



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša HRIBAR

**PROBLEMATIKA SPOR IN BIOFILMOV V
BIOTEHNOLOGIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša HRIBAR

PROBLEMATIKA SPOR IN BIOFILMOV V BIOTEHNOLOGIJI

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

PROBLEMATICS OF SPORES AND BIOFILMS IN BIOTECHNOLOGY

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorico diplomskega seminarja imenovala doc. dr. Tjašo Danevčič.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 24.8.2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 602.3:579.852.11:579.26:628.3 (043.2)
KG	biotehnologija/spore/biofilm/ <i>Bacillus subtilis</i>
AV	HRIBAR, Tjaša
SA	DANEVČIČ, Tjaša (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2017
IN	PROBLEMATIKA SPOR IN BIOFILMOV V BIOTEHNOLOGIJI.
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	IV, 22 str., 9 pregl., 3 sl., 58 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Biofilmi so visoko organizirana skupnost bakterij, ki se razlikujejo v fenotipu in jih zato delimo v subpopulacije. Vsaka subpopulacija ima dodeljene vloge, ob zorenju biofilma pa nastajajo tudi spore. Spore so visoko odporne na kemijske in fizikalne dejavnike, kar jim omogoči njihova struktura. Pri starejšem biofilmu se te razpršijo in s tem kolonizirajo druga področja. Nastanejo novi biofilmi, ki so nezaželeni v raznih industrijah ter se komercialno uporabljajo kot biološki kontrolni agensi za zaščito rastlin in za čiščenje odpadnih voda. V okviru diplomske naloge smo spremljali vpliv gojenja bakterijskih celic v biofilmih na sporulacijo. Primerjali smo delež sporulacije za bakterijska seva PS-216 wt in PS-216 $\Delta comQ$. Poleg tega smo merili intenziteto fluorescence in optično gostoto sevov PS-216 wt in PS-216 $\Delta comQ$ in njunih različic, ki vsebujeta poročevalsko fuzijo promotorja gena <i>spoIIQ</i> sklopljenega z genom za rumeni fluorescentni protein (<i>yfp</i>). Neoznačena seva, ki nista fluorescirala, sta služila kot kontroli. S tem smo spremljali rast in izražanje sporulacijskih genov v biofilmu. Pri označenem divjem sevu je bila opažena višja optična gostota in nižji nivo sporulacije celic, kar je bilo razvidno iz nižje intenzitete fluorescence. Pri sevu z okvarjeno signalizacijo (mutanti <i>comQ</i>) smo opazili manjšo optična gostoto in višjo intenziteto fluorescence.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 602.3:579.852.11:579.26:628.3 (043.2)

CX biotechnology/spores/biofilm/*Bacillus subtilis*

AU HRIBAR, Tjaša

AA DANEVČIČ, Tjaša (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2017

TI PROBLEMATICS OF SPORES AND BIOFILMS IN BIOTECHNOLOGY

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO IV, 22 p., 9 tab., 3 fig., 58 ref. .

LA sl

AL sl/en

AB Biofilms are highly structured group of bacteria that are different in phenotype which divides them in several subpopulations. Each subpopulation has an important role and as biofilm matures spores are formed. Because of their structure they are very resistant to chemical and physical factors. In old biofilms spores and other vegetative cells disperse in the environment and colonise other areas. Biofilms are undesired in various industries but also commercially used as biological control agents for plant protection and wastewater treatment. Within the thesis we studied the influence of the growth of bacterial cells in biofilms on sporulation. The fractions of spores in biofilms were compared between bacterial strains PS-216 wt and PS-216 $\Delta comQ$. Besides this the intensity of fluorescence and optical density of strains PS-216 wt, PS-216 $\Delta comQ$ and their marked strains was measured. In marked strains the fusion of the promoter of the gene *spoIIQ* and gene for yellow fluorescent protein (*yfp*) was used. Unmarked strains without fluorescent fusion were used as a control. They were used to monitor growth and expression of the sporulation genes. In comparison to marked mutant strain marked PS-216 wt strain had higher optical density and lower level of expression of the sporulation genes which has been observed in the lower fluorescence intensity.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	1
2.1 BIOFILMI	1
2.1.1 Splošno.....	1
2.1.2 Preučevanje biofilmov v laboratoriju	2
2.1.3 Bakterija <i>Bacillus subtilis</i>	2
2.2. NASTANEK BIOFILMA	2
2.2.1 Vloga transkripcijskega regulatorja Spo0A pri tvorbi biofilma.....	3
2.2.2 Vpliv transkripcijskega regulatorja ComA na tvorbo biofilmov.....	4
2.2.3 Vpliv transkripcijskega regulatorja DegU na tvorbo biofilma	4
2.3 PROBLEMATIKA BIOFILMOV	5
2.3.1 Živilska industrija	5
2.3.2 Farmacevtska industrija	5
2.3.3 Zdravstvo.....	6
2.4 UPORABNOST BIOFILMOV BAKTERIJE <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.5 PROBLEMATIKA SPOR.....	7
2.5.1 Živilska industrija	7
2.5.2 Farmacevtska industrija	7
2.6 PRAKTIČEN DEL NALOGE	7
3 MATERIALI IN METODE	8
3.1 MATERIALI	8
3.1.1 Bakterijski sevi.....	8
3.1.2 Antibiotik.....	8
3.1.3 Gojišča	8
3.1.4 Raztopine.....	9
3.1.5 Kemikalije, reagenti in encimi.....	10

3.1.6	Aparature	10
3.2	METODE	11
3.2.1	Priprava bakterijske kulture	11
3.2.2	Kultura v mikrotitrski plošči	11
3.2.3	Razbijanje biofilmov z ultrazvokom	12
3.2.4	Priprava redčitev in nacepljanje na plošče za določanje skupnega števila mikroorganizmov	12
3.2.5	Segrevanje redčitev in nacepljanje na plošče za določanje spor	12
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	13
4.1	RASTNA KOMORA	13
4.1.1	Rast bakterijskih celic v biofilmu za določanje deleža sporulacije	13
4.1.2	Sporulacija bakterij v biofilmu v različnih časovnih točkah	13
4.2	FLUORIMETER	14
4.2.1	Spremljanje rasti in izražanja genov bakterijskih sevov v biofilmu	14
4.2.2	Spremljanje rasti bakterijskih sevov v biofilmu	15
4.2.3	Spremljanje izražanja <i>PspoIIQ-yfp</i> bakterijskih sevov v biofilmu	16
5	SKLEPI	17
6	POVZETEK	17
7	VIRI	18

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni bakterijski sevi <i>Bacillus subtilis</i>	8
Preglednica 2: Uporabljeni antibiotik	8
Preglednica 3: Sestavine gojišča MSgg	8
Preglednica 4: Sestavine tekočega gojišča LB	9
Preglednica 5: Sestavine agariziranega gojišča LB	9
Preglednica 6: Sestavine fiziološke raztopine	9
Preglednica 7: Sestavine raztopine tiamin hidroklorida	9
Preglednica 8: Sestavine raztopine mikroelementov	10
Preglednica 9: Optična gostota bakterijskih kultur v mikrotitrski plošči v različnih časovnih točkah v gojišču MSgg pri temperaturi 37 °C	13

KAZALO SLIK

Slika 1: Delež sporulacije bakterijskih sevov v gojišču MSgg pri temperaturi 37 °C po 16-ih in 24-ih urah inkubacije. Prikazana so povprečja in standardni odkloni dveh neodvisnih gojenj bakterijske kulture v dveh ponovitvah.	14
Slika 2: Optična gostota (OD ₆₅₀) pri različnih bakterijskih sevih, ki so rasli v gojišču MSgg pri temperaturi 37 °C. Prikazana so povprečja in standardni odkloni 6 tehničnih ponovitev enega neodvisnega gojenja bakterijskih sevov.	15
Slika 3: Izražanje <i>PspoIIQ-yfp</i> pri različnih bakterijskih sevih, ki so rasli v gojišču MSgg pri temperaturi 37° C. Prikazana so povprečja in standardni odkloni 6 tehničnih ponovitev enega neodvisnega gojenja bakterijskih sevov.	16

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	enote, ki tvorijo kolonije (ang. colony forming units)
EPS	zunajcelični polisaharidi matriksa (ang. exopolysaccharides)
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nm valovne dolžine
w/V	utežno-volumski odstotek
V/V	volumsko-volumski odstotek

1 UVOD

Preučevanje biofilmov je zanimivo zaradi visoke organiziranosti več bakterijskih celic skupaj, ki je posledica komunikacije med njimi z različnimi signali. V biofilmu so celicam dodeljene različne vloge, kar jih uvrsti v subpopulacije, ki so ključne za optimalno delovanje biofilma. Čeprav je njihova prilagoditev in organiziranost fascinantna, nam to pogosto povzroči marsikatero nevšečnost. Prisotni so v raznih bolnišniških okužbah, v živilski industriji, okužujejo tudi vodo v cevovodih (Hall-Stoodley in sod., 2004).

Problem povzročajo tudi spore, ki nastanejo v zrelem biofilmu in tako tvorijo novo subpopulacijo. Poznane so po odpornosti na razna dezinfekcijska sredstva, antibiotike in njihovi zaščiti pred UV sevanjem, visokimi temperaturami in drugimi dejavniki. Navedeno jim omogočita sloj plašča in korteksa, ki hkrati zagotavljata tudi zadostno dehidracijo in dormantnost spore. Slednja ob primernih pogojih vzklije. V živilski industriji je tako pomemben nadzor nad kontaminacijami, v gospodinjstvu moramo biti previdni, da hrano ne ohlajamo predolgo na sobni temperaturi in jedi dovolj segrejemo. Biofilmi in spore so zaradi svoje organizacije in posebnosti deležni študij, kjer preučujejo regulacijske sisteme in odkrivajo nove metode za razbitje biofilmov.

