

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tanja TESOVNIK

**PREUČEVANJE DIFUZIJSKIH LASTNOSTI  
BIOFILMOV PRI BAKTERIJI *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tanja TESOVNIK

**PREUČEVANJE DIFUZIJSKIH LASTNOSTI BIOFILMOV PRI  
BAKTERIJI *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**STUDY OF DIFFUSION PROPERTIES OF *Bacillus subtilis* BIOFILMS**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan David Stopar, za somentorja je bil imenovan Natan Osterman. Meritve difuzije so bile opravljene na Oddelku za fiziko, Fakultete za matematiko in fiziko, ostalo delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentor: prof. dr. David Stopar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo

Somentor: doc. dr. Natan Osterman  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko, Oddelek za fiziko

Recenzent: dr. Iztok Prislan  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za fizikalno kemijo

Datum predstavitve: 11.9.2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Podpis kandidatke:

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2  
DK UDK 602.3:579.852.11:602.62(043.2)  
KG biofilmi/*Bacillus subtilis*/difuzija/mikrofluidika/zunajcelični matriks  
AV TESOVNIK, Tanja, dipl. mikrobiol.  
SA STOPAR, David (mentor) / OSTERMAN, Natan (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2015  
IN PREUČEVANJE DIFUZIJSKIH LASTNOSTI BIOFILMOV PRI BAKTERIJI  
*Bacillus subtilis*  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
OP X, 40 str., 8 pregl., 18 sl., 49 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Biofilmi so strukturirane skupnosti mikroorganizmov, v katerih so celice obdane z zunajceličnim matriksom. V biofilmih je difuzija glavni mehanizem prenosa topljencev do celic, vendar je zaradi heterogene strukture biofilmov proučevanje difuzije težavno. V magistrski nalogi smo pripravili nov sistem za gojenje biofilmov v mikrofluidni napravi, ki nam omogoča neinvazivne meritve difuzije, spremeljanje nastanka bofilma, enostavno spreminjaanje geometrije prostora v katerem nastaja biofilm, pretoke snovi skozi sistem in kontrolirano dodajanje snovi v biofilm. Za preučevanje smo biofilme bakterije *Bacillus subtilis* gojili na različnih gojiščih (SYM, MSgg, Czapek in LB). Biofilmi se med seboj morfološko razlikujejo. Difuzijske koeficiente smo pridobili s spremeljanjem koncentracije fluoresceina v rastnih komorah. Difuzijski koeficienti so se med razvojem biofilmov zmanjševali. Za primerjavo podatkov difuzijskih koeficientov različnih biofilmov smo uvedli nov parameter, ki smo ga poimenovali faktor pakiranja biofilma in ocenjuje gostoto biomase. Rezultati so pokazali, da faktor pakiranja dobro korelira z difuzijskimi koeficienti v tistih primerih, ko je delež zunajceličnega materiala v biofimuh relativno nizek (LB in Czapek gojišče). V primeru, ko je na difuzijske lastnosti poleg mikrobnih celic znatno vplival tudi zunajcelični matriks (SYM in MSgg gojišče) se je difuzija značilno spremenila.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du2  
DC UDC 602.3:579.852.11:602.62(043.2)  
CX biofilms/*Bacillus subtilis*/diffusion/microfluidics/extracellular matrix  
AU TESOVNIK, Tanja  
AA STOPAR, David (supervisor) / OSTERMAN, Natan (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology  
PY 2015  
TY STUDY OF DIFFUSION PROPERTIES OF *Bacillus subtilis* BIOFILMS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO X, 40 p., 8 tab., 18 fig., 49 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB Biofilms are structured community of microorganisms in which cells are surrounded by extracellular matrix. Diffusion is a major transport mechanism of solutes in biofilms. Due to heterogeneous structure of the biofilm, however, the study of diffusion is very difficult. We have prepared a new system for growing biofilms in the microfluidic device which allows noninvasive measurements of diffusion, real time monitoring of biofilms development, simple change of geometry and flow through the system, and controlled addition of different substance in and out of the biofilm. In the study we have grown biofilms of bacteria *Bacillus subtilis* in different growth medium (SYM, MSgg, Czapek and LB). Biofilms were morphologically different. The diffusion coefficients were obtained by monitoring fluorescein intensity in the growth chambers. During the development of biofilm the diffusion coefficient decreased. For comparison of diffusion coefficients in different biofilms we have introduced a new parameter, which we named the packaging factor that correlates with biomass density. The results imply that the packaging factor is tightly correlated with the diffusion coefficients when the fraction of extracellular matrix in biofilm is low (LB and Czapek medium). In case when the fraction of extracellular matrix is high the diffusion properties of the biofilm change significantly (SYM and MSgg medium).

## KAZALO VSEBINE

	Str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b>	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b>	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b>	V
<b>KAZALO SLIK</b>	VII
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	VIII
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	IX
<b>SLOVARČEK</b>	X
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI MAGISTRSKE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	2
2.1 BIOFILMI	2
<b>2.1.1 Nastanek biofilma pri bakteriji Bacillus subtilis</b>	3
2.1.1.1 Uravnavanje nastanka biofilma	4
<b>2.1.2 Zunajcelični matriks v biofilmu B. subtilis</b>	6
<b>2.1.3 Struktura biofilmov</b>	7
2.2 BIOFILMI IN DIFUZIJA	8
2.3 MIKROFLUIDIKA	11
<b>2.3.1 Izgradnja mikrofluidnih naprav</b>	12
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	14
3.1 MATERIALI	14
<b>3.1.1 Kemikalije</b>	14
<b>3.1.2 Sestava gojišč</b>	14
<b>3.1.3 Založne raztopine</b>	16
<b>3.1.4 Bakterijski sevi</b>	16
<b>3.1.5 Laboratorijska oprema in pribor</b>	16
3.2 METODE	17
<b>3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur</b>	17
<b>3.2.2 Gojenje biofilmov v petrijevih posodicah</b>	17
<b>3.2.3 Priprava mikrofluidnega vezja</b>	17

<b>3.2.4</b>	<b>Merjenje difuzije v mikrofluidni napravi</b>	19
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	20
4.1	RAZVOJ BIOFILMOV	20
<b>4.1.1</b>	<b>Faktor pakiranja</b>	24
4.2	DIFUZIJA BIOFILMOV V RAZLIČNIH GOJIŠČIH	26
<b>4.2.1</b>	<b>Preverjanje vezave natrijevega fluoresceina na PDMS in biofilm</b>	26
<b>4.2.2</b>	<b>Difuzija natrijevega fluoresceina v biofilmih različnih gojišč</b>	29
<b>4.2.3</b>	<b>Primerjava difuzijskega koeficienta v različnih gojiščih pri podobnem faktorju pakiranja</b>	31
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	32
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	35
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	36
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	37
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Razvoj biofilma na površini (Vlamakis in sod., 2013).	2
Slika 2: Nastanek biofilma pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i> (Kobayashi, 2007).	4
Slika 3: Štirje podsklopi regulacije izražanja genov zunajceličnega matriksa (Vlamakis in sod., 2013).	5
Slika 4: Delež komponent zunajceličnega matriksa v različnih gojiščih (Dogsa in sod., 2013).	7
Slika 5: Slika prikazuje pripravo vzorca za izdelavo mikrofluidne naprave s pomočjo fotolitografije z masko (Weibel in sod., 2007).	12
Slika 6: Prikaz priprave vzorca za izdelavo mikrofluidnih naprav s fotolitografijo brez mask (Kavčič, 2013).	13
Slika 7: Prikaz izdelave PDMS replike (Longo in Hasty, 2006).	13
Slika 8: Shema A prikazuje pozicije rezervarjev ob inokulaciji vezja z bakterijami (pretok $0 \mu\text{L}/\text{h}$ ). Shema B prikazuje pozicijo rezervarjev, ko je pretok v vezju $\approx 16 \mu\text{L}/\text{h}$ . Rezervoar z gojiščem je bil v tem primeru vertikalno premaknjen.	18
Slika 9: Makroskopske slike biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 urah gojenja v različnih gojiščih.	20
Slika 10: Prikaz oblike mikrofluidnega vezja, ki smo ga uporabili pri našem delu.	21
Slika 11: Prikaz nastanka biofilma po času.	22
Slika 12: Biofilmi bakterije <i>B. subtilis</i> gojenih v različnih gojiščih po 19 do 21 urah.	23
Slika 13: Prikaz pridobitve faktorja pakiranja pri posamezni fazи razvoja biofilmov.	24
Slika 14: Sprememba faktorja pakiranja v mikrofluidni komori po času inkubacije.	25
Slika 15: Dodatek natrijevega fluoresceina v mikrofluidno napravo brez bakterijskih celic.	27
Slika 16: Dodatek natrijevega fluoresceina v mikrofluidno napravo v kateri je v komorah nastal biofilm v gojišču LB.	28
Slika 17: Odvisnost difuzijskega koeficienta od faktorja pakiranja v biofilmih <i>B. subtilis</i> , ki so rasli na različnih gojiščih.	29
Slika 18: Primerjava difuzijski koeficientov pri faktorju pakiranja 0.05 (biofilm v komorah še ni nastal) in pri 0.2 (bifilm formiran) pri <i>B. subtilis</i> , ki je rastel v različnih gojiščih v mikrofluidni napravi.	31

## KAZALO PREGLEDNIC

Str.

Preglednica 1: Preglednica s kemikalijami.	14
Preglednica 2: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča LB.	14
Preglednica 3: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča SYM.	15
Preglednica 4: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča Czapek.	15
Preglednica 5: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča MSgg.	15
Preglednica 6: Preglednica s sestavinami za pripravo trdnega gojišča LB.	16
Preglednica 7: Aparature uporabljeni pri delu.	16
Preglednica 8: Prikazuje vrednosti naklonov in presečišč premic iz slike 16.	29

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotek
°C	stopinje Celzija
µm	mikrometri
M	molarnost [mol l <sup>-1</sup> ]
obr./min	obrati na minuto
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini
T	temperatura
UV žarki	ultravijolični žarki
lat	latinsko
σ	sigma faktor
EPS	eksopolimerne snovi
J	difuzijski tok [mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
D	difuzijski koeficient [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]
c	koncentracija [mol m <sup>-3</sup> ]
x	dolžina [m]
t	čas [s]
FRAP	obnavljanje fluorescence po bledenju
NMR	jedrska magnetna resonanca
PRG	gradient pulzirajočega polja
PDMS	polidimetilsilosil
LDI	direktno lasersko osvetljevanje
Pa	Paskal [N m <sup>-2</sup> ]
t <sub>D</sub>	karakteristični čas za difuzijo

## SLOVARČEK

***in situ*** – eksperiment se izvaja na mestu samem, lat. »v naravnem legu«

***in vitro*** – eksperiment se izvaja v nadzorovanih laboratorijskih pogojih, lat. »v kozarcu«

**filamentozna rast** – rast celic v obliki podolgovatih celic, kjer celice po delitvi ostanejo skupaj

**fotolitografija** – uporaba ultra vijoličenega (UV) svetlobnega vira in vzorčne maske na tankem filmu svetlobno občutljivega materiala - fotorezista

**fotorezist** – svetlobno občutljiv material, ki je zasnovan na osnovi epoksi smol in se uporablja za mikrostrukturiranje v različnih aplikacijah, kjer potrebujemo različno debele kemijsko in termično stabilne filme

**faktor pakiranja** – parameter, ki poda oceno gostote biomase v mikrofluidni komori

**mikrofluidika** – veda o fluidnih sistemih na mikrometerski skali

**zunajcelični matriks (EPS)** – je skupek različnih biopolimerov (polisaharidi, proteini, nukleinske kisline, lipidi), ki omogočajo tvorbo tridimenzionalnih struktur biofilma in so pomembni za njihov oprijem na površine

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI MAGISTRSKE NALOGE

V naravnem okolju bakterijske celice najpogosteje najdemo v povezavi s površinami, kjer tvorijo večcelične agregate oziroma biofilme (Branda in sod., 2005). Biofilmi so strukturirane skupnosti mikroorganizmov, v katerih so celice obdane z zunajceličnim matriksom. To niso le pasivne asociacije mikroorganizmov, temveč so strukturno in dinamično kompleksni sistemi. Skozi evolucijo so si mikroorganizmi s tvorbo biofilmov zagotovili homeostazno okolje kljub stalnemu nihanju okoljskih pogojev. Zato je verjetno prav tvorba biofilmov tisti sestavni del prokariontskega življenjskega cikla, ki je ključni faktor preživetja v raznolikih okoljih (Hall-Stoodley in sod., 2004). Fizikalno kemijske lastnosti v biofilmu močno vplivajo na izmenjavo hranil, plinov in preostalih snovi med okoljem in biofilmom. V biofilmu je difuzija glavni mehanizem prenosa topljencev (Bungay in sod., 1969; Billings in sod., 2015). Poznavanje difuzijskih lastnosti biofilmov je ključnega pomena za napovedovanje prenosa hranil in končnih produktov metabolizma ter inženiring sistemov, ki uporabljajo bakterijske biofilme (Renslow in sod., 2013). Zardi zelo heterogene narave biofilmov je določanje difuzije v biofilmih težavno.

V magistrski nalogi smo preučevali difuzijske lastnosti po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*. Preverili smo kako se med razvojem biofilma spreminjajo difuzijske lastnosti. Da smo difuzijske lastnosti biofilmov čim bolj kontrolirano spremljali, smo za proučevanje uporabili mikrofluidne sisteme. Difuzijske lastnosti biofilmov smo preverili v različnih gojiščih z namenom določiti vpliv zunajceličnega matriksa na difuzijske lastnosti biofilmov.

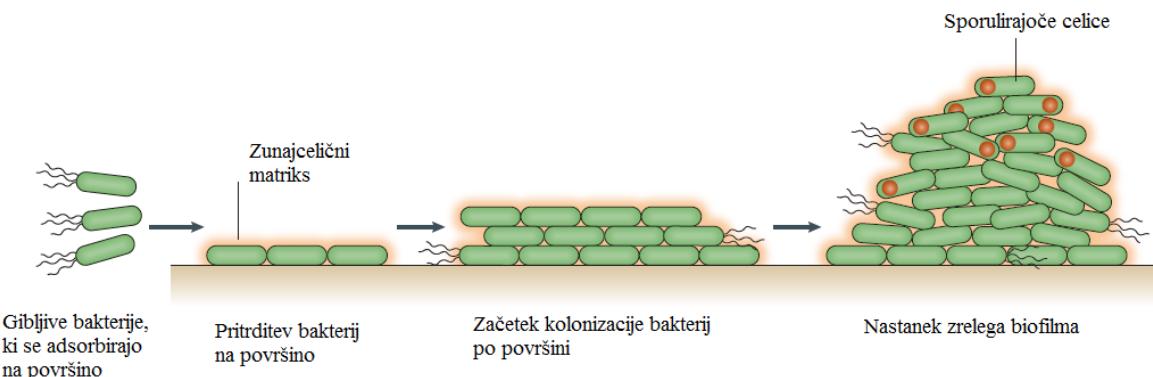
### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Biofilm predstavlja difuzijsko-reakcijsko bariero za transport snovi,
- Sestava in debelina biofilmov vpliva na njihove difuzijske lastnosti,
- Mikrofluidna naprava omogoča sledenje aktivnosti posameznih bakterijskih celic.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIOFILMI

Sredi dvajsetega stoletja so obravnavali posamezne plavajoče celice kot prevladujoči način življenja mikroorganizmov. Danes je znano, da imajo mikroorganizmi raje družabno življenje v obliki biofilmov (Gerbersdorf in Weprech, 2015). Beseda biofilm je sestavljena iz dveh delov. Film pomeni tanko prevleko, bio pa se nanaša na živo naravo. Če združimo ti dve besedi dobimo okrnjeno definicijo biofilma, ki pomeni tanko prevleko z živim materialom (Karatan in Watnick, 2009). Vendar se v člankih največkrat uporablja definicijo, kjer biofilme opredelijo kot mikrobne združbe obdane z zunajceličnim matriksom (Percival in sod., 2011). Rast biofilmov je urejena s številnimi fizikalnimi, kemijskimi in biološkimi procesi. Za njihov začetek je pomembna adsorpcija bakterij na površino ali substrat, sledi pritrditev bakterij in na koncu pride do kolonizacije bakterij po površini (Slika 1). Z deljenjem celic in izločanjem zunajceličnega matriksa nastanejo na površini celični agregati, ki skupaj tvorijo kompakten biofilm (Garrett in sod., 2008).



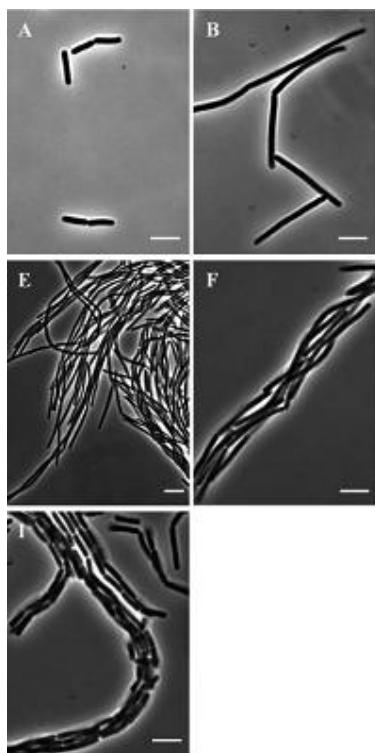
Slika 1: Razvoj biofilma na površini (Vlamakis in sod., 2013).

