

Univerza v Ljubljani  
Biotehniška fakulteta



ZBORNİK PRISPEVKOV  
II. DOKTORSKEGA DNE

# Bi(o)znanosti?



Ljubljana, 27. maj 2021

# **Drugi doktorski dan Bi(o)znanosti**

Zbornik prispevkov

Ljubljana, 2021

## **Drugi doktorski dan Bi(o)znanosti**

### **Zbornik prispevkov**

#### **Založnik zbornika:**

Biotehniška fakulteta  
Jamnikarjeva 101  
1000 Ljubljana

#### **Uredniki zbornika:**

Maja Hostnik, Amela Kujović, Jure Mravlje

#### **Organizacijski odbor:**

Maja Hostnik, Amela Kujović, Jure Mravlje, dr. Tanja Potočnik Mesarić (KC BF), Vesna Ješe Janežič in Programski svet Bioznanosti

#### **Datum in kraj dogodka:**

27. maj 2021  
Biotehniška fakulteta (spletni dogodek)

#### **Tehnično urejanje zbornika:**

Zala Brajnik, Maja Hostnik, Amela Kujović, Jure Mravlje, Marija Srnko

**Zbornik recenziranih prispevkov** (Recenzirali člani PS Bioznanosti).

#### **Število strani:**

229

#### **Naklada:**

Elektronska publikacija

#### **Publikacija je dostopna na povezavi:**

<https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=127208>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v NUK Ljubljana

COBISS.SI-ID=64641027

ISBN 978-961-6379-56-4 (PDF)

## KAZALO

<b>AGROŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA</b> .....	1
<b>Belcijan in sod.:</b> Razvoj metode za genetsko manipulacijo in raziskave transformacije <i>Bacillus subtilis</i> .....	1
<b>Erega in sod.:</b> Inhibitory effect of <i>Bacillus subtilis</i> on <i>Campylobacter jejuni</i> .....	11
<b>Jug in Klančnik:</b> Profil membranskih proteinov bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> pri različnih temperaturah gojenja biofilma .....	19
<b>Krajnc in sod.:</b> Vpliv frekvence vrtenja na nastanek in na propad peliklov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
<b>Podnar in Mandić Mulec:</b> Inhibitorni potencial izbranih izolatov bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na rast bakterije <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium .....	36
<b>Ramić in sod.:</b> Obvladovanje filmotvornosti bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> s pripravki sivke .....	44
<b>Rozman in sod.:</b> Razširjenost odpornosti proti protimikrobnim zdravilom pri bakterijah, namerno dodanih v agroživilsko verigo .....	52
<b>Volk in Klančnik:</b> Vpliv topila DMSO na izražanje genov pri bakterijah <i>Campylobacter jejuni</i> .....	59
<b>BIOINFORMATIKA</b> .....	66
<b>Deutsch in sod.:</b> Spremljanje spinalne mišične atrofije pred in po zdravljenju v primerjavi z zdravo kohorto .....	66
<b>BIOLOGIJA</b> .....	74
<b>Hostnik in sod.:</b> Sinteza in izolacija sintetičnega mikrorazdelka P <sub>du</sub> z vključenim transkripcijskim faktorjem LacI .....	74
<b>Kujović in Zalar:</b> Restoration-conservation of artworks with synthetic materials requires understanding of their potential degradability by fungi .....	81
<b>Mravlje in sod.:</b> Učinek hladne plinske plazme na kalitev in dekontaminacijo semen navadne ajde ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench) .....	88
<b>Starič in sod.:</b> Vpliv dušikove in kisikove hladne plinske plazme na kalitev semen navadne ajde .....	95
<b>BIOTEHNOLOGIJA</b> .....	101
<b>Brajnik in Ogorevc:</b> Celični modeli za preučevanje mastitisa .....	101
<b>Eržen in sod.:</b> Vsebnost kanabinoidov v različnih sortah konoplje ( <i>Cannabis sativa</i> L.) .....	108
<b>Hariri Akbari in sod.:</b> The importance of studying CD73 in cancer studies (Overview) .....	113
<b>Knez in sod.:</b> Regulatorna vloga TLR10 v vnetnem odzivu celic pljučnega epitelijskega tkiva ob imunostimulaciji z dvoverižno RNA .....	126

<b>Kovač in sod.:</b> Koncentracije sproščenih kovinskih ionov nesnemnih ortodontskih aparatov ne povzročajo oksidativnega stresa v normalnih fizioloških pogojih .....	134
<b>Menegatti in sod.:</b> Tailoring properties of hydrogels for their use as biocatalyst immobilization matrices .....	143
<b>Petek in sod.:</b> Izolacija in karakterizacija novih keratinolitičnih mikroorganizmov .....	149
<b>EKONOMIKA NARAVNIH VIROV</b> .....	155
<b>Stare in sod.:</b> Analiza odločanja zasebnih lastnikov gozdov o sanaciji gozdov po ujmah ....	155
<b>HORTIKULTURA</b> .....	161
<b>Smrke in sod.:</b> Odziv ameriške borovnice ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.) sorte 'Brigitta' na gojenje v loncih .....	161
<b>Vošnjak in Usenik:</b> The effect of sunlight conditions in the canopy on flower bud sugars, fruit quality and yield of sweet cherry.....	170
<b>LES IN BIODIVERZITETA</b> .....	178
<b>Škrk in sod.:</b> SLOCLIM: baza modeliranih dnevnih meteoroloških podatkov za Slovenijo. 178	178
<b>UPRAVLJANJE GOZDNIH EKOSISTEMOV</b> .....	185
<b>Šmidovnik in Grošelj:</b> Razvoj modela za načrtovanje gospodarjenja z gozdovi z uporabo sivih števil v DEMATELu .....	185
<b>ZNANOST O CELICI</b> .....	192
<b>Kunčič in sod.:</b> Izgradnja in preoblikovanje medceličnih stikov v epidermisu členonožca med embrionalnim in postembrionalnim razvojem.....	192
<b>Potočnik in sod.:</b> Gene electrotransfer by high-frequency short bipolar pulses in vitro .....	199
<b>Tavčar in Jorgačevski:</b> Meritve makroavtofagije v podganjih astrocitih s fluorescenčno mikroskopijo.....	205
<b>Vižintin in sod.:</b> Metal release from electrodes after application of electroporation pulses used in clinical practise.....	216
<b>ŽIVILSTVO</b> .....	223
<b>Mencin in Terpinc:</b> Can we improve the accessibility of bound phenolics of spelt seeds using different biotechnological processes?.....	223

## AGROŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA

### Razvoj metode za genetsko manipulacijo in raziskave transformacije *Bacillus subtilis*

Katarina BELCIJAN<sup>1</sup>, Polonca ŠTEFANIČ<sup>1</sup>, Ines MANDIĆ MULEC<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si](mailto:ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si)

#### Razvoj metode za genetsko manipulacijo in raziskave transformacije *Bacillus subtilis*

**Izveček:** Izolati po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* so zmožni naravne kompetence za transformacijo, ki omogoča privzem in integracijo proste zunajcelične DNA (eDNA) iz okolja in tako hitrejšo adaptacijo vrste ter usmerjeno genetsko manipulacijo v raziskovalne in biotehnološke namene. Večinoma transformacijo sevov *B. subtilis* izvajamo v tekočem gojišču z dodatkom zelene eDNA. Raziskave, ki naslavljajo istočasno izločanje in sprejem eDNA, še posebej če so celice pritrjene na površine, so redke. V tej raziskavi smo sledili transformaciji naravnega izolata *B. subtilis* PS-18 po klasičnem postopku v tekočem gojišču z dodano eDNA, ki nosi zapis za antibiotično odpornost in transformante selekcionirali na gojišču z antibiotikom. Dodatno smo testirali simultano transformacijo med sevoma *B. subtilis*, ki se razlikujeta v genu za odpornost na antibiotik, ki smo ju skupaj gojili v tekočem gojišču in transformante selekcionirali v gojišču z dvema antibiotikoma. Testirali smo tudi izmenjavo DNA med dvema sevoma, na površini gojišča, ki podpira skupinsko gibanje bakterij (rojenje). Ugotovili smo, da je transformacija seva z geni za antibiotično odpornost primerljiva v obeh modelih tekočega gojišča, in sicer  $3,95 \times 10^{-6}$  v primeru dodane DNA in  $8,66 \times 10^{-6}$  ob izmenjavi DNA med sevi; medtem ko je bila izmenjava DNA med roji na površini poltrdega gojišča manj učinkovita, vendar še vedno zaznavna, in sicer  $3,95 \times 10^{-7}$ . Slednja metoda bolje posnema naravno okolje mikroorganizmov in zato ponuja ekološko bolj relevanten model za raziskave transformacije in horizontalnega prenosa genov med bakterijami.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*; transformacija; poltrdo gojišče; eDNA; izmenjava DNA

#### Development of a method for genetic manipulation and research of transformation in *Bacillus subtilis*

**Abstract:** Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* is capable of natural competence for transformation, which enables uptake and integration of free extracellular DNA (eDNA) from the environment. This behaviour facilitates faster adaptation of the species and enables genetic manipulation for research or biotechnological purpose. Transformation of *B. subtilis* strains is usually performed in liquid media with the addition of the desired eDNA. Research on active excretion and concurrent uptake of DNA, especially of surface-attached cells is rare. In this study, we focused on the transformation of natural isolate *B. subtilis* PS-18 during classical transformation protocol in liquid media with the addition of eDNA carrying a selective marker gene – antibiotic resistance. Transformants were selected for in media supplemented with

respective antibiotics. Furthermore, we tested simultaneous transformation (DNA exchange) of two *B. subtilis* strains in a liquid co-culture, carrying different antibiotic resistance genes, by selecting transformants on solid media supplemented with both antibiotics. Additionally, we tested DNA exchange between two *B. subtilis* strains on semisolid media, which supports the social movement of bacteria (swarming). We show that transformation rates were similar in both liquid media models, namely added DNA or DNA exchange in liquid media,  $3,95 \times 10^{-6}$  and  $8,66 \times 10^{-6}$  respectively. However, DNA exchange between swarms on semisolid media was less efficient but still detectable -  $3,95 \times 10^{-7}$ . The latter method shows better resemblance to the natural environment of microorganisms and thus provides an ecologically more relevant model for transformation research and horizontal gene transfer between bacteria.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; transformation; semisolid media; eDNA; DNA exchange

## 1 UVOD

Za vnos DNA v tarčne seve lahko izkoriščamo naravne mehanizme bakterij za privzem in vstavljanje tuje DNA v genom. Ti mehanizmi so konjugacija - privzem ali izmenjava plazmidne DNA (Tatum in Lederberg, 1947), transdukcija - okužba z bakteriofagi, ki lahko prenesejo del svoje DNA v bakterijski kromosom (Zinder in Lederberg, 1951), in transformacija, ki je privzem proste eDNA iz bakterijske okolice.

Nekatere bakterijske vrste so naravno zmožne privzema zunajcelične DNA (eDNA). Takšno stanje imenujemo kompetenca za transformacijo in povzroči, da bakterijska celica sprejme eDNA iz njene okolice (Lorenz in sod., 1991). Privzemu eDNA sledi homologna rekombinacija med donorsko DNA in kromosomom in do vključitve privzete DNA v genom. Naravno kompetenco za transformacijo so zato pogosto uporabljali tudi za spreminjanje genomov nekaterih industrijsko pomembnih vrst bakterij (npr. *B. subtilis*, *Streptococcus* sp.), še intenzivnejše 70-ih letih prejšnjega stoletja, ko je odkritje verižne reakcije s polimerazo omogočilo pomnoževanje in sestavljanje delov DNA (Kleppe in sod., 1971).

Za razvoj kompetence so potrebni Com proteini, ki so zapisani v *com* genih. Njihovo izražanje je običajno omejeno na specifične pogoje v okolju oz. fazo rasti, zato je transformacija in s tem privzem eDNA možen le v določeni fazi rasti, pri specifičnih pogojih in običajno v omejenem časovnem oknu (Albano in sod., 1987; Dubnau, 1991; Johnston in sod., 2014). Geni za kompetenco se aktivirajo ob visoki celični gostoti populacije in tudi ob stresu ob prisotnosti antibiotikov, kot odziv na poškodbe lastnega genoma, pomanjkanje izbranega vira ogljika ali splošnega stradanja (Blokesch, 2016; Calaverys, 2006). Transformacija zaradi naravne kompetence omogoča privzem kromosomske, fagne ali plazmidne DNA (Canosi in sod., 1978; Anagnostopoulos in Spizizen, 1961; Veldhuisen in sod., 1968).

Tudi *B. subtilis*, po Gramu pozitivna bakterija, ki jo najdemo predvsem v tleh in v asociacijah z rastlino, je naravno kompetentna bakterija (Lorenz in sod., 1991). Kompetenca pri *B. subtilis* je regulirana z zaznavanjem kvoruma, pri čemer bakterija sprošča signalni peptid ComX, ki ob zadostni količini preko fosforilacije ComA aktivira transkripcijo *srf* operona. V *srf* operonu se nahaja gen za ComS, katerega produkt prepreči razgradnjo glavnega kompetenčnega regulatorja ComK in s tem omogoči izražanje poznih kompetenčnih genov in razvoj stanja K (Berka in sod., 2002; Maier, 2020). Po vstopu ssDNA v celico, se nanjo veže protein RecA, ki omogoči iskanje homologije med donorsko ssDNA in kromosomsko DNA prejemnega

organizma (Duncan in sod., 1978). Pri transformaciji *B. subtilis* so opazili tako imenovano spolno izolacijo, kjer se DNA, ki izvira iz filogenetsko bolj sorodnega seva iste vrste v večji meri vgradi v genom (višja frekvenca transformacije), kot manj sorodna DNA. To je posledica stabilnosti heterodupleksa med samim postopkom vgradnje DNA v genom, ki je višja ob večji homologiji med vstopno in sprejemno DNA (Roberts in Cohan, 1993).

Naše trenutno znanje o fiziologiji in regulatornih mehanizmih, ki usmerjajo razvoj kompetence pri bakteriji *B. subtilis* temelji na raziskavah, kjer so bakterije gojili kot monokulture v tekočih gojiščih. Najbolj pogosto uporabljen protokol transformacije sta razvila že Anagnostopoulos in Spizizen (1961), pri čemer sta udomačeni sev *B. subtilis* 168 gojila preko noči na LB ploščah, nato pa jih inokulirala v gojišče za stradanje SM1 (angl. *starvation media 1*) do koncentracij  $10^8$  celic/ml. Sledila je 4 h inkubacija, centrifugiranje celic in 10-kratno redčenje v SM2 medij (revnejše kot gojišče SM1). Nato so po dodatku kromosomske DNA inkubirali bakterije še 90 min pri 37 °C in nato celice nacepili na selektivno gojišče za transformante. Frekvenca transformacije *B. subtilis* 168 je znašala  $2 \times 10^{-2}$  (na 10 µg dodane DNA; Anagnostopoulos in Spizizen, 1961).

Vendar v večini ekosistemov bakterijske populacije ne rastejo homogeno in niso dobro premešane, zato so neenakomerno razporejene in izpostavljene gradientom kisika, temperature in hranil. Ravno vrsta gojišča močno pogojuje frekvenco transformacije (Anagnostopoulos in Spizizen, 1961; Nijland in sod., 2010). Zelo redke so raziskave transformacije na trdem gojišču, kot sta jo izvedla Hauser in Karamata (1994). Le ta predlaga metodo transformacije z nanosom mešanice bakterijskih celic ( $10^7$  celic v eksponentni fazi rasti) in kromosomske ali plazmidne DNA (1-3 µg) na površino revnega trdega gojišča, pri čemer je bila učinkovitost transformacije še vedno zadovoljiva (100-200 transformant/µg DNA), frekvenca transformacije pa nižja in sicer  $10^{-5}$  glede na skupno število prisotnih celic (Hauser in Karamata, 1994). To nakazuje, da je morda frekvenca transformacije, ki jo ugotavljamo pri laboratorijskih pogojih v tekočem gojišču, precenjena glede na frekvenco transformacije v naravnem okolju, kjer so bakterije na površini. Poleg tega se je v večini dosedanjih raziskav v raziskovalne namene uporabljal laboratorijski sev *B. subtilis* 168, ki je bil od začetka šestdesetih let prejšnjega stoletja »udomačen« (angl. *domesticated*) in selekcioniran za višjo stopnjo transformacije (Anagnostopoulos in Spizizen, 1961). V procesu udomačenja je izgubil številne ekološko pomembne lastnosti, kot je npr. sposobnost tvorbe biofilma in rojenja, ki je skupinsko gibanje po površini s pomočjo bičkov in surfaktantov (Julkowska, 2005; Valamakis, 2013) in ima pomembno vlogo pri kolonizaciji korenin rastlin (Gao in sod., 2016). Za spodbujanje rojenja sevov *B. subtilis* uporabljamo v laboratoriju gojišče B z 0.7 % vsebnostjo agarja (Kearns in Losick, 2004). V naši raziskavi bomo uporabili izolat *B. subtilis*, izoliran iz slovenskih peščenih tal, ki ima genetsko in morfološko ohranjene lastnosti socialnih vedenj ter še ni bil izpostavljen selekciji za povečano kompetenco (Štefanič in Mandič-Mulec, 2009).

Cilj raziskave je razvoj in optimizacija nove metode, ki bo omogočala ekološko bolj relevanten način gojenja mikroorganizmov (na površini) in izmenjavo DNA med sevi, ki vstopajo v fizične interakcije.



## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Uporabljeni sevi

**Preglednica 1:** Uporabljeni sevi in njihov vir.

<i>Sev</i>	<i>Vir</i>
PS-18	Štefanič in Mandić-Mulec, 2009
PS-18 <i>amyE::p43-cfp</i> (Sp)	Štefanič, Belcijan in sod., 2021
PS-18 <i>sacA::p43-yfp</i> (Cm)	Štefanič, Belcijan in sod., 2021
PS-216 <i>amyE::p43-cfp</i> (Sp)	Štefanič, Belcijan in sod., 2021
PS-216 <i>sacA::p43-yfp</i> (Cm)	Štefanič, Belcijan in sod., 2021
BGSC 1E56, JAS9 s plazmidom pIM13 Em leuB trpC	Mahler, 1980; Monod, 1986; Projan, 1987
BGSC, BKK24730 <i>comGA::kan</i> trpC2	Koo in sod., 2017
PS-216 <i>sacA::p43-yfp</i> (Cm) pIM13 (MLS) <i>comGA::kan</i>	To delo

### 2.2 Transformacija z dodano DNA v tekočem gojišču

Transformacijo v tekočem gojišču smo izvajali v gojišču CM, ki smo ga pripravili iz 1x SS brez magnezija (v 1 l destilirane vode smo raztopili 6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g Na-citrata dihidrata. pH smo umerili z NaOH na pH 7. V 500 ml sterilnega 1 x SS smo dodali 5 ml 50 % D-glukoze, 5 ml 10 % kvasnega ekstrakta, 5 ml 2 % kazeinskega hidrolizata, 2,5 ml metionina (10 mg/ml), 2,5 ml levcina (10 mg/ml), 2,5 ml histidina (10 mg/ml), 1,25 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$ . V gojišče LB smo nacepili kolonijo seva *B. subtilis* in inkubirali preko noči s stresanjem (200 vrt./min) pri 37 °C. Prekonočno kulturo smo nacepili v sveže gojišče CM (1 % prekonočne kulture) in stresali (200 vrt./min) pri 37 °C. Rast smo spremljali z merjenjem optične gostote  $\text{OD}_{650}$  nm. 2h po prehodu v stacionarno fazo (T2) ( $\text{OD}_{650}$  nm od 0,8-0,9) smo v 0,5 ml kulture dodali 2  $\mu\text{l}$  DNA (1,7-2  $\mu\text{g}$ ) in inkubirali 30 min s stresanjem (200 vrt./min) pri 37 °C. Nato smo dodali 0,5 ml svežega na 37 °C termostadiranega gojišča LB in kulturo inkubirali še 1 h s stresanjem (200 vrt./min) pri 37 °C. Transformacijsko in kontrolno mešanico (kontrola brez dodane DNA) smo nacepili na LB z dodanim selekcijskim antibiotikom. Celokupno število celic smo ugotavljali tako, da smo redčeno transformacijsko mešanico nacepili na LB brez dodanega antibiotika. Vse plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Prešteli smo število kolonij na selekcijskem LB z dodanim antibiotikom ter tako ugotovili število transformant. Frekvenco transformacije smo izračunali na podlagi števila transformant in celokupnega števila celic v mešanici: CFU transformant / CFU vseh celic. Dodajali smo kromosomsko DNA seva PS-216 *amyE::p43-cfp* (Sp) (995  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ali PS-216 *sacA::p43-yfp* (Cm) (870  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Eksperiment smo ponovili v treh bioloških ponovitvah.

### 2.3 Izmenjava DNA v tekočem gojišču CM

Pogostost izmenjave DNA v tekočem gojišču CM smo ugotavljali tako, da smo v sveže gojišče CM nacepili 1 % spor *B. subtilis* 2 sevov, pri čemer je vsak od sevov para predstavljal ½ inokuluma. Uporabljena seva *B. subtilis* sta bila označena z različnima antibiotičnima oz. fluorescentnima označbama, in sicer *amyE::p43-cfp* (Sp) in *sacA::p43-yfp* (Cm). Nacepljeno kulturo smo stresali (200 vrt./min) 8 ur, pri 37 °C. Kulturo smo nato nacepili na agarško gojišče LB s kloramfenikolom (LB Cm) ali spektinomycinom (LB Sp), da smo ugotovili koncentracijo

celic posameznega seva in na selekcijsko gojišče z obema antibiotikoma (LB Sp Cm), kjer so lahko rasle le celice, ki so sprejele DNA kokultiviranega seva. Prešteli smo kolonije na vseh gojiščih in izračunali delež transformant, pri čemer smo upoštevali, da transformante, ki rastejo na obeh antibiotikih (Sp in Cm) prav tako zrastejo tudi na ploščah s posameznim antibiotikom, zato smo vrednost števila transformant v izračunu celokupnega CFU odšteli. Izračunali smo delež transformant s pomočjo spodnje enačbe (Enačba 1). Eksperiment smo ponovili v treh bioloških ponovitvah, vsako pa v treh tehničnih ponovitvah.

$$\text{Delež transformant} = \frac{\text{CFU transformant (LB Sp Cm)}}{\text{CFU 1.seva (LB Cm)} + \text{CFU 2.seva (LB Sp)} - \text{CFU transformant (LB Sp Cm)}} \dots\dots (1)$$

## 2.4 Izmenjava DNA med sevi na poltrdem gojišču

Gojišče B smo pripravili tako, da smo v 1 l destilirane vode zatehtali 7,880 g Tris-HCl, 1,982 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,972 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 2,013 g KCl, 2,059 g Na-citrat dihidrata. Nato smo z dodajanjem NaOH umerili pH na 7,5. Dodali smo še 10 ml 200 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,1 ml 10 mM FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,1 ml 100 mM MnSO<sub>4</sub> x 4H<sub>2</sub>O, 0,842 g Na-glutaminske kisline, 0,1593 g triptofana, 0,1257 g lizina, 1 ml 600 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g glukoze in 0,7 g agarja. Avtoklavirano gojišče smo nalili v petrijevke s premerom 7 cm (15 ml) in plošče inkubirali preko noči, da so se osušile. Nacepili smo 2 µl kulture posameznega seva v eksponentni fazi rasti po 3h gojenja s stresanjem pri 37 °C in 200 vrt./min in inkubirali preko noči (22-24 ur) pri 37 °C in vlažnosti 80 % RH. Na stiku dveh rojev smo vzorčili 10 vzorcev agarja, preraščenih s celicami obeh sevov. Vzorčili smo z odrezanimi pipetnimi nastavki, kot je prikazano na Sliki 1. Vzorce smo umešali v 500 µl fiziološke raztopine in transformante selekcionirali na LB gojišču z dvema antibiotikoma, kot je opisano v podpoglavju 2.3. Eksperiment smo ponovili v treh bioloških ponovitvah, vsako v treh tehničnih ponovitvah.

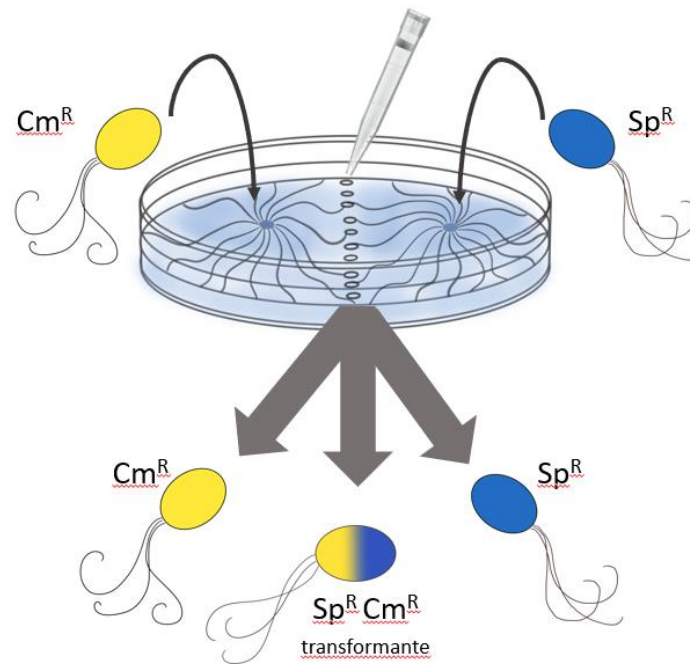
## 2.5 Statistične metode

Podatki so prikazani kot povprečje treh bioloških ponovitev ± standardna deviacija (SD) (Slika 2). Za statistično analizo smo izvedli Studentov t-test za dva neodvisna vzorca na podlagi vzorca treh bioloških ponovitev. V rezultatih so navedene izračunane p vrednosti, z »\*« so označeni statistično signifikantni rezultati (p < 0,05) (Slika 2). Izračune smo izvedli s programom Microsoft Excel 12.00 (2016, Microsoft, Redmond, WA, ZDA).

# 3 REZULTATI

## 3.1 Transformacija in izmenjava DNA v tekočem gojišču

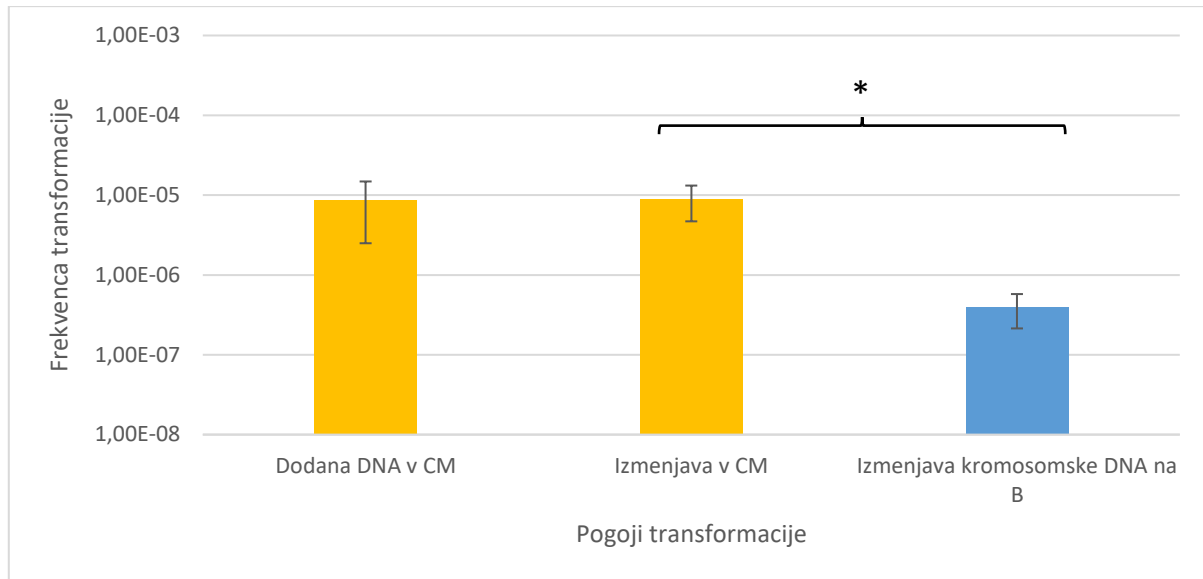
Testirali smo povprečno frekvenco transformacije seva PS-18 *B. subtilis* v tekočem gojišču CM z dodano DNA (1,7-2,0 µg), ki je znašala 8,66x10<sup>-6</sup> (SD = 6,17x10<sup>-6</sup>) po 5 h gojenja (Slika 2). Povprečna frekvenca izmenjave DNA v tekočem gojišču CM med dvema izogenima sevoma *B. subtilis* PS-18, označenima z različnima genoma za odpornost na antibiotik je bila 8,93x10<sup>-6</sup> (SD = 4,24x10<sup>-6</sup>) (Slika 2). Čeprav smo eDNA dodali v tekoče gojišče v visoki koncentraciji, ni signifikantnih razlik (p = 0,95) med povprečno frekvenco transformacije seva PS-18 z dodano eDNA in povprečno frekvenco izmenjave DNA med sevoma PS-18. To nakazuje, da omejitveni dejavnik verjetno ni koncentracija prisotne DNA ampak število kompetentnih celic v populaciji.



**Slika 1:** Ugotavljanje frekvence transformacije med roji sevov *B. subtilis*. Vsak izmed sevov ima svojo antibiotično označbo – odpornost proti spektinomycinu ali kloramfenikolu ( $Sp^R$  ali  $Cm^R$ ). Po vzorčenju z odrezanim pipetnim nastavkom na območju srečanja rojev ugotavljamo koncentracijo celic posameznega seva s selekcijo za odpornost proti posameznemu antibiotiku in koncentracijo transformant, ki so odporne proti obema antibiotikoma ( $Sp^R + Cm^R$ ).

### 3.2 Spremljanje izmenjave DNA na poltrdem gojišču B

Za namen ugotavljanja izmenjave DNA na trdni podlagi smo seve spodbudili k rojenju na poltrdem gojišču B z 0,7 % agarjem. Na površino gojišča smo na oddaljenosti 2-3 cm nacepili dva izogena *B. subtilis* seva z različnim genom za odpornost proti antibiotiku, in sicer *amyE::p43-cfp* ( $Sp$ ) in *sacA::p43-yfp* ( $Cm$ ) in po preko nočni inkubaciji vzorčili 10 vzorcev agarja na stiku dveh rojev. Celice smo vmešali v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl) in tako pripravljene celice nacepili na selekcijska gojišča LB  $Cm$  ali LB  $Sp$ , da smo ugotovili koncentracijo celic posameznega seva in na LB  $Sp Cm$ , da smo selekcionirali transformante z odpornostjo na dva antibiotika (Slika 1). Izračunali smo delež transformant z uporabo Enačbe 1. Na območju srečanja rojev izogenih sevov PS-18 na poltrdem agarskem gojišču je bila frekvenca izmenjave DNA nižja ( $3,95 \times 10^{-7}$ ,  $SD = 1,81 \times 10^{-7}$ ) (Slika 2) kot v tekočem gojišču CM. Na poltrdem gojišču B je povprečna frekvenca izmenjave DNA statistično signifikantna nižja ( $p = 0,03$ ), kot povprečna frekvenca izmenjave v tekočem gojišču CM, vendar rezultati pokažejo, da je izmenjava DNA med sevi še vedno mogoča, četudi na površino agarja nismo dodali eDNA.



**Slika 2:** Frekvenca privzema DNA in izmenjave DNA med sevi *B. subtilis* v tekočem CM gojišču (rumena stolpca) in izmenjava kromosomske DNA na površini poltrdega gojišča B (modri stolpec). Oznaka »\*« ponazarja signifikantno razliko ( $p < 0,05$ ).

#### 4 DISKUSIJA

V okolju se s pomočjo horizontalnih genskih prenosov, kot je transformacija, lahko prenašajo zelo raznoliki geni, vključno z geni za odpornost proti antibiotikom, ki se na tak način lahko razširjajo v okolju. Prav zaradi tega so raziskave izmenjave genov med bakterijami ključnega pomena, saj le dobro poznavanje mehanizmov izmenjave DNA omogoča preprečevanje razširjanja antibiotičnih odpornosti. Vendar večina raziskav transformacije temelji na gojenju v dobro premešani in zato homogeni in tekoči kulturi, ki slabše odraža stanje v okolju. Poleg tega se v raziskavah večinoma uporabljajo laboratorijski sevi, ki so v zadnjih petdesetih letih izgubili pomembne ekološke funkcije na račun bolj učinkovite transformacije.

Naši rezultati tako kažejo, da tudi na poltrdem agarškem gojišču B med roji sevov *B. subtilis* divjega tipa pride do izmenjave kromosomske DNA in je zato metoda po našem mnenju primerna za študije vpliva medceličnih interakcij na razvoj kompetence, genske transformacije sevov in na izmenjavo DNA med njimi. Rezultati frekvence izmenjave DNA v tekočem gojišču so bili sicer signifikantno višji zato sklepamo, da je frekvenca izmenjave DNA v naravnem okolju, ki ga bolje ponazarja trdo gojišče, verjetno nekoliko nižja. Vendar bi bilo za potrditev te hipoteze potrebno izvesti tudi eksperimente direktno v vzorcih tal npr. v mikrokozmi ali in situ in z uporabo divjih tipov sevov, ki so genetsko različni. Čeprav pričujoči rezultati prikažejo le posredno vlogo eDNA v eksperimentu, rezultati objavljeni v Štefanič, Belcijan in sod. (2021) potrjujejo, da je eDNA nujna za prenos genov, saj dodatek DNaze na območje stika rojev zavre prenos genov (Štefanič, Belcijan in sod., 2021).

V preteklosti so transformacijo bakterijskih sevov spremljali predvsem v revnih tekočih gojiščih (Anagnostopoulos in Spizizen, 1961), nekaj raziskav je spremljalo izmenjavo DNA na trdem gojišču (Hauser in Karamata, 1994) in v tleh (Donnarumma in sod., 2010; Graham in Istock, 1978). Prav slednji eksperimenti so pomembni, saj omogočajo bolj naraven privzem DNA, na katerega lahko močno vplivajo tudi interakcije med bakterijskimi sevi. V specifičnih primerih lahko frekvenca transformacije na poltrdem gojišču celo preseže frekvenco

transformacije v tekočem gojišču, kar nakazuje na vpliv medceličnih interakcij na razvoj kompetence (Štefanič, Belcijan in sod., 2021). Menimo, da ugotavljanje izmenjave DNA predstavlja dobro alternativo za raziskave mehanizmov horizontalnega prenosa genov, saj bolje posnema naravno okolje, kot tekoče gojišče. Predpostavljamo, da ob stiku dveh sevov pride do sproščanja eDNA zaradi lize celic (Danevčič in sod., sprejeto v objavo 2021), in ne od direktnega prenosa DNA skozi nanocevice ali pile (Štefanič, Belcijan in sod., 2021). Naše nedavne raziskave so pokazale, da je frekvenca transformacije med sevi na površini povečana, če so odnosi med sevi antagonistični (Štefanič, Belcijan in sod., 2021). Podobno so opazili tudi Borgeaud in sod. (2015) za prenos DNA med sevi bakterije *Vibrio cholerae* na površinah iz hitina (Borgeaud in sod., 2015).

Pri eksperimentih smo uporabljali bakterijsko vrsto *B. subtilis*, ki jo najdemo v različnih okoljih in je tudi biotehnološko pomembna za proizvodnjo medicinsko in industrijsko pomembnih encimov in antibiotikov (Su Y., Liu C., Zhang D., 2020). Zaradi zmožnosti sprejemanja proste DNA lahko pri teh bakterijah usmerjeno manipuliramo genom, po drugi strani pa hitre spremembe genoma lahko povzročajo težave pri biotehnoloških procesih. Zato so raziskave kompetence za transformacijo pri *B. subtilis* pomembne tudi za izboljšanje genomske stabilnosti biotehnološko pomembnih sevov.

## 5 SKLEPI

Pri raziskavah transformacije se še vedno najpogosteje uporablja gojenje v tekočem gojišču. Naša raziskava pokaže, da je izmenjava DNA pri bakteriji *B. subtilis* možna tudi ob stiku roječih sevov brez dodajanja zunanje DNA, kar ponuja nov model za raziskave regulacije razvoja naravne kompetence pri bakterijah.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) za financiranje raziskav v okviru raziskovalnega programa P4-0116 in projektov J4-8228 in J4-9302. Hvala tudi tehnični sodelavki Simoni Leskovec za podporo in pomoč pri našem raziskovalnem delu.

## 6 VIRI

- Albano, M., Hahn, J., Dubnau, D. (1987). Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3110–3117.
- Anagnostopoulos, C. in Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 81(5), 741-746.
- Berka, R. M., Hahn, J., Albano, M., Draskovic, I., Persuh, M., Cui, X., Sloma, A., Widner, W., Dubnau, D. (2002). Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Molecular Microbiology*, 43(5), 1331-1345. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02833.x>
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology*, 26(23), 3225. DOI: 10.1016/j.cub.2016.11.023.
- Borgeaud, S., Metzger, L. C., Scrignar, T., Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science*, 347(6217), 63–67. DOI: 10.1126/science.1260064

- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 451–475. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142139
- Canosi, U., Morelli, G, Trautner T. A. (1978). The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 166(3): 259-267. DOI: 10.1007/BF00267617
- Danevčič, T., Dragoš, A., Spacapan, M., Stefanic, P., Dogsa, I., Mandic-Mulec, I. (2021). Surfactin facilitates horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, sprejeto v objavo
- Donnarumma F., Paffeti D., Stotzky G., Giannini R., Vettori C. (2010). Potential gene exchange between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus* spp. in soil in situ. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(8), 1329-1337. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.03.014>
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55(3), 395–424.
- Duncan, C. H., Wilson, A. A., Young, F. E. (1978). Mechanism of integrating foreign DNA during transformation of *Bacillus subtilis*. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 75(8), 3664-3668. DOI: 10.1073/pnas.75.8.3664.
- Gao, S., Wu, H., Yu, X, Qian, L., Gao, X. (2016). Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*, 98, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.011>
- Graham, J. B. in Istock, C. A. (1978) Genetic exchange in soil. *Molecular and General Genetics MGG*, 166, 287-290.
- Hauser, P. M., Karamata, D. (1994). A rapid and simple method for *Bacillus subtilis* transformation on solid media. *Microbiology*, 140, 1613 – 1617. DOI:10.1099/13500872-140-7-1613
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3) 181-196.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B., Seror, S. J. (2005). Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: Critical effects of surfactin and the composition of the medium. *Journal of Bacteriology*, 187(1): 65-76. DOI: 10.1128/JB.187.1.65-76.2005
- Kearns, D. B. in Losick, R. (2004). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(3), 581-590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x>
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 56(2): 341-361. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90469-4
- Koo, B. M. in sod. (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Systems*, 4, 291-305 e297. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013>
- Lorenz, M. G., Gerjets, D., Wackernagel, W. (1991). Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Archives of Microbiology*, 156(4), 319–326
- Mahler, I., Halvorson, H. O. (1980). Two erythromycin-resistance plasmids of diverse origin and their effect on sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of general microbiology*, 120(1), 259-263. DOI: 10.1099/00221287-120-1-259
- Maier, B. (2020). Competence and transformation in *Bacillus subtilis*. *Current Issues in Molecular Biology*, 37, 57-76. DOI: 10.21775/cimb.037.057
- Monod, M, Denoya, C., Dubnau, D. (1986). Sequence and properties of pIM13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 167(1), 138-147. DOI: 10.1128/jb.167.1.138-147.1986

- Projan, S. J., Monod, M., Narayanan, C. S., Dubnau, D. (1987) Replication properties of pIM13, a naturally occurring plasmid found in *Bacillus subtilis*, and of its close relative pE5, a plasmid native to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 169(11):5131-5139. DOI: 10.1128/jb.169.11.5131-5139.1987.
- Roberts M. S. in Cohan F. M. (1993). The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics*, 134(2): 401-408.
- Su Y., Liu C., Zhang D., (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19, 173.
- Štefanič, P. in Mandić-Mulec, I. (2009). Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 1756-1764. DOI: 10.1128/JB.01290-08
- Štefanič, P., Belcijan, K., Kraigher, B., Kostanjšek, R., Nesme, J., Madsen, J., Kovac, J., Sørensen, S., Vos, M., Mandić-Mulec, I. (2021). Kin discrimination promotes horizontal gene transfer between unrelated strains in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*, sprejeto v objavo
- Tatum, E. L., Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 53, 673–684.
- Valamakis, H., Chai, Y., Beaudard, P., Losick, R., Kolter, R. (2014). Sticking together: building biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157-168. DOI: 10.1038/nrmicro2960
- Veldhuisen, G. in Goldberg, E. B. (1968). Genetic transformation of bacteriophage T4. *Methods in Enzymology*, 12, 858-864. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)12203-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)12203-9)
- Zinder, N. D. in Lederberg, J. (1951). Genetic exchange in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 64(5), 679-699. Vorbach C., Capecchi M. R., Penninger J. M. 2006. Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *BioEssays*, 28: 606-616
- Wicik Z., Gajewska M., Majewska A., Walkiewicz D., Osińska E., Motyl T. 2015. Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breedheifers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, doi: 10.1111/jbg.12172

## Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni*

Andi EREGA<sup>1\*</sup>, Ines MANDIĆ MULEC<sup>1</sup>, Sonja SMOLE MOŽINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [andi.erega@bf.uni-lj.si](mailto:andi.erega@bf.uni-lj.si)

### **Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni***

**Abstract:** The gram-negative, foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* is typically found in animals, such as birds, as an intestinal commensal, and also in food products. As a most common cause of human campylobacteriosis, it is a consistent and worsening food safety problem in the developed countries of the EU and globally. Probiotics are one of the strategies that can be easily applied in animal feeding to attenuate *Campylobacter* problem in the food production and human nutrition. In this study, we investigated *Bacillus subtilis*, a gram-positive, beneficial, spore forming probiotic bacterium, as a potent *C. jejuni* antagonist in an experimental in vitro co-culture model. Using agar diffusion and co-culture broth assay, we demonstrated a reduction in *C. jejuni* growth in the presence of *B. subtilis* PS-216. We also show that the cell-free supernatant of *B. subtilis* inhibits *C. jejuni* growth, which is consistent with both previous and current experiments indicating that bacillaene, a polyketide/non-ribosomal secondary metabolite produced by *B. subtilis*, may not be the only metabolite involved in the interaction between *C. jejuni* and *B. subtilis*. This work contributes to a better understanding of *B. subtilis* and *C. jejuni* interactions and provides a pathway for further research towards probiotic antimicrobial molecules. Taken together, this supports natural approach of probiotic applications of *B. subtilis* in animal production and may greatly reduce the second burning issue of antibiotic resistance in *Campylobacter*.

**Key words:** *Campylobacter jejuni*; *Bacillus subtilis*; microbial interactions, food safety; probiotic; antimicrobial molecules

### **Inhibitorni učinek bakterij *Bacillus subtilis* na bakterije *Campylobacter jejuni***

**Izveček:** Po Gramu negativne patogene bakterije *Campylobacter jejuni*, ki se prenašajo s hrano, običajno najdemo v črevesju živali, pa tudi v živilih, zlasti svežem perutninskem mesu. So stalno tveganje za varnost živil v državah EU in po svetu in izziv zdravstvu in gospodarstvu za iskanje sprejemljive strategije nadzora kontaminacije, preživetja in prenosa teh bakterij vzdolž agroživilske verige. Probiotiki so ena od uporabnih strategij. V tej študiji smo raziskali po Gramu pozitivno sporogeno bakterijo *Bacillus subtilis* kot antagonista bakterij *C. jejuni* v eksperimentalnem in vitro modelu kokulture. Z uporabo difuzijskega testa v agarju in analize kokulture smo pokazali zmanjšanje rasti *C. jejuni* v prisotnosti *B. subtilis* PS-216. Prav tako dokazujemo, da izrabljeno gojišče *B. subtilis* zavira rast *C. jejuni*, kar je skladno s prejšnjimi in sedanjimi poskusi, ki kažejo, da bacilen, poliketid/ne-ribosomski sekundarni presnovek bakterije *B. subtilis*, morda ni glavni presnovek, ki sodeluje pri interakciji med *C. jejuni* in *B. subtilis*. To delo prispeva k boljšemu razumevanju interakcij *B. subtilis* in *C. jejuni* in ponuja pot za nadaljnje raziskave probiotičnih protimikrobnih molekul kot naravnega pristopa uporabe



probiotikov *B. subtilis* v živinoreji in tudi za zmanjšanje odpornosti kampilobaktrov proti antibiotikom.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*; *Bacillus subtilis*; mikrobne interakcije; probiotik; protimikrobne molekule

## 1 INTRODUCTION

Thermotolerant bacteria *Campylobacter* in humans cause campylobacteriosis, which has been the most common zoonosis in humans since 2005. In recent years, this infectious disease accounts for 70 % of all human zoonoses in the European union EU (EFSA, 2019; WHO, 2020). In Slovenia, *Campylobacter jejuni* is the most common bacterial causative agent of infectious enteritis in humans with approximately 1.300 reported cases per year (NIJZ, 2019). The main route of transmission is inadequately heat-treated chicken meat and contaminated drinking water (EFSA/ECDC, 2019; WHO, 2020; Marotta et al., 2015). In addition to high prevalence, the problem is worsened by the increasing resistance of pathogenic *Campylobacter* to antimicrobials (Smole Možina et al., 2011; EFSA, 2019).

We urgently need new strategies for *Campylobacter* control, especially in the poultry industry where, except from good husbandry and hygiene measures, additional measures may be applied to reduce the population of *Campylobacter* (Melo et al., 2017; Hanning et al., 2008). Among promising measures is the use of probiotics, which can reduce the burden of *C. jejuni* in the poultry chain and contribute to a safer human food (Johnson et al., 2017). *Bacillus subtilis* has been recognized for over 65 years as a potent biological agent for controlling pathogenic bacteria (Stein, 2005). It is used as a probiotic for animals and humans (Stein, 2005) with approved Qualified Presumption of Safety status (EFSA BIOHAZ Panel, 2020). In support, there are many commercial feed additives containing *B. subtilis* such as Subalin®, Biosporin®, Ecobiol®, Calsporin® (Sorokulova et al., 1997; Fritts et al., 2000).

*B. subtilis* characterizes a strong antibacterial activity against Gram-positive and -negative bacteria (Baruzzi et al., 2011; Caulier et al., 2019). The antimicrobial potential of *B. subtilis* lies in the production of many ribosomal and non-ribosomal synthesized secondary metabolites such as bacteriocins, glyco-peptides, lipo-peptides, and cyclic peptides (Caulier et al., 2019). Furthermore, probiotic potential is demonstrated by the increasing nutrient digestibility and growth efficiency in broilers (Li et al., 2016). Previous and recent *in vitro* and *in vivo* studies suggest that *B. subtilis* inhibits the growth of *C. jejuni* (Sorokulova, 1997; Teo and Tan, 2005; Erega et al., 2021). First *in vitro* model describing *C. jejuni* NCTC 11168 and *B. subtilis* PS-216 interaction in biofilm setting was described by Erega et al. (2021). By using co-culture approach and *B. subtilis* mutants in genes coding for non-ribosomal peptides and polyketides researchers revealed that bacillaene significantly contributes to the inhibitory effect of *B. subtilis* PS-216 (Erega et al., 2021). Originally, bacillaene molecule produced by *B. subtilis* revealed a bacteriostatic effect against prokaryotic, but not eucaryotic cells (Patel et al., 1995) and presents a laboratory challenge for the isolation and characterization of the molecule due to its instability (Butcher et al., 2007; Straight et al., 2006; Li et al., 2021).

The aim of this study was to further investigate the potential inhibitory effect of *B. subtilis* on *C. jejuni* and to obtain additional data about the possible mechanism which is behind the interaction of the model set by the Erega et al., (2021). This was achieved by measuring the

inhibitory effect of *B. subtilis* using a co-culture approach in broth or on agar plates and by testing *C. jejuni* survival in *B. subtilis* cell free supernatant (CFS).

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Bacterial strains and growth conditions

The wild type genotypes of *C. jejuni* NCTC 11168 (Parkhill et al., 2000) and *B. subtilis* PS-216 (Stefanic and Mandic Mulec, 2009) were used in all experiments. The *C. jejuni* strain was maintained at -80 °C and sub-cultured two times on Karmali agar at 42 °C for 24 h under microaerobic conditions (85 % N<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>) prior to experimental use. The *B. subtilis* strain was prepared on Müller-Hinton agar (MHA) at 28 °C for 24 h under aerobic conditions. All experiments were done in static microaerobic conditions on MHA or broth (MHB) in biological triplicate. *C. jejuni* colony counts (CFU/ml) were determined on Karmali agar plates incubated at 42 °C for 24 h under microaerobic conditions while *B. subtilis* colonies were determined on MHA plates incubated at 28 °C for 18 h under aerobic conditions selective against *C. jejuni* growth.

### 2.2 Agar diffusion assay

The antibacterial activity of the *B. subtilis* PS-216 against *C. jejuni* was evaluated with agar diffusion assay. Using sterile cotton swab, we inoculated the whole surface of an MHA plate with *C. jejuni* culture (OD<sub>600</sub> = 0.08) and added 2 µL of *B. subtilis* (OD<sub>600</sub> = 0.1) spot to the agar. After 24 h incubation at 42 °C in microaerobic conditions agar plates were evaluated for the zone of inhibition (diameter) around the *B. subtilis* colony. As a positive control strain, we used *Micrococcus luteus*. All experiments were done in triplicate.

### 2.3 Co-culture assay

Antagonistic activity of the *B. subtilis* PS-216 against *C. jejuni* was tested according to the multi-species biofilm method described by Erega et al. (2021) in standing broth co-culture. Here, except *C. jejuni* GFP labeled strain we used natural *C. jejuni* WT strain and different time points of the experiment during broth co-culture as well as the different ratio during co-culture, which is 1000-times less advantage of *C. jejuni* when *B. subtilis* was added.

### 2.4 Cell free supernatant assay

To examine *C. jejuni* growth in *B. subtilis* PS-216 CFS we prepared 50 ml of *B. subtilis* mono- and co-culture (*B. subtilis* and *C. jejuni* together) from 28 h old culture after incubation at 42 °C in microaerobic conditions using 100 ml Erlenmeyer flask. One set of overnight *B. subtilis* culture was exposed to source of day light (daylight program, Mammert incubator, Germany), the other was incubated in dark. Cultures were spun down (7,500 g during 10 min) and filtered using 0.22 µm filters (Millipore) and immediately used for the inoculation with *C. jejuni*. *C. jejuni* overnight cultures were prepared according to Erega et al. (2021) and inoculated in 5 ml of *B. subtilis* mono- and co-culture CFS. *C. jejuni* controls were inoculated into fresh MHB.

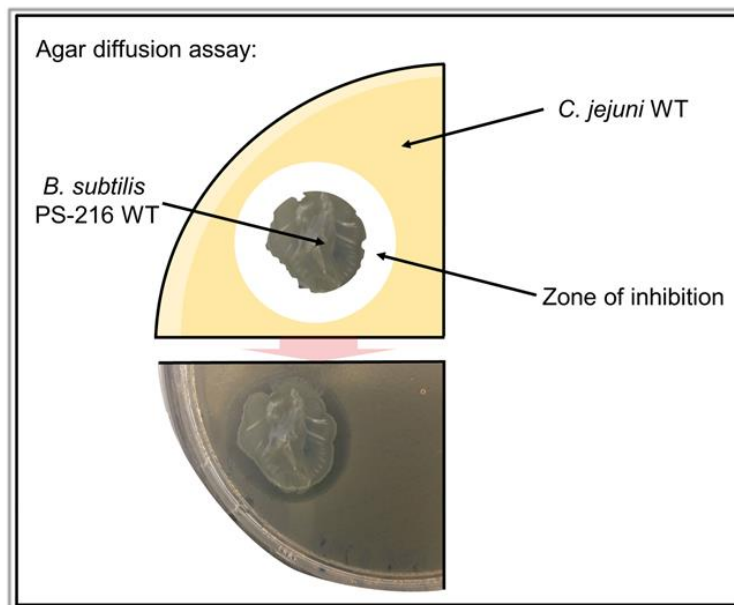
## 2.5 Statistical analysis

Two-sample t-test using Welch correction in which equal variance is not assumed was used for calculating statistically significant values ( $p < 0.05$ ) obtained from experiment 2.3 and 2.4.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 *B. subtilis* inhibits *C. jejuni* during co-culture

Bacterial inhibition depends on cell-cell contact or diffusible molecules excreted into the environment. Agar diffusion method is a qualitative and widely used method to evaluate the antimicrobial activity of any *B. subtilis* strain against foodborne pathogenic bacteria (Moore et al., 2013). We spread *C. jejuni* to create the lawn on agar plate in the presence of 2  $\mu$ l culture spot of *B. subtilis* and incubated plates in microaerobic conditions. After 24 h the inhibition zone is formed around the *B. subtilis* colony (Figure 1).

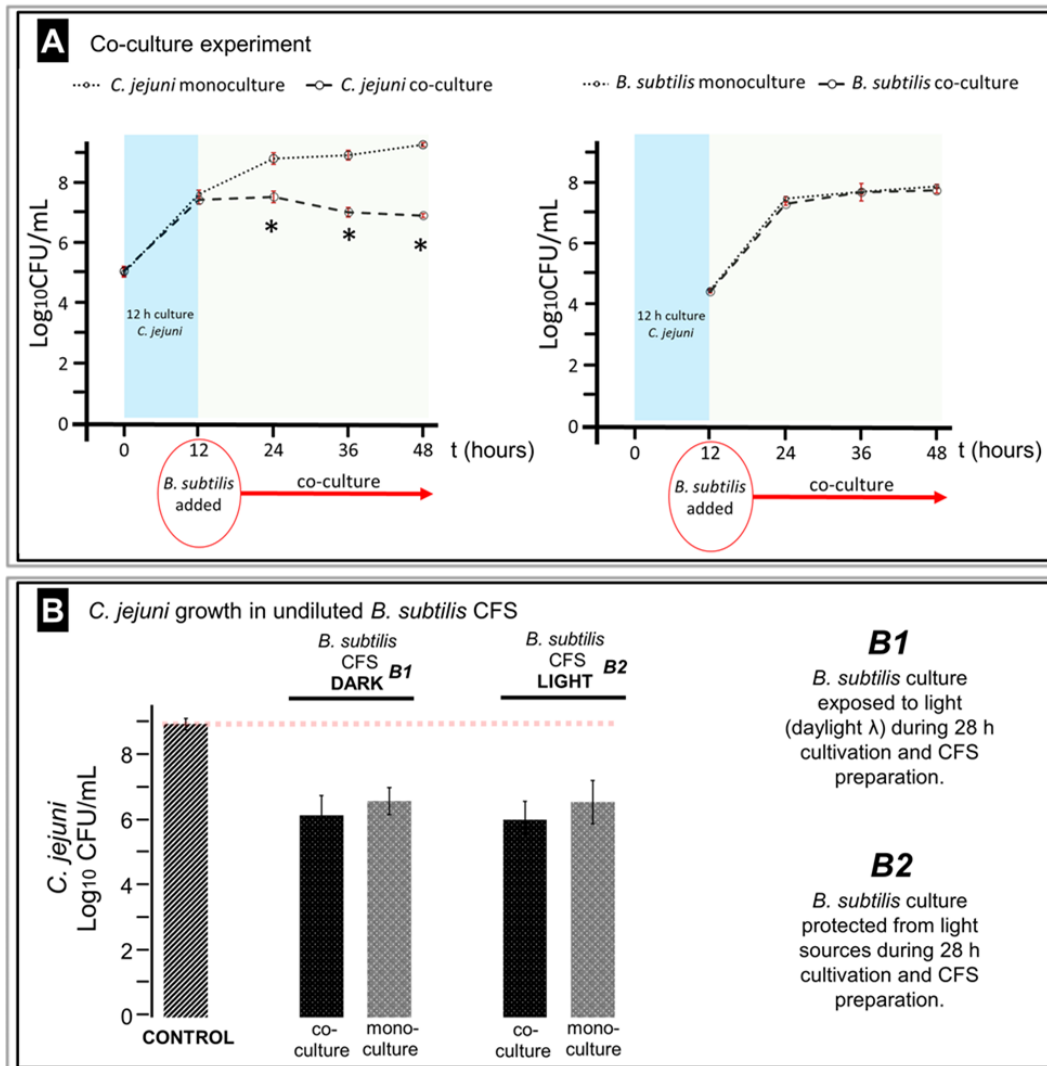


**Figure 2:** Evaluation of antimicrobial activity of *B. subtilis* against *C. jejuni* - the lawn of *C. jejuni* on agar plate in the presence of *B. subtilis* was made. After 24 h of co-incubation the clear zone of inhibition of *C. jejuni* was visible around *B. subtilis* bacterial colony.

