

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Simon SRETENOVIĆ

**VLOGA LEVANA PRI STRUKTURIRANJU
BAKTERIJSKIH BIOFILMOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Simon SRETENOVIĆ

**VLOGA LEVANA PRI STRUKTURIRANJU BAKTERIJSKIH
BIOFILMOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

THE ROLE OF LEVAN IN STRUCTURING BACTERIAL BIOFILMS

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti in Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za fiziko, Fakultete za matematiko in fiziko Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorja asist. dr. Iztoka Dogšo in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrih.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentor: asist. dr. Iztok Dogša

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora:

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

Simon Sretenović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 579.26:544.1:544.35(043)=163.6
- KG biofilmi / *Bacillus subtilis* / EPS / levan / fazna separacija / reologija / mehanska sklopitev gibanja bakterij / optična pinceta / mikroskopija
- AV SRETENOVIĆ, Simon, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA STOPAR, David (mentor) / DOGŠA, Iztok (somentor) / POKLAR ULRIH, Nataša (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
- LI 2015
- IN VLOGA LEVANA PRI STRUKTURIRANJU BAKTERIJSKIH BIOFILMOV
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
- OP XII, 62 str., 4 pregl., 22 sl., 7 pril., 95 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Mikroorganizmi živijo v naravnih habitatih kot posamezne, prosto plavajoče celice, pogosteje pa v združbah, ki jih imenujemo biofilmi. Poleg celic biofilmi vsebujejo tudi zunajcelične polimerne snovi (EPS), ki povezujejo celice in omogočajo arhitekturno kompleksnost biofilmov. Bakterija *Bacillus subtilis* lahko v gojišču bogatemu s saharozo sintetizira fruktan levan, ki predstavlja večino suhe mase EPS. Levan pa ne odraža viskoelastičnega obnašanja, ki je značilno za EPS biofilma. V nalogi smo raziskali, kako dodatek ostalih komponent EPS prispeva k spremembam reološkega obnašanja levana. Ugotovili smo, da dodatek DNA levanu, ki ga proizvajajo bakterije *B. subtilis*, *Zymomonas mobilis* in *Erwinia herbicola*, povzroči agregacijo levanskih delcev in fazno separacijo levana in DNA ter hkrati znatno poveča viskoznost in psevdoplastičnost zmesi. Dodatno smo s pomočjo optične pincete dokazali mehansko sklopitev gibanja bakterij preko medceličnih povezav pri zgodnjih časih gojenja. Z aktivnim celičnim metabolizmom ter časom gojenja se je domet medceličnih povezav večal. Del rezultatov te naloge je bil objavljen v revijah *Biophysical Journal*, *Langmuir* in *ACSi*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.26:544.1:544.35(043)=163.6
CX biofilms / *Bacillus subtilis* / EPS / levan / phase separation / rheology / mechanical coupling of bacteria / optical tweezers / microscopy
AU SRETENOVIĆ, Simon
AA STOPAR, David (supervisor) / DOGŠA, Iztok (co-advisor) / POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TY THE ROLE OF LEVAN IN STRUCTURING BACTERIAL BIOFILMS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 62 p., 4 tab., 22 fig., 7 ann., 95 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In natural habitats, microorganisms prefer a community-based lifestyle in biofilms to a planktonic existence. Biofilms are composed of cells and extracellular polymeric substances (EPS) which bind cells together and form architecturally complex biofilms. In a growth medium rich with sucrose, bacterium *Bacillus subtilis* synthesizes fructan levan which is the major component of an EPS dry mass. However, levan does not reflect viscoelastic behavior of the EPS. In this work we studied how the addition of the other EPS components to levan contributes to the rheological behavior of the mixture. The results indicate that the addition of DNA caused aggregation of levan spherical particles, which induced phase separation of levan and DNA and increased viscosity and a shear thinning behavior of the mixture. In addition, using optical tweezers, we have demonstrated the existence of mechanical coupling of bacteria via intercellular connections during early exponential growth phase. With active metabolism and growth the range of bacterial coupling increased. Part of the results were published in Biophysical Journal, Langmuir, and ACSi.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJA NALOGE.....	1
1.2 DELOVNI HIPOTEZI	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BIOFILMI	2
2.1.1 Pojavne oblike biofilmov in njihovo preučevanje v laboratoriju.....	2
2.1.2 Prednosti življenja bakterij v biofilmih.....	3
2.1.3 Struktura biofilmov	4
2.1.4 Razvoj biofilmov	5
2.1.5 Regulacija razvoja biofilmov	7
2.1.6 Vloga posameznih komponent zunajceličnega matriksa biofilmov	8
2.1.6.1 Levan.....	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Kemikalije	14
3.1.2 Gojišča	15
3.1.3 Bakterijski sevi.....	15
3.2 METODE	15
3.2.1 Priprava suspenzij levana in raztopin DNA	15
3.2.2 Priprava zmesi levana, DNA in DAPI	16
3.2.3 Priprava preparatov in svetlobna mikroskopija	16
3.2.4 Določitev premora levanskih delcev.....	17
3.2.5 Določitev odstotka raztopljenega levana v suspenziji	17
3.2.6 Določitev površine, ki jo pokrivajo skupki levana	17
3.2.7 Tretiranje zmesi levana in DNA z DNazo I.....	18

3.2.8	Makroreologija levana, DNA in njunih zmesi	18
3.2.9	Mikroreologija levana, DNA in njunih zmesi	18
3.2.9.1	Teorija aktivne enodelčne mikroreologije.....	19
3.2.10	Gelska elektroforeza bakterijske in lososove DNA	20
3.2.11	Sonikacija levana <i>Erwinia herbicola</i>	20
3.2.11.1	Določitev <i>Mn</i> levana in dekstrana z metodo HPSEC.....	21
3.2.11.2	Določitev koncentracije redukcijskih koncev levana, dekstrana in fruktoze z metodo BCA.....	23
3.2.12	Gojitev bakterij.....	24
3.2.12.1	Gojitev stresanih kultur	24
3.2.12.2	Spiranje celic in ponovna gojitev stresanih kultur	24
3.2.12.3	Gojitev plavajočih biofilmov	25
3.2.13	Določitev makroreoloških lastnosti stresanih kultur	25
3.2.14	Priprava preparatov in presevna elektronska mikroskopija divjega tipa <i>Bacillus subtilis</i>	25
3.2.15	Določanje mehanske sklopitve gibanja bakterij z optično pinceto	26
3.2.16	Encimska razgradnjva medceličnih povezav	27
3.2.17	Fluorescenčna mikroskopija.....	28
4	REZULTATI	29
4.1	MIKROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA LEVANSKIH DELCEV	29
4.2	DODATEK DNA RAZTOPINI LEVANA POVZROČI FAZNO SEPARACIJO	32
4.3	RAZTAPLJANJE LEVANSKIH DELCEV	36
4.4	MAKRO- IN MIKROREOLOGIJA LEVANA, DNA IN NJUNIH ZMESI.....	38
4.5	MEDCELIČNE POVEZAVE PRI ZGODNJIH ČASIH GOJENJA <i>Bacillus subtilis</i>	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1	RAZPRAVA.....	48
5.2	SKLEPI.....	53
6	POVZETEK.....	54
7	VIRI.....	55
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti standardov dekstrana za HPSEC po specifikacijah proizvajalca.	15
Preglednica 2: Povprečni premer delcev 1 % (w/v) suspenzij levanov v topilu PBS in odstotek raztopljenega levana v suspenziji.	30
Preglednica 3: Povprečni premer delcev treh levanov v vodi pri različnih koncentracijah.	30
Preglednica 4: Odstotek površine, ki jo zavzamejo skupki levana <i>Erwinia herbicola</i>	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvojne stopnje v tvorbi biofilma (Van Houdt in Michiels, 2005: 627).	5
Slika 2: Poenostavljen prikaz regulatorne mreže preklopa med pritrjenim in planktonskim načinom življenja bakterije <i>Bacillus subtilis</i> (Lemon in sod., 2008: 9).	8
Slika 3: Shematski prikaz vezave eDNA z ostalimi biopolimeri in metaboliti v EPS (Das in sod., 2013: 784).	11
Slika 4: Struktura levana (Srikanth in sod., 2015: 105).	12
Slika 5: Trajektorije aktivne in pasivne pasti divjega tipa <i>Bacillus subtilis</i> po 2,5 urah inkubacije v odvisnosti od časa.	27
Slika 6: Svetlobna mikroskopija v tehniki DIC: topilo PBS (A) in 1 % (w/v) suspenzije levanov <i>Bacillus subtilis</i> (B), <i>Zymomonas mobilis</i> (C) ter <i>Erwinia herbicola</i> (D).	29
Slika 7: Svetlobna mikroskopija v tehniki DIC: deionizirana voda (A), 1 % (w/v) suspenzije levanov <i>Bacillus subtilis</i> (B), <i>Zymomonas mobilis</i> (C), <i>Erwinia herbicola</i> (D) ter 6 % (w/v) suspenzije levanov <i>B. subtilis</i> (E), <i>Z. mobilis</i> (F), <i>E. herbicola</i> (G).	31
Slika 8: Svetlobna mikroskopija suspenzije levana <i>Erwinia herbicola</i> , raztopine DNA in njunih mešanic: topilo PBS, tehnika DIC (A), 0,33 % (w/v) levan, tehnika DIC (B), zmes levana in DNA v razmerju 3 : 1 (w/w), tehnika DIC (C), z DAPI obarvana zmes levana in DNA, isto vidno polje kot pri C, tehnika fluorescenčne mikroskopije (D), z DNazo I tretirana zmes levana in DNA, tehnika DIC (E).	33
Slika 9: Gel po gelski elektroforezi z umeritveno lestvico, DNA, izolirano iz bakterije <i>Bacillus subtilis</i> in DNA, izolirano iz lososovih mod.	34
Slika 10: Tvorba skupkov iz kroglastih delcev levana pri različnih koncentracijah levana <i>Erwinia herbicola</i> in DNA v zmesi.	34
Slika 11: Tvorba skupkov iz kroglastih delcev levana pri različnih koncentracijah levana <i>Zymomonas mobilis</i> in DNA v zmesi.	36
Slika 12: Mn levana <i>Erwinia herbicola</i> (A) in Mn dekstrana (B) ter koncentracija reduksijskih koncev v odvisnosti od časa sonikacije.	37
Slika 13: Mn levana <i>Erwinia herbicola</i> (A) in Mn dekstrana (B), izračunanega iz reduksijskih koncev, v odvisnosti od Mn levana <i>Erwinia herbicola</i> (A) in Mn dekstrana (B), določenega iz HPSEC.	38
Slika 14: Viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za levan <i>Erwinia herbicola</i> (A), DNA, izolirano iz lososovih mod (B), zmesi levana in DNA (C) ter primerjava viskoznosti za zmes levana in DNA, suspenzijo levana in raztopino DNA pri istih koncentracijah (D).	39

Slika 15: Mikroviskoznosti v odvisnosti od frekvence za levan <i>Erwinia herbicola</i> (A), DNA, izolirano iz lososovih mod (B), zmesi levana in DNA (C) ter primerjava mikroviskoznosti za zmes levana in DNA, suspenzijo levana in raztopino DNA pri istih koncentracijah (D).	40
Slika 16: Mikroviskoznost (A) in elastični modul (B) v odvisnosti od frekvence za zmesi levana <i>Erwinia herbicola</i> in DNA v razmerju 3:1 pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana znotraj in izven skupkov levana.	41
Slika 17: Primerjava mikroviskoznosti (A) in elastičnega modula (B) 0,33 % (w/v) suspenzije levana <i>Erwinia herbicola</i> z mikroviskoznostjo (A) in elastičnim modulom (B) znotraj skupkov v zmesi levan : DNA = 3:1 pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana.	42
Slika 18: Domet medceličnih povezav bakterij divjega tipa <i>Bacillus subtilis</i> ter z dodatkom azida po nacepitvi v odvisnosti od časa gojenja.	43
Slika 19: Presevna elektronska mikroskopija s tehniko negativnega kontrastiranja: gojišče SYM brez kvasnega ekstrakta (A), kultura divjega tipa <i>Bacillus subtilis</i> po nacepitvi (B) in po 2,5 urah gojitve (C).	44
Slika 20: Povprečne viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za stresane kulture divjega tipa <i>Bacillus subtilis</i> in gojišča.	45
Slika 21: Domet medceličnih povezav različno tretiranih bakterij divjega tipa in dvojne mutante <i>Bacillus subtilis</i>	46
Slika 22: Normalizirana intenziteta fluorescence reporterskega konstrukta P_{epsA} - <i>gfp</i> na celico.	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja HPSEC standardov dekstrana.

Priloga B: Koncentracija redukcijskih koncev fruktoze pri posameznih časih sonikacije.

Priloga C: Amplituda aktivne in pasivne pasti s silikatnima kroglicama v odvisnosti od frekvence.

Priloga D: Optična gostota divjega tipa *Bacillus subtilis* v odvisnosti od časa.

Priloga E: Jakost mehanske sklopite gibanja bakterij divjega tipa *Bacillus subtilis*, določena s povprečno amplitudo bakterije v pasivni pasti, pri različnih časih gojenja.

Priloga F: Povprečne viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za stresane kulture dvojne mutante $\Delta tasA/eps$ *Bacillus subtilis* in gojišča.

Priloga G: Jakost mehanske sklopite gibanja bakterij divjega tipa *Bacillus subtilis* in dvojne mutante $\Delta tasA/eps$ po 2,5 urah gojitve v odvisnosti od razdalje.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHL	acil homoserin lakton
BCA reagent	reagent z bikonkinsko kislino (ang. bicinchoninic acid)
CLSM	konfokalni laserski vrstični mikroskop (ang. Confocal Laser Scannig Microscope)
Cm	antibiotik kloramfenikol
Da	Dalton
DAPI	fluorescenčno barvilo 4',6-diamidin-2-fenilindol
DIC	diferenčni interferenčni kontrast (ang. Differential Interference Contrast)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
DNAza I	encim endonukleaza, ki cepi DNA
eDNA	zunajcelična DNA (ang. Extracellular DNA)
EPS	zunajcelične polimerne snovi (ang. Extracellular Polymeric Substances)
<i>eps(A-O)</i>	operon 15 genov za sintezo in transport polisaharida eps
FL	fluorescenčna mikroskopija
HPSEC	visokotlačna velikostno izključitvena kromatografija (ang. High Pressure Size Exclusion Chromatography)
LB	gojišče Luria Bertani
Mn	številčna povprečna molekulska masa
Mp	molekulska masa kromatografskega vrha
MSgg	minimalno gojišče s 3-morfolinpropan sulfonsko kislino, glicerolom in glutamatom
Mw	utežna povprečna molekulska masa
NA	numerična apertura
PBS pufer	fosfatni pufer (ang. Phosphate Buffered Saline)
PH	fazni kontrast (ang. Phase Contrast)
QS	mehanizem zaznavanja kvorum (ang. Quorum Sensing)
RI	refrakcijski indeks
SAM	S-adenozil metionin
SinI	antagonist SinR
SinR	glavni transkripcijski regulator za tvorbo biofilma
SipW	signalna peptidaza, ki cepi predpeptida YqxM in TasA
Sp	antibiotik spektinomicin
Spo0A	regulatorni protein sporulacije in aktivator proteina SinI
SYM	gojišče bogato s saharozo in kvasnim ekstraktom (ang. Sucrose Yeast Extract medium)
TAE pufer	tris acetatni EDTA puter (ang. Tris-acetate-EDTA buffer)
TasA	matrični protein biofilma <i>Bacillus subtilis</i>
Tc	antibiotik tetraciklin

UV	ultravijolični spekter svetlobe
WT	divji tip
YlbF	regulatorni protein, ki pozitivno vpliva na izražanje genov matriksa (operonov <i>eps(A-O)</i> in <i>yqxM-sipW-tasA</i>)
YmcA	regulatorni protein, ki pozitivno vpliva na izražanje genov matriksa (operonov <i>eps(A-O)</i> in <i>yqxM-sipW-tasA</i>)
YqxM	omogoči transport TasA v matriks
σ^H	sigma faktor, ki posredno omogoča izražanje operonov <i>eps(A-O)</i> in <i>yqxM-sipW-tasA</i>

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJA NALOGE

Mikroorganizmi se pojavljajo v naravnih habitatih kot posamezne celice ali kot skupine celic, ki so organizirane v biofilme (Flemming in Wingender, 2010). Biofilmi so sestavljeni iz celic in zunajceličnih polimernih snovi (EPS), ki jih tekom tvorbe biofilma proizvedejo celice same. EPS je pretežno sestavljen iz polisaharidov, v manjšem deležu so prisotni še lipopolisaharidi, glikolipidi, lipidi, proteini, peptidi in nukleinske kisline (Wingender in sod., 1999).

Nekatere bakterije in glive lahko sintetizirajo zunajcelični homopolisaharid levan (Han, 1990). Levan je nenabit polimer fruktoze, ki ima glede na druge polisaharide nenavadno visoko topnost, vodi celo do 55 % (w/v), in nizko viskoznost (Arvidson in sod., 2006). Bakterija *Bacillus subtilis* tvori v različnih gojiščih plavajoče biofilme, ki se med seboj razlikujejo po vsebnosti EPS (Dogsa in sod., 2013). V gojišču bogatem s saharozo (gojišču SYM) lahko *B. subtilis* sintetizira levan, ki predstavlja več kot 95 % suhe mase EPS, preostali del pa predstavlja proteini in nukleinske kisline (Dogsa in sod., 2013). Levan, čeprav po deležu prevladujoča sestavina EPS, ne odraža viskoelastičnega obnašanja, ki je značilen za EPS biofilma (Klapper in sod., 2002). Vpliv levana na mehanske lastnosti biofilmov ni raziskan. Prvi cilj te magistrske naloge je ugotoviti, kako dodatek ostalih zunajceličnih komponent (npr. proteinov, peptidov, nukleinskih kislin) prispeva k spremembji reološkega obnašanja levana.

Razvoj biofilma se začne s populacijo bakterij, ki živijo kot prosto plavajoče posamezne celice in se konča z dozorelim biofilmom, kjer so celice med seboj tesno povezane (Lemon in sod., 2008). Pri bakteriji *B. subtilis* je dobro preučena tvorba plavajočega biofilma (Kobayashi, 2007). Skupki bakterij so opazni že po šestih urah, tanek biofilm pa popolnoma prekrije površino gojišča po približno desetih urah. Po približno 12 urah se pelikel začne gubati, pri 15 do 24 urah se izoblikuje končna arhitektura biofilma. Kljub temu, da v prvih šestih urah po nacepitvi pod mikroskopom ne opazimo skupkov to še ne pomeni, da celice med seboj niso mehansko povezane. Zanima nas, kdaj se pričenjajo vzpostavljanje prve mehanske povezave med celicami. Zato je drugi cilj te magistrske naloge ugotavljanje, ali obstajajo fizične povezave med celicami *B. subtilis* v planktonski obliki in od česa je vzpostavljanje takih povezav odvisno.

1.2 DELOVNI HIPOTEZI

- Levan, čeprav po deležu prevladujoča sestavina EPS, ne odraža reoloških lastnosti biofilmov. Dodatek nukleinskih kislin ali proteinov bo očiščenemu levanu znatno povečal viskoznost in agregiranost.
- Bakterije *Bacillus subtilis* bodo relativno zgodaj po nacepitvi gojišča tvorile mehanske povezave.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOFILMI

Biofilmi so arhitekturno kompleksni konzorciji mikroorganizmov, ki so pritrjeni na biotskih površinah (preostalih celicah, tkivih in organskih polimerih matriksa) in abiotskih površinah (mineralnih in sintetičnih), najdemo jih tudi na interfazah (Coenye in Nelis, 2010; López in sod., 2010). Celice v biofilmih rastejo v večceličnih skupkih, ki so obdani z zunajceličnimi polimernimi snovmi (EPS, ang. Extracellular Polymeric Substances), ki jih sintetizirajo celice biofilma (Branda in sod., 2005; Hall-Stoodley in Stoodley, 2009). Biofilmi uspevajo v najrazličnejših okoljih. Lahko povzročajo številne težave na področju medicine in veterine ter v različnih industrijskih aplikacijah, lahko pa jih s pridom izkoristišamo (López in sod., 2010).

2.1.1 Pojavne oblike biofilmov in njihovo preučevanje v laboratoriju

Že Van Leeuwenhoek je v drugi polovici 17. stoletja opazoval s svojim preprostim mikroskopom mikroorganizme, pritrjene na površino zob, kar dandanes pojmujemo kot biofilm (Donlan, 2002). Kasneje so Heukelekian in Heller (1940) ter Zobell (1943) pokazali, da se mikrobna rast in aktivnost povečata ob povečanju površine, na katero se mikrobi lahko pritrdijo ter da je na površinah prisotnih več mikroorganizmov kot v okoliški tekočini. Razvoj zmogljivejših svetlobnih in elektronskih mikroskopov ter molekularno genetskih tehnik nam je omogočil nadaljnje preučevanje strukture ter razvoja biofilmov. Za preučevanje biofilmov so se uveljavili štirje modelni mikroorganizmi: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis* in *Staphylococcus aureus* (López in sod., 2010).

Biofilmi lahko uspevajo pri različnih laboratorijskih pogojih in jih lahko gojimo na različne načine. Zaradi enostavnega preučevanja biofilmov, njihove manipulacije in ponovljivosti poskusov med laboratorijskih raziskovalci večinoma uporabljali štiri pristope preučevanja biofilmov: v pretočni celici, v mikrotitrskih ploščah, pelikle na interfazi kapljevinaplinska faza tekočih gojišč in kolonije na trdnih gojiščih (Branda in sod., 2005; Lemon in sod., 2008).

Za preučevanje potopljenih biofilmov se najpogosteje uporablja pretočna celica (Branda in sod., 2005; Kumada in sod., 2008; Lemon in sod., 2008). Pretočna celica je majhna komora s prostornino nekaj cm^3 in prozornimi stenami. Znotraj komore se tvori potopljeni biofilm ob kontinuiranem dotoku gojišča s hranili. Zaradi prozornih sten se lahko vsebino pretočnih celic neposredno opazuje pod mikroskopom v realnem času. Običajno celice opazujemo pod konfokalnim mikroskopom (CLSM, ang. Confocal Laser Scanning Microscope), ki nam omogoča zajem posameznih rezin vzorca, iz katerih ustvarimo tridimenzionalno rekonstrukcijo prostornine vzorca. Pretočne celice imajo tudi slabost: niso primerne za hiter pregled večjega števila biofilmov bakterij ozziroma mutant (Branda in sod., 2005; Lemon in sod., 2008). Potopljene filme šaržnih kultur brez dotoka

svežega gojišča preučujemo v mikrotitrskih ploščah (O'Toole in Kolter, 1998). Prednosti te metode sta zlasti hiter pregled biofilmov različnih mutant in cenovna ugodnost (Branda in sod., 2005; Lemon in sod., 2008). Plavajoči biofilmi ali pelikli, ki se tvorijo na interfazi kapljevina-zrak, so tudi zanimiva oblika biofilmov za preučevanje (Branda in sod., 2001; Friedman in Kolter, 2004; Dogsa in sod., 2013). Zaradi nastanka biofilma na interfazi, ki ni tako trdna kot površina trdnih snovi, imajo pelikli visoko stopnjo samoorganizacije celic, odsotnost hitrih tokov na površini biofilma z zrakom pa omogoča tvorbo kompleksnejših struktur. Zadnja našteta oblika biofilmov so kolonije, ki rastejo na površini različnih gojišč z agarjem in imajo makroskopsko kompleksno strukturo, ki je odvisna od sposobnosti tvorbe EPS. Podobno kot pri peliklih in potopljenih biofilmih v mikrotitrskih ploščah omogoča metoda gojenja kolonij na trdnih gojiščih hiter pregled kolonij različnih mutant, kar omogoča določitev genov vpletenih v tvorbo in vzdrževanje biofilma z molekularno-genetskimi metodami (Lemon in sod., 2008).

2.1.2 Prednosti življenja bakterij v biofilmih

Življenje v biofilmih ima veliko prednosti, kot povzemata Flemming in Wingender (2010). Zunajcelični matriks omogoča adhezijo celic na površine in agregacijo celic, pripomore pri koheziji biofilmov, zadržuje vodo, predstavlja zaščitno bariero, adsorbira organske spojine in ione, zadrži in veže encime, je vir nutrientov, omogoča izmenjavo genetske informacije, je lahko donor ali akceptor pri redoks reakcijah in predstavlja zalogo odvečne energije pri neuravnoveženih pogojih razmerja C:N. Prednosti življenja v biofilmih lahko razdelimo v naslednje tematske sklope (Jefferson, 2004): obramba pred škodljivimi dejavniki, obstanek v želenem habitatru in visoka celična gostota.

Dejavnikov, ki preprečujejo ali zavirajo bakterijsko rast, je veliko: pomanjkanje hrani, prenizek, previsok ali spremenjajoči se pH in temperatura okolja, pomanjkanje kisika pri aerobičnih, prisotnost kisika pri anaerobičnih, delež nevezane vode, prisotnost dezinfekcijskih sredstev, antibiotikov, baktericinov in drugih baktericidnih ter bakteristatičnih agensov. Praživali s svojim hranjenjem tudi predstavljajo nevarnost bakterijam. Celice biofilmov v telesih živali in ljudi morajo biti odporne tudi proti fagocitozi in preostalim dejavnikom imunskega sistema (Jefferson, 2004; López in sod., 2010). Bakterije v biofilmih so v splošnem bolj odporne proti škodljivim dejavnikom okolja kot planktonske bakterije. Mehanizmi višje odpornosti v biofilmih še niso popolnoma preučeni. Višja odpornost je verjetno povezana z nekaterimi lastnostmi življenja v biofilmu kot so: počasnejša rast bakterij v notranjih slojih biofilmov, fiziološka heterogenost bakterij, obdajajoči matriks biofilma, ki otežuje difuzijo škodljivih snovi v notranjost biofilma, (Jefferson, 2004) in povečan delež celic persisterjev (López in sod., 2010).

Naravno okolje mikroorganizmov je sestavljeni iz heterogenih habitatov. V nekaterih habitatih, kot so na primer krvni obtok, ustna votlina z izpiralnim učinkom sline, rečne struge in vodovodne cevi, je hidrodinamski tok tekočine lahko hiter in turbulenten, kar zavira nastanek in razvoj biofilmov. V kolikor se bakterije uspejo pritrditi na površino jim

biofilmi nudijo obstanek v takšnih habitatih in s tem dostop do hranil in kisika ter odplavljanje produktov presnove. Zaradi strukturne različnosti posameznih delov biofilma pride do lokalnega nihanja vrednosti pH in dostopnosti hranil ter kisika, kar vodi do heterogenega izražanja genov v bakterijski populaciji. Neenakost posameznih delov biofilma omogoča nastanek raznolikih niš znotraj biofilma, kar omogoča rast različnih bakterijskih vrst. Poznamo celo mešane biofilme z bakterijami in glivami. V takšnih biofilmih imajo mikroorganizmi različne rastne potrebe in različne metabolne sposobnosti (Jefferson, 2004).

V biofilmih se bakterije različnih vrst nahajajo blizu skupaj, kar je ugodno za horizontalni prenos genov bodisi preko transformacije, transdukcije ali konjugacije. Medsebojna bližina bakterij je tudi ugodna za medcelično komuniciranje, od česar je odvisen usklajen odgovor populacije celic, čemur pravimo tudi socialno obnašanje bakterij (Jefferson, 2004). Ker nudijo biofilmi bakterijam številne prednosti ni presenetljivo, da večina poznanih bakterij tvori biofilme in da so biofilmi preferenčna oblika obstoja bakterijskih celic v okolju (Lemon in sod., 2008).

2.1.3 Struktura biofilmov

Struktura biofilmov ni značilnost bakterijskega seva, ampak se lahko spreminja s spreminjačimi se okoljskimi pogoji (Dogsma in sod., 2013). Dandanes v splošnem velja, da se biofilmi različnih bakterij med seboj razlikujejo in da so sestavljeni iz skupkov celic oziroma mikrokolonij, ki so med seboj ločene z vmesnimi prazninami in kanali (Stoodley in sod., 1999). Znotraj mikrokolonij je prisoten zgolj difuzijski transport topljencev, po kanalih in mikrokanalih med skupki celic (Yang in Lewandowski, 1995) pa prevladuje konvekcijski transport (de Beer in sod., 1994). Znan je tudi primer posebne organizacije: na primer bakterija *B. subtilis* tvori posebne zračne strukture (ang., fruiting body), ki so preferenčna mesta sporulacije (Branda in sod., 2001).

