Svi navedeni ishodi teoretski su objašnjivi, ali je u većini slučajeva teško razjasniti koji mehanizam uzrokuje navedeni ishod. Chase i sur. (2002) u svom preglednom članku kao rješenje problema navode potrebu za (1) boljom definicijom pojmova kao što su jakost i efekt kompeticije, (2) razlikovanje mehanizama preko kojih predacija može utjecati na interspecijsku kompeticiju i (3) utjecaj odabira eksperimentalnog sustava i organizama koje manipuliramo na rezultat. Također način na koji mjerimo kompeticiju bitno utječe na interpretaciju rezultata. Tri su najčešća načina mjerenja u studijima kompeticije i predacije: (1) reproduktivni uspjeh, (2) gustoća populacije i (3) koegzistencija (Chase i sur. 2002). Teorijska i empirijska istraživanja u suglasnosti su da se u prisutnosti predatora gustoća populacija smanjuje, a time i utjecaj jačeg kompetitiora slabi (Gurevitch i sur. 2000, Chase i sur. 2002). Utjecaj predatora na vjerojatnost uspostavljanja koegzistencije među vrstama u kompeticiju područje je koje je dobilo najveću pažnju teoretskih istraživanja. Ovisno o prirodi kompeticije i predacije, predator može povećati, smanjiti ili ne imati utjecaj na koegzistenciju. Različiti utjecaji proizlaze iz činjenice da koegzistencija primarno ovisi o omjeru interspecijskih prema intraspecijskim odnosima (Chesson 2000). Predacija u većini slučajeva smanjuje inter i intra-specijske interakcije, ali ovisno o tome kako utječe na njihov omjer dobivamo različite rezultate. Više je načina na koji predator može utjecati na kompeticiju: (1) predacija nad jakim generalnim iskorištavačem resurs povećati će količinu i raznolikost resurs za druge organizme i omogućiti opstanak organizama specijalizatora za određene resurse. (2) Budući se broj predatora može povećati u slučaju povećanja količine plijena, predator može biti limitirajući faktor koji određuje broj jedinki plijena u sustavu. U

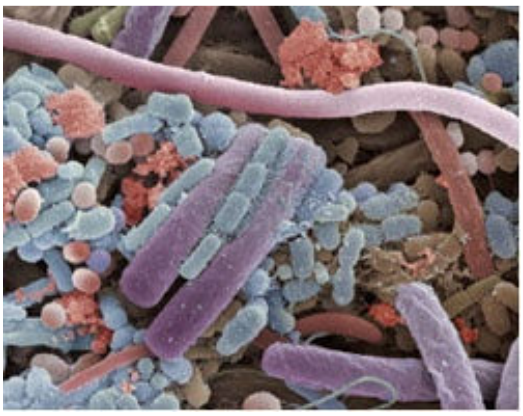
slučaju predatora specijalista svaki predator može djelovati kao limitirajući faktor vrsta i time promovirati njihovu koegzistenciju (Grover 1994, Chase i sur. 2000). U drugom slučaju predator generalista može promovirati koegzistenciju svoja 2 plijena u slučaju da je plijen koji jače zahvaćen predacijom bolji kompetitor za resurse. Ovaj kompromis pretpostavlja da je jedna vrsta ograničena predacijom, a druga resursima (Chase i sur. 2000, Abrams 1999). (3) Adaptivno ponašanje predatora (mogućnost biranja plijena, iskorištenje onog plijena kojeg u sustavu ima više, adaptacija u traženju hrane) također može dovesti do moguće koegzistencije vrsta i smanjenog utjecaja komeptcije (Krivan 2003).

Empirijska istraživanja također pokazuju različite rezultate o utjecaju predacije na koegzistenciju. Na primjer, Spiller i Schoener (1988, 1998) pokazali su da je unošenje guštera na Bahami otocima reduciralo broj vrsta pauka putem smanjenja broja rijetkih vrsta. Augustine i McNaughton (1998) pokazuju da je predacija herbivora dvopapkara smanjila raznolikost biljnih vrsta u šumama. S druge strane Sommer (1999) pokazuje da u malom intenzitetu herbivori mogu povećati biljnu raznolikost, ali s povećanjem pritiska predacije raznolikost pada. Također jedno od najpoznatijih istraživanja kompeticije i predacije ono je Painea (1969) koji je pokazao da je uklanjanje morske zvijezde (predatora) smanjilo broj vrsta rakova vitičara.

Pregled navedenih istraživanja, teoretskih i empirijskih, pokazuju velik broj različitih ishoda zajedničkog utjecaja kompeticije i predacije na sustav. Iz navedenog možemo zaključiti da rezultat ovisi o modelnim organizmima koje koristimo, načinu na koji mjerimo parametre, produktivnosti biološkog sustava, tipu predacije koji promatramo, koji organizam manipuliramo (predator, slabiji ili jači kompetitor), vremenskom periodu istraživanja i dr. Teorijski i empirijski gledano još je mnogo toga za otkriti o prirodi ovih interkacija i velika je potreba za jasnijim opisom mehanizama i boljom spoznajom o mogućem utjecaju raznih varijabli na sustav.

1.6. Bakterije i biološke interakcije

Premda smo dosada u opisu kompeticije većinom navodili primjere za složenije eukariote, kompeticija među bakterijama je jednako zanimljiva i zastupljena u istraživačkim radovima. Bakterije su najbrojnija skupina živih organizama s jednom od najvećih bioraznolikosti i rasprostranjenosti na svim tipovima staništa na Zemlji (voda, zemlja, zrak) (Slika 8). Sposobnost za prilagodbu omogućila im je da se nastane i u najekstremnijim uvijetima za život (nizak pH, ekstremno hladna i topla, sušna i slana područja). Premda točan broj bakterijskih vrsta nije poznat novija istraživanja bakterijske raznolikosti na temelju razlikovanja 16S RNA sljedova pokazuju mogućnost postojanja 2 milijuna različitih vrsta u moru, 4 milijuna u zemlji i 4 milijuna u zraku (Curtis i sur. 2002). Procjenjuje se da je ukupan broj bakterijskih stanica u morima $1{,}2x10^{29}$, u zemlji $2{,}6x10^{29}$, te $3{,}5x10^{30}$ i $2{,}5x10^{30}$ u područjima do 10m ispod razine morskog dna i zemlje, dakle sveukupno oko 6 $x10^{30}$ bakterijskih stanica na Zemlji (Whitman i sur. 1998). Kao i svi organizmi bakterijske vrste su u interakciji s svojim okolišem i drugim organizmima igrajući pri tome vrlo bitnu ulogu u živom sustavu. Mnogi organizmi u potpunosti su ovisni o bakterijama za opskrbljivanje s određenim hranjivim tvarima (mahunarke) ili jednostavno za probavu hrane (većina životinja). Radi svoje široke rasprostranjenosti mnogi organizmi koriste bakterije kao izvor hrane. S druge strane bakterije su poznati patogeni, uzrokujući mnoge bolesti na biljkama i životinjama. Sve ovo nam govorio o važnosti bakterija u živom sustavu i bitnosti poznavanja njihove ekologije, a samim time i interakcija kompeticije i predacije na ovim organizmima.



Slika 8 Raznolikost bakterijskih vrsti (http://biology.uoregon.edu/people/BOHANNAN/pic/Microbes.jpg)

1.6.1. Kompeticija među bakterijama

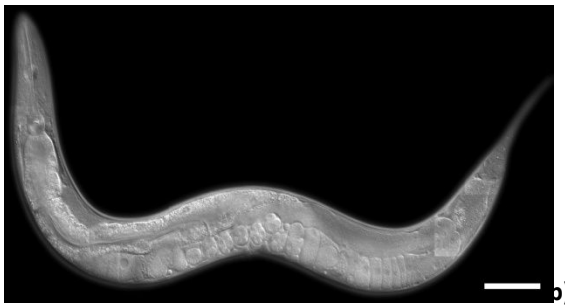
Istraživanja kompeticije na bakterijama mnogobrojna su i vrlo raznolike tematike, budući da su jednako zanimljiva s ekološkog i medicinskog stajališta. Gledano s medicinskog stajališta kompeticija se većinom proučava na primjerima kolonizacije crijeva i invazije patogenih bakterija u populaciju crijevne flore (Flint i sur. 2007, Ley i sur. 2006), te moguće uporabe kompeticije među bakterijama u sprečavanju infekcija (Mead 2000) i zamjene za antibiotike (Xavier i sur. 2006, Gillor i sur. 2008). Brza adaptacija bakterija kroz pojavu rezistentnosti pokazala je neučinkovitost i štetnost uporabe antibiotika u liječenju bolesti. S druge strane mnoge bakterije pokazuju sposobnost proizvodnje antimikrobnih tvari, čime u kompeticiji često uzrokuju eliminaciju senzitivne vrste. Ova činjenica danas se sve više nastoji iskoristiti ka način regulacije i sprečavanje infekcija (Gillor i sur. 2008).

U ekologiji kompeticija među bakterijama, kao i ona kod viših eukariota, nastoji objasniti i predvidjeti određene fenomene u okolišu i kako oni utječu na ostale organizme. Velik broj bakterija u morima i u zemlji čini ih velikim potrošačima hrane i mineralnih tvari čime one indirektno stupaju u kompeticiju s ostalim mikroorganizmima. Kompeticija za hranjive tvari među cijanobakterijama i fitoplanktonom u morima (Currie i Kalff 1984, Joint 9 sur. 2002) , te ona između bakterija i gljivica u zemlji (de Boer 2005) bitno utječe na sastav ovih zajednica i predmet je mnogih proučavanja. Veliki broj bakterijskih vrsta i utjecaj staništa na bioraznolikost također su teme koje se nastoje objasniti preko kompeticijskih mehanizama (Hall i Colegrave 2007, Czaran i sur. 2002).

Uzgoj bakterija in vitro pruža mogućnost stvaranja ekološkog sustava u kontroliranim uvjetima. Kratko generacijsko vrijeme čini bakterije idealnim organizmima za proučavanje i testiranje evolucijskih teorija. Jedna od takvih problema je evolucije kooperacije te doprinos teorije selekcije prema srodniku (kin selection) kooperativnom ponašanju (Griffin i sur. 2004). U novije vrijeme dosta pažnje se posvećuje sociobiologiji bakterija i biofilmovima, pri čemu intraspecijski konflikti i kompeticija igraju značajnu ulogu (Dunny i sur. 2008).

1.6.2. Predacija nad bakterijama

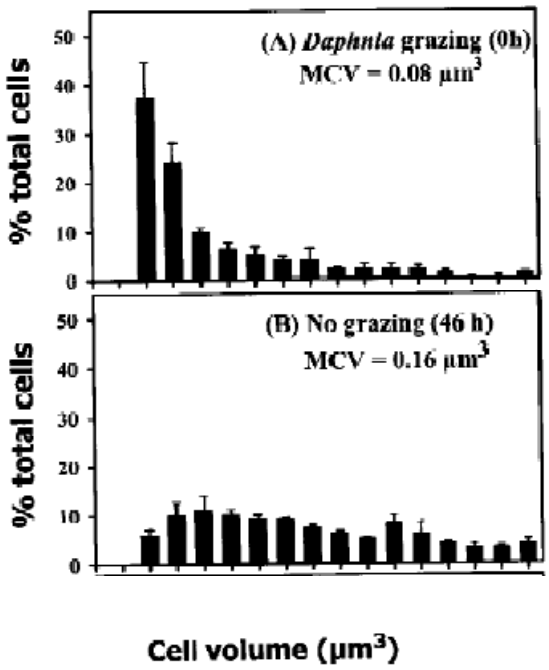
U vodenim i podzemnim ekosustavima bakterije su integralna komponenta hranidbenih mreža i igraju veliku ulogu u sveukupnim bio - geokemijskim putovima. Regulacija bakterijske biomase, produktivnosti i strukture zajednice su prema tome centralne točke istraživanja ekologije tih sustava. Glavni faktori koji utječu na navedene varijable su količina hranjivih tvari, kompeticija među bakterijama i predacija posredovana protozoama i bakteriofazima (Jürgens i Matz 2002). Još uvijek postoje mnoge dileme da li je važniji faktor u regulaciji bakterijskih zajednica ograničenost hranjivim tvarima (bottom-up kontrola) ili predacija (top-down kontorla).

a)  b) 

Slika 9 a) oblić Caenorhabditis elegans (http://www.nematode.net/IMAGES/c_elegans.jpg) b) protozoa *Daphnia* sp. (http://www.sciencefriday.com/news/050207/daphnia.jpg) tipični su bakteriovori

Protozoa, oblići i bakteriofazi najčešći su predatori na bakterijama (Slika 9). Prema tipu predacije bakteriovori su većinom strugači. Predacija nad bakterijama zanimljiva je za proučavanje iz dva aspekta: (1) utjecaja predatora na strukturu bakterijskih zajednica i (2) antipredatorske prilagodbe u bakterija. Visoka genetska raznolikost, fenotipska plastičnost, sposobnost brze evolucije omogućila je bakterijama širok spektar antipredatorskih adaptacija i učinila ih interesantnim organizmima za proučavanje ovih interakcija (Jürgens i Matz 2002). Veliki broj protozoa selektivno se hrani bakterijama određenih veličina, što rezultira selekcijom u veličini bakterija koje dominiraju u okolišu (Slika 10) (Langenheder i Jürgens 2001, Young 2007). Mnoge bakterije razvojem kompleksne morfologije (filamentozne, spiralne, formacija agregata) mogu postati rezistentne na predaciju. Pokretljivost, promjena strukture stanične

stjenke, fizikalno kemijska svojstva, bakterijske kapsule i toksična svojstva neke su od adaptacija bakterija na predatore (Jürgens i Matz 2002).



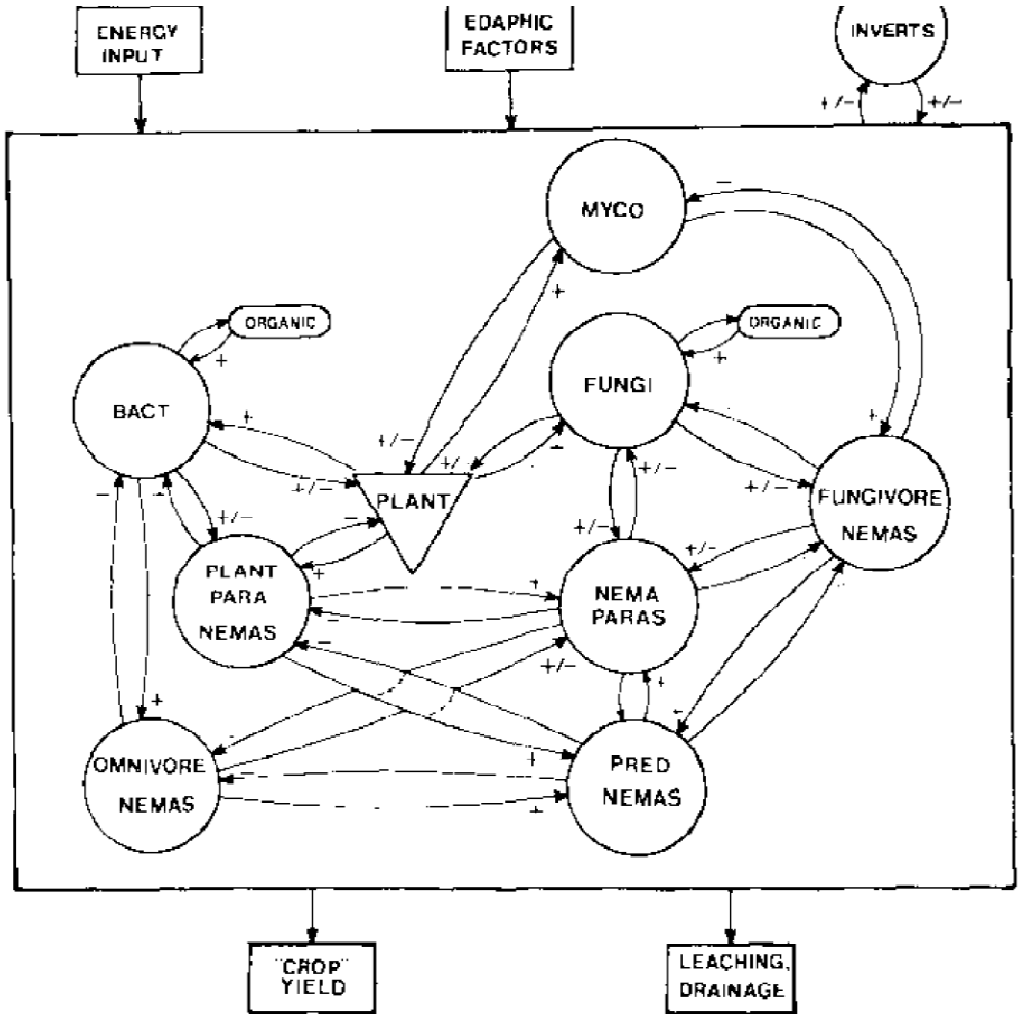
Slika 10 Promjene u distribuciji veličine bakterija u planktonskoj zajednici A) s predatorom *Daphnia* sp. i B) bez predatora (preuzeto iz Langenheder i Jürgens 2001)

S gledišta ekosustava direktnim i indirektnim putem bakteriovori imaju velik utjecaj na mineralizaciju, degradaciju i cirkulaciju hranjivih tvari i minerala. Predacijom nad bakterijama, koje su jedni od glavnih regulatora navedenih proces, bakteriovori reguliraju količinu i raznolikost bakterija, što ima indirektan utjecaj na stopu kojom bakterije provode naveden procese. Mnogi bakteriovori su specijalisti pri čemu predacija može imati pozitivan i negativan učinak na bio - geokemijske procese što uvelike ovisi o uvjetima u sustavu (Laakso i Setälä 1999, Wardle 2006).