Diffusible metabolites produced by *B. subtilis* may be the main antagonist against *C. jejuni*. A similar study demonstrated strong inhibition of *B. subtilis* against many other foodborne pathogens (Moore et al., 2013). Our first research with a co-culture experiment with membrane separation gave a clear indication that diffusible molecules play a major role in inhibition of *C. jejuni* (Erega et al., 2021). We here retest whether *B. subtilis* PS-216 can affect *C. jejuni* growth if *C. jejuni* has 1000-times higher advantage in number of bacterial cells (Figure 2A). We added *B. subtilis* PS-216 cells at concentration of 4.3  $\log_{10}$  CFU/ml to *C. jejuni* cultures that had already been maintained in microaerobic conditions for 12 h and therefore reached 1000-times higher cell concentration than *B. subtilis* PS-216. Despite this disadvantage in numbers PS-216 significantly reduced the colony counts of *C. jejuni* at time point 24 h, 36 and 48 h, by 1.3  $\log_{10}$  CFU/ml, 1.9  $\log_{10}$  CFU/ml and 2.4  $\log_{10}$  CFU/ml, respectively. On the other hand, *C. jejuni* showed no effect on *B. subtilis* growth during co-incubation at time point 24 h

and 38 h. Results demonstrate similar inhibition as described in our first work (Erega et al., 2021).

It has been demonstrated that aerobic conditions are the key factor for efficient expression of antimicrobials by *B. subtilis* (Yang et al., 2015). However, our results suggest that *B. subtilis* PS-216 still produced antimicrobial activity in microaerobic conditions (Figure 2A) which are present in gastrointestinal tract of broilers, where the probiotic is expected to act (Albenberg et al., 2014).



**Figure 2:** *B. subtilis* reduces the number of *C. jejuni* colony counts in broth. (A) Left panel, the addition of *B. subtilis* to 12 h monoculture of *C. jejuni* (1:1000 ratio) decreases *C. jejuni* CFU by > 2 log order. Right panel, *C. jejuni* do not disturb *B. subtilis* growth. (B) *C. jejuni* cells were inoculated into undiluted *B. subtilis* CFS. After 24 h in static mono- and co-culture in *B. subtilis* CFS, the colony counts of *C. jejuni* in the broth were determined. Three biological and up to three technical repeats were performed. \* represent statistically significant values

### 3.2 *C. jejuni* growth was inhibited by *B. subtilis* CFS

We demonstrated the importance of secondary metabolites involved in *B. subtilis* antagonism against *C. jejuni* (Erega et al., 2021). Bacillaene is a specific *B. subtilis* hybrid metabolite, which is a product of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases encoded by the *pks* gene cluster (Straight et al., 2006). *B. subtilis* bacillaene inhibits *C. jejuni* growth and biofilm formation (Erega et al., 2021). In the last few decades bacillaene presents a laboratory challenge for the isolation (Butcher et al., 2007) due to its instability when exposed to the light source, oxygen, and room temperature (Li et al., 2021). Therefore, if bacillaene is the only molecule that inhibits *C. jejuni* growth, an exposure of the *B. subtilis* culture to daylight will contribute to the decomposition of bacillaene (Butcher et al., 2007; Li et al., 2021) resulting in a weaker potency of CFS against *C. jejuni* growth. To test this prediction, we grew *B. subtilis* PS-216 in the dark and light conditions and in mono and in co-culture with *C. jejuni*. We then tested the activity of both types of undiluted CFS against *C. jejuni* growth in static culture. Our results demonstrate similar inhibition of *C. jejuni* by CFS regardless of whether it originates from co-cultures (*B. subtilis* and *C. jejuni* together) or *B. subtilis* monoculture or whether *B. subtilis* was cultivated in LIGHT or DARK (Figure 2B). Specifically, after 24 h of incubation at 42 °C, the colony counts of *C. jejuni* in *B. subtilis* co-culture CFS broth were significantly still lower (LIGHT, 6.05 log<sub>10</sub> CFU/ml; DARK, 6.18 log<sub>10</sub> CFU/ml) than if *C. jejuni* was grown in monoculture without addition of CSF (8.9 log<sub>10</sub> CFU/ml). The *B. subtilis* co-culture CFS LIGHT reduced *C. jejuni* CFU/ml by 2.92 log<sub>10</sub> and in the DARK by 2.8 log<sub>10</sub>. The colony counts of *C. jejuni* in *B. subtilis* monoculture CFS broth were also significantly lower (LIGHT, 6.59 log<sub>10</sub> CFU/ml; DARK, 6.62 log<sub>10</sub> CFU/ml) than those of *C. jejuni* in monoculture (8.9 log<sub>10</sub> CFU/ml). The *B. subtilis* monoculture CFS LIGHT reduced *C. jejuni* CFU/ml by 2.38 log<sub>10</sub> and in the DARK by 2.35 log<sub>10</sub>. There is a lack of literature in this particular research topic. However, taken together, our results demonstrate that there is no significant difference in inhibition of *C. jejuni* growth during static culture between *B. subtilis* CFS exposed to light or held in dark during growth. This raises a question of whether another *B. subtilis* molecule is involved in *C. jejuni* inhibition and remains open. Further research in this direction is continued in the frame of PhD thesis.

## 4 CONCLUSION

*B. subtilis* PS-216 exhibits probiotic potential for *Campylobacter* and it is a part of our patent application (Mandic Mulec et al., 2020). In this study we have demonstrated that *B. subtilis* showed strong antimicrobial effect against *C. jejuni* visible on agar diffusion assay and co-culture assay even if added in 1000-times lower frequency. As noted previously (Erega et al., 2021), polyketide/non-ribosomal secondary metabolite bacillaene produced by *B. subtilis* plays a significant role in interaction with *C. jejuni*. Furthermore, *B. subtilis* CFS showed inhibition of *C. jejuni* growth even when we exposed *B. subtilis* CFS to the light source known for causing chemical instability of the bacillaene molecule (Li et al., 2021) leaving the option that bacillaene is not the only molecule that negatively affects *C. jejuni* growth. There is a need to elucidate the exact involvement of the *B. subtilis* molecules in *C. jejuni* inhibition and to gain a better understanding of the molecular mechanism by which *B. subtilis* affects the growth of *C. jejuni* bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Polonca Stefanic, Tjaša Danevčič and Katarina Šimunović for helpful discussions and advice. We further acknowledge the research funding by Slovenian Research Agency ARRS of the research program grant P4-0116 and project grants J4-7637 and J4-2542.

## 5 VIRI

- Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C. P., Bittinger, K., Chen, J., Wu, G. D. (2014). Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 147:1055-1063. e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.020>.
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., Caputo, L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. Undefined. /paper/Antimicrobial-compounds-produced-by-Bacillus-spp.-Baruzzi-Quintieri/7e457bdb20f3a5fe3ce0c5bd542748021c4adefb
- Butcher, R. A., Schroeder, F. C., Fischbach, M. A., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., & Clardy, J. (2007). The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5), 1506-1509. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610503104>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC, 2019. The EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J* 17(2):5598. DOI 10.2903/j.efsa.2019.5598
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Davies, R., Chemaly, M., 2020. Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. *EFSA Journal* 2020;18(4):6090, 89 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6090>.
- Erega, A., Stefanic, P., Dogša, I., Danevčič, T., Simunovic, K., Klančnik, A., Smole Možina, S., Mandic Mulec, I. 2021. Bacillaene mediates the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 87:e02955-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02955-20>.
- Fritts, C. A., Kersey, J. H., Motl, M. A., Kroger, E. C., Yan, F., Si, J., Jiang, Q., Campos, M. M., Waldroup, A. L., & Waldroup, P. W. (2000). *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 9(2), 149-155. <https://doi.org/10.1093/japr/9.2.149>
- Hanning, I., Jarquin, R., Slavik, M. (2008). *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1199-1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03853.x>
- Johnson, T. J., Shank, J. M., Johnson, J. G. (2017). Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Frontiers in Microbiology*, 8, 487. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00487>
- Li, Y., Xu, Q., Huang, Z., Lv, L., Liu, X., Yin, C., Yan, H., & Yuan, J. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers. *Journal of applied microbiology*, 120(1), 195-204. <https://doi.org/10.1111/jam.12972>
- Li, H., Han, X., Dong, Y., Xu, S., Chen, C., Feng, Y., Cui, Q., Li, W. (2021). Bacillaenes: Decomposition trigger point and biofilm enhancement in *Bacillus*. *ACS Omega*, 6(2), 1093-1098. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03389>

- Mandic Mulec I., Simunovic K., Stefanic P., Erega A., Smole Možina S., Klančnik A., Zhang Q., Sahin O. (2020). *Bacillus subtilis* strain with strong inhibition of enteropathogenic and foodborne pathogenic bacteria. *US patent application* 63117215. EFS ID: 41197988, confirmation number: 4289.
- Marotta, F., Garofolo, G., Di Donato, G., Aprea, G., Platone, I., Cianciavichia, S., Alessiani, A., Di Giannatale, E. (2015). Population diversity of *Campylobacter jejuni* in poultry and its dynamic of contamination in chicken meat. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/859845>
- Melo, R. T., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Siqueira, M. C., Pereira, C. B., Peres, P. A. B. M., Fernandez, H., Rossi, D. A. (2017). Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>
- Moore T. (2013). Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against foodborne pathogens. *J Probiotics Health* 1:3. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000110>.
- NIJZ 2019. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2018. <https://www.nijz.si/sl/epidemiolosko-spremljanje-nalezljivih-bolezni-letna-in-cetrletna-porocila>. (January, 2021).
- Patel, P. S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Mayerl, F. (1995). Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 48(9), 997-1003. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.997>
- Parkhill J., Wren B. W., Mungall K., Ketley J. M., Churcher C., Basham D., Barrell B. G. (2000). The genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403:665-668. <https://doi.org/10.1038/35001088>
- Smole Možina, S., Kurinčič, M., Klančnik, A., Mavri, A. (2011). *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.09.003>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Stefanic P., Mandic Mulec I. (2009). Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *J Bacteriol* 191:1756-1764. <https://doi.org/10.1128/JB.01290-08>.
- Sorokulova, I. B., Kirik, D. L., & Pinchuk, I. V. (1997). Probiotics against *Campylobacter* Pathogens. *Journal of Travel Medicine*, 4(4), 167-170. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.1997.tb00813.x>
- Straight, P. D., Fischbach, M. A., Walsh, C. T., Rudner, D. Z., Kolter, R. (2007). A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 305-310. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609073103>
- Teo, A. Y. L., Tan, H. M. (2005). Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4185-4190. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4185-4190.2005>
- Yang, J. J., Niu, C. C., Guo, X. H. (2015). Mixed culture models for predicting intestinal microbial interactions between *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in the presence of probiotic *Bacillus subtilis*. *Benef Microbes* 6:871-877. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0033>.
- WHO 2020. *Campylobacter*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter> (January, 2021)

## Profil membranskih proteinov bakterij *Campylobacter jejuni* pri različnih temperaturah gojenja biofilma

Blaž JUG<sup>1\*</sup>, Anja KLANČNIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [blaz.jug@bf.uni-lj.si](mailto:blaz.jug@bf.uni-lj.si)

### **Profil membranskih proteinov bakterij *Campylobacter jejuni* pri različnih temperaturah gojenja biofilma**

**Izveček:** Bakterije *Campylobacter jejuni* so kljub zahtevnim laboratorijskim ravnim pogojem, vsesplošno prisotni v okolju in so glavni povzročitelji humanega gastroenteritisa v svetu. Eden od njihovih mehanizmov preživetja in zaščite pred neugodnimi pogoji je tvorba biofilma. Planktonske celice se po adheziji na površino združujejo v mikrokolonije, izločajo zunajcelične polimerne snovi ter formirajo tridimenzionalno strukturo biofilma. V naši raziskavi nas je zanimal zrel biofilm bakterij *C. jejuni* NCTC 11168, tvorjen 48 h pri dveh različnih temperaturah, pri katerih je temperatura 42 °C simulirala perutninskega gostitelja, temperatura 37 °C pa človeškega gostitelja. Podrobneje so nas zanimali membranski proteini, ki sodelujejo pri medcelični interakciji bakterij, interakciji s kontaktno površino in/ali gostiteljskimi celicami. Zaradi pomanjkanja ustreznih postopkov smo najprej optimizirali postopek izolacije membranskih proteinov, čiščenje ter encimsko razgradnjo. Razgrajene proteine smo analizirali z masno spektrometrijo in bioinformacijskimi orodji. Analiza je izpostavila prisotnost petih proteinov, vključenih v skupine flagelinov, adhezinov in porinov, prisotnih pri obeh temperaturah ter dveh proteinov MapA ter FlaC, prisotnih le pri 42 °C. Zaključimo lahko, da imajo bakterije *C. jejuni* specifičen membranski profil proteinov, ki ima pomembno vlogo za optimalno prilagoditev na črevesne temperature različnih gostiteljev. Specifični proteini predstavljajo potencialne tarče za nadaljnje študije interakcij med bakterijami ter z gostitelji.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*; biofilm; membranski proteini

### **Membrane protein profile of *Campylobacter jejuni* bacteria at different biofilm cultivation temperatures**

**Abstract:** *Campylobacter jejuni* bacteria are ubiquitous in the environment despite difficult growth conditions in the laboratory and are the leading cause of human gastroenteritis worldwide. One of their means of survival and protection against adverse conditions is biofilm formation. After adhesion to the surface, planktonic cells form microcolonies, secrete extracellular polymeric substances and form a three-dimensional biofilm structure. In our study, we were interested in the mature biofilm of *C. jejuni* NCTC 11168 bacteria formed after 48 h at two different temperatures, where the temperature of 42 °C simulated an avian host and the temperature of 37 °C simulated a human host. Specifically, we were interested in membrane proteins involved in bacterial intercellular interactions, interactions with the contact surface and/or host cells. In the absence of suitable methods, we optimized the process of membrane protein isolation, purification and enzymatic degradation. The degraded proteins were analysed by mass spectrometry and bioinformatics tools. The analysis revealed the presence of five proteins from the groups of flagellins, adhesins and porins, which were present at both



temperatures, and two MapA and FlaC proteins, which were present only at 42 °C. We can conclude that *C. jejuni* bacteria possess a specific membrane profile of proteins that plays an important role in optimal adaptation to gut temperatures of different hosts. Specific proteins represent potential targets for further studies of bacteria-host interactions.

**Key words:** *Campylobacter jejuni*; biofilm; membrane proteins

## 1 UVOD

Črevesni patogeni so nenehno izpostavljeni stresnim razmeram v svojem naravnem okolju gostitelja in še bolj zunaj njega, vključno s pogoji v agroživilski verigi. Eden izmed najpogostejših patogenov so bakterije *C. jejuni*, ki so kljub zahtevnim laboratorijskim ravnim pogojem vsesplošno prisotni in so glavni povzročitelji bakterijskih črevesnih okužb pri ljudeh (Rubeša Mihaljević in sod., 2007). Bakterije *C. jejuni* v neugodnih pogojih preživijo tudi zaradi tvorbe biofilma. Ta odporna oblika omogoča pritrjenim celicam zaščito predvsem preko zunajceličnega matriksa, ki obdaja celice biofilma (Melo in sod., 2017).

Molekularni mehanizmi, ki uravnavajo ter usmerjajo tvorbo biofilma, so pri bakterijah *C. jejuni* slabo raziskani. Nekateri že znani geni, ki imajo dokazano vlogo v različnih fazah biofilma, opravljajo druge funkcije, kot so vključenost v: (i) gibljivost celice - gena *flaA* in *flaB* (Mahdavi in sod., 2014); (ii) adhezijo celic - gen *cadF* (Talukdar in sod., 2020); (iii) zaznavanje kvoruma - gen *luxS* (Shagieva in sod., 2020); (iv) stresni odziv celice - *katA*, *ahpC* in *sodB* (Oh in Jeon, 2014); ter (v) modulacijo imunskega sistema - gen *flaC* (Faber in sod., 2015).

Proteomski pristop raziskovanja omogoča identifikacijo in kvantifikacijo profila proteinov, ki je v celici, ob stalnem prilagajanju na nove stresne izzive zelo dinamičen in zato zelo pomemben za študij interakcije celice z okoljem. Molekularna metoda za študije proteinov predstavlja pomembno dopolnitev pri študijah na nivoju DNA ali pri študijih izražanja genov na nivoju mRNA, saj omogoča detekcijo tudi post-translacijskih modifikacij proteinov, ki iz genomskih in transkriptomskih molekularnih analiz niso razvidne (Wells in Bennik, 2003).

Z namenom primerjave membranskega profila proteinov bakterij *C. jejuni* pri dveh različnih gostiteljih smo izbrali temperaturi črevesja perutninskega (42 °C) ter človeškega gostitelja (37 °C). Najprej smo optimizirali postopek izolacije proteinov zunanje membrane, nato smo iz *C. jejuni* v zrelem biofilmu po inkubaciji 48 h izolirali proteine zunanje membrane, izvedli procese čiščenja ter encimsko razgradnjo. Pripravljene proteine smo nato identificirali z masno spektrometrijo in kvantificirali z orodji bioinformatike.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Pridobivanje biomase zrelega biofilma bakterij *C. jejuni*

Uporabili smo referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168. Po revitalizaciji na selektivnem gojišču Karmali pod mikroaerofilnimi pogoji (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) na 42 °C je sledil prenos na gojišče Mueller-Hinton Agar (MHA). Delež biomase smo prenesli v sterilni fosfatni pufer z NaCl (pufer PBS) in pri 600 nm umerili optično gostoto na 0,1. Nato smo 100 µl tekoče biomase prenesli na MHA. Plošče smo v treh bioloških ponovitvah inkubirali 48 h pod mikroaerofilnimi pogoji na dveh različnih temperaturah, in sicer 37 °C ter 42 °C. Biomaso

biofilma smo omočili z 2 ml pufru PBS, postrgali s celičnim strgalcem, prenesli v mikrocentrifugirko (1,5 ml Eppendorf safe-lock) in centrifugirali 5 min pri pogojih 5000 x g ter 4 °C. Supernatant smo odstranili ter pelet resuspendirali v pufru PBS. Po vnovičnem centrifugiranju smo suh pelet shranili na temperaturi -80 °C.

## 2.2 Izolacija proteinov zunanje membrane

Na suhem peletu (imenovanem vzorci) smo izvedli lizo celic z dodatkom 300 µl ledeno-hladnega pufru za lizo (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) ter trikratnim ciklom hitrega zamrzovanja s tekočim dušikom in odtajanja v mlačni vodi. Po vsakem odtajanju smo vzorce premešali na vrtničniku. Sledila je 3-minutna homogenizacija s cirkonij-kremenčevimi kroglicami v homogenizatorju (Bullet blender, program 8). Nato smo vzorce 5 min inkubirali na ledu ter ponovno homogenizirali. Supernatant s proteinsko frakcijo smo ločili od celičnih ostankov z 10 min centrifugiranjem pri pogojih 13000 × g, 4 °C in ga nato prenesli v novo mikrocentrifugirko, ter shranili na temperaturi -80 °C.

Supernatant smo prenesli v vialo za ultracentrifugiranje (5 ml, Beckman Coulter) in s pufrom za lizo dopolnili do 5 ml. Nameščene vialo s supernatantom smo centrifugirali 60 min pri pogojih 100000 × g in 4 °C (Beckman L8-70M ultracentrifuga). Supernatant smo odstranili, pelet pa dvakratno sprali z ledeno hladnim pufrom za lizo, resuspendirali v 0,2 ml 10 mM pufru HEPES (pH 7.4) in prenesli v nove mikrocentrifugirke. Za raztapljanje notranje membrane smo uporabili enak volumen 2 % natrijevega lavril sarkosinata, raztopljenega v 10 mM pufru HEPES, in inkubirali na sobni temperaturi 30 min z vmesnim mešanjem na vrtničniku. Sledilo je centrifugiranje za 30 min pri pogojih 15600 × g in 4 °C, s čimer smo ločili frakcijo notranje membrane v supernatantu in frakcijo zunanje membrane v peletu. Po odstranitvi supernatanta smo pelet dvakrat sprali z 0,5 ml 10 mM pufru HEPES ter ga resuspendirali v 50 µl 50 mM pufru amonijevega bikarbonata (pufer ABC) s 5 M pufrom urea. Koncentracijo proteinov smo določili z dodatkom reagenta Bradford (Bio-rad).

## 2.3 Čiščenje in encimska razgradnja membranskih proteinov

Proteine smo čistili z obarjanjem. Po določitvi koncentracije proteinov smo za vsak supernatant posebej izračunali volumen, potreben za 50 µg proteinov. V nove mikrocentrifugirke (1,5 ml) smo prenesli izračunani volumen supernatanta ter dodali trikloroacetno kislino (TCA) v razmerju 1:4 suspenzije proteinov ter izvedli precipitacijo proteinov z 10-minutno inkubacijo pri 4 °C. Obarjane proteine s supernatantom smo centrifugirali 5 min na 14000 x g, odstranili supernatant, pelet sprali z 200 µl ledeno hladnim acetonom in ponovno centrifugirali. Celoten postopek smo ponovili še enkrat, na koncu, po odstranitvi acetona pa mikrocentrifugirke pustili 5 min odprte, da je preostali aceton izhlapel.

Pelet očiščenih proteinov je bilo potrebno za nadaljnjo encimsko razgradnjo ponovno raztopiti v 50 µl 50 mM pufru ABC s 5 M pufrom urea. Raztopljenim očiščenim membranskim proteinom smo določili koncentracijo z dodatkom reagenta Bradford. Nato smo za vsak supernatant izračunali volumen potreben za 25 µg proteinov. Izračunan volumen, ki je vseboval 25 µg proteinov, smo prenesli v novo mikrocentrifugirko (1,5 ml) in dopolnili s svežim 50 mM pufrom ABC do volumna 50 µl. Proteinom smo dodali 5 µl 20 mM ditiotreitola (DTT), premešali ter jih inkubirali 45 min na sobni temperaturi. Vzorcem smo dodali 6 µl 40 mM jodoacetamida (IAA), premešali ter jih 45 min inkubirali na sobni temperaturi v temi. Za

nevtaliziranje pribitka IAA smo dodali 10  $\mu$ l 20 mM DTT, premešali in inkubirali 45 min na sobni temperaturi. Za encimsko razgradnjo vzorcev smo dodali endoproteinazo Lys-C v razmerju 1:100, premešali in inkubirali 2 h v vodni kopeli na 37 °C. Vzorce smo hitro centrifugirali in razredčili z dodatkom 200  $\mu$ l 50 mM pufra ABC ter premešali. Dodali smo drugo proteazo tripsin v razmerju 1:25, premešali in inkubirali 16 h v vodni kopeli na 37 °C. Po končani razgradnji smo membranske proteine zakisali z dodatkom 30  $\mu$ l 20 % acetonitrila in 10 % mravljinčne kisline, premešali in shranili na temperaturi -80 °C.

#### 2.4 Identifikacija in kvantifikacija proteinov, ter njihova bioinformacijska analiza

Vzorce smo analizirali z metodo »ionske pasti brez oznake« na masnem spektrometru Thermo LCQ v proteomskem laboratoriju prof. dr. Marjorie Fournier na Univerzi v Oxfordu. Pridobljene rezultate je statistično obdelala prof. dr. Marjorie Fournier po metodi Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF). Ta metoda upošteva razlike med vzorci, ki smo jih pridobili z analizo bioloških ponovitev pri enem setu pogojev, hkrati pa nam omogoča direktno primerjavo različnih koncentracij membranskih proteinov, ki smo jih pridobili pri različnih pogojih. Izbrane identificirane membranske proteine smo anotirali z bazo Uniprot, kjer smo pridobili informacije o njihovih genih, vlogi v celici in kemijskih interakcijah.

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

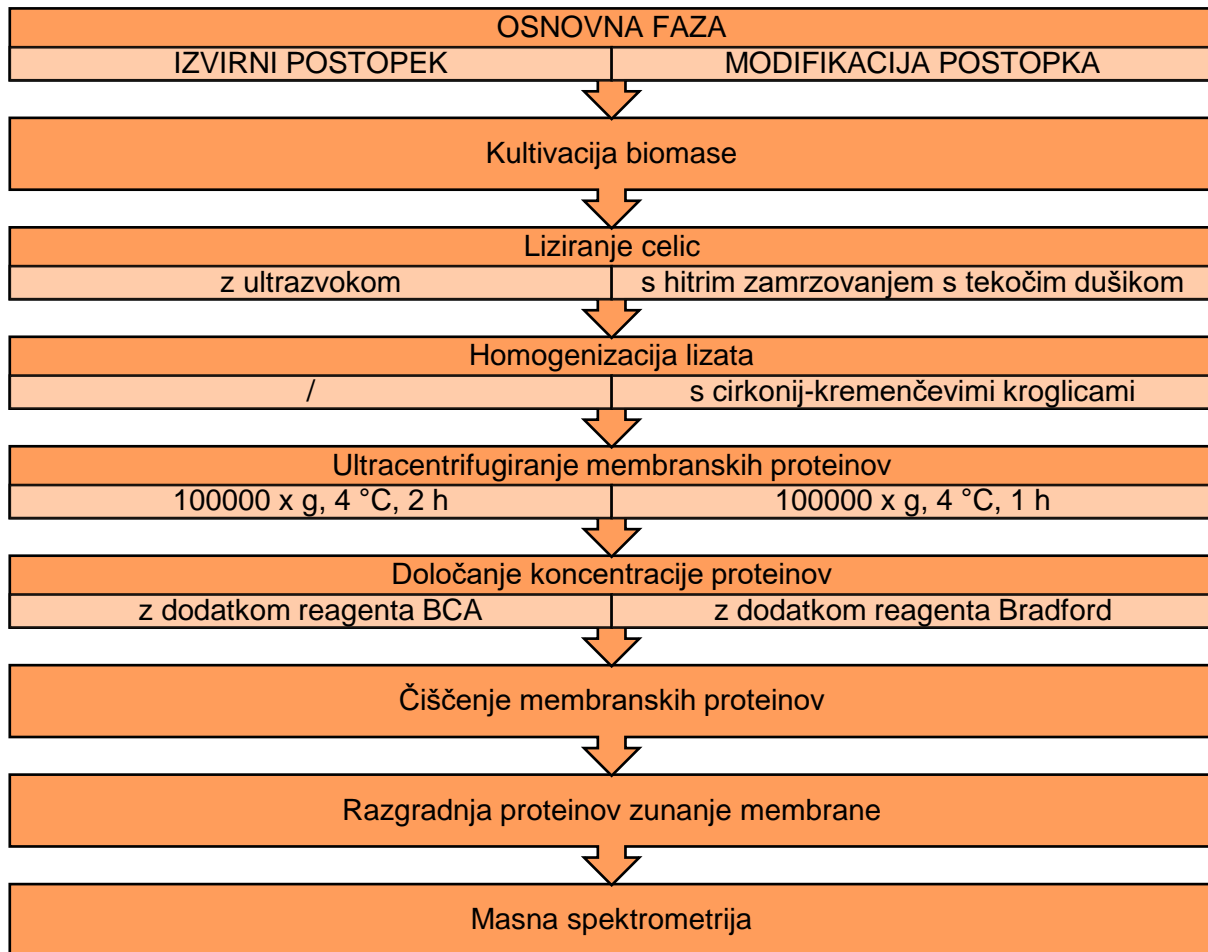
Membranski proteini predstavljajo manjši delež proteinskega profila, a sodelujejo pri ključnih interakcijah z ostalimi celicami v biofilmu, s površino in z gostiteljskimi celicami. Identifikacija specifičnih proteinov predstavlja potencialne tarče za študij interakcij ter alternativne strategije nadzora nad patogenimi bakterijami. Namen eksperimenta je bil raziskati proteinski profil bakterij *C. jejuni* v zrelem biofilmu po 48 h na gojišču MHA pri temperaturah 42 °C in 37 °C.

#### 3.1 Optimizacija izolacije membranskih proteinov bakterij

V literaturi zasledimo več postopkov izolacije membranskih proteinov bakterij. Pri odločitvi za izbiro primernega postopka je potrebno upoštevati več dejavnikov:

- (i) Izbira postopka oz. prilagoditev za preiskovani mikroorganizem, npr. bakterije;
- (ii) Izbira postopka glede na željeno koncentracijo in volumen proteinov v končnem vzorcu;
- (iii) Izbira postopka glede na zahteve masnega spektrometra pri končni analizi profila proteinov, npr. neuporaba/substitucija nekaterih reagentov ali kemikalij pred analizo na masnem spektrometru, saj lahko motijo in popačijo rezultate analize.

Za izolacijo membranskih proteinov bakterij *C. jejuni* smo izbrali postopek, ki so ga objavili Shoaf-Sweeney in sod. (2008), z nekaj modifikacijami, prikazanimi na Sliki 1.



**Slika 1:** Faze izbranega modificiranega postopka izolacije membranskih proteinov.

Da bi izboljšali izkoristek ekstrakcije proteinov v fazi lize celic, smo postopek modificirali z uporabo hitrega zamrzovanja s tekočim dušikom in mehanskega homogeniziranja. Membranski proteini so predstavljali manjši delež celotnega surovega ekstrakta, zato je bilo za ekstrakcijo membran potrebno zagotoviti visoko stopnjo popolne lize celic. Druga modifikacija je bila vezana na pelet po ultracentrifugiranju. Ta je vseboval zunanjo in notranjo membrano. Slednjo smo po našem modificiranem postopku raztopili z dodatkom 2 % natrijevega lavril sarkosinata ter tako izboljšali topnost membrane. Izvirni postopek je predlagal posedanje zunanje membrane z 2 h ultracentrifugiranjem, a smo z dodatkom 2 % natrijevega lavril sarkosinata dosegli zadostno količino peleta že s centrifugiranjem 30 min,  $15600 \times g$  na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2 Proteomska analiza membranskih proteinov

Po optimizaciji ter izolaciji smo proteine identificirali z masno spektrometrijo ter jih kvantificirali. Rezultati prisotnih membranskih proteinov pri bakterijah *C. jejuni*, prisotnih v največji količini pri obeh testiranih temperaturah, so zbrani v Preglednici 1. Zbrani proteini spadajo, glede na literaturo, v raznolike skupine porinov, flagelarnih proteinov, šaperonov in lipoproteinov. Naši rezultati nakazujejo pomemben vpliv temperature na količino in pestrost izražanja membranskih in transmembranskih proteinov. S simulacijo temperatur dveh različnih gostiteljev, perutnine pri  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  in človeka pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , smo tako pridobili vpogled v sestavo membranskih proteinov v zrelem biofilmu. Preglednico 1 smo dopolnili tudi z dokazanimi

vlogami ali vključenostjo proteinov v posamezne procese, kot je adhezija, tvorba biofilma ali virulentnost.

**Preglednica 1:** Proteini zunanje membrane, identificirani in kvantificirani pri dveh temperaturah rasti; pripadajoči gen, ter njegova vloga ali vključenost v procese pomembne za tvorbo biofilma.

<i>Proteini zunanje membrane</i>	<i>Gen</i>	<i>Vloga gena v procesih</i>
Poglavitni protein zunanje membrane	porA	Porin, transport ionov, adhezija (Moser in sod., 1997)
Flagelin A	flaA	Giblljivost, virulenca, adhezija (Mahdavi in sod., 2014); tvorba biofilma (Melo in sod., 2017); adhezija, medcelična komunikacija za tvorbo pelikla (Kalmokoff in sod., 2006)
Flagelin B	flaB	Giblljivost, virulenca, adhezija (Mahdavi in sod., 2014); adhezija, medcelična komunikacija za tvorbo pelikla (Kalmokoff in sod., 2006)
Flagelarni sestavljalni protein FliW	fliW	Regulacija biosinteze flagelinov in njihove sekrecije (Radomska in sod., 2017)
Fibronektin, vezni protein zunanje membrane	cadF	Adhezija in invazija v gostiteljsko celico (Talukdar in sod., 2020)
Flagelin C	flaC	Adhezija in invazija gostiteljske celice (Song in sod., 2004); moduliranje imunskega sistema (Faber in sod., 2015)
Lipoprotein zunanje membrane MapA	mapA	Kolonizacija prebavil perutnine, fitnes faktor (Johnson in sod., 2014)

V nadaljevanju smo primerjali količino proteinov pri temperaturi 42 °C, ki je optimalna za rast bakterij *C. jejuni*, ter jo primerjali s količino proteinov, prisotnih pri 37 °C. Večino navedenih proteinov v Preglednici 1, in sicer proteini PorA, flagelinA, flagelinB, FliW in cadF, so bili prisotni pri obeh uporabljenih temperaturah, a v različnih koncentracijah. Zaznali smo manjšo koncentracijo obeh porinov PorA (1,6-krat) ter CadF (2,3-krat) pri 37 °C.

Povečano koncentracijo smo zaznali pri flagelinu A (1,6-krat) in flagelinu B (1,1-krat). Oba sta regulirana s proteinom FliW, ki se veže na protein CsrA, ter mu tako prepreči represijo translacije gena flaA in flaB. Torej prisotnost proteina FliW poveča prisotnost omenjenih dveh flagelinov. Kot je znano se protein FliW veže tudi na flageline in sodeluje pri tvorbi bička (Radomska in sod. 2016). Pridobljeni rezultati ne potrjujejo navedene povezave med proteinom FliW s flagelinom A in flagelinom B, saj je bila koncentracija proteina FliW manjša (0,7-krat), a smo zaznali povišani koncentraciji flagelina A in flagelina B. Ena izmed možnosti je tudi ta, da se procesi nastanka bičkov ter njihove regulacije razlikujejo glede na starost biofilma. Proteina flagelin A in flagelin B sta pomembna v prvih fazah tvorbe biofilma, in sicer pri adheziji celic na površino, zato bi pričakovali večjo koncentracijo le teh ter povečano koncentracijo regulatorja FliW. Biofilm po 48 h že prehaja v fazo zrelega biofilma in zato flagelarna proteina izgubljata na pomembnosti, kar nakazuje tudi nižja koncentracija regulatorja FliW. V nadaljevanju bomo to preverili z vzorčenjem biofilma v različnih starostnih stopnjah in tako pridobili dinamiko spreminjanja proteinskega profila celic znotraj biofilma.

Glede na rezultate, podane v Preglednici 1, pa lahko izpostavimo tudi dva unikatna proteina, ki sta bila prisotna le pri temperaturi 42 °C. Prvi je protein MapA s pomembno vlogo pri kolonizaciji perutninskega prebavnega trakta. Johnson in sod. (2014) so pokazali, da ima mutant  $\Delta mapA$  ob mešani kolonizaciji z divjim sevom slabšo sposobnost rasti. Drugi je protein flagelin C, ki lahko preko receptorja TLR5 (Toll-like receptor 5) vpliva na imunski sistem gostitelja (Faber in sod. 2015). Potencialni razlog za njegovo odsotnost je sekrecijsko delovanje aparata flagelarnega tipa III. Ta izloča flagelin C v okolico celice, ki jo večkrat speremo pred lizo celic in tako potencialno odstranimo v okolici prisotne proteine.

Proteini v Preglednici 1 imajo kompleksne funkcije s sekundarnimi vlogami. Njihovo vlogo pri adheziji ali tvorbi biofilma je možno potrditi tudi preko priprave mutant, ki se jim odstrani izbrani gen (»*knock out*« mutante), zato le-te niso sposobne tvoriti določenega proteina. Nato spremljamo njihovo sposobnost adhezije, invazije ali tvorbe biofilma v primerjavi z divjim sevom ter ovrednotimo vpliv genske mutacije na lastnosti celic (Moser in sod., 1997; Kalmokoff in sod., 2006; Mahdavi in sod., 2014; Melo in sod., 2017; Talukdar in sod., 2020).

#### 4 SKLEPI

Zaključimo lahko, da imajo bakterije *C. jejuni* specifičen membranski profil proteinov, ki ima pomembno vlogo pri optimalni prilagoditvi na temperature prebavnih traktov gostiteljev. Simulacija dveh različnih gostiteljev, perutnine pri 42 °C in človeka pri 37 °C, je pokazala prisotnost istih proteinov, vključenih v kolonizacijo na površinah, a v različni koncentraciji. Nekateri od izpostavljenih proteinov imajo dokazano tudi sekundarno vlogo kot virulentni dejavniki z vlogo v patogenosti.

Proteomika nam omogoča vpogled v celične procese na molekularnem nivoju ter spremljanje prilagajanja s prehodom celic v odporno stanje biofilma. Membranski proteini sodelujejo pri različnih interakcijah z ostalimi bakterijami v biofilmu, s površino in s celicami gostitelja. Pri bakterijah *C. jejuni* pa identiteta, funkcije in sekundarne vloge vseh membranskih proteinov še niso raziskane v celoti. Te manjkajoče informacije usmerjajo naše nadaljnje raziskave, ki nam bodo pomagale podrobneje razumeti posamezne in morda specifične faze adhezije in tvorbe biofilma, preko katerih bomo spoznali njihovo pomembnost v patogenezi. Tako bomo lahko podali nove potencialne tarče znotraj celic, na katerih bo razvita alternativna strategija obvladovanja te patogene bakterije.

#### ZAHVALA

Za financiranje se zahvaljujemo agenciji ARRS (projekt št. J4-9299), ter EU H2020 (Instruct-ULTRA, št. 731005) in sodelavcem projekta.

#### 5 VIRI

- Faber, E., Gripp, E., Maurischat, S., Kaspers, B., Tedin, K., Menz, S., ... Josenhans, C. (2015). Novel immunomodulatory flagellin-like protein FlaC in *Campylobacter jejuni* and other *Campylobacteriales*. *mSphere*, 1(1), e00028-15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00028-15>
- Johnson, J. G., Livny, J., DiRita, V. J. (2014). High-throughput sequencing of *Campylobacter jejuni* insertion mutant libraries reveals *mapA* as a fitness factor for chicken colonization. *Journal of Bacteriology*, 196(11), 1958–1967. <https://doi.org/10.1128/JB.01395-13>
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T. L., Foss, M., Lau, P. C., Sanders, G., ... Szymanski, C. M. (2006) Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4312-4320. doi: 10.1128/JB.01975-05. <https://doi.org/10.1128/JB.01975-05>
- Mahdavi, J., Pirinccioglu, N., Oldfield, N. J., Carlsohn, E., Stoof, J., Aslam, A., ... Ala'Aldeen D. A. A. (2014). A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biology*, 4(1), 130202. <https://doi.org/10.1098/rsob.130202>

- Melo, R. T., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Siqueira, M. C., Pereira, C. B., Peres, P. A. B. M., ... Rossi, D. A. (2017). Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 18(8), 1332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>
- Mihaljevic Rubesa, R., Sikic, M., Klančnik, A., Brumini, G., Mozina, S. S., Abram, A. (2007) Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 43(2-3),120-125. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.03.004>
- Moser, I., Schroeder, W., Salnikow, J. (1997). *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein and a 59-kDa protein are involved in binding to fibronectin and INT 407 cell membranes. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 233–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12778.x>
- Oh, E. in Jeon, B. (2014). Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 9(1), e87312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087312>
- Radomska, K. A., Ordoñez, S. R., Wösten, M. M. S. M., Wagenaar, J. A., van Putten, J. P. M. (2016). Feedback control of *Campylobacter jejuni* flagellin levels through reciprocal binding of FliW to flagellin and the global regulator CsrA. *Molecular Microbiology*, 102(2), 207-220. <https://doi.org/10.1111/mmi.13455>
- Radomska, K. A., Wösten, M. M. S. M., Ordoñez, S. R., Wagenaar, J. A., van Putten, J. P. M. (2017). Importance of *Campylobacter jejuni* FliS and FliW in flagella biogenesis and flagellin secretion. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01060>
- Shagieva, E., Teren, M., Michova, H., Strakova, N., Karpiskova, R., Demnerova, K. (2020). Adhesion, biofilm formation, and luxS sequencing of *Campylobacter jejuni* isolated from water in the Czech Republic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 596613. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.596613>
- Shoaf-Sweeney, K. D., Larson, C. L., Tang, X., Konkel, M. E. (2008). Identification of *Campylobacter jejuni* proteins recognized by maternal antibodies of chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 6867–6875. <https://doi.org/10.1128/AEM.01097-08>
- Song, Y. C., Jin, S., Louie, H., Ng, D., Lau, R., Zhang, Y., ... Chan, V. L. (2004). FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Molecular Microbiology*, 53(2), 541-553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04175.x>
- Talukdar, P. K., Negretti, N. M., Turner, K. L., Konkel, M. E. (2020). Molecular dissection of the *Campylobacter jejuni* CadF and FlpA virulence proteins in binding to host cell fibronectin. *Microorganisms*, 8(3), 389. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030389>
- Wells, J. M., Bennik, M. H. J. (2007). Genomics of food-borne bacterial pathogens. Cambridge University Press. *Nutrition Research Reviews*, 16(1), 21–35. 10.1079/NRR200358

## Vpliv frekvence vrtenja na nastanek in na propad peliklov bakterije

### *Bacillus subtilis*

Mojca KRAJNC<sup>1\*</sup>, Polonca ŠTEFANIČ<sup>1</sup>, David STOPAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [mojca.krajnc@bf.uni-lj.si](mailto:mojca.krajnc@bf.uni-lj.si)

### **Vpliv frekvence vrtenja na nastanek in na propad peliklov bakterije *Bacillus subtilis***

**Izveček:** Biofilmi nudijo celicam zaščito pred plenilci in hitrimi, ekstremnimi spremembami okolja. Glavno vlogo pri zaščiti igra zunajcelični polimerni material (EPS), ki celicam omogoči vzpostavitev povezav, lahko nevtralizira ali veže protimikrobna sredstva in nudi mehansko stabilnost. V tej raziskavi nas je zanimalo, pri kateri sili biofilm izgubi sposobnost prenašanja mehanske obremenitve, oziroma kdaj pride do zloma oz. propada. Plavajoče biofilme oz. pelikle bakterije *B. subtilis* smo izpostavili delovanju centrifugalne sile, bodisi med gojenjem bakterij ali že formiranih peliklov. Stabilnost biofilmov smo preverjali v odvisnosti od frekvence vrtenja in površine za razvoj pelikla. Iz pridobljenih rezultatov smo izračunali pretržno napetost, ki jo je pelikel še lahko zdržal pred propadom. Ugotovili smo, da na stabilnost pelikla na interfazi tekočina-zrak močno vpliva dostopna površina, na kateri lahko raste pelikel, saj so biofilmi, ki so rasli v manjših gojitvenih posodicah, prenesli  $7 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ , kar je 2,3 krat več kot biofilmi, ki so bili gojeni pri največji površini interphase tekočina-zrak. Za preprečitev nastanka pelikla so bile potrebne nižje frekvence vrtenja in nižje pretržne napetosti, kot smo jih izmerili pri propadu že formiranih peliklov.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*; pelikel; dostopna površina; frekvenca vrtenja; pretržna napetost

### **Influence of rotational frequency on the formation and decay of *Bacillus subtilis* pellicles**

**Abstract:** Biofilms offer their cells protection from predators and rapid, extreme changes in the environment. The main role in protection is played by extracellular polymeric substances (EPS), which allow cells to connect and interact with each other, can neutralize or bind antimicrobial agents, and provide mechanical stability. In this research, we were interested in force at which the biofilm loses its ability to withstand mechanical stress, or when a fracture occurs. Floating biofilms or pellicles produced by *B. subtilis* were exposed to centrifugal force, either during the cultivation of bacteria or already formed pellicles. The stability of the biofilms was investigated as a function of rotational frequency and the accessible surface for pellicle development. From the obtained data, we calculated the breaking stress that the pellicle could still withstand before it collapsed. We found that the stability of the pellicle at the liquid-air interphase is strongly influenced by the accessible surface on which the pellicle can form and grow, as biofilms grown in smaller dishes were able to withstand stress of  $7 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ , which is 2,3 times more than biofilms, which were grown at the largest surface of the liquid-air interphase. To prevent pellicle formation, lower rotational frequencies and lower breaking stress were required as for the fracture of already formed pellicles.



**Key words:** *Bacillus subtilis*; pellicle; accessible surface; rotational frequency; breaking stress

## 1 UVOD

Oblikovanje in nastanek biofilma je proces, pri katerem se mikroorganizmi vežejo na površino, rastejo in izločajo zunajcelične polimerne snovi (EPS, angl. *extracellular polymeric substances*), ki olajšajo vezavo celic in tvorbo matriksa. Na celice v biofilmu vplivajo različni okoljski pogoji, kar vodi v diferenciacijo celic (de Kievit in sod., 2001) ter nastanek različnih morfoloških struktur (McLoon in sod., 2011; Branda in sod., 2005). Celice v biofilmu imajo spremenjen fenotip (Donlan, 2001). Nastanek in razvoj biofilma je primerljiv z razvojem celičnih tkiv v večceličnih organizmih (Shapiro, 1998).

Biofilmi nudijo celicam zaščito pred plenilci in hitrimi, ekstremnimi spremembami okolja. Preživetje bakterij v biofilmih je odvisno od več dejavnikov (Jefferson, 2004; Hall-Stoodley in sod., 2004). Glavno vlogo pri zaščiti igra EPS, ki celicam omogoči vzpostavitev povezav (de Kievit in sod., 2001), nudi mehansko stabilnost (Wingender in sod., 1999), lahko nevtralizira ali veže protimikrobna sredstva (Dibdin in sod., 1996). Zunajcelični matriks dodatno ščiti celice pred pomanjkanjem hranil, spremembami pH, kisikovimi radikali, dezinfekcijskimi sredstvi in antibiotiki. K odpornosti na protimikrobne snovi prispeva tudi upočasnjena rast bakterij v združbi (Hoyle in sod., 1992). Prav tako pa zunajcelični matriks biofilma zagotavlja odpornost na mehanski stres (Boudarel in sod., 2018), kot je na primer strižni stres in tlak vode v vodnih okoljih (Peterson in sod., 2015).

Za obstoj biofilmov je ključno, da so odporni na mehanske obremenitve. Zato morajo izražati določeno stopnjo elastičnosti, prav tako pa se morajo biti sposobni prilagoditi na mehanski stres in se obnašati kot viskoelastični material. To pomeni, da pri deformaciji združujejo tako lastnosti viskozne kot elastičnega materiala (Charlton in sod., 2019). Če na polimere z visoko molekulsko maso, kot je npr. EPS, delujemo z mehansko silo in posledično pride do sprememb v konformaciji makromolekul, se elastično akumuliranje energije kaže kot sposobnost polimernih verig, da se po odstranitvi napetosti vrnejo v začetno stanje (Barnes in sod., 1989; Capurro in Barberis, 2014). Viskoelastičnost določajo tako bakterijske celice kot zunajcelični matriks in interakcije med njimi (Peterson in sod., 2015), prav tako pa tudi konformacija celičnih verig ter preplet in zamreženje EPS (Pen in sod., 2015). V kolikor na biofilm deluje premočan mehanski stres oz. premočna sila/napetost, lahko pride do trajne deformacije ali porušitve biofilma. V tem primeru biofilm izgubi svojo elastičnost in se popolnoma deformira, lahko tudi pretrga. Pri preseženi strižni ali natezni napetosti biofilma polimerne verige začnejo viskozno drseti druga mimo druge, kar deformira material (Barnes in sod., 1989; Larson, 1999) in lahko v končni instanci privede do trganja biofilma.

V tem delu smo proučili vpliv delovanja centrifugalne sile med gojenjem bakterij na zmožnost nastanka pelikla, kot tudi vpliv centrifugalne sile na obstojnost že formiranih peliklov. Stabilnost biofilmov smo preverjali v odvisnosti od frekvence vrtenja in površine nastalega pelikla.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Bakterijski sevi in priprava prekonočne kulture

Uporabili smo bakterijski sev *Bacillus subtilis* PS-216 wt (Štefanič in Mandić-Mulec, 2009). Bakterijski sev PS-216 smo imeli shranjen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sev smo s cepilno zanko prenesli na trdno agarsko gojišče LB (Laboratorios Conda S.A., Španija: tripton 1,0 % (w/v); kvasni ekstrakt 0,5 % (w/v); NaCl 0,5 % (w/v), agar 1,5 % (w/v)) in agarske plošče inkubirali 20 h pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v zaprti plastični posodi. Prekonočno kulturo smo pripravili tako, da smo v 5 ml tekočega gojišča LB (Laboratorios Conda S.A., Španija): tripton 1,0 % (w/v); kvasni ekstrakt 0,5 % (w/v); NaCl 0,5 % (w/v)) s cepilno zanko prenesli eno kolonijo seva PS-216 wt in preko noči (16 h) inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 200 obr./min do  $\text{OD}_{650} \sim 1,8$  a.u.

### 2.2 Vpliv frekvence vrtenja na propad pelikla

Biofilme smo gojili na orbitalnem stresalniku (Tehtnica, Slovenija). Za določanje vpliva frekvence vrtenja na propad pelikla smo sev PS-216 inkubirali do nastanka pelikla. V sterilne Erlenmajerice različnih volumnov (25 ml, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 250 ml, 500 ml) smo dodali 1/5 volumna tekočega gojišča MSgg ter 1 % inokulum prekonočne kulture in jih zatesnili s celuloznimi zamaški in aluminijasto folijo. Vzorce smo nato inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 h brez stresa. Po nastanku pelikla smo vzorce najprej stresali za 1 h na 25 obr./min ter določili ali je prišlo do propada pelikla ali ne. Naslednjo uro smo vzorce stresali pri 50 obr./min. Vsako naslednjo uro smo povečali število obratov za 10 obr./min do 140 obr./min, oziroma do porušitve biofilma. Na ta način smo določili maksimalno frekvenco vrtenja, pri kateri pelikel še ni propadel. S pridobljeno maksimalno frekvenco vrtenja smo izračunali kotno hitrost po Enačbi 1:

$$a_r = 2\pi v \left[ \frac{1}{s} \right], \quad \dots \quad (1)$$

kjer  $v$  predstavlja maksimalno frekvenco vrtenja, kjer se struktura biofilma še ne poruši.

Radialni ali centripetalni pospešek smo izračunali po Enačbi 2:

$$a_r = \omega^2 r_r \left[ \frac{m}{s^2} \right], \quad \dots \quad (2)$$

kjer  $r_r$  predstavlja radij rotorja, s katerim se stresalnik vrti oz. maksimalno amplitudo stresalnika. Reakcijsko silo, ki še omogoča obstoj biofilma, smo izračunali z drugim Newtonovim zakonom po Enačbi 3:

$$F = m a_r \left[ \frac{N}{m^2} \right], \quad \dots \quad (3)$$

kjer  $F$  predstavlja silo, ki deluje na pelikel z dano maso  $m$ . Mehanska napetost, ki deluje na material, predstavlja silo na enoto površine. Največja napetost, ki jo material lahko zdrži, preden se zlomi oz. propade, je pretržna napetost ali končna natezna napetost (angl. *breaking stress*,  $B_s$ ). Pretržno napetost smo izračunali po Enačbi 4:

$$B_s = \frac{F}{A} \left[ \frac{N}{m^2} \right], \quad \dots \quad (4)$$

kjer  $A$  predstavlja površino pelikla, na katero deluje določena sila  $F$ .

Površino pelikla smo izračunali po Enačbi 5:

$$A = \pi r^2 \quad [m^2] \quad \dots\dots (5)$$

kjer r predstavlja radij Erlenmajerice na višini, kjer je nastal pelikel.

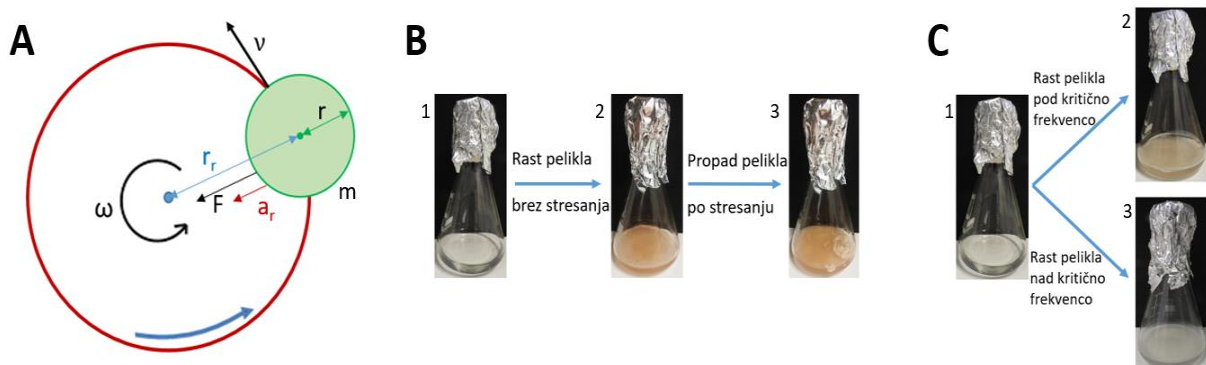
### 2.3 Vpliv frekvence vrtenja na nastanek pelikla

V sterilne Erlenmajerice različnih volumnov (25 ml, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 250 ml, 500 ml) smo dodali 1/5 volumna tekočega gojišča MSgg ter 1 % inokulum prekonočne kulture, jih zatesnili s celuloznimi zamaški in aluminijasto folijo ter vse vzorce inkubirali pri 37 °C 24 h pri 25 obr./min. Erlenmajerice tistih dimenzij, v katerih pelikel ni nastal, smo izločili iz nadaljnjega eksperimenta. Iz ostalih Erlenmajeric smo po inkubaciji nastale pelikle zavrgli, Erlenmajerice oprali, sterilizirali in v njih pripravili sveže vzorce - dodali 1/5 volumna tekočega gojišča MSgg ter 1 % inokulum prekonočne kulture, zatesnili s celuloznimi zamaški in aluminijasto folijo ter vzorce inkubirali pri 37 °C 24 h pri 50 obr./min. Za vsak naslednji poskus smo pripravili sveže vzorce ter povečali število obratov za 10 obr./min do končnih 110 obr./min, pri katerih v nobeni Erlenmajerici nismo zaznali nastanka pelikla.

### 2.4 Določanje suhe mase nastalega pelikla

Maso suhega pelikla PS-216 smo določali v MSgg gojišču, ki smo ga pripravili po recepturi Branda in sod. (2001; MOPS 100 mM; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM; triptofan 50 mg/l; fenilalanin 50 mg/l; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2mM; natrijev glutamat 0,5 % (w/v); glicerol 0,5 % (w/v); CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 700 μM; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 μM; MnCl<sub>2</sub> 50 μM; ZnCl<sub>2</sub> 1 μM; tiamin hidroklorid (vitamin B1) 2 μM). V sterilne Erlenmajerice različnih volumnov (25 ml, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 250 ml, 500 ml) smo dodali 1/5 volumna tekočega gojišča MSgg ter 1 % inokulum prekonočne kulture jih zatesnili s celuloznimi zamaški in inkubirali pri 37 °C 24 h brez stresanja. Po 24 h smo iz Erlenmajeric s stekleno pipeto previdno odstranili tekočino in nastali pelikel prenesli v predhodno stehtane sterilne centrifugirke. Vzorce smo sušili 48 h pri 60 °C. Po sušenju smo vzorce vzeli iz pečice, ohladili na sobno temperaturo in jih skupaj s centrifugirkami stehtali na analitski tehtnici ter preračunali maso suhega pelikla.

Vse eksperimente smo izvedli v treh bioloških in šestih tehničnih ponovitvah.



**Slika 1:** Eksperimentalna shema. A) shematski prikaz delovanja sil med vrtenjem Erlenmajerice na orbitalnem stresalniku, kjer v predstavlja frekvenco vrtenja,  $\omega$  kotno hitrost pri dani frekvenci,  $r_r$  polmer rotorja orbitalnega stresalnika,  $r$  polmer Erlenmajerice (na višini, kjer je nastal pelikel),  $a_r$  radialni ali centripetalni pospešek in  $F$  radialno silo, ki deluje na Erlenmajerico in posledično na interfazo tekočina-zrak, B) eksperiment, kjer smo določevali vpliv frekvence vrtenja na propad biofilma v tekočem gojišču (1) pri izbrani velikosti interfaze tekočina-zrak brez stresanja med rastjo pelikla (2) in propad dozorelega biofilma po stresanju (3), C) shema

eksperimenta, kjer smo določevali vpliv frekvence vrtenja na nastanek biofilma v tekočem gojišču (1) pri izbrani velikosti interfaze tekočina-zrak pod kritično frekvenco stresanja (2), oziroma nad kritično frekvenco stresanja (3).