Namen eksperimentalnega dela je bil preveriti zastavljeno hipotezo, izboljšati tehniko aseptičnega dela, naučiti se analize in interpretacije rezultatov in ugotoviti prisotnost spor v biofilmih. V okviru naloge smo si zastavili hipotezo, da bo pri daljšem času inkubacije opazen višji delež sporulacije, saj bodo celice stresu izpostavljene dalj časa. Menimo, da bo v biofilmu več spor po 24-ih urah inkubacije celic v primerjavi z deležem sporulacije po 16-urni inkubaciji. Primerjali smo tudi fluorescenco in optično gostoto sevov PS-216 *amyE::PspoIIQ-yfp* (spec) in PS-216 *ΔcomQ amyE::PspoIIQ-yfp* (spec), ki sta imela gen za rumeni fluorescentni protein vstavljen za promotorjem za gen *spoIIQ*. Ta je namreč aktiven ob sporulaciji, zato nam je intenziteta fluorescence posredno kazala na sporulacijo celic. V označenem divjem tipu seva smo pričakovali večjo intenziteto fluorescence, mutanta ima namreč okvaro v komunikaciji, ki bi lahko negativno vplivala na nastanek spor.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOFILMI

2.1.1 Splošno

Biofilmi so vsesplošno prisotne skupnosti bakterij, ki so med seboj tesno povezane z zunajceličnim matriksom. Organiziranost celic poznamo pri višjih organizmih, a je prisotna tudi v mikrobnih združbah. Celice v biofilmu se namreč diferencirajo v subpopulacije in tako tvorijo neko skupnost. So genetsko enake, a fenotipsko različne, kar je posledica različnega izražanja genov. Njihova diferenciacija je ključna za tvorbo arhitekturno kompleksnih mikrobnih agregatov, strateško delitev dela in minimalno porabo energije ter s tem čim manjšo tvorbo spor (Baty in sod., 2000a,b). Spore so namreč energijsko zelo potratne in tako predstavljajo le manjši del biofilma. V naravi so biofilmi večinoma sestavljeni iz več mikrobnih vrst, ki so v interakciji in tako tekmujejo ali sodelujejo za prostor in hranila. Interakcije potekajo na osnovi komunikacije med celicami. Poznamo medcelično signaliziranje oziroma zaznavanje kvoruma ter mehanizem za njegovo inaktivacijo s pomočjo

naravnih encimov in kemikalij, nekateri v okolico izločajo sekundarne metabolite kot so siderofori in druge protimikrobne snovi (Lopez in sod., 2009b, 2009c).

2.1.2 Preučevanje biofilmov v laboratoriju

Heterogene biofilme, ki so sestavljeni iz več mikrobnih vrst, težje preučujemo, medtem ko homogene biofilme, vzgojene v laboratoriju ali nekatere klinično pomembne biofilme lažje. V laboratoriju namreč lažje spremljamo, kontroliramo in reguliramo njihovo rast in razvoj. Skozi leta preučevanj biofilmov s pomočjo modelnih organizmov so odkrili že marsikaj o njihovih molekularnih strategijah in signalizaciji. Na začetku so se analize izvajale na po Gramu negativni patogeni bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, zadnje čase se veliko preučuje bakterija *Bacillus subtilis* (Vlamakis in sod., 2013), ki smo jo uporabili pri praktičnem delu diplomske naloge.

2.1.3 Bakterija *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je gibljiva nepatogena po Gramu pozitivna bakterija, ki v naravi tvori robustne biofilme, med laboratorijskim gojenjem zaradi udomačitve akumulira različne mutacije, kar vodi v izgubo kompleksne arhitekturne morfologije. Pri raziskovanju se največ uporabljata udomačen bakterijski sev 168 ali neudomačen bakterijski sev NCIB 3610, ki imata sekvenciran genom (Lopez in sod., 2009c). V naravi najdemo bakterijo *Bacillus subtilis* v zemlji in na koreninah v zgornji rizosferi. V laboratoriju se njegove biofilme preučuje s tremi različnimi pristopi gojenja. Uporabimo lahko biofilme v obliki plavajočega biofilma ali pelikla, robustne kolonije na agariziranem gojišču, v primeru udomačenih sevov lahko nastajajo tudi submerzni biofilmi (Branda in sod., 2001; Vlamakis in sod., 2013). Slednji nastanejo v tekočini, medtem ko se tvorijo pelikli na površini tekočine oziroma na interfazi tekočina-zrak.

2.2 NASTANEK BIOFILMA

Tvorba biofilmov se začne z defosforilacijo flagelarnih genov, kar vodi v nastanek dolgih rigidnih verig, in s fosforilacijo pomembnih regulatorjev (Branda in sod., 2006). Navedeni prehod je posledica zunanjih signalov, kot so zmanjšana dostopnost nutrientov, zmanjšana dostopnost kisika ali pritrjanje na površino (Kolodkin-Gal in sod., 2013). Razumeti moramo, da je diferenciacija celic irreverzibilen proces, saj ob spremembi okoljskih pogojev, gibljive in matriks-producirajoče celice spremenijo izražanje genov, v primeru spor te vzklijejo in nadaljujejo z vegetativnim celičnim ciklom (Vlamakis in sod., 2013).

Sistem regulacije je zelo kompleksen, med tri glavne regulatorje spadajo Spo0A, ComA in DegU. V gibljivih populacijah celic, ki še niso tvorile biofilma, so ti regulatorji v nefosforiliranem stanju. Z različnimi signali se celice diferencirajo, količina gibljivih celic se tako drastično zniža. Inaktivacija kateregakoli ključnega regulatorja se kaže v napakah v morfologiji kolonij (Vlamakis in sod., 2008).

2.2.1 Vloga transkripcijskega regulatorja Spo0A pri tvorbi biofilma

Centralni transkripcijski regulator je Spo0A, saj kontrolira izražanje približno 121 genov. V celici sta vedno prisotni fosforilirana in nefosforilirana oblika proteina Spo0A, njuno razmerje vpliva na profil genskega izražanja in je odvisno od aktivnosti fosfataz Rap in Spo0E, ki s svojim delovanjem odcepljata fosfatne skupine (Perego in sod., 1994). Nižja raven Spo0A~P diferencira subfrakcijo celic v proizvajalke matriksa, medtem ko višja raven favorizira sporulacijo (Fujita in sod., 2005). Spore ne nastanejo takoj po tvorbi biofilma, temveč iz matriks-producirajočih celic ob neželjenih zunanjih pogojih. Producentke matriksa najdemo v sredini biofilma, spore na vrhu biofilma, saj to olajša razpršitev spor v zrelem biofilmu (Vlamakis in sod., 2008). Spo0A~ON celice tako zaradi izražanja proteina EpsE niso gibljive, poleg tega so tudi kanibalistke. Celicam škodujejo z izločenimi peptidnimi toksini Skf in Sdp. Same so na njih imune, medtem ko škodujejo svojim občutljivim sorodnikom, v heterogeni skupnosti predvsem drugim bakterijskim vrstam. Toksin tako ubije celice, ki toksina ne producirajo ali nanj niso odporne (Nandy in sod., 2007). Mrtve celice nato služijo kot hrana in s tem omogočijo odlašanje z energijsko potratnim procesom sporulacije (Lopez in sod., 2009a).

Zunajcelični matriks

Zunajcelični matriks je ključno vezivo za zaščito celic pred zunanjimi vplivi. V primeru bakterije *Bacillus subtilis* ta vsebuje zunajcelične polisaharide (EPS), proteine in nukleinske kisline. Znano je, da mutante z okvarjenim operonom eps tvorijo ploske kolonije in zelo občutljive pelikle (Chai in sod., 2012). Zelo preučevan je protein EpsE, ki ima vlogo inhibicije vrtenja bička in s tem prepreči gibljivost večine celic. Nekateri ostanejo gibljivi, saj te poleg izločanja surfaktantov oziroma površinsko aktivnih snovi, omogočajo širjenje biofilma. Gibljive celice zato najdemo na spodnjem delu biofilma (Angelini in sod., 2009). Biofilm je zaščiten tudi na površini, saj tam nastane hidrofozna plast v zadnjih fazah zorenja biofilma (Hobley in sod., 2013).

Sporulacija

Pod stresnimi pogoji je bakterija *Bacillus subtilis* zmožna aktivirati različne preživetvene mehanizme kot so gibljivost, sprejem tuje DNA, tvorba biofilma in seveda sporulacija (Vlamakis in sod., 2013). Namen sporulacije je nastanek dormantnega celičnega tipa imenovanega endospora, ki je zmožna preživetja pri neugodnih okoljskih pogojih (Paredes-Sabja in sod., 2011). Ker je proces sporulacije energijsko potraten, ga celice odlašajo predvsem s kanibalističnim obnašanjem. Ko to ni več mogoče, se v subpopulaciji celic aktivirajo geni *spo0A*. Takrat je proces sporulacije še reverzibilen, ob aktivaciji sigma faktorja σ^F v prespori in σ^E v materinski celici to ni več mogoče (Dworkin in Losick, 2005).