1.6.3. Interakcija kompeticije i predacije na bakterijskim sustavima

Kada govorimo o zajedničkom utjecaju predacije i kompeticije u bakterijskim sustavima istraživanja su rijetka. Velik broj istraživanja koja se bave utjecajem predacije na bioraznolikost sustava indirektno nam daju spoznaje o zajedničkom utjecaju kompeticije i predacije, premda kompeticija nije direktno mjerena. Dok su istraživanja kompeticije i predacije jednako zastupljena u vodenim i kopnenim sustavima studije interakcija kompeticije i predacije većinom su proučavana na kopnenim sustavima. Stalna dilema da li je struktura ekosustava više regulirana bottom-up (količinom hranjivih tvari-kompeticija) ili top-own (predacija) pritiskom u većini slučajeva gleda ove procese izolirano. Najtočniji odgovor možda možemo dobiti upravo proučavanjem ovih dviju interakcija zajedno. U općem pregledu zajedničkog djelovanja kompeticije i predacije (poglavlje 1.5.) spomenuli smo da ishod jako varira ovisno o količini resurs u sustavu. Ovaj princip potvrđen je i u bakterijskim sustavima s predatorom bakteriofagom T2 i bakterijom *E. coli* (Bohannan i Lenski 2000), pri čemu u sustavu s manje glukoze (jači kompetivni pritisak) raste broj bakterija koja bolje iskorištava resurse, dok u sustavu s više glukoze (manji kompetitivni pritisak i veći utjecaj predacije) raste broj bakterija koja je manje osjetljiva na infekciju. Kako bakteriovori u zemlji utječu na kolonizaciju, mineralizaciju i strukturu bakterijskih zajednica još uvijek nije dobro razjašnjeno, te se zajednička uloga kompeticije i predacije u novije vrijeme sve se više uzima u obzir. Bakteriovorni oblići imaju veliku ulogu u regulaciji mineralnih tvari (posebice dušika), hraneći se korisnim, saprofitskim i štetnim bakterijama, te disperzijom istih značajno utječu na rast bilja (Slika 11). Konzumacijom bakterija i njihovom probavom povećavaju količinu dušika u zemlji što ima pozitivan utjecaj na rast bakterija (Freckman i Caswell 1985). Wardle i Yeats (1993) su pokazali kako oblići koji se hrane bakterijama i oni koji se hrane gljivama mogu utjecati na kompeticiju između bakterija u gljiva u zemlji. Bakteriovorni oblići vrše jaki selekcijski pritisak na bakterije što uzrokuje pad broja bakterija i povećanje broja gljiva. S druge strane oblići koji se hrane gljivama vrše puno manji pritisak na gljive i ne utječu na dinamiku ovih dviju zajednica. Vrsta predatora također igra veliku ulogu u utjecaju na predaciju. Pederson i sur. (2009) pokazuju kako protozoa *Cercomonas longicauda* koji ima mogućnost selekcije hrane i oblić *Caenorhabditis elegans* koji se ne hrani selektivno različito mijenjaju ishod kompeticije između dva različita soja bakterije *Pseudomonas fluorescens.* Također nedavna istraživanja su pokazala

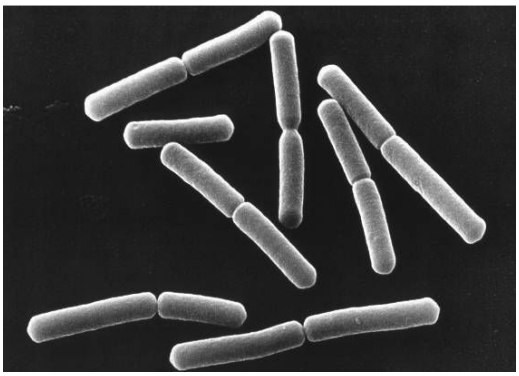
kako predator *Caenorhabditis elegans* može utjecati na dinamiku miješajućih populacija bakterija divljeg tipa i mutanta (Jousset i sur. 2009).



Slika 11 Neke od mogućih interakcija između sastavnica agroekosustava. Strelice pokazuju smjer interakcije, a + i – označavaju pozitivan ili negativan utjecaj. Skraćenice: bact:bakterija, omnivore nemas: omnivorni oblić, myco:mikorize, inverts: beskrelježnaci, nema paras:parazitski i oblići, pred nemas: predatorski oblići. (preuzeto iz Freckman i Caswell 1985)

1.7. *Bacillus subtilis*

Bacillulu subtilis je gram pozitivna, štapićasta, nepatogena bakterija čije je primarno stanište tlo. Prvi ju je opisao Ehrenberg 1835. pod nazivom *Vibrio subtilis*, nakon čega je 1872. Ferdinand Cohen svrstava u rod *Bacillus* i dobiva naziv *Bacillus subtilis*. Rod *Bacillus* vrlo je raznolika grupa saprofitskih bakterija koje ujedinjuje svojstvo formiranja endospore, štapićasti oblik i rast u prisutnosti kisika. Radi svoje raznolikosti rod je podijeljen u 6 grupa, pri čemu *Bacillus subtillis* pripada Grupi II, poznatoj i kao B.subtilis Grupa. Pripadnike ove grupe primarno nalazimo u tlu od kuda često putem vjetra i vode dospijevaju na biljke, životinje, hranu ili vodena staništa. Asocijacija s biljkama od velike je poljoprivredne važnosti, budući da bakterije uzrokuju bolje prinose žitarica, omogućujući biljkama bolji pristup hranjivim tvarima i mineralima (fiksacija dušika u vrste *B.polymxa*), potiču rast biljaka i suprimiraju biljne bolesti. Pri čemu je vrsta *B.subtilis* od velike važnosti i koristi se u kontroli mnogih gljivičnih bolesti (Hall i Davis 1990). *B. subtilis* često nalazimo u hrani, ali često se ignorira jer se ne smatra ljudskim patogenom. Premda im voda nije primarno stanište vrste poput *B.licheniformis* i *B.subtilis* univerzalno su rasprostranjene u morima u tolikim količinama da ih možemo smatrati primarnim stanovnicima mora. I ovdje ih većinom nalazimo u sedimentu, a ne toliko u stupcu vode, pri čemu spore *Bacillus* mogu zauzimati 80% ukupne heterotrofne flore (Sonenshein i sur. 1993). Premda se *Bacillus subtilis* većinom svrstava u aerobne, pokazano je da može rasti i sporulirati u strogo anaerobnim uvjetima. Koristeći nitrat ili nitrit kao terminalni akceptor elektrona ili pomoću fermentacije (Nakano i Zuber 1998).



Slika 12 Štapićasti *B.subtilis* u diobi (http://www.nas.gov/images /content/177389main_POEMS1.jpg)

Bakterija je štapićastog oblika dužine 3-5µm (Srgent 1975) (Slika 12). Genom *Bacillus subtilis* 168 sekvencioniran je 1997. i sastoji se od 4,2 x10^6 pb i 4100 protein kodirajućih gena. Veliki udio genoma posvećen je iskorištavanju različitih izvora ugljika, sekretornom aparatu, ATP vezujućim transportnim proteinima i produkciji sekundarnih metabolita (Kunst i sur. 1997).

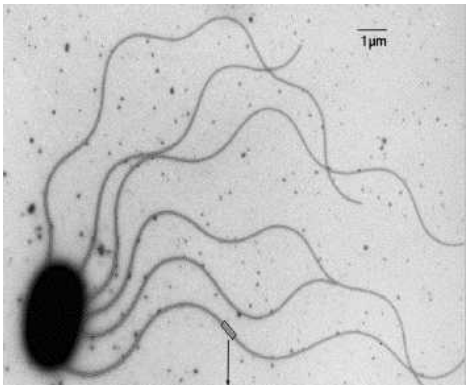
Sposobnost formiranja endospore glavna je karakteristika porodice Bacilliceae. Do sporulacije dolazi prilikom stresnih uvjeta u okolišu, kao što su manjak hranjivih tvari, velika gustoća populacije i visoke temperature. Do produkcije endospore dolazi asimetričnom diobom, a cijeli proces sporulacije traje 7-8 sati. Endospora je rezistentna na visoke temperature, kiselost i slanost te omogućuje preživljavanje tokom dugog vremenskog perioda (Sonenshein i sur. 1993).

Još jedan zanimljiva karakteristika *B. subtilis* je proizvodnja antibiotika. Do sda je izolirano nekoliko stotina divljih tipova *B.subtilis* s potencijalom za produkciju preko dvadeset različitih antibiotika, većinom surfaktanata. Neki od njih zajednički su svim *B.subtils* sojevima (subtilozin, surfaktin, bacilizin), dok su drugi specifični za pojedine sojeve (lantibiotic subtilin, ericin, merscidin). Biološka uloga surfaktanata nije u potpunosti razjašnjena, ali pretpostavlja se da (1) povećava hidrofobnu površinu za rast, (2) povećavaju dostupnost hidrofobnih supstrata, (3) utječu na sposobnost organizma da se veže i oslobodi od površine, (4) utječu na mobilnost, (5) povezani su s nastankom biofilma, (6) pomažu u kompeticiji s drugim bakterijama (Stein 2005). Premda zanimljivo područje za istraživanje, sistematska istraživanja o spektru antibiotika u različitim *B.subtilis* sojevima vrlo su rijetka (Stein 2005). Antibiotik surfaktin do sada je najviše istražen od navedenih *B.subtilis* antibiotika. Surfaktin je ciklički lipoprotein amfipatskog karaktera i jakog surfaktantskog djelovanja. Kao biosurfaktant, mikrobnog podrijetla, ima veliku prednost pred kemijskim spojevima te se često koristi u deterdžentima i sapunima. S druge strane kroz mnoge mikrobiološko-medicinske studije zabilježeno je njegovo anti-viralno, anti-mikrobno, anti-fungalno, anti-mikoplazma i hemolitičko djelovanje (Singh i Cameort 2004, Stein 2005). Biološka aktivnost surfaktina rezultat je njegova emulzificirajućeg djelovanja. Antimikrobno djelovanje posljedica je interakcije surfaktina s staničnom membranom. Ipak, detaljniji mehanizama djelovanja nije poznat. Do sda su predložene različite hipoteze; (1) surfaktin na sebe može vezati katione, pri prolazu kroz staničnu membranu, on prenosi i ione što može utjecati na osmotski tlak u stanici, (2) putem formiranja kationskih kanala u membrani i (3) preko efekta deterdženta, pri čemu dolazi do integracije lipidnog djela surfaktina u membranu, destabilizacije strukture membrane i veće polarizabilnosti (Deleu i sur. 2003).

B.subtilis postao je čest modelni organizam radi lakoće genetičkih manipilacija. Proces formiranja endospore i razni diferencijski mehanizmi koji se odvijaju tijekom sporulacije učinili su ga također čestim modelom istraživanja. Također njegovo antiviralno, antimikrobno i antifungalno djelovanje čini ga je važnom bakterijskom vrstom s poljoprivredne i biomedicinske strane (Singh i Cameort 2004). Određeni sojevi upotrebljavaju se za komercijalnu proizvodnju peptida te kao aditivi u deterdžentima i kozmetici.

1.8. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gram negativna, aerobna, štapićasta i nesporulirajuća bakterija koja nastanjuje donji dio probavnog trakta sisavaca. Prvi ju je opisao 1885. god Theodor Escherich, bavarski pedijatar, kao normalnu floru u zdrave djece (Lederberg 2004). U ljudi *E.coli* naseljava gastrointestinalni trakt 40 sati nakon rođenja gdje ostaje kao komenzal koji pomaže domaćinu u razgradnji i apsorpciji hrane, opskrbljuje ga vitaminom K, te kao vrlo uspješni kompetitor sprječava naseljavanje patogenih i stranih bakterija u crijevu. Premda je ovo nepatogena bakterija u slučaju imunosupresije i oštećenih crijevnih ovojnica može uzrokovati infekcije. Također određeni sojevi razvili su virulenciju i uzročnici su velikog spektra bolesti (Drasri Hill 1974). Bakterija ima optimalan rast na 37°C. Premda najbolje raste u aerobnim uvjetima, fakultativni je anaerob pri čemu fermentacijom proizvodi laktat, sukcinat, etanol, acetat i ugljikov dioksid. Stanice su štapićastog oblika dugačke oko 2µm i široke 0,5 µm, te ovisno o soju mogu ili ne moraju imati flagele (Neidhardt 1987) (Slika 13).



Slika 13 *E.coli* s flagelama (http://www.ichthus.info/Evolution/Flagellum/Flagellum001.jpg)

E.coli je najčešći bakterijski modelni organizam. K-12 soj najviše se koristi u istraživanjima, lako se kultivira i za razliku od divljih tipova izgubio je sposobnost nastanjivanja crijeva. Mnoga istraživanja na području genetike, genske regulacije i bakterijskog transfera gena izrađena su upravo na ovom organizmu. *E.coli* igra veliku ulogu u genetičkom inženjerstvu, gdje se često koristi za proizvodnju velikih količina DNA potrebnih za sekvencioniranje, te proteina za daljnje biokemijske studije.

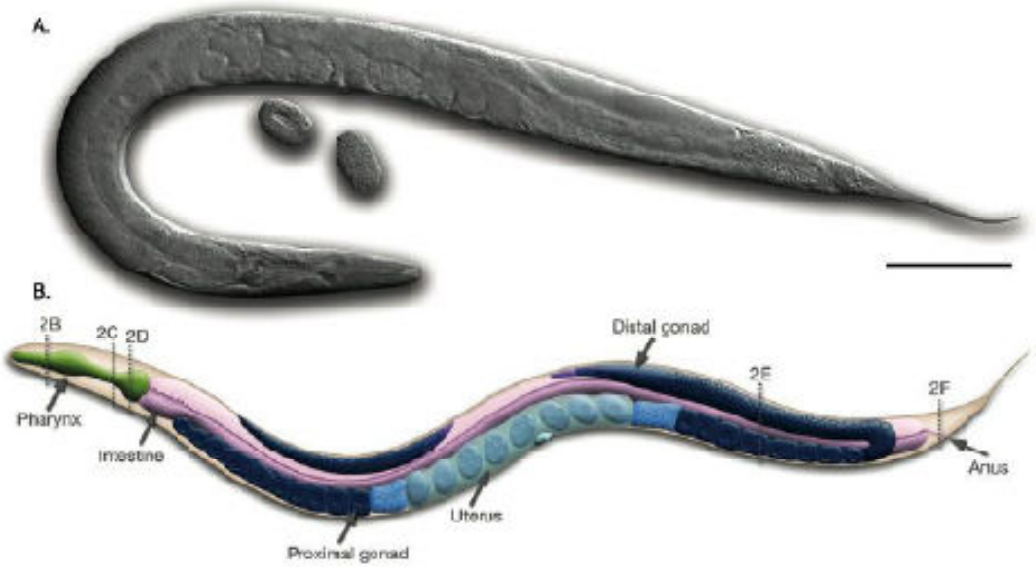
1.9. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans je slobodno živući oblić koji živi u tlu umjerenih područja gdje se hrani mikroorganizmima. Primjena ovog organizma u istraživanjima počela je 1974. god. kada ga je S. Brenner izabrao za modelni organizam u studijima razvojne biologije i ponašanja (Hope i Hames 1999). Od tada se ovaj organizam koristi u širokom spektru istraživanja u područjima genetike, razvojne biologije, ponašanja, virulencije, starenja, evolucije, ekologije zemlje, poljoprivredi i dr. Također, genom *C.elegans* je sekvencioniran i velik broj mutantnih sojeva lako je dostupan što ga također čini vrlo dobrim organizmom za istraživanja (www.wormbase.org).

Tijelo mu je transparentno dugačko oko 1mm i široko oko 0,1 mm. Na površini tijela nalazi se kutikula koju izlučuje hipoderma, ispod nje se nalaze četiri mišićna sloja i pseudocelomatna šupljina koja je ispunjena tekućinom i oblaže crijevo (Slika 14). Osnovna anatomija *C.elegans* sadrži usta, mišićni farinks, crijevo koje se proteže cijelom dužinom tijela i gonade. Postoje dva spola, samooplođujući hermafrodit (XX) i mužjak (XO). U normalnim populacijama mužjaci su vrlo rijetki (0,1%), a parenjem im se povećava frekvencija. *C.elegans* sadrži pet parova autosomalnih kromosoma i jedan par spolnih kromosoma. Hermafroditi sadrže oba spolna kromosoma (XX), dok mužjaci imaju smo jedan spolni kromosom (XO). Razvojna biologija *C.elegans* poznata je u detalje i čini ga idealnim organizmom za istraživanje u ovom području. Tijelo mu je građeno od strogo definiranog broja stanica koji u hermafrodita iznosi 959, a u mužjaka 1031 stanica. Također živčani sustav se sastoji od 302 neurona, za svaki od kojih je poznat razvojni put i povezanost s neuronima (Hope i Hames 1999).

Razvojni ciklus *C.elegans* sastoji se od četiri ličinačka stadija (skraćeno se označavaju L1-L4, a u literaturi se mogu naći i pod imenom juvenilni stadiji) koji su odvojeni presvlačenjima (Slika 15). U slučajevima manjka hrane i velike gustoće populacije, drugi stadij (L2) može ući u dauer diapauzu. Ovo je stadij u kojem se oblić ne hrani nego preživljava na zalihama energije. Kada se uvjeti u okolišu poprave, dauer ličinke prelaze u normalni ličinački stadij i nastavljaju razvoj u obliku L4 stadija. Ovisno o temperaturi na kojoj se razvija generacijsko vrijeme (vrijeme od jajeta do adultnog stadija koji je sposoban proizvoditi jaja) varira od 2 dana na 25°C do 6 dana na 15°C. U slučaju smooplodnje *C.elegans* liježe oko 300 jaja. U slučaju da mužjak ubaci svoju spermu u hermafrodita, hermafrodit će preferentno koristiti spermu mužjaka i liježe oko

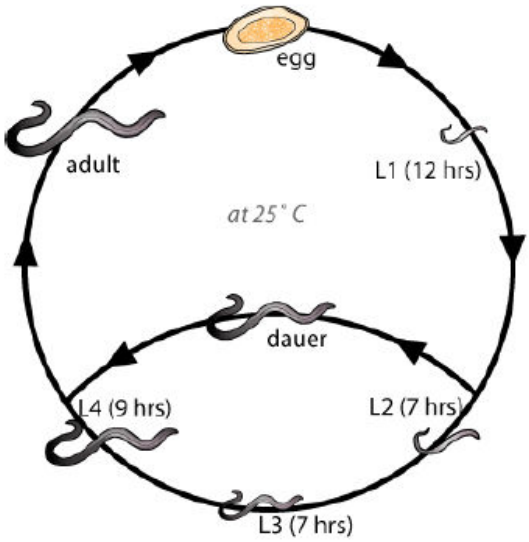
1000 jaja. Životni vijek varira ovisno o temperaturi i bakterijskoj vrsti kojom se hrani i iznosi 7-15 dana (Hope i Hames 1999, Garsin i sur. 2003).



Slika 14 Anatomija odraslog hermafrodita (www.wormatlas.org)

A). Diferencijalno kontrasna slika odraslog hermafrodita i dva jaja, lijeva lateralna strana. Skalarna crta je veličine 0.1 mm

B) Shematski crtež anatomske strukture, lijeva lateralna strana.



Slika 15 Životni ciklus *C.elegans* (preuzeto iz Yuan i sur. 2007)

Ekologija *C.elegans* puno je manje poznata u odnosu na njegov razvojni ciklus, genetiku i molekularnu biologiju. Sve *Caenorhabditis* vrste, uključujući i *C.elegans*, kolonizatori su hranjivim tvarima i mikroorganizmima bogatih područja pod zemljom gdje ne formiraju stabilne populacije, zbog relativno brzog iscrpljivanja organskih tvari. Pretpostavlja se da je kolonizacija ovih područja vrlo brza, lokalna populacija u kratkom vremenu postiže visoku gustoću, što dovodi do brzog iskorištenja niše i prelaska u dauer stadij, koji je najčešći stadij u kojem ćemo u prirodnim uvjetima naći *C.elegans* u zemlji. U većini slučajeva dauer stadij zatim ulazi u asocijaciju s beskralježnjacima kao što su stonoge, izopodni rakovi, kukci i puževi. Ove životinje dauer ličinka koristi kao transport do novog povoljnog okoliša. U nekim slučajevima ličinka može čekati da beskralježnjak ugine, te ga koristi kao novi izvor hrane. *C.elegans* se u većini slučajeva koristi beskralježnjacima kao transportom, premda su zabilježeni i slučajevi kada se hrani na mrtvim životinjama. *C.elegans* se gotovo uvijek nalazi na antropogenim staništima, kao što su vrtovi i gnojiva zemlja obradivih površina u svim područjima Zemlje (Kiontke i Sudhaus 2006).