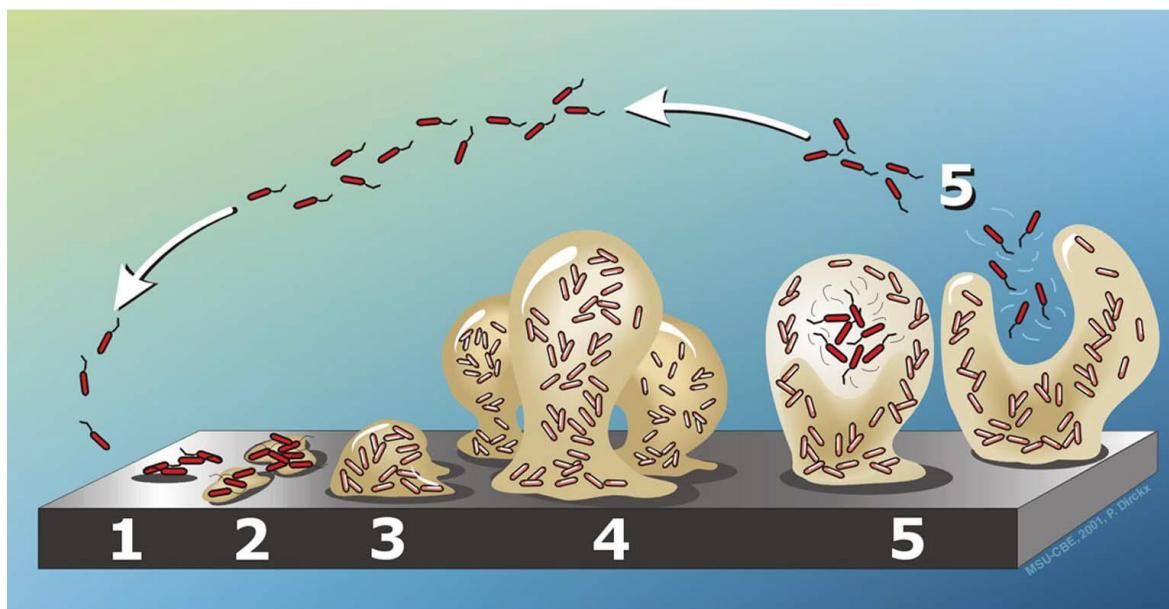
Raziskovalci so opazovali strukturo biofilmov s pomočjo svetlobne ter presevne in vrstične elektronske mikroskopije, kot povzema Dunne (2002). Vsaka od naštetih metod ima svoje pomanjkljivosti: nizka ločljivost svetlobnih mikroskopov v primerjavi z elektronskimi in tvorba artefaktov zaradi dehidracije vzorca ali drugih procesov priprave vzorca za elektronsko mikroskopijo. Šele kasnejši razvoj konfokalnega mikroskopa (CLSM) in postopkov molekulskih barvanj, mikroelektrod in pretočne celice nam je omogočil nedestruktivno opazovanje in računalniško rekonstrukcijo arhitekture biofilmov (Stoodley in sod., 1999; Dunne, 2002). Na strukturo biofilma vplivajo površina, hranila in hidrodinamika okoliške tekočine, kot povzema Stoodley in sod. (1999). Ker sta prenos topljencev in strig odvisna od hidrodinamskih pogojev, imajo hidrodinamske lastnosti okoliške tekočine velik vpliv na procese znotraj biofilma (Stoodley in sod., 1999): biofilm mešanih kultur je najdebelejši pri prehodu iz laminarnega v turbulentni režim. V laminarnem režimu namreč prihaja do omejevanja rasti, in s tem do tanjših biofilmov zaradi omejitev v transportu, v turbulentnem režimu pa prihaja do odcepitve biofilmov s

površin. V turbulentnem režimu se biofilmi izdolžijo v smeri toka tekočine, preden se odtrgajo s površine, in prihaja do oscilacije koncev, kar kaže na viskoelastične lastnosti biofilmov. Meja elastičnega obnašanja celičnih skupkov biofilma je bila med 110 % in 150 % hitrosti okoliške tekočine, pri kateri so bili biofilmi gojeni. Nad to mejo so se obnašali viskozno: mikrokolonije so polzele po površini in se nato, s povišanjem pretoka, odcepile. Še vedno ni popolnoma znano ali je struktura biofilmov zgolj posledica okoljskih pogojev in hidrodinamskih sil ali se biofilmi sami organizirajo v strukturo, ki je najbolj optimalna za rast v izbranih okoljskih pogojih (Stoodley in sod., 1999).

2.1.4 Razvoj biofilmov

Nastanek biofilmov je razvojni proces, pri katerem bakterije preidejo iz prosto plavajoče (planktonske) enocelične oblike v pritrjeno (sedentarno) večcelično združbo, kar je posledica celične diferenciacije. Delo številnih raziskovalnih skupin je omogočilo nastanek hipotetičnega modela razvoja biofilmov v vodnem okolju, ki v splošnem velja za obe skupini bakterij: gibljivih in negibljivih. Tekom razvoja biofilmov namreč lahko gibljive bakterije postanejo negibljive (Lemon in sod., 2008).

Splošno sprejet model razvoja biofilmov je sestavljen iz petih korakov (Davey in O'Toole, 2000; Donlan, 2002; Dunne, 2002; Van Houdt in Michiels, 2005): i. prvotna, reverzibilna pritrditev planktonskih bakterij na površino; ii. irreverzibilna pritrditev bakterij na površino; iii. pričetek nastanka arhitekture biofilma; iv. razvoj mikrokolonij v zrel biofilm; v. disperzija celic biofilma v okolico in vrnitev k planktonski obliki. Razvojne stopnje v tvorbi biofilma so prikazane na sliki 1.



Slika 1: Razvojne stopnje v tvorbi biofilma (Van Houdt in Michiels, 2005: 627).

Običajno biofilmi nastajajo na biotskih ali abiotiskih površinah, ki so prekrite s filmom adsorbirane vode, soli, organskih molekul; odvisno od prisotnosti snovi v okoliški tekočini. Tako modificirana površina ima drugačno afiniteto vezave celic od tiste brez adsorbiranega filma (Dunne, 2002; Van Houdt in Michiels, 2005). Planktonska bakterija se približa površini do razdalje <1 nm bodisi s tokom okoliške tekočine ali z aktivnim plavanjem s flageli oziroma kemotakso (Dunne, 2002). Da se bakterija lahko reverzibilno pritrdi na površino, mora premagati odbojne elektrostatske interakcije: tako bakterije kot večina površin so običajno negativno nabite. Privlačne elektrostatske interakcije so tudi običajno nespecifične: hidrofobne, van der Waalsove in vodikove vezi (Hermansson, 1999; Dunne, 2002). Reverzibilno vezane bakterije nato utrdijo svojo povezanost s površino s produkcijo EPS in/ali preko adhezinov, ki se nahajajo na pilih ali fimbrijah. Planktonske bakterije enakih ali različnih vrst se lahko povežejo tudi med seboj in tvorijo skupke na substratu (Dunne, 2002). Bakterije sintetizirajo več adhezinov, katerih sinteza je uravnana na nivoju transkripcije, kar omogoča prehod bakterij nazaj k prosto plavajoči obliku ob pojavu neugodnih okoljskih razmer (Ziebuhr in sod., 1999). Po zaključku te faze bakterije postanejo irreverzibilno vezane na površino, seveda ob odsotnosti premočnih mehanskih in kemijskih vplivov. Po uspešni irreverzibilni pritrditvi bakterij na površino pričneta gostota in kompleksnost biofilmov naraščati: bakterije se pričnejo razmnoževati, EPS pa tvori z organskimi in anorganskimi molekulami iz okolice biofilma glikokaliks (Dunne, 2002).

Rastni potencial kateregakoli bakterijskega biofilma je limitiran s koncentracijo hranil v neposrednem okolju biofilma, uspešnostjo prodiranja hranil v sredico biofilma in odstranitvijo produktov presnove. Preostali pomembnejši parametri so še: pH, hidrodinamski pretok, uspešnost prodiranja kisika v biofilm, osmolarnost, temperatura in vir ogljika. Mikrokolonije se začnejo povezovati, nastane zrel biofilm. Pri določeni kritični masi biofilma se vzpostavi dinamično ravnotežje: celice zunanjega sloja biofilma začnejo postajati planktonske, zapustijo biofilm in lahko ponovno kolonizirajo različne površine; celice sloja ob površini pa odmrejo ali postanejo manj aktivne zaradi vse težjega prodora hranil in kisika ter odvajanja produktov presnove (Dunne, 2002).

Stoječe kulture bakterije *B. subtilis* tvorijo plavajoče biofilme - pelikle (Branda in sod., 2001; Dogsa in sod., 2013). Časovni potek nastanka plavajočega biofilma spremljajo morfološke spremembe celic (Kobayashi, 2007). Po nacepitvi (do štirih ur) se planktonske celice prosto gibljejo v gojišču. Po šestih urah celice niso več gibljive in nepopolna septacija po delitvi privede do organizacije celic v verige. Po sedmih do osmih urah se število verig poveča in te pričnejo tvoriti skupke, kar pomeni da se povezovanje začne še predno prispejo do kapljevinsko-plinaste interfaze. Po devetih do desetih urah se celice dokončno ločijo od verig in so morfološko podobne celicam iz zrelega pelikla. Pojavi se tanek biofilm, ki popolnoma prekrije površino gojišča. Po približno 12 urah se pelikel začne gubati, po 15 do 24 urah pa se izoblikuje končna arhitektura biofilma.

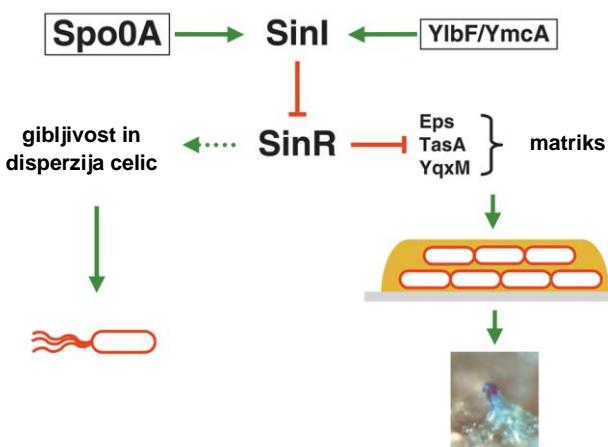
2.1.5 Regulacija razvoja biofilmov

Aktivacijo metabolnih poti, ki vodijo v nastanek biofilma, regulirajo specifične zunajcelične signalne molekule, ki jih sintetizirajo celice biofilma (López in sod., 2010). Signalne molekule so vpletene pri medcelični komunikaciji zaznavanja kvorum (ang. Quorum Sensing, QS) (Waters in Bassler, 2005). Pri po Gramu negativnih bakterijah so to pogosto avtoinduktorji, ki se akumulirajo zunaj celic. Njihova koncentracija narašča z gostoto populacije. Ko koncentracija avtoinduktorjev preseže mejno koncentracijo, se sproži signalna kaskada, ki povzroči spremenjeno izražanje genov na nivoju populacije celic. Preko mehanizma zaznavanja kvoruma so regulirani številni procesi: bioluminiscenca, izražanje virulenčnih faktorjev, produkcija antibiotikov, sporulacija, kompetenca in tvorba biofilma (Waters in Bassler, 2005; Camilli in Bassler, 2006).

Poznamo dve skupini avtoinduktorjev: pri po Gramu negativnih bakterijah so to acil homoserin laktoni (AHL) (Faqua in sod., 2001). AHL so sintetizirani z LuxI tipom AHL sintetaze iz S-adenozil metionina (SAM) in prenašalnih proteinov acila. Vsi AHL imajo enako sredico, to je homoserin lakton, in različne stranske acilne verige, ki jih pripnejo različni encimi tipa LuxI. AHL prehajajo prosto preko celične membrane, v citoplazmi jih prepoznajo receptorji tipa LuxR. Po uspešni prepoznavi specifičnih AHL in vezavi z receptorjem LuxR se kompleksi LuxR-AHL vežejo na promotor na verigi DNA in aktivirajo transkripcijo genov, katerih prepisovanje je regulirano z mehanizmom QS. Druga skupina avtoinduktorjev so oligopeptidi, ki jih za medcelično sporazumevanje uporabljam po Gramu pozitivne bakterije. Sestavljeni so iz 5 do 17 aminokislinskih ostankov in so pogosto posttranslacijsko modificirani z priključitvijo laktonov, tiolaktonov, lantioninov in isoprenskih skupin. Oligopeptide prepoznajo na zunanjih strani celične membrane membranski dvokomponentni signalni sistemi. Signal se prenese preko dvokomponentnega sistema preko membrane, v citoplazmi pa se prenos signala nadaljuje s fosforilacijo signalne kaskade (Camilli in Bassler, 2006).

Poleg avtoinduktorjev poznamo tudi signalne molekule, ki pri številnih bakterijah inducirajo tvorbo biofilma neodvisno od mehanizma zaznavanja celične gostote (mehanizma QS). Te so sekundarni metaboliti, med drugimi tudi antibiotiki, pigmenti in siderofori (López in sod., 2010). Pri subinhibitornih koncentracijah povzročijo številni antibiotiki spremenjeno izražanje genov (Yim in sod., 2007): imipenem inducira sintezo polisaharida alginata, ki je pomembna komponenta matriksa biofilma bakterije *P. aeruginosa*; aminoglikozidni antibiotik teobramycin pa inducira nastanek biofilma pri bakterijah *P. aeruginosa* in *E. coli* (López in sod., 2010). Fenazini, pigmenti bakterije *P. aeruginosa*, tudi služijo kot signalne molekule za aktivacijo tvorbe biofilma. Surfaktin pri *B. subtilis* služi kot signala molekula za aktivacijo sinteze zunajceličnega matriksa pri subpopulaciji celic (López in sod., 2009). Mehanizmi delovanja tovrstnih signalnih molekul še niso znani (López in sod., 2010).

Med bolj proučenimi je nastanek plavajočega biofilma *B. subtilis*. Eden pomembnejših korakov tekom tvorbe biofilma je prehod iz prosto plavajoče, planktonske oblike v negibljivo, pritrjeno obliko (Lemon in sod., 2008). Regulacija tega prehoda je dobro proučena pri bakteriji *B. subtilis*, kar je prikazano na sliki 2.



Slika 2: Prenostavljen prikaz regulatorne mreže preklopa med pritrjenim in planktonskim načinom življenja bakterije *Bacillus subtilis* (Lemon in sod., 2008: 9).

Glavni transkripcijski regulator, ki preklaplja med pritrjeno in planktonsko obliko, je regulator SinR (Kearns in sod., 2005). Ta pri gibeljivih celicah preprečuje transkripcijo genov za produkcijo matriksa in posredno aktivira prepisovanje genov za gibeljivost in disperzijo celic (Branda in sod., 2006). SinR se izraža konstitutivno, ob ugodnih razmerah za tvorbo biofilma pa njegovo aktivnost neposredno zaustavi SinI, posredno pa YlbF in YmcA ter Spo0A (Branda in sod., 2006). Zmanjšana aktivnost SinR vodi v izgubo mobilnosti, sintezo EPS in nastanek verig iz posameznih celic (Branda in sod., 2006). O proteinih YlbF in YmcA ni znano veliko glede njunega mesta v širši regulatorni mreži. Spo0A je vključen tudi pri regulaciji zgodnjih stopenj sporulacije in se aktivira preko avtoinduktorjev z mehanizmom QS (Kearns in sod., 2005). Spo0A in σ^H posredno uravnavata tudi izražanje operona 15 genov *epsA-O*, ki kodirajo produkte za sintezo in prenos zunajceličnih polisaharidov Eps (Lemon in sod., 2008). Spo0A in σ^H prav tako posredno uravnavata izražanje operona treh genov *yqxM-sipW-tasA*, katerih produkti so pomembni pri tvorbi matriksa (Lemon in sod., 2008). SipW je signalna peptidaza, ki cepi predpeptida YqxM in TasA. Slednji je pomemben matrični protein, YqxM pa omogoči prenos TasA v matriks (Branda in sod., 2006).

2.1.6 Vloga posameznih komponent zunajceličnega matriksa biofilmov

Biofilme sestavljajo mikrobne celice in EPS, ki predstavlja od 50 % do 90 % celokupne organske snovi posameznega biofilma (Nielsen in sod., 1997; Flemming in sod., 2000). EPS gradi matriks biofilma in se pri posameznih biofilmih razlikuje po kemijskih in fizikalnih lastnostih (Donlan, 2002). Običajno v EPS prevladujejo polisaharidi, ki lahko predstavljajo do 65 % vseh zunajceličnih polimerov (Horan in Eccles, 1986), prisotni so še proteini, nukleinske kisline in lipidi v nižjih deležih (Wingender in sod., 1999).

Lastnosti polisaharidov v veliki meri določa njihova primarna struktura, ki je dolga, tanka veriga, pri večini polisaharidov biofilma z molekulsko maso od $0,5 \times 10^6$ Da do $2,0 \times 10^6$ Da (Sutherland, 2001). Iz primarne strukture se tvori sekundarna, ki lahko zavzame različne konformacije. Najpogostejši sta konformaciji naključnega zvitja in viačnice. Slednje pogosto med seboj agregirajo in tako tvorijo terciarno strukturo. Nekateri homopolisaharidi imajo sekundarno strukturo s ponovljivim vzorcem razvejitve, drugi, kot so dekstrani in levani, imajo manj ponovljiv vzorec razvejitve. Heteropolisaharidi, z izjemo bakterijskih alginatov, so sestavljeni iz ponovitev osnovne enote, ki vsebuje od 2 do 8 monosaharidov. Bakterijski alginati, kot tudi njihovi analogi, so sestavljeni iz neregularnih ponovitev D-manuronskih in L-guluronskih kislinskih ostankov (Sutherland, 2001). Polisaharidi so v vodnih raztopinah dobro topni in lahko nase vežejo veliko vode, nekateri so zaradi svoje sestave in terciarne strukture v posameznih regijah lahko tudi hidrofobni, torej amfibilni (Neu in Poralla, 1988).

Polisaharidi so lahko nevtralni, redkeje polikationski, večinoma pa so polianionski zaradi prisotnosti uronskih kislin (D-glukuronske, D-galakturonske in D-manuronske kisline), sulfata, fosfata ali ketalno vezanega piruvata (Sutherland, 2001). Nevtralni polisaharidi (dekstrani, levani) so pogosto prisotni v biofilmih ustne votline, polianionski polisaharidi pa v biofilmih z alginatom, kot ga tvori oportunistični patogen *P. aeruginosa*. Bakterijski alginati so acetilirani na številnih ostankih manuronskih kislin, kar onemogoča interakcijo polianionskih polisaharidnih verig s kationi in tako tvorbo gelov (Sutherland, 2001).

Monomeri, med seboj povezani z 1,4- β - ali 1,3- β - glikozidnimi vezmi, tvorijo bolj rigidni polimer, kot je na primer osnovna polisaharidna veriga ksantana, ki ga sintetizira bakterija *Xanthomonas campestris*. 1,2- α - ali 1,6- α - glikozidne vezi med monomeri pa prispevajo k večji fleksibilnosti oziroma upogljivosti polimera. Takšne vezi najdemo pri številnih dekstranih. Pri polianionskih polisaharidih je za aggregacijo posameznih verig v terciarno strukturo še posebej pomembna prisotnost di- in polivalentnih kationov, ki delujejo kot kationski mostički in utrdijo povezavo med sosednjima viačnicama. Polisaharidi, ki so lahko acetilirani ali neacetilirani, se lahko nahajajo v raztopini v obliki naključno zvitih viačnic ali v obliki urejenih agregiranih viačnic. Prehod med omenjenima konformacijema je predvsem odvisen od prisotnosti ali odsotnosti acilnih substituentov, kot so O-acetilni estri, O-sukcinilni estri ali ketalno vezani piruvati. V naravnih in eksperimentalnih pogojih se polisaharidi s sposobnostjo acetilacije, prisotni v EPS, večinoma nahajajo v konformaciji urejenih agregiranih viačnic, ki so stabilnejše pri nižjih temperaturah in v prisotnosti soli (Sutherland, 2001).

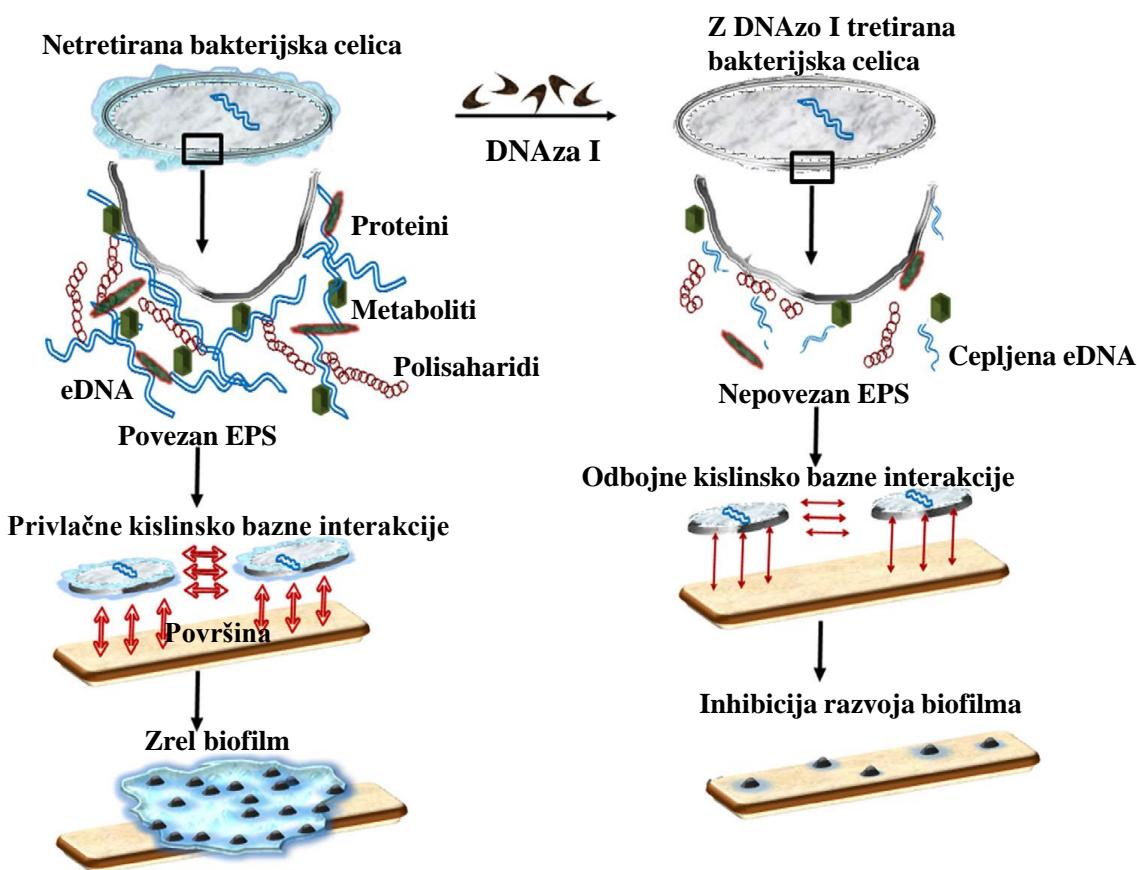
Polisaharidi se v biofilmih lahko različno organizirajo: lahko so v filamentozni obliki pritrjeni na površino bakterijskih celic in tvorijo kompleksno mrežo, ki obdaja celico. Takšno organizacijo omogočajo predvsem elektrostatske sile in vodikove vezi med molekulami. Ionske interakcije so pomembne v primerih, ko se verige sosednjih molekul lahko povežejo v kompleks zaradi strukturnega ujemanja njihove površine. Taki kompleksi

tvorijo flokule ali goste mreže, ki so v vodnih raztopinah slabo topne (Sutherland, 2001). Drugi možen način organizacije polisaharidov je tvorba gelov. Polisaharidi v biofilmih tudi interagirajo z drugimi molekulami matriksa, kot so lektini, preostalimi proteini, nukleinske kisline in lipidi (Sutherland, 2001), kar omogoča nastanek matriksa v katerem so ujete celice in njihovi produkti. Biofilmi nekaterih bakterij vsebujejo tudi površinsko aktivne snovi, kot so na primer surfaktin, viskozin in emulsan, ki dispergirajo hidrofobne snovi, ki tako postanejo lažje dostopne mikroorganizmom (Flemming in Wingender, 2010). Biosurfaktanti imajo lahko protibakterijske in protiglivne lastnosti, so pomembni pri adheziji in desorpciji celic od oljnih kapljic in drugih hidrofobnih snovi (Ron in Rosenberg, 2001) ter pri zniževanju površinske napetosti kapljevinsko-plinskih interfaz in s tem olajševanju prehoda plinov preko interfaze (Leck in Bigg, 2005).

Zunajcelični proteini v biofilmih so lahko encimi ali strukturni proteini. Med encimi prevladujejo tisti, ki so sposobni razgradnje biopolimerov. To so proteaze, peptidaze, endocelulaze, hitinaze, α - in β -glukozidaze, glukozaminidaze, hitobiozidaze, β -glukuronidaze, lipaze, esteraze, fosfataze in različne oksidoreduktaze (Flemming in Wingender, 2010). Zunajcelične oksidoreduktaze lahko povzročijo tudi korozijo kovin (Busalmen in sod., 2002). S pomočjo encimov lahko postane zunajcelični matriks razgrajen v pogojih stradanja, monomeri postanejo celicam viri ogljika, dušika in drugih elementov ter energije. Če encimi razgradijo tudi strukturne komponente EPS, s tem omogočijo disperzijo celic. Nekateri encimi so lahko virulentni faktorji med okužbo gostitelja. Encimi biofilmov v talnem ekosistemu omogočajo tudi razgradnjo polimerov v tleh in sedimentih ter so odgovorni za samočistilno sposobnost teh habitatov. Zunajcelični encimi so pripeti na polisaharide in tako zadržani v matriksu biofilma, kar zagotavlja kratko difuzijsko razdaljo razgrajenih produktov do celic. Druga skupina proteinov v biofilmih so strukturni proteini. To so proteini brez encimskih aktivnosti, ki skrbijo za tvorbo in stabilizacijo polisaharidne mreže ter omogočajo povezavo med celično površino in zunajceličnim EPS (Flemming in Wingender, 2010). Biofilmi različnih bakterij vsebujejo različne strukturne proteine (Flemming in Wingender, 2010; López in sod., 2010). Na primer v biofilmih *B. subtilis* je glavni strukturni protein TasA.

V biofilmih se nahaja tudi eDNA (zunajcelična DNA, ang. extracellular DNA) v lokalnih koncentracijah do 300 mg eDNA na gram organske snovi (Dominiak in sod., 2011). V biofilmih različnih bakterijskih vrst se koncentracija eDNA lahko zelo razlikuje. V okoliški matriks je sproščena po lizi celic, ki je lahko inducirana preko mehanizma zaznavanja celične gostote (QS) ali pa je od QS neodvisna, inducirana s profagi (Das in sod., 2013). Pri *P. aeruginosa* se DNA izloča tudi s sproščanjem veziklov, ki vsebujejo DNA, s celične površine živih celic (Kadurugamuwa in Beveridge, 1996). Raziskovalci so v zadnjem desetletju, zlasti po odkritju Whitchurch s sod. (2002), da dodatek DNAAze I zaustavi nastajanje biofilmov in dispergira celice biofilmov bakterije *P. aeruginosa*, začeli pripisovati eDNA tudi strukturno vlogo (Dominiak in sod., 2011, Das in sod., 2013). Pri *P. aeruginosa* tvori eDNA mreži podobno strukturo (Allesen-Holm in sod., 2006), pri rečnem

izolatu gamaproteobakterije F8 filamentozno omrežje podobno pajčevini (Böckelmann in sod., 2006) in pri netipiziranem sevu *Haemophilus influenzae* gosto omrežje s tankimi vlakni in posameznimi debelejšimi snopi vlaken (Jurcisek in Bakaletz, 2007). Po razširjeni teoriji DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey in Overbeek) so za adhezijo in agregacijo bakterij preko eDNA in ostalih biopolimerov ključne privlačne van der Waalsove in kislinsko bazne interakcije kljub prisotnosti elektrostatskih odbojnih sil zaradi običajno negativno nabitih površin in celic (Hermansson, 1999; Das in sod., 2013). Pri nekaterih bakterijskih vrstah odstranitev eDNA z DNazo I povzroči nastanek hidrofobne površine bakterijskih celic, kar privede do dezintegracije komponent EPS in inhibicije nadaljnega razvoja biofilma, kot je prikazano na sliki 3 (Das in sod., 2013).

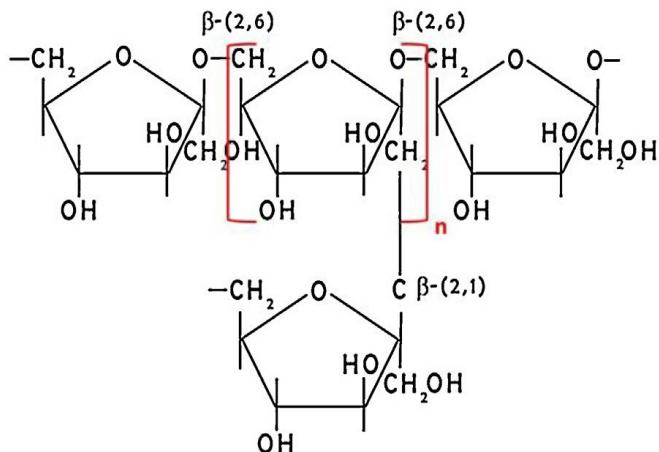


Slika 3: Shematski prikaz vezave eDNA z ostalimi biopolimeri in metaboliti v EPS. Privlačne van der Waalsove in kislinsko bazne interakcije so pomembne pri adheziji in agregaciji bakterij ter strukturni trdnosti EPS (Das in sod., 2013: 784).

V biofilmih najdemo tudi komponente nemikrobnega izvora, ki v EPS zaidejo iz okolja. V biofilmih v krvnem obtoku so to pogosto rdeče krvničke, krvne ploščice in fibrin (Donlan, 2002). Fibrinske kapsule obvarujejo bakterije pred levkociti gostitelja, kar omogoča razvoj endokarditisa (Durack, 1975). V biofilme v vodah pa pogosto zaidejo minerali, kot so kalcijev karbonat, železovi oksidi kot produkti korozije in delci tal (Donlan, 2002).

2.1.6.1 Levan

Levan je pogosta polisaharidna komponenta zunajceličnega matriksa biofilmov. Ker lahko predstavlja glavno komponento zunajceličnega matriksa biofilma bakterije *B. subtilis* (Dogsa in sod., 2013) in glavni polisaharid, ki bo obravnavan v tem magistrskem delu, ga bomo nekoliko bolj podrobno predstavili. Levan je homopolisaharidni polimer, sestavljen iz fruktoznih podenot. Poznamo dva tipa homopolisaharidov fruktanov: levan in inulin. Med seboj se razlikujeta v tipu vezi med osnovnimi enotami glavnih verig in v razvejiščih. Pri levanu so D-fruktofuranozilni ostanki v glavnih verigah med seboj povezani z β -(2,6) O-glikozidno vezjo in z β -(2,1) O-glikozidno vezjo v razvejiščih, kot prikazuje slika 4, pri inulinu pa je ravno obratno (Han, 1990).



Slika 4: Struktura levana (Srikanth in sod., 2015: 105).

Levani so lahko rastlinskega ali mikrobnega izvora (bakterijski ali glivni) (Han, 1990). Levani rastlin, kot so na primer nekatere vrste trav, pšenica in ječmen, so običajno nižjih molekularnih mas v primerjavi z levani mikrobnega izvora in rastlinam predstavljajo založne polisaharide, povečali pa naj bi tudi odpornost rastlin proti suši in mrazu (Han, 1990; Srikanth in sod., 2015). Levani mikrobnega izvora imajo molekularno maso od 2×10^6 Da do 10^8 Da (Keith in sod., 1991).

Levane sintetizirajo številne bakterije, med njimi tudi *B. subtilis*, *Zymomonas mobilis* in *Erwinia herbicola*, in sicer z ekstracelularnim inducibilnim encimom levansukrazo, natančneje saharoza 6-fruktoziltransferazo (EC 2.4.1.10) (Han, 1990; Srikanth in sod., 2015). Levansukraza cepi O-glikozidno vez med glukozo in fruktozo v molekuli saharoze ter prenese posamezno fruktofuranozilno enoto na hidroksilno skupino C₆ terminalnega fruktoznega ostanka rastoče verige levana (Han, 1990; Meng in Fütterer, 2003; Srikanth in sod., 2015). Poleg saharoze so lahko donorji fruktoze za sintezo mikrobnih levanov še rafinoza, maltoza, manoza, ali pa v reakciji vstopa direktno fruktoza, vendar tedaj reakcija polimerizacije levana poteka počasneje kot s saharozo (Srikanth in sod., 2015).

Levani so netoksični, ne dražijo oči, so temperaturno obstojni in odporni na razgradnjo z glivnimi amilazami in invertazami (Srikanth in sod., 2015). Dodatek pektina, gume rožičevca in polietilen glikola povzroči fazno separacijo zmesi z levanom (Kasapis in sod., 1994; Chung in sod, 1997). V vodi so levani zelo dobro topni: levan bakterij rodu *Bacillus* celo do 55 % (w/v) (Arvidson in sod., 2006). Različni levani imajo tudi nizko intrinzično viskoznost v vodi, med 0,07 in 0,18 dL/g pri velikosti med $1,6 \times 10^7$ Da in $2,4 \times 10^7$ Da (Arvidson in sod., 2006). To je dokaj nenavadno za polimere takih velikosti. Komercialno dostopni polisaharidi podobnih velikosti, kot so na primer celuloza, ksantan in karagenan imajo intrinzične viskoznosti v rangu med 5 dL/g in 50 dL/g, kot povzema Arvidson (2006). Dinamična viskoznost levana, ki ga sintetizirajo bakterije *Microbacterium laevaniformans* z naraščajočo strižno hitrostjo pada, kar kaže na njegov psevdoplastični značaj (Bae in sod., 2008). Zaradi omenjenih lastnosti so tudi komercialno zelo zanimivi v številnih industrijskih panogah: živilski, farmacevtski, kozmetični, tekstilni, industriji barv in črnih ter v medicini (Han, 1990; Srikanth in sod., 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- 10 kbp DNA lestvica (GeneRuler, Thermo Scientific, ZDA)
- 1x TAE elektroforezni pufer (Sigma Aldrich, Nemčija)
- agarosa (Sigma Aldrich, Nemčija)
- BCA reagent:
 - komponenta A: raztopina z bikinkonsko kislino (Sigma Aldrich, USA)
 - komponenta B: Raztopili in zmešali smo 10 ml 3,5 % (w/v) asparaginske kisline in 5 % (w/v) Na₂CO₃ s 4 ml 4 % (w/v) CuSO₄ in dodali 1 ml destilirane H₂O.
 - BCA reagent: Združili smo komponenti A in B v razmerju 23:1, dodali še 6 deležev 96 % (v/v) etanola in pridobili 30 ml BCA reagenta.
- D - fruktoza (Biochemica, Fluka, Švica)
- DNA bakterije *Bacillus subtilis*, izolirana na Katedri za mikrobiologijo, BF, UL
- DNA izolirana iz lososovih mod (Sigma Aldrich, ZDA, lot 047K7304)
- DNaza I (Thermo Fisher scientific, ZDA)
- fiziološka raztopina (0,9 % (w/v) NaCl)
- fluorescenčno barvilo GelRed Nucleic Acid Red Stain (41003, Biotium, ZDA)
- fluorescenčno barvilo nukleinskih kislin DAPI (Carl Roth GmbH and Co. KG, Nemčija)
- levan bakterije *Bacillus subtilis*, izoliran na Katedri za mikrobiologijo, BF, UL (Benigar in sod., 2014)
- levan bakterije *Erwinia herbicola* (Sigma Aldrich, Izrael, lota 101M4038V in 021M4050)
- levan bakterije *Zymomonas mobilis* (Sigma Aldrich, Nemčija, lot: E432891/1V)
- nanašalni elektroforezni pufer (Sigma Aldrich, Nemčija)
- natrijev azid (Sigma Aldrich, Nemčija)
- natrijev fluoresceinat (Sigma Aldrich, Nemčija)
- poli L-lizin (Sigma Aldrich, Nemčija)
- pufer PBS: 8,00 g/L NaCl, 0,20 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄, pH umerjen na 7,4
- reagent proti bledenju fluorescence SlowFade Gold (Life Technologies, ZDA)
- silikatne kroglice premera 2,32 µm (SS04N, Bangs Laboratories, Inc., Indiana, ZDA)
- standardi za HPSEC iz dekstrana (Polymer standards service GmbH, Nemčija, lot dxtkit-05)

Preglednica 1: Lastnosti standardov dekstrana za HPSEC po specifikacijah proizvajalca.

Zaporedna številka standarda	M _p (Da)	M _w (Da)	M _n (Da)	PDI
1	1080	1320	1080	1,22
2	9900	11600	8100	1,43
3	$1,24 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	1,48
4	$4,01 \times 10^5$	$6,68 \times 10^5$	$3,33 \times 10^5$	2,01
5	$2,21 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$	2,50

3.1.2 Gojišča

Uporabili smo naslednja gojišča:

- trdno gojišče LB: 1,0 % (w/v) tripton, 0,5 % (w/v) kvasni ekstrat, 1,0 % (w/v) NaCl in 1,5 % (w/v) agar.
- tekoče gojišče LB: 1,0 % (w/v) tripton, 0,5 % (w/v) kvasni ekstrat in 1,0 % (w/v) NaCl.
- tekoče gojišče SYM (Shida in sod., 2002): K₂HPO₄ 70 mM; KH₂PO₄ 30 mM; (NH₄)₂SO₄ 25 mM; MgSO₄ 0,5 mM; MnSO₄ 0,01 mM; amonijev železov(III) citrat 22 mg/l; kvasni ekstrat 2 % (w/v) in saharoza 20 % (w/v). Priprava 500 ml gojišča: 375 ml deionizirane vode dodamo 6,1 g K₂HPO₄; 2,05 g KH₂PO₄; 1,65 g (NH₄)₂SO₄; 15,5 µl 5 % (w/v) MnSO₄ in 10 g kvasnega ekstrakta ter pripravljeno mešanico avtoklaviramo na 121 °C. Po avtoklaviraju in ohladitvi mešanice aseptično dodamo 600 µl 5 % (w/v) MgSO₄ in 1100 µl 1 % (w/v) amonijevega železovega(III) citrata, ki smo ju avtoklavirali ločeno na 121 °C. Nazadnje dodamo še 125 ml 80 % (w/v) saharoze, ki smo jo avtoklavirali na 110 °C.
- tekoče gojišče SYM brez kvasnega ekstrakta. Pripravljeno po enakem postopku kot gojišče SYM, le brez dodatka kvasnega ekstrakta.

3.1.3 Bakterijski sevi

Uporabili smo bakterijske seve *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* NCIB 3610 divji tip, dvojno mutanto *ΔtasA/eps* (*tasA::spc* *eps(A-O)::tet*) in *B. subtilis* YC164 (P_{epsA-gfp} v *amy* lokusu, Cm^R). Obe mutanti sta bili pripravljeni iz seva NCIB 3610.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava suspenzij levana in raztopin DNA

Suspenzije željenih koncentracij različnih levanov in raztopin DNA, izolirane iz lososovih mod, smo pripravili v pufru PBS, ki smo ga predhodno prefiltrirali s filtrom premera por 0,20 µm (Sartorius, Nemčija) z namenom odstranitve nečistoč. Vzorce DNA smo mešali z vrtinčnim mešalom vsaj 10 min, pri raztopinah višjih koncentracij je bilo potrebno mešati tudi do 50 minut za dosego vidno homogene raztopine. V poskusih smo uporabljali dve

različni šarži levana *Erwinia herbicola*: šarža z lotom 021M4050V je bila v nitasti obliki, ki se je enostavno raztopila do homogene suspenzije delcev levana. Homogeno suspenzijo smo definirali preko odsotnosti neraztopljenih agregatov, sestavljenih iz večih delcev levana, kar smo sproti preverjali z mikroskopom. Šarža z lotom 101M4038V je bila v gostejši gmotasti obliki in se je raztopila do homogene suspenzije, podobne prvo naštevi šarži, šele po 30 min mešanja z vrtinčnim mešalom in gretja v vodni kopeli za 30 min na 100 °C. Levana bakterij *Zymomonas mobilis* in *Bacillus subtilis* sta se raztopila po 10 minutah mešanja do homogene suspenzije.

Suspenzije levanov (1; 2; 4 in 6 % (w/v)) smo pripravili tudi v prefiltirani deionizirani vodi po zgoraj opisanem postopku za določitev povprečnega premera delcev levanov s pomočjo mikroskopije.

3.2.2 Priprava zmesi levana, DNA in DAPI

Pripravili smo trikratne koncentracije končnih raztopin DNA in DAPI ter suspenzije levana v pufru PBS, kot je opisano zgoraj. Za pripravo zmesi smo zmešali enake volumne (15 µL) izbranega levana, DNA in DAPI v 1,5 ml mikrocentrifugirkah in jih mešali z vrtinčnim mešalom približno 1 min. Nato smo vzorce inkubirali (40 ± 10) min pri sobni temperaturi ovite v aluminijasto folijo, da smo preprečili fotooksidacijo barvila DAPI. Pripravili smo kontrole brez barvila DAPI in ugotovili, da le-ta ni vplival na tvorbo skupkov. Vse zmesi smo pripravili v vsaj dveh ponovitvah. Pripravili smo zmesi naslednjih končnih koncentracij levana *Erwinia herbicola*: 4; 3; 2; 1; 0,5; 0,33 in 0,1 % (w/v). Pri vzorcih levana *Erwinia herbicola* s koncentracijo ≤1 % (w/v) smo dodali toliko DNA, da smo dosegli naslednja razmerja levana in DNA: 100:1; 20:1; 10:1; 5:1; 3:1 in 1:1 (w/w), pri koncentracijah levana >1 % (w/v) pa toliko DNA, da smo dosegli razmerja levana in DNA 100:1; 20:1 in 10:1 (w/w). Z levanoma *Zymomonas mobilis* in *Bacillus subtilis* smo pripravili naslednje zmesi končnih koncentracij: 1; 0,5; 0,33 in 0,1 % (w/v). Pri vsaki izmed naštetih končnih koncentracij levana *Zymomonas mobilis* smo dodali toliko DNA, da smo dosegli razmerja levana in DNA 100:1; 20:1; 10:1; 5:1; 3:1 in 1:1 (w/w), pri vzorcih levana *Bacillus subtilis* pa le razmerje levana in DNA 1:1 (w/w). V vsako zmes smo dodali 3×10^{-4} % (w/v) DAPI.

3.2.3 Priprava preparatov in svetlobna mikroskopija

Objektna stekla smo oprali s 70 % etanolom, z deionizirano vodo in jih posušili. Z avtomatsko pipeto smo na objektno steklo nanesli 5 µl vzorca in ga pokrili s krovnim stekлом velikosti 20×20 mm² in debeline od 0,16 mm do 0,19 mm. Za preprečitev izhlapevanja vode smo režo med objektnim in krovnim steklom zatesnili s prozornim lakom za nohte. Uporabljali smo invertni mikroskop Axio Observer Z1 (Zeiss, Göttingen, Nemčija). Preparate smo opazovali s kontrastno tehniko diferenčnega interferenčnega kontrasta (DIC), tehniko faznega kontrasta (PH) in fluorescenčno tehniko (FL) z uporabo kockastega filtra 49 DAPI (Zeiss, Göttingen, Nemčija). Uporabljali smo 63× (NA 0,75) in 100× (NA 1,4) objektiva (Zeiss, Göttingen, Nemčija) in 1,6× ter 2,5× vmesno lečo. Slike

smo posneli z MRm Axiocam kamero in jih obdelali s programom ImageJ verzije 1.48b z dodanim vmesnikom za poenotenje ozadja slik, posnetih s tehniko DIC. Kontrast slik smo izboljšali s funkcijo za izboljšanje kontrasta.

3.2.4 Določitev premera levanskih delcev

Za nepristransko določitev povprečnega premera delcev smo analizirali premere delcev na slikah levanov s programom ImageJ vzdolž horizontalne in vertikalne osi. Za posamezen levan sta podana povprečni premer delcev in standardni odklon. Pridobljena sta iz vsaj 60 premerov različnih delcev levana.

3.2.5 Določitev odstotka raztopljenega levana v suspenziji

Odstotek raztopljenega levana v suspenziji smo določili s pomočjo kolorimetrične metode celokupnih sladkorjev (Cuesta in sod., 2003). Pripravili smo dva seta suspenzij levana *E. herbicola*, *Z. mobilis* in *B. subtilis* naslednjih končnih koncentracij: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 in 0,5 mM. Pri prvem setu smo 500 µl vzorca levana vsake koncentracije centrifugirali pri 18000 g pri 4 °C za 15 min. Po centrifugiraju smo 300 µl supernatanta prenesli v viale iz borosilikatnega stekla. Drugi set vzorcev so bile 300 µl suspenzije necentrifugiranega levana. Obema setoma vzorcev smo dodali 150 µl 5 % (w/v) fenola, po kratkem mešanju z vrtinčnim mešalom še 750 µl koncentrirane žveplove(VI) kislina. Viale smo zatesnili z zamaški, jih ohladili v vodni kopeli s sobno temperaturo, da je bil začetek reakcije pri vseh vzorcih enak, nato pa potopili v vodno kopel s 100 °C za 20 min. Žveplova(VI) kislina je med reakcijo cepila β-glikozidno vez med fruktoznimi ostanki v levanu. Fruktozni monomeri so nato pri povišani temperaturi dehidrirali v hidroksimetil furfural, ki je s fenolom tvoril rumeno barvo. Po ohladitvi na sobno temperaturo in nanosu vzorcev na mikrotitrsko ploščo smo izmerili optično gostoto pri 490 nm s pomočjo čitalca mikrotitrski plošč (Multiskan spectrum, Thermo Electron Corporation, Finska). Odstotek raztopljenega levana v suspenziji (% razt. lev.) smo izračunali kot stokratni količnik med koncentracijo levana v supernatantu (L_s) in koncentracijo levana v raztopini (L_t):

$$\% \text{ razt. lev.} = \frac{L_s}{L_t} \times 100 \quad \dots(1)$$

Umeritveno krivuljo smo pripravili iz raztopin fruktoze naslednjih končnih koncentracij: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 in 0,5 mM vsakokrat posebej. Pripravili smo tudi vzorec z deionizirano vodo, katerega optična gostota je predstavljala ozadje in smo to vrednost odšteli od optičnih gostot vseh preostalih vzorcev. Pri posameznem levanu smo poskus, pri katerem smo določili odstotek raztopljenega levana v suspenziji, ponovili vsaj dvakrat.

3.2.6 Določitev površine, ki jo pokrivajo skupki levana

Odstotek površine, ki jo pokrivajo skupki levana *Erwinia herbicola*, smo določili iz slik, pridobljenih z 63× objektivom (NA 0,75) v tehniki PH. Po poenotenju ozadja slik s pomočjo programa ImageJ smo z istim programom nastavili intenziteto sivine, ki je

pokrivala večino skupkov in najbolje izključevala okoliški šum. Slike smo pretvorili v binarni format in skupke po potrebi ročno zamejili. Odstotek površine, ki jo pokrivajo skupki levana, smo določili s pomočjo funkcije za analizo delcev v programu ImageJ. Objekti, ki so bili manjši od ločljivosti objektiva ($< 0,4 \mu\text{m}$) so predstavljali šum in niso bili vključeni v določitev površine, ki so jo pokrivali skupki.

3.2.7 Tretiranje zmesi levana in DNA z DNAAzo I

Z namenom preverjanja stabilnosti zmesi levana in DNA smo zmes tretirali z DNAAzo I. 15 μl 0,99 % (w/v) levana *Erwinia herbicola* v prefiltirani deionizirani vodi smo dodali 15 μl 0,33 % (w/v) DNA. Nato smo zmesi dodali še 10 μl 22,5 mM MgCl₂, 1,8 Kunitz enot DNAAze I in zmes previdno pomešali s pipetiranjem. Sledila je 2,5 h inkubacija na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali še 3,65 μl 12,3×10⁻⁴ % (w/v) DAPI, celoten volumen mešanice je znašal 45 μl . Vzorec smo ponovno previdno pomešali s pipetiranjem in ga analizirali s pomočjo mikroskopa s kontrastno tehniko DIC in fluorescenčno mikroskopijo. Pripravili smo kontrolni vzorec brez DNA-ze I, da smo preverili nastanek skupkov levana v raztopini z MgCl₂. Preverili smo tudi vpliv DNAAze I na suspenzijo delcev levana po enakem postopku, kot je opisan za zmes levana in DNA.

3.2.8 Makroreologija levana, DNA in njunih zmesi

Pripravili smo suspenzije levana *Erwinia herbicola* v prefiltiranem pufru PBS (0,1; 0,33; 0,5; 1 in 4 % (w/v)), raztopine DNA v prefiltiranem pufru PBS (0,0033; 0,0165; 0,033; 0,066; 0,11 in 0,33 % (w/v)) ter zmesi levana in DNA brez barvila DAPI v razmerjih 100:1; 20:1; 10:1; 5:1; 3:1 in 1:1 (w/w) pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana, kot je opisano v podpoglavljih 3.2.1 in 3.2.2. Za merjenje makroviskoznosti smo uporabljali rotacijski reometer Anton Paar Physica MCR 301 (Gradec, Avstrija) s sistemom plošča-plošča. Polmer plošče je bil 49,975 mm, razdalja med ploščama 0,250 mm, temperatura merjenja ($20,00 \pm 0,01$) °C. Z avtomatsko pipeto smo nanesli približno 490 μl vzorca, kar je bilo dovolj za zapolnitev prostora med ploščami. Izmerili smo viskoznost pri strižnih hitrostih v območju med 2 in 1000 s^{-1} v 28 konstantno logaritmično odmaknjениh točkah s časovnim zamikom 5 s med zaporednimi meritvami.

3.2.9 Mikroreologija levana, DNA in njunih zmesi

Kupljeno 10 % (w/v) suspenzijo silikatnih kroglic smo redčili z deionizirano vodo za faktor 10⁴. Po 10 μl tako razredčene suspezie silikatnih kroglic smo dodali k 50 μl suspenzijam levana *Erwinia herbicola* in pridobili naslednje končne koncentracije levana: 0,1; 0,33; 0,5 in 1 % (w/v). Po enakem postopku smo pridobili tudi naslednje končne koncentracije DNA: 0,0033; 0,0165; 0,033; 0,066 in 0,11 % (w/v) in zmesi levana in DNA v razmerju 100:1; 20:1; 10:1; 5:1 in 3:1 (w/w) pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana. Po 1 min mešanju z vrtinčnim mešalom smo približno 40 μl vsakega vzorca z avtomatsko pipeto prenesli v celico, ki je bila sestavljena iz dveh krovnih stekel. Zgornje je bilo krožno s polmerom 10 mm in debeline od 0,16 mm do 0,19 mm, spodnje pa pravokotno (60×24

mm^2) in enake debeline kot zgornje. Krovni stekli sta bili med seboj oddaljeni 200 μm , kar smo dosegli z distančniki. Po zapolnitvi vmesnega prostora z vzorcem smo rob med obema krovnikoma zatesnili z UV lepilom in celico izpostavili UVA svetlobi (365 nm). Tako smo preprečili izhlapevanje vode in s tem zmanjšali tokove v celici.

Pred vsakimi mikroreološkimi meritvami smo togost optične pasti ponovno umerili s pomočjo statistične analize premikanja kroglice v stacionarni pasti s pomočjo programa TweezPal (Osterman, 2010).

Za izvedbo mikroreoloških poskusov smo uporabljali invertni mikroskop Nikon Eclipse TI (Nikon, Amstelveen, Nizozemska) z lasersko pinceto (Aresis, Tweez 250si). Laserski žarek v infrardečem območju (valovna dolžina 1064 nm) smo fokusirali skozi vodno imerzijski 60 \times objektiv (NA 1,0) (Nikon, Amstelveen, Nizozemska) v ravnino celice z vzorcem in ga uporabljali za manipulacijo silikatnih kroglic med meritvami. Meritve so potekale pri sobni temperaturi (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, gravitacijski vpliv smo zanemarili. Da bi preprečili vpliv površinskih efektov na meritve smo laserski žarek fokusirali v ravnino, ki je bila oddaljena od spodnjega in zgornjega roba vsaj 20 μm . Lokacijo optične pasti smo sinusoidno spremenjali z konstantno amplitudo 0,3 μm in frekvencami 0; 5; 1; 2; 5 in 10 Hz. Lokacijo silikatne kroglice v optični pasti smo posneli s CMOS kamero (PixeLink, PLB-741) z 200 slikami vsako sekundo. Zajetje slik s kamero je bilo sinhronizirano z gibanjem optične pasti preko zunanjega sprožilca, kar je omogočilo natančno določitev faznega zamika med lokacijo kroglice in lokacijo optične pasti. Trajektorije kroglice smo pridobili z analizo pridobljenih posnetkov s pomočjo programa PartTrack verzije 3,36. Za pridobitev mikroreoloških lastnosti vzorcev so bile trajektorije kroglice in optične pasti analizirane s posebej v ta namen napisanim programom v Matlabu (Osterman, 2010).

3.2.9.1 Teorija aktivne enodelčne mikroreologije

Aktivne enodelčne mikroreološke meritve smo izvedli z natančno, računalniško vodeno sinusoidno modulacijo lokacije optične pasti in sinhronim merjenjem lokacije silikatne kroglice v pasti. Sinusoidno modulacijo optične pasti lahko opišemo kot

$$x_t(t) = A_t \sin(\omega t), \quad \dots(2)$$

kjer je A_t amplituda odmika optične pasti in ω frekvenca modulacije pasti. Lokacijo silikatne kroglice v odvisnosti od časa smo dobili z analizo posnetka in jo lahko zapišemo kot

$$x_b(t) = A_b(\omega) \sin[\omega t - \delta_b(\omega)], \quad \dots(3)$$

kjer je $A_b(\omega)$ amplituda odmika silikatne kroglice in $\delta_b(\omega)$ fazni zamik kroglice. Če zanemarimo vztrajnostni prispevek in termalne fluktuacije, lahko enačbo gibanja okroglega telesa, $x(t)$, s polmerom r zapišemo kot

$$6\pi\eta r\dot{x}(t) + [k_t + k_m]x(t) = k_t A_t \sin(\omega t), \quad \dots(4)$$

kjer je η viskoznost topila, k_m lokalna togost medija in k_t togost optične pasti. Rešitev enačbe gibanja (Valentine in sod., 1996; Frust, 2005; Brau in sod., 2007) da obe komponenti kompleksnega viskoelastičnega modula:

$$G'(\omega) = \frac{k_m}{6\pi r} = \frac{k_t}{6\pi r} \left[\frac{\cos \delta_b(\omega) A_t(\omega)}{A_b(\omega)} - 1 \right], \quad \dots(5)$$

in

$$G''(\omega) = \omega\eta(\omega) = \frac{k_t}{6\pi r} \left[\frac{\sin \delta_b(\omega) A_t(\omega)}{A_b(\omega)} \right]. \quad \dots(6)$$

3.2.10 Gelska elektroforeza bakterijske in lososove DNA

Pripravili smo 30 ml 0,8 % (w/v) agaroznega gela velikosti 6 cm × 10 cm: agarozo smo raztopili v 1× TAE elektroforeznem pufru v mikrovalovni pečici. Po nanosu raztopljeni agaroze v plastično banjico z glavničkom, smo raztopino pustili na sobni temperaturi vsaj 20 min, da se strdi. Oba vzorca DNA (DNA, izolirano iz *Bacillus subtilis* in iz lososovih mod) smo pomešali z nanašalni pufrom v razmerju DNA:nanašalni pufer = 5:1 (v/v), previdno pomešali s pipetiranjem in ju prenesli v jamici v gelu. V tretjo jamico smo nanesli tudi 10 kbp lestvico DNA. Elektroforezno kadičko (mini sub cell GT 8, Bio-Rad, Madžarska) smo napolnili z 1× TAE pufrom, priključili na napajalnik (P 25 Standard Power Pack, Biometra, Nemčija) in ga nastavili na 75 V in 40 mA. Elektroforeza je potekala toliko časa, dokler ni prednji rob modrega barvila bromofenol prepotoval približno 60 % dolžine gela. Po končani gelski elektroforezi smo gel barvali 25 min z rdečim barvilom GelRed, nato pa ga sprali v kadički z deionizirano vodo. Slike smo posneli z G boksom (SynGene, UK) in jih obdelali s programom GeneSnap (SynGene, UK).

3.2.11 Sonikacija levana *Erwinia herbicola*

Pripravili smo 1,5 % (w/v) suspenzijo levana *E. herbicola* v deionizirani vodi, (podpoglavlje 3.2.1). Kot kontrolo poskusa smo sonicirali še 1,5 % (w/v) standard dekstrana za HPSEC (preglednica 1, zaporedna številka standarda 4) in 1,5 % (w/v) fruktozo. Uporabljali smo ultrasonični dezintegrator Mk 2 (MSE scientific instruments, Sussex, Anglija) s 3 mm eksponentno konico (MSE scientific instruments, Sussex, Anglija). Sonicirali smo v 1,5 ml mikrocentrifugirki, v kateri je bilo ob pričetku sonikacije 1 ml vzorca. Sonikacija je potekala v 20 s intervalih pri amplitudi 12 µm in frekvenci 20 kHz 960 s. Med sonikacijo in vmesnimi intervali, ki so trajali vsaj 30 s, smo vzorec hladili z ledom. Po vsakih 80 s sonikacije smo s pomočjo tehtanja mikrocentrifugirke na analitski tehtnici (XA105 dual range, Mettler Toledo, Giessen, Nemčija) določili količino izhlapele

vode ter jo nadomestili na raven pred sonikacijo. Po 40, 80, 160, 320, 640 in 960 s sonikacije smo odvzeli alikvot vzorcev za kasnejšo določitev številčne povprečne molekulske mase (M_n) z metodo HPSEC in koncentracijo redukcijskih sladkorjev z metodo BCA. Med 960 s sonikacijo smo celokupno odvzeli 120 μl vzorca za analize od začetnega 1 ml, pri obeh kontrolah pa 285 μl od začetnega 1 ml.

3.2.11.1 Določitev M_n levana in dekstrana z metodo HPSEC

Uporabili smo tekočinsko kromatografsko tehniko s predkolono in tremi zaporedno vezanimi kolonami, s katerimi smo vzorce levana in dekstrana ločili po velikosti.

Predkolona: PSS Suprema Analytical, dimenzije: 50 mm \times 8,00 mm, velikost delcev: 10 μm .

Kolone:

- PSS Suprema Analytical 10000 Å, ki ločuje molekule velikosti 10 Da – 10^6 Da
- PSS Suprema Analytical 1000 Å, ki ločuje molekule velikosti 100 Da – 10^6 Da
- PSS Suprema Analytical 100 Å, ki ločuje molekule velikosti 100 Da – 10^5 Da

Lastnosti kolon:

- Velikost: 300 mm \times 8,00 mm
- Stacionarna faza: polihidroksimetakrilatni polimer
- pH: 1,5-13
- Temperatura: do 80 °C
- Največji pretok: 2 ml/min
- Največji tlak: med 50 in 80 barov, odvisno od poroznosti kolone

Kromatografski pogoji:

- Mobilna faza: 0,05 M NaOH
- Temperatura kolon: 35 °C
- Pretok: 1 ml/min
- Čas meritve: 40 min
- Volumen vzorca: 112 μl

Detektorja:

- Smartline RI detektor 2300/2400, KNAUER, Advanced Scientific Instruments
- UV detektor K-2501, KNAUER, Advanced Scientific Instruments

Vzorcem levana in dekstrana v 0,05 M NaOH smo dodali fruktozo kot interni standard. Končne koncentracije vzorcev in internega standarda v vzorcih so bile 0,05 % (w/v). Večje

delce smo odstranili iz vzorcev v mikrocentrifugirkah s centrifugiranjem (10000 g, 10 min).