Proces sporulacije se začne z asimetrično delitvijo celice *Bacillus subtilis* v genetsko identični hčerinski celici, ki jima je dodeljena različna morfologija in celična usoda. Ob podvojitvi kromosoma najprej poteče kondenzacija genskega materiala. Nastane aksialni filament, ki se s pomočjo proteina RecA razporedi na oba pola celice. V naslednjih fazah sporulacije sta novo nastali materinska celica in manjša prespora že ločeni s posebno pregrado, imenovano polarni

septum (Schaeffer in sod., 1963; Piggot in Coote, 1976; Ben-Yehuda in sod., 2005). Proces asimetrične delitve in s tem nastanek septuma je posledica aktivacije faktorja σ^F v prespori in faktorja σ^E v obeh celicah. Zanimivo je, da septum asimetrično razporedi aksialni filament med obema celicama, natančneje se na začetku v presporo prenese le tretjina kromosoma (Wu in Errington, 1998; Fiche in sod., 2013). V nadaljevanju sporulacije veliko vlogo pripisujemo faktorju σ^E , ki je odgovoren za uvihanje polarnega septuma in s tem za prosto gibanje prespore v citosolu materinske celice. Proces vključuje delno razgradnjo peptidoglikana. V nadaljevanju je za izražanje ključnih sporulacijskih genov pomembna majhna metabolna aktivnost prespore, kar omogoči kanal, v katerem se dostavljajo majhne molekule iz materinske celice v presporo in jo s tem prehranjujejo (Meisner in sod., 2008; Camp in Losick, 2009). Zrela spora je tako prosta v citosolu, obdajajo jo zunanji proteinski plašč in notranji korteks, ki je narejen iz specializiranega peptidoglikana (Tipper in Linnett, 1976). Njegov peptidoglikan ima drugačno strukturo v primerjavi s celično steno vegetativnih celic, kar omogoči širjenje in krčenje spore kot odziv na okoljske spremembe, poleg tega naj bi vplival tudi na zaželen pojav dehidracije spore (Ou in Marquis, 1970; Meador-Parton in Popham, 2000). Korteks ima tako v povezavi z dehidracijo tudi zaščitno vlogo pred visokimi temperaturami, proteinski plašč zaščiti sporo pred delovanjem encimov. Mineralizacija tudi prispeva k odpornosti pred visokimi temperaturami, pred poškodbami genskega materiala je spora zaščitena z dipikolinsko kislino in z 'v kislini-topnimi' proteini imenovanimi SAS. Oboje zaščiti DNA pred UV sevanjem in vodikovim peroksidom (Imae in Strominger, 1976; Warth, 1978; Setlow in Setlow, 1987; Setlow in Setlow, 1993). Sčasoma spora dozori v delno dehidrirano, dormantno celico, ki se ob lizi materinske celice sprosti v okolje (Tan in Ramamurthi, 2013).

2.2.2 Vpliv transkripcijskega regulatorja ComA na tvorbo biofilmov

Aktivacija transkripcijskega regulatorja ComA je najbolj preučevana in poteče ob vezavi feromona ComX na ComP senzorno kinazo (Magnuson in sod., 1994). ComX je visoko polimorfen signal, ki ga prepoznajo le določeni sevi. Regulacija poteče s sporulacijskim faktorjem CSF, ki deluje specifično na določeno vrsto bakterij in s tem prispeva h komunikaciji med različnimi sevi (Pottathil in sod., 2008). Aktivnost regulatorja ComA vodi v diferenciacijo celic v dva celična tipa; surfaktin producirajoče celice in kompetentne celice. Surfaktin producirajoče celice izražajo parakrinski signal, ki sproži diferenciacijo nekaterih celic v proizvajalke matriksa. Zanimivost parakrinskega signala je, da ga njegove producentke ne morejo prepoznati in se tako nikoli ne diferencirajo v producentke matriksa. Pri zadostni celični gostoti nastanejo kompetentne celice, ki v genom vključijo tujo DNA, s čimer si povečajo genetsko variabilnost (Lopez in sod., 2009b). Lokacija obeh subpopulacij celic še ni znana, saj detekcijo otežuje njihova majhna zastopanost v biofilmu.

2.2.3 Vpliv transkripcijskega regulatorja DegU na tvorbo biofilma

Izražanje gena *degU* vodi v subpopulacijo celic, ki se specializirajo v izločanje zunajceličnih proteaz. Te razgradijo velike biopolimere v manjše, ki so za skupnost celic veliko bolj hranljive. Lahko bi jih opredelili kot rudarje (Veening in sod., 2008). Nekateri viri navajajo, da je aktivacija regulatorja DegU povezana s spremembami v osmolarnosti, drugi da je povezana z vezavo specifičnih peptidnih signalov (Ogura in sod., 2003). Točen razlog še ni

znan, odkrili so sposobnost bakterije *B. subtilis* za inaktivacijo fosforilacije DegU z mehanizmom specifične proteolize (Ogura in Tsukahara, 2010). Zanimivo je, da celice z aktivnim DegU najdemo na površini biofilmov in s tem v stiku z zrakom. DegU~ON celice namreč pozitivno regulirajo izražanje hidrofobnega proteina BslA na površini biofilma (Kobayashi in Iwano, 2012; Hogley in sod., 2013).

2.3 PROBLEMATIKA BIOFILMOV

Biofilmi so zanimiv in zelo organiziran primer prilagoditve v mikrobnem svetu, kar nam velikokrat povzroča nevšečnosti. V naravi in v industrijskem okolju predstavljajo pogost način življenja bakterij, saj v taki strukturi lažje preživijo in se delijo. Skozi študije so spoznali že nekaj snovi, ki vplivajo na razpršitev biofilmov. To so D-amino kisline, poliamin norspermidin in zarazna kislina (Mielich-Süss in Lopez, 2015). V nadaljevanju so predstavljene glavne panoge, kjer opazimo negativni vpliv biofilmov.

2.3.1 Živilska industrija

Produkti živilske industrije velikokrat ne dosežejo pričakovanj kupcev zaradi prisotnosti velikega števila mikroorganizmov, kvara in kontaminacije živil s patogenimi bakterijami. Bakterije pogosto najdemo v skupkih imenovanih biofilmi, ki se jih brez uporabe sterilizacije težko znebimo s površin hrane in proizvodnih naprav. V primeru živil rastlinskega izvora, kot sta špinača in solata, na površini pogosto najdemo heterogene biofilme, saj so ti v primerjavi s homogenimi biofilmi stabilnejši (Mosteller in Bishop, 1993). Problem pri pridelavi zelenjave je tudi velika površina za pritrditev in majhen selektivni pritisk, saj se zelenjavo pred pakiranjem velikokrat le dobro očisti in manj temperaturno obdela. Biofilme najdemo tudi pri proizvodnji raznih mlečnih napitkov. S tvorbo biofilmov v živilski industriji se bakterije namreč zaščitijo pred škodljivimi vplivi, kolonizirajo in izkoriščajo potencialne koristi okolja. Kolonizacija v napravah poteka na raznolikih materialih, najraje na hidrofobnih površini. Zdi se, da je nastanek biofilmov primerljiv z začaranim krogom. Kljub njihovem preprečevanju in odstranjevanju namreč lahko kakšnega izpustimo, ta ob zrelosti razprši vegetativne celice in spore kar vodi v ponovno okužitev celotnega sistema in s tem znižanje kvalitete in varnosti živila (Flint in sod., 1997).

2.3.2 Farmacevtska industrija

Pri cevovodih preprečimo nastanek biofilma z uporabo cevi iz nerjavečega jekla in konstantnim pretokom vode z visoko temperaturo. Če pretoka ni, voda zastaja in s tem pride do kopičenja bakterij. Za uspešno preprečevanje nastanka biofilmov moramo upoštevati smernice dobre proizvodnje prakse, ki vključujejo čiščenje vode, nadzor njene kakovosti, preverjanje poškodb cevi in shranjevanje suhih naprav in materialov. Vлага je ugodno okolje za biofilme in voda je ključna pri proizvodnji zdravil, saj se uporablja kot sestavina cepiv ali za spiranje vial, ampul. Z metodo destilacije in reverzne osmoze se nato vodi odstrani ionske in organske komponente. Pri samem čiščenju moramo biti pazljivi na kopičenje bakterij na aktivno oglje, perforirane izmenjevalce toplote in membranske filtre v procesu reverzne osmoze. Cevi morajo biti vzdrževane, da ne pride do korozij in lažje kolonizacije bakterij. Za

preprečevanje mikrobne kontaminacije vode uporabljajo tudi ozon in UV svetlobo, vendar imata oba prednosti in slabosti. Ozon v vodi ni varen in celo spodbuja rast bakterij, saj cepi velike molekule, ki so tako bakterijam bolj dostopne. Učinkovitost UV svetlobe je omejujoča, saj večina svetlobe prizadane le matriks, medtem ko so gibljive celice pred njo zaščitene. Poleg tega je pomembno, kje se nahaja vir bakterij in vir svetlobe, ki je lahko prižgan ves čas ali le v primeru potrebe po vodi (Jacob, 2012). Odstranjevanje biofilmov otežuje tudi njihova robustna narava, v cevovodih so biofilmi poleg filamentoznih bakterij sestavljeni še iz korozivnih snovi, gline in kremenastih alg. Pogostno identificirani so biofilmi bakterij *Acinetobacter* in *Pseudomonas*, najdemo lahko tudi patogene organizme, kot sta *Legionella pneumophila* in *Helicobacter pylori* (Mahapatra in sod., 2015).