1.10. Cilj istraživanja

1.10.1. Generalni cilj

Kompeticija i predacija među najvažnijim su silama u oblikovanju organizama i ekosustava. U većini slučajeva njihov utjecaj na organizme je proučavan odvojeno. Kako bi što preciznije razjasnili procese i fenomene u ekosustavima, interakcije unutar sustava moramo proučavati zajedno, a ne izolirane jedne od drugih. Testiranje interakcija u prirodnim uvjetima često je teško, ili moguće smo tijekom kratkog vremenskog perioda i bez mogućnosti praćenja evolucijskih promjena. Mogućnost mjerenja efekta različitih stopa predacije, inter i intraspecijskog kompetitivnog efekta i manipulacije obje vrste u kompeticiji proširilo bi naše znanje u razumijevanju ovih proces. Teoretski modeli u velikom broju slučajeva nisu empirijski dokazani i trebaju jednostavan i pristupačan eksperimentalan sustav za njihovo testiranje. Sustav s bakterijama i oblićem kao modelnim organizmima omogućava konstrukciju jednostavnog sustava s mogućnošću kontrole i manipulacije nad parametrima kao što su: stopa predacije i kompeticije, količina hranjivih tvari, homogeni i heterogeni okoliš, dug vremenski period, mogućnost evolucije, te predstavlja idealan sustav za proučavanje zajedničkog djelovanja kompeticije i predacije. Također, ovaj sustav od velikog je ekološkog i poljoprivrednog značaja te nam je njegovo bolje razumijevanje vrlo bitno pri opisu i kontroli pojava u ovim područjima.

Generalni cilj ovog istraživanja bio je razviti jednostavan eksperimentalni sustav za laboratorijsko proučavanje zajedničkog djelovanja kompeticije i predacije na dobro poznatim modelnim organizmima; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Caenorhabditis elegans*.

1.10.2. Specifični cilj

Radi velikog opsega projekta i ograničenog vremenskog perioda za izvedbu, utvrđeni su specifični ciljevi:

- razviti eksperimentalni sustav za proučavanje:

- potvrditi inhibicijsko djelovanje *B.subtilis* surfaktina na bakteriju *E.coli*
- odabrati soj *B.subtilis* koji pokazuje najbolji inhibitorni efekt
- ustvrditi optimalnu temperaturu, strukturu medija (tekući ili kruti) te bogatstvo nutrijentima (bogati ili siromašni medij) za proučavanje kompeticije
- pronaći optimalni selektivni medij za praćenje broja bakterije tijekom eksperimenta

- testirati da li u miješanim kulturama bakterija *B.subtilis* i *E.coli* pokazuju kompetitivni odnos
- istražiti da li I na koji način različiti omjeri navedenih organizama utječu na ishod kompeticije
- testirati da li stopa predacije od jednog oblića *C.elegans* može utjecati na odnos između bakterijskih vrsta

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

2.1.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi korišteni u istraživanju uključivali su različite sojeve *E.coli* i *B.subtilis*. Svi bakterijski sojevi su dobiveni od Inserm U571 Laboratorija za medicinsku i evolucijsku genetiku. Bakterijski sojevi *E.coli* korišteni u eksperimentima kompeticije su MG1665, MG1665 *(pro),* 536 patogeni soj (Diard i sur. 2007). Soj *E.coli* OP50 standardna je bakterija korištena za kultivaciju i održavanje populacije *C.elegans*. Soj *E.coli* OP50 UV sadrži deleciju lokus za popravak DNA putem ekscizije nukleotida, te bakterija ne može popraviti DNA oštećenu UV zračenjem. Korišteni sojevi *Bacillus subtilis* navedeni su i genotipski opisni u Tablici 2.

Tablica 2 Značajni genotipovi *B.subtilis* sojeva korištenih u istraživanju

Soj	Genotip	Referenca
ATCC 21332	sfp+, prirodni izolat	Nakano i sur. 1988
3610	sfp+, prirodni izolat	Julkowska i sur. 2005
OKB105	pheA1 sfp+	Nakano i sur. 1988
JH642	trpC2 pheA1	Nakano i sur. 1988

2.1.2. *Caenorhabditis elegans*

Kao predator korišten je *Caenorhabditis elegans fer-15* soj kondicionalno sterilan na 25°C i fertilan na 15°C (Diard i sur. 2007). Populacija je održavana nasađivanjem jaja na mediju za uzgoj nematoda (NGM) s *E.coli* OP50 sojem i držanjem na 15°C (Hope i Hames 1999).

2.1.3. Hranidbene podloge

Luria-Bertani (LB)- podloga

Za uzgoj prekonoćnih kultura svih bakterijskih sojeva korištena je tekuća LB-podloga sastava: 10 g/l triptona, 5 g/l kvaščevog ekstrakta , 5 g/l NaCl . Za eksperimente dokazivanja inhibicijskog djelovanje surfaktina korištena je kruta LB-podlogu istog sastava s dodatkom 15 g/l agara. Sastav selektivnih LB-podloga je jednak s dodatkom 100µg/l ampicilina, 40µg/ml nalidiksične kiseline. Za raspoznavanje *E.coli* i *B.subtilis* kolonije korištena je β-galaktozidaza test, pri čemu je na LB-podlogu dodano 40 µl/ml X-gala i IPTG konačne koncentracije 0,1 mM. β-galaktozidaza test djeluje na principu plavo-bijele selekcije na iskorištenje laktoze. U slučaju da bakterija može iskorištavati laktozu IPTG djeluje kao induktor *lac*-operona, dolazi do proizvodnje enzima β-galaktozidaza koja razgrađuje X-gal i kolonije dobivaju plavo obojenje. Bakterije koje ne iskorištavaju laktozu bijele su boje.

MacConkey podloga

MacConkey podloga korištena je kao selektivna podloga za *E.coli*. MacConkey-podloga poznata je kao selektivna podloga za rast gram negativnih bakterija, posebice *E.coli* . Žućne soli i kristalno ljubičasta boja u sastavu ove podloge inhibiraju rast gram pozitivnih bakterija. Sastav korištene MacConkey podloge: pepton 17g/l, peptone proteaze 3 g/l, laktoza 10 g/l, žučne soli br.3 1.5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 13.5 g/l, neutralno crveno 0.03 g/l, kristalna ljubičasta 0.001 g/l.

Minimalna podloga

Minimalna podloga korištena je kao selektivna podloga u eksperimentu kompeticije u sastavu: 5x koncentrirana otopina M9 soli, $MgSO_4$ 1g/l, šećer 0.4%, vitamin B1 0,03%, uracil 0,02%, aminokiselina 1%. Ovisno o uvjetima selekcije, medij je nadopunjen s šećerom: glukoza ili laktoza i aminokiselinama: triptofan + fenilalanin, prolin, smjesa svih aminokiselina.

Cooper – podloga

Cooper podloga navodi se kao optimalna podloga za proizvodnju surfaktina u *B.subtilis*. Tekući Cooper medij korišten je pri uzgoju *B.subtilis* prekonoćnih kultura prilikom istraživanja

inhibicijskog djelovanja. Sastav podloge : NH_4NO_3 (4,5 g/l), KH_2PO_4 (0.03 M), Na_2HPO_4 (0.04 M), $MgSO_4$ (8.0 x 10^{-4} M), $CaCl_2$ (7.0 x 10^{-6} M), Na_2 EDTA (4.0 x 10^{-6} M), $MnSO_4$ (27.2 10^{-2} g/l), $FeSO_4$ (4x10^{-3} g/l) , glukoza (36,5 g/l) (Cooper i sur. 1981, Ramkrishna 1997).

NGM- podloga

U kultivaciji *C.elegans* korištena je kruta NGM (nematode growth media) podloga (Hope i Hames 1999) sastava: pepton 2.5 g/l, kolesterol 0.005 g/l, NaCl 3g/l, agar 17.5 g/l, $KHPO_4$ (1M) 25ml/l , $MgSO_4$ (1M) 1ml/l, $CaCl_2$ (1M) 1ml/l.

Hranjiva podloga koja sadrži krv ovce

Za utvrđivanje produkcije surfaktina u istraživanju je korišten Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TS II) (Sigma) sastava: tripton H 15g/l, soytone 5g/l, NaCl 5g/l, agar 15g/l, 5% defibrinirane krvi ovce.

Top agar

Top agar korišten je u ispitivanju inhibicijskog djelovanja *B.subtilis*. Sastav podloge: agar 4.5 g/l, baktotripton 10 g/l, NaCl 2.5 g/l.

2.1.4. Osnovne kemikalije

$MgSO_4$ (aq) (10^{-2} M)

destilirana H_2O

glicerol 60%

etanol 70% i 90%

NaOH 5mM

bleach otopina ($HClO^-$)

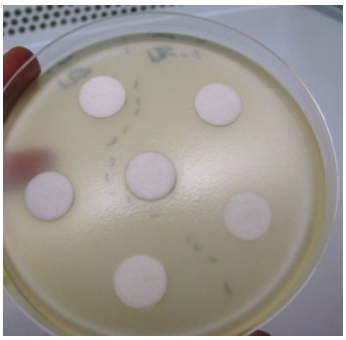
2.2. Metode

2.2.1. Inhibitorni učinak *Bacillus subtillis* na *Escherichia coli*

Test difuzije na top agaru (TA) s *E.coli* 536

100µl prekonoćne kulture *E.coli* 536 pomiješano je s 3ml tekućeg top agara (sadrži 4.5 g/l agara) temperature oko 50°C, smjesa je vorteksirana i izlivena na LB ploče. Ploče su ostavljene preko noći na 37°C kako bi dopustili da *E.coli* naraste. Sljedeći dan ploče su prije rada dobro osušene u digestoru. Kako bi testirali da li u različitim medijima *B.subtilis* sojevi proizvode različite količine surfaktina, i time pokazuju jači inhibitorni učinak (veći plak na top agaru) sojevi *B.subtilis* OKB105, ATCC 21332, JH642 uzgojeni su preko noći u LB, NGM i Cooper tekućim medijima. Na ploče smo nasadili (A) 10µl prekonoćnih kultura *B.subtilis* iz svakog od navedenih medija, (B) supernatant iz prekonoćne kulture u svakom od navedenih medija. 500µl prekonoćne kulture prebačeno je u mikroepruvetu (1ml) i centrifugirano 1.5 min na 13 200 rpm. Supernatant je pažljivo prebačen u novu mikroepruvetu, a talog s bakterijskim stanicama je bačen. Postupak centrifugiranja je ponovljen dva puta. Ovaj postupak napravili smo kako bi se riješili bakterijskih stanica i mogli ispitati da li su tvari iz bakterijskih kultura dovoljne za inhibiciju rasta bakterije *E.coli* 536. 10µl supernatanta svakog bakterijskog uzorka uzgojenog na svakom od medija nasađen je na filtar papir postavljen na pripremljeni top agar (Slika 16). Uzorci su ostavljeni 1.5h na +4°C kako bi dopustili supernatantu da difundira u top agar. Sve ploče su zatim ostavljene 24h na 30°C, nakon čega je provjereno da li je došlo do inhibicije. Inhibitorni učinak vidljiv je u obliku čistine (plaka) bakterijskih stanica *E.coli* u top agaru oko mjesta nasađivanja supernatanta (Brinkhoff i sur. 2004). *B.subtilis* soj JH642 negativan je za proizvodnju surfaktina i korišten je kao kontrola.

Postupak (B) ponovljen je sljedeći dan s istim 2 dana starim kulturama *B.subtilis* uzgojenim u LB,NGM i Cooper mediju. Na filtar papir na top agar pločama nasađeno je 10µl, 50µl i 100µl pročišćenog supernatanta.



Slika 16 Filter papir natopljen s supernatantom bakterijske kulture na ploči s top agarom koji sadrži *E.coli*

Test difuzije na LB i NGM agaru

Test difuzije zasniva se na činjenici da bakterije otpuštaju različite tvari u podlogu, od kuda one difundiraju u okolni prostor, te inhibiraju rast bakterija ukoliko imaju antibiotičko djelovanje. U eksperimentu 10µl prekonoćne kulture *B.subtilis* ATCC 21332, OKB105, 3610, JH642 nasađeno je u obliku kapljice na LB i NGM ploče i ostavljeno 24h na 28°C, 30°C i 37°C. Time je dopušten rast bakterija, te proizvodnja i produkcija antibiotika. Zatim je u neposrednoj blizini rasta *B.subtilis* u obliku kapljice nasađeno 10µl prekonoćne kulture *E.coli* 536 i MG 1665. Ploče su vraćene na početne temperature i ostavljene da rastu 24h. Inhibitorni učinak je zabilježen fotografiranjem digitalnim fotoaparatom (Canon PowerShot SX100 IS) i pomoću lupe (Leica MZ75) s kamerom (Leica DFC320)

Kako bi testirali da li *E.coli* ima inhibitorni učinak na *B.subtilis* isti postupak je ponovljen s nasađivanjem 10µl prekonoćne kulture *E.coli* prvi dan i *B.subtilis* sljedeći dan.

2.2.2. Produkcija surfaktina

Budući da surfaktin ima hemolitičko djelovanje, jedan od načina njegova dokazivanja je nasađivanjem bakterijske kulture na krutu podlogu koja sadrži krv (Nakano i sur. 1988). Kako bismo potvrdili produkciju surfaktina u sojevima *B.subtilis* koje smo koristili 20µl prekonoćne kulture sojeva nasađeno je u obliku kapljice na TS II Blood Agar podloge i ostavljeno 24h na 30°C i 37°C. Postupak je ponovljen na 2 različite ploče za svaku temperaturu.

Kako bismo provjerili količinu surfaktina u tekućem LB i Cooper mediju u kojoj je uzgojena prekonoćna kultura *B. subtilis*. Iz uzorka prekonoćne kuture smo centrifugiranjem

izdvojili bakterijske stanice (opisno u ulomku 2.2.4.1.) i 20µl supernatanta nasadili na filter papir na podlogu s ekstraktom krvi. Ploče su ostavljene 24h na 30°C. Postupak je ponovljen na 2 različite ploče.

2.2.3. Mjerenje krivulje rasta

Prekonoćna kultura *E.coli* MG1665 i *B.subtilis* JH642 i ATCC 21332 uzgojena je u 5ml LB-a, na 37°C s konstantnim miješanjem na 200 okretana po minuti. Sve prekonoćne kulture tijekom istraživanja uzgajane su na ovaj način.

Prekonoćna kultura razrijeđena je u svježem LB u dok stanična gustoća uzorka na 600nm (dalje OD600nm) nije iznosila oko 0.1. Uzorci za mjerenje krivulje rasta u NGM-u su zatim isprani od LBa s otopinom $MgSO_4$ (10^{-2} M) po sljedećem postupku. 1.5ml uzorka stavljeno je u mikroepruvetu od 2ml i centrifugirano 1.5 min na 13 200 rpm. Supernatant je maknut i talog je otopljen u 1.5ml $MgSO_4$ (10^{-2} M). Postupak centrifugiranja i ispiranja je ponovljen 3 puta. Smatramo da je to dovoljno da se ukloni svaki trag tekućeg LB-a iz prvotnog uzorka. 20µl uzorka svakog soja dodano je u 180µl tekućeg NGM-a u ploču s 96 jažice. Za svaki uzorak napravljena su 3 ponavljanja. Krivulja rasta praćena je mjerenjem OD600nm svakih 5 min tokom 16h. Sva mjerenja vršena su na 37°C uz miješanje uzoraka 60sec prije svakog mjerenja stanične gustoće.

2.2.4. Korelacija stanične gustoće bakterijske kulture i broja bakterija u tekućem LB-u

U 10ml svježeg tekućeg LB-a stavljeno je 10 µl prekonoćne bakterijske kulture. OD je mjeren na 600nm svakih 15-30 minuta tokom eksponencijalne faze, tj. dok kultura nije dostigla OD600nm veći od 1. Nakon svakog mjerenja uzorak je razrijeđen u $MgSO_4$ (10^{-2} M) otopini u ploči s 96 jažice i 100µl razrjeđenja je nasađeno na LB ploču. Za svako mjerenje nasađena su 3 različita razrjeđenja kako bi bili sigurni da ćemo imati barem jednu ploču s brojivom količinom kolonija. Ploče su preko noći ostavljene u termostatu na 37°C, nakon čega je izbrojen broj bakterijskih kolonija za pojedinačni OD600nm. Za daljnju obradu korištene su ploče koje su sadržavale 15-250 kolonija/ploči. Postupak je ponovljen dva puta za uzorke *E.coli* MG 1665, *B.subtilis* JH642 i ATCC 21332.

2.2.6. Eksperiment kompeticije

Kako bismo eksperiment započeli s svježom kulturom i bakterijama u eksponencijalnoj fazi od prekonoćne kulture *E.coli* i *B.subtilis* uzeto je 10µl, nasađeno u 5ml svježeg LB-a i ostavljeno na 37°C uz miješanje od 200rpm dok uzorci nisu dosegli OD600nm preko 0.6. Bakterijske kulture su zatim razrijeđene u tekućem LB-u do željene optičke gustoće. Jednaki volumeni suspenzije bakterija *E.coli* i *B.subtilis* pomiješani su u mikroepruveti (2ml). Miješane kulture MG1665+JH642 i MG1664+ATCC 21332 (eksperiment kompeticije) i pojedinačne kulture MG1665, JH642, ATCC 21332 (kontrola bez kompeticije) nasađene su na NGM podlogu. U radu s pločama promjera 9cm, 100µl bakterijske kulture je nasađeno i razmazano pomoću plastičnog štapića u obliku slova L spatulom. Kada su korištene ploče s 12 jažice nasađeno je 20µl po bunarčiću i razmazano pomoću staklenog štapića u obliku slova L. Ploče su tokom eksperimenta držane u termostatu na 28°C. Kako bismo ustvrdili broj bakterija s kojima smo započeli eksperiment svi bakterijski uzorci su razrijeđeni u $MgSO_4$ (10^{-2} M) otopini u ploči s 96 jažice, 100µl razrjeđenja je nasađeno na LB.

Početni omjeri bakterija prikazani su u Tablici 3. Omjer 1:1 ponovljen je 3 puta za kompeticiju MG1665 s ATCC 21332 i 4 puta za kompeticiju MG1665 s JH642, s jednom replikom, omjer 1:13 napravljen je jednom s 2 replike, omjer 1:40 jednom s 1 replikom i omjer, omjer 1:180 je napravljen smo za kompeticiju MG1665 s ATCC 21332, jednom s 1 replikom.