Molekulsko maso nesoniciranega levana (točka ob času 0 na sliki 12A) smo le ocenili, saj večji kroglasti delci levana kljub centrifugiranju ostanejo na predkoloni. Iz mikroskopske ocene polmera smo ocenili volumen kroglastih delcev. Gostoto delcev smo ocenili na 1,1 g/cm³, saj so bili delci pod mikroskopom v tehniki DIC (ang. Differential Interference Contrast) podobno kontrastni kot celice, ki imajo gostoto približno 1,1 g/cm³ (Czerlinski in sod., 1987). Iz prostornine in gostote smo nato izračunali maso delca ter to pomnožili z Avogadrovim številom. Dobavljen rezultat je predstavljal oceno številčne povprečne molekulske mase (M_n). Napako ocene molekulske mase nesoniciranega levana smo izračunali iz standardnega odklona porazdelitve polmerov kroglastih delcev.

M_n vzorcev soniciranega levana smo izračunali po naslednjem postopku iz kromatogramov, pridobljenih z detektorjem za spremembo refrakcijskega indeksa (RI). Na podlagi internega standarda (fruktoze) smo retencijski čas vzorcev na kromatogramu popravili tako, da so se vrhovi fruktoze pokrivali tako pri standardih kot pri vzorcih soniciranega levana. Ker je bil razpon mas med različno dolgo soniciranim levanom velik, smo nekatere vrhove na kromatogramu modelirali, saj so večji delci levana ostali na predkoloni. Eluirali so se le manjši delci v vzorcu, zato smo na kromatogramu videli porezan začetni del vrha. Vrh smo modelirali z Gaussovim modelom s programom Origin 9.0 (OriginLab, Massachusetts, USA), saj smo pričakovali normalno porazdelitev mase molekul. Pri vsaki krivulji smo odsteli bazno linijo.

Za pretvorbo elucijskega časa v molekulsko maso na najvišjih točkah vrhov (M_p) smo pripravili umeritveno krivuljo (priloga A) iz standardov dekstrana (podpoglavlje 3.1.1, preglednica 1). Iz umeritvene krivulje smo za vsako točko krivulje na kromatogramih vzorcev določili molekulsko maso (M_{pi}). Iz dela kromatograma, ki je predstavljal vrh soniciranega levana, smo povprečili vse refrakcijske indekse (RI) in tako izračunali povprečni RI, ki je ustrezal koncentraciji 1,5 % (w/v) levana. Z deljenjem teh dveh količin smo dobili vrednost, ki je predstavljala koncentracijo polisaharida na signal ($c_{p/s}$):

$$c_{p/s} = \frac{0,015 \frac{g}{ml}}{povprečni RI} \quad \dots(7)$$

Z množenjem $c_{p/s}$ z vrednostjo signala (RI) v točkah vrha na kromatogramu smo pridobili koncentracijo soniciranega levana (c_{levana}) v točkah vrha v enotah (g/ml):

$$c_{levana} \left[\frac{g}{ml} \right] = c_{p/s} \times RI \quad \dots(8)$$

Koncentracijo verig (N_i) v posameznih točkah vrha v enotah (mol/ml) na kromatogramu smo izračunali z deljenjem koncentracije soniciranega levana (c_{levana}) in M_{pi} v posameznih točkah vrha:

$$N_i \left[\frac{mol}{ml} \right] = \frac{c_{levana}}{Mp_i} \quad \dots(9)$$

Številčno povprečno molekulsko maso (Mn) v enotah Dalton smo izračunali takole (Atkins, 1994):

$$Mn [Da] = \frac{\sum N_i \times Mp_i}{\sum N_i} \quad \dots(10)$$

N_i predstavlja število verig v posameznih točkah vrha, Mp_i pa Mp v posameznih točkah vrha, pridobljen je iz umeritvene krivulje s standardi dekstrana. Utežno povprečno molekulsko maso (Mw) v enotah Dalton smo izračunali tako (Atkins, 1994):

$$Mw [Da] = \frac{\sum N_i \times Mp_i^2}{\sum N_i \times Mp_i} \quad \dots(11)$$

Molekulsko maso v najvišji točki vrha (Mp) v enotah Dalton pa takole:

$$Mp [Da] = \sqrt{Mw \times Mn} \quad \dots(12)$$

Pri soniciranem levanu smo napako Mn določili iz napake modeliranja vrha z Gaussovim modelom. Za vsako časovno točko smo poiskali krivulji modela, iz katerih smo izračunali najvišji in najnižji Mn . Ti dve vrednosti Mn sta predstavljali spodnjo in zgornjo mejo napake. Napako smo določili tudi iz napake umeritvene krivulje, kjer smo čas elucije razbrali z natančnostjo $\pm 0,1$ min. Prikazana je večja izmed naštetih napak znotraj ene ponovitve.

Pri vzorcu soniciranega dekstrana vrhov na kromatogramu ni bilo potrebno modelirati, saj se je eluiral v celoti. Mw , Mn in Mp smo izračunali na enak način, kot je opisano za levan. Napaka Mn predstavlja napako, ki smo jo določili iz napake umeritvene krivulje na enak način kot pri levanu. Sonikacijo levana, dekstrana in fruktoze smo ponovili trikrat.

3.2.11.2 Določitev koncentracije redukcijskih koncev levana, dekstrana in fruktoze z metodo BCA

Metodo BCA za kvantitativno zaznavanje redukcijskih koncev so opisali Manzi in sodelavci (1995). Pripravili smo po $300 \mu L$ razredčenega vzorca levana, dekstrana in fruktoze. $1,5 \text{ \% (w/v)}$ levan smo po odvzemu vseh alikvotov redčili 30-krat, da smo prišli znotraj intervala največje občutljivosti metode. $1,5 \text{ \% (w/v)}$ dekstran smo pred sonikacijo redčili $2\times$, po 80 s sonikacije $4\times$ in po vseh nadaljnih časih $6\times$. $1,5 \text{ \% (w/v)}$ fruktozo smo po odvzemu vseh alikvotov redčili $1666\times$. $300 \mu L$ tako razredčenih vzorcev v borosilikatnih vialah smo dodali $700 \mu L$ reagenta BCA. Po zatesnitvi vial in kratkem mešanju z vrtinčnim mešalom smo vzorce izpostavili $80^\circ C$ za 30 min. Pri tem se je bakrov(II) kompleks reduciral v obarvani bakrov(I) kompleks zaradi oksidacije redukcijskih koncev sladkorjev v alkalni raztopini. Po ohladitvi na sobno temperaturo smo vzorce prenesli z avtomatsko pipeto na mikrotitrsko ploščo in pomerili optično gostoto pri 560 nm s čitalcem

mikrotitrskih plošč (Multiskan spectrum, Thermo electron corporation, Finska). Umeritveno krivuljo smo pripravili iz 8 koncentracij raztopin fruktoze od 6×10^{-5} % (w/v) do $1,8 \times 10^{-3}$ % (w/v) vsakokrat posebej. Pripravili smo tudi vzorec z deionizirano vodo, katerega optična gostota je predstavljala ozadje. To vrednost smo odšteli od optičnih gostot preostalih vzorcev. Iz koncentracije redukcijskih koncev (c_{rk}) smo izračunali Mn po formuli:

$$Mn [Da] = \frac{1,5\%}{c_{rk}} \times 162 Da \quad \dots(13)$$

Koncentracijo redukcijskih koncev smo podali v procentih in pomnožili z molekulsko maso fruktoznega ostanka.

Napake Mn smo izračunali iz umeritvene krivulje in iz napake odčitavanja optične gostote na spektrofotometru. Prikazana je višja izmed obeh napak. Med 960 s sonikacijo raztopine čiste fruktoze se koncentracija redukcijskih koncev ni spremnjala nad mejo napake (priloga B), kar kaže na stabilnost fruktoze med postopkom.

3.2.12 Gojitev bakterij

Bakterijski sevi *B. subtilis* so bili shranjeni na -80 °C. Divji tip smo pred pričetkom eksperimentov nacepili na trdno gojišče LB, dvojno mutanto $\Delta tasA/eps$ na gojišče LB z dodanimi antibiotikoma streptomycinom in tetraciklinom v končnih koncentracijah 100 µg/ml in 20 µg/ml, sev *B. subtilis* YC164 pa na gojišče LB z kloramfenikolom v končni koncentraciji 20 µg/ml. Plošče smo inkubirali na 28 °C 48 ur.

3.2.12.1 Gojitev stresanih kultur

Seve smo nacepili v 10 ml tekočega gojišča LB brez antibiotikov in jih inkubirali preko noči (16 h ± 1 h) v 100 ml erlenmajericah z utori na 28 °C s stresanjem pri 200 obr./min. Po končani inkubaciji smo pomerili optično gostoto suspenzije celic pri 650 nm z fotometrom (MA 9510, Metrel, Brand, Nemčija), da smo lahko dosegli ponovljive koncentracije celic v inokulumu.

3.2.12.2 Spiranje celic in ponovna gojitev stresanih kultur

Celice prekonočnih kultur smo po končani inkubaciji dvakrat oprali s fiziološko raztopino: dvakrat po 1 ml kulture celic posameznega seva smo centrifugirali (10000 g, 10 min) s centrifugo (5424 Eppendorf, Hamburg, Nemčija). S tem smo ločili celice od gojišča. Gojišče smo zavrgli in ga nadomestili z enako prostornino fiziološke raztopine, celice pa resuspendirali z mešanjem z vrtinčnim mešalom pri 3000 obr./min do nastanka vidno homogene suspenzije. Spiranje smo ponovili dvakrat. Nato smo celice ponovno centrifugirali pri enakih pogojih, zavrgli fiziološko raztopino in jih resuspendirali z mešanjem v gojišču SYM.

Oprane celice sevov divjega tipa in dvojne mutante prekonočnih kultur smo gojili v gojišču SYM: 500 ml erlenmajerici z utori in 100 ml gojišča SYM smo nacepili z 2 ml kulture opranih celic posameznega seva, torej z 2 % (v/v) inokulumom. Seva smo inkubirali do 24 ur na 28 °C s stresanjem pri 200 obr./min. Takoj po nacepitvi in po 30; 60; 90; 120 ter 150 minutah inkubacije smo pomerili optično gostoto pri 650 nm in odvzeli 1 ml alikvot obeh sevov ter ju shranili na 4 °C za kasnejše opazovanje z optično pinceto. Pripravili smo tudi vzorec bakterij, ki smo ga odvzeli takoj po nacepitvi, z dodanim 7,7 mM (= 0,05 % (w/v)) NaN₃ v končni koncentraciji in vzorec z opranimi celicami prekonočne kulture, ki smo ga razredčili za faktor 10⁴ ter mu dodali 7,7 mM NaN₃ v končni koncentraciji.

Oprane celice seva fluorescenčno označene mutante smo oprali in gojili na enak način kot celice divjega tipa, le da smo odvzeli vzorce takoj po nacepitvi in po 2,5; 6 in 26 urah. Vzorce smo takoj po odvzetju pogledali pod epifluorescenčnim mikroskopom (3.2.17).

3.2.12.3 Gojitev plavajočih biofilmov

Prekonočno kulturo divjega tipa smo nacepili, inkubirali ter po inkubaciji celice sprali kot je opisano v podpoglavljih 3.2.12.1 in 3.2.12.2.

Oprane celice prekonočne kulture divjega tipa smo gojili v Petrijevih ploščah: v Petrijevo ploščo s premerom 85 mm in s 50 ml sterilnega gojišča smo dodali 1 ml oprane kulture divjega tipa, torej 2 % (v/v) inokulum. Petrijeve plošče smo inkubirali na 28 °C vsaj 48 ur brez stresanja.

3.2.13 Določitev makroreoloških lastnosti stresanih kultur

Med gojivijo obeh bakterijskih sevov, ki je opisana v podpoglavlju 3.2.12.2, smo pomerili optično gostoto kulture pri 650 nm in odvzeli 1 ml alikvot takoj po inokulaciji celic, po 5 urah in po 24 urah. Pomerili smo viskoznost z rotacijskim reometrom Anton Paar Physica MCR 302 (Gradec, Avstrija) s sistemom stožec-plošča. Polmer stožca je bil 25 mm, kot 1 °, razdalja med stožcem in ploščo 0,102 mm, temperatura merjenja ($20,00 \pm 0,01$) °C. Z avtomatsko pipeto smo nanesli približno 590 µL vzorca, kar je bilo dovolj za zapolnitev prostora med stožcem in ploščo. Izmerili smo viskoznost pri strižnih hitrostih v območju med 0,5 s⁻¹ in 500 s⁻¹ v 25 točkah. Meritev v posamezni točki je trajala različno dolgo: v začetni točki 100 s, v zadnji 2 s, v vmesnih točkah je čas padal od 100 s proti 2 s z logaritemskim upadom. Poskus smo ponovili dvakrat, pri vsakem času smo optično gostoto povprečili in nato viskoznosti normalizirali na povprečno vrednost optične gostote.

3.2.14 Priprava preparatov in presevna elektronska mikroskopija divjega tipa

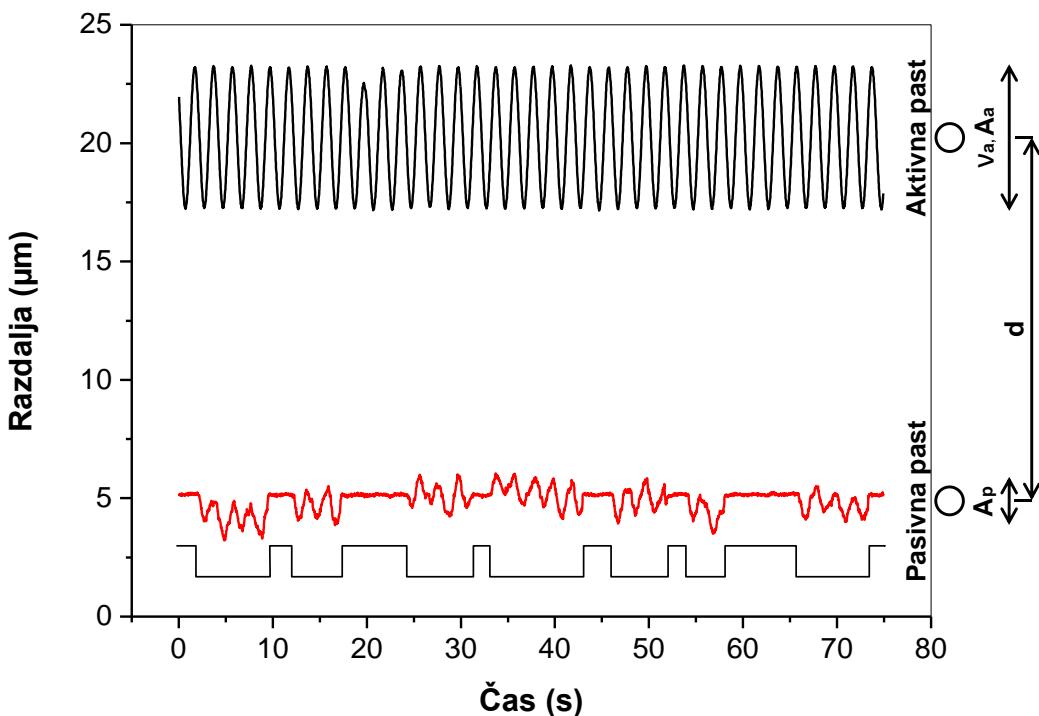
Bacillus subtilis

Oprane celice prekonočne kulture divjega tipa smo gojili v Petrijevih ploščah v gojišču SYM brez kvasnega ekstrakta (podpoglavlje 3.2.12.3). Pripravili smo preparate gojišča, celic takoj po nacepitvi in po 2,5 urah gojivte: približno 10 µl vzorca smo nanesli na bakrene mrežice z ogljikovim filmom (SPI Supplies, ZDA). Po 5 minutah, ko so se večji

objekti posedli, smo mrežice posušili pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato kontrastirali z dodatkom enakega volumna 1 % (w/v) uranilnega acetata za 5 s in ponovno posušili površino mrežic. Preparate smo si ogledali s presevnim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100) in posneli slike s CCD kamero 792 Bioscan (Gatan Inc., ZDA) in uporabo programa Digital Micrograph.

3.2.15 Določanje mehanske skloplitve gibanja bakterij z optično pinceto

Sklopljeno gibanje dveh bakterij v optičnih pasteh smo raziskovali z istim invertnim mikroskopom, opremljenim z optično pinceto, kot je opisan v podpoglavlju 3.2.9. Tudi priprava preparatov in rokovanje z optično pinceto sta bili podobni z nekaj izjemami, glavni sta bili: celice smo zatesnili s silikonsko pasto, namesto z UV lepilom, in vzorcem nismo dodajali silikatnih kroglic. Za opazovanje skloplitve gibanja bakterij smo ujeli dve nepremikajoči se bakteriji, podobnih velikosti, vsako v svojo optično past. Lokacijo ene izmed pasti (aktivna past) smo sinusoidno modulirali s konstantno amplitudo 3 μm in frekvenco 0,5 Hz. Druga past je bila stacionarna, zato smo jo poimenovali pasivna past. Pasivno past smo izklopili za približno 3 periode oscilacije aktivne pasti, da smo zaznali maksimalni učinek sinusoidne oscilacije aktivne pasti. Zaradi učinkovanja Brownovega gibanja smo pasivno past ponovno prižgali in s tem vrnili celice v začetno točko (Slika 5). Gibanje dveh bakterij smo merili na razdaljah med 10 μm in 45 μm (s 5 μm korakom) med aktivno in pasivno pastjo. Lokacijo obeh optičnih pasti smo posneli s CMOS kamero (UI-3370CP-M-GL, Obersulm, Nemčija) s približno 50 slikami vsako sekundo. Trajektorije lokacij v odvisnosti od časa smo pridobili z analizo posnetkov s programom za sledenje delcev (PartTrack V3.36, Aresis) in jih analizirali s programom Origin 9.0 (OriginLab, Massachusetts, ZDA).



Slika 5: Trajektorije aktivne in pasivne pasti divjega tipa *Bacillus subtilis* po 2,5 urah inkubacije v odvisnosti od časa. Razdalja med pastema (d) = 15 μm , amplituda aktivne pasti (A_a) = 3 μm , frekvenca aktivne pasti (v_a) = 0,5 Hz in amplituda pasivne pasti (A_p) = 1 μm . Črta pod trajektorijo pasivne pasti prikazuje stanje pasivne pasti (vključenost/izključenost).

Tako smo pridobili amplitudo pasivne pasti. Mejo detekcije smo postavili pri vrednosti amplitud pasivne pasti, ki so bile manjše od 0,35 μm . Z odmikanjem pasivne pasti od aktivne smo določili maksimalno razdaljo med optičnima pastema, pri kateri smo še zaznali amplitudo pasivne pasti. To razdaljo smo enačili z dometom medceličnih povezav. Poskus določitve dometa medceličnih povezav pri posameznih časih gojenja smo ponovili devetkrat.

Pomerili smo tudi amplitudo pasivne pasti silikatnih kroglic v vodi. S tem poskusom smo želeli pokazati, da pomerjena amplituda pasivne pasti ni posledica hidrodinamskega efekta oscilacije aktivne pasti (priloga C). Časovno domeno smo s Furierjevo transformacijo pretvorili v frekvenčno. Pri 0,5 Hz na grafu (priloga C) nismo zaznali amplitude pasivne pasti nad nivojem šuma.

3.2.16 Encimska razgradnja medceličnih povezav

Iz propadajočega plavajočega biofilma divjega tipa v gojišču MSgg (Branda in sod., 2001) smo pridobili izrabljeno gojišče z encimi za razgradnjo medceličnih povezav. Gojitev plavajočih biofilmov je opisana v podpoglavlju 3.2.12.3, od opisanega se je razlikovalo naslednje: biofilme smo gojili na 37 °C 54 ur, ko se je biofilm pričel razgrajevati in so se začele tvoriti spore. Takrat smo 1 ml izrabljenega gojišča centrifugirali (10000 g, 10 min). S tem smo ločili celice od izrabljenega gojišča z encimi. Stresani kulturi divjega tipa po 2,5

urah inkubacije smo dodali enak volumen nerazredčenega izrabljenega gojišča z encimi. Dodali smo še 7,7 mM (= 0,05 % (w/v)) NaN_3 v končni koncentraciji in s tem preprečili nadaljnjo rast bakterij. Vzorec smo pomešali s pipetiranjem in inkubirali na 37 °C ($17 \pm 0,5$) h. Pripravili smo tudi kontrolo, kjer smo stresani kulturi divjega tipa po 2,5 urah inkubacije dodali sveže gojišče MSgg v razmerju 1:1 (v/v) in 7,7 mM NaN_3 v končni koncentraciji. Do razgradnje medceličnih povezav v tem primeru ni prišlo. Po končani inkubaciji smo vzorca shranili na 4 °C do opazovanja z optično pinceto. Poskus smo ponovili trikrat, prikazana napaka predstavlja standardno napako.

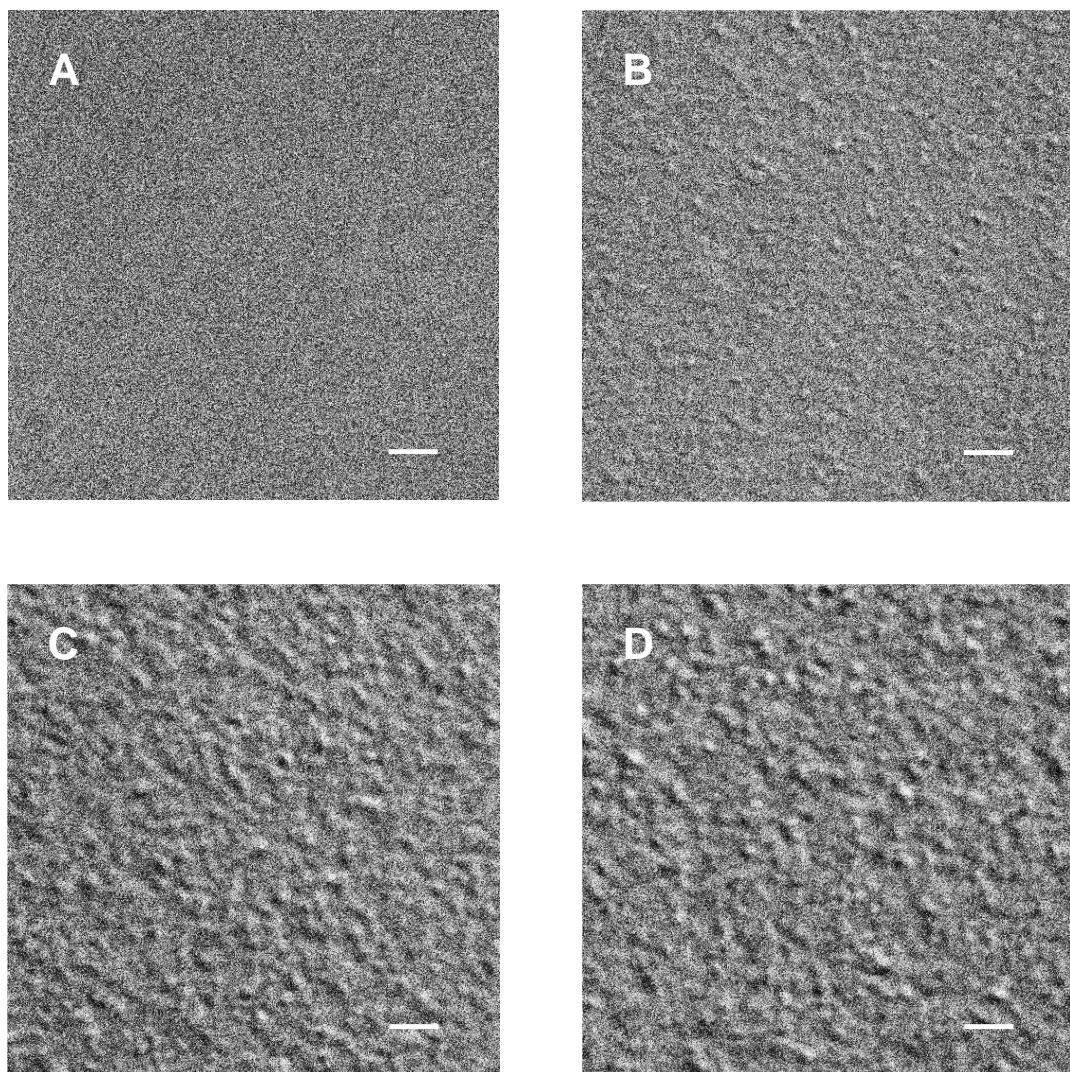
3.2.17 Fluorescenčna mikroskopija

Izražanje operona *eps(A-O)* smo spremljali s fluorescenčno označeno mutanto *B. subtilis* YC164. V jamice diagnostičnih objektnikov (Gerhard Menzel GmbH, Nemčija), ki smo jih za boljšo pritrdiritev celic predhodno prevlekli z 0,05 % (w/v) raztopino poli L-lizina, smo nanesli 30 μl nerazredčene suspenzije celic mutante in divjega tipa (za določitev avtofluorescence). Po 10 minutah smo objektnike sprali s pufrom PBS, da smo odstranili nevezane celice obeh kultur, odstranili odvečno tekočino, v jamice dodali 2 μl sredstva proti bledenju SlowFade Gold in objektnike prekrili s krovnimi stekelci (Brand GmbH, Nemčija) velikosti ($60 \times 24 \text{ mm}^2$) in debeline od 0,16 mm do 0,19 mm. Preparate smo opazovali s kontrastno tehniko DIC in fluorescenčno tehniko z uporabo filtra GFP (Zeiss, Göttingen, Nemčija) in s $100\times$ (NA 1,4) objektivom na epifluorescenčnem mikroskopu, opisanem v podoglavlju 3.2.3. Posnete slike smo analizirali s programom ImageJ verzije 1.48b in izračunali povprečno intenziteto fluorescence reporterskega konstrukta na celico s pomočjo posebej pripravljenega podprograma. Podprogram je digitalno odstranil nehomogenost osvetlitve belega polja, nato pa še nehomogenosti fluorescenčnega vidnega polja z normalizacijo slik na fluoresceinski standard. Tega smo pripravili z raztopitvijo 0,75 g natrijevega fluorescinata v 1 mL 0,1 M NaHCO_3 . Ozadje fluorescenčnih slik je podprogram odstranil prav tako na digitalni način. Nato je prepozna posamezne celice iz slik, posnetih s tehniko DIC, za katere je tudi izračunal povprečne intenzitete fluorescence, normalizirane na fluoresceinski standard, iz fluorescenčnih slik. Od povprečnih intenzitet fluorescence celic z reporterskim konstruktom smo odšteli povprečne intenzitete fluorescenc celic divjega tipa pri enakem času gojenja.

4 REZULTATI

4.1 MIKROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA LEVANSKIH DELCEV

Suspenzije levanov *B. subtilis*, *Z. mobilis* in *E. herbicola* smo pogledali pod svetlobnim mikroskopom. Pri vseh treh levanih so vidni kroglasti delci (slike 6B, 6C in 6D), opazili smo tudi njihovo Brownovo gibanje. Ob primerjavi različnih levanov lahko opazimo, da se je levan *B. subtilis* bistveno razlikoval od preostalih levanov tako v kontrastu kot tudi v premeru delcev.



Slika 6: Svetlobna mikroskopija v tehniki DIC: topilo PBS (**A**) in 1 % (w/v) suspenzije levanov *Bacillus subtilis* (**B**), *Zymomonas mobilis* (**C**) ter *Erwinia herbicola* (**D**). Merilo predstavlja 2 µm.

Pri vseh treh levanih smo določili povprečni premer levanskih delcev in odstotek raztopljenega levana v suspenziji (preglednica 2). Submikronski delci levana *B. subtilis* so bili najmanjši, največje delce smo opazili pri levanu *E. herbicola*. Slednji je imel tudi najširšo porazdelitev delcev po velikosti, kar je razvidno iz relativno velikega standardnega odklona. Levani različnih bakterij so se razlikovali tudi po odstotku raztopljenega levana v suspenziji, ki ga svetlobni mikroskop ni zaznal (preglednica 2). Pri levanu *B. subtilis* je bil skoraj ves levan raztopljen ($90\% \pm 7\%$), oziroma so bili njegovi delci manjši od ločljivosti mikroskopa ($<0,2\text{ }\mu\text{m}$). To razloži slabšo kontrastnost kroglastih delcev levana *B. subtilis*, saj jim je okolica bolj podobna in s tem razlika v refrakcijskih indeksih nižja, kot pri ostalih levanih, kjer je stopnja raztopljenega levana nižja.

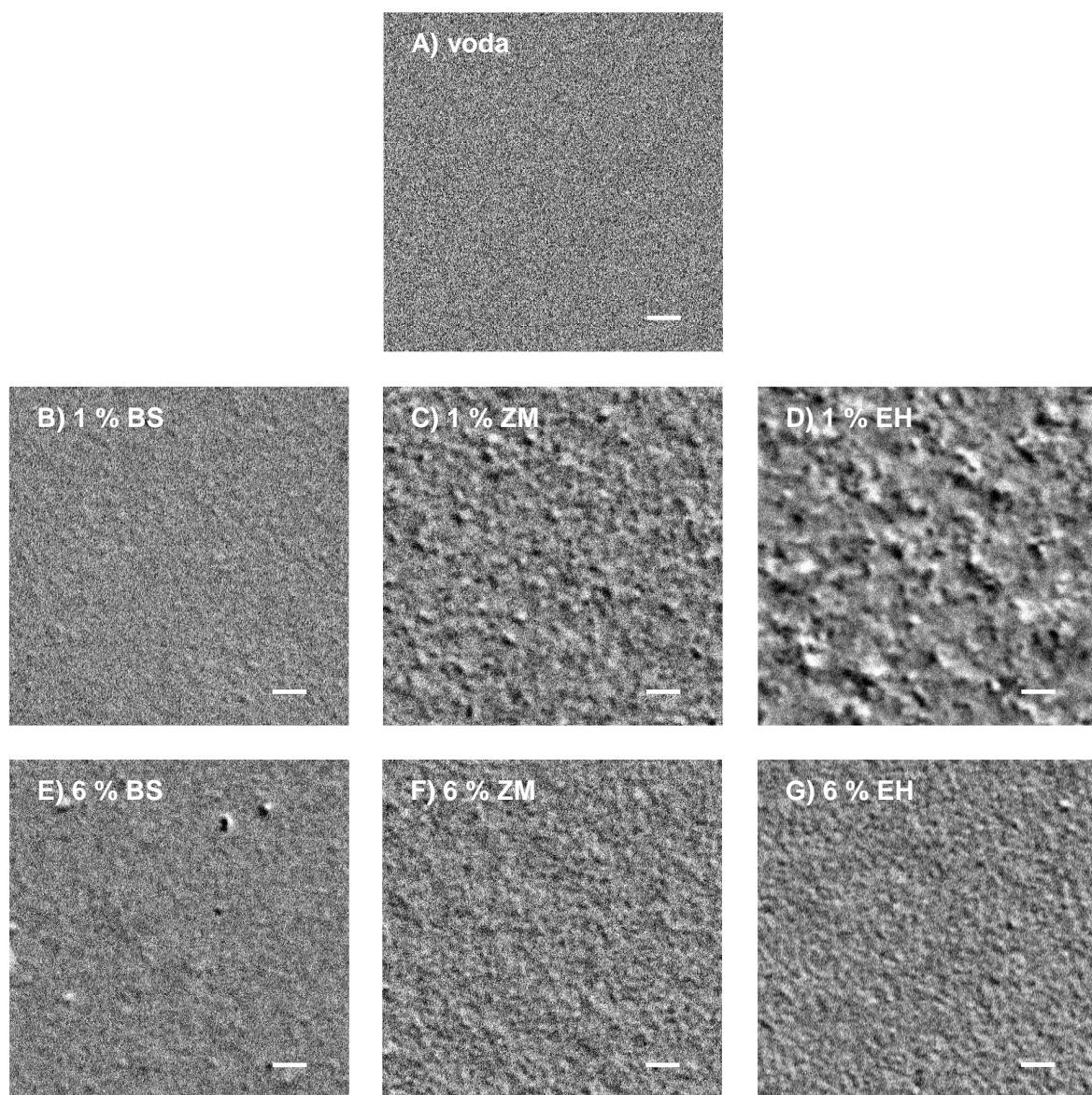
Preglednica 2: Povprečni premer delcev 1 % (w/v) suspenzij levanov v topilu PBS in odstotek raztopljenega levana v suspenziji. Napake predstavljajo standardni odklon.

Levan	Povprečni premer delcev v topilu PBS (μm)	Odstotek raztopljenega levana v suspenziji (%)
<i>Bacillus subtilis</i>	$0,34 \pm 0,09$	90 ± 7
<i>Zymomonas mobilis</i>	$0,48 \pm 0,09$	33 ± 4
<i>Erwinia herbicola</i>	$0,5 \pm 0,3$	21 ± 6

Opazili smo, da premer delcev ni bil odvisen zgolj od vrste levana, ampak tudi od topila in koncentracije. Delci levanov v vodi so imeli v povprečju nekoliko večji premer kot delci v pufru PBS pri enakih koncentracijah (preglednici 2 in 3). Pri vseh treh levanih, pripravljenih v deionizirani vodi ali PBS, je povprečni premer delcev padal z naraščajočo koncentracijo levana v suspenziji. Rezultati mikroskopije so prikazani samo za suspenzije levanov v deionizirani vodi (slika 7).

Preglednica 3: Povprečni premer delcev treh levanov v vodi pri različnih koncentracijah. Ocena napake za povprečni premer je $\pm 0,10\text{ }\mu\text{m}$.

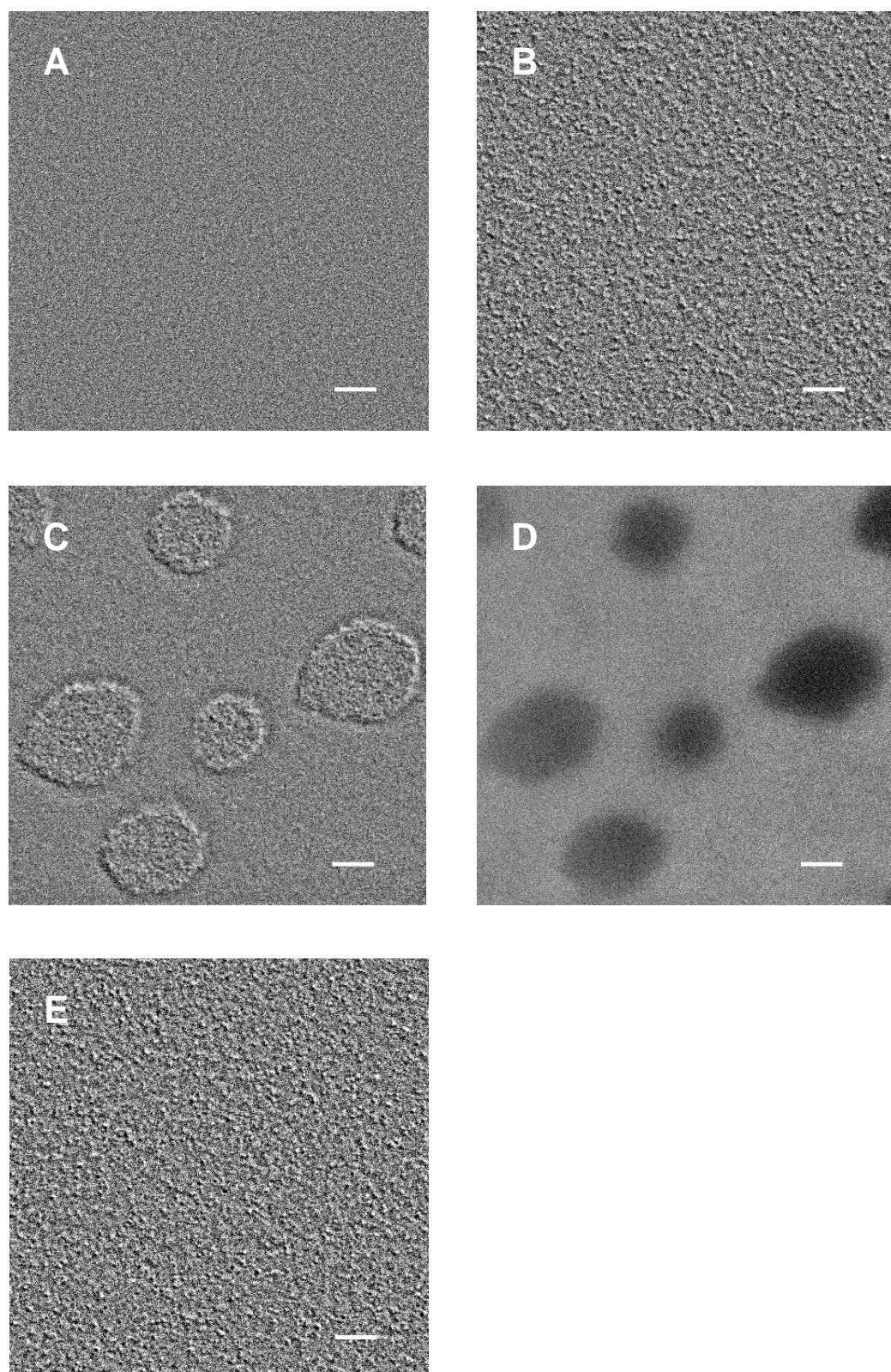
Koncentracija (% (w/v))	Povprečni premer delcev v deionizirani vodi (μm)		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
1	0,45	0,65	0,65
2	0,40	0,55	0,60
4	0,40	0,50	0,45
6	0,35	0,45	0,35



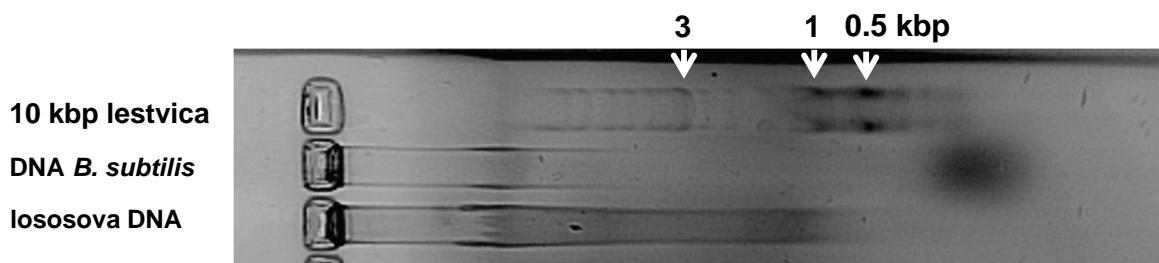
Slika 7: Svetlobna mikroskopija v tehniki DIC: deionizirana voda (A), 1 % (w/v) suspenzije levanov *Bacillus subtilis* (B), *Zymomonas mobilis* (C), *Erwinia herbicola* (D) ter 6 % (w/v) suspenzije levanov *B. subtilis* (E), *Z. mobilis* (F), *E. herbicola* (G). Merilo predstavlja 2 μm .

4.2 DODATEK DNA RAZTOPINI LEVANA POVZROČI FAZNO SEPARACIJO

Dodatek DNA, izolirane iz lososovih mod, je znatno spremenil obnašanje levana *E. herbicola*. Dodatek DNA je povzročil tvorbo dveh faz (slika 8C): faze delcev levana, ki so se nahajali v kroglastih skupkih, in faze, v kateri se je nahajala predvsem DNA. Skupki levana so bili jasno vidni pod mikroskopom s kontrastno tehniko DIC in so merili v premeru od nekaj do nekaj 10 µm. V suspenziji so se lahko premikali in se med seboj zlivali – koalescirali, kar je privedlo do tvorbe večjih skupkov. Porazdelitev DNA v vzorcu smo lahko določili s pomočjo fluorescenčnega barvila DAPI (slika 8D). Temne lise na sliki 8D predstavljajo regije, kjer DNA ni bila prisotna. Odsotnost DNA kolokalizira z mestom nahajanja ter obliko skupkov na sliki 8C, kar nakazuje na fazno separacijo delcev levana in DNA. Rezultati kažejo, da je DNA tvorila nepretrgano fazo med skupki, ki so sestavljeni iz delcev levana. Delci levana so se znotraj skupkov prosto gibali. V zmesi levana in DNA so se delci levana nahajali tudi izven skupkov v majhnem, a signifikantnem številu. S cepitvijo molekul DNA z DNAAzo I smo skupke izgubili in pridobili homogeno zmes na mikroskopski skali (slika 8E), ki je bila podobna raztopini čistega levana (slika 8B). Disperzija levanskih delcev iz skupkov po restrikciji DNA je bila stabilna, saj tvorbe skupkov nismo opazili tudi po več kot mesecu dni. Skladno s tem rezultatom smo pokazali, da je fazna separacija levana in DNA odvisna od velikosti uporabljene DNA. Skupkov iz levanskih delcev nismo opazili v primeru, ko smo levanu *E. herbicola* dodali DNA, izolirano iz *B. subtilis*, v razmerju 3:1 (w/w) pri 0,33 % (w/v) levanu. Ker tvorbe skupkov nismo opazili tudi pri višjih absolutnih koncentracijah levana pri omenjenem razmerju levan:DNA (rezultati niso prikazani), smo preverili velikosti obeh izoliranih DNA z gelsko elektroforezo. Ugotovili smo, da je bila DNA, izolirana iz bakterije *B. subtilis* zelo majhna, sestavljena iz približno do 100 baznih parov (slika 9). DNA, izolirana iz lososovih mod, je bila sicer fragmentirana, a bistveno večjih dolžin, kar pa je omogočilo nastanek skupkov levana in fazno separacijo sistema. Ko smo pripravili raztopine zmesi levana in lososove DNA v destilirani vodi, namesto v pufru PBS, skupkov sestavljenih iz delcev levana nismo opazili. Prisotni so bili samo delci levana.

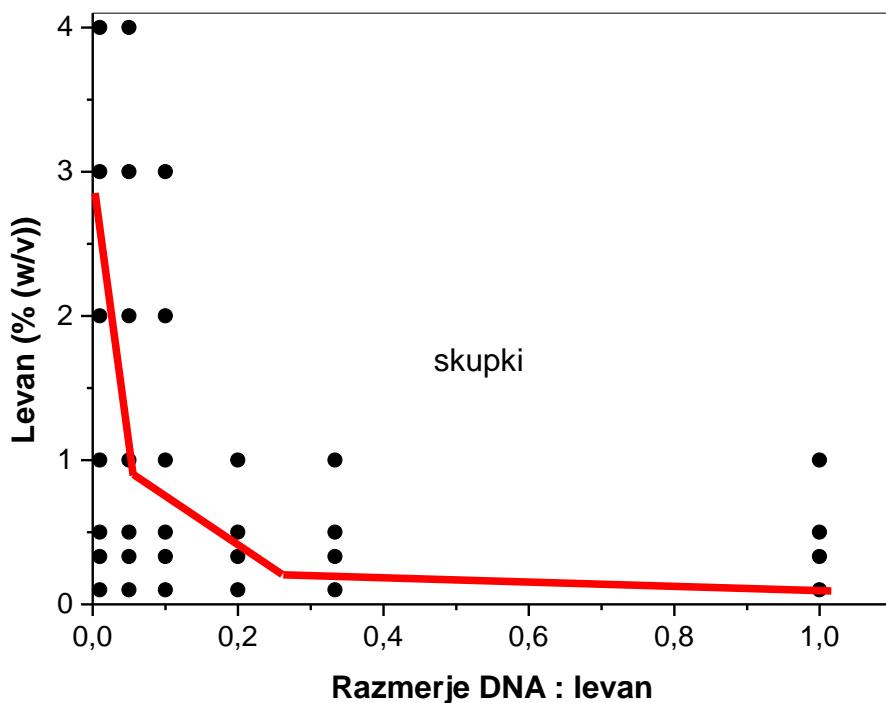


Slika 8: Svetlobna mikroskopija suspenzije levana *Erwinia herbicola*, raztopine DNA in njunih mešanic: topilo PBS, tehnika DIC (A), 0,33 % (w/v) levan, tehnika DIC (B), zmes levana in DNA v razmerju 3 : 1 (w/w), tehnika DIC (C), z DAPI obarvana zmes levana in DNA, isto vidno polje kot pri C, tehnika fluorescenčne mikroskopije (D), z DNAzo I tretirana zmes levana in DNA, tehnika DIC (E). Merilo predstavlja 5 µm.



Slika 9: Gel po gelski elektroforezi z umeritveno lestvico, DNA, izolirano iz bakterije *Bacillus subtilis* in DNA, izolirano iz lososovih mod.

Preverili smo, ali skupki nastanejo tudi pri drugih koncentracijah levana *E. herbicola* in DNA, izolirane iz lososovih mod, v pufru PBS. Ugotovili smo, da je bila tvorba skupkov iz delcev levana v zmesi odvisna od absolutne koncentracije levana in od razmerja med levanom in DNA (slika 10). Skupki niso nastali pri nizkih koncentracijah levana, pod 0,1 % (w/v) oziroma pod fazno linijo, ki razmejuje področje nastanka skupkov. Z naraščajočo absolutno koncentracijo levana so skupki začeli nastajati že pri nižjem odstotku DNA v zmesi. Na primer: pri 0,5 % (w/v) levanu so se začeli tvoriti skupki pri razmerju med DNA in levanom 1:5 (= 0,2), pri 3 % (w/v) levanu pa že pri razmerju med DNA in levanom 1:100 (= 0,01). Pri višjih absolutnih koncentracijah levana (približno 3 % (w/v)) so se začeli pojavljati skupki iz DNA, obdani z delci levana.



Slika 10: Tvorba skupkov iz kroglastih delcev levana pri različnih koncentracijah levana *Erwinia herbicola* in DNA v zmesi. Pod fazno linijo nismo opazili skupkov s pomočjo svetlobne mikroskopije s tehniko DIC.

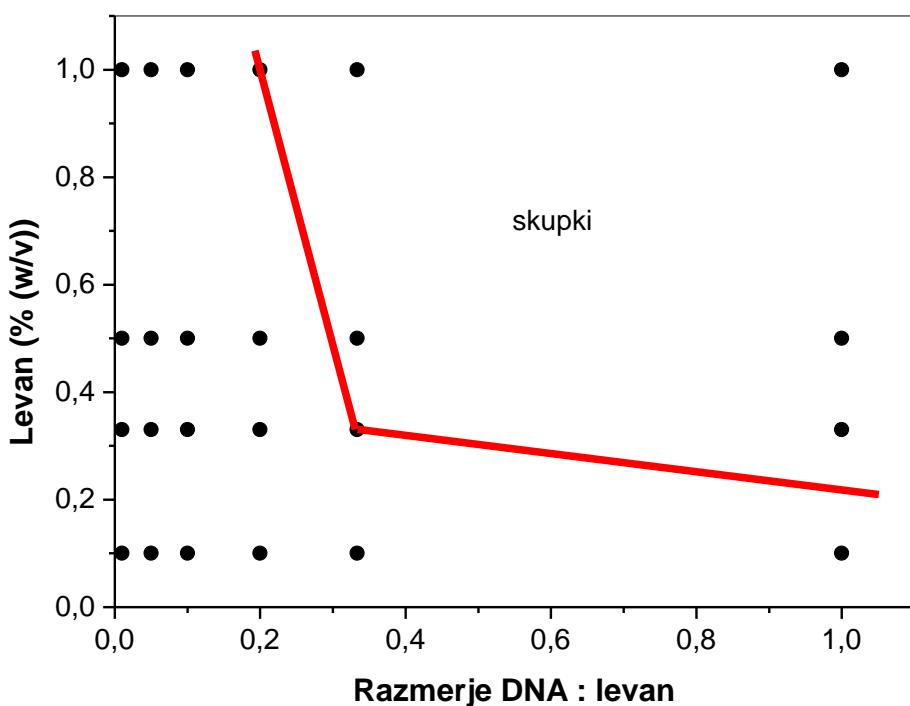
Oblika in velikost skupkov levana sta bili odvisni tako od absolutne koncentracije levana kot tudi od razmerja med levanom in DNA v zmesi. Z naraščajočo absolutno koncentracijo levana pri izbranem razmerju levana in DNA se je odstotek s skupki pokrite površine večal, kar je prikazano v preglednici 4. Med deležem DNA v zmesi in pokritostjo površine s skupki nismo opazili jasne korelacije. Pri 3 % (w/v) levanu pri razmerju med levanom in DNA 100:1 so bili skupki sestavljeni iz DNA.

Preglednica 4: Odstotek površine, ki jo zavzamejo skupki levana *Erwinia herbicola*. Podana napaka predstavlja standardni odklon.

	L : DNA =					
	100 : 1	20 : 1	10 : 1	5 : 1	3 : 1	1 : 1
3 % L	41 ± 1*	4 ± 1	44 ± 3	-	-	-
2 % L	0	6 ± 3	25 ± 2	-	-	-
1 % L	0	5 ± 5	29 ± 2	20 ± 2	27 ± 3	35 ± 3
0,5 % L	0	0	0	3 ± 3	18 ± 7	16 ± 3
0,33 % L	0	0	0	2 ± 2	12 ± 1	15 ± 1
0,1 % L	0	0	0	0	0	3 ± 3

* Skupki so iz DNA

Dodatek lososove DNA je povzročil fazno separacijo zmesi tudi pri levanih bakterij *Z. mobilis* (slika 11) in *B. subtilis* (rezultati niso prikazani). Tvorba skupkov je bila pri levanu *Z. mobilis*, tako kot pri levanu *E. herbicola*, odvisna od absolutne koncentracije levana in od razmerja med levanom in DNA v zmesi (slika 11). Če primerjamo pogoje za tvorbo skupkov pri levanu *E. herbicola* (slika 10) in levanu *Z. mobilis* (slika 11) opazimo, da so se skupki iz delcev levana *Z. mobilis* tvorili pri nekoliko višjih absolutnih koncentracijah levana in razmerjih med DNA in levanom v zmesi, kvalitativno pa so si primerjani rezultati podobni. Delci levana *B. subtilis* so pričeli tvoriti skupke v zmesi z lososovo DNA šele pri 1 % (w/v) levanu pri razmerju levan:DNA 1:1 (rezultati niso prikazani), kar je pri bistveno višji absolutni koncentraciji levana kot pri preostalih levanih (sliki 10 in 11).



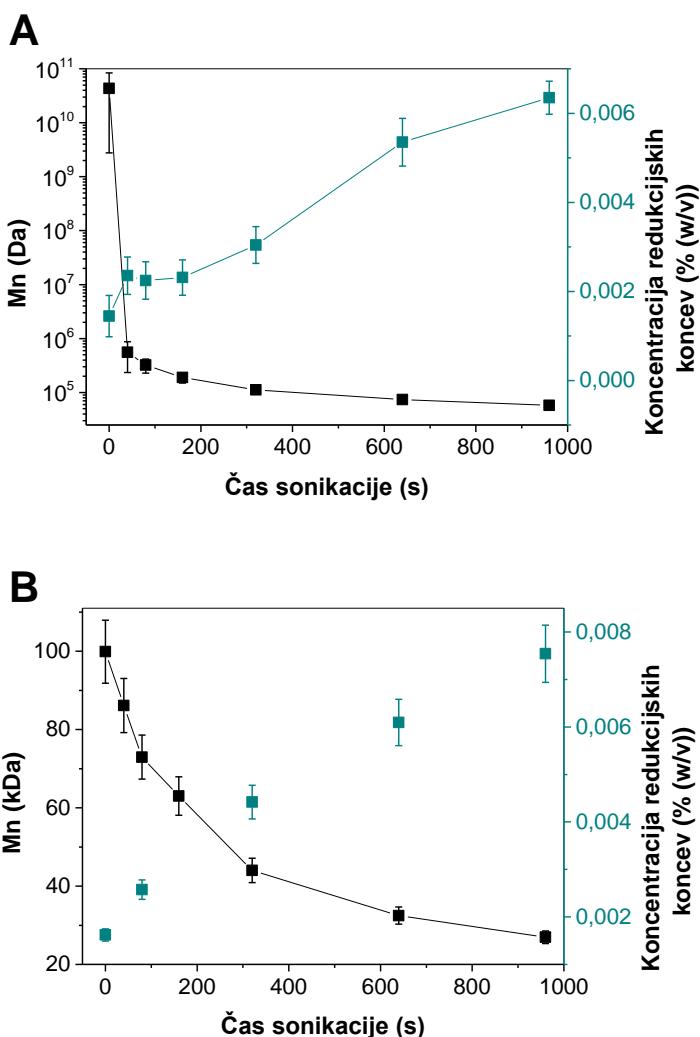
Slika 11: Tvorba skupkov iz kroglastih delcev levana pri različnih koncentracijah levana *Zymomonas mobilis* in DNA v zmesi. Pod fazno linijo nismo opazili skupkov s pomočjo svetlobne mikroskopije s tehniko DIC.

Določili smo tudi stabilnosti fazne separacije oziroma tvorbe skupkov. V zmesi levana *E. herbicola* in DNA 3:1 pri 0,33 % (w/v) levanu je fazna separacija ostajala kljub segrevanju vzorca na 50 °C ali ohlajanju na 4 °C ali po 10 minutnem mešanju z vrtinčnim mešalom. Do fazne separacije pa ni prišlo po 5 s sonikaciji pri amplitudi 12 µm.

4.3 RAZTAPLJANJE LEVANSKIH DELCEV

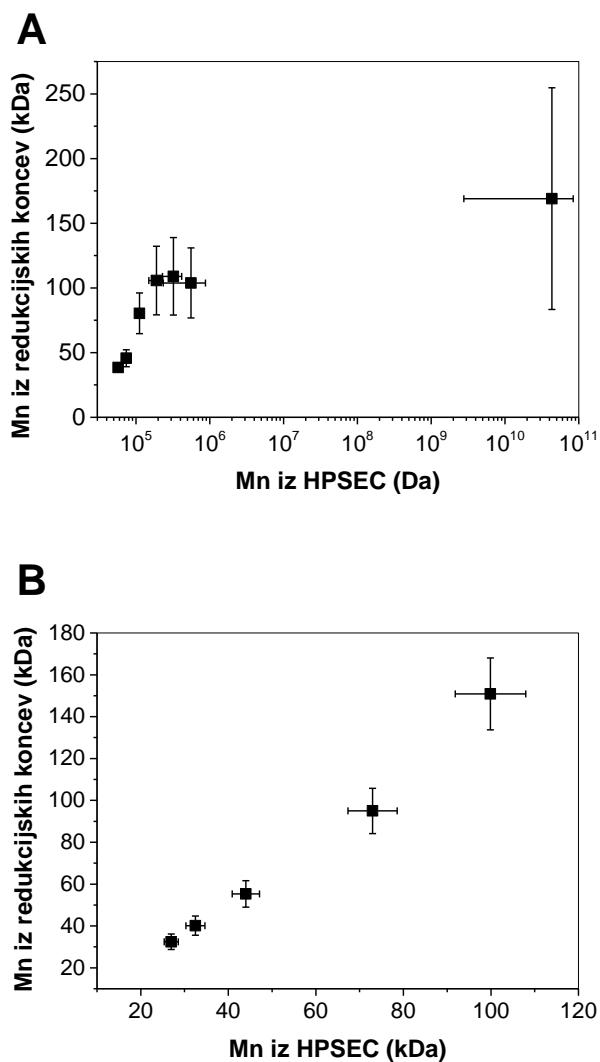
S podaljšanjem časa sonikacije ni prišlo zgolj do porušenja skupkov sestavljenih iz levanskih delcev, ampak so izginili tudi kroglasti delci levana tako v zmesi levana in DNA, izolirane iz lososovih mod, kot tudi v suspenziji čistega levana. Vprašali smo se ali se je levan v suspenziji zgolj bolj raztopil ali je prišlo s soniciranjem tudi do loma verig. Ugotovili smo, da se je med sonikacijo suspenzije levanu *E. herbicola Mn* (številčna povprečna molekulska masa) eksponentno znižal za približno milijonkrat in sicer iz začetne 4×10^{10} Da na 6×10^4 Da po 960 s sonikacije (slika 12A). *Mn* smo v tem primeru določili s pomočjo HPSEC iz dekstranskih standardov, ki ne odražajo nujno dejanske velikosti polimerov levana. Približno 50 % upada *Mn* se je zgodilo v prvih 320 s sonikacije. Zanimivo, da se je v enakem času sonikacije koncentracija redukcijskih koncev povečala zgolj za približno 4 krat, od tega v začetnih 320 s za 2 krat. Na drugi strani se med sonikacijo dekstrana (kontrola) *Mn* ni znižal tako drastično kot pri levanu, iz začetne 1×10^5 Da na 3×10^4 po 960 s sonikaciji (slika 12B). Približno polovica upada *Mn* dekstrana

se je zgodila v prvih 320 s sonikacije. Koncentracija redukcijskih koncev dekstrana se je po koncu sonikacije povečala za približno enak faktor, kot se je znižal Mn .



Slika 12: Mn levana *Erwinia herbicola* (A) in Mn dekstrana (B) ter koncentracija redukcijskih koncev v odvisnosti od časa sonikacije.