2.3.3 Zdravstvo

V zdravstveni panogi najdemo homogene biofilme na površinah tkiv in medicinskih pripomočkov. Bakterije, ki tvorijo biofilme in posledično prispevajo k nastanku infekcij, so *Candida albicans*, koagulaza-negativni *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus* (Donlan, 2002). Povzročijo nastanek cistične fibroze, vnetje notranjega ušesa, vnetje dlesni, endokarditis in kronični bakterijski prostatitis. Predstavnik biofilmov poznamo, manj znana je njihova povezava z infekcijami. Pomembne lastnosti za njihov nastanek so odlusčenje celic ali agregatov biofilma v krvnem ali urinarnem traktu, izmenjava plazmidov med celicami v biofilmu, manjša dovzetnost za protimikrobna sredstva, proizvodnja endotoksinov s strani po Gramu negativnih bakterij in odpornost biofilmov na imunski sistem gostitelja (Donlan, 2002).

2.4 UPORABNOST BIOFILMOV BAKTERIJE *Bacillus subtilis*

Biofilmi niso vedno nezaželeni, kot primer imamo biofilm bakterije *Bacillus subtilis*, ki čistijo odpadno vodo in imajo potencial za pridobivanje energije iz vodikovega plina in metanola, z oksidacijo goriva na anodi in redukcijo na katodi (Logan, 2009; Mielich-Süss in Lopez, 2015). Pogosta je tudi komercialna uporaba bakterije *Bacillus subtilis* kot biološkega kontrolnega agensa v agronomiji, saj zaščiti rastline pred infekcijami s patogenimi bakterijami, glivami in celo nematodami (Lugtenberg in Kamilova, 2009). Bakterija je normalno prisotna v zemlji, kjer za razmnoževanje pridobiva energijo iz odmrlega organskega materiala in rastlinskih izločkov, ki jih v velikih količinah najdemo v rizosferi. Rizosfera je za bakterijo *Bacillus subtilis* ugodno okolje, saj v njej rastlina izloča snovi, ki spodbujajo nastanek biofilma. V naravi je znan primer izločanja malične kisline s strani s *Pseudomonas syringae* okužene rastline *Arabidopsis thaliana* (Navadni repnjakovec). Prisotnost bakterije *Bacillus subtilis* na koreninah namreč inducira sistemsko rezistenco rastline pred patogeni, poleg tega ima bakterija tudi protimikrobno delovanje proti drugim vrstam (Rudrappa in sod., 2008).

2.5 PROBLEMATIKA SPOR

Omenili smo, da spore predstavljajo eno izmed subpopulacij biofilma, vendar jih najdemo lahko tudi posamezno. Zelo so odporne na zunanje dejavnike, zato se jih težje znebimo. V nadaljevanju sta predstavljeni področji, kjer spore predstavljajo največ težav.

2.5.1 Živilska industrija

Največji problem predstavljajo bakterije vrste *Bacillus* in *Clostridium*. Spore *Bacillus* najpogosteje izolirajo iz riža, testenin, jaje in mleka. V mleku jih najdemo zaradi kontaminacije surovega mleka, ki je posledica zvišanja temperature mleka nad 4 °C ob transportu in neučinkovitosti pasterizacije pri odstranitvi spor. Spore so lahko tudi vir biofilmov, ki se pojavljajo na skladiščnih tankih ali posodah, proizvodnih linijah in na področjih, ki so težje dostopna za čiščenje. Ob zaužitju takšnega živila spore vzkaliijo, vegetativne celice nato izločajo toksin, ki povzroča diarejo. Podoben vpliv imamo pri zaužitju živila s preveliko količino celic in spor *Clostridium perfringens*. Omenja se ga v povezavi z mesnimi izdelki, postreženimi največkrat v restavracijah, kjer hrano predolgo ohlajajo na sobni temperaturi in jo segrevajo do prenizke temperature (Andersson in sod., 1995; Soni in sod., 2016).

2.5.2 Farmacevtska industrija

Farmacevtska industrija je le ena od panog, ki vključujejo delo v laboratoriju. Stalna praksa je sterilizacija pribora v avtoklavu, saj ta pri temperaturi 121 °C uniči vse organizme, tudi spore. Čiščenje z raznimi dezinfekcijskimi sredstvi v primeru eliminacije spor ne pride v poštev, se z njimi uničimo le vegetativne celice. Spore so odporne na kemijsko in fizikalno inaktivacijo, poleg tega so tudi visoko razširjene v okolju. Pri delu v bioreaktorjih preprečimo njihov nastanek s konstantnim mešanjem brozge, dovajanjem hranil in zagotavljanjem ustreznih pogojev. V industrijskem okolju jih lahko najdemo tudi na rešetkah in v jaških. Razmnoževanje v tem primeru nadziramo s stalnim pretokom vode v ceveh, s fizičnimi preprekami, kontrolo temperature in vlažnosti ter nadzorom higiene površin. Vir mikroorganizmov so seveda tudi delavci v proizvodnji, še posebej v primeru transporta naprav in materiala. Delavci morajo skrbeti za svojo higieno in upoštevati pravila dobre proizvodne prakse (Steris, 2017).

2.6 PRAKTIČEN DEL NALOGE

V okviru praktičnega dela naloge smo primerjali proces sporulacije v biofilmu bakterij *Bacillus subtilis* PS-216 in *Bacillus subtilis* PS-216 $\Delta comQ$ v gojišču MSgg. Prvi sev je naravni izolat (divji tip), drugi sev ima okvaro v medceličnem signaliziranju, saj ni sposoben tvorbe aktivnega signala za zaznavanje kvoruma. Vloga ComQ je ključna pri izoprenilaciji feromona, ki ga producira gen *comX*. Feromon je zunajcelična peptidna signalna molekula, ki stimulira spremembe v izražanju genov ob višji gostoti celic, zato je normalno modificiran feromon pomemben za razvoj kompetence (Bacon Schneider in sod., 2002). V ta namen smo pri obeh bakterijskih sevih spremljali delež sporulirajočih celic v biofilmu po 16 in 24 urah

inkubacije ter spremljali rast in izražanje sporulacijskih genov preko poročevalske fuzije *PspoIIQ-yfp* v lokusu *amyE*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Preglednica 1: Uporabljeni bakterijski sevi *Bacillus subtilis*

Oznaka bakterijskega seva in genotip	Referenca
PS-216 wt	Stefanič in Mandić-Mulec (2009)
PS-216 $\Delta comQ$	Špacapan (2015)
PS-216 <i>amyE::PspoIIQ-yfp</i> (Sp)	Špacapan (neobjavljeno)*
PS-216 $\Delta comQ$ <i>amyE::PspoIIQ-yfp</i> (Sp)	Špacapan (neobjavljeno)*

* UL BF, oddelek za za živilstvo, katedra za mikrobiologijo

3.1.2 Antibiotik

Preglednica 2: Uporabljeni antibiotik

Antibiotik	Kratka	Koncentracija antibiotika v založni raztopini	Končna koncentracija antibiotika v kulturi	Topilo	Shranjevanje
Spektinomycin	Sp	50 mg/mL	100 µg/mL	dH ₂ O	-20 °C

3.1.3 Gojišča

Tekoče gojišče MSgg

Gojišče MSgg je minimalni medij, ki se uporablja za gojenje biofilmov (Branda in sod., 2001).

Preglednica 3: Sestavine gojišča MSgg

Sestavina	Količina v 100 mL dH ₂ O
MOPS	2,093 g
K ₃ PO ₄	0,106 g
Triptofan	5 mg
Fenilalanin	5 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,041 g
Na-glutamat	0,5 g
mikroelementi (1000x)	100 µL
Glicerol	0,5 g
vitamin B1(tiamin hidroklorid)	50 µL

Navedeno, z izjemo vitamina B1, smo zatehtali v čašo, prelili s 100 mL destilirane vode in sestavine raztopili s pomočjo magnetnega mešala. Gojišče smo umerili na pH 7 s pH metrom.

Nato smo ga avtoklavirali 30 minut pri temperaturi 110 °C in tlaku 1,1 bara. Ko se je gojišče ohladilo, smo dodali še vitamin B1.

Tekoče gojišče LB

Tekoče gojišče LB se široko uporablja za namnoževanje bakterij. Vsebuje tripton 10 g/L, natrijev klorid 5 g/L in kvasni ekstrakt 5 g/L (Laboratorios Conda, S.A., 2010).

Preglednica 4: Sestavine tekočega gojišča LB

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/100 mL)
LB broth	2

Po raztopitvi sestavin v destilirani vodi, smo gojišče avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Trdno gojišče LB

Preglednica 5: Sestavine agariziranega gojišča LB

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/400 mL)
LB agar	14

Pripravili smo ga v erlenmajericah in ga avtoklavirali 35 minut pri temperaturi 110 °C. Po avtoklaviranju smo predstavili erlenmajerice v vodno kopel s temperaturo 55 °C in počakali, da se gojišče ohladi. Nato smo ga sterilno razlili v petrijevke s premerom 90 mm. Ko se je agar strdil, smo petrijevke hranili pri temperaturi 4 °C in jih tako imeli pripravljene za nadaljno delo.

3.1.4 Raztopine

Fiziološka raztopina

Preglednica 6: Sestavine fiziološke raztopine

Sestavina	Koncentracija v raztopini (g/100 mL)
NaCl	0,9

Pripravljeno 0,9 % (w/V) fiziološko raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Tiamin hidroklorid (vitamin B1)

Preglednica 7: Sestavine raztopine tiamin hidroklorida

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/100 mL)
tiamin hidroklorid - vitamin B1	0,07

Po pripravi smo raztopino sterilno prefiltrirali skozi filter s porami premera 0.2 µm v sterilno stekleničko.

