

## Povzetek

V disertaciji smo se osredotočili na strukturne in dinamične raziskave vodnih raztopin komponent zunajceličnega polimernega matriksa (EPS-matriksa) po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* sev NCIB 3610. Ta bakterija na gojišču s saharozo tvori polisaharid levan in je pogosto izbrana kot modelni sistem za proučevanje biofilmov. Izziv tega doktorskega dela je bil mikrobiološko-fizikalno-kemijski, saj je bilo potrebno najprej vzgojiti zadostno količino raziskovanega biofilma, nato iz njega izolirati EPS-matriks in očistiti zadostno količino posameznih komponent (levan, nukleinske kisline) ter na njihovih vodnih raztopinah in mešanica izvesti dinamične reološke meritve, meritve statičnega (SLS) in dinamičnega sipanja laserske svetlobe (DLS) ter meritve ozkokotnega rentgenskega sipanja (SAXS). Podatke SAXS smo nato še analizirali z ustreznim fizikalno-kemijskim modelom; uporabili smo klasični Ornstein-Zernike model za polimerne raztopine z dodatnim Debye-Bueche členom, preizkusili pa smo tudi model biserne verižice (angl. »string-of-beads model«).

V prvem delu raziskave smo raziskali strukturne in dinamične lastnosti vodnih raztopin večinske komponente EPS-matriksa (~90 %), polisaharida levana. Rezultate, dobljene za levan *B. subtilis*, smo primerjali z rezultati, dobljenimi za komercialno dostopna levana po Gramu negativnih bakterij *Zymomonas mobilis* in *Erwinia herbicola*. Poznano je namreč, da se levani različnih bakterij razlikujejo tako po stopnji polimerizacije kot tudi po razvejanosti. Iz rezultatov reoloških meritev smo ugotovili, da imajo vodne raztopine levana pri nizkih koncentracijah viskoznost neodvisno od strižne hitrosti, hkrati pa kažejo tudi znatno elastičnost. Elastičen značaj teh vzorcev levana smo potrdili tudi z rezultati DLS, ki so pokazali, da se v teh sistemih tudi na mikro nivoju odvija določen relaksacijski proces, ki ni difuzijske narave. Izmerjeni relaksacijski časi dinamičnega odziva vzorcev so se sicer spreminjali v skladu z viskoznostjo teh vzorcev. Vse to nakazuje na močne intramolekularne interakcije med molekulami levana že pri vzorcih z nizkimi koncentracijami levana. Te interakcije se odražajo tudi v prisotnosti velikih delcev levana, ki smo jih v teh vzorcih opazili s svetlobnim mikroskopom. S tehniko SLS in s svetlobno mikroskopijo smo pokazali, da velikost delcev levana v vzorcih narašča v zaporedju *Bacillus subtilis* < *Zymomonas mobilis* < *Erwinia herbicola*. Raziskali smo tudi stopnjo razvejanosti in hidratacijo vzorcev levana vseh treh bakterij, vendar pa znantnih sprememb nismo opazili. Pri višjih koncentracijah je bil nekoliko bolj hidratiran levan iz bakterije *B. subtilis*, ki je tudi najbolj topen. Reološke in druge rezultate smo dopolnili še s strukturnimi podatki na nano nivoju o korelacijskih

dolžinah polimernih molekul, ki smo jih dobili s pomočjo tehnike SAXS. Ta raziskava je tako pokazala, da imajo raztopine levana izredno nizko viskoznost in ne tvorijo gelov. To je na prvi pogled presenetljivo, saj se levan pojavlja kot večinska komponenta biofilma, ki pa je kompakten gel. Iz tega sklepamo, da imajo manjšinske primesi biofilma (nukleinske kisline in proteini) pomembno vlogo pri tvorbi gela.

V drugem delu raziskave smo levanu *B. subtilis*, ki je bil raztopljen v elektrolitskem mediju gojišča SYM, dodajali manjšinske komponente EPS-matriksa (DNK in modelni protein). Zmesi polimerov smo pripravili v takšnem razmerju, kot jih najdemo v biofilmu bakterije *B. subtilis*. Rezultati reoloških meritev so pokazali, da prisotnost DNK v raztopinah levana močno poveča viskoznost in elastično naravo vzorcev, prisotnost proteina v raztopinah levana pa jim močno poveča viskoznost in togost. V obeh primerih se močno spremeni oblika reološke krivulje (viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti). To kaže, da je prisotnost manjšinskih komponent biofilma (nukleinskih kislin, proteinov, preprostih soli) ključna za nastanek gela. Zdi se, da DNK in proteini predstavljajo ogrodje, v katerega se »ujame« levan, ki se v teh vzorcih obnaša kot polnilo, ki večja viskoznost vzorca. Tudi te ugotovitve so bile dopolnjene s podatki SAXS, ki so razkrili razlike v strukturi raziskovanih polimernih mešanic na molekularnem nivoju.

V prvem poglavju doktorske disertacije so predstavljene splošne fizikalne značilnosti biofilma in njegovih komponent. Drugo poglavje obravnava osnove uporabljenih metod in fizikalno-kemijskih modelov. V tretjem poglavju je opisan potek gojitve bakterij, izolacije posameznih polimernih komponent iz biofilma ter eksperimentalni pogoji pri posameznih metodah. Sledita četrto poglavje z rezultati in razpravo ter peto poglavje z zaključki. Literatura je zbrana v šestem poglavju.

**Ključne besede:** Levan, *Bacillus subtilis*, EPS-matriks, biofilm, SAXS, SLS, DLS, reologija, razvejanost polimerov, hidratacija polimerov, model biserne verižice.