### 3 REZULTATI

#### 3.1 Vpliv frekvence vrtenja na propad pelikla

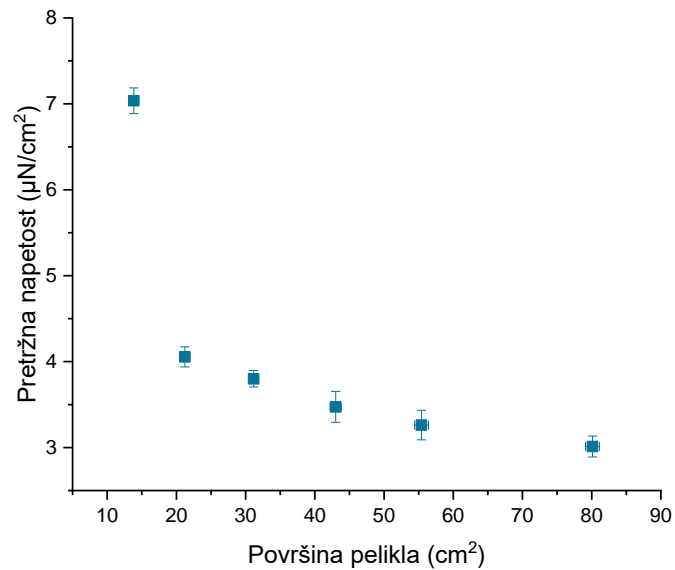
Z izpostavitvijo formiranega pelikla vrtenju se je v prerezu pelikla razvila določena notranja napetost. Pri povečevanju sile, s katero smo delovali na pelikel, je v neki točki naš material izgubil sposobnost prenosa dodatne obremenitve. Največja napetost, pri kateri lahko material zdrži pred propadom/zlomom, imenujemo natezna napetost materiala, napetost, ki je potrebna za propad pelikla, pa imenujemo pretržna napetost.

Stabilnost pelikla je bila odvisna tako od površine, na kateri je lahko rasel biofilm, kot od frekvence stresanja (Preglednica 1). Rezultati jasno kažejo, da je z večanjem površine biofilma le ta propadel pri nižjih frekvencah stresalnika. Pri površini interfaze tekočina-zrak 13,9 cm<sup>2</sup> je biofilm propadel šele pri 140 obr./min, medtem ko je biofilm pri površini interfaze 80,1 cm<sup>2</sup> propadel že pri 80 obr./min. Obstoynost filma je bila nelinearno odvisna od površine interfaze tekočina-zrak, kjer je biofilm nastajal.

**Preglednica 1:** Vpliv dostopne površine, na kateri je lahko rasel pelikel in frekvence vrtenja na rast pelikla. S + so označene frekvence vrtenja, kjer je pelikel ostal nepoškodovan na interfazi tekočina-zrak, z znakom – so označene frekvence vrtenja, kjer je prišlo do preloma oz. propada pelikla.

<i>Površina pelikla [cm<sup>2</sup>]</i>	<i>13,9</i>	<i>21,2</i>	<i>31,2</i>	<i>43,0</i>	<i>55,4</i>	<i>80,1</i>
<i>Frekvenca [obr./min.]</i>						
<b>0</b>	+	+	+	+	+	+
<b>25</b>	+	+	+	+	+	+
<b>50</b>	+	+	+	+	+	+
<b>60</b>	+	+	+	+	+	+
<b>70</b>	+	+	+	+	+	+
<b>80</b>	+	+	+	+	+	–
<b>90</b>	+	+	+	–	–	–
<b>100</b>	+	+	–	–	–	–
<b>110</b>	+	–	–	–	–	–
<b>120</b>	+	–	–	–	–	–
<b>130</b>	+	–	–	–	–	–
<b>140</b>	–	–	–	–	–	–

Iz maksimalne frekvence vrtenja, ki jo biofilm lahko prenese, smo izračunali pretržno napetost, ki predstavlja največjo napetost, ki jo biofilm lahko zdrži, preden se zlomi (Slika 2). Maksimalna pretržna napetost je bila značilno višja pri peliklih, ki so bili gojeni v manjših posodicah in so imeli manjšo površino interfaze tekočina-zrak, na kateri je lahko rasel pelikel. Pred zlomom so lahko biofilmi, ki so rasli v manjših gojitvenih posodicah, prenesli 7 μN/cm<sup>2</sup>, kar je 2,3 krat več kot biofilmi, ki so bili gojeni pri največji površini interfaze tekočina-zrak.



**Slika 2:** Pretržna napetost v odvisnosti od površine nastalega pelikla. Prikazani so povprečni rezultati treh bioloških ponovitev in standardna deviacija.

### 3.2 Vpliv frekvence vrtenja na nastanek pelikla

Ker se biofilm med rastjo in dozorevanjem mehansko stabilizira, bi lahko tak biofilm prenesel večjo mehansko silo, kot biofilm, ki šele nastaja in je med rastjo podvržen mehanskim stresom. Da bi testirali to hipotezo, smo suspenzijo bakterijskih celic med inkubacijo stresali pri različnih frekvencah. Nastanek pelikla je bil odvisen tako od površine interfaze tekočina-zrak, kot od frekvence stresanja. Rezultati kažejo, da lahko z dovolj visoko frekvenco stresanja popolnoma zaustavimo nastanek pelikla. Sila, ki je potrebna za preprečitev nastanka biofilma, je bila odvisna od velikosti interfaze tekočina-zrak. Pri največji testirani interfazi je bila rast pelikla zaustavljena pri napetostih, ki so bile višje od  $2,2 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ , medtem ko so biofilmi pri najmanjši površini interfaze tekočina-zrak prenesli več kot  $5,0 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ .

## 4 DISKUSIJA

Življenjski cikel pelikla je sestavljen iz več razvojnih faz. Najprej bakterijske celice migrirajo na interfazo med tekočino in zrakom, nato se inducira celična adhezija in nastanejo številni celični klastri in verige. Skozi čas se njihovo število povečuje, dokler ne zasedejo celotne površine interfaze in ustvarijo enoslojen pelikel. Sledi rast pelikla (ustvarjanje večslojnega pelikla), zorenje s proizvodnjo zunajceličnega matriksa ter na koncu propad nastalega pelikla (Lee in sod., 2019). Glede na proces nastanka pelikla smo predvidevali, da bodo dozoreli biofilmi prenesli večjo mehansko silo, kot filmi, ki šele nastajajo. To hipotezo smo eksperimentalno potrdili.

Propad biofilma je lahko delni - izguba kohezije - ali popoln - izguba kohezije in adhezije. EPS matriks zaradi fizikalno-kemijskih interakcij med komponentami omogoča mehansko stabilnost biofilma. Z oslavitvijo kohezijskih sil se porušijo povezave med biofilmskimi klastri ali polimernimi verigami (Irsfeld in sod., 2014). Ko so mehanske obremenitve pod kritično vrednostjo, se bo biofilm deformiral, ne da bi se zlomil (Boudarel in sod., 2018). V raziskavi smo ugotovili, da je za propad pelikla, ki je rasel pri manjši razpoložljivi interfazi tekočina-zrak, potrebna večja zunanja sila. To kaže, da biofilmi, ki so rasli pri različnih velikostih

interfaze tekočina-zrak, kljub primerljivim pogojem rasti, niso bili enaki. Površinska gostota biofilmov (masa pelikla/enoto površine pelikla) se je značilno razlikovala. Pri največji površini interfaze je bila površinska gostota biofilma skoraj 50 % večja kot pri najmanjši površini interfaze. Več mase na površino pomeni večjo inercijo, na katero je lahko delovala centrifugalna sila in pretrganje pelikla pri manjšem mehanskem stresu. Zdi se, da je pri večji površini za rast pelikla možno bolj raztegniti komponente zunajceličnega matriksa in s tem prej preseči mejno napetost, ki jo lahko zdržijo. S poskusom vpliva mehanskega stresa na propad peliklov smo na celice delovali v stacionarni fazi rasti. V tej fazi so celice veliko bolj prilagojene na okolje in lahko prenesejo večje mehanske obremenitve kot celice v eksponentni fazi rasti (Gao in sod., 2014), prav tako pa je značilnost bakterije *Bacillus subtilis*, da v tej fazi rasti tvori visoko odporne endospore (Moeller in sod., 2008; Dittmann in sod., 2015). Poznano je tudi, da je stabilnost biofilmov odvisna od sestave EPS matriksa, ki se spreminja glede na sev bakterij, pogoje rasti in razpoložljivost hranil (Boudarel in sod., 2018). Številni avtorji (Van Loosdrecht, 1995; Kuchma in sod., 2010; Luo in sod., 2015) so mnenja, da lahko mikroorganizmi znotraj biofilma zaznajo povečanje strižne napetosti in posledično ustvarijo močnejši matriks - npr. s sintezo zunajceličnih polimerov (Van Loosdrecht, 1995) ali diferenciacijo bakterijskih celic, ki povečajo mehansko trdnost biofilma (Boudarel in sod., 2018). Rezultati te raziskave kažejo, da se lahko stabilnost biofilmov na mehanski stres razlikuje tudi glede na razpoložljivo površino za rast, kar do sedaj ni bilo poznano.

Pri dovolj velikem zunanem mehanskem stresu pelikel med rastjo bakterijske kulture sploh ne nastane. To kaže, da je v začetnih fazah razvoja pelikla zelo občutljiv na mehanski stres. Podobno kot pri razpadu razvitih biofilmov je bilo tudi preprečevanje nastanka pelikla odvisno od razpoložljive površine za rast. Pri manjši razpoložljivi površini za rast so se pri višjih frekvencah stresanja pelikli še vedno lahko razvili, medtem ko se pri teh pogojih biofilmi, ki so rasli na večji interfazni površini, niso uspeli formirati. V kolikor je bila frekvenca stresanja pod kritičnimi vrednostmi, je kljub vneseni energiji pelikel lahko nastal. Krhke začetne medcelične povezave (začetni klastri in verige) so se v tem primeru lahko vzpostavile in z nadaljnjo rastjo in produkcijo zunajceličnega matriksa utrdile. Ko so bile kritične vrednosti presežene, je prišlo do porušanja šibkih povezav v novo nastajajočih agregatih pelikla ter zaustavitve rasti in nastanka biofilma na interfazi tekočina-zrak.

Biofilmi po eni strani predstavljajo resne težave v medicini, kjer lahko kolonizirajo medicinske pripomočke in povečujejo bolnišnične okužbe (Busscher in sod., 2017), po drugi strani pa so lahko za človeštvo zelo koristni, saj jih uporabljamo v biotehnologiji, npr. pri čiščenju odpadnih voda (Martin in Nerenberg, 2012), bioremediaciji, sintezi biogoriv in nanomaterialov (Ng in sod., 2015). Razumevanje mehanizmov, ki uravnavajo nastanek, zorenje in nenazadnje propad biofilmov je zato ključno tako za ustrezen nadzor škodljivih biofilmov kot tudi za izkoriščanje biotehnološko koristnih biofilmov.

## 5 SKLEPI

- Na stabilnost peliklov na interfazi tekočina-zrak značilno vpliva razpoložljiva površina za rast pelikla kot tudi frekvenca vrtenja.
- Z dovolj visoko frekvenco stresanja lahko popolnoma zaustavimo nastanek pelikla.
- Maksimalna pretržna napetost je višja pri peliklih, ki so gojeni pri manjši razpoložljivi površini.

- Formiran biofilm lahko prenese večjo mehansko silo, kot biofilm, ki je šele v procesu nastajanja in je med rastjo podvržen mehanskim stresom.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, ki je omogočila pripravo raziskave v okviru programa Mladi raziskovalec [šifra raziskovalca: 53622] ter Programski skupini P4-0116: Mikrobiologija in biotehnologija živil, pod okriljem katere smo raziskavo izvedli.

## 6 VIRI

- Barnes, H. A., Hutton, J. F., Walters, K. (1989). *An introduction to rheology*. 1st ed. Amsterdam, AM: Elsevier Science B.V.
- Boudarel, H., Mathias, J. D., Blaysat, B., Grédiac, M. (2018). Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: Analysis and critical review. *Nature Partner Journal Biofilms and Microbiomes*, 4(17), e8875. <https://doi:10.1038/s41522-018-0062-5>
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20-26.
- Busscher, H. J. van der Mei, H. C., Subbiahdoss, G., Jutte, P. C., van den Dungen, J. J. A. M., Zaat, S. A. J., ... Grainger, D. W. (2012). Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Science Translational Medicine*, 4(153), 153rv10. <https://doi:10.1126/scitranslmed.3004528>
- Capurro, M. & Barberis, F. (2014). Evaluating the mechanical properties of biomaterials. In P. Dubruel & S. V. Vlierberghe (Eds.), *Biomaterials for bone regeneration—novel techniques and applications* (pp. 270-323). Amsterdam, AM: Elsevier Ltd.
- Charlton, S. G. V., White, M. A., Jana, S., Eland, L. E., Jayathilake, P. G., Burgess, ... Curtis, T. P. (2019). Regulating, measuring, and modeling the viscoelasticity of bacterial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 201(18), e00101-19. <https://doi:10.1128/JB.00101-19>
- De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B. H. (2001). Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1865–1873.
- Dibdin, G. H., Assinder, S. J., Nichols, W. W., Lambert, P. A. (1996). Mathematical model of beta-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released beta-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38(5), 757–769.
- Dittmann, C., Han, H.-M., Grabenbauer, M., Laue, M. (2015). Dormant *Bacillus* spores protect their DNA in crystalline nucleoids against environmental stress. *Journal of Structural Biology*, 191(2), 156-164.
- Donlan, M. R. (2001). Biofilm Formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387-1392.
- Gao, S., Lewis, G. D., Ashokkumar, M., Hemar, Y. (2014). Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 446-453.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108.
- Hoyle, B. D., Wong, C. K. W., Costerton, J. W. (1992). Disparate efficacy of tobramycin on  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(11), 1214-1218.

- Irsfeld, M., Prüß, B. M., Stafslie, S. J. (2014). Screening the mechanical stability of *Escherichia coli* biofilms through exposure to external, hydrodynamic shear forces. *Journal of Basic Microbiology*, 54(12), 1403–1409.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163–173.
- Kuchma, S. L., Ballok, A. E., Merritt, J. H., Hammond, J. H., Lu, W., Rabinowitz, J. D., O'Toole, G. A. (2010). Cyclic-di-GMP mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*: the pilY1 gene and its impact on surface-associated behaviors. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 420–430.
- Larson, R. G. (1999). The structure and rheology of complex fluids. 1st ed. Oxford, OXF: Oxford University Press.
- Lee, L. M., Rosenberg, G., Rubinstein, S. M. (2019). A sequence of developmental events occurs underneath growing *Bacillus subtilis* pellicles. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00842>
- Luo, Y., Zhao, K., Baker, A. E., Kuchma, S. L., Coggan, K. A., Wolfgang, M. C., ... O'Toole, G. A. (2015). A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *mBio*, 6(1), e02456-14. <https://doi:10.1128/mBio.02456-14>
- Martin, K. J. & Nerenberg, R. (2012). The membrane biofilm reactor (mbfr) for water and wastewater treatment: principles, applications, and recent developments. *Bioresource Technology*, 122, 83–94.
- McLoon, A. L., Kolodkin-Gal, I., Rubinstein, S. M., Kolter, R., Losick, R. (2011). Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 193(3), 679–685.
- Moeller, R., Horneck, G., Rabbow, E., Reitz, G., Meyer, C., Hornemann, U., Stöffler, D. (2008). Role of DNA protection and repair in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ultrahigh shock pressures simulating hypervelocity impacts. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6682–6689.
- Ng, C. K., Mohanty, A., Cao, B. (2015). Biofilms in bio-nanotechnology. In O. V. Singh (Ed.), *Bio-nanoparticles: biosynthesis and sustainable biotechnological implications* (pp. 83–100). 1st ed. New Jersey, NJ: Wiley-Blackwell.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79.
- Pen, Y., Zhang, Z. J., Morales-García, A. L., Mears, M., Tarmey, E. S., Edyvean, R. G., ... Geoghegan, M. (2015). Effect of extracellular polymeric substances on the mechanical properties of *Rhodococcus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(2), 518–526.
- Peterson, B. W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M. R., Sharma, P. K., ... Busscher, H. J. (2015). Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 2, 234–245.
- Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*, 52, 81–104.
- Štefanič, P. & Mandić-Mulec, I. (2009). Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1756–1764.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., Heijnen, J. J. (1995). Biofilm structures. *Water Science and Technology*, 32(8), 35–43.
- Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H. C. (1999). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. 1st ed. Berlin, B: Springer-Verlag.



## Inhibitorni potencial izbranih izolatov bakterije *Bacillus subtilis* na rast bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Eli PODNAR<sup>1</sup>, Ines MANDIĆ MULEC<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si](mailto:ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si)

### **Inhibitorni potencial izbranih izolatov bakterije *Bacillus subtilis* na rast bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

**Izveček:** Bakterija *Salmonella enterica* serovar Typhimurium je patogena bakterija in pogosta povzročiteljica črevesnih okužb pri živalih in ljudeh. Sposobna je preživeti zunaj gostitelja in je prisotna v različnih ekosistemih. Eden izmed teh ekosistemov so tudi tla, kjer najdemo bakterijo *Bacillus subtilis*. Bakterija *B. subtilis* je sposobna sinteze številnih protimikrobnih spojin in pri tej bakteriji so dokazali protimikrobno delovanje proti številnim vrstam bakterij in prav tako tudi proti bakteriji *S. Typhimurium*. Cilj te raziskave je bil testirati inhibitorni potencial različnih izbranih izolatov bakterije *B. subtilis* iz nabrežja reke Save in rizosfere paradižnika na rast bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028. Bakterije smo gojili na trdnem gojišču TSB, na katerega smo po celotni površini nanegli bakterijo *S. Typhimurium* in nato nacepili kulture različnih izolatov bakterije *B. subtilis*. Rezultati so pokazali, da so vsi izolati bakterije *B. subtilis* zmožni inhibicije rasti bakterije *S. Typhimurium*, kar se pokaže kot cona zbitritve. Predpostavljamo, da do inhibicije pride zaradi sinteze protimikrobnih spojin. Izrabljena gojišča testiranih izolatov *B. subtilis* niso inhibirala rasti patogene bakterije *S. Typhimurium*, verjetno zaradi premajhne koncentracije protimikrobnih spojin v gojišču, če bakterija raste sama.

**Gljučne besede:** *Bacillus subtilis*; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; protimikrobne spojine

### **Inhibitory potential of selected isolates of *Bacillus subtilis* on the growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

**Abstract:** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a pathogenic bacterium and a common cause of intestinal infections in both animals and humans. *Salmonella* survives outside the host and has been isolated from various ecosystems, including soil. Soil is a known habitat of *B. subtilis*, which is capable of synthesizing many antimicrobial compounds during growth. It has been shown that *B. subtilis* antagonizes many species of bacteria including *S. Typhimurium*. The aim of this study was to test the inhibitory potential of selected strains of *B. subtilis* that were isolated from the sandy soil at the bank of the River Sava and the tomato rhizoplane on the growth of *S. Typhimurium* ATCC 14028. Tested bacteria were grown on solid TSB medium, where *S. Typhimurium* was first spread in a thin layer over the agar surface and cultures of different *B. subtilis* isolates inoculated on the top of the lawn. The results showed that all *B. subtilis* isolates are capable of inhibiting the growth of *S. Typhimurium* and that inhibition occurs due to the synthesis of antimicrobial compounds. The spent media of the tested

*B. subtilis* isolates did not inhibit the growth of the pathogenic *S. Typhimurium*, probably due to a low concentration of antimicrobial compounds.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; antimicrobial compounds

## 1 UVOD

Bakterijo *B. subtilis* uvrščamo v deblo *Firmicutes* (Mandic-Mulec in sod., 2015). Je paličasta, gibljiva bakterija in modelni organizem po Gramu pozitivnih bakterij za raziskave stresnega odziva, sporulacije, medcelične signalizacije in razvoja biofilma (Kalamara in sod., 2018). Zaradi svojih značilnosti kot so tvorba dolgo živečih, metabolno neaktivnih endospor, filmotvornosti ter sinteze sekundarnih metabolitov je široko razširjena bakterija, ki jo najdemo v tleh, vodah in prebavilih živali ter ljudi (Ilinskaya in sod., 2017; Caulier in sod., 2019). Raznolikost na nivoju sinteze številnih sekundarnih metabolitov je razvidna v 4-5 % genoma, ki je namenjen sintezi protimikrobnih spojin (Stein, 2005). Te glede na njihovo pot biosinteze in kemijsko strukturo delimo v poliketide (poliene, polietre, makrolide...), hlapne spojine (terpenoide, hlapne spojine, ki vsebujejo dušik ali ogljik), ribosomalne peptide (bakteriocine, encime) in neribosomalno sintetizirane peptide (siderofore, lipopeptide) (Caulier in sod., 2019).

Bakterija *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) sodi v družino Enterobacteriaceae. Je fakultativno anaerobni, paličasti, po Gramu negativni patogen, povzročitelj črevesnih okužb pri živalih in ljudeh, ki uživajo kontaminirano hrano ali vodo (Fàbrega in Villa, 2013). Bakterije iz rodu *Salmonella* najdemo v različnih ekosistemih, vključno s tlemi (Fornefeld in sod., 2017; Mallon in sod., 2018; Schierstaedt in sod., 2020). Pojavnost bakterije *S. enterica* v tleh izhaja iz organskih gnojil, iztrebkov, ostankov rastlin ali namakalne/poplavne vode. Bakterija *S. enterica* lahko v tleh preživi nekaj mesecev – preživetje je odvisno od številnih abiotskih in biotskih faktorjev, kot so tip tal in vrsta organskega gnojila, eksudati korenin in sestava mikrobne združbe (Fornefeld in sod., 2017; Schierstaedt in sod., 2020).

Pri bakteriji *B. subtilis* je dokazano antagonistično delovanje proti nekaterim patogenim bakterijam, kot so na primer *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophilla*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* (Pinchuk in sod., 2001; Teo in Tan 2005; Rivardo in sod., 2009; Loiseau in sod., 2015; Kimelman in Shemesh 2019). Značilnost bakterije *S. Typhimurium* je, da se pojavlja v izbruhih in ob tem prizadene veliko število bolnikov hkrati, kar lahko privede do hospitalizacij ali v hujših primerih celo smrti (Fàbrega in Villa, 2013). Znano je, da sekundarni metabolit bakterije *B. subtilis* surfaktin, inhibira nastanek biofilma bakterije *S. Typhimurium* (Mireles in sod., 2001). Prav tako so pokazali, da imajo nekateri sevi bakterije *B. subtilis* potencialno protimikrobno aktivnost proti sevom iz rodu *Salmonella*, pri čemer tudi inhibirajo nastanek biofilma tega patogena (Tazehabadi in sod., 2021). Glede na to, da imajo sekundarni metaboliti bakterije *B. subtilis* negativni vpliv na rast nekaterih bakterij in gliv (Sansinenea in Ortiz, 2011), predpostavljamo, da imajo tudi potencialno vlogo pri nadzoru patogenov v prehranski verigi.

V tej raziskavi smo testirali različne izolate bakterije *B. subtilis* z namenom ugotavljanja potenciala zaviranja rasti patogene bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Bakterijski sevi

**Preglednica 1:** Uporabljeni bakterijski sevi.

<i>Bakterijski sev</i>	<i>Izolat</i>	<i>Vir</i>
<i>B. subtilis</i> PS-13	Nabrežje reke Save	Stefanič in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-196	Nabrežje reke Save	Stefanič in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-209	Nabrežje reke Save	Stefanič in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-216	Nabrežje reke Save	Stefanič in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> PS-218	Nabrežje reke Save	Stefanič in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i> T14-3	Rizosfera paradižnika	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i> T16-2	Rizosfera paradižnika	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i> T16-5 A	Rizosfera paradižnika	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i> T16-5 B	Rizosfera paradižnika	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i> T16-8	Rizosfera paradižnika	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i> NCIB 3610	/	Branda in sod., 2001
<i>B. subtilis</i> NBRP 168	/	Koo in sod., 2017
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	/	Fields in sod., 1986

### 2.2 Pogoji rasti in priprava kultur

Bakterije smo nacepili v 5 mL tekočega gojišča TSB (Conda, Španija) in gojili preko noči na stresalniku pri temperaturi 37 °C in 200 obratih na minuto. Prekonočne kulture bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028 smo centrifugirali 10 min pri 10000 x g, odlili supernatant ter dodali enak volumen svežega gojišča TSB. Celice smo resuspendirali v svežem gojišču TSB in jih redčili do vrednosti  $OD_{650} = 0,006$ . Tako pripravljen vzorec je vseboval  $10^6$  celic/mL.

Za pripravo izrabljenih gojišč različnih sevov *B. subtilis* smo 1 % (V/V) prekonočne kulture precepili v 5 mL svežega tekočega gojišča TSB in stresali 24 ur na stresalniku pri temperaturi 37 °C in 200 obratih na minuto. Pri bakteriji *B. subtilis* smo izmerili vrednost  $OD_{650}$  prekonočnih kultur in kultur za pripravo izrabljenih gojišč. Vrednosti  $OD_{650}$  so v povprečju imele vrednost okoli 2,5, kar ustreza koncentraciji  $10^8$  celic/mL.

### 2.3 Testiranje vpliva izolatov *B. subtilis* na rast bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028

Pripravili smo trdno gojišče TSB z 1,5 % (m/V) agarjem (Sigma-Aldrich, ZDA) in 40 mL gojišča razlili v petrijevke s premerom 90 mm (Golias Labortehnika, Slovenija). Najprej smo po površini gojišča razmazali 100 µL pripravljene kulture bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028, v kateri je bilo  $10^5$  bakterijskih celic. Na posušeno razmazano kulturo smo nacepili po 2 µL prekonočnih kultur različnih izolatov bakterije *B. subtilis*. Plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C in dokumentirali nastanek cone zavrte rasti testnega seva *S. Typhimurium* s fotografiranjem plošč.

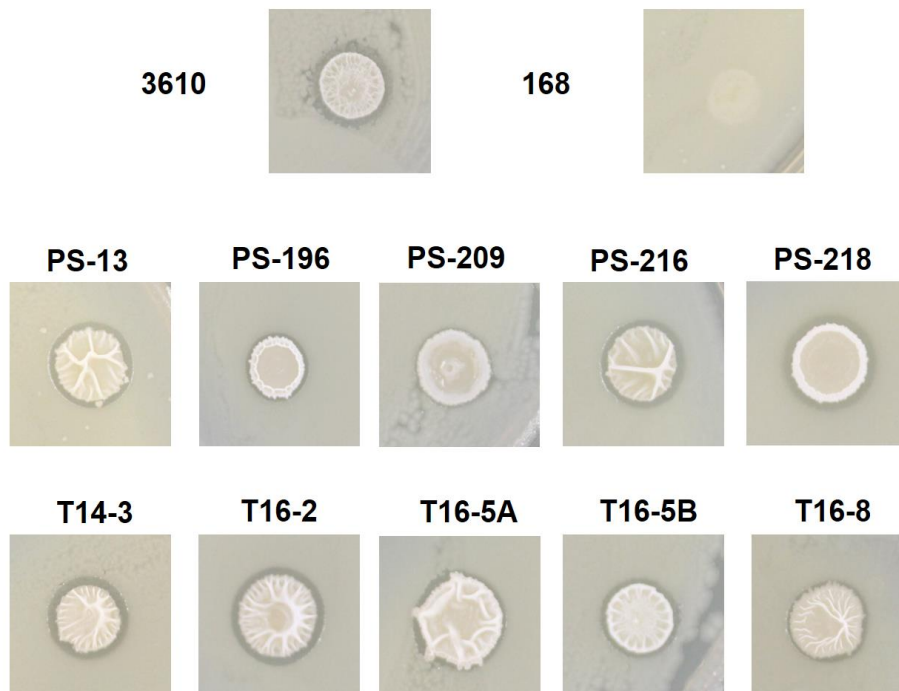
## 2.4 Testiranje vpliva izrabljenega gojišča izolatov *B. subtilis* na rast bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028

Na enak način smo nacepili bakterijo *S. Typhimurium* ATCC 14028 na trdnem gojišču TSB. Za testiranje vpliva izrabljenega gojišča izolatov bakterije *B. subtilis* smo v trdnem gojišču naredili luknje z luknjačem Harris Uni-Core 6,0 (GE Healthcare, Velika Britanija). 24-urne kulture izolatov bakterije *B. subtilis* smo centrifugirali 10 min pri 10000 x g in supernatant sterilno prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,2 µm (Sartorius, Nemčija) ter tako pridobili sterilno izrabljeno gojišče. Po 100 µL sterilnega izrabljenega gojišča smo nacepili v luknje na trdnem gojišču TSB. Plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C.

## 3 REZULTATI

### 3.1 Vpliv izolatov *B. subtilis* na rast bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028

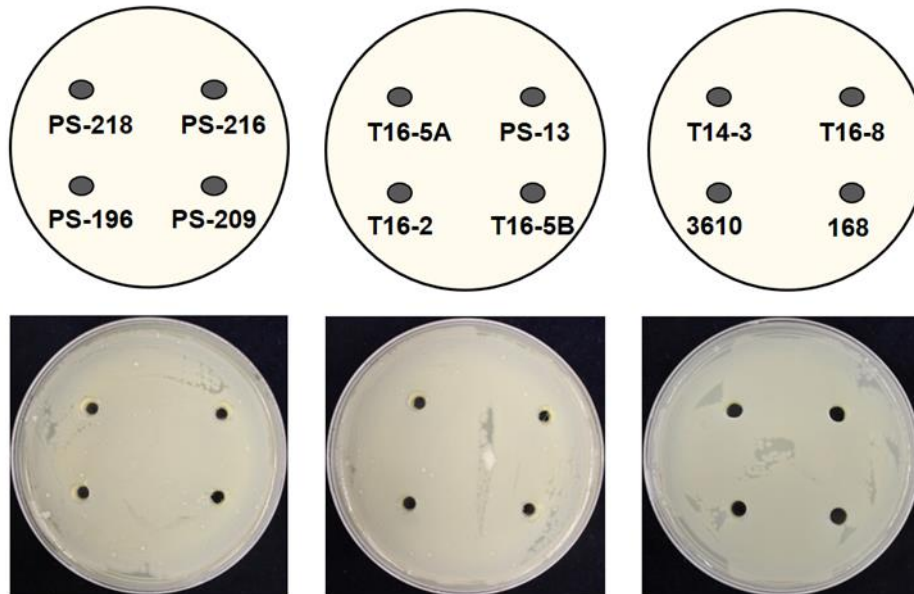
Preverili smo ali izbrani izolati bakterije *B. subtilis* zavirajo rast bakterije *S. Typhimurium* med rastjo bakterij na trdnem gojišču TSB. Na Sliki 1 vidimo, da pri vseh testiranih izolatih bakterije *B. subtilis* pride do nastanka cone zavrte rasti testne kulture *S. Typhimurium*, kar kaže na inhibicijo rasti bakterije *S. Typhimurium*. Kot kontrolo smo uporabili dva seva, in sicer sev 3610, ki tvori robusten biofilm in sintetizira protimikrobne spojine (Nye in sod., 2017) ter sev 168, ki ima mutacije v genih za tvorbo biofilma in sintezo nekaterih sekundarnih metabolitov (surfaktin, bacilen in plipastatin) (Coutte in sod., 2009; McLoon in sod., 2011). Vidimo, da pri pozitivni kontroli (sev 3610) pride do nastanka cone zbistritve okoli kolonije, medtem ko pri negativni kontroli (sev 168) cono zbistritve ne zaznamo. Prav tako pri sevu 168 ne pride do nastanka kompleksne, nagubane kolonije, karakteristične za seve, ki nimajo okvar v genih za sintezo biofilma.



**Slika 3:** Nastanek cone zavrte rasti testne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028 ob kolonijah različnih izolatov bakterije *B. subtilis* na trdnem gojišču TSB po 24 urah inkubacije pri temperaturi 37 °C.

### 3.2 Vpliv izrabljenega gojišča na rast bakterije *S. Typhimurium*

Glede na to, da smo pokazali, da imajo različni izolati bakterije *B. subtilis* zaviralni učinek na rast bakterije *S. Typhimurium*, nas je zanimalo ali tudi njihova izrabljena gojišča vplivajo na rast bakterije *S. Typhimurium*. Seve smo gojili v gojišču TSB in izrabljena gojišča vseh testiranih izolatov nacepili v luknje na trdnem gojišču, na katerega smo predhodno razmazali bakterije *S. Typhimurium*. Na Sliki 2 je v zgornji vrstici shema razporeditve izolatov, spodnja vrstica predstavlja rezultate poskusa, ki pokažejo, da nobeno od izrabljenih gojišč nima zaviralnega učinka na rast bakterije *S. Typhimurium*.



**Slika 2:** Rast bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028 na trdnem gojišču TSB po dodatku izrabljenih gojišč različnih sevov *B. subtilis* po 24 ur inkubacije pri temperaturi 37 °C.

## 4 DISKUSIJA

Cilj raziskave je bil testirati zaviralni potencial različnih izolatov bakterije *B. subtilis* na rast patogene bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028. Vsi testirani izolati, razen negativne kontrole seva 168, so zavirali rast bakterije *S. Typhimurium*. Večja cona zavrte rasti bi lahko pomenila večjo inhibicijo - npr. pri izolatih PS-13, PS-216, PS-218, T14-3, T16-2. Vendar je uporabljena metoda, s katero smo testirali inhibicijo rasti, kvalitativna metoda, zato iz velikosti cone zavrte rasti testne kulture ne moremo sklepati na količino sintetiziranih protimikrobnih snovi. Glede na to, da sev 168, ki ne sintetizira protimikrobnih spojin, ni pokazal učinka, sklepamo, da ostali sevi spojine tega tipa sintetizirajo in zato inhibirajo rast bakterije *S. Typhimurium*, kar sovпада z ugotovitvami za nekatere druge seve bakterij iz rodu *Bacillus* (Mireles in sod., 2001; Pinchuk in sod., 2001).

V nasprotju z očitno cono zavrte rasti testne kulture na trdnem gojišču pa izrabljena gojišča niso pokazala zaviralnega učinka na rast te patogene bakterije. Možno je, da je koncentracija sekundarnih metabolitov po 24 ur gojenja izbranih sevov v tekočem gojišču TSB prenizka, da bi lahko inhibirali rast bakterije *S. Typhimurium*. Možno je tudi, da je sinteza antibiotikov bolj učinkovita na trdnem gojišču ali pa da jo spodbudi kompeticija z bakterijo *S. Typhimurium*.

Potrebne so dodatne raziskave za dokaz potrebnega direktnega stika obeh bakterij (Russell in sod., 2014a; 2014b; Whitney in sod., 2017) za sprožitev sinteze določenih metabolitov, ki delujejo zaviralno na rast bakterije *S. Typhimurium* ali pa je pomanjkanje inhibicije res posledica prenizke koncentracije antibiotika v izrabljenem gojišču.

## 5 SKLEPI

Iz rezultatov lahko zaključimo, da:

- vsi testirani izolati bakterije *B. subtilis* imajo potencial za zaviranje rasti bakterije *S. Typhimurium* ATCC 14028, kar smo pokazali s cono zavrte rasti testnega seva,
- izbrabljena gojišča izolatov bakterije *B. subtilis* ne kažejo zaviralnega učinka na rast bakterije *S. Typhimurium*.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) za financiranje raziskav v okviru raziskovalnega programa P4-0116 in štipendiranje mlade raziskovalke skozi program MR+. Zahvaljujemo se Univerzi v Ljubljani za sofinanciranje projekta CELSA. Zahvaljujemo se tudi prof. Hansu Steenackersu za sev bakterije *S. Typhimurium*. Posebna zahvala gre doc. dr. Tjaši Danevčič in Andiju Eregi za vse nasvete pri uvajanju v eksperimentalno delo z bakterijo *S. Typhimurium* ter vsem članom Katedre za mikrobiologijo za pozitivno vzdušje in pomoč.

## 6 VIRI

- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 98(20): 11621–11626.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10(302), doi: 10.3389/fmicb.2019.00302: 19 str.
- Coutte, F., Leclère, V., Béchet, M., Guez, J.-S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P., Jacques, P. (2009). Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 480–491.
- Fàbrega, A. in Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341.
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. & Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella Typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *PNAS*, 83(14), 5189–5193.
- Fornfeld, E., Schierstaedt, J., Jechalke, S., Grosch, R., Schikora, A., Smalla, K. (2017). Persistence of *Salmonella Typhimurium* LT2 in soil enhanced after growth in lettuce medium. *Frontiers in Microbiology*, 8(757), doi: 10.3389/fmicb.2017.00757: 8 str.
- Ilinskaya, O.N., Ulyanova, V.V., Yarullina, D.R., Gataullin, I.G. (2017). Secretome of intestinal Bacilli: a natural guard against pathologies. *Frontiers in Microbiology*, 8(1666), doi: 10.3389/fmicb.2017.01666: 15 str.
- Kalamara, M., Spacapan, M., Mandic-Mulec, I., Stanley-Wall, N.R. (2018). Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Molecular Microbiology*, 110(6), 863-878.

- Kimelman, H, Shemesh, M. (2019). Probiotic bifunctionality of *Bacillus subtilis*—Rescuing lactic acid bacteria from desiccation and antagonizing pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 7, 407.
- Koo, B, Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A. B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., Gross, C. A. (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Systems*, 4, 291–305.
- Loiseau, C., Schlüsselhuber, M., Bigot, R., Bertaux, J., Berjeaud, J.-M., Verdon, J. (2015). Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 5083–5093.
- Mallon, C.A., Le Roux, X., van Doorn, G.S., Dini-Andreote, F., Poly, F., Salles, J.F. (2018). The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. *The ISME Journal*, 12, 728–741.
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., van Elsas, J.D. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum*, 3, 2: TBS-0017-2013, doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013: 24 str.
- McLoon, A. L., Guttenplan, S. B., Kearns, D. B., Kolter, R., Losick R. (2011). Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *Journal of Bacteriology*, 193(8): 2027–2034.
- Mireles, J. R., Toguchi, A., Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 5848–5854.
- Nye, T. M., Schroeder, J. W., Kearns, D. B., Simmons, L. A. (2017). Complete genome sequence of undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610. *Genome Announcements*, 5(e00364-17), doi.org/10.1128/genomeA.00364-17: 2 str.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Vatovec, S., Beigot Glaser, S., Rupnik M., Mandic-Mulec I. (2015). Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizosphere. *Microbial Biotechnology*, 8, 527–540.
- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Mégraud, F., Urdaci, M. C. (2001). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3156–3161.
- Rivardo, F., Turner, R. J., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M. G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 541–553.
- Russell, A. B., Peterson, S. B., Mougous, J. D. (2014a). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 137–148.
- Russell, A. B., Wexler, A. G., Harding, B. N., Whitney, J. C., Bohn, A. J. Goo, Y. A., Tran, B. Q., Barry, N. A., Zheng, H., Peterson, S. B., Chou, S., Gonen, T., Goodlett, D. R., Goodman, A. L., Mougous, J. D. (2014b). A type VI secretion-related pathway in *Bacteroidetes* mediates interbacterial antagonism. *Cell Host & Microbe*, 16, 227–236.
- Sansinenea, E., Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523–1538.
- Schierstaedt, J., Jechalke, S., Nesme, J., Neuhaus, K., Sørensen, S. J., Grosch, R., Smalla, K., Schikora, A. (2020). *Salmonella* persistence in soil depends on reciprocal interactions with indigenous microorganisms. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2639–2652.
- Stefanic, P., Mandic-Mulec, I. (2009). Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191(6): 1756–1764.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857.

- Tazehabadi, M. H., Algburi, A., Popov, I. V., Ermakov, A. M., Chistyakov, V. A., Prazdnova, E. V., Weeks, R., Chikindas, M. L. (2021). Probiotic Bacilli inhibit Salmonella biofilm formation without killing planktonic cells. *Frontiers in Microbiology*, 12:615328, doi: 10.3389/fmicb.2021.615328: 12 str.
- Teo, AY-L., Tan, H-M. (2005). Inhibition of Clostridium perfringens by a novel strain of Bacillus subtilis isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4185-4190.
- Whitney, J. C., Peterson, S. B., Kim, J., Pazos, M., Verster, A. J., Radey, M. C., Kulasekara, H. D., Ching, M. Q., Bullen, N. P., Bryant, D., Goo, Y. A., Surette, M. G., Borenstein, E., Vollmer, W., Mougous, J. D. (2017). A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. *eLife*, 6(e26938), doi: 10.7554/eLife.26938.001: 24 str.



## Obvladovanje filmotvornosti bakterij *Campylobacter jejuni* s pripravki sivke

Dina RAMIĆ<sup>1\*</sup>, Iztok DOGŠA<sup>2</sup>, Sonja SMOLE MOŽINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [dina.ramic@bf.uni-lj.si](mailto:dina.ramic@bf.uni-lj.si)

### Obvladovanje filmotvornosti bakterij *Campylobacter jejuni* s pripravki sivke

**Izveček:** Mikrobni biofilmi in njihovo obvladovanje (t.j. preprečevanje pritrjevanja in filmotvornosti mikroorganizmov, odstranjevanje zrelih biofilmov) predstavljajo velik izziv v živilski proizvodno-oskrbovalni verigi. Potrebno je poiskati nove, alternativne učinkovine s protifilmotvornim učinkom za obvladovanje biofilmov. *Campylobacter jejuni* je bakterija, ki se pogosto prenaša s kontaminiranim in termično nezadostno obdelanim perutninskim mesom. Stik živila s kontaminiranimi površinami posledično pripelje do kontaminacije in prenosa patogena na človeka. V raziskavi smo uporabili rastlinske pripravke sivke - eterično olje (EO) in etanolne izvlečke cvetov pred (EtI) in po (EtID) destilaciji eteričnega olja z namenom modulacije začetnega pritrjevanja, filmotvornosti in odstranjevanja zrelega biofilma bakterij *C. jejuni* s površine polistirena. Pokazali smo, da so rastlinski pripravki sivke uspešni pri zaviranju filmotvornosti bakterij *C. jejuni* v različnih časovnih intervalih (24, 48 in 72 h), kakor tudi pri odstranjevanju zrelega biofilma bakterij *C. jejuni* s površine polistirena. Najboljši učinek je imelo EO, ki je v koncentraciji 0,5 mg/mL popolnoma odstranilo biofilm bakterij *C. jejuni*. Odstranjevalni učinek so imeli tudi etanolni izvlečki cvetov EtI in EtID destilaciji eteričnega olja sivke. Te ugotovitve raziskovalno delo usmerjajo v izkoriščanje stranskih proizvodov in odpadkov, ki v industriji predstavljajo velik ekonomski in okoljski problem. Ker pa vsebujejo dovolj bioaktivnih snovi, lahko njihovi pripravki pomenijo dodano vrednost kot bioaktivni dodatki pri obvladovanju neželenih mikroorganizmov in njihove aktivnosti v okolju živilske proizvodnje.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*; biofilm; sivka; obvladovanje filmotvornosti

### Control of biofilm formation of *Campylobacter jejuni* with *Lavandula* preparations

**Abstract:** Microbial biofilms and their control (i.e. prevention of attachment and biofilm formation, removal of mature biofilms) present a major challenge in the food industry. It is necessary to find new, alternative active substances with antibiofilm effect. *Campylobacter jejuni* is transmitted by contaminated and undercooked poultry meat. Contact of food with contaminated surfaces consequently leads to contamination and transmission of this pathogen to humans. We used *Lavandula* plant preparations - essential oil (EO) and ethanolic flower extracts before (EtI) and after (EtID) distillation of essential oil to modulate the initial attachment, biofilm formation and removal of mature biofilms of *C. jejuni* from the polystyrene surface. We have shown that *Lavandula* preparations are successful in inhibiting the biofilm formation of *C. jejuni* at different time intervals (24, 48 and 72 h), as well as in removing the

mature biofilms of *C. jejuni* from the polystyrene surface. EO had the best effect, completely removing the biofilm of *C. jejuni* at a concentration of 0.5 mg/mL. Ethanol extracts EtI and EtID also removed mature biofilms of *C. jejuni*. These findings direct research to the exploitation of by-products and waste, which are a major economic and environmental problem in industry. However, they can still contain enough bioactive substances, and their formulations could be used as bioactive additives for the control of unwanted microorganisms in the food production environment.

**Key words:** *Campylobacter jejuni*; biofilm; *Lavandula*; biofilm control

## 1 UVOD

Mikrobni biofilmi so prevladujoča naravna oblika življenja mikroorganizmov. Nastajajo povsod, kjer so osnovni pogoji: mikrobi, podlaga, voda in hranila. Obvladovanje mikrobnih biofilmov je resen izziv tudi v živilski proizvodno-oskrbovalni (v nad. živilski) verigi, saj nastajajo na različnih abiotskih površinah plastičnih materialov, jekla stekla, gume ali lesa. Pritrjevanje mikroorganizmov in nadaljnja filmotvornost na površinah, ki so v stiku s prehranskimi izdelki, je vir velikih ekonomskih izgub (Bridier in sod., 2015). Mikrobni biofilmi so vzrok energetskih izgub, poškodb površin in opreme ter stalen vir kontaminacije živil. Ta lahko pomeni izgubo kakovosti in obstojnosti, pa tudi prenosa okužb in hudih bolezenskih stanj ljudi (Galié in sod., 2018; Yuan in sod., 2020). Okoli 80 % perzistentnih bakterijskih okužb je povezanih z biofilmi (Scallan, 2011; Srey in sod., 2013).

Patogene bakterije iz rodu *Campylobacter* so najpogostejši bakterijski povzročitelji črevesnih okužb ljudi, lahko pa povzročajo tudi resnejša nevrološka obolenja kot je Guillian-Baré sindrom in akutna ohlapna paraliza (Oh in sod., 2018). Najpogosteje se prenašajo s kontaminiranim in termično nezadostno obdelanim perutninskim mesom. Kontaminirane površine in živila so vektor prenosa patogena na človeka (Tram in sod., 2020). Kampilobaktri močno bremenijo javno zdravstvo Evropske Unije, ocene letnih ekonomskih izgub dosega 2,4 milijarde €. V svetu se ocenjuje, da so odgovorni za približno 166 milijonov črevesnih okužb in 37.600 smrtnih izidov letno (Gözl in sod., 2018).

Čeprav veljajo kampilobaktri za občutljive bakterije, dobro preživijo tudi v okolju izven svojega naravnega okolja, t.j. črevesa. Lastnosti kot so medcelično signaliziranje, gibljivost in kemotaksa jim omogočajo filmotvornost ali pa kolonizacijo že obstoječih biofilmov na abiotskih površinah, kot so polistiren, steklo in nerjaveče jeklo (Püning in sod., 2021; Teh in sod., 2014). Biofilmi predstavljajo edinstveno strategijo preživetja mikroorganizmov zaradi zaščite pred okoljskimi stresnimi razmerami, pogostejša je tudi izmenjava genetskega materiala (Smole Možina in sod., 2013). Prevalenca proti antibiotikom in biocidom odpornih sevov bakterij *C. jejuni*, izoliranih predvsem iz perutnine, je visoka in še narašča, kar predstavlja globalni problem (Mavri in Smole Možina, 2013; Rozman in sod., 2019). Znotraj biofilmov pa so kampilobaktri prav tako zaščiteni proti delovanju protimikrobnih učinkovin, ker te počasneje in slabše prodirajo skozi matriks biofilma. Subletalne koncentracije teh učinkovin lahko le upočasnijo rast biofilmskih celic in povečujejo izražanje rezistenčnih genov (Klančnik in sod., 2021). Zato je nujen pravilni pristop k obvladovanju kampilobaktrov v živilski verigi, kot tudi izbor alternativnih učinkovin s potencialno protifilmotvornim učinkom. Ta je lahko kurativni, kar pomeni, da odstranjujemo že obstoječi biofilm ali preventivni, kjer poskušamo omejiti

začetno pritrjevanje bakterij kot predstopnjo filmotvornosti, in nadaljnje rasti biofilma. S tem preprečimo prilagajanje bakterij in nadaljnje razmnoževanje in širjenje v živilski verigi.

Za ta namen smo uporabili rastlinske pripravke sivke [eterično olje (EO), etanolni izvleček cvetov (EtI) in etanolni izvleček cvetov po destilaciji eteričnega olja (EtID)] in raziskali njihov učinek na: a) pritrjevanje bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 na polistiren, b) nadaljnji razvoj biofilma v 48 in 72 h in c) časovni učinek teh pripravkov na odstranjevanje že zrelih biofilmov bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 s površine polistirena. Pridobili smo podatke o pripravkih sivke kot potencialnih razkuževalnih sredstvih.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Bakterijski sevi in pogoji gojenja

V raziskavi smo uporabili sev *C. jejuni* NCTC 11168, ki je del mikrobiološke zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Sev je hranjen v raztopini glicerola (Kemika, Hrvaška) v zamrzovalniku pri temperaturi – 80 °C. Pred izvajanjem poskusov smo sev revitalizirali na selektivnem gojišču Karmali (Biolife, Italija) in ga naprej gojili 24 h v mikroaerofilni atmosferi (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> in 85 % N<sub>2</sub>) pri temperaturi 42 °C. Delovno kulturo smo pripravili v tekočem gojišču Mueller-Hinton (MHB) (Oxoid, Velika Britanija) do OD<sub>600</sub> 0,1 in jo za potrebe nadaljnjih poskusov 100x redčili.

### 2.2 Določanje protimikrobne aktivnosti pripravkov sivke

Protimikrobno aktivnost pripravkov sivke (EO, EtI in EtID) oz. njihovo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) smo določili z redčitveno metodo (Klančnik in sod., 2009). Založne raztopine smo pripravili v raztopini DMSO (40 mg/mL). DMSO v tekočem gojišču MHB ni presegal 1 % in ni vplival na rast bakterij (Šimunović in sod., 2020).

### 2.3 Določanje učinka pripravkov sivke na pritrjevanje in razvoj biofilma *C. jejuni*

Učinek pripravkov sivke na pritrjevanje in razvoj biofilma bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 na površini polistirena smo izmerili po 24, 48 in 72 h. Bakterijske kulture smo pripravili kot je opisano v poglavju 2.1. Tretirali smo jih s subinhibitorno koncentracijo rastlinskih pripravkov sivke (1/4 MIK). V polistirenske mikrotitrne plošče s 96 luknjicami (Nunc 266 120, Nunc, Danska) smo prenesli po 200 µL tako pripravljene kulture in jih inkubirali v mikroaerofilni atmosferi na 42 °C, 24, 48 in 72 h. Po inkubaciji smo plošče tri-krat sprali z raztopino PBS (Oxoid, Velika Britanija), za odstranitev nepritrjenih celic. Nato smo dodali 200 µL raztopine PBS in plošče sonicirali v ultrazvočni kopeli 10 min (28 kHz, 300 W; IskraPIo, Šetnjerne, Slovenia). Število pritrjenih celic smo določili z metodo štetja kolonij (CFU/mL) (Šikić Pogačar in sod., 2015). Negativno kontrolo so predstavljale ne-tretirane kulture. Poskuse smo naredili v treh bioloških in tehničnih ponovitvah. Podatke smo ovrednotili kot relativno adhezijo oz. relativno filmotvornost bakterijskih celic na površini polistirena (Slika 1).

### 2.4 Določanje učinka pripravkov sivke na odstranjevanje zrelih biofilmov *C. jejuni*

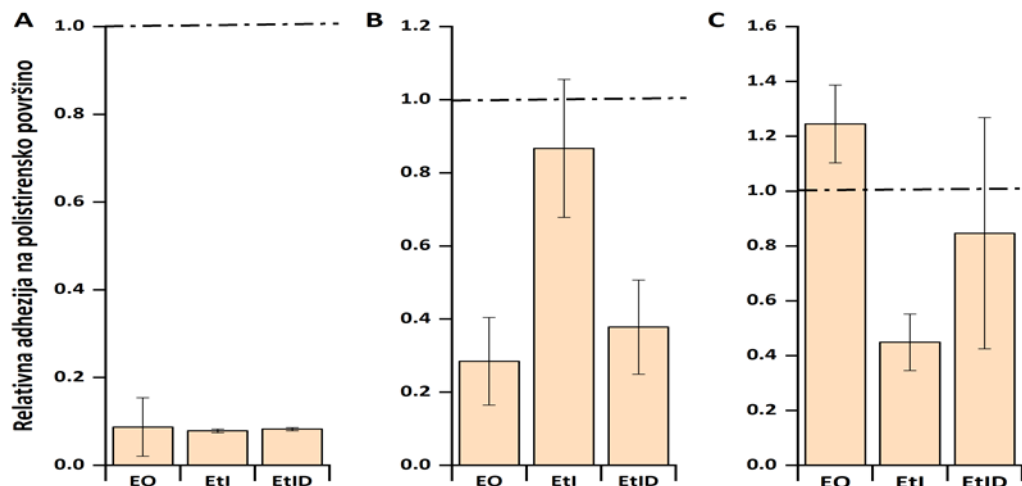
Učinek pripravkov sivke na odstranjevanje zrelih biofilmov *C. jejuni* s površine polistirena smo merili v času 0, 2, 4, 6 in 24 h. Bakterijske kulture smo pripravili kot je opisano v poglavju 2.1.

V polistirenske mikrotitrne plošče smo prenesli po 200  $\mu\text{L}$  kulture in jih inkubirali v mikroaerofilni atmosferi na 42  $^{\circ}\text{C}$  za razvoj zrelega biofilma. Po 48 h inkubacije smo izrabljeno gojišče zamenjali s svežim gojiščem MHB z dodatkom pripravkov (EO: 1/2 $\times$  MIK, MIK, 2 $\times$  MIK in 4 $\times$  MIK, EtI in EtID: 2 $\times$ , 4 $\times$  in 8 $\times$  MIK). Zrele biofilme smo tretirali 0, 2, 4, 6 in 24 h. Po inkubaciji smo plošče tri-krat sprali z raztopino PBS za odstranitev nepritrjenih celic in postopek dokončali, kot je opisano v točki 2.3. Poskuse smo naredili v treh bioloških in tehničnih ponovitvah. Podatke smo ovrednotili kot relativno adhezijo bakterijskih celic na površini polistirena (Slika 2).

### 3 REZULTATI

#### 3.1 Zaviralni učinek pripravkov sivke na pritrjevanje in razvoj biofilma *C. jejuni*

Pri določanju učinka pripravkov sivke na pritrjevanje in razvoj biofilma bakterij *C. jejuni* uporabljamo subinhibitorne koncentracije, saj želimo vplivati na lastnosti bakterij, ki so pomembne za filmotvornost, a ne za rast celic. S tem zmanjšamo tudi selektivni pritisk na celice, ki spodbuja razvoj rezistenčnih genov. Zato smo najprej določili vrednosti MIK, ki so znašale 0,25 mg/mL za eterično olje ter 1 mg/mL za oba etanolna izvlečka. Na Sliki 1A pa je razvidno, da so po 24 h vsi pripravki sivke močno zavirali pritrjevanje bakterij na površino polistirena. Relativna adhezija po uporabi pripravkov je znašala le  $0,08 \pm 0,07$ . Po 48 h sta bila pripravka EO in EtID še vedno zelo uspešna pri zaviranju filmotvornosti (slika 1B). Relativna filmotvornost je znašala  $0,3 \pm 0,1$  (EO) oz.  $0,4 \pm 0,1$  (EtID). Po 72 h je bilo zaviranje filmotvornosti učinkovito le še pri pripravku EtI (relativna filmotvornost  $0,4 \pm 0,1$ ).

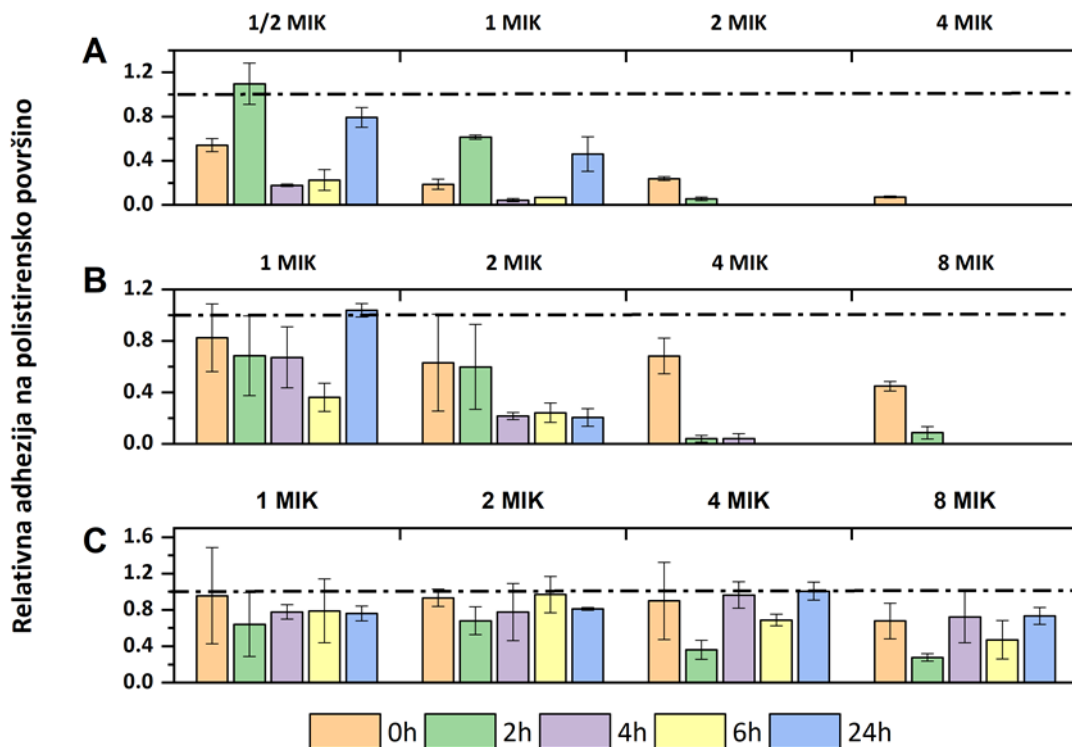


**Slika 4:** Relativna adhezija bakterij *C. jejuni* na polistirenski površini po 24 h (A), ter relativna filmotvornost po 48 h (B) in 72 h (C) inkubacije (mikroaerofilna atm., 42  $^{\circ}\text{C}$ , dodatek 1/4 MIK pripravkov sivke EO (eterično olje), EtI (etanolni izvleček cvetov) in EtID (etanolni izvleček cvetov po destilaciji eteričnega olja sivke) v primerjavi z netretirano kontrolo (črtkana črta). Prikazane so povprečne vrednosti relativne adhezije  $\pm$  standardni odklon.