Založna raztopina mikroelementov (1000x)

Preglednica 8: Sestavine raztopine mikroelementov

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/100 mL)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	10,3
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1,3
MnCl ₂	0,8
ZnCl ₂	0,01

Raztopino smo pripravili nesterilno, tako da smo zatehtali mikroelemente v 100 mL destilirane vode.

3.1.5 Kemikalije, reagenti in encimi

MOPS	Carl Roth GmbH+ Co. KG
K ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich, ZDA
L-triptofan	Sigma-Aldrich, ZDA
L-fenilalanin	Merck, Nemčija
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Fluka Analytical, Španija
Na-glutamat	Aldrich Chemistry, Francija
glicerol	Merck, Nemčija
vitamin B1(tiamin hidroklorid)	Fluka Analytical, Španija
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Nemčija
FeCl ₃ x 6H ₂ O	Fluka, Analytical, Španija
MnCl ₂	Merck, Nemčija
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich, Nemčija
LB broth	Laboratorios Conda S.A., Španija
LB agar	Laboratorios Conda S.A., Španija
Spektinomycin	Thermo Fisher, Nemčija
NaCl	Riedel - de Haën, Seelze-Hannover, Danska

3.1.6 Aparature

Avtoklav	Kambič A-21
Laboratorijska tehnica	Vibra
Analitska tehnica	Mettler toledo
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH, Tehnica
Vortex	Vibromix 10, Domel
Spektrofotometer	Iskra Photometer MA9510
Čitalec mikrotitrskih plošč	Thermo Multiskan Spectrum
Fluorimeter	Cytation 3 imaging reader, Biotek
Stresalnik kultur	Vibromix, Tehnica
Ultrazvočni sonikator	Ultrazvočni dezintegrator 150 watt Mk2, MSE
Termoblok	Block heater, Stuart

3.2 METODE

3.2.1 Priprava bakterijske kulture

Pred začetkom dela smo si pripravili ves potreben material, kar vključuje tudi namnožitev sevov z nacepitvijo na trdno gojišče LB. S sterilno plastično cepilno zanko smo eno kolonijo seva prenesli v 5 mL tekočega gojišča LB, ki smo ga odpipetirali v epruveto z zamaškom. V primeru dela s sevoma PS-216 *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp) in PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp) smo dodali tudi spektinomycin. Inkubacija je potekala preko noči na stresalniku pri temperaturi 37 °C in 200 rpm v temi.

3.2.2 Kultura v mikrotitrski plošči

Po inkubaciji smo kulturam izmerili optično gostoto in tiste s primerljivimi vrednostmi prenesli kot 1 % (V/V) inokulum oziroma 20 μ L prekonočne kulture v 1,98 mL svežega tekočega gojišča MSgg in premešali na vibracijskem mešalniku. Suspenzijo smo prenesli po 200 μ L v osem luknjic sterilne mikrotitrskе plošče. V luknjice levo in desno od vzorcev smo odpipetirali sterilno destilirano vodo.

Inkubacija mikrotitrskih plošč v rastni komori

V tem primeru smo uporabili seva PS-216 wt in PS-216 $\Delta comQ$. Po nanosu vzorcev in destilirane vode, smo prozorno mikrotitrsko ploščo pokrili s pokrovom in jo dvakrat oblepili z milipor trakom. Nato smo mikrotitrsko ploščo položili v tesno zaprto plastično posodo in jo inkubirali v rastni komori pri temperaturi 37 °C brez stresanja 16 ali 24 ur.

Inkubacija mikrotitrskih plošč v fluorimetru

Uporabili smo vse štiri seve iz preglednice 1. Po prepipetiranju suspenzije smo sterilno črno mikrotitrsko ploščo s prozornim dnom ravno tako pokrili s pokrovom in dvakrat oblepili z milipor trakom ter jo inkubirali v fluorimetru brez stresanja 60 ur pri temperaturi 37 °C. Vsakih 30 minut je čitalec izmeril optično gostoto pri 650 nm (OD_{650}) in intenziteto fluorescence v vsaki luknjici. Intenziteto rumene fluorescence smo izmerili pri ekscitaciji 500 nm in emisiji 530 nm s stopnjo ojačanja 80. Dobljeni rezultat nam je kazal na izražanje gena za rumeni fluorescenčni protein (*yfp*) in s tem posledično promotorja gena *spolIQ* pri označenih sevih *Bacillus subtilis*. Po končanem merjenju je sledila obdelava podatkov. Izračunali smo povprečje in standardni odklon optične gostote za vse štiri seve in gojišče MSgg, pri čemer smo upoštevali vse vrednosti z izjemo vrednosti v vrsticah A in H (luknjice ob strani mikrotitrskе plošče), saj je tam prišlo do večjega izhlapevanja suspenzije. Povprečju optične gostote seva smo nato odšteli povprečje optične gostote gojišča MSgg. Posledično smo dobili tudi nov standardni odklon za razliko povprečij optičnih gostot. Vrednosti smo predstavili na Sliki 2. Po enakem postopku smo izračunali vrednosti intenzitete fluorescence, ki smo jih predstavili na Sliki 3. V nadaljevanju se metode nanašajo na seve inkubirane v rastni komori.

3.2.3 Razbijanje biofilmov z ultrazvokom

Po inkubaciji v rastni komori smo celicam v luknjicah mikrotitrne plošče najprej izmerili optično gostoto pri 650 nm. Za oba seva smo izbrali dva reprezentativna vzorca. Najprej smo iz luknjice z nastavkom za pipeto ročno pobrali biofilm na površini, ki smo ga prenesli v dvomililitrsko mikrocentrifugirko, nato smo vanjo odpipetirali še celotno vsebino luknjice (200 μ L). Luknjico smo nato sprali z 200 μ L fiziološke raztopine in vsebino prenesli v isto mikrocentrifugirko kot v prejšnjem koraku, nato smo suspenziji dodali še 600 μ L fiziološke raztopine. Suspenzijo smo premešali na vibracijskem mešalniku, sledilo je razbijanje skupkov z ultrazvočnim sonikatorjem. Sonikacija vzorca je potekala trikrat po 10 sekund pri amplitudi ultrazvoka 15 μ m, med ponovitvami je bila 20 sekundna prekinitev. Pred soniciranjem drugega vzorca smo sondo v sonikatorju očistili najprej z vodo, nato razkužili z etanolom. Mikrocentrifugirko smo imeli v času soniciranja v čaši z ledom in s tem preprečili preveliko segrevanje suspenzije celic. Za nadaljne postopke smo namreč potrebovali žive celice.

3.2.4 Priprava redčitev in nacepljanje na plošče za določanje skupnega števila mikroorganizmov

Po končanem razbijanju skupkov smo v mikrocentrifugirko dodali 1 mL fiziološke raztopine in 2 mL suspenzijo premešali na vibracijskem mešalniku. Tako smo dobili redčitev 10^{-1} . Za vsak vzorec smo nato pripravili 7 mikrocentrifugirk z 900 μ L fiziološke raztopine in jih označili z imenom vzorca in redčitev, ki smo jih v njej naredili. V zadnji mikrocentrifugirki je bila tako redčitev 10^{-8} . Sledila je izvedba redčitvene vrste s prenosom 100 μ L suspenzije v novo mikrocentrifugirko z 900 μ L fiziološke raztopine v vsakem koraku in vse do končne redčitve. Med redčitveno vrsto in pred nacepljanjem smo redčitve dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo nacepili 100 μ L suspenzije redčitev 10^{-4} do 10^{-8} s steklenimi kroglicami na trdno gojišče LB. Plošče smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 24 ur.

3.2.5 Segrevanje redčitev in nacepljanje na plošče za določanje spor

Mikrocentrifugirke z redčitvami 10^{-4} do 10^{-8} vseh štirih vzorcev smo segrevali v termobloku pri temperaturi 80 °C 30 minut. Pred nacepljanjem smo jih dobro premešali na vibracijskem mešalniku in nato 100 μ L s steklenimi kroglicami nacepili na trdna gojišča LB, po enakem postopku kot smo nacepili neseGRETE vzorce. Sledila je inkubacija pri temperaturi 37 °C 24 ur.

3.2.6 Računanje kolonijskega števila

Število preštetiH kolonij smo nato uporabili pri računanju kolonijskega števila, za primerjavo vrednosti pred in po segrevanju suspenzije smo izračunali delež sporulacije. To je zelo pomembna informacija, saj nam pove kolikšen delež celic je v času inkubacije sporuliralo v primerjavi z vsemi celicami. Predstavi nam velikost subfrakcije, ki je bila regulirana v proces sporulacije. Pri daljši inkubaciji tako sklepamo, da je zaradi daljšega stresnega obdobja, kot je velika gostota celic v gojišču MSgg, sporuliralo več celic.

Enačba za določanje kolonijskega števila:

$$\text{CFU [/mL]} = \text{št. kolonij} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL}} \times \frac{1}{10^{-x}} \quad \dots (1)$$

Opomba: Vrednost x pomeni redčitev pri kateri smo prešteli število kolonij.