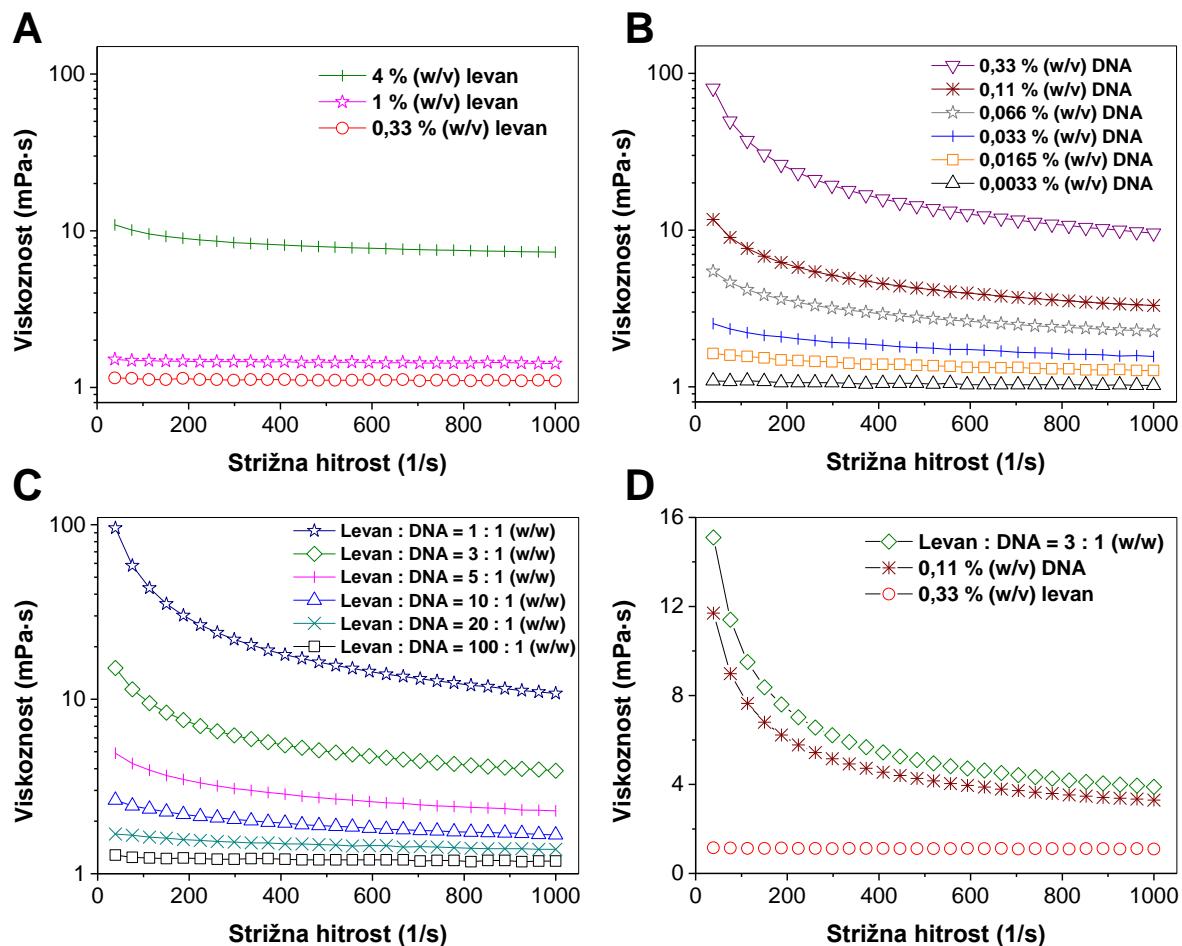
Pomembno je, da pri sonikaciji levana Mn , ki je bil določen iz HPSEC, ni linearno koreliral z Mn , ki smo ga izračunali iz koncentracije redukcijskih koncev (slika 13A). Koncentracija redukcijskih koncev se je zvišala za faktor 4, medtem ko se je Mn , določen iz HPSEC, spremenil za milijonkrat. Pri kontroli (sonikaciji dekstrana) je Mn , določen iz HPSEC kromatogramov, koreliral približno linearno z Mn , ki smo ga izračunali iz koncentracij redukcijskih koncev (slika 13B). To nakazuje na različen efekt sonikacije na dekstran in levan.



Slika 13: Mn levana *Erwinia herbicola* (**A**) in Mn dekstrana (**B**), izračunanega iz redukcijskih koncev, v odvisnosti od Mn levana *Erwinia herbicola* (**A**) in Mn dekstrana (**B**), določenega iz HPSEC.

4.4 MAKRO- IN MIKROREOLOGIJA LEVANA, DNA IN NJUNIH ZMESI

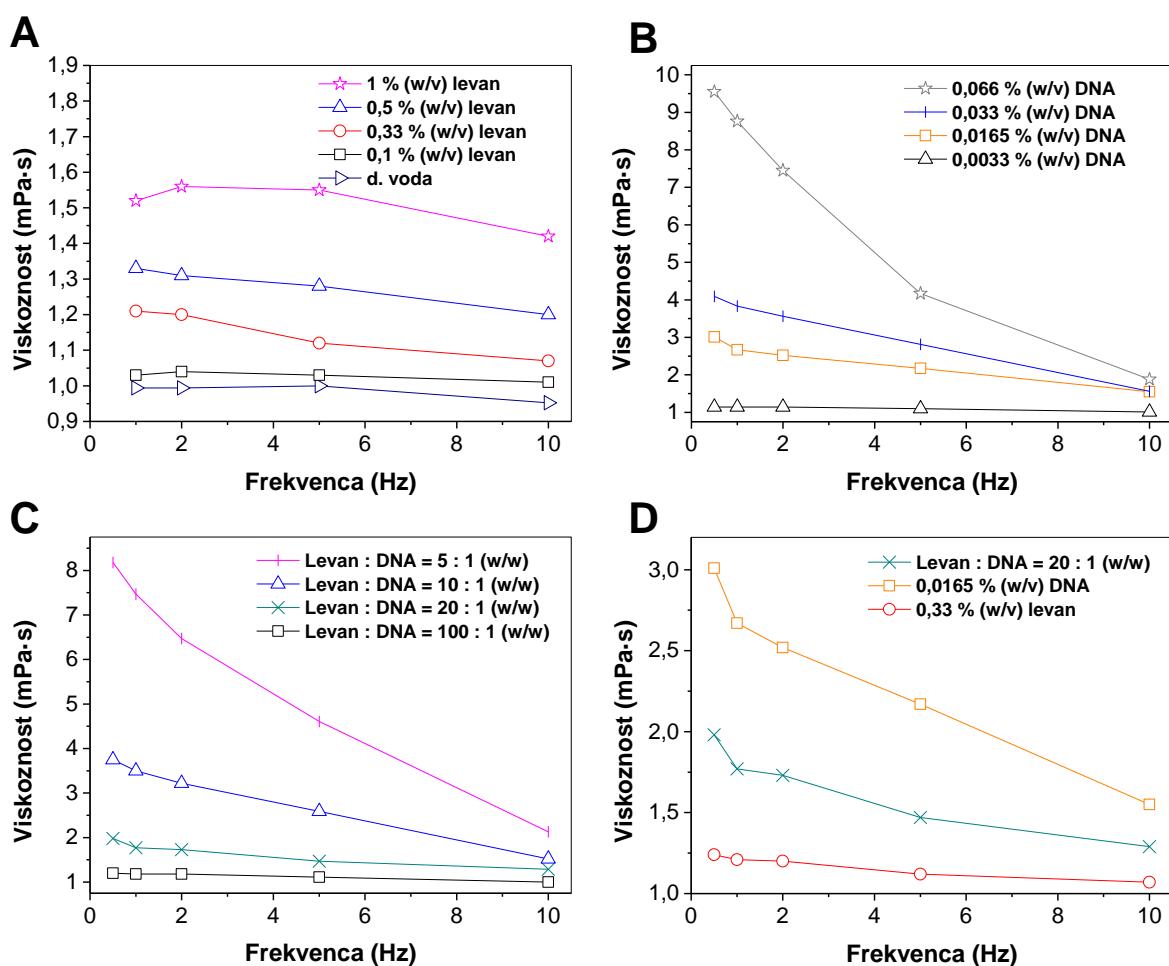
Z dodatkom DNA levanu so se spremenile tudi viskoelastične lastnosti zmesi. Suspenzije levana *E. herbicola* do 1 % (w/v) so se obnašale kot Newtonske tekočine (slika 14A). Pri 4 % (w/v) levanu smo opazili psevdoplastično obnašanje. Viskoelastične lastnosti raztopin DNA v koncentracijskem rangu med 0,0033 in 0,33 % (w/v) so prikazane na sliki 14B. V nasprotju z levanom se raztopine DNA obnašale izrazito psevdoplastično že pri nižjih koncentracijah. V zmesi levana in DNA smo opazili psevdoplastično obnašanje, podobno kot pri raztopinah DNA (slika 14C). Makroskopske viskoznosti zmesi levana in DNA so bile primerljive vsoti viskoznosti suspenzije levana in raztopine DNA pri enakih koncentracijah (slika 14D).



Slika 14: Viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za levan *Erwinia herbicola* (A). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 4 (■); 1 (★) in 0,33 (○) % (w/v) suspenzijo levana v PBS. Viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za DNA, izolirano iz lososovih mod (B). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 0,33 (▽); 0,11 (＊); 0,066 (☆); 0,033 (□); 0,0165 (□) in 0,0033 (△) % (w/v) raztopino DNA. Viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za zmesi levana in DNA (C). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 1:1(☆); 3:1 (◇); 5:1(□); 10:1(△); 20:1(×) in 100:1(□) razmerje levana : DNA pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana. Primerjava viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za zmes levana in DNA ter suspenzijo levana in raztopino DNA pri istih koncentracijah (D). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 3:1 razmerje levana : DNA pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana (◇); 0,11 % (w/v) DNA (＊) in 0,33 % (w/v) levan (○). Napaka viskoznosti pri meritvah je bila enaka velikosti simbola.

Zaradi mikroheterogenosti oziroma fazne separacije zmesi levana in DNA nad kritično koncentracijo DNA, smo pomerili mikroreološke lastnosti na invertnem svetlobnem mikroskopu, opremljenem z optično pinceto. Rezultati aktivne mikroreologije za zmesi, kjer ni prišlo do fazne separacije, so prikazani na sliki 15. V suspenzijah čistega levana oziroma raztopinah DNA so bili rezultati mikroreoloških meritov (sliki 15A in 15B) kvalitativno podobni rezultatom makroreoloških meritov (sliki 14A in 14B). Vrednosti so se razlikovale pri zmeseh levana in DNA. Mikroreološke meritve so pokazale, da je bila viskoznost zmesi levana in DNA nižja od viskoznosti DNA v raztopini z enako

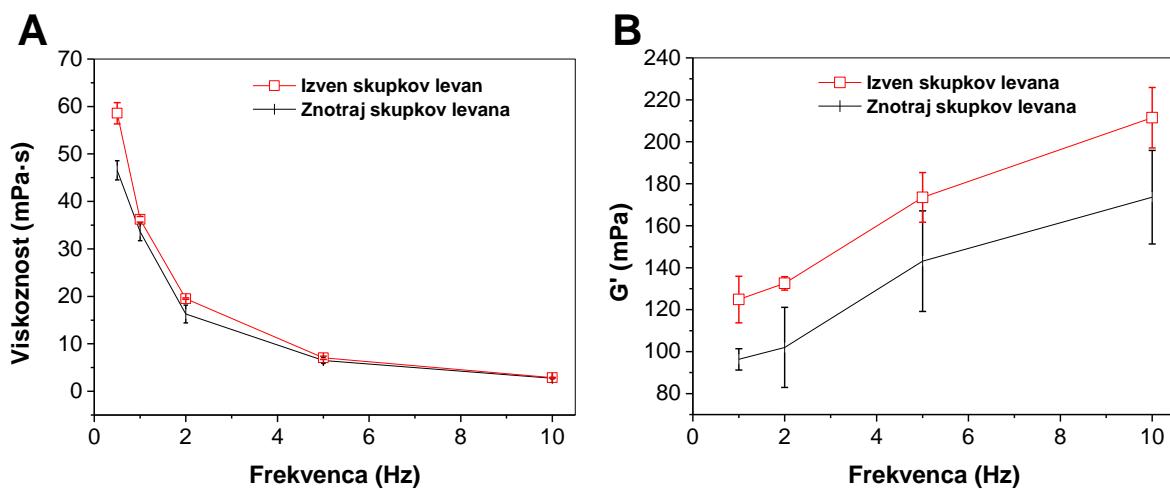
koncentracijo (sliki 15B in 15C). Na primer: viskoznost zmesi levana in DNA v razmerju 20:1 je predstavljala približno polovico viskoznosti DNA v raztopini (slika 15D). Ker rezultati na sliki 15 prikazujejo mikroreološke lastnosti zmesi levana in DNA pod kritično koncentracijo DNA, potrebno za tvorbo skupkov, popišejo povprečno lokalno mikroreologijo zmesi levana in DNA.



Slika 15: Mikroviskoznosti v odvisnosti od frekvence za levan *Erwinia herbicola* (A). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 1 (★); 0,5 (△); 0,33 (○); 0,1 (□) % (w/v) levan in deionizirano vodo (▷). Mikroviskoznosti v odvisnosti od frekvence za DNA, izolirano iz lososovih mod (B). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 0,066 (★); 0,033 (⊕); 0,0165 (□) in 0,0033 (△) % (w/v) DNA. Mikroviskoznosti v odvisnosti od frekvence za zmesi levana in DNA (C). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 5:1 (⊕); 10:1 (△); 20:1 (×) in 100:1 (□) razmerje levana : DNA pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana. Primerjava mikroviskoznosti v odvisnosti od frekvence za zmesi levana in DNA ter suspenzijo levana in raztopino DNA pri istih koncentracijah (D). Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: 0,0165 % (w/v) DNA (□); 20:1 razmerje levana : DNA pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana (×) in 0,33 % (w/v) levan (○). Napaka mikroviskoznosti pri meritvah je bila enaka velikosti simbola.

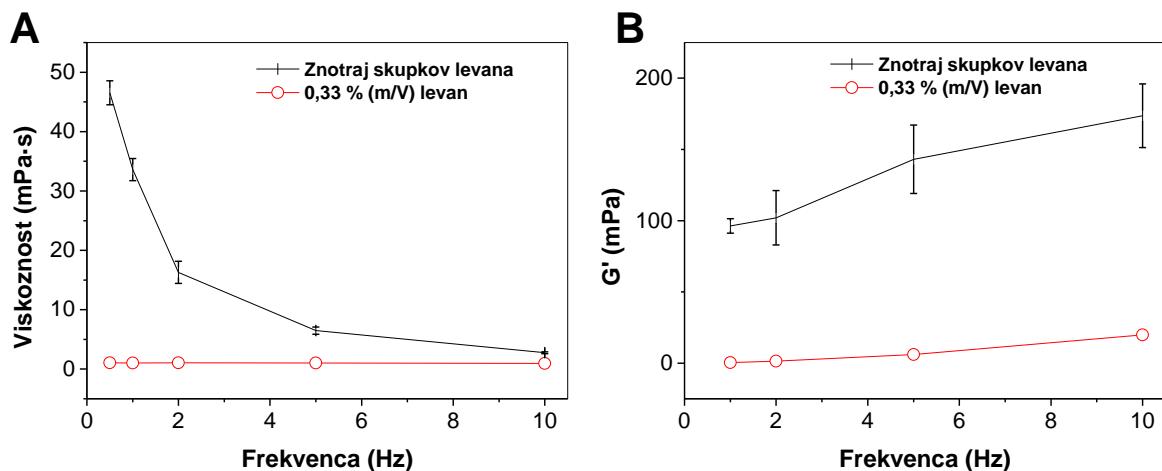
V zmesi levana in DNA nad kritično koncentracijo DNA so zaradi fazne separacije nastala lokalna mikrookolja obogatena z levanom ali DNA, v katerih so se mikroreološke lastnosti znatno razlikovale. V taki zmesi so bile silikatne kroglice približno enakomerno

razporejene med obe fazami, kar se je kljub majhnim razlikam v kontrastu med obema fazama dalo videti z invertnim svetlobnim mikroskopom, opremljenim z optično pinceto. Rezultati so prikazani na sliki 16. Elastični modul (G') se je izrazito razlikoval med obema fazama in je bil višji v fazi z DNA (slika 16B), viskoznost med obema fazama pa je bila podobna (slika 16A).



Slika 16: Mikroreologija zmesi levana *Erwinia herbicola* in DNA v razmerju 3:1 pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana znotraj in izven skupkov levana. Viskoznost znotraj (l) in izven (□) skupkov (A). Elastični modul (G') znotraj (l) in izven (□) skupkov (B).

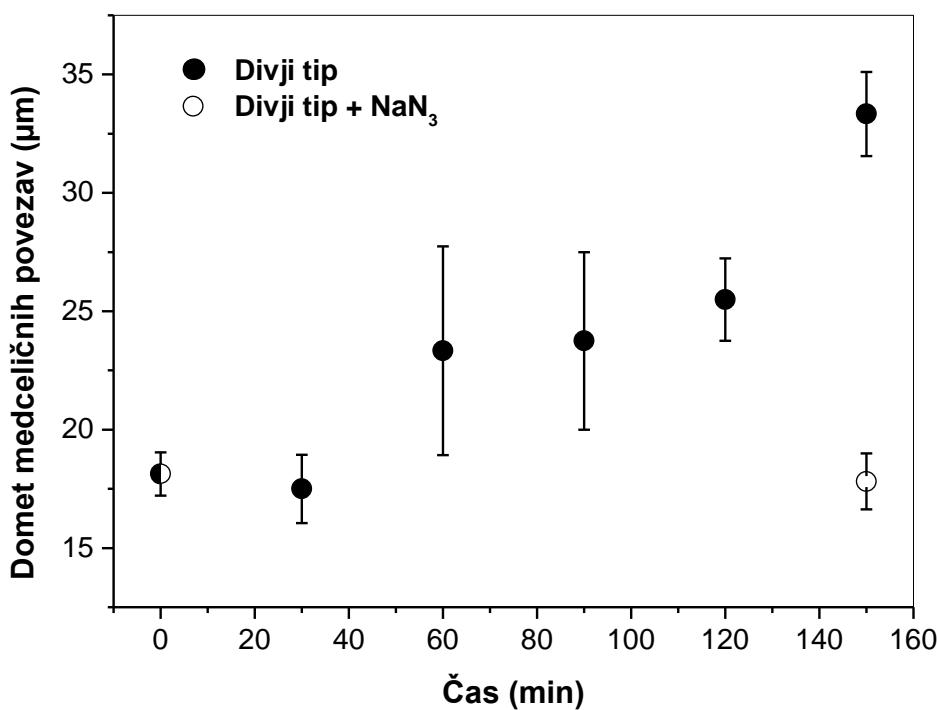
Mikroreologija levana v suspenziji se je razlikovala od mikroreologije levana v skupkih (slika 17). Viskoznost suspenzije levana je bila nizka in ni bilo zaznati psevdoplastičnega obnašanja. S tvorbo skupkov levana se je levanu viskoznost povečala in psevdoplastično obnašanje je postalo očitno (slika 17A). Efekt agregacije levana je bil še bolj izrazit na elastičnem modulu (G'): znotraj skupkov levana se je elastičnost povečala za približno stokrat v primerjavi s suspenzijo levana (slika 17B). Poleg tega je bilo povečanje elastičnosti z naraščajočo frekvenco bolj razvidno v agregiranem levanu kot pa v suspenziji. Viskoznost 0,11 % (w/v) raztopine DNA je bila previsoka za merjenje z optično pinceto. Zanimivo pa je, da se je v zmesi z levanom viskoznost faze DNA znižala in smo jo lahko pomerili z optično pinceto.



Slika 17: Primerjava mikroviskoznosti 0,33 % (w/v) suspenzije levana *Erwinia herbicola* (○) z mikroviskoznostjo znotraj skupkov (|) v zmesi levan : DNA = 3:1 pri 0,33 % (w/v) koncentraciji levana (A). Primerjava elastičnih modulov (G') 0,33 % (w/v) suspenzije levana (○) z elastičnim modulom znotraj skupkov (|) v zmesi levan : DNA = 3:1 pri 0,33 (w/v) % koncentraciji levana (B).

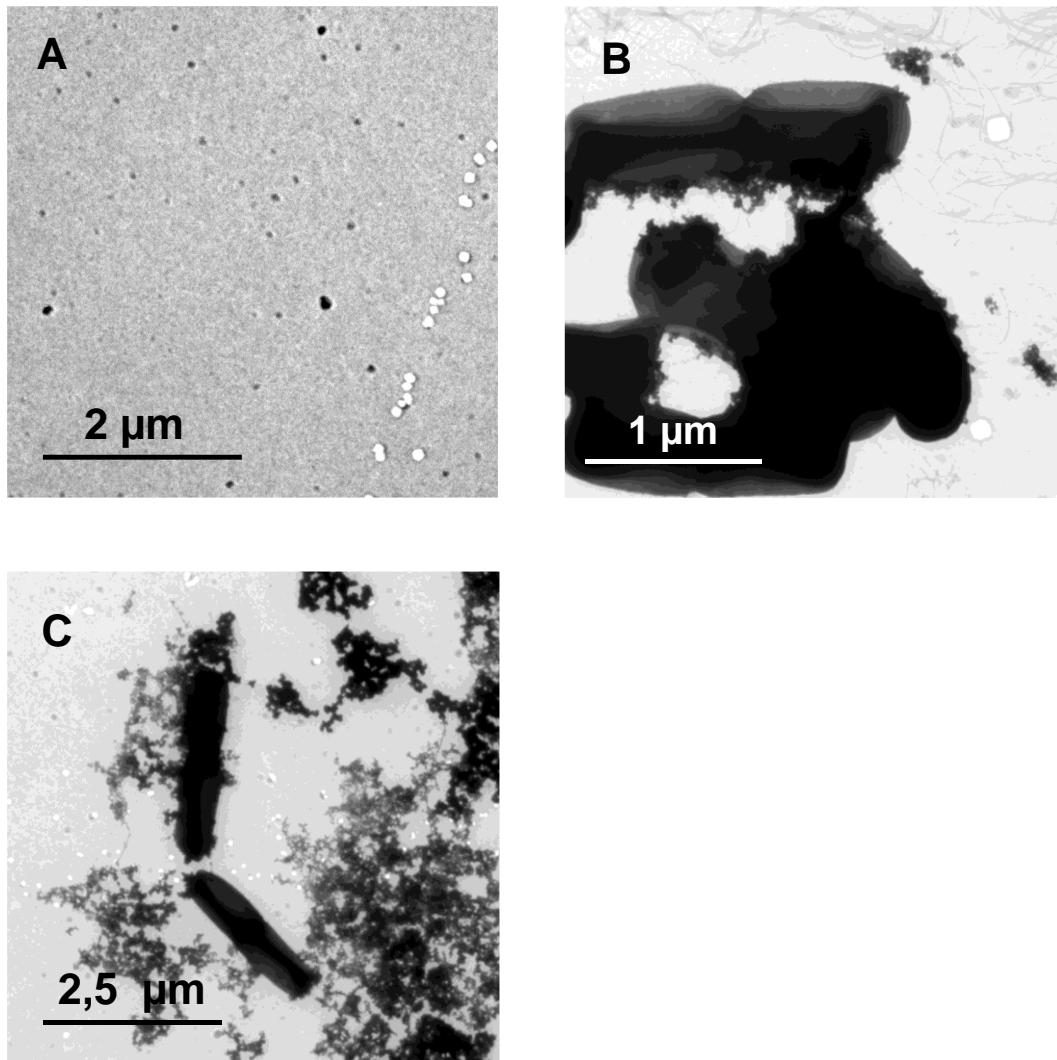
4.5 MEDCELIČNE POVEZAVE PRI ZGODNJIH ČASIH GOJENJA *Bacillus subtilis*

Obstoj medceličnih povezav v planktonski kulturi v zgodnji fazi rasti mikrobne kulture ni poznan. Pri kulturi divjega tipa bakterije *B. subtilis* smo spremljali nastanek zgodnjih medceličnih povezav z optično pinceto. Bakterijsko rast smo spremljali 150 min (priloga D). V tem času se je optična gostota bakterijske kulture povečala za dvakrat. Z rastjo se je domet medceličnih povezav posamezne bakterije povečeval in je po 2,5 urah narastel na 33 μm (slika 18). Presenetljivo je, da smo medcelične povezave na razdalji 18 μm izmerili že takoj po nacepitvi svežega gojišča z dvakrat spranim inokulumom. Dodatek natrijevega azida (NaN_3), respiracijskega inhibitorja, bakterijski kulturi takoj po nacepitvi je preprečil povečanje dometa medceličnih povezav, kar nakazuje na potrebo po aktivnem metabolizmu za vzpostavljanje medceličnih povezav. Z razdaljo je jakost medceličnih povezav pri posameznem času gojenja linearno padala (priloga E). Domet medceličnih povezav smo določili kot tisto razdaljo, kjer smo lahko še zanesljivo določili amplitudo pasivne bakterije. Ker je mehanska sklopitev bakterij lahko posledica hidrodinamskega efekta, smo domet hidrodinamskih interakcij preverili tako z bakterijami v redčenem gojišču kot s silikatnimi kroglicami primerljivih velikosti bakterijam. Rezultati so pokazali, da hidrodinamski efekt ne vpliva na rezultate meritev pri razdaljah med pasivno in aktivno bakterijo, ki so večje od 10 μm (priloga C).



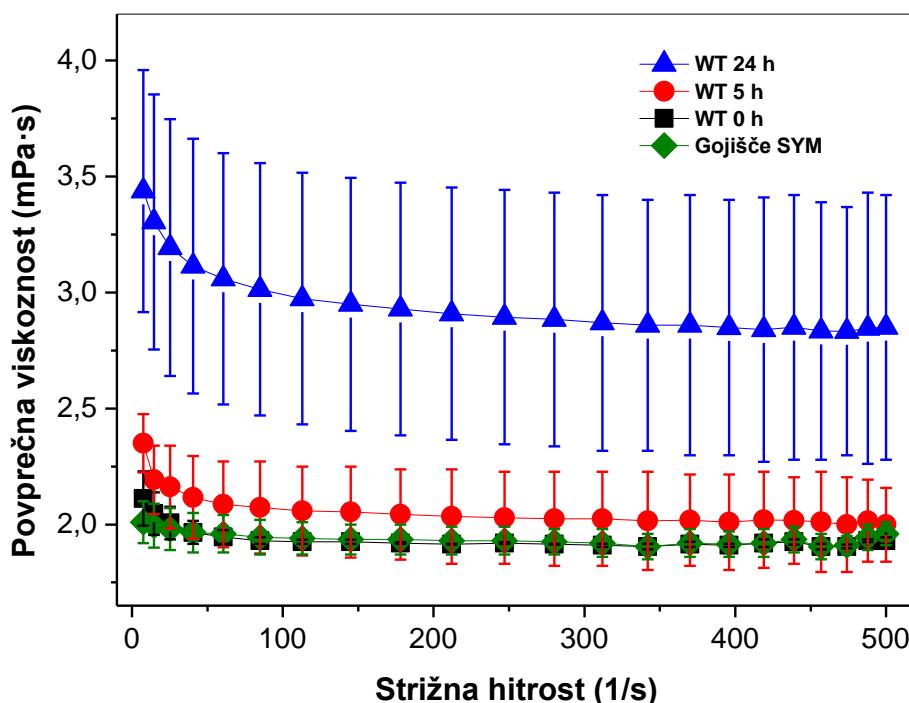
Slika 18: Domet medceličnih povezav bakterij divjega tipa *Bacillus subtilis* (●) in z dodatkom azida po inokulaciji (○) v odvisnosti od časa gojenja. Napake dometa medceličnih povezav prikazujejo standardne napake 8 ponovitev poskusa.

Ker je vzpostavitev medceličnih povezav zelo verjetno posledica proizvodnje zunajceličnega matriksa, smo kulturo divjega tipa *B. subtilis* opazovali z elektronskim mikroskopom. Iz slike 19B je razvidno, da smo kljub spiranju celic z inokulumom prenesli v sveže gojišče tudi nekaj zunajceličnih snovi, ki jih v samem gojišču nismo opazili (slika 19A). Po 2,5 urah gojitve je bilo zunajceličnega matriksa veliko več (slika 19C). Vezan je bil na celično površino ali pa se je nahajal v zunajceličnem prostoru bodisi pritrjen na bičke bodisi nevezan. Na vseh slikah so vidni tudi kristalčki soli (beli poliedri), ki so kristalizirali med dehidracijo vzorca.



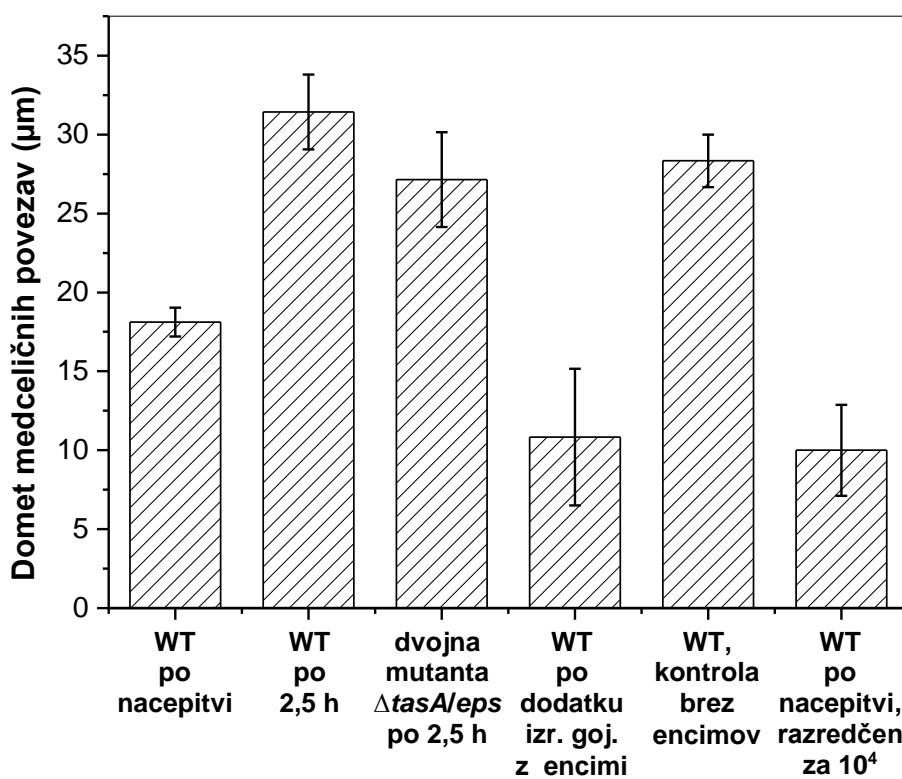
Slika 19: Presevna elektronska mikroskopija s tehniko negativnega kontrastiranja: gojišče SYM brez kvasnega ekstrakta (A), kultura divjega tipa *Bacillus subtilis* po nacepitvi (B) in po 2,5 urah gojitve (C).

Reološko obnašanje stresane kulture divjega tipa smo spremljali pri različnih časih gojenja z rotacijskim viskozimetrom. Tokovni krivulji kulture divjega tipa po nacepitvi in gojišča brez bakterij sta si bili zelo podobni razen pri nižjih strižnih hitrostih, kjer je bilo mogoče zaznati šibko psevdoplastično obnašanje stresane kulture divjega tipa (slika 20). S podaljševanjem časa inkubacije se je povprečna viskoznost večala in psevdoplastično obnašanje stresane kulture je postal izrazitejše, vendar se v času 5 ur vrednosti za viskoznosti ne razlikujejo signifikantno od kontrole. Viskoznost po 24 urah gojitve se je povečala signifikantno, za približno 1,5 krat.



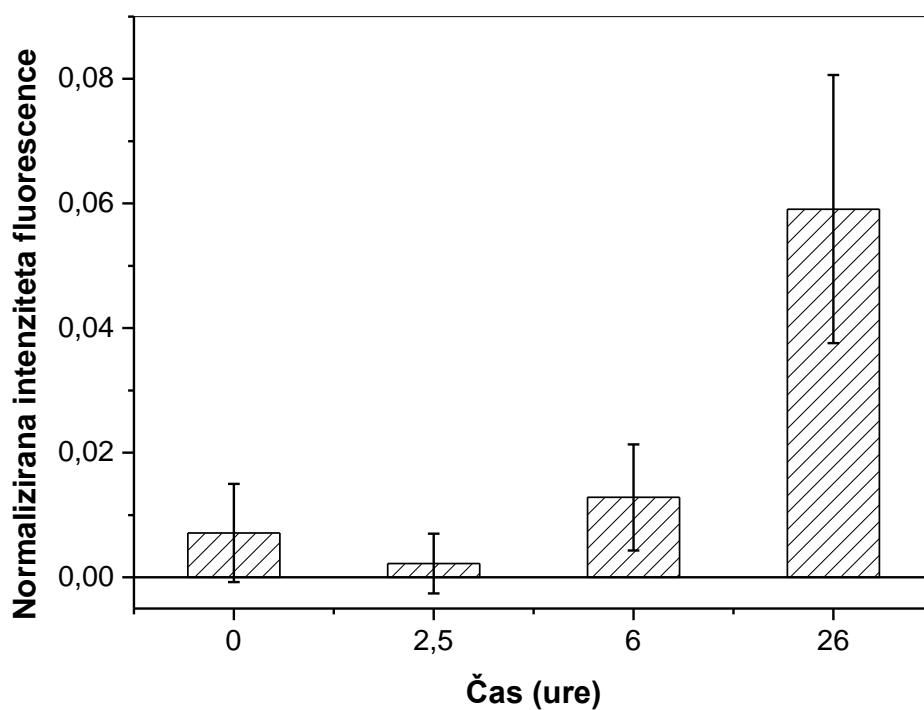
Slika 20: Povprečne viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za stresane kulture divjega tipa *Bacillus subtilis* in gojišča. Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: divji tip po 24 urah (▲), 5 urah (●) in po nacepitvi (■) ter gojišče SYM (◆). Prikazana je standardna napaka dveh ponovitev.

Z optično pinceto smo določili domet medceličnih povezav tudi pri dvojni mutanti, ki ima okvarjene gene za proizvodnjo zunajceličnega polisaharida eps(A-O) in zunajceličnega proteina TasA, ki sta pomembna za vzpostavljanje medceličnih povezav v biofilmih. Reološko se je mutanta obnašala podobno kot divji tip (priloga F). V zgodnjih fazah inkubacije je vzpostavljanje medceličnih povezav primerljivo med divjim tipom in mutanto (slika 21). Kljub temu, da je bil domet medceličnih povezav pri dvojni mutanti nekoliko manjši, razlika ni bila statistično značilna. Bistveno se nista razlikovali tudi jakosti medceličnih povezav, merjenih preko amplitude pasivne pasti (priloga G). V primeru, ko smo po 2,5 urah inkubacije kulturi dodali izrabljeno gojišče razpadlega biofilma, ki vsebuje encimsko mešanico, je prišlo do signifikantnega upada dometa medceličnih povezav in pri tem se je tudi značilno zmanjšalo število celic. Pri kontroli, kjer smo namesto izrabljenega gojišča z encimi dodali zgolj sveže gojišče, ni prišlo do zmanjšanja dometa medceličnih povezav, kar kaže da efekta izrabljenega gojišča ne moremo razložiti zgolj z razredčevanjem. Domet medceličnih povezav pa se je značilno zmanjšal z 10000 kratnim redčenjem inokuliranega gojišča. Opazili smo, da so v razredčeni kulturi celice tonile, medtem ko v nacepljeni kulturi po 2,5 urah tega nismo opazili. V sveže nacepljeni nerazredčeni kulturi so celice tonile veliko počasneje kot pri 10000 krat razredčeni kulturi. Celice so prenehale s tonjenjem po enourni gojitvi.



Slika 21: Domet medceličnih povezav različno tretiranih bakterij divjega tipa in dvojne mutante *Bacillus subtilis*. Prikazana je standardna napaka.

Ker je formiranje biofilma brez zunajceličnega polisaharida eps(A-O) močno oteženo, smo z uporabo reporterskega genskega konstruktka $P_{epsA}-gfp$ preverili, kdaj med inkubacijo pride do produkcije tega polisaharida. Rezultati so prikazani na sliki 22. Normalizirana intenziteta fluorescence celic, ki proizvajajo zunajcelični polisaharid, je zanemarljiva po 2,5 urah, ko se zunajcelične mehanske povezave med celicami že vzpostavijo. Do porasta produkcije zunajceličnega polisaharida pride šele po 6 urah inkubacije.



Slika 22: Normalizirana intenziteta fluorescence reporterskega konstrukta $P_{epsA}\text{-}gfp$ na celico. Prikazana je standardna napaka 2 ponovitev.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V tem delu smo proučevali vpliv različnih komponent na mehanske lastnosti zunajceličnega matriksa biofilmov *Bacillus sp.* Kljub temu, da je kemijska sestava biofilmov bakterij *Bacillus sp.* dokaj dobro poznana (Branda in sod., 2006; Marvasi in sod., 2010; Dogsa in sod., 2013), pa je vloga posameznih komponent pri zagotavljanju mehanskih lastnosti večinsko nepoznana. Zato smo v tem delu izolirali posamezne komponente zunajceličnega matriksa biofilmov *Bacillus sp.* in določali njihove reološke in strukturne lastnosti. Predvsem smo se osredotočili na vlogo polisaharida levana. Poleg tega smo z uporabo optične pincete kot prvi pokazali na obstoj šibkih medceličnih povezav med bakterijami že v najzgodnejših fazah rasti bakterijske kulture, kar predstavlja popolnoma nov pogled na obnašanje planktonskih bakterij.

V suspenzijah levanov, ki jih proizvajajo *B. subtilis*, *Z. mobilis* in *E. herbicola* smo pod mikroskopom opazili submikronske kroglaste delce (slika 6), ki so se premikali po prostoru predvsem zaradi Brownovega gibanja. Prisotnost kroglastih delcev so pri levanih *Z. mobilis* in *Kozakia baliensis* opazili tudi drugi raziskovalci (Kim in sod., 2005; Jakob in sod., 2013). Ugotovili smo, da je bil premer levanskih delcev odvisen od vrste levana in koncentracije levana v suspenziji. Molekulske mase levanov, izmerjenih s tehniko statičnega sisanja laserske svetlobe (Benigar in sod., 2014) so skladne z mikroskopom izmerjenimi premeri levanskih delcev v tem delu (preglednica 2). Najmanjši so delci levana *B. subtilis* ((31 ± 2) MDa), sledita približno enako velikalevana *Z. mobilis* ((226 ± 4) MDa) in *E. herbicola* ((280 ± 40) MDa). Glede na dobljeno velikost se pojavi vprašanje ali te strukture predstavljajo posamezne verige polimera ali pa preplet večih verig, ki sestavljajo levanski delec. Glede na rezultate sonikacije levanskih delcev *E. herbicola* lahko sklepamo, da levanski delci, vidni pod mikroskopom, ne predstavljajo popolnoma raztopljenega levana. Ocenili smo, da je zaradi sonikacije levanskih delcev prišlo do zmanjšanja molekulske mase levana *E. herbicola* za približno milijonkrat, medtem ko se koncentracija redukcijskih koncev ni bistveno spremenila. Ob primerjavi efekta sonikacije čistega levana *E. herbicola* (sliki 12A in 13A) in dekstrana (sliki 12B in 13B) lahko sklepamo, da je v prvih 320 s sonikacije (sliki 12A in 13A) Mn levana padal predvsem zaradi odmotavanja in dokončnega raztapljanja polimernih verig iz levanskih delcev, po tem času pa zaradi delne cepitve verig. Sklepamo lahko tudi, da so kroglasti levanski delci vseh treh levanov psevdostabilno stanje med posušeno in popolnoma raztopljeno obliko, ki je posledica izolacije levana iz biofilma. Pri ponovnem omočenju se verige levana prepletejo in šele energija v obliki akustičnih vibracij, vnešena s sonikacijo, je omogočila razplet posameznih verig iz levanskih delcev. Raziskovalci so že uporabljali sonikacijo za lažje raztapljanje levana (Manandhar in sod., 2009). Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo zaključiti, da so opažene razlike v velikosti levanskih delcev pod mikroskopom pri treh bakterijskih vrstah posledica različne sinteze. Povsem mogoče je, da so razlike v

velikosti delcev posledica različnih izolacijskih tehnik. Levan *B. subtilis* smo izolirali sami, preostala levana sta bila kupljena in izolirana na nam neznan način. Povprečni premer levanskih delcev je padal z naraščajočo koncentracijo levana (preglednica 3). Opisano odvisnost lahko razložimo z zmanjševanjem razpoložljivega prostora pri povišanih koncentracijah. To nakazuje na elastičnost oziroma zmožnost stisljivosti levanskih delcev.

Dodatek dolgih verig DNA levanu je povzročil fazno separacijo levana in DNA (sliki 8C in 8D). Nastanek dveh faz v zmesi z bakterijskim levanom povzroči tudi dodatek pektina, gume rožičevca in polietilen glikola (Kasapis in sod., 1994; Chung in sod., 1997). Fenomen fazne separacije so raziskovalci preučevali pri različnih polimerih in dvokomponentnih zmeseh pri kritičnih koncentracijah ter opisali mehanizma, ki privedeta do fazne separacije. Po prvem je fazna separacija posledica termodinamske nekompatibilnosti (Flory, 1942; Siggia, 1979; Doublier in sod., 2000), po drugem pa je fazna separacija posledica deplecijsko flokulacijskega mehanizma (Asakura in Oosawa, 1958; Jenkins in Snowden, 1996; Bourriot in sod., 1999). Deplecijsko flokulacijski mehanizem je verjetneji vzrok fazne separacije zmesi levana in DNA, saj opiše fazno separacijo oziroma flokulacijo prvotno dispergiranih kroglastih delcev zaradi izrinjenja verig polimera DNA iz vmesnega prostora med kroglastimi delci. To povzroči razliko v koncentraciji polimera v vmesnem prostoru med delci in okolo z večjo koncentracijo polimera. Zaradi večje koncentracije je namreč osmotski tlak tega predela zmesi večji in povzroči flokulacijo oziroma fazno separacijo kroglastih delcev.

Skupki levana so se pri vseh treh levanih tvorili le v zmeseh levana in DNA, ki so bile pripravljene v topilu s solmi. Ioni, prisotni v pufru PBS, so senčili znotrajmolekulske in medmolekulske elektrostatske interakcije molekul DNA, ki je negativno nabita. To je zmanjšalo persistenčno dolžino DNA, postala je fleksibilnejša (Tinland in sod., 1997; Chen in sod., 2012; Pavlov in sod., 2013), razdalje med sosednjimi molekulami so se zmanjšale in s tem se je entropija sistema povečala (Flory, 1942; Oosawa in Asakura, 1954; Götzelmann in sod., 1998). Fazna separacija postaja izrazitejša z naraščajočo polimerizacijo makromolekulskega veriga (Jenkins in Snowden, 1996), ko pa smo omrežje molekul DNA encimatsko razgradili, se skupki levana v zmesi niso več pojavili (slika 8E). To kaže na ključno vlogo dolgih verig DNA pri nastanku skupkov. Dolžina verig DNA je ključna: ko le ta pada pod 100 bp, kot v primeru DNA *B. subtilis* (slika 9), do fazne separacije ne pride več.

Tvorbo skupkov v zmesi smo opazili pri vseh treh levanih, a pri različnih absolutnih koncentracijah posameznega levana in različnem razmerju levana in DNA v zmeseh (sliki 10, 11). Opazili smo tudi korelacijo med višino praga, nad katerim je prišlo do fazne separacije, in povprečnim premerom levanskih delcev ter odstotkom raztopljenega levana, ki se ni nahajal v kroglastih delcih (preglednica 2). V zmeseh z levanom *E. herbicola* in DNA je bil ta prag najnižji (slika 10). Omenjeni levan je namreč tvoril največje delce med levani in je imel tudi najnižji odstotek raztopljenega levana. V zmeseh z levanom *B.*

subtilis je bil prag fazne separacije postavljen najvišje. Ta levan je tvoril delce z najmanjšim premerom in je bil skoraj v celoti raztopljen.

Viskoznost suspenzij levanov je nizka v primerjavi z raztopinami drugih polisaharidov (npr. celuloze in ksantana) podobnih koncentracij in molekulskih velikosti (Arvidson in sod., 2006). Sklepamo, da na nizko viskoznost levana *E. herbicola* (slika 14A) vpliva tvorba kroglastih delcev, ki ima učinek mazanja. Tako levanu *E. herbicola* kot DNA se je spremenilo njuno reološko obnašanje po združitvi in fazni separaciji, kar ni razvidno iz makroreoloških meritov. Pri makroreoloških meritvah je razvidno, da so imele zmesi levana in DNA višje viskoznosti kot posamezni sestavini dvokomponentne zmesi enakih koncentracij. Povečana viskoznost je bila približno enaka njuni vsoti (slika 14D). Kvalitativno so se zmesi levana in DNA obnašale psevdoplastično primerljivo psevdoplastičnosti čiste raztopine DNA (sliki 14B in C). Povečanje viskoznosti in stopnje agregiranosti levana po dodatku DNA potrjuje prvo hipotezo.

S fazno separacijo levana in DNA se kompleksnost zmesi znatno poveča in meritve povprečnih reoloških količin z rotacijskim reometrom ne odražajo več mikroheterogenosti reoloških parametrov. Šele mikroreološke meritve posamezne faze zmesi (slika 16) so prikazale kompleksnost reologije zmesi. Viskoznost faze z DNA je bila približno enaka viskoznosti znotraj skupkov levana (slika 16A), medtem ko se je viskoznost znotraj skupkov levana v primerjavi s suspenzijo levana znatno povečala (slika 17A). To je najverjetnejše posledica povečane gostote levanskih delcev znotraj agregatov. Iz ocenitve volumskega deleža obeh faz je razvidno, da je bil levan znotraj skupkov približno osemkrat bolj koncentriran kot levan v suspenziji. Povečanje koncentracije levana je povzročilo povečanje viskoznosti in prehod k psevdoplastičnemu tokovnemu obnašanju (slika 17A). Psevdoplastično obnašanje je značilno tudi za zunajcelični matriks biofilma (Kavita in sod., 2013; Kavita in sod., 2014). Poleg povečanja viskoznosti znotraj skupkov levana smo opazili tudi povečanje elastičnega modula. Skupki levana so bili približno stokrat bolj elastični in so imeli večjo frekvenčno odvisnost elastičnosti kot levan v čisti suspenziji (slika 17B). Sklepamo lahko, da se je med faznim prehodom zaradi dodatka DNA reološko obnašanje levana spremenilo iz nizkoviskoznega v viskoelastično. Tudi viskoelastično obnašanje je ena od temeljnih značilnosti zunajceličnih matriksov biofilmov (Klapper in sod., 2002; Di Stefano in sod., 2009; Wilking in sod., 2011).

Zaradi fazne separacije zmesi se ni povečala zgolj koncentracija levana v skupkih, ampak tudi lokalna koncentracija DNA. Zanimivo, da se je viskoznost koncentrirane DNA v zmesi zmanjšala. Čeprav se je večina levana nahajala v skupkih, je bilo tudi približno 20 % raztopljenega levana (preglednica 2) in nekaj levanskih delcev v fazi z DNA. Zmanjšanje viskoznosti faze z DNA je bila lahko posledica mazalnega učinka levanskih delcev in raztopljenega levana, ki so ostali v fazi z DNA. Onuki (1994) je pokazal, da lahko že majhen delež molekul sosednje faze z nižjo viskoznostjo drastično zniža viskoznost

prvotno bolj viskozne faze. Molekule sosednje faze delujejo v tem primeru kot lubrikant znotraj širokega intervala strižne hitrosti (Onuki, 1994).

Povečanje viskoznosti in psevdoplastičnih lastnosti raztopine je značilna sprememba, ki se zgodi pri nastanku biofilma. Reološke spremembe kulture bakterije (npr. *S. aureus*) med rastjo so že bile opisane (Portela in sod., 2013). Z rotacijskim viskozimetrom so zaznali spremembe v viskoznosti po približno 3,5 urah, signifikantno pa se je viskoznost povečala pri prehodu v stacionarno fazo. V našem primeru (slika 20) povečanje viskoznosti v prvih petih urah gojenja ni bilo statistično signifikantno. Ker pa so nekateri predhodni rezultati v laboratoriju kazali na znatno viskoelastično obnašanje kulture tudi v primeru, ko z makroreologijo niso zaznali sprememb v reologiji, smo kulturo divjega tipa *B. subtilis* v zgodnji eksponentni fazi opazovali z optično pinceto. Opazili smo mehansko sklopitev gibanja bakterij v aktivni in pasivni pasti že takoj po inokulaciji (slika 18). Kljub spiranju celic pred inokulacijo smo s pomočjo elektronske mikroskopije (slika 19B) opazili ostanke zunajceličnega matriksa. Sklepamo, da prisotnost zunajceličnega matriksa kljub spiranju lahko razloži obstoj medceličnih povezav, ki smo jih zaznali z optično pinceto že takoj po inokulaciji. Z rastjo bakterijske kulture se je domet medceličnih povezav povečeval. Znatno povečanje dometa medceličnih povezav smo opazili že eno uro po inokulaciji (slika 18). Po 2,5 urah inkubacije je segal do 33 µm. S tem smo potrdili tudi drugo hipotezo. Povečanje dometa medceličnih povezav med inkubacijo nismo opazili po dodatku azida, kar nakazuje na potrebo po aktivnem metabolizmu pri sintezi zunajceličnega matriksa (slika 18). Na medsebojne povezave celic bi lahko vplivala peritrihna običkanost *B. subtilis* (Guttenplan in sod., 2013). Velikost bičkov smo ocenili na dve do tri dolžine bakterijske celice, na $7,5 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$. Možen preplet bičkov bi lahko razložil mehansko sklopitev bakterij na razdaljah, ki so manjše od 15 µm, zagotovo pa ne pri večjih razdaljah. Zlasti pri krajših razdaljah bi lahko bilo sklopljeno gibanje bakterij posledica hidrodinamskega efekta. Hidrodinamski efekt smo preverili in izključili njegov vpliv pri razdaljah, ki so večje od 10 µm (priloga C). Mehansko sklopitev gibanja bakterij je težko opaziti pod svetlobnim mikroskopom brez optične pincete, kar je verjetno razlog, zakaj ta fenomen v literaturi še ni bil opisan kljub dobremu poznavanju kasnejših stopenj tvorbe plavajočega biofilma (Kobayashi, 2007). Viskoelastični zunajcelični hidrokoloidni material, ki je odgovoren za mehansko sklopitev bakterij, vsebuje namreč veliko vode in ima kljub lokalni visoki gostoti raztopljenih proteinov in polisaharidov povprečno gostoto, ki se razlikuje od okoliške vode le za 0,1 % (Reynolds in sod., 1981). Tako nizka razlika v gostoti matriksa od okoliške tekočine ima premajhen vpliv na razliko v refrakcijskem indeksu, da bi lahko opazili medcelične povezave s tradicionalno svetlobno mikroskopijo.

Z uporabo izrabljenega gojišča iz razpadlega biofilma smo uspeli razgraditi medcelične povezave, ki so se vzpostavile v zgodnji eksponentni fazi (slika 21). V izrabljenem gojišču lahko pričakujemo encime (Flemming in Wingender, 2010). Razgradnja zunajceličnega matriksa in posledično odsotnost sklopitve bakterij nakazuje na prisotnost podobnih molekul na začetku eksponentne faze rasti bakterij in v biofilmu. Opazili smo, da je po

dodatku izrabljenega gojišča z encimi in azida drastično upadlo število celic. Zelo verjetno so encimi razgradili tudi komponente celične stene, zaradi metabolne neaktivnosti celic ob prisotnosti azida pa le te niso bile sposobne nadomestiti razgrajenih komponent. Prav tako mehanske sklopitve bakterij nismo opazili po redčenju kulture divjega tipa za 10000 krat (slika 21), kar nakazuje na topnost medceličnih povezav. Zanimivo, po dvakratnem spiranju (s centrifugiranjem in resuspendiranjem) inokuluma pred nacepitvijo lahko mehansko sklopitev opazimo. Sklepamo, da lahko razlike pripišemo centrifugiraju: v obeh primerih smo kulturo redčili, le da so se celice pri centrifugiranju sedimentirale skupaj z zunajceličnim polimernim materialom, ki se ob ponovnem resuspendirjanju peleta ni v celoti raztopil.

Število celic v stresanih kulturah je naraščalo eksponentno (priloga D). Po določenem času število celic preseže perkolacijski prag, ko se dotikajo druga druge in tvorijo mrežo (Salek in sod., 2012). Rezultati te naloge kažejo, da se z večanjem števila celic veča tudi domet medceličnih povezav, zato se celice lahko veliko prej povežejo preko zunajceličnega matriksa, kot bi to sklepali le iz celičnih prostornin. Ko celice dosežejo perkolacijski prag tvorijo kontinuirano mrežo. V začetku je ta mreža zelo krhkna in celice se še vedno lahko aktivno gibajo skozi mrežo, kar smo opazili z optično pinceto. Predpostavljamo, da se povezave pri gibanju bakterij zlahka pretrgajo ter nato ponovno vzpostavijo. Pozneje se mreža učvrsti z dodatkom zunajceličnih komponent kot sta polisharid, ki ga kodira operon *eps(A-O)* in zunajcelični protein TasA (Branda in sod., 2006; Dogsa in sod., 2013). V nalogi smo preverili ali sta ti dve komponenti pomembni že pri začetnem vzpostavljanju povezav med bakterijami. Celice divjega tipa in mutante, ki ne producira zunajceličnega polisaharida *eps(A-O)* in zunajceličnega proteina TasA, se niso bistveno razlikovale v povprečnem dometu medceličnih povezav (slika 21). Predpostavili smo, da se dometa medceličnih povezav nista bistveno razlikovala zaradi kasnejšega izražanja genov *tasA* (Stöver in Driks, 1999) in *eps(A-O)* (Kobayashi, 2007). Za potrditev te domneve smo uporabili genski konstrukt *B. subtilis* YC164 (*P_{epsA}-gfp*). Preko spremeljanja izražanja *eps* operona smo ugotovili, da se *eps(A-O)* dejansko začne izražati bistveno pozneje po vzpostavitvi prvih mehanskih povezav med celicami (slika 22).

Rezultati te magistrske naloge pomembno prispevajo k našemu znanju o biofilmih, kar med drugim kažejo objave v revijah Biophysical Journal (Stojković in sod., 2015), Langmuir (Benigar in sod., 2014) in ACSi (Benigar in sod., 2015), še nekaj rezultatov te naloge pa bo predvidoma uporabljenih pri publikaciji o zgodnjem nastanku medceličnih povezav med bakterijami, ki so pomembne pri vzpostavitvi biofilma. Gre za popolnoma novo spoznanje o tem, da celice tudi v planktonski obliki niso neodvisne druga od druge, ampak tvorijo mehanske povezave, ki jim omogočajo sklopljeno gibanje na razdaljah do 40 µm. Drugi rezultati v laboratoriju kažejo, da vzpostavitev zgodnjih mehanskih povezav med celicami ni zgolj posebnost bakterij *B. subtilis*, ampak se podoben fenomen kaže tudi pri *Vibrio ruber*, *Pseudomonas fluorescens* in *E. coli*. Prihodnost bo pokazala, kaj to

pomeni za medcelično signaliziranje, mehanotransdukcijo bakterij in za nadaljnji razvoj mikrobiologije.

5.2 SKLEPI

Poglavitna sklepa:

- DNA povzroči agregacijo levanskih delcev in fazno separacijo levana in DNA ter znatno poveča viskoznost in psevdoplastičnost zmesi, kar nakazuje na vlogo DNA pri strukturiranju zunajceličnega matriksa biofilmov.
- Mehanska sklopitev gibanja bakterij, ki kaže na obstoj zunajcelične polimerne mreže, se začne vzpostavljati takoj po začetku rasti bakterijske kulture, bistveno prej kot so raziskovalci domnevali.

Preostali sklepi:

- Levani bakterij *B. subtilis*, *Z. mobilis* in *E. herbicola* tvorijo v suspenzijah submikronske kroglaste delce, katerih premer je odvisen od vrste levana in koncentracije.
- Topnost levana lahko izboljšamo s sonikacijo.
- Tvorba levanskih skupkov je odvisna od koncentracije levana, povprečnega premera levanskih delcev, odstotka raztopljenega levana, dolžine DNA, vrste topila in od razmerja med levanom in DNA v zmesi.
- Encimska cepitev DNA uniči levanske skupke.
- V homogenem sistemu se rezultati makro in mikroreoloških meritev ujemajo, pri fazno nehomogenem sistemu pa povprečne vrednosti reoloških parametrov, pridobljene z makroreologijo, ne odražajo dejanske kompleksnosti reološkega sistema.
- Z mikroreologijo lahko v fazno ločenem sistemu določamo reološke lastnosti posamezne faze na velikostni skali nekaj deset mikrometrov.
- Za mehansko sklopitev gibanja bakterij *B. subtilis* v tekočem gojišču je potreben aktivnen metabolizem in proizvodnja zunajceličnih polimernih snovi.
- S časom gojenja in aktivnim celičnim metabolizmom se domet medceličnih povezav, ki omogočajo mehansko sklopitev gibanja bakterij, veča.
- Komponente zunajceličnega matriksa bakterij v zgodnjem biofilmu se razlikujejo od komponent zrelega biofilma.
- Celice divjega tipa *B. subtilis* in dvojne mutante $\Delta tasA/eps$, ki ne proizvajajo zunajceličnega polisaharida in proteina, pomembna za nastanek zrelega biofilma, se v zgodnjih fazah nastanka biofilma bistveno ne razlikujejo v povprečnem dometu medceličnih povezav, se pa razlikujejo njuni biofilmi.

6 POVZETEK

Mikroorganizmi živijo v naravnih habitatih v združbah, ki jih imenujemo biofilmi. Poleg celic biofilmi vsebujejo tudi zunajcelične polimerne snovi (EPS), ki omogočajo arhitekturno kompleksnost biofilmov. Znano je, da bakterija *Bacillus subtilis* v gojišču bogatem s saharozo (gojišču SYM) lahko sintetizira levan, ki predstavlja večino suhe mase EPS. Levan pa ne odraža viskoelastičnega obnašanja, ki je značilno za EPS biofilma. Biofilmi niso edini poznan način življenja mikroorganizmov, saj lahko celice živijo tudi kot prosto plavajoče posamezne celice, preden se pritrđijo na površino in tvorijo biofilme. Pri bakteriji *B. subtilis* je dobro preučena tvorba plavajočega biofilma, vendar šele pri kasnejših stopnjah, ki jih lahko spremojamo s tradicionalnimi kontrastnimi tehnikami svetlobne mikroskopije.

V nalogi smo želeli raziskati dvoje: kako dodatek ostalih komponent EPS prispeva k spremembi reološkega obnašanja levana in ali obstajajo fizične povezave med celicami *B. subtilis* še pred nastankom vidnih skupkov. S pomočjo svetlobnega mikroskopa smo opazili, da levani bakterij *B. subtilis*, *Zymomonas mobilis* in *Erwinia herbicola* tvorijo v suspenzijah submikronske kroglaste delce, s poskusom s sonikacijo pa pokazali, da levanski delci predstavljajo nepopolno raztopljen levan. Dodatek dovolj dolgih molekul DNA je pri vseh treh levanih povzročil stabilno agregacijo levanskih delcev oziroma fazno separacijo dvokomponentne zmesi. Hkrati pa je dodatek DNA tudi znatno povečal mikro- in makroviskoznost ter psevdoplastičnost zmesi, kar smo pomerili z optično pinceto in rotacijskim viskozimetrom. Tvorba levanskih skupkov je bila odvisna od koncentracije levana, povprečnega premora levanskih delcev, odstotka raztopljenega levana in od razmerja med levanom in DNA v zmesi.

Z optično pinceto smo opazili mehansko sklopitev gibanja bakterij preko medceličnih povezav že pri zgodnjih časih gojenja. Tovrstne povezave med celicami do sedaj niso bile poznane. Z aktivnim metabolizmom in časom gojenja se je domet medceličnih povezav še povečal. Po redčenju kulture za visok faktor mehanske sklopitve celic nismo več opazili, prav tako tudi ne po dodatku izrabljenega gojišča iz razpadlega biofilma. Celice divjega tipa in dvojne mutante *ΔtasA/eps* *B. subtilis*, ki ne izraža zunajceličnih polisaharidov in proteinov pomembnih za vzpostavitev plavajočega biofilma, se niso bistveno razlikovale v povprečnem dometu medceličnih povezav pri zgodnjih časih gojenja, so se pa razlikovali njuni biofilmi. To kaže, da je sestava zunajceličnega matriksa zgodnjih in poznih biofilmov različna.