#### 3.2 Učinkovitost pripravkov sivke za odstranjevanje zrelih biofilmov *C. jejuni*

Učinkovitost pripravkov sivke za odstranjevanje zrelih biofilmov *C. jejuni* s površine polistirena smo preučevali v času 0, 2, 4, 6 in 24 h. Kot najučinkovitejše se je izkazalo eterično

olja EO, ki je biofilm odstranilo že v koncentraciji 1/2× MIK (Slika 2A). V tej koncentraciji protibiofilmsko delovanje opazimo po 4, 6 in 24 h. Močnejši učinek imajo večje koncentracije, npr. 2× MIK popolnoma odstrani zrel biofilm po 4 h delovanja (Slika 2A). Eterično olje pokaže takojšnji učinek (čas 0 h) pri vseh koncentracijah, a si celice opomorejo pri izpostavitvi majhnim koncentracijam eteričnega olja. Nekoliko slabši učinek je imel etanolni izvleček EtI (Slika 2B), ki odstranjuje zrel biofilm v koncentraciji 2× MIK, a za popolno odstranitev biofilma bakterij *C. jejuni* potrebujemo koncentracijo 4× MIK, biofilm je bil uspešno odstranjen po 6 h delovanja. S koncentracijo 8×MIK smo biofilm popolnoma odstranili po 4 h delovanja (Slika 2B). Izvleček EtID v nobeni koncentraciji ni uspel popolnoma odstraniti zrelega biofilma bakterij *C. jejuni* (Slika 2C).



**Slika 2:** Biofilmske celice *C. jejuni* na polistirenski površini po tretiranju zrelega biofilma, gojenega 48 h v mikroaerofilni atmosferi na 42 °C. Zrele biofilme bakterij *C. jejuni* smo tretirali s pripravki sivke EO (eterično olje) (A), EtI (etanolni izvleček cvetov) (B) in EtID (etanolni izvleček cvetov po destilaciji eteričnega olja sivke) (C) v koncentracijah od 1/2× MIK do 8× MIK. Biofilmske celice *C. jejuni* na polistirenski površini smo določili po tretiranju v času 0, 2, 4, 6 in 24 h v primerjavi z netretirano kontrolo (črtna črta). Podatki so prikazani kot povprečne vrednosti relativne adhezije ± standardni odklon.

#### 4 DISKUSIJA

V raziskavi smo uporabili pripravke sivke (EO, EtI in EtID) z namenom modulacije začetnega pritrjevanja in filmotvornosti ter odstranjevanja zrelega biofilma bakterij *C. jejuni* s površine polistirena. Pri zaviranju začetnega pritrjevanja po 24 h inkubacije so vsi rastlinski pripravki sivke uspešno zavrli začetno pritrjevanje in sicer za več kot 1 log<sub>10</sub> CFU/mL. Podoben rezultat so dobili Šimunović in sod. (2020), ki so pokazali, da eterično olje lavandina, timijana in

rožmarina, kot tudi etanolni izvlečki rmana, dobre misli in koprive zavirajo začetno pritrjevanje bakterij *C. jejuni* na površino polistirena.

Pripravka EO in EtID sta uspešno zavirala filmotvornost tudi po 48 h inkubacije, pripravke EtI je imel nekoliko slabši učinek. Duarte in sod. (2016) so prav tako pokazali, da eterično olje koriandra, kot tudi čista spojina linalol, uspešno zavirata filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini polistirena po 48 h inkubacije. Po 72 h pa je imel boljši zaviralni učinek pripravek EtI. Primerljiv učinek so pokazali etanolni izvlečki rastline *Euodia ruticarpa*, ki so uspešno zavirali filmotvornost bakterij *C. jejuni* na površini nerjavečega jekla tudi po 72 h inkubacije (Bezdek in sod., 2016). Možno je, da pripravki sivke različno delujejo na molekularne (izražanje genov, pomembnih za gibljivost, kemotakso, medcelično signaliziranje, pritrjevanje) in površinske lastnosti, tako bakterij kot abiotične površine (površinska napetost, hidrofobnost), zaradi česar so zaznavne razlike po različnih časih inkubacije.

Pri odstranjevanju biofilmov je imelo najboljši učinek EO sivke. Za popolno odstranitev biofilma je zadostovala izjemno nizka koncentracija 0,5 mg/mL, glede na to, da so biofilmske celice do 1000x bolj odporne proti protimikrobnim sredstvom (Stewart, 2015). Za primerjavo, MIK eteričnega olja sivke proti planktonskim celicam je iznašal 0,25 mg/mL, kar je samo za polovico manj kot protifilmotvorna koncentracija. Eterična olja sestavljajo številni rastlinski sekundarni metaboliti, ki delujejo na različne tarče bakterijske celice, kot so celična stena, sinteza in aktivnost encimov, prevzem hranilnih snovi, itn. (Pisoschi in sod., 2018), ali pa degradirajo zunajcelične polimere, ki sestavljajo biofilm (Wagle in sod., 2019). Duarte in sod. (2016) so tudi pokazali aktivnost eteričnega olja koriandra in sestavine linalola pri odstranjevanju biofilma *C. jejuni* s površine polistirena. Odstranjevalni učinek smo potrdili tudi pri pripravku EtID, etanolnem izvlečku iz materiala po destilaciji eteričnega olja sivke, kar nakazuje na to, da lahko svoje raziskovalno delo usmerjamo predvsem v izkoriščanje stranskih proizvodov in odpadkov, ki nastajajo v različnih agro-živilskih postopkih, v tem primeru pri destilaciji eteričnih olj. Učinkovitost pripravkov iz stranskih proizvodov je bila že potrjena pri drugih vrstah rastlinske predelave, npr. grozdnih in oljčnih tropinah, brinju, timijanu (Šikić Pogačar in sod., 2016; Klančnik in sod., 2017). Ti stranski proizvodi in odpadki v industriji predstavljajo tudi velik okoljski problem, vsebujejo pa še dovolj bioaktivnih snovi, da le-te lahko pomenijo dodano vrednost, bodisi ob neposrednem dodajanju živilom ali pri obvladovanju neželenih mikroorganizmov in njihove aktivnosti v okolju živilske proizvodnje.

## 5 SKLEPI

Rastlinski pripravki sivke so učinkovita naravna sredstva za omejevanje filmotvornosti in odstranjevanje biofilmov bakterij *C. jejuni* s površine polistirena. Eterično olje odstranjuje biofilm že v koncentraciji 0,5 mg/mL. Zanimiva ugotovitev za nadaljnje raziskave pa je podobna učinkovitost pripravka iz odpadnega rastlinskega materiala, ki v velikih količinah ostaja po destilaciji eteričnega olja sivke. Pripravek je protimikrobno aktiven in zavira adhezijo in filmotvornost bakterije *C. jejuni*.

## ZAHVALA

Avtorji prispevka se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) za financiranje projektov 51861 (MR-Smole-Možina, Ramić) ter J4-2542 in

P4-0116. Prof. Franzu Bucarju s Katedre za farmakognozijo, Farmaceutvske fakultete, Univerze v Gradcu se zahvaljujemo za vso pomoč pri pripravi in kemijski karakterizaciji pripravkov sivke.

## 6 VIRI

- Bezek K., Kurinčič M., Knauder E., Klančnik A., Raspor P., Bucar P., Smole Možina, S. (2016). Attenuation of adhesion, biofilm formation and quorum sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. *Phytotherapy Research*, 30, 1527-1532.
- Bridier A, Sanchez-Vizueté, Guilbaud M, Piard J-C, Naïtali M, Briandet R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>.
- Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F. C. (2016). Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*. 61, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.033>.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>.
- Gölz, G., Kittler, S., Malakauskas, M., Alter, T. (2018). Survival of *Campylobacter* in the food chain and environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 126-134. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0092-z>.
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H., Smole Možina, S. (2009). In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 1744-1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744>.
- Klančnik, A., Šikić Pogačar, M., Trošt, K., Tušek-Žnidarič, M., Mozetič Vodopivec, B., Smole Možina, S. (2017). Anti-*Campylobacter* activity of resveratrol and an extract from waste pinot noir grape skins and seeds, and resistance of *C. jejuni* planktonic and biofilm cells, mediated via the CmeABC efflux pump. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 65-77. <https://doi:10.1111/jam.13315>.
- Klančnik, A., Šimunović, K., Sterniša, M., Ramić, D., Smole Možina, S., Bucar, F. (2021). Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. *Phytochemistry Reviews*, 30. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09669-6>.
- Mavri, A., Smole Možina, S. (2013). Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.006>.
- Oh, E., Andrews, K. J., Jeon, B. (2018). Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1204. doi: 10.3389/fmicb.2018.01204.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuș, V., Olah, N. K., Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medical Chemistry*, 143, 922-935. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.095>.
- Püning, C., Su, Y., Lu, X., Gölz, G. (2021). Molecular mechanisms of *Campylobacter* biofilm formation and quorum sensing. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 431. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8_11).
- Rozman, V., Bogovič Matijašić, B., Smole Možina, S. (2019). Antimicrobial resistance of common zoonotic bacteria in the food chain : an emerging threat. V: KUMAR, Yashwant (ur.). Antimicrobial Resistance : A global Threat. London: *IntechOpen*. 2019, str. 13-32. <http://doi: 10.5772/intechopen.80782>.
- Scallan, E. (2011). Foodborne illness acquired in the United States - unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1): 16-22. <http://doi:10.3201/eid1701.P21101>.

- Smole Možina S., Klančnik A., Raspor, P. (2013). Mechanisms of microbial resistance in biofilms. V: Simões, M. (ur.), Mergulhão, F. (ur.). *Biofilms in Bioengineering, (Microbiology research advances)*. New York: *Nova Science Publishers*, str. 311-332.
- Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, *31*, 572-585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>.
- Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiology Spectrum*, *30*, 26185072. <https://doi:10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014>.
- Šikić Pogačar, M., Klančnik, A., Bucar, F., Langerholc, T., Smole Možina, S. (2016). Anti-adhesion activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract, thyme post-distillation waste, and olive (*Olea europea* L.) leaf extract against *Campylobacter jejuni* on polystyrene and intestine epithelial cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*, 2723-2730. <https://doi:10.1002/jsfa.7391>.
- Šimunović, K., Ramić, D., Xu, C., Smole Možina, S. (2020). Modulation of *Campylobacter jejuni* motility, adhesion to polystyrene surfaces, and invasion of INT407 cells by quorum sensing inhibition. *Microorganisms*, *14*, 39140805. <https://doi:10.3390/microorganisms8010104>.
- Teh, A. H. T., Lee, S. M., Dykes, G. A. (2014). Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Applied and Environmental Microbiology*, *80*, 5154-5160. <https://doi:10.1128/aem.01493-14>.
- Tram, G., Day, C. J., Korolik, V. (2020). Bridging the gap: A role for *Campylobacter jejuni* biofilms. *Microorganisms*, *8*, 452. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030452>.
- Yuan, L., Hansen, M. F., Røder, H. L., Wang, N., Burmølle, M., He, G. (2020). Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*, 13, 2277-2293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>.
- Wagle, B. R., Upadhyay, A., Upadhyay, I., Shrestha, S., Arsi, K., Liyanage, R., Venkitamarayamam, K., Donoghue, D. J., Donoghue, A. M. (2019). Trans-cinnamaldehyde, eugenol and carvacrol reduce *Campylobacter jejuni* biofilms and modulate expression of select genes and proteins. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1837. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01837>.



## Razširjenost odpornosti proti protimikrobnim zdravilom pri bakterijah, namerno dodanih v agroživilsko verigo

Vita ROZMAN<sup>1\*</sup>, Tomaž ACCETTO<sup>1</sup>, Petra MOHAR LORBEG<sup>1</sup>, Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIČ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [vita.rozman@bf.uni-lj.si](mailto:vita.rozman@bf.uni-lj.si)

### Razširjenost odpornosti proti protimikrobnim zdravilom pri bakterijah, namerno dodanih v agroživilsko verigo

**Izveček:** Širjenje odpornosti proti antibiotikom med patogenimi bakterijami postaja vedno večji problem. Komenzalne bakterije iz agroživilske verige lahko predstavljajo rezervoar genov za odpornost. Cilj naše študije je raziskati odpornost mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij, namenoma dodanih v agroživilsko verigo, ter ovrednotiti njihov doprinos k širjenju odpornosti. Fenotipsko občutljivost za antibiotike smo ugotavljali za 470 sevov (153 sevov, namenoma dodanih v agroživilsko verigo preko starterskih, zaščitnih in probiotičnih kultur ter krmnih dodatkov, 154 sevov iz fermentiranih mlečnih izdelkov, proizvedenih z ali brez komercialnih starterskih kultur, 90 sevov iz humane črevesne sluznice in 73 sevov iz humanega mleka). Z metodami *in silico* smo ugotavljali prisotnost genov (ARG) in mutacij, povezanih z odpornostjo, ter mobilnih genetskih elementov (MGE) v genomih sevov, ki smo jih sekvencirali in sestavili sami (n = 75), ter v genomskih zaporedjih, dostopnih v javnih podatkovnih zbirkah (n = 1010). Rezultati so pokazali, da je bila fenotipska odpornost razširjena pri izolatih iz humane črevesne sluznice (77,8 %), manj pa pri starterskih kulturah (40,8 %). Presežene mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij za 104 seve smo razložili deloma, in sicer z detektiranimi ARG in mutacijami v proteinih, ki so bile predhodno povezane z odpornostjo. Skupno smo zaznali 425 pridobljenih ARG v genomih 218 sevov, od tega pri 124 sevih iz humanega blata in pri 66 namerno dodanih v agroživilsko verigo. Bakterije, namenoma vnesene v agroživilsko verigo, lahko predstavljajo rezervoar odpornosti proti antibiotikom, vendar so rezultati naše raziskave nakazali manjšo pojavnost ARG pri namerno vnesenih mlečnokislinskih bakterijah in bifidobakterijah kot pri sevih iz humanega blata.

**Ključne besede:** odpornost proti antibiotikom; mlečnokislinske bakterije; bifidobakterije; probiotiki; starterske kulture

### Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria intentionally added to agro-food chain

**Abstract:** The emergence of (multidrug) resistant pathogenic bacteria has been recognised as a major global health concern. Commensal bacteria from agro-food chain may act as a reservoir of antimicrobial resistance genes. Our aim was to characterise antibiotic resistance of bacteria intentionally introduced into the agro-food chain and to evaluate their contribution to dissemination of resistance. Phenotypic susceptibility to clinically relevant antimicrobials was determined for 470 strains (153 strains, deliberately introduced into the agro-food chain as starter or probiotic cultures, 154 from fermented dairy products, 90 from human intestinal mucosa, and 73 from human milk). Whole genome sequences that were obtained by sequencing of the selected representatives (n = 75) and publicly available genomes (n = 1010) were

screened *in silico* for antibiotic resistance genes (ARGs), mutations and mobile genetic elements (MGEs). Phenotypic resistance was the most prevalent in human intestinal mucosa isolates (77.8 %) and the least in starter cultures (40.8 %). The detected ARGs and mutations only partially explained the exceeded cut-off values of minimum inhibitory concentrations of 104 strains. Altogether, 425 ARGs were detected in genomes of 218 strains, of these in 124 strains from human faeces and in 66 strains, deliberately added to agro-food chain. In conclusion, bacteria, intentionally added to agro-food chain may indeed act as a reservoir of antimicrobial resistance genes, however our results showed lower prevalence of ARGs in these strains compared to strains, isolated from human faeces.

**Key words:** antibiotic resistance; lactic acid bacteria; bifidobacteria; probiotics; starter cultures

## 1 UVOD

Odpornost proti antibiotikom je naravni pojav (D'Costa in sod., 2011), vendar je obsežna uporaba protimikrobnih zdravil pospešila njeno širjenje preko pridobljenih genov za odpornost (ARG) in mutacij. Patogene bakterije, ki so odporne proti več antibiotikom hkrati, ogrožajo uspešnost zdravljenja in so postale velik zdravstveni problem (World Health Organization, 2014). Antibiotiki istih skupin se uporabljajo za zdravljenje okužb tako pri človeku kot v veterini, kar vpliva na širjenje odpornosti preko agroživilske verige (EFSA / ECDC, 2018).

Mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije so bile prepoznane kot rezervoar odpornosti (Duranti in sod., 2017), prenos ARG, tudi na potencialno patogene bakterije, pa je bil dokazan tako *in vitro* kot *in vivo* (Kazmierczak in sod., 2006). Bakterije, ki jih namenoma dodajamo v agroživilsko verigo preko prehranskih dopolnil, starterskih in zaščitnih kultur, ne smejo vsebovati pridobljenih genov za odpornost proti klinično pomembnim antibiotikom, kar je potrebno preiskati v celih genomskih zaporedjih sevov (EFSA-FEEDAP, 2018; EFSA, 2005). Dejansko varnostno tveganje, povezano z odpornostjo pri bakterijah, namerno vnesenih v agroživilsko verigo, ni dobro raziskano. Čeprav je sekvenciranje postalo dostopnejše, še vedno ni dovolj podatkov o razširjenosti pridobljenih ARG med mlečnokislinskimi bakterijami in bifidobakterijami, ki jih namenoma dodajamo v agroživilsko verigo, saj je večina preteklih raziskav temeljila na fenotipskih podatkih in na preiskovanju prisotnosti omejenega števila ARG z molekularnimi metodami.

Naš cilj je raziskati odpornost mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij, namenoma dodanih v agroživilsko verigo, na osnovi celih genomskih zaporedij, ter ovrednotiti njihov doprinos k širjenju odpornosti preko agroživilske verige.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Fenotipsko ugotavljanje občutljivosti za antibiotike

Fenotipsko občutljivost za klinično pomembne antibiotike (EFSA-FEEDAP, 2018) smo ugotavljali za skupno 470 bakterijskih sevov, in sicer 153 sevov, namenoma dodanih v agroživilsko verigo preko starterskih, zaščitnih in probiotičnih kultur ter krmnih dodatkov, 154 sevov iz fermentiranih mlečnih izdelkov, proizvedenih z ali brez komercialnih starterskih kultur, 90 sevov iz humane črevesne sluznice in 73 sevov iz humanega mleka, z mikrodilucijo

v skladu s standardom ISO 10932. Odpornost in občutljivost smo ugotavljali skladno z mejnimi vrednostmi (EFSA-FEEDAP, 2018).

## 2.2 Preiskovanje celih genomskih zaporedij

Na podlagi fenotipskih podatkov smo izbrali 75 sevov za sekvenciranje celih genomov. Genomsko DNA smo izolirali s pomočjo komercialnih kompletov (Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) ali Bioline genomic DNA Kit). Sekvenciranje je potekalo na platformi MiSeq Illumina. Analizo in obdelavo surovih podatkov (FastQC, Trimmomatic, Flash), povezovanje odčitkov (Spades, Bowtie, Velvet), anotacijo in napovedovanje genov (Prokka) smo izvedli z javno dostopnimi programi.

Z metodami *in silico* (BLAST, HMMER) smo ugotavljali prisotnost genov, povezanih z odpornostjo, v genomih sevov, ki smo jih sekvencirali in sestavili sami ( $n = 75$ ), ter v genomskih zaporedjih, dostopnih v javnih podatkovnih zbirkah ( $n = 1010$ ). Za napovedovanje ARG smo uporabili enotno bazo, sestavljeno iz podatkovnih zbirk CARD (Jia in sod., 2017), ResFinder (Zankari in sod., 2012), ARG-ANNOT (Gupta in sod., 2014), KEGG (Sequence data collection: antimicrobial resistance) in NCBI's AMR Reference Gene Database. Mutacije v proteinih, predhodno povezanih z odpornostjo, smo ugotavljali preko poravnave proteinskih zaporedij s programom Clustal Omega.

Mobilne genetske elemente (MGE) v genetski okolici ARG smo izluščili z orodjem BLAST in podatkovno bazo, ki smo pripravili sami (zaporedja iz javnih podatkovnih zbirk), vključili pa smo tudi specializirane javno dostopne baze, npr. PlasmidFinder, ICEberg in PHASTER.

## 2.3 Analize pangenomov in metagenomov

Analize pangenomov, jedrnih genomov vrst in akcesornih genov, smo pripravili s programom Roary. Ugotavljali smo, kateri zaznani ARG so del jedrnega genoma in kateri ARG so verjetno pridobljeni.

V javnih podatkovnih zbirkah smo poiskali metagenomska zaporedja humane črevesne/fekalne mikrobiote, humanega mleka in mikrobiote fermentiranih izdelkov, pridobljena v različnih raziskavah. Kontige metagenomov, že sestavljene ali pridobljene z bioinformacijskimi orodji, smo proučili z orodjem BLAST in pridobili podatke o razširjenosti ARG in MGE med celotno mikrobioto posameznih metagenomov.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Fenotipska odpornost je bila najpogostejša pri izolatih iz humane črevesne sluznice (77,8%), sledijo izolati iz humanega mleka (72,6 %), prehranskih dopolnil (70,7 %) in fermentiranih mlečnih izdelkov (60,4 %), najnižjo stopnjo odpornosti (40,8%) pa smo zaznali pri starterskih kulturah. Bimodalno razporeditev vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij, ki nakazujejo na pridobljeno odpornost, smo zaznali za 10 antibiotikov. Skupina probiotikov je izkazovala najvišjo stopnjo odpornosti proti eritromicinu (9,8 %) in klindamicinu (15,9 %). Človeška prebavila so zaradi velike gostote raznolikih bakterij in pogostega kontakta z antibiotiki idealno okolje za prenos ARG (Liu in sod., 2012), zato je visoka stopnja odpornosti v izolatih iz humane črevesne sluznice in pri sevih iz prehranskih dopolnil, ki v veliki meri izvirajo iz črevesja, pričakovana.

**Preglednica 1:** Pridobljeni geni za odpornost, detektirani v sevih, za katere smo pridobili fenotipske podatke in cela genomski zaporedja. Primeri, kjer se fenotip in genotip nista ujemala, so označeni z rdečo.

	AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia	ANT(6)-Ia	APH(3')-IIIa	CAD-I	cat	dfpG	erm(49)	erm(B)	lnuA	SAT-4	tet(L)	tet(M)	tet(O)	tet(S)	tet(U)	tetW
<i>B. animalis</i> IM414																Green
<i>B. animalis</i> IM557																Red
<i>B. animalis</i> IM812																Red
<i>B. animalis</i> IM418																Red
<i>B. animalis</i> IM661																Green
<i>B. animalis</i> IM841																Green
<i>B. breve</i> IM1386													Green			
<i>B. longum</i> IM810							Green									
<i>C. divergens</i> IM1464				Green												
<i>E. faecalis</i> IM1301		Green	Green							Green	Green					
<i>E. faecalis</i> IM1315		Green	Green		Green			Green		Green	Green	Green				
<i>E. faecalis</i> IM1437	Green					Green		Green								
<i>E. faecalis</i> IM1438		Green	Green		Green			Green		Green		Green				
<i>E. italicus</i> IM1319															Green	
<i>L. lactis</i> IM1325		Green												Green		
<i>L. reuteri</i> IM566									Green							Green
<i>L. reuteri</i> IM565									Green							Green
<i>S. carnosus</i> IM1421																
<i>S. xylosus</i> IM1419																

Z metodami *in silico* smo ugotavljali prisotnost genov in mutacij, povezanih z odpornostjo, ter mobilnih genetskih elementov v genomih sevov, ki smo jih sekvencirali in sestavili sami ( $n = 75$ ), ter v genomskih zaporedjih, dostopnih v javnih podatkovnih zbirkah ( $n = 1010$ ). Skupno smo zaznali 425 (57 različnih) pridobljenih ARG v 218 analiziranih bakterijskih sevih, največ v sevih iz humanega blata (124), sledijo sevi iz prehranskih dopolnil (66), fermentiranih izdelkov (22) in humanega mleka (6). Najbolj razširjeni so bili geni za odpornost proti tetraciklinom, makrolidom, linkozamidom in streptograminom B (MLSb) ter aminoglikozidom, kar odraža njihovo široko uporabo v preteklosti in danes. Makrolidi se poleg penicilinov in fluorokinolonov najpogosteje uporabljajo za zdravljenje okužb pri človeku, velikokrat pa se predpišejo tudi aminoglikozidi in tetraciklini, tako pri ljudeh kot tudi pri živalih (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

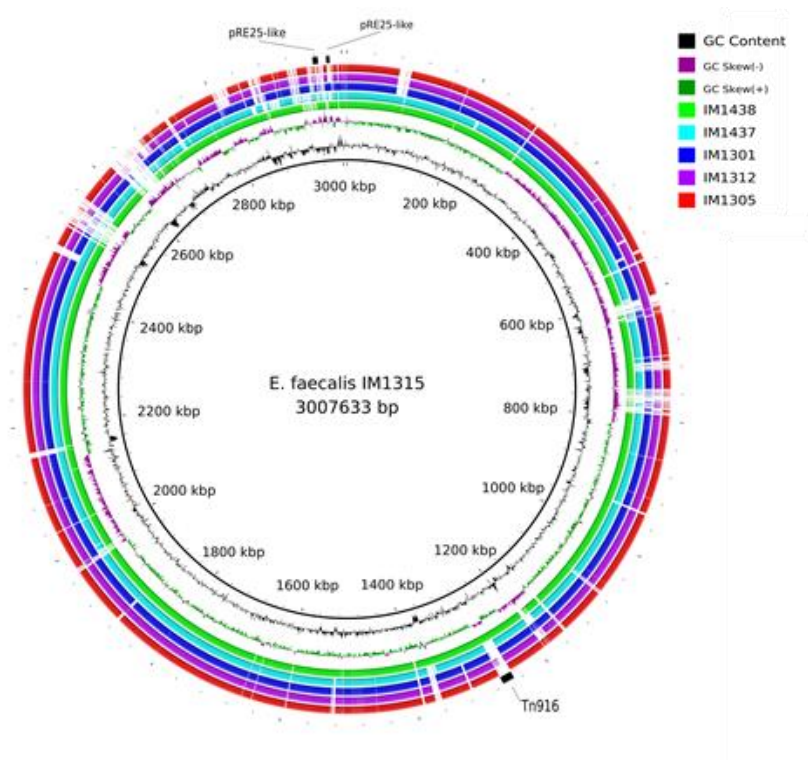
Presežene mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij (EFSA-FEEDAP, 2018) za 104 seve smo razložili deloma, in sicer z detektiranimi ARG (Preglednica 1) in mutacijami v tarčah, ki so bile predhodno povezane z odpornostjo. Na Sliki 1 je prikazan primer mutacije v ribosomalnem proteinu S12, ki povzroča odpornost proti streptomycinu. Številne intrinzične odpornosti pri mlečnokislinskih bakterijah in bifidobakterijah še niso natančno genetsko okarakterizirane, zato popolnega ujemanja fenotipskih in genotipskih rezultatov nismo dosegli.

Campedelli in sod. (2019) so za laktobacile (bivši rod *Lactobacillus* je od aprila 2020 razdeljen na 23 novih rodov) ugotovili ujemanje pri 67 % primerov.

	43	MIC (µg/ml)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	CTRVYTTTP <b>K</b> KPNS 47	S
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> IM417	CTRVYTTTP <b>K</b> KPNS 47	8
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> IM661	CTRVYTTTP <b>K</b> KPNS 47	8
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> IM217	CTRVYTTTP <b>N</b> KPNS 47	>2048
<i>Bifidobacterium breve</i> IM1386	CTRVYTTTP <b>R</b> KPNS 47	>256
<i>Bifidobacterium breve</i> IM703	CTRVYTTTP <b>R</b> KPNS 47	>256
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> IM937	CTRVYTTTP <b>K</b> KPNS 47	16
<i>Bifidobacterium breve</i> IM1336	CTRVYTTTP <b>K</b> KPNS 47	128
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> IM1339	ATRVGTMT <b>P</b> <b>K</b> KPNS 60	32
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> IM1384	ATRVGTMT <b>P</b> <b>R</b> KPNS 60	>256
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> IM1429	ATRVGTMT <b>P</b> <b>M</b> KPNS 60	>256
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> M1459	ATRVGTMT <b>P</b> <b>K</b> KPNS 60	32
	. *** * ** ****	

**Slika 1:** Odsek poravnave zaporedij proteinov S12. Mutacija na mestu K43N/R/M (*M. tuberculosis*) je bila povezana z odpornostjo proti streptomycinu. Presežene mejne vrednosti (EFSA-FEEDAP, 2018) so označene s krepko pisavo. MIC, minimalna inhibitorna koncentracija; S, občutljiv.

Detektirali smo tudi 321 MGE, povezanih s pridobljenimi ARG (77 različnih, od tega 34 novih in 43 znanih), v 149 sevih. Primer pridobljenih ARG znotraj dveh različnih MGE (Tn916 in plazmidu pRE25 podobni elementi) je prikazan na Sliki 2. Elementa sta konjugativna in pogosta pri enterokokih, odkrili pa so jih tudi pri drugih rodovih (Roberts in Mullany, 2009; Kang in Hwang, 2020). Oba elementa smo zaznali tudi v metagenomskih zaporedjih humanega blata in/ali humanega mleka, kar nakazuje na uspešen prenos teh elementov znotraj kompleksne mikrobiote. V preiskovanih metagenomskih sekvencah smo sicer detektirali 24 različnih MGE.



**Slika 2:** Poravnava celih genomskih zaporedij sevov *Enterococcus faecalis* in prikaz mobilnih genetskih elementov (Tn916 (*tet(M)*) in elementi podobni plazmidu pRE25 (*erm(B)*, *cat*, *ANT(6)-Ia*, *APH(3'')-IIIa*)).

#### 4 SKLEPI

Največjo pojavnost pridobljenih ARG smo ugotovili pri izolatih iz humanega blata, manj pa smo jih zaznali pri sevih, namenoma dodanih v agroživilsko verigo. Pri slednjih so prevladovali izolati iz prehranskih dopolnil, starterski sevi pa ne predstavljajo pomembnega vira pridobljenih ARG. Bakterije, namenoma vnesene v agroživilsko verigo, lahko predstavljajo rezervoar genov za odpornost proti antibiotikom, vendar v primerjavi z izolati iz humanega blata/črevesja predstavljajo manjše tveganje za širjenje preko agroživilske verige.

#### 5 VIRI

- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., ... Hill, C. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, e01738-18.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., . . . Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477, 457-461.
- Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Turroni, F., Milani, C., Mangifesta, M., . . . Ventura, M. (2017). Prevalence of antibiotic resistance genes among human gut-derived bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e02894-16.
- ECDC/EFSA/EMA. (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, 15,135.
- EFSA. (2005). Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal*, 226.
- EFSA/ECDC. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, 16, 5182.
- EFSA-FEEDAP. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16, 5206.
- EMA. (2018). Reflection paper on use of aminoglycosides in animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. Retrieved from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-aminoglycosides-animals-european-union-development-resistance-impact-human\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-aminoglycosides-animals-european-union-development-resistance-impact-human_en.pdf)
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 212-220.
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Wagglehner, N., Guo, P., Tsang, K. K., . . . McArthur, A. G. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acid Research*, 45, D556-D573.
- Kang, J.-H., & Hwang C.-Y. (2020). First detection of multiresistance pRE25-like elements from *Enterococcus* spp. in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 304-308.
- Kazimierczak, K. A., Flint, H. J., & Scott, K. P. (2018). Comparative analysis of sequences flanking tet(W) resistance genes in multiple species of gut bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2632-2639.
- Liu, L., Chen, X., Skogerbø, G., Zhang, P., Chen, R., He, S., & Huang, D.-W. (2012). The human microbiome: A hot spot of microbial horizontal gene transfer. *Genomics*, 100(5), 265-270.

- Roberts, A. P., & Peter Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends in Micorbiology*, 17(6), 251-258.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. Retrieved from <http://www.who.int/iris/handle/10665/112642>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., ... Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2640-2644.

## Vpliv topila DMSO na izražanje genov pri bakterijah *Campylobacter jejuni*

Manca VOLK<sup>1\*</sup>, Anja KLANČNIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [manca.volk@bf.uni-lj.si](mailto:manca.volk@bf.uni-lj.si)

### Vpliv topila DMSO na izražanje genov pri bakterijah *Campylobacter jejuni*

**Izveček:** Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* so komenzalne bakterije, prisotne v črevesju različnih živali, iz katerih se na človeka lahko prenesejo preko stika ali preko kontaminiranih živil, najpogosteje je vir okužbe nezadostno toplotno obdelana perutnina. Prekomerna uporaba antibiotikov v reji živali je povzročila porast sevov *C. jejuni*, odpornih proti antibiotikom. Strategije zmanjšanja števila bakterij v agro-živilski verigi zato vključujejo alternativne učinkovine naravnega vira, kot so fenolni izvlečki ali eterična olja rastlin. Pri raztapljanju fenolnih izvlečkov ali eteričnih olj se pogosto uporabi topilo dimetil sulfoksid (DMSO). Pri tem je namen ovrednotiti minimalno inhibitorno koncentracijo učinkovin, pri čemer koncentracija topila DMSO ne sme vplivati na rast bakterij. Raziskovalci se zato ne ukvarjajo z vplivom topila DMSO na celice in tako je njegov potencialni vpliv v sub-inhibitornih koncentracijah neraziskan. Z namenom ovrednotiti vpliv topila DMSO na molekularnem nivoju smo z metodo RNA sekvenciranja: (i) spremljali izražanje genov bakterij *C. jejuni* v eksponentni fazi po tretiranju celic z 1 % DMSO 30 minut, ter (ii) primerjali odziv na molekularnem nivoju pri dveh različnih sevih *Campylobacter jejuni*. Primerjava dveh sevov je pokazala spremenjen nivo izražanja skupno 59 genov pri sevu 1 ter 463 genov pri sevu 2. Spremembe na molekularnem nivoju celic bakterij *C. jejuni* nakazujejo pomembnost izbire topila za protimikrobne učinkovine ter njegovo potencialno delovanje tudi na drugih nivojih celice.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*; topilo DMSO; RNA sekvenciranje; transkriptom

### The effect of the solvent DMSO on the gene expression of *Campylobacter jejuni*

**Abstract:** *Campylobacter jejuni* is an intestinal commensal of various animal species and can be transmitted as a human pathogen by contact or through contaminated food, with inadequately heat-treated poultry being the most common source of infection. The overuse of antibiotics in farmed animals has led to an increase in antibiotic-resistant strains of *C. jejuni*. Strategies to reduce bacteria along the food production chain include bioactive compounds of natural origin, such as phenolic extracts or essential oils from plants. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is often used as a solvent to dissolve phenolic extracts or essential oils, with the aim of determining the minimum inhibitory concentration of the active compounds, although the concentration of DMSO should not affect the growth of bacteria. Therefore, the researchers do not address the effect of the solvent DMSO on the cells and thus the possible effect at subinhibitory concentration is not studied. To evaluate the effect of DMSO at the molecular level, we used the RNA sequencing method to: (i) monitor the gene expression of *C. jejuni* in the exponential phase after treatment of cells with 1 % DMSO for 30 min and (ii) compare the cell response of two different strains of *Campylobacter jejuni* to DMSO at the molecular level. Comparison of



the two strains showed altered expression levels of a total of 59 genes in strain 1 and 463 genes in strain 2. Changes at the molecular level of *C. jejuni* cells indicate the importance of solvent selection prior to evaluation of antimicrobial activity and its possible effect at other cellular levels.

**Key words:** *Campylobacter jejuni*; DMSO solvent; RNA sequencing; transcriptome

## 1 UVOD

Bakterije rodu *Campylobacter* spp. so najpogostejši povzročitelj s hrano prenosljivega bakterijskega gastroenteritisa v svetu, ki vsako leto prizadene do 96 milijonov ljudi. Približno 80 do 90 % vseh kampilobakterioz povzroča vrsta *Campylobacter jejuni* (Elmi in sod., 2021). Pogostost kampilobakterioz predstavlja velik socialno ekonomski problem, saj bolezen spremlja huda diareja, možni zaplet s sindromom Guillain-Barré, v redkih primerih pa smrt (Ruiz-Palacios, 2007). Bakterije *C. jejuni* so komenzalne bakterije in kolonizirajo črevesje perutnine ter drugih živali, rejenih za meso v agro-živilski verigi. Najpogostejši viri okužbe z bakterijami *C. jejuni* so kontaminirano nezadostno toplotno obdelano perutninsko meso, kontaminirano nepasterizirano mleko ali voda (Elmi in sod., 2021).

Bakterije *C. jejuni* potrebujejo za svojo rast zelo specifične pogoje, a prilagoditveni mehanizmi jim vseeno omogočajo vsesplošno razširjenost v okolju. Poleg rastnih zahtev (mikroaerofilna atmosfera, temperatura nad 30 °C) so bakterije izredno občutljive na osmotski stres, spremembe temperature in pH, ki so pogoste v naravi in agro-živilski verigi (Teh in sod., 2014). Bakterije *C. jejuni* so razvile številne mehanizme odpornosti, kot so prehod v živo, a nekultivabilno stanje (angl. *viable but not culturable*, VBNC), tvorba biofilma ali odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Ti prilagoditveni mehanizmi jim omogočajo preživetje ter zaščito pod neugodnimi okolijskimi dejavniki ali gostiteljskim obrambnim mehanizmom ter hkrati povečujejo odpornost proti antibiotikom in protimikrobnim sredstvom (Klančnik in sod., 2021; Soro in sod., 2020). Zato se razvoj usmerja v iskanje alternativnih načinov nadzora ali zmanjšanja števila bakterij, potencialno uporabnih na različnih nivojih živilske predelovalno-distribucijske verige. Ker je razvoj odpornosti na protimikrobne učinkovine posledica globalnega širjenja antibiotikov, biocidov ter razkužil in je odvisen predvsem od tipa učinkovine, se nove raziskave in tudi aplikacije usmerjajo k uporabi učinkovin naravnega vira, kot so npr. fenolni izvlečki, eterična olja ali odpadni produkti agroživilske industrije (Kaakoush in sod., 2015; Klančnik in sod., 2021). Fenolne učinkovine je potrebno pred uporabo raztopiti v organskih topilih, od katerih je v laboratorijskih pogojih najpogostejši dimetil sulfoksid (DMSO). Pri tem je namen ovrednotiti minimalno inhibitorno koncentracijo učinkovin, pri čemer koncentracija topila DMSO ne sme vplivati na rast bakterij. Raziskovalci se zato ne ukvarjajo z vplivom topila DMSO na celice in tako je njegovo potencialni vpliv v sub-inhibitornih koncentracijah neraziskan.

Namen raziskave je: (i) ovrednotiti vpliv topila DMSO na bakterije *C. jejuni* na molekularnem nivoju z metodo RNA sekvenciranja preko spremljanja izražanja genov celic v eksponentni fazi po tretiranju 30 minut z 1 % DMSO; ter (ii) primerjati odziv na molekularnem nivoju pri dveh različnih sevih *C. jejuni*.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Bakterijski sevi in pogoji gojenja

Uporabili smo dva seva bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 (poimenovali smo ga sev *C. jejuni* 1) in *C. jejuni* 11168 $\Delta$ *luxS* (poimenovali smo ga sev *C. jejuni* 2). Seva *C. jejuni* sta shranjena v mikrobiološki zbirki Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in sicer v raztopini glicerola (Kemika, Hrvaška) pri temperaturi – 80 °C. Pred izvedbo poizkusov smo seve revitalizirali na selektivnem gojišču Karmali (Biolife, Italija) v mikroaerofilni atmosferi (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> in 85 % N<sub>2</sub>) pri temperaturi 42 °C. Po revitalizaciji smo seva precepili na gojišče Mueller-Hinton Agar (MHA) (Biomérieux, Francija) in ju gojili 24 h v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C. Delovne kulture smo pripravili v tekočem gojišču Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid, Velika Britanija) s 5 % vcepkom z OD<sub>600</sub> 0,1 in ju 16 h gojili v mikroaerofilni atmosferi pri temperaturi 42 °C. Po 16-ih urah smo polovici bakterijske kulture dodali topilo DMSO (Merck, ZDA) do končne koncentracije 1 % in nadaljevali z gojenjem 30 minut.

### 2.2 Izolacija in kvantifikacija RNA

Celice v eksponentni fazi rasti smo poželi s centrifugacijo pri pogojih 5000 x g, 5 min, 4 °C. Izolacijo in čiščenje celokupne RNA smo izvedli z uporabo reagenta TRI (Sigma Aldrich, ZDA) in kompleta PureLink RNA mini kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalcev. Čiščenje izolirane RNA z encimom DNaza smo izvedli z kompletom PureLink DNase kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Kvantifikacijo RNA smo izvedli s fluorometrom Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) s kompletom Qubit RNA HS assay (Thermo Fisher Scientific). Z uporabo magnetnih kroglic NEXTflex PolyA (Perkin Elmer, ZDA) smo iz celokupne RNA izolirali mRNA.

### 2.3 Priprava knjižnic in sekvenciranje

Transkriptomsko knjižnico smo pripravili s kompletom Ion Total RNA-seq v2 (Thermo Fisher Scientific, ZDA) preko naslednjih faz: encimska razgradnja mRNA na fragmente, odstranjevanje preostalih nukleinskih kislin z uporabo magnetnih kroglic, hibridizacija in ligacija adapterjev na fragmentirano mRNA ter reverzna transkripcija. Po reverzni transkripciji smo cDNA očistili z magnetnimi kroglicami in jih označili s črtno kodo z uporabo Ion Xpress RNA-Seq Barcode BC primer (Thermo Fisher Scientific). Z analizo na Agilent 2100 Bioanalyzer in kompletom Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, ZDA) smo določili koncentracijo in distribucijo knjižnic cDNA. Knjižnice smo redčili do enake molske koncentracije in jih združili do enakih končnih volumnov ter jih pomnožili z Ion PI Hi-Q OT2 200 kompletom na sistemu Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Sekvenciranje je potekalo na sistemu Ion Proton z uporabo kompleta Ion PI Hi-Q Sequencing 200 (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

### 2.4 Analiza podatkov

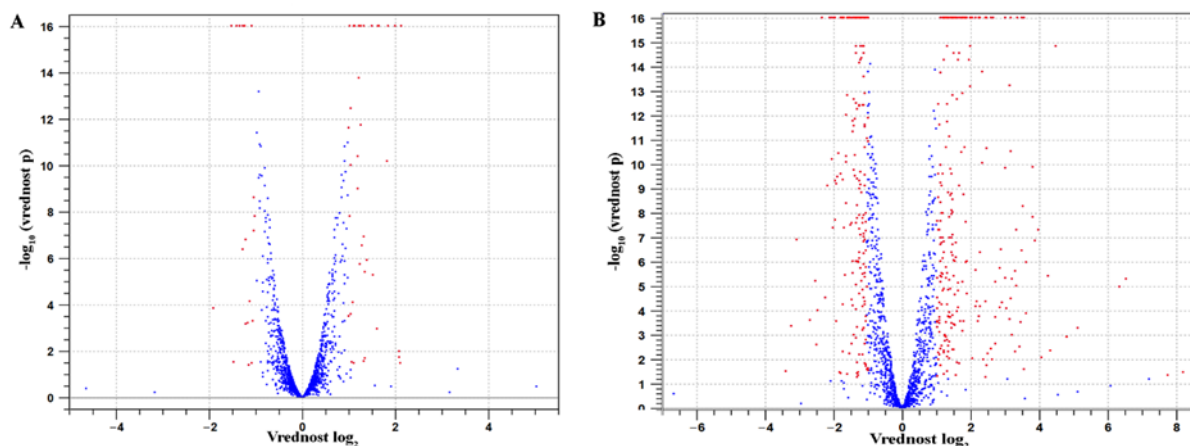
Bioinformatična analiza je bila izvedena z uporabo programa CLC Genomics Workbench (verzija 12.0.3) in CLC Genomics Server (verzija 11.0.2). Pred analizo diferencialnega izražanja genov smo izvedli kontrolo kvalitete odčitkov in odstranjevanje adapterskih sekvenc

z uporabo orodja »Trim Reads«. Analizo diferencialnega izražanja genov smo izvedli na odčitkih sekvenc posamezne knjižnice z orodjem RNA-Seq Analysis 2.21 (CLC Genomics Server 20.0.2). Kot referenčni genom smo uporabili anotirano sekvenco genoma iz NCBI Nucleotide database za *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168 (ATCC 700819) s številko NC\_002163.1 (Parkhill in sod., 2000). Za primerjavo izražanja genov med sevom *C. jejuni* 1 in sevom *C. jejuni* 2 smo uporabili orodje »Differential Expression in Two Groups 1.1«. Gene z absolutno spremembo  $\log_2 \geq 1$  in vrednostjo  $p \leq 0,05$  (FDR kriterij) smo smatrali kot diferencialno izražene.

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

#### 3.1 Vpliv topila DMSO na izražanje genov pri bakterijah *C. jejuni*

Najprej nas je zanimal vpliv topila DMSO na izražanje genov bakterij *C. jejuni* v eksponentni fazi. Celice smo 30 min tretirali s topilom DMSO v koncentraciji, ki ni vplivala na rast bakterij (1 %). Po izolaciji in obdelavi RNA smo izvedli RNA sekvenciranje ter rezultate ovrednotili. Na Sliki 1 so prikazani vsi diferencialno izraženi geni pri obeh vključenih sevih *C. jejuni*.



**Slika 5:** Vulkanski graf diferencialno izraženih genov ob tretiranju s topilom DMSO pri sevu *C. jejuni* 1 (A) in sevu *C. jejuni* 2 (B). Z rdečo piko so označeni geni z absolutno spremembo  $\log_2 \geq 1$  in vrednostjo  $p \leq 0,05$ .

Na Sliki 1A so prikazani vsi diferencialno izraženi geni pri sevu *C. jejuni* 1. Po 30 minutnem tretiranju s topilom DMSO je bilo sevu *C. jejuni* 1 diferencialno izraženih 59 genov, od katerih je bila pri 39 genih raven izražanja povečana. Največja raven izražanja je bila pri genu *Cj0724*, katerega proteinska funkcija ni znana (vrednost  $\log_2$  2,13). Sledijo mu geni *Cj0729* z domnevno funkcijo fosfodiesteraze tipa I (vrednost  $\log_2$  2,10), gen *Cj0035c* z domnevno funkcijo izlivnega proteina (vrednost  $\log_2$  2,09) ter gen *Cj1160c* z domnevno funkcijo membranskega proteina (vrednost  $\log_2$  2,08). Pri ostalih genih, ki so vključeni v različne procese v celici, je bila sprememba  $\log_2$  manjša od 2. Od vseh 59 diferencialno izraženih genov pri sevu *C. jejuni* 1 pa je bilo 20 genov z zmanjšano ravno izražanja, najmanjšo raven je dosegel gen *Cj1232* z neznano funkcijo (vrednost  $\log_2$  -1,90).

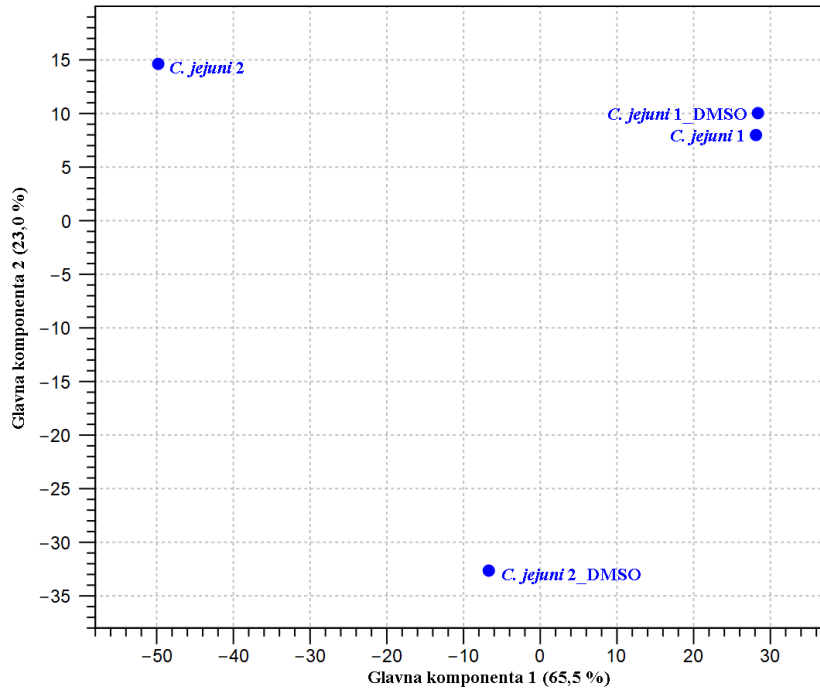
Na Sliki 1B so prikazani vsi diferencialno izraženi geni pri sevu *C. jejuni* 2. Po tretiranju s topilom DMSO je bilo pri sevu *C. jejuni* 2 diferencialno izraženih kar 463 genov, od katerih je bila pri 262 genih raven izražanja povečana. Pri genih s povečanim izražanjem jih je kar 80

imelo vrednost  $\log_2$  več kot 2. Najvišjo vrednost je dosegel gen *Cj0158c*, ki je domnevni lipoprotein z vezavnim mestom za hem (vrednost  $\log_2$  8,19). Sledijo mu geni *Cj0395c* z neznano funkcijo (vrednost  $\log_2$  7,74), gen *purS* s funkcijo podenote sintaze v purinski biosintezi (vrednost  $\log_2$  6,53), gen *Cj1589* z neznano funkcijo (vrednost  $\log_2$  6,34) ter gen *Cj1472c* z domnevno funkcijo membranskega proteina (vrednost  $\log_2$  5,12). Od vseh 463 diferencialno izraženih genov pri sevu *C. jejuni* 2 pa je bilo 201 genov z zmanjšano ravno izražanja, od katerih jih je 14 imelo vrednost  $\log_2$  manjšo od -2. Najmanjšo raven izražanja smo opazili pri genu *Cj0035c* z domnevno funkcijo izlivnega proteina (vrednost  $\log_2$  -3,41). Sledita mu gen *ybeY* s funkcijo endoribonukleaze (vrednost  $\log_2$  -2,34) ter gen *exbB2* s funkcijo transportnega proteina (vrednost  $\log_2$  3,07).

Iz podanih rezultatov diferencialnega izražanja genov je razvidno, da tretiranje s topilom DMSO pri obeh sevih v večjem številu poveča izražanje genov. Te gene, ki smo jim z metodo RNA sekvenciranja dokazali največje spremembe (najbolj povečana ali zmanjšana raven izražanja), bomo v prihodnjih eksperimentih potrdili z metodo PCR v realnem času. Pri metodi PCR v realnem času vsakemu izbranemu genu določimo nivo izražanja po predhodni normalizaciji na enega ali več referenčnih genov. Referenčni geni so običajno geni, ki v celici opravljajo osnovne funkcije in pri katerih se izražanje genov pri različnih rastnih pogojih bistveno ne spremeni. Na podlagi znanih podatkov iz literature (Ritz in sod., 2009; Suerbaum in sod., 2001) in naših rezultatov RNA sekvenciranja smo že lahko izbrali kandidatne gene za referenčne gene, ki se jim nivo izražanja ne spreminja. Med potencialnimi referenčnimi geni, ki so navedeni v literaturi in se nivo izražanja tudi po tretiranju s topilom DMSO ni spremenil, so geni: *asd* (aspartat-semialdehid dehidrogenaza), *ilvC* (kislinsko-ketolna reduktoizomeraza) ter *rpoA* ( $\alpha$ -podenota RNA polimeraze).

### 3.2 Primerjava odziva celic na topilo DMSO pri dveh sevih *C. jejuni*

V prejšnjem poglavju smo dokazali vpliv topila DMSO na izražanje genov pri obeh sevih *C. jejuni*. Zato smo v nadaljevanju primerjali ta odziv z analizo glavnih komponent (statistična tehnika, ki analizira medsebojno soodvisnost spremenljivk z namenom, da se število spremenljivk zmanjša) ter predstavili razlike med sevoma *C. jejuni* 1 in *C. jejuni* 2 na razsevnem grafikonu v Sliki 2.



**Slika 2:** Razsevni grafikon analize glavnih komponent netretiranih sevov ter sevov, tretiranih s topilom DMSO.

Iz razsevnega grafikona na Sliki 2 je vidno, da sta točki netretiranega seva *C. jejuni* 1 ter tretiranega seva *C. jejuni* 1 s topilom DMSO zelo blizu. Ta rezultat nam pove, da pri sevu *C. jejuni* 1 ni velike razlike na nivoju transkriptoma med netretiranimi celicami ter celicami, tretiranimi s topilom DMSO.

Iz razsevnega grafikona je razvidno tudi, da je razlika med točkama netretiranega seva *C. jejuni* 2 ter tretiranega seva *C. jejuni* 2 s topilom DMSO zelo velika. Ta rezultat nam pove, da so pri sevu *C. jejuni* 2 pomembne razlike na nivoju transkriptoma med netretiranimi celicami ter celicami, tretiranimi s topilom DMSO.

Povzamemo lahko, da že kratkotrajno tretiranje celic s topilom DMSO vpliva na transkriptom pri obeh testiranih sevih. Večje razlike v diferencialnem izražanju genov so bile vidne pri sevu *C. jejuni* 2, kar nakazuje na večjo občutljivost seva *C. jejuni* 2 na topilo DMSO. S tem smo dokazali, da je vpliv topila DMSO sevno specifičen in je zato pri potrebno raziskati vpliv topila pri vsakem sevu.

#### 4 SKLEPI

Zaključimo lahko, da topilo DMSO v koncentraciji 1 % ne vpliva na rast bakterij, vendar je njegov vpliv na molekularnem nivoju celice vseeno prisoten. Na podlagi analize RNA sekvenciranja smo dokazali vpliv topila DMSO na diferencialno izražanje genov pri obeh testiranih sevih *C. jejuni*.

Na podlagi rezultatov RNA sekvenciranja smo določili gene, ki niso kazali sprememb na nivoju diferencialnega izražanja genov v primerjavi med netretiranimi celicami ter celicami, tretiranimi s topilom DMSO. Te gene smo izbrali za referenčne gene. Uporabili jih bomo v našem nadaljnjem delu in sicer za normalizacijo pri kvantifikaciji izražanja posameznih

izbranih genov, katerim bomo pod drugimi pogoji dokazali največje spremembe (najbolj povečana ali zmanjšana raven izražanja).

Vpliv topila DMSO je bil pri sevu *C. jejuni* 2 večji. To dokazuje sevno specifičen vpliv in izpostavlja pomembnost preudarne izbire topila za raztapljanje protimikrobnih učinkovin pri ovrednotenju minimalne inhibitorne koncentracije različnih bakterijskih sevov.

## ZAHVALE

Doktorsko delo poteka v okviru projekta 52659 (MR – Klančnik, Volk), ki ga financira Slovenska Agencija za Raziskovalno dejavnost (ARRS).