Biofilmi se v okolju pojavljam v različnih velikostih in oblikah. Najpogosteje v obliki gobastih, stebričastih, hribovitih ali ploščatih struktur (Pamp in sod., 2009). Biofilme lahko sestavljajo monokulture, medtem ko so v večini primerov biofilmi sestavljeni iz različnih vrst mikroorganizmov (Costerton in sod., 1995). Delež mikroorganizmov v večini biofilmov je okoli 10 % suhe mase, ostalih 90 % suhe mase pa lahko predstavlja zunajcelični matriks. Zunajcelični matriks je skupek različnih biopolimerov, ki omogočajo tvorbo tridimenzionalnih struktur biofilma in so pomembni za njihov oprijem na površine. Vsebuje polisaharide, proteine, nukleinske kisline, lipide in druge biopolimere, zato ima razmerje posameznih komponent zunajceličnega matriksa in njihova kemijska sestava velik vpliv na naravo in tridimenzionalno strukturo biofilmov (Flemming in Wingender, 2010).

Sprva je sposobnost razvoja biofilma veljala kot domena nekaj vrst. Danes pa je tvorba biofilmov skoraj univerzalni atribut mikroorganizmov. Prav tako so tudi poti, ki jih mikroorganizmi uporabljajo za tvorbo biofilmov zelo raznolike (Lemon in sod., 2008). Med najbolj proučenimi biofilmi so biofilmi po Gramu pozitivne paličaste bakterije *Bacillus subtilis* (Earl in sod., 2008), ki smo jih za proučevanje difuzijskih lastnosti uporabili v tem magistrskem delu.

### 2.1.1 Nastanek biofilma pri bakteriji *Bacillus subtilis*

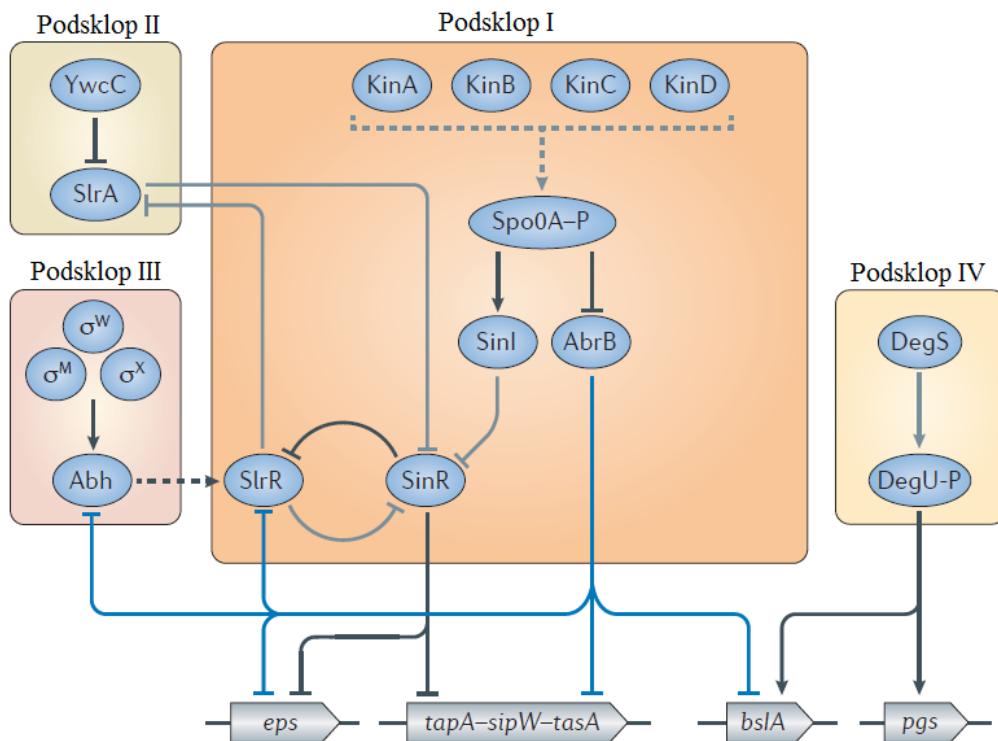
Bakterijo *Bacillus subtilis* najdemo v številnih okoljih, saj je splošno razširjena in prilagojena na rast v različnih okoljih (Earl in sod., 2008). V zadnjem desetletju se *B.subtilis* uporablja kot modelni organizem za proučevanje biofilmov, saj tvorijo biofilme na različnih površinah oziroma interfazah: trdna snov - tekočina, zrak - tekočina in trdna snov - zrak (Lappin-Scott in Costerton, 2003). Vendar večina študij o biofilmih pri *B.subtilis* preučuje nastanek nagubanih biofilmov na interfazi zrak - tekočina, imenovani plavajoči filmi ali pelikli (Branda in sod., 2006; Kobayashi, 2008; Dogsa in sod., 2013; Branda in sod., 2001; Kobayashi, 2007; Kearns in sod., 2005). Nastanek plavajočega biofilma pri *B. subtilis* poteka v več korakih (Lemon in sod., 2008). Dve do štiri ure po inokulaciji so v kulturi opažene posamezne ali v dvojicah gibljive celice (Slika 2A). Pri šestih urah celice v večini izgubijo gibljivost in postanejo štiri do desetkrat daljše (Slika 2B). Po sedmih do osmih urah se število filamentoznih celic poveča, med seboj se začnejo povezovati in tako pride do nastanka snopov filamentoznih celic (Slika 2E in F) (Kobayashi, 2007). To je bistvenega pomena za integrirato biofilma, ki drži večcelične skupnosti skupaj (Vlamakis in sod., 2013). Pri devetih do desetih urah se v snopih pojavi vidna delitev podolgovatih celic, tako da so ponovno vidne posamezne celice (Slika 2I). Začetni stadiji nastanka pelikla se sprva dogajajo na dnu gojišča (Kobayashi, 2007). Po 12 do 24 urah inkubacije kultura doseže gostoto pri kateri pelikel začne prehajati na interfazo zrak-tekočina (Branda in sod., 2001). Kljub temu, da se tvori biofilm, se v tej fazи nahajajo tako negibljive filamentozne kot tudi gibljive ne-filamentozne celice. Do takšnega pojava pride zaradi izražanja različnih genov pri genetsko identičnih celicah, kar vodi do nastanka subpopulacij oziroma do populacijske heterogenosti (Vlamakis in sod., 2013; Kearns in Losick, 2005). Razlog za nastanek populacijske heterogenosti pa je razlika v ekspresiji genov povezanih z gibljivostjo (Kearns in Losick, 2005).



Slika 2: Nastanek biofilma pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Na sliki A so vidne posamezne in v dvojicah gibaljive celice, ki se nahajajo v kulturi prve štiri ure po inokulaciji. Slika B prikazuje bakterijske celice po šestih urah, ko večina ni več gibaljivih in se začnejo podaljševati. Slika E in F prikazujeta stanje bakterij po sedmih do osmih urah, ko se začnejo med seboj povezovati v snope. Na sliki I so vidne delitve znotraj filamentoznih celic, kar se začne dogajati pri devetih do desetih urah (Kobayashi, 2007).

### 2.1.1.1 Uravnavanje nastanka biofilma

*B. subtilis* za plavanje potrebuje flagele. To so proteinske komponente kodirane z operonom fla/che, ki vsebuje gen za alternativni sigma faktor D ( $\sigma^D$ ), in 31 genov vpletenih pri kemotaksi in tvorbi flagelov.  $\sigma^D$  je glavni faktor, ki vpliva na prepis ostalih genov, ki sodelujejo pri sintezi flagelov.  $\sigma^D$  vpliva tudi na prepis genov avtolitičnih encimov (lytC, lytD in lytF), ki sodelujejo pri ločevanju hčerinskih celic ob delitvi. Rastoče celice *B. subtilis* so heterogena populacija, ker je  $\sigma^D$  faktor v nekaterih celicah prisoten v večjih koncentracijah kot v drugih. Ko je  $\sigma^D$  faktor prisoten, so te celice gibaljive, celice kjer je  $\sigma^D$  faktorja manj pa tvorijo podolgovate filamentozne celice. Razvojno stanje je torej odvisno od  $\sigma^D$  faktorja in njegovega vpliva na prepisovanje genov. Kearns in Losick (2005) sta opazila, da se populacija divjega seva *B. subtilis* 3610 bolj nagiba k gibaljivim celicam kot pa laboratorijski sev PY79 v eksponentni fazni rasti. Ugotovili so, da na to vpliva regulatorni protein SwrA, ki aktivira prepis operona fla/che (Kearns in Losick, 2005). Nastanek negibljivih celic se začne z izražanjem genov za produkcijo matriksa kot odziv na zunanje signale (temperatura, hranila, pH itd.). Tako iz kratkih paličastih in gibaljivih celic nastanejo filamentozne in negibljive celice, ki se poravnajo in prilepljajo ena na drugo ter na površine z izločanjem matriksa (Vlamakis in sod., 2013). Poravnava celic nakazuje, da je tvorjenje peliklov reguliran proces, ki ne sloni na naključni agregaciji celic (Kobayashi, 2007). Regulacija nastanka biofilma je kompleksen proces, ki ga lahko razdelimo na štiri podsklope (Slika 3), ki regulirajo izražanje genov zunajceličnega matriksa in posledično nastanka plavajočega biofilma (Vlamakis in sod., 2013).



Slika 3: Štirje podsklopi regulacije izražanja genov zunajceličnega matriksa (Vlamakis in sod., 2013).

Prvi podsklop vključuje osrednji transkripcijski regulator Spo0A, ki vpliva na ekspresijo več kot 100 genov, med njimi tudi na gene pomembne za nastanek biofilmov in spor. Spo0A je reguliran s fosforilacijo (Spo0A-P) preko štirih kinaz (KinA, KinB, KinC in KinD), ki delujejo neposredno na Spo0A ali posredno preko fosforilacijske poti. Spo0A-P vpliva na izražanje genov zunajceličnega matriksa preko regulatorja SinR, ki je represor *eps* in *tapA-sipW-tasA* operona. Ker je SinR represor, se geni teh dveh operonov ne izražajo. Antirepresijo operonov omogoča delovanje SinI antirepresorja, ki je reguliran z Spo0A-P. Spo0A-P aktivira izražanje SinI, ki prepreči represijo SinR proteina z nastankom SinI-SinR kompleksa. Posledično se SinR ne more več vezati na operona. Spo0A reprimira tudi drugi represor genov zunajceličnega matriksa, AbrB. Poleg tega reprimira tudi izražanje hidrofobnega zunajceličnega proteina matriksa BslA (površinska plast biofilmov) in regulatorna proteina SlrR ter Abh. SlrR je pomemben za kontrolo nastanka biofilma na dva načina. SlrR se lahko veže na SinR in tvori SinR-SlrR kompleks, kar prepreči represijo SinR na operonih zunajceličnega matriksa in SlrR promotorju. Drugi način kontrole nastanka biofilma vključuje SinR-SlrR kompleks posredovano represijo hag operona (geni za gibljivost bakterij) in represijo genov vpletenih pri celični delitvi (avtolizini). Filamentozne celice so bistvenega pomena pri začetku nastanku biofilma. Za nastanek filamentoznih celic je pomembna SinR-SlrR posredovana represija avtolizinov, ki so potrebni za delitev celic. Prepis *slrR* gena je posredno aktiviran z drugim podsklopom preko regulatornega proteina Abh. Abh protein je reprimiran z AbrB, prepis pa je kontroliran z več  $\sigma$  faktorji ( $\sigma^M$ ,  $\sigma^W$  in  $\sigma^X$ ). SlrR gen je pozitivno reguliran tudi z drugimi proteini. RemA in RemB aktivirata izražanje operonov pomembnih za sintezo zunajceličnega matriksa preko SlrR. Dodatna regulacija SlrR obsega tretji podsklop z YwcC in SlrA potjo. SlrA je paralog SinI in je antirepresor SinR. SlrA gen je reprimiran z

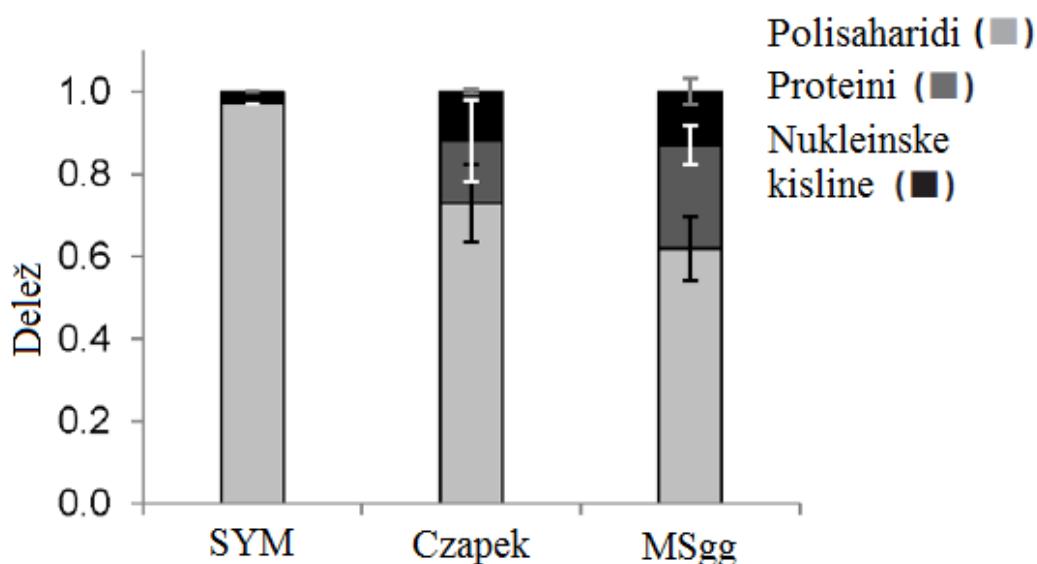
YwcC, vendar ob sprejemu signala dereprimiran SlrA. SlrA takrat represira SinR, kar vodi v prepis matričnih genov. Sistem YwcC-SlrA predstavlja stresni odziv, ki omogoča, da se celice hitro odzovejo na okoljske spremembe. Četrti podsklop regulira izražanje blsA in pgs operona, ki vključuje DegS-DegU dvokomponentni sistem. V tem sistemu je DegS senzorska histidin kinaza, ki fosforilira DegU, ki je odzivni regulator vpletен v kontrolu celičnih procesov kot je kompetenca, gibljivost in izločanju encimov razgradnje (Vlamakis in sod., 2013).

### **2.1.2 Zunajcelični matriks v biofilmu *B. subtilis***

V dozorelem biofilmu je zunajcelični matriks sestavljen iz polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin. Ti polimeri, znani kot eksopolimerne snovi (EPS), so le delno okarakterizirani pri *B. subtilis*. Eksopolisaharidi, ki jih kodira operon epsA-O so sestavljeni iz glukoze, galaktoze in N-acetylgalaktozamina (Dogsa in sod., 2014). Pomembnost eksopolisaharidov pri nastanku biofilmov je razvidna iz dejstva, da je epsA-O operon direktno reprimiran s SinR transkripcijskim faktorjem, ki je glavni regulator prehoda med gibljivih in negibljivimi filamentoznimi celicami. Poleg eksopolisaharidov so pomembne tudi proteinske komponente zunajceličnega matriksa. Sem spadajo yqxM, sipW in tasA geni, ki skupaj tvorijo operon tudi reguliran preko SinR represorja. SipW kodira signalno peptidazo tipa I, ki je pomembna za procesiranje in izločanje proteinov genov yqxM in tasA v zunajcelični prostor. YqxM je protein s še neznano funkcijo, prisoten predvsem v pogojih visoke slanosti (Branda in sod., 2006). TasA protein tvori amiloidna vlakna, ki vplivajo na celične interakcije v povezavi z drugimi zunajceličnimi komponentami v biofilmu. S celično steno je povezan preko TapA proteina, ki je del tapA-sipW-tasA operona in je vključen v TasA vlakna (Dogsa in sod., 2013).

Sestava zunajceličnega matriksa je variabilna in odvisna od pogojev gojenja. Npr. Dogša in sod. (2013) so preverili raznolikost EPS-a z gojenjem *B. subtilis* v treh različnih gojišči. SYM je gojišče bogato s saharozo, medtem ko sta Czapek in MSgg s saharozo revni gojišči. Biofilmi v gojišču SYM in Czapek so bili gladki, medtem ko je bila površina biofilmov v gojišču MSgg nagubana. Tudi v celični morfologiji je prišlo do razlik, saj so bile v gojiščih MSgg in SYM celice organizirane v vzporednih verigah, medtem ko so v gojišču Czapek prisotne gosto pakirane filamentozne celice. V gojišču SYM je prišlo do nastanka plavajočega biofilma že po petih urah inkubacije, v Czapek in MSgg gojiščih pa po 23 urah inkubacije. Čeprav so ekstracelularni polisaharidi, proteini in nukleinske kisline proizvedene v vseh gojiščih so se koncentracije posameznih komponent značilno razlikovale po 24 urni inkubaciji. V SYM biofilmih je zunajcelični matriks vseboval pretežno polisaharide ( $> 95\% \text{ w/w}$ ) in nizko vsebnost proteinov ter nukleinskih kislin, medtem ko je bila vsebnost polisaharidov veliko manjša v biofilmih nastalih v gojišču Czapek in MSgg. V študiji so pokazali tudi, da je glavni polisaharid izoliran iz SYM gojišča levan, medtem ko MSgg in Czapek biofilmi ne vsebujejo levana. Preverili so tudi mehanske lastnosti biofilmov. Najbolj struktorno stabilni so bili biofilmi v s saharozo bogatem gojišču SYM. Biofilmi iz MSgg in Czapek pa so bili strukturo zelo nestabilni (Dogsa in sod., 2013).

Iz zgoraj opisnih primerov je razvidno, da ima gojišče velik vpliv na strukturo biofilmov, predvsem zaradi razlik v sestavi zunajceličnega matriksa. Ta nima vpliva le na strukturo biofilma, temveč tudi na difuzijske lastnosti biofilma. Razumevanje transportnih lastnosti biofilma je za razumevanje delovanja biofilma ključno (Lawrence in sod., 1994).



Slika 4: Delež komponent zunajceličnega matriksa v različnih gojiščih (Dogsa in sod., 2013).

### 2.1.3 Struktura biofilmov

Biofilme sestavljajo prostorsko heterogeno urejene mikrokolonije bakterij, zunajcelični matriks, vmesne praznine in kanali (Lappin-Scott in Costerton, 2003). Biofilmci so heterogeni tako v prostoru in času, saj se njihova sestava nenehno spreminja zaradi zunanjih in notranjih procesov. Koncept heterogenosti ni prisoten le pri biofilmih mešanih kultur, temveč tudi pri monokulturnih biofilmih. Debeline biofilmov se lahko spreminjajo od enoplastnega filma pa do več plasti debelih biofilmov (Donlan, 2002). Bakterije za preživetje v biofilmu potrebujejo hranila. Znotraj biofilmov pogosto pride do nastanka območij z razliko v koncentraciji hranil in ostalih snovi, saj večino hranil porabijo celice na periferiji. Zato so bakterije razvile mehanizem za lažji prenos snovi na daljše razdalje (Wilking in sod., 2013). Kanali so strukture, ki olajšajo pretok hranil v bazalne plasti biofilma, s čimer podpirajo aerobne heterotrofe in hkrati ustvarjajo okolje, ki omogoča rast anaerobnih mikroorganizmov (Lappin-Scott in Costerton, 2003). Kanali izboljšajo prenos hranil v biofilmu, vendar ne omogočajo njihov prenos v notranjost mikrokolonij. Do posameznih bakterij znotraj mikrokolonij prehajajo nutrienti preko prenosa z difuzijo (Stewart, 2003).

## 2.2 BIOFILMI IN DIFUZIJA

Difuzija je primarni mehanizem transporta hrani v biofilmih (Wilking in sod., 2013). Ko bakterije gojimo v tekočih kulturah, difuzija običajno ni znatno omejena. Ker se tekoče kulture stresajo, konvektivni tok tekočine prenaša topljence dovolj hitro v bližino celic, kjer potem z difuzijo vstopajo v celice. Transport s konvekcijskim tokom je veliko hitrejši kot difuzijski transport. Omejitev transporta se pojavi v biofilmih, kjer je konvektivni tok omejen na večje kanale, v preostale dele biofilma pa se snovi transportirajo z difuzijo. Difuzijska razdalja pri prosto plavajočih bakterijah je velikosti posamezne celice, razdalja difuzije v biofilmu pa je velikosti večceličnih skupkov. Torej pride v biofilmih do povečanja razdalje, ki jo mora snov prepotovati z difuzijo in posledično do omejevanja difuzije. Zaradi heterogene strukture biofilmov merjenje difuzijskih koeficientov ni enostavno (Stewart, 2003).

Za opis molekularne difuzije v homogenih sistemih se pogosto uporablja prvi Fickov zakon, ki nam poda zvezo med difuzijskim tokom in koncentracijskim gradientom.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad \dots (1)$$

Pri tem je  $J$  difuzijski tok, ki meri prehajanje snovi na majhnem območju v majhnem časovnem intervalu ( $\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ).  $D$  je difuzijski koeficient in predstavlja površino na enoto časa ( $\text{m}^2/\text{s}$ ).  $c$  predstavlja koncentracijo, ki je izražena z količino snovi na volumen ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ) in  $x$  predstavlja dolžino (m). Prvi Fickov zakon nam pove, kako razlike v koncentraciji poganjajo tokove delcev. Tok delcev se spreminja sorazmerno z odvodom koncentracije delcev. Če se spremeni odvod koncentracije, se zaradi tega spreminja tok delcev. Drugi Fickov zakon je parcialna diferencialna enačba, ki povezuje prvi odvod koncentracije po času z drugim odvodom koncentracije po kraju.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \dots (2)$$

Pri tem je  $t$  čas (s),  $D$  je difuzijski koeficient ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $x$  je dolžina (m) in  $c$  je koncentracija ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ), ki je odvisna od lokacije in časa ( $c=c(x,t)$ ). Drugi zakon se uporablja, ko se koncentracija delcev s časom spreminja, saj nam napove kako difuzija povzroča spremembo v koncentraciji skozi čas. Težava je, kako določati koncentracijo snovi po času in prostoru v heterogenem sistemu kot je biofilm, zlasti pri hitrih prehodih koncentracij topljencev. Za določanje takšnih gradientov se uporablja tehnologija mikrosenzorjev, ki prodrejo v strukturo biofilma brez vpliva na njegove lastnosti. Sonde so bile uporabljene za merjenje koncentracij kisika, ogljikovega dioksida, sulfida, pH, amonija, nitrata in nitrita

znotraj biofilma (Billings in sod., 2015). Prve študije difuzije v biofilmih so bile dokaj grobe, saj so pristopi k preučevanju difuzije vključevali uporabo dializnih cevi, membran in gelov agarja kot modelnih sistemov. Lawrence in sod. (1994) so za merjenje difuzijskih koeficientov uporabili tehniko FRAP (obnavljanje fluorescence po bledenju) skupaj z uporabo konfokalne laserske mikroskopije. FRAP je metoda, ki se uporablja za pridobivanje informacij o prenosu fluorescentnih molekul skozi območje našega zanimanja v biofilmu. Temelji na načelu ireverzibilnega ugašanja fluoroforov ob izpostavljenosti impulzu svetlobe visoke intenzitete. Obnavljanje fluorescence se pojavi znotraj območja, ki smo ga osvetili, zaradi potovanja osvetljenih in ne osvetljenih fluoroforov v biofilmu iz česar lahko ugotovimo difuzijski koeficient barvila (Billings in sod., 2015). Naslednja uporabljena metoda za preučevanje difuzijskih lastnosti je NMR slikanje, še posebej PRG-NMR (NMR z gradientom pulzirajočega polja). Metoda se uporablja za opazovanje strukture, prenos fluorescenčnih sond in njihovo interakcijo z biofilmom (Billings in sod., 2015). Z razvojem tehnologije se za proučevanje difuzije v biofilmih uporablja predvsem sistemi, ki temeljijo na mikroskopskem slikanju (Branda in sod., 2005). Takšni sistemi so učinkoviti za opazovanje in kvantifikacijo transporta topljenca skozi biofilme. Med najpogosteje spadajo optične tehnike, ki temeljijo na fluorescenčni mikroskopiji, saj fluorescencija omogoča direktno vizualizacijo molekul v realnem času znotraj biofilma. To omogoča določanje difuzije, določanje interakcij med sondami in matriksom, ter določanje praznin, kanalov in ostalih mikrobnih struktur znotraj biofilma. Delci, ki se uporabljajo za fluorescenčno mikroskopiranje, so lahko majhne molekule (fluorescenčna barvila, peptidi, lipidi), večje makromolekule (proteini, glikanske verige) in mikrofluorescenčne kroglice (premera 1 µm). Fluorescenčna barvila in fluorescenčno označeni dekstrani lahko zagotovijo dobro oceno difuzije skozi biofilm, vendar zaradi razlik v sestavi matriksa in celotni strukturi biofilma lahko pride do odstopanja difuzijskih koeficientov. Takšna odstopanja nakazujejo na interakcije med barvilm in komponentami matriksa ter na potovanje barvila skozi kanale znotraj biofilma (Billings in sod., 2015). Za pridobitev difuzijskega koeficiente znotraj biofilma se z mikroskopijo spremembo intenzivnosti fluorescence po času. Bolj specifično lahko s pomočjo fluorescenčnega mikroskopiranja preučujemo potovanje barvila preko mikroinjiciranja na različnih lokacijah biofilma. Npr. z vbrizganjem barvila na različna mesta po biofilmu so Debeer in sod. (1997) pokazali, da je fronta barvila pri difuziji ohranjala okroglo obliko. Ko pa so barvilo vbrizgali v kanale v biofilmu, barvilo ni tvorilo sferičnih krogov, temveč so opazili, da barvilo potuje po biofilmu v obliki podolgovatih lis, kar kaže na tok tekočine znotraj biofilmov. To delo je pokazalo, da imajo strukture biofilmov velik vpliv na gibanje topljencev znotraj biofilmov (Billings in sod., 2015; Debeer in sod., 1994).

Določanje difuzije je pomembno tudi iz aplikativnega vidika. Zunajcelični matriks služi kot filter za topljence in tako vpliva na omejen prenos antibiotikov po biofilmu, kar omogoča povečanje odpornosti na antibiotike pri celicah v biofilmih. Prenos antibiotikov je odvisen od sestave zunajceličnega matriksa, fizikalno-kemijskih lastnosti antibiotika in heterogene strukture biofilma. Antibiotiki lahko hitro preidejo biofilm s pomočjo kanalov in por znotraj biofilma. Vendar sorpcija v matiks, sferične ovire in inaktivacija antibiotikov znotraj biofilma lahko zmanjšajo dostopnost antibiotikov do tarč v učinkovitih koncentracijah (Billings in sod., 2015). S fluorescenčno mikroskopijo so npr. preučevali prenos protimikrobnih snovi preko biofilmov, ker je odpornost biofilmov proti antibiotikom velik problem v medicini. S testi občutljivosti na *in vitro* biofilmih so pokazali, da bakterije v biofilmih preživijo zdravljenje z antibiotiki tudi pri 100 do 1000 krat večjih koncentracijah kot je minimalna koncentracija, ki inhibira bakterije. Zato lahko ob prenehanju zdravljenja z antibiotiki biofilmi delujejo kot izvor ponovne okužbe (Stewart in Costerton, 2001).

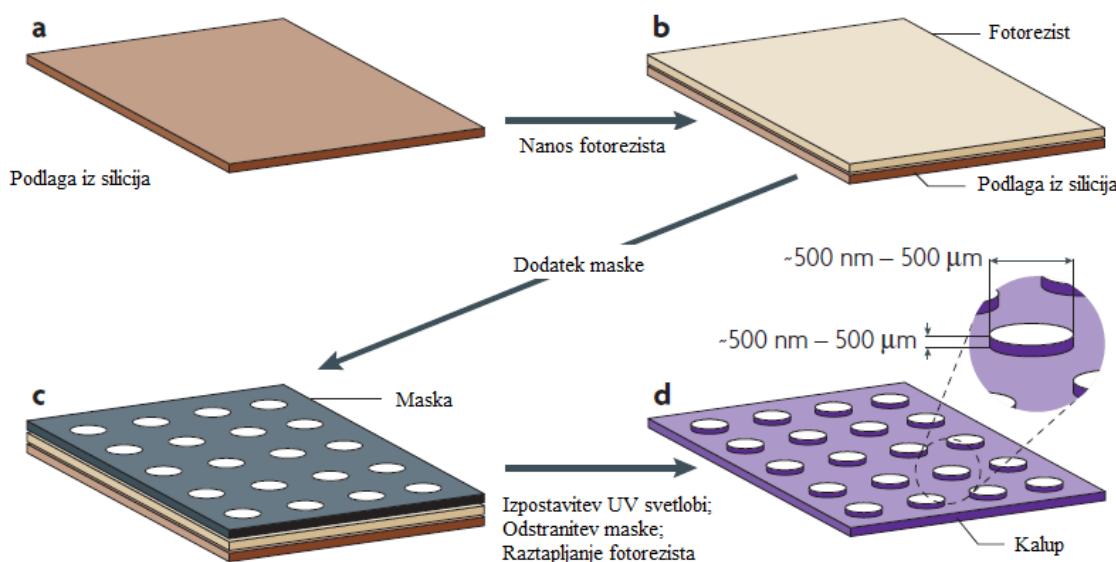
Večina dosedanjih raziskav preučuje difuzijske lastnosti zrelih biofilmov. Raziskav o določanju difuzijskih lastnosti mladih biofilmov oziroma sprememb difuzijskih lastnosti med razvojem biofilma ni. Eden izmed razlogov za takšno stanje je heterogena struktura biofilmov, zato je za proučevanje biofilmov potrebno bolj kontrolirano okolje. Da bi razvoj in difuzijske lastnosti kar najlaže preučevali brez invazivnih posegov, smo v delu uporabili mikrofluidni sistem.

## 2.3 MIKROFLUIDIKA

Mikrofluidika je veda o fluidnih sistemih na mikrometerski skali (Whitesides, 2006). Mikrofluidne aplikacije so zaradi izjemnega potenciala glavna tehnologija številnih miniaturnih sistemov na področju kemije, biologije, medicine in fizike. Te aplikacije lahko razdelimo na štiri področja: analitične sisteme, biomedicinske naprave, orodja za kemijo in biokemijo, ter sisteme za raziskave (McDonald in sod., 2000). Uporaba mikrofluidnih naprav na teh področjih omogoča manjo porabo reagentov, fleksibilno načrtovanje različnih mikrofluidnih geometrij, ima kratek čas analize in je cenovno ugodna (Yawata in sod., 2010). Mikrofluidne naprave so v raziskavah uporabljene tudi za mikrobiološke študije. Yawata in sod. (2010) poročajo o tehniki spremljanja nastanka biofilmov v mikrofluidni napravi. Rast biofilma bakterije *Streptococcus mutans* so spremljali v 12 urnih intervalih. S konfokalno refleksno mikroskopijo so ugotovili, da rast biofilma poteka do 60 ur po inokulaciji, nato je prišlo do zmanjšane rasti zaradi pomanjkanja hrani (Yawata in sod., 2010). Takšen pristop k raziskovanju omogoča uporabo majhnih volumnov tekočin in omogoča prostorsko kontrolo nastanka biofilmov (Kim in sod., 2012a). Za razliko od makrobiofilmov lahko izdelamo mikrofluidna vezja z večjim številom ponovitev posameznih geometrij pri identičnih pogojih kar omogoča boljšo kvantifikacijo dobljenih podatkov (Weibel in sod., 2007). Zagotavljajo tudi pretočni sistem za rast bakterij, dostopnost za opazovanje njihovega razvoja in boljši nadzor nad pretoki tekočin (Kim in sod., 2012b). Zato je uporaba mikrofluidike primerna za preučevanje difuzije, saj lahko z nadzorovanjem pretokov tekočin in spremljanjem nastanka biofilma izvajamo poskuse z dobro opredeljenimi in ponovljivimi pogoji (Weibel in sod., 2007). Kim in sod. (2012b) so ustvarili PDMS mikrofluidno napravo za preučevanje nastanka in organizacije biofilmov glede na različne koncentracije molekul kot so indol, 7-HI (7-hidroksi indol) in isatin. Ker zdravljenje z antibiotiki manj učinkovito pri biofilmih, so preučevali alternativno strategijo odstranjevanja biofilmov. Ugotovili so, da povečanje koncentracij indola in 7-HI uspešno inhibirajo razvoj biofilma *E. coli*, medtem ko isatin, ki je derivat indola, spodbuja nastanek biofilma. S to raziskavo so pokazali, da s pomočjo mikrofluidne naprave lahko preiskujejo sinergijske učinke spojin, ki zavirajo nastanek biofilmov (Kim in sod., 2012b).

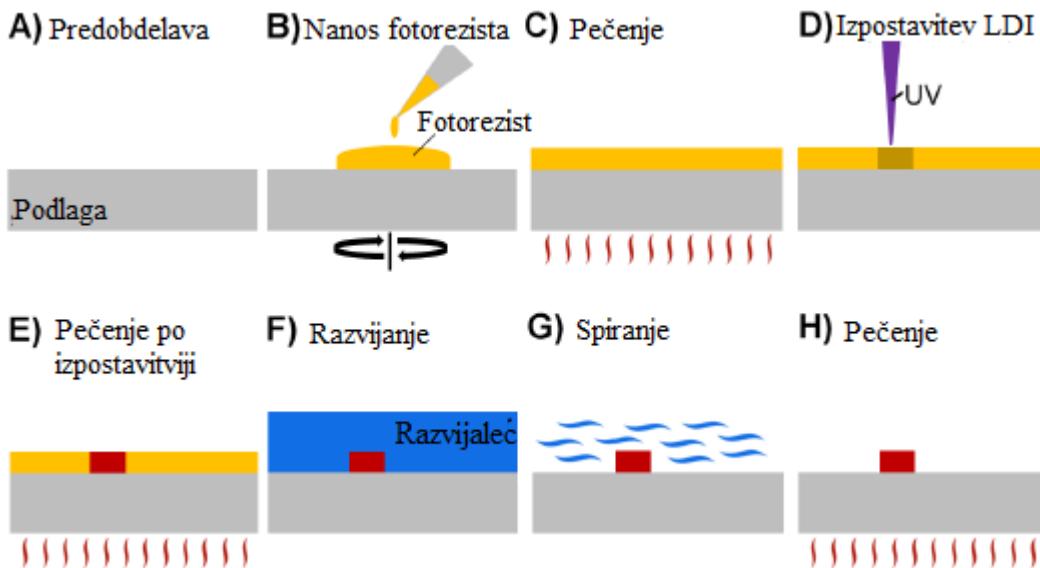
### 2.3.1 Izgradnja mikrofluidnih naprav

Za pripravo mikrofluidnih naprav potrebujemo fotolitografijo. Pri fotolitografiji z ultra vijoličnim (UV) svetlobnim virom osvetlimo plast svetlobno občutljivega materiala - fotorezista, ki je po navadi zasnovan na osnovi epoksi smol. Uporablja se za mikrostrukturiranje v različnih aplikacijah, kjer potrebujemo različno debele kemijsko in termično stabilne filme. Pri izdelavi naših vzorcev smo uporabljali fotorezist SU-8 2000 s katerim lahko ustvarimo enoslojne filme različnih debelin (4 – 120 µm). Glede topnosti ali pa kemijske stabilnosti fotorezistov po obsevanju s svetlobo določene valovne dolžine fotoreziste delimo v dve skupini, pozitivne in negativne (MicroChem, 2015). Pozitivni fotorezisti so fotorezisti, ki ob osvetlitvi postanejo topni v razvijальнem reagentu. Medtem ko neosvetljeni deli fotorezista ostanejo netopni v razvijальнem reagentu. Negativni fotorezisti so fotorezisti, ki ob osvetlitvi postanejo netopni v razvijальнem reagentu. Neosvetljeni del fotorezista pa postane topen v razvijальнem reagentu (Tian in Finehout, 2008). Osvetljen fotorezist se nato dokonča v razvijальнem reagentu in dokončno strdi s segrevanjem. Stekelce z oblikovanim fotorezistom je vzorec oziroma podlaga, ki služi kot glavni kalup za replikacijo vzorcev v PDMS. Litografija z masko je metoda, ki zahteva visoko kvalitetne maske na fotorezistu, izdelava mask je draga in zamudna, zato je primerna le za aplikacije kjer se struktura vzorcev le redko spreminja (Slika 5) (Kavčič, 2013).