7 VIRI

- Allesen-Holm M., Barken K. B., Yang L., Klausen M., Webb J. S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59, 4: 1114-1128.
- Arvidson S. A., Rinehart B. T., Gadala-Maria F. 2006. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*, 65, 2: 144-149.
- Asakura S., Oosawa F. 1958. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33: 183-192.
- Atkins P.W. 1994. Physical chemistry. 5th ed. Oxford, Oxford University press: 1031 str.
- Bae I. Y., Oh I.-K., Lee S., Yoo S.-H., Lee H. G. 2008. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, 1: 10-13.
- Benigar E., Dogsa I., Stopar D., Jamnik A., Cigić I. K., Tomšič M. 2014. Structure and dynamics of a polysaccharide matrix: aqueous solutions of bacterial levan. *Langmuir*, 30, 14: 4172-4182.
- Benigar E., Tomšič M., Sretenovic S., Stopar D., Jamnik A., Dogsa I. 2015. Evaluating SAXS results on aqueous solutions of various bacterial levan utilizing the string-of-beads model. *Acta Chimica Slovenica*, 62, doi: 10.17344/acsi.2015.1437: 9 str. (v tisku)
- Böckelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T. R., Wecke J., Lawrence J. R., Szewzyk U. 2006. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, 262, 1: 31-38.
- Bourriot S., Garnier C., Doublier J.-L. 1999. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein–guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, 1: 43-49.
- Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59, 4: 1229-1238.
- Branda S. S., González-Pastor J. E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 20: 11621-11626.
- Branda S. S., Vik Å., Friedman L., Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 1: 20-26.

- Brau R. R., Ferrer J.M., Lee H., Castro C. E., Tam B. K., Tarsa P. B., Matsudaira P., Boyce M. C., Kamm R. D., Lang M. J. 2007. Passive and active microrheology with optical tweezers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9, 8: S103-S112.
- Busalmen J. P., Vázquez M., de Sánchez S. R. 2002. New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion. *Electrochimica Acta*, 47, 12: 1857-1865.
- Camilli A., Bassler B. L. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311, 5764: 1113-1116.
- Chen H., Meisburger S. P., Pabit S. A., Sutton J. L., Webb W. W., Pollack L. 2012. Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 3: 799-804.
- Chung B. H., Kim W. K., Song K.-B., Kim C.-H., Rhee S.-K. 1997. Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning. *Biotechnology Techniques*, 11, 5: 327-329.
- Coenye T., Nelis H. J. 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 2: 89-105.
- 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, 1: 69-73.
- Czerlinski G. H., Reid D. S., Apostol A., Bauer K. D., Scarpelli D. G. 1987. Determination of the density of cells from sedimentation studies at 1G. *Journal of Biological Physics*, 15, 2: 29-32.
- Das T., Sehar S., Manefield M. 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 6: 778-786.
- Davey M. E., O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 4: 847-867.
- de Beer D., Stoodley P., Lewandowski Z. 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 5: 636-641.
- Di Stefano A., D'Aurizio E., Trubiani O., Grande R., Di Campli E., Di Giulio M., Di Bartolomeo S., Sozio P., Iannitelli A., Nostro A., Cellini L. 2009. Viscoelastic properties of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mono-microbial biofilms. *Microbial Biotechnology*, 2, 6: 634-641.

- Dogsa I., Brložnik M., Stopar D., Mandic-Mulec I. 2013. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. PLoS ONE, 8, 4: e62044, doi: 10.1371/journal.pone.0062044: 10 str.
- Dominiak D. M., Nielsen J. L., Nielsen P. H. 2011. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. Environmental Microbiology, 13, 3: 710-721.
- Donlan R. M. 2000. Biofilm control in industrial water systems: approaching an old problem in new ways. V: Biofilms: recent advances in their study and control. Evans L. V. (ed.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 333-360.
- Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8, 9: 881–890.
- Doublier J.-L., Garnier C., Renard D., Sanchez C. 2000. Protein–polysaccharide interactions. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 5, 3: 202-214.
- Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clinical Microbiology Reviews, 15, 2: 155-166.
- Durack D. T. 1975. Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions. Journal of Pathology, 115, 2: 81-89.
- Flemming H.-C., Wingender J., Griegbe T., Mayer C. 2000. Physico-chemical properties of biofilms. V: Biofilms: recent advances in their study and control. Evans L.V. (ed.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 19-34.
- Flemming H.-C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8: 623-633.
- Flory P. J. 1942. Thermodynamics of high polymer solutions. Journal of Chemical Physics, 10: 51-61.
- Friedman L., Kolter R. 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. Molecular Microbiology, 51, 3: 675-690.
- Frust E. M. 2005. Application of laser tweezers in complex fluid rheology. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 10, 1-2: 79-86.
- Fuqua C., Parsek M. R., Greenberg E. P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annual Review of Genetics, 35: 439-468.
- Götzelmann B., Evans R., Dietrich S. 1998. Depletion forces in fluids. Physical Review E, 57, 6: 6785-6800.

- Guttenplan S. B., Shaw S., Kearns D. B. 2013. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 87, 1: 211-229.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. Cellular Microbiology, 11, 7: 1034-1043.
- Han Y.W. 1990. Microbial levan. Advances in Applied Microbiology, 35: 171-194.
- Hermansson M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 14, 1-4: 105-119.
- Heukelekian H., Heller A. 1940. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. Journal of Bacteriology, 40, 4: 547-558.
- Horan N. J., Eccles C. R. 1986. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. Water Research, 20, 11: 1427-1432.
- Jakob F., Pfaff A., Novoa-Carballal R., Rübsam H., Becker T., Vogel R. F. 2013. Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. Carbohydrate Polymers, 92, 2: 1234-1242.
- Jefferson K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters, 236, 2: 163-173.
- Jenkins P., Snowden M. 1996. Depletion flocculation in colloidal dispersions. Advances in Colloid and Interface Science, 68: 57-96.
- Jurcisek J. A., Bakaletz L. O. 2007. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. Journal of Bacteriology, 189, 10: 3868-3875.
- Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J. 1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. Journal of Bacteriology, 178, 10: 2767-2774.
- Kasapis S., Morris E. R., Gross M., Rudolph K. 1994. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. Carbohydrate Polymers, 23, 1: 55-64.
- Kavita K., Mishra A., Jha B. 2013. Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: characterization and applications. Carbohydrate Polymers, 94, 2: 882-888.
- Kavita K., Singh V. K., Mishra A., Jha B. 2014. Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. Carbohydrate Polymers, 101: 29-35.

- 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.
- Keith J., Wiley B., Ball D., Arcidiacono S., Zorfass D., Mayer J., Kaplan D. 1991. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. Biotechnology and Bioengineering, 38, 5: 557-560.
- Kim K. H., Chung C. B., Kim Y.H., Kim K.S., Han C.S., Kim C. H. 2005. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. Journal of Cosmetic Science, 56, 6: 395-406.
- Klapper I., Rupp C. J., Cargo R., Purvedorj B., Stoodley P. 2002. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. Biotechnology and Bioengineering, 80, 3: 289-296.
- Kobayashi K. 2007. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. Journal of Bacteriology, 189, 13: 4920-4931.
- Kumada M., Senpuku H., Motegi M., Nakao R., Yonezawa H., Yamamura H., Watanabe H., Tagami J. 2008. Effects of *Enterococcus faecium* on *Streptococcus mutans* biofilm formation using flow cell system. Journal of Oral Biosciences, 50, 1: 68-76.
- Leck C., Bigg E. K. 2005. Biogenic particles in the surface microlayer and overlaying atmosphere in the central Arctic Ocean during summer. Tellus B, 57, 4: 305-316.
- Lemon K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C., Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. V: Bacterial biofilms. Romeo T. (ed.). Berlin, Springer: 1-16.
- López D., Vlamakis H., Kolter R. 2010. Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2, 7: a000398, doi:10.1101/cshperspect.a000398: 11 str.
- López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009. Paracrine signaling in a bacterium. Genes & Development, 23, 14: 1631-1638.
- Manandhar S., Vidhate S., D'Souza N. 2009. Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. Carbohydrate Polymers, 78, 4: 794-798.
- Manzi A. E., Powell L. D., Varki, A. 1995. Analysis of monosaccharides. Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 32, Section 4: Unit 17.18: 17.18.1-17.18.19.
- Marvasi M., Visscher P. T., Martinez L. C. 2010. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. FEMS Microbiology Letters, 313, 1: 1-9.
- Meng G., Fütterer K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. Nature Structural & Molecular Biology, 10, 11: 935-941.

- Neu T. R., Poralla K. 1988. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain. FEMS Microbiology Letters, 49, 3: 389-392.
- Nielsen P. H., Jahn A., Palmgren R. 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. Water Science and Technology, 36, 1: 11-19.
- O'Toole G.A., Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology, 28, 3: 449-461.
- Onuki A. 1994. Domain growth and rheology in phase-separating binary mixtures with viscosity difference. Europhysics Letters, 28, 3: 175-179.
- Oosawa F., Asakura S. 1954. Surface tension of high-polymer solutions. Journal of Chemical Physics, 22: 1255-1255.
- Osterman N. 2010. TweezPal – Optical tweezers analysis and calibration software. Computer Physics Communications, 181, 11: 1911-1916.
- Pavlov G. M., Okatova O. V., Gavrilova I. I., Ul'yanova N. N., Panarin E. F. 2013. Sizes and conformations of hydrophilic and hydrophobic polyelectrolytes in solutions of various ionic strengths. Polymer Science Series A, 55, 12: 699-705.
- Portela R., Almeida P. L., Patrício P., Cidade T., Sobral R. G., Leal C. R. 2013. Real-time rheology of actively growing bacteria. Physical Review E, 87, 3: 030701, doi: 10.1103/PhysRevE.87.030701: 5 str.
- Reynolds C. S., Jaworski G. H. M., Cmiech H. A., Leedale G. F. 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* kutz. Emend. Elenkin. Philosophical Transactions B, 293, 1068: 419-477.
- Ron E. Z., Rosenberg E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology, 3, 4: 229-236.
- Salek M. M., Sattari P., Martinuzzi R. J. 2012. Analysis of fluid flow and wall shear stress patterns inside partially filled agitated culture well plates. Annals of Biomedical Engineering, 40, 3: 707-728.
- Shida T., Mukaijo K., Ishikawa S., Yamamoto H., Sekiguchi J. 2002. Production of long-chain levan by a *sacC* insertional mutant from *Bacillus subtilis* 327UH. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 66, 7: 1555–1558.
- Siggia E. D. 1979. Late stages of spinoidal decomposition in binary mixtures. Physical Review A, 20, 2: 595-605.

- Srikanth R., Reddy C. H. S. S., Siddartha G., Ramaiah M. J., Uppuluri K. B. 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 20: 102-114.
- Stojković B., Sretenovic S., Dogsa I., Poberaj I., Stopar S. 2015. Viscoelastic properties of levan-DNA mixtures important in microbial biofilm formation as determined by micro- and macrorheology. *Biophysical Journal*, 108: 758-765.
- Stoodley P., Boyle J. D., DeBeer D., Lappin-Scott H. M. 1999. Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling: Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 14, 1: 75-90.
- Stöver A. G., Driks A. 1999. Regulation of synthesis of the *Bacillus subtilis* transition-phase, spore-associated antibacterial protein TasA. *Journal of Bacteriology*, 181, 17: 5476-5481.
- Sutherland I. W. 1997. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure and Applied Chemistry*, 69, 9: 1911-1918.
- Sutherland I. W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 1: 3-9.
- Tinland B., Pluen A., Sturm J., Weill G. 1997. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, 30, 19: 5763-5765.
- Valentine M. T., Dewalt L. E., Ou-Yang H. D. 1996. Forces on a colloidal particle in a polymer solution: a study using optical tweezers. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 8, 47: 9477-9482.
- Van Houdt R., Michiels C. W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156, 5-6: 626-633.
- Waters C. M., Bassler B. L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319-346.
- Wilking J. N., Angelini T. E., Seminara A., Brenner M. P., Weitz D. A. 2011. Biofilms as complex fluids. *Materials Research Society Bulletin*, 36, 5: 385-391.
- Wingender J., Neu T. R., Flemming H.-C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? V: Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. Wingender J., Neu T. R., Flemming H.-C. (eds.). Berlin, Springer: 1-20.
- Yang S., Lewandowski Z. 1995. Measurement of local mass transfer coefficient in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 6: 737-744.

Yim G., Wang H. H., Frs, J. D. 2007. Antibiotics as signalling molecules. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 362, 1483: 1195-1200.

Ziebuhr W., Krimmer V., Rachid S., Lößner I., Götz F., Hacker J. 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Molecular Microbiology, 32, 2: 345-356.

Zobell C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. Journal of Bacteriology, 46, 1: 39-56.

ZAHVALA

Za vse strokovne nasvete, vložen čas in pomoč pri pisanju tega dela se zahvaljujem mentorju, profesorju dr. Davidu Stoparju. Zahvaljujem se tudi somentorju, dr. Iztoku Dogši, za številne razlage in napotke ter pomoč pri analizah podatkov.

Profesorju dr. Igorju Poberaju in Biljani Stojković se zahvaljujem za seznanitev z optično pinceto in korektno sodelovanje. Prof. dr. Roku Kostanjšku pa se želim zahvaliti za pomoč pri presevni elektronski mikroskopiji.

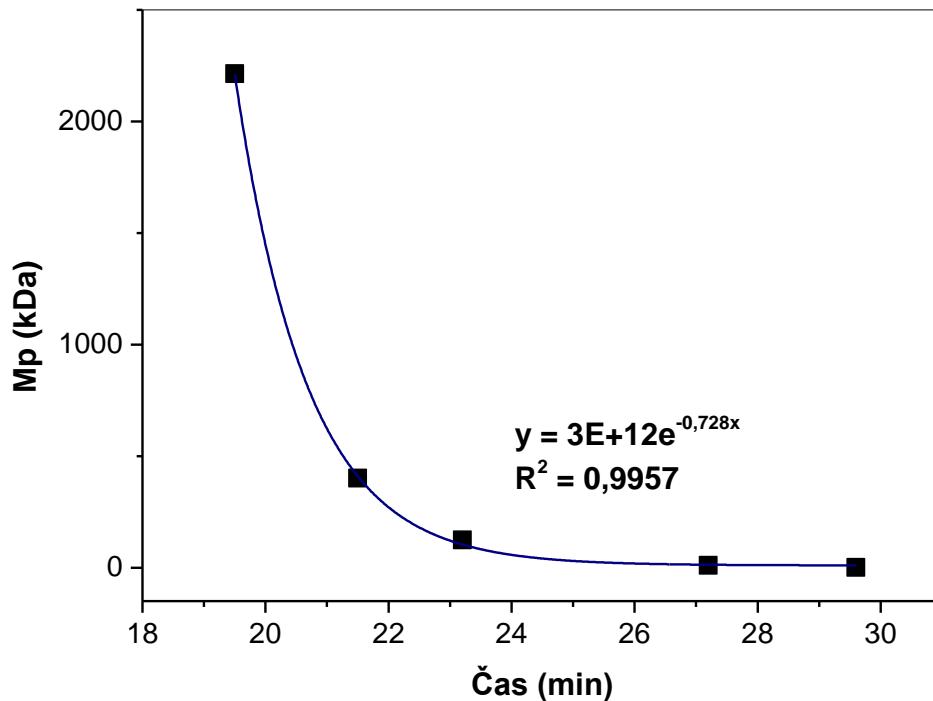
Za produktivno sodelovanje pri pripravi člankov se zahvaljujem mentorju prof. dr. Davidu Stoparju, somentorju dr. Iztoku Dogši, prof. dr. Igorju Poberaju, prof. dr. Roku Kostanjšku, doc. dr. Matiju Tomšiču, dr. Elizabeti Benigar in Biljani Stojković.

Hvala tudi doc. dr. Tjaši Danevčič za prijaznost, obilo dobre volje, praktične nasvete in nepogrešljivo pomoč. Dr. Elizabeti Benigar se zahvaljujem za izolacijo levana bakterije *Bacillus subtilis* in prijetno druženje z zanimivimi pogovori. Tjaši Stošicki pa se zahvaljujem za marsikatero nacepitev prekonočnih kultur konec vikenda, obilo smeha in prijetno družbo.

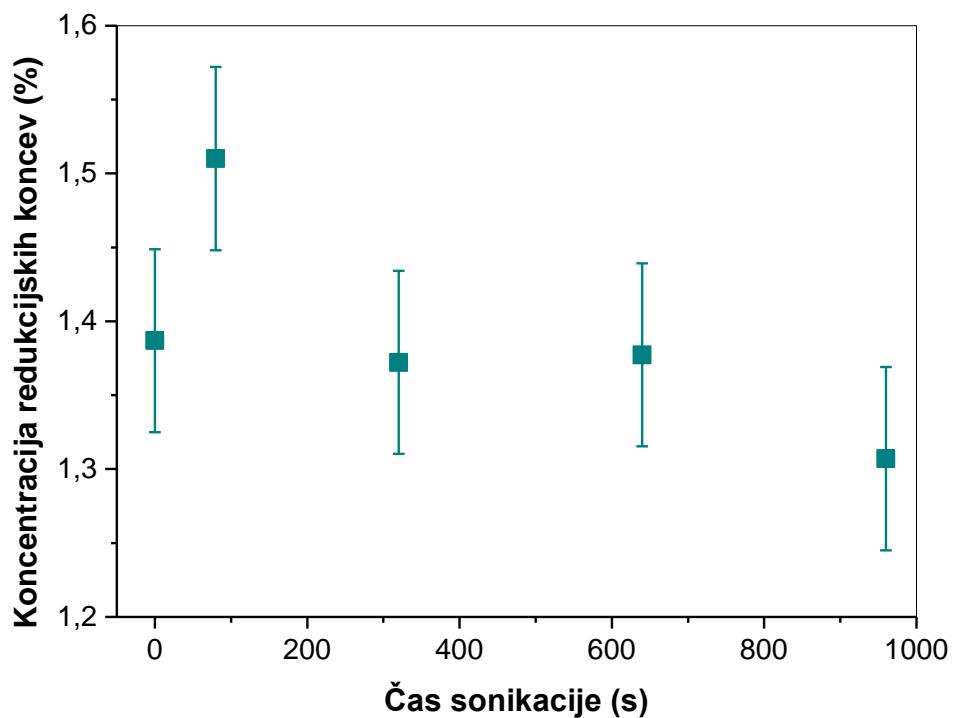
Za prijetno druženje se zahvaljujem tudi študentom in študentkam, s katerimi smo skupaj eksperimentirali. Mihael, Nina, Špela, Maja, še ena Maja, Tea, Erika, Sara, Katja, Bernarda, Martina, Tanja, Domen, Aleksander, Anita: hvala vam in srečno naprej. Za prijetno vzdušje in dobro sodelovanje se želim zahvaliti še vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete.

Posebna zahvala gre mojim staršem. Hvala vam za vzpodbudo in podporo pri študiju.

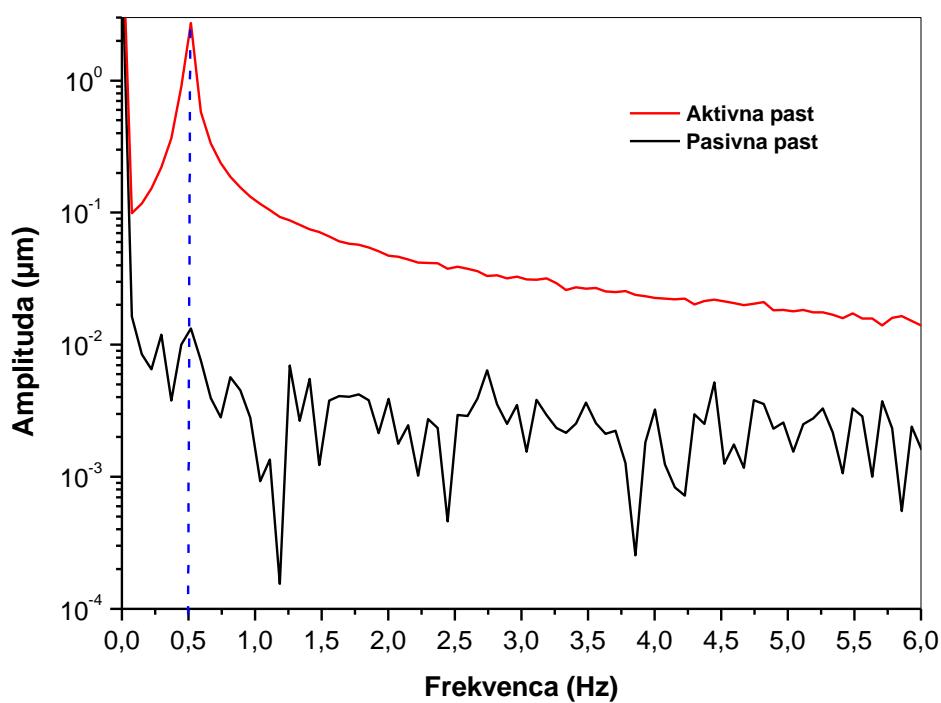
PRILOGE



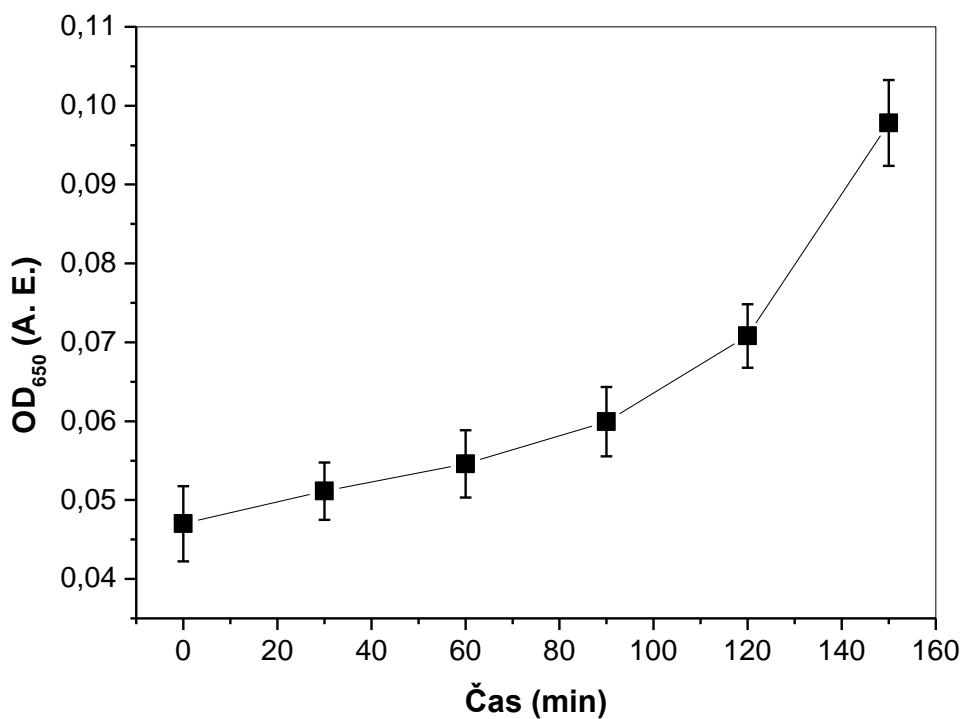
Priloga A: Umeritvena krivulja HPSEC standardov dekstrana.



Priloga B: Koncentracija redukcijskih koncev fruktoze pri posameznih časih sonikacije.



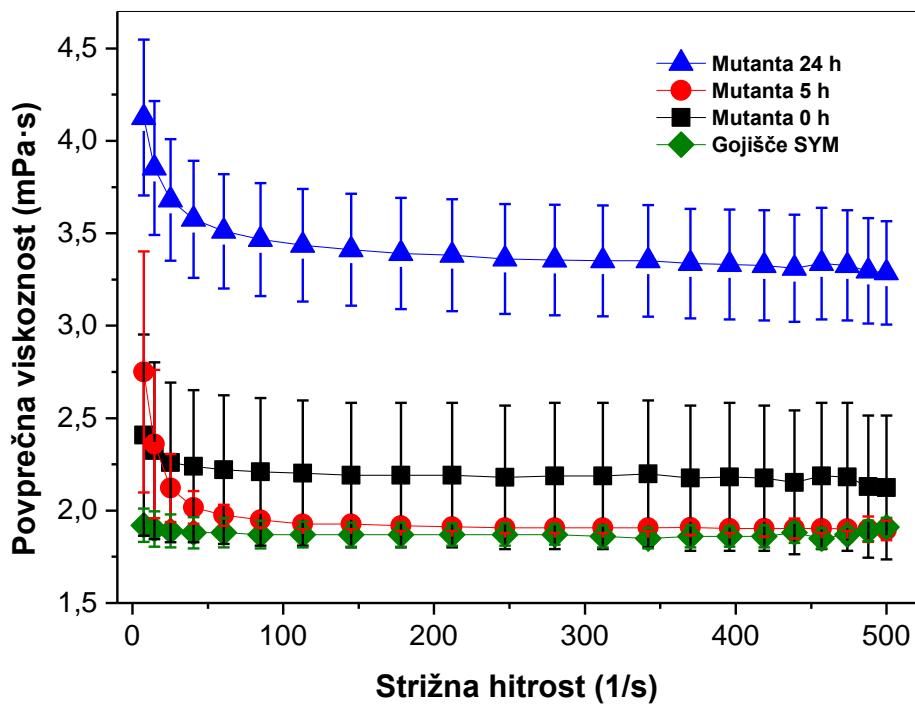
Priloga C: Amplituda aktivne in pasivne pasti s silikatnima kroglicama v odvisnosti od frekvence.



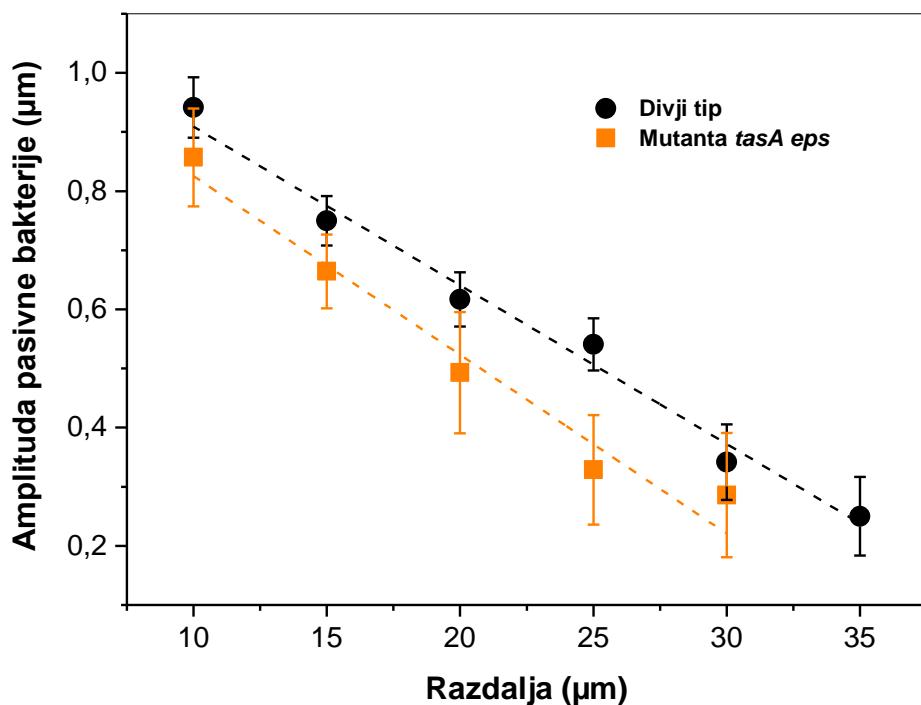
Priloga D: Optična gostota divjega tipa *Bacillus subtilis* v odvisnosti od časa. Prikazana je standardna napaka 8 ponovitev.

Priloga E: Jakost mehanske sklopitve gibanja bakterij divjega tipa *Bacillus subtilis*, določena s povprečno amplitudo bakterije v pasivni pasti, pri različnih časih gojenja. Jakost medceličnih povezav je padala z razdaljo in smo jo zaznali na daljših razdaljah po daljšem času gojenja. Prikazana je standrdna napaka vsaj treh ponovitev.

Razdalja (µm)	Povprečna amplituda pasivne bakterije (µm)					
	WT po nacepitvi	WT po 30 min	WT po 60 min	WT po 90 min	WT po 120 min	WT po 150 min
10	$0,8 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
15	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
20	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
25			$0,4 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
30					$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
35						$0,3 \pm 0,1$



Priloga F: Povprečne viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti za stresane kulture dvojne mutante $\Delta tasA/eps$ *Bacillus subtilis* in gojišča. Krivulje od zgoraj proti abscisi predstavljajo: mutanto po 24 urah (▲), 5 urah (●) in po nacepitvi (■) ter gojišče SYM (◆). Prikazana je standardna napaka dveh ponovitev.



Priloga G: Jakost mehanske sklopitve gibanja bakterij divjega tipa *Bacillus subtilis* (●) in dvojne mutante $\Delta tasA/eps$ (■) po 2,5 urah gojitve v odvisnosti od razdalje. Prikazana je standardna napaka 8 ponovitev.