## 5 VIRI

- Elmi, A., Nasher, F., Dorrell, N., Wren, B., & Gundogdu, O. (2021). Revisiting *Campylobacter jejuni* virulence and fitness factors: role in sensing, adapting, and competing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.607704>
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Klančnik, A., Šimunović, K., Sterniša, M., Ramić, D., Smole Možina, S., & Bucar, F. (2021). Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. *Phytochemistry Reviews*, 20(1), 55–84. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09669-6>
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., ... Barrell, B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), 665–668. <https://doi.org/10.1038/35001088>
- Ritz, M., Garenaux, A., Berge, M., & Federighi, M. (2009). Determination of *rpoA* as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress. *Journal of Microbiological Methods*, 76(2), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.014>
- Ruiz-Palacios, G. M. (2007). The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(5), 701–703. <https://doi.org/10.1086/509936>
- Soro, A. B., Whyte, P., Bolton, D. J., & Tiwari, B. K. (2020). Strategies and novel technologies to control *Campylobacter* in the poultry chain: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1353–1377. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12544>
- Suerbaum, S., Lohrengel, M., Sonnevend, A., Ruberg, F., & Kist, M. (2001). Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2553–2559. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2553-2559.2001>
- Teh, A. H. T., Lee, S. M., & Dykes, G. A. (2014). Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5154–5160. <https://doi.org/10.1128/AEM.01493-14>

## BIOINFORMATIKA

### Spremljanje spinalne mišične atrofije pred in po zdravljenju v primerjavi z zdravo kohorto

Leon DEUTSCH<sup>1\*</sup>, Damjan OSREDKAR<sup>2,3</sup>, Janez PLAVEC<sup>4</sup>, Blaž STRES<sup>1,5,6,7\*</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Oddelek za otroško nevrologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Nacionalni inštitut za kemijo, NMR center, Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup> Univerza v Ljubljani, Inštitut za zdravstveno hidrotehniko, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>6</sup> Inštitut Jožef Stefan, Oddelek za avtomatiko, biokibernetiko in robotiko, Ljubljana, Slovenija

<sup>7</sup> Univerza v Innsbrucku, Oddelek za mikrobiologijo, Innsbruck, Avstrija

\*korespondenčni avtor: [blaz.stres@bf.uni-lj.si](mailto:blaz.stres@bf.uni-lj.si)

### **Spremljanje spinalne mišične atrofije pred in po zdravljenju v primerjavi z zdravo kohorto**

**Izveček:** V okviru študije smo analizirali metabolomske profile urinov, likvorjev in serumov pacientov s spinalno mišično atrofijo pred in po četrti aplikaciji terapije z nusinersenom, ki je bila prva uradno potrjena terapija s strani regulatorjev. Na vzorcu 25ih pacientov nismo odkrili bistvenih metabolomskih sprememb, navkljub temu, da je bilo opazno klinično izboljšanje stanja pri pacientih (boljše gibalne sposobnosti, več moči v rokah ipd.). Naredili smo tudi primerjavo urinskih metabolomov z ujemajočo zdravo kohorto. Z uporabo multivariatnih statističnih metod in metod avtomatskega strojnega učenja smo pokazali, da je koncentracija kreatinina v urinu pri zdravi kohorti povišana, kar predstavlja potencialni marker za spremljanje in diagnostiko bolezni. Predstavili smo tudi model, ki bi lahko bil za dodatno pomoč pri odkrivanju spinalne mišične atrofije na podlagi koncentracije kreatinina iz urina, ki je neinvazivna metoda vzorčenja, kar je pomembno pri mlajših pacientih, ki imajo hujšo obliko SMA.

**Ključne besede:** nusinesen; spinalna mišična atrofija; metabolomika; NMR; JADBIO; zdrava kohorta

### **Monitoring of spinal muscular atrophy before and after treatment compared with a healthy cohort**

**Abstract:** The study analyzed the metabolic profiles of urine, cerebrospinal fluid, and serum from patients with spinal muscular atrophy before and after the fourth application of nusinersen, the first regulatory-approved therapy. No significant metabolic changes were observed in a sample of 25 patients, although significant clinical improvement was observed in the patients

(better motor skills, more strength in the hands, etc.). We also compared urinary metabolites with a matched healthy cohort. Using multivariate statistical methods and automated machine learning, we showed that urinary creatinine concentration was elevated in a healthy cohort, which is a potential marker for disease monitoring and diagnosis. We also presented a model that could be an additional help in the detection of spinal muscular atrophy based on urinary creatinine concentration, a non-invasive sampling method that is important in younger patients with a severe form of SMA.

**Key words:** nusinesen; spinal muscular atrophy; metabolomics; NMR; JADBIO; healthy cohort

## 1 UVOD

Spinalna mišična atrofija (SMA) je redka bolezen (incidenca 1/11000 rojenih), ki prizadene motorične nevrone in se kaže kot progresivna atrofija, torej poslabšanje mišičnega tonusa zaradi izgube mišičnih nevronov (Sugarman in sod., 2012). Do same bolezni pride zaradi substitucije (C->T) gena *SMN2*, ki je lociran na telomeri. Če je mutiran tudi gen *SMN1*, ki je lociran na centromeri, pride ob transkripciji do sinteze okvarjenih proteinov SMN, ki povzročijo SMA. SMN je protein, ki se nahaja pravzaprav v vseh somatskih tkivih, njegova vloga pa zaenkrat še ni v celoti razumljena (Lunn in Wang, 2008; Smeriglio in sod., 2020). Bolezen SMA ni samo atrofična, ampak se posredno kaže tudi v gastrointestinalnih, kardiovaskularnih in tudi drugih težavah (Yeo in Darras, 2020). Poznamo štiri tipe bolezni, pri čemer je tip I najhujša oblika, ki se konča s smrtjo v zelo zgodnji fazi življenja. Dokler ni bilo zdravila za SMA, je ta veljala kot najpogostejši vzrok smrti pri otrocih. To se je spremenilo s prihodom terapij, ki lahko modificirajo izražanje genov SMN. Ena izmed takih je tudi nusinersen, ki je protismiselni oligonukleotid (ang. *antisense oligonucleotide*), ki prepreči izrezovanje eksona 7, zaradi točkovne mutacije, na genu *SMN2*, kar omogoči nastanek delujočega proteina (Chiriboga, 2017). Nusinersen je bilo prva terapija, ki je dobilo dovoljenje FDA in EMA in ne prehaja krvno-možganske bariere kar pomeni, da ga je potrebno aplicirati intratekalno skozi hrbtnjačo (Corey, 2017; Ramdas in Servais, 2020).

Namen naše študije je bil preučiti vpliv dolgotrajne neaktivnosti (pacienti SMA) iz metabolomskega vidika. Metabolomika je metoda preučevanja majhnih molekul v telesnih tekočinah. Ena izmed metod je uporaba protonske jedrske resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ), ki je nekoliko manj občutljiva, hkrati pa ni destruktivna za vzorce. Uporabljena je bila na različnih boleznih v preteklosti, hkrati pa zaradi enostavnosti rokovanja z vzorci (brez derivacij) ter možnosti avtomatizacije merilnih sistemov prihaja vedno bolj v ospredje (Smolinska in sod., 2012).

## 2 MATERIAL IN METODE

Študija je bila izvedena na slovenski kohorti pacientov s SMA mlajših od 19 let starosti. Pri vseh pacientih je bila SMA klinično in tudi genetsko potrjena. Celotna študija je potekala na Oddelku za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo na pediatrični kliniki v Ljubljani. Vsi eksperimentalni protokoli so bili odobreni iz strani Nacionalne etične komisije (0120-305/2018/6 in 0120-305/2018/11). V študijo je bilo vključenih 25 pacientov (Deutsch in sod., 2021; Osredkar in sod., 2021).

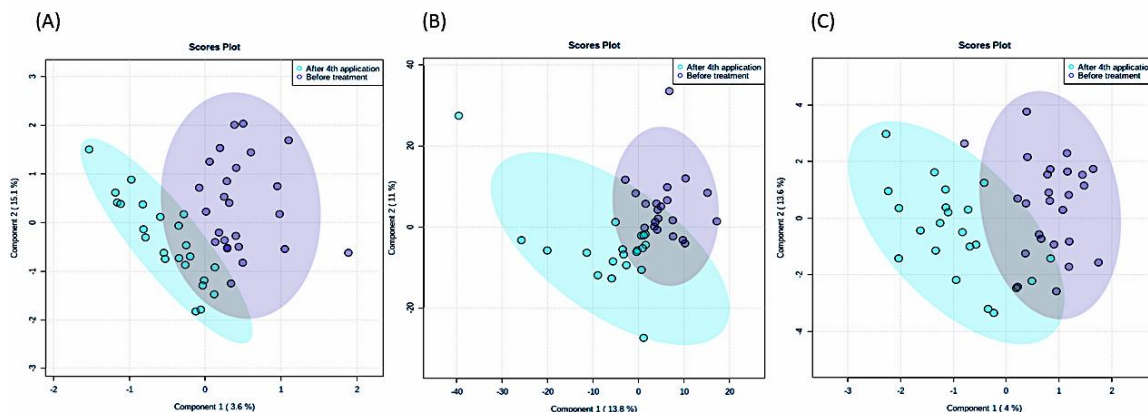


Vsi pacienti so bili predhodno klinično pregledani in so prejeli standardno dozo (12 mg/mL) nusinersena z intratekalno aplikacijo. Pacienti so bili odpuščeni v domačo oskrbo še isti dan ali pa naslednji dan. Vsem pacientom je bil ob intratekalni aplikaciji odvzet likvor, hkrati pa še serum in urin. Za potrebe metabolomike smo uporabili urine, likvorje in serume odvzete ob prvi in četrti (po dveh mesecih) aplikaciji nusinersena. Zaradi neinvazivnosti same metode, smo zbrali še urine pri zdravi ujemajoči se kohorti (n=125) (Deutsch in sod., 2021; Osredkar in sod., 2021). Na vzorcih je bila narejena metabolomika z  $^1\text{H-NMR}$ . Vzorci so bili pripravljene v skladu z ustaljenimi protokoli od prej (Beckonert in sod., 2007). Serumske vzorce smo dodatno prefiltrirali s Amicon Ultra 3 kDa kolonami za filtracijo proteinov (Merck Milipore). Spektri so bili posneti na 600 MHz NMR spektrometrih Agilent Technologies DD2 pri temperaturi 24 °C. Programa VNMRJ (Agilent) in Topspin (Bruker) smo uporabili za predprocesiranje spektrov (Deutsch in sod., 2021; Murovec in sod., 2018; Sket in sod., 2018; Šket in sod., 2020). Metaboliti so bili identificirani s pomočjo programa Chenomx NMR suite verzije 8.6 s primerjavo s spektri v Humani metabolomski podatkovni bazi (HMDB) (Wishart in sod., 2018).

Uporabljeni so bili različni nivoji statističnih analiz: (i) neparametično MANOVO (PERMANOVA) (Legendre in Legendre, 2012), (ii) MetaboAnalyst (Chong in sod., 2018; Chong in sod., 2019) spletno platformo zasnovano za metabolomske statistične analize in analize metabolnih poti. Rezultate statističnih analiz smo dodatno potrdili z uporabo platforme JADBIO (Tsamardinis in sod., 2020), ki temelji na avtomatizaciji uporabe metod strojnega učenja in je bila zasnovana prav za namene analize biomedicinskih podatkov. Surovi podatki so bili razdeljeni v razmerju 70:30, pri čemer smo prvi del uporabili za treniranje modela, ostali del pa za njegovo testiranje. JADBIO platforma je bila ustanovljena prav z namenom obdelave biomedicinskih podatkov z upoštevanjem biomedicinskih značilnosti in jo uporabljajo na področju medicine (Borboudakis in sod., 2017; Karaglani in sod., 2020; Mustafa in Rahimi Azghadi, 2021).

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

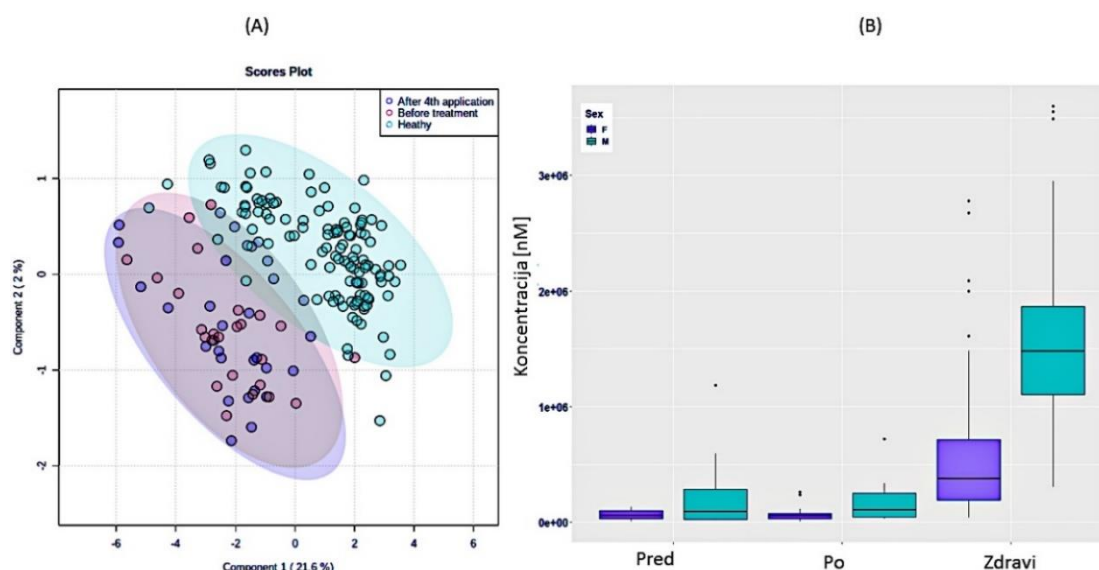
Klinični pregledi pred in po zdravljenju so pokazali napredek pri nekaterih pacientih po četrti aplikaciji, ki se je pokazal predvsem z večjo močjo v spodnjih okončinah, boljše stabilnostjo glave in pri pacientih z lažjo obliko z večjimi gibalnimi sposobnostmi. Boljša klinična slika pa se ni odražala na nivoju metabolnega profila urina, likvorja ali seruma. Čeprav je analiza PLSDA vizualno pokazala (Slika 1), da takšne razlike bi lahko bile, bi za statistično signifikantno potrditev teh razlik morali zbrati vsaj 1000 vzorcev na skupino, kar pa pri tako redki bolezni na slovenskem nacionalnem nivoju ni možno (Deutsch in sod., 2021).



**Slika 6:** Analiza PLSDA narejena na metabolomskih podatkih pacientov SMA pred (modra) in po (turkizna) zdravljenju z nusinersenom v urinih (A), serumih (B) in likvorjih (C). (CC-BY (Deutsch in sod., 2021))

Do sedaj sta bili pri raziskavah SMA uporabljena serum in likvor, uporaba urina v SMA do sedaj še ni bila opisana. Zato smo primerjali metabolomske profile med pacienti SMA in zdravo kohorto na nivoju urinov, med moškimi in ženskami (Deutsch in sod., 2021). Z npMANOVO smo pokazali, da k razlikam med metabolomskimi profili prispeva tako spol ( $F = 54,9$ ;  $p = 0,0001$ ), kot tudi sama prisotnost bolezni ( $F = 20,7$ ;  $p = 0,0001$ ). Analiza je bila narejena na treh vrstah transformacij podatkov: (i) sestavi (%), (ii) Box-Cox in (iii)  $\log(x+1)$ . Analize v MetaboAnalyst (PLSDA in randomforest) so pokazale, da obstaja razlika v metabolomskem profilu med SMA pacienti na eni strani in zdravimi na drugi ( $p < 0,05$ ) (Slika 2A). Primerjava kumulativnih koncentracij je pokazala, da je pri zdravih koncentracija metabolitov za 58 % višja kot pri pacientih SMA ( $p < 0,05$ ) in tudi število prisotnih metabolitov je bilo signifikantno znižano ( $p < 0,001$ ) pri bolnikih s SMA. Opazili smo signifikantno razliko med zdravo moško in žensko kohorto. Pri slednji smo opazili manjšo količino metabolitov ( $178.2 \pm 10.8$  (moški) in  $154.9 \pm 24$  (ženske)), kar dodatno kaže na to, da so potrebne dodatne študije tako na strani bolnikov s SMA kot tudi študije na primerjavi med spoloma na nivoju metabolitov.

Povišana količina metabolitov pri zdravi populaciji se je v preteklosti pokazala tudi pri drugih študijah, kjer so preučevali redno vadbo, ki prav tako povzroči močnejši metabolomski odziv (Nieman in sod., 2013). Tudi kontrolirane študije, kjer so preučevali vpliv neaktivnosti so pokazale, da ta vpliva na manjši metabolomski odziv in, da že 3 tedensko konstantno ležanje vodi v 30 % padec metabolitov, je v časovnem sosledju s pojavom insulinske rezistence, zmanjšanim obsegu mišičja, upočasneni prebavi in zaprtju, psihičnih odzivih in depresiji in tudi v negativnih ter vnetnih interakcijah z mikrobiomom (Debevec in sod., 2014; Deutsch in Stres, 2021; Sket in sod., 2018; Sket, Treichel, Debevec, in sod., 2017; Sket, Treichel, Kublik in sod., 2017; Šket in sod., 2020). Vse to lahko zelo močno vpliva tudi na zelo bolne paciente SMA, ki zaradi bolezni večino časa preživijo v neaktivnosti.



**Slika 2:** (A) Analiza PLSDA narejena na urinskih metabolomskih podatkih pacientov SMA pred (rdeče) in po (modra) zdravljenju z nusinersenom ter ujemajočo zdravo kohorto (turkizna). (B) Koncentracije kreatinina pred in po zdravljenju ter v zdravi kohorti pri ženskah (modra) in moških (zeleno). (CC-BY (Deutsch in sod., 2021))

S strojnim učenjem in modeliranjem biomedicinskih podatkov smo poiskali najustreznejši model, ki ločuje med zdravimi in pacienti SMA na podlagi  $^1\text{H-NMR}$  urinskih metabolitov. Na podlagi 60340 testiranih modelov, smo pridobili najboljši model, ki ločuje na podlagi kreatinina (v nM koncentracijah). Gre za model z logistično regresijo (angl. *Ridge logistic regression*) z AUC metriko 0,958, ki ga je možno poganjati tudi lokalno na lastnem sistemu in na lastnih podatkih. Treniran model smo uporabili na testnih podatkih, v katere so bili prav tako vključeni bolni in pripadajoča zdrava kohorta, pri čemer smo ugotovili, da je model na testiranih podatkih bil prav tako uspešen za njihovo ločevanje (AUC = 0,97). S pomočjo JADBIO smo dobili tudi ostale metrike za oceno uspešnosti modela (Preglednica 1). S tem smo potrdili tudi rezultate statističnih analiz, ki je prav tako potrdila kreatinin kot metabolit, ki najbolje ločuje med pacienti SMA in zdravimi (Slika 2B). Kreatinin v serumu so v 2020 identificirali kot metabolit, ki bi lahko bil uporaben za namene diagnostike (Alves in sod., 2020). Z našo študijo smo prvič pokazali, da tako ločevanje omogoča tudi kreatinin v urinu, ki se lahko vzorči s popolnoma neinvazivnimi pristopi in s tem pri mlajši populaciji omejimo povzročanje dodatnega stresa pri jemanju krvi ali likvorja. Uporaba urina tako predstavlja pomemben napredek pri poenostavitvi diagnostike SMA in rutinskem pregledovanju.

**Preglednica 1:** Prikaz ocen različnih metrik treniranega modela.

<i>Metrika</i>	<i>Srednja ocena</i>	<i>95 % interval zaupanja</i>
Površina pod krivuljo (AUC)	0,958	[0.873, 1.00]
Povprečna preciznost	0,979	[0.908, 1.00]
Natančnost	0,929	[0.826, 0.982]
F1 vrednost	0,863	[0.764, 0.954]
<i>Matthewsova korelacija</i>	0,772	[0.580, 0.905]
<i>Preciznost</i>	0,79	[0.606, 0.960]
<i>Delež resničnih pozitivnih primerov</i>	0,903	[0.744, 1.00]
<i>Specifičnost</i>	0,88	[0.783, 0.983]

#### 4 SKLEPI

Podatki o SMA kažejo, da je SMA bolezen, ki prizadene nevrone, kar se pa manifestira tudi na drugih tkivih oz. organskih sistemih. Vpliv neaktivnosti na celoten sistem, ki se prav tako manifestira na množici organskih sistemov, lahko posredno povežemo tudi s pacienti SMA, ki so fizično precej manj aktivni ali celo neaktivni skozi daljša časovna obdobja. Čeprav gre za popolnoma različne načine neaktivnosti, se ta lahko manifestira na precej podoben način, ki je viden tudi na nivoju metabolitov, ki so na nek način odtis tistega, kar se v določnem trenutku dogaja v telesu. Urin smo v naši študiji prvi uporabili za spremljanje metabolnega stanja SMA v povezavi z do sedaj uporabljanim serumom in likvorjem. Urin kot telesna tekočina, ki je v stiku tudi s krvnim obtokom (preko ledvic), je lahko pokazatelj metabolnega stanja v telesu na molekularnem biokemijskem nivoju. Kot zanimivost – progresivno znižane koncentracije kreatinina so bile tudi opažene v projektu PlanHab (Sket in sod., 2018; Sket, Treichel, Debevec,

in sod., 2017; Sket, Treichel, Kublik, in sod., 2017; Šket in sod., 2020), kjer so preučevali tritedensko ležanje v okoljih z nizko (hipoksično) ali normalno (normoksično) koncentracijo kisika. Ponovna uvedba fizične aktivnosti po treh tednih neaktivnosti je takoj spremenila metabolno sliko preiskovancev, kar bi lahko uporabili za izboljšanje stanja tudi v primeru SMA s pomočjo primerne adaptacije in uporabe vibracijske terapije za vzpodbujanje krčenja mišic in večanja fizične aktivnosti pacientov s SMA in s tem boljšim metabolomskim odzivom (Hoff in sod., 2015).

## ZAHVALA

Za izvedbo študije je bilo potrebno veliko sodelovanja med različnimi inštitucijami. Tako se avtorji študije zahvaljujemo Titi Butenko, Tanji Lobodi in Tanji Goli za zbiranje kliničnih podatkov. Za nemoteno izvedbo meritev na NMR se avtorji zahvaljujemo Klemnu Pečniku in Urošu Javorniku. Hvala tudi Zali Prevorsek za pomoč pri organiziranju. Zahvaljujemo se za podporo s strani prof. Heriberta Insama, Univerza v Innsbrucku, Avstrija.

## 5 VIRI

- Alves, C. R. R., Zhang, R., Johnstone, A. J., Garner, R., Nwe, P. H., Siranosian, J. J., & Swoboda, K. J. (2020). Serum creatinine is a biomarker of progressive denervation in spinal muscular atrophy. *Neurology*, *94*(9). <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008762>
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*, *2*(11), 2692-2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Borboudakis, G., Stergiannakos, T., Frysali, M., Klontzas, E., Tsamardinos, I., & Froudakis, G. E. (2017). Chemically intuited, large-scale screening of MOFs by machine learning techniques. *Npj Computational Materials*, *3*, Article 40. <https://doi.org/10.1038/s41524-017-0045-8>
- Chiriboga, C. A. (2017). Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Rev Neurother*, *17*(10), 955-962. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1364159>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research*, *46*(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*, *68*(1), e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Corey, D. R. (2017). Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nature neuroscience*, *20*(4). <https://doi.org/10.1038/nn.4508>
- Debevec, T., Bali, T. C., Simpson, E. J., Macdonald, I. A., Eiken, O., & Mekjavic, I. B. (2014). Separate and combined effects of 21-day bed rest and hypoxic confinement on body composition. *Eur J Appl Physiol*, *114*(11), 2411-2425. <https://doi.org/10.1007/s00421-014-2963-1>
- Deutsch, L., Osredkar, D., Plavec, J., & Stres, B. (2021). Spinal Muscular Atrophy after Nusinersen Therapy: Improved Physiology in Pediatric Patients with No Significant Change in Urine, Serum, and Liquor 1H-NMR Metabolomes in Comparison to an Age-Matched, Healthy Cohort. *Metabolites*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/metabo11040206>

- Deutsch, L., & Stres, B. (2021). The Importance of Objective Stool Classification in Fecal <sup>1</sup>H-NMR Metabolomics: Exponential Increase in Stool Crosslinking Is Mirrored in Systemic Inflammation and Associated to Fecal Acetate and Methionine [Article]. *Metabolites*, 11(3), 172. <https://doi.org/10.3390/metabo11030172>
- Hoff, P., Belavý, D. L., Huscher, D., Lang, A., Hahne, M., Kuhlmeier, A. K., Maschmeyer, P., Armbrrecht, G., Fitzner, R., Perschel, F. H., Gaber, T., Burmester, G. R., Straub, R. H., Felsenberg, D., & Buttgerit, F. (2015). Effects of 60-day bed rest with and without exercise on cellular and humoral immunological parameters. *Cellular & molecular immunology*, 12(4). <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.106>
- Karaglani, M., Gourlia, K., Tsamardinos, I., & Chatzaki, E. (2020). Accurate Blood-Based Diagnostic Biosignatures for Alzheimer's Disease via Automated Machine Learning. *Journal of clinical medicine*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/jcm9093016>
- Legendre, P., & Legendre, L. F. J. (2012). *Numerical Ecology* (3 ed., Vol. 24). Elsevier.
- Lunn, M. R., & Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet (London, England)*, 371(9630). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60921-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60921-6)
- Murovec, B., Makuc, D., Kolbl Repinc, S., Prevorsek, Z., Zavec, D., Sket, R., Pecnik, K., Plavec, J., & Stres, B. (2018). (1)H NMR metabolomics of microbial metabolites in the four MW agricultural biogas plant reactors: A case study of inhibition mirroring the acute rumen acidosis symptoms. *J Environ Manage*, 222, 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.068>
- Mustafa, A., & Rahimi Azghadi, M. (2021). Automated Machine Learning for Healthcare and Clinical Notes Analysis. *Computers*, 10(2), 24.
- Nieman, D. C., Shanely, R. A., Gillitt, N. D., Pappan, K. L., & Lila, M. A. (2013). Serum metabolic signatures induced by a three-day intensified exercise period persist after 14 h of recovery in runners. *Journal of proteome research*, 12(10). <https://doi.org/10.1021/pr400717j>
- Osredkar, D., Jílková, M., Butenko, T., Loboda, T., Golli, T., Fuchsová, P., Rohlenová, M., & Haberlova, J. (2021). Children and young adults with spinal muscular atrophy treated with nusinersen. *European Journal of Paediatric Neurology*, 30, 1 - 8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.11.004>
- Ramdas, S., & Servais, L. (2020). New treatments in spinal muscular atrophy: an overview of currently available data. *Expert Opin Pharmacother*, 21(3), 307-315. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1704732>
- Sket, R., Debevec, T., Kublik, S., Schloter, M., Schoeller, A., Murovec, B., Mikus, K. V., Makuc, D., Pecnik, K., Plavec, J., Mekjavic, I. B., Eiken, O., Prevorsek, Z., & Stres, B. (2018). Intestinal Metagenomes and Metabolomes in Healthy Young Males: Inactivity and Hypoxia Generated Negative Physiological Symptoms Precede Microbial Dysbiosis. *Frontiers in Physiology*, 9, Article 198. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00198>
- Sket, R., Treichel, N., Debevec, T., Eiken, O., Mekjavic, I., Schloter, M., Vital, M., Chandler, J., Tiedje, J. M., Murovec, B., Prevorsek, Z., & Stres, B. (2017). Hypoxia and Inactivity Related Physiological Changes (Constipation, Inflammation) Are Not Reflected at the Level of Gut Metabolites and Butyrate Producing Microbial Community: The PlanHab Study. *Frontiers in Physiology*, 8, Article 250. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00250>
- Sket, R., Treichel, N., Kublik, S., Debevec, T., Eiken, O., Mekjavic, I., Schloter, M., Vital, M., Chandler, J., Tiedje, J. M., Murovec, B., Prevorsek, Z., Likar, M., & Stres, B. (2017). Hypoxia and inactivity related physiological changes precede or take place in absence of significant rearrangements in bacterial community structure: The PlanHab randomized trial pilot study. *Plos One*, 12(12), Article e0188556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188556>
- Smeriglio, P., Langard, P., Querin, G., & Biferi, M. G. (2020). The Identification of Novel Biomarkers Is Required to Improve Adult SMA Patient Stratification, Diagnosis and Treatment. *Journal of personalized medicine*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/jpm10030075>

- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M., & Wijmenga, S. S. (2012). NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: a review. *Anal Chim Acta*, 750, 82-97. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>
- Sugarman, E. A., Nagan, N., Zhu, H., Akmaev, V. R., Zhou, Z., Rohlf, E. M., Flynn, K., Hendrickson, B. C., Scholl, T., Sirko-Osada, D. A., & Allitto, B. A. (2012). Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *Eur J Hum Genet*, 20(1), 27-32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.134>
- Tsamardinos, I., Charonyktakis, P., Lakiotaki, K., Borboudakis, G., Zenklusen, J. C., Juhl, H., Chatzaki, E., & Lagani, V. (2020). Just Add Data: Automated Predictive Modeling and BioSignature Discovery. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.075747>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vazquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C., & Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D608-d617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Yeo, C. J. J., & Darras, B. T. (2020). Overturning the Paradigm of Spinal Muscular Atrophy as Just a Motor Neuron Disease. *Pediatric Neurology*, 109, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.003>
- Šket, R., Deutsch, L., Prevoršek, Z., Mekjavić, I. B., Plavec, J., Rittweger, J., Debevec, T., Eiken, O., & Stres, B. (2020). Systems View of Deconditioning During Spaceflight Simulation in the PlanHab Project: The Departure of Urine 1 H-NMR Metabolomes From Healthy State in Young Males Subjected to Bedrest Inactivity and Hypoxia. *Frontiers in physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.532271>

## BIOLOGIJA

### Sinteza in izolacija sintetičnega mikrorazdelka Pdu z vključenim transkripcijskim faktorjem LacI

Maja HOSTNIK<sup>1\*</sup>, Jan OTONIČAR<sup>1</sup>, Matej BUTALA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [maja.hostnik@bf.uni-lj.si](mailto:maja.hostnik@bf.uni-lj.si)

#### **Sinteza in izolacija sintetičnega mikrorazdelka Pdu z vključenim transkripcijskim faktorjem LacI**

**Izvleček:** Bakterijski mikrorazdelki so proteinski organeli, ki sodelujejo v različnih metabolnih procesih v celici. Izolati bakterij *Salmonella enterica* in *Citrobacter freundii* imajo na genomu operon *pdu*, ki vključuje gene za ene izmed največjih mikrorazdelkov, ki sodelujejo pri razgradnji 1,2-propandiol. Mikrorazdelek Pdu je zgrajen iz sedmih različnih proteinov, ki se najprej sestavijo v homoheksamere ali homopentamere, ki se nato samo-sestavijo v lupino mikrorazdelka. Številni metabolni encimi, ki vključujejo specifično peptidno zaporedje naaminskem koncu, se tekom izgradnje mikrorazdelka vključijo v lumen mikrorazdelka. Če peptidno zaporedje sklopimo s poljubnim proteinom ga tako usmerimo v notranjost mikrorazdelka. V študiji smo pripravili plazmid z geni za proteine za izgradnjo lupine mikrorazdelka Pdu ter s transkripcijskim faktorjem LacI, sklopljenim s signalnim zaporedjem encima PduD in zelenim fluorescentnim proteinom. Eno izmed podenot lupine mikrorazdelka, podenoto PduA, smo sklopili z oznako »Twin-Strep-tag«, ki nam je omogočila afinitetno izolacijo mikrorazdelka. Sintezo mikrorazdelkov in fluorescenčno označenega LacI smo sprožili z dodatkom arabinoze k bakterijski kulturi *Escherichia coli* s plazmidom z operonom Pdu in genom za modificirani LacI. Rezultati fluorescentne mikroskopije kažejo, da smo dosegli vključitev modificiranega LacI v notranjost mikrorazdelka Pdu *in vivo*. Z uporabo fluorescentne mikroskopije in masne spektroskopije smo dokazali prisotnost LacI v izoliranih mikrorazdelkih Pdu. Slednje nam omogoča razvoj metode za vnos izbranega odseka DNA v kompleksu z LacI v mikrorazdelek in njegovo izolacijo.

**Ključne besede:** primitivni organel; bakterijski mikrorazdelek Pdu; Twin-Strep-tag; represor LacI

#### **Synthesis and isolation of a sythetic Pdu microcompartment with a transcription factor LacI**

**Abstract:** Bacterial microcompartments are protein organelles involved in various metabolic processes in a cell. Genomes of *Salmonella enterica* and *Citrobacter freundii* encode proteins for one of the largest microcompartments involved in the degradation of 1,2-propanediol. The Pdu microcompartment is composed of seven different proteins that first assemble into homoheexamers or homopentamers, which then self-assemble into the shell of the microcompartment. Many metabolic enzymes, which involve a specific peptide sequence at the amino-terminus, are incorporated into the lumen of the microcompartment during the assembly of the microcompartment. This microcompartment packaging sequences can be linked to the

protein of interest to direct it into the microcompartment. In our study, we constructed a plasmid with genes for shell proteins of the Pdu microcompartment and a transcription factor LacI fused to the PduD enzyme signal sequence and green fluorescent protein. One of the shell subunits, the PduA subunit, was fused with a “Twin-Strep-tag” that allowed us affinity purification of the microcompartments. The synthesis of the microcompartments and fluorescently labelled LacI was initiated by the addition of arabinose to the bacterial culture of *Escherichia coli* carrying a plasmid with the Pdu operon and the modified LacI gene. The results of fluorescence microscopy indicate that we achieved the incorporation of the modified LacI into the interior of the Pdu microcompartment *in vivo*. We confirmed the presence of LacI in isolated Pdu microcompartments by using fluorescence microscopy and mass spectroscopy. The experimental setup allows us to develop a method for introducing a selected segment of DNA in a complex with LacI into a microcompartment and its isolation.

**Key words:** primitive organelle; bacterial Pdu microcompartment; Twin-Strep tag; repressor LacI

## 1 UVOD

Kompartimentalizacija procesov v celicah je dobro opisana pri evkariontih, a obstaja tudi pri prokariontih. Nedavne raziskave kažejo, da tudi bakterije natančno organizirajo strukturo genoma in nekatere metabolne procese ali del procesov izvedejo z encimi, ki so prostorsko ločeni od preostanka citoplazme v »primitivnih« organelih, mikrorazdelkih (Greening in Lithgow, 2020). Mikrorazdelki so veliki od 20 do 600 nm in jih sestavlja selektivno prepustna proteinska lupina, ki po svoji funkciji spominja na lipidni dvosloj evkariontov (Liberton in sod., 2011; Mayer in sod., 2016). Lupina pakira niz encimov in bakterijam omogoča učinkovitejšo izvedbo določenih metabolnih reakcij in hkrati ščiti bakterijo pred vmesnimi toksičnimi produkti metabolizma. Selektivno prepustna lupina ima glavno vlogo pri ločevanju metabolnih procesov mikrorazdelka od tistih v citosolu, obenem pa povečuje lokalno koncentracijo encimov ter olajša transport substrata in kofaktorjev skozi pore v notranjost mikrorazdelka ter sprostitvev metabolnih produktov v citoplazmo (Kerfeld in sod., 2018).

Potek izgradnje mikrorazdelka zaenkrat ostaja slabo poznan. Posamezne proteinske podenote mikrorazdelka najprej oligomerizirajo v homopentamerne ali homoheksamerne enote, ki se kasneje samo-sestavijo v ikozaedrično strukturo s pomočjo homopentamerne podenote, ki tvorijo ogljišča mikrorazdelka (Lee in sod., 2019). Interakcije med proteinskimi podenotami mikrorazdelka in encimi v notranjosti pa vodijo v sinhrono samo-sestavljanje mikrorazdelka (Kerfeld in sod., 2018).

Glede na vrsto enkapsuliranih encimov lahko mikrorazdelke ločimo na karboksosome in metabolosome. Prvi so mikrorazdelki avtotrofnih bakterij, ki pakirajo encime za fiksacijo ogljikovega dioksida (Kerfeld in sod., 2018). Bolj raznovrstni so metabolosomi, ki lahko vključujejo širok spekter katabolnih encimov, ki bakterijam omogočijo metabolno specializacijo, izkoriščanje alternativnih virov ogljika in dušika, s tem pa rast v sicer nedostopnih ekoloških nišah. V določenih primerih lahko metabolosomi celo povečajo virulentnost nekaterih človeških patogenov (Jakobson in Tullman-Ercek, 2016; Dadswell in sod., 2019).



Ene izmed največjih in bolje opisanih metabolosomov sintetizirajo bakterije *Salmonella enterica* in *Citrobacter freundii*. Ti si metabolosomi Pdu, ki vsebujejo encime za razgradnjo 1,2-propandiola (1,2-PD) do propanojske kisline in propanola (Bobik in sod., 1999; Parsons in sod., 2008). Lupina mikrorazdelka Pdu je prepustna za 1,2-PD, hkrati pa onemogoča izstop propionaldehida, ki nastane v prvem koraku razgradnje 1,2-PD in je sicer toksičen za celico (Crowley in sod., 2010; Chowdhury in Bobik, 2019).

Operon Pdu, ki vključuje gene za proteinske podenote mikrorazdelka, je sestavljen iz 23 genov. Izražanje izključno 7 genov, ki kodirajo PduA, B, B' (krajšo obliko PduB, ki se sintetizira zaradi alternativnega mesta prevajanja v prepisu *pduB*), J, K, N in U, vodi v sestavljanje prazne lupine Pdu v *Escherichia coli*. Pentameri podenot PduN tvorijo oglišča, ostale proteinske podenote pa stene mikrorazdelka (Parsons in sod., 2010; Mayer in sod., 2016). V primerjavi z naravnimi metabolosomi so sintetični mikrorazdelki manjši in bolj robustni (Mayer in sod., 2016). Poglavitni protein mikrorazdelka predstavlja podenota PduA, ki jo lahko sklopimo z izbranim proteinom naaminskem koncu PduA in ga tako predstavimo na površini mikrorazdelka (Parsons in sod., 2010). V notranjost mikrorazdelka lahko usmerimo heterologne proteine in sicer tako, da sklopimo poljuben protein s signalnim zaporedjem naravnih encimov Pdu (Fan in sod., 2010; Fan in Bobik, 2011).

Z raziskavo smo želeli uvesti nov pristop za izolacijo sintetičnega mikrorazdelka Pdu iz bakterijskih celic in v notranjost mikrorazdelka usmeriti heterologen protein, transkripcijski faktor LacI.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Izdelava plazmidnih konstruktov

Plazmid pACBSR-OH smo izdelali s kloniranjem *Twin-Strep-tag*, *pduABJKNU* in *pduD<sub>1-18</sub>-lacI-EGFP* v vektor pACBSR-DL1 (Butala in sod., 2009). Najprej smo pomnožili gen za protein Gam iz plazmida pACBSR-DL1 ter uvedli restrikcijski mesti za NotI in SphI. Zaporedje za *Twin-Strep-tag* smo pomnožili z uporabo začetnih oligonukleotidov za uvedbo restrikcijskih mest NotI in XhoI. Gene za podenote mikrorazdelka Pdu (*pduABJKNU*) smo pomnožili iz plazmida pLysS-*pduABB'JKNU* (Parsons in sod., 2010) z uporabo začetnih oligonukleotidov za uvedbo restrikcijskih mest XhoI in SphI. Pomnožen fragment z genom *gam* smo rezali s SphI in NotI, pomnožen fragment *Twin-Strep-tag* z NotI in XhoI ter pomnožen fragment z geni *pdu* z XhoI in SphI. Posamezne fragmente smo očistili in jih nato ligirali v vektor pACBSR-DL1, predhodno rezan s SphI. Pomnožen fragment z genom za fuzijski protein PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP smo rezali z BglII in ga ligirali v končni plazmid pACBSR-OH.

### 2.2 Sinteza in izolacija bakterijskih mikrorazdelkov

Za ekspresijo genov mikrorazdelka smo uporabili sev *E. coli* iz zbirke Keio, označen kot JW0336-1, z izbranim genom *lacI*. Celice smo gojili v minimalnem gojišču M9 z dodatkom 0,2 % glukoze, 0,04 % MgSO<sub>4</sub> in kloramfenikolom (25 µg ml<sup>-1</sup>). Prekonočno kulturo svežih transformant smo redčili 1:50 v 500 ml minimalnega medija. Celice smo gojili pri 37 °C s stresanjem do optične gostote izmerjene pri valovni dolžini svetlobe 600 nm 0,8. Z dodatkom 0,4 % L-arabinoze smo sprožili prepis genov pod promotorjem pBAD-sintezo kvasne meganukleaze Sce, bakteriofagnega proteina Gam, podenot mikrorazdelka Pdu in fluorescentno

označenega LacI. Po eni uri smo bakterijsko kulturo centrifugirali 15 min pri 8000 x g (4 °C). Sediment celic smo lizirali z dodatkom reagenta B-PER za ekstrakcijo proteinov iz bakterij (Thermo Scientific, ZDA), lizocima (100 µg ml<sup>-1</sup>), mešanice inhibitorjev proteaz (Roche, ZDA), DNaze I (0,4 U ml<sup>-1</sup>) in RNaze A (20 µg ml<sup>-1</sup>). Celice smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi in jih nato centrifugirali 5 min pri 15 000 x g (4 °C). Celični lizat smo nato nanесли na kolono s 500 µl predhodno nanešene suspenzije kroglic Strep-Tactin®XT Superflow® High Capacity Agarose Beads (IBA Lifesciences, Nemčija). Mešanico smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi, da bi omogočili vezavo »Twin-Strep-tag« označenih mikrorazdelkov na agarozne kroglice Strep-Tactin®XT. Nespecifično vezane proteine smo s kolone dvakrat sprali z 10 ml fiziološkega pufru za spiranje (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl). Twin-Strep-tag-vezane mikrorazdelke smo eluirali v 1,5 ml pufru BXT (IBA Lifesciences, Nemčija).

### 2.3 Gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Za preučitev proteinske sestave mikrorazdelkov smo izolirane mikrorazdelke v pufru BXT skoncentrirali z obarjanjem s trikloroocentno kislino in acetonom. Sediment smo resuspendirali v nanašalnem pufru LDS Sample Buffer, destilirani vodi in DTT. Vzorce smo inkubirali 5 min pri 95 °C in jih nato nanесли na 4-12 % gradientni gel (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Ločitev proteinov je potekala 35 min pri stalni napetosti 200 V. Gel smo nato barvali s SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in zajeli slike s programom GeneSnap na napravi G:BOX (Syngene, Združeno Kraljestvo).

### 2.4 Masna spektroskopija

Za identifikacijo izoliranih proteinov po ločitvi s SDS-PAGE, smo iz gela izrezali posamezne lise proteinov v velikosti 1-3 mm, jih reducirali in s tripsinom razgradili na peptide. Peptidi so bili identificirani z uporabo sistema Triversa Nanomate sklopljenega z masnim spektrometrom Bruker Solarix XR na Oddelku za napredno masno spektrometrijo Univerze v Birminghamu, Združeno Kraljestvo.

### 2.5 Fluorescentna spektroskopija

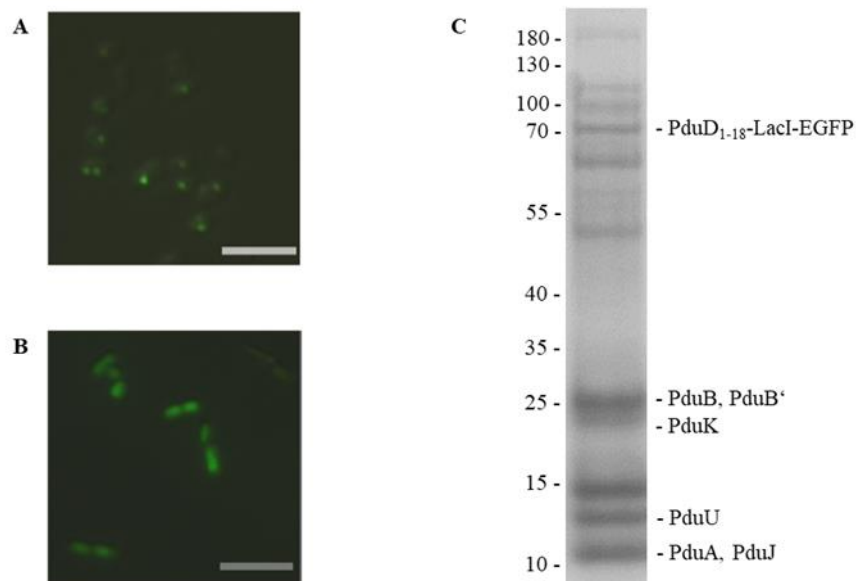
Po indukciji sinteze mikrorazdelkov z arabinozo smo odvzeli 5 µl bakterijskih celic in jih fiksirali na objektno stekelce s poli-L-lizinom. Mikroskopijo smo izvedli v Infrastrukturnem centru za mikroskopijo bioloških vzorcev (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Slovenija). Celice smo vizualizirali z uporabo mikroskopa AxioImager Z1 z dodatkom ApoTome in kamero Zeiss AxioCam HRc (Carl Zeiss, Nemčija). Fluorescenco EGFP smo vzbujali s svetlobo valovne dolžine 475 nm in zajeli slike s programom AxioVision (Carl Zeiss, Nemčija).

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Geni za sestavljanje mikrorazdelka *pduA*, B, B', J, K, N, U iz bakterije *C. freundii* so bili klonirani v plazmid pACBSR-DL1, ki kodira tudi kvasno meganukleazo I-SceI in protein Gam. Naknadno smo v plazmid vstavili še gen za transkripcijski represor LacI, sklopljen s fluorescentnim proteinom EGFP na karboksilnem koncu proteina. Dodatek prvih 18 aminokislinskih ostankov proteina PduD (PduD<sub>1-18</sub>) na aminski konec represorja LacI, nam je omogočil vključitev LacI-EGFP v lumen mikrorazdelka Pdu. Vsi omenjeni geni so pod

kontrolno promotorja pBAD, ki ob dodatku arabinoze omogoči sintezo podenot mikrorazdelka Pdu in modificiranega LacI.

Da bi ugotovili, ali se protein PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP učinkovito pakira v notranjost mikrorazdelka Pdu, smo plazmid pACBSR-OH transformirali v sev *E. coli* JW0336-1 z izbranim genom *lacI*. Po sprožitvi sinteze podenot mikrorazdelka in modificiranega LacI z arabinozo v bakterijah opazimo točkovno lokalizacijo signala EGFP (Slika 1A). Kot kontrolno smo uporabili celice *E. coli* s plazmidom pACBSR-OHΔPdu, ki nosi zapis za sintezo sklopljenega proteina LacI-EGFP brez signalne sekvence PduD in genov za podenote mikrorazdelka. V kontrolni skupini bakterij opazimo, da je signal EGFP razpršen po celotni citoplazmi celic (Slika 1B). Rezultati fluorescentne mikroskopije kažejo, da se LacI-EGFP učinkovito pakira v mikrorazdelke Pdu.



**Slika 7:** Enkapsulacija proteina PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP v mikrorazdelke Pdu. (A) Slika pridobljena s fluorescentno mikroskopijo celic *E. coli* s plazmidom pACBSR-OH, kjer je PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP točkovno lokaliziran, kar kaže na uspešno pakiranje proteina PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP v notranjost mikrorazdelka Pdu. Merilo na sliki predstavlja 5 μm. (B) Slika pridobljena s fluorescentno mikroskopijo celic *E. coli* s plazmidom pACBSR-OHΔPdu, kjer je LacI-EGFP razporejen po celotni citoplazmi. Merilo na sliki predstavlja 5 μm. (C) Ločba proteinov afinitetno izoliranega mikrorazdelka Pdu z gradientnim 4-12 % SDS-PAGE iz celic *E. coli*. Na desni strani gela so prikazane prisotne podenote mikrorazdelka Pdu in proteina PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP, ki so bile potrjene z masno spektrometrijo. Na levi strani gela je prikazana velikost proteinov v kDa.

Izolacija mikrorazdelkov običajno poteka z uporabo blagih detergentov za razgradnjo celic in s serijo korakov gradientnega centrifugiranja (Mayer in sod., 2016). Nedavno pa je bila opisana afinitetna izolacija mikrorazdelkov bakterije *Haliangium ochraceum* (Hagen in sod., 2018), zato smo pristop afinitetne izolacije želeli vpeljati tudi za izolacijo mikrorazdelkov Pdu. Oznaka »Twin-Strep-tag«, ki je spojena s podenoto PduA naaminskem koncu, nam je omogočila afinitetno izolacijo mikrorazdelkov Pdu z uporabo agaroznih kroglic prevlečenih s »Strep-Tactin-om« (Schmid in sod., 2013). Po ločbi proteinov prisotnih v izoliranih mikrorazdelkih s SDS-PAGE, smo na gelu opazili obogatitev podenot Pdu, ki gradijo lupino mikrorazdelka (Slika 1C). Lisa v višini 70 kDa ustreza velikosti proteina PduD<sub>1-18</sub>-LacI-EGFP, ki smo ga skupaj s podenotami Pdu identificirali z masno spektrometrijo. Predvideva se, da oligomeri podenote PduN tvorijo ogljišča mikrorazdelka in jih v mikrorazdelkih najdemo v manjši

koncentraciji (Parsons in sod., 2010), kar pojasnjuje dejstvo, da podenote PduN nismo zaznali v izoliranih mikrorazdelkih. Kot prvi smo izolirali mikrorazdelek Pdu z afinitetno kromatografijo. Ugotovitve fluorescentne mikroskopije in masne spektrometrije kažejo, da smo dosegli sintezo mikrorazdelkov Pdu *in vivo* in uspešno izolirali intaktne mikrorazdelke Pdu z vključenim represorjem LacI.

#### 4 SKLEPI

V bakteriji *E. coli* smo z arabinozo sprožili sintezo podenot Pdu in represorja LacI ter dosegli izgradnjo sintetičnega mikrorazdelka Pdu in pakiranje fluorescentno označenega represorja LacI v notranjost mikrorazdelka. Z dodajanjem afinitetne oznake na poglobitno podenoto mikrorazdelka smo opisali novo metodo za izolacijo mikrorazdelkov Pdu iz bakterij. Manipulacija proteinskih podenot daje bakterijskim mikrorazdelkom visok biotehnološki potencial in uporabnost v sintezni biologiji, saj lahko preko signalne aminokislinske sekvence v mikrorazdelek zajamemo poljuben protein v živi celici. Zaradi funkcionalne podobnosti mikrorazdelkov z organeli evkariontov je večina študij usmerjena v pospeševanje produkcije določenih molekul preko enkapsulacije različnih metabolnih proteinov. Na podlagi strukturne podobnosti mikrorazdelkov z virusnimi kapsidami bi bilo v prihodnje potrebno raziskati tudi njihovo morebitno interakcijo z nukleinskimi kislinami. Rezultati te študije predstavljajo temelj za razvoj metode za *in vivo* enkapsulacijo izbranega odseka DNA v kompleksu z LacI-EGFP v mikrorazdelek in afinitetno izolacijo sintetičnega organela iz bakterije.

#### 5 VIRI

- Bobik, T. A., Havemann, G. D., Busch, R. J., Williams, D. S. & Aldrich, H. C. (1999). The propanediol utilization (pdu) operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol degradation. *Journal of Bacteriology* 181, 5967–5975.
- Butala, M., Busby, S. J. W. & Lee, D. J. (2009). DNA sampling: A method for probing protein binding at specific loci on bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Resesearch*, 37.
- Chowdhury, C. & Bobik, T. A. (2019). Engineering the PduT shell protein to modify the permeability of the 1,2-propanediol microcompartment of *Salmonella*. *Microbiology* 165(12), 1355–1364.
- Crowley, C. S., Cascio, D., Sawaya, M. R., Kopstein, J. S., Bobik, T. A., Yeates, T. O. (2010). Structural insight into the mechanisms of transport across the *Salmonella enterica* Pdu microcompartment shell. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37838–37846.
- Dadswell, K., Creagh, S., McCullagh, E., Liang M., Brown, I. R., Warren, M. J., ... Prentice, M. B. (2019). Bacterial microcompartment-mediated ethanolamine metabolism in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 87.
- Fan, C. & Bobik, T. A. (2011). The N-terminal region of the medium subunit (PduD) packages adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase (PduCDE) into the Pdu microcompartment. *Journal of Bacteriology* 193, 5623–5628.
- Fan, C., Cheng, S., Liu, Y., Escobar, C. M., Crowley, C. S., Jefferson, R. E., ... Bobik, T. A. (2010). Short N-terminal sequences package proteins into bacterial microcompartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7509–7514.
- Greening, C. & Lithgow, T. (2020). Formation and function of bacterial organelles. *Nature Reviews Microbiology* 1–13. doi:10.1038/s41579-020-0413-0

- Hagen, A., Sutter, M., Sloan, N. & Kerfeld, C. A. (2018). Programmed loading and rapid purification of engineered bacterial microcompartment shells. *Nature Communications* 9, 2881.
- Jakobson, C. M. & Tullman-Ercek, D. (2016). Dumpster Diving in the Gut: Bacterial Microcompartments as Part of a Host-Associated Lifestyle. *PLoS Pathogens* 12.
- Kerfeld, C. A., Aussignargues, C., Zarzycki, J., Cai, F. & Sutter, M. (2018). Bacterial microcompartments. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 277–290.
- Lee, M. J., Palmer, D. J. & Warren, M. J. (2019). Biotechnological Advances in Bacterial Microcompartment Technology. *Trends in Biotechnology* 37, 325–336.
- Liberton, M., Austin, J. R., 2nd, Berg, R. H., & Pakrasi, H. B. (2011). Unique thylakoid membrane architecture of a unicellular N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium revealed by electron tomography. *Plant physiology*, 155(4), 1656–1666.
- Mayer, M. J., Juodeikis, R., Brown, I. R., Frank, S., Palmer, D. J., Deery, E., ... Warren, M. J. (2016). Effect of bio-engineering on size, shape, composition and rigidity of bacterial microcompartments. *Scientific Reports* 6, 1–11.
- Mohajerani, F., & Hagan, M. F. (2018). The role of the encapsulated cargo in microcompartment assembly. *PLoS Computational Biology*, 14(7), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006351>
- Parsons, J. B., Dinesh, S. D., Deery, E., Leech, H. K., Brindley, A. A., Heldt, D., ... Prentice, M. B. (2008). Biochemical and structural insights into bacterial organelle form and biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14366–14375.
- Parsons, J. B., Frank, S., Bhella, D., Liang, M., Prentice, M. B., Mulvihill, D. P., Warren, M. J. (2010). Synthesis of empty bacterial microcompartments, directed organelle protein incorporation, and evidence of filament-associated organelle movement. *Molecular Cell*, 38(2), 305–315.
- Schmidt, T. G. M., Batz, L., Bonet, L., Carl, U., Holzapfel, G., Kiem, K., ... Stanar K. (2013). Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification*, 92(1), 54–61.

## Restoration-conservation of artworks with synthetic materials requires understanding of their potential degradability by fungi

Amela KUJOVIĆ<sup>1\*</sup>, Polona ZALAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [amela.kujovic@bf.uni-lj.si](mailto:amela.kujovic@bf.uni-lj.si)

### **Restoration-conservation of artworks with synthetic materials requires understanding of their potential degradability by fungi**

**Abstract:** Fungal colonization of cultural heritage objects and works of art is frequently reported, especially when the objects are made of natural materials. It leads to aesthetic changes, mechanical/biochemical degradation and consequently reduced value. Fungal growth is usually associated with high humidity, but can also occur in controlled environments with low humidity due to xerophilic fungi. Synthetic polymers, considered the most stable of all, are increasingly used in the conservation and restoration of such objects. Some studies reported fungal growth on these materials (acryl and alkyd polymers), but the exact mechanisms of degradation are not known. Our study focused on testing selected fungal strains isolated from artistic canvas paintings for esterase activity, xerotolerance/xerophily, and ability to degrade long chain hydrocarbons. Several species of fungi from the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were found to possess a combination of all these properties. They may have the potential to degrade synthetic materials used in conservation-restoration processes, which will be further investigated.

**Key words:** fungi; restoration; conservation; biodegradation; synthetic polymers; plastics

### **Restavriranje-konserviranje umetniških del s sintetičnimi materiali zahteva razumevanje njihove potencialne razgradljivosti z glivami**

**Izveček:** Glivna kolonizacija predmetov kulturne dediščine in umetniških del je pogost pojav, zlasti kadar so predmeti narejeni iz naravnih materialov. Privede do estetskih sprememb, mehanske/biokemijske razgradnje in posledično zmanjšane vrednosti predmeta. Rast gliv je običajno povezana z visoko vlažnostjo, lahko pa se pojavi tudi v nadzorovanih okoljih z nizko vlažnostjo zaradi rasti kserofilnih gliv. Sintetični polimeri, ki veljajo za najbolj stabilne od vseh, se vse pogosteje uporabljajo pri konzerviranju in restavriranju takšnih predmetov. Nekatere raziskave poročajo o rasti gliv na teh materialih (akrilni in alkidni polimeri), a natančni mehanizmi razgradnje niso znani. V tej študiji smo se osredotočili na testiranje izbranih sevov gliv, izoliranih iz umetniških slik na platnu, na esterazno aktivnost, kserotoleranco/kserofilijo in sposobnost razgradnje dolgoverižnih alkanov. Ugotovili smo, da ima več vrst gliv iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* kombinacijo vseh teh lastnosti. Te bi lahko imele potencial za razgradnjo sintetičnih materialov, ki se uporabljajo v konzervatorsko-restavratorskih procesih, kar pa bomo podrobneje raziskali v prihodnje.