Enačba za računanje deleža sporulacije:

$$\text{delež sporulacije [/]} = \frac{\text{CFU}_{\text{po segr.}}}{\text{CFU}_{\text{pred segr.}}} \quad \dots (2)$$

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1. RASTNA KOMORA

4.1.1 Rast bakterijskih celic v biofilmu za določanje deleža sporulacije

Merili smo optično gostoto bakterijskih kultur v mikrotitrski plošči po inkubaciji v rastni komori. Pri merjenju vzorcev v mikrotitrski plošči smo za vsak sev izbrali dva reprezentativna vzorca s podobno optično gostoto in jima odšteli povprečje optične gostote gojišča MSgg. V preglednici 9 so podane povprečne vrednosti optične gostote kultur v mikrotitrski plošči, ki smo jih uporabili za določanje deleža sporulacije. Vidimo, da je sev PS-216 $\Delta comQ$ boljše in hitreje rasel kot sev PS-216 wt.

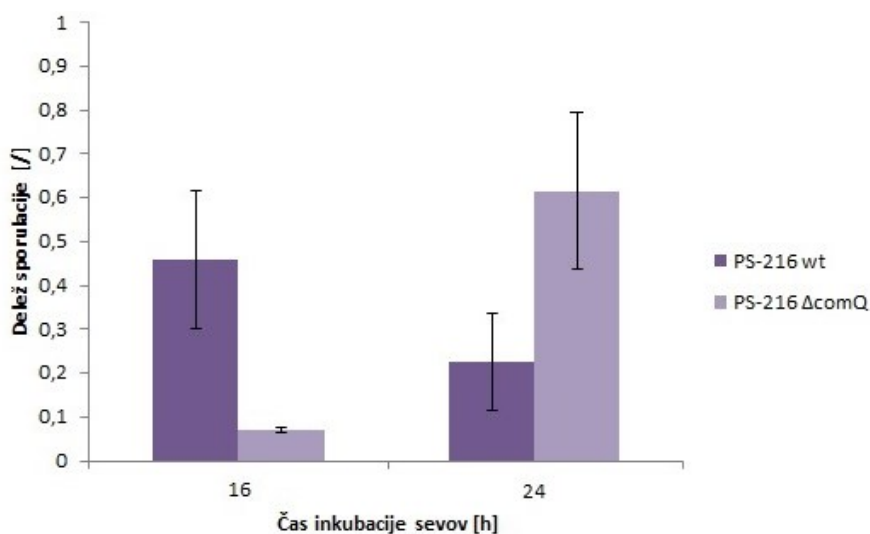
Preglednica 9: Optična gostota bakterijskih kultur v mikrotitrski plošči v različnih časovnih točkah v gojišču MSgg pri temperaturi 37 °C

Čas	PS-216 wt		PS-216 $\Delta comQ$	
	Povprečje	Standardni odklon	Povprečje	Standardni odklon
16 ur	0,54	0,05	0,99	0,04
24 ur	0,93	0,06	1,14	0,05

Prikazana so povprečja in standardni odkloni uporabljenih štirih vzorcev pri istem času inkubacije.

4.1.2 Sporulacija bakterij v biofilmu v različnih časovnih točkah

Pri štetju kolonij smo upoštevali, da so plošče števnice, ko imajo med 30 in 300 kolonij. Znano je, da celice na trdnem gojišču LB ne tvorijo zunajceličnega matriksa (Dervaux in sod., 2014), kar pomeni, da se ne povezujejo z vezivom, poleg tega smo pred redčenjem skupke razbili s soniciranjem.



Slika 1: Delež sporulacije bakterijskih sevov v gojišču MSgg pri temperaturi 37 °C po 16-ih in 24-ih urah inkubacije. Prikazana so povprečja in standardni odkloni dveh neodvisnih gojenj bakterijske kulture v dveh ponovitvah.

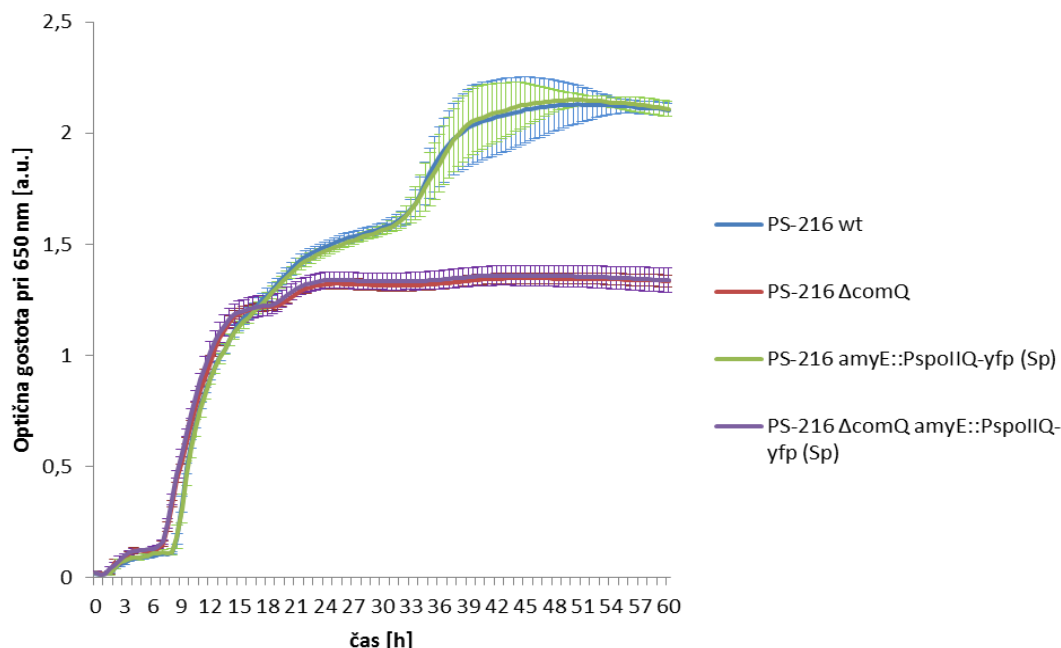
Naša hipoteza je bila, da bomo po 24-urni inkubaciji celic v mikrotitrski plošči, v primerjavi z 16-urno inkubacijo, opazili večji delež sporulacije, ki bi se med sevoma razlikoval. Pričakovali smo, da bo sev PS-216 $\Delta comQ$ sporuliral, saj ima organizem v času inkubacije možnosti prilagoditve na stresne dejavnike. Pri sevu PS-216 $\Delta comQ$ opazimo signifikantno povečanje deleža sporulacije po 24-urni inkubaciji, medtem ko je prišlo pri sevu PS-216 wt do zmanjšanja deleža sporulacije v povprečju, vendar ne signifikantno. Standardni odkloni nakazujejo veliko razpršenost podatkov od povprečja z izjemo pri sevu PS-216 $\Delta comQ$ po 16-urni inkubaciji. Minimalno vrednost standardnega odklona 0,07 opazimo po 16-urni inkubaciji seva PS-216 $\Delta comQ$, maksimalno vrednost 0,22 pri istem sevu po 24-urni inkubaciji. Kljub upoštevanju standardnega odklona mutante *comQ*, je njen delež sporulacije po 24-urni inkubaciji višji od deleža sporulacije seva PS-216 wt. Iz preglednice 9 tudi vidimo, da se je optična gostota pri sevu PS-216 wt bistveno povečala med 16-imi in 24-imi urami inkubacije, medtem ko pri mutanti *comQ* ni bilo velikih razlik v rasti v istem obdobju. Mutanta *comQ* je v 16-urah rasla hitreje kot divji tip. Tako je prišlo hitreje do višje koncentracije celic in posledično do hitrejšega nastanka biofilma in sporulacije pri mutanti *comQ*, čeprav je ta okvarjena v komunikaciji. Nižja sporulacija seva PS-216 wt po 24-urni inkubaciji nakazuje na počasnejšo rast celic in boljše obvladovanje stresa.

4.2. FLUORIMETER

4.2.1 Spremljanje rasti in izražanja genov bakterijskih sevov v biofilmu

Naredili smo tri ponovitve poskusa, ki so kazale podobne rezultate in predstavili najbolj reprezentativno. Pri analizi rezultatov nismo uporabili vrednosti v vrsticah A in H (luknjice ob strani mikrotitrne ploščice), saj je tam prišlo do največjega izhlapevanja in posledično do večje napake pri merjenju. Izračunali smo povprečje in standardni odklon za vsako luknjico ob določenem času. Iz navedenih rezultatov smo odšteli podatke dobljene za gojišče MSgg in s tem izničili vpliv gojišča na optično gostoto in intenziteto fluorescence.

4.2.2 Spremljanje rasti bakterijskih sevov v biofilmu

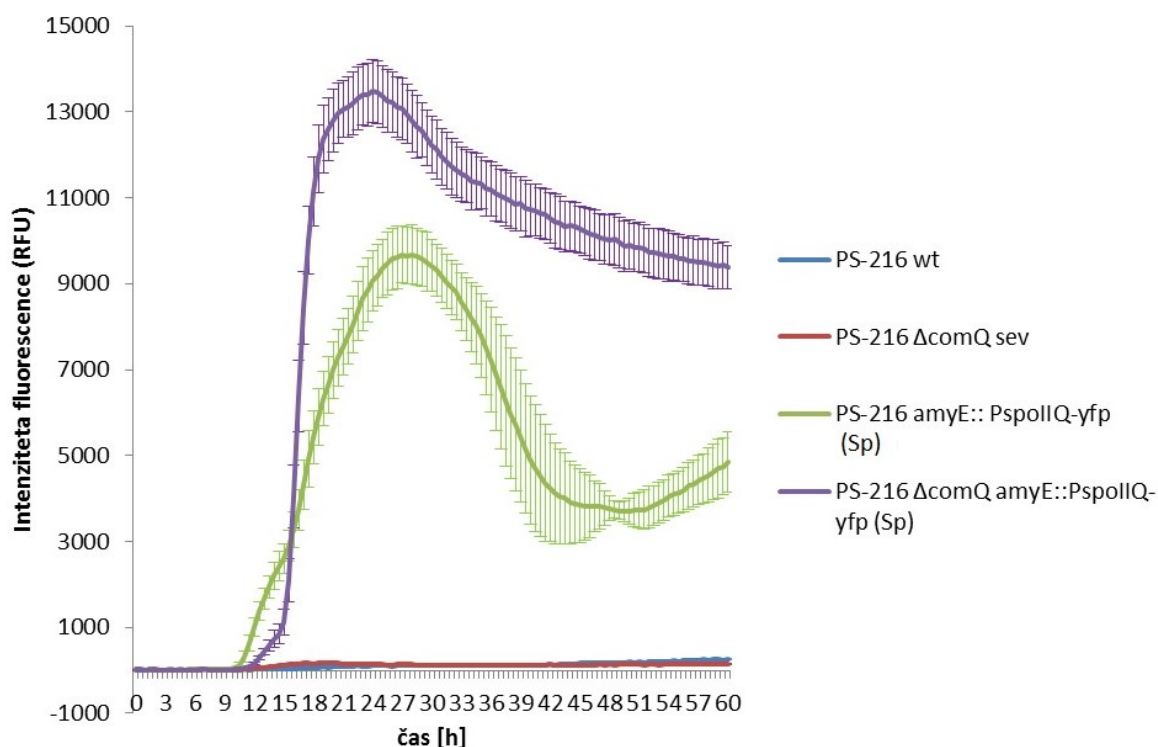


Slika 2: Optična gostota (OD_{650}) pri različnih bakterijskih sevih, ki so rasli v gojišču MSgg pri temperaturi 37 °C. Prikazana so povprečja in standardni odkloni 6 tehničnih ponovitev enega neodvisnega gojenja bakterijskih sevov.

Iz slike 2 je razvidno, da se optična gostota seva PS-216 wt in seva PS-216 *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp) signifikantno razlikuje v primerjavi z označenim in neoznačenim sevom PS-216 $\Delta comQ$, medtem ko v obeh primerih označen in neoznačen sev raste podobno. Poleg tega vsi štirje sevi podobno rastejo prvih 17 ur inkubacije, ko dosežejo enako vrednost, nato se optična gostota označenega in neoznačenega seva PS-216 $\Delta comQ$ ustaljuje pri OD_{650} približno 1,3. Ta seva imata okvarjen gen, ki je odgovoren za signalizacijo ob višji gostoti celic. ComQ ima namreč vlogo izoprenilacije feromona, ki ga producira gen *comX*. Feromon je zunajcelična peptidna signalna molekula, ki stimulira spremembe v izražanju genov ob visoki gostoti celic, kar v nadaljevanju vodi v sintezo zunajceličnega matriksa in posledično v tvorbo biofilma. Višja gostota celic deluje kot stresni dejavnik, pred katerim se seva PS-216 $\Delta comQ$ in PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp) težje zavarujeta. Nekatere celice preživijo, druge stresu podležejo, kar je vidno v rahlo padajoči krivulji ob koncu merjenja in bi lahko kazalo na lizo bakterijskih celic.

Optična gostota obeh divjih tipov je naraščala do 32-ih ur inkubacije oziroma do vrednosti OD_{650} 1,6. Takrat je v celicah prišlo do velikih sprememb, saj so se prilagodile na stres in eksponentno povišale OD_{650} do vrednosti 2,1 po 51-ih urah inkubacije. Razlog v povečanih vrednostih po 32-ih urah inkubacije je poleg velike delitve celic tudi diferenciacija celic v producentke matriksa, ki je prispeval k tvorbi pelikla in s tem tudi vplival na povečanje optične gostote. Pri primerjavi standardnih odklonov vidimo, da imamo večja odstopanja od povprečja pri sevih PS-216 wt in PS-216 *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp), kar tudi nakazuje na večjo heterogenost in diferenciacijo celic pri divjem tipu v primerjavi z mutanto *comQ*.

4.2.3 Spremljanje izražanja *PspoIIQ-yfp* bakterijskih sevov v biofilmu



Slika 3: Izražanje *PspoIIQ-yfp* pri različnih bakterijskih sevih, ki so rasli v gojišču MSgg pri temperaturi 37° C. Prikazana so povprečja in standardni odkloni 6 tehničnih ponovitev enega neodvisnega gojenja bakterijskih sevov.

Po pričakovanjih sta fluorescirala le seva PS-216 *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp) in PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp), saj sta imela edina vključena gen za rumeni fluorescenčni protein. Opazna je zelo majhna fluorescenca preostalih dveh sevov, ki je posledica avtofluorescence celic. Opazne so tudi minimalne negativne vrednosti, ki so posledica višje povprečne intenzitete fluorescence gojišča MSgg v primerjavi z meritvami za neoznačen sev. Sev PS-216 *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp) je začel fluorescirati po 10-ih urah inkubacije, intenziteta fluorescence je eksponentno naraščala do maksimalne vrednosti 9600 po 27-ih urah inkubacije. Kasneje je prišlo do hitrega padca intenzitete fluorescence. Pri označenem divjem tipu smo pričakovali višjo intenziteto fluorescence v primerjavi s sevom PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp), saj pri njih signalizacija pravilno deluje in tako pričakujemo večji delež spor v biofilmu. Promotor gena *spoIIQ* je namreč udeležen v II. fazi procesa sporulacije in tako direktno odraža nastanek spor, saj je aktiven v prespori. Sev PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp) ima okvarjeno signalizacijo, kar bi lahko vodilo v nastanek manjšega števila spor. Na sliki 3 smo opazili močno eksponentno naraščanje intenzitete fluorescence do maksimuma 13500, nato padanje intenzitete fluorescence. Rezultata, ki nakazuje višjo intenziteto fluorescence pri označenem okvarjenem sevu, nismo pričakovali. Prav tako se je maksimalna intenziteta fluorescence pri mutanti *comQ* pojavila prej kot pri divjem tipu. Pri mutanti *comQ* se je pojavila po 24-ih urah, medtem ko pri divjem tipu po 27-ih urah.

Rezultati so skladni z deležem sporulacije na sliki 1, kjer smo določili višji delež sporulacije seva PS-216 $\Delta comQ$ po 24-urni inkubaciji v primerjavi z divjim tipom. Po 24-urni inkubaciji mutante *comQ* je opazno kar 8-kratno povišanje deleža sporulacije v primerjavi z vrednostjo

po 16-urni inkubaciji, medtem ko pri divjem tipu opazimo 1,5-kratno znižanje deleža sporulacije. Glede na predstavljeno intenziteto fluorescence na sliki 3 bi predvidevali, da se bo vrednost deleža sporulacije pri sevu PS-216 *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp) po 24-ih urah inkubacije povišala za 2,6-kratnik v primerjavi z intenziteto fluorescence po 16-urni inkubaciji. Pri označeni mutanti *comQ* bi se zvišal 2,7-kratno. Vrednosti sta si podobni, sama intenziteta fluorescence izmerjena po 16-urah se med njima razlikuje za 1500, kar nakazuje na hitrejšo rast seva PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspoIIQ-yfp* (Sp), začetna optična gostota pri nanosu v mikrotitsko ploščo je bila namreč podobna. Označen divji sev je imel vrednost optične gostote 1,19, označena mutanta 1,14. Vrednosti deleža sporulacije po 16-urah inkubacije nakazujejo začetno nastajanje spor, po 24-urah inkubacije dobimo maksimalno vrednost sporulacije.

5 SKLEPI

Pri dobljenih rezultatih nas je presenetila visoka intenziteta fluorescence gena *yfp* in visok delež sporulacije pri okvarjenem sevu. Okvara v genu *comQ* povzroči napako v komunikaciji med celicami in s tem slabšo zaščito pred stresnimi dejavniki. Visoka gostota celic vpliva na višjo sporulacijo, ki je bila bolj izražena pri mutanti. Razlog je v njeni hitrejši rasti celic, kar je vodilo v zgodnejši nastanek biofilma in sporulacijo pred divjim tipom.

Iz rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Opazna je hitrejša rast celic seva PS-216 $\Delta comQ$ v primerjavi z divjim tipom.
- Delež sporulacije je pri sevu PS- 216 wt padal s časom inkubacije, medtem ko je pri sevu PS- 216 $\Delta comQ$ naraščal.
- Mutanta $\Delta comQ$ je dosegla večji delež sporulacije in večje izražanje sporulacijskih genov v biofilmu kot divji tip.

Verjamem, da je eksperimentalno delo poglobilo moje razumevanje biofilmov in v prihodnje upam, da bodo znanstveniki s preučevanjem biofilmov do potankosti spoznali njihovo organizacijo in s tem omogočili učinkovito razbitje nezaželenih biofilmov v industrijskem okolju.

6 POVZETEK

Biofilmi so visoko organizirana skupnost bakterij, ki so zaradi različnega izražanja genov genetsko enake, a fenotipsko različne. Zaradi razlik med celicami, jih razdelimo v subpopulacije. Vsaka subpopulacija ima ključno vlogo pri nastanku in preživetju biofilma. Njihova robustnost jim daje sposobnost dolgega preživetja in visoke odpornosti pred fizikalno-kemijskimi dejavniki. Biofilmi in njihove spore predstavljajo nevšečnosti v različnih industrijah in bolnišniških okužbah. V koristne namene se biofilme uporablja za čiščenje odpadne vode in kot biološki kontrolni agens. Za namen razpršitve nezaželenih biofilmov poskušajo najti različne snovi, ki vplivajo na spremembo njihove organizacije. Trenutno so obetavne D-amino kisline, poliamin norspermidin in zaragozna kislina. Ključno pri njihovem delovanju je, da ne izvajajo selektivnega pritiska, ki bi vodil v mutacijo sevov.

Pri eksperimentalnem delu smo preučevali biofilme bakterije *Bacillus subtilis* v obliki pelikla, ki je plaval na površini gojišča MSgg. To gojišče se pogosto uporablja za študije biofilmov, saj spodbuja njihov nastanek. Eksperiment smo ločili na dva dela, prvi se je navezoval na določanje deleža sporulacije za seva PS-216 wt in PS-216 $\Delta comQ$, pri drugem delu smo preučevali rast in izražanje sporulacijskih genov za seva PS-216 *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp) in PS-216 $\Delta comQ$ *amyE::PspolIQ-yfp* (Sp). Sprememba sevov v genu *comQ* vpliva na nezmožnost delovanja quorum-sensing sistema, saj feromon ni pravilno izopreniliran in tako ne more ustrezno inducirati sprememb v izražanju genov ob zaznavi povišane gostote celic, kar spada pod stresne dejavnike. Pri deležu sporulacije po 16 in 24-urni inkubaciji celic smo pričakovali, da bo tako za seva PS-216 wt in PS-216 $\Delta comQ$ opazen višji delež sporulacije ob daljšem času inkubacije. Rezultati so nam nakazali kar 8-kratno povišanje deleža sporulacije pri sevu PS-216 $\Delta comQ$ in 1,5-kratno znižanje deleža sporulacije pri sevu PS-216 wt. Dobljene vrednosti nakazujejo na hitrejšo rast celic mutante in s tem hitrejši nastanek biofilma ter spor. Pri analizi rezultatov optičnega čitalca smo opazili višjo optično gostoto pri označenem divjem tipu, a manjšo intenziteto fluorescenco in s tem nižji delež sporulacije v primerjavi z označeno mutanto *comQ*. Višja optična gostota nakazuje na večjo prilagoditev na stresne dejavnike, nižja intenziteta fluorescence na manj aktiven sporulacijski gen *spolIQ*, kar pri pravilno delujočem sevu nismo pričakovali.

7 VIRI

- Andersson A., Ronner U., Granum P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology, 28, 2:145-155
- Angelini T. E., Roper M., Kolter R., Weitz D. A., Brenner M. P. 2009. *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 18109–18113
- Bacon Schneider K., Palmer T. M., Grossman A. D. 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 184: 410–419
- Baty A. M., 3rd, Eastburn C. C., Techkarnjanaruk S., Goodman A. E., Geesey G. G. 2000a. Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3574–3585
- Baty A. M., 3rd, Eastburn C. C., Diwu Z., Techkarnjanaruk S., Goodman A. E., Geesey G. G. 2000b. Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of a marine bacterium during chitin degradation. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3566–3573
- Ben-Yehuda S., Fujita M., Liu X. S., Gorbatyuk B., Skoko D., Yan J. in sod. 2005. Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. Molecular Cell, 17: 773–782

- Branda S. S., Gonzalez-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: 11621–11626
- 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: 1229–1238
- Camp A. H., Losick R. 2009. A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. Genes and Development, 23: 1014–1024
- Chai Y., Beauregard P. B., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2012. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. mBio, 3: e00184–e00112
- Dervaux J., Magniez J. C., Libchaber A. 2014. On growth and form of *Bacillus subtilis* biofilms. Interface Focus, 4, 6: 20130051
- Donlan M. R. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases Journal, 8, 9: 881–890
- Dworkin J., Losick R. 2005. Developmental commitment in a bacterium. Cell, 121: 401–409
- Fiche J. B., Cattoni D. I., Diekmann N., Langerak J. M., Clerte C., Royer C. A. in sod. 2013. Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy. PLoS Biology, 11: e1001557, doi.org/10.1371/journal.pbio.1001557: 20 str.
- Flint S. H., Bremer P. J., Brooks J. D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control. Biofouling, 11: 81–97
- Fujita M., Gonzalez-Pastor J. E., Losick R. 2005. High and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 187: 1357–1368
- Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology, 2: 95–108
- Hobley L., Ostrowski A., Rao F. V., Bromley K. M., Porter M., Prescott A. R. in sod. 2013. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110: 13600–13605
- Imae Y., Strominger J. L. 1976. Cortex content of asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 126: 914–918
- Jacob D. 2012. Biofilms and their associated risks to pharmaceutical industry (Production Equipment's & Pharmaceutical Water Systems). Pharma treasures. <https://pharmatreasures.blogspot.si/2012/01/biofilms-their-associated-risks-to.html> (13. avg. 2017)

- Kobayashi K., Iwano M. 2012. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Molecular Microbiology*, 85: 51–66
- Kolodkin-Gal I., Elsholz A. K., Muth C., Girguis P. R., Kolter R., Losick R. 2013. Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes and Development*, 27: 887–899
- Laboratorios Conda, S. A. 2010. LB broth (Lennox), Španija, <http://www.condalab.com/products/molecular-biology/condaproduct/molecular-biology/dehydrated-culture-media-for-molecular-biology//show/Categoria/1231/> (31. jul. 2017)
- Logan E. B. 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 375–381
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009a. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 74: 609–618
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009b. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes and Development*, 23: 1631–1638
- Lopez D., Fischbach M. A., Chu F., Losick R., Kolter R. 2009c. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 280–285
- Lugtenberg B., Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541–556
- Magnuson R., Solomon J., Grossman A. D. 1994 Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell*, 77: 207–216
- Mahapatra A., Padhi N., Mahapatra D., Bhatt M., Sahoo D., Jena S., Dash D., Chayani N. 2015. Study of Biofilm in Bacteria from Water Pipelines. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 3: DC09–DC11
- Meador-Parton J., Popham D. L. 2000. Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. *Journal of Bacteriology*, 182: 4491–4499
- Meisner J., Wang X., Serrano M., Henriques A. O., Moran C. P., Jr. 2008. A channel connecting the mother cell and forespore during bacterial endospore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 15100–15105
- Mielich-Süss B., Lopez D. 2015. Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 17, 3: 555–565

- Mosteller T. M., Bishop J. R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection*, 56: 34–41
- Nandy S. K., Bapat P. M., Venkatesh K. V. 2007. Sporulating bacteria prefers predation to cannibalism in mixed cultures. *FEBS Letters*, 581: 151–156
- Ogura M., Shimane K., Asai K., Ogasawara N., Tanaka T. 2003. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49: 1685–1697
- Ogura M., Tsukahara K. 2010. Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. *Molecular Microbiology*, 75: 1244–1259
- Ou L. T., Marquis R. E. 1970. Electromechanical interactions in cell walls of gram-positive cocci. *Journal of Bacteriology*, 101: 92–101
- Paredes-Sabja D., Setlow P., Sarker M. R. 2011. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*, 19: 85–94
- Perego M., Hanstein C., Welsh K. M., Djavakhishvili T., Glaser P., Hoch J. A. 1994. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell*, 79: 1047–1055
- Piggot P. J., Coote J. G. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological Reviews*, 40: 908–962
- Pottathil M., Jung A., Lazazzera B. A. 2008. CSF, a species-specific extracellular signaling peptide for communication among strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology*, 190: 4095–4099
- Rudrappa T., Czymmek K. J., Pare P. W., Bais H. P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148: 1547–1556
- Schaeffer P., Ionesco H., Ryter A., Balassa G. 1963. La sporulation de *Bacillus subtilis*: etude gendtique et physiologique. In: *Mechanismes de regulation des activites cellulaires chez les microorganismes*. Paris, France: Centre National de la Recherche Scientifique, pp. 553–563
- Setlow B., Setlow P. 1987. Thymine-containing dimers as well as spore photoproducts are found in ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores that lack small acid-soluble proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 421–423
- Setlow B., Setlow P. 1993. Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3418–3423

- Soni A., Oey I., Silcock P., Bremer P. 2016. *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 6: 1139–1148
- Stefanič P., Mandic-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* pherotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756–1764
- Steris. 2017. Spore control in pharmaceutical and biotech manufacturing environments:1.str. <http://www.sterislifesciences.com/Education-and-Training/Technical-Bulletin-Library/Spore-Control-in-Pharmaceutical-and-Biotech-Manufacturing-Environments.aspx> (7. avg. 2017)
- Špacapan M. 2015. Povezava med celično gostoto, koncentracijo signalnega peptida in odzivom na signal pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Magistrsko delo. Ljubljana, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 55 str.
- Tan I. S., Ramamurthi K. S. 2013. Minireview, Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, 6: 212–225
- Tipper D. J., Linnett P. E. 1976. Distribution of peptidoglycan synthetase activities between sporangia and forespores in sporulating cells of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Bacteriology*, 126: 213–221
- Veening J. W., Igoshin O. A., Eijlander R. T., Nijland R., Hamoen L. W., Kuipers O. P. 2008. Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Molecular Systems Biology*, 4: 15 str.
- Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes and Development*, 22: 945–953
- Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature reviews Microbiology*, 11: 157-166
- Warth A. D. 1978. Molecular structure of the bacterial spore. *Advances in Microbial Physiology*, 17: 1–45
- Wu L. J., Errington J. 1998. Use of asymmetric cell division and *spoIIIE* mutants to probe chromosome orientation and organization in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 27: 777–786