Tablica 3 Omjeri *E.coli:B.subtilis* korišteni tokom eksperimenta

Omjer *E.coli:B.subtilis*	1:1	1:13	1:40	1:180

Tijekom sljedećih 7-9 dana praćen je rast svake bakterije na pločama s i bez kompeticije. Mjerenja su vršena 1., 3., 5., 7. i 9.dan. Postupak je izveden na sljedeći način: ploča s bakterijskom kulturom isprana je s 1.5ml $MgSO_4$ (10^{-2} M) u slučaju pločama promjera 9cm i s 200µl u slučaju ploča s 12 jažica. Bakterije su sastrugane s površine ploče pomoću staklenog štapića u obliku slova L i prebačene pomoću pipete u 2ml epruvete. Postupak je ponovljen 3 puta, što je u većini slučajeva bilo dovoljno da kod zadnjeg ispiranja dobijemo otopinu otprilike

jednake bistrine kao i čisti $MgSO_4$ (10^{-2} M). U slučaju da je ploču bilo potrebno isprati i četvrti put korekcija za različit volumen napravljena je kod obrade podataka. Suspenzija bakterijskih stanica razrijeđene su u $MgSO_4$ (10^{-2} M) otopini u ploči s 96 jažice, 100µl razrjeđenja je nasađeno na LB (za uzorke bez kompeticije), te LB s X-gal i IPTG (uzorci s kompeticijom) ili neki od navedenih selektivnih medija. Kako bi ustanovili utječe li kompeticija na rast bakterija na MacConkey podlozi, uzorke MG 1665 bez kompeticije i u kompeticiji s JH642 i ATCC prilikom nasađivanja razrjeđenja nasadili bi i na MacConkey podloge. Rezultati s LB podloga koje smo koristili u obradi podataka, služili su nam kao kontrola pravilnog rasta *E.coli*. Sve ploče su preko noći ostavljene u termostatu na 37°C i broj kolonija/ploči je izbrojan.

2.2.7. Eksperiment s kompeticijom i predacijom

Oblić *C.elegans fer-15* kultiviran je na *E.coli* OP50 na NGM podlozi na 15°C. Budući da je na ovoj temperaturi *C.elegans* fertilan u kulturi nalazimo jaja,stadij ličinke i odrasle jedinke. Ovakva kultura isprana je s 2ml destilirane H_2O kako bi se s podloge uklonio što veći broj jaja i jedinki *C.elegans.* Otopina je prebačena u 15ml epruvetu. Na 4ml otopine dodano je 500µl bleach otopine i 500µl NaOH 5mM. Inkubacija je trajala 2-3 minute kako bi se ubile bakterije, ličinke i adultne jedinke *C.elegans* i ostala smo jaja. Smjesa je centrifugirana 15-20 sekundi na 3000rpm. Supernatant je bačen, a talog resuspendiran u 10ml destilirane H_2O. Sve je ponovno centrifugirano 15-20 sekundi na 3000rpm. Supernatant je bačen, a talog resuspendiran s 2-5ml destilirane H_2O. Ova otopina sda sadrži neuništena jaja i mrtve jedinke *C.elegans*. 2-5 kapljica otopine nasađeno je na NGM-podloge s ozračenim *E.coli* OP50 sojem (Hope i Hames 1999). Dio ploča ostavljen je na 15°C kako bi jaja koja su razvila bila fertilna i time imali konstantu zalihu jedinki *C.elegans*, a drugi dio ploča ostavljen je na 25°C kako bi za 1.5 dan imali L4 stadij *C.elegans*. NGM podloga s ozračenim *E.coli* OP50 UV su pripremljene prema sljedećem postupku: 100µl soja OP50 UV nasađeno je na NGM podlogu i ostavljeno 24h na 37°C. Ploče su zatim na 30min ozračene s UV svjetlom valne duljine 254nm. Ova količina zračenja ubila je bakterije na podlozi, što nam je bitno kako prilikom prenošenja *C.elegans* uzgojenog na ovoj podlozi ne bi prenijeli i žive OP50 UV stanice i time kontaminirali eksperiment.

Dan nakon što su jaja nasađena na podlogu s mrtvim OP50 UV započet je eksperiment kompeticije opisan u poglavlju 2.2.5. Eksperiment kompeticije morao je biti započet dan prije

nego što smo u sustav stavili *C.elegas* kako bi omogućili da bakterije narastu. Sljedeći dan (1.5 dana nakon nasađivanja jaja) kultura *C.elegnas* ušla je u L4 stadij. Na svaku ploču s bakterijama s i bez kompeticije stavljen je jedan *C.elegans*. Ploče su vraćene na 28°C. Na ovoj temperaturi *C.elegans* je sterilan, te se stoga broj predatora ne povećava tijekom eksperimenta, a stopa predacije je konstanta. Budući da na različitim bakterijskim podlogama *C.elegans* pokazuje različitu duljinu života a time i različitu mobilnost (Diard i sur. 2007.). Stopa predacije održavana je konstantnom i jednakom. Tijekom cijelog eksperimenta stopu za sve podloge, na podloge bi stavljali novog *C.elegans* u L4 stadiju svaka 2 dana, a stara jedinka se je uklonjena. Kao i u eksperimentu kompeticije, broj bakterija mjeren je 1., 3., 5., 7. i 9.dan. Kao kontrola paralelno su mjereni bakterijske kulture s predacijom i kompeticijom i smo s kompeticijom.

2.2.8. Mjerenje kompetitivnog reproduktivnog uspjeha

Kompetitivni reproduktivni uspjeh (competitive fitness) bakterija u kompeticiji mjeren je kao (1) relativni reproduktivni uspjeh bakterije u uvjetima kompeticije u odnosu na uvjet bez kompeticije i kao (2) relativni reproduktivni uspjeh *E.coli* u odnosu na *B.subtilis* u miješanoj kulturi (Leroi i sur. 1993).

$$(1) \qquad W = \frac{Ln\left(\frac{N^f_{komp}}{N^i_{komp}}\right)}{Ln\left(\frac{N^f_{solo}}{N^i_{solo}}\right)}$$

$$(2) \qquad W = \frac{Ln\left(\frac{N^f_{E.coli}}{N^i_{E.coli}}\right)}{Ln\left(\frac{N^f_{B.subtilis}}{N^i_{B.\boldsymbol{subtilis}}}\right)}$$

Pri čemu je N broj bakterija, donji indeks *komp* označava bakterije u kompeticiji, dok *solo* označava istu bakteriju u uvjetima bez kompeticije bilo to *E.coli* ili *B.subtilis*. *E.coli* i

B.subtilis označavaju bakterije u miješanoj kulturi. Gornji indeksi *f* i *i* označavaju konačni (final) i početni (initial) uzorak. Vrijednost W=1 ukazuje da dva kompetitora imaju jednak reproduktivni uspjeh. W≠1 govori da kompetitori imaju različit reproduktivni uspjeh koji može biti posljedica razlike u preživljavanju i/ili reproduktivnog uspjeha tokom kompeticije. Za W>1 bakterija u kompeticiji ima bolji reproduktivni uspjeh u odnosu na bakteriju bez kompeticije (1), tj. *E.coli* u miješanoj kulturi ima bolji reproduktivni uspjeh u odnosu na *B.subtilis* (2) .

Prilikom prikaza vremenskog praćenja promjene omjera bakterija u miješanoj kulturi korištena je formula (Lenski i sur. 1994, Ginzburg 1991):

$$(3) \quad R(t) = Ln(\frac{N_{E.coli}\,(t)}{N_{B.subtilis}(t)})$$

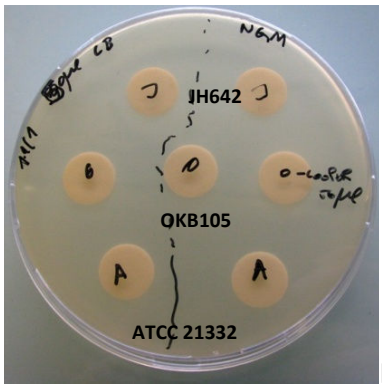
pri čemu N označava broj bakterija u trenutku t, dok donji indeks označava bakteriju. Za vrijednosti R > 0 u kulturi ima više E.coli, dok u slučaju R < 0 u kulturi ima više B.subtilis.

3. Rezultati

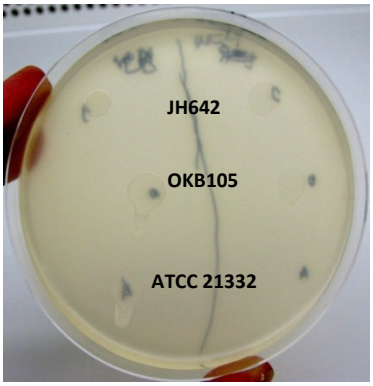
3.1. Inhibitorni učinak *B.subtilis* na *E.coli*

Kako bi dokazali inhibitorni učinak *B.subtilis* ATCC 21332 i OKB105 sojeva prema *E.coli* 536 soju koristili smo dvije metode.

Svi rezultati dobiveni testom difuzije su bili negativni, tj ni supernatant ni bakterijska kultura *B.subtilis* ATCC 21332 i OKB105 nisu uzrokovali nastanak plaka (Slika 17). Rezultat je bio isti za sve medije i neovisan o količini nasađenog supernatanta (10µl, 50µl, 100µl) (Slika 17).

a) 

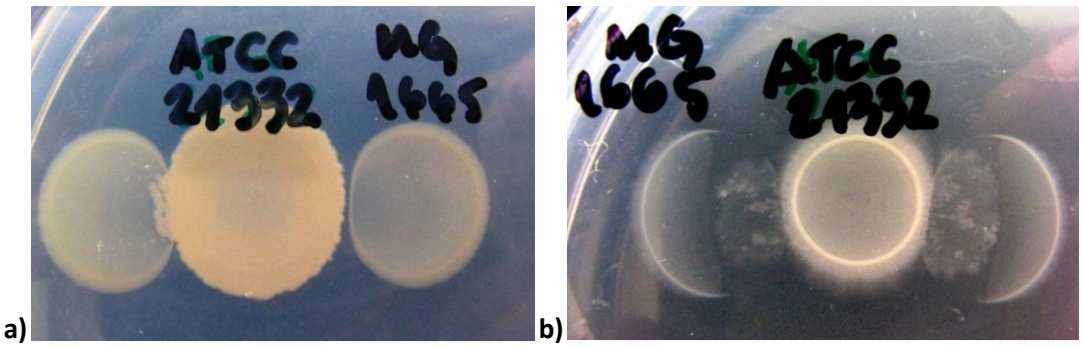
b) 

c) 

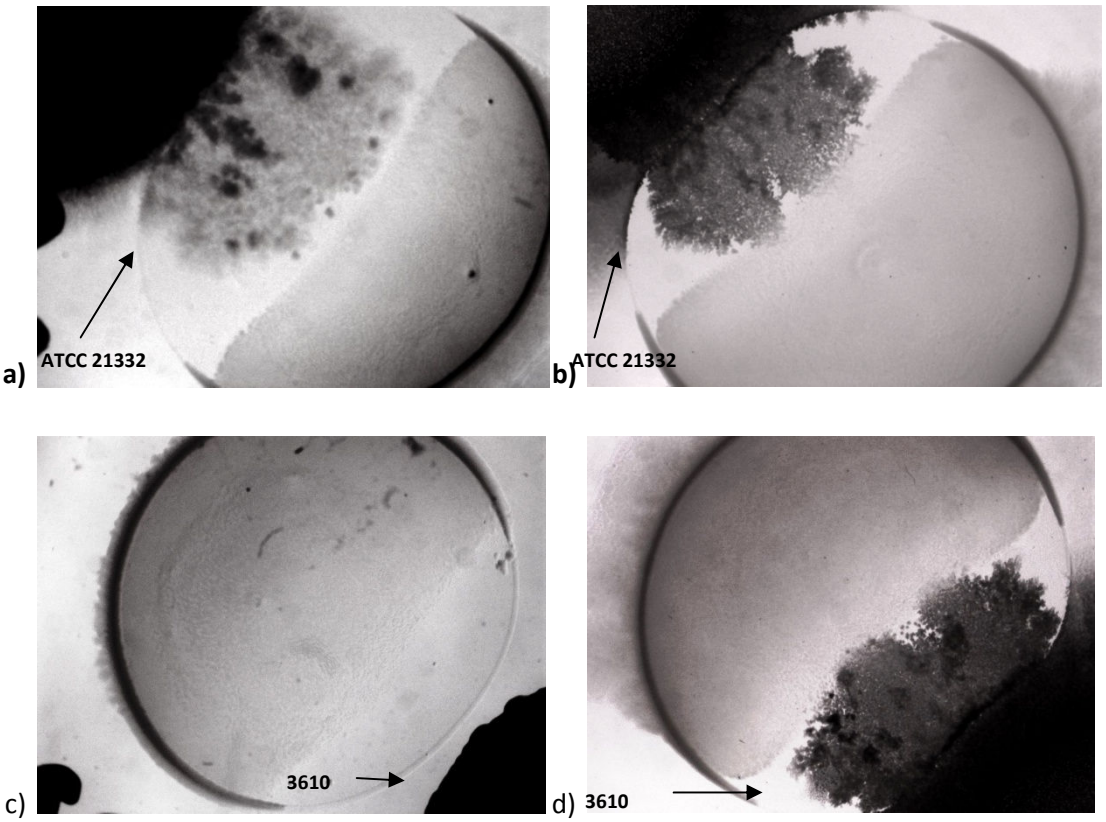
Slika 17 Top agar s E.coli 536 ploče i B.subtilis JH642, OKB105, ATCC 21332 a) 50µl supernatanta prekonoćnih kultura iz LB(lijevo), NGM (desno), b) 10µl (lijevo) i 50µl (desno) supernatanta prekonoćnih kultura iz Cooper-medija, c) 10µl prekonoćne bakterijske kulture u LB(lijevo) i NGM(desno) mediju

Agar difuzija testom na LB podlozi nijedan soj *B.subtilis* (ATCC 21332, OKB105, 3610) na nijednoj temperaturi nije pokazao inhibiciju rasta *E.coli* 536 i MG 1665 (Slika 18 a.). JH642 soj ne proizvodi surfaktin i neovisno o podlozi i temperaturi nije pokazao inhibiciju rasta *E.coli*. Na NGM podlozi *B.subtilis* ATCC 21332, 3610 pokazali su inhibiciju rasta *E.coli* 536 i MG 1665 (Slika 19). Inhibicija rasta bila je veća za *E.coli* 536. ATCC 21332 soj pokazao je najjaču inhibiciju za oba soja *E.coli* pri svim temperaturama. Efekt inhibicije bio jači na 28°C nego na 37°C (Slika 19). Soj *B.subtilis* OKB105 nije pokazao inhibitorni učinak na MG 1665 soju (Slika 20 a.), dok je inhibicija na 536 soj bila jako mala, rezultati su bili jednaki za sve temperature. Na određenim pločama unutar zone inhibicije zapazili smo rast rezistentnih kolonija, pri čemu je pojava rezistentnosti je

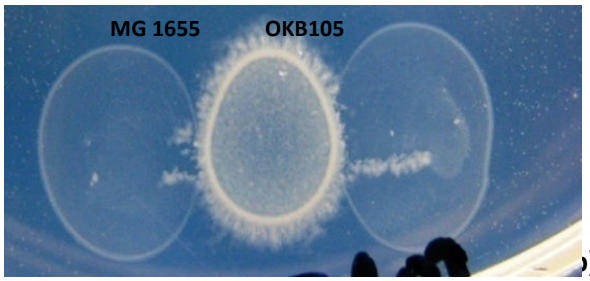
bila učestalija za 536 soj, a najmanje učestala na pločama s ATCC 21332. *E.coli* nije pokazala inhibitorni učinak na rast *B.subtilis* sojeva.

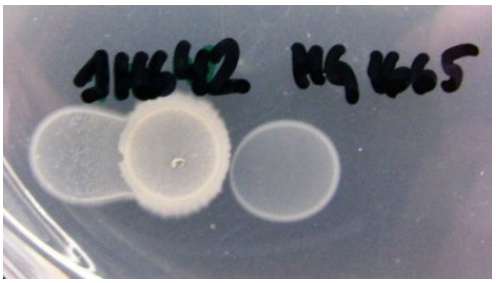


Slika 18 Inhibicijski učinak ATCC 21332 na MG1665 na 28°C a) LB podloga b) NGM podloga



Slika 19 Inhibicija rasta MG1665 uz djelovanje ATCC 21332 (a. i b.) i 3610 (c. i d.) na 28°C (a. i c.) i 37°C (b. i d.) Povećanje 6.3x

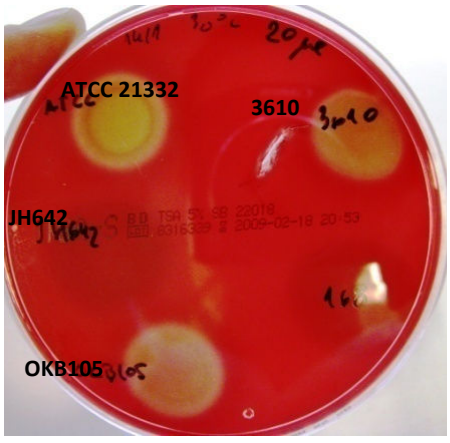
a) 

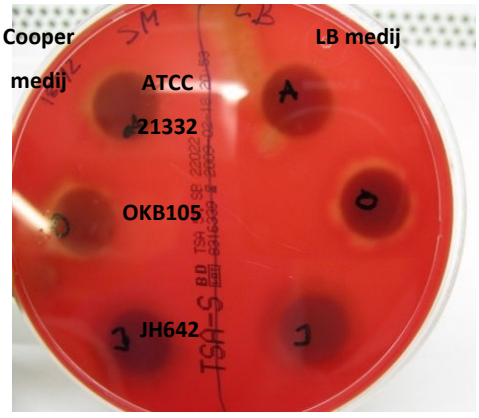


Slika 20 *B.subtilis* OKB105 (a.) i JH642 (b.) nisu pokazali inhibiciju rasta MG1665.

3.2. Proizvodnja surfaktina

Bakterijske kulture sojeva *B.subtilis* ATCC 21331, OKB105 i 3610 pokazuju proizvodnju surfaktina. Prema jačini hemolitičkog djelovanja možemo zaključiti da OKB105 pokazuje najjaču proizvodnju surfaktina, zatim slijede ATCC 21332 i na kraju 3610 s najslabijim hemolitičkim djelovanjem. JH642 negativna je kontrola i ne pokazuje hemolitičko djelovanje (Slika 21 a.). U supernatantu nismo mogli dokazati postojanje surfaktina. Svijetli krugovi koje vidimo posljedica su rasta bakterija koje su ostale u supernatantu, a ne smog supernatanta (Slika 21 b.).

a) 

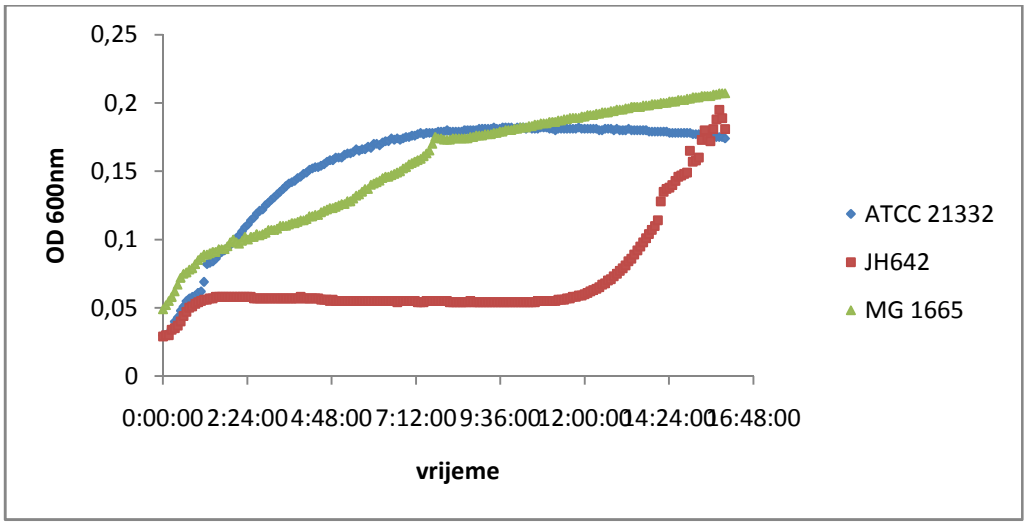
b) 

Slika 21 Hemolitičko djelovanje B.subtilis ATCC 21332, OKB105, 3610 i JH642 a) bakterijskih stanica i b) supernatant iz Cooper (lijevo) i LB(desno) tekućeg medija (temp. 30°C)

.

3.3. Krivulja rasta

Krivulje rasta prikazane su na slici 22. Bakterijski sojevi pokazali su nejednak rast u tekućem NGM mediju. *E.coli* MG 1665 i *B.subtilis* ATCC 21332 ušle su u log fazu rasta vrlo brzo nakon početka mjerenja. *B.subtilis* JH642 pokazao je početnu lag fazu rasta tokom koje nema povećanja broja stanica. Za JH642 soj lag faza je trajala 12h. Za svako mjerenje napravljene su 3 replike. JH642 soj nije pokazao rast u 2 od 3 mjerenja. Generacijsko vrijeme za svaki soj prikazan je u Tablici 4.



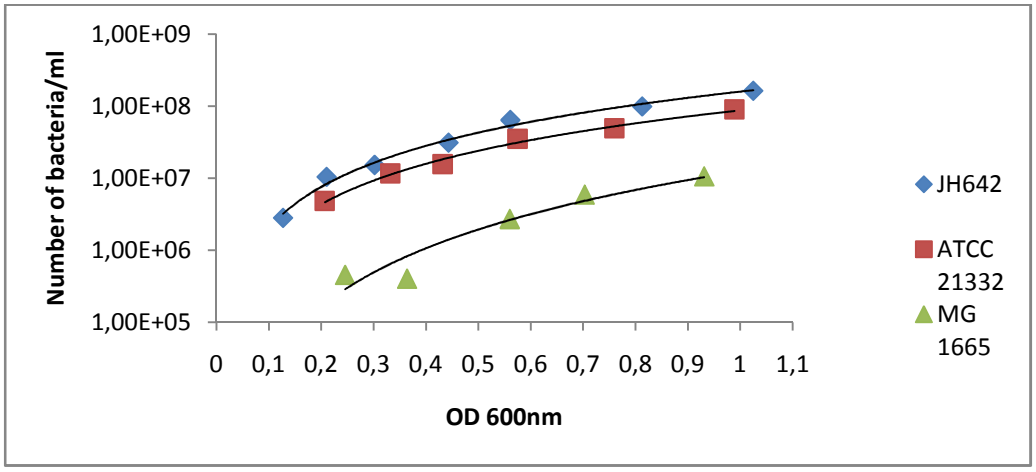
Slika 22 Krivulja rasta u tekućem NGM mediju na 37°C za bakterijske sojeve E.coli MG 1665 i B.subtilis ATCC 21332, JH642

Tablica 4 Generacijsko vrijeme u NGM tekućem mediju na 37°C za bakterijske sojeve E.coli MG 1665, 536 i B.subtilis ATCC 21332, JH642, OKB105

Bakterijski soj	Duplikacijsko vrijeme/min
MG 1665	140
ATCC 21332	140
JH642	120

3.4. Ovisnost stanične gustoće bakterijske kulture i broja bakterija u tekućem LBu

Rezultati su prikazani na slici 23. JH642 pokazuje malo veći broj stanica u odnosu na ATCC 21332 za isti OD 600nm. MG1665 sadrži oko 10 puta manje stanica u odnosu na ATCC 21332 i JH642 pri istom OD 600nm. Ovi podatci su važni kako bi u eksperimentu kompeticije bakterijske stanice mogli pomiješati u željenom omjeru.



Slika 23 Prikaz stanične gustoće na 600nm i odgovarajućeg broja bakterijskih stanica/ml tekućeg LB - a, 37°C

3.5. Selektivne podloge

Kako bismo mogli točno odrediti broj bakterijskih stanica *E.coli* i *B.subtilis* tokom kompeticije ispitali smo rast bakterija na različitim selektivnim podlogama.

Minimalna podloga

a. s različitim sastavom aminokiselina

B.subtilis ATCC 21332 i JH642 (*trpC2 pheA1*) pokazali su jednako slab rast na minimalnoj podlozi s dodanim fenilalaninom i triptofanom u usporedbi s rastom na LB podlozi. Kada smo prekonoćnu kulturu nacijepili u razrjeđenju 10^{-6} i 10^{-7} na podlogama nismo opazili rast niti jedne kolonije. Nasađivanjem prekonoćnih kultura bez prethodnog razrjeđivanja dolazi do rasta bakterija, ali je manje u odnosu na LB podlogu.

E.coli MG 1665 (pro) nije pokazivao rast na minimalnoj podlozi suplementiranoj s fenilalaninom i triptofanom, dok je na podlozi s prolinom pokazivao normalan rast.

b) s različitim sastavom šećera

Na minimalnoj podlozi obogaćenoj s svim aminokiselinama i glukozom kao jedinim izvorom ugljika *B.subtilis* ATCC 21332 i JH642 pokazali su rast jednak onome na LB-podlozi. Na istoj minimalnoj podlozi smo s laktozom kao jedinim izvorom ugljika iste bakterije nisu rasle.

LB-podloga s dodatkom antibiotika

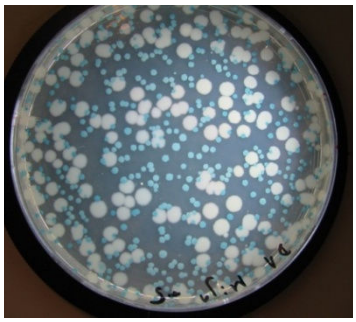
Dodatak ampicilina pokazao je inhibiciju rasta svih bakterija osim 536 soja. Premda inhibiran rastom na podlozi s ampicilinom, kod soja ATCC 21332 nalazimo pojavu rezistentnih kolonija. Sojevi ATCC 21332, JH642 i MG 1665 u potpunosti su bili inhibirani nalidiksičnom kiselinom.

MacConkey podloga

MacConkey podloga ne podržava rast gram pozitivnih bakterija. Sukladno s time, nijedan korišteni soj *B.subtilis* nije raso na podlozi. *E.coli* MG 1665 pokazao je prosječno 8 puta manji rast na MacConkey podlozi u odnosu na LB podlogu.

LB-podloga s dodanim X-gal i IPTG-om

B.subtilis nije pokazao sposobnost korištenja laktoze i na ovoj podlozi formira kolonije bijele boje. *E.coli* MG 1665 može koristiti laktozu i daje plave kolonije (Slika 24). β-galaktozidaza test pokazao se kao najboljom i najjednostavnijom za određivanje broja bakterijskih stanica *E.coli* i *B.subtilis* tokom kompeticije i korištena je u eksperimentima kompeticije.



Slika 24 β-galaktozidaza test za miješanu kulturu E.coli i B.subtilis, pokazao je da E.coli MG 1665 koristi laktozu (plave kolonije), dok B.subtilis ne koristi lakzotu (bijele kolonije)

3.6. Eksperiment kompeticije

Kompeticija je mjerenja u omjerima *E.coli:B.subtilis* 1:1, 1:13,1:40 i 1:180. Omjeri 1:13,1:40 i 1:180 dali su jednake rezultate kompeticije, te smo ih tokom statističke obrade uzeli kao jednu grupu, pri čemu je svaki omjer jednak ponavljanju eksperimenta. Dobiveni rezultati za sve omjere prikazani su obliku relativnog kompetitivnog fitnes bakteriju u kompeticiji prema onome bez kompeticije (Tablica 5) i relativnog kompetitivnog fitnes *E.coli* prema *B.subtilis* (Tablica 6).

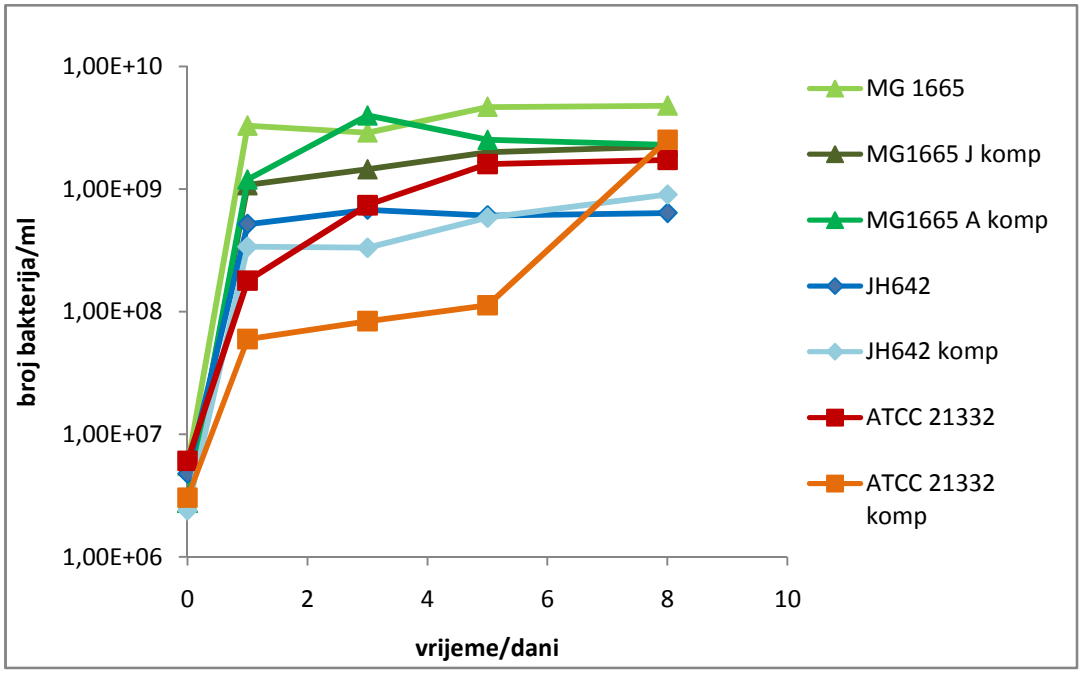
Tablica 5 Utjecaj različitih početnih omjera *E.coli:B.subtilis* na relativni kompetitivni fitnes bakterije u kompeticiji s obzirom na onaj bez kompeticije. P-vrijednost dobivena je prema t-testu, two-tailed, ne spareni. Vrijednosti s P<0,05 uzete su kao statistički značajne.

			Relativni fitnes (W) (komp/bez komp)		
Bakterija	početni omjer	n	srednja vrijednost	SD	P
MG1665 komp s JH642	1:1	4	0,950	0,074	0,227
MG1665 komp s JH642	10x više *B.subtilis*	2	1,025	0,108	0,775
JH642 komp	1:1	4	1,119	0,072	<0,05
JH642 komp	10x više *B.subtilis*	2	1,049	0,037	0,204
MG1665 komp s ATCC21332	1:1	3	0,973	0,097	0,589
MG1665 komp s ATCC21332	10x više *B.subtilis*	3	0,885	0,022	<0,001
ATCC21332 komp	1:1	3	0,889	0,305	0,485
ATCC21332 komp	10x više *B.subtilis*	3	1,180	0,040	<0,001

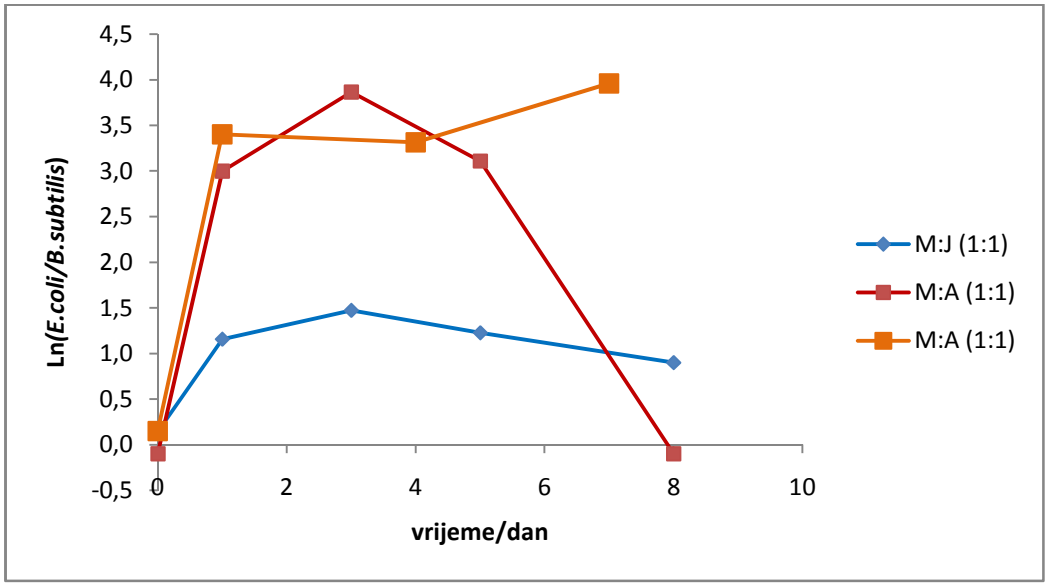
Tablica 6 Utjecaj različitih početnih omjera *E.coli:B.subtilis* na relativni kompetitivni fitnes *E.coli* u odnosu na *B.subtilis* u eksperimentu kompeticije. P-vrijednost dobivena je prema t-testu, two-tailed, ne spareni. Vrijednosti s P<0,05 uzete su kao statistički značajne.

			Relativni fitnes (W) (*E.coli/B.subtilis*)		
E.coli : B.subtilis	početni omjer	n	srednja vrijednost	SD	P
MG1665 : JH642	1:1	4	1,134	0,011	<0,001
MG1665 : JH642	10x više *B.subtilis*	2	2,379	0,010	<0,001
MG1665 : ATCC 21332	1:1	3	1,420	0,539	0,248
MG1665 : ATCC 21332	10x više *B.subtilis*	3	1,521	0,101	<0,05

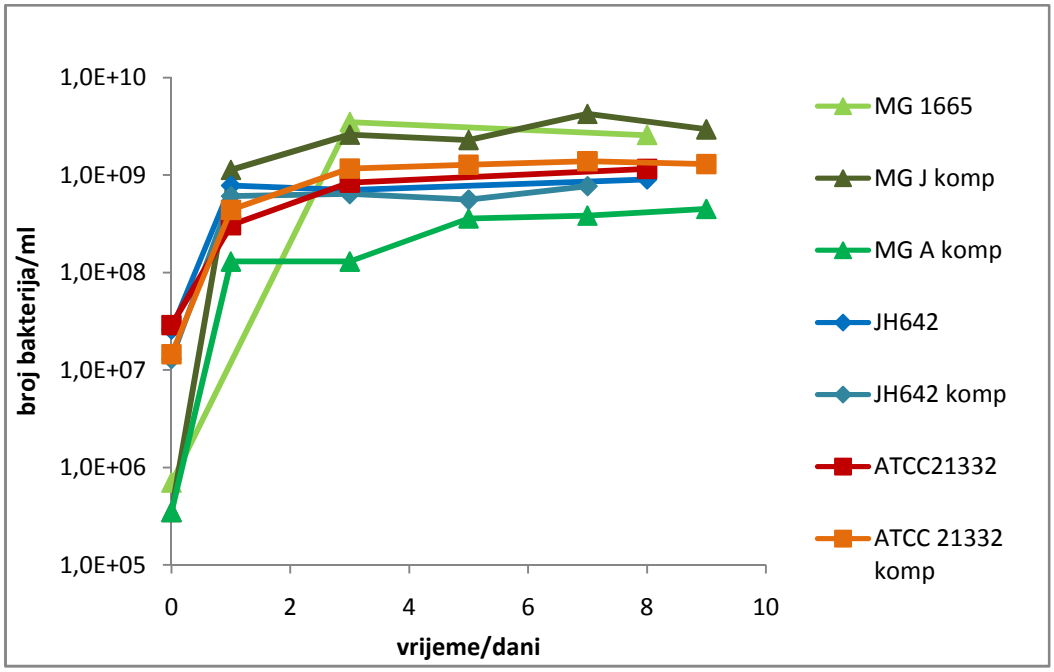
Budući da pri mjerenju relativnog kompetitivnog fitnes u obzir uzimamo smo početni i konačni broj bakterija, rezultati pokazuju generalni trend bakterije, ali i ne uzimaju u obzir put kojim je bakterija došla u konačno stanje. Kako bismo dobili spoznaje o dinamici populacija tokom kompeticije, broj bakterija je mjeren svaka 2 dana. Rezultati dobiveni mjerenjem dinamike populacija tokom 7-9 dana prikazani su u obliku krivulje rasta bakterija s i bez kompeticije (Slika 25. za omjer 1:1 i Slika 27 za omjer 1:40) i kao prirodni logaritam omjera *E.coli i B.subtilis* tokom vremena t (Slika 26 za omjer 1:1, Slika 28 za omjer 1:40).