**Ključne besede:** glive; restavriranje; konserviranje; biodegradacija; sintetični polimeri; plastika

## 1 INTRODUCTION

Artistic canvas paintings are an important part of cultural heritage. Unfortunately, fungi are routinely encountered on such paintings during conservation-restoration practices. The presence of numerous organic materials, sedimentation of microbial cells by dirt or dust from the environment, and the appropriate microclimatic conditions can cause fungal growth leading to deterioration [1, 2]. Fungal colonization of such objects is accelerated at moderate temperatures and high humidity, but can also occur at low humidity, due to xerophilic fungi. Mould growth leads to aesthetic changes, mechanical and biochemical degradation, and thus reduces the value of artworks. Such paintings are then restored, often using synthetic materials. An intriguing fact is that some paintings can be overgrown by fungi relatively soon after conservation-restoration intervention. There is little information about fungal growth on various canvas materials, paints, ground and other materials, as well as how storage conditions influence fungal growth or how fungi alter these materials. Synthetic materials (plastics) have been widely used in conservation-restoration practices of cultural heritage objects in the last 90 years [3]. For example, acrylic polymers have been used as consolidants for paints and as varnishes to protect surfaces of paintings and to enhance visual effects [4]. The replacement of original components of art pieces by new materials has practical advantages (e.g. stability). Some studies dealt with biodeterioration of synthetic polymers by fungi [3, 5-10], but precise mechanisms of deterioration were not understood. Moreover, the use of plastics in restoration is ethically questionable, as cultural heritage should remain materially unchanged.

In order to investigate the influence of fungi on synthetic materials in conservation-restoration practice and their potential degradation ability, selected fungal strains derived from various museum artefacts, mainly from art paintings, were chosen for our experiments. They were tested for (i) esterase activity, (ii) xerotolerance/ xerophily, and (iii) ability to degrade mineral oil. Esterase activity was selected as the most likely enzymatic activity involved in degradation of targeted synthetic polymers because of the ester bonds present in all acrylic resins and dispersions [11]. Xerotolerant/xerophilic fungi are the most common contaminants in dry museum environments. Mineral oil was chosen as a challenging substrate for fungal growth, since it is composed of different hydrocarbons.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Fungal Strains and Culture Conditions

The selected fungal strains (Table 1) are maintained at the Culture Collection Ex within Infrastructural Centre Mycosmo (Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia). They are preserved in liquid nitrogen or freeze-dried at -80 °C.

### 2.2 Esterase Activity

The tested strains were grown on Malt Extract Agar (MEA) or/and on Dichloran 18 % (w/v) Glycerol medium (DG18) [12]. Cell/spore suspensions were prepared from fresh cultures and volumes of 5 µL were three point inoculated on below described agar medium. The esterase activity was determined on agar medium [13]. It consisted of 1 % Tween-80 (polyoxyethylene-sorbitan-monooleate), 1 % Peptone, 0.5 % NaCl, 0.01 % CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 1.5 % agar, and contained 0.0025 % pH indicator Bromocresol purple; final pH was adjusted to 5.4. In case of

testing xerophilic fungi, 18 % (w/v) glycerol was added to the medium to reduce its water activity ( $a_w$ ) to 0.939. The assay was incubated at 24 °C. The cleavage of the ester bonds was recognised by the change of indicator from yellow to purple/blue, and by white precipitation of calcium salts around the coloured zone. After 14 days (7 weeks for xerophilic fungi) incubation and enzymatic index (EI) was determined according to the modified Equation 1 [14]:

$$EI = \text{diameter of (dis)coloration}/(\text{diameter of the colony})^{-1} \quad \dots\dots (1)$$

The level of the esterase activity (EA) was determined based on esterase enzymatic index. The range between the lowest value of EI and the highest value of EI was divided to five levels. Thus, to each species an activity level was assigned, which facilitated comparison between the fungal strains: »1« meaning no esterase activity, and »5« the highest esterase activity.

### 2.3 Assimilation of Mineral Oil

The growth of fungi on mineral oil was determined according to Satow et al. (2008) [15]. Fungi were grown in liquid yeast nitrogen base (YNB) medium (pH 7.0) with the addition of 0.5 % (w/v)  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  in three different sets: (i) negative control: non-inoculated YNB; (ii) positive control: inoculated YNB with the addition of 2 % (w/v) glucose; (iii) test for mineral oil utilization: YNB with 20 % (w/v) filter-sterilized mineral oil (Sigma-Aldrich) as the sole carbon source. Tubes were inoculated with 20  $\mu\text{L}$  of fungal suspensions and incubated statically at 24 °C. Growth was assessed by descriptive evaluation after one month of incubation.

### 2.4 Tolerance to low water activity

The different lowered water activities were obtained by adding different amounts of glycerol to the basic DG18 agar medium [12]: no addition of glycerol (DG0) resulted in  $a_w$  0.99, addition of 18 %, 30 %, and 40 % (w/v) of glycerol resulted in  $a_w$  0.942 (DG18),  $a_w$  0.882 (DG30), and  $a_w$  0.827 (DG40), respectively. Tolerance to low water activity (xerotolerance or xerophily) was evaluated after point inoculated culture media were incubated at 24 °C for one month. Xerophily (X) factor was determined for each isolate as follows: xerotolerant fungi were assigned factors 1-3, where »1« represented weak xerotolerance (growth on agar media without and with 18 % glycerol) and 3 represented extreme xerotolerance (fungi grew on all DG media). Xerophiles were assigned factor »4« (fungi require glycerol), and extreme xerophiles factor »5« (no growth without or with 18 % glycerol, growth with 30 and 40 % (w/v) glycerol).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the results of esterase activity, assimilation of mineral oil and tolerance to low water activity for selected fungal strains. The results are presented as numerical values for xerophily (X) and esterase activity (EI and EA), and as descriptive value to define ability to assimilate mineral oil (+ or -).

**Table 1:** Esterase activities, xerotolerance and mineral oil degradation for selected fungal strains.

Species	Strain	EI	EA	Mineral Oil	X
<i>Akanthomyces muscarius</i>	EXF-10648	1.21	2	+	1
<i>Alternaria sp.</i>	EXF-10651	1.13	2	-	2
<i>Aspergillus conicus</i>	EXF-7660	>9.00*	5	-	3



<i>Aspergillus creber</i>	EXF-7677	1.75	2	-	3
<i>Aspergillus destruens</i>	EXF-7651	>9.00*	5	-	3
<i>Aspergillus domesticus</i>	EXF-10462	0.00	1	-	4
<i>Aspergillus halophilicus</i>	EXF-10624	0.00	1	-	5
<i>Aspergillus infrequens</i>	EXF-10450	6.00*	4	-	4
<i>Aspergillus jensenii</i>	EXF-10405	>3.90	3	+	3
<i>Aspergillus magnivesiculatus</i>	EXF-10353	0.00*	1	-	4
<i>Aspergillus penicillioides</i>	EXF-10425	0.00*	1	-	4
<i>Aspergillus puulaauensis</i>	EXF-7678	>3.10	2	+	3
<i>Aspergillus reticulatus</i>	EXF-10429	>9.00*	5	-	3
<i>Aspergillus salinicola</i>	EXF-10401	>9.00*	5	-	5
<i>Aspergillus sloanii</i>	EXF-7656	0.00*	1	-	4
<i>Aspergillus tardicrescens</i>	EXF-10431	0.00*	1	-	4
<i>Aspergillus vitricola</i>	EXF-15210	0.00*	1	-	4
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	EXF-10372	5.29	4	-	3
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF-14317	5.29	3	-	2
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	EXF-10556	1.10	2	+	1
<i>Botryotrichum domesticum</i>	EXF-10840	1.29	2	-	1
<i>Chaetomium globosum</i>	EXF-7690	1.00	1	-	1
<i>Chaetomium subaffine</i>	EXF-7669	1.00	1	-	1
<i>Cladosporium allicinum</i>	EXF-10573	6.92	4	-	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF-14315	3.00	2	-	3
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	EXF-14314	6.43	4	-	3
<i>Cladosporium westerdijkiae</i>	EXF-10492	3.06	2	-	2
<i>Cladosporium xylophilum</i>	EXF-10656	5.29	3	-	2
<i>Coniochaeta ligninaria</i>	EXF-15505	2.90	2	-	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EXF-10652	10.00	5	-	3
<i>Dichotomopilus pseudoerectus</i>	EXF-15084	1.84	2	-	1
<i>Parengyodontium album</i>	EXF-10663	3.46	3	+	1
<i>Penicillium bialowiezense</i>	EXF-10584	3.46	3	-	3
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EXF-10484	4.29	3	-	3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EXF-15508	2.14	2	+	3
<i>Penicillium corylophilum</i>	EXF-15064	2.57	2	+/-	3
<i>Penicillium palitans</i>	EXF-10368	1.88	2	+/-	3
<i>Penicillium rubens</i>	EXF-10503	1.64	2	+	3
<i>Penicillium scabrosum</i>	EXF-10557	2.14	2	-	3
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	EXF-10502	1.00	1	-	1
<i>Zalaria obscura</i>	EXF-10650	2.71	2	-	2
<i>Bjerkandera adusta</i>	EXF-15111	0.74	1	-	0
<i>Cylindrobasidium sp.</i>	EXF-15086	1.00	1	-	1
<i>Trametes versicolor</i>	EXF-15049	0.00	1	-	1
<i>Wallemia aff. muriae</i>	EXF-10120	8.00	5	-	4
<i>Wallemia canadensis</i>	EXF-10342	2.25	2	-	3

EI, enzymatic index (numeric); EA, activity level (numeric) 1-5 [0- no activity, 5-high activity]; +, good activity; +/- weak activity; - no activity (descriptive); X, xerophily factor \* EI determined after 7 weeks of incubation

According to the determined values of enzymatic index and activity level, six fungal species showed the highest esterase activity ( $A = 5$ ): *Aspergillus conicus*, *A. destruens*, *A. reticulatus*, *A. salinicola*, *Wallemia* aff. *muriae* and *Debaryomyces hansenii*. Relatively high esterase activities ( $A = 4$ ) were evident for *A. infrequens*, *Cladosporium allicinum*, *Aureobasidium melanogenum* and *Cladosporium pseudocladosporioides*. Fungi of the genus *Cladosporium* have been reported to grow well on alkyd and acrylic resins, hence high esterase activity was expected [6, 7, 9]. *Aureobasidium pullulans*, which was reported to grow on alkyd resin and to degrade polyurethane [6, 16] did not show the expected high esterase activity ( $A = 3$ ) and also did not grow on mineral oil. Similar result was obtained for *Chaetomium globosum*, previously reported as able to grow on alkyd and acrylic resins [5, 9]. Potentially reported growth of these two fungi was due to non-esterase enzymatic activity. Determination of esterase activity in xerophilic fungi was unexpectedly challenging, since added glycerol altered the assay chemical reactions and change in pH could not be initially observed. However, after prolonged incubation (7 weeks), the agar media dried out enabling growth of the xerophilic fungi, followed by change in pH and calcium salt precipitation.

Tolerance of fungi to low water activity is an important characteristic, since humidity is tightly regulated during storage of art objects in museums and depots. In such conditions the xerophilic and xerotolerant fungi pose the major threat. According to factor X, 28 of 46 tested fungi were either extremely xerotolerant ( $X = 3$ ), xerophilic ( $X = 4$ ) or extremely xerophilic ( $X = 5$ ). When esterase activity was also taken into account, eight fungal strains represented a major potential threat to artworks: *Aspergillus conicus*, *A. destruens*, *A. infrequens*, *A. reticulatus*, *A. salinicola*, *Aureobasidium melanogenum*, *Cladosporium pseudocladosporioides*, *Debaryomyces hansenii* and *Wallemia* aff. *muriae*. None of them had the ability to assimilate mineral oil. Few had low esterase activity but were able to assimilate mineral oil: *Akanthomyces muscarius*, *Beauveria pseudobassiana* and *Parengyodontium album*. Some were additionally extremely xerotolerant: *A. jensenii*, *A. puulaauensis*, *Penicillium chrysogenum* and *P. rubens*. They may pose a threat due to their ability to degrade mineral oil, which may cause chemical degradation of complex synthetic materials used in conservation-restoration. Biodegradation of synthetic compounds used for conservation-restoration of artworks might enable discovery of new enzymes involved in the biodegradation of chemically similar plastics such as polyurethane (PU), polluting on a global scale and causing worldwide concern. Polyurethanes are polyesters or polyethers of monomers containing isocyanate groups with significant urethane groups (carbamate ester linkages) in their structure. The enzymes involved in degradation have been classified as esterases/lipases, proteases and ureases with the ability to cleave ester bonds [17]. Amongst few microorganisms capable of degrading PU by hydrolysis ester bonds [18, 19], fungi, e.g. *Aureobasidium pullulans*, *Curvularia senegalensis* and *Fusarium solani* were listed [16].

#### 4 CONCLUSIONS

Fungal species that exhibit high esterase activity, low water activity tolerance and the potential to assimilate complex hydrocarbon mixtures, have the potential to degrade synthetic materials used in conservation-restoration processes. This study represents the first phase required for the selection of the most suitable candidates to be studied in more detail using genomic and transcriptomic techniques. In addition to the application aspect these results may open up a broader perspective on the degradation of plastics by fungi.

## 5 REFERENCES

1. López-Miras, M., Piñar, G., Romero-Noguera, J., Bolivar-Galiano, F. C., Etenauer, J., Sterflinger, K., & Martin-Sanchez, I. (2013). Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. *Aerobiologia*, 29(2), 301-314. doi: 10.1007/s10453-012-9281-z
2. Sterflinger, K. (2010). Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal biology reviews*, 24(1-2), 47-55. doi: 10.1016/j.fbr.2010.03.003
3. Farmakalidis, H. V., Douvas, A. M., Karatasios, I., Sotiropoulou, S., Boyatzis, S., Argitis, P., Chryssoulakis Y., Kilikoglou, V. (2016). Accelerated Thermal Ageing Of Acrylic Copolymers, Cyclohexanone-Based And Urea-Aldehyde Resins Used In Paintings Conservation. *Mediterranean Archaeology & Archaeometry*, 16(3). doi: 10.5281/zenodo.163773
4. Johnson, B. W., & McIntyre, R. (1996). Analysis of test methods for UV durability predictions of polymer coatings. *Progress in Organic Coatings*, 27(1-4), 95-106. doi: 10.1016/0300-9440(94)00525-7
5. Abdel-Kareem, O. (2016). Microbiological testing to assess the susceptibility of museum textiles conserved with polymers to fungal deterioration'. *Polymer Science: Research Advances, Practical Applications and Educational Aspects*, 309-320.
6. Cappitelli, F., Vicini, S., Piaggio, P., Abbruscato, P., Princi, E., Casadevall, A. & Zanardini, E. (2005). Investigation of fungal deterioration of synthetic paint binders using vibrational spectroscopic techniques. *Macromolecular bioscience*, 5(1), 49-57. doi: 10.1002/mabi.200400134
7. Cappitelli, F., Principi, P., Pedrazzani, R., Toniolo, L., & Sorlini, C. (2007). Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Science of the Total Environment*, 385(1-3), 172-181. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.06.022
8. Kigawa, R. (2005). Evaluation of mould resistance of various synthetic resins used in conservation of historic sites. *Science for conservation= Hozon kagaku*, (44), 149-156.
9. Domenech Carbo, M., Bitossi, G., De la Cruz Cañizares, J., Bolivar Galiano, F., López Miras, M., Romero Noguera, J. & Domenech Carbo, A. (2008). Study on the biodeterioration of alkyd resin used as a binding medium for modern paintings by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and ftir spectroscopy. *Arché*, (3), 191-196. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/31842/2008\\_03\\_191\\_196.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/31842/2008_03_191_196.pdf?sequence=1)
10. Pinna, D., and O. Salvadori. (1999). Biological growth on Italian monuments restored with organic or carbonatic compounds, p. 149–154. In O. Ciferri, G. Mastromei, and P. Tiano (ed.), *Of microbes and art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Plenum Publishers, New York, NY.
11. Bracci, S. and Melo, M.J. (2003). Correlating nature ageing and Xenon irradiation of Paraloid B72 applied on stone. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 80, pp. 533-541.
12. Hocking, A. D., Pitt, J. I. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3), 488-492.
13. Lelliott, R.A.; Stead, D.E. (1987). *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*; Published on behalf of the British Society for Plant Pathology; Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK; 216p.
14. Sharma, R.R.; Singh, D.; Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205–221.
15. Satow, M.M.; Attili-Angelis, D.; de Hoog, G.S.; Angelis, D.F.; Vicente, V.A. (2008). Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Mycology*, 61, 157–163.
16. Crabbe, J. R., Campbell, J. R., Thompson, L., Walz, S. L., and Schultz, W. W. (1994). Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 33, 103–113. doi: 10.1016/0964-8305(94)90030-2

17. Scott G. (1999). *Polymer and the environment*. Cambridge: RSC Paperbacks. 132p
18. Howard, G. T. (2002). Biodegradation of polyurethane: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 49, 245–252. doi: 10.1016/S0964-8305(02)00051-3
19. Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F., and Nakahara, T. (1999). Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 134–140. doi:10.1007/s002530051373

## Učinek hladne plinske plazme na kalitev in dekontaminacijo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Jure MRAVLJE<sup>1\*</sup>, Pia STARIČ<sup>2</sup>, Miran MOZETIČ<sup>2</sup>, Katarina VOGEL-MIKUŠ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [jure.mravlje@bf.uni-lj.si](mailto:jure.mravlje@bf.uni-lj.si)

### Učinek hladne plinske plazme na kalitev in dekontaminacijo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench)

**Izveček:** Semena številnih poljščin pogosto kolonizirajo glive, s katerimi pridejo v stik že na polju ali pa kasneje, kot posledica neustreznega skladiščenja. Glive so lahko vzrok za številne rastlinske bolezni, nekatere pa lahko izločajo mikotoksine, ki poslabšajo uporabno vrednost semen, saj so mikotoksini škodljivi za zdravje ljudi in živali. V naši raziskavi smo proučevali vpliv hladne plinske plazme (HPP) na kaljivost in dekontaminacijo semen navadne ajde. Semena smo obdelali z različno dolgimi časovnimi izpostavitvami hladni kisikovi plazmi (30 – 120 sekund) generirani pri znižanem tlaku z radio-frekvenčnim izvorom. Po obdelavi smo izvedli teste kaljivosti in izolirali glive iz površine in notranjosti semen na PDA gojiščih. Daljše obdelave s HPP (60 sekund in več) so statistično značilno vplivale na zmanjšano stopnjo kontaminacije semen z glivami, a so hkrati tudi zavrle kalitev. Rezultati naše raziskave kažejo, da je obdelava semen navadne ajde s HPP pri danih pogojih primerna za uporabo v prehranski industriji, ne pa tudi za nadaljnje sejanje.

**Ključne besede:** hladna plinska plazma; semena; zrna; navadna ajda; dekontaminacija; glive

### Effect of cold gaseous plasma on germination and decontamination of common buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench)

**Abstract:** Seeds of many crops are frequently contaminated with fungi that can colonize them either on the field or later due to inappropriate storage. Fungi are responsible for many plant diseases, and some of them can also produce mycotoxins that can spoil seeds and are harmful to humans and animals. Our study examined the effect of cold gaseous plasma (CGP) on germination and decontamination of common buckwheat seeds. The seeds were treated with CGP generated at reduced pressure by radio-frequency source for different time exposures (30 – 120 seconds). After CGP treatment, we performed germination tests and isolated fungi from seeds on PDA media. Longer CGP treatments (60 seconds and more) significantly reduced contamination with seed-borne fungi, but germination was also suppressed. Our results indicate that CGP treatment of buckwheat seeds at our experimental conditions could be used in the food industry, but not for later sowing in agriculture.

**Key words:** cold gaseous plasma; seeds; grains; common buckwheat; decontamination; fungi

## 1 UVOD

Ajda je tradicionalna poljščina, ki jo gojimo predvsem v Evropi in Aziji. Izvira iz osrednje Azije, včasih pa so jo precej pogosto gojili tudi v Sloveniji kot »alternativno žito«, čeprav gre v resnici za psevdo-žito, saj je ne uvrščamo med trave. Danes zaradi svojih številnih ugodnih lastnosti za naše zdravje znova pridobiva na pomenu kot »funkcionalno živilo« (Bonafaccia in sod., 2003; Bonafaccia & Fabjan, 2003). Ajda namreč ne vsebuje glutena in je tako primerna za bolnike s celiakijo (Skerritt, 1986), poleg tega pa je tudi bogat vir polifenolov, predvsem flavonoidov, med katerimi prevladuje rutin (Kalinova in sod., 2006). Produkcija ajde po Evropi in svetu tako znova narašča, predvsem zaradi njenih skromnih rastnih zahtev, zaradi česar je primerna tudi za ekološko pridelavo (Popović in sod., 2014), ki je osnova za trajnostni razvoj in okolju prijazno kmetijstvo brez uporabe umetnih gnojil in pesticidov. Okužbe z mikroorganizmi, predvsem pa z glivami, predstavljajo enega največjih problemov v žitni industriji. Številne med njimi so namreč sposobne izločati strupene sekundarne metabolite – mikotoksine, ki so lahko nevarni za zdravje ljudi in živali (Fung & Clark, 2004), poleg tega pa povzročajo tudi ogromne ekonomske izgube in nepopravljivo škodo na zrnih, saj zmanjšujejo njihovo kakovost, hranilno vrednost ter v splošnem negativno vplivajo na zrna (Selcuk in sod., 2008; Misra in sod., 2016; Los in sod., 2018). Tudi pri ajdi so glive najpomembnejši vzrok bolezni na vseh razvojnih stopnjah rastline od setve do žetve (Milevoj, 1989). Zato je preprečevanje okužb semen z glivami izrednega pomena, predvsem v luči strmo naraščajoče človeške populacije, ki naj bi po ocenah FAO do leta 2050 dosegla 10 milijard (FAO United Nations, 2009). V današnjem času se za zaščito semen uporabljajo predvsem različni kemični pripravki (fungicidi), ki imajo lahko precejšnje negativne posledice za okolje. Zato so potrebe nove, okolju prijazne in ekonomsko učinkovite tehnologije, ki bodo zmanjšale uporabo pesticidov in drugih škodljivih pripravkov v rastlinski produkciji. V zadnjih letih hitro razvijajoče se področje uporabe hladne plinske plazme (HPP) ponuja obetavno in učinkovito rešitev. Plazma je ioniziran plin, sestavljen iz elektronov, atomov, ionov, prostih radikalov in drugih molekul, ki soobstajajo skupaj s fotoni UV in vidne svetlobe. Vse te različne kemijske zvrsti dajejo plazmi edinstvene lastnosti, med drugim tudi električno prevodnost, čeprav je v celoti gledano plazma elektro nevtralna (Tendero in sod., 2006). Plazma nastane z dovajanjem energije plinu bodisi v obliki toplotne ali električne energije (z električnim tokom ali elektromagnetnim valovanjem) (Conrads & Schmidt, 2000). Za HPP so značilne nižje elektronske gostote in nasploh nižja temperatura v primerjavi z visokotemperaturno plazmo (Tendero in sod., 2006). V zadnjih nekaj letih je področje obdelave semen s HPP postalo precej popularno v kmetijstvu, saj je bilo dokazano, da ima lahko tovrstna obdelava številne pozitivne učinke, med drugim izboljša kaljivost semen in služi kot metoda za površinsko dekontaminacijo semen (Filatova in sod., 2009, 2012; Mitra in sod., 2014; Randeniya & De Groot, 2015; Zahoranová in sod., 2016; Zahoranová in sod., 2018). Aktivne kemične zvrsti v plazmi imajo namreč učinkovito protimikrobno aktivnost ter jih posledično lahko uporabljamo kot sredstvo za sterilizacijo površin (Tendero in sod., 2006; Misra in sod., 2016;). Rezultati dosedanjih študij tako nakazujejo, da bi HPP lahko uporabljali kot novo, alternativo tehnologijo za izboljšanje kakovosti semen, kakor tudi za njihovo nadaljnje procesiranje v prehranski industriji.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Izvor semen in obdelava s HPP

Semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) smo pridobili iz Semenarne Ljubljana, letnik 2019. Semena so bila ustrezno skladiščena (na suhem in temnem, pri sobni temperaturi), poskusi so potekali jeseni 2019. Semena ajde so obdelali na Inštitutu Jožef Stefan v velikem radio-frekvenčnem (RF) plazemskem sistemu pod znižanim tlakom lastne izdelave (Holc in sod., 2019). Plazmo smo vzdrževali pri tlaku okoli 50 Pa in delovni moči približno 1300 W, uporabljen plin je bil kisik (99,99 %). Bakrena žica je bila povezana z RF generatorjem, ki je deloval pri delovni frekvenci 27,12 MHz. Približno 200 semen vsake obdelave je bilo enakomerno razporejenih po kovinski mreži in postavljenih v sredino cevi. Semena so bila izpostavljena plazmi za 30, 60, 90 in 120 sekund. Kontrolna skupina semen ni bila obdelana s HPP.

## 2.2 Kalitveni test

Kalitveni testi so potekali v petrijevkah (premer 70 mm), v katere smo predhodno položili 2 sloja filtrirnega papirja in ga dobro navlažili z destilirano vodo. Testi so potekali v 5 ponovitvah za vsako časovno obdelavo s plazmo. V vsaki petrijevki je bilo po 20 semen. Semena so kalila en teden v rastnih komorah pri stalnih rastnih razmerah (22 °C, 60 % zračna vlaga, tema). Delež kalitve za posamezno obdelavo je bil izračunan po Enačbi 1:

$$(1) \text{ Delež kalitve (\%)} = (\text{število skaljenih semen}) / (\text{število vseh semen}) \times 100$$

## 2.3 Glivni test

Za oceno stopnje kolonizacije z glivami smo uporabili metodo gojenja gliv na agarjih ploščah. Uporabili smo petrijevke (premer 70 mm) z 2 % gojiščem PDA (krompirjev dekstrozni agar) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom (50 mg/L) za preprečevanje rasti bakterij. Po eno seme ajde smo sterilno položili na sredino gojišča in petrijevko dobro zatesnili. Za vsako obdelavo s HPP in za kontrolno skupino smo naredili 16 ponovitev. Plošče smo inkubirali en teden v rastnih komorah pod pogoji, opisanimi v točki 2.2. Po inkubaciji smo izračunali stopnjo preraščenosti posamezne petrijevke z glivami po Enačbi 2.

$$(2) \text{ St. preraščenosti (\%)} = (\text{premer glivne površine [mm]}) / (\text{premer petrijevke [mm]}) \times 100$$

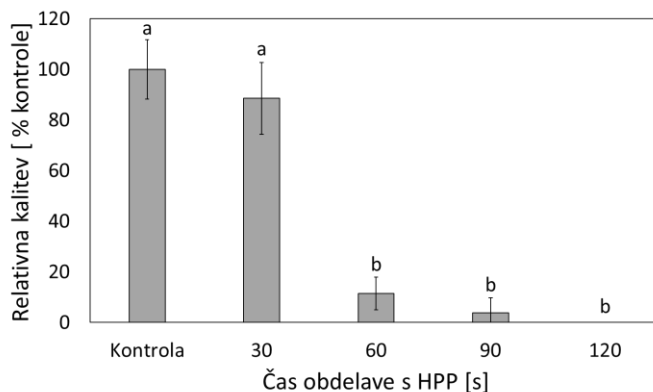
Na osnovi morfoloških znakov (barva, oblika, površina, način razrasti ipd.) smo določili število glivnih izolatov (morfotipov) na posamezni plošči ter izračunali absolutne frekvence glivnih izolatov po izpostavitvah HPP (kot vsoto vseh glivnih morfotipov na vseh ploščah pri posamezni izpostavitvi HPP oz. kontrolni skupini).

## 2.4 Statistična analiza podatkov

Rezultati so prikazani kot povprečja +/- standardne napake (SN). Pri kalitvenih testih smo imeli 5 ponovitev, pri glivnih testih 16 ponovitev na posamezno obdelavo. Statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (obdelavami) smo testirali z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Duncanovim post hoc testom (programska oprema Statistica StatSoft version 7). Razlike smo smatrali kot statistično značilno različne pri  $p$ -vrednosti manjši od 0,01.

### 3 REZULTATI Z DISKUSIJO

Kalitev semen ajde z najkrajšo obdelavo s HPP (30 s) je bila primerljiva s kontrolno skupino, medtem ko se je kalitev semen ajde pri daljših obdelavah značilno zmanjšala (Slika 1). Po 60 s obdelave s HPP je kalilo le še približno 12 % semen glede na kontrolo, medtem ko je po 90 s obdelavi ta delež padel na manj kot 5 % glede na kontrolo. Po 120 s obdelavi s HPP je bila kalitev semen popolnoma zavrta. Čeprav številni avtorji poročajo o pozitivnih učinkih obdelave s HPP na kalitev različnih vrst semen (Filatova in sod., 2012, 2013; Randeniya & De Groot, 2015; A. Zahoranová in sod., 2016; Anna Zahoranová in sod., 2018; Živković in sod., 2004), v naši raziskavi tega nismo potrdili. Tudi pri najkrajši časovni obdelavi (30 s) namreč nismo opazili izboljšane kalitve semen. Potrdili pa smo, da se s podaljševanjem obdelave semen s HPP kalitev drastično zmanjša, kar opažajo tudi v drugih raziskavah (Filatova in sod., 2013; A. Zahoranová in sod., 2016; Anna Zahoranová in sod., 2018). Po naših podatkih so učinke HPP na semenih ajde do zdaj testirali le Šera in sod. (Šerá in sod., 2012), ki so proučevali vplive različnih virov HPP na kalitev semen ajde. Pri tipu plazme, generiranem z razelektrivjo z drsnim lokom pod atmosferskim tlakom, so opazili rahel pozitiven vpliv na kalitev semen, pri večini drugih tipov plazme pa ni bilo značilnega vpliva, ali pa je bil ta kvečjemu negativen. Z daljšimi časovnimi obdelavami (300 s in 600 s) pa so opazili izrazito zavirajoč učinek na kalitev, iz česar so sklepali, da so semena ajde zelo občutljiva na obdelavo s HPP. Čeprav smo v naših poskusih uporabili precej drugačen sistem plazme kot v omenjeni raziskavi, se naši rezultati ujemajo z zgoraj navedeno ugotovitvijo.

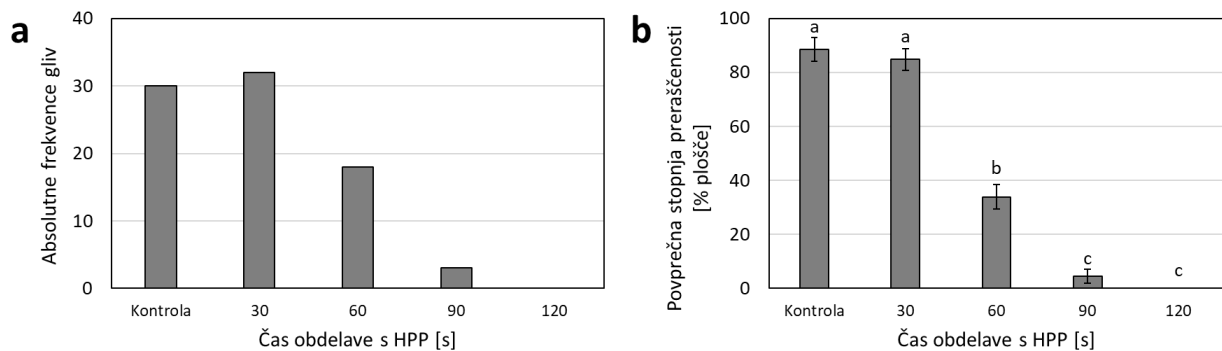


**Slika 1:** Kalitev semen navadne ajde po obdelavi s HPP glede na kontrolno skupino. Prikazane so povprečne vrednosti  $\pm$  SN. Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (Duncanov test,  $p < 0,01$ ).

Daljše obdelave s HPP (60 s in več) so imele negativen učinek tako na absolutne frekvence izoliranih gliv (Slika 2a) kakor tudi stopnjo preraščenosti plošč (Slika 2b). Po 60 s obdelavi smo izolirali približno polovico gliv glede na kontrolno skupino, prav tako je bila stopnja preraščenosti značilno nižja, približno 2/3 manj kot v kontrolni skupini. Po 90 s obdelavi smo opazili le še minimalno glivno rast, po 120 s obdelavi pa nismo izolirali več nobene glive, iz česar lahko sklepamo, da smo dosegli popolno dekontaminacijo semen ali pa so bile te tako poškodovane, da niso bile več sposobne rasti. Podobno so tudi drugi avtorji, ki so uporabili različne vire in naprave za obdelavo s HPP, poročali o zmanjšani kontaminaciji z glivami, ki so naravno prisotne na semenih različnih rastlin (Filatova in sod., 2012; Mitra in sod., 2014; Zahoranová in sod., 2016; Kopacki in sod., 2017; Zahoranová in sod., 2018). Večja učinkovitost dekontaminacije je verjetno posledica večje elektronske gostote, več sevanja UV in toplote, ki naraščajo z daljšimi časovnimi izpostavitvami plazmi (Bol'shakov in sod., 2004), ki pa so



verjetno odgovorni tudi za poškodbe semen ter posledično manjšo kaljivost. Podobno kot v našem primeru, so tudi Zahoranová in sod. popolno dekontaminacijo naravno prisotnih gliv dosegli po 120 s obdelavi pri pšenici (Zahoranová in sod., 2016) oziroma po 180 s obdelavi pri koruzi (Zahoranová in sod., 2018). Vendar pa naših rezultatov ne moremo direktno primerjati z drugimi avtorji, saj so ti uporabljali precej različne tipe plazme, pod atmosferskim tlakom, v našem poskusu pa smo prvi uporabili plazmo pod znižanim tlakom. In ravno ta raznolikost uporabljenih virov za generiranje plazme, različnih plinov, časovnih in drugih operativnih parametrov plazme, otežuje primerjave med raziskavami različnih avtorjev.



**Slika 2:** Absolutna frekvenca gliv, izoliranih iz semen ajde po obdelavi s HPP (a) in stopnja preraščenosti petrijevk (b). Prikazane so povprečne vrednosti  $\pm$  SN. Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (Duncanov test,  $p < 0,01$ ).

#### 4 SKLEPI

Naši rezultati potrjujejo, da obdelava s HPP vpliva tako na kalitev kot tudi na glivno dekontaminacijo semen navadne ajde. Pri krajših obdelavah s HPP (30 s) ta ni imela značilnega vpliva na kalitev semen, pa tudi dekontaminacije semen ni bila učinkovita. Pri daljših izpostavitvah HPP (60 s in 90 s) se je bistveno znižala stopnja kolonizacije z glivami, vendar pa je HPP hkrati zelo negativno vplivala na kalitev semen, saj je bila ta pri 60 s že zelo močno, pri 90 s pa skoraj v celoti zavrta. Po 120 s obdelavi s HPP smo dosegli popolno dekontaminacijo semen, saj glivna rast ni bila več prisotna, prav tako pa je prišlo tudi do popolne inhibicije kalitve semen. Čeprav obdelava s HPP v splošnem velja za učinkovito orodje za izboljšanje kalitve in zmanjševanje površinske kontaminacije z mikroorganizmi, pa naši operativni pogoji HPP niso bili optimalni, da bi ohranili kalitev semen in hkrati zmanjšali glivne okužbe. Naša obdelava s HPP bi bila tako lahko primerna za obdelavo zrn ajde za prehranske namene, ne pa tudi v kmetijske namene za nadaljnjo setev. Potrebne bodo še dodatne raziskave, da bomo poiskali čim bolj optimalne pogoje obdelave s HPP za semena navadne ajde.

#### ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za sofinanciranje iz državnega proračuna (financiranje MR Jure Mravlje).

#### 5 VIRI

Bol'shakov, A. A., Cruden, B. A., Mogul, R., Rao, M. V. V. S., Sharma, S. P., Khare, B., & Meyyappan, M.

- (2004). Radio-frequency oxygen plasma as a sterilization source. *AIAA Journal*, 42(4), 823–832.
- Bonafaccia, G, Marocchini, M., & Kreft, I. (2003). Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80, 9–15.
- Bonafaccia, G., & Fabjan, N. (2003). Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.*, 81(2), 349–355.
- Conrads, H., & Schmidt, M. (2000). Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*, 9(4), 441–454. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/9/4/301>
- FAO United Nations. (2009). *How to Feed the World in 2050 Executive*. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
- Filatova, I., Azharonok, V., Gorodetskaya, E., Mel, L., Shedikova, O., & Shik, a. (2009). Plasma-radiowave stimulation of plant seeds germination and inactivation of pathogenic microorganisms. *Ispc\_19*, 10, 4–7.
- Filatova, I., Azharonok, V., Lushkevich, V., Zhukovsky, A., Gadzhieva, G., & Spasi, K. (2013). Plasma seeds treatment as a promising technique for seed germination improvement. *31st ICPIG*, 4–7.
- Filatova, I., Azharonok, V., Shik, A., Antonuk, A., & Terletskaya, N. (2012). Fungicidal Effects of Plasma and Radio-Wave Pre-treatments on Seeds of Grain Crops and Legumes. *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology*, 469–479. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2852-3>
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: A toxicological overview. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 42(2), 217–234. <https://doi.org/10.1081/CLT-120030947>
- Holc, M., Prime, G., Iskra, J., Titan, P., Kovač, J., Mozetič, M., & Junkar, I. (2019). Effect of oxygen plasma on sprout and root growth, surface morphology and yield of garlic. *Plants*, 8(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants8110462>
- Kalinova, J., Triska, J., & Vrhotova, N. (2006). Distribution of Vitamin E, Squalene, Epicatechin, and Rutin in Common Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 74, 5330–5335.
- Kopacki, M., Pawlat, J., Terebun, P., Kwiatkowski, M., Starek, A., & Kiczorowski, P. (2017). Efficacy of non-thermal plasma fumigation to control fungi occurring on onion seeds. *2017 International Conference on Electromagnetic Devices and Processes in Environment Protection with Seminar Applications of Superconductors, ELMECO and AoS 2017*, 1–4. <https://doi.org/10.1109/ELMECO.2017.8267746>
- Los, A., Ziuzina, D., Akkermans, S., Boehm, D., Cullen, P. J., Van Impe, J., & Bourke, P. (2018). Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing. *Food Research International*, 106, 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.009>
- Milevoj, L. (1989). Buckwheat diseases. In I. Kreft (Ed.), *Fagopyrum (Buckwheat newsletter)* (Vol. 9, pp. 31–40). Biotehniška fakulteta.
- Misra, N., Schluter, O., & Cullen, P. (2016). Cold Plasma in Food and Agriculture. In *Cold Plasma in Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801365-6.09991-1>
- Mitra, A., Li, Y., Klämpfl, T. G., Shimizu, T., Jeon, J., Morfill, G. E., & Zimmermann, J. L. (2014). Inactivation of Surface-Borne Microorganisms and Increased Germination of Seed Specimen by Cold Atmospheric Plasma. *Food Bioprocess Technol*, 7, 645–653. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1126-4>
- Popović, V., Sikora, V., Berenji, J., Filipović, V., Dolijanović, Ž., Ikanović, J., & Dončić, D. (2014). Analysis of buckwheat production in the world and Serbia. *Ekonomika Poljoprivrede*, 61(1), 53–62. <https://doi.org/10.5937/ekopolj1401053p>
- Randeniya, L. K., & De Groot, G. J. J. B. (2015). Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review. *Plasma Processes and Polymers*, 12(7), 608–623. <https://doi.org/10.1002/ppap.201500042>
- Selcuk, M., Oksuz, L., & Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99(11), 5104–5109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.076>

- Šerá, B., Gajdová, I., Černák, M., Gavril, B., Hnatiuc, E., Kováčik, D., Kříha, V., Sláma, J., Šerý, M., & Špatenka, P. (2012). How various plasma sources may affect seed germination and growth. *Proceedings of the International Conference on Optimisation of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM, May*, 1365–1370. <https://doi.org/10.1109/OPTIM.2012.6231880>
- Skerritt, J. H. (1986). Molecular Comparison of Alcohol-Soluble Wheat and Buchwheat Proteins. *Cereal Chemistry*, 63(4), 365–369.
- Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., & Leprince, P. (2006). Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 61(1), 2–30. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.003>
- Zahoranová, A., Henselová, M., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., & Černák, M. (2016). Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on the Wheat Seedlings Vigor and on the Inactivation of Microorganisms on the Seeds Surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36(2), 397–414. <https://doi.org/10.1007/s11090-015-9684-z>
- Zahoranová, A., Hoppanová, L., Šimončicová, J., Tučeková, Z., Medvecká, V., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., & Černák, M. (2018). Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 38(5), 969–988. <https://doi.org/10.1007/s11090-018-9913-3>
- Živković, S., Puač, N., Giba, Z., Grubišić, D., & Petrović, Z. L. (2004). The stimulatory effect of non-equilibrium (low temperature) air plasma pretreatment on light-induced germination of *Paulownia tomentosa* seeds. *Seed Science and Technology*, 32(3), 693–701. <https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.3.05>

## Vpliv dušikove in kisikove hladne plinske plazme na kalitev semen navadne ajde

Pia STARIČ<sup>1\*</sup>, Jure MRAVLJE<sup>2</sup>, Katarina VOGEL-MIKUŠ<sup>1,2</sup>, Miran MOZETIČ<sup>1</sup>, Ita JUNKAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [pia.staric@ijs.si](mailto:pia.staric@ijs.si)

### Vpliv dušikove in kisikove hladne plinske plazme na kalitev semen navadne ajde

**Izveček:** Hladna plazemska tehnologija postaja v kmetijstvu vedno bolj popularna. Poleg vloge dekontaminacije površin (semenska lupina), se hladna plazma lahko uporablja tudi za izboljšanje kalivosti semen. Preučevali smo kalitev semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) po obdelavi s kisikovo in dušikovo hladno radio-frekvenčno plazmo. Uporabili smo dve moči (100 in 200 W), ter štiri časovne izpostavitve (5, 10, 15 in 30 s). Rezultati nakazujejo, da 30 s obdelave deluje škodljivo in zmanjša kalivost semen navadne ajde. Obdelava semen v kisikovi plazmi pri moči 200 W za 30 s je v večji meri znižala končni delež kalivih semen v primerjavi z obdelanimi semeni v dušikovi plazmi pri enakih plazemskih parametrih. Za obdelavo semen navadne ajde je za pozitivne rezultate potrebno uporabiti krajše in šibkejšje plazemske obdelave tako pri kisikovi kot dušikovi plazmi.

**Ključne besede:** seme; navadna ajda; *fagopyrum esculentum*; hladna plazma; kalitev

### Oxygen and nitrogen cold plasma treatment of *Fagopyrum esculentum* seeds affects seed germination rate

**Abstract:** Cold plasma technology is becoming increasingly popular in the field of agriculture, where it can be used either as a form of surface decontamination of seeds, or as a method to increase seed germination rate. We examined the changes in germination rate of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) after seed treatment with oxygen or nitrogen cold radio-frequency plasma. The parameters used were two different powers (100 W and 200 W) and four different time exposures (5, 10, 15 and 30 s). The results indicate harmful effects of 30 s plasma seed treatment with a lower final germination rate of buckwheat seeds. Seed treatment with cold oxygen plasma at 200 W and 30 s had a greater lowering effect on seed germination compared to nitrogen plasma treatment (at 200 W and 30 s). Results indicate that buckwheat seeds should be treated with weaker plasma power and shorter time exposures in both nitrogen and oxygen cold plasmas.

**Key words:** seed; common buckwheat; *Fagopyrum esculentum*; cold plasma; germination

## 1 UVOD

V preteklih letih je uporaba in raziskovanje hladne plazme (HP) prešlo tudi na področje bioloških vzorcev. V medicini se hladna plazma že s pridom uporablja, na področju kmetijske in prehranske industrije pa je HP v zadnjih letih le pritegnila pozornost in so mnoge raziskave še v svojih začetkih (Dobrynin in sod., 2009). Plazma je četrto agregatno stanje snovi, ki je vseskozi prisotno v naravi, npr. v ognju, v nevihtnih strelah itd. Plazma je delno ioniziran plin, ki je sestavljen iz številnih atomov in molekul plina, ionov, radikalov, elektronov in številnih drugih reaktivnih zvrsti. Med drugim je v plazmi prisotno tudi ultravijolično (UV) in elektromagnetno sevanje, pojavi pa se lahko tudi naraščanje temperature. Hladna plazma je plazma, ki ni v termodinamičnem ravnovesju in se zato v plazmi temperatura giblje pod 60 °C (Frank-Kamenetskii, 1972; Misra in sod., 2016). Prav zato je primerna za obdelavo bioloških vzorcev.

V kmetijstvu se hladna plazma lahko uporablja predvsem za dva namena. Prvi namen je dekontaminacija semenskega materiala, kar lahko potencialno zmanjša obolelost rastlin na polju ter hkrati omogoči zmanjšanje uporabe pesticidov, ki močno obremenjujejo okolje. Drugi namen uporabe hladne plazme pa je izboljšanje kalivosti semen ter izboljšanje rasti in razvoja rastlin (Kyzek in sod., 2019; Starič in sod., 2020; Zahoranová in sod., 2016). Hladna plazma je površinska tehnika, saj spreminja predvsem kemijsko sestavo površine semena. Ta postane bolj hidrofilna in zato olajša prehod vode skozi trdo in težko prepustno semensko lupino (Bormashenko in sod., 2012). Številni znanstveniki predvidevajo, da to omogoči hitrejšo in boljše kalitev semen, vendar mnogi rezultati nakazujejo, da to ni edni mehanizem vpliva hladne plazme na semena (Bermúdez-Aguirre, 2019). V večini raziskav je obdelava semen s HP povečala kalivost (Dobrin in sod., 2015; Henselová in sod., 2012; Zahoranová in sod., 2018), obstajajo pa tudi nasprotujoči si rezultati, kjer so druge raziskovalne skupine poročale o slabši kalitvi semen (Zahoranová in sod., 2016; Zahoranová in sod., 2018; Zhang in sod., 2017). Podatki niso enotni, saj raziskovalci uporabljajo različne plazemske naprave, plazemske parametre, uporabljen plin ter tudi različne rastlinske vrste. V naši raziskavi smo želeli oceniti, kateri plazemski parametri so primerni za obdelavo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) z radio-frekvenčno HP, da potencialno dosežemo izboljšano kalivost, ter ugotovimo katere obdelave semen s HP imajo negativen učinek na kalitev semen.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Semenski material

V raziskavi smo uporabili semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), sorte Trdinova iz leta 2020 (Mlinarstvo in trgovina Rangus d.o.o.).

### 2.2 Obdelava semen s hladno plinsko plazmo

Obdelava semen s hladno plinsko plazmo smo izvedli v posebej izdelanem plazemskem sistemu. Na posamezno kombinacijo plazemskih parametrov smo obdelali po 100 semen navadne ajde. Semena so bila izpostavljena kisikovi ali dušikovi radio-frekvenčni (RF) HP. Pritisk v plazmi je bil 50 Pa, vhodna moč plazme pa 100 ali 200 W. Semena smo obdelali s HP v različnih časovnih izpostavitvah: 5, 10, 15 in 30 sekund. V poskus smo vključili tudi kontrolne neobdelane vzorce in neobdelani vakuumski kontroli, pri čemer smo semena izpostavili

nizkemu tlaku (50 Pa) in enakemu pretoku plina (kisika ali dušika) kot med plazemsko obdelavo.

### 2.3 Kalitveni test

Za vsako plazemsko obdelavo, kontrolo ter dušikovo in kisikovo vakuumsko kontrolo smo pripravili 5 petrijevok z dvema slojema filtrirnega papirja. V vsako petrijevko smo dali po 20 semen; skupaj torej 100 semen na plazemsko obdelavo ter omočili filtrirni papir s 4 ml destilirane vode. Semena smo inkubirali v temi pri nočni temperaturi 19 °C in dnevni temperaturi 21 °C. Število kalečih semen smo prešteli po 10 dneh. Kriterij, da je seme vzkalilo, je bil prodor radikule v dolžini vsaj 1 mm iz semenske lupine. Delež kalečih semen (K) smo izračunali po sledeči formuli:

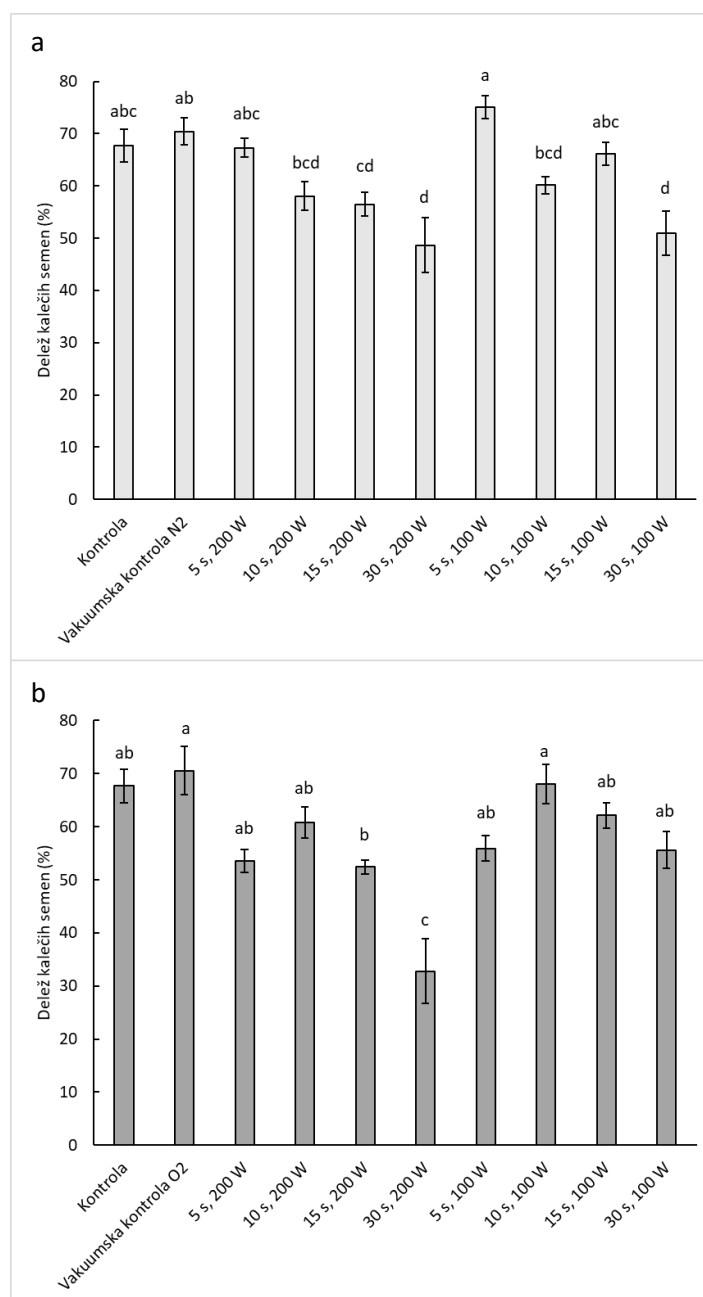
$$K (\%) = \frac{\text{število kalečih semen}}{\text{število vseh semen}} \times 100 \quad \dots\dots (1)$$

### 2.4 Statistična analiza

Podatke smo statistično obdelali s pomočjo programa Microsoft Excel in Excelove razširitve XLStat. Signifikantne razlike med vzorci smo ocenili z uporabo enosmerne analize variance (ANOVA) in post hoc Dunnettovim testom. Razlike so bile ovrednotene kot statistično značilne za  $P < 0,05$ . Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina s  $\pm$  standardno napako dveh ponovitev ( $N = 2$ ).

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Obdelava semen z dušikovo HP z močjo 100 in 200 W ni vplivala na kalitev semen (Slika 1a). Edini obdelavi, ki sta pokazali statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo (in vakuumsko kontrolo) sta bili 100 W in 200 W obdelava semen s HP za 30 s, pri čemer nakazujeta na znižanje deleža kalečih semen za približno 20 %. Tovrstne obdelave semen HP torej že povzročajo poškodbe semena in embria, kar poslabša kalitev semen. Kontrola in vakuumška kontrola s pretokom  $N_2$  se statistično ne razlikujeta. Za te parametre hladne plazme so potrebne dodatne ponovitve poskusa, ter vpeljava dodatnih časov izpostavitve semen HP blizu 5 s (na primer 3 s in 7 s). Delež kalečih semen, obdelanih s kisikovo HP, se statistično ne razlikuje od kontrole, razen obdelava semen s kisikovo plazmo pri 200 W in 30 s (Slika 1b). Tu je končni delež kalečih semen v primerjavi s kontrolo za približno polovico- nižji, kar nakazuje na poškodbe semena in embria s strani plazemskih komponent. Kontrola in vakuumška kontrola s pretokom  $O_2$  se statistično ne razlikujeta. Poleg 30 s plazemske obdelave pri 200 W pa se v primerjavi z vakuumsko kontrolo statistično razlikuje tudi 15 s obdelava pri 200 W, pri kateri je prav tako opaziti nižji delež kalečih semen, vendar je ta večji kot pri 30 s in 200 W plazemski obdelavi.



**Slika 8:** Delež vzkaljenih semen ajde, obdelanih v dušikovi (a) in kisikovi (b) hladni plazmi. Rezultati prikazujejo povprečne vrednosti  $\pm$  standardno napako. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike ( $P < 0,05$ ).

Šera in sod. (2012) so opazili, da so semena navadne ajde močno občutljiva na obdelavo s HP, pri čemer se že pri krajši obdelavi s HP zniža kalivost semen v primerjavi s semeni nekaterih drugih kmetijsko pomembnih sort, kot je na primer pšenica, kjer so semena izpostavljali HP tudi po več minut, kalivost pa je ostala enaka kontrolni skupini semen ali pa se je celo izboljšala. Tudi naši rezultati nakazujejo na občutljivost semen ajde za HP, pri čemer se tako pri kisikovi kot pri dušikovi plazmi kaže izrazit negativen vpliv po 30 s in moči 200 W. To nakazuje, da je potrebno pri obdelavi semen navadne ajde s HP uporabiti predvsem šibkejšo plazmo in krajše časovne izpostavitve, tako pri kisiku kot dušiku. Prav tako je opaziti za približno 15 % nižji delež kalivih semen pri izpostavitvi kisikovi HP za 30 s in moči 200 W, v primerjavi z enakimi plazemskimi parametri v dušikovi HP. Kisikova plazma med drugimi plazemskimi komponentami vsebuje tudi veliko reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in malo reaktivnih

dušikovih zvrsti (RNS), za katere predvidevajo, da so odgovorne za večino bioloških odzivov na obdelavo s HP (Cui in sod., 2019; Panngom in sod., 2018). Dušikova HP po drugi strani vsebuje manj ROS in več RNS. ROS in RNS lahko igrajo dvojno vlogo: v majhnih količinah delujejo kot signalne molekule v mnogih fizioloških in metabolnih procesih, v velikih količinah pa so vir oksidativnega stresa in poškodb v celicah (Cui in sod., 2019; Romero-Puertas in sod., 2019).

#### 4 SKLEPI

Plazemska tehnologija ima velik potencial v kmetijski industriji, tudi na področju izboljšanja kalivosti rastlin. Za raziskovanje vplivov HP na semena je sprva potrebno poiskati ugodne plazemske parametre in pogoje, ki bi spodbudili kalitev semen. V zastavljenem poskusu smo ugotovili, da 30 s obdelava semen navadne ajde s kisikovo in dušikovo HP neugodno vpliva na kalitev semen, saj se ta močno zmanjša. Za nadaljnje iskanje ugodnih pogojev je ključno, da smo opazili ugodne odzive pri nižjih časovnih obdelavah in manjši moči plazme, predvsem pri dušikovi HP, ki pa niso pokazale statistično značilnih razlik (dušikova plazma, pri 100 W in času obdelave 5 s). Ti rezultati so izhodišče za nadaljnje poskuse in optimizacijo plazemskih parametrov in pogojev.

