

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca BRLOŽNIK

**VPLIV GOJIŠČA NA MORFOLOGIJO BIOFILMOV IN SESTAVO
ZUNAJCELIČNIH POLIMEROV (EPS) BAKTERIJE *Bacillus subtilis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECTS OF GROWTH MEDIUM ON BIOFILM MORPHOLOGY
AND EXOPOLYMER COMPOSITION IN *Bacillus subtilis***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je potekalo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomske naloge je imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja dr. Iztok Dogša in za recenzenta prof. dr. Jure Stojan.

Mentorica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC

Somentor: dr. Iztok DOGŠA

Recenzent: prof. dr. Jure STOJAN

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: dr. Iztok DOGŠA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jure STOJAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Brložnik

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24 + 579.26:579.853.11:577.35(043)=163.6
KG	mikrobne združbe/ <i>Bacillus subtilis</i> /biofilmi/tvorba biofilmov/gojišča/ekologija mikroorganizmov/zunajcelične polimerne snovi/EPS/
AV	BRLOŽNIK, Mojca
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/DOGŠA, Iztok (somentor)/STOJAN, Jure (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	VPLIV GOJIŠČA NA MORFOLOGIJO BIOFILMOV IN SESTAVO ZUNAJCELIČNIH POLIMEROV (EPS) BAKTERIJE <i>Bacillus subtilis</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 61 str., 29 sl., 7 pril., 80 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Mikroorganizmi živijo v naravi v mikrobnih združbah, ki jih poimenujemo biofilmi. Ključnega pomena pri vzdrževanju integritete teh združb so zunajcelični polimeri (EPS), ki jih v glavnem sestavljajo polisaharidi, proteini in občasno tudi nukleinske kisline. V diplomski nalogi smo uporabili tri tekoča gojišča, ki se bistveno razlikujejo v viru in količini ogljika: bogato gojišče s saharozo in kvasom (SYM), minimalno gojišče z morfolinpropan sulfonsko kislino (MSgg) in minimalno gojišče z glukozo (Czapek). Preučevali smo njihov vpliv na razvoj, mikromorfološke in makromorfološke lastnosti plavajočih biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> 3610. Po 24 h gojenja smo določili debelino biofilmov, izolirali EPS iz biofilmov in rabljenih gojišč ter določili kemijsko sestavo EPS. S pomočjo visokoločljivostne tekočinske kromatografije smo ugotavliali velikostno porazdelitev polimerov v izoliranih EPS. V bogatem gojišču SYM so nastali najdebelejši in najbolj vzdržljivi biofilmi. To gojišče je tudi omogočilo, da v biofilmu in rabljenem gojišču nastane največ biomase in mase EPS. Ugotovili smo, da gojišče vpliva na kemijsko sestavo EPS, saj je v biofilmih SYM največ polisaharidov, medtem ko v MSgg največ proteinov. Med SYM polisaharidi prevladujejo fruktani. V biofilmih vseh treh gojišč smo odkrili proteine, ki po molski masi ustrezajo proteinu TasA. Presenetljivo pa v istem gojišču EPS v biofilmu vsebuje manj polisaharidov in več polimerov z visokimi molskimi masami v primerjavi z EPS v rabljenem gojišču.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.24 + 579.26:579.853.11:577.35(043)=163.6
CX	microbial aggregates/ <i>Bacillus subtilis</i> /biofilms/formation of biofilms/growth media/ecology of microorganisms/extracellular polymeric substances/EPS
AU	BRLOŽNIK, Mojca
AA	MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/DOGŠA, Iztok (co-advisor) /STOJAN, Jure (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2012
TI	EFFECTS OF GROWTH MEDIUM ON BIOFILM MORPHOLOGY AND EXOPOLYMER COMPOSITION IN <i>Bacillus subtilis</i>
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 61 p., 29 fig., 7 ann., 80 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In nature microorganisms live in microbial aggregates called biofilms. Constituent cells are held together by an extracellular matrix composed mostly of polysaccharides, proteins and sometimes nucleic acids. In this work influence of three different liquid media: a rich saccharose yeast extract media (SYM), a minimal media with morpholinepropane sulfonic acid, glycerol and glutamate (MSgg) and a minimal media with glucose (Czapek), were tested in relation to biofilm development and composition of EPS (extracellular polymeric substances). <i>Bacillus subtilis</i> 3610 biofilm was used as a model system and EPS from biofilms and conditioned media bellow the biofilm was isolated and analysed with the high performance liquid chromatography analysis. The SYM biofilm was the thickest, had the highest biomass and was the most stable. Furthermore, the highest EPS mass was obtained in SYM medium biofilm and condition medium. A chemical composition of EPS was highly dependent on the growth media used, as the SYM biofilms were rich in polysaccharides and the MSgg biofilms in proteins. The predominant SYM polysaccharide was fructan. Furthermore, proteins corresponding to the molecular mass of TasA protein were detected in all three biofilms. Surprisingly, EPS in biofilms in all three media contained less polysaccharides in comparison to EPS in conditioned media.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI DIPLOMSKE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOFILMI.....	3
2.1.1 Razvoj biofilmov.....	3
2.1.2 Zunajcelični polimerni material (EPS)	4
2.1.3 Vpliv okolja na sintezo EPS v biofilmih.....	6
2.2 BAKTERIJA <i>B. subtilis</i>	7
2.2.1 Ekologija	7
2.2.2 Nastanek biofilmov bakterije <i>B. subtilis</i> in njihovo uravnavanje.....	7
2.2.3 Diferenciacija celic in parakrino signaliziranje v biofilmu <i>B. subtilis</i>.....	8
2.2.4 Morfologija biofilmov bakterije <i>B. subtilis</i> in vpliv okolja.....	10
2.2.5 Sestavine EPS v biofilmu <i>B. subtilis</i>.....	13
2.2.5.1 Protein TasA in polisaharid (<i>epsA-O</i>)	13
2.2.5.2 Levan	15
2.2.5.3 FT-3 polisaharid.....	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Bakterijski sev	18
3.1.2 Gojišča	18
3.1.3 Reagenti.....	19
3.1.4 Pogoji rasti	19
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Biofilmi gojeni v mikrotiterskih ploščah	19
3.2.1.1 Časovno spremljanje razvoja biofilmov	19
3.2.2 Biofilmi gojeni v petrijevkah.....	20
3.2.2.1 Določanje debeline biofilmov po končani 24 h inkubaciji	20

3.2.2.2	Določanje biomase in izolacija EPS iz biofilmov ter rabljenih gojišč po končani 24 h inkubaciji.....	21
3.2.2.3	Kemijska analiza EPS.....	22
3.2.2.3.1	Zaznavanje vsebnosti proteinov z Bradfordovim reagentom	22
3.2.2.3.2	Merjenje koncentracije nukleinskih kislin.....	23
3.2.2.3.3	Določanje vsebnosti celokupnih sladkorjev z metodo celokupnih sladkorjev .	24
3.2.2.4	Analiza EPS z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo HPSEC	25
3.2.2.5	Analiza sestave kromatografskih vrhov.....	26
3.2.2.6	Tankoplastna tekočinska kromatografija (TLC).....	26
4	REZULTATI.....	28
4.1	RAZVOJ BIOFILMOV	28
4.2	MAKROSKOPIJA IN MIKROSKOPIJA PO 24 h INKUBACIJI	33
4.3	DEBELINA BIOFILMOV PO 24 h INKUBACIJI.....	35
4.4	VSEBNOST BIOMASE V BIOFILMU IN RABLJENEM GOJIŠČU PO 24 h INKUBACIJI.....	35
4.5	KONCENTRACIJA IN SESTAVA EPS V BIOFILMU PO 24 h INKUBACIJI	38
4.5.1	Produkcija EPS v biofilmih.....	38
4.5.2	Kemijska analiza EPS iz biofilmov.....	39
4.5.3	HPSEC analiza EPS iz biofilmov	40
4.6	KONCENTRACIJA IN SESTAVA EPS V RABLJENIH GOJIŠČIH.....	43
4.6.1	Produkcija EPS v rabljenih gojiščih.....	43
4.6.2	Kemijska analiza EPS iz rabljenih gojišč	44
4.6.3	HPSEC analiza EPS iz rabljenih gojišč	45
4.7	TANKOPLASTNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1	RAZPRAVA.....	48
5.2	SKLEPI.....	53
6	POVZETEK	54
7	VIRI	55
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO SLIK

Slika 1: Hipotetični model razvoja biofilma (Van Houdt in Michiels, 2005: 627).	4
Slika 2: Uravnavanje preklopa med sesilnim in gibljivim načinom življenja pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i> (Aguilar in sod., 2007: 641).....	8
Slika 3: Raznolikost v biofilmu bakterije <i>Bacillus subtilis</i> (López in sod., 2010: 5).	9
Slika 4: Vpliv koncentracije agarja na razvoj biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na trdnih gojiščih MSgg (Branda in sod., 2005: 21)	10
Slika 5: Biofilmi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> v gojišču MSgg po 5 dneh gojenja na 25 °C (Branda in sod., 2001: 11623)	11
Slika 6: Mikromorfologija biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 36 in 96 h gojenja v gojišču MSgg na 25 °C. (Branda in sod., 2001: 11624)	11
Slika 7: Biofilm bakterije <i>Bacillus subtilis</i> 3610 wt gojene na trdnem gojišču MSgg (leva slika) in DS (srednja slika) ter biofilm mutante 3610 s povečanim izražanjem SinI na trdem gojišču DS (desna slika) (Chai in sod., 2008: 14).....	12
Slika 8: Sinteza levana tipa 1 in 2 (Shida in sod., 2002: 1555).	16
Slika 9: Petrijevka s tekočim gojiščem SYM ali Czapek ali MSgg, na vrhu katerega je plavajoč biofilm.	20
Slika 10: Optična gostota stoječih kultur bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih... ...	28
Slika 11: Makromorfološki razvoj biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih	30
Slika 12: Mikroskopske slike biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih ob pojavu spor.....	32
Slika 13: Makroskopske slike biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	33

Slika 14: Mikroskopske slike biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	34
Slika 15: Debelina biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih 35	
Slika 16: Vsebnost biomase v biofilmih bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	36
Slika 17: Vsebnost biomase v rabljenih gojiščih (rab.g.) biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	36
Slika 18: Razmerje med suho biomaso v biofilmu in rabljenem gojišču v vzorcih bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih	37
Slika 19: Koncentracija EPS v biofilmih bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	38
Slika 20: Razmerje med suho maso EPS in suho biomaso v biofilmih bakerije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	39
Slika 21: Kemijska analiza EPS iz biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih 24 h.....	40
Slika 22: HPSEC kromatogrami vzorcev EPS, izoliranih iz biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih 24 h.....	42
Slika 23: Analiza sestave posameznih kromatografskih vrhov, pridobljenih z analizo HPSEC vzorcev EPS, izoliranih iz biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	42
Slika 24: Koncentracija EPS v rabljenih gojiščih pod biofilmi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	43
Slika 25: Razmerje med suho maso EPS in suho biomaso v rabljenih gojiščih pod biofilmi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih	44
Slika 26: Kemijska analiza EPS iz rabljenih gojišč pod biofilmi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih 24 h.....	45

Slika 27: HPSEC kromatogrami vzorcev EPS, izoliranih iz rabljenih gojišč pod biofilmimi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v različnih gojiščih 24 h.....	46
Slika 28: Analiza sestave posameznih kromatografskih vrhov, pridobljenih z analizo HPSEC vzorcev EPS, izoliranih iz rabljenih gojišč pod biofilmimi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> po 24 h gojenja v različnih gojiščih.....	46
Slika 29: Tankoplastna tekočinska kromatografija EPS iz biofilmov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> , gojenih v gojišču SYM	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Mikroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* v različnih gojiščih odvzete, ko je večina celic že sporulirala.

Priloga B: Mikroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 oz. 29 h gojenja v različnih gojiščih.

Priloga C: Volumni biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Izračunani so s pomočjo njihove debeline.

Priloga D: Suha biomasa celic v biofilmih bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih.

Priloga E: Suha biomasa celic v rabljenih gojiščih pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih.

Priloga F: Suha masa EPS, izoliranega iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih.

Priloga G: Suha masa EPS izoliranega iz 55 ml rabljenega gojišča pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih.

Priloga H: Tankoplastna tekočinska kromatografija EPS iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v gojišču Czapek in MSgg.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BFM	(ang. <i>biofilm-rich medium</i>)
BSA	goveji serum albumin (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
CHO	ogljikovi hidrati
<i>comGB</i>	gena, ki uravnava kompetenco in sta odgovorna za izločanje DNK iz celice ter za vezavo in sprejem DNK v celico
Czapek	minimalno gojišče z glukozo
DIC	diferencialni interferenčni kontrast (ang. <i>differential interference contrast</i>)
DS	sporulacijsko gojišče (ang. <i>Difco sporulation medium</i>)
EPS	zunajcelični polimeri (ang. <i>extracellular polymeric substances</i>)
<i>epsA-O</i>	operon, ki nosi zapis za encime, odgovorne za sintezo polisaharida
FT-3	zunajcelični polisaharid v stresanih kulturah bakterije <i>Bacillus subtilis</i> FT-3
HPSEC	visokoločljivostna tekočinska kromatografija z velikostno ločljivostno kolono (SEC)
MSgg	minimalno gojišče z morfolinpropan slufonsko kislino, glicerolom in glutamatom
NK	nukleinske kisline
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nm
PH	fazni kontrast (ang. <i>phase contrast</i>)
prot.	proteini
rab. g.	rabljeno gojišče
RI	refrakcijski indeks
RpoS	regulator stresnega odziva
SacB	levansukraza, odgovarna za sintezo levana
SacC	levanaza, odgovorna za razgradno levana
SinI	antagonist SinR
SinR	glavni transkripcijski regulator, ki spodbuja gibljivost in zavre sintezo zunajceličnih polimerov
SipW	signalna peptidaza, odgovorna za iznos proteinov TapA (YqxM) in TasA
SMS-CAA	(ang. <i>Spizizen's minimal salt medium</i> z 0,5 % kazeinskih aminokislin)
<i>spoIIG</i>	operon, ki nosi zapis za encime, odgovorne za sporulacijo
Spo0A	sporulacijski regulator in aktivator proteina SinI
SYM	gojišče s saharozo in kvasnim ekstraktom (ang. <i>saccharose yeast extract medium</i>)
Tap A	protein, ki je potreben za nastanek in pritrdiritev TasA vlaken na celico
TasA	protein v zunajceličnem matriksu biofilma <i>Bacillus subtilis</i>
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija
wt	divji tip
Yhxb	fosfoheksomutaza odgovorna za sintezo nukleotidnih sladkorjev

YlbF	protein, ki pozitivno vpliva na izražanje operonov <i>epsA-O</i> in <i>yqxM-sipW-tasA</i>
YmcA	protein, ki pozitivno vpliva na izražanje operonov <i>epsA-O</i> in <i>yqxM-sipW-tasA</i>
YqxM	protein, ki je potreben za nastanek in pritrdiritev amiloidnih vlaken na celico

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Po Gramu pozitivna bakterija *Bacillus subtilis* 3610 je poleg ustvarjanja biofilmov na trdnih površinah sposobna tvorbe teh tudi na interfazi voda-zrak (Branda in sod., 2001; Branda in sod., 2004). Ti plavajoči biofilmi, ki jih lahko poimenujemo tudi pelikli, imajo do velike mere enake lastnosti kot tisti na trdnih gojiščih (Branda in sod., 2004). V obeh primerih so celice med sabo povezane preko zunajceličnih polimernih snovi (EPS), ki jih proizvedejo same (Branda in sod., 2005). Ta material je v glavnem sestavljen iz polisaharidov, proteinov in občasno tudi nukleinskih kislin ter ima pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju biofilmov (Branda in sod., 2006; Sutherland, 2001a).

V diplomski nalogi smo uporabili tri popolnoma različna gojišča, ki se med sabo bistveno ločijo v viru in količini ogljika. Gojišče SYM (ang. *saccharose yeast extract medium*) je bogato in vsebuje 20 % saharoze, Czapek 3 % glukoze in MSgg 0,5 % glutamata ter glicerola. V teh gojiščih so bile že opravljene nekatere študije, na podlagi katerih smo zasnovali svojo raziskavo. V biofilmih bakterije *B. subtilis* 3610 zraslih na tekočem gojišču MSgg sta najpomembnejši sestavini EPS protein TasA, velik 31 kDa, in polisaharid sintetiziran z encimi, ki so zapisani na operonu *epsA-0* (Branda in sod., 2006; Stover in Driks, 1999). Bakterija *B. subtilis* sev natto (*B. subtilis* (natto)) v stresanem gojišču SYM tvori polisaharid levan. Ta polisaharid je fruktan in je sestavljen iz 11 in 1794 kDa velikih frakcij (Shih in sod., 2005). V gojišču Czapek pa so odkrili, da bakterija *B. subtilis* FT-3 v stresanih kulturah tvori heteropolisaharid FT-3, katerega molska masa znaša 25-29 kDa (Morita in sod., 1979). Teh rezultatov ne moremo direktno primerjati, saj se raziskave razlikujejo v uporabljenih sevih in načinu gojenja teh sevov.

Poleg omenjenih raziskav, ki so temeljile na preučevanju EPS, pa so nekateri raziskovalci preučevali tudi morfologijo biofilmov v odvisnosti od gojišča. Raziskave osnovane na vplivu različnih gojišč na nastanek biofilmov in njihovo morfologijo so bile najbolj pogoste. Najbolj natančno je bil preučovan vpliv MSgg na razvoj biofilma seva *B. subtilis* 3610. Cilj te diplomske naloge je bil ovrednotiti vpliv različnih rastnih gojišč na morfologijo, časovni razvoj in debelino biofilma ter na količino in kemijsko sestavo EPS tako v biofilmu kot tudi v rabljenem gojišču pod biofilmom bakterije *B. subtilis* 3610. S

kemijskimi analizami smo določili delež polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin. In s HPSEC analizo ovrednotili velikostne frakcije EPS in njihovo kemijsko sestavo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- ➔ Biofimi bakterije *B. subtilis*, gojeni v različnih gojiščih, se morfološko med sabo razlikujejo. Te razlike je mogoče zaznati tudi v dinamiki razvoja in propada biofilma.
- ➔ Zunajcelične polimerne snovi (EPS) se med biofilmimi, gojenimi v različnih gojiščih, razlikujejo v deležu polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin.
- ➔ V istem gojišču ni razlik med deleži polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin v zunajceličnem polimernem materialu (EPS) biofilmov in rabljenih gojišč pod biofilmom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOFILMI

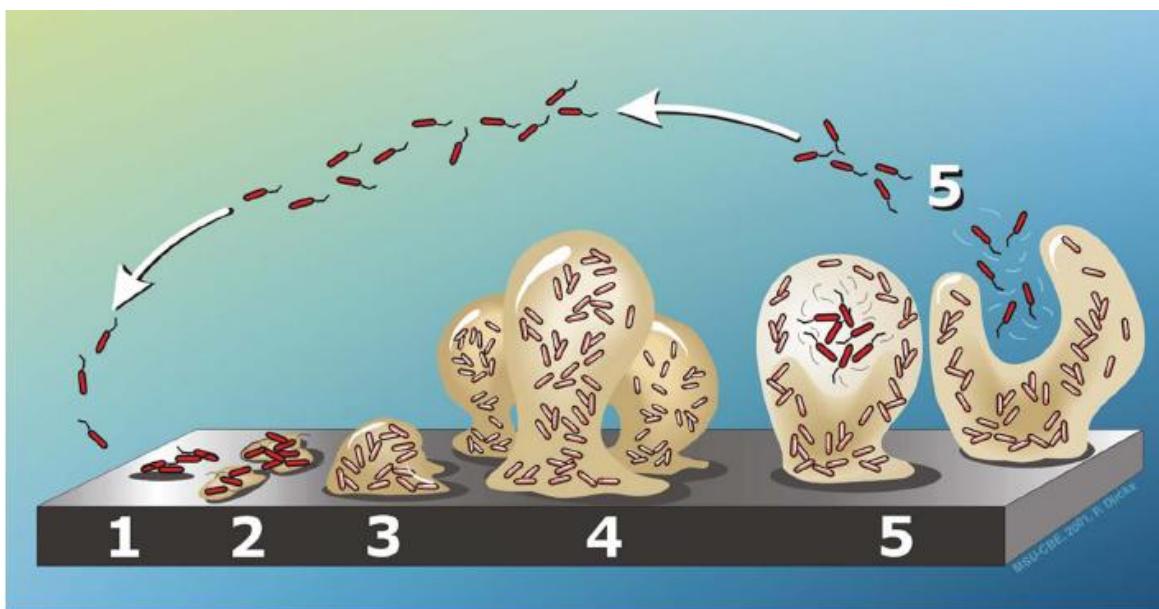
Bakterije so sposobne rasti skoraj na vseh površinah, kjer tvorijo strukturno kompleksne združbe, ki jim rečemo biofilmi. Čeprav lahko živijo kot prosto plavajoče celice, je pojav biofilmskih združb veliko pogostejši. Mehanizem tvorbe biofilmov se razlikuje med bakterijami in je velikokrat odvisen od okolja (López in sod., 2010; Branda in sod., 2005). Skupno vsem je, da njihov razvoj običajno sprožijo okoljski signali in signali, ki jih proizvajajo celice v biofilmu in da so te celice med sabo povezane z zunajceličnim polimernim materialom (Branda in sod., 2005; Spoering in Gilmore, 2006).

Biofilmi nudijo zaščito mikroorganizmom pred okoljskim stresom in mnogimi plenilci, pri čemer igra ključno vlogo ravno EPS. Ta številnim okoljskim stresnim dejavnikom, kot so antibiotiki, dezinfekcijska sredstva in sestavine imunskega sistema, otežuje dostop do celic (Stewart, 2002; Drenkard in Ausubel, 2002). Posledično so mikrobi v biofilmu bolj odporni in infekcije, ki jih povzročajo, težko ozdravljive (Lemon in sod., 2008; López in sod., 2010). Poleg tega vpliva na povišano odpornost tudi dejstvo, da so celice v spodnjih slojih biofilma v dormantnem stanju oz. imajo sprožene številne stresne odzive (običajno odvisne od RpoS), ki jih tudi naredijo bolj rezistentne na antibiotike (Sauer, 2003; Beloin in Ghigo, 2005). Biofilmi imajo tudi negativne vplive na ljudi, saj jih najdemo med drugimi v vodovodnih ceveh, na kontaktnih lečah, katetrih in različnih implantatih (Lemon in sod, 2008; Flemming in Wingedner, 2001b). Po drugi strani pa igrajo v naravi ključno vlogo pri kroženju elementov in so pomembni v prehrambeni industriji, farmaciji in biotehnologiji (Czaczyk in Myszka, 2007; Banik in sod., 2000).

2.1.1 Razvoj biofilmov

Razvoj biofilmov uravnava mehanizmi, ki skrbijo za preklop med planktonskim in sesilnim načinom življenja (Lemon in sod., 2008). V splošnem razvoj biofilmov poteka v več stopnjah: 1. planktonske celice izločijo proteine, ki se adsorbirajo na površino v okolju in tvorijo proteinski sloj (Czaczyk in Myszka, 2007; Van Houdt in Michiels., 2005); 2. celice se približajo površini, pri čemer se gibljive približajo same s pomočjo bičkov,

negibljive pa k površini prinese tok tekočine; 3. sledi reverzibilno pritrjanje s pomočjo površinskih adhezinov in nastanek enojnega sloja bakterij, ki s pomočjo aktivnega premikanja tvorijo večslojno mikrokolonijo; 4. ireverzibilno pritrjanje je vezano na aktivno izločanje EPS, ki omogoči adhezijo planktonskih celic v okolini. Sinteza EPS se nepretrgano nadaljuje skozi celoten življenjski cikel biofilma. Produkt vseh teh procesov je zrel biofilm s tridimenzionalno strukturo, v katerem se izguba celic nadomešča s produkcijo novih (Van Houdt in Michiels, 2005; Lemon in sod., 2008).



Slika 1: Hipotetični model razvoja biofilma. Prikazane so splošne stopnje razvoja (Van Houdt in Michiels, 2005: 627).

2.1.2 Zunajcelični polimerni material (EPS)

Zunajcelični polimerni material se v biofilmu razlikuje ne le med različnimi vrstami bakterij ampak lahko tudi med sevi ene vrste (López in sod., 2010). Prav tako je lahko ta EPS različen od tistega, ki ga proizvajajo planktonske celice (Drenkard in Ausbel, 2002). Poznamo kapsularni EPS, ki je povezan s celičnim površjem, EPS, ki se nahaja v matriksu biofilma, in prost, ki je izločen v gojišče (Omoike in sod., 2006). V glavnem ga sestavljajo polisaharidi, proteini in nukleinske kisline, v manjši meri pa tudi glikoproteini in

fosfolipidi. Te snovi so nabite, z izjemo polisaharidov, ki so lahko tudi nenabiti (Czaczik in Myszka, 2007; Dogsa in sod., 2008).

Nekatere sestavine zunajceličnega materiala služijo kot signalne molekule, druge delujejo kot zaloge nutrientov ali energije (Marvasi in sod., 2010). Dejstvo pa je, da obstoj biofilmov brez EPS sploh ne bi bil mogoč, saj igra ta ključno vlogo pri nastanku in vzdrževanju oblike biofilma, njegovi integriteti in, kot že omenjeno, povečani odpornosti celic proti okoljskemu stresu (Branda in sod., 2005, Czaczik in Myszka, 2007; Van Houdt in Michiels, 2005). Pri tem so bistvene funkcionalne skupine, ki reagirajo z antimikrobnimi snovmi in tako preprečijo njihovo penetracijo. Poleg tega funkcionalne skupine tvorijo različne vezi, ki omogočajo adhezijo in kohezijo celic (Drenkard in Ausbel, 2002). V nekaterih primerih pa matriks pripomore tudi k pridobivanju hranič iz okolice (Dunne, 2002).

Najbolje preučeni in zastopani sestavini EPS sloja predstavljajo polisaharidi in proteini, katerim lahko pripisemo največji prispevek k omejenim funkcijam. Prve delimo na heteropolisaharide, ki so sestavljeni iz različnih monomerov, in homopolisaharide, ki so sestavljeni izključno iz glukoze ali fruktoze in jih zato tudi imenujemo glukani ali fruktani (Sutherland, 2001b; Czaczik in Myszka, 2007). Tip glikozidne vezi med monomeri, stopnja razvejenosti in naboj določata fizikalne lastnosti polisaharidov (Sutherland, 2001b). Zunajcelični proteini so snovi z molsko maso 10-200 kDa in v večini biofilmov predstavljajo manjši delež EPS kot polisaharidi (Liu in Tai, 2001). Splošno gledano vsebujejo 40-60 % hidrofobnih aminokislin in zelo malo tistih z žveplom (Lory, 1992; Czaczik in Myszka, 2007).

Ne smemo zanemariti niti vloge DNK, katere prisotnost v matriksu ni zgolj posledica celične lize. Vsekakor je za transformacijo pri naravno kompetetnih vrstah v biofilmu osnova za horizontalne prenose genov (Spoering in Gilmore, 2006), v nekaterih primerih pa ima še širšo vlogo. V biofilmih bakterij *Pseudomonas aeruginosa* in *Streptococcus mutans* predstavlja zunajcelična DNA večinski delež matriksa. V prvem primeru pripomore k ojačenju medceličnih povezav (Withchurch in sod., 2002). V drugem primeru pa je DNA pomembna zunajcelična sestavina matriksa in pomembno prispeva k izgradnji biofilma. Petersen in sod. (2005) so pokazali, da so geni, ki uravnavaajo kompetenco za

transformacijo in so odgovorni za izločanje DNK iz celice ter za vezavo in sprejem DNK v celico (*comGB*), potrebni za izgradnjo biofilma. Prisotnosti DNaze zavre razvoj biofilmov in njihov fenotip je podoben mutanti v *comGB*.

2.1.3 Vpliv okolja na sintezo EPS v biofilmih

Producija zunajceličnih polimerov je odvisna od razpoložljivosti ogljika in dušika v gojišču. Večina bakterij izkorišča vir ogljika (npr. sladkorje) za pridobivanje energije in biosintezo ter amonijeve soli in aminokisline kot vir dušika (Gandhi in sod., 1997; Looijesteijn in sod., 1999). Na splošno je produkcija EPS višja, kadar je v gojišču na voljo veliko sladkorja, predvsem glukoze (Flemming in Wingedner, 2001a; Looijesteijn in sod., 1999). Sintezo polisaharidov sprožijo še drugi mono- in disaharidi, vendar je od bakterijske vrste odvisno, kateri je pri tem najuspešnejši (Sutherland, 2001b; Branda in sod., 2005). Nizka vsebnost dušika pogosto pripomore k pretvorbi ogljika v zunajcelične polisaharide, medtem ko njegova visoka razpoložljivost vodi v sintezo proteinov (Sanin in sod., 2003; Sutherland, 2001b; Lee in sod., 1999).

Prav tako igra pomemben faktor pri sintezi EPS temperatura. Sutherland (2001b) je pokazal, da zmanjšanje le te za 10 °C pod optimalno vrednost pri nekaterih bakterijskih vrstah zavre sintezo zunajceličnih polisaharidov in sproži sintezo proteinov (Sutherland, 2001b; Briandet in sod., 1999). V biofilmih bakterije *Listeria monocytogenes* pa so dokazali, da spadajo ti proteini, ki so sintetizirani pod optimalno temperaturo, v razred proteinov hladnega šoka (Briandet in sod., 1999.). Poleg temperature je pomemben tudi pH. Njegova optimalna vrednost za biosintezo zunajceličnih polimerov se giblje med 5,5 in 7,5 (Lee in sod., 1999; Gandhi in sod., 1997). Po drugi strani pa je biosinteza pri pH pod 2 ali nad 10 popolnoma ustavljenata (Stredansky in Conti, 1999). Shu in Lung (2004) sta v svoji študiji tudi odkrila, da vpliva pH celo na molsko maso zunajceličnih polisaharidov. Pri kislem pH nastajajo polisaharidi z višjo molsko maso, ki se niža z višanjem pH (Shu in Lung, 2004).

2.2 BAKTERIJA *B. subtilis*

2.2.1 Ekologija

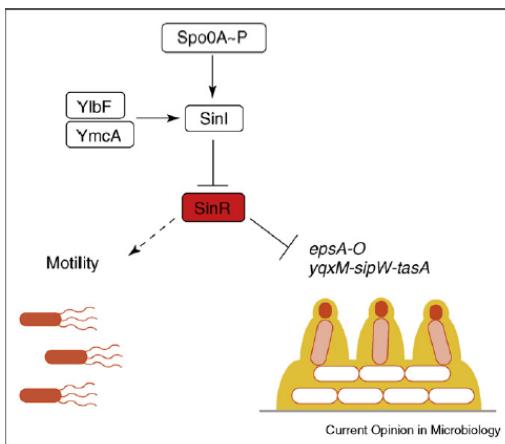
Bacillus subtilis je gibljiva in zelo razširjena bakterija, ki na različnih površinah in inter fazah voda-zrak tvori biofilme oz. pelikle (Chagneau in Saier, 2004). Sposobna je preživeti v različnih okoljih, od kopenskih do vodnih, najpogosteje pa so jo osamili iz tal. Najdemo jo tudi v rizosferi, kjer tvori biofilme na površju korenine (Bais in sod., 2005) in pospeši rast rastlin (Cazorla in sod., 2007). Najbolj prepoznavna lastnost predstavnikov rodu *Bacillus* je sposobnost tvorbe endospor, v katere se celica diferencira ob pomanjkanju hranil (Earl in sod., 2008). Nekaj časa so mislili, da je *B. subtilis* obligatni aerob, vendar so novejše raziskave potrdile, da lahko v anaerobnih pogojih fermentira ali izkorišča nitrat in nitrit kot končni elektronski akceptor (Nakano in Zuber, 1998). S tega vidika ni presenetljivo, da najdemo te bakterije tudi v prebavilih živali, kjer so pogoji anaerobni. Menijo, da v prebavila vstopijo kot spore, ki tam tudi vzklijejo in rastejo (Tam in sod., 2006). Prehod bakterije skozi prebavila pa ni brez učinkov na žival. Tam pomaga vzdrževati ravnovesje mikroflore in tako deluje kot probiotik (Casula in Cutting, 2002). *B. subtilis* najdemo tudi v komercialno dostopnih fermentiranih produktih kot je soja, ki jo na Japonskem pridobivajo s pomočjo seva *B. subtilis* (natto) (Inatsu in sod., 2006).

2.2.2 Nastanek biofilmov bakterije *B. subtilis* in njihovo uravnavanje

Med razvojem biofilma *B. subtilis* preklopi iz gibljivega na sesilen načina življenja. Na sliki 2 je prikazano uravnavanje tega preklopa. Protein SinR je v celicah konstitutivno izražen in je glavni transkripcijski regulator, ki uravnava ta preklop (Kearns in sod., 2005). V gibljivih celicah zavire prepis operonov *epsA-O* in *yqxM-sipW-tasA*, ki so odgovorni za izdelovanje zunajceličnega polimernega materiala, hkrati pa sproži celično gibljivost (Branda in sod., 2006; Kearns in sod., 2005; Chu in sod., 2006). V ta proces se ob ugodnih pogojih za nastanek biofilmov vmeša sporulacijski regulator Spo0A, ki v fosforilirani obliki aktivira izražanje proteina SinI. Ko ta protein preseže določeno koncentracijo, inaktivira delovanje SinR (Bai in sod., 1993), kar vodi v izgubo gibljivosti in produkcijo matriksa. Znano je tudi, da je SinI v biofilmih izražen le v nekaterih celicah, medtem ko je

SinR v večini in je prisoten v višjih koncentracijah (Branda in sod., 2006; Chai in sod., 2008).

Poleg SinI pozitivno vplivata na izražanje operonov *epsA-O* in *yqxM-sipW-tasA* tudi proteina YlbF in YmcA, vendar njuno delovanje še ni popolnoma razjasnjeno. Lahko, da spodbujata sintezo ali stabilnost SinI. Obstaja pa tudi možnost, da direktno vplivata na delovanje SinI ali SinR (Kearns in sod., 2005).

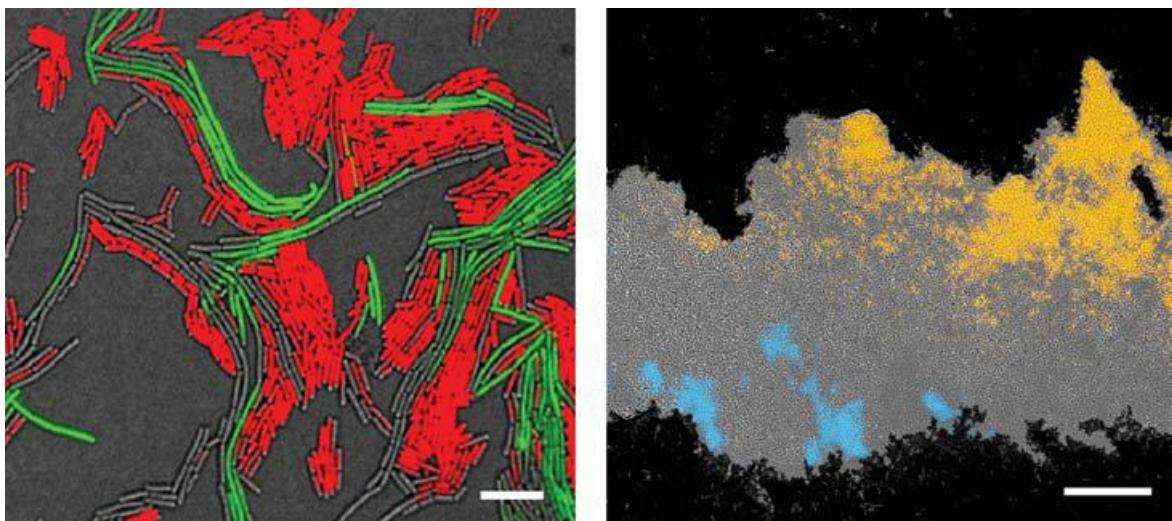


Slika 2: Uravnavanje preklopa med sesilnim in gibljivim načinom življenja pri bakteriji *Bacillus subtilis* (Aguilar in sod., 2007: 641).

2.2.3 Diferenciacija celic in parakrino signaliziranje v biofilmu *B. subtilis*

Zaradi velikih količin zunajceličnega materiala se predvideva, da je difuzija majhnih molekul v biofilmu otežena, kar vodi v nastanek različnih gradientov kisika, nutrientov, vitaminov, kofaktorjev in sprejemnikov elektronov. Zaradi tega se ustvarijo mikroniše, na katere celice odgovorijo z raznolikim izražanjem genov. Posledično prihaja znotraj biofilmov do tvorbe različnih podpopulacij, ki niso posledica različne genske zasnove (Stewart in Franklin, 2008). V biofilmih, zraslih na trdnih gojiščih MSgg, lahko tako ločimo med podpopulacijami gibljivih celic, celic, ki proizvajajo EPS (proizvajalke EPS) in sporami (slika 3) (López in sod., 2009c; Branda in sod., 2001). Delež posamezne podpopulacije niha glede na fazo razvoja biofilma. V zgodnji fazi prevladujejo gibljive celice, ki se v zrelem biofilmu diferencirajo v proizvajalke EPS. Kasneje se del teh celic

razvije v spore, ki se preferenčno nahajajo na zračnih strukturah (Vlamakis in sod., 2008). Te konstrukcije se tvorijo na površini biofilmov in močno spominjajo na plodna telesa miksobakterij in jih zato tako tudi poimenujemo (Branda in sod. 2001). Potrebno je še omeniti, da proizvajalke delujejo tudi kanibalno, saj proizvajajo toksine, ki povzročijo lizo ostalih celic, same pa so nanje rezistentne (Fujita in sod., 2005). Producija kanibalnih toksinov je sprožena istočasno, preko istih molekul in iste genske kaskade kot sinteza zunajceličnega materiala (López in sod., 2009b). To ima za biofilm številne koristi. Propadle celice sprostijo nutriente v okolje, od katerih imajo korist druge bakterije, kar preloži energijsko potratno sporulacijo na kasnejši čas. Prav tako pa imajo proizvajalke EPS prednost pred ostalimi, tako da se v biofilmu tvori veliko matriksa, kar omogoča biofilmu rast in stabilnost (Ellermeier in sod., 2006; Claverys in Havarstein, 2007).



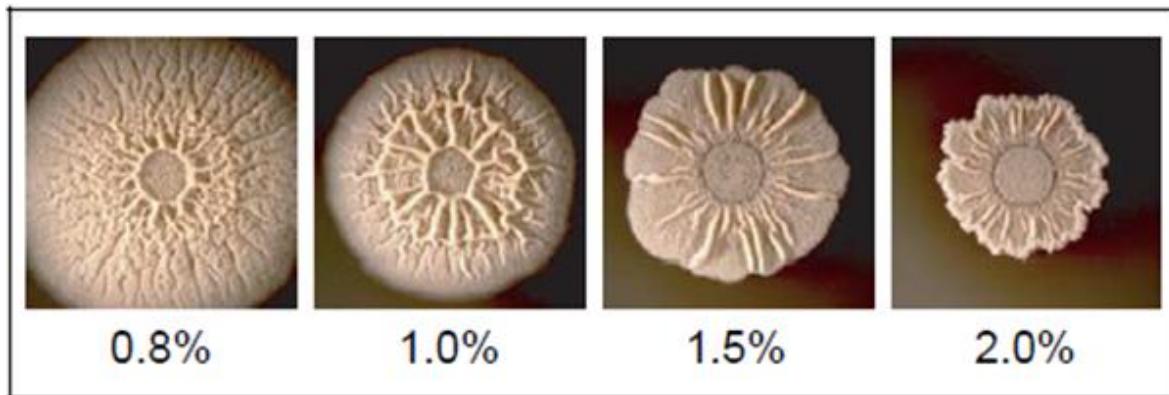
Slika 3: Raznolikost v biofilmu bakterije *Bacillus subtilis*. Leva slika je slikana od zgoraj navzdol. Z rdečo so prikazane proizvajalke EPS, z zeleno gibljive in z sivo vse ostale. Desna slika prikazuje biofilm na plošči slikan s strani. Agar je na dnu in center biofilma na desni strani. Celice označene z modro so gibljive, sporulirajoče oranžno in vse ostale sivo (López in sod., 2010: 5).

Molekuli, ki sta v odgovorni za diferenciacijo v proizvajalke EPS in hkrati v kanibalne celice, sta signalni molekuli ComX in surfaktin. Zunajcelični feromon ComX aktivira sintezo surfaktina (Dubnau, 1991), ta pa sproži pot SpoOA-P in s tem sintezo EPS. Zanimivo je, da se le del populacije celic, ki akumulira dovolj SpoOA-P razvije v

proizvajalke EPS, kar je v skladu z raznolikim izražanjem genov v populaciji (López in sod., 2009a; Chai in sod., 2008). Tu gre za primer parakrinega signaliziranja, kjer se celice, ki proizvajajo signal (surfaktin), na ta signal ne odzovejo, temveč signal zaznajo druge celice v bližini, ki postanejo proizvajalke EPS (López in sod., 2009c).

2.2.4 Morfologija biofilmov bakterije *B. subtilis* in vpliv okolja

Morfologija biofilmov niha glede na uporabljen sev in okoljske pogoje. Že spremembe v koncentraciji agarja imajo velik vpliv na njihovo arhitekturo (slika 4) (Branda in sod., 2005; Veening in sod., 2006). Okolje torej pogojuje številne lastnosti biofilma, kot so poroznost, gostota, vsebnost vode, naboj, adsorpcija, ionsko izmenjevalne lastnosti, hidrofobnost in mehansko stabilnost (Marvasi in sod., 2010).



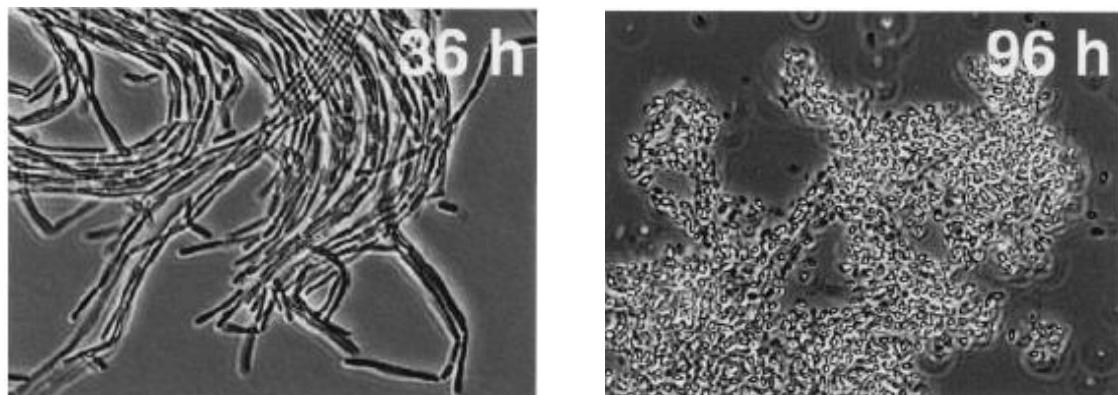
Slika 4: Vpliv koncentracije agarja na razvoj biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* na trdnih gojiščih MSgg (Branda in sod., 2005: 21).

Branda in sod. (2001) so opazovali morfologijo biofilmov oz. peliklov divjih tipov bakterije *B. subtilis* 3610, zraslih v tekočih in na trdnih gojiščih MSgg pri 25 °C, in sledili njihovem razvoju. Opazili so, da divji tip bakterije tvori debel, robusten in zelo urejen pelikel, ki daje videz prepletenosti z venami (slika 5). Prvi znaki razvoja na interfazi voda-zrak so bili opazni nekje med 12-24 h gojenja. Mikroskopija je pokazala, da celice v začetni fazi (po 36 h gojenja) tvorijo dolge filamente, ki so paralelno usmerjeni in med

sabo povezani (slika 6) (Branda in sod., 2001). Te ugotovitve so se ujemale z rezultati, ki jih je že leta 1872 pridobil Cohn (Kearns in sod., 2005). Pri 60 h gojenja so bile opazne že prve spore in po 96 h so le te tudi prevladovale. Takrat so bile na površini biofilmov opazne zračne projekcije oz. plodna telesa, ki so služila kot preferenčno mesto sporulacije. Mikroskopski pregled biofilmov je še pokazal, da so celice takrat tudi prenehale tvoriti filamente (slika 6). Prav tako so ugotovili, da imajo biofilmi na trdnih gojiščih v glavnem enake morfološke lastnosti kot pelikli na površini tekočih gojišč (Branda in sod., 2001). Najbolj opazna razlika med njimi je pojav koncentričnih krogov, katere opazimo le na biofilmih na trdnih gojiščih (Branda in sod., 2004; Branda in sod., 2001).



Slika 5: Biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* v gojišču MSgg po 5 dneh gojenja na 25 °C. Na levi strani je pelikel na tekočem gojišču, na sredini biofilm na plošči MSgg in na levi zračne projekcije, ki so se pojavile po 96 h gojenja (Branda in sod., 2001: 11623).



Slika 6: Mikromorfologija biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 36 in 96 h gojenja v gojišču MSgg na 25 °C. Vidno je, kako celice prenehajo tvoriti filamente (Branda in sod., 2001: 11624).

Za razliko od gojišča MSgg pa *B. subtilis* 3610 v gojišču DS (ang. *Difco sporulation medium*) ne tvori debelih peliklov ali visoko strukturiranih biofilmov. Da bi odkrili razlog temu, so se številni znanstveniki lotili raziskav, v katerih so proučevali razlike na nivoju uravnavanja nastanka biofilmov v teh dveh gojiščih. Sledili so izražanju regulatorjev Spo0A in SinI ter operona *epsA-O*. Odkrili so, da se v gojišču DS ne tvorijo biofilmi kljub visoki koncentraciji Spo0A v celicah, ki je, kot prej omenjeno, ključen za nastanek biofilmov (Fujita in Losick, 2005, Jiang in sod., 2000). Razlog temu tiči v različnem delovanju regulatorja v teh gojiščih. Visoke koncentracije Spo0A v gojišču MSgg aktivirajo izražanje gena *sinI* in posledično operonov *epsA-O* ter *yqxM-sipW-tasA*. Tako je formacija biofilma podprtta. V gojišču DS pa visoke koncentracije regulatorja ne aktivirajo teh genov, temveč tiste zapisane na operonu *spoIIIG*, ki so odgovorni za sporulacijo. Da bi potrdili te ugotovitve so ustvarili mutanto, ki povečano izraža gen *sinI* in jo gojili na trdnem gojišču DS. Ta mutanta je ustvarila biofilme s podobnimi karakteristikami, kot jih imajo biofilmi divjega tipa na trdnem gojišču MSgg (slika 7). Iz vsega tega so zaključili, da gojišče DS podpira proces sporulacije, medtem ko MSgg nastanek biofilma. Torej je formacija biofilma vsaj v ekstremnem primeru, kjer primerjamo gojišče za sporulacijo z gojiščem, ki izrazito podpira tvorbo biofilmov, odvisna od uporabljenega gojišča. Pri tem prihaja do razlik na nivoju uravnavanja nastanka biofilmov (Chai in sod., 2008; Fujita in sod., 2005).



Slika 7: Biofilm bakterije *Bacillus subtilis* 3610 wt gojene na trdnem gojišču MSgg (leva slika) in DS (srednja slika) ter biofilm mutante 3610 s povečanim izražanjem SinI na trdém gojišču DS (desna slika) (Chai in sod., 2008: 14).

Da bi bolje razumeli, kako lahko okolje vpliva na tvorbo biofilmov, je potrebno še omeniti študijo, ki sta jo izvedla Chagneau in Saier (2004). Opazovala sta, kako glukoza vpliva na rast bakterije *B. subtilis* JH642. Kljub temu, da nista uporabila sev 3610, lahko iz njunih rezultatov dobimo ključne podatke, ki so pomembni za naše razumevanje vpliva gojišča na razvoj biofilmov. Uporabila sta gojišče BFM (ang. *biofilm-rich medium*) in SMS-CAA (ang. *Spizizen's minimal salt medium* z 0,5 % kazeinskih aminokislin). Ugotovila sta, da lahko glukoza zavre ali aktivira tvorbo biofilmov, odvisno od uporabljenega gojišča. Gojišče SMS-CAA z dodanim citratom ne podpira rasti biofilmov, ki pa je ob prisotnosti glukoze za 2,3-krat pospešena (merili so OD₅₇₀ v mikrotiterskih ploščah). Zanimivo je tudi to, da ima glukoza v gojišču BFM drugačen učinek. Kadar povečamo koncentracijo glukoze v tem gojišču za 10-krat, se rast biofilma zmanjša za 1,3-krat.

2.2.5 Sestavine EPS v biofilmu *B. subtilis*

EPS, ki ga v kontroliranih laboratorijskih pogojih proizvajajo divji tipi bakterije *B. subtilis*, kažejo širok razpon v velikosti in kemijskih lastnosti polimerov. Tako poznamo nevtralne polisaharide, nabite polimere, amifilne molekule in proteine (Marvasi in sod, 2010). V našem pregledu zunajceličnega materiala, ki ga sintetizira *B. subtilis* bomo predstavili sestavine EPS, ki imajo največji vpliv na nastanek biofilmov, so najbolje preučene ali pa so jih izolirali iz biofilmov ali stresanih kultur gojenih na gojiščih, ki smo jih uporabili v diplomski nalogi.

2.2.5.1 Protein TasA in polisaharid (*epsA-O*)

Branda in sod. (2006) so v biofilmih *B. subtilis* 3610, gojenih na gojišču MSgg, identificirali protein TasA in polisaharid operona *epsA-O* kot najpomembnejši sestavini zunajceličnega materiala. Do tega sklepa so jih pripeljala dejstva, da sta polimera najbolj zastopani sestavini v EPS materialu, da izguba ene izmed njiju povzroči nastanek močno deformiranih biofilmov, odsotnost obeh pa vodi celo v absolutno nezmožnost tvorbe kakršnihkoli mnogoceličnih struktur. Presenetljivo pa ja, da njihova sinteza poteka nemoteno, kadar sta v biofilmu hkrati prisotni mutanti *eps* in *tasA* in tako sinteza proteina

in polisaharida poteka v različnih celicah. To pripelje do sklepa, da TasA in polisaharid (*epsA-O*) neodvisno prispevata k nastanku in integriteti biofilma (Branda in sod., 2006).

Omenjeni polisaharid sintetizirajo encimi, ki so zapisani na operonu *epsA-O*. Ti encimi so odgovoreni za biosintezo, modifikacijo in iznos polisaharida iz celic (Branda in sod., 2001). Prekurzorji za polisaharid predstavljajo nukleotidni sladkorji, ki jih sintetizira fosfoheksomutaza zapisana na genu *yhbB* (Branda in sod., 2004). Neaktivnost tega encima ali mutacija v operonu *eps* imata enake posledice za biofilm, obakrat pride do formacije nepopolnih biofilmov z zmanjšanim deležem polisaharidov v zunajceličnem materialu (Branda in sod., 2001; Branda in sod., 2004).

Protein TasA, katerega velikost znaša 31 kDa, je zapisan na operonu *yqxM-sipW-tasA* (Branda in sod., 2004; Stover and Driks, 1999). Do raziskave Branda in sod. (2006) je veljal le za protein, ki ga izločajo vegetativne celice v stresanih kulturah in kot pomemben sestavni del spor (Stover and Driks, 1999). V tej študiji pa so ugotovili, da je njegova sinteza tudi neodvisna od procesa sporulacije in da predstavlja velik delež zunajceličnega materiala, ki ni posledica celične lize, ter da proteina v rabljenem gojišču ni. Vse to nakazuje, da je njegova prisotnost v biofilmu bistvenega pomena. Za nastanek biofilmov pa v operonu *yqxM-sipW-tasA* ni potreben le gen za ta protein ampak tudi gena *sipW* in *yqxM*. Njuna delecija povzroči tvorbo nedovršenih peliklov, ki ne prekrivajo celotne razpoložljive površine in so sestavljeni iz relativno kratkih filamentov celic. Takšna morfologija je posledica neuspešne sinteze TasA (Chu in sod., 2006; Branda in sod., 2004). Vsak od genov operona ima svojo funkcijo, ki pripomore k celovitosti biofilmov. SipW je signalna peptidaza, ki je potrebna za razvoj in iznos proteinov YqxM in TasA, pri čemer je protein YqxM odgovoren za pravilno lokacijo TasA v matriksu (Branda in sod., 2006; Tjalsma, in sod., 2000). Najnovejše raziskave pa so pokazale, da je YqxM, ki so ga v teh raziskavah poimenovali TapA, lokaliziran tudi v celični steni, natančneje v peptidoglikanu, in da je preko njega TasA pritrjen na celico (Driks, 2011). V primeru hiperprodukცije TasA, kar vodi v tvorbo dolgih amiloidnih vlaken, je TapA vgrajen v ta vlakna in tako odgovoren tudi za njihovo obliko in integriteto (Romero in sod., 2009, Romero in sod., 2011).

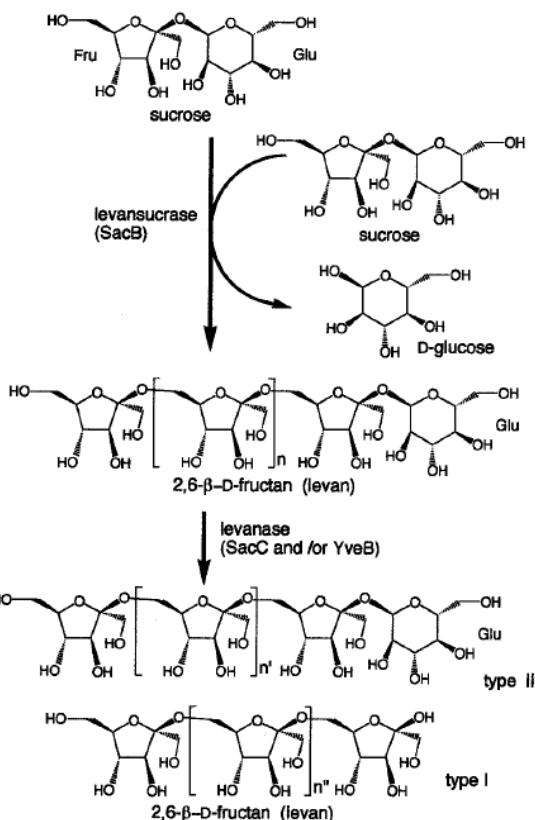
2.2.5.2 Levan

Najbolje preučen polisaharid, ki ga sintetizira *B. subtilis*, je vodotopen levan, ki ima nevtralen značaj (Marvasi in sod., 2010; Shih in sod., 2005). Sintetizirajo ga različne rastline in mikroorganizmi, med katere spadajo *B. subtilis* sevi 327UH, ISS3119, QB112 in *Pseudomonas sp.* ter *Erwinia herbicola* (Marvasi in sod., 2010). V tej sekciji ga omenjamo, ker smo v diplomski nalogi uporabili gojišče SYM z 20 % saharoze, ki močno favorizira njegovo producijo (Shida in sod., 2002; Shih in sod., 2005).

Za raziskave je zanimiv iz številnih razlogov. Ima antitumorno delovanje, v rastlinah deluje kot zaloga hrane, v rizosferi pšenice pa skrbi za oblikovanje talnih agregatov (Calazans in sod., 2000; Ebskamp in sod., 1994; Bezzate in sod., 2000). Ker je naraven in varen polisaharid ponuja tudi številne aplikacije na področjih kozmetike, prehrane in farmacije (Han, 1990, cit. po Shih in sod., 2005).

Obstajata dva tipa levana, ki sta sestavljena iz D-fruktoz, povezanih z β -2,6 vezjo. Razlika med njima je ta, da se pri prvem tipu konec verige zaključi s fruktozo in je zato reducirajoč. Pri drugem pa je na terminalno fruktozo z α -glikozidno vezjo vezana glukoza, tako da nima redukcijske moči. Za sintezo obeh tipov je odgovoren encim levanskraza (*sacB*), medtem ko je levanaza (*sacC*) odgovarna za njuno degradacijo. Levanskraza je zunajcelična transferaza, katere sinteza je močno podprta, kadar je v gojišču prisotna sahariza. Ta encim prenese fruktozo iz disaharida na levan in tako omogoča njegovo polimerizacijo (Shida in sod., 2002). Levanaza pa je odgovorna za degradacijo polimera in je sprožena, kadar v gojišču primanjkuje fruktoze (slika 8) (Wanker in sod., 1995).

Molska masa levana znaša 11 oz. 1794 kDa. Na začetku inkubacije prevladuje frakcija z višjo molsko maso, kar je posledica delovanja levanskraze in neaktivnosti levanaze. Dlje časa kot inkubiramo, manj je fruktoze v gojišču, bolj se to razmerje zaradi delovanja levanaze previsi v prid manjše frakcije (Shih in sod., 2005).



Slika 8: Sinteza levana tipa 1 in 2 (Shida in sod., 2002: 1555).

2.2.5.3 FT-3 polisaharid

FT-3 polisaharid so izolirali iz biofilmov *B. subtilis* FT-3, gojenih na gojišču Czapek. Sestavljen je iz glukoze, galaktoze, fukoze, glukoronske kisline in O-acetilnih skupin v razmerju 2:2:1:1,5, kjer fukoza predstavlja reducirajoči konec. Razen galaktoze, ki povzroča razvejenost polisaharida, so vse molekule med sabo povezane linearne. Pri tem pa ostaja nejasno, kako so na strukturo pripete O-acetylne skupine (Morita in sod., 1979). To pa ni edina neznanka, saj poleg tega ne poznamo funkcije polisaharida niti genov, ki nosijo zapis za encime, ki so potrebni za njegovo sintezo (Marvasi in sod., 2010), niti ali je ta polisaharid prisoten pri obeh sevih *B. subtilis*.

Polisaharid je velik 25-29 kDa in je topen v vodi le v nizkih koncentracijah. Njegova bistvena lastnost je, da 1 % raztopina tega polisaharida, kadar jo segrejemo in nato spet ohladimo na sobno temperaturo, tvori gel, ki je podoben agarju. Moč gela FT-3 ne dosega moči agarja, ampak ko v gojišče dodamo 1-2 % agarja in 1 % polisaharida FT-3, je rast

tipičnih mikroorganizmov, kot so plesni, kvasovke in bakterije, običajna. Zaradi tega je zanimiv za nadaljnje raziskave, saj kaže potencialno uporabo kot želirno sredstvo (Morita in sod., 1979).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sev

Uporabili smo bakterijski sev *Bacillus subtilis* 3610 wt, ki smo ga vzdrževali na ploščah LB pri 28 °C.

3.1.2 Gojišča

Uporabili smo naslednja tekoča gojišča:

- SYM (Shida in sod., 2002): K₂HPO₄ 70 mM; KH₂PO₄ 30 mM; pH 7,0; (NH₄)₂SO₄ 25 mM; MgSO₄ 0,5 mM; MnSO₄ 0,01 mM; amonijev železov citrat 22 mg/l; kvasni ekstrakt 2 % (w/v) in saharoza 20 % (w/v). Priprava za 100 mL gojišča: Posebej pripravimo mešanico 75 mL (K₂HPO₄ 1,22 g; KH₂PO₄ 0,41 g; (NH₄)₂SO₄ 0,33g; 3,1 ul 5 % (w/v) MnSO₄; kvasnega ekstrakta 2 g, ki jo damo v avtoklav na 121 °C. Potem aseptično dodamo 120 ul 5 % (w/v) MgSO₄; 220 ul 1 % (w/v) železov amonijev citrat (oba avtoklavirana ločeno). Nazadnje še dodamo 25mL 80 % (w/v) saharoze, ki smo jo predhodno sterilizirali v avtoklavu na 110 °C.
- Gojišče Czapek (Morita in sod., 1979): glukoza 3 % (w/v); NaNO₃ 0,3 % (w/v); kvasni ekstrakt 0,01 % (w/v); K₂HPO₄ 0,05 % (w/v); MgSO₄·7H₂O 0,05 % (w/v); FeSO₄·7H₂O 0,001 % (w/v) in MnSO₄·nH₂O 0,0005 % (w/v); pH približno 7,6. Glukoza, 5 % (w/v) MgSO₄·7H₂O, 1 % (w/v) FeSO₄·7H₂O se avtoklavirajo ločeno. Za avtoklaviranje uporabimo temperaturo 110 °C.
- MSgg gojišče (Branda in sod., 2001): MOPS (morpholinopropan sulfonska kislina) 100 mM; glicerol 0,5 % (w/v); glutamat 0,5 % (w/v); K₃PO₄ 5 mM; triptofan 50 µg/ml; fenilalanin 50 µg/ml; MgCl₂ 2 mM; CaCl₂ 700 µM; FeCl₃ 50 µM; MnCl₂ 50 µM; ZnCl₂ 1 µM; tiamin 2µM. Vse, razen tiamin, se skupaj avtoklavira pri temperaturi 110°C. Tiamin steriliziramo s filtracijo in ga dodamo v mešanico po avtoklaviranju.

3.1.3 Reagenti

- PBS pufer: NaCl 8 g/l; KCl 0,20 g/l; Na₂HPO₄ 1,44 g/l; KH₂PO₄ 0,24 g/l; pH 7,4.
- Detektorska raztopina za tankoplastnko kromatografijo (TLC): 0,2 ml 100 % (w/v) anilins, 0,2 g difenilamins, 20 ml acetons in 2 ml 85 % fosforne kisline.

3.1.4 Pogoji rasti

Prekonočne kulture smo vzgojili v LB tekočem gojišču pri 28 °C pri 200 obr./min. Inkubacija je potekala približno 13,5 h. Takrat so kulture dosegle OD₆₅₀ ~ 5 a.u. Po tem smo jih inokulirali v vsa tekoča gojišča s končnim OD₆₅₀ = 0,03 a.u. Inkubacija je potekala pri 37 °C 24 h za biofilme vzgojene v petrijevkah oz. 8 dni za tiste v mikrotiterskih ploščah. Inkubacija v mikrotiterskih ploščah je potekala dlje časa, ker smo v njih spremljali razvoj biofilmov po času, ki je moral biti dovolj dolg, da so se pokazale razlike med biofilmi.

3.2 METODE

3.2.1 Biofilmi gojeni v mikrotiterskih ploščah

3.2.1.1 Časovno spremjanje razvoja biofilmov

Biofilme smo gojili pri 37 °C v mikrotiterskih ploščah, pri čemer smo pazili, da je bilo razmerje med površino biofilma in volumnom gojišča enako kot pri tistih, gojenih v petrijevkah. V različnih časovnih intervalih smo pomerili absorbenco stoječih kultur (biofilm in spodaj ležeče gojišče) z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation pri 650 nm, z digitalnim fotoaparatom Nikon D40 smo pod lupo poslikali filme in odvzeli vzorce za preverjanje prisotnosti spor oz. za opazovanje morfologije s pomočjo invertnegra mikroskopa Zeiss Axio Observer Z1, kjer smo uporabljali PC (ang. *phase contrast*) in DIC (ang. *differential interference contrast*) mikroskopijo (Hitchins in sod., 1968). Namen opazovanja razvoja biofilma je bil določiti primerno dolžino inkubacije za izolacijo zunajceličnega polimernega materiala.

Pri opazovanju sporulacije smo morali paziti, da nismo spor zamenjali s celico, ki je le navpično orientirana, tako da se vidi njen zgornji del. Tako postavljena celica daje videz spore. Da smo se izognili tej napaki, smo ob prvih pojavih morebitnih spor, z gibanjem po njeni globini, preverjali ali morda ne gre le za navpično orientirano bakterijo. Tako je bila razlika med njima opazna, saj so celice bistveno daljše. Tej napaki smo se izognili tudi s pogostimi intervali opazovanja in iskanjem tipičnih primerov začetka sporulacije, kjer je celica še prisotna, spora pa je vidna v njeni notranjosti.

3.2.2 Biofilmi gojeni v petrijevkah

Biofilme smo gojili v petrijevkah v 55 ml tekočega gojišča na 37 °C.



Slika 9: Petrijevka s tekočim gojiščem SYM ali Czapek ali MSgg, na vrhu katerega je plavajoč biofilm.

3.2.2.1 Določanje debeline biofilmov po končani 24 h inkubaciji

Košček biofilma smo položili na objektno steklo in ga pokrili s krovnim steklom. Pred tem smo med obe stekli ob robovih nanesli sloj silikona, da ne bi prišlo do poškodbe biofilma oz. da se ne bi sploščil. Nato smo določili debelino s pomočjo invertnega mikroskopa, ki ima možnost merjenja razdalj v z-osi. To smo storili tako, da smo s premikanjem po globini biofilma našli njegovo površino in s pomočjo mikroskopa to točko fiksirali. Potem smo se počasi gibali do dna biofilma. Na zaslonu smo lahko odčitali razdaljo od prve točke oz. površine biofilma do dna, kar nam je predstavljalo njegovo debelino. V primeru, da je bil biofilm predebel za merjenje z mikroskopom, smo uporabili alternativno metodo, pri kateri smo ocenili debelino biofilmov s primerjanjem debeline krovnih stekel, za katere vemo, da so debela 0,17 mm.

3.2.2.2 Določanje biomase in izolacija EPS iz biofilmov ter rabljenih gojišč po končani 24 h inkubaciji

Pri izolaciji zunajceličnega polimernega materiala smo se zgledovali po metodah, ki so jih uporabljali Shih in sod. (2010), Morita in sod. (1982) ter Li in sod. (2002). Slednji so izolirali EPS z EDTA in 0,1 M NaOH z ali brez pomoči izmenični toka. Glede na predhodne raziskave, ki so pokazale, da izolacija z NaOH da več EPS kot z EDTA in da izmenični tok pri izolaciji z NaOH nima posebno velikega vpliv, smo se odločili, da bomo izvedli izolacijo prav z 0,1 M NaOH. Skrajšali smo čas inkubacije z NaOH, da bi preprečili morebitno poškodbo celic. Prav tako je potrebno omeniti, da smo preverili metodo izolacije, ki so jo izvedli Oliveira in sod. (1999), kjer so izolirali EPS s TCA ali z uravnavanjem pH z NaOH in HCl. Ugotovili smo, da dobimo s pomočjo 0,1 M NaOH v primerjavi s TCA večje količine izoliranega EPS, kar je ponovno potrdilo našo izbiro metode.

Po 24 urah inkubacije smo iz petrijevk s pipeto pazljivo odstranili gojišče in nato še biofilm ter ju tako ločili. V eksperiment smo vključili tudi sterilno gojišče kot kontrolo. Tako smo za vsako gojišče imeli 3 tipe vzorcev, biofilm, rabljeno gojišče in kontrolo. Vzorce smo prenesli v predhodno posušene in stehtane centrifugirke, jim dodali pufer PBS do razmerja PBS:vzorec = 1:1 ter nato rahlo premešali in jih razdelili po 1 ml v mikrocentrifugirke. Sledilo je 5 sekund soniciranja s 15 mikronsko amplitudo z MSE 150 vatnim ultrazvočnim dezintegratorjem Mk2 z eksponentno konico. Nato smo vzorce ponovno združili. Z porazdelitvijo vzorca smo dosegli, da so bili vsi vzorci, kljub različnim volumnom, pri tem koraku tretirani pod enakimi pogoji. S pomočjo mikroskopa smo ugotovili, da pri sonikaciji, katere namen je bil razbiti biofilm, ni prišlo do zmanjšanja števila celic, kar se ujema z dognanji Branda in sod. (2006). Poleg prostega EPS pa smo želeli pridobiti tudi celično vezanega, zato smo vzorcem dodali NaOH do 0,1 M koncentracije. Nato smo jih močno mešali z vibracijskim mešalnikom in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Ta postopek smo ponovili še enkrat, s tem da je inkubacija tokrat potekala na ledu, s čimer smo vzorce pred dodatkom HCl primerno ohladili. Nato smo jih mešali z vibracijskim mešalnikom 10 s, s čimer smo s celic dokončno sprali EPS. Po tem postopku je bilo potrebno uravnati pH, zato smo v treh korakih dodali ohlajeno HCl do 0,1 M koncentracije. Takšna raztopina NaOH in HCl nam da približno 0,5 % raztopino NaCl,

ki omogoča boljše obarjanje nabitih polimerov (Morita in sod., 1982). Sledilo je 10 min centrifugiranja $10.400 \times g$ pri 4°C s centrifugo Sigma 3K30. Tako smo odstranili biomaso, v supernatantu nam je ostal EPS, ki smo ga oborili s počasnim dodajanjem v 3-kraten volumen ohlajenega 96 % etanola (Shih in sod., 2010). To mešanico smo inkubirali približno 20 h pri 4°C , medtem ko smo biomaso sušili pri 55°C vsaj do naslednjega dne oz. dokler ni bila suha ter jo takrat stehtali.

Naslednji dan smo vzorce, supernatant v etanolu, centrifugirali 10 min pri $10.400 \times g$ pri 4°C in tako dosegli, da se je oborjeni EPS posedel ter ga nato resuspendirali v desetkratnem volumnu destilirane vode. S tem smo ga očistili ostankov gojišča in ga hkrati skoncentrirali, kar je omogočilo boljše naslednje obarjanje. K tej raztopini smo dodali NaCl do koncentracije 0,5 % in EPS spet oborili v trikratnem volumnu ohlajenega 96 % etanola ter pustili stati pri 4°C približno 20 h. Centrifugirke, v katerih smo obarjali, so bile posušene in stehtane.

Po 20 h inkubacije smo vzorce ponovno centrifugirali pri enakih pogojih kot do sedaj, supernatant smo zavrgli, oborek (EPS) stehtali in sušili na 55°C . Posušeni EPS, smo ponovno stehtali in tako določili njegovo maso. Za nadaljnje analize smo ga raztopili v destilirani vodi in tako pripravili založne raztopine.

3.2.2.3 Kemijska analiza EPS

Delali smo z založnimi raztopinami EPS, vendar je bila njegova topnost v vodi slaba, zato smo ga poskušali raztopiti z nižanjem pH. Predpostavili smo, da je v glavnem sestavljen iz treh sestavin, polisaharidov, nukleinskih kislin in proteinov.

3.2.2.3.1 Zaznavanje vsebnosti proteinov z Bradfordovim reagentom

Vzorcem EPS smo dodali NaOH do 0,1 M koncentracije, tako da se je zagotovo raztopil. Prav tako smo si v 0,1 M NaOH vedno sproti pripravili umeritveno krivuljo z raztopinami govejega serumskega albumina (BSA, ang. *bovine serum albumin*) v koncentracijah od 0 do 1 mg/ml. Bradfordov reagent vsebuje Brilliant Blue G barvilo, ki je v reagentu v

protonirani oblici. Takrat absorbira svetlobo pri valovni dolžini 465 nm. Ko se barvilo veže na protein, se absorpcijski maksimum pomakne k 595 nm.

V mikrotitersko ploščo smo prenesli po 10 µl založnih raztopin EPS in raztopin BSA. Bradfordov reagent smo premešali ter ogreli na sobno temperaturo in ga šele nato 0,25 ml dodali k vzorcem. Potem smo to mešanico inkubirali 15 min na sobni temperaturi. Koncentracijo smo določili z merjenjem absorbance z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation pri 595 nm.

3.2.2.3.2 Merjenje koncentracije nukleinskih kislin

Tokrat smo založnim raztopinam zaradi slabe topnosti EPS dodali NaOH do 0,05 M koncentracije. Tako so bili rezultati o količini nukleinski kislin, pridobljeni s spektrofotometrom Thermo Scientific Nanodrop 1000, primerljivi s tistimi od HPSEC analize, kjer je raztopina 0,05 M NaOH predstavljala mobilno fazo. Zaradi višjega pH v tej raztopini so absorcijske lastnosti nukleinskih kislin in proteinov drugačne kot v destilirani vodi. Zato smo pripravili raztopine BSA do koncentracije 3 mg/ml in raztopine lososove DNK do koncentracije 1 mg/ml in z njimi pripravili umeritvene krivulje absorpcij pri 260 in 280 nm. Tako smo pridobili koeficiente za nukleinske kisline in proteine pri teh dveh valovnih dolžinah ($k_{\text{prot.},260}$; $k_{\text{NK},260}$; $k_{\text{prot.},280}$; $k_{\text{NK},280}$), ki nam podajo razmerje med jakostjo absorpcije pri 260 oz. 280 nm (A_{260} , A_{280}) in koncentracijo nukleinskih kislin oz. proteinov (c_{NK} , $c_{\text{prot.}}$). Pri analizi EPS smo upoštevali le absorpciji pri 260 in 280 nm, h katerima poleg nukleinskih kislin prispevajo tudi proteini. Njihovo koncentracijo ($c_{\text{prot.}}$) smo določili z Bradfordovim reagentom. Z vsemi temi podatki smo lahko izračunali koncentracijo nukleinskih kislin s pomočjo enačbe (1) ali (2).

$$A_{260} = k_{\text{prot.},260} \times c_{\text{prot.}} + k_{\text{NK},260} \times c_{\text{NK}} \quad \dots(1)$$

$$A_{280} = k_{\text{prot.},280} \times c_{\text{prot.}} + k_{\text{NK},280} \times c_{\text{NK}} \quad \dots(2)$$

3.2.2.3.3 Določanje vsebnosti celokupnih sladkorjev z metodo celokupnih sladkorjev

Uporabili smo metodo, ki so jo opisali Cuesta in sod. (2003). Z njo smo določili delež polisaharidov v EPS. Delali smo z založnimi raztopinami, kjer ni bilo pomembno ali je EPS dobro raztopljen, saj se je zagotovo raztopil v koncentrirani H_2SO_4 , ki smo jo uporabili v tej metodi. Raztopine smo morali le ustrezeno redčiti, ker je zgornji prag te metode 0,5 mM sladkorjev.

Vedno smo si sproti do koncentracije 0,5 mM pripravili dve umeritveni krivulji, eno z raztopino glukoze in drugo z raztopino fruktoze. Slednjo smo potrebovali, ker je znano, da v gojišču SYM nastaja levan, ki je polimer fruktoz (Shida in sod., 2002). Ta pa v tej reakciji bolj prispeva h končni absorbciji. S segrevanjem pri kislem pH smo hidrolizirali polisaharid do monomerov. Te smo nato obdelali s koncentrirano H_2SO_4 , pri čemer je prišlo do dehidracije in nastanka hidroksi metil furfurala, ki je reagiral s fenolom in tvoril obarvan produkt.

Reakcijo smo izvedli v bor-silikatnih vialah s teflonskimi zamaški. Potrebovali smo 0,3 ml vzorca, ki smo mu dodali 0,15 ml fenola in nato mešali z vibracijskim mešalnikom. Po tem smo dodali še 0,75 ml koncentrirane H_2SO_4 in spet na kratko mešali z vibracijskim mešalnikom ter takoj vzorce v vodni kopeli ohladili na sobno temperaturo. Ta korak je kritičen, saj moramo tu vsem vzorcem dodati kislino enako hitro, pri čemer temperatura naglo naraste, kar močno vpliva na končni rezultat. Hlajenje je pa pomembno, ker s tem zmanjšamo razlike v intervalih ohlajanja med posameznimi vzorci. Nato smo vse vzorce skupaj z umeritvenimi krivuljami zavili v alu folijo in naredili par luknjic. S tem smo pri naslednjem koraku, kjer smo jih kuhalni 20 minut pri 100 °C, ustvarili enake pogoje reakcije pri vseh vzorcih. Po tem smo vse hkrati ohladili v vodni kopeli in v mikrotiterski plošči izmerili njihovo absorbanco z optičnim čitalcem pri 490 nm.

3.2.2.4 Analiza EPS z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo HPSEC

Uporabili smo kromatografsko tehniko s tremi zaporedno vezanimi kolonami, kjer smo sestavine vzorcev EPS ločili na podlagi velikosti.

Kolone:

- PSS Suprema Analytical 10.000 A°, ki ločuje molekule velikosti 10-10⁶ Da.
- PSS Suprema Analytical 1.000 A°, ki ločuje molekule velikosti 100-10⁶ Da.
- PSS Suprema Analytical 100 A°, ki ločuje molekule velikosti 100- 10⁵ Da.

Karakteristike kolon:

- Stacionarna faza: polihidroksi metakrilatni polimer
- pH: 1,5-13
- Temperatura: do 80 °C

Kromatografski pogoji:

- Pretok: 1 ml/min
- Temperatura: 35 °C
- Čas meritev: 40 minut
- Mobilna faza: 0,05 M NaOH (pH ~ 12,7)
- Injicirani volumen: 20 µl

Detektorji:

- Smartline RI detektor 2300/2400, KNAUER, *advanced scientific instruments*
- UV detektor K-2501, KNAUER, *advanced scientific instruments*

Pripravili smo umeritveno krivuljo raztopine dekstrana, različnih molskih mas, ki nam je podala časovno odvisnost elucije od velikosti.

3.2.2.5 Analiza sestave kromatografskih vrhov

Tudi tukaj smo predpostavili, da EPS v glavnem sestavlja le polisaharidi, nukleinske kisline in proteini. Pripravili smo umeritvene krivulje iz raztopin nukleinskih kislin, BSA in dekstrana, različnih koncentracij, ki so nam podale odvisnost površine vrha od koncentracije snovi ($k_{RI,CHO}$, $k_{RI,NK}$, $k_{RI,prot.}$, $k_{260,CHO}$, $k_{260,NK}$, $k_{260,prot.}$, $k_{280,CHO}$, $k_{280,NK}$, $k_{280,prot.}$). Uporabili smo podatke iz dveh detektorjev, RI in UV, kjer smo merili absorbanco pri valovnih dolžinah 280 in 260 nm. Sladkorji veliko slabše absorbirajo UV pri teh dveh valovnih dolžinah kot proteini in nukleinske kisline, medtem ko spreminjajo signal RI (ang. *refractive index*) vse tri sestavine približno enako. Sestavo posameznega vrha smo določili s pomočjo reševanja treh linearnih enačb (3), (4) in (5) s tremi neznankami (c_{CHO} , c_{NK} , $c_{prot.}$).

$$RI = k_{RI,CHO} \times c_{CHO} + k_{RI,NK} \times c_{NK} + k_{RI,prot.} \times c_{prot.} \quad \dots(3)$$

$$A_{260} = k_{260,CHO} \times c_{CHO} + k_{260,NK} \times c_{NK} + k_{260,prot.} \times c_{prot.} \quad \dots(4)$$

$$A_{280} = k_{280,CHO} \times c_{CHO} + k_{280,NK} \times c_{NK} + k_{280,prot.} \times c_{prot.} \quad \dots(5)$$

3.2.2.6 Tankoplastna tekočinska kromatografija (TLC)

Tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC) smo izvedli, da bi izvedeli iz katerih monosaharidov so sestavljeni polisaharidi v EPS.

Uporabili smo standardno raztopino mešanice sladkorjev glukoze, laktoze, fruktoze, ramnoze in saharoze. Vsak od njih je imel koncentracijo 20 mg/ml. Hidrolizo vzorcev EPS, katerih koncentracija je znašala 0,5-1,5 mg/ml, odvisno od vsebnosti sladkorja, smo opravili s 3 % (v/v) TCA (triklorocetno kislino). Vzorce s kislino smo segrevali 15 min pri 55 °C in jih nato nevtralizirali z 1 M NaOH (Muro in sod., 1999). Enak postopek smo uporabili pri raztopini standarda, levan (0,5 mg/ml) bakterije *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich). Nato smo vzorce, standard in standardno raztopino mešanice sladkorjev nanesli na ploščo TLC Silica gel 60 RP-18 F_{254S} (Merck). Kromatografijo smo izvedli v sistemu topil iz acetona in mili Q vode v razmerju 9:1. Monosaharide smo detektirali s pomočjo detektorske raztopine opisane pri materialih in metodah. Raztopino smo poškropili po

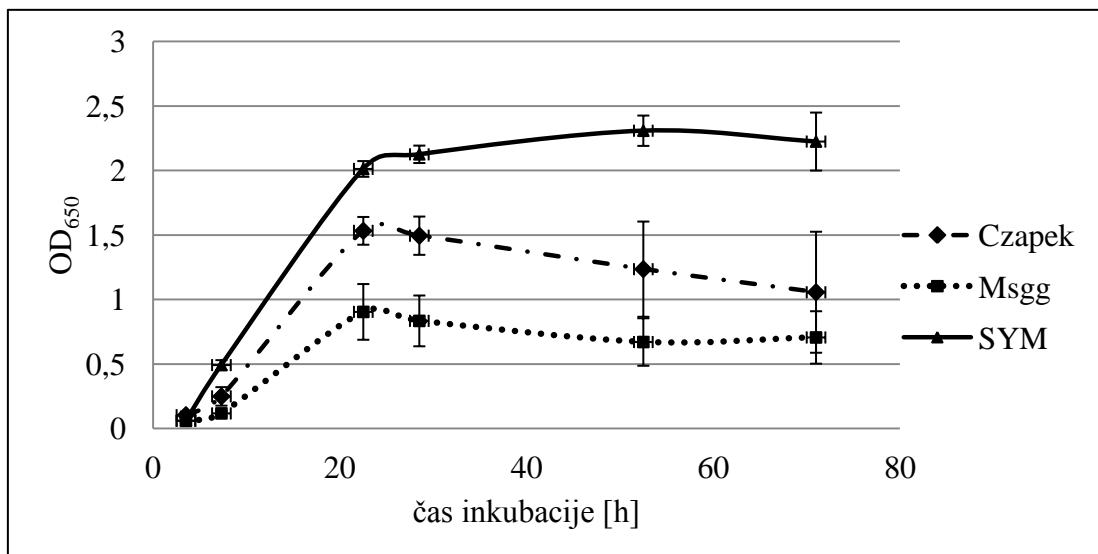
plošči in nato ploščo segrevali 20 min pri 120 °C. Sladkorje smo zaznali kot lise različnih barv.

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ BIOFILMOV

Razvoj biofilmov smo spremljali, da bi določili primeren čas trajanja inkubacije za izolacijo EPS iz biofilmov oz. rabljenih gojišč. V ta namen smo jih gojili v mikrotiterskih ploščah pri 37 °C. Optično gostoto smo merili pri valovni dolžini 650 nm, kjer je na končno vrednost vplivala gostota biofilma in motnost spodaj ležečega rabljenega gojišča.

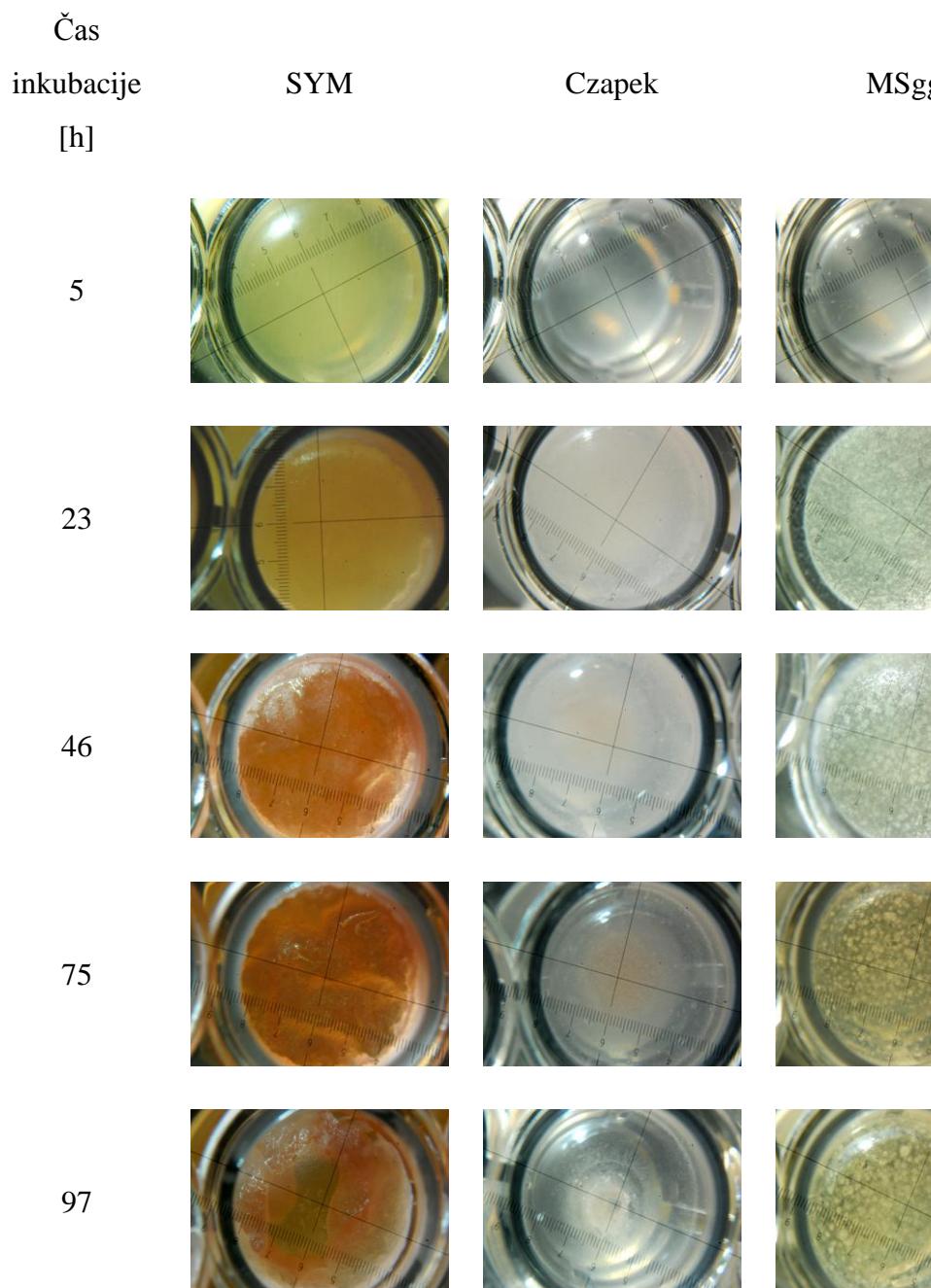
Iz slike 10 je razvidno, da vzorci, gojeni v gojišču SYM, dosegajo najvišje vrednosti OD₆₅₀ in tisti v gojišču MSgg najnižje. Prav tako lahko opazimo, da gostota pri vseh treh tipih vzorcev po 24 h ne narašča več, ampak se umiri in začne v vzorcih MSgg in Czapek celo počasi padati.



Slika 10: Optična gostota stoječih kultur bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih. Optična gostota je izmerjena pri valovni dolžini 650 nm. Inkubacija je potekala v mikrotiterskih ploščah pri 37 °C. Krivulja iz polne črte pripada vzorcem SYM, krivulja iz črtic in pik pripada vzorcem Czapek in krivulja iz pik pripada vzorcem MSgg. Prikazane so povprečne vrednosti optične gostote in standardni odkloni ob določenem času inkubacije.

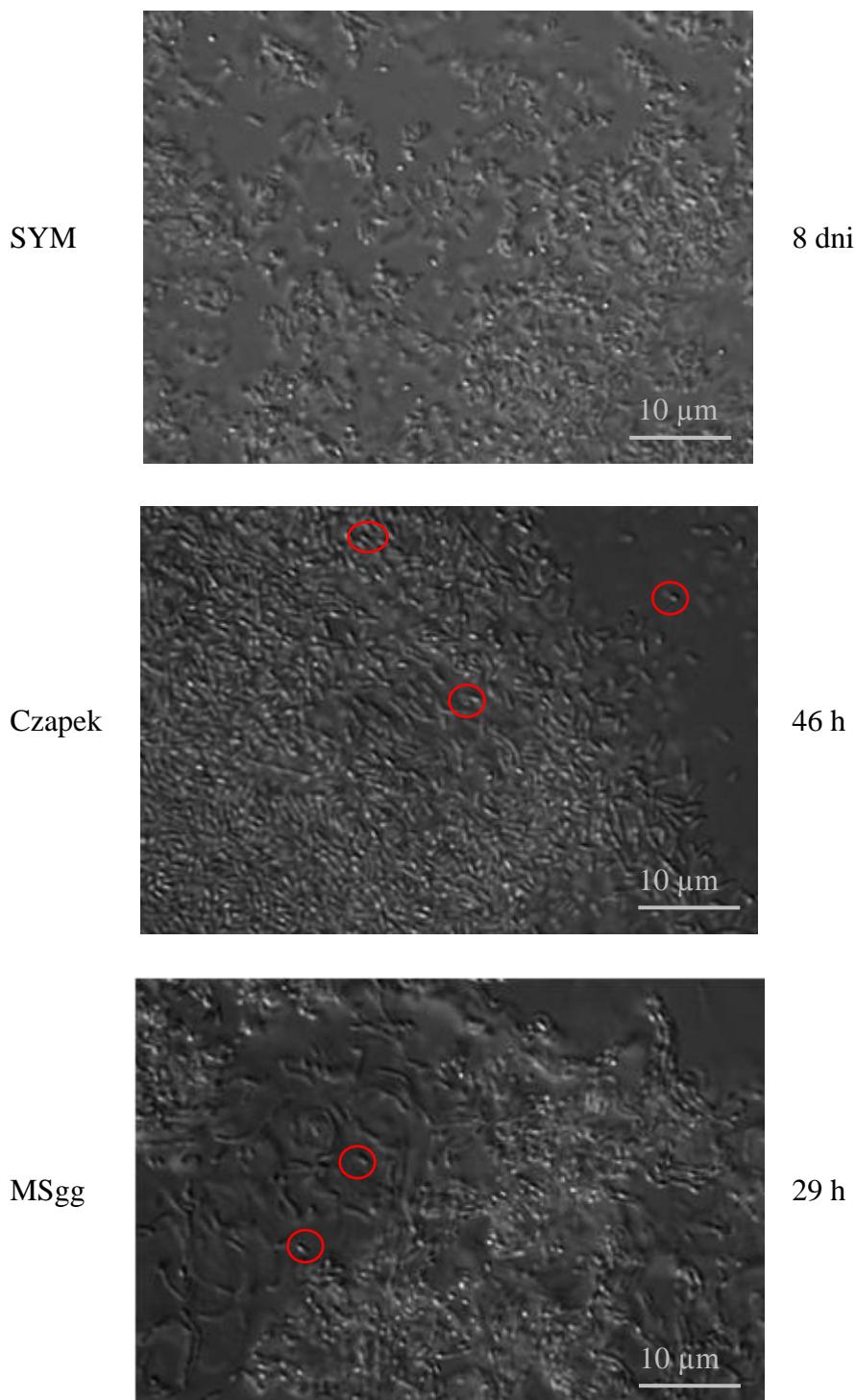
Makroskopsko spremljanje razvoja biofilmov (slika 11) je potekalo v različnih časovnih intervalih. Uspelo nam je ujeti prve znake razvoja biofilmov v gojišču SYM in propad tistih v gojišču Czapek. V najbolj bogatem gojišču SYM, se prvi znaki razvoja biofilmov pojavijo najprej in sicer že po 5 h. Pri vzorcih, zraslih v ostalih dveh gojiščih, opazimo

biofilme med 5. do 23. uro gojenja, čeprav vmesnih stopenj razvoja v tem obdobju nismo spremljali. Indikacije propadanja so se pri teh dveh gojiščih (MSgg in Czapek) pojavile že do drugega dne gojenja. To je razvidno iz slik, ki so bile odvzete pri 46 h, kjer vidimo, da biofilmi Czapek niso več enakomerno razporejeni po luknjici, ampak so na sredini zgoščeni in tanjši ob robovih. Z nadaljnjo inkubacijo takšen trend preoblikovanja le napreduje ter do 97 h gojenja vodi do popolnega propada. Prav tako tisti v gojišču MSgg pokažejo že prve znake razpadanja med 23 in 46 urami gojenja, saj pride do lokalnega kopičenja biomase, tako da dajejo pikčast videz. Po 4 dneh gojenja so ti, za razliko od tistih v gojišču Czapek, še vedno prisotni in plavajoči. V tem obdobju opazovanja pa biofilmi SYM niso pokazali kakršnihkoli znakov propadanja. Ti izstopajo tudi po tem, da se z dolžino inkubacije njihova struktura in tekstura spreminja, tako da postaja površina vedno bolj hrapava in nagubana, medtem ko ostaja pri biofilmih Czapek površina vseskozi gladka, pri MSgg pa hrapava.



Slika 11: Makromorfološki razvoj biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih.
 Slikali smo po 5, 23, 46, 75, 97 h gojenja. Slike v levemu stolpcu pripadajo biofilmom SYM, v srednjem Czapek in v desnem MSgg.

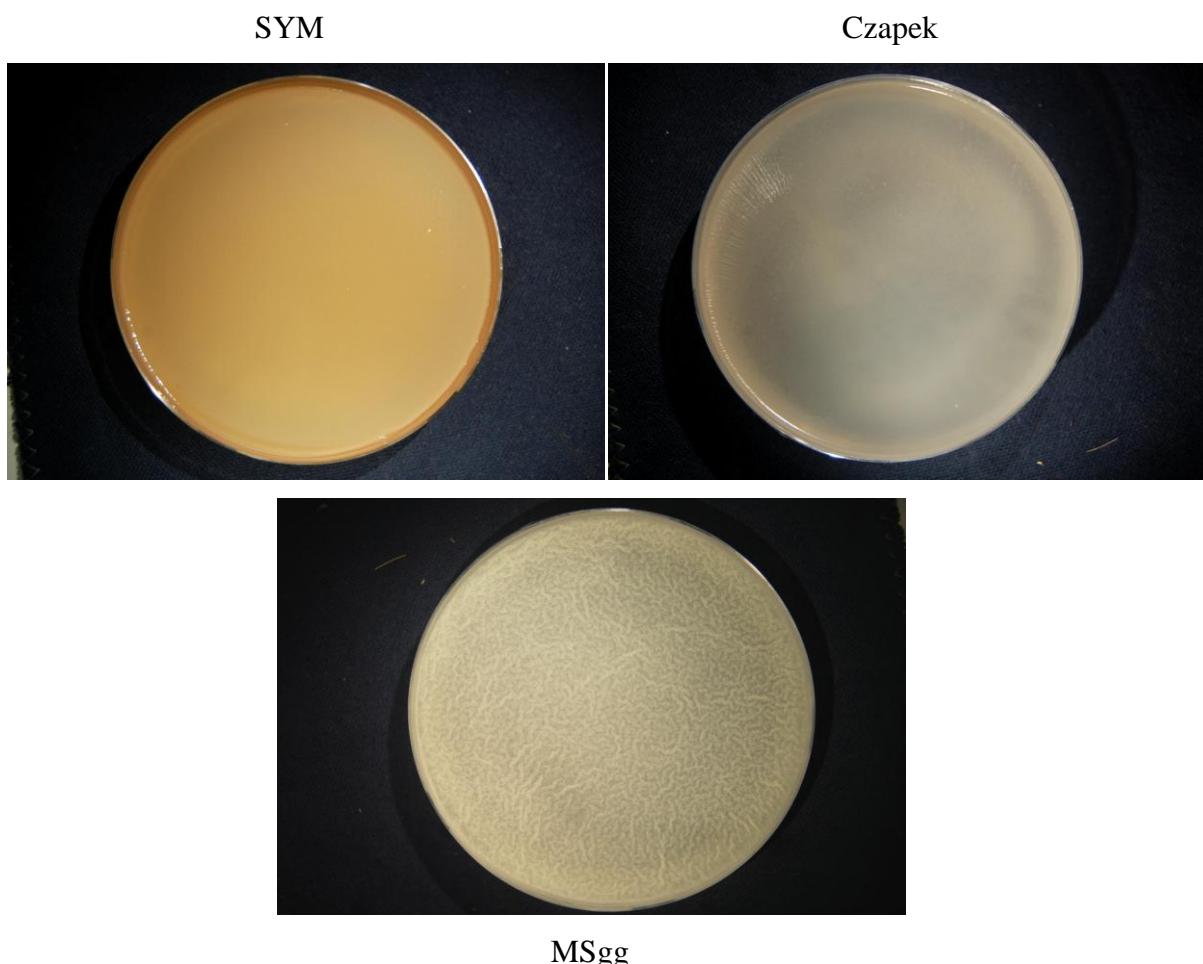
V biofilmih gojenih v gojiščih Czapek in MSgg smo po 46 h in 29 h gojenja opazili prve primere spor (slika 12), katerim je sledila popolna sporulacija po 75 h (Czapek) in po 46 h (MSgg) gojenja (priloga A). V gojišču SYM je sporulacija nastopila bistveno kasneje, saj po 4 dneh še ni bilo prisotnih spor, po 8 dneh pa so spore predstavljale že znaten delež.



Slika 12: Mikroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih ob pojavu spor. Tipični primeri endospor, locirani v celicah, so označeni z rdečo. Slika biofilmov, gojenih v gojišču MSgg in Czapek, je zajeta ob pojavu prvih spor, po 46 in 29 h gojenja. Pri biofilmih v SYM pa je slika zajeta po 8 dneh, ko so celice večinoma že sporulirale. Inkubacija je potekala pri 37 °C. Slike so posnete pri 100-kratni povečavi.

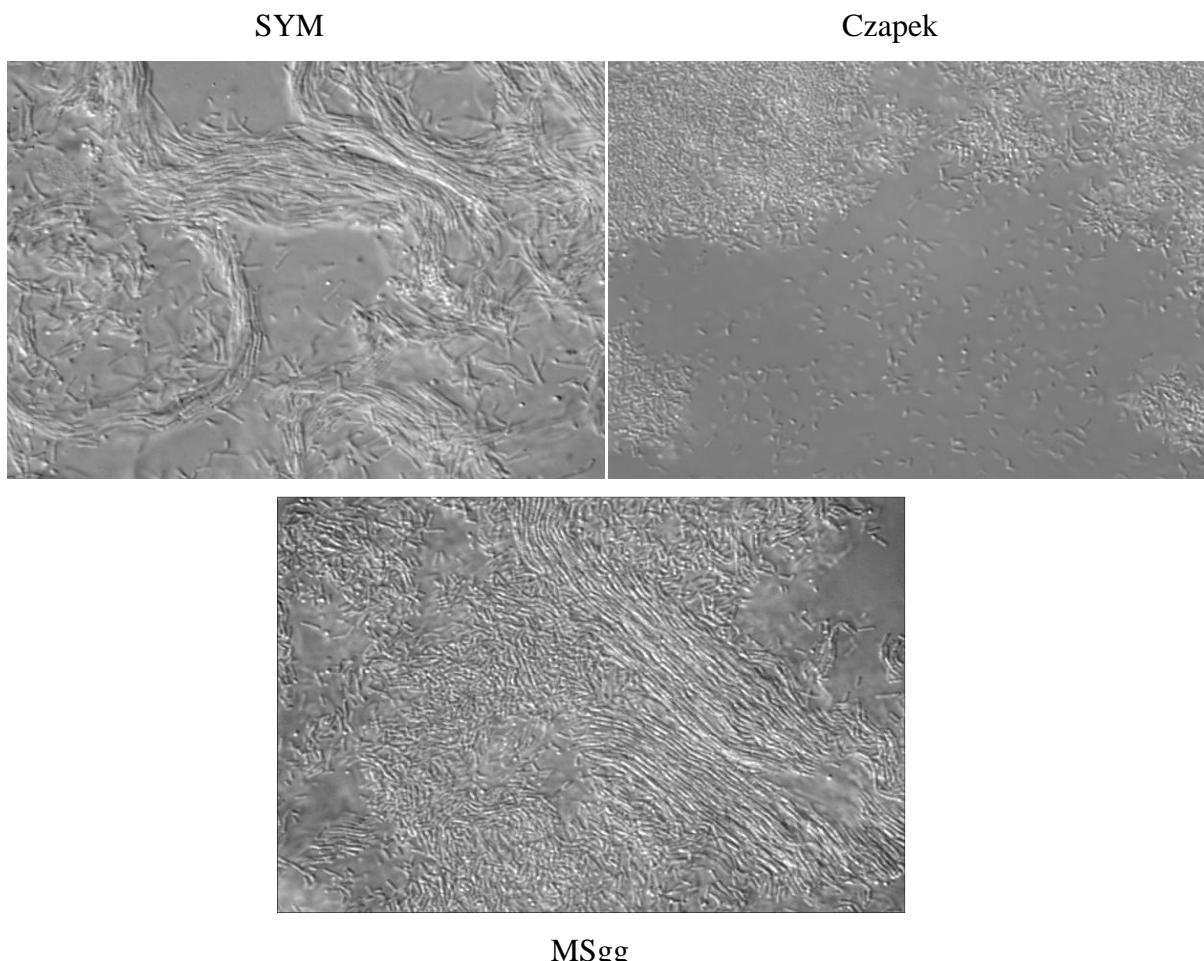
4.2 MAKROSKOPIJA IN MIKROSKOPIJA PO 24 h INKUBACIJI

Na sliki 12 so prikazani biofilmi bakterije *Bacillus subtilis*. Razvidno je, da se med sabo razlikujejo v barvi in teksturi. Biofilm SYM ima rjavu barvo, Czapek belo in MSgg rahlo rumeno. Slednji je edini, ki ima po 24 h gojenja nagubano in hrapavo površino, tako da daje videz prepletenosti z venami. Pri tem biofilmu ostane spodaj ležeče rabljeno gojišče bistro, kar ne velja za ostali dve gojišči.



Slika 13: Makroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih.
Biofilmi so gojeni v petrijevkah v tekočih gojiščih. Na vrhu je biofilm gojen v gojišču SYM, na sredini v Czapku in spodaj v gojišču MSgg.

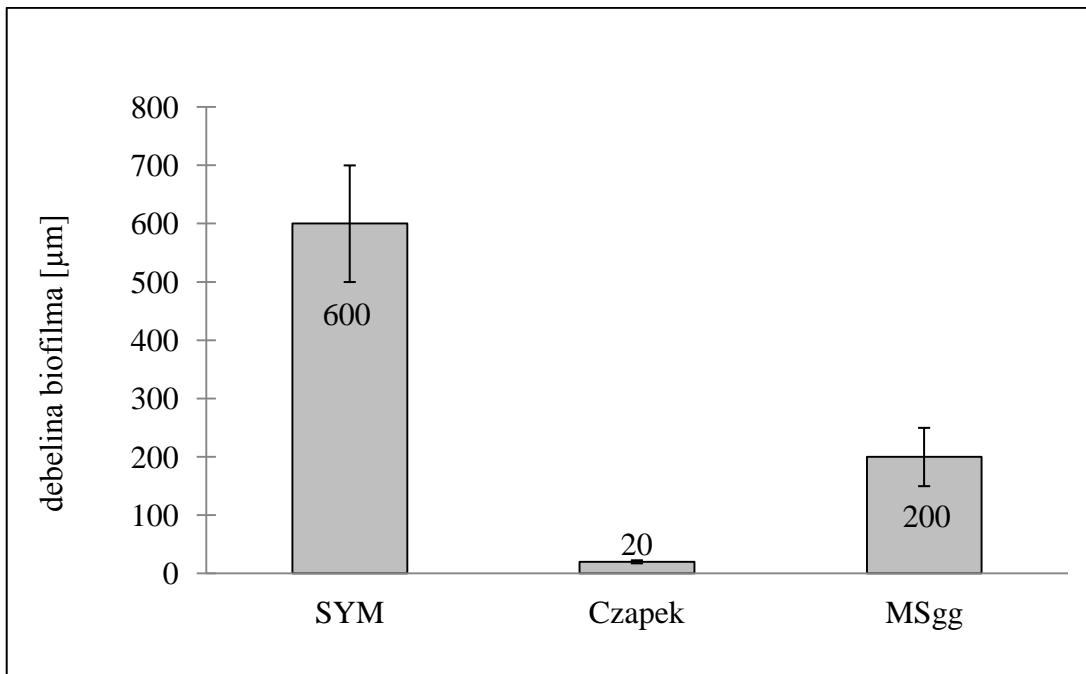
Razlike so opazne tudi na mikroskopskem nivoju (slika 13). Celice v biofilmih SYM in MSgg tvorijo dolge verige, ki so med sabo povezane v filamente in paralelno usmerjene. V biofilmih Czapek pa se celice ne povezujejo v verige in so krajše od tistih v ostalih dveh biofilmih. V kasnejših fazah, ob vstopu v sporulacijo, celice v biofilmih MSgg ne tvorijo več vzporedno urejenih filamentov in se začnejo krajsati, kar je opazno že po 29 h gojenja (priloga B). Prav tako celice v SYM po daljšem času gojenja prenehajo rasti filamentozno.



Slika 14: Mikroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Biofilmi so bili gojeni v mikrotiterskih ploščah v tekočih gojiščih SYM, Czapek in MSgg. Slike so narejene pri 100-kratni povečavi.

4.3 DEBELINA BIOFILMOV PO 24 h INKUBACIJI

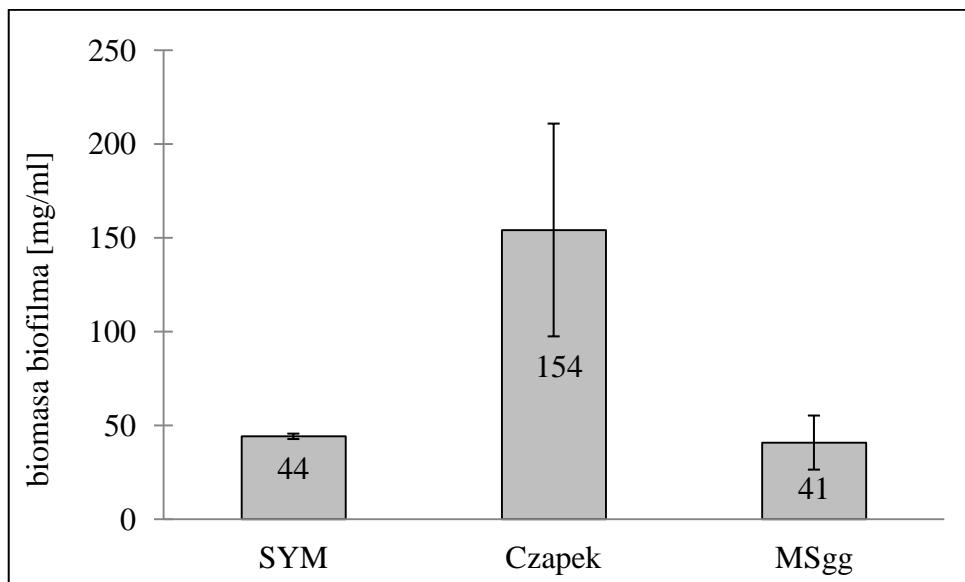
Ugotovili smo, da so biofilmi v SYM najdebelejši, v MSgg 3 krat tanjši, v gojišču Czapek pa celo 30-krat tanjši.



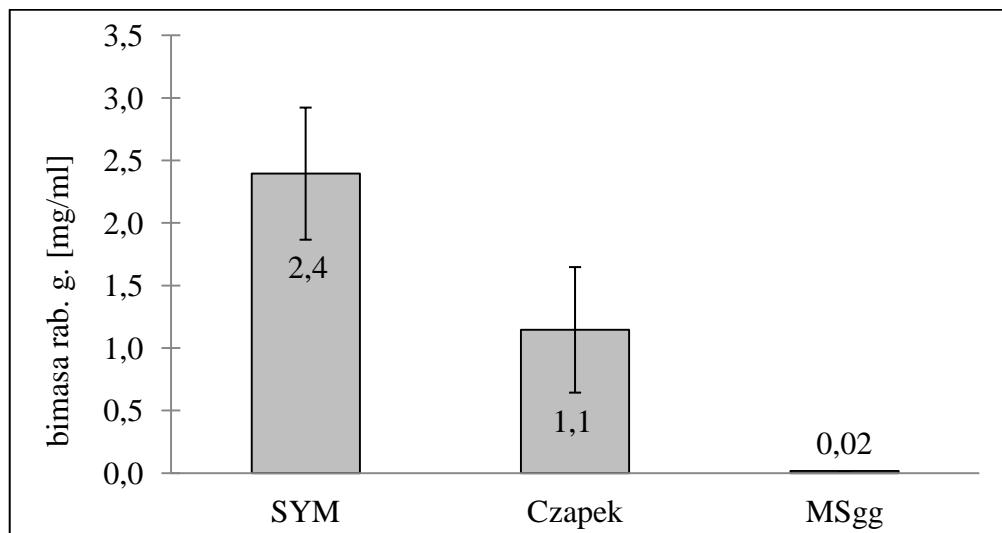
Slika 15: Debelina biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Debelina biofilmov Czapek je izmerjena z mikroskopom, medtem ko je pri ostalih dveh biofilmih ocenjena s pomočjo krovnih stekel. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.

4.4 VSEBNOST BIOMASE V BIOFILMU IN RABLJENEM GOJIŠČU PO 24 h INKUBACIJI

Vsebnost biomase (slika 16) v biofilmih SYM in MSgg se ne razlikuje, kljub temu da je suha biomasa (priloga D) prvih višja. To je posledica različnih volumnov biofilmov, ki rezultirajo iz različnih debelin. Biofilmi Czapek imajo v tem primeru, kljub najnižji celokupni suhi biomasi, signifikantno višjo vsebnost biomase, saj so njihovi volumni najmanjši. Razlike so vidne tudi pri rabljenih gojiščih (slika 17), kjer izstopa MSgg z najnižjimi vrednostmi.

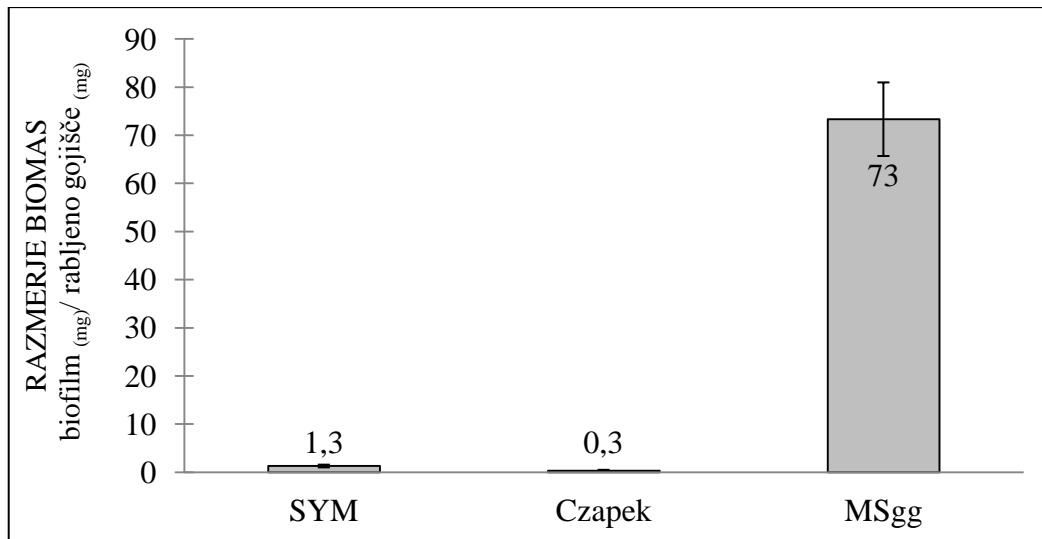


Slika 16: Vsebnost biomase v biofilmih bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Izračunana je iz celotne suhe biomase biofilma in njegovega volumna, ki je izračunan s pomočjo debeline. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



Slika 17: Vsebnost biomase v rabljenih gojiščih (rab.g.) biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Izračunana je iz celotne suhe biomase biofilma in njegovega volumna. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.

Prav tako prihaja do razlik v razmerju med suho biomaso celic v biofilmu in rabljenem gojišču (slika 18). Glede na to, da je biomasa rabljenega gojišča v vzorcih MSgg nizka in v biofilmu relativno visoka, je to razmerje tukaj signifikantno višje od ostalih dveh. V vzorcih Czapek je razmerje celo nižje od ena. Na prvi pogled se zdi ta trditev napačna, vendar je potrebno omeniti, da do razmerij nismo prišli preprosto z delitvijo vsebnosti biomase v biofilmu in gojišču, ampak smo jih izračunali iz suhih biomas celotnega biofilma in gojišča. Tako dobimo tukaj, kljub nižji biomasi v gojišču, nizko razmerje, saj znaša volumen biofilmov približno 0,13 ml, gojišč pa kar 55 ml.

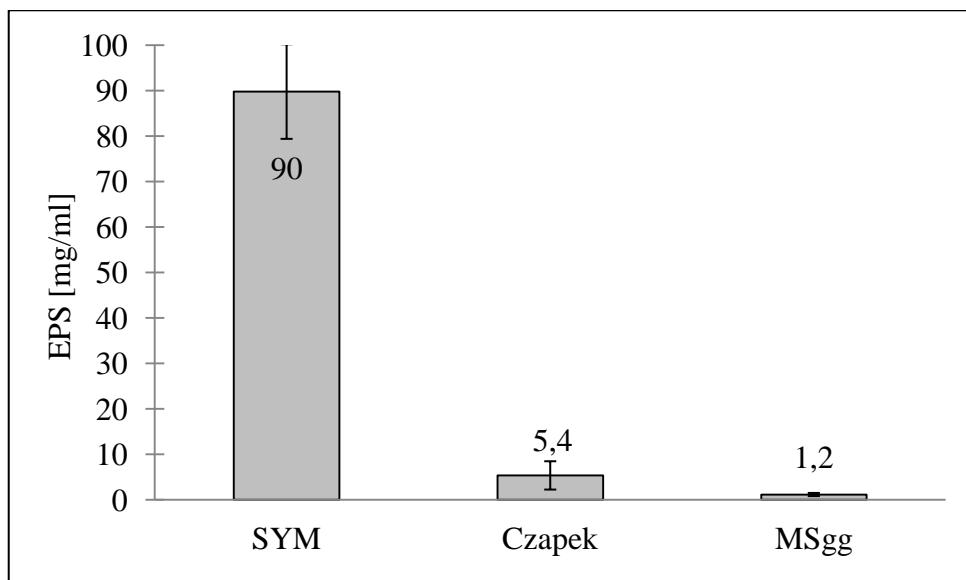


Slika 18: Razmerje med suho biomaso v biofilmu in rabljenem gojišču v vzorcih bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.

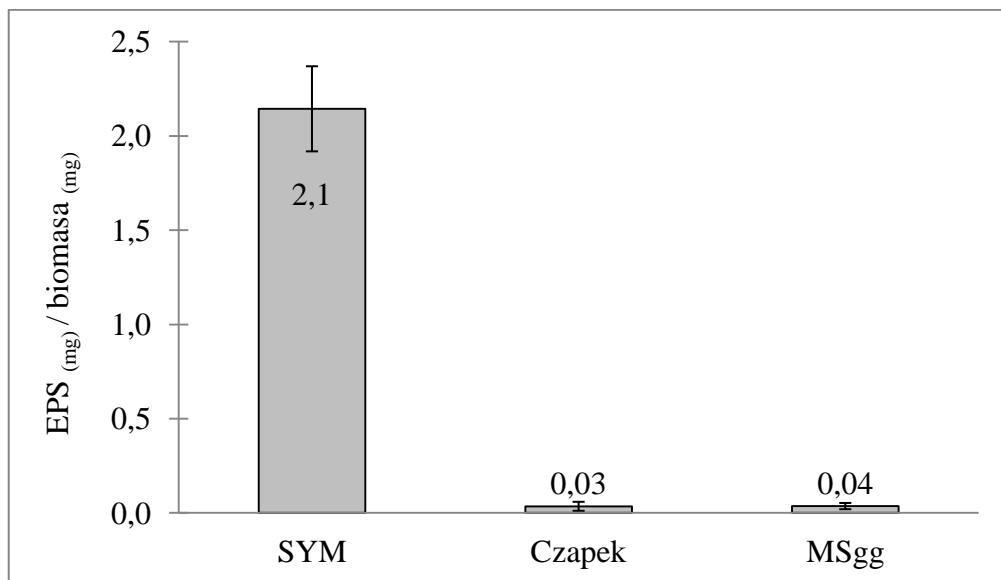
4.5 KONCENTRACIJA IN SESTAVA EPS V BIOFILMU PO 24 h INKUBACIJI

4.5.1 Producija EPS v biofilmih

Z namenom, da bi ocenili EPS produktivnost celic v biofilmu, smo določili koncentracijo EPS (slika 19) ter razmerje med maso EPS in celično biomaso (slika 20). Rezultati kažejo, da vzorci SYM izstopajo, saj sta koncentracija in razmerje signifikantno višja kot pri ostalih dveh.



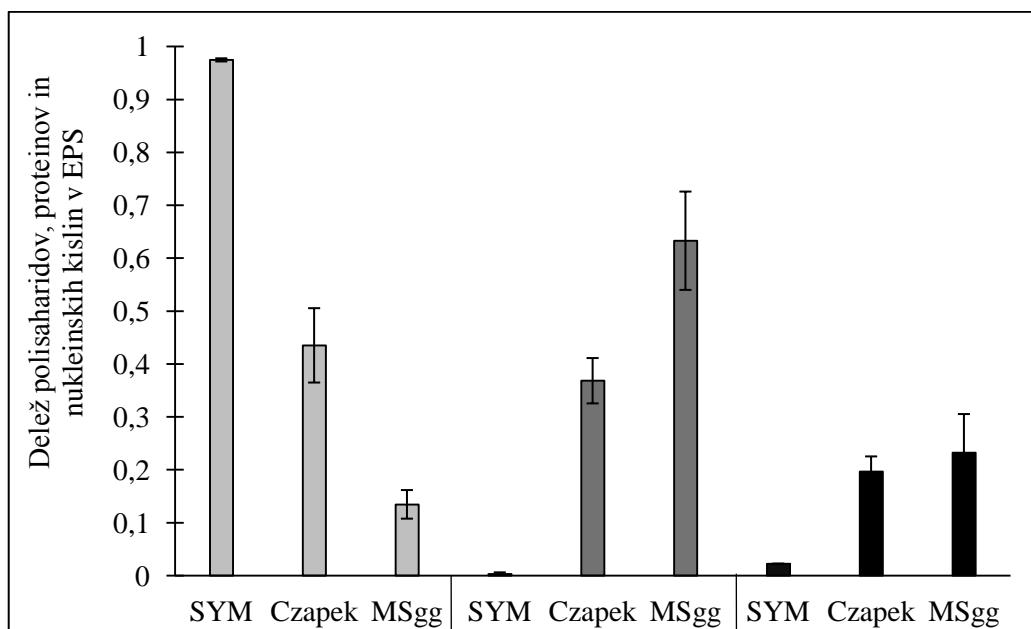
Slika 19: Koncentracija EPS v biofilmih bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih.
 Izračunana je iz suhe mase EPS v celotnem biofilmu in njegovega volumna, ki smo ga določili s pomočjo debeline. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



Slika 20: Razmerje med suho maso EPS in suho biomaso v biofilmih bakerije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Razmerje prikazuje EPS proizvodnjo celic v biofilmu. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.

4.5.2 Kemijska analiza EPS iz biofilmov

S kemijsko analizo vzorcev zunajceličnega polimernega materiala (EPS), izoliranega iz biofilmov, smo želeli ugotoviti, ali ima gojišče vpliv tudi na kemijsko sestavo EPS. Slika 21 prikazuje deleže proteinov, nukleinskih kislin in polisaharidov. Vidimo lahko, da je v vseh vzorcih najmanj nukleinskih kislin. Zunajcelični polimerni material v biofilmih SYM je v glavnem sestavljen iz sladkorjev. Nasprotno, je v MSgg teh najmanj, prevladujejo pa proteini. Tudi EPS iz biofilmov Czapek je poseben, saj ga sestavljajo proteini in polisaharidi v razmerju 1:1.



Slika 21: Kemijska analiza EPS iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih 24 h. Prikazani so delež polisaharidov (svetlo siva), proteinov (temno siva) in nukleinskih kislin (črna). Na delež polisaharidov, ki je določen z metodo celokupnih sladkorjev, vplivajo s slatkorno sestavino tudi nukleinske kisline, katerih delež smo odšteli. Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni.

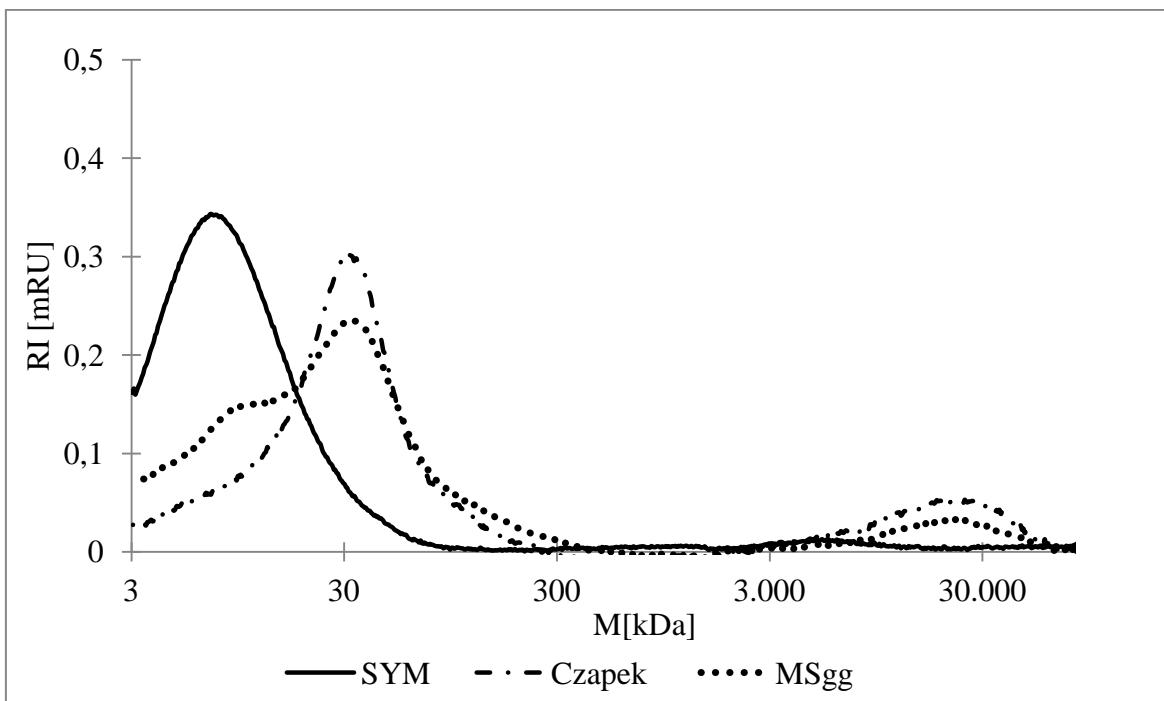
4.5.3 HPSEC analiza EPS iz biofilmov

HPSEC kromatogrami EPS (slika 22) izolirani iz biofilmov izraslih v treh gojiščih kažejo nekoliko drugačno razporeditev vrhov, kar je v skladu s predpostavko, da je molekularna sestava EPS v teh biofilmih različna.

Za posamezen kromatografski vrh smo tudi izračunali povprečno molsko maso, M_w (ang. *weight average molar mass*), po formuli $\sum N_i M_i^2 / \sum N_i M_i$, kjer M_i predstavlja molsko maso i-te sestavine in N_i število molekul z maso M_i . N_i je sorazmeren z razmerjem med višino RI signala in M_i . Na podlagi teh vrednosti smo kromatografske vrhove razporedili v štiri velikostna območja: 3-30, 31-300, 301-3000 in nad 6×10^3 kDa, in jim na podlagi signalov RI in UV pri valovni dolžini 260 nm in 280 nm določili kemijsko sestavo (slika 23).

EPS se med posamezni biofilmi razlikuje v številu vrhov in njihovih povprečnih molskih masah. Vrhovi z M_w okoli 6×10^3 kDa (SYM) in nad 15×10^3 kDa (Czapek, MSgg) spadajo v najvišje velikostno območje in so sestavljeni v glavnem iz polisaharidov ter nekaj proteinov. Na podlagi njihovih površin vidimo, da predstavljajo manjši delež v

zunajceličnem materialu. Vrhovi z nižjim Mw, ki spadajo v prvi dve velikostni območji, 3-30 in 31-300 kDa, se med sabo bolj razlikujejo in predstavljajo večinski delež EPS. Tu najdemo pri SYM in Czapek samo en vrh v prvem oz. drugem velikostnem območju. Iz slike 23 vidimo, da je pri SYM ta vrh sestavljen izključno iz polisaharidov, medtem ko pri vzorcih Czapek najdemo še enak delež proteinov. Pri MSgg se v vsakemu od prvih dveh velikostnih območij pojavlja en vrh sestavljen večinoma iz proteinov. Prvi vrh iz MSgg, z nižjim Mw, na kromatogramu sovpada z vrhom iz SYM, medtem ko drugi vrh iz MSgg, z višjim Mw, sovpada z vrhom Czapek (slika 22). Potrebno pa je izpostaviti, da se ta vrhova iz MSgg razlikujeta od vrhov iz SYM in Czapek po kemijski sestavi (slika 23).



Slika 22: HPSEC kromatogrami vzorcev EPS, izoliranih iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih 24 h. Krivulja iz polne črte pripada vzorcem SYM, krivulja iz pik MSgg ter krivulja iz črtic in pik vzorcem Czapek. Prikazani so reprezentativni kromatogrami od 3 kDa naprej.

Mw [kDa]	3-30	31-300	301-3000	> 6 x 10 ³
SYM	■			■
Czapek		■	■	
MSgg	■	■	■	

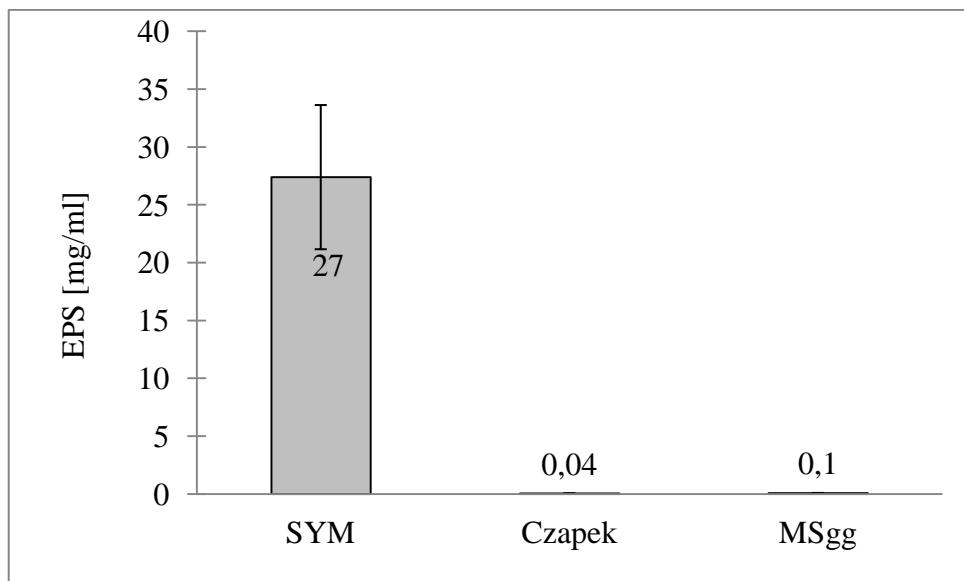
Slika 23: Analiza sestave posameznih kromatografskih vrhov, pridobljenih z analizo HPSEC vzorcev EPS, izoliranih iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazani so povprečni deleži polisaharidov (svetlo siva), nukleinskih kislin (črna) in proteinov (temno siva) v določenih vrhovih, ki so razvrščeni v velikostne razrede.

4.6 KONCENTRACIJA IN SESTAVA EPS V RABLJENIH GOJIŠČIH

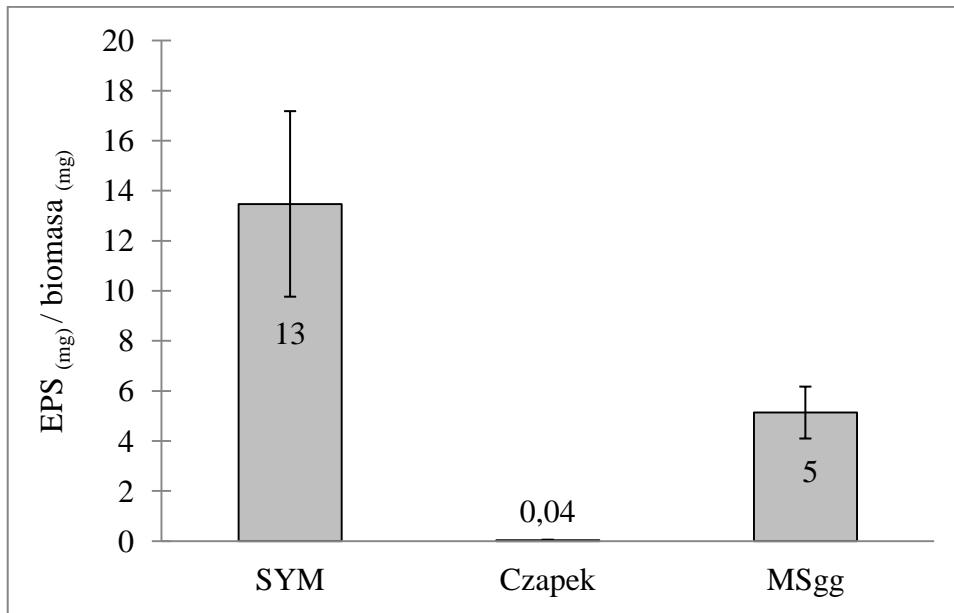
4.6.1 Producija EPS v rabljenih gojiščih

Kot v biofilmu nas je tudi v gojišču zanimala producija EPS, o kateri smo lahko sklepali s pomočjo njegove koncentracije v gojišču ter razmerja med suho maso EPS in suho biomaso v rabljenem gojišču.

Opazimo lahko, da je koncentracija EPS (slika 24) v rabljenem gojišču SYM najvišja in da je v gojišču Czapek skoraj 700-krat ter MSgg okoli 300-krat nižja. Razmerje med maso EPS in biomaso (slika 25) je še vedno najvišje v vzorcu SYM, vendar je tudi pri MSgg glede na samo maso EPS (priloga G) relativno visoko, kar je posledica nizke biomase v rabljenem gojišču.



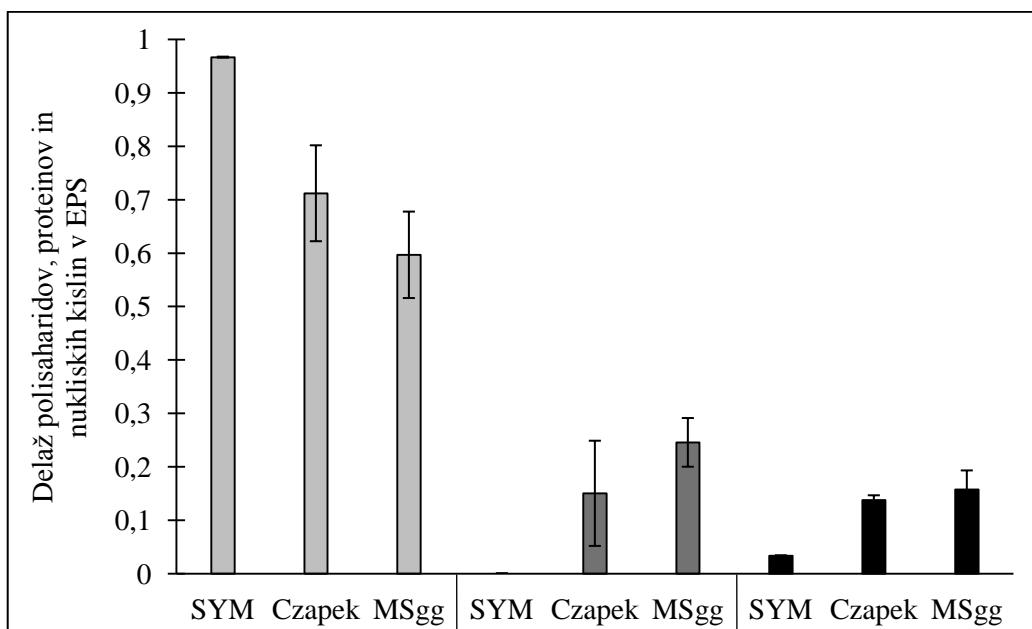
Slika 24: Koncentracija EPS v rabljenih gojiščih pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Izračunana je iz suhe mase EPS v celotnem gojišču in volumena gojišča. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



Slika 25: Razmerje med suho maso EPS in suho biomaso v rabljenih gojiščih pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Razmerje je mera za producijo posamezne celice v rabljenem gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.

4.6.2 Kemijska analiza EPS iz rabljenih gojišč

Kemijska analiza EPS v rabljenih gojiščih kaže, da v vseh treh primerih v zunajceličnem polimernem materialu prevladujejo polisaharidi. Deleži nukleinskih kislin, proteinov in polisaharidov so si podobni v vzorcih Czapek in MSgg, SYM pa edini ne vsebuje proteinov in zelo malo nukleinskih kislin.

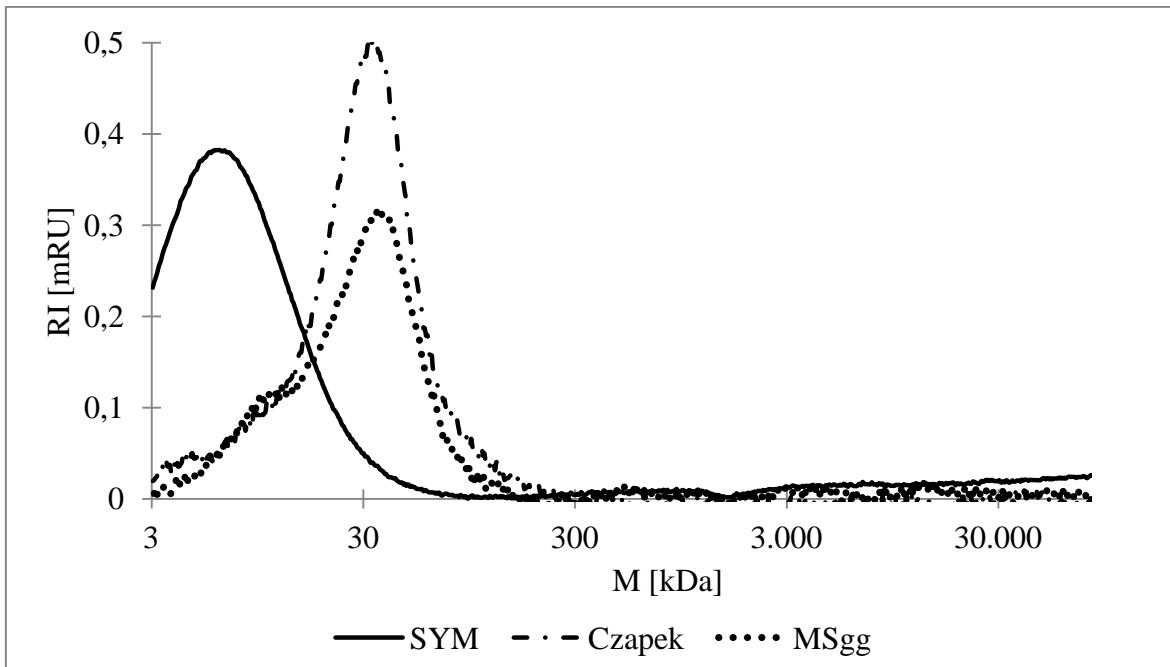


Slika 26: Kemijska analiza EPS iz rabljenih gojišč pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih 24 h. Prikazani so delež polisaharidov (svetlo siva), proteinov (temno siva) in nukleinskih kislin (črna). Na delež polisaharidov, ki je določen z metodo celokupnih sladkorjev, vplivajo s sladkorno sestavino tudi nukleinske kisline, katerih delež smo odšeli. Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni.

4.6.3 HPSEC analiza EPS iz rabljenih gojišč

Tudi tu smo kromatografskim vrhovom (slika 27) izračunali Mw in jih na podlagi teh vrednosti razporedili v primerno velikostno območje ter jim določili kemijsko sestavo (slika 28).

Kromatogrami vzorcev EPS rabljenih gojišč (slika 27) se, kot tisti iz biofilmov, med sabo razlikujejo. Kromatogram SYM vsebuje en vrh z Mw 9 kDa, ki je sestavljena le iz polisaharidov, medtem ko vrha MSgg in Czapek spadata v velikostni razred 31-300 kDa in sta v večini sestavljena iz polisaharidov in proteinov. Ta vrh je v vzorcih Czapek edini izrazitejši, medtem ko se v vzorcih MSgg pojavi še dodaten manjši vrh velikostnega razreda 3-30 kDa, ki je sestavljen le iz proteinov.



Slika 27: HPSEC kromatogrami vzorcev EPS, izoliranih iz rabljenih gojišč pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v različnih gojiščih 24 h. Krivulja iz polne črte pripada vzorcem SYM, krivulja iz pik MSgg ter krivulja črtic in pik vzorcem Czapek. Prikazani so reprezentativni kromatogrami od 3 kDa naprej.

Mw [kDa]	3-30	31-300	301-3000	>6 x 10 ³
SYM				
Czapek		█	█	
MSgg	█	█	█	

Slika 28: Analiza sestave posameznih kromatografskih vrhov, pridobljenih z analizo HPSEC vzorcev EPS, izoliranih iz rabljenih gojišč pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazani so povprečni deleži polisaharidov (svetlo siva), nukleinskih kislin (črna) in proteinov (temno siva) v določenih vrhovih, ki so razvrščeni v velikostne razrede.

4.7 TANKOPLASTNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

Fruktoza se na plošči TLC obarva rjavo. V skladu s tem je standard levana, za katerega vemo, da je polimer fruktoz, obarvan rjavo. S TLC smo pokazali, da je polisaharid v EPS iz SYM biofilmov fruktan.

TLC vzorcev MSgg in Czapek ni uspel, ker se EPS s 3 % TCA ni hidroliziral, kar kaže na prisotnost drugačnih polisaharidov, kot smo jih določili v SYM biofilmu (priloga H).



Slika 29: Tankoplastna tekočinska kromatografija EPS iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v gojišču SYM. Prikazana je plošča TLC. a: standardna raztopina mešanice sladkorjev; b-f: standard levana različnih koncentracij; g,h: EPS iz biofilmov SYM. Sladkorji standarda na plošči si od zgoraj navzdol sledijo: ramnoza, fruktoza, glukoza, lakoza in saharoza.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo želeli pokazati, da sestava gojišča vpliva na morfološke karakteristike in razvoj biofilmov ter na kemijsko sestavo EPS. Glede na to, da smo uporabili tri popolnoma različna gojišča, smo predvidevali, da razvoj biofilmov ne bo časovno usklajen. Zato smo ob pričetku raziskovanja za izolacijo EPS iz biofilmov in rabljenih gojišč določili najprimernejši čas trajanja inkubacije. Biofilme smo želeli ujeti v približno enaki fazi razvoja. Po približno 24 h gojenja so bili v vseh gojiščih biofilmi že razviti, kar je bil prvi indikator, da je 24 h primeren čas za odvzem vzorcev. Prav tako je takrat celična gostota vseh vzorcev, izmerjena z OD₆₅₀, dosegla maksimum.

Pri opazovanju morfologije (slika 12) smo ugotovili, da se vsi trije tipi biofilmov (biofilmi SYM, Czapek in MSgg) med sabo popolnoma razlikujejo v barvi, teksturi in debelini. Na mikroskopskem nivoju so bile te razlike manjše. V biofilmih SYM in MSgg smo opazili, da celice tvorijo filamente, ki so paralelno usmerjeni, kar se ujema z dognanji Branda in sod. (2001). Ti so prav tako opazili, da se ob pojavu sporulacije celice bistveno skrajšajo in niso več vzporedno usmerjene. Mi smo ta dogodek opazili bolj zgodaj in sicer v biofilmih MSgg v skladu s pojavom prvih spor, pri SYM pa veliko prej in popolnoma neodvisno od sporulacije. To nakazuje, da celice samo v mladih biofilmih tvorijo filamente, ki se kasneje skrajšajo in tesneje pakirajo. Zanimivo pa bakterije v biofilmih Czapek sploh ne tvorijo filamentov. Glede na to, da imajo ti biofilmi najkrajšo življenjsko dobo, se procesi v njih verjetno hitreje odvijajo. Možno pa je, da smo filamente spregledali, ker biofilmov nismo opazovali kontinuirano.

Pri spremeljanju razvoja biofilmov (slika 10) smo opazili, da se prvi znaki razvoja pokažejo najhitreje v gojišču SYM. Biofilmi, ki so zrastli v tem gojišču, so tudi najbolj vzdržljivi, saj ni bilo opaznih znakov propadanja niti po 4 dneh gojenja. K temu je najverjetneje prispevala obilica hrаниl, predvsem ogromne količine saharoze. Vsebnost celokupnega ogljika (TC) v tem gojišču znaša 85 g/l in celokupnega dušika (TN) 2,5 g/l, kar je bistveno več kot v ostalih dveh gojiščih. Biofilmi v gojišču Czapek so po drugi strani najbolj nestabilni in že po 97 h gojenja popolnoma propadejo. To je zanimivo, ker je to gojišče v primerjavi z MSgg relativno bogato, saj vsebuje 12 g/l TC in 0,5 g/l TN, medtem ko

znašajo te vrednosti v gojišču MSgg 4 in 0,5 g/l. Biofilmi v gojišču Czapek so tudi najtanjši in posledično najbolj krhki med tremi primerjanimi in v skladu s tem najhitreje propadejo. Na drugi strani imajo najdebelejši biofilmi, torej SYM, najdaljšo življenjsko dobo. Tu nastopi sporulacija najkasneje, v biofilmih MSgg pa celo hitreje kot Czapek. To lahko razložimo z nižjo vsebnostjo sladkorjev v MSgg gojišču. Shih in Labbé (1994) sta dokazala, da že zelo nizka vsebnost glukoze v gojišču zavre sporulacijo in da število spor pada z višanjem koncentracije katerega koli sladkorja v gojišču. Tako ni presenetljivo, da v gojišču SYM, ki vsebuje kar 20 % saharoze, ki s pomočjo levansukraze v gojišču razpada na glukozo in fruktozo (Shida in sod., 2002), biofilmi sporulirajo najkasneje. Po drugi strani biofilmi MSgg sporulirajo najhitreje, saj to gojišče sploh ne vsebuje sladkorja temveč so vir C glicerol in aminokisline.

Biofilmi SYM vsebujejo tudi največ suhe biomase (priloga D), vendar je njena vsebnost (slika 16) relativno nizka v primerjavi z biofilmi Czapek, ki vsebujejo najmanjšo, toda najbolj skoncentrirano biomaso. Celice v biofilmih SYM so najproduktivnejše in proizvedejo največ EPS, saj je njegova koncentracija (slika 18) in tudi suha masa (priloga F) v primerjavi z ostalima dvema biofilmoma najvišja. Prav tako je razmerje med suho maso EPS in suho biomaso samo v primeru biofilma SYM v prid EPS. To se sklada z ugotovitvami, da je EPS produkcija višja, kadar je v gojišču na voljo več sladkorja (Flemming in Wingedner, 2001a; Looijesteijn in sod., 1999). Tako medcelični prostor v SYM biofilmu zapolnjuje zunajcelični material in posledično celice niso tako tesno pakirane. Poleg tega tudi ti rezultati pojasnjujejo, zakaj so ti biofilmi najdebelejši in najbolj vzdržljivi, saj ima EPS, kot omenjeno, ključno vlogo pri vzdrževanju oblike biofilma, njegove integritete in pri povečani odpornosti celic proti okoljskemu stresu (Branda in sod., 2005; Czaczik in Myszka, 2007; Van Houdt in Michiels, 2005).

Vpliv gojišča je očiten tudi na nivoju razmerja med biomaso biofilma in rabljenim gojiščem. Gojišče SYM podpira tvorbo biofilmov in rast planktonskih celic, MSgg močno favorizira le tvorbo biofilmov in v gojišču Czapek tvorba biofilmov ni tako dobro podprta, tako da se bakterije raje zadržujejo v gojišču, zato so tu biofilmi tanki in krhki.

S pomočjo kemijskih analiz smo primerjali kemijsko sestavo izoliranega EPS iz biofilmov (slika 21) in rabljenih gojišč (slika 26). V EPS iz biofilmov so v vseh primerih najmanj

zastopane nukleinske kisline. V biofilmu SYM in MSgg izrazito prevladuje ena sestavina, polisaharidi (SYM) oz. proteini (MSgg), v biofilmih Czapek pa sta ti dve sestavini zastopani v razmerju 1:1. Analiza HPSEC (slika 22 in 23) je potrdila razlike med EPS različnih biofilmov. Ti se med sabo v glavnem razlikujejo v polimerih z nižjim Mw, 3-300 kDa. Skupno vsem pa je, da polimere z visokim Mw, nad 6×10^3 kDa, predstavljajo polisaharidi, ki so sicer zastopani v manjši meri. V rabljenih gojiščih v vseh treh primerih prevladujejo polisaharidi. Tu najbolj izstopa EPS izoliran iz SYM, v katerem je zelo malo nukleinskih kislin, medtem ko proteinov nismo zaznali. V rabljenih gojiščih Czapek in MSgg je poleg polisaharidov še okoli 15 % nukleinskih kislin in 20 % proteinov. V splošnem se EPS v teh dveh rabljenih gojiščih ne razlikuje signifikantno. Analiza HPSEC je pokazala, da v rabljenih gojiščih nastajajo le zunajcelični polimeri, ki spadajo v prva dva velikostna razreda in se med sabo razlikujejo po kemijski identiteti in molski masi. Tako smo s kemijskimi analizami in analizo HPSEC pokazali, da gojišče vpliva na sintezo EPS v biofilmih in rabljenih gojiščih, saj se ta razlikuje v vsebnosti polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin ter v velikosti teh polimerov. Prav tako tudi opazimo, da se v nasprotju s pričakovanji EPS v rabljenih gojiščih razlikuje od tistega v biofilmu. To se zgodi predvsem zaradi odsotnosti polimerov z Mw nad 6×10^3 kDa v rabljenih gojiščih, ostali polimeri so si v biofilmu in rabljenem gojišču podobni. Poleg tega v rabljenem gojišču v splošnem prevladujejo zunajcelični polisaharidi, kar za biofilme ne moremo trditi.

Rezultati HPSEC analize zunajceličnega materiala v biofilmu (slika 22) so primerljivi s kemijskimi (slika 20). V obeh analizah EPS v biofilmih SYM sestavlja pretežno polisaharidi. Če gledamo analizo sestave posameznih vrhov kromatogramov (slika 22), vidimo, da je ta v biofilmih MSgg sestavljen v glavnem iz proteinov, kar nam poda tudi kemijska analiza. Tu lahko prav tako opazimo, da tretji vrh predstavlja polisaharidi, vendar je ta frakcija proti prvima proteinskima relativno majhna. Podobno velja tudi za vzorec EPS iz biofilmov Czapek, tretja frakcija polisaharidov je relativno majhna proti ostalima. Po kemijskih analizah je ta material v glavnem sestavljen iz proteinov in polisaharidov v razmerju 1:1 ter nekaj nukleinskih kislin. S HPSEC analizo smo zaznali le proteine in polisaharide. Odstopanja lahko razložimo z dejstvom, da smo v HPSEC analizi upoštevali le polimerne molekule ($Mw > 3\text{kDa}$) in nukleinske kisline, ki smo jih zaznali s metodo HPSEC, niso zadoščale temu pogoju. Prav tako je pri vzorcih EPS iz rabljenih

gojišč HPSEC analiza (slika 27) v grobem skladna s kemijsko (slika 25). Obakrat je vzorec SYM sestavljen v glavnem le iz polisaharidov, ostala dva vzorca pa poleg teh sestavljajo tudi proteini. Tudi tu se v vzorcih MSgg in Czapek s HPSEC analizo ne pokažejo nukleinske kisline.

Na podlagi objavljenih rezultatov in naših rezultatov HPSEC in TLC je mogoče sklepati o kemični sestavi EPS. Znano je, da v stresanem gojišču SYM nekateri sevi bakterije *B. subtilis* proizvajajo levan z molsko maso 11 in 1794 kDa (Shih in sod., 2005). Pričakujemo lahko, da to velja tudi za sev *B. subtilis* 3610, saj ima v svojem genomu zapis za encima levanazo in levansukrazo. V SYM biofilmih in tudi v rabljenih gojiščih smo izolirali polisaharid z Mw 11 oz. 9 kDa, kar v grobem ustreza manjši frakciji levana iz raziskave Shih in sod. (2005). Analiza TLC je pokazala, da je ta polisaharid sestavljen izključno iz fruktoze, kar potrjuje hipotezo, da gre najverjetneje za levan. TLC analiza EPS iz vzorcev Czapek in MSgg ni uspela, saj hidroliza polisaharidov s 3 % TCA ni potekla. Iz tega lahko zaključimo, da je v EPS iz vzorcev Czapek in MSgg drugačen polisaharid kot v vzorcih SYM. V raziskavah opravljenih na plavajočih biofilmih bakterije *B. subtilis* 3610, v gojišču MSgg ugotavljajo, da je protein TasA (31 kDa), poleg polisaharidov, ki jih sintetizirajo encimi, zapisani na operonu *epsA-O*, glavna sestavina biofilmov (Branda in sod., 2006; Stover in Driks, 1999). Za TasA je tudi značilno, da ga v rabljenem gojišču ne najdemo (Branda in sod., 2006). V naši raziskavi smo pokazali, da matriks biofilma MSgg vsebuje v glavnem le proteine z Mp (ang. *peak molecular weight*) okoli 30 kDa ter zelo malo polisaharidov (Mw nad 15×10^3 kDa), pri čemer je delež prvih v rabljenem gojišču bistveno nižji, kar je skladno z ugotovitvam raziskave Branda in sod. (2006). Na osnovi kemijske analize EPS izoliranega iz biofilmov in rabljenih gojišč gojišča Czapek lahko pridemo do podobnih zaključkov kot pri vzorcih MSgg. V biofilmu se polisaharidi in proteini nahajajo v razmerju 1:1, v rabljenem gojišču pa je manj zunajceličnih proteinov in več polisaharidov. Prav tako kot v biofilmih MSgg tudi v bifilmih Czapek analiza EPS s HPSEC pokaže, da frakcijo proteinov sestavljajo proteini z Mp okoli 30 kDa, kar kaže na prisotnost TasA. Podobno frakcijo zasledimo tudi v biofilmih SYM. Celokupna masa EPS v biofilmu SYM (priloga F) je 100-400 krat višja kot v biofilmu Czapek in MSgg. Če deleže proteinov preračunamo v mase vidimo, da je le teh v biofilmu SYM približno enako

kot v ostalih dveh biofilmih, le da so zasenčeni zaradi velikih količin polisaharidov. V nasprotnem pa proteinov v rabljenih gojiščih SYM nismo zaznali.

Ugotovitev Branda in sod. (2006), da sta najbolj zastopani sestavini EPS v biofilmu *B. subtilis* protein TasA in polisaharid, sintetiziran s strani encimov, zapisanih na operonu *epsA-O*, ne velja univerzalno. V biofilmih SYM je najbolj zastopana sestavina fruktan, v biofilmih Czapek pa imajo nukleinske kisline, sicer manjši, a še vedno znaten delež.

5.2 SKLEPI

- Gojišče vpliva na morfologijo biofilmov in na kemijsko sestavo EPS v biofilmih in rabljenih gojiščih, saj se biofilmi razlikujejo po nagubanosti, pigmentaciji ter debelini. Tako smo potrdili del prve in drugo hipotezo.
- Gojišče vpliva na dinamiko razvoja in propad biofilmov, s čimer smo potrdili ostali del prve hipoteze.
- V nasprotju s tretjo hipotezo pa je v istem gojišču delež polisaharidov v EPS biofilmov nižji kot v EPS spodaj ležečih rabljenih gojišč.
- V bogatem gojišču SYM, ki vsebuje najvišje vrednosti TC in TN v primerjavi z gojišči MSgg in Czapek, se oblikujejo najdebelejši in najbolj vzdržljivi biofilmi, katerih biomasa in tudi masa EPS je največja.
- *B. subtilis* 3610 v rabljenih gojiščih in plavajočih biofilmih SYM proizvaja fruktan, ki je najverjetneje polisaharid levan.
- V biofilmih vseh treh gojišč najdemo proteine, ki po velikosti ustrezajo proteinu TasA.
- Ugotovitev Branda in sod. (2006), da sta najbolj zastopani sestavini EPS v biofilmu TasA in polisaharid, zapisan na operonu *epsA-O*, ne velja v splošnem za vse biofilme.

6 POVZETEK

Večina bakterij tvori mnogocelične kompleksne strukture poimenovane biofilmi. Tvorijo jih na trdnih površinah, sluznicah in na interfazi voda-zrak. Bistvenega pomena za nastanek in integriteto teh struktur je EPS, ki omogoča adhezijo celic na površine in njihovo kohezijo.

V diplomski nalogi smo preučevali vpliv gojišča na morfologijo biofilmov in kemijsko sestavo EPS bakterije *Bacillus subtilis* 3610. Da bi bil ta čim bolj opazen, smo biofilme gojili v treh popolnoma različnih tekočih gojiščih, SYM, Czapek in MSgg, ki se med sabo bistveno razlikujejo v količini in vrsti vira ogljika ter vsebnosti drugih hranil. Med tremi predstavlja gojišče SYM najbogatejše in MSgg najrevnejše gojišče.

Spremljali smo razvoj in morfologijo biofilmov ter določili deleže polisaharidov, nukleinskih kislin in proteinov v materialu EPS, izoliranem iz biofilmov in rabljenih gojišč. Po 24 h gojenja so stoječe kulture (biofilm in spodaj ležeče rabljeno gojišče) dosegle maksimalno celično gostoto in biofilmi so bili že popolnoma razviti, zato smo takrat inkubacijo prekinili in izolirali EPS. Ugotovili smo, da imajo biofilmi različno morfologijo, ki se pokaže na makroskopskem in mikroskopskem nivoju. Prav tako smo ugotovili, da biofilmi SYM najbolj izstopajo, saj so najdebelejši, najbolj vzdržljivi, v njih se celice najbolj namnožijo in proizvedejo največ zunajceličnega materiala. Poleg različne morfologije smo opazili v biofilmih tudi različno sestavo EPS. V biofilmu SYM v EPS prevladuje polisaharidna frakcija, ki predstavlja, glede na rezultate metode TLC, po vsej verjetnosti levan. V biofilmu MSgg prevladuje protein, za katerega, glede na njegovo velikost in predhodne raziskave predvidevamo, da je TasA. V biofilmu Czapek so polisaharidi in proteini prisotni v medsebojnem razmerjem 1:1. V nasprotju z našimi pričakovanji pa smo v gojiščih MSgg in Czapek opazili, da se EPS iz biofilmov in rabljenih gojišč razlikuje, saj slednji vsebuje več polisaharidov. In sicer se EPS razlikuje po kemijski sestavi ter številu, velikosti in poziciji vrhov, ki jih zaznamo z HPSEC analizo. Na primer, v vseh treh rabljenih gojiščih ne zasledimo frakcije polisaharidov z Mw nad 6×10^3 kDa.

7 VIRI

- Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. Current Opinion in Microbiology, 10: 638-643
- Bai U., Mandic-Mulec I., Smith I. 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. Genes and Development, 7: 139-148
- Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, 134, 1: 307-319
- Banik R.M., Kanari B., Upadhyay S.N. 2000. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16: 407-414
- Beloin C., Ghigo J.M. 2005. Finding gene expression patterns in bacterial biofilms. Trends in Microbiology, 13, 1: 16-19
- Bezzate S., Aymerich S., Chambert R., Czarnes S., Berge O., Heulin T. 2000. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. Environmental Microbiology, 2, 3: 333-342
- Branda S.S., Gonzalez-Pastor J.E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. Proceedings of National Academy for Science of the United States of America, 98, 20: 11621-11626
- Branda S.S., Gonzalez-Pastor J.E., Dervyn E., Ehrlich S.D., Losick R., Kolter R. 2004. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 186, 12: 3970-3979
- Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology, 13, 1: 20-26
- 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
- Briandet R., Leriche V., Carpenter B., Bellon-Fontaine M.N. 1999. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. Journal of Food Protection, 62, 9: 994-998
- Calazans G.M.T., Lima R.C., de França F.P., Lopes C.E. 2000 Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. International Journal of Biological Macromolecules, 27, 4: 245-247

- Casula G., Cutting S.M. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2344-2352
- Cazorla F.M., Romero D., Pérez-García A., Lugtenberg B.J.J., de Vicente A., Bloemberg G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1950-1959
- Chagneau C., Saier M.H.Jr. 2004. Biofilm-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 8: 177-188
- Chai Y., Chu F., Kolter R., Losick R. 2008. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 67, 2: 254-263
- Chu F., Kearns D.B, Branda S.S., Kolter R., Losick R. 2006. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 59, 4: 1216-1228
- Claverys J.P., Havarstein L.S. 2007. Cannibalism and fratricide: Mechanisms and reasons d'etre. *Nature Reviews: Microbiology*, 5: 219-229
- Cohn F.E. 1872. Utersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1: 124-224
- Cuesta G., Suarez N., Bessio M.I., Ferreira F., Massaldi H. 2003. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 69-73
- Czaczzyk K., Myszka K. 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 6: 799-806
- Dogsa I., Štrancar J., Laggner P., Stopar D. 2008. Efficient modeling of polysaccharide conformations based on Small-Angle X-ray Scattering experimental data. *Polymer*, 49: 1398-1406
- Drenkard E., Ausubel F. M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416: 740-743
- Driks A. 2011. Tapping into the biofilm: insights into assembly and disassembly of a novel amyloid fibres in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 80, 5: 1133-1136
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 395-424

- Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2: 155-166
- Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 6: 269-275
- Ebskamp M.J., van der Meer I.M., Spronk B.A., Weisbeek P.J., Smeekens S.C. 1994 Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Biotechnology*, 12, 3: 272-275
- Ellermeier C.D., Hobbs E.C., Gonzalez-Pastor J.E., Losick R. 2006. A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell*, 124: 549-559
- Flemming H.C., Wingedner J. 2001a. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43, 6: 1-8
- Flemming H.C., Wingedner J. 2001b. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology*, 43, 6: 9-16
- Fujita M., Gonzalez-Pastor J.E., Losick R. 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187, 4: 1357-1368
- Fujita M., Losick R. 2005. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes and Development*, 19: 2236-2244
- Gandhi H.P., Ray R.M., Patel R.M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate Polymers*, 34: 323-327
- Han Y.W. 1990. Microbial levan. *Advances in Applied Microbiology*, 35: 171-94. Cit. po Shih I.L., Yu Y.T., Shieh C.J., Hsieh C.Y. 2005. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 21: 8211-8215
- Hitchens A.D., Kahn A.J., Slepecky R.A. 1968. Interference contrast and phase contrast microscopy of sporulation and germination of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 96, 5: 1811-1817
- Inatsu Y., Nakamura N., Yuriko Y., Fushimi T., Watanasirithum L., Kawamoto S. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 3: 237-242
- 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

- Jiang M., Shao W., Perego M., Hoch J.A. 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 38, 3: 535-542
- Lee J.W., Yeomans W.G., Allen A.L., Deng F., Gross R.A., Kaplan D.L. 1999. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 12: 5262-5271
- 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
- Li X.G., Cao H.B., Wu J.C., Zhong F.L., Yu K.T. 2002. Enhanced extraction of extracellular polymeric substances from biofilms by alternating current. Biotechnology Letters, 24: 619-621
- Liu Y., Tai J.H. 2001. Detachment forces and their influence on structure and metabolic behavior of biofilms. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17: 111-117
- Looijesteijn P.J., Boels I.C., Kleerebezem M., Hugenh Oltz J. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cemoris* by the sugar source. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 5003-5008
- López D., Fischbach M.A., Chu F., Losick R., Kolter R. 2009a. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. Proceedings of National Academy for Science of the United States of America, 106, 1: 280-285
- López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009b. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 74, 3: 609-618
- López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009c. Paracrine signaling in a bacterium. Genes and Development, 23: 1631-1638
- López D., Vlamakis H., Kolter R. 2010. Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2: 1-8
- Lory S. 1992. Determinants of extracellular protein secretion in Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology, 174, 11: 3423-3428
- Marvasti M., Visscher P. T., Casillas Martinez L. 2010. Exopolymeric Substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. FEMS Microbiology Letters, 13, 1: 1-9

- Morita N., Takagi M., Murao S. 1979. A new gel-forming polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* FT-3 its structure and its physical and chemical characteristics. Bulletin of University of Osaka Prefecture, Series B, 31: 27-41
- Morita N., Matsumoto S., Takagi M. 1982. Rheological properties of aqueous solutions of *Bacillus subtilis* FT-3 polysaccharide. Bulletin of University of Osaka Prefecture, Series B, 34: 57-66
- Muro A.C., Rodriguez E., Abate C.M., Siiqeriz F. 1999. Identification in TLC of fructose and fructosyl derivatives in levan and sugar mixtures with resorcinol and thiourea. Folia Microbiologica, 44, 6: 647-649
- Nakano M.M., Zuber P. 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). Annual Review of Microbiology, 52: 165-190
- Oliveira R., Marques F., Azeredo J. 1999. Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. Biotechnology Techniques, 13: 391-393
- Omoike A., Chorover J. 2006. Adsorption to goethite of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 70: 827–838
- Petersen F.C., Tao L., Scheie A.A. 2005. DNA binding uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. Journal of Bacteriology, 187, 13: 4392-4400
- Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2009. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. Proceedings of National Academy for Science of the United States of America, 107, 5: 2230-2234
- Romero D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2011. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. Molecular Microbiology, 80, 5: 1155-1168
- Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D. 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. Process Biochemistry, 38, 6: 909-914
- Sauer K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biology, 4, 6: 219.1-219.5
- Shida T., Mukaijo K., Ishikawa S., Yamamoto H., Sekiguchi J. 2002. Production of long-chain levan by a sacC insertion mutant from *Bacillus subtilis* 327UH. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66, 7: 1555-1558
- Shih N.J., Labbé R.G. 1994. Effect of glucose on sporulation and extracellular amylase production by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. Current Microbiology, 29, 3: 163-169

- Shih I.L., Yu Y.T., Shieh C.J., Hsieh C.Y. 2005. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 21: 8211-8215
- Shih I.L., Chen L.D., Wu J.Y. 2010. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. Carbohydrate Polymers, 82: 111-117
- Shu C.H., Lung M.Y. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. Process Biochemistry, 39, 8: 931-937
- Spoering A.L., Gilmore M.S. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Current Opinion in Microbiology, 9: 133-137
- Stewart P.S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International Journal of Medical Microbiology, 292, 2: 107-113
- Stewart P.S., Franklin M.J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. Nature Reviews: Microbiology, 6: 199-210
- Stover A., Driks A., 1999. Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. Journal of Bacteriology, 181, 5: 1664-1672
- Stredansky M., Conti E. 1999. Xanthan production by solid state fermentation. Process Biochemistry, 34: 581-587
- Sutherland I.W. 2001a. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology, 9, 5: 222-227
- Sutherland I.W. 2001b. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. International Dairy Journal, 11: 663-874
- Tam N.K., Uyen N.Q., Hong H.A., Duc le H., Hoa T.T., Serra C.R., Henriques A.O., Cutting S.M. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. Journal of Bacteriology, 188, 7: 2692-2700
- Tjalsma H., Stover A., Driks A., Venema G., Bron S., van Dijl J. M. 2000. Conserved serine and histidine residues are critical for activity of the ER-type signal peptidase SipW of *Bacillus subtilis*. Journal of Biological Chemistry, 275, 33: 25102-25108
- Van Houdt R., Michiels C.W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Research in Microbiology, 156: 626-633

Veening J.W., Kuipers O.P., Brul S., Hellingwerf K.J., Kort R. 2006. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 8: 3099-3109

Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes and Development*, 22: 945-953

Wanker E., Huber A., Schwab H. 1995. Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 5: 1953-1958

Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Raga S.P.C., Mattick J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295: 1487-1487

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec za prijaznost in zanesljivost ter za vse strokovne nasvete in hiter pregled diplome. Hvala za vso podporo.

Posebna zahvala gre delovnemu mentorju dr. Iztok Dogši za organizacijo eksperimentalnega dela. Iskrena hvala za stalne napotke, spodbudo, razumevanje in podporo tudi v trenutkih, ki niso bili del dela.

Prof. dr Juretu Stojanu se zahvaljujem za izjemno hiter, temeljit in kritičen pregled diplomske naloge.

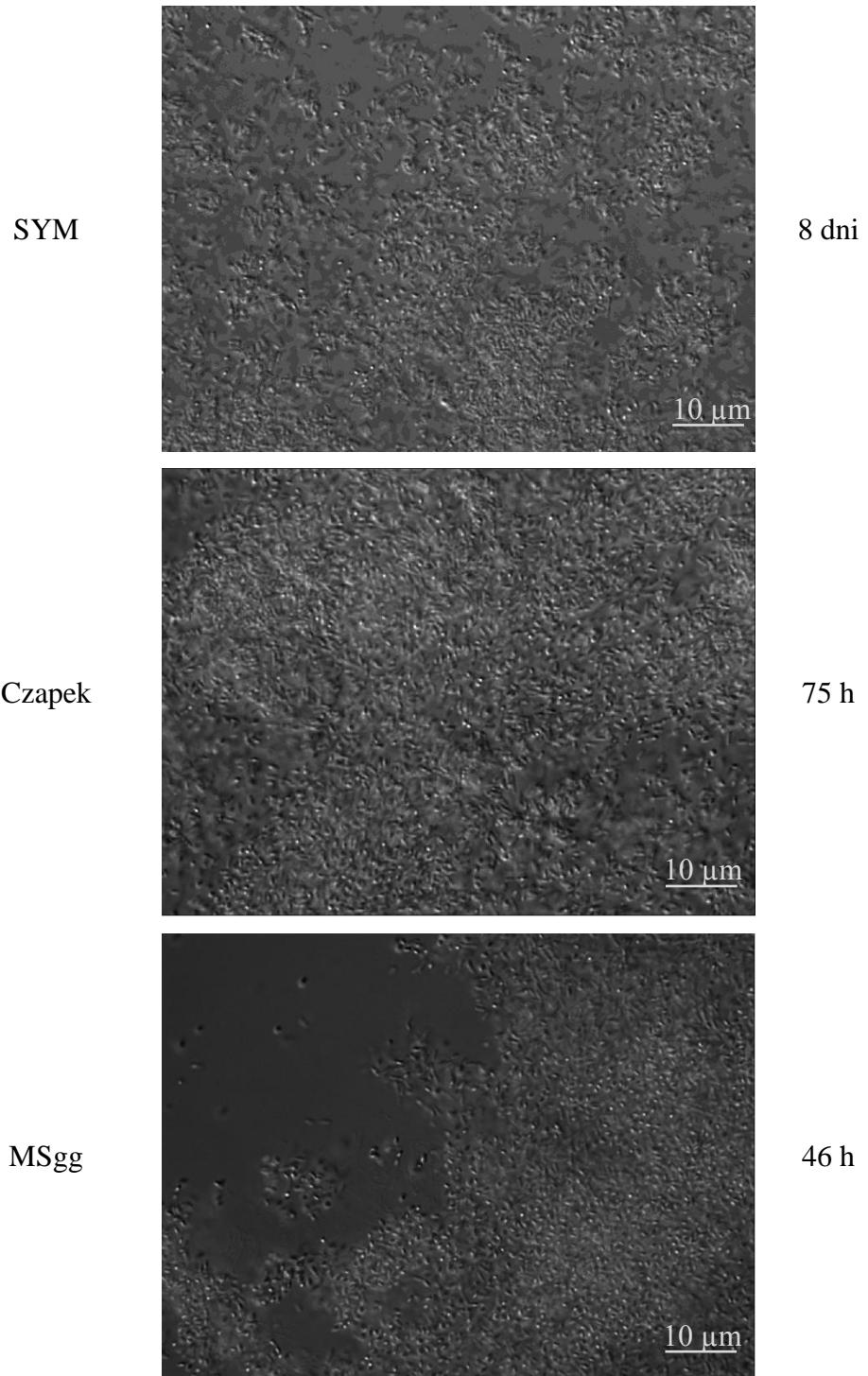
Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo za stalno pomoč in prijaznost, kar mi je polepšalo preživeti čas na katedri. Še posebej se zahvaljujem dr. Tjaši Danevčič in dr. Polonci Štefanič za reševanje problemov v stresnih situacijah, kar mi je olajšalo in skrajšalo delo. Zahvaljujem se tudi mladima raziskovalkam Maji Borić in Anni Oslizlo za pripravo prekonočnih kultur ob nedeljah. Prav tako se moram zahvaliti tehnični sodelavki Simoni Leskovec za potrpežljivost, stalno pomoč pri iskanju kemikalij in za ves izposojen sterilen inventar, brez katerega se bi mi eksperiment premaknil vsaj za kakšen dan, če ne celo teden.

Zahvaljujem se mlademu raziskovalcu Janezu Orehku za pomoč pri metodi HPSEC.

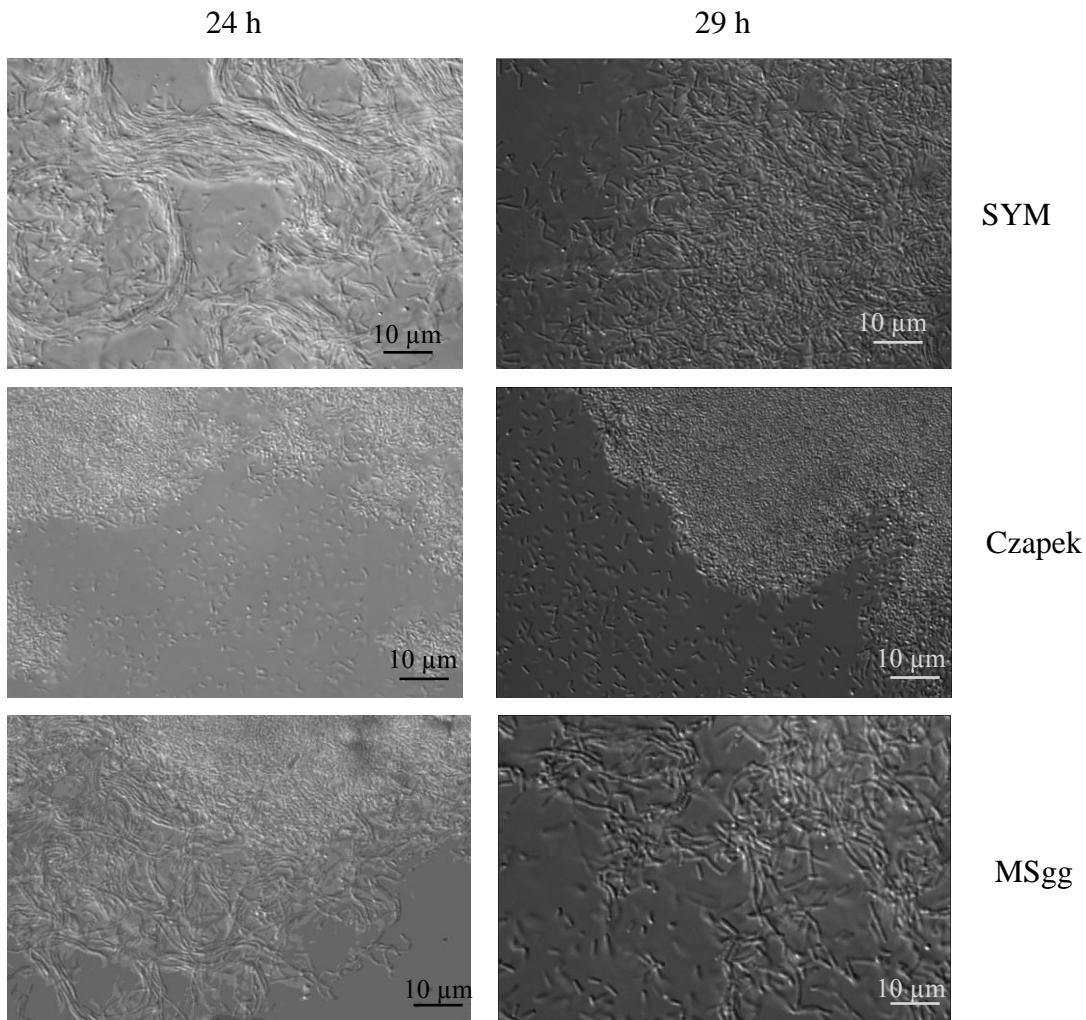
Zahvaljujem se prijateljem in sošolcem, zaradi katerih so bila moja študijska leta prečudovita.

Prav posebna zahvala gre mojim staršem in sestri, ki so me v času študija podpirali in verjeli vame, takrat ko sem to najbolj potrebovala. Brez njih ne bi bila to kar sem.

PRILOGE



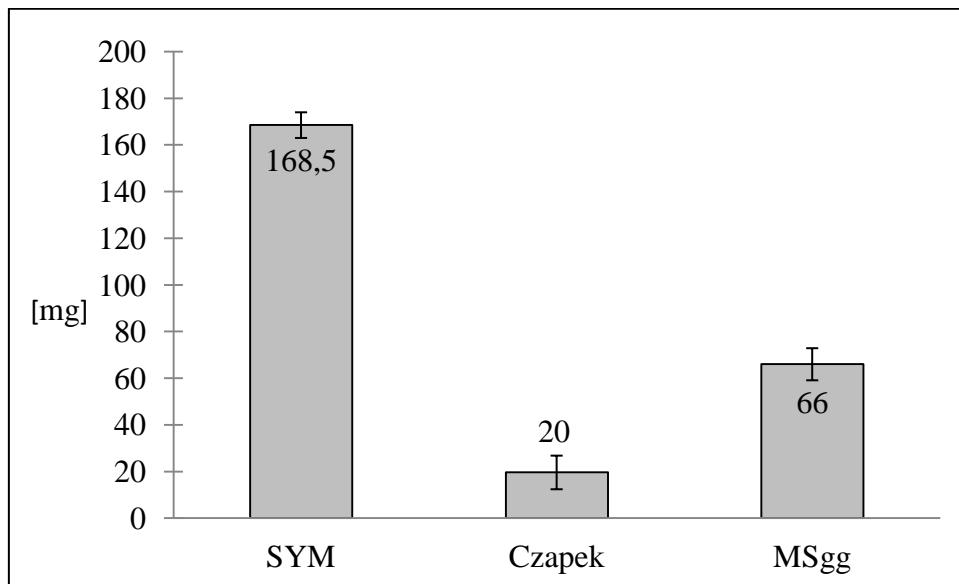
Priloga A: Mikroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* v različnih gojiščih odvzete, ko je večina celic že sporulirala.



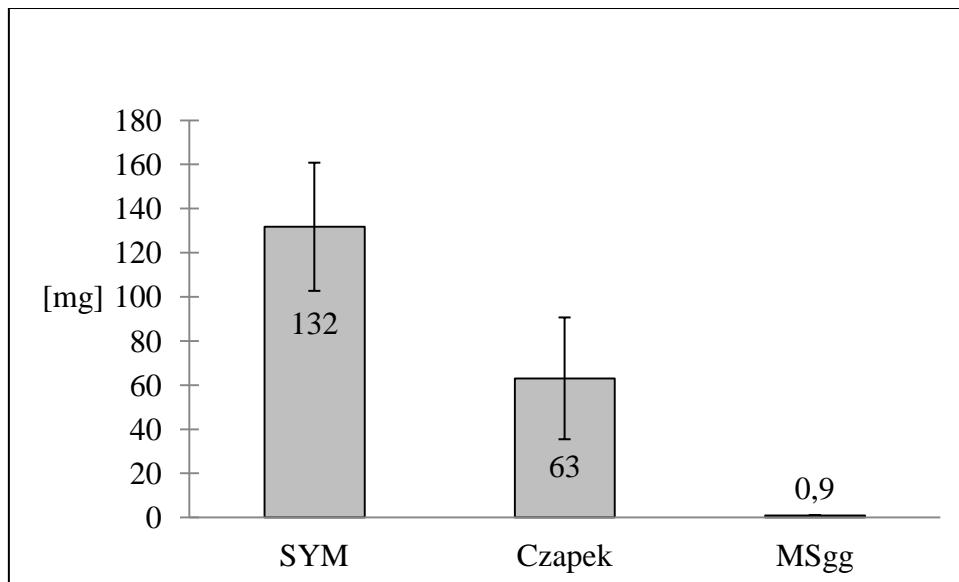
Priloga B: Mikroskopske slike biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 oz. 29 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazujejo, kako se je v relativno kratkem času morfologija celic pri SYM in MSgg spremenila. Vidimo lahko, da po 29 h pri nobenem vzorcu ni več filamentozne rasti.

Priloga C: Volumni biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Izračunani so s pomočjo njihove debeline. Prikazane so povprečen vrednosti in standardni odkloni.

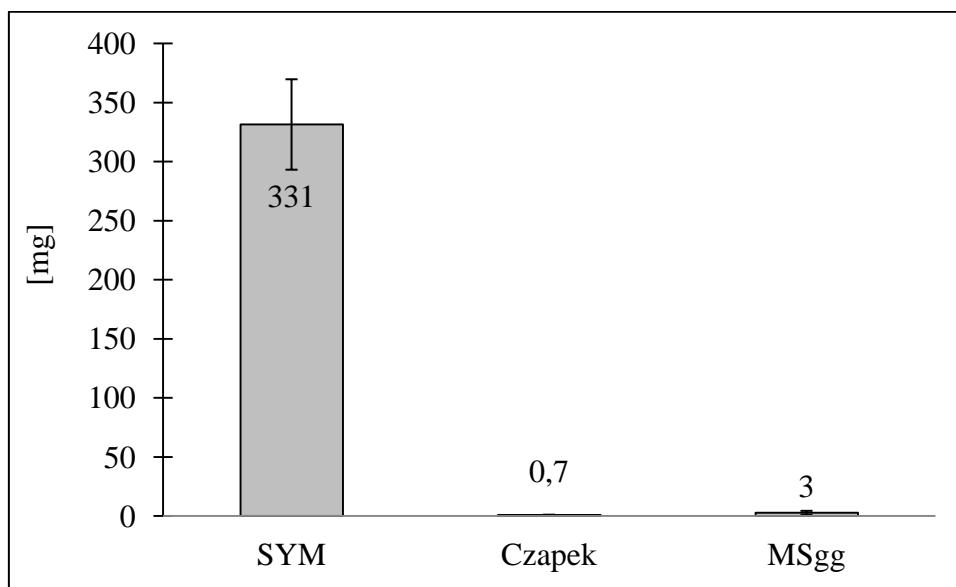
	SYM	Czapek	MSgg
V [ml]	3,8	0,13	1,3
SD [ml]	0,6	0,02	0,3



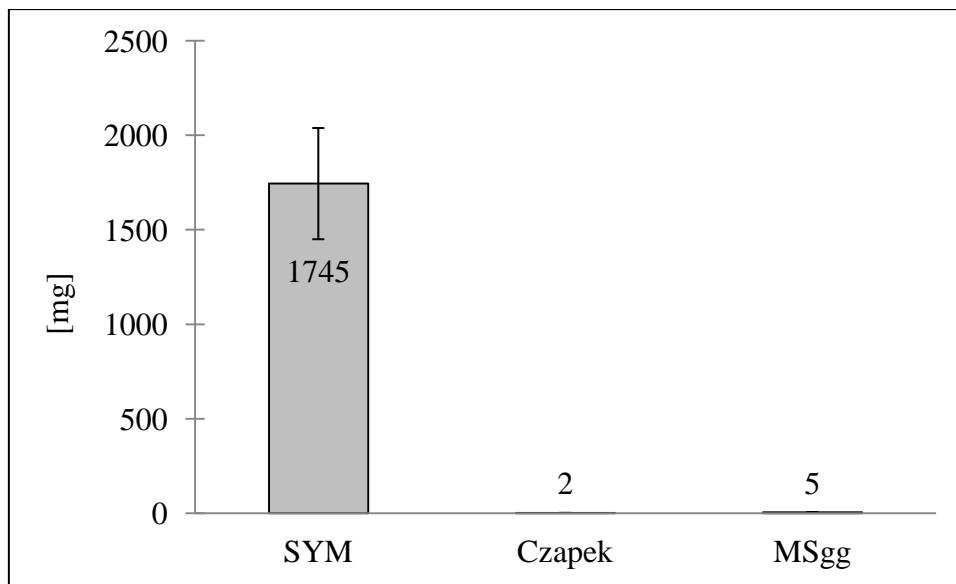
Priloga D: Suha biomasa celic v biofilmih bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



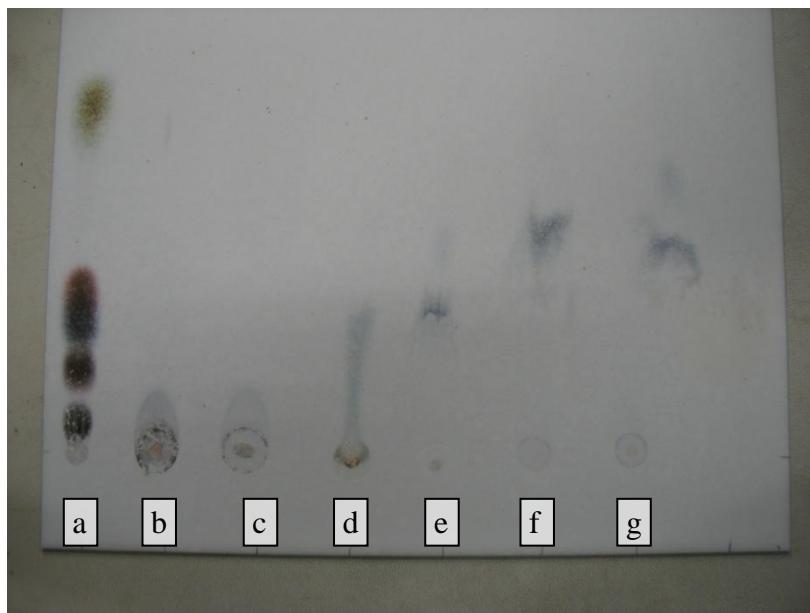
Priloga E: Suha biomasa celic v rabljenih gojiščih pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



Priloga F: Suha masa EPS, izoliranega iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



Priloga G: Suha masa EPS izoliranega iz 55 ml rabljenega gojišča pod biofilmi bakterije *Bacillus subtilis* po 24 h gojenja v različnih gojiščih. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni.



Priloga H: Tankoplastna tekočinska kromatografija EPS iz biofilmov bakterije *Bacillus subtilis*, gojenih v gojišču Czapek in MSgg. Prikazana je plošča TLC. a: standardna raztopina mešanice sladkorjev; b: EPS iz biofilma Czapek hidroliziran s 3 % TCA; c: EPS iz biofilma MSgg Czapek hidroliziran s 3 % TCA; e-g: EPS iz biofilma Czapek in MSgg hidrolizirana z drugo metodo. Sladkorji standarda na plošči si od zgoraj navzdol sledijo: ramnoza, fruktoza, glukoza, lakoza in saharoza.