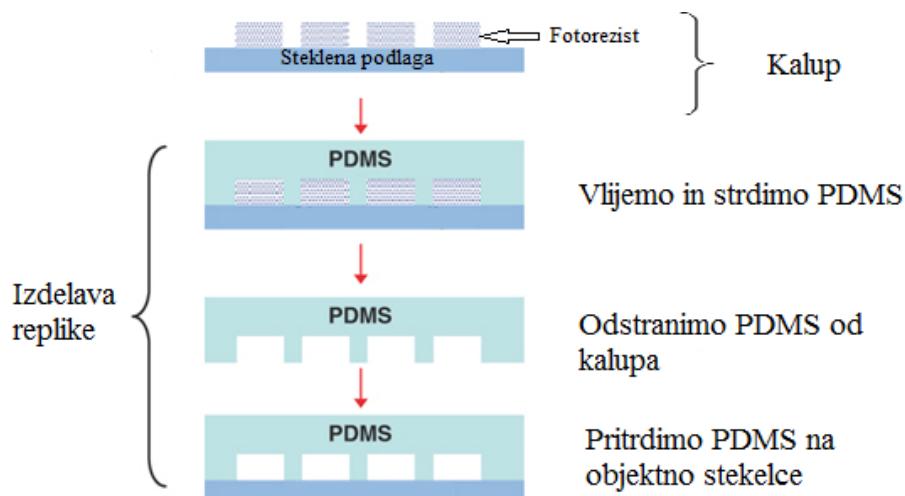
Slika 5: Slika prikazuje pripravo vzorca za izdelavo mikrofluidne naprave s pomočjo fotolitografije z masko (Weibel in sod., 2007).

Pri uporabi fotolitografije brez mask je fotorezist neposredno izpostavljen elektronskim, ionskim ali laserskim žarkom (Slika 6). V zadnjih letih so laserske metode postale bolj pomembne v industriji. Direktno lasersko osvetljevanje (v nadaljevanju LDI) je metoda litografije, pri kateri z uporabo usmerjenega fokusiranega žarka UV laserja na fotorezistu neposredno ustvarimo želen vzorec. Kemija in preostali način predelave je enak ali podoben tistim pri litografiji z masko (Kavčič, 2013).



Slika 6: Prikaz priprave vzorca za izdelavo mikrofluidnih naprav s fotolitografijo brez mask (Kavčič, 2013).

Prve mikrofluidne naprave so bile narejene iz silicija in stekla. Vendar so bile te tehnike drage in časovno zahtevne. Uporaba polimerov je enostavna, hitra in cenovno ugodnejša. Eden izmed najbolj uporabnih polimerov za mikrofluidiko je polidimetilsilosan (PDMS) (McDonald in Whitesides, 2002). Velik del raziskav v mikrofluidnih celicah je narejenih v PDMS-ju, ki se ga po izdelavi vlije na stekelce s kalupom (Slika 7) (Whitesides, 2006; Fujii, 2002). PDMS je nato potrebno polimerizirati, kar se naredi s povišano temperaturo. Strjenega se odlepi od kalupa in to predstavlja repliko, ki se jo prilepi na različne podlage kot je na primer steklo. PDMS je eden izmed najprimernejših materialov za mikrofluidne celice zaradi svojih ugodnih lastnosti, lahko ustvari mikrostrukture z gladkimi površinami, je optično transparenten in se ga lahko uporablja tudi za analize kjer se uporablja fluorescenčna barvila (Fujii, 2002).



Slika 7: Prikaz izdelave PDMS replike (Longo in Hasty, 2006).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Preglednica s kemikalijami.

Kemikalija	Proizvajalec
aceton	Merck,Darmstadt, Nemčija
etanol	Sigma-Aldrich,Steinheim, Nemčija
2 - propanol	Sigma-Aldrich,Steinheim, Nemčija
SU - 8 3005	MicroChem, Newton, ZDA
SU - 8 2000 Thinner	MicroChem, Newton, ZDA
silikon elastomer osnova	Sylgard, Dow Corning, Michigan, ZDA
Developer mr-Dev 600	Micro resist technology, Berlin, Nemčija
natrijev fluorescin	Fluka, St. Gallen, Switzerland
silikon elastomer trdilo	Sylgard, Dow Corning, Michigan, ZDA
spektinomicin	Sigma-Aldrich,Steinheim, Nemčija

##### 3.1.2 Sestava gojišč

###### Tekoče gojišče Luria Bertani bujon

Tekoče gojišče Luria Bertani bujon smo pripravili tako, da smo v 1L destilirane vode raztopili 5 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl in 10 g triptona. Gojišče smo sterilizirati na 121°C, pri tlaku 1,1 bara, za 20 minut. Po avtoklaviranju smo gojišče shranili do uporabe na 4°C.

Preglednica 2: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča LB.

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)
Kvasni ekstrakt	5
NaCl	5
Tripton	10
dH <sub>2</sub> O	do 1L

###### Tekoče gojišče SYM

Tekoče gojišče SYM smo pripravili, tako da smo komponente naštete v preglednici 3 raztopili v 1L destilirane vode. Gojišče smo avtoklavirati na 110°C, pri 1,1 bara za 30 minut.

Preglednica 3: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča SYM.

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)
<b>Kvasni ekstrakt</b>	20
<b>Saharoza</b>	200
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	12
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	4
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	3
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	6
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	0,0015
<b>Amonijev železov (III) sulfat</b>	0,02
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	do 1L

### Tekoče gojišče Czapek

Tekoče gojišče Czapek smo pripravili tako da smo komponente naštete v preglednici 4 raztopili v 1L destilirane vode. Gojišče smo nato dali sterilizirati na 110°C, pri 1,1 bara za 30 minut.

Preglednica 4: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča Czapek.

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)
<b>Kvasni ekstrakt</b>	0,1
<b>Glukoza</b>	30
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	3
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,5
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,5
<b>FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0,01
<b>MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	0,005
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	do 1L

### Tekoče gojišče MSgg

Tekoče gojišče MSgg smo pripravili tako da smo komponente naštete v preglednici 5 raztopili v 1L destilirane vode. Gojišče smo nato dali sterilizirati na 110°C, pri 1,1 bara za 30 minut.

Preglednica 5: Preglednica s sestavinami za pripravo gojišča MSgg.

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)
<b>Mops</b>	21
<b>K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	1
<b>Triptofan</b>	0,05
<b>Fenilalanin</b>	0,05
<b>MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O</b>	0,4
<b>Glutamat - Na</b>	5
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,08
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	0,008
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	0,006
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0,00014
<b>Tiamin hidroklorid</b>	0,0006
<b>Glicerol</b>	5
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	do 1L

### Trdno gojišče Luria Bertani - Agar

Za pripravo trdnega gojišča Luria Bertani smo raztopili komponente naštete v preglednici 6 v 1 L destilirane vode. Gojišče smo nato avtoklavirali na 121°C, tlak 1,1 bar, za 30 minut. Po sterilizaciji smo gojišče pustili, da se je ohladilo na okoli 50 °C. Pred razlivanjem gojišča smo aseptično dodali ustrezno količino antibiotika spektinomicina in ga razlili v petrijeve plošče. Dodatek antibiotika nam omogoča selekcijo bakterij z odpornostjo na spektinomicin, saj vsebuje proučevani bakterijski sev zapis za odpornost proti antibiotiku. Petrijeve plošče z gojiščem smo nato do uporabe hranili na 4°C.

Preglednica 6: Preglednica s sestavinami za pripravo trdnega gojišča LB.

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)
Agar	15
Kvasni ekstrakt	5
NaCl	5
Tripton	10
dH <sub>2</sub> O	do 1L

### **3.1.3 Založne raztopine**

#### Raztopina natrijevega fluoresceina

Za pripravo 10 mM raztopine natrijevega fluorescina smo v 10 mL destilirane vode raztopili 0,0376 g natrijevega fluoresceina.

### **3.1.4 Bakterijski sevi**

Pri izvedbi poskusov smo uporabljali bakterijski sev *Bacillus subtilis* PS216 amiE yfp.

### **3.1.5 Laboratorijska oprema in pribor**

Preglednica 7: Aparature uporabljene pri delu.

Aparatura	Aparatura		
Avtoklav	Kambič A-21	Fluorescenčni mikroskop	Nikon 90i, objektiv TIRF Plan Neo-Flour 100x
Laboratorijska tehnica	Mettler PM4600 DeltaRange	Grelna plošča	Yellow line MAG HP1
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH	Grelna plošča	Yellow line MSH basic
Vortex	IKA MS3 digital	Millipore	Simplicity 185, Simpack 2
Spektrofotometer	Iskra Photometer MA9510	Analitska tehnica	Kern ABJ 120-4M
Vortex	Yellow line TTS2		

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje bakterijskih kultur

V 100 mL erlenmajerice s stranskim rokavom smo prenesli 25 mL gojišča LB. V erlenmajerico smo nato s sterilno ezo prenesli kulturo gojeno na petrijevi plošči. Nacepljeno kulturo smo inkubirali na stresalniku preko noči pri 28 °C in 220 obr./min.

### 3.2.2 Gojenje biofilmov v petrijevih posodicah

Biofilme smo gojili v petrijevih posodicah. V 40 mL tekočega gojišča smo dodali 2% inokulum in dali gojiti na 28°C. Po 24 urah smo zrasle biofilme poslikali s fotoaparatom, tako da smo zajeli celotno petrijevo ploščo.

### 3.2.3 Priprava mikrofluidnega vezja

#### Priprava fotorezista

Objektno stekelce očistimo tako, da ga speremo z acetonom (30 s), izopropanolom (30 s) in milipore vodo. Stekelce nato posušimo z dušikom, da odstranimo vso vlago, ki je lahko prisotna na površini stekelca. Pred nanosom fotorezista na zgornjo stran stekelca dodamo 100 µL reagenta Ti prime, ki izboljša adhezijo fotorezista na stekelce. Da reagent Ti prime razporedimo enakomerno po stekelcu, ga damo na »spin coater« na 3000 rpm za 20 sekund. Sledi sušenje nanesenega sloja na vroči plošči dve minuti pri 120°C, da se stabilizira (MicroChemicals, 2002).

Ko je stekelce suho dodamo fotorezist SU-8 100 µL in damo steklce na »spin coater« na 3500 rpm za 40 sekund, da se fotorezist enakomerno porazdeli po stekelcu. Tudi tu je debelina sloja odvisna od prej naštetih parametrov. Glavni lastnosti, ki vplivata na debelino filma sta viskoznost fotorezista in frekvenca vrtenja stekelca. Viskoznost je odvisna od razmerja organskega topila (ciklopantanon ali  $\gamma$ -butirolaktona) in SU-8 smole. Bolj viskozen je fotorezist debelejši bo sloj na steklcu in večja kot bo frekvenca vrtenja tanjši bo sloj fotorezista. Tako lahko z uravnavanjem teh dveh faktorjev dosežemo želeno debelino fotorezista. Po nanosu fotorezista stekelce zopet sušimo na vroči plošči dve minuti pri 95°C (MicroChem, 2015; Jain in Gopal, 2014).

#### Fotolitografija

Po pripravi ploščico z nanešenim fotorezistom vstavimo v napravo LDI. V programu ProtoLaserD narišemo želeno strukturo, naprava pa nato s fokusiranim UV laserskim žarkom osvetli želeni vzorev na fotorezistu (Kavčič, 2013). Ker SU-8 spada med negativne fotoreziste ima fotoaktivne spojine, ki polimerizirajo ob osvetljevanju s svetlobo. Zato so deli izpostavljeni svetlobi obstojni, medtem ko se neizpostavljeni dele nato odstrani z uporabo razvijalnega reagenta. Po osvetljevanju sledi peka na 95°C, nato vzorec razvijemo v približno 15mL razvijalnega reagenta mr-Dev 600. Na koncu izpostavimo še zadnjemu pečenju pri 120°C za 30 minut, ki dokončno strdi fotorezist in ga naredi trajnega (MicroChem, 2015; Jain in Gopal, 2014).

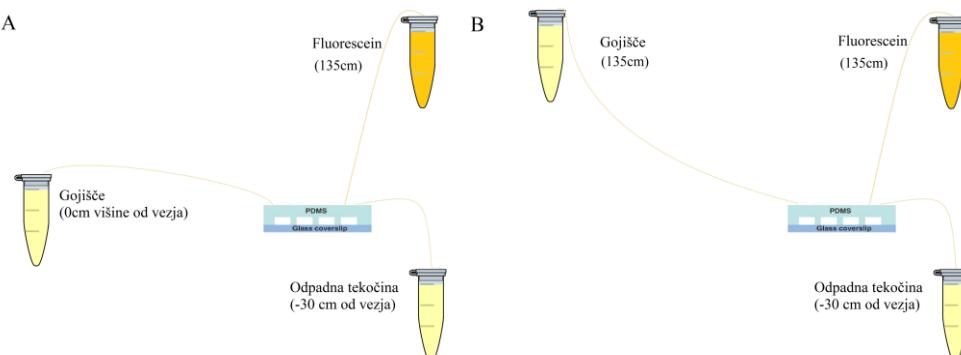
### Priprava PDMS-ja

Za pripravo PDMS-ja potrebujemo trdilo in silikonski elastomer, ki je baza PDMS-ja. Silikonski elastomer in njegovo trdilo (Sylgard) zmešamo v razmerju 10:1. Nato je zmes potrebno dobro premešati in razpliniti v eksikatorju, dokler ni več vidnih mehurčkov. Zaradi hitrega sušenja PDMS-ja na sobni temperaturi ga je potrebno shranjevati v zamrzovalniku do nadaljnje uporabe.

### Priprava vezja

Na stekelce s kalupom položimo aluminijast okvir v katerega vlijemo PDMS. Stekelce nato položimo na vročo ploščo z 95 °C, da se PDMS strdi. Ko je PDMS strjen ga s skalpelom ločimo od aluminijastega okvirja in ga previdno odstranimo s stekelca. V PDMS nato z zbrušeno iglo napravimo luknje, kamor kasneje vstavimo cevke za dotok in odtok gojišča. PDMS je potrebno pred pritrjevanjem na krovno stekelce sprati z izopropanolom in milipore vodo ter posušiti z dušikom. Prav tako smo spirali in sušili tudi krovno stekelce. Stekelce in PDMS ločeno vstavimo v plazemski reaktor, ki tvori zračno plazmo pri tlaku 50 Pa za 10 sekund, zato da material aktiviramo. PDMS nato previdno primemo in ga položimo na stekelce, da se sama od sebe sprimeta skupaj. Narejeno mikrofluidno vezje smo nato položili na vročo ploščo še za 5 minut na 95 °C za boljšo vezavo. Dobro vezavo preverimo, tako da PDMS s stekelcem primemo in ju rahlo povlečemo narazen. V tem primeru se PDMS in stekelce dobro držita skupaj in ne opazimo odstopanja PDMS-ja od stekelca.

Za začetek poskusa smo pripravili epice z gojiščem, fluorescentnim barvilom in odpadno tekočino (Slika 8). Epice smo z mikrofluidnim vezjem povezali preko cevk, ki smo jih vstavili v pripravljene luknje v PDMS vezju. Pretok gojišča in fluorescentnega barvila smo uravnavali z odpiranjem in zapiranjem zapiralke na cevkah. Tok tekočine je poganjala tlačna razlika med rezervarjem, pretoke smo regulirali z predhodno preverjeno višino epic od tal, tako da smo dobili pretoke v povprečju okoli  $\approx 16 \mu\text{L}/\text{h}$ .



Slika 8: Shema A prikazuje pozicije rezervarjev ob inokulaciji vezja z bakterijami (pretok 0  $\mu\text{L}/\text{h}$ ). Shema B prikazuje pozicijo rezervarjev, ko je pretok v vezju  $\approx 16 \mu\text{L}/\text{h}$ . Rezervoar z gojiščem je bil v tem primeru vertikalno premaknjen.

### **3.2.4 Merjenje difuzije v mikrofluidni napravi**

Prekonočno kulturo namnoženo v erlenmajerici smo 100 krat redčili in vnesli 1 - 2  $\mu\text{L}$  redčitve v mikrofluidno vezje z gojiščem. Pri vnosu bakterijskega inkoluma v mikrofluidnem vezju ni bilo toka tekočine. Ko smo z mikroskopom preverili, da se bakterije nahajajo v stranskih kanalih smo zopet vzpostavili tok gojišča v vezju. Tako pripravljeno vezje z bakterijami smo inkubirali pri sobni temperaturi in v rednih intervalih s svetlobno mikroskopijo preverjali rast biofilma v posameznih komorah. V izbranih časovnih intervalih, ko smo želeli določiti difuzijski koeficient, smo vzpostavili pretok fluorescenčnega barvila, tako da smo odprli zapiralko na cevki z barvilkom in sledili gibanju fluorescenčnega barvila skozi rastno komoro. Z občutljivo kamero CCD kamero Hamamatsu ImageEM, nameščeno na fluorescenčnem mikroskopu Zeiss Axiovert 200M smo pridobili posnetke fluorescence z zajemanjem 1 slike na sekundo. Nato smo s programom HisViewer iz posnetkov odčitali intenziteto fluorescence na vhodu v komore in njegovo ozadje, ter na koncu komore (oddaljenem 310  $\mu\text{m}$  od vhoda v kamero) in njen ozadje. Tako smo pridobili numerične podatke o polnjenju in praznjenju komor v katerih je rasel biofilm. Z dobljenimi podatki smo izrisali grafe polnjenja in praznjenja komor, tako da smo od podatkov za intenziteto fluorescence pri vhodu v komoro in na koncu komore odšeli njuni ozadji ter intenzitete fluorescence normalizirali. Dobljene podatke smo nato uporabili za izračun difuzijskega koeficiente.

#### Določanje difuzijskega koeficiente

Proces difuzije barvila skozi biofilm smo modelirali z enodimenzionalno difuzijsko enačbo (Enačba (2)). Ker v našem primeru te diferencialne enačbe ni mogoče analitično rešiti, smo jo rešili numerično v programu Wolfram Mathematica 7. Robni pogoj, torej koncentracijo barvila na ustju komore v odvisnosti od časa, smo pridobili iz eksperimenta in uporabili pri numeričnem reševanju. Izmerjeni koncentraciji barvila na koncu komore v odvisnosti od časa smo prilagajali numerično rešitev difuzijske enačbe s spremenjanjem enega samega parametra - difuzijske konstante  $D$ . Ujemanje eksperimentalnih podatkov in numerične rešitve difuzijske enačbe smo tipično dosegli v nekaj iteracijah prilagajanja  $D$ .

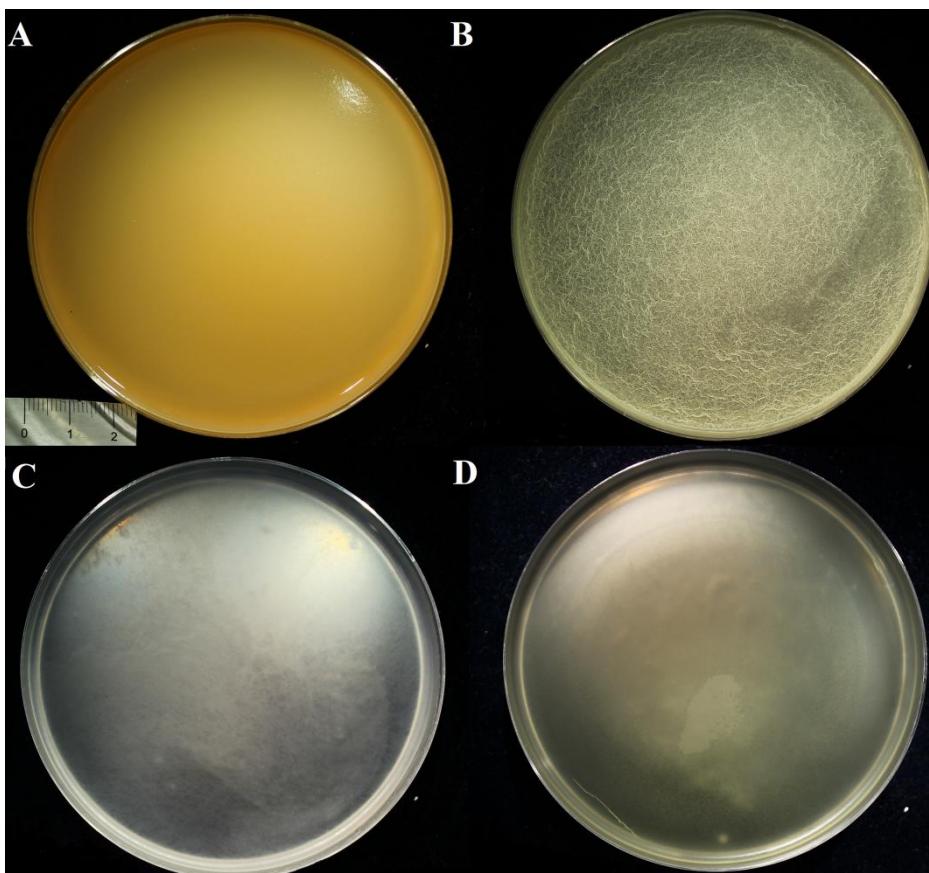
#### Določanje faktorja pakiranja biofilmov

Za določanje faktorja pakiranja biofilma iz svetlobne mikroskopske slike smo razvili preprost algoritem, ki na podlagi Sobelovega algoritma (MATLAB) za detekcijo robov vsaki vhodni sliki priredi neko število. Če je slika uniformna (homogeno ozadje brez bakterij), je to število 0, z večanjem neuniformnosti slike (s povečevanjem števila bakterij) pa to število narašča vse do zgornje meje okoli 0.3.

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZVOJ BIOFILMOV

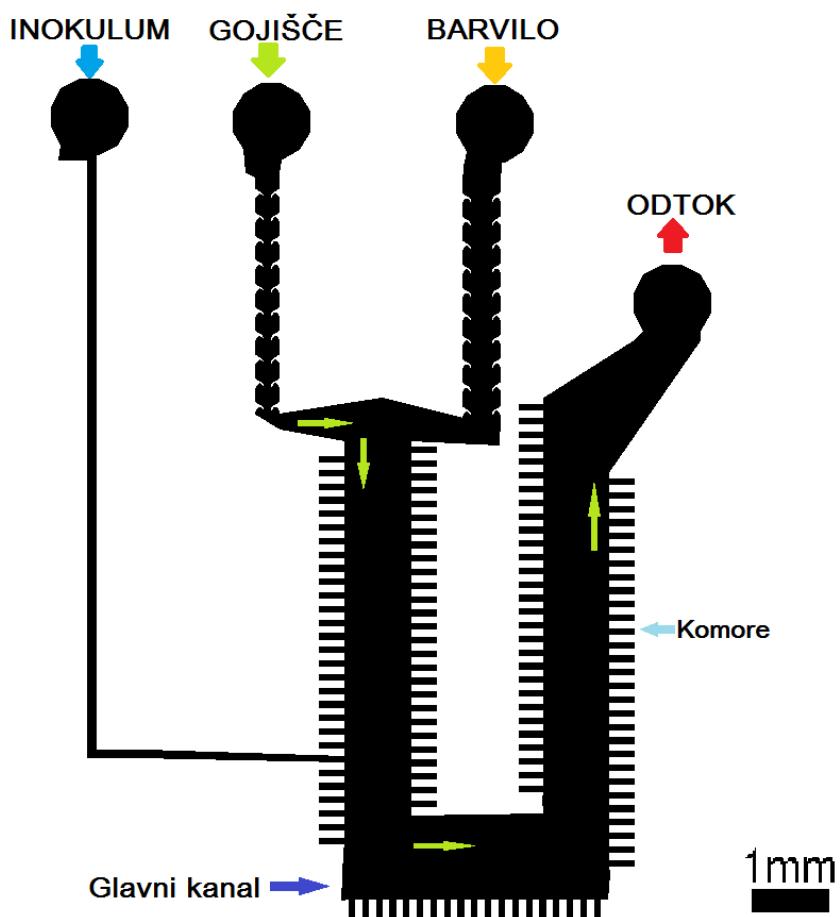
Slika 9 prikazuje biofilme bakterije *Bacillus subtilis*, kjer smo preverili vpliv gojišč na razvoj biofilmov na makroskopskem nivoju. Iz slike je razvidno, da so biofilmi gojeni v gojišču SYM (Slika 9A) tvorili po 24 urah inkubacije kompakten debel biofilm, rahlo naguban in rjavkasto obarvan. V gojišču MSgg (Slika 9B) so nastali močno nagubani in rumeno obarvani biofilmi. Biofilmi, gojeni v gojišču Czapek (Slika 9C), rastejo počasneje kot v ostalih dveh gojiščih. Bakterije so v vzorcih z gojiščem Czapek tvorile zelo tanke sloje biofilma, ki so bili belo obarvani. Pri vzorcih, zraslih v gojišču LB (Slika 9D), opazimo da je nastanek biofilma še slabši kot v gojišču Czapek. Biofilm ni nastal po celotni površini. Prišlo je do manjše lokalne agregacije celic na površini.



Slika 9: Makroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 urah gojenja v različnih gojiščih. Biofilme smo gojili v različnih tekočih gojiščih v nestresanih petrijevih posodicah. Slika A prikazuje biofilm v SYM gojišču, slika B v MSgg, slika C v Czapek in slika D v LB gojišču.

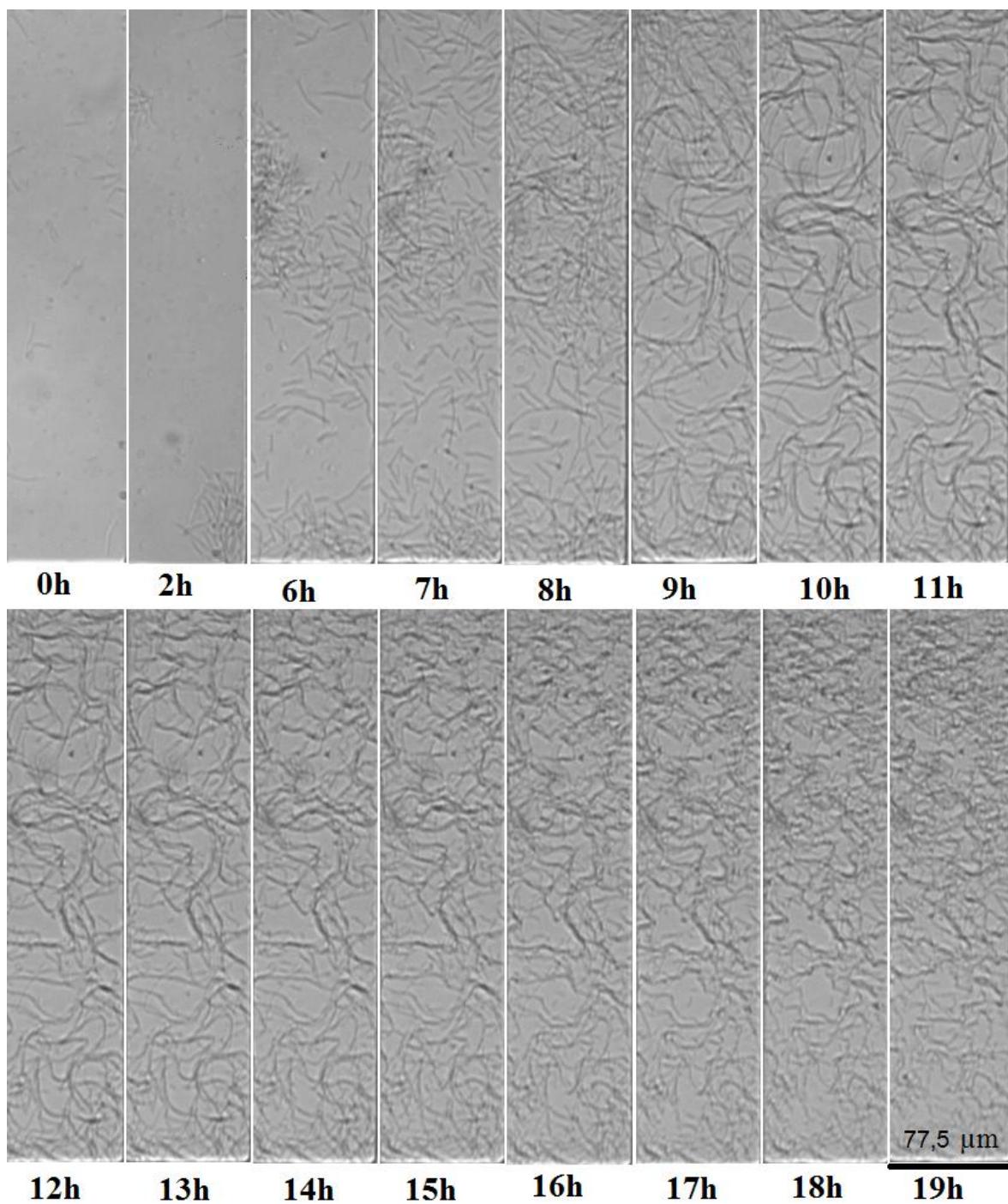
Razvoj biofilmov *B. subtilis* smo spremljali tudi na mikroskopskem nivoju v mikrofluidni napravi. Shema mikrofluidne naprave je prikazana na sliki 10. V glavni kanal mikrofluidne naprave smo dovajali gojišče s pretokom  $\approx 16 \mu\text{m}/\text{s}$ , po potrebi tudi fluorescenčno barvilo. Iz glavnega kanala so vodili stranski zaprti rokavi (komore), v katere je gojišče prihajalo z difuzijo. Nizvodno po kanalu smo speljali dotok za inokulum bakterij. Da bi bakterijam

preprečili potovanje do rezervoarjev za hranila in fluorescenčno barvilo, smo v zgornjem toku pripravili serijo geometrijskih preprek. Višek gojišča in nepritrjene bakterije smo odplavljalili v odtok. Bakterije smo gojili pri sobni temperaturi. Zaradi transparentne narave mikrofluidnega vezja smo lahko v posameznih komorah mikroskopsko spremljali razvoj biofilma.



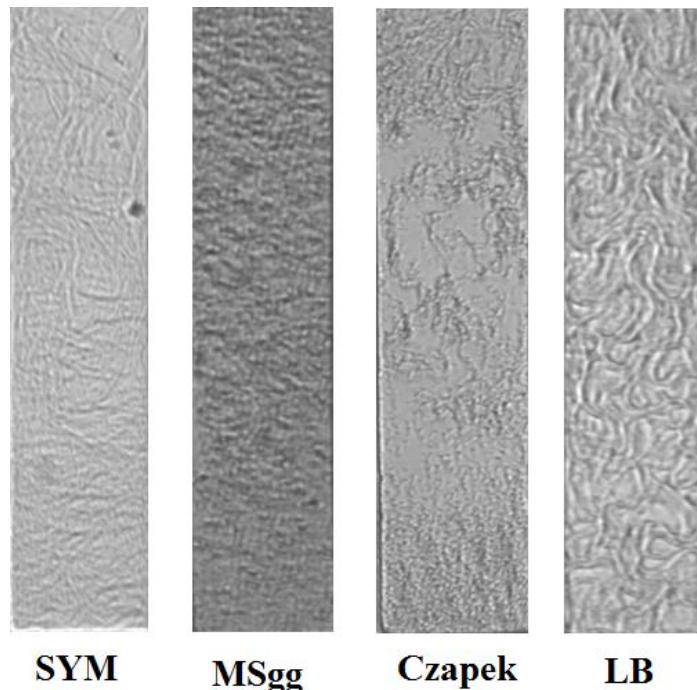
Slika 10: Prikaz oblike mikrofluidnega vezja, ki smo ga uporabili pri našem delu.

Kot je razvidno iz slike 11 se v prvih šestih urah v izbrani komori pojavljajo predvsem posamezne celice, ki se delijo in so gibljive. Z daljšanjem časa inkubacije se pojavijo krajevi filamenti celic, ki so sestavljeni iz večjega števila celic, ki po delitvi ostanejo povezane v filament. Po osmih urah je filamentozna rast bolj opazna. Filamenti se med rastjo zvijajo in postopno zapolnijo prostor v komori. V filamentih se po določenem času pojavi vidna delitev do posameznih celic (po 16h), vendar celice še vedno ostajajo povezane s svojimi sosedji. Razvoj zrelega biofilma se začne s pojavom filamentov.



Slika 11: Prikaz nastanka biofilma po času. *B. subtilis* smo inokulirali v mikrofluidno vezje s stalnim pretokom LB gojišča in spremljali njegovo rast v izbrani komori pri različnih časovnih intervalih pri sobni temperaturi.