#### 5 VIRI

- Bermúdez-Aguirre, D. (2019). Advances in cold plasma applications for food safety and preservation. (D. Bermudez-Aguirre, Ur.) (1. izd.). United States, Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
- Bormashenko, E., Grynyov, R., Bormashenko, Y. in Drori, E. (2012). Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds. *Scientific Reports*, 2, 3–10.
- Cui, D., Yin, Y., Wang, J., Wang, Z., Ding, H., Ma, R. in Jiao, Z. (2019). Research on the Physio-Biochemical Mechanism of Non-Thermal Plasma-Regulated Seed Germination and Early Seedling Development in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Dobrin, D., Magureanu, M., Mandache, N. B. in Ionita, M. D. (2015). The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 255–260.
- Dobrynin, D., Friedman, G. in Fridman, A. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue Related content Inactivation of bacteria using dc corona discharge: role of ions and humidity. *New Journal of Physics*, 11.
- Frank-Kamenetskii, D. A. (1972). Introduction. V *Plasma: The Fourth State of Matter* (str. 1–8). Springer US.
- Henselová, M., Slovákova, E., Martinka, M. in Zahoranová, A. (2012). Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia*, 67(3), 490–497.
- Kyzek, S., Holubová, E., Medvecká, V., Tomeková, J., Gálová, E. in Zahoranová, A. (2019). Cold Atmospheric Pressure Plasma Can Induce Adaptive Response in Pea Seeds. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 39(2), 475–486.
- Misra, N., Schlüter, O., Agriculture, P. C.-C. plasma in food and in 2016, U. (2016). Plasma in food and agriculture. *Elsevier*.
- Panngom, K., Chuesaard, T., Tamchan, N., Jiwchan, T., Srikongsritong, K. in Park, G. (2018). Comparative assessment for the effects of reactive species on seed germination, growth and metabolisms of vegetables. *Scientia Horticulturae*, 227, 85–91.



- Romero-Puertas, M. C., Terrón-Camero, L. C., Peláez-Vico, M. Á., Olmedilla, A. in Sandalio, L. M. (2019). Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 107–119.
- Šerá, B., Gajdová, I., Černák, M., Gavril, B., Hnatiuc, E., Kováčik, D., ... Špatenka, P. (2012). How various plasma sources may affect seed germination and growth. *Proceedings of the International Conference on Optimisation of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM*, (May), 1365–1370.
- Starič, P., Vogel-Mikuš, K., Mozetič, M. in Junkar, I. (2020). Effects of nonthermal plasma on morphology, genetics and physiology of seeds: A review. *Plants*, 9(12), 1–18.
- Zahoranová, A., Henselová, M., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V. in Černák, M. (2016). Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on the Wheat Seedlings Vigor and on the Inactivation of Microorganisms on the Seeds Surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36(2), 397–414.
- Zahoranová, Anna, Hoppanová, L., Šimončicová, J., Tučeková, Z., Medvecká, V., Hudecová, D., ... Černák, M. (2018). Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 38(5), 969–988.
- Zhang, J. J., Jo, J. O., Huynh, D. L., Mongre, R. K., Ghosh, M., Singh, A. K., ... Jeong, D. K. (2017). Growth-inducing effects of argon plasma on soybean sprouts via the regulation of demethylation levels of energy metabolism-related genes. *Scientific Reports*, 7, 41917.

## BIOTEHNOLOGIJA

### Celični modeli za preučevanje mastitisa

Zala BRAJNIK<sup>1\*</sup>, Jernej OGOREVC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Domžale, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [zala.brajnik@bf.uni-lj.si](mailto:zala.brajnik@bf.uni-lj.si)

#### Celični modeli za preučevanje mastitisa

**Izveček:** Mleko proizvajajo epitelne celice mlečne žleze (MEC), ki se med laktacijo postopoma luščijo iz epitelijskega tkiva, zato so prisotne tudi v mleku. Izolacija MEC iz mleka predstavlja ne-invazivno pridobljen vir celic za vzpostavitev primarnih celičnih kultur ali za preučevanje izražanja genov v epitelnih celicah mlečne žleze. Primarne epitelne celične kulture, vzpostavljene iz mleka, nam lahko služijo kot model za preučevanje fizioloških procesov v mlečni žlezi, vključno z imunskim odzivom ob okužbah. Vnetje mlečne žleze (mastitis) je eden glavnih zdravstvenih problemov prežvekovalcev, namenjenih prirerji mleka. V tem prispevku opisujemo primer izolacije MEC iz mleka ter vzpostavitev celičnega modela za preučevanje mastitisa in identifikacijo kandidatnih genov za odpornost proti mastitisu. V ta namen smo vzpostavljeno primarno celično kulturo MEC imunostimulirali z LPS in preverili izražanje nekaterih genov, povezanih z imunskim odzivom.

**Ključne besede:** epitelne celice; imunostimulacija; imunski odziv; kandidatni geni; mastitis; mlečna žleza

#### Cell models for mastitis research

**Abstract:** Milk is produced in mammary gland by mammary epithelial cells (MEC), which are gradually exfoliated from the epithelium during lactation and are therefore present in milk. Isolation of MEC from milk represents a non-invasive source of cells for establishing primary cell cultures or for studying gene expression in mammary epithelial cells. Primary epithelial cell cultures established from milk are useful models for studying physiological processes in the mammary gland, including the immune response to infections. Inflammation of the mammary gland (mastitis) is one of the main health problems of dairy ruminants. In this paper, we describe an example of MEC isolation from milk and establishment of a primary cell-based model for mastitis research and identification of mastitis associated candidate genes. For this purpose, the established primary MEC culture was immunostimulated with LPS to study expression of some genes associated with mammary immune response.

**Key words:** candidate genes; epithelial cells; immunostimulation; immune response; mastitis

#### 1 UVOD

Mleko je eno najbolj hranljivih in celostnih živil, prirerja in potrebe po mleku pa iz leta v leto naraščajo. Mastitis predstavlja enega največjih zdravstvenih problemov v čredah prežvekovalcev, namenjenih prirerji mleka, in je eden najpomembnejših dejavnikov, ki

omejujejo proizvodnjo mleka in optimalno rabo virov v sektorju prireje mleka, s hudimi gospodarskimi posledicami (Hogeveen in sod. 2011). Razumevanje molekularnih osnov za večjo odpornost proti mastitisu in specifičnih molekularnih interakcij med povzročitelji boleznin in obrambnimi mehanizmi gostitelja je zato ključnega pomena za dolgoročno izboljšanje zdravja v mlečnih čredah.

Epitelne celice mlečne žleze (MEC) imajo poleg sekretorne in drugih funkcij tudi pomembno vlogo v prirojenem imunskem odzivu (Vorbach in sod., 2006), saj skupaj z imunskimi celicami sodelujejo pri obrambi organizma ob vdoru patogenov. Študije na MEC so pokazale prisotnost molekul prirojenega imunskega sistema gostitelja, npr. receptorjev za prepoznavanje patogenih organizmov in protimikrobnih peptidov (Petzl in sod., 2008; Griesbeck-Zilch in sod., 2009), ki so prisotni v mlečni žlezi že pred aktivacijo vnetnega odziva (Danowski in sod., 2012).

Večina raziskav je bila opravljena na trajnih celičnih linijah. Vendar pa lahko genetske spremembe vplivajo na metabolne poti in posledično povzročijo fenotipske spremembe transformiranih celičnih linij, ki pogosto kažejo nizko odzivnost na laktogene hormone (German in Barash, 2002). Uporaba primarnih celičnih kultur mlečne žleze je zato boljši približek stanju *in vivo* (Pantschenko in sod., 2000). Primarne kulture se običajno vzpostavijo iz tkiva, kar poleg invazivnega značaja biopsije predstavlja tudi veliko verjetnost za kontaminacijo celične linije s fibroblasti, ki lahko prerastejo ciljne epitelne celice in potencialno vplivajo na rezultate raziskav (Danowski in sod., 2012).

Celične kulture so dobrodošla *in vitro* alternativa poskusom na živalih, še posebej, če jih lahko vzpostavimo na ne-invaziven način (npr. iz mleka). So cenejši, hitrejši in etično sprejemljivejši način preučevanja najrazličnejših boleznin živali in razvoja novih načinov zdravljenja. Obenem omogočajo izvedbo poskusov v kontroliranem okolju, veliko tehničnih ponovitev in preučevanje specifičnega celičnega tipa. V prispevku predstavljamo opis vzpostavitve MEC iz kravjega mleka in preliminarni poskus indukcije imunskega sistema z lipopolisaharidom (LPS), na predhodno vzpostavljeni in opisani celični kulturi, pridobljeni iz tkiva kozje mlečne žleze (Ogorevc in sod., 2009).

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Vzpostavitev primarne celične kulture kravjih epitelnih celic mlečne žleze (pbMEC)

Mleko smo pridobili od krave na začetku laktacije. Primarno celično kulturo smo vzpostavili po optimizirani metodi Danowski in sod. (2012). Liter mleka smo razdelili v štiri centrifugirke (vsaka po 250 ml) in jih centrifugirali na 1850 g, 10 minut pri temperaturi 8 °C. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, pelet celic pa resuspendirali v 25 ml vnaprej segretega (37 °C) pufrā za spiranje (HBSS, Sigma-Aldrich, München, Nemčija), ki je vseboval dodatek antibiotikov: 200 µg/ml penicilina-G, 200 µg/ml streptomicina, 200 µg/ml gentamicina in 10 µg/ml amfotericina-B (Sigma-Aldrich, München, Nemčija). Sledilo je ponovno centrifugiranje na 500 g, 5 minut pri sobni temperaturi. Celice smo resuspendirali v 25 ml HBSS in filtrirali skozi 100 µm sito (Falcon Cell Strainer 100 µm, BD Biosciences, Bedford, ZDA) v centrifugirko. Ponovno smo centrifugirali na 500 g, 5 minut na sobni temperaturi. Celice smo resuspendirali v rastnem gojišču DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, München, Nemčija), z dodatkom 10 % fetalnega telečjega seruma (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, ZDA), ITS (5 mg/ml inzulin, 5 mg/ml transferin, 0.005 mg/ml natrijev selenit; Invitrogen, Carlsbad, ZDA), 100 µg/ml

penicilina-G, 100 µg/ml streptomicina, 100 µg/ml gentamicina in 5 µg/ml amfotericina-B. Celice smo naselili v gojitvene posodice površine 25 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio One, Frickenhausen, Nemčija) in jih inkubirali pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in 90 % vlažnosti. Po 24 urah smo nepritrjene celice odstranili. Rastni medij smo menjavali na tri dni.

## 2.2 Imunostimulacija primarne celične kulture kozjih epitelnih celic mlečne žleze (pgMEC)

pgMEC so bile vzpostavljene in opisane predhodno (Ogorevc in sod., 2009; Prpar-Mihevc in sod., 2014). Da bi preučili imunokompetentnost vzpostavljene primarne celične linije, smo epitelne celice imunsko stimulirali z lipopolisaharidom (LPS), pridobljenim iz bakterije *E. coli*. Celice smo 24 ur inkubirali v prisotnosti LPS (10 µg LPS/ml). Z uporabo qPCR smo določili diferencialno izražanje kandidatnih genov, predhodno povezanih z imunskim odzivom, v stimuliranih celicah in v kontrolah.

## 2.3 Izolacija mRNA in priprava cDNA knjižnice

Po 24 h inkubacije z LPS smo celokupno RNA izolirali z uporabo kompleta reagentov PureLink RNA (Invitrogen, Carlsbad, ZDA). Da bi se izognili morebitni prisotnosti genomske DNA v vzorcu, smo le-te obdelali z DNazo. Izolirano RNA smo prepisali v komplementarno DNA (cDNA) z uporabo kompleta reagentov High capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA).

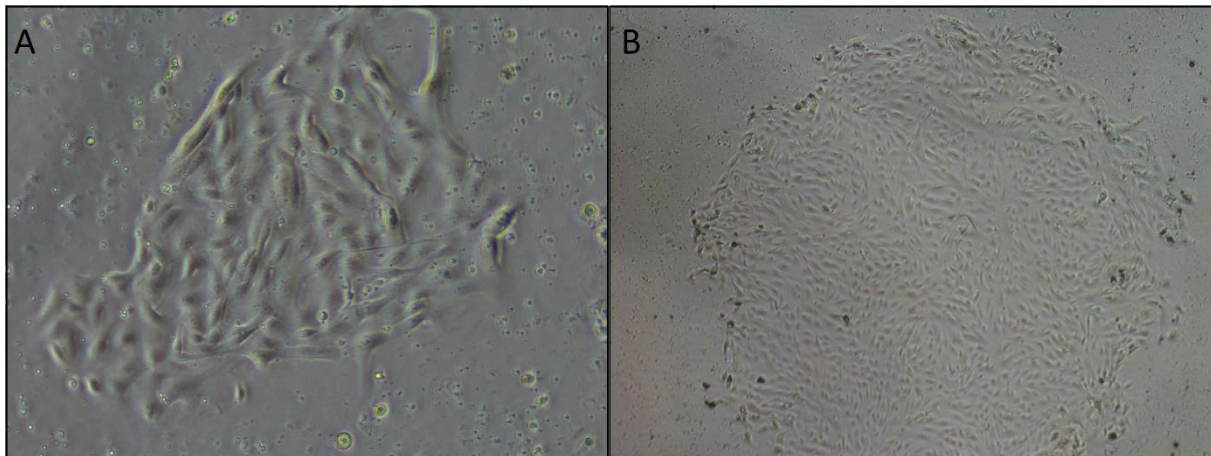
## 2.4 qPCR

Izražanje genov smo določili s qPCR po metodi  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak in Schmittgen, 2001), z uporabo reagenta PowerUp SYBR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA). Za normalizacijo izražanja smo uporabili gen GAPDH. V ta namen smo uporabili začetne oligonukleotide, ki smo jih oblikovali sami, oziroma so bili predhodno opisani v literaturi (Bulgari in sod., 2017; preglednica 1) ter začetna oligonukleotida za *GAPDH*: *GAPDH\_F*: 5'- CATGTTTGTGATGG-  
-GCGTGAACCA -3' in *GAPDH\_R*: 5'- TAAGTCCCTCCACGATGCCAAAGT -3'.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

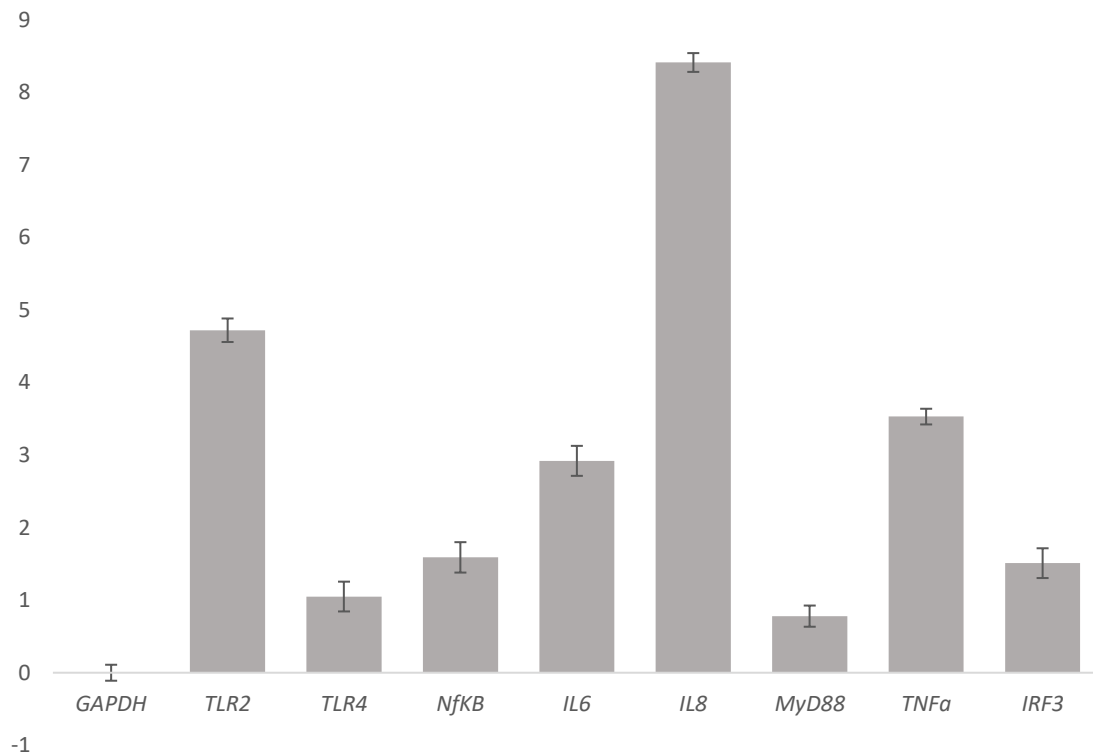
Iz vzorcev mleka smo uspeli vzpostaviti primarno celično linijo epitelnih celic kravje mlečne žleze, ki jo je potrebno v nadaljevanju ustrezno opisati. Primer primarne celične kulture pbMEC, vzpostavljene iz kravjega mleka, je predstavljen na Sliki 1. Smotrnost uporabe primarnih celičnih kultur mlečne žleze za preučevanje prirojenega imunskega odziva smo preverili na predhodno vzpostavljeni in opisani primarni kulturi, pridobljeni iz tkiva kozje mlečne žleze v laktaciji (Ogorevc in sod., 2009).

Izražanje osmih kandidatnih genov (*TLR4*, *TLR2*, *MyD88*, *TNF $\alpha$* , *IL8*, *IL6*, *NF $\kappa$ B*, *IRF3*), povezanih z imunskim sistemom, smo spremljali v celicah, imunostimuliranih z LPS in v kontrolah.



**Slika 9:** Skupki MEC v obliki monosloja na plastični podlagi. (A): Morfologija celične kulture kravjih epitelnih celic po dveh dneh in po sedmih dneh (B).

Lipopolisaharid (LPS) je glavna komponenta zunanje membrane gram-negativnih bakterij in v veliki meri prispeva k strukturalni integriteti bakterije. Učinkuje kot endotoksin, ki sproži močan imunski odziv pri živalih (aktivira sistem komplementa, inducira tvorbo provnetnih citokinov), zato se pogosto uporablja tudi za imunostimulacijo celičnih kultur (Kang in sod., 2016). Z imunostimulacijo z LPS smo ugotovili imunokompetentnost vzpostavljene primarne celične linije epitelnih celic kozje mlečne žleze (Ogorevc in sod., 2009; Ogorevc in sod., 2015) in potrdili vpliv LPS na izražanje genov, povezanih z imunskim odzivom (Slika 2; Preglednica 1).



**Slika 2:** Diferenčno izražanje kandidatnih genov (log<sub>2</sub>FC) v pgMEC ob imunostimulaciji z 10 µg LPS/ml.

**Preglednica 1:** Diferenčno izražanje kandidatnih genov v pgMEC ob imunostimulaciji (10 µg/ml LPS).

	<i>ΔCt</i>	<i>SD</i>	<i>FC</i>	<i>Začetni oligonukleotidi</i>
<i>TLR4</i>	1,09	0,26	2,13	<i>TLR4_F</i> : 5'- TTC AAC CGT ATC ACG GCC TC -3' <i>TLR4_R</i> : 5'- TGA CCC ACT GCA GGA AAC TC -3'
<i>TLR2</i>	4,72	0,12	26,35	<i>TLR2_F</i> : 5'- TTG ACA AGA AGG CCA TCC CC -3' <i>TLR2_R</i> : 5'- AGA ACG CTT CCT GCT GAG TC -3'
<i>MyD88</i>	0,59	0,06	1,49	<i>MyD88_F</i> : 5'- TTG AGA AGA GGT GCC GTC G -3' <i>MyD88_R</i> : 5'- CAG ACA GTG ATG AAG CGC AG -3'
<i>TNFα</i>	3,49	0,04	11,31	<i>TNFα_F</i> : 5'- GCA CTT CGG GGT AAT CGG C -3' <i>TNFα_R</i> : 5'- GCC TTG AGG GCA TTG GCA T -3'
<i>IL8</i>	8,41	0,13	340,14	<i>IL8_F</i> : 5'- TGT GTG AAG CTG CAG TTC TGT -3' <i>IL8_R</i> : 5'- TGG GGT CTA AGC ACA CCT CT -3'
<i>NFκB</i>	1,44	0,19	2,71	<i>NFκB_F</i> : 5'- CTG GAA GCA CGA ATG ACA GA -3' <i>NFκB_R</i> : 5'- GCT GTA AAC ATG AGC CGT ACC -3'
<i>IL6</i>	3,04	0,19	8,23	<i>IL6_F</i> : 5'- TGG GTT CAA TCA GGC GAT TTG -3' <i>IL6_R</i> : 5'- GTG TTT GTG GCT GGA GTG GT -3'
<i>IRF3</i>	1,33	0,16	2,51	<i>IRF3_F</i> : 5'- TTG TGA ACT CAG GGG TCA GG -3' <i>IRF3_R</i> : 5'- TGG GCT CAA GTC CAT GTC AC -3'

ΔCt: delta-delta CT; SD: standardni odklon; FC: relativna sprememba v izražanju

Imunostimulacija z virulentnim dejavnikom LPS je v pgMEC povzročila indukcijo provnetnih citokinov (npr. *IL6*, *IL8*, *TNFα*). Citokini delujejo kot posredniki med elementi imunskega sistema in so regulirani preko aktivacije različnih transkripcijskih dejavnikov. Sprememba v izražanju nekaterih kandidatnih genov kaže na aktivacijo predvsem *NFκB* signalizacije.

Aktivacija *NFκB* poti, ki ob infekciji sproži izražanje številnih genov, povezanih s prirojeno in pridobljeno imunostjo (Tatusova in sod., 2016), preko *MyD88* odvisne poti, ki ima ključno vlogo pri aktivaciji imunskih celic preko toličnih receptorjev (Sayers in sod., 2019), je pričakovana. Od *NFκB* odvisni kemokini (npr. *IL6* in *IL8*) vplivajo na intenziteto in trajanje imunskega odziva.

Zanimivo je, da se je izražanje *TLR2* ob imunostimulaciji z LPS bolj povečalo kot izražanje *TLR4*, preko katerega poteka z LPS induciran prenos signala preko membrane v celico. LPS se sicer sam ne veže direktno na *TLR4*, vendar signalizacija poteka preko receptorskega kompleksa *TLR4/MD-2*. Ob aktivaciji kompleksa pride do sprožitve imunskega odziva (sinteze različnih vnetnih posrednikov, kot so *IL6*, *IL8*, *TNFα*; Gorbet in Sefton, 2005).

Povečano izražanje genov, povezanih z imunskim odzivom potrjuje imunokompetentnost primarnih celic mlečne žleze in vlogo izbranih genov v imunskem odzivu mlečne žleze. Vendar pa so ti geni zgolj peščica od številnih pomembnih vnetnih mediatorjev, ki jih sproščajo epitelne celice mlečne žleze kot odziv na okužbo. V prihodnosti bomo preučili tudi druge kandidatne gene in vpliv njihovih alelnih variant, kar bi omogočilo širši vpogled v odkrivanje regulatornih mehanizmov, pomembnih za patogenezo mastitisa. Ko bodo pbMEC ustrezno opisane, bomo poskuse aktivacije imunskega sistema ponovili tudi na teh celicah. Ponovitev poskusa na celicah druge vrste (tj. goveda), bo omogočila primerjalno analizo molekularnih vzorcev

regulacije genov, povezanih z imunskim odzivom mlečne žleze pri različnih vrstah prežvekovalcev.

#### 4 SKLEPI

S preliminarnim poskusom stimulacije pgMEC z LPS smo pokazali smiselnost uporabe celičnih modelov za preučevanje mastitisa in dodatno potrdili potencialno vlogo izbranih kandidatnih genov pri aktivaciji prirojenega imunskega odziva. Uspešna optimizacija metode izolacije MEC iz mleka pa predstavlja obetavno možnost za pridobitev večjega števila različnih celičnih kultur (bioloških ponovitev) na neinvaziven način, kar omogoča raziskave fiziologije laktacije (Mobuchon in sod., 2015; Wicik in sod., 2015) in regulacije imunske obrambe mlečne žleze ob vdoru patogenov (Lawless in sod., 2013; Jin in sod., 2014) na večjem številu različnih genotipov.

#### ZAHVALA

Avtorja prispevka se zahvaljujeva Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) za štipendiranje mlade raziskovalke v okviru programa Mladi raziskovalec [šifra raziskovalca: 54734] ter Programski skupini P4-0220: Primerjalna genomika in genomska biodiverziteteta, pod okriljem katere smo raziskavo izvedli.

#### 5 VIRI

- Bulgari, O., Dong, X., Roca, A. L., Caroli, A. M., Loor, J. J. (2017). Innate immune responses induced by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid in primary goat mammary epithelial cells. *Journal of animal science and biotechnology*, 8, 29.
- Danowski, K., Sorg, D., Gross, J., Meyer, H. H. D., Kliem, H. (2012). Innate defense capability of challenged primary bovine mammary epithelial cells after an induced negative energy balance in vivo. *Czech Journal of Animal Science*, 57(5), 207-219.
- German, T., Barash, I. (2002). Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. In vitro cellular & developmental biology. *Animal*, 38(5), 282-292.
- Gorbet, M. B., Sefton, M. V. 2005. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*, 26(34), 6811-6817.
- Griesbeck-Zilch, B., Osman, M., Kuhn, C., Schwerin, M., Bruckmaier, R. H., Pfaffl, M. W., Hammerle-Fickinger, A., Meyer, H. H., Wellnitz, O. (2009). Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *Journal of Dairy Science*, 92, 4621-4633.
- Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T. J. (2011). Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1), 16-23.
- Jin, W., Ibeagha-Awemu, E. M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X., Guan le, L. (2014). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics*, 15, 181.
- Kang, S., Lee, J. S., Lee, H. C., Petriello, M. C., Kim, B. Y., Do, J. T., Lim, D. S., Lee, H. G., Han, S. G. (2016). Phytoncides extracted from pinecone decreases LPS induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 579-587.

- Lawless, N., Foroushani, A. B., McCabe, M. S., O'Farrelly, C., Lynn, D. J. (2013). Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. *PLoS ONE* 8:e57543, doi:10.1371/journal.pone.0057543
- Livak, K. J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Mobuchon, L., Marthey, S., Boussaha, M., LeGuillou, S., Leroux, C., Le Provost, F. (2015). Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *BMC Genomics*, 16, 285.
- Ogorevc, J., Prpar Mihevc, S., Dovč, P. (2009). In vitro mammary gland model = In vitro model mlečne žleze : establishment and characterization of caprine mammary epithelial cell line : vzpostavitev in določitev značilnosti epitelne celične linije iz kozje mlečne žleze. *Acta agriculturae Slovenica*, 94(2), 133-138.
- Ogorevc, J., Prpar Mihevc, S., Hedegaard, J., Benčina, D., Dovč, P. (2009). Transcriptomic response of goat mammary epithelial cells to *Mycoplasma agalactiae* challenge – a preliminary study\*. *Animal science papers and reports*, 33, 155-163.
- Pantschenko, A. G., Woodcock-Mitchell, J., Bushmich, S. L., Yang, T. J. (2000). Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line (CMEC). In vitro cellular & developmental biology. *Animal*, 36(1), 26-37.
- Petzl, W., Zerbe, H., Gunther, J., Yang, W., Seyfert, H. M., Nurnberg, G., Schuberth, H. J. (2008). *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Research*, 39, 18.
- Prpar Mihevc, S., Ogorevc, J., Dovč, P. (2014). Lineage-specific markers of goat mammary cells in primary culture. In vitro cellular & developmental biology. *Animal*, 50(10): 926-936.
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D., Karsch-Mizrachi, I. (2019). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D94-D99.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614-6624.
- Vorbach, C., Capecchi, M. R., Penninger, J. M. (2006). Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *BioEssays*, 28, 606-616.
- Wicik, Z., Gajewska, M., Majewska, A., Walkiewicz, D., Osińska, E., Motyl, T. (2015). Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breedheifers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, doi: 10.1111/jbg.12172



## Vsebnost kanabinoidov v različnih sortah konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Marjeta ERŽEN<sup>1\*</sup>, Iztok Jože KOŠIR<sup>2</sup>, Miha OCVIRK<sup>2</sup>, Samo KREFT<sup>3</sup>, Andreja ČERENAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za rastline, tla in okolje, Žalec, Slovenija

<sup>2</sup> Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za agrokemijo in pivovarstvo, Žalec, Slovenija

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [marjeta.erzen@ihps.si](mailto:marjeta.erzen@ihps.si)

### Vsebnost kanabinoidov v različnih sortah konoplje (*Cannabis sativa* L.)

**Izveček:** Konoplja (*Cannabis sativa* L.) ima dolgo zgodovino uporabe. Vsebuje številne snovi, ki delujejo pozitivno na zdravje ljudi. Med najpomembnejše spadajo kanabinoidi. V poskusu smo uporabili tri različne sorte industrijske konoplje in sicer Carmagnola selected, Tiborszallasi in Finola selection. S tekočinsko kromatografijo (HPLC) smo v vzorcih določili 10 različnih kanabinoidov. Pri vseh treh sortah je bila najvišja vsebnost kanabinoida CBD-A. Sorta Finola selection je imela skoraj pri vseh kanabinoidih najvišje vsebnosti razen vsebnosti CBG-A in  $\Delta$ -9-THC-A, ki sta bili najvišji pri sorti Carmagnola selected. Finola selection je imela najvišjo vsebnost celokupnega CBD in celokupnega CBG, medtem ko je imela Carmagnola selected najvišjo vsebnost celokupnega  $\Delta$ -9-THC. Na podlagi PCA analize smo ugotovili, da se vse tri sorte glede na vsebnost kanabinoidov lahko ločijo med sabo. Zaradi visoke vsebnosti predvsem celokupnega CBD bi lahko vse tri sorte bile zanimive v farmacevtski industriji za pridobivanje ekstrakta CBD.

**Ključne besede:** konoplja; *Cannabis sativa*; sorta; kanabinoidi

### Cannabinoid content in different hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties

**Abstract:** Hemp (*Cannabis sativa* L.) has long history of use. It contains numerous phytochemicals. The most important are cannabinoids. In this study three different varieties were used; Carmagnola selected, Tiborszallasi and Finola. Selection. In samples, ten different cannabinoids were determined with liquid chromatography (HPLC). In all three hemp varieties, Cannabinoid CBD-A was the most abundant cannabinoid. The Finola selection had the highest contents of almost all cannabinoids. The exceptions were CBG-A and  $\Delta$ -9-THC-A which were the highest in Carmagnola selected. Finola selection had also the highest content of total CBD and total CBG while the total  $\Delta$ -9-THC content was in Carmagnola selected. According to PCA analysis all three varieties can be distinguished from each other. Due to high content of total CBD all three varieties can be interesting for pharmaceutical industry for CBD extraction.

**Key words:** hemp; *Cannabis sativa*; variety; cannabinoids

## 1 UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je imela veliko uporabno vrednost že skozi celotno človeško zgodovino. Uporablja se za prehrano ljudi in živali, v medicini, v gradbeništvu, avtomobilski industriji, kot vir vlaken za vrvi (Hillig, 2005). Vsebuje številne snovi, ki imajo terapevtske učinke na ljudi in živali (Andre, Hausman in Guerriero, 2016). Do sedaj je bilo v konoplji raziskanih več kot 500 snovi (Namdar in sod., 2018), med katere med drugimi spadajo kanabinoidi, terpenioidi, steroidi, flavonoidi, lignani, alkaloidi.

Kanabinoidi so eni izmed najbolj raziskanih sekundarnih metabolitov. Gre za terpenofenolne spojine, ki jih najdemo samo v konoplji (Turner, Hemphill in Mahlberg, 1978). Med najpomembnejše kanabinoide spadajo  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabinol ( $\Delta$ -9-THC), kanabidiol (CBD), kanabikromen (CBC) in kanabigerol (CBG) ter njihove karboksilirane oblike (Namdar in sod., 2018). Najvišja vsebnost kanabinoidov se nahaja v žleznihih trihomih rastlin (do 60 %), v ne oprášenih socvetjih rastlin je lahko do 30 % kanabinoidov, v oprášenih socvetjih do 13 %, v listih do 0,05 % in v steblih do 0,02 %. V koreninah in semenih kanabinoidov ne najdemo (Russo in Marcu, 2017). Kanabinoide se uporablja pri zdravljenju številnih bolezni kot so epilepsija, multipla skleroza, Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, diabetes, ter pri lajšanju bolečin in slabosti po kemoterapijah (Namdar in sod., 2018).

Konopljo lahko glede na kemijski profil uvrstimo v 5 različnih kemotipov in sicer: kemotip I; ki ima vsebnost THC višjo do 0,3 % in vsebnost CBD nižjo od 0,5 %, kemotip II; pri katerem je razmerje med kanabinoidoma CBD in THC približno enaka, kemotip III; kjer je vsebnost CBD višja od 0,3 % in vsebnost THC nižja, kemotip IV; ki ima visoko vsebnost kanabinoida CBG in kemotip V; pri katerem so vsebnosti kanabinoidov v tako majhnih količinah, da jih ni mogoče zaznati (Fournier in sod., 1987; Small in Beckstead, 1973).

V raziskavi smo želeli določiti vsebnost kanabinoidov v treh različnih sortah konoplje z namenom določitve razlik med njimi.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Rastlinski material in priprava vzorcev

Tri različne sorte, Carmagnola selected (CS), Tiborszallasi (T) in Finola selection (FS) so bile posejane v letu 2019. Carmagnola selected in Tiborszallasi na lokaciji Ljubno ob Savinji ter Finola selection na lokaciji Žalec. Sorti Carmagnola selected in Tiborszallasi sta bili posejani v začetku julija na površini veliki 1000 m<sup>2</sup>. Medvrstna razdalja je bila 0,75 m ter gostota setve 1,2 kg/ha. Sorta Finola selection je bila posejana v sredini maja na površini veliki 2,8 ha. Medvrstna razdalja je bila 2,8 m. Socvetja vseh treh sort so bila vzorčena konec septembra. Moške rastline so se iz posevka odstranjevale z namenom preprečitve oprášitve ženskih rastlin. Vzorčenim rastlinam smo odstranili stebila in večje liste ter jih sušili pri temperaturi 30 °C. Suha socvetja smo zmleli in shranili na -20 °C do začetka analiz.

### 2.2 Analiza HPLC

Vsebnost 10 kanabinoidov (kanabidiolna kislina (CBD-A), kanabigerolna kislina (CBG-A), kanabigerol (CBG), kanabidiol (CBD), kanabinol (CBN),  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabinol ( $\Delta$ -9-THC),  $\Delta$ -8-tetrahidrokanabinol ( $\Delta$ -8-THC), kanabikromen (CBC),  $\Delta$ -9-tetrahidrokanabinolna kislina

( $\Delta$ -9-THC-A) in kanabikromenska kislina (CBC-A)) smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Vzorcem vseh treh sort (200 mg) smo dodali 25 mL 80 % metanola. Ekstrakcija je potekala 15 minut v ultrazvočni kopeli, pri čemer so bili vzorci vsakih 5 minut dani na vrtničnik (Mudge, Murch in Brown, 2017). Prefiltrirane vzorce smo nato injicirali v injektor (5  $\mu$ L). Ločitev komponent je potekala na koloni Raptor ARC-18, 2,7 $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm ID (Restek, ZDA). Mobilna faza A je bila sestavljena iz 5 mM amonijevega nitrata in 0,1 % mravljične kisline v deionizirani vodi. Mobilna faza B je bila pripravljena iz acetonitrila in 0,1 % mravljične kisline. Detekcija je potekala 15 min pri 228 nm.

### 2.3 Določitev celokupne vsebnosti kanabinoidov

Določili smo tudi vsebnosti celokupnih kanabinoidov, ki smo jih izračunali po sledečih enačbah glede na HPLC rezultate (Glivar in sod., 2020):

- 1) % celokupnega  $\Delta$ -9-THC = %  $\Delta$ -9-THC + (%  $\Delta$ -9-THC-A x 0.877)
- 2) % celokupnega CBD = % CBD + (% CBD-A x 0.877)
- 3) % celokupnega CBG = % CBG + (% CBG-A x 0.878).

### 2.4 Statistična analiza

Podatke za analizo glavnih komponent smo obdelali v programu Orange, medtem ko so bile vse statistične analize z eno spremenljivko narejene v programu Microsoft Excel.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

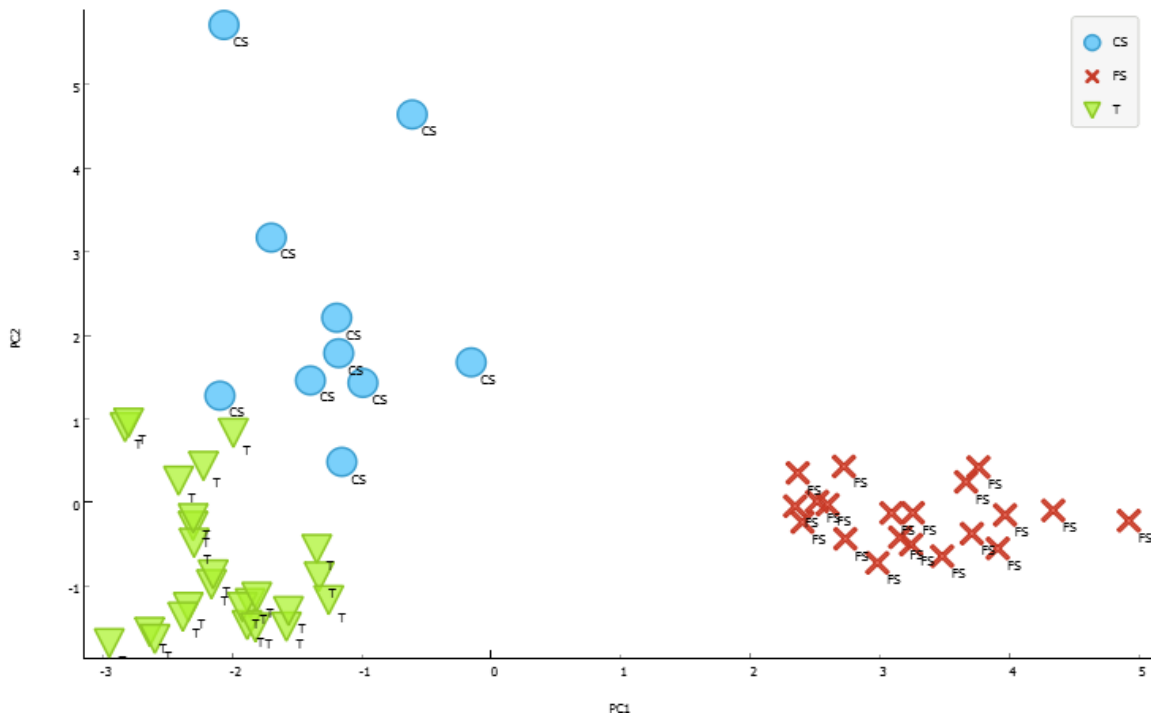
Iz Preglednice 1 je razvidno, da je bila najvišja vsebnost kanabinoida CBD-A pri sorti FS in sicer 6,46 %. CBD-A je bil tudi sicer najbolj zastopan izmed vseh kanabinoidov. Prav tako so bile vsebnosti CBG (0,06 %), CBD (0,66 %), CBN (0,03 %),  $\Delta$ -9-THC (0,09 %), CBC (0,06 %) in CBC-A (0,62 %) najvišje pri sorti FS. CS je imela najvišjo vsebnost kanabinoida CBG-A (1,03 %) in vsebnost  $\Delta$ -9-THC-A (0,83 %). Pri sorti T pa so bile vrednosti vseh kanabinoidov nižje. Vsebnosti  $\Delta$ -8-THC ni bilo mogoče zaznati v nobeni sorti. Če primerjamo sorti CS in Carmagnola, ki so jo analizirali Glivar in sod. (2020) je bila vsebnost kanabinoidov CBD-A, CBG-A in  $\Delta$ -9-THC v našem primeru višja, medtem ko so bile vsebnosti pri kanabinoidih CBD,  $\Delta$ -9-THC in CBC nižje v našem primeru. Enako je bilo v primeru sorte T, če primerjamo sorti Finola in FS pa so bile vse vrednosti naših kanabinoidov višje kot pri Glivar in sod. (2020).

**Preglednica 1:** Diferenčno izražanje kandidatnih genov v pgMEC ob imunostimulaciji (10  $\mu$ g/ml LPS).

	<i>CBD-A</i>	<i>CBG-A</i>	<i>CBG</i>	<i>CBD</i>	<i>CBN</i>	<i><math>\Delta</math>-9-THC</i>	<i><math>\Delta</math>-8-THC</i>	<i>CBC</i>	<i><math>\Delta</math>-9-THC-A</i>	<i>CBC-A</i>	<i>Total CBG</i>	<i>Total CBD</i>	<i>Total THC</i>
<i>CS</i>	2,74	1,03	0,04	0,07	0,00	0,05	0,00	0,01	0,83	0,24	0,94	2,48	0,77
<i>SD</i>	1,62	1,71	0,02	0,05	0,00	0,07	0,00	0,01	1,47	0,08	1,5	1,5	1,4
<i>T</i>	3,14	0,20	0,01	0,06	0,00	0,03	0,00	0,01	0,59	0,30	0,19	3,01	0,72
<i>SD</i>	0,98	0,07	0,01	0,03	0,00	0,03	0,00	0,01	0,78	0,14	0,1	1,0	0,9
<i>FS</i>	6,46	0,91	0,06	0,66	0,03	0,09	0,00	0,06	0,48	0,62	0,95	6,30	0,51
<i>SD</i>	0,29	0,30	0,01	0,14	0,02	0,02	0,00	0,01	0,07	0,09	0,2	0,3	0,1

Na podlagi formule za izračun celokupnih kanabinoidov, ki je prikazana v metodah dela smo izračunali vrednosti pri posameznih sortah za kanabinoide CBG, CBD in  $\Delta$ -9-THC. Kislinke oblike kanabinoidov namreč pri visoki temperaturi, kot sta sušenje ali kajenje in pa s staranjem dekarboksilirajo v ne-kislinske oblike (Stiasna in sod., 2015). Na primer, CBD-A dekarboksilira v CBD. Kot je iz preglednice 1 razvidno ima sorta FS najvišjo vsebnost celokupnega CBD in celokupnega CBG, medtem ko je celokupna vsebnost  $\Delta$ -9-THC najvišja pri sorti CS. Celokupne vsebnosti  $\Delta$ -9-THC pri vseh treh sortah presegajo mejo 0,2 %, kar je najvišja dovoljena vsebnost  $\Delta$ -9-THC, ki je še dovoljena v sortah na seznamu Evropske sorte liste. Vzrok tako visokih vsebnosti je najverjetneje večja medvrstna razdalja in ne oprášena socvetja. Delež kanabinoidov je namreč odvisen od številnih abiotskih in biotskih dejavnikov, kot so spol rastline, genotip, temperatura, svetloba, zrelost rastline (Hillig in Mahlberg, 2004), gostota setve (Amaducci in sod., 2015). Pri oprášitvi socvetij se energija preusmeri v tvorbo semen in ne tvorbo kanabinoidov, zato je v oprášenih socvetjih vsebnost kanabinoidov nižja.

Sorta FS ima zelo visoko vsebnost celokupnega kanabinoida CBD, ta pa ima številne pozitivne učinke na zdravje. Deluje protivnetno, antioksidativno, antipsihotično, proti glivično, proti bakterijsko (Appendino in sod., 2008), pomaga pri zdravljenju nevrodegenerativnih in nevroloških boleznih kot so Parkinsonova bolezen, Huntingtonova bolezen, epilepsija, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza (Hofmann in Frazier, 2013). FS bi zato bila lahko uporabna za pridelavo v farmacevtske namene za pridobivanje CBD.



**Slika 10:** PCA graf vsebnosti kanabinoidov za sorte Carmagnola CS, Tiborszallasi in Finola selection. PC1 pojasni 50,71 % in PC2 pojasni 17,00 %.

Na podlagi analize PCA (Slika 1) lahko ugotovimo, da se sorte glede na vsebnost kanabinoidov ločijo med sabo. PC1 pojasni 50,71 % in PC2 pojasni 17,00 %. Sorta Finola je finska sorta, Carmagnola CS je italijanska sorta, ki je bila selekcionirana iz stare tradicionalne sorte Carmagnola, medtem ko je Tiborszallasi stara madžarska sorta (Clarke in Merlin, 2013), kar kaže na to, da ne izvirajo iz skupnega prednika in so si zato lahko po vsebnosti kanabinoidov tudi različne.

#### 4 SKLEPI

Iz analize je razvidno, da se vse tri sorte lahko ločijo med sabo glede na vsebnosti kanabinoidov. Kanabinoid CBD-A je imel pri vseh treh sortah najvišjo vsebnost. Prav tako je imel celokupni CBD, ki je dekarboksilirana oblika CBD-A najvišjo vsebnost izmed vseh celokupnih kanabinoidov. Zaradi visoke vsebnosti tega kanabinoida bi predvsem sorto FS lahko uporabili za nadaljnjo uporabo v farmaciji in medicini. Prav tako bi bili uporabni za farmacevtske namene tudi ostali dve sorti, vendar z upoštevanjem vseh pridelovalnih pogojev, ki bi kar se da najboljše omogočali optimalno pridelavo in rast rastlin za tvorbo kanabinoidov.

#### 5 VIRI

- Amaducci, S., D. Scordia, F. H. Liu, Q. Zhang, H. Guo, G. Testa, and S. L. Cosentino. (2015). Key Cultivation Techniques for Hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products* 68:2–16. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.06.041.
- Andre, Christelle M., Jean Francois Hausman, and Gea Guerriero. (2016). Cannabis Sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–17. doi: 10.3389/fpls.2016.00019.
- Appendino, Giovanni, Simon Gibbons, Anna Giana, Alberto Pagani, Gianpaolo Grassi, Michael Stavri, Eileen Smith, and M. Mukhlesur Rahman. (2008). Antibacterial Cannabinoids from Cannabis Sativa: A Structure-Activity Study. *Journal of Natural Products* 71(8):1427–30. doi: 10.1021/np8002673.
- Fournier, G., C. Richez-Dumanois, J. Duvezin, J. P. Mathieu, and M. Paris. (1987). Identification of a New Chemotype in Cannabis Sativa: Cannabigerol-Dominant Plants, Biogenetic and Agronomic Prospects. *Planta Medica* 53(3):277–80. doi: 10.1055/s-2006-962705.
- Hillig, Karl W. (2005). Genetic Evidence for Speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 52(2):161–80. doi: 10.1007/s10722-003-4452-y.
- Hillig, Karl W., and Paul G. Mahlberg. (2004). A Chemotaxonomic Analysis of Cannabinoid Variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 91(6):966–75. doi: 10.3732/ajb.91.6.966.
- Hofmann, Mackenzie E., and Charles J. Frazier. (2013). Marijuana, Endocannabinoids, and Epilepsy: Potential and Challenges for Improved Therapeutic Intervention. *Experimental Neurology* 244:43–50. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.047.
- Mudge, Elizabeth M., Susan J. Murch, and Paula N. Brown. (2017). Leaner and Greener Analysis of Cannabinoids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(12):3153–63. doi: 10.1007/s00216-017-0256-3.
- Namdar, Dvory, Moran Mazuz, Aurel Ion, and Hinanit Koltai. (2018). Variation in the Compositions of Cannabinoid and Terpenoids in Cannabis Sativa Derived from Inflorescence Position along the Stem and Extraction Methods. *Industrial Crops and Products* 113, 376–82. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.060.
- Ranalli, Paolo. (2004). Current Status and Future Scenarios of Hemp Breeding. *Euphytica* 140(1–2):121–31. doi: 10.1007/s10681-004-4760-0.
- Russo, Ethan B., and Jahan Marcu. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. Vol. 80. 1st ed. Elsevier Inc.
- Small, E., and H. D. Beckstead. (1973). Common Cannabinoid Phenotypes in 350 Stocks of Cannabis. *Lloydia* 36(2):144–65.
- Stiasna, Klara, Maria Presinszka, Tomas Vyhnanek, Vaclav Trojan, Eva Mrkvicova, Ludek Hrivna, and Ladislav Havel. (2015). Analysis of Genes From Cannabinoid Biosynthetic Pathway. *MendelNet 2015* (November):6.
- Turner, Jocelyn C., John K. Hemphill, and Paul G. Mahlberg. (1978). Quantitative Determination of Cannabinoids in Individual Glandular Trichomes of Cannabis Sativa L. (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 65(10):1103–6. doi: 10.1002/j.1537-2197.1978.tb06177.x.

## The importance of studying CD73 in cancer studies (Overview)

Farhad HARIRI AKBARI<sup>1\*</sup>, Lucija SLEMC<sup>1</sup>, Mahdi ALIZADEH<sup>2,3</sup>, Mahnaz HATAMI FARD<sup>4</sup>, Peymaneh SHAFAEI<sup>5</sup>, Maryam SHEYBANI-NASAB<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Department of Genetic and Plant Breeding Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.

<sup>5</sup> Department of biochemistry, Islamic Azad University, Branch Falavarjan, Isfahan, Iran.

<sup>6</sup> Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

\*corresponding author: [hariri.a.farhad@gmail.com](mailto:hariri.a.farhad@gmail.com)

**Abstract:** The purinergic signaling pathway has been introduced as the main way in the progression of cancer and it is regulated by a series of nucleotides. CD73 is a surface protein encoded by the NT5E gene and plays a crucial role in Purinergic signaling. It can enhance tumor proliferation and development by confining anti-tumor immune T-cells through signaling that involves the adenosine receptor. This study considers the molecular pathway and numerous roles of CD73 in the growth and development of cancers and tumors, clinical importance including metastasis, angiogenesis, repressive effects on response to tumors in the immune system, regulation of gene expression mechanisms, and prevalent status of anti-CD73 treatment. Studies on various models have shown that CD73 plays a key role in the growth of tumors; also, it has become an attractive therapeutic goal for scientists in many studies related to cancer. These studies include identifying different cancer subsets, the anticipation of drug response in patients, precipitation of purine escape pathway activity, etc. Population studies have shown that CD73 is a key molecule that formulates proliferation, colony spreading, and invasion in vitro, angiogenesis, and immune escape in vivo in cancer and tumor cells. The data has shown the potential of CD73 as a recognizable biological marker in the next generation of treatment and research studies on cancer.

**Keywords:** Cancer, Tumorigenesis, Purinergic signaling, Ecto-5'-nucleotidase (CD73)

### Pomen preučevanja CD73 v študijah raka

**Izveček:** Purinergična signalna pot se je uveljavila kot glavni način napredovanja raka in uravnava jo vrsta nukleotidov. CD73 je površinski protein, ki ga kodira gen NT5E in ima ključno vlogo pri purinergični signalizaciji. CD73 lahko poveča proliferacijo in razvoj tumorja z omejevanjem protitumorskih imunskih T-celic s signalizacijo, ki vključuje adenoziński receptor. Ta študija obravnava molekularno pot in različne vloge CD73 pri rasti in razvoju raka in tumorigenezi, klinični pomen, vključno z metastaziranjem, angiogenezo, represivnimi učinki

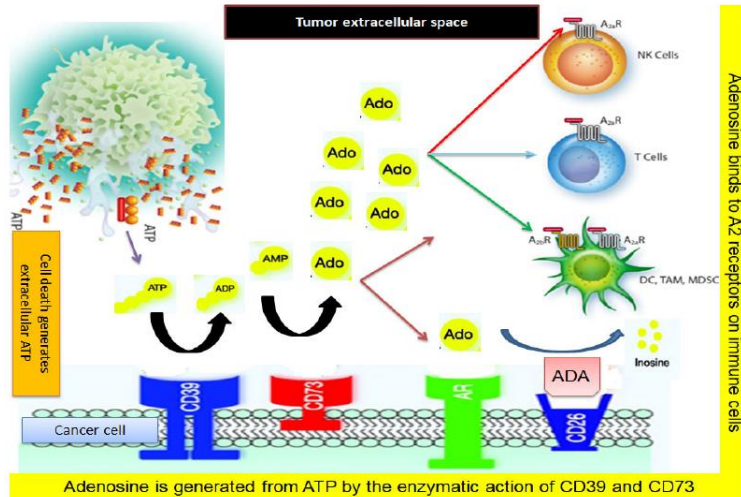
na odziv imunskega sistema na tumorje, uravnavanje genskega izražanja in glavne uporabe zdravljenja s CD73. Študije na različnih modelih so pokazale, da ima CD73 ključno vlogo pri rasti tumorjev; prav tako je postal za raziskovalce pomemben terapevtski cilj v študijah, povezanih z rakom. Te študije vključujejo identifikacijo različnih podvrst raka, predvidevanje odziva na zdravila pri bolnikih, spremljanje posledic uhanja purina itd. Populacijske študije so pokazale, da je CD73 ključna molekula, ki oblikuje proliferacijo, raztros kolonij in invazivnost in vitro, angiogenezo in izmikanje rakavih in tumorskih celic imunskemu odgovoru. Podatki so pokazali potencial CD73 kot zaznavnega biološkega označevalca za načrtovanje terapij in raziskave karcinogeneze.

**Ključne besede:** rak, tumorigeneza, purinergična signalizacija, ekto-5'-nukleotidaza (CD73)

## 1 INTRODUCTION

Cancer cells use a variety of mechanisms to enforce and enhance immune evasion. The treatment of many cancers includes surgery, radiotherapy, chemotherapy, and using a complex network of factors to modulate and control the immune response in the microenvironment of tumors. Inadequacies of these methods are a reason for the failure of cancer therapy (Galluzzi et al., 2018). The body exploits the immune system to recognize and suppress the development of malignant cells (Pandya et al., 2016). During the progressive development of cancer or in tumor genesis, these cells foster tolerant micro-environments that activate a number of immune-suppressing mechanisms in the patient's body. These mechanisms can work effectively to counteract immune responses (Gabriel et al., 2007). Complex cell malignancy processes have been modeled in vivo, in vitro or ex-vivo. These processes include tumor genesis, progression, and metastasis induced by cancers or tumors which are very complex. It must be mentioned that they involve a chain of reactions including dedifferentiation and prevention of programmed cell death (apoptosis, autophagy, etc.). Also, these processes include the rapid and uncontrolled proliferation of transformed cells that affects the regulation of metabolism, induces epigenetic changes and angiogenesis, causes evasion from immune surveillance, incursion, and colonization into distant organs, etc. (Allard et al., 2019; Cao, 2017; Wang et al., 2012). Many signaling pathways contributing to cancer and tumor progression have been elucidated; one of the most important pathways is the purinergic signaling pathway, which plays an important and key role in tumorigenesis. Recent studies have indicated the extracellular adenosine triphosphate (ATP) mechanism to adenosine monophosphate (AMP) through the purinergic signaling pathway involving CD39 (Stagg et al., 2011). This is followed by AMP transformation to adenosine involving CD73 as a leading signaling molecule. The relations between extra-cellular nucleotides include ATP and CD39, ADP and CD73, and AMP and the corresponding receptors on cancer and tumor cells (Zhao et al., 2017; Burnstock et al., 2013; Serra et al., 2011). In investigating patients by biopsies the researchers have recently found that CD73 could be over-expressed in a multitude of cancer types such as breast cancer, colorectal cancer (CRC), ovarian cancer, gastric cancer, and gall bladder cancer, associated with clinical features, prognostics, and diagnostics in cancer patients (Allard et al., 2017; Marian et al., 2015; Leve et al., 2019). This study focuses on previous research that has provided new empirical evidence, this evidence suggests that CD73 interferes with mechanisms of T-cell anti-tumor activities. These studies strongly support and extend the fact that extracellular adenosine and A2A adenosine receptors (A2AR) play a fundamental role in tumor immune escape. It has been confirmed that CD73 is a major regulatory molecule in cancer formation (24). Also, in this

study we describe the function of CD73 molecule, fully explain the signal transmission, and discuss the important clinical and pharmacological studies on CD73. It was found that controlling CD73 can be considered a promising approach to treat cancer patients in the future (Figure 1).



**Figure 1:** The relations between extra-cellular nucleotides include ATP and CD39, ADP and CD73, and AMP and the corresponding receptors on cancer tumor cells.

One of the most important signaling pathways contributing to cancer and tumor progression is the purinergic signaling pathway, which plays an important and key role in tumorigenesis, extracellular adenosine triphosphate (ATP) mechanism to adenosine monophosphate (AMP) through the purinergic signaling pathway involving CD39. This is followed by AMP transformation to adenosine involving CD73 as a leading signaling molecule. CD73 could be over-expressed in a multitude of cancer types and interferes with mechanisms of anti-tumor activity of immune systems. Extracellular adenosine and A2A adenosine receptors (A2AR) play a fundamental role in tumor immune escape.

## 2 BACKGROUND STUDIES

### 2.1 Molecular function

Stress in biology is defined as any environmental or physical pressure (biotic or abiotic) that elicits reactions from an organism (Hariri Akbari et al., 2021); in other words, any factor that seriously threatens homeostasis in the organism (Schneiderman et al., 2021). Many biotic and abiotic stressors have been shown to induce cell responses such as injury, different pathogens, inflammatory agents, oxygen availability (hypoxia), oxidative and ER stress, chemotherapeutic agents, irradiation, etc. (Juliana et al., 2019). Due to all these stressors, different types of cells release nucleotides in response to them, Subsequently, a lot of enzyme cascades hydrolyze nucleotides include ATP or ADP into AMP by NTPDases, AMP into adenosine by ecto-5'-nucleotidase also known as CD73, and finally, adenosine turns into inosine by applying adenosine (Wang et al., 2012; Kukulski et al., 2005). CD73 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) and anchored cell surface protein that is encoded by the NT5E gene and plays multiple roles in tumor processes. Previous studies have presented a potential value of CD73 to serve as



a detectable biomarker for the prognosis of several solid tumors, but the results were controversial (Wang et al., 2017).