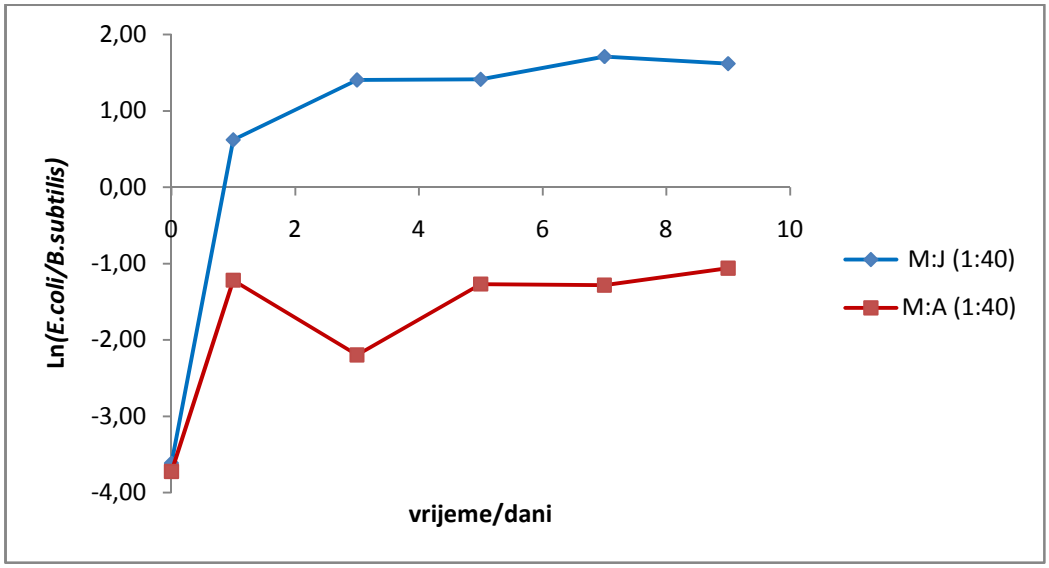
Slika 25 Krivulja rasta bakterije s i bez kompeticije za početni omjer 1:1 . Oznake: komp –kompeticija, MG1665 J komp i MG1665 A komp označavaju MG1665 u kompeticiji s JH642, tj. ATCC 21332. JH642 komp i ATCC 21332 komp- JH642, tj. ATCC 21332 u kompeticiji s MG1665. Oznake imaju isto značenje na svim slikama.



Slika 26 Prirodni logaritam omjera *E.coli:B.subtilis* u slučaju početnog omjera 1:1. Oznake: M:J za kompeticiju MG1665:JH642, M:A za kompeticiju MG1665:ATCC 21332. Oznake imaju isto značenje na svim slikama.



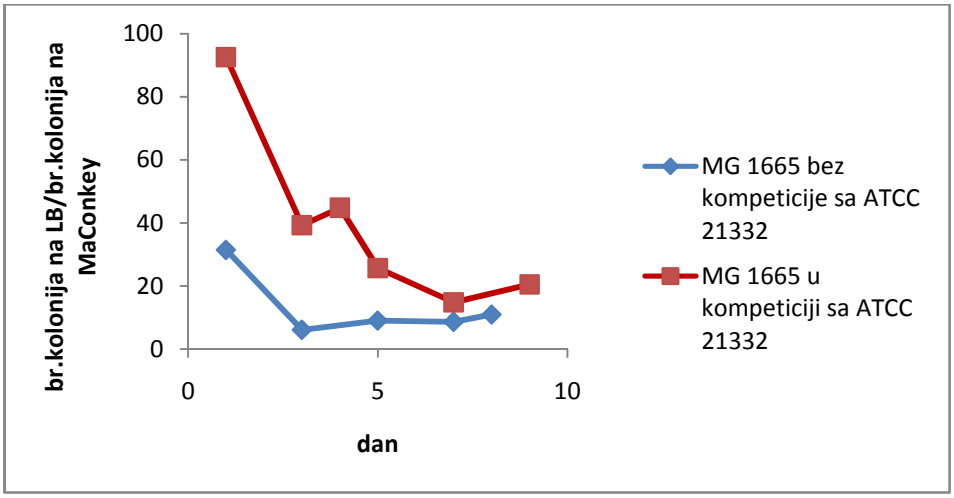
Slika 27 Krivulja rasta bakterija s i bez kompeticije za omjer *E.coli:B.subtilis* 1:40. (za oznake vidi Sliku 29.)



Slika 28 Prirodni logaritam omjera *E.coli:B.subtilis* u slučaju početnog omjera 1:40. Oznake: M:J za kompeticiju MG1665:JH642, M:A za kompeticiju MG1665:ATCC 21332.

3.7. Utjecaj kompeticije na redukciju rasta na MacConkey podlozi

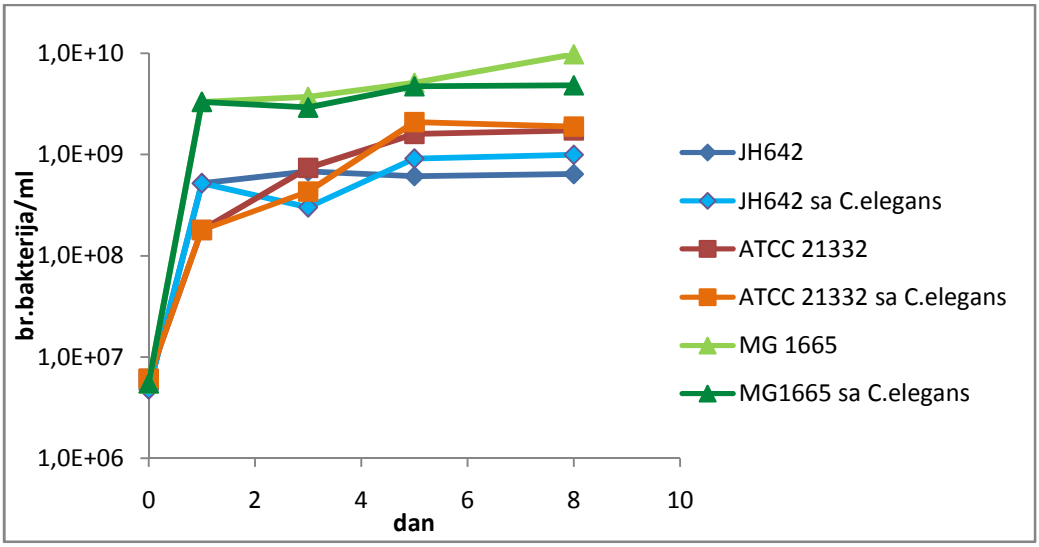
Kako bismo utvrdili utječe li kompeticija na rast bakterija na MacConkey podlozi, uzorci MG 1665 bez kompeticije, u kompeticija s JH642 i ATCC 21332 tokom eksperimenta kompeticije su nasađeni na MacConkey podlogu. Rezultati su prikazani na slici 29. U slučaju bez kompeticije, kompeticije s JH642 i kompeticije s ATCC 21332 u 1:1 početnim omjerom rast je bio jednak , ali 8 puta manji na MacConkey podlozi. U slučajevima kompeticije s ATCC 21332 kada je početni omjer bakterija bio u korist ATCC 21332 (1:3 i 1:20) *E.coli* je rastao 3 puta manje u odnosu na slučaj bez kompeticije, te prosječno 21 puta manje u odnosu na kontrolu. U svim slučajevima prvi dan mjerenja bilježimo najveću osjetljivost bakterija i značajno smanjene rasta, nakon čega dolazi do pada osjetljivosti na konstantu vrijednosti, slučaj bez kompeticije, i polaganog pada vrijednosti tokom cijelog eksperimenta, slučaj kompeticije s ATCC 21332.



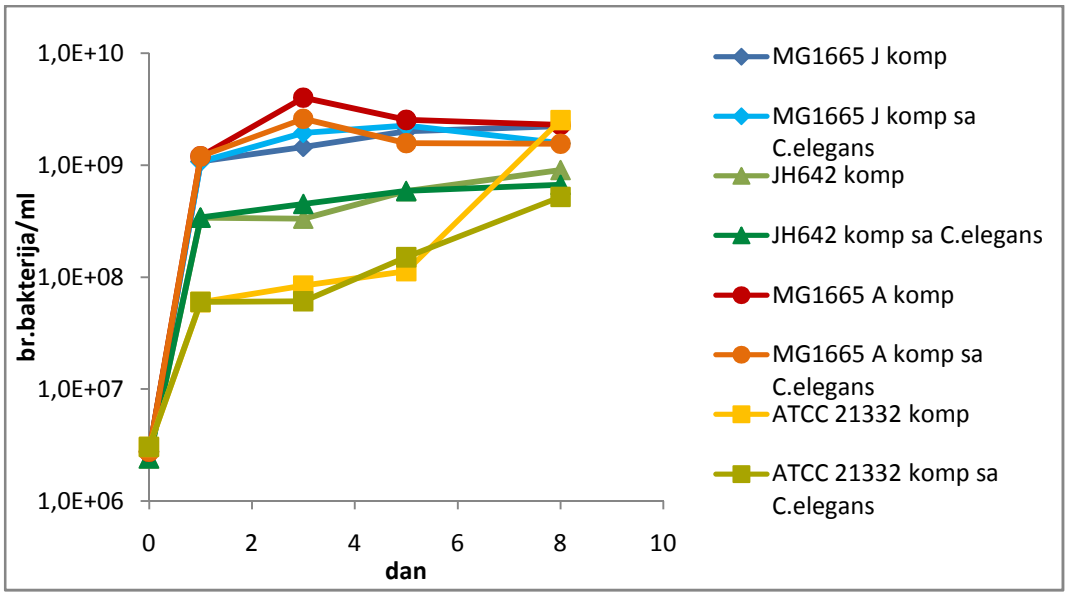
Slika 29 Redukcija rasta *E.coli* MG 1665 na MacConkey podlozi tokom 9 dana mjerenja. Rezultati su prikazani kao omjer broja *E.coli* MG1665 kolonija na LB podlozi prema broju kolonija na MacConkey podlozi. Plava linija prikazuje slučaj bez kompeticije s ATCC 21332, crvena linija pokazuje slučaj kompeticije s ATCC 21332 za početni omjer 1:40 (Isti rezultati dobiveni su i za početne omjere 1:13 i 1:180)

3.8. Eksperiment s kompeticijom i predacijom

Korištenje jednog predatora *C.elegans* nije pokazao utjecaj na rast bakterija u sustavima s i bez kompeticije (Slika 30 i Slika 31). Ni u jednom slučaju nije primijećen smanjen rast bakterije uslijed predacijskog pritiska. Također predacija nije imala utjecaj na ishod kompeticije.



Slika 30 Utjecaj predatora *C.elegans* na broj bakterija u slučajevima bez kompeticije.



Slika 31 Utjecaj predatora *C.elegans* na broj bakterija u slučajevima s kompeticijom. Oznake: komp. označava bakteriju u kompeticiji. MG 1665 A komp i MG 1665 J komp označavaju MG 1665 u kompeticiji s ATCC 21332, tj JH642.

4. Rasprava

Do sada, većina istraživanja interakcija između predatora i plijena, te kompetitivnih interakcija bavila su se ovim temama odvojeno. Tek u novije vrijeme prepoznaje se važnost njihovog zajedničkog utjecaja na sustav. Mnogi teoretski modeli nastoje predvidjeti i objasniti ekološke fenomene vezane uz ove biološke interakcije. Istraživanja interakcija predatora i plijena kod bakterija i bakteriovore faune odvojeno su se bavila sljedećim temama: (1) utjecaj predatora na ukupni broj bakterija, (2) rast i životni vijek oblića ovisno o tipu bakterije i (3) obrambeni mehanizmi u bakterija (Pederson i sur. 2009). Tijekom ovog istraživanja nastojali smo iskoristiti jednostavnost, pristupačnost i lako rukovanje sustavom s bakterijama i bakteriovornim oblićem za svrhu konstrukcije eksperimentalnog sustava za praćenje utjecaja predatora na populacijsku dinamiku plijena koji je u kompeticiji. Kao eksperimentalne organizme odabrali smo oblića *C.elegans* i bakterije *E.coli* i *B.subtilis*. Sva tri organizma dobro su okarakterizirani, s mnogim mutantnim sojevima, te su poznati standardni modelni organizmi u laboratoriju. *B.subtilis* proizvodi mnoge biosurfaktante, od kojih je najpoznatiji i najjačeg djelovanja antibiotik surfaktin. Surfaktin je poznat zbog svog širokog spektra anti-bakterijskog, anti-fungalnog, anti-mikoplazma i antiviralnog djelovanja (Stein 2005). Ako se fokusiramo na djelovanje surfaktina na *E.coli*, pokazan je inhibitorni učinak surfaktina na rast (Huang i sur. 2008, Fernades i sur 2007, Nandy i sur 2007) i formaciju biofilma (Mireles i sur. 2001).

4.1. Inhibicija rasta i proizvodnja surfaktina

Kako bi pronašli optimalne uvijete za proučavanje kompeticije između bakterija *B.subtilis* i *E.coli* ispitali smo inhibiciju rasta na različitim medijima i pri različitim temperaturama. Različiti kemijski sastav medija može jako utjecati na proizvodnju surfaktina (Cooper i sur. 1981, Al-Qumber i Tagg 2006). Povećana proizvodnja surfaktina u mediju trebala bi pokazati i jači inhibicijski efekt. LB, NGM i Cooper mediji odabrani su za uzgoj bakterija. LB je hranjivim tvarima bogat medij, NGM hranjivim tvarima je siromašan medij i standardni je medij za uzgoj C.elegans, dok je Cooper medij poznati medij za povećanu proizvodnju surfaktina u *B.subtilis* sojevima (Cooper i sur. 1981). Kako bi ustanovili da li različiti sojevi imaju različit

inhibitorni učinak, inhibiciju smo testirali s tri različita soja *B.subtilis* (ATCC 21332, 3610 i OKB105) za koje je pokazano da proizvode surfaktin (Nakano i sur. 1988, Julkowska i sur. 2005). Supernatant izoliran iz bakterijskih kultura uzgajanih u svim tekućim medijima nije pokazao inhibicijski učinak na *E.coli* u top agaru (Slika 17 a) i b)), te nije bio pozitivan na surfaktin (Slika 21 b)). Ovime smo pokazali da *B.subtilis* uzgajan u tekućem mediju ne proizvodi ili proizvodi vrlo malu količinu surfaktina, te da tekući medij nije pogodan za proučavanje kompeticije. Ovo opažanje za *B.subtilis* potvrđeno je i u drugim istraživanjima (Al-Qumber i Tagg 2006, Yan i sur 2003). Inhibicija rasta E.coli pokazana je agar-difuzija testom na NGM podlozi, dok na LB podlozi nije bilo nikakve inhibicije (Slika 18). Ovo je u suglasnosti s činjenicom da mala količina hranjivih tvari u okolišu potiče sintezu surfaktina, pri čemu bi očekivali da na LB bogatoj podlozi neće doći do njegove produkcije, barem ne u količinama dovoljnim za inhibicijsko djelovanje (Sonenshein 1993). Radi tehničkih razloga i zahtjevne pripreme nismo ispitali inhibicijsko djelovanje na čvrstoj Cooper podlozi.

Kao što je i očekivano različiti sojevi *B.subtilis* pokazali su različitu jačinu inhibicije, koja je također ovisila o soju *E.coli*. JH642 nema sposobnost proizvodnje surfaktina i nije imao inhibicijski učinak na *E.coli* (Slika 20 b)). ATCC 21332 i 3610 prirodni su izolati te smo i očekivali da će pokazati inhibicijsko djelovanje (Slika 19). OKB105 laboratorijski je soj s ugrađenim genskim lokusom za proizvodnju surfaktina (*sfp* lokus) iz ATCC 21332 (Nakano i sur 1988), te nismo očekivali vrlo slabo do nikakvo inhibicijsko djelovanja ovog soja (Slika 20 a)). Štoviše, testiranje sojeva na produkciju surfaktina pokazalo je najveće hemolitičko djelovanje OKB105. Jačina inhibicije u ATCC 21332 i 3610 soju bila je sukladna s intenzitetom inhibcije, budući da je 3610 pokazao manje hemolitičko djelovanje i manju inhibiciju (Slika 21 a)). Ovo možemo objasniti činjenicom da *B.subtilis* ima sposobnost produkcije više različitih antimikrobnih tvari, te da se efekt ostvaruje njihovim zajedničkim djelovanjem, a ne utjecajem pojedinačne tvari (Stein 2005). *E.coli* nije pokazao inhibicijsko djelovanje na *B.subtilis*, što nam govori da je inhibicija rasta jednosmjerna i ide smo u smjeru *B.subtilis* prema *E.coli.*

Ispitivanje inhibicije na različitim temperaturama pokazala su bolju inhibiciju na 28°C u odnosu na 37°C (Slika 19). Ova tendencija pokazana je u istraživanjima optimizacije antimikrobnog učinka surfaktina na *E.coli* (Huang i sur. 2008). Suprotno očekivanjima druga studija je pokazala da je proizvodnja surfaktina najveća pri temperaturi 37°C i pada s sniženjem temperature na 25°C, dok proizvodnja drugog poznatog *B.subtilis* antibiotika iturina raste s sniženjem temperature i najveća je pri 25°C (Ohno i sur. 1995). Iz ovih spoznaja možemo

pretpostaviti da bolja inhibicija na 28°C nije posljedica veće proizvodnje surfaktina, već zajedničkog djelovanja s drugim antimikrobnim tvarima. Također, budući da je prirodno stanište *E.coli* crijevo sisavaca, u kojem je temperatura oko 36°C, moguće je da niže temperature uzrokuju stres kod *E.coli* i čine je senzitivnijom na antimikrobna djelovanja.

Na temelju navedenih eksperimenata odlučili smo da ćemo u daljnjem istraživanju koristiti *B.subtilis* ATCC 21332 soj, s najsnažnijim antimikrobnim djelovanjem, te *E.coli* MG 1665 soj, radi velikog broja lako dostupnih mutantnih auksotrofa, što će nam omogućiti lakšu selekciju bakterija putem selektivnog medija. JH642 soj koji nema inhibicijskog utjecaja koristili smo kao kontrolu za utjecaj antibiotika na kompeticiju, te kao kontrolu za provjeru stope kompeticije za resurse. Budući da ATCC 21332 i JH642 nisu izogeni sojevi, svjesni smo da JH642 nije dobar izbor kontrole. Izogeni soj ATCC 21332 negativan na produkciju antibiotika nije nam bio dostupan, te smo se morali zadovoljiti ovim izborom. Čvrsta NGM podloga i temperatura od 28°C dali su najbolji inhibitorni efekt, što bi trebalo dati jači selekcijski pritisak na *E.coli* i osigurati bolje praćenje kompeticije.

4.2. Krivulja rasta

Kako bi okarakterizirali rast bakterija koje ćemo koristiti u eksperimentima kompeticije napravili smo krivulju rasta u NGM tekućem mediju. Krivulja rasta pokazala je vrlo dugo duplikacijsko vrijeme za sve bakterije (120-140 min) (Tablica 4). Također stacionarnu fazu sve bakterije su pokazale na OD 600nm oko 0.2. Ovo možemo objasniti činjenicom da je NGM hranjivim tvarima siromašan medij (u usporedbi s LB medijem). JH642 pokazao je neuobičajeno dugu lag fazu, koju ne nalazimo kod ATCC 21332 i MG1665 (Slika 22). Ovu pojavu zapazili smo i kod krivulje rasta u tekućem LB mediju (podatci nisu pokazani). Postojanje ove lag faze ne znamo objasniti, kao ni razlog zbog kojeg je smo jedan uzorak pokazao rast. Budući da su tekući i čvrsti medij strukturno dva potpuno različita okoliša, te bakterije na njima pokazuju drugačiju fiziologiju, što vjerojatno utječe i na njihov rast, ove podatke treba uzeti kao okviran opis rasta, budući da rast bakterija na čvrstom mediju tokom privih 24 sta nismo mogli mjeriti.

4.3. Selekcijske podloge

Prije početka eksperimenta testirali smo velik broj selekcijskih podloga kako bi osigurali jednostavno brojanje *E.coli* i *B.subtilis* bakterija u eksperimentu kompeticije isprobali. Na minimalnom mediju s dodanim Phe i Trp za koje je JH642 auksotrof neočekivano nismo uočili rast *B.subtilis*. Istraživanje Sung i Yasbin (2000) pokazalo je isti fenomen. Oni su proveli detaljnije istraživanje i ustvrdili da *B.subtilis*, auksotrof za određene aminokiseline, ako se prvo uzgaja na mediju koji sadrži sve aminokiselinama (u našem slučaju NGM), te se zatim prebaci na minimalni medij koji sadrži smo esencijalne aminokiseline pokazuje $13^3 – 10^4$ puta manji rast.

Za selekciju putem antibiotika odabrali smo antibiotike koji su poznati po inhibiciji rasta gram negativnih bakterija, ampicilin i nalidiksična kiselina. Oba antibiotika inhibirala su rast i *E.coli* i *B.subtilis*. Na podlozi s ampicilinom ATCC 21332 pokazao je pojavu mnogih rezistentnih kolonija, dok je *E.coli* 536 pokazao gotovo potpunu rezistentnost. Obje bakterije nalazimo u okolišu, ATCC 21332 prirodni je izolati iz zemlje, dok je 536 humani uropatogeni soj, pri čemu je vrlo vjerojatno da su se već prije susreli s nekim antibioticima te možemo pretpostaviti da su u takvim uvjetima stekle veću rezistentnost na antibiotike. Radi velike upotrebe antibiotika u medicini i poljoprivredi, sve veći broj bakterija pokazuje rezistentnost s antibiotike, te dobiveni rezultati nisu iznenađujući (Neu 1992)

MacConkey podloga poznata je kao podloga koja dopušta rast gram negativnih dok sprječava rast gram pozitivnih bakterija, te se često koristi kao selektivni medij za *E.coli* (http://www.microbelibrary.org /ASMOnly/details.asp?id=1976&Lang, Dineshkumar i sur. 2002). Očekivano, *B.subtilis* nije pokazao rast na ovoj podlozi, dok je *E. coli* MG1665 pokazao reduciran rast. Ispitivanje nismo proveli za 536 soj. Daljnjim istraživanjem pokazali smo da *E coli* pokazuje 8 puta manji rast na MacConkey podlozi.

Nacjepljivanjem B.subtilis na minimalni medij s laktozom pokazali smo da *B.subtilis* ne koristi laktozu kao izvor ugljika. Iz literaturnih izvora poznato nam je da je soj *E. coli* MG1665 sposoban za korištenje laktoze (Neidhardt 1987). Kao selektivni medij isprobali smo LB suplemetiran s X-gal i IPTG-om. Na ovom mediju bakterije koje koriste laktozu će biti plave, dok će ostale biti bijele (Slika 24). Podloga se pokazala zadovoljavajućom za određivanje broja pojedine bakterije, te smo je koristili u daljnjim eksperimentima.

4.4. Eksperiment kompeticije

Eksperimenti kompeticije provedeni su na različitim omjerima E.coli i B.subtilis. Svi navedeni rezultati su preliminarnog tipa, budući da radi nedostatka vremena i tehničkih problema, nismo bili u mogućnosti napraviti veći broj ponavljanja. Mali broj ponavljanja uvelike je utjecao i na P vrijednost t testa, radi čega određena opažanja ne možemo uzeti kao statistički značajna. S obzirom na prikupljene preliminarne podatke možemo donijeti sljedeće zaključke i pretpostavke.

Početni omjer bakterija u kompeticiji imao je velik utjecaj na ishod kompeticije i populacijsku dinamiku bakterija. Suprotno očekivanjima omjer 1:1 nije pokazao inhibitorni učinak ATCC 21332 na MG1665. Neovisno o *B.subtilis* s kojim je bio u kompeticiji MG1665 nije pokazao reduciran rast (Slika 25), dok je kompetitivni fitnes bio jednak onome MG1665 bez kompeticije ($W \approx 1$, Tablica 5. prvi i četvrti red). Iznenađujuće, kompeticija je djelovala pozitivno na rast JH642 ($W=1,119$, $SD=0,072$, $P<0,05$, Tablica 5). S druge strane ATCC 21332 je pokazao do 10 puta slabiji rast tokom prvih 5 dana, nakon čega je u 2 slučaja dosegao rast jednak onome bez kompeticije, dok u jednom slučaju nakon početne inhibicije ne dolazi do promjene rasta (Slika 25 i Slika 26). Budući da kompetitivni fitnes uzima u obzir smo početni i konačni broj bakterija ovim mjerenjem ne vidimo početnu inhibiciju u rastu ATCC 21332 ($W \approx 1$, Tablica 6). Suprotan učinak E.coli na ATCC 21332 i JH642 sojeve možemo objasniti činjenicom da ova dva soja nisu izogena, te vrlo vjerojatno imaj u različitu fiziologiju. Bolji rast JH642 možemo objasniti modifikacijom okoliša od strane MG1665 što ga zatim čini povoljnijim za JH642. Ovakav metabolički komenzalizam česta je pojava u bakterijskim sustavima (Peterson i sur. 2006, Beam i Perry 1974) Budući da u slučaju miješane kulture s JH642 (ne proizvodi surfaktin) nije bilo redukcije u rastu bakterija možemo pretpostaviti da tokom trajanja eksperimenta bakterije nisu bile u kompeticiji za resurse. Inhibiciju rasta ATCC 21332 u omjeru 1:1 možemo objasniti uz pretpostavku da određeni metabolički produkti ATCC 21332 mogu potaknuti proizvodnju obrambenih tvari u MG1665 koje zatim imaju inhibitorni učinak na ATCC 21332. Ipak, agar difuzija test nije pokazao inhibitorni učinak MG1665 na rast ATCC 21332. Ovo smo upućuje na činjenicu da kada raste sam na podlozi MG1665 ne producira tvari toksične za B.subtilis, te da je inhibicija posljedica kontakta između MG1665 i ATCC 21332 bakterijskih stanica. Rast broja ATCC 21332 nakon 5 dana stacionarne faze, ne znamo objasniti. Također, budući da ATCC

21332 proizvodi surfaktin na prijelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta, očekivali bi da će ponovni rast ATCC 21332 potaknuti proizvodnju surfaktina, te kao posljedicu imati smanjen rast MG1665. Iako smo smanjenje rasta MG1665 zapazili, ono nije bilo statistički značajno. Mogući razlog je da (1) količina proizvedenog surfaktina bila premala da bi imala utjecaj na E.coli (poznato je da surfaktin ostvaruje inhibicijski učinak na E.coli tek pri koncentracijama između 15.625 μg/mL i 31.25 μg/mL (Huang i sur. 2008)) ili (2) da u trenutku posljednjeg mjerenja ATCC 21332 još nije počeo s produkcijom surfaktina, te bi za opažanje inhibicije bilo potrebno eksperiment provesti u dužem vremenskom period.

Kako bi vidjeli da li inhibicijski učinak ATCC 21332 i MG1665 ovisi o početnom omjeru u ovih bakterija eksperiment kompeticije smo proveli pri omjerima 1:13, 1:40 i 1:180 u korist *B.subtilis*. Pri tome smo očekivali da će veći početni broj ATCC 21332 pokazati inhibiciju rasta MG1665 te da će efekt rasti s povećanjem udjela ATCC 21332. Također, pretpostavili smo kako će se opaženo inhibicijsko djelovanje MG1665 smanjiti. Sukladno s očekivanjima veći udio ATCC 21332 pokazao je statistički značajnu inhibiciju rasta MG1665 ($W=0,885$, $SD=0,022$, $P<0,001$, Tablica 5), dok je ATCC 21332 pokazao malo bolji rast u kompeticiji nego bez kompeticije ($W=1,180$, $SD=0,040$, $P<0,001$, Tablica 5). Uspoređivanjem kompetitivnog fitnes MG1665 prikazanog preko relativnog fitnes *E.coli* prema *B.subtilis* možemo primijetiti da je on u kulturi s ATCC 21332 1,6 puta manji za MG1665 u odnosu na onaj u kulturi s JH642 (Tablica 5, drugi i četvrti red). Činjenicu da je u oba slučajeva kompetitivni fitnes MG1665 veći omjera posljedica je smanjenja početnog omjera bakterija u korist MG1665. Isto objašnjenje vrijedi i za 1:1 slučaj (Tablica 6). Suprotno očekivanjima efekt inhibicije nije se povećao s većim udjelom ATCC 21332. Bolji rast ATCC 21332 nam daje za pretpostaviti da MG 1665 nije djelovao inhibicijski na njegov rast. Miješana kultura MG1665 i JH642, kao i u slučaju početnog omjera 1:1, nije utjecala na rast ovih bakterija te je on u oba slučaja jednaka onom bakterija bez kompeticije ($W\approx1$, Tablica 5 drugi i četvrti red). Pozitivan rast JH642 u prisutnosti MG1665 nismo zapazili u ovim slučajevima, vjerojatno kao posljedicu smanjenog broja MG1665, što je dovelo do smanjenja pozitivnog efekta na ionako mali ($W=1,119$, Tablica 6). U daljnjim istraživanjima potrebno je istražiti utjecaj većih koncentracija MG1665 na rast JH642. Proučavanje inhibicijskog učinka iz perspektive dinamike populacija daje nam bolji opis djelovanja antimikrobnih surfaktanata *B.subtilis*. Slika 30 prikazuje rast bakterija tokom 9 dana kompeticije, dok nam Slika 31 govori o dinamici njihovih međusobnih odnos. Jasno možemo vidjeti da se inhibicijski učinak očituje u inhibiciji rasta MG1665 tokom prvog dana, kada sve kulture bilježe rast. Nakon toga bakterije

ulaze u stacionarnu fazu pri čemu im se broj više ne mijenja te ostaje isti sve do 9.dana mjerenja. Surfaktanti dakle utječu na početnu fazi rasta. Ako pojave promatramo iz perspektive prirodnih staništa početna faza rasta može se uzeti kao faza kolonizacije novog staništa, što bi dalo za pretpostavku da surfaktanti umanjuju kolonizacijsku sposobnost bakterija s kojima je *B.subtilis* u prostornoj kompeticiji. Ovu hipotezu o djelovanju surfaktanata nalazimo i u drugim radovima (Stein 2005). Također, ovakvo djelovanje je lako objasniti uzimajući u obzir fiziologiju proizvodnje surfaktina. Produkcija surfaktina energetski je skupa za bakteriju, te se ne odvija tijekom cijelog životnog ciklus bakterije. Nepovoljni uvjeti, kao što su velika gustoća populacije (prijelaz iz eksponencijalne u stacionarnu fazu), mala količina hranjivih tvari i ulazak u sporulaciju potiču produkciju surfaktina (Sonensheim 1993). U našem slučaju nasađivnje stanica na svježu podlogu uzrokuje eksponencijalni rast stanica. Pri kraju eksponencijalne faze počinje proizvodnja surfaktina što djeluje inhibitorno na rast *E.coli* uzrokujući smanjenje broja *E.coli* i ostavljajući prostor za rast većeg broja *B.subtilis* stanica. Nakon ulaska u stacionarnu fazu produkcija surfaktina i prostorna ograničenost ne dopušta veći rast MG1665. U budućim istraživanjima bilo bi vrlo zanimljivo vidjeti kako se mijenja dinamika populacija tokom prva 24 sta rasta. Ova istraživanja mogla bi biti posebno zanimljiva budući da je pokazano da produkcija surfaktina u B.*subtilis* ima i kanibalistički učinak, što za posljedicu ima oscilacije u broju *B.subtilis* bakterija nakon što dosegne maksimalnu gustoću populacije (Nandy i sur. 2006, Gonza`lez-Pastor i sur. 2003). Također, pokazano je da u miješanoj kulturi s *E.coli B.subtilis* preferira predaciju nad drugom bakterijom u odnosu na kanibalizam (Nandy i sur. 2006). Ovi rezultati dobiveni su miješanjem superantata stanica *E.coli i B.subtilis* (oko 10^{16} st od svake bakterije) u tekućem mediju. Puno bi zanimljivije bilo vidjeti kako će se kanibalizam i predacija očitovati u uvjetima paralelnog rasta obje bakterije na tvrdoj podlozi, što puno više odgovara stvarnoj situaciji u okolišu.

4.5. Utjecaj kompeticije na redukciju rasta na MacConkey podlozi

MacConkey podloga sadrži soli žući koje djeluju na integritet membrane što uzrokuje da gram pozitivne bakterije (koje ne sadrže staničnu stjenku) ne rastu na ovoj podlozi, dok gram negativne bakterije (sadrže staničnu stjenku povrh lipidne membrane) pokazuju rast (Rehse i sur. 2007). Tijekom istraživanja pokazali smo da *E.coli* MG1665 soj pokazuje smanjen rast na

MacConkey podlozi (Slika 29), što je zapaženo i kod drugih gram negativnih bakterija (Rehse i sur 2007). Djelovanje surfaktina i ostalih surfaktanata koje proizvodi *B.subtilis* temelji se na njihovom amfipatskom karakteru putem kojeg ulaze u interakciju s membranom nakon čega na više načina mogu narušiti integritet membrane i stanice (detaljnije opisno u 1.7 poglavlju). Budući da sastav MacConkey podloge i surfaktanti imaju slično djelovanje pretpostavili smo da će *E.coli* u kulturi s ATCC 21332 sojem dati smanjen rast na MacConkey podlozi u odnosu na *E.coli* u bez *B.subtilis* i u kulturi s JH642 sojem. Eksperimenti su pokazali da *E.coli* u uvjetima bez kompeticije, te kompeticije s JH642, pokazuje jednak rast kolonija prilikom nasađivanja na MacConkey podlogu. U kompeticiji s ATCC 21332 u uvjetima kada je početni omjer bio 1:1, tj. kada ATCC21332 nije inhibirao rast *E.coli*, rast *E.coli* kolonija na MacConkey podlozi bio je jednak onome u uvjetima bez kompeticije. Kada je početni omjer bio 1:13 i 1:20, tj. u uvjetima kad je ATCC 21332 imao inhibitorni učinak na *E.coli*, broj kolonija *E.coli* na MacConkey podlozi bio je 3 puta u odnosu na onaj bez kompeticije (Slika 29). Oba slučaja pokazuju početnu slabiju sposobnost formiranja kolonija u odnosu na LB podlogu. Sposobnost formiranja kolonija raste prva 3 dan nakon čega se stabilizira na vrijednostima od 8 puta manje kolonija u slučaju bez kompeticije i 20 puta manje kolonija u slučaju kompeticije s ATCC 21332. U slučaju bez kompeticije ne znamo objasniti do 4 puta manje kolonija 1. dan u odnosu na 3. dan. U slučaju kada ATCC 21332 dodatno snižava sposobnost formiranja kolonija pretpostavljamo da je početna velika vrijednost posljedica velike proizvodnje surfaktanata tokom eksponencijalne faze rasta ATCC 21332, surfaktanti dodatno narušavaju integritet stanične stjenke i membrane, što uzrokuje veću osjetljivost na žućne soli u MacConkey podlozi. Nakon prvog dana pretpostavljamo da proizvodnja surfaktanata prestaje ili pada na vrlo male vrijednosti što uzrokuje bolji rast *E.coli*. Također, moguće je da tokom eksperimenta *E.coli* postaje rezistentnija na djelovanje surfaktina preko modifikacija na staničnoj stjenci i/ili membrani što dalje utječe na bolju sposobnost rasta na MacConkey podlozi. Ovime smo pokazali da proizvodnja surfaktanta u prisutnosti kompetitorne bakterije može imati pozitivan učinak na rast *B.subtilis*, ne smo preko inhibicije rasta kompetitora, već i smanjenjem njegove kolonizacijske sposobnost.

4.6. Eksperiment s kompeticijom i predacijom

Pokazali smo da stopa predacije jednog *C.elegans* nema posljedice na rast bakterija, kao ni na ishod kompeticije (Slika 30 i 33). Radi nedostatka vremena nismo uspjeli pokazati da li bi veća stopa predacije imala utjecaj na rast i dinamiku bakterijskih populacija te ishod kompeticije. Veća stopa predacije za posljedicu bi mogla imati smanjen rast bakterija što bi oslobodilo prostor za novi rast. U slučaju ATCC 21332 ovo bi moglo ponovno potaknuti oslobađanje surfaktanata. S druge strane predacija nad ATCC 21332 smanjila bi broj bakterija, što bi za posljedicu imalo i manju količinu surfaktanta i dovelo do boljeg rasta *E.coli* u prisutnosti predatora. Osim negativnog utjecaja na plijen putem predacije, *C.elegans* ima i pozitivan utjecaj na rast plijena. Ovo se ostvaruje defekacijom bakterija, od kojih je 30%-60% i dalje vijabilno. Prilikom hranjenja mnoge bakterije ostaju na kutikuli *C.elegans* i kao posljedicu ima njihovo širenje po podlozi (Freckman i Caswell 1985). *C.elegans* svojim gibanjem i defekacijom može utjecati na bolju pomiješanost bakterijskih kultura. Surfaktin djeluje inhibitorno tek kad je u koncentracijama između 15.625 μg/mL i 31.25 μg/mL (Huang i sur. 2008). Možemo pretpostaviti da će veće kolonija ili veća koncentracija bakterija biti sposobnija proizvesti navedenu koncentraciju surfaktina. Miješanjem bakterija potiče se njihovo širenje, ali i smanjuje mogućnost postizanja navedene koncentracije, budući se smanjuje grupni učinak. Ovo može djelovati na slabiji inhibitorni učinak *B.subtilis* na *E.coli*. Također, poznato je da je da su humani nepatogeni sojevi *E.coli* slabi patogeni za *C.elegans*, te skraćuju životni vijek oblića. S druge strane *B.subtilis*, je uobičajena bakterija koja živi u tlu, te se pretpostavlja da je standardna hrana za *C.elegans*. Pokazano je da je životni vijek *C.elegans* koji se hrani bakterijom *B.subtilis* (PY79) dulji od onoga hranjenim bakterijom *E.coli* OP50 (Grasin i sur. 2003). Ako bi kompeticiju među bakterijama gledali iz perspektive *C.elegans*, te pratili njegov životni vijek na podlogama s *E.coli* i *B.subtilis*, pretpostavljamo da bi različiti bakterijski omjeri dali različit životni vijek, pri čemu bi *C.elegans* uzgajan na pločama s većim udjelom *B.subtils* trebao pokazati dulji životni vijek. Dulji životni vijek također utječe na zdravlje oblića, stopu predacije, a time i dinamiku bakterijski populacija. Na početku projekta želja nam je bila uz kompeticiju i predaciju pratiti i životni vijek *C.elegans*, ali radi nedostatka vremena to nismo uspjeli sprovesti. Premda se često uzima da se *C.elegans* hrani neselektivno (Pedersen i sur. 2009) istraživanja pokazuju da on može pokazati odbojnost prema određenim bakterijama. Ovo ponašanje vrlo je

specifično za svaki bakterijski soj i povezano je s proizvodnjom toksina i drugih odbojnih tvari od strane bakterije (Predel i sur. 2006, Jousset i sur. 2009). Pokazno je da određeni tipovi biosurfaktanata, među kojima i surfaktin kada su pomiješani s kulturom *E.coli* OP50 djeluju odbojno na *C.elegans* (Pradel i sur. 2006). Još nije pokazano da li se isti efekt dobiva na podlozi s *B.subtilis*, te je ovo jedna od hipoteza koju bi trebali daljnje preispitati. Iz vlastitih opažanja nismo zamijetili selektivno hranjenje s *E.coli* u prisutnosti *B.subtilis*. Efekt će uvelike ovisiti o koncentraciji proizvedenog surfaktina, čiju prisutnost bi u daljnjim istraživanjima trebali kvantificirati.

5. Zaključak

Tijekom ovog rada razvila sam sustav za praćenje zajedničkog djelovanja kompeticije i predacije na sustavu s predatorom *C.elegans* i bakterijskim plijenom *B.subtilis* i *E.coli*. Optimalni uvjeti za rad pokazali su se s bakterijskim sojevima *B.subtilis* ATCC 21332 i *E.coli* MG1665 na krutoj NGM podlozi, temperaturi od 28°C, te korištenje β-galaktizodaza testa za praćenje bakterijske dinamike. Tokom istraživanja došla sam do sljedećih zaključaka:

- Smo određeni sojevi *B.subtilis* pokazuju inhibicijski učinak na *E.coli*, te ovo djelovanje nije strogo povezano s proizvodnjom surfaktina. Jak inhibicijski učinak vjerojatno je posljedica djelovanja koktela antimikrobnih surfaktanata koje *B.subtilis* može proizvoditi.
- U temperaturnom rasponu od 28°C-37°C pokazala sam da niže temperature imaju jači inhibitorni učinak na rast *E.coli* MG1665
- Potvrdila sam opažanje da se u tekućem mediju gubi inhibicijski učinak *B.subtillis,* te da je za njegovo proučavanje potrebno raditi na krutoj podlozi.
- Proizvodnja surfaktina povezana je s padom količine hranjivih tvari u okolišu. Sukladno time *B.subtilis* nije pokazao inhibicijsko djelovanje na hranjivim tvarima bogatoj LB podlozi, dok je na hranjivim tvarima siromašnoj NGM podlozi inhibicijski učinak bio vrlo snažan. Potvrdila sam da prototrofni *B.subtilis* ukoliko prvo raste na podlozi s svim aminokiselinama, te se zatim prebaci na minimalnu podlogu bez aminokiseline pokazuje 10^3-10^4 puta manji rast.
- Prirodni izolat *B.subtilis* ATCC 21332 i uropatogeni soj *E.coli* pokazuju bolju rezistenciju na ampicilin za razliku od laboratorijskih sojeva ovih bakterijskih vrsti
- do sda još nitko nije proučavao bakterijsku dinamiku *B.subtili i E.coli* u miješanoj kulturi na krutoj podlozi. Ishod kompeticije ovisio je o početnom omjeru *E.coli : B.subtilis,* pri čemu je u 1:1 omjeru *E.coli* pokazao inhibitorni učinaka na ATCC 21332 soj, dok su omjeri 1:13, 1:40 i 1:180 pokazali inhibicijsko djelovanje ATCC 21332 na MG1665. JH642 i MG1665 nisu pokazali međusobnu kompeticiju neovisno o omjeru u kojem su se nalazili.
- Proizvodnja surfaktina i drugih surfaktanata djeluje na staničnu membranu *E.coli* što dodatno smanjuje sposobnost formiranja kolonija *E. coli* na MacConkey podlozi pokazujući s da osim antimikrobnog djelovanja surfaktanti smanjuju sposobnost kolonizacije bakterija na podlozi s tvarima amfipatskog karaktera.

- Stopa predacije od jednog *C.elegans* ne uzrokuje nikakav selekcijski pritisak na bakterije, te ne utječe na dinamiku bakterijskih populacija.

6. Prijedlozi za daljnja istraživanja

Zbog nedostatka vremena, velikog broja tehničkih problema i velikog opsega projekta nisam bila u mogućnosti projekt sprovesti u njegovom punom obliku. Također, rad na projektu otvorio je mnogo novih pitanja, pretpostavki i ideja za njegovo poboljšanje.

- Koristiti bolju kavantifikacijsku metodu za proizvodnju surfaktina i nastojati identificirati proizvodnju većeg proja surfaktanata.
- Pokazati kako će uvjetima kompeticije za hranjive tvari utjecati na djelovanje kompeticije i predacije na populacijsku dinamiku miješanih kultura *E.coli i B.subtilis*. Ovo se može testirati uporabom podloge siromašnije hranjivim tvarima od NGM-medija (npr. minimalni medij s glukozom)
- Radi relativno malog broja ponavljanja svi dobiveni rezultati preliminarnog su tipa i trebali bi biti ponovljeni još barem 2 puta s 2-3 replike po ponavljanju. Za buduća istraživanja zanimljivo bi bilo testiranje interakcija u više različitih omjera, te tokom dužeg vremenskog perioda.
- Radi nedostatka literature, nedovoljno definiranih interakcija kompeticije, te male dinamike sustava u daljnjem razvoju sustava za proučavanje zajedničkog djelovanja kompeticije i predacije uporaba bakterijskih organizama s bolje definiranom i proučavanom kompeticijom učinila bi sustav jednostavnijim za proučavanjem. Primjeri dobro proučavanih sustava s bakterijama u kompeticiji oni su s *E.coli* koja proizvodi kolicin *i E.coli* senzitivnom na kolicin (Riley i Gordon 1999), te fenotipski različiti *Pseudomonas fluorescens* (Rainey i Travisno 1998). Budući da su ovi sustavi dobro poznati njihovo korištenje omogućilo bi nam da se tokom istraživanja više koncentriramo na zajedničko djelovanje predacije i kompeticije.
- Ispitati utjecaj većeg broja *C.elegans*, tj veće stope predacije na sustavu. Također, zanimljivo bi bilo proučavati utjecaj miješanih bakterijskih kultura na životni vijek *C.elegans*.
- Opisati sustav korištenjem matematičkih modela te time teorijski i eksperimentalno pridonijeti boljem poznavanju ovog sustava.

7. Literatura

Abrams P.A. 1987. On classifying interactions between populations. Oecologia **73**, 272-281

Abrams P.A. 1995. Monotonic or unimodal diversityproductivity gradients: what does competition theory predict? Ecology **76**, 2019–2027.

Abrams P.A. 1999. Is predator mediated coexistence possible in unstable systems? Ecology, **80,** 608–621

Al-Qumber M., Tagg J.R. 2006. Commensl bacilli inhibitory to mastits pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. Journal of Applied Microbiology **101**, 1152-1160

Beam H.W., Perry J.J. 1974. Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-metabolism and commenslism. Journal of General Microbiology **82**, 63-169

Begon M., Townsend C. R., Harper J. L. (2006): Ecology: From individuals to ecosystems. (4t. izdanje). Blackwell.

Bohannan B.J.M., Lenski R.E. 2000. The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. The Amrecina Naturalis **156,** 329-340

Brinkhoff T., Bach G., Heidorn T., Liang L., Schlingloff A., Simon M. 2004. Antibiotic Production by a Roseobacter Clade-Affiliated Species from the German Wadden Sea and Its Antagonistic Effects on Indigenous Isolates. Applied and Environmental Micobiology **70,** 2560-2565

Brodie ED III, Brodie ED Jr. 1999. Costs of exploiting poisonous prey:evolutionary trade-offs in a predator-prey arms race. Evolution **53**, 626–631.

Case T.J., Gilpin M.E. 1974. Interference Competition and Niche Theory. PNAS. **71**, 3073-3077

Chase J.M., Abrams P.A., Grover J.P., Diehl S., Chesson P., Holt R.D., Richards S. A., Nisbet R.M., Case T.J. 2002. The interaction between predation and competition: a review and synthesis. Ecology Letters **5**, 302-315

Chesson P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. Ann. Rev. Ecol. Syst. **31,** 343–366.

Cheasson P., Kuang 2008. The interacition between predation and competition. Nature **456**, 235-238

Cooper D. G., Macdonald C. R., Duff S. J. B., Kosric N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. Applied Environmental Microbiology **42**, 408-412

Currie D.J., Kalff J. 1984. Can bacteria outcompete phytoplankton for phosphorus? a chemostat test. Microbila Ecology **10,** p205-216

Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. PNAS. **99**, 10494-10499

Czaran T. L., Hoekstra R. F., Pagie L. 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. PNAS. **99**, 786–790

Dawkins R., Krebs J. R. 1979. Arms races between and within species. Proceedings of the Royal society of London B 205, 489-511.

Deleu M., Bouffioux O., Razafindralambo H., Paquot M., Hbid C., Thonart P., Jacques P., Brasseur R. 2003. Interaction of Surfactin with Membranes: A Computational Approach.. Langmuir **19**, 3377–3385

de Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C., Boddy L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development FEMS Microbiology Reviews **2**, 795-811

Diard M., Baeriswyl S., Clermont O., Gouriou S., Picard B., Taddei F., Denamur E., Matic I. 2007. Caenorhabditis elegans as a simple model to study phenotypic and genetic virulence determinants of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Microbes and Infection **9,** 214-223

Dineshkumar T.K., Thanedar S., Subbulakshmi C., Varshney U. 2002. An unexpected absence of queuosine modification in the tRNAs of an *Escherichia coli* B strain. Microbiology **148**, 3779–3787

Drasr, B.S., Hill M.J. (1974) : Human Intestinal Flora. Academic Press. London

Dunny G.M., Brickman T.J., Dworkin M. 2008. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. BioEssys **30**, 296-298

Fernades P.A.V., de Arruda I.R., dos Sntos A.F.A.B., de Araujo A.A., Maior A.M.S., Ximenes E.A. 2007. Antimicrobal activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 agains multidrug-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology **38,** 704-709

Flint H.J., Duncan S.H., Scot K.P. Loui P. 2007. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. Environmental Microbiology **9,** 1101-1111

Freckman D.W., Caswell E.P. 1985. The ecology of nematodes in agroecosystems. Annual Review of Phytopatology **23**, 2775-2796

Garsin D.A., Villanueva J.M., Begun J., Kim D.H., Sifri C.D., Calderwood S.B., Ruvkun G., Ausubel F.M. 2003. Long-Lived *C. elegans* daf-2 Mutants Are Resistant to Bacterial Pathogens. Science **300**, 5627-5635

Gillor O, Etzion A, Riley M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl Microbiol Biotehnology **81**, 591-606

Ginzburg L.R. (1991): Assessing ecological risks of biotechnology. U: Lenski R.E.(ur) Quantifying fitness and gene stability in microorganisms, New York, str.173-191

Gonza`lez-Pastor J.E., Hobbs E.C., Losick R. 2003. Canibalism by sporulating bacteria. Science **301**, 510-513

Griffin A.S., Stuart A., Buckling W, Buckling A. 2004. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. Nature **430**, 1024-1027

Grover J.P. 1994. Assembly rules for communities of nutrientlimited plants and specialist herbivores. American Naturalist **143**, 258– 282.

Gurevitch J.J., Morrison A., Hedges, L.V. 2000. The interaction between competition and predation: a meta-analysis of field experiments. American Naturalist **155**, 435–453.

Hall T.J., Davis W.E.E. 1990. Survival of *Bacillus subtilis* in silver and sugar maple seedlings over two year period. Plant Disease **74**, 608-609

Hall A.R., Colegrave N. 2007. How does resource supply affect evolutionary diversification? Procedings of Royal Society of London. B **274**, 73–78

Hardin G. 1960. The Competitive Exclusion Principle. Science **131,** 1292-1297.

Holt R.D., Lawton J.H. 1994. The ecological consequences of shared enemies. Annual Rev. Eco.l Syst. **25,** 495-520

Hope I.A., Hames B.D. (1999): *C. elegans*: A practical approach. Oxford University Press Inc. New York

Huang X., Wei Z., Zhao G., Gao X., Yang S., Cui Y. 2008. Optimization of Sterilization of *Escherichia coli* in Milk by Surfactin and Fengycin Using a Response Surface Method. Current Microbiology **56**, 376–381

Jaeger R.G. 1971. Competitive Exclusion as a Factor Influencing the Distributions of Two Species of Terrestrial Slamanders. Ecology **52**, 632-637

Jousset A , Rochat L , Pechy-Tarr M, Keel C, Scheu S, Bonkowski M. 2009. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. The ISME Journal. advance online publication, 1–9

Julkowska D. 2005. Comparative Analysis of the Development of Swarming Communities of *Bacillus subtilis* 168 and a Natural Wild Type: Critical Effects of Surfactin and the Composition of the Medium. Journal of Bacteriology **187,** 65-76

Jürgens K., Matz C. 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek **81,** 413–434

Kiontke K., Sudhaus W. 2006. Ecology of Caenorhabditis species. The *C. elegans* Research Community, WormBook, http://www.wormbook.org

Krivan V. 2003. Competitive co-existance cause by adaptive predators. Evolutionary Ecology Research **5,** 1163-1182

Kunst F., Ogaswara N., Moszer I., <146 drugih autora>, Yoshikawa H., Danchin A. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis.* Nature **390,** 249-256

Laakso J., Setälä H. 1999. Population- and ecosystem-level effects of predation on microbial-feeding nematodes. Oecologia **120,** 279-286

Langenheder S., Jürgens K. 2001. Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. Limnol. Oceanogr. **46**, 121–134.

Lederberg J. 2004. E. coli K-12. Microbiology Today **31**, 116-128

Lenski R.E., Simpson S.C., Nguyen T.T. 1994. Genetic Analysis of a Plasmid-Encoded, Host Genotype-Specific Enhancement of Bacterial Fitness. Journal of Bacteriology **176**, 3140-3147

Ley R.E. , Peterson D.A., Gordon J.I. 2006. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. Cell **124**, 837-848

Lidicker W. Z. 1979. A Clarification of Interactions in Ecological Systems. BioScience **29**, 475-477.

Mead G.C. 2000. Prospects for 'Competitive Exclusion' Treatment to Control Slmonellas and Other Foodborne Pathogens in Poultry. The Veterinary Journal **159**, 111-123

Mireles J.R., Toguchi A., Harshey R.M. 2001. *Slmonella enterica Serovar Typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. J Bacteriol. **183**, 5848–54.

Murray J.D. (2002): Mathematical Biology I. An Introduction. 3.izdanje. Springer

Nakano M.M., Marahiel M.A., Zuber P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **170**. 5662-5668

Nakano M.M., Zuber P. 1998. Anaerobic growth of a „strick aerob" (*Bacillsu subtilis*). Annual Review of Microbiology **52,** 165-190

Nandy S.K., Bapat P.M., Venkatesh K.V. 2006. Sporulating bacteria prefers predation to canibalism in mixed cultures. FEBS Letters **581,** 151-156

Neidhardt F.C. (1987): *Escherichia coli* & *Slmonella Typhimurium*: Cellular & Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington

Neu H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. Science **257,** 1064-1073

Ohno A., Ano T., Shoda M. 1995. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. Journal of Fermantation and Bioegeniring **80,** 517-519

Paine R.T. 1969. The Pisster–Tegula interaction: prey patches, predator food preferences, and intertidal community structure. Ecology 50, 950–961

Pedersen A.L., Nybroe O., Winding A., Ekelund F., Bjørnlund L. 2009. Bacterial Feeders, the Nematode *Caenorhabditis elegans* and the Flagellate *Cercomonas longicauda*, have different Effects on Outcome of Competition among the *Pseudomonas* Biocontrol Strains CHA0 and DSS73. Microb Ecol**. 3,** 501-509

Peterson S.B., Dunn A.K., Klimowicz A.K., Handelsman J. 2006 Peptidoglican from Bacillus cereus mediates commenslism with rhizosphere bacteria from the Cytophaga-Flavobacterium Group. Applied and Environmental Microbiology **72,** 5421-5427

Pradel E., Zhang Y., Pujol N., Matsuyama T., Bargmann C.I., Ewbank J.J. 2007. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium Serratia marcescens by *Caenorhabditis elegans*. PNAS. **104**, 2295-2300

Rainey P.B., Travisno M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environmant. Nature **394**, 69-72

Ramkrishna S. 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. J. Chem. T ech. Biotechnol. **68**, 263-270

Rehse S.J., Diedrich J., Palchaudhuri S. 2007. Identification and discrimination of *Pseudomonas aeruginos* bacteria grown in blood and bile by laser-induced breakdown spectroscopy. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy **62,** 1169-1176

Riley M.A., Gordon D.M. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends in Microbiology **7,** 129-133

Ripple W.J., Beschta R.J. 2004. Wolves and the Ecology of Fear: Can Predation Risk Structure Ecosystems? BioScience **54**, 755-766

Srgent M.G. 1975. Control of cell lenght in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **123**, 10225-10231

Sears C.L. 2005. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. Anaerobe **11**, 247–51.

Singh P., Cameort S.S. 2004. Potential application of microbial surfactants in biomedical sciences. TRENDS in Biotechnology **22,** 142-146

Sommer U. 1999. The impact of herbivore type and grazing pressure on benthic microalgal diversity. Ecology Letters **2,** 65–69.

Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (1993): *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington

Spiller D.A., Schoener T.W. 1988. An experimental study of the effect of lizards on web-spider communities. Ecol. Monog. **58**, 57–77.

Spiller D.A., Schoener T.W. 1998. Lizards reduce spider species richness by excluding rare species. Ecology **79,** 503–516.

Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology **56**, 45–857

Sung H., Yasbin R.E. 2000. Transient Growth Requirement in *Bacillus subtilis* following the Cesstion of Exponential Growth. Applied and Environmatal Microbiology **66,** 1220-1222

Wardle D.A., Yeates G.W. 1993. The dual importance of competition and predation as regulatory forces in terrestrial ecosystems: evidence from decomposer food-webs. Oecologia **93**, 303-306

Wardle D.A. 2006. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. Ecology Letters **9,** 870–886

Whitman W., Coleman D., Wiebe W. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. PNAS. **95**, 6578–6583.

Wormatlas www.wormatlas.org.

Xavier B.M., Russell J.B. 2006. Bacterial competition between a bacteriocin producing and a non-producing strain of streptococcus bovis in batch and continuous culture. FEMS Microbiology Ecology **58**, 317-322.

Yan L., Boyd K.G., Adams D.R., BUIrgess J.G. 2003. Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobal compounds in bacilli. Applied Environmental Microbiology **69**, 3719-3727

Yoshida T, Laura E. Jones, Stephen P. Ellner, Gregor F. Fussmann, Nelson G. Hairston Jr. 2003. Rapid evolution drives ecological dynamics in a predator–prey system. Nature **424**, 303-306

Yuan J., Philpott J. 2007. Genetic Studies of Aging and Longevity in model organisms. The Science Creative Quarterly. http://www.scq.ubc.ca/genetic-studies-of-agingand-longevity-in-model-organisms/