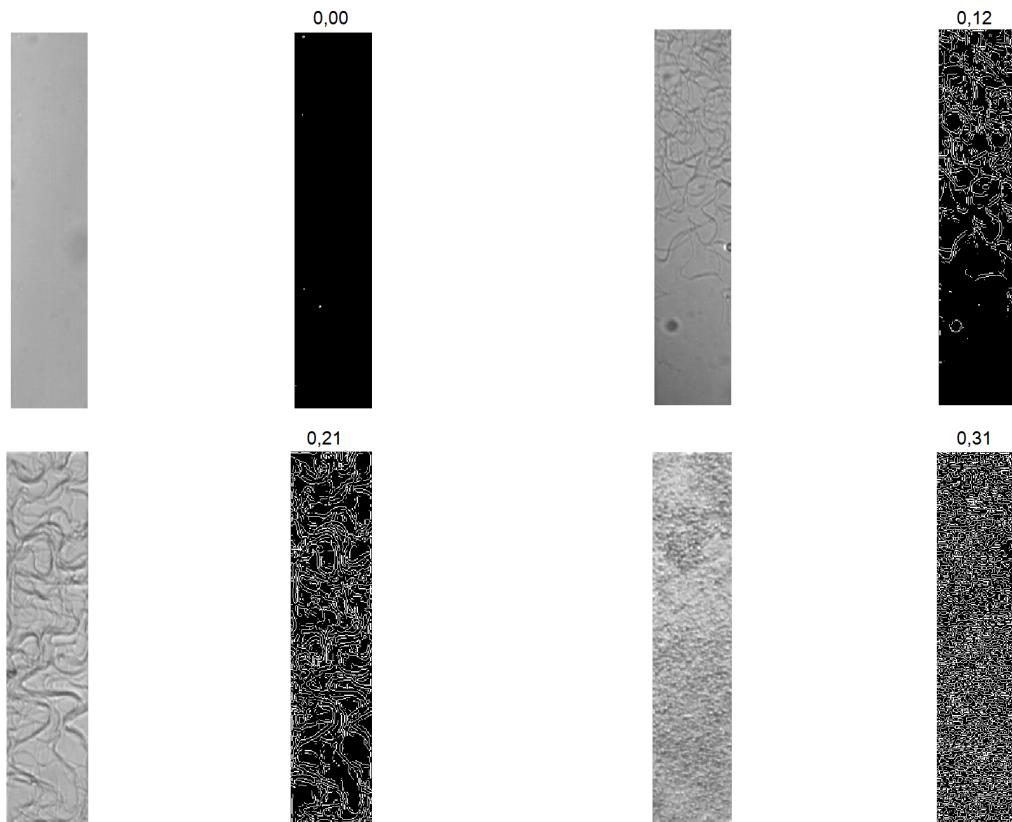
Biofilmi v različnih gojiščih v mikrofluidni napravi so se razlikovali (Slika 12). Filamentozna rast je bila manj opazna v gojiščih MSgg in Czapek. Po 19 do 21 urah se v vseh gojiščih pojavijo kompaktni biofilmi, kar prikazuje slika 12. Gostota biofilmov v različnih gojiščih je bila različna. Najgosteje so bile celice pakirane v gojišču Msgg najmanj pa v gojišču Czapek. V gojišču SYM je bil kontrast celic glede na okolico nižji, kar je posledica znatne produkcije zunajceličnega matriksa (Dogsma in sod. 2013). V mikrofluidni napravi je za razliko od makroskopsko gojenih biofilmov nastal gost biofilm tudi v gojišču LB. To kaže, da geometrija prostora v katerem nastaja biofilm vpliva na njegov razvoj.



Slika 12: Biofilmi bakterije *B. subtilis* gojenih v različnih gojiščih po 19 do 21 urah. Biofilme smo gojili v mikrofluidnem vezju pri sobni temperaturi in stalnem pretoku gojišč. Slike prikazujejo reprezentativne komore v različnih gojiščih.

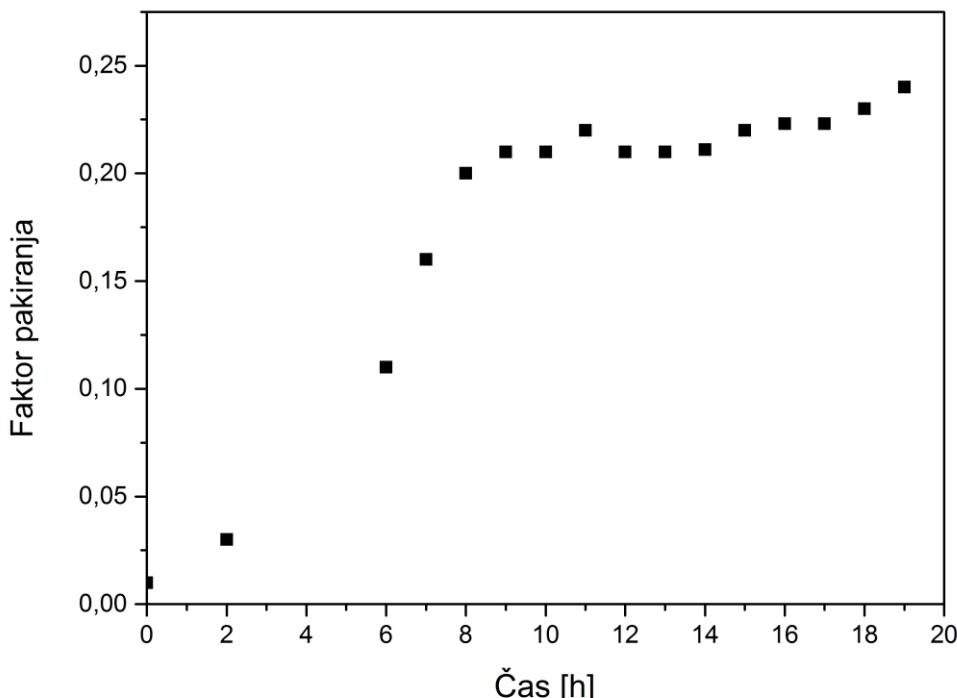
#### 4.1.1 Faktor pakiranja

V mikrofluidni napravi smo zaradi velikega števila stranskih komor lahko enostavno preverili ponovljivost rezultatov. Izkazalo se je, da je variabilnost nastanka biofilma zelo velika. Pri istem času gojanja so bili v nekaterih komorah biofilmi popolnoma razviti, v sosednjih pa biofilm sploh ni nastal. Biofilmi so se razlikovali tudi glede na gostoto celic in morfologijo. Zaradi tega smo razvojni stadij biofilma okarakterizirali preko deleža celic na površino komore s pomočjo konturnih grafov. Dobljeni faktor pakiranja nam poda oceno o gostoti biofilma.



Slika 13: Prikaz pridobitve faktorja pakiranja pri posamezni fazi razvoja biofilmov. Levo je prikazana mikroskopska slika, desno pa binarna slika in pripadajoči faktor pakiranja. Slika levo zgoraj prikazuje faktor pakiranja za vezje pred inokulacijo *B. subtilis*. Slika desno zgoraj prikazuje kanal, ki je že delno preraščen z biofilmom. Levo spodaj imamo sliko, kjer je biofilm že prerastel kanal vendar to ni še dokončno izoblikovan biofilm. Slika desno spodaj pa prikazuje dobro pakiran biofilm.

Kot kaže slika 13 konturni grafi zadovoljivo povzamejo gostoto pakiranja celic v komori, čeprav se celice pojavljajo v več nivojih in kontrast ni vedno optimalen. Vendar pa s pomočjo konturnih grafov ne moremo zadovoljivo opisati zunajceličnega materiala, ki lahko pomembno prispeva k strukturi biofilma. Ne glede na omenjene težave faktor pakiranja dobro opiše razvoj biofilma, kot je prikazano na sliki 14. Faktor pakiranja se sigmoidno povečuje skladno s povečanjem števila celic v komori do 8 ure inkubacije, kar sovpada s časom masovnega pojava filamentov v komori, kot je prikazano na sliki 10. Gostota pakiranja se z nadaljnjo inkubacijo povečuje, vendar je porast relativno majhen.



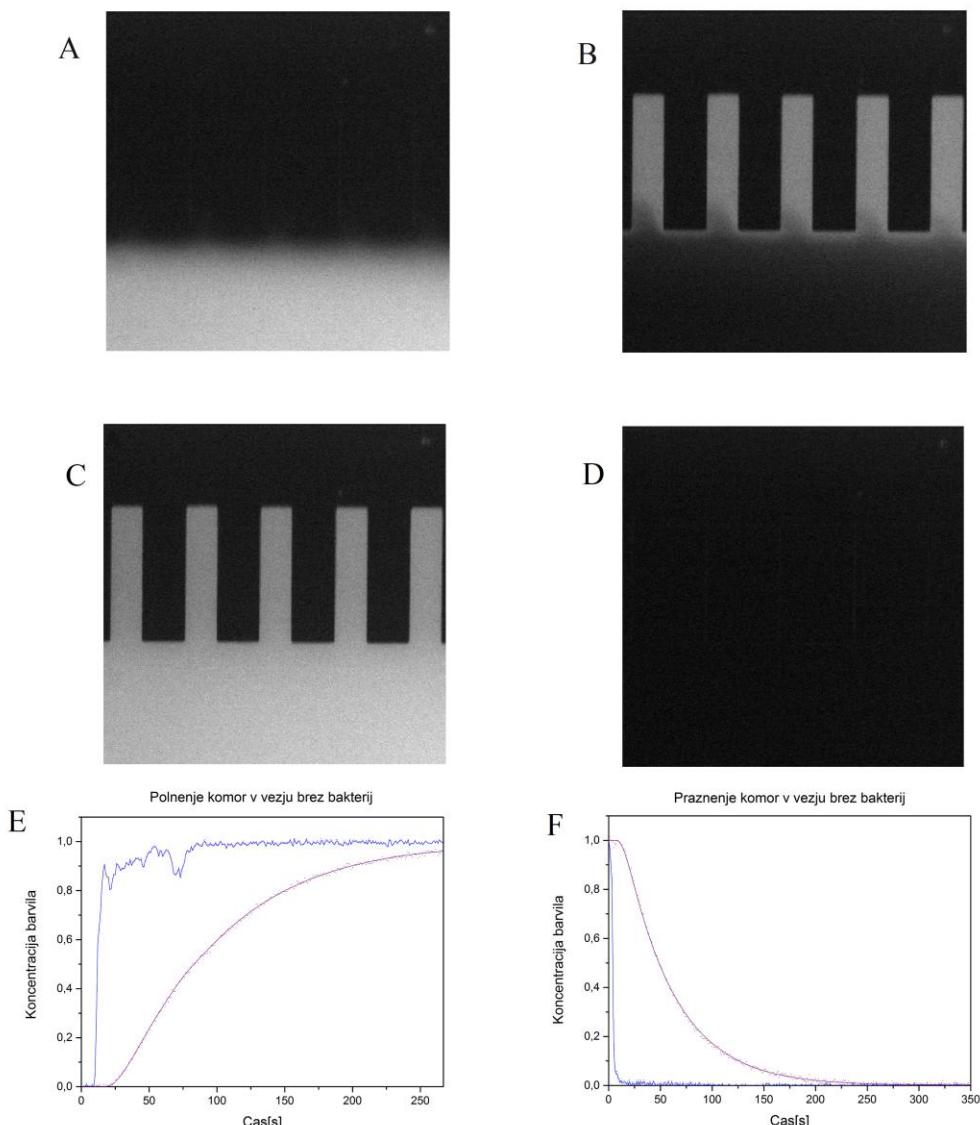
Slika 14: Sprememba faktorja pakiranja v mikrofluidni komori po času inkubacije. Faktorji pakiranja so bili pridobljeni iz biofilma v gojišču LB (prikazan na sliki 10).

## 4.2 DIFUZIJA BIOFILMOV V RAZLIČNIH GOJIŠČIH

Difuzija molekul je odvisna od številnih parametrov (npr. gostote pakiranja delcev, vezave molekul na površine, kemijskih reakcij difundirajočih molekul). Preden smo začeli s preučevanjem difuzijskih lastnosti biofilmov smo zato preverili ali se natrijev fluorescein veže na PDMS oziroma celice v biofilmu.

### 4.2.1 Preverjanje vezave natrijevega fluoresceina na PDMS in biofilm

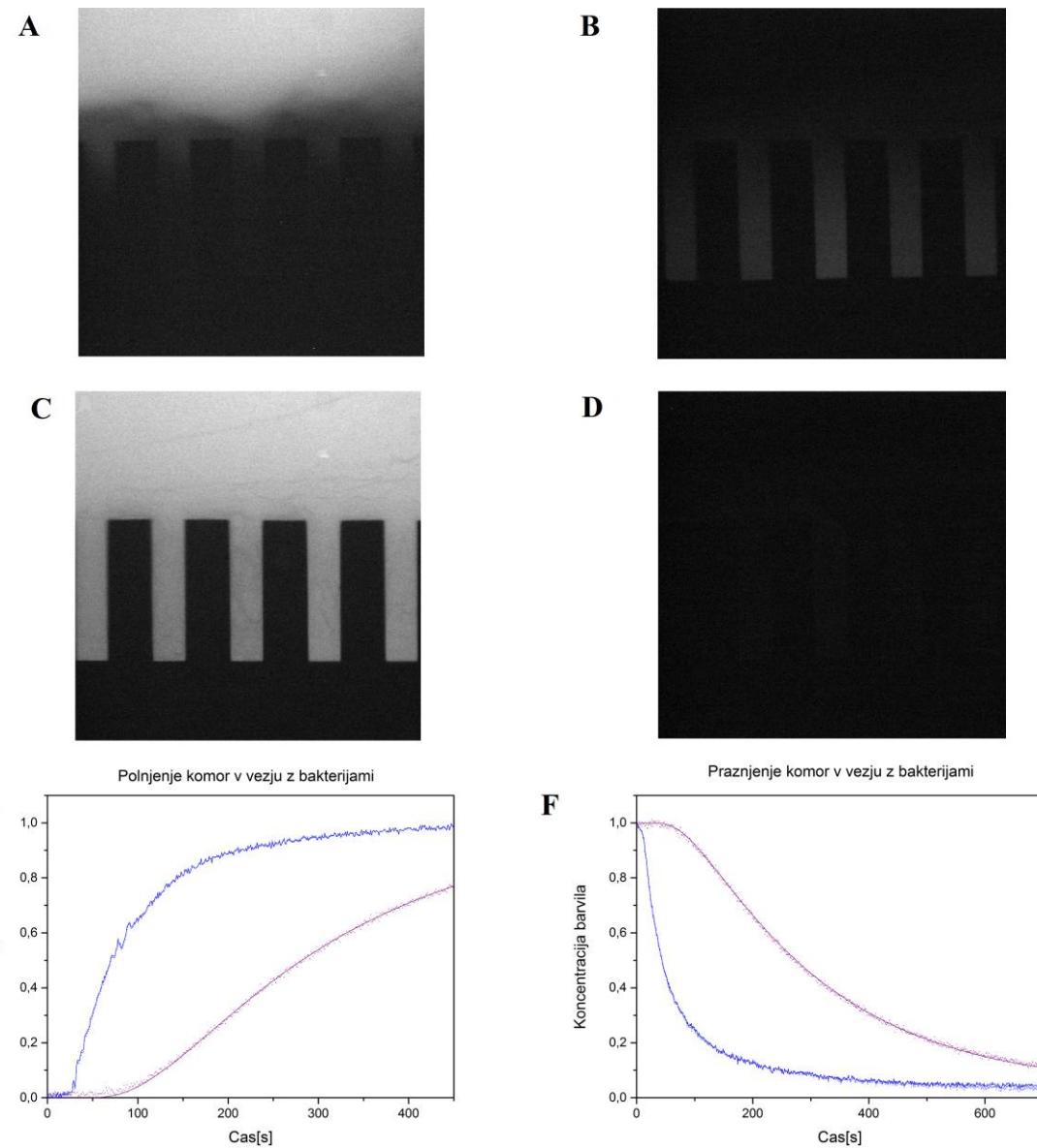
Na sliki 15A je prikazan glavni kanal v katerega smo dovajali fluorescenčno barvilo in komore v katere je barvilo prehajajo z difuzijo (Slika 15C). Ko je bil vzpostavljen tok barvila v glavnem kanalu, se je s karakterističnim časom  $t_D$  koncentracija fluorescenčnega barvila v komorah povečevala kot je prikazano na sliki 15E. Meritve difuzije smo opravili na fluorescenčnem mikroskopu opremljenem s sistemom za spremljanje intenzitete fluorescence. Na sliki 15E sta prikazani dve krivulji, prva (modra) predstavlja koncentracijo barvila v glavnem kanalu. Druga krivulja (vijolična) pa predstavlja koncentracijo barvila na koncu komore, ki je na oddaljenosti 310  $\mu\text{m}$  od glavnega kanala. Pri polnjenju komor smo z uporabo drugega Fickovega zakona pridobili podatek o difuzijskem koeficientu, ki je znašal  $600 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Izmerili smo tudi hitrost praznjenja komor po tem, ko smo prenehali z dovajanjem fluorescenčnega barvila v glavni kanal (Slika 15B). S časom začne koncentracija v komori padati do koncentracije nič, ko barvila v komorah in glavnem kanalu nismo več zaznali (Slika 15D). Difuzijski koeficient smo dobili z uporabo drugega Fickovega zakona. Tudi v tem primeru je bilo prileganje modela eksperimentalnim podatkom zelo dobro. Difuzijski koeficient pri praznjenju komor je bil  $880 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Slika 15F). Rezultati kažejo, da se natrijev fluorescein ni ireverzibilno vezal na stene PDMS.



Slika 15: Dodatek natrijevega fluoresceina v mikrofluidno napravo brez bakterijskih celic. Skozi mikrofluidno napravo je teklo gojišče LB, ki smo mu v izbranem času dodali natrijev fluorescein. Pri sliki A svetli del kaže fluorescenčno obarvan glavni kanal. Slika C prikazuje polnjenje komor z difuzijo fluoresceina po dodatku fluorescenčnega barvila. Na sliki E je z modro črto prikazana koncentracija barvila na meji glavnega kanala in komore po dodatku fluorescenčnega barvila, z vijolično barvo so prikazane eksperimentalno določene točke za koncentracijo barvila na koncu komore, s polno vijolično črto pa numerična rešitev enačbe (2). Slika B kaže začetek praznjena komor z difuzijo po prenehanju dovanja fluoresceina v glavni kanal. Slika D kaže isti del mikrofluidne naprave po končani difuziji. Na sliki F so prikazani podatki za praznjenje glavnega kanala in komore ter numerična rešitev za slednjo.

Preverili smo tudi kako natrijev fluorescein difundira v komore, v katerih je nastal biofilm (Slika 16). Zaradi delne razrasti biofilma v glavnem kanalu je bilo polnjenje in praznjenje glavnega kanala počasnejše kot v primeru brez celic, z zakasnitvijo so se začele polniti tudi komore v katerih je nastal gost biofilm. Po dodatku fluoresceina je ta oddifundiral v komore znatno počasneje kot v primeru, ko v komori ni bilo bakterij. Fluorescein je penetriral v vse dele biofilma. Podobno kot pri polnjenju je bilo tudi praznjenje biofilma

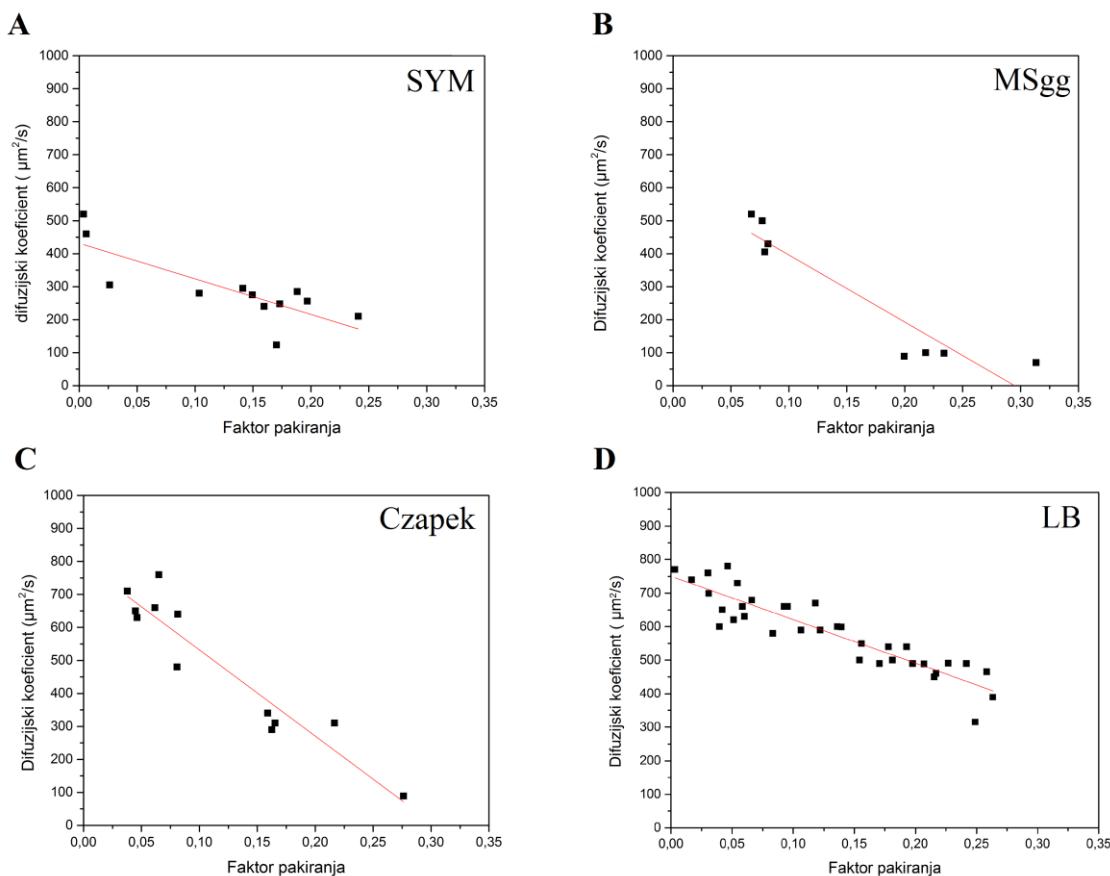
znatno počasnejše. Difuzijski koeficient iz biofilma je znašal  $210 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , kar je približno 4 krat počasneje kot v primeru brez celic. Tudi v primeru, ko so v komorah zrasli biofilmi, se fluorescein ni irreverzibilno vezal na celice in je v celoti zapustil komoro (Slika 16D).



Slika 16: Dodatek natrijevega fluoresceina v mikrofluidno napravo v kateri je v komorah nastal biofilm v gojišču LB. Na sliki A svetli del kaže fluorescenčno obarvan glavni kanal. Slika C prikazuje polnjenje komor z difuzijo fluoresceina po dodatku fluorescenčnega barvila. Na sliki E je z modro črto prikazana koncentracija barvila na meji glavnega kanala in komore po dodatku fluorescenčnega barvila, z vijolično barvo so prikazane eksperimentalno določene točke za koncentracijo barvila na koncu komore, s polno vijolično črto pa numerična rešitev enačbe (2). Slika B kaže začetek praznjena komor z difuzijo po prenehanju dovajanja fluoresceina v glavni kanal. Slika D kaže isti del mikrofluidne naprave po končani difuziji. Na sliki F so prikazani podatki za praznjenje glavnega kanala in komore ter numerična rešitev za slednjo.

#### 4.2.2 Difuzija natrijevega fluoresceina v biofilmih različnih gojišč

Difuzijski koeficient natrijevega fluoresceina je bil zelo odvisen od vrste gojišča v katerem je nastajal biofilm in gostote pakiranja celic v biofilmu kot je prikazano na sliki 17. Z večanjem faktorja pakiranja je vrednost difuzijskega koeficiente linearno padala, vendar je bil gradient upada različen v različnih gojiščih (Preglednica 8).



Slika 17: Odvisnost difuzijskega koeficiente od faktorja pakiranja v biofilmih *B. subtilis*, ki so rasli na različnih gojiščih. Slika A prikazuje biofilm v gojišču SYM, slika B v MSgg, slika C v Czapek in slika D v gojišču LB.

Preglednica 8: Prikazuje vrednosti naklonov in presečišč premic iz slike 16.

	Naklon	Odsek
<b>SYM</b>	-1078 ± 252	431 ± 38
<b>MSgg</b>	-2070 ± 289	603 ± 53
<b>Czapek</b>	-2612 ± 284	793 ± 39
<b>LB</b>	-1296 ± 100	750 ± 15
<b>Brez celic</b>		880 ± 14

V gojišču SYM (Slika 17A) pride že pri zelo nizkih vrednostih za faktor pakiranja do znatnega upada vrednosti za difuzijski koeficient. V tem gojišču celice proizvajajo enormne količine zunajceličnega matriksa (Dogša in sod., 2013). Difuzijski koeficient pada s povečanjem faktorja pakiranja, vendar je gradient upada v tem gojišču najnižji. Ekstrapolacija na komoro brez bakterij (faktor pakiranje = 0, presečišče z ordinato) da znatno nižje vrednosti za difuzijski koeficient kot izmerjena vrednost v komorah brez celic, kar kaže, da na difuzijo poleg celic v tem gojišču vplivajo tudi zunajcelične komponente matriksa.

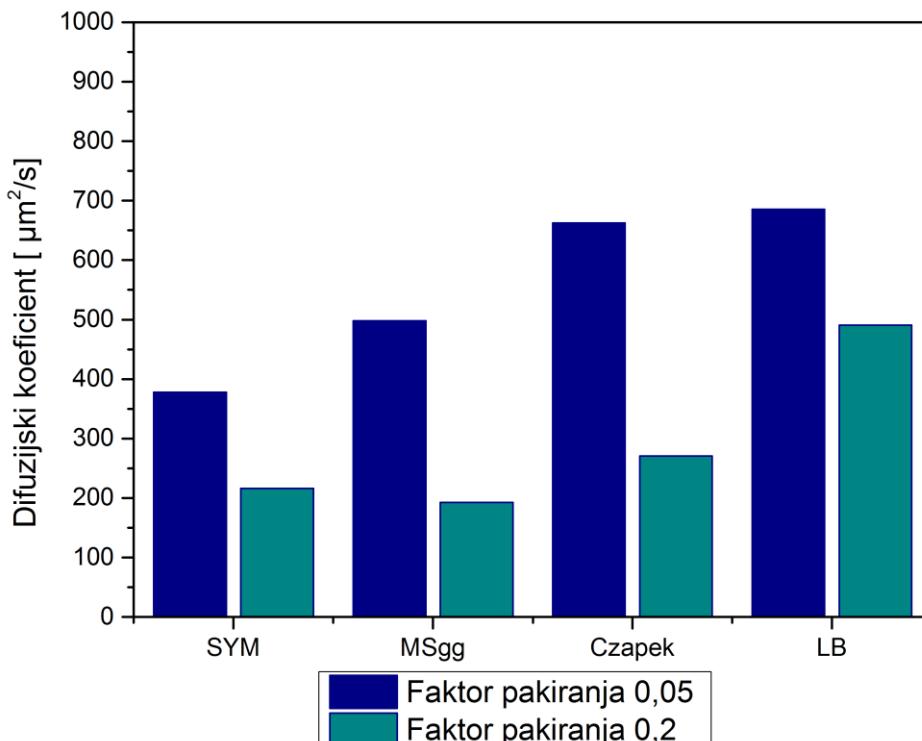
Rezultati za gojišče MSgg, kjer nastanejo najbolj kompaktni biofilmi, so podani na sliki 17B. V tem gojišču je prihajalo do delne vezave natrijevega fluoresceina na komponente biofilma, zato je bila kvaliteta določanja difuzijskih koeficientov slabša, saj enostavni difuzijski model ni zadovoljivo popisal eksperimentalnih podatkov. Na sliki 17B so podani le tisti podatki, kjer je bila zanesljivost določanja difuzijske konstante zadovoljiva. Rezultati nakazujejo, da je difuzija iz tega biofilma zelo omejena. Pri visokih faktorjih pakiranja je difuzija le okrog 5 % tiste, ki jo najdemo v praznih komorah. Poleg celic podobno kot pri SYM tudi v gojišču Msgg k znižanju difuzijskega koeficiente prispevajo komponente zunajceličnega matriksa.

Vrednost difuzijskega koeficiente v odvisnosti od faktorja pakiranja v gojišču Czapek je prikazana na sliki 17C. Vrednost za difuzijski koeficient je proporcionalna gostoti bakterijskih celic v komori. Kot je razvidno iz Preglednice 8 ekstrapolacija na vrednost brez bakterij daje difuzijski koeficient, ki je primerljiv izmerjenemu v komorah brez bakterij. To kaže, da večino zmanjšanja vrednosti difuzijskega koeficiente lahko pripisemo bakterijskim celicam. Kljub temu je ekstrapolirana vrednost za približno 15 % nižja od izmerjene vrednosti v komorah brez celic, kar kaže, da lahko nekaj zmanjšanja difuzijskega koeficiente pripisemo zunajceličnemu matriksu.

Podobno odvisnost difuzijskega koeficiente od faktorja pakiranja kot pri Czapek gojišču smo dobili tudi v gojišču LB (Slika 17D). Tudi v tem primeru je bilo zmanjšanje difuzijskega koeficiente v največji meri posledica povečane gostote celic in manj povečanja zunajceličnega matriksa. Za razliko od gojišča Czapek je bil gradient upada v gojišču LB bistveno manjši.

#### 4.2.3 Primerjava difuzijskega koeficienta v različnih gojiščih pri podobnem faktorju pakiranja

Da bi lažje primerjali difuzijske koeficiente biofilmov pridobljenih v različnih gojiščih pri podobnem faktorju pakiranja, smo izdelali graf na sliki 18. Iz obstoječih podatkov za difuzijske koeficiente izmerjene pri faktorjih pakiranja 0,05 (biofilm v komori še ni nastal) in 0,2 (biofilm v komori) smo določili povprečni difuzijski koeficient in primerjali različna gojišča. V primerih, ko biofilmi v komorah še niso nastali, so bili difuzijski koeficienti v vseh gojiščih višji kot v primeru nastanka biofilmov. Najnižjo vrednost za difuzijski koeficient smo dobili v gojišču SYM, kjer je produkcija zunajceličnega matriksa največja. V LB in Czapek gojišču je bila difuzija le nekoliko zmanjšana glede na kontrolo brez celic. V primeru, ko je nastal biofilm, so bile vrednosti za difuzijski koeficient v gojiščih SYM, Msgg in Czapek primerljive. Odstopal je difuzijski koeficient za gojišče LB, ki je bil znatno večji.



Slika 18: Primerjava difuzijskih koeficientov pri faktorju pakiranja 0,05 (biofilm v komorah še ni nastal) in pri 0,2 (bifilm formiran) pri *B. subtilis*, ki je rastel v različnih gojiščih v mikrofluidni napravi.

## 5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo preučevali difuzijske lastnosti biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*. Proučevanje difuzije v biofilmih je težavno zaradi zelo heterogene strukture biofilmov. Zato smo v nalogi pripravili nov sistem za gojenje biofilmov v mikrofluidni napravi, ki omogoča sledenje morfološkim spremembam med rastjo biofilma in določanje difuzijskega koeficienta v različnih razvojnih fazah istega biofilma. Tak sistem za merjenje difuzijskega koeficienta še ni bil opisan. V tem sistemu je možno spremenjati geometrije prostora v katerem nastaja biofilm, pretoke snovi skozi sistem, kontrolirano dodajati snovi v biofilm, zaradi paralelnega načina gojenja biofilmov pa je možno bolje oceniti heterogenost strukture in pojavnih oblik biofilma.

Biofilme *B. subtilis* smo gojili na različnih gojiščih (SYM, MSgg, Czapek in LB). Skladno s predhodnimi raziskavami (gojišče SYM (Shida in sod., 2002), gojišče MSgg (Branda in sod., 2001), gojišče Czapek (Dogska in sod., 2013)) smo pokazali, da se biofilmi v različnih gojiščih med seboj razlikujejo po barvi, kompaktnosti, nagubanosti in debelini. V gojišču LB biofilm ni nastal po celotni površini, kar kaže, da to gojišče ni primerno za tvorbo biofilma. LB ne sodi med gojišča, ki se uporabljajo za proučevanje biofilmov (Shemesh in Chai, 2013). Kljub temu, da *B. subtilis* v gojišče LB na makroskopskem nivoju ne tvori kompaktnega biofilma, pa ga lahko naredi v mikrofluidni napravi. Za razliko od mirujoče petrijeve posodice, v kateri dodatno ne dovajamo hranil med rastjo in kjer biofilm običajno nastane na interfazi voda-zrak, je mikrofluidni sistem kontinuiran sistem, kjer ves čas rasti dovajamo hrnila, sistem ni v neposrednem stiku z atmosfero in ima drugačno geometrijo prostora, kar skupaj omogoča celicam nastanek biofilma tudi v gojišču LB. Ti rezultati kažejo, da je *B. subtilis* zelo prilagodljiv in lahko tudi v gojišču, kjer običajno ne dela biofilmov, le te ob primernih pogojih naredi.

V tem delu smo pokazali, da lahko bakterija *B. subtilis* naredi biofilme v mikrofluidni napravi v vseh proučevanih gojiščih. Nastali biofilmi se med seboj morfološko razlikujejo. Zlasti v Czapekovem mediju celice v biofilmih ne tvorijo izrazitih filamentoznih celic. Največkrat jih zasledimo v obliki gosto pakiranih paličastih celic, ki so naključno usmerjene in delajo biofilm relativno porozen. V gojišču LB smo opazili, da so filamenti organizirani v obliki snopov v katerih je prisotnih od 2 do 7 paralelno orientiranih filamentov. Pri polnjenju prostora v takem filmu prihaja do stikov med filamenti, ki omogočajo porozno strukturo tudi v tem biofilmu. Pri gojišču SYM je kontrast med celicami in okolico najslabši, saj se v tem gojišču sintetizira največja količina zunajceličnega materiala (Dogša in sod., 2013). Zunajcelični matriks zapolni porozno strukturo, ki nastaja ob stiku filamentov. Zelo gost filamentozni preplet nastane tudi v gojišču MSgg, kjer je medfilamentozni prostor dodatno zapolnjen z zunajceličnim matriksom (Branda in sod., 2001; Kobayashi, 2007). Tvorba gostih filamentoznih

prepletov je bila v gojišču MSgg pokazana tudi pri biofilmih, ki so rasli na mikrotiterski ploščah (Kobayashi, 2007).