Purinergic signaling can be defined as a multistep adjusted cascade that involves induced secretion of ATP/ADP, enabling signaling activity via P2 receptors and nucleotide inactivation to adenosine; Furthermore, adenosine binds to its own P1 receptors, which use biological pathways as well as regulation and maintenance of micro internal environment and homeostasis of cells and tissues, differentiation, proliferation, or finally the cell death (Beavis et al., 2012; Ghiringhelli et al., 2012; Zhao-Wei et al., 2017). Hence, it is adjusted with a set of cell surface-located ectonucleotidases, and Coordination between ATP/ADP, AMP, and adenosine could be considered as an essential method for controlling tumor progression (Zhao et al., 2017). Ectoenzymes CD39 and CD73 sequentially convert ATP or ADP to AMP by coordinated action. Extracellular adenosine (ADO) mediates the effect of antibodies and paracrine hormones and type 1 purine receptors (Horenstein et al., 2013). CD73 has been determined as ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT, EC 3.1.3.5) and is a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface protein; its enzymatic activity was detected in many tissue cell types (Zhang, 2010). Adenosine has now been identified as one of the most important molecules for regulating the immune system in microenvironment tumors (Di Virgilio et al., 2018; Quezada et al., 2013). CD73 genes have been reported to be overexpressed in a wide range of cancers. Also, with clinical and statistical studies, its importance has been determined by correlation analysis (Ghalamfarsa et al., 2019). CD73 has both enzymatic and non-enzymatic functions in cells; CD73 acts as a nucleotidase that catalyzes AMP hydrolysis to adenosine and phosphate; adenosine is produced by CD73 which in particular, plays an important role in immunogenesis in tumor cells (Zhao-Wei et al., 2017; Synnestvedt et al., 2002; ZH et al., 2016). In addition, CD73 has a non-enzymatic function as a signaling and adhesive molecule which can suppress the interaction of the cell with extracellular matrix components (ECM) laminin and fibronectin and affects metastatic characteristics of cancer (Holger et al., 2013; Loi et al., 2013). Studies have indicated that both the enzymatic and non-enzymatic roles of CD73 are involved in cancer-related processes and are not independent of each other (Riethmüller et al., 1998; Ghiringhelli et al., 2012). it was demonstrated that Higher expression of CD73 was connected to metastasis, invasiveness, and tumor revascularization (Bin Zhang, 2010; Loi et al., 2013), it was proved in patients who have breast cancer the survival time was observed to be shorter than normal cells regarding encodes CD73 (Monteiro et al., 2018). Furthermore, CD73 causes migration and promotes the invasion of cancer cells in humans (Sean et al., 2006). Upregulated expression of CD73 has been discovered in extremely invasive human melanoma cell lines (Sadej et al., 2006). The biological function of CD73 (ecto-5'-NT) is broadly the consequence of the enzymatic activity of phosphate enzymes which adjust extracellular nucleotides (Zhao-wei et al., 2014). This ecto-enzymatic cascade is associated with CD39 (ecto-ATPase) that generates adenosine from ATP which exploits adenosine receptors (Antonioli, et al., 2013). In spite of the intracellular production of adenosine, cytosolic repositories of adenine can be catalyzed by cytosolic 5' NTnucleotidesin in the cell. Howbeit the extracellular pathways and the amount of the availability of extracellular AMP (Zhang, et al., 2010; Vigano et al., 2014) play a major role in maintaining immune cell homeostasis (Rong et al., 2017).

## 2.2 Studies of the effects of drugs

In the course of cancer immunotherapy, studies on ecto-nucleotidases and adenosine receptors have been introduced as novel clinical targets to enhance antitumor immune response therapies,

and early clinical attempts have presented hopeful results to discover different mechanisms of action. Thus, adenosine target agents are becoming important for research related to cancer. Excessive CD73 expression can be related to resistance to antitumor factors (Zhao-Wei et al., 2017). Quezada et al., indicated that knocking down or/and deterrence activity of CD73 gene expression by siRNA reverses the vincristine resistance phenotype in glioblastoma multiform (GBM) cells (Allard et al., 2017; Gardani et al., 2019). Small molecule suppressors or monoclonal antibodies which target CD73 showed in the mice model that targeted CD73 therapy was an alternative and realistic method to effectively control tumor growth. In particular, increasing the response of the adaptive immune system helps T-cell-based therapy which enhances the function of T-penetrating lymphocytes into tumor cells and subsequently leads to improved survival in cancer patients (Antonioli et al., 2019; Xiao-Xia et al., 2019).

The relationship between CD73 expression level and pathologic complete responses (PCR) rate in  $n=59$  triple-negative breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy anthracycline was evaluated by Loi et al., Their investigation showed that low-level expression of CD73 was related to enhancing PCR rate. In addition, they used breast cancer mouse models to show that in tumor cells, CD73 overexpression might give chemoresistance to doxorubicin interdependent on the activity of A2A adenosine receptor. In mice models, targeted blockage of A2A adenosine receptors could release doxorubicin sensitivity of CD73-overexpressing tumors (Loi et al., 2013; Quezada et al., 2013).

Therewith, in spite of the great interest in cancer immunotherapy, clinical advantages must be further studied with the aim to better understand the mechanisms of immune escape. As an important immune escape monitoring molecule in the body, CD73 can inevitably be involved in immunotherapy resistance (Loi et al., 2013). Therefore, treatment of patients with high CD73 expression should be considered by linking CD73 and resistance to some anti-tumor therapies; in other words, anti-CD73 chemotherapy could be combined with immunotherapy. In the future, with the next generation of cancer treatment, CD73 expression in cancer patients could also be an indicator of gene identification in the selection and use of drugs that can be used to treat cancer (Zhao-wei et al., 2014; Jin, et al., 2010).

Geoff et al., performed an experiment by testing interferon-beta-1a (IFN-beta-1a) in ex-vivo for CD73 activity. It was illustrated that IFN-beta-1a induced up-regulation of CD73 in cultured human lung tissue specimens of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). FP-1201 up-regulates CD73 expression in human lung, and it is correlated with a 28-day decline in mortality in patients with ARDS. These findings, in general, needed to be proven and needed to be prospective in randomized trials; however, this suggests that FP-1201 may be an effective drug with a particular target for patients having ARDS (Geoff et al., 2010).

### 2.3 Clinical studies

In research on CD73 expression regulation by pro-inflammatory cytokines, there has been disagreement whether these inflammatory cytokines affect CD73 in cancer cells or not. However, it has recently been revealed in epithelial cells that there is a case of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) for regulating the CD73 pathway (Hariri Akbari, 2021; Wettstein et al., 2015). The available evidence points to the role of HIF-1 $\alpha$  and CD73 in conversion of AMP to adenosine which results in an increased level of extracellular adenosine in the tumor (Serra et al., 2013; Jin et al., 2010). Loi et al., showed that the expression of CD93 and CD73 was

connected with a worse prognosis in patients with triple-negative cancer (TNBC) (Loi et al., 2013).

Lu, et al., measured the clinical significance and prognostic power of CD73 in  $n = 68$  human gastric cancer patients. Analysis of CD73 expression by immune histochemistry (IHC) disclosed that overexpression of CD73 was positively correlated with differentiation of cells in the tumor (Lu et al., 2013). Zhao et al., surveyed the expression of CD73 in miscellaneous leukemia subtypes in  $n = 86$  patients with hematologic neoplasms and disclosed that the expression of CD73 was correlated with leukemia subtype, differentiation, and proliferation (Zhao et al., 2014). In clinical practice, high expression of CD73 in papillary thyroid tumors of patients with thyroid carcinoma presents a base for the differential diagnosis test (Zhang et al., 2010). The unregulated ecto-enzymatic activity of CD73 was suggested to have diagnostic value for colon cancer patients (Luca et al., 2016). Researchers have discovered that epithelial tumor cells in mice and humans expressed CD39 and CD73. The presence of CD73 is accompanied by high enzymatic activity in cancer tissue cells and it can mediate the production of adenosine in the extracellular environment. This supports the hypothesis that the tumor cells contribute to the increase of adenosine in the microenvironment of the tumor through the enzymatic activity of CD73 levels. In particular, it indicates the development of T-cell-based therapy by enhancing adaptive immune response processes in T lymphocytes which would then infiltrate the tumor and subsequently improve survival in cancer patients (Zhang et al., 2010). Cancer immunotherapy by endogenous or adoptively transferred antitumor T-cells could be complementary to routine therapies, including chemotherapy, radiotherapy, surgery, etc (Fabrizio et al., 2018; Sadej et al., 2012).

In another investigation performed by Grozio et al, it was proved that nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) can be chiefly synthesized in "salvage" pathways inside human cells beginning by nicotinamide, nicotinic acid, or nicotinamide riboside (NR). Initiation of the "salvage" pathway from nicotinamide is activated by FK866 inhibition (Grozio et al., 2013). FK866 brings about apoptosis by very special non-competitive inhibition activity of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAPRT) and is a key enzyme for adjustment of the NAD<sup>+</sup> production from natural nicotinamide (Hasmann et al., 2003; Sean et al., 2006). In addition, it displays a strong anti-tumor activity in multiple different clinical models of cancer (Grozio et al., 2013).

It was shown in this study that clinical experiments have been performed by FK866 and for patients who underwent this treatment there is no need for resection of their tumor in other words they don't need surgery to take out tumors. Also, it was illustrated that extracellular micromolar concentrations of NAD<sup>+</sup> or NAD<sup>+</sup> and low concentrations of Nicotinamide Mononucleotide (NMN) and NR can invert the FK866-induced cell death. This can be a logical explanation for the failure of Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibition as an anti-cancer treatment (Hasmann et al., 2003; Sociali et al., 2016). NMN can be a substrate of both CD38 and CD73 ectoenzymes for producing NAM and NR, respectively. The role of CD38 and CD73 was investigated in providing ecto-cellular NAD<sup>+</sup> precursors for NAD<sup>+</sup> biosynthesis and modification of cell sensitivity to FK866. Exclusively silencing or over-expressing CD38 enhances endogenous production of CD73 whereas CD38 suppresses the extracellular alteration of NMN to NR (an intracellular precursor of NAD biosynthesis in cells). In addition, cell survival by FK866-treated cells with extracellular NMN in tumor cells is severely diminished after drug control (pharmacological inhibition) or special adjustment

(down-regulation) of CD73. This study, therefore, mentioned genetic or pharmacological interventions by CD73 activity indicating that it could be useful to increase the sensitivity of cancer cells to NAMPT inhibitors (Grozio et al., 2013).

The possibility of expression of CD39 and CD73 by chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells for measuring activates of adenosinergic factors which affected cell proliferation and survival has been investigated by Serra et al., 2011. It was shown by immune-histochemistry methods that CD39 is highly expressed in the CLL lymph nodes. CD73 was found to be confined to proliferation centers and Expression of CD73 may be numerous in the Ki67 cells and in the vicinity of T lymphocytes; also it was found in vascular areas in which T lymphocytes are likely found, and in perivascular areas (Serra et al., 2011). CD39/ CD73 CLL cells produce ADO from ADP in a time-dependent way (Vaisitti et al., 2018). CD73 expression takes place in CLL 97/299 (32%) and is connected with CD38 and ZAP-70 expression in peripheral blood of patients (Serra et al., 2011). The extracellular CD73/CD39 induced A2A purinergic type1 of A1 receptors in CLL cells and increased proliferation of neoplastic cells (Vaisitti et al., 2018; Allard et al., 2020). Activation of the ADO receptors enhanced cytoplasmic cAMP amounts, and limited chemotaxis and restricted spontaneous drug-induced apoptosis in CLL cells (Serra et al., 2011). The results from Serra et al, (2011) are in accordance with the presence of an autocrine adenosinergic loop in which leukemia cells dwell in optimal growth niches where they are protected from the function of chemotherapeutic agents (Loi et al., 2013).

Antonioli et al., (2016) investigated the role of immunotherapy by anti-CD73 in cancer treatment; they emphasized that new methods that complement routine chemotherapy and targeted therapy could prove effective in treatment; such as restraining of CD152, CTLA4 (CD152) is a B7/CD28 family member (Seidel et al., 2018) that inhibits T cell functions and alternatively acts as immune checkpoint receptor so Anti-CTLA-4 antibodies can Promote Cancer Immunity in cancer therapies (Allard et al., 2020; Liu et al., 2018). CD279 also named programmed cell death protein-1 (PD-1) or CD274 Kwon as the programmed death 1 receptor (PD-1) and its ligand (PD-L1) (Fabrizio et al., 2018) are successfully used in clinical immunotherapy experiments. Checkpoints between the respective pathways were also considered; ecto-5'-nucleotidase (CD73) was found to have a greater effect on escaping from the immune system's invasion than other previously studied substances (Meejeon et al., 2020) which implied a goal for the development of exquisite anticancer immunotherapy practices (Luca et al., 2016).

The expression of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in human gastric carcinoma were investigated by Lu et al., (2013) who discovered the clinical importance and credibility of their prognosis by applying immune-histochemistry in sequential sections of 68 specimens from gastric carcinoma patients' tissue. It was demonstrated that CD73 and HIF-1 $\alpha$  expressions were higher in gastric carcinoma than in gastric mucosal tissues. In gastric carcinoma, the expression of CD73 could be related to the expression of HIF-1 $\alpha$  (28). CD73 could be an independent diagnosis marker for gastric carcinoma. The findings of Lu et al., (2013) confirm the results of previous studies that indicate the key role of CD73 in cancer development (Xiao-Xia et al., 2013).

Gene-expression information from over 6,000 breast cancer patients have been gathered by Loi et al., (2013). It was reported that high CD73 expression could be associated with a little anticipation in triple-negative breast cancer (TNBC). Also, anthracycline-based chemotherapy

regimens were commenced treatment with applying mouse models of breast cancer. They illustrated that CD73 overexpression in tumor cells conferred chemo-resistance to doxorubicin, routine consumption of anthracycline. Suppression of compatible antitumor immune targeted blockade of CD73 and elevated doxorubicin-mediated antitumor immune responses and increased survival significantly in mice suffering from metastatic breast cancer. Overall, these data suggest that CD73 would be a therapeutic target in TNBC (Sherene et al., 2013; Monteiro et al., 2018).

### 3 CONCLUSIONS

Early-phase clinical trials showed promising and important results to decipher the distinct action mechanism of adenosine-targeting agents (Wang et al., 2017). Briefly, CD73 plays a key role in various studies in the field of cancer (Gao et al., 2017). The association between overexpression of CD73 and clinical approaches, as well as the identification of different subtypes of cancer, the patient's prognosis and response to medication, has shown that CD73 can be considered as a biologically detectable marker in the next generation of treatment in cancer studies (Harvey et al., 2020). In addition, the early effects of CD73 on tumor formation and metastasis have shown that CD73 could be a potential target for cancer treatment. These findings suggest that CD73 is a key factor in controlling tumor growth (Dachuan et al., 2010; Antonioli et al., 2016). Subsequently, increased CD73 during tumor development could be a physiological effort by tumor cells to cater more substrate to initiate the activity of the purine escape pathway, it reveals that CD73 would be a leading agent for controlling tumor proliferation (Dwivedi, et al., 2021). Recently, evidence in rat models suggests that targeted blockade of CD73 may be a viable treatment for cancer patients in the future (Zhao-Wei et al., 2014). Discoveries with tiny molecule suppressors or monoclonal antibodies that targeted CD73 in mice for the tumor model analysis proposes that CD73 targeted treatment are an important and realistic alternative method for affecting tumor growth control. These observations provide a useful opportunity to expand anti-CD73 therapy for patients with specified cancers (Antonioli et al., 2013). Although based on these findings, there is still a long path to meet this goal, but more studies are expected to translate anti-CD73 treatment into clinical approaches. In particular, due to the high performance of the CD73 range in vivo situation; there are no adverse events by anti-CD73 treatment in mice models yet. In this case, it is necessary to measure the potential for harmful risk before applying this treatment process to cancer patients, and a more detailed discussion of anti-CD73 therapy should be considered. (Antonioli et al., 2016). Nevertheless, the exact function of CD73 in cancer progression has not been still discovered completely, based on previous studies, CD73 contributes to cell-cell and cell-matrix interactions and is involved in drug resistance in tumor progression. In general agreement, genetic data offer that CD73 regulates in disparate human as well as in of ovary, lung, colon, carcinomas, pancreas, etc cancers. (Zhang et al., 2010). The body exploits the immune system to recognize and suppress malignant cells but as has been mentioned already, previous studies have shown that CD73 is an important molecule that regulates the proliferation of cancer cells, colonization and incursion in vitro as well as tumor and cancer angiogenesis, and immune evasion in vivo (Lu et al., 2013; Zhang et al., 2010). It is now acknowledged that extracellular adenosine is produced by tumor enzyme activity of CD39 and CD73, Consecutive performances of CD39 and CD73 are both represent a major pathway for the production of extracellular adenosine in the tumor microenvironment (Figure 1). It was suggested that this activity can down-regulate antitumor immunity by affecting extracellular adenosine

metabolism in tumor-induced and immune suppression (Antonioli et al., 2016; Bin et al., 2010). The action of CD39 and CD73 is caused by tumor hypoxia that results in degrading ATP and generation in the tumor microenvironment (Allard et al., 2017). It is most likely that the increase of the consonant expression and activity of CD39-CD73 caused a decrease of ecto-adenosine deaminase ADA in human cells that might be connected to CD26 in the cell surface and contribute to high levels of extracellular adenosine (Schneider et al., 2019). Adenosine acts as an anti-inflammatory mediator on the immune system and has been described in regulatory T cell (Treg)-mediated suppression. In the absence of adenosine deaminase (ADA), adenosine and other purine metabolites accumulate which leads to severe immunodeficiency with recurrent infections (ADA-SCID) during tumor progression (Wang et al., 2012; Sauer, et al., 2012). Precise effects of CD39-CD73 on the nonmalignant host cells (e.g.Treg) in the tumor microenvironment have not been specified yet (Zhang et al., 2010). The effects of high concentrations of adenosine suppressor on antitumor T-cell activation and survival and effectors function through A2AR engagement are being considered. As it was shown in figure 1 Adenosine can induce interaction with adenosine receptors (AR) on cancer cells. In order to expand the cell chemotaxis and tumor progression, adenosine may also adversely affect the differentiation and function of Dendritic cells (DC) and further inhibit Natural killer cell proliferation and cytolytic function (de Leve et al., 2019).

The first generation of immunotherapy against various types of tumors has been used with moderate success for decades. However, using of these treatments in many therapeutic and clinical cases lead to side effects (Antonioli et al., 2016). Over time, it is possible to better understand the complex interactions between the immune system and tumors by identifying key molecules, for instance, programmed death-ligand 1 (PD-L1). CTLA-4 also known as CD152 that governs such relationships. Further research to overcome the mechanisms used in tumors to prevent the destruction of immune mediators is needed (Seidel et al., 2018; Ramos et al., 2016).

#### ACKNOWLEDGEMENT

The appreciations go to Nina Gunde-Cimerman and Cene Gostinčar for their support, to Elham Sarhadi for preparing the Plagiarism Detection Tool and to Vesna Ješe Janežič and Sara Eshmoel for their help and support during the preparation of the paper.

#### 4 REFERENCES

- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev.* 2017 Mar;276(1):121-144. doi: 10.1111/imr.12528. PMID: 28258700; PMCID: PMC5338647.
- Allard D, Allard B, Stagg J. On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy. *J Immunother Cancer.* 2020 Feb;8(1):e000186. doi: 10.1136/jitc-2019-000186
- Allard, David, Pavel Chrobak, Bertrand Allard, Nouredin Messaoudi, and John Stagg. "Targeting the CD73-Adenosine Axis in Immuno-Oncology." *Immunology Letters* 205 (2019): 31–39.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013 Jun;19(6):355-67. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23601906; PMCID: PMC3674206.

- Antonoli Luca, Yegutkin Gennady, Pacher Pal, Blandizzi Corrado, Haskó György. (2016). Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities. *Trends in Cancer*. 2. 10.1016/j.trecan.2016.01.003.
- Beavis, Paul & Stagg, John & Darcy, Phillip & Smyth, Mark. (2012). CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology*. 33. 231-7. 10.1016/j.it.2012.02.009.
- Bellingan, Geoff, Mikael Maksimow, David C. Howell, Martin Stotz, Richard Beale, Monika Beatty, Timothy Walsh, Alexander Binning, Alan Davidson, and Martin Kuper. "The Effect of Intravenous Interferon- Beta-1a (FP-1201) on Lung CD73 Expression and on Acute Respiratory Distress Syndrome Mortality: An Open-Label Study." *The Lancet Respiratory Medicine* 2, no. 2 (2014): 98–107.
- Bin Zhang. 2010. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2010 Aug 15; 70(16): 6407–6411. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1544.
- Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*. 2013 Dec;9(4):491-540. doi: 10.1007/s11302-013-9372-5. PMID: 23797685; PMCID: PMC3889385.
- Cao, Y. Tumorigenesis as a process of gradual loss of original cell identity and gain of properties of neural precursor/progenitor cells. *Cell Biosci* 7, 61 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0188-9>.
- Dachuan Jin, Jie Fan, Long Wang, Linda F. Thompson, Aijie Liu, Benjamin J. Daniel, Tahiro Shin, Tyler. Curiel, and Bin Zhang. 2010. "CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression," *Cancer Research*, vol. 70, no. 6, pp. 2245–2255, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-310.
- de Leve S, Wirsdörfer F, Jendrossek V. The CD73/Ado System-A New Player in RT Induced Adverse Late Effects. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 16;11(10):1578. doi: 10.3390/cancers11101578. PMID: 31623231; PMCID: PMC6827091.
- Di Virgilio, F., Sarti, A.C., Falzoni, S. et al., Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 18, 601–618 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>.
- Dwivedi S, Rendón-Huerta EP, Ortiz-Navarrete V, Montañó LF. CD38 and Regulation of the Immune Response Cells in Cancer. *J Oncol*. 2021 Feb 27;2021:6630295. doi: 10.1155/2021/6630295. PMID: 33727923; PMCID: PMC7936891.
- Fabrizio FP, Trombetta D, Rossi A, Sparaneo A, Castellana S, Muscarella LA. Gene code CD274/PD-L1: from molecular basis toward cancer immunotherapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2018 Dec 17;10:1758835918815598. doi: 10.1177/1758835918815598. PMID: 30574211; PMCID: PMC6299305.
- G Riethmüller, E Holz, G Schlimok, W Schmiegell, R Raab, K Höffken, R Gruber, I Funke, H Pichlmaier, H Hirche, P Buggisch, J Witte, R Pichlmayr. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *Journal of clinical oncology*. 1998 May; 16(5):1788-94. doi.org/10.1200/JCO.1998.16.5.1788
- Gabriel A. Rabinovich, Dmitry Gabrilovich, and Eduardo M. Sotomayor. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609
- Galluzzi, L., Yamazaki, T. & Kroemer, G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 731–745 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0>
- Gao ZW, Wang HP, Lin F, Wang X, Long M, Zhang HZ, Dong K. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer*. 2017 Feb 15;17(1):135. doi: 10.1186/s12885-017-3128-5. PMID: 28202050; PMCID: PMC5311855.
- Gardani, C. F. F., Cappellari, A. R., de Souza, J. B., da Silva, B. T., Engroff, P., Moritz, C. E. J., Morrone, F. B. (2019). Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signalling*, 15(1), 95–105. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9642-3>.

- Ghalamfarsa G, Kazemi MH, Raofi Mohseni S, Masjedi A, Hojjat-Farsangi M, Azizi G, Yousefi M, Jadidi-Niaragh F. 2019. CD73 as a potential opportunity for cancer immunotherapy .2019 Feb; 23(2):127-142. doi: 10.1080/14728222.2019.1559829.
- Ghiringhelli, F, Bruchard, M, Chalmin, Fanny RébéC. (2012). Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunescape. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012. 473712. 10.1155/2012/473712. <https://doi.org/10.1155/2012/473712>.
- Grozio, Alessia, Giovanna Sociali, Laura Sturla, Irene Caffa, Debora Soncini, Annalisa Salis, Nadia Raffaelli, Antonio De Flora, Alessio Nencioni, and Santina Bruzzone. "CD73 Protein as a Source of Extracellular Precursors for Sustained NAD<sup>+</sup> Biosynthesis in FK866-Treated Tumor Cells." *Journal of Biological Chemistry* 288, no. 36 (2013): 25938–25949.
- Hariri Akbari, F., An overview of Stress in cellular and molecular levels and the importance of studying responses to stresses in biology. *Res. J. Biotech*. Vol. 16 (4) April (2021) 258-282.
- Harvey JB, Phan LH, Villarreal OE, Bowser JL. CD73's Potential as an Immunotherapy Target in Gastrointestinal Cancers. *Front Immunol*. 2020 Apr 15;11:508. doi: 10.3389/fimmu.2020.00508. PMID: 32351498; PMCID: PMC7174602.
- Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*. 2003 Nov 1;63(21):7436-42. PMID: 14612543.
- Holger K. Eltzschig, Michail V. Sitkovsky, and Simon C. Robson. 2013. Purinergic Signaling during Inflammation. *Purinergic Signaling during Inflammation*. *N Engl J Med*. 2012 Dec 13; 367(24): 2322–2333.doi: 10.1056/NEJMra1205750.
- Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, Serra S, Malavasi F. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology*. 2013 Sep 1;2(9):e26246. doi: 10.4161/onci.26246. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24319640; PMCID: PMC3850273.
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, Shin T, Curriel TJ, Zhang B. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res*. 2010 Mar 15;70(6):2245-55. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3109. Epub 2010 Feb 23. PMID: 20179192; PMCID: PMC2883609.
- Juliana H, Nils L, Elizandra B and Theresa L. W. 2019. Inhibition of the Adenosinergic Pathway in Cancer Rejuvenates Innate and Adaptive Immunity. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov; 20(22): 5698.Published online 2019 Nov 14. doi: 10.3390/ijms20225698.
- Kukulski, F., Lévesque, S.A., Lavoie, É.G. et al., Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling* 1, 193 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6217-x>.
- Liu Y, Zheng P. How Does an Anti-CTLA-4 Antibody Promote Cancer Immunity? *Trends Immunol*. 2018 Dec;39(12):953-956. doi: 10.1016/j.it.2018.10.009. PMID: 30497614; PMCID: PMC6589807.
- Lu, Xiao-Xia, Yi-Tian Chen, Bing Feng, Xiao-Bei Mao, Bo Yu, and Xiao-Yuan Chu. "Expression and Clinical Significance of CD73 and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Gastric Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 19, no. 12 (2013): 1912.
- Luca Antonioli, Gennady G. Yegutkin, Pál Pacher, Corrado Blandizzi, and György Haskó. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer*. 2016 Feb 1; 2(2): 95–109.doi: 10.1016/j.trecan.2016.01.003.
- Marian S. Wettstein, Lorenz Buser, Thomas Hermanns, 1 Filip Roudnický, 3 Daniel Eberli, 1 Philipp Baumeister, 1 TullioSulser, 1 Peter Wild, and CédricPoyet. 2015 .CD73 Predicts Favorable Prognosis in Patients with Nonmuscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer. *Dis Markers*. 2015; 2015: 785461. Published online 2015 Oct 12. doi: 10.1155/2015/785461. PMCID: PMC4620269. PMID: 26543299.



- Meejeon Roh, Derek A Wainwright, Jennifer D Wu, Yong Wan, Bin Zhang, Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy, *Current Opinion in Pharmacology*, Volume 53, 2020, Pages 66-76, ISSN 1471-4892, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.07.001>.
- Monteiro I, Vigano S, Faouzi M, Treilleux I, Michielin O, Ménétrier-Caux C, Caux C, Romero P, de Leval L. CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. *Oncotarget*. 2018 Jun 1;9(42):26659-26669. doi: 10.18632/oncotarget.25426. PMID: 29928476; PMCID: PMC6003551.
- Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res*. 2016;2016:4273943. doi: 10.1155/2016/4273943. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28116316; PMCID: PMC5220497.
- Piro G, Carbone C, Carbognin L, Pilotto S, Ciccarese C, Iacovelli R, Milella M, Bria E, Tortora G. Revising PTEN in the Era of Immunotherapy: New Perspectives for an Old Story. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 10;11(10):1525. doi: 10.3390/cancers11101525. PMID: 31658667; PMCID: PMC6826982.
- Quezada C, Garrido W, Oyarzún C, Fernández K, Segura R, Melo R, Casanello P, Sobrevia L, San Martín R. 2013. 5'-Ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *J Cell Physiol*. 2013 Mar; 228(3):602-8. doi: 10.1002/jcp.24168.
- Ramos, Teresa L., Luis Ignacio Sánchez-Abarca, Sandra Muntión, Silvia Preciado, Noemí Puig, Guillermo López-Ruano, Ángel Hernández-Hernández, Alba Redondo, Rebeca Ortega, and Concepción Rodríguez. "MSC Surface Markers (CD44, CD73, and CD90) Can Identify Human MSC-Derived Extracellular Vesicles by Conventional Flow Cytometry." *Cell Communication and Signaling* 14, no. 1 (2016): 2.
- Ren ZH, Lin CZ, Cao W, Yang R, Lu W, Liu ZQ, Chen YM, Yang X, Tian Z, Wang LZ, Li J, Wang X, Chen WT, Ji T, Zhang CP. CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61690-61702. doi: 10.18632/oncotarget.11435. PMID: 27557512; PMCID: PMC5308683.
- Sadej R, Spychala J, Skladanowski AC. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res*. 2006 Jun;16(3):213-22. doi: 10.1097/01.cmr.0000215030.69823.11. PMID: 16718268.
- Sadej RI, Skladanowski AC. 2012. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol*. 2012; 59(4):647-52. Epub 2012 Nov 16.
- Sauer AV, Brigida I, Carriglio N, Hernandez RJ, Scaramuzza S, Clavenna D, Sanvito F, Poliani PL, Gagliani N, Carlucci F, Tabucchi A, Roncarolo MG, Traggiai E, Villa A, Aiuti A. Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1428-39. doi: 10.1182/blood-2011-07-366781. Epub 2011 Dec 19. PMID: 22184407; PMCID: PMC3426348.
- Schneider E, Rissiek A, Winzer R, Puig B, Rissiek B, Haag F, Mittrücker H-W, Magnus T and Tolosa E (2019) Generation and Function of Non-cell-bound CD73 in Inflammation. *Front. Immunol*. 10:1729. doi: 10.3389/fimmu.2019.01729.
- Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol*. 2005;1:607-28. doi: 10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141. PMID: 17716101; PMCID: PMC2568977.
- Sean P. Colgan, Holger K. Eltzhig, Tobias Eckle and Linda F. Thompson. 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). Published online 2006 Jun 1. doi: 10.1007/s11302-005-5302-5. PMCID: PMC2254482. PMID: 18404475.
- Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*. 2018 Mar 28;8:86. doi: 10.3389/fonc.2018.00086. PMID: 29644214; PMCID: PMC5883082.

- Selena Vigano, Dimitrios Alatzoglou, Melita Irving, Christine Ménétrier-Caux, Christophe Caux, Pedro Romero and George Coukos. 2019. Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function. *Front. Immunol.*, 06 June 2019 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00925>.
- Serra, S., Horenstein, A. L., Vaisitti, T., Brusa, D., Rossi, D., Laurenti, L., Deaglio, S. (2011). CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*, 118(23), 6141–6152. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374728>.
- Sherene Loi, Sandra Pommey, Benjamin Haibe-Kains, Paul A. Beavis, Phillip K. Darcy, Mark J. Smyth, and John Stagg. 2013. “CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer, PNAS July 2, 2013 110 (27) 11091-11096; <https://doi.org/10.1073/pnas.1222251110>.
- Sociali G, Raffaghello L, Magnone M, Zamporlini F, Emionite L, Sturla L, Bianchi G, Vigliarolo T, Nahimana A, Nencioni A, Raffaelli N, Bruzzone S. Antitumor effect of combined NAMPT and CD73 inhibition in an ovarian cancer model. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2968-84. doi: 10.18632/oncotarget.6502. PMID: 26658104; PMCID: PMC4823084.
- Stagg, J., Smyth, M. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29, 5346–5358 (2010). <https://doi.org/10.1038/onc.2010.292>
- Syn NL, Teng MW, Mok TS, Soo RA (December 2017). "De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting". *The Lancet. Oncology*. 18 (12): e731–e741. doi:10.1016/s1470-2045(17)30607-1. PMID 29208439.
- Synnestvedt, Kristin, Glenn T. Furuta, Katrina M. Comerford, Nancy Louis, Jorn Karhausen, Holger K. Eltzschig, Karl R. Hansen, Linda F. Thompson, and Sean P. Colgan. “Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulation by Hypoxia-Inducible Factor-1 Mediates Permeability Changes in Intestinal Epithelia.” *The Journal of Clinical Investigation* 110, no. 7 (2002): 993–1002.
- Vaisitti T, Arruga F, Deaglio S. Targeting the Adenosinergic Axis in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Way to Disrupt the Tumor Niche? *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 12;19(4):1167. doi: 10.3390/ijms19041167. PMID: 29649100; PMCID: PMC5979564.
- Wang H, S Lee, C Lo Nigro, L Lattanzio, M Merlano, M Monteverde, R Matin, K Purdie, N Mladkova, D Bergamaschi, C Harwood, N Syed, P Szlosarek, E Briasoulis, A McHugh, A Thompson, A Evans, I Leigh, C Fleming, GJ Inman, E Hatzimichael, C Proby and T Crook. 2012. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br J Cancer* 106:1446–1452. Published online 2012 Mar 27. doi: 10.1038/bjc.2012.95.
- Wang, Rong, Yingying Zhang, Xia Lin, Yalin Gao, and Ying Zhu. “Prognostic Value of CD73-Adenosinergic Pathway in Solid Tumor: A Meta-Analysis and Systematic Review.” *Oncotarget* 8, no. 34 (2017): 57327.
- Xiao-Xia Lu, Yi-Tian Chen, Bing Feng, Xiao-Bei Mao, Bo Yu, Xiao-Yuan Chu. 2013. “Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 12, pp. 1912–1918, 2013. doi:10.3748/wjg.v19.i12.1912.
- Zhang Bin, CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. 2010. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. American Association for Cancer Research. 2010 Aug 15;70(16):6407-11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1544. Epub 2010 Aug 3.
- Zhao-Wei Gao, Hui-ping Wang, Fang Lin, Xi Wang, Min Long, Hui-zhong Zhang, and Ke Dong. (2017). *BMC Cancer*. 2017; 17: 135. Published online 2017 Feb 15. doi: 10.1186/s12885-017-3128-5. PMCID: PMC5311855. PMID: 28202050.
- Zhao-Wei Gao, Ke Dong, and Hui-zhong Zhang. 2014. The Roles of CD73 in Cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 460654. Published online 2014 Jul 14. doi: 10.1155/2014/460654. PMCID: PMC4121992.

## Regulatorna vloga TLR10 v vnetnem odzivu celic pljučnega epitelijskega ob imunostimulaciji z dvoverižno RNA

Špela KNEZ<sup>1</sup>, Mojca NARAT<sup>1</sup>, Jernej OGOREVC<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Domžale, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [jernej.ogorevc@bf.uni-lj.si](mailto:jernej.ogorevc@bf.uni-lj.si)

### Regulatorna vloga TLR10 v vnetnem odzivu celic pljučnega epitelijskega z dvoverižno RNA

**Izveček:** Pljuča so notranji organ, ki je najbolj izpostavljen tujkom iz okolja. Na zunanje dražljaje se pljuča odzovejo s prirojenim imunskim odzivom, med katere spadajo tudi Toll-u podobni receptorji (TLR). TLR10 je edini član družine TLR, čigar funkcija še ni dobro raziskana, povezujejo pa ga tako s pro- kot proti-vnetnimi procesi. Z raziskavo želimo osvetliti vlogo TLR10 v celicah pljučnega epitelijskega ob okužbi z virusi. V ta namen smo z vnosom eksogenega *TLR10* pripravili celično linijo A549 s prekomerno izraženim *TLR10*. Po imunostimulaciji celic z dsRNA smo preučevali izražanje genov, udeleženih v vnetnem odzivu. Preliminarni rezultati nakazujejo na dvojno vlogo TLR10: povečano izražanje *TLR10* je povzročilo tudi povečano izražanje nekaterih citokinskih genov (npr. *IFNB1*, *TNF*, *IL6*, *CXCL10* in *IL1A*) medtem ko se je izražanje nekaterih zmanjšalo (npr. *IL1B*, *IL8*). Povečano izražanje *TLR10* je vplivalo tudi na izražanje drugih TLR (*TLR2*, *TLR3*, *TLR4*). Glede na pridobljene preliminarne rezultate, se zdi, da bi bil TLR10 lahko potencialni imunomodulator prirojenega vnetnega odziva, vendar pa je potrebno natančneje opredeliti njegove ligande, lokalizacijo v celici in možne mehanizme delovanja.

**Ključne besede:** TLR10; pljuča; celični model; imunski odziv; COVID-19; imunomodulacija

### Regulatory role of TLR10 in inflammatory response of lung epithelial cells challenged with double-stranded RNA

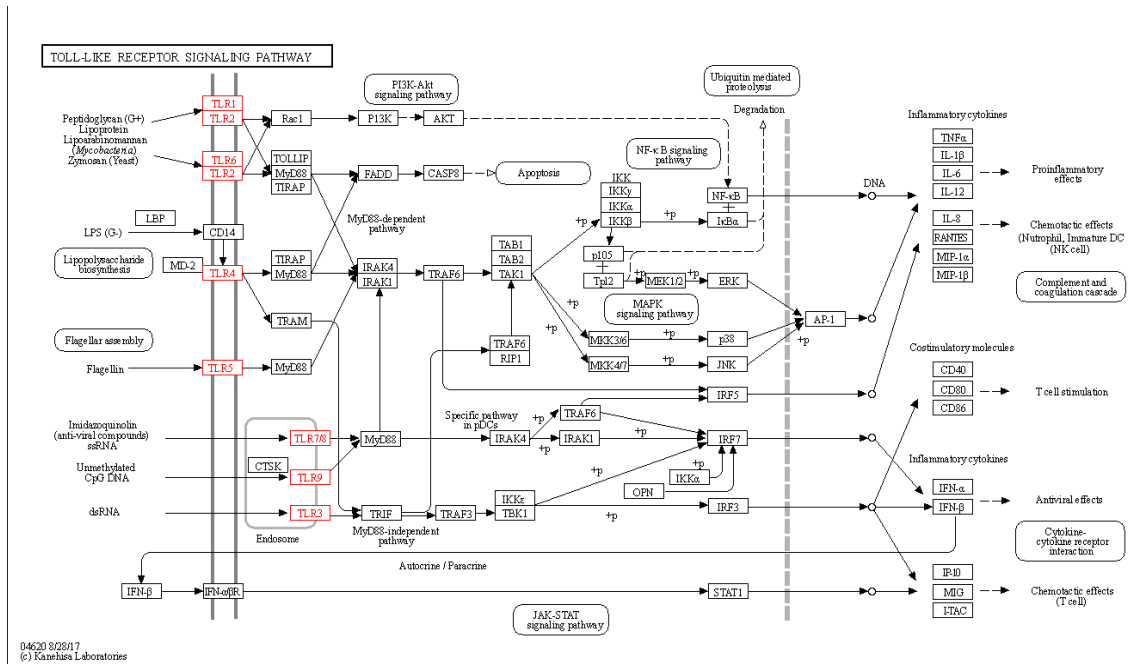
**Abstract:** The lungs are the internal organ that is most exposed to foreign substances from the environment. The lungs respond to external stimuli with an innate immune response, which includes Toll-like receptors (TLRs). TLR10 is the only member of the TLR family with unclear function and has been associated with both pro- and anti-inflammatory processes. The aim of this study was to highlight the role of TLR10 in viral infections, which has not yet been studied in lung epithelial cells. For this purpose we introduced exogenous *TLR10* into A549 cell line to study the potential effect of TLR10 overexpression on genes involved in the inflammatory response upon dsRNA immunostimulation. Preliminary results suggest a dual role for TLR10: increased expression of *TLR10* also resulted in increased expression of some cytokine genes (e.g., *IFNB1*, *TNF*, *IL6*, *CXCL10*, and *IL1A*) while expression of some decreased (e.g., *IL1B*, *IL8*). Increased expression of *TLR10* also correlated with expression levels of other TLRs (*TLR2*, *TLR3*, *TLR4*). Therefore it appears that TLR10 could be a potential immunomodulator of the innate inflammatory response, however its ligands, localization in the cell, and possible mechanisms of action have to be precisely defined.

**Key words:** TLR10; lungs; cell model; immune response; COVID-19; immunomodulation

1 UVOD

Pljuča so notranji organ, ki je najbolj izpostavljen okužbam in poškodbam iz zunanjega okolja zaradi stalne izpostavljenosti prašnim delcem, cvetnemu prahu, kemikalijam in mikroorganizmom. Pljuča so imunokompetentna, saj se na okoliške dražljaje odzivajo s pomočjo različnih komponent prirojenega imunskega sistema (Martin in Frevert, 2005). Prirojen imunski sistem pljuč sestavljajo epitelne celice, ki tvorijo površino alveol in dihalnih poti, alveolni makrofagi (Tokairin in sod., 2008) ter topne beljakovine, ki vežejo mikrobo (Arora in sod., 2019).

Pomemben del prirojenega imunskega sistema so Toll-u podobni receptorji (TLR), ki sodelujejo pri prepoznavi patogenov in regulaciji imunskega odziva. Pljučne epitelne celice in imunske celice, izražajo različne TLR proteine, ki zaznavajo molekularne vzorce, povezane s patogeni (PAMPs) in sprožijo imunski odziv. Pri ljudeh poznamo deset TLR, pri čemer se TLR1, 2, 4, 6, 10 nahajajo na celični membrani in prepoznavajo bakterijske, glivne in virusne molekularne vzorce, vključno s strukturnimi molekulami mikrobojne celične stene, kot so lipopolisaharidi (LPS), lipoteihoična kislina (LTA) ter lipoproteini (Slika 1). TLR3, 5, 7, 8, 9 se nahajajo v citosolu, kjer prepoznavajo nemetilirano bakterijsko DNA in enoverižno (ssRNA) in dvoverižno virusno RNA (dsRNA) (Vidya in sod., 2018).



Slika 11: TLR signalne poti, podatkovna zbirka KEGG.

TLR10 je edini član družine TLR, ki še nima jasno opisane funkcije in liganda, podatki iz literature, ki opisujejo njegovo potencialno funkcijo pa so si nasprotujoči (Fore in sod., 2020). Študije so ga najprej povezovale z indukcijo vnetja (Regan in sod., 2013), kasneje pa so pokazale, da lahko TLR10 tudi zavira vnetne procese (Oosting in sod., 2014). TLR10 bi bil zato lahko eden izmed regulatorjev prirojene imunosti. Pri nekaterih boleznih, kjer je regulacija imunskega odziva ključnega pomena, bi lahko z modulacijo izražanja TLR10 vplivali na potek bolezni in zmanjšali poškodbe tkiv. Za prenos signala mora TLR10 tvoriti homodimere ali heterodimere s TLR1 ali TLR2 (Govindaraj in sod., 2010). Predvideva se, da lahko TLR10 ob stimulaciji celic z bakterijami in virusi (Nagashima in sod., 2015) inducira izražanje pro-vnetnih dejavnikov (Regan in sod., 2013), v primerih, ko se izražanje TLR10 poveča pa lahko deluje tudi protivnetno, in sicer s tvorbo heterodimer s TLR2 (Guan in sod., 2010) ali s produkcijo

IL1RA2 (Oosting in sod., 2014). Natančen mehanizem funkcij homodimer in heterodimer še ni poznan, v literaturi pa so si rezultati nasprotujoči.

Prav tako še ni jasno opisan ligand za TLR10. Imunska signalizacija preko TLR10 je bila sicer zaznana ob uporabi bakterijskih ligandov Pam3Cys (Oosting in sod., 2014), FSL-1 (Van Le in Kim 2016), ter LPS (Nagashima in sod., 2015). Poleg bakterijskih ligandov lahko TLR10 zaznava viruse, na primer virusa gripe H1N1 in H5N1 (Lee in sod., 2014) preko virusnih RNA-beljakovinskih kompleksov ter virus HIV-1 preko gp41 (Henrick in sod., 2019). TLR10 se nahaja na površini celic ter v citoplazmi kot endosomalni receptor, kjer veže dvoverižno DNA (dsRNA) (Lee in sod., 2018). Predpostavlja se, da TLR10 s TLR3 tekmuje za vezavo dsRNA, s čimer uravnava interferonsko signalizacijo (IFN) ali aktivira MyD88-odvisno signalno pot in zavira TLR7-IRF7 signalizacijo (Lee in sod., 2018).

Študije na celičnih kulturah kažejo, da povečano izražanje TLR10 v celicah HEK293 zavira produkcijo IFN tipa 1 (Jiang in sod., 2016), medtem ko njegovo izbitje v celicah HT-29 ohromi vnetni odziv na *L. monocytogenes* (Regan in sod., 2013). Izbitje gena TLR10 v celicah THP-1 zmanjša izražanje provnetnih citokinov (Van Le in Kim 2016) in inhibira celični imunski odziv na H1N1 in H5N1 (Lee in sod., 2014).

Ker rezultati študij kažejo nasprotujoče si rezultate o funkciji TLR10, želimo preučiti vpliv povečanega izražanja TLR10 ob imunostimulaciji celic pljučnega epitelija A549 z dvoverižno RNA (dsRNA). Identifikacija nabora ligandov, ki vplivajo na izražanje TLR10 in funkcionalna anotacija DNA variabilnosti v TLR10 bo omogočila razjasnitev njegove funkcije in potencialne imunomodulatorne vloge.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Celična linija

V poskusu smo uporabili trajno celično linijo humanega pljučnega epitelija A549, ki smo jo gojili v osnovnem gojišču DMEM, z dodatkom 10% FBS (ThermoFischer) 1% L-glutamina (ThermoFischer), 0,01% Penicilin-Streptomicina (ThermoFischer) in 0,01% Gentamicina (ThermoFischer). Celice smo namnožili v ploščah s 6-luknjicami do 70-90 % konfluentnosti.

### 2.2 Stimulacija celic z virulenčnimi dejavniki

V celicah A549 s predhodno povišano izraženim TLR10 smo spremljali izražanje genov po imunostimulaciji z virusno dvoverižno RNA (dsRNA). Povečano izražanje TLR10 v celicah smo dosegli s transfekcijo plazmida 2,5 ug pUNO-hTLR10 (InvivoGen), ki nosi celoten zapis za funkcionalen TLR10. Plazmid smo transficirali z uporabo transfekcijskega reagenta Lipofectamine 3000 (ThermoFischer). Štiriindvajset ur po transfekciji plazmida smo celice stimulirali tako, da smo jih transficirali z dsRNA (10 ug/ml) z uporabo Lipofectamine 3000 (ThermoFischer).

### 2.3 Izolacija RNA in reverzna transkripcija

Po 6h inkubacije z dsRNA smo iz celic izolirali celokupno RNA. Koncentracijo in kvaliteto izolirane RNA smo izmerili s spektrofotometrom (NanoVue plus, GE). RNA (0,5 µg) smo pretvorili v cDNA z uporabo kompleta reagentov za sintezo cDNA (Thermo Fisher Scientific).

## 2.4 Relativna kvantifikacija izražanja genov, povezanih s TLR signalizacijo

Imunski odziv celične linije A549 smo analizirali z uporabo predpripravljenih qPCR mrež za profiliranje (Reagent RT2 Profiler PCR array, Qiagen), ki vključujejo nabor 80 optimiziranih začetnih oligonukleotidov za PCR v realnem času za gene, povezane s signalizacijo TLR. Izražanje genov po imunostimulaciji z dsRNA smo določili v celicah s povečanim izražanjem TLR10 in kontrolah. Relativno kvantifikacijo smo izvedli na sistemu ViiA 7 (Thermo Fischer Scientific) po navodilih proizvajalca.

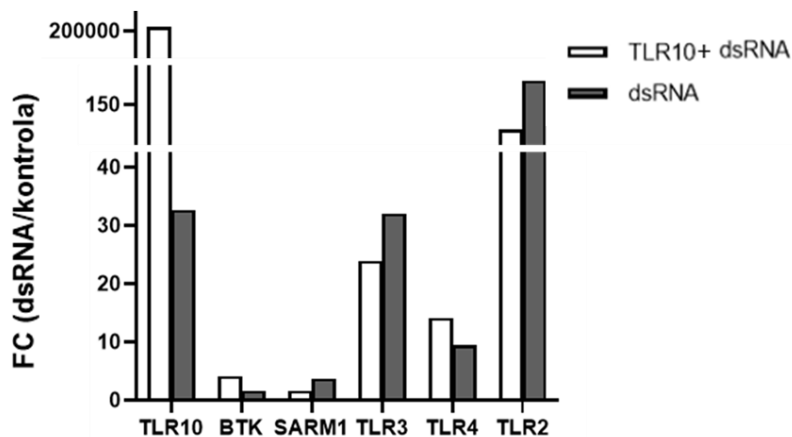
## 2.5 Statistična analiza

Relativno izražanje genov smo analizirali po metodi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak in Schmittgen 2001). Statistične analize in grafi so bili narejeni s pomočjo programske opreme GraphPad Prism 8.4.3.

# 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

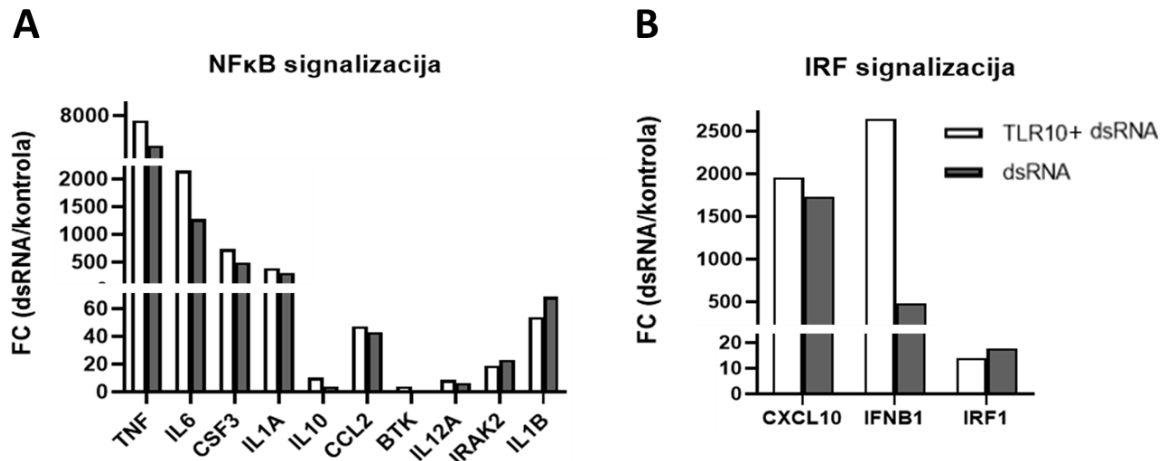
## 3.1 Učinek imunostimulacije v celicah A549

Za preučevanje vpliva imunostimulacije na signalizacijo TLR smo z uporabo qPCR določili izražanje 80 genov, vključenih v regulacijo TLR. Primerjalna analiza rezultatov je pokazala diferencialno izražanje 25 genov v imunostimuliranih vzorcih s predhodno induciranim izražanjem TLR10. V teh vzorcih smo zaznali višje ravni mRNA prepisov nekaterih genov kot so *IFNB1*, *TNF*, *CSF2*, *IL6*, *CSF3*, *CXCL10* in *IL1A*, hkrati pa nižje ravni izražanja genov, kot so *TLR2*, *CLE4E*, *IL8*, *IL1B*.



**Slika 2:** Spremembe v izražanju genov, povezanih s TLR signalizacijo. Oznaka TLR10+ dsRNA predstavlja vzorec s predhodno povečanim izražanjem TLR10 in stimulacijo z dsRNA, oznaka dsRNA predstavlja vzorec s nativnim izražanjem TLR10, stimuliran z dsRNA.

Pri imunostimuliranih celicah z induciranim izražanjem TLR10, se je povečalo izražanje *TLR4*, kar lahko nakazuje na tvorjenje dimer med TLR10 in TLR4 (Sliki 2). Povečalo se je izražanje *BTK*, ki sodeluje v kaskadni poti NF $\kappa$ B. Nasprotno pa se je zmanjšalo izražanje *TLR2* in *TLR3*, kar nakazuje, da TLR10 morda s TLR3 tekmuje za vezavo liganda (dsRNA), ter da za tvorbo dimer ne potrebuje TLR2. Hkrati se je zmanjšalo tudi izražanje *SARM1*, ki lahko zavira TLR signalno pot.



**Slika 3:** Diferenčno izražanje genov, povezanih z NFκB in IRF signalizacijo. Oznaka TLR10+ dsRNA predstavlja vzorec s predhodno povečanim izražanjem TLR10, imunostimuliran z dsRNA, oznaka dsRNA predstavlja vzorec z nativnim izražanjem TLR10, imunostimuliran z dsRNA.

TLR signalizacija lahko deluje preko aktivacije NFκB in/ali IRF signalne poti, zato smo preverili izražanje značilnih genov, vpletenih v omenjeni kaskadni poti aktivacije prirojene imunosti. Razlike v diferencialnem izražanju genov, povezanih z NFκB (A) ali IRF (B) signalno potjo so prikazane na Sliki 3. V celicah z induciranim izražanjem *TLR10* smo, v primerjavi s celicami z nativnim izražanjem, ob imunostimulaciji z dsRNA zaznali povečano izražanje *TNF*, *IL6*, *CSF3* in *IL1A*, medtem ko se je izražanje *IRAK2* ter *IL1B* zmanjšalo. Inducirano izražanje *TLR10* je v imunostimuliranih celicah povzročilo močnejšo aktivacijo IRF poti, v primerjavi s kontrolo.

### 3.2 Diskusija

Epitelne celice dihalnih poti predstavljajo prvo oviro za vstop respiratornih virusov v organizem in so glavna tarča virusov za razmnoževanje. Celice celične linije A549 izražajo vseh 10 humanih TLR (TLR1-TLR10) (Cherfils-Vicini in sod., 2010), zato predstavljajo idealen model za preučevanje signalnih poti TLR. Dosedanje študije delovanja TLR10 so bile večinoma opravljene na imunskih celicah (THP-1, JurkaT in celice B), zato smo želeli podrobneje preučiti mehanizem delovanja in potencialno imunomodulatorno vlogo TLR10 v celicah pljučnega epitelijskega tkiva, ki se zdi ob izbruhu pandemije SARS-CoV-2 še posebej aktualna.

TLR-ji ob prisotnosti virusa aktivirajo prirojeni imunski sistem, kar prispeva k eliminaciji virusa, povečano vnetje pa lahko poškoduje tkivo, zato je regulacija izražanja pro-vnetnih faktorjev pomembna. Na mestu okužbe se sproščajo vnetni citokini, kot so IL-1, IL-6, TNF in IL-8, ki so pomembni posredniki pri lokalnem in sistemskem vnetju (vročina, fibroza) (Mojtabavi in sod., 2020). Drug tip citokinov, ki se sprostito ob okužbah z virusi, so kemokini-CXC, ki delujejo kot kemoatraktanti za nevtrofilce. IL8 je v pljučih primarni kemoatraktant za bazofilce, eozinofilce in celice T (Warringa in sod., 1991). Ključnega pomena za učinkovit in reguliran odziv na virusne okužbe pa je izražanje IFN tipa I (Chen in sod., 2017), katerega glavna vloga je omejiti replikacijo in širjenje virusa (Schneider in sod., 2014).

Kot zanimiv primer deregulacije imunskega sistema lahko navedemo primer okužb s SARS-CoV-2, ki vodi do koronavirusne bolezni (COVID-19). SARS-CoV-2 je razvil imunoregulacijsko strategijo, ki mu omogoča uspešno okužbo in razmnoževanje v gostiteljskih celicah z zaviranjem izražanja IFN genov (Chen in sod., 2017). To vodi do povečanega izražanja pro-vnetnih citokinov, kar lahko privede do citokinske nevihte in poškodb organov

(Hadjadj in sod., 2020). Natančen vpliv regulacije mehanizmov prirojene in pridobljene imunosti na potek bolezni še ni znan, ključna pa bi bila lahko regulacija s TLR, saj več študij nakazuje, da imajo pomembno vlogo v patogenezi SARS-CoV-2 (Khanmohammadi in Rezaei, 2021).

V naši raziskavi smo celice pljučnega epitelija stimulirali z virusnim ligandom, natančneje z dsRNA, ter preverjali vpliv predhodno povečano izraženega TLR10 na regulacijo TLR signalnih poti med imunostimulacijo. Pridobljeni preliminarni rezultati kažejo, da lahko TLR10 v pljučnem epiteliