

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina VRABEC

**FIZIKALNO – KEMIJSKI OPIS ZUNAJCELIČNIH POLIMERNIH
SUBSTANC (EPS) PRI BAKTERIJI *BACILLUS SUBTILIS***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHYSICO – CHEMICAL DESCRIPTION OF EXTRACELLULAR
POLYMERIC SUBSTANCES (EPS) OF *BACILLUS SUBTILIS***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Meritve viskoznosti so bile opravljene v JUB-u, meritve sipanja rentgenskih žarkov so bile opravljene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo na Katedri za fizikalno kemijo. Vse ostale meritve so bile izvedene na Katedri za mikrobiologijo, na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 09.06.2010 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorja dr. Iztoka Dogša in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur-Bertok.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentor: dr. Iztok Dogša

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Vrabec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.22:579.852.11:577.34(043)=163.6
KG fiziologija mikroorganizmov/biofizika/biofilmi/zunajcelične polimerne substance/EPS/proteini/*Bacillus subtilis*/divji tip/mutante/sipanje X - žarkov pod majhnimi koti/SAXS
AV VRABEC, Katarina
SA STOPAR, David (mentor)/DOGŠA, Iztok (somentor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN FIZIKALNO – KEMIJSKI OPIS ZUNAJCELIČNIH POLIMERNIH SUBSTANC (EPS) PRI BAKTERIJI *BACILLUS SUBTILIS*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 36 str., 15 sl., 2 pril., 37 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V diplomski nalogi smo bakterije *Bacillus subtilis* gojili na trdnih gojiščih MSgg s Kongo rdečim in v tekočem nestresanem Czapkovem mediju. Znatne razlike med divjim tipom in mutantami (*eps*⁻, *tasA*⁻, *eps*⁻ in *tasA*⁻, *pgs*⁻) smo opazili tako v morfologiji kolonij kot pri tvorbi peliklov. V izrabljenem tekočem gojišču smo merili porabo glukoze z metodo določevanja redukcijskih koncev. Največjo hitrost porabe glukoze smo izmerili pri *tasA*⁻ mutanti, vendar pa je mutanta *eps*⁻ dosegla najvišjo maksimalno optično gostoto. Delecija *tasA*⁻ koncentracije izvenceličnih proteinov znatno ne spremeni, signifikantno pa zmanjša produkcijo izvenceličnih polisaharidov. Delecija *eps*⁻ nima signifikantnega vpliva na koncentracijo izvenceličnih proteinov in polisaharidov. Meritve določevanja viskoznosti smo izvedli na rotacijskem viskozimetru, strukturo EPS pa smo določali z meritvami SAXS. Mutacije genov *tasA*⁻ ali *eps*⁻ spremenijo viskoznost, vendar kot kažejo SAXS meritve, ne spremenijo strukturiranosti EPS. Rezultati kažejo, da imajo celice visoko sposobnost, da primanjkljaj v izbranem polisaharidu ali proteinu v EPS kompenzirajo s produkcijo funkcijsko sorodnih komponent.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
DC UDC 579.22:579.852.11:577.34(043)=163.6
CX physiology of microorganisms/biophysics/biofilms/extracellular polymeric substances/EPS/proteins/*Bacillus subtilis*/wild type/mutants/Small Angle X - ray Scattering/SAXS
AU VRABEC, Katarina
AA STOPAR, David (supervisor)/DOGŠA, Iztok (co-advisor)/ŽGUR-BERTOK, Darja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI PHYSICO – CHEMICAL DESCRIPTION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES (EPS) OF *BACILLUS SUBTILIS*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 36 p., 15 fig., 2 ann., 37 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the graduation thesis *Bacillus subtilis* was grown on solid MSgg Congo red agar plates and in standing cultures in liquid Czapek medium. Significant differences between the wild type of *Bacillus subtilis* and its mutants (*eps*⁻, *tasA*⁻, *eps*⁻ and *tasA*⁻, *pgs*⁻) were observed in morphology of the colonies, as well as in pelicles at the air/liquid interface. Measurement of glucose consumption in conditioned medium indicated that *tasA*⁻ mutant had the fastest consumption of glucose but *eps*⁻ mutant reached the highest maximum optical density. Deletion in *tasA*⁻ had no significant effect on the concentration of extracellular protein, but it significantly decreased the formation of extracellular polysaccharides. Deletion in *eps*⁻ did not significantly affect the production of extracellular protein or the production of polysaccharide. Viscosity was measured with rotational viscometer and the structure of EPS was determined by SAXS. Mutations in *tasA*⁻ or *eps*⁻ affected viscosity, but they did not change the conformational properties of EPS as seen by SAXS. Results indicate that bacterial cells have the ability to compensate the deletion of one type of polysaccharide or protein in the EPS with the functionally similar one.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	iii
KEY WORDS DOCUMENTATION	iv
KAZALO VSEBINE	v
KAZALO SLIK	vii
KAZALO PRILOG	viii
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	ix
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI DIPLOMSKE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BIOFILMI	2
2.1.1 Značilnosti biofilmov	2
2.1.2 Zgradba EPS	4
2.1.3 Strukturne značilnosti EPS	4
2.1.4 Vloga EPS pri nastanku biofilma	5
2.2 BAKTERIJA <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	6
2.2.1 Biofilmi pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i> in regulacija njihovega nastanka .	7
2.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> – divji tip 3610 in mutante <i>eps⁻</i> , <i>tasA⁻</i> , <i>eps⁻tasA⁻</i> , <i>pgs⁻</i>	9
2.2.3 EPS in diferenciacija <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.2.4 EPS in parakrino signaliziranje pri <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.3 EPS IN VISKOZNOST	12
2.4 STRUKTURIRANOST EPS IN NJENO DOLOČANJE	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 IZBIRA BAKTERIJSKEGA SEVA, MEDIJA IN POGOJEV RASTI	15
3.2 TVORBA KOLONIJ NA MS _{gg} AGARJU S KONGO RDEČIM	15
3.3 SPREMLJANJE RASTI (RASTNA KRIVULJA)	16
3.4 NESTRESANE KULTURE	16
3.5 SPREMLJANJE PORABE GLUKOZE V MEDIJU Z METODO DOLOČEVANJA KONCENTRACIJE REDUKCIJSKIH KONCEV	16

3.6	DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE NASTALEGA POLISAHARIDA PO KONČANI INKUBACIJI Z METODO CELOKUPNIH SLADKORJEV	17
3.7	ZAZNAVANJE KONCENTRACIJE NASTALEGA PROTEINA Z BRADFORDOVIM REAGENTOM.....	18
3.8	MERJENJE VISKOZNOSTI IZRABLJENEGA GOJIŠČA NA ROTACIJSKEM VISKOZIMETRU.....	19
3.9	PRIPRAVA VZORCA ZA SAXS.....	19
3.10	IZOLACIJA EPS	19
3.11	VSEBNOST NUKLEINSKIH KISLIN.....	20
4	REZULTATI	21
4.1	TVORBA KOLONIJ NA MS _{gg} AGARJU S KONGO RDEČIM	21
4.2	TVORBA BIOFILMOV V NESTRESANIH KULTURAH	23
4.3	SPREMLJANJE HITROSTI RASTI.....	24
4.4	ZAZNAVANJE PORABE GLUKOZE Z METODO DOLOČEVANJA REDUKCIJSKIH KONCEV	25
4.5	DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE NASTALEGA POLISAHARIDA.....	26
4.6	KONCENTRACIJA NASTALEGA PROTEINA.....	27
4.7	VISKOZNOST	28
4.8	SAXS SIPALNA KRIVULJA	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	30
5.1	RAZPRAVA	30
5.2	SKLEPI.....	31
6	POVZETEK.....	32
7	VIRI.....	34
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Regulacija prehoda med gibljivimi celicami in celicami, ki tvorijo EPS (Aguilar in sod., 2007: 641).	7
Slika 2: Vpliv mutacij v <i>sinI</i> in <i>sinR</i> na nastanek verig v tekoči kulturi, na tvorbo biofilma, na izgled površine kolonij in na gibljivost na trdni plošči (Kearns in sod., 2005: 740).....	8
Slika 3: Primerjava izgleda EPS pri divjem tipu in pri <i>eps</i> - in <i>tasA</i> - mutantah s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (Branda in sod., 2006: 1230).....	9
Slika 4: Kolonija divjega tipa, posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Branda in sod., 2001: 11623).	11
Slika 5: Signaliziranje ima pomembno vlogo pri tvorbi EPS (Lopez in sod., 2009: 1632)	12
Slika 6: Shema meritve sipanja rentgenskih žarkov z metodo SAXS	14
Slika 7: Kolonije bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na trdnem gojišču MSgg s Kongo rdečim.	22
Slika 8: Sredina kolonij divjega tipa in mutant na trdnem gojišču MSgg s Kongo rdečim	22
Slika 9: Pelikli bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na površini tekočega Czapkovega gojišča	23
Slika 10: Rastna krivulja bakterije <i>Bacillus subtilis</i> in mutant <i>tasA</i> ⁻ in <i>eps</i> ⁻ v tekočem Czapkovem mediju	24
Slika 11: Spremljanje porabe glukoze pri divjem tipu in <i>eps</i> ⁻ ter <i>tasA</i> ⁻ mutanti bakterije <i>Bacillus subtilis</i>	25
Slika 12: Koncentracija polisaharida z metodo določevanja celokupnih sladkorjev pri divjem tipu in mutantah bakterije <i>Bacillus subtilis</i>	26
Slika 13: Zaznavanje koncentracije nastalega proteina pri divjem tipu in mutantah bakterije <i>Bacillus subtilis</i>	27
Slika 14: Primerjava strižnih napetosti in viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti pri divjem tipu in mutantah <i>eps</i> ⁻ in <i>tasA</i> ⁻ bakterije <i>Bacillus subtilis</i>	28
Slika 15: SAXS sipalna krivulja I(q) v odvisnosti od kota sipanih žarkov pri divjem tipu in <i>eps</i> ⁻ ter <i>tasA</i> ⁻ mutanti	29

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rezultati izolacije EPS
- Priloga B1: Preverjanje čistosti vzorca z merjenjem absorbanca pri različnih valovnih dolžinah
- Priloga B2: Rezultati čistosti vzorcev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Cm	kloramfenikol
Cm ^r	odpornost proti kloramfenikolu
EPS	zunajcelične ali ekstracelularne polimerne substance (ang. extracellular polymeric substances)
<i>eps</i> ⁻	mutanta, ki ne tvori ekstracelularnega polisaharida
<i>eps</i> ⁻ <i>tasA</i> ⁻	mutanta, ki ne tvori niti ekstracelularnega polisaharida, niti proteina TasA
<i>pgs</i> ⁻	mutanta, ki ne tvori γ -poliglutamata
SAXS	sipanje rentgenskih žarkov pod majhnimi koti (ang. Small Angle X – Ray Scattering)
Sp	spektinomycin
Sp ^r	odpornost proti spektinomycinu
<i>tasA</i> ⁻	mutanta, ki ne tvori proteina TasA
Tc	tetraciklin
Tc ^r	odpornost proti tetraciklinu
wt	divji tip

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Zunajcelične polimerne substance (EPS; extracellular polymeric substances) imajo pomembno vlogo pri celični agregaciji, celični adheziji in tvorbi biofilma, poleg tega pa tudi ščitijo celice pred okoljskimi spremembami. EPS sestavljajo makromolekule, kot so polisaharidi, proteini, glikoproteini, nukleinske kisline in fosfolipidi, od katerih so prve tri spojine zastopane v največjem deležu (Dogša in sod., 2005). Fizikalno-kemijske lastnosti zunajceličnih polimernih substanc so slabše poznane.

V diplomskem delu smo preučevali EPS bakterije *Bacillus subtilis*, in sicer divji tip 3610 ter štiri mutante (eps^- , $tasA^-$, eps^-tasA^- , pgs^-). Želeli smo preveriti, ali se mutante omenjene bakterije na makroskopskem nivoju razlikujejo od divjega tipa in med seboj. Opazovali smo tvorbo peliklov v nestresanem tekočem Czapkovem mediju, še posebej očitne razlike pa so se pokazale pri gojenju divjega tipa in mutant na MSgg agarških ploščah z dodanim barvilom Kongo rdeče. Zanimalo nas je, kaj se dogaja na makroskopskem nivoju, na nivoju morfologije kolonij. V nadaljevanju smo se lotili preučevanja razlik v sestavi ekstracelularnih polimernih substanc (EPS) med divjim tipom, eps^- mutanto in $tasA^-$ mutanto s fizikalno-kemijskimi metodami, kot so meritve koncentracije nastalih polisaharidov in proteinov, merili smo viskoznost izrabljenega gojišča in poskušali prikazati razlike v strukturi EPS z meritvami ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov (SAXS).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Mutante bakterije *Bacillus subtilis* se na trdnem gojišču morfološko razlikujejo od divjega tipa in med seboj,
- strukturiranost EPS divjega tipa in mutant je različna,
- mutanta eps^- tvori manj polisaharida od divjega tipa,
- mutanta $tasA^-$ tvori manj proteina kot divji tip.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOFILMI

2.1.1 Značilnosti biofilmov

V mikrobem svetu je življenje v biofilmu prej pravilo kot izjema, večina mikroorganizmov je sposobna tvoriti biofilme (Branda in sod., 2006). Biofilmi so agregati velikega števila med seboj povezanih bakterijskih celic, ki so obdane z zunajceličnim matriksom (v nadaljevanju matriks). Zgradba matriksa je ponavadi kompleksna, v največjem deležu ga sestavljajo zunajcelični polisaharidi in proteini, v manjši meri pa tudi DNA (Kearns in sod., 2005, 2008). Te komponente imenujemo zunajcelične polimerne substance (EPS). V biofilmu so opazili tudi mrtve celice in predvidevajo, da tudi celični detrit lahko predstavlja del zunajceličnega matriksa (Branda in sod., 2005). Matriks stabilizira biofilm in zagotavlja tako mehansko kot kemično zaščito bakterijskim celicam v njem (Kearns in sod., 2008). Bakterije so sicer zmožne samostojnega enoceličnega življenja, vendar se v naravnih okoljih pogosto nahajajo znotraj večceličnih skupnosti (Branda in sod., 2005), saj so v biofilmu bolj odporne proti antimikrobnim agensom kot so planktonske celice (Chagenau in sod., 2004). Večina bakterij tvori biofilme kot odgovor na aktivnosti mnogih genetskih poti, ki omogočajo bakteriji, da tvori biofilme pod različnimi okoljskimi pogoji (Kobayashi, 2007).

Biofilmi nastajajo na trdnih površinah ali kot pelikli na površini tekočih medijev na interfazi zrak/tekočina (Chai in sod., 2008). Bakterije tvorijo kompleksne, strukturirane skupnosti, biofilme, kot odgovor na spremenjene okoljske dejavnike (Romero in sod., 2010) in predstavljajo prevladujoče stanje bakterijske organizacije v naravnih, kliničnih in industrijskih okoljih (Chagenau in sod., 2004). Vsaka bakterijska vrsta ima sicer drugačno strukturo in regulacijo formacije biofilma (Winkelman in sod., 2009), kemijske in fiziološke lastnosti se precej razlikujejo glede na naravo bakterij in okolja (Branda in sod., 2005), razlikujejo se metabolne poti, ki se aktivirajo ob spremembah, prav tako pa se razlikujejo tudi komponente matriksa. Pri vseh vrstah je rezultat nastanek matriksa,

katerega naloga je vzdrževati strukturno integriteto biofilma in posredovati interakcije celica-celica in celica-površina (Romero in sod., 2010). EPS prispeva k mehanski stabilnosti biofilma in omogoča upiranje biofilma zunanjih silam (Morikawa in sod., 2006). Zunajcelični matriksi so morda prav tako raznoliki kot biofilmi in močno prispevajo k organizaciji skupnosti (Branda in sod., 2005).

Vloga biofilmov za rast in razvoj bakterij je precej široka; spodbujajo vezavo celic na trdne površine, formirajo in vzdržujejo mikrokolonije ter zrelo strukturo biofilma in povečujejo odpornost na okoljske spremembe (stres). Ekstracelularne substance, ki jih pri formiranju biofilma kot vezavno sredstvo izločajo bakterije, pomagajo pri pridobivanju hranil (Czaczyk in sod., 2007). EPS igra pomembno vlogo pri celični agregaciji, adheziji, tvorbi biofilma in zaščiti celic pred okoljem (Dogša in sod., 2005), predvsem pred izsušitvijo in predatorji ter pomaga vzdrževati primarno celično funkcijo (Borgio in sod., 2008). Zunajcelični polisaharidi, izločeni v medij, pri industrijskih mikroorganizmih izboljšujejo kvaliteto produktov (Dogša in sod., 2005). Vedno več pozornosti se jim posveča zaradi njihove bioaktivne vloge in širokega spektra komercialne uporabnosti. Lahko se uporabljajo kot aditivi pri hrani (ksantan, alginat, dekstran, glukomanan), pa tudi na drugih področjih za kontroliranje viskoznosti, želiranja in flokulacije (ksantan, agar, glukan) (Manca in sod., 1996). EPS je material, ki je uporaben v mnogih industrijskih sektorjih, kot je tekstilna industrija, detergenti, adhezivi, tretiranje odpadnih vod, kozmetična industrija in farmakologija. Mikrobni polisaharidi so potencialni novi vir funkcionalnih biopolimerov za prehrabeno, industrijsko in medicinsko uporabo. Izboljšujejo kvaliteto in teksturo hrane, uporabljajo se tudi kot hidrofilni matriks za kontrolirano sproščanje zdravil v farmacevtski industriji in pri razvoju vakcin (Gandhi in sod., 1997). Raziskave so pokazale, da vsebnost ogljikovih hidratov v odplakah lahko izkoristijo bakterije, ki vršijo bioremediacijo in tako čistijo okolje pred nevarnimi polutanti (Borgio in sod., 2008). Polisaharidi pri človeku delujejo tudi kot protitumorski, protivnetni in protivirusni dejavniki (Kumar in sod., 2004). Po drugi strani pa lahko povzročajo probleme s higieno v prehrabeni industriji. Pritrjeni organizmi, obdani z matriksom, lahko povzročajo persistente infekcije pri človeku, saj so močno odporni proti antibiotikom. Mikrobna aktivnost v biofilmih pospešuje staranje in razpad materialov in je vzrok za velike ekonomske izgube (Dogša in sod., 2005).

2.1.2 Zgradba EPS

Zunajcelične polimerne substance (EPS) so heterogeni biopolimeri, ki jih producirajo tako G- kot G+ bakterijske celice. EPS so povezane s celičnim površjem (kapsularni EPS), izločene v okolje oz. medij (prost EPS), ali pa povezane z matriksom v biofilm (Omoike in sod., 2006). Zunajcelične polisaharide so klasificirali kot kapsularne polisaharide oziroma eksopolisaharide glede na to, kako se obnašajo pri centrifugiranju. Tisti, ki ostanejo vezani na površino, so kapsularni; tisti, ki ostanejo v supernatantu, pa so eksopolisaharidi. Sposobnost tvorbe zunajceličnega matriksa je zelo pogosta lastnost večceličnih skupnosti, vendar pa obstaja ogromna diverziteteta v načinu, po katerem so ti matriksi zgrajeni. Ta diverziteteta je opazna na različnih nivojih. Dramatične razlike v arhitekturi biofilma lahko povzročijo že manjše spremembe v okolju (Branda in sod., 2005).

Prevladujoča komponenta mikrobnih zunajceličnih polimernih substanc (EPS) so zunajcelični polisaharidi, ki so ali povezani s celičnim površjem ali pa izločeni v gojišče (Dogša in sod., 2005). Polisaharidi so največje makromolekule v naravi. Lahko modificirajo lastnosti tekočin, stabilizirajo suspenzije, flokulirajo delce, enkapsulirajo materiale in delajo emulzije. Polisaharidi se lahko uporabljajo kot zgoščevalci, stabilizatorji, emulgatorji ter sredstvo za želiranje in vezavo vode v prehrabi, kozmetični in naftni industriji. Nekateri imajo tudi unikatne fiziološke aktivnosti, kot so protitumorski, protivirusni in protivnetni agensi, lahko pa delujejo tudi kot spodbujevalci interferonov. Odkrili so veliko mikrobnih sevov, ki proizvajajo polisaharide različnih struktur in funkcionalnosti, ki jih lahko izkoristimo za komercialno uporabo (Yun in sod., 2003).

2.1.3 Strukturne značilnosti EPS

EPS matriks je navadno debel od 0,2 - 1,0 μm , pri nekaterih vrstah bakterij pa ne preseže debeline 10 - 30 nm (Czaczyk in sod., 2007). Polisaharidi so lahko nabiti ali nenabiti, konformacijsko pa so tako različni, da jim je težko določiti strukturo (Dogša in sod., 2008). Struktura polisaharidov se močno razlikuje v načinu vezave in v nesladkornih

substituentih. Mikrobní eksopolisaharidi so lahko homopolisaharidi, sestavljeni le iz enega tipa monosaharidov (npr. glukani, fruktani) ali heteropolisaharidi, ki so ponavadi sestavljeni iz ponavljajočih enot različnih monosaharidov (alginat) (Czaczyk in sod., 2007). Posamezne enote polisaharidov so med seboj povezane z glikozidnimi vezmi (Kumar in sod., 2004). Znano je, da ima EPS pogosto termo-reverzibilne lastnosti. Ko ga segrevamo in nato ohladimo na sobno temperaturo, postane gel (Morita in sod., 1982). Zunajcelično izločeni proteini so substance z molekulsko maso med 10 kDa in 200 kDa. Pri bakteriji *Bacillus subtilis* je zunajcelični sloj proteinov zgrajen predvsem iz L- in D- glutaminozilnih ostankov. Celó znotraj ene vrste bakterije se enote EPS razlikujejo oziroma pripadajo različnim kategorijam. S pomočjo teh značilnosti lahko bakterije tudi identificiramo in klasificiramo (Czaczyk in sod., 2007).

2.1.4 Vloga EPS pri nastanku biofilma

Nastanek biofilma lahko razdelimo na pet stopenj: 1. začetna pritrditev na površino, 2. tvorba enega sloja, 3. migracija, ki omogoča tvorbo večplastnih mikrokolonij, 4. produkcija ekstracelularnega matriksa in 5. nastanek zrelega biofilma, ki ima karakteristike tridimenzionalne strukture (Lemon in sod., 2008). Celice v biofilmu so fiziološko precej različne od tistih v planktonskem stanju, izražajo se tudi druge skupine genov. Ta proces nastanka biofilma je natančno uravnavan, nanj močno vplivajo okoljski pogoji in dostopnost hranil (Chagenau in sod., 2004).

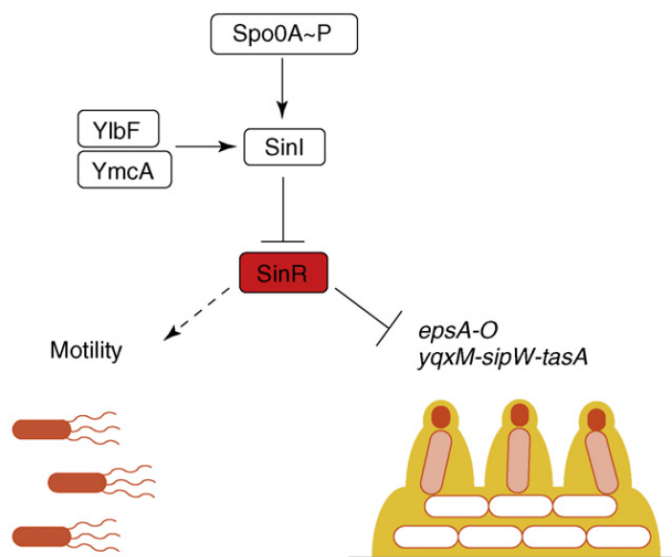
Pomembno vlogo pri nastanku biofilma ima EPS. Zunajcelične komponente omogočajo prehod v nastanku biofilma na drugo stopnjo, imenovano faza ireverzibilne pritrditve. Molekule EPS ojačajo interakcije med mikroorganizmi in spodbujajo tvorbo celičnih agregatov na trdnih površinah. Na arhitekturo in morfologijo biofilma oziroma matriksa najbolj vplivajo zunajcelični proteini, eksopolisaharidi in zunajcelične DNA. Eksopolisaharide imenujejo tudi adhezivni polimeri in verjetno igrajo ključno vlogo pri gradnji tridimenzionalnega biofilma in pri vzdrževanju strukturne integritete biofilma. Zunajcelično izločeni proteini določajo pritrditev mikrobov na trdne površine. Sloj

adsorbiranih proteinov omogoči vezavo drugih specifičnih polimerov (Czaczyk in sod., 2007).

2.2 BAKTERIJA *BACILLUS SUBTILIS*

Bacillus subtilis je po Gramu pozitivna paličasta gibljiva bakterija (Lemon in sod., 2008), ki se nahaja v zemlji (Kobayashi, 2007) in služi kot modelni organizem za študij diferenciacije biofilmov (Kearns in sod., 2005). Bakterija omogoča lažje razumevanje večceličnega obnašanja oziroma populacijske heterogenosti v biofilmih (Aguilar in sod., 2007). Je tudi zelo dostopna za manipulacijo s klasičnimi tehnikami in molekularno genetiko, zato na njej pogosto raziskujejo funkcije genov oziroma vpletenost genov pri tvorbi biofilma (Kearns in sod., 2005). Njene razvojne poti so dobro karakterizirane, raziskane in razumljene (Vlamakis in sod., 2008). Ima sposobnost kompetence in sporulacije v primeru stradanja ali visoke populacijske gostote. Na molekularnem nivoju je regulacija sporulacije te bakterije verjetno najboljše razumljen mikrobni proces (Lemon in sod., 2008).

Divji sevi tvorijo robustne biofilme tako na interfazah zrak/tekočina, kot tudi na trdnih površinah (Kearns in sod., 2005). Na trdnih gojiščih razvije kompleksne nagubane kolonije, na površini tekočih medijev pa producira pelikle. (Lemon in sod., 2008). Morfologija kolonij močno variira od seva do seva in okoljskih pogojev. Robovi kolonij so karakterizirani z zračnimi (od površine agarja dvignjenimi) strukturami, katerih vrhovi služijo kot mesta za sporulacijo. Te kolonije izražajo visoko stopnjo prostorsko-časovne organizacije v procesu sporulacije (Aguilar in sod., 2007). V tekočem mediju na začetku nastanka biofilma opazimo planktonske, gibljive celice. Te celice migrirajo na površino medija, kjer tvorijo dolge verige negibljivih celic. Verige so visoko organizirane v paralelnih vzorcih, med seboj so tesno povezane z zunajceličnim matriksom in tako tvorijo plavajoče biofilme, ki jih imenujemo pelikli. Rast povezanih verig se nadaljuje v nastanek večjih struktur, ki vključujejo plodna telesca (Branda in sod., 2004).

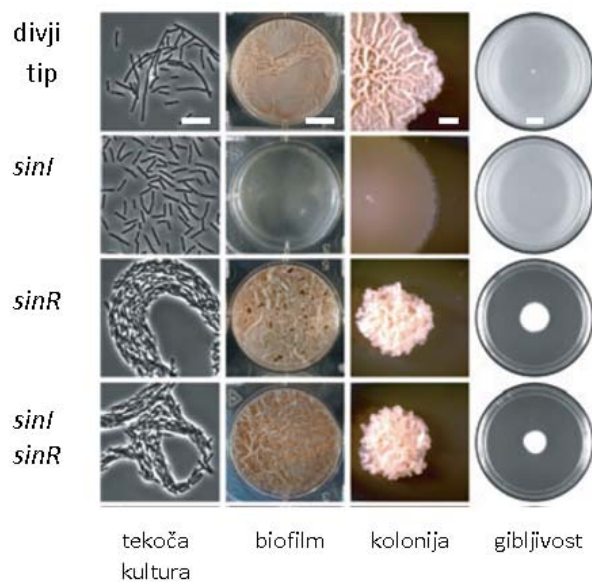


Slika 1: Regulacija prehoda med gibljivimi celicami in celicami, ki tvorijo EPS. Produkt gena *sinR* omogoča celicam gibljivost in blokira ekspresijo *epsA-O* in *yqxM-sipW-tasA* operonov in tako tvorbo biofilma. Ob neugodnih okoljskih pogojih pride do fosforilacije Spo0A, ki je glavni regulator vstopa v sporulacijo in tvorbo biofilma. Spo0A~P aktivira transkripcijo gena *sinI*, katerega produkt je represor gena *sinR*. Na aktivnost SinI pozitivno vplivata še dva proteina YlbF in YmcA. Na shemi puščica pomeni aktivacijo, prečna črta pa represijo (Aguilar in sod., 2007: 641).

2.2.1 Biofilmi pri bakteriji *Bacillus subtilis* in regulacija njihovega nastanka

Produkcija matriksa je pogosto kritična točka pri prehodu na življenje v biofilmu, zato je njegova regulacija zelo kompleksna (Kearns in sod., 2008). Pokazali so, da je izražanje genov prostorsko in časovno regulirano in da koeksistirajo najmanj 3 tipi celic v zrelem biofilmu (Vlamakis in sod., 2008); gibljive, sporulirajoče celice in celice, ki tvorijo matriks (Chu in sod., 2008). Lokacija in delež teh tipov celic se spreminja tekom razvoja skupnosti v biofilmu (Vlamakis in sod., 2008). Kot je razvidno iz slike 1, nastanek biofilma zahteva izražanje dveh operonov, ki kodirata strukturni komponenti zunajceličnega matriksa (Kearns in sod., 2008), to sta eksopolisaharidi in protein TasA. Zapis za eksopolisaharide se nahaja na *epsA-O* operonu, geni, ki kodirajo TasA, pa so locirani v *yqxM-sipW-tasA* operonu. Oba operona sta pod negativno kontrolo represorja SinR, ki se nanju veže in blokira transkripcijo (Chu in sod., 2008); aktivira pa gibljivost in ločitev celic (Lemon in sod., 2008). SinR je glavni regulator, ki uravnava prehod med planktonskim stanjem in pritrjenim stanjem v biofilmu (Kearns in sod., 2005).

SinI je antirepresor, ki se veže na SinR in mu tako prepreči vezavo na DNA. Produkt gena *sinI* je pod pozitivno kontrolo Spo0A, ki je glavni regulator pri vstopu celice v sporulacijo (Chai in sod., 2008). Tvorba biofilma je del kompleksnega razvijajočega se procesa in simultano ali sekvenčno sodeluje s sporulacijo, kompetenco in tvorbo plodnih teles (Chagenau in sod., 2004). Koncentracija Spo0A močno naraste ob pomanjkanju hranil in sproži sporulacijo (Vlamakis in sod., 2008). Tako sta formacija biofilma in sporulacija procesa, ki sta odvisna od Spo0A. Spo0A je aktiven le v nekaterih celicah v populaciji, zato se tudi gen *sinI* izraža le v majhnih subpopulacijah celic. V teh celicah tudi koncentracija SinI preseže koncentracijo SinR, medtem ko je splošna koncentracija SinI 18x nižja kot koncentracija SinR, saj se gen *sinR* izraža v skoraj vseh celicah konstitutivno. Iz tega sledi, da subpopulacija celic producira eksopolisaharide in proteine in zagotavlja te komponente ekstracelularnega matriksa za potrebe celotne skupnosti. Komponente matriksa se lahko izmenjujejo med celicami (Chai in sod., 2008). Nezmožnost tvorbe SinI ali SinR močno vpliva na strukturo biofilma. Brez SinI se ne tvori pelikel, kolonije so ploske, medtem ko mutante brez SinR tvorijo ekstremno nagubane pelikle in kolonije (Lemon in sod., 2008).

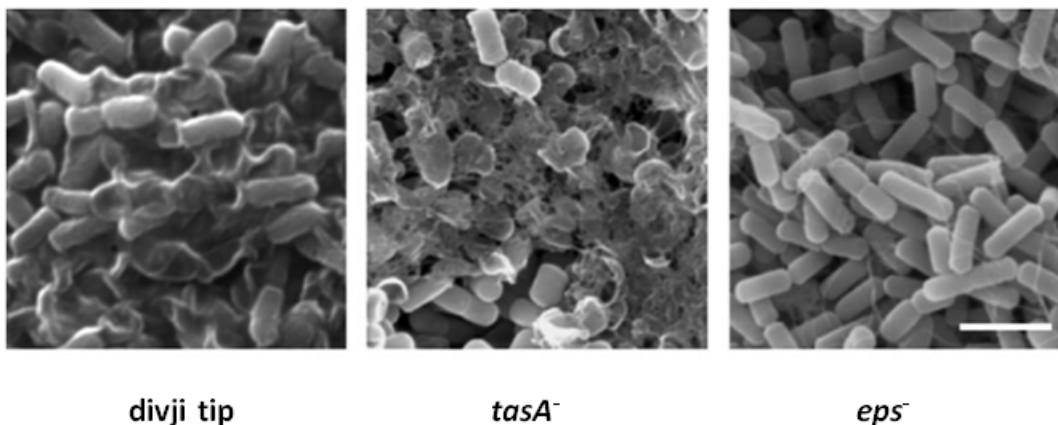


Slika 2: Vpliv mutacij v *sinI* in *sinR* na nastanek verig v tekoči kulturi (črtica predstavlja 10 μ m), na tvorbo biofilma (črtica predstavlja 1 cm), na izgled površine kolonij (črtica predstavlja 1 mm) in na gibljivost na trdni plošči (črtica predstavlja 1 cm). Fenotip dvojne mutante *sinI sinR* se ne razlikuje bistveno od fenotipa *sinR* mutante (Kearns in sod., 2005: 740)

2.2.2 *Bacillus subtilis* – divji tip 3610 in mutante *eps*⁻, *tasA*⁻, *eps*⁻ *tasA*⁻, *pgs*⁻

Divji sevi producirajo robustne biofilme (Branda in sod., 2004). Zunajcelični matriks je esencialen za razvoj kompleksne arhitekture kolonij z mesti, ki se dvigajo od površine agarne plošče (Aguilar in sod., 2007) in so plodnim telescem podobne zračne strukture (Branda in sod., 2004). Vrhovi teh struktur služijo kot potencialna mesta za sporulacijo (Aguilar in sod., 2007). Mutante, ki ne producirajo matriksa, tvorijo nestrukturirane biofilme, ki nimajo kompleksne arhitekture, v katerih ne pride do sporulacije. (Vlamakis in sod., 2008).

Na slikah 2 in 3 lahko vidimo, da so celice divjih sevov skoraj popolnoma obdane z debelim slojem zunajceličnega materiala. Celice *tasA*⁻ mutante (mutanta, ki ne tvori zunajceličnega proteina TasA) imajo manj zunajceličnega materiala, ta pa izgleda bolj vlaknast, nitkast, kar je značilno za biofilme, bogate s polisaharidi. Še manj ekstracelularnega materiala so opazili pri *eps*⁻ mutanti (mutanta, ki ne tvori zunajceličnega polisaharida). Iz tega lahko sklepamo, da *tasA* in *eps* geni vplivajo na fizikalne lastnosti biofilma (Branda in sod., 2006).



Slika 3: Primerjava izgleda EPS pri divjem tipu in pri *eps*⁻ in *tasA*⁻ mutantah s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa: 10000-kratna povečava, črtica predstavlja 200µm (Branda in sod., 2006: 1230)

Medtem, ko sta mutanti *eps*⁻ in *tasA*⁻ vsaka zase nezmožni tvoriti normalen kompleksen biofilm (Kearns in sod., 2008), pa *eps*⁻ *tasA*⁻ dvojna mutanta (mutanta, ki ne tvori niti zunajceličnega polisaharida, niti zunajceličnega proteina TasA) sploh ne producira pelikla

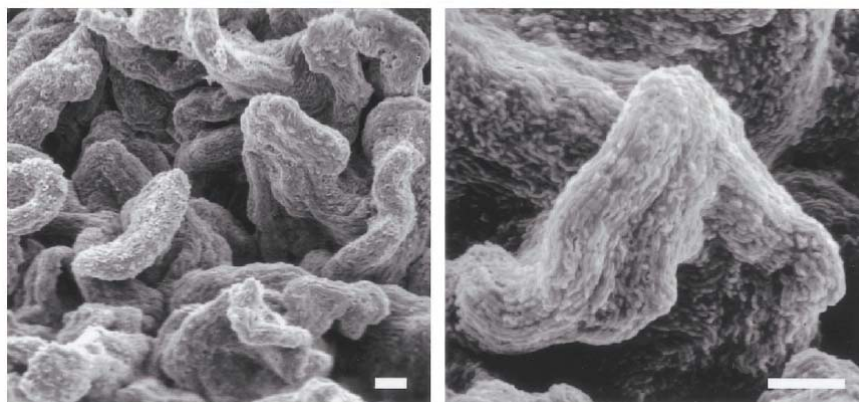
(Lemon in sod., 2008). Iz tega Lemon in sod. (2008) sklepajo, da sta produkta teh dveh operonov glavni strukturni komponenti matriksa. Presenetljivo pa *eps*⁻ mutanta v kokulturi s *tasA*⁻ mutanto tvori funkcionalen biofilm podobno kot divji tip (Lemon in sod., 2008), kar kaže na to, da se komponente matriksa lahko porazdelijo izven celice in med populacijami (Kearns in sod., 2008). Produkt gena *tasA*⁻ je najpomembnejša proteinska komponenta zunajceličnega matriksa v biofilmu (Branda in sod., 2006). TasA tvori amiloidna vlakna, ki so esencialna za integriteto zunajceličnega matriksa in torej tudi biofilma. Amiloidna vlakna pomagajo bakterijam pri pritrjevanju na površine in dvigovanju zračnih struktur od površine agarja, imajo pa tudi vlogo v patogenih procesih, kot je adhezija na gostiteljsko celico in indukcija toksičnosti na gostiteljske celice (Romero in sod., 2010). Tudi γ -poliglutamati naj bi imeli pomembno vlogo pri pritrjevanju celic na trdne površine, vendar pa očitno nima signifikantne vloge v zunajceličnem matriksu (Branda in sod., 2006), saj mutanta, ki te komponente ne producira (*pgs*⁻), tvori biofilm s fenotipom divjega tipa bakterije *Bacillus subtilis* 3610 (Lemon in sod., 2008).

2.2.3 EPS in diferenciacija *Bacillus subtilis*

Giblјive celice se diferencirajo v verige pritrjenih celic, medsebojno povezanih z zunajceličnim matriksom, ki lahko tvorijo zračne strukture plodnih teles. Produkcija plodnih teles je odvisna od regulatornih genov, ki so potrebni za začetek sporulacije, in od genov, potrebnih za tvorbo eksopolisaharidov in surfaktinov. Ko je produkcija teh zračnih struktur končana, se lahko prične sporulacija (Branda in sod., 2001).

Preučevanje kolonij divjega tipa bakterije *Bacillus subtilis* pokaže visoko strukturiranost skupnosti. Tvorijo se zavite strukture, dvignjene od površine agarne plošče, kar je lepo vidno na sliki 4. Zračne strukture so zgrajene pretežno iz dolgih verig celic, ki so paralelno poravnane med seboj. Te zračne strukture so tudi mesta, kjer pretežno poteka sporulacija. Sporulacijo izzovejo predvsem izvencelični signali, kot je visoka gostota populacije. Sporulacija je tako verjetno socialni fenomen, ne pa domena ene celice, kot so predvidevali prej, in je močno časovno in prostorsko organizirana. Tradicionalni pogled je, da so bakterije striktno enocelični organizmi (Branda in sod., 2001), ki niso zmožni

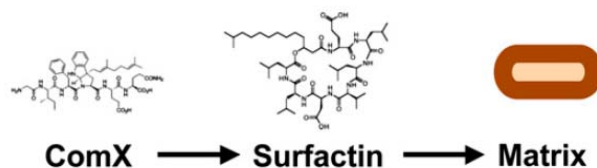
diferenciacije v različne koeksistirajoče celične tipe. Zdaj je jasno, da se bakterije lahko razvijejo v morfološko kompleksne večcelične skupnosti, ki jih sestavljajo različne subpopulacije specializiranih celičnih tipov (Lopez in sod., 2009).



Slika 4: Kolonija divjega tipa, posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri 600-kratni povečavi (levo) in pri 1000-kratni povečavi (desno). Črtica predstavlja 10 μm (Branda in sod., 2001: 11623).

2.2.4 EPS in parakrino signaliziranje pri *Bacillus subtilis*

Celična diferenciacija je sprožena s strani zunajceličnih signalov. Parakrini signal pomeni, da neke celice producirajo signal, na katerega druge (določene) celice odgovorijo. Tvorba biofilma pri bakteriji *Bacillus subtilis* je vezana na dve pomembni signalni molekuli, ComX in surfaktin. ComX sproži nastajanje surfaktina, surfaktin pa spodbudi subpopulacijo celic k tvorbi ekstracelularnega matriksa. Celice, ki producirajo surfaktin, so nanj nezmožne odgovoriti. Tako ena subpopulacija celic producira signal, druga subpopulacija pa se nanj odzove. Parakrino signaliziranje torej v bakterijski populaciji zagotavlja vzdrževanje določenega stanja (določenih tipov celic) skozi več generacij (Lopez in sod., 2009).



Slika 5: Signaliziranje ima pomembno vlogo pri tvorbi EPS. Prikazana je signalna kaskada, ki vodi v produkcijo EPS pri bakteriji *Bacillus subtilis* (Lopez in sod., 2009: 1632)

2.3 EPS IN VISKOZNOST

Biopolimeri lahko tvorijo gele. Kumar in sod. (2004) so pokazali, da viskoznost (η) polimerne raztopine pada z naraščajočo strižno silo (τ) in izkazuje tipično ne-Newtonovo psevdoplastično obnašanje. Za Newtonovo obnašanje je značilno, da je viskoznost neodvisna od strižne hitrosti. Opazno eksponentno padanje viskoznosti z naraščanjem strižne hitrosti bi lahko bila tudi posledica degradacije polimera (Kumar in sod., 2004).

Za merjenje viskoznosti obstaja več metod, ki jih lahko ločimo po načinu merjenja. Pri vibracijskem viskozimetru merilni plošči vibrirata z določeno frekvenco, amplituda pa se razlikuje glede na viskoznost vzorca med njima. Pri kapilarnem viskozimetru merimo hitrost toka vzorca skozi vertikalno kapilarno cev, ali čas, v katerem določena količina vzorca steče do konca vertikalne kapilarne cevi. Pri viskozimetru s padajočo kroglo, ki ima znane dimenzije in gostoto, merimo čas, ki ga krogla potrebuje za padanje skozi vzorec na določeni razdalji (A&D Weighing, 2010). Pri naših eksperimentih smo uporabili rotacijski viskozimeter, ki deluje tako, da stisne vzorec med dve merilni plošči, nato pa meri viskoznost (upor snovi) in strižno napetost v odvisnosti od strižne hitrosti. Viskoznost tekočih snovi se ponavadi spreminja s temperaturo, zato meritve potekajo pri določeni temperaturi.

2.4 STRUKTURIRANOST EPS IN NJENO DOLOČANJE

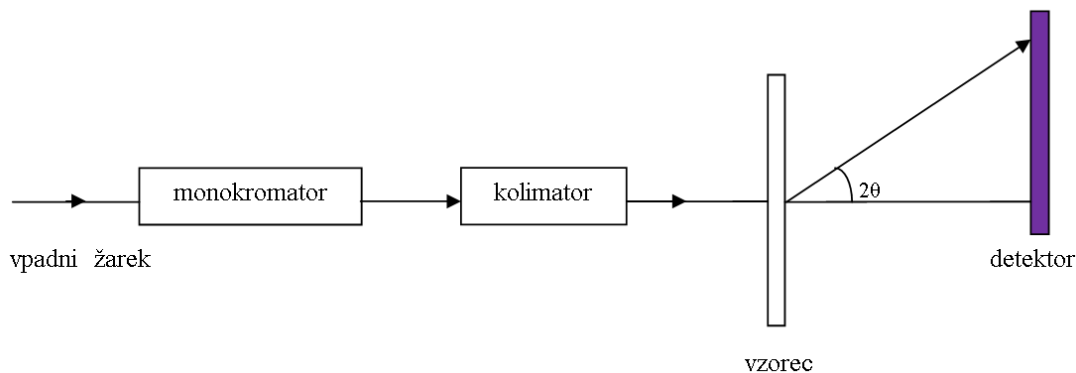
SAXS tehnika je rentgensko-difrakcijska metoda za določevanje prostorske strukture snovi. S to metodo lahko dobimo strukturno informacijo tako o majhnih molekulah kot tudi o makromolekulah (Dore in sod., 1995). Tako jo lahko uporabljamo za preučevanje strukture polisaharidov. Te makromolekule so konformacijsko tako različne, da jim je težko določiti neko splošno strukturo. S pomočjo SAXS-a lahko dobimo informacijo o strukturi na 1-100 nm (10-1000Å) skali v raztopini, kar je z drugimi metodami nedostopno (Dogša in sod., 2008).

Z monokromatskim in kolimiranim rentgenskim žarkom obsevamo vzorec in nato opazujemo sipano svetlobo. Vpadni žarki se sipajo pod različnimi koti na elektronih vzorca, pri tem pa prihaja do interference med njimi. Kjer prihaja do konstruktivne interference, se intenziteta sipanega žarka poveča, kjer pa do destruktivne, se zmanjša. Z detektorjem zaznamo intenziteto sipane svetlobe v odvisnosti od kota sipanja 2θ (Dore in sod., 1995).

Pri SAXS eksperimentih imamo pogosto eno snov raztopljeno v drugi. Če imata ti dve snovi enako elektronsko gostoto, strukture vzorca ne moremo opazovati, saj se ta ne razlikuje od svoje okolice. Če so v vzorcu prisotne nehomogene strukture, velike vsaj 1 nm, dobimo sipanje v območju majhnih kotov. Pri izvajanju meritev se predvideva, da je vpadni žarek neskončno ozek, kar pa ne drži popolnoma. Z luknjičastimi kolimatorji lahko dobimo relativno ozek vpadni žarek, vendar na ta način znižamo intenziteto žarka. To težavo lahko rešimo tako, da povečamo vhodno intenziteto ali pa dopustimo širši žarek. Sinhrotron omogoča prvo rešitev, v manjših laboratorijskih SAXS sistemih pa moramo dopustiti širši vpadni žarek z režnim kolimatorjem. Režo takega kolimatorja si lahko predstavljamo kot skupek več luknjic.

Osnovna postavitev SAXS eksperimenta je prikazana na sliki 6. Rentgenski žarki izhajajo iz rentgenske cevi ali sinhrotronskega izvora sevanja in potujejo skozi monokromator. Kolimator zbere žarke v vzporeden snop, saj želimo, da vpadni curek pade na opazovano snov pod enakim vpadnim kotom. Opazovana snov je lahko trdna ali pa raztopina, ki se

nahaja v kapilari, vpeti v kovinski nosilec. Tega vložimo v kovinsko škatlo (SAXS kamera), ki jo zatesnimo in ustvarimo vakuum. Na prednji strani vstopa vpadni žarek, se sipa na vzorcu in nato pade pod različnimi koti na detektor. Ta je razdeljen na polja in ko padejo fotoni sipanega žarka na eno izmed polj, jih detektor zazna. Polje, ki je v isti ravnini kot vpadni žarek, ustreza kotu sipanja 0.



Slika 6: Shema meritve sipanja rentgenskih žarkov z metodo SAXS

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBIRA BAKTERIJSKEGA SEVA, MEDIJA IN POGOJEV RASTI

Raziskave smo opravljali na bakteriji *Bacillus subtilis* 3610 in sicer 3610 wt (tvori normalne biofilme), 3610 *eps*⁻ Tc^r (ne tvori ekstracelularnega polisaharida, je odporna proti tetraciklinu), 3610 *tasA*⁻ Sp^r (tvori ekstracelularni polisaharid, vendar ne dela TasA proteina, je odporna proti spektinomycinu), 3610 *eps*⁻ *tasA*⁻ Tc^r Sp^r (ne tvori ekstracelularnega polisaharida in tudi ne TasA proteina, je odporna proti tetraciklinu in spektinomycinu) in 3610 *pgs*⁻ Cm^r (ne tvori poliglutamata, je odporna proti kloramfenikolu).

Seve smo vzdrževali na ploščah LB. Mutantam smo v gojišče dodali antibiotike in sicer *eps*⁻ mutanti 20 mg/l Tc (tetraciklina), *tasA*⁻ mutanti 100 mg/l Sp (spektinomicina), *eps*⁻ *tasA*⁻ mutanti 20 mg/l Tc in 100 mg/l Sp ter *pgs*⁻ mutanti 5 mg/l Cm (kloramfenikola).

Za gojenje smo uporabljali Czapkov medij, kot so ga uporabljali Morita in sod. (1979): glukoza 3 %, NaNO₃ 0,3 %, kvasni ekstrakt 0,01 %, K₂HPO₄ 0,05 %, MgSO₄·7H₂O 0,05 %, FeSO₄·7H₂O 0,001 % in MnSO₄·nH₂O 0,0005 %, pH gojišča je bil 7,7. Rastni pogoji so bili konstantni skozi celoten potek eksperimenta. Inkubacija je potekala pri 250 obr./minuto na 37 °C. Kulture smo stresali ves čas inkubacije.

3.2 TVORBA KOLONIJ NA MSgg AGARJU S KONGO RDEČIM

Sledili smo postopku, kot so ga opisali Branda in sod. (2006). Kulture smo nacepili na LB agarne plošče (agar 1,5 %) in jih inkubirali preko noči pri 37 °C. Nato smo jih resuspendirali v LB tekočem mediju in inkubirali na 37 °C pri 200 obr./minuto približno 5h do OD₆₅₀ ~ 1,0 . Po inkubaciji smo na MSgg agarne plošče kapnili 3 µl kulture in plošče inkubirali na 28 °C 42 - 84 ur. MSgg gojišče: 100 mM MOPS (morfolinpropan sulfonska kislina); 0,5 % glicerol; 0,5 % glutamat, 5 mM kalijev fosfat (K₃PO₄); 50 µg/ml triptofan; 50 µg/ml fenilalanin; 2 mM MgCl₂; 700 µM CaCl₂; 50 µM FeCl₃; 50 µM MnCl₂;

2 μ M tiamin; 1 μ M ZnCl₂. Dodali smo še 1,5 % agarja (Branda in sod., 2006), ustrezne antibiotike (*eps*⁻ mutanti 20 mg/l Tc, *tasA*⁻ mutanti 100 mg/l Sp, *eps*⁻ *tasA*⁻ mutanti 20 mg/l Tc in 100 mg/l Sp ter *pgs*⁻ mutanti 5 mg/l Cm) in 20 μ g/mL barvila Kongo rdeče (Romero in sod., 2010).

3.3 SPREMLJANJE RASTI (RASTNA KRIVULJA)

Kulture smo gojili v tekočem Czapkovem mediju na 37 °C in pri 250 obr./minuto. Hitrost rasti smo spremljali z merjenjem absorbance z optičnim čitalcem Photometer MA 9510, Metrel pri 650 nm. Kulture smo ustrezno redčili, saj pri vrednostih optične gostote nad 1,2 slednja ni več linearno odvisna od celične gostote. Vrednost OD 6 smo npr. izmerili pri 10-krat redčeni kulturi.

3.4 NESTRESANE KULTURE

Tega eksperimenta smo se lotili, ker smo želeli preveriti razlike v tvorbi peliklov pri divjem tipu in pri vseh štirih mutantah (*eps*⁻, *tasA*⁻, *eps*⁻ *tasA*⁻, in *pgs*⁻). Kulture smo gojili v tekočem Czapkovem mediju in jih inkubirali 5 dni pri 37 °C. Vsak dan smo opazovali tvorbo peliklov na površini tekočega medija.

3.5 SPREMLJANJE PORABE GLUKOZE V MEDIJU Z METODO DOLOČEVANJA KONCENTRACIJE REDUKCIJSKIH KONCEV

Uporabili smo podobno metodo, kot jo je opisal Miller (1959). Pri tej metodi detektiramo redukcijska mesta sladkornih komponent v našem vzorcu, kar sovпада s koncentracijo oziroma s številom molekul (kvantitativna metoda). Na ta način lahko sledimo porabi glukoze v mediju in tako zaznamo, kdaj bakterije porabijo vso razpoložljivo glukozo in takrat zaključimo inkubacijo. To reakcijo smo zato izvajali vsak dan. Zgornji prag detekcije te metode je 0,1 % glukoza, zato vzorce ustrezno redčimo.

Za detekcijo sladkornih enot smo uporabljali reagent DNS, ki smo ga pripravili po naslednjem postopku: 5 g 3,5-dinitrosalicilne kisline smo med segrevanjem raztopili v 100 ml 2 M NaOH. V 25 ml H₂O smo med segrevanjem raztopili 150 g K₂Na-tartrata. V 500 ml bučki smo raztopini združili in z vodo dopolnili do 500 ml.

Za izdelavo umeritvene krivulje smo pripravili raztopine glukoze do koncentracije 0,1 w/v % (preračunano na maso glukoznih enot). Pri določevanju koncentracije sladkorjev moramo hkrati z vzorcem vedno sproti pripraviti tudi umeritveno krivuljo, saj nam naklon le-te lahko od testa do testa nekoliko odstopa, s sprotno izdelavo pa se te napake znebimo. Reakcija poteka v steklenih epruveh. 1 ml vzorca, ki smo mu odcentrifugirali celice (12000 obr./minuto, 10 minut), smo dodali 1 ml DNS reagenta, epruveto pokrili s kovinskim zamaškom, dobro premešali in jih kuhali 10 minut pri 100 °C. Epruvete smo nato ohladili na sobno temperaturo. Koncentracijo redukcijskih koncev smo izmerili v mikrotitrski plošči z merjenjem absorbance z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation pri 575 nm.

3.6 DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE NASTALEGA POLISAHARIDA PO KONČANI INKUBACIJI Z METODO CELOKUPNIH SLADKORJEV

S pomočjo metode, ki so jo opisali Cuesta in sod. (2003), zaznamo količino nastalega polisaharida v izrabljenem gojišču (po končani inkubaciji). Metodo uporabimo, ko koncentracija redukcijskih koncev pade na minimum. Zgornji prag detekcije te metode je 0,01 % sladkorjev, zato vzorce ustrezno redčimo.

Pripravimo si umeritveno krivuljo z raztopinami glukoze do koncentracije 0,01 w/v %. Tako, kot pri reakciji določevanja redukcijskih koncev, je tudi tu potrebno pripraviti umeritveno krivuljo vsakič sproti. Za izvedbo testa potrebujemo tudi koncentrirano H₂SO₄ in 5 % fenol. V reakciji pride do pretvorbe glukoznih enot v furfural, ki reagira s fenolom in tvori obarvan produkt. Reakcija poteka v bor-silikatnih vialah s teflonskimi septami. V viale smo odpipetirali 0,3 ml vzorca (celice smo odcentrifugirali pri 12000 obr./minuto, 10 minut), dodali 0,15 ml raztopine fenola in vorteksirali. Nato smo dodali še 0,75 ml

koncentrirane H_2SO_4 , na kratko vorteksirali in takoj ohladili v vodni kopeli na sobno temperaturo. Pri dodajanju kisline je pomembno, da jo vsem vzorcem dodamo enako hitro in da je čas od začetka dodajanja kisline pa do ohlajanja vzorca enak. Hlajenje je pomembno, ker z redčenjem kisline pride do razvitja visoke temperature, kar močno prispeva h končni absorbanci. S hlajenjem znižamo razlike v intervalih ohlajanja med posameznimi vzorci. Nato smo vse vzorce skupaj z raztopinami za pripravo umeritvene krivulje zavili v alu folijo in jih kuhali 20 minut pri 100 °C. Alu folija je pripomogla, da so se vzorci potopili in se kuhali pri enaki temperaturi. Po končani reakciji smo vse vzorce hkrati ohladili v vodni kopeli na sobno temperaturo. Koncentracijo celokupnih sladkorjev smo izmerili v mikrotitrski plošči z merjenjem absorbance z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation pri 490 nm.

3.7 ZAZNAVANJE KONCENTRACIJE NASTALEGA PROTEINA Z BRADFORDOVIM REAGENTOM

Reakcijo izvedemo po končani inkubaciji, saj nas zanima količina nastalega zunajceličnega proteina. Bradfordov reagent se uporablja za določevanje koncentracije proteina v raztopini. Vzorce smo najprej centrifugirali (12000 obr./minuto, 10 minut) in tako odstranili celice. V reakciji nastane kompleks med barvilom Brilliant Blue G in proteini v raztopini, ki povzroči premik v absorpcijskem maksimumu barvila s 465 nm na 595 nm. Absorbanca je proporcionalna količini prisotnega proteina. Umeritveno krivuljo pripravimo z raztopinami govejega serumskega albumina (BSA = bovine serum albumine) kot standardnega proteina.

V mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali po 10 μ l vzorca in raztopin za umeritveno krivuljo (0 – 1 mg/ml BSA). Dodali smo 250 μ l Bradfordovega reagenta, ki smo ga predhodno premešali in ogreli na sobno temperaturo. Inkubacija je potekala na sobni temperaturi 15 minut. Nato smo odčitali koncentracijo proteina z merjenjem absorbance z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation pri 595 nm. Pomembno je, da vrednosti vedno odčitamo po enakem času inkubacije, saj tako zmanjšamo napako.

3.8 MERJENJE VISKOZNOSTI IZRABLJENEGA GOJIŠČA NA ROTACIJSKEM VISKOZIMETRU

Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri 12000 obr./minuto 10 minut, supernatant smo zamrznili. Pred meritvami smo vzorce odtalili in pustili, da se ogrejejo na sobno temperaturo. Meritve so bile opravljene na plate-plate reometru Anton Paar Physican MCR 301, uporabljali smo vreteno PP50 z diametrom 49,975 mm. Razmik med meritvenima ploščama je bil 0,25 mm, temperatura, pri kateri so potekale meritve, pa je bila 20 °C. Rezultat je krivulja v območju merjenja strižne hitrosti od 0-1000 s⁻¹.

3.9 PRIPRAVA VZORCA ZA SAXS

Eksperimenti ozkokotnega sipanja rentgenskih žarkov so bili izvedeni s Kratky kamero (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za fizikalno kemijo). Generator rentgenskih žarkov je bil opremljen z rentgensko cevjo z bakrovo anodo, ki izseva rentgensko svetlobo CuK_α z valovno dolžino (λ) 0,154 nm z močjo 1,4 kW (40 kV, 35 mA). Meritve vzorcev so potekale pri 25 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri 12000 obr./minuto za 10 minut, supernatant smo zamrznili. Pred meritvami smo vzorce odtalili in pustili, da se ogrejejo na sobno temperaturo, nato pa z njimi napolnili kapilaro. Sledilo je merjenje sipanja.

3.10 IZOLACIJA EPS

Uporabili smo skrajšano verzijo izolacije po postopku, kot so ga opisali Morita in sod. (1979). Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri 15000 obr./minuto 20 minut, prelili supernatant in ponovili centrifugiranje, saj se zaradi povečane viskoznosti celice usedajo počasneje. Nato smo dodali NaCl do 0,5 % končne koncentracije, vzorce premešali in raztopine prelili v merilne valje. Previdno smo dolili na 4 °C ohlajeni 96 % etanol (precipitacija EPS s hladnim etanolom) v razmerju 1 : 3 in rahlo premešali. Valje smo pokrili s parafilmom in jih preko noči postavili na 4 °C.

Naslednji dan smo ločili nastale skupke polisaharida od tekočine. Nato smo skupke polisaharida centrifugirali pri 15000 obr./minuto 15 minut in se tako znebili čimveč tekočine. Polisaharid smo postrgali s stene, ga ponovno raztopili v 2 ml destilirane vode in z vzorci napolnili dializne vrečke, ki smo jih zatesnili in dali v destilirano vodo (razmerje 1 : 200) in pustili pri sobni temperaturi. Vodo smo po 24 urah zamenjali in pustili na dializi nadaljnjih 24 ur. Nato smo vsebino dializnih vrečk prelili v tehtiče in jih dali sušiti v pečico na 55 °C. Ko so se vzorci posušili, smo jih stehtali. S postopkom dialize smo se želeli znebiti vseh v gojišču prisotnih soli ter morebitnih ostankov glukoze.

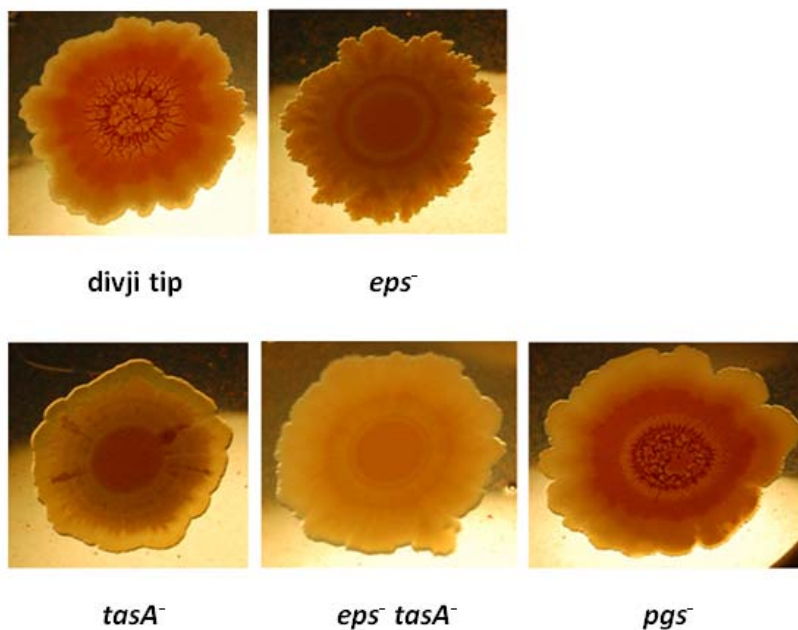
3.11 VSEBNOST NUKLEINSKIH KISLIN

Glede na to, da so poleg polisaharidov in proteinov v EPS prisotne tudi nukleinske kisline, nas je zanimalo, kakšen delež EPS predstavljajo oziroma kako čisti so naši vzorci, saj bi prisotnost nukleinskih kislin lahko močno vplivala na naše teste. Tako smo čistost vzorcev preverjali z merjenjem UV/VIS absorpcijskega spektra od 200-400 nm z optičnim čitalcem Multiscan spectrum, Thermo electron corporation. Znano je, da proteini absorbirajo pri 280 nm, nukleinske kisline pa pri 260 nm. Tako smo lahko iz razmerja A_{260}/A_{280} ocenili, koliko nukleinskih kislin ali proteinov je prisotnih v vzorcu oz. določili čistost vzorca. Razmerje okoli 2,0 pomeni vzorce čistih nukleinskih kislin, razmerje okoli 0,57 pa vzorce proteinov.

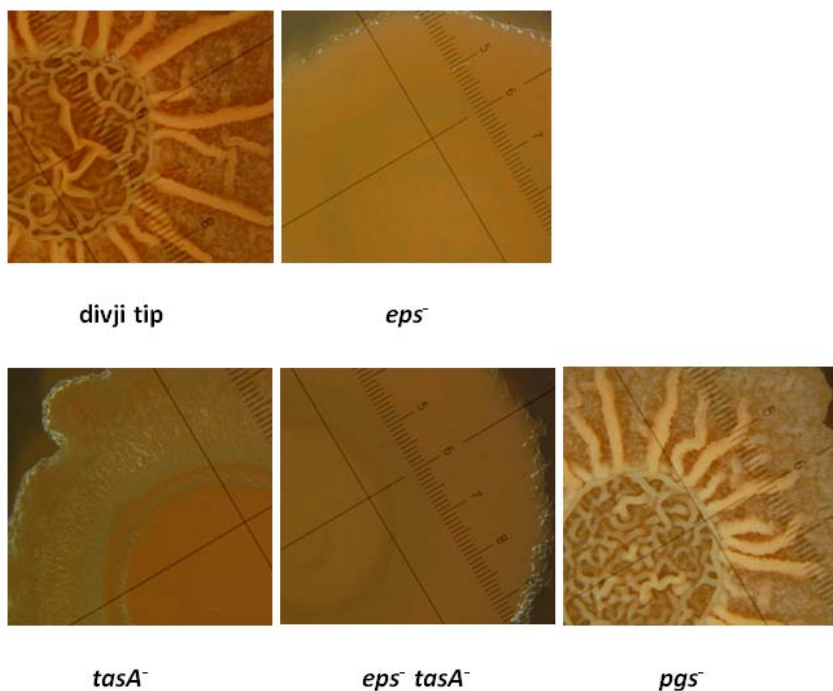
4 REZULTATI

4.1 TVORBA KOLONIJ NA MSgg AGARJU S KONGO RDEČIM

Na ploščah na sliki 7 so vidne razlike med divjim tipom in mutantami. Opazni so koncentrični krogi, ki različno vežejo barvilo Kongo rdeče pri različnih sevih. Poleg obarvanosti se razlikujejo tudi robovi kolonij. Morfološko sta si najbolj podobni koloniji divjega tipa in mutante *pgs*⁻. Pri divjem tipu, ki ima vse potrebne komponente za tvorbo funkcionalnega biofilma, je opazna nagubanost površine kolonij in njihova kompleksna struktura (slika 8). Ker kolonije mutante *pgs*⁻ kažejo enake ali zelo podobne značilnosti kot kolonije divjega tipa, lahko sklepamo, da γ -poliglutamat nima zelo pomembne vloge pri tvorbi biofilma na površinah trdnih gojišč. Kljub temu so opazne razlike v osrednjem delu pri tvorbi zračnih struktur. Pri ostalih mutantah ni prišlo do nastanka zračnih struktur. Kolonije mutant *eps*⁻ imajo najbolj razčlenjene robove kolonij. Kolonije mutant *tasA*⁻ imajo prosojne robove. Ker Kongo rdeče veže protein TasA, smo pričakovali, da *tasA*⁻ mutanta ne bo obarvana, vendar kljub temu kultura v osrednjem delu kolonije veže barvilo. Dvojna mutanta, ki ne producira ne polisaharida, ne proteina (*eps*⁻ *tasA*⁻), ima podobne robove in obarvanost kot *tasA*⁻ mutanta.



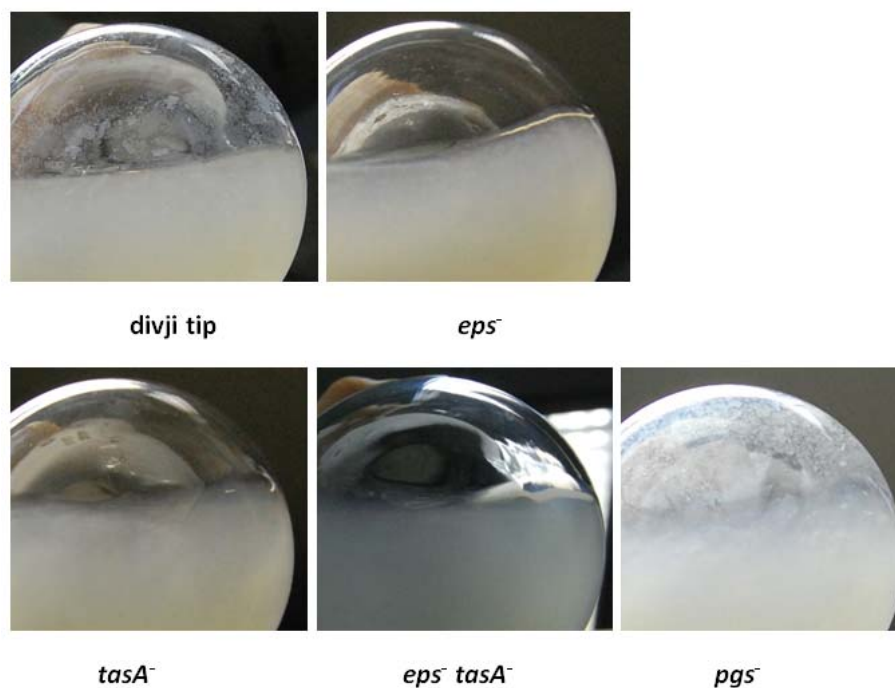
Slika 7: Kolonije bakterije *Bacillus subtilis* na trdnem gojišču MSgg s Kongo rdečim.



Slika 8: Sredine kolonij divjega tipa in mutant na trdnem gojišču MSgg s Kongo rdečim. Lepo so vidne od trdnega gojišča dvignjene zračne strukture pri divjem tipu in mutanti *pgs*⁻, ki jih ne opazimo pri ostalih treh mutantih. Slikali smo jih skozi lupo Leica wild M10.

4.2 TVORBA BIOFILMOV V NESTRESANIH KULTURAH

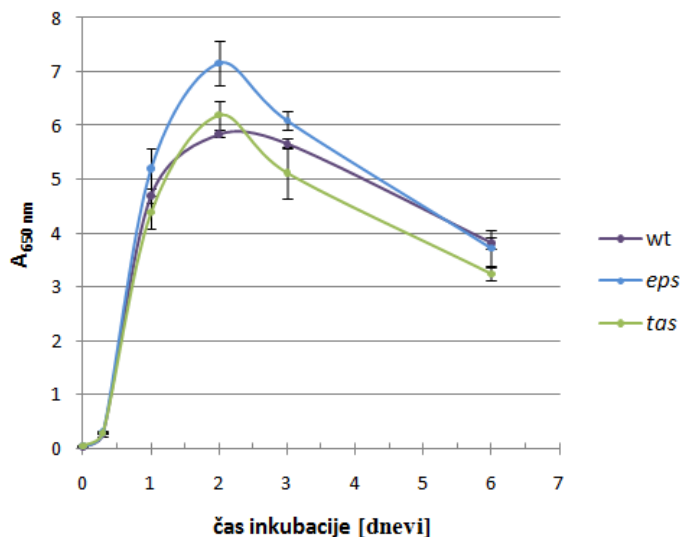
Najbolj kompaktno strukturo biofilma oziroma pelikla smo opazili pri divjem tipu in pri *pgs*⁻ mutanti, pelikel se ni razdrl niti ob rahlem premikanju. Pelikli so bili tudi najdebelejši pri teh dveh kulturah. Med *eps*⁻ in *tasA*⁻ mutanto ni bilo opaziti razlik, pelikel je bil pri obeh tanjši kot pri divjem tipu in *pgs*⁻ mutanti. Najmanj biofilma je nastalo pri dvojni mutanti *eps*⁻ *tasA*⁻, kjer je bilo opaznih nekaj manjših, med seboj nepovezanih kosmičev.



Slika 9: Pelikli bakterije *Bacillus subtilis* na površini tekočega Czapkovega gojišča. Na slikah se vidi dno erlenmajerice, ki smo jih za slikanje nagnili, zato se je pelikel oprijel stekla. Z nagibanjem smo delno porušili povezanost biofilma. Divji tip in *pgs*⁻ mutanta sta tvorila zelo podoben biofilm, vendar se je biofilm slednje bolje oprijel stekla. Mutanti *eps*⁻ in *tasA*⁻ sta tvorili slabše strukturiran pelikel, pri *eps*⁻ *tasA*⁻ mutanti pa je prišlo do nastanka le nekaj med seboj nepovezanih kosmičev.

4.3 SPREMLJANJE HITROSTI RASTI

Iz slike 10 je razvidno, da so lag faze enako dolge pri vseh mutantah, manjše razlike se pokažejo proti koncu eksponentne faze. Razlikuje pa se maksimalna dosežena optična gostota. Najvišja je pri *eps*⁻ mutanti, pri kateri doseže vrednost 7,2 po približno 48 urah inkubacije. Najmanjšo vrednost doseže divji tip, kjer maksimalna optična gostota znaša 5,8.



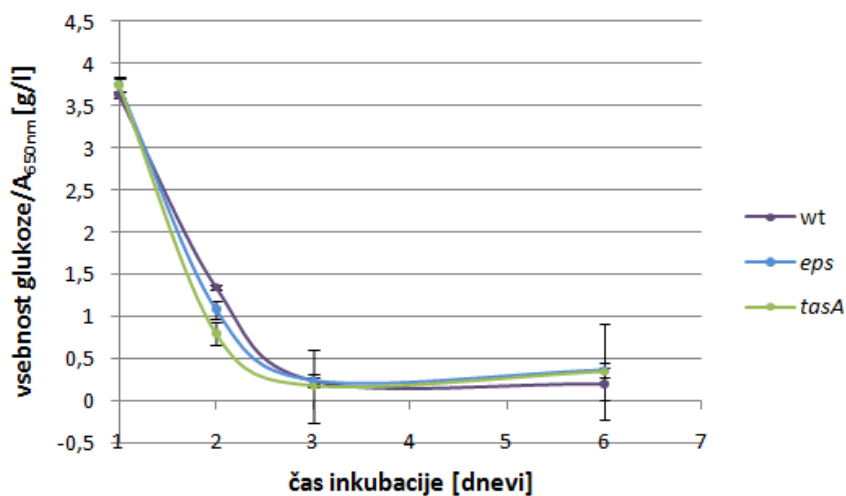
Slika 10: Rastna krivulja bakterije *Bacillus subtilis* in mutant *tasA*⁻ in *eps*⁻ v tekočem Czapkovem mediju. Okrajšava wt pomeni divji tip. Meritve so bile ponovljene trikrat. Prikazana je srednja vrednost in standardna deviacija.

Podvojevalni časi se med mutantami ne razlikujejo bistveno. V 24 urah so se bakterije divjega tipa in mutante *eps*⁻ v eksponentni fazi podvojile 5,9 krat, bakterije mutante *tasA*⁻ pa 5,6 krat. Za izračun tega podatka smo uporabili enačbo (1), pri kateri je OD vrednost po 24-ih urah, OD₀ vrednost po 7-ih urah in n število delitev bakterij.

$$N = N_0 \cdot 2^n \approx OD = OD_0 \cdot 2^n \quad \dots(1)$$

4.4 ZAZNAVANJE PORABE GLUKOZE Z METODO DOLOČEVANJA REDUKCIJSKIH KONCEV

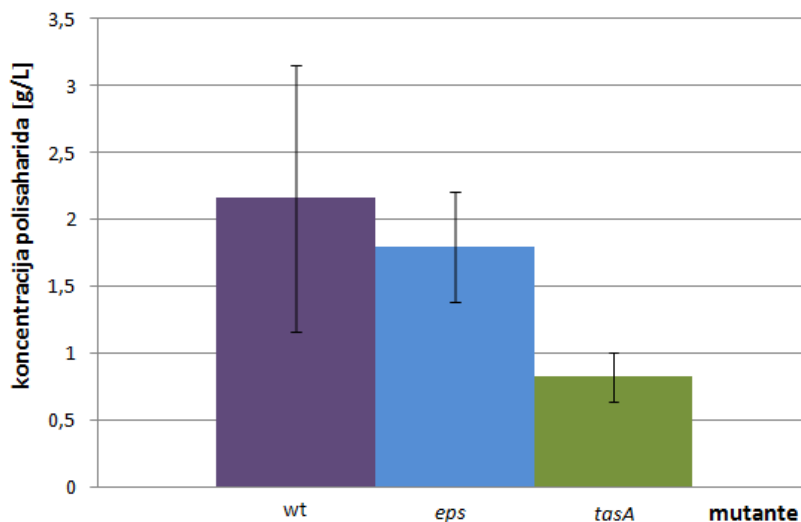
Na sliki 11 je prikazana poraba glukoze pri divjem tipu in mutantih. Vrednosti vsebnosti glukoze smo delili z optično gostoto. Kinetika porabe glukoze med mutantami je bila različna. Glukoza se je najhitreje porabila pri *tasA*⁻ mutanti, ki je po dveh dneh inkubacije porabila signifikantno ($p = 0,0244$) več glukoze kot *eps*⁻ mutanta. Prav tako se poraba statistično signifikantno ($p = 0,0024$) razlikuje od porabe pri divjem tipu. Po treh dneh inkubacije so bakterije porabile večino glukoze, koncentracija preostale glukoze se ne razlikuje signifikantno.



Slika 11: Spremljanje porabe glukoze pri divjem tipu in *eps*⁻ ter *tasA*⁻ mutanti bakterije *Bacillus subtilis*. Vsebnost glukoze smo v vsaki točki delili z optično gostoto, da bi tako dobili realno sliko porabe glukoze. Točke 0 nismo prikazali zaradi preglednosti, saj je razmerje med vsebnostjo glukoze in optično gostoto v času 0 zelo visoko. Meritve so bile ponovljene trikrat. Prikazana je srednja vrednost in standardna deviacija.

4.5 DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE NASTALEGA POLISAHARIDA

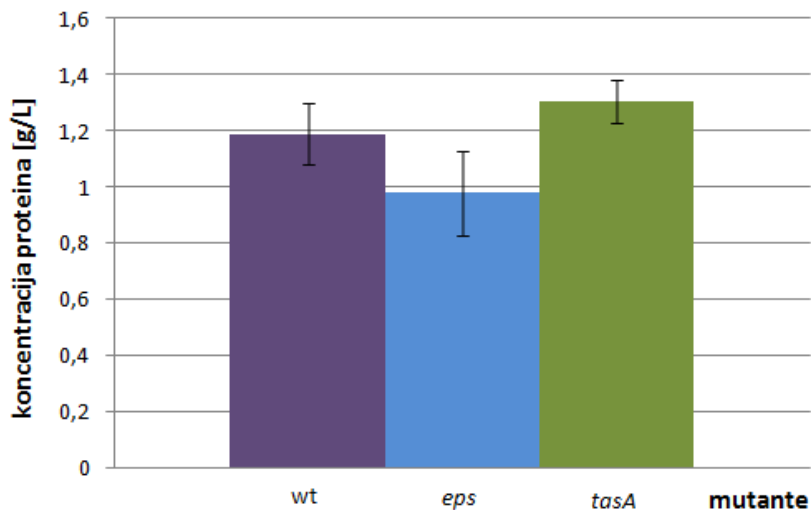
Iz rezultatov ne moremo sklepati, da je pri divjem tipu nastalo več zunajceličnega polisaharida kot pri *eps*⁻ mutanti, saj so standardne deviacije visoke in razlika ni statistično ($p = 0,0015$) različna od *eps*⁻ mutante, razlikuje se tudi od divjega tipa ($p = 0,0748$).



Slika 12: Koncentracija polisaharida z metodo določevanja celokupnih sladkorjev pri divjem tipu in mutantih bakterije *Bacillus subtilis*. Meritve so bile ponovljene trikrat. Prikazana je srednja vrednost in standardna deviacija.

4.6 KONCENTRACIJA NASTALEGA PROTEINA

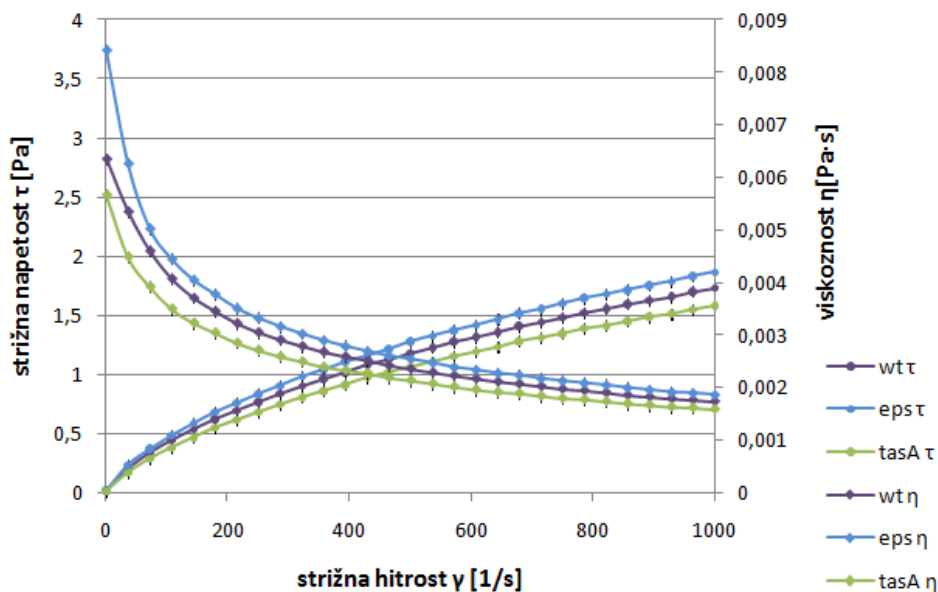
Najvišjo koncentracijo nastalega zunajceličnega proteina smo zaznali pri *tasA*⁻ mutanti, kar je v nasprotju z našimi pričakovanji, najnižjo pa pri *eps*⁻ mutanti. Produkcija proteina se med mutantama *eps*⁻ in *tasA*⁻ signifikantno razlikuje ($p < 0,0001$). Razlika z divjim tipom ni signifikantna. Biomase celic pri vrednotenju proteina nismo upoštevali, ker se optične gostote celic v gojišču po končani inkubaciji niso bistveno razlikovale ($OD = 5,6 \pm 0,5$).



Slika 13: Zaznavanje koncentracije nastalega proteina pri divjem tipu in mutantah bakterije *Bacillus subtilis*. Meritve so bile ponovljene trikrat. Prikazana je srednja vrednost in standardna deviacija.

4.7 VISKOZNOST

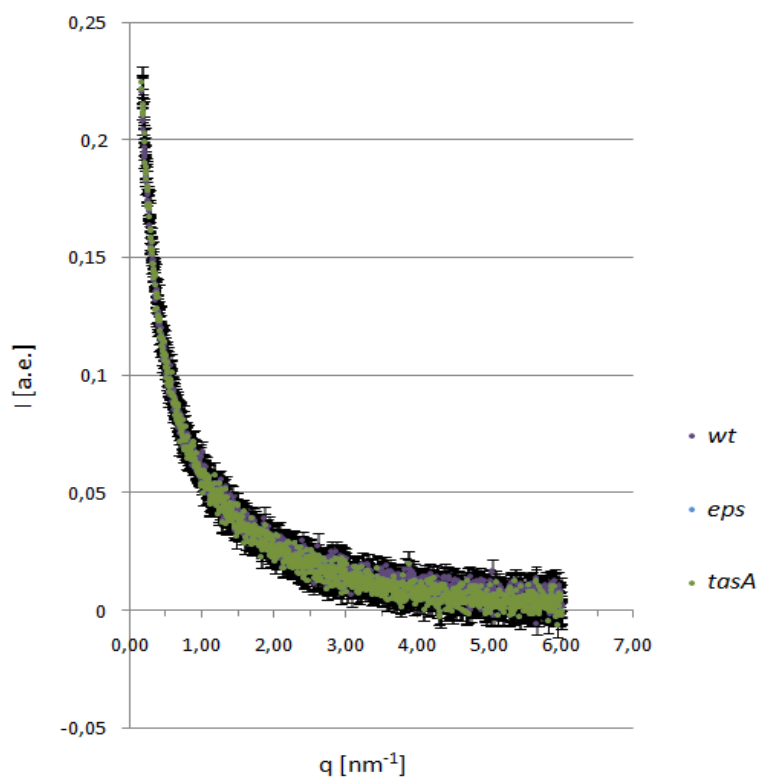
Na sliki 14 je prikazana strižna napetost (τ) v odvisnosti od strižne hitrosti (γ). Viskoznost predstavlja naklon krivulje. Na sliki 15 je prikazana tudi sprememba viskoznosti v odvisnosti od hitrosti tekočine. Meritve viskoznosti smo opravili v izrabljenem gojišču po končani inkubaciji. Optične gostote celic v gojišču se niso bistveno razlikovale ($OD = 5,6 \pm 0,5$). Viskoznost izrabljenih gojišč je bila odvisna od hitrosti toka tekočine. Vsa izrabljena gojišča so se obnašala kot psevdoplastične tekočine. Najvišjo viskoznost imajo pri najnižjih strižnih hitrostih. Viskoznost z višanjem strižne hitrosti nelinearno pada. Najbolj viskozna je raztopina *eps*⁻ mutante, najmanj pa raztopina *tasA*⁻ mutante. Pri višjih strižnih hitrostih se razlike med mutantami manjšajo.



Slika 14: Primerjava strižnih napetosti in viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti pri divjem tipu in mutantah *eps*⁻ in *tasA*⁻ bakterije *Bacillus subtilis*. Meritve so bile ponovljene trikrat. Prikazana je srednja vrednost in standardna deviacija.

4.8 SAXS SIPALNA KRIVULJA

Na sliki 15 so prikazane SAXS krivulje, na katerih je $I(q)$ intenziteta sipanega žarka, q pa je sipalni vektor. Iz grafa je razvidno, da je glavčina sipanja pri divjem tipu in mutantah pri majhnih q , kar kaže na prisotnost večjih struktur v EPS. S to metodo ne zaznamo statistično značilnih razlik v strukturiranosti med eps^- in $tasA^-$ mutanto in divjim tipom.



Slika 15: SAXS sipalna krivulja $I(q)$ v odvisnosti od kota sipanih žarkov pri divjem tipu in eps^- ter $tasA^-$ mutanti. Eksperimentalna napaka je prikazana le za podatke pri divjem tipu. Med meritvami ni bilo statistično značilnih razlik v intenziteti sipanja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo preučevali razlike v sestavi EPS pri bakteriji *Bacillus subtilis* 3610 pri divjem tipu ter pri štirih mutantih, ki so imele okvarjeno produkcijo polisaharida (*eps*⁻), produkcijo zunajceličnega proteina (*tasA*⁻), produkcijo polisaharida in proteina (*eps*⁻ *tasA*⁻) ter produkcijo poliglutamata (*pgs*⁻).

Z gojenjem na trdnih gojiščih MSgg s Kongo rdečim smo dokazali razlike v morfologiji kolonij, ki so posledice specifičnih mutacij. Iz rezultatov izhaja, da ima TasA vsaj tako pomembno vlogo pri strukturiranosti biofilma kot zunajcelični polisaharid. V primeru, ko je bil v koloniji prisoten bodisi TasA ali polisaharid, je kolonija ohranila določeno stopnjo organiziranosti. Pri dvojni mutanti, kjer sta bila odstranjena tako polisaharid kot TasA, je stopnja organiziranosti kolonije vidno zmanjšana. Podobno je v nestresanih kulturah prišlo do tvorbe kompaktnih peliklov le pri divjem tipu in pri *pgs*⁻ mutanti. Pri *eps*⁻ in *tasA*⁻ mutanti so bili le - ti opazno šibkejši. Pri dvojni mutanti *eps*⁻ *tasA*⁻ pa se EPS niti ni povezal v enotno strukturo, ampak smo opazili posamezne slabo strukturirane kosmiče.

Glede na dobljene morfološke razlike smo pričakovali znatne razlike tudi pri ostalih opazovanih fizikalno-kemijskih parametrih. Podvojevalni časi se ne razlikujejo bistveno, razlikuje pa se maksimalna dosežena optična gostota, ki je največja pri *eps*⁻ mutanti. Hkrati pa je *tasA*⁻ mutanta najhitreje porabljala glukozo, proizvedla je največ proteinov, česar nismo pričakovali, proizvedla je signifikantno manj polisaharidov in je imela najmanjšo viskoznost. Na drugi strani je *eps*⁻ mutanta proizvedla nekoliko manj polisaharidov in proteinov, nepričakovano pa je bila viskoznost tu največja. Povečanje viskoznosti pri *eps*⁻ mutanti, ki tvori najmanj zunajceličnega materiala, je presenetljivo in trenutno nimamo ustrezne razlage, zakaj je do tega prišlo. Odgovor bi lahko ponudili rezultati SAXS meritev, vendar pa iz rezultatov SAXS meritev izhaja, da ni znatnih razlik v elektronski gostoti med različnimi vzorci in posledično razlik v strukturiranosti med EPS divjega tipa

in mutant. Ti rezultati nakazujejo, da gre pri tvorbi EPS za kompleksno dogajanje, ki ni skladno z enostavnim modelom: ena mutacija, ena spremenjena lastnost.

Pri postavljanju hipotez za to diplomsko nalogo smo se naslonili na racionalno predvidevanje, da bo delecija gena za izbrano fenotipsko lastnost povzročila spremembo te lastnosti. Rezultati kažejo, da z uporabljenimi metodami ne moremo potrditi hipoteze, da mutanta *eps⁻* tvori manj celokupnih polisaharidov od divjega tipa, ali da mutanta *tasA⁻* producira manj celokupnega izvenceličnega proteina kot divji tip. To kaže na visoko sposobnost celic, da primanjkljaj v izbranem polisaharidu ali proteinu kompenzirajo s produkcijo funkcijsko sorodnih komponent v EPS. Prav tako iz rezultatov te naloge izhaja, da trenutni strukturni model za *Bacillus subtilis* pripisuje preveliko vlogo pri nastanku EPS proteinu TasA, ki ga kodira *yqxM-sipW-tasA* operon in polisaharidu, ki ga kodira *epsA-O* operon. Tudi, če oba odstranimo, še vedno dobimo EPS, ki pa ima spremenjene nekatere fizikalno-kemijske lastnosti. Izgleda, da je EPS bakterije *Bacillus subtilis* dokaj prilagodljiva struktura, ki je vezana na specifične in generične lastnosti udeleženih proteinov in polisaharidov (npr. sposobnost lepljenja zaradi polisaharidov in sposobnost prostorskega organiziranja zaradi proteinov).

5.2 SKLEPI

- Opazovanje kolonij na trdnih gojiščih MSgg s Kongo rdečim kaže na morfološke razlike med divjim tipom in mutantami,
- Delecija proteina TasA, ki ga kodira *yqxM-sipW-tasA* operon, ali polisaharida, ki ga kodira *epsA-O* operon, ne spremeni znatno koncentracije izvenceličnih proteinov ali polisaharidov,
- mutacije *tasA⁻* ali *eps⁻* spremenijo viskoznost, vendar ne spremenijo strukturiranosti EPS, kot kažejo SAXS meritve.

6 POVZETEK

Zunajcelične polimerne substance (EPS) imajo pomembno vlogo pri celični agregaciji, celični adheziji in tvorbi biofilma, poleg tega pa tudi ščitijo celice pred okoljskimi spremembami. EPS sestavljajo makromolekule, v največjem deležu so zastopani polisaharidi in proteini. Njihove strukturne lastnosti so slabše poznane.

Za preučevanje EPS smo izbrali bakterijo *Bacillus subtilis*, in sicer divji tip 3610 ter štiri mutante (*eps*⁻, *tasA*⁻, *eps*⁻*tasA*⁻, *pgs*⁻). Želeli smo preveriti, ali se mutante omenjene bakterije na makroskopskem nivoju razlikujejo od divjega tipa in med seboj. Zanimale so nas razlike na nivoju morfologije kolonij. V ta namen smo divji tip in mutante nacepili na trdno gojišče MSgg s Kongo rdečim. Razlike smo pokazali tudi pri gojenju kultur v tekočem Czapkovem mediju brez stresanja. V nadaljevanju smo se lotili preučevanja razlik v sestavi EPS s fizikalno – kemijskimi metodami. Spremljali smo porabo glukoze v tekočem Czapkovem mediju z metodo določevanja koncentracije redukcijskih koncev z DNS reagentom. Ko je koncentracija glukoze v mediju padla na minimum, smo zaključili inkubacijo. V izrabljenem gojišču smo določali koncentracijo nastalega polisaharida z metodo celokupnih sladkorjev. Ker so poleg polisaharidov pomemben del EPS tudi proteini, smo izmerili tudi koncentracijo nastalega proteina z Bradfordovim reagentom. Meritve določevanja viskoznosti smo izvedli na rotacijskem viskozimetru, natančnejšo strukturo oziroma razlike v strukturi EPS med divjim tipom in mutantama *eps*⁻ ter *tasA*⁻ pa smo poskušali dobiti z meritvami SAXS.

Z gojenjem na trdnih gojiščih MSgg s Kongo rdečim smo dokazali razlike v morfologiji kolonij, ki so posledice specifičnih mutacij. Pokazali smo, da imata tako polisaharid kot protein TasA pomembno vlogo pri strukturiranosti biofilma. Ko je manjkala le ena od komponent, je kolonija ohranila določeno stopnjo organiziranosti. Ob odsotnosti polisaharida in proteina TasA, pa je stopnja organiziranosti kolonije vidno zmanjšana. Podobno je v nestresanih kulturah prišlo do tvorbe kompaktnih peliklov le pri divjem tipu in pri *pgs*⁻ mutanti. Pri *eps*⁻ in *tasA*⁻ mutanti so bili ti opazno šibkejši. Pri dvojni mutanti *eps*⁻ *tasA*⁻ pa smo opazili samo posamezne slabo strukturirane kosmiče.

Na podlagi teh rezultatov smo predvidevali znatne razlike tudi pri ostalih opazovanih parametrih. Najvišjo maksimalno optično gostoto je dosegla *eps*⁻ mutanta. *tasA*⁻ mutanta je najhitreje porabljala glukozo, nepričakovano je producirala signifikantno manj polisaharidov, imela je tudi najmanjšo viskoznost. Na drugi strani je *eps*⁻ mutanta producirala nekoliko manj polisaharidov in proteinov, viskoznost je bila tu največja. Iz rezultatov SAXS meritev izhaja, da ni znatnih razlik v elektronski gostoti med različnimi vzorci in posledično ni razlik v strukturiranosti med EPS divjega tipa in mutant.

Tvorba EPS je kompleksno dogajanje, ki ni skladno z enostavnim modelom: ena mutacija, ena spremenjena lastnost. Rezultati kažejo, da imajo celice visoko sposobnost, da primanjkljaj v izbranem polisaharidu ali proteinu v EPS kompenzirajo s produkcijo funkcijsko sorodnih komponent. EPS, ki ga tvori bakterija *Bacillus subtilis*, je očitno dokaj prilagodljiva struktura, ki je vezana tako na generične kot na specifične lastnosti udeleženih proteinov in polisaharidov.

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
- A&D Weighing. 2010. Measuring viscosity. San Jose, A&D Weighing: 2 str.
<http://www.andweighing.com/and.nsf/html/measuring+viscosity> (14. avg. 2010)
- Bai U., Mandič-Mulec I., Smith I. 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes & Development*, 7: 139-148
- Blair K.M., Turner L., Winkelman J.T., Berg H.C., Kearns D.B. 2008. A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science*, 320: 1636-1638
- Borgio J.F., Bency B.J., Ramesh S., Amuthan M. 2008. Exopolysaccharide production by *Bacillus subtilis* NCIM 2063, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2862 and *Streptococcus mutans* MTCC 1943 using batch culture in different media. *African Journal of Biotechnology*, 9, 20: 5454-5457
- Branda S.S., Gonzales-Pastor J.E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy for Sciences of the United States of America*, 98, 20: 11621-11626
- Branda S.S., Gonzales-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 Å., 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 *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59, 4: 1229-1238
- 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
- Chen M.Y., Lee D.J., Tay J.H., Show K.Y. 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 467-474
- 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
- Chu F., Kearns D., McLoon A., Chai Y., Kolter R., Losick R. 2008. A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 68, 5: 1117-1127

- Cuesta G.C., 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
- Czaczyk K., Myszk K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 6: 799-806
- Dogša I., Kriechbaum M., Stopar D., Laggner P. 2005. Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS. *Biophysical Journal*, 89: 2711-1720
- Dogša 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
- Dore J.C., North A.N., Rigden J.S. 1995. Small-angle scattering studies of meso-scopic structures with synchrotron X-rays. *Radiational Physical Chemistry*, 45, 3: 413-426
- Gandhi H.P., Ray R.M., Patel R.M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate Polymers*, 34: 323-327
- Kearns D.B., Chu F., Branda S.S., Kolter R., Losick R. 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55, 3: 739-749
- Kearns D.B. 2008. Division of labour during *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 67, 2: 229-231
- Kobayashi K. 2007. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of Bacteriology*, 189, 13: 4920-4931
- Kumar C.G., Joo H.S., Choi J.W., Koo Y.M., Chang C.S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 673-681
- 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
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development*, 23: 1631-1638
- Manca M.C., Lama L., Improta R., Esposito E., Gambacorta A., Nicolaus B. 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 9: 3265-3269
- Mary M.S., Gopal J., Tata B.V.R., Rao T.S., Vincent S. 2008. A Confocal microscopic study on colony morphology and sporulation of *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2435-2442
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428
- Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S. 2006. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. *Microbiology*, 152: 2801-2807

- 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 Preference, Series B, 34: 57-66
- Omoike A., Chorover J. 2006. Adsorption to goethite of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 70: 827-838
- Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. Proceedings of the National Academy for Sciences of the United States of America, 107, 5: 2230-2234
- Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. Genes & Development, 22: 945-953
- Winkelman J.T., Blair K.M., Kearns D. 2009. RemA (YlzA) and RemB (YaaB) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 191, 12: 3981-3991
- Yun U.J., Park H.D. 2003. Physical properties of an extracellular polysaccharide produced by *Bacillus* sp. CP912. Letters in Applied Microbiology, 36: 282-287

ZAHVALA

Prof. dr. Davidu Stoparju se zahvaljujem za organizacijo celotne izdelave diplomske naloge, usmerjanje tekom eksperimentalnega dela in pozitiven pristop tudi takrat, ko stvari niso tekle po načrtu.

Mojemu delovnemu mentorju, dr. Iztoku Dogši, se zahvaljujem za stalno pomoč pri eksperimentalnem delu in ker si je vedno vzel čas, ko sem ga potrebovala.

Prof. dr. Darji Žgur-Bertok se zahvaljujem za hiter pregled diplomske naloge.

Mlademu raziskovalcu Janezu Orehku se zahvaljujem za koristne napotke, ki so mi gotovo skrajšali čas, ki bi ga sicer potrebovala za korektno izvedbo metod.

Svojim staršem se zahvaljujem za finančno podporo, ki mi je omogočila dokončanje tega študija.

Posebno zahvalo si zasluži moj fant Blaž Perko za stalno podporo in razumevanje na vseh področjih.

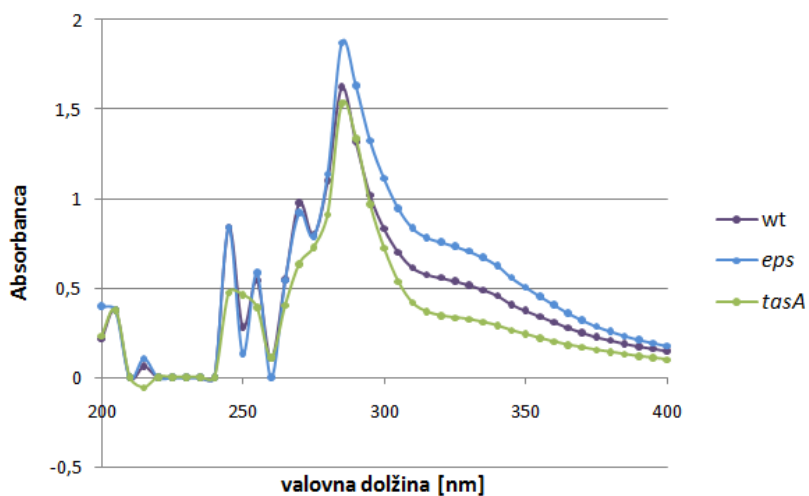
PRILOGE

Priloga A: Rezultati izolacije EPS. Masa izoliranih in posušenih EPS iz 40 ml vzorca in njihove preračunane vrednosti v 1 L

mutante	m [mg/L]	c [mg/L]
wt	8,5	21,25
<i>eps</i> ⁻	5,3	13,25
<i>tasA</i> ⁻	11,1	27,75

Rezultati izolacije EPS kažejo, da produkcija EPS s strani bakterije *Bacillus subtilis* znatna. Divji tip producira 8,5 mg/L. Mutanta *tasA*⁻ je producirala več materiala kot divji tip bakterije, medtem ko je *eps*⁻ mutanta producirala manj EPS. Lahko sklepamo, da EPS tvorijo tako divji tip bakterije kot njegovi mutanti *eps*⁻ in *tasA*⁻. S postopkom izolacije smo izključili možnost, da bi ostanki glukoze ali oligosaharidi bili bistven del celokupnih sladkorjev. Rezultati predstavljajo podatke za eno meritev in jih zato nismo upoštevali v nalogi.

Priloga B1: Preverjanje čistosti vzorca z merjenjem absorbance pri različnih valovnih dolžinah



Slika prikazuje izmerjeno absorbance v odvisnosti od valovne dolžine na območju od 200-400 nm. Proteini absorbirajo pri 280 nm, nukleinske kisline pa pri 260 nm.

Priloga B2: Rezultati čistosti vzorcev.

mutante	A_{260}/A_{280}
wt	0,096
<i>eps</i> ⁻	0,096
<i>tasA</i> ⁻	0,120

Bistvenih razlik med divjim tipom in mutantami nismo izmerili. Rezultati kažejo, da je vsebnost nukleinskih kislin v vzorcih zelo majhna in zato lahko izključimo možnost, da bi te vplivale na rezultate drugih testov. Te meritve smo izvedli samo enkrat, zato jih nismo upoštevali v nalogi.