Glavni namen te naloge je bil določiti difuzijske lastnosti biofilmov. V ta namen smo različno razvitim biofilmom dodajali fluorescenčni označevalci, ki je iz glavnega kanala mikrofluidne naprave z difuzijo prehajal v rastne komore. Rezultati meritev so pokazali, da je možno difuzijo fluorescenčnega barvila v rastne komore popisati z relativno enostavnim modelom na osnovi drugega Fickovega zakona. Izmerjena difuzijska konstanta za difuzijo fluoresceina v komori je znašala  $600 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Ta vrednost je znotraj ranga za difuzijske koeficiente fluoresceina, ki so bile izmerjene v vodnem okolju in se gibljejo med 490 in  $640 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Galambos in Forster, 1998; Rani in sod., 2005). Merili smo tako difuzijo v komoro kot tudi difuzijo iz komore po tem ko smo zaustavili dovajanje fluorescenčnega označevalca. Difuziji v in iz komore sta se razlikovali. Ker gre za enostavno difuzijo bi pričakovali, da bo difuzija enaka, vendar je bila difuzija iz komore nižja. Obstaja več razlag za opaženi fenomen. Najbolj verjetno je difuzijski koeficient nižji zato, ker je koncentracija v komori po končanem polnjenju nižja kot koncentracija v glavnem kanalu (Slika 15E), kar pomeni, da je bil koncentracijski gradient pri praznjenju nižji od koncentracijskega gradiента pri polnjenju komore. Obstaja tudi možnost reverzibilne vezave fluoresceina na površino komore. Možnost ugašanja fluorescence v času trajanja poskusa je pri uporabljenih koncentracijah manj verjetna. V nadalnjem delu smo se odločili, da bomo določali difuzijske koeficiente pri praznjenju komor predvsem zato, ker je pri praznjenju komor lažje zaznati morebitne anomalije pri difuziji (npr. ireverzibilno vezavo na komponente biofilma).

Difuzija natrijevega fluoresceina je bila pomerjena tudi v biofilmih, ki jih dela *Staphylococcus epidermidis*. V tem primeru se je difuzija fluoresceina v biofilmu znašala okrog  $160 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Rani in sod., 2005). Raziskovalci so ugotovili, da se vrednosti za difuzijski koeficient razlikujejo od eksperimenta do eksperimenta. Difuzijski koeficient se je gibal med 96 in  $210 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pri različnih dneh gojenja biofilma in je bil odvisen od velikosti celičnih klastrov v katere je penetriral fluorescein.

Difuzija v biofilmu ni odvisna samo od vrste mikroorganizma, uporabljenega gojišča, tipa in velikosti difundirajočih molekul ter geometrije v katerem nastaja biofim ampak tudi od razvojne stopnje biofilma. Z razvojem biofilma se gostota celic v biofilmu povečuje, kar načelno zmanjšuje difuzijo. Da bi lahko podatke med različnimi biofilmi med seboj primerjali, je potrebno podatek o difuzijskem koeficientu normalizirati glede na gostoto biofilma. To je glede na izrazito strukturno variabilnost biofilma zahtevna naloga. V ta namen smo v nalogi uvedli nov parameter, ki smo ga poimenovali faktor pakiranja biofilma. Glede na to, da sta dolžina in širina komore v kateri gojimo biofilme bistveno večji od višine komore, smo faktor pakiranja podali kot delež površine bakterij proti

površini komore. Rezultati so pokazali, da je omenjena ocena gostote biofilma dobro korelirala z difuzijskim koeficientov v tistih primerih, ko je bil delež zunajceličnega materiala v biofim relativno nizek (gojišče LB in Czapek). V teh primerih je difuzijski koeficient padal prenosorazmerno z deležem bakterij. V primeru, ko je na difuzijske lastnosti poleg mikrobnih celic znatno vplival tudi zunajcelični matriks je bila korelacija slabša. Pri gojiščih SYM in MSgg je očitno, da omejitve za difuzijo v biofilmu ne predstavljajo le celice. Znano je, da biofilmi nastali v gojišču SYM tvorijo veliko zunajceličnega materiala, zlasti polisheridov med katerimi je večinsko zastopan levan (Dogša in sod. 2013). Celice v gojišču SYM začno tvoriti zunajcelični matriks že zgodaj v eksponentni fazi, kar ima očitno velik vpliv na difuzijski koeficient že pri zelo nizkih faktorjih pakiranja. Biofilmi v gojiščih MSgg tvorijo gost in močno naguban biofilm. V zunajceličnem materialu se pri teh biofilmih sintetizira TasA protein in zunajcelični polisaharid, ki ga kodira operon epsA-O. Ti dve komponeti predstavljata ključna zunajcelična polimera za nastanek kompaktnega biofilma (Branda in sod., 2006). Ker se operon epsA-O preferenčno izraža v poznejših fazah razvoja biofilma je pričakovati, da bo pri daljših časih inkubacije, to je pri večjem faktorju pakiranja, biofilm bolj kompakten in posledično difuzijski koeficient nizek. To smo uspeli tudi eksperimentalno potrditi. V tem gojišču je zaradi povečane vsebnosti proteinskih komponent v zunajceličnem materialu povečana tudi možnost vezave natrijevega fluoresceina, kar razloži anomalno obnašanje difuzije fluoresceina. Rezultati so namreč kazali na reverzibilno vezavo fluoresceina, ki je podaljšal čas praznjenja in ni omogočal dobrega prileganja numerične rešitve drugega Fickovega zakona eksperimentalnim podatkom. Po drugi strani je razumljivo, zakaj je v gojišču Czapek največji upad difuzijskega koeficiente s povečanjem faktorja pakiranja. V tem biofimu je zaradi načina rasti biofilma, opaziti relativno velike pore, ki omogočajo hitro polnjenje in praznjenje biofilma. V primerjavi z gojiščem SYM se v tem biofimu sintetizira približno 99.9 % manj zunajceličnega matriksa, ki bi lahko zapolnil porni sistem. Podobno biofilmi v gojišču Czapek sintetizirajo 77 % manj zunajceličnega matriksa, kot v gojišču MSgg (Dogša in sod., 2013). Ker biofilm v Czapekovem mediju poleg tega ne tvori veliko filamentoznih struktur, ki bi biofim dale viskoelastični značaj, je verjetno stisljivost tega filma ob dodatku novih celic večja. Z večanjem faktorja pakiranja se zato velikost por zmanjšuje kar posledično vodi v nižji difuzijski koeficient. Pri gojišču LB se podobno kot pri Czapek mediju tvorijo biofilmi, ki so relativno porozni, vendar imajo celice v tem gojišču preferenčno filamentozno rast. Glede na rezultate difuzije sklepamo, da podobno kot v primeru gojišča Czapek tudi v gojišču LB celice ne tvorijo veliko zunajceličnega matriksa. Kljub temu se z večanjem faktorja pakiranje biofilm v gojišču LB vendarle obnaša drugače kot biofilm v Czapekovem mediju. To je zelo verjetno posledica prisotnih filamentoznih struktur, ki preprečijo znatno stisljivost tega biofilma. To opazimo tudi pri razvoju biofilma (Slika 14), kjer se faktor pakiranja v začetku hitro povečuje po osmih urah gojenja, ko nastopi filamentozna rast, pa le malo spreminja. Domnevamo, da se zaradi bolj elastične narave biofilma z višanjem faktorja pakiranja difuzijski koeficient v gojišču LB manj spremeni kot v gojišču Czapek.

## 6 SKLEPI

- Izdelana mikrofluidna naprava omogoča gojenje in opazovanje razvoja biofilmov.
- Biofilmi *B. subtilis*, ki rastejo na različnih gojiščih v mikrofluidni napravi, se morforološko razlikujejo.
- Mikrofluidna naprava omogoča spremljanje difuzijskih lastnosti biofilma med njegovim razvojem.
- Na difuzijo znatno vpliva gostota biomase v merilni komori, ki jo lahko parametriziramo s faktorjem pakiranja.
- Z uporabo mikrofluidne naprave lahko določimo vpliv celic in zunajceličnega matriksa na difuzijo.

## 7      POVZETEK

Biofilmi so strukturirane mikrobne združbe, v katerih so celice obdane z zunajceličnim matriksom, ki ga same izdelajo. Fizikalno kemijske lastnosti močno vplivajo na izmenjavo hranil, plinov in preostalih snovi med okoljem in biofilmom. Zato je v biofilmih difuzija glavni mehanizem prenosa topljencev do celic. Poznavanje difuzijskih lastnosti biofilmov je ključnega pomena za napovedovanje transporta hranil in končnih produktov metabolizma, kar je uporabno v medicini in biotehnologiji. Veliko raziskav je preučevalo difuzijske lastnosti biofilmov, vendar je proučevanje zelo težavno zaradi heterogene strukture biofilmov. Zato smo v nalogi pripravili nov sistem za gojenje biofilmov v mikrofluidni napravi. Naš sistem nam omogoča neinvazivne meritve na metabolno aktivnih biofilmih, spremljanje nastanek bofilma, enostavno spremiščanje geometrije prostora v katerem nastaja biofilm, pretoke snovi skozi sistem, kontrolirano dodajanje snovi v biofilm, možna je tudi ocena heterogenosti strukture in pojavnih oblik biofilma.

V našem delu smo proučevali difuzijo v biofilmih pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Biofilme *B. subtilis* smo gojili na različnih gojiščih (SYM, MSgg, Czapek in LB). Pokazali smo, da lahko bakterija *B. subtilis* naredi biofilme v mikrofluidni napravi v vseh proučevanih gojiščih. Rezultati meritve so pokazali, da je možno difuzijo fluorescenčnega barvila v rastne komore popisati z relativno enostavnim modelom na osnovi drugega Fickovega zakona. Pokazali smo, da ocena gostote biofilma s faktorjem pakiranja dobro korelira z izmernimi difuzijskimi koeficienti. V primerih, ko je bil delež zunajceličnega materiala v biofimu relativno nizek (gojišče LB in Czapek) obstaja linearna zveza med faktorjem pakiranja in difuzijskim koeficientom. V teh gojiščih je difuzijski koeficient padal prenosorazmerno z deležem bakterij. V primeru, ko je na difuzijske lastnosti poleg mikrobnih celic vplival tudi zunajcelični matriks je bila korelacija slabša (gojišče SYM in MSgg). Efekt izrazitega znižnja difuzijskega koeficiente je bil opazen že pri nizkih faktorjih pakiranja. Rezultati tega magistrskega dela predstavljajo zelo dobro osnovo za nadaljnja raziskovanja heterogene strukture biofilmov.

## 8 VIRI

- Billings N., Birjiniuk A., Samad T. S., Doyle P. S., Ribbeck K. 2015. Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. Reports on Progress in Physics, 78, 3: e036601, doi:10.1088/0034-4885/78/3/036601: 17 str.
- Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. Molecular Microbiology, 59, 4: 1229-1238
- Branda S. S., González-Pastor J. E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 20: 11621-6
- Branda S. S., Vik S., Friedman L., Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology, 13, 1: 20-26
- Bungay H. R., Whalen W. J., Sanders W. M. 1969. Microprobe techniques for determining diffusivities and respiration rates in microbial slime systems. Biotechnology and Bioengineering, 11, 5: 765-772
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappinscott H. M. 1995. MICROBIAL BIOFILMS. Annual Review of Microbiology, 49: 711-745
- Debeer D., Stoodley P., Lewandowski Z. 1994. Liquid Flow in Heterogeneous Biofilms. Biotechnology and Bioengineering, 44, 5: 636-641
- Dogsa I., Brložnik M., Stopar D., Mandic-Mulec I. 2013. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. PLoS One, 8, 4: e62044, doi:10.1371/journal.pone.0062044: 10 str.
- Dogsa I., Oslizlo A., Stefanic P., Mandic-Mulec I. 2014. Social Interactions and Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*. Food Technology and Biotechnology, 52, 2: 149-157
- Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8, 9: 881-890
- Earl A. M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology, 16, 6: 269-275
- Flemming H. C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8, 9: 623-633
- Fujii T. 2002. PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications. Microelectronic Engineering, 61, 2: 907-914
- Galambos P., Forster F. K. 1998. Micro-Fluidic Diffusion Coefficient Measurements. V: Micro Total Analysis Systems '98. Harrison D. J. (ed.), Van der Berg A. (ed.) Springer Netherlands: 492 str.

- Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z. B. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science-Materials International*, 18, 9: 1049-1056
- Gerbersdorf S. U., Wieprecht S. 2015. Biostabilization of cohesive sediments: revisiting the role of abiotic conditions. physiology and diversity of microbes, polymeric secretion, and biofilm architecture. *Geobiology*, 13, 1: 68-97
- Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 2: 95-108
- Jain A., Gopal R. 2014. Formation of tick SU-8 mold for the fabrication of UV-LIGA based nickel micro-gyroscope structures. *Journal of microelectronics electronic components and materials*, 44, 4: 330-335
- Karatan E., Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 2: 310-347
- Kavčič B. 2013. Optična nanolitografija. Doktorsko delo. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko, Oddelek za fiziko: 163 str.
- Kearns D. B., Chu F., Branda S. S., Kolter R., Losick R. 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55, 3: 739-749
- Kearns D. B., Losick R. 2005. Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 19, 24: 3083-3094
- Kim J., Hegde M., Kim S. H., Wood T. K., Jayaraman A. 2012a. A microfluidic device for high throughput bacterial biofilm studies. *Lab on a Chip*, 12, 6: 1157-1163
- Kim J., Park H. D., Chung S. 2012b. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*, 17, 8: 9818-9834
- Kobayashi K. 2007. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of Bacteriology*, 189, 13: 4920-4931
- Kobayashi K. 2008. SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 69, 6: 1399-1410
- Lappin-Scott H. M., Costerton J. W. 2003. *Microbial Biofilms*. Cambridge, Cambridge University Press: 310 str.
- Lawrence J. R., Wolfaardt G. M., Korber D. R. 1994. Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4: 1166-1173
- Lemon K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C., Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322: 1-16

- Longo D., Hasty J. 2006. Dynamics of single-cell gene expression. *Molecular Systems Biology*, 2: 1-10
- McDonald J. C., Duffy D. C., Anderson J. R., Chiu D. T., Wu H. K., Schueller O. J. A., Whitesides G. M. 2000. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21, 1: 27-40
- McDonald J. C., Whitesides G. M. 2002. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, 35, 7: 491-499
- MicroChem. 2015. SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist PROCESSING GUIDELINES FOR: SU-8 2000.5, SU-8 2002, SU-8 2005, SU-8 2007, SU-8 2010 and SU-8 2015. Newton, MicroChem: 5 str.  
<http://www.microchem.com/Prod-SU82000.htm> (avgust 2015)
- Micro Chemicals. 2002. TI PRIME adhesion promoter: Technical Data Sheet. Ulm, Micro Chemicals: 2 str.  
<http://microchemicals.com/micro/> (julij 2015)
- Pamp S. J., Sternberg C., Tolker-Nielsen T. 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry Part A*, 75, 2: 90-103
- Percival S. L., Malic S., Cruz H., Williams D. W. 2011. Introduction to biofilms V: Biofilms and veterinary medicine. Percival S. L. (ed.) Knottenbelt D. C. (ed.), Cochrane C. A. (ed.) Heidelberg, Springer: 41-68
- Rani S. A., Pitts B., Stewart P. S. 2005. Rapid diffusion of fluorescent tracers into *Staphylococcus epidermidis* biofilms visualized by time lapse microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2: 728-732
- Renslow R. S., Babauta J. T., Majors P. D., Beyenal H. 2013. Diffusion in biofilms respiring on electrodes. *Energy & Environmental Science*, 6, 2: 595-607
- Renslow R. S., Majors P. D., McLean J. S., Fredrickson J. K., Ahmed B., Beyenal H. 2010. In Situ Effective Diffusion Coefficient Profiles in Live Biofilms Using Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 6: 928-937
- Shemesh M., Chai Y. R. 2013. A Combination of Glycerol and Manganese Promotes Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* via Histidine Kinase KinD Signaling. *Journal of Bacteriology*, 195, 12: 2747-2754
- Shida T., Mukaijo K., Ishikawa S., Yamamoto H., Sekiguchi J. 2002. Production of long-chain levan by a sacC insertional mutant from *Bacillus subtilis* 327UH. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66, 7: 1555-1558
- Stewart P. S. 2003. Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185, 5: 1485-1491

- Stewart P. S., Costerton J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358, 9276: 135-138
- Tian W.-C., Finehout E. 2008. Microfluidics for biological applications. 1st ed. edn. New York, Springer: 416 str.
- Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 3: 157-168
- Weibel D. B., Diluzio W. R., Whitesides G. M. 2007. Microfabrication meets microbiology, *Nature Reviews Microbiology*, 5, 3: 209-218
- Whitesides G. M. 2006. The origins, the future of microfluidics. *Nature*, 442, 7101: 368-373
- Wilking J. N., Zaburdaev V., De Volder M., Losick R., Brenner M. P., Weitz D. A. 2013. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 110, 3: 848-852
- Yawata Y., Toda K., Setoyama E., Fukuda J., Suzuki H., Uchiyama H., Nomura N. 2010. Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 3: 377-380

## ZAHVALA

Zahvaljujem se za pomoč vsem, ki so mi pomagali in pripomogli k nastanku magistrske naloge. Še posebej se zahvaljujem mentorju prof. dr. Davidu Stoparju za gradivo, napotke in usmerjanje pri pisanju. Prav tako se za vso pomoč zahvaljujem somentorju doc. dr. Natanu Ostermanu za napotke, usmerjanje in pomoč v laboratoriju.

Za hiter in temeljiti pregled naloge se zahvaljujem recenzentu dr. Iztku Prislantu.

Prav tako se zahvaljujem tudi vsem sodelavcem na Katedri za mikrobiologijo, za vso pomoč, nasvete in dobro družbo.

Zahvala gre tudi družini in vsem najbljižnjim prijateljem, ki ste mi stali ob strani med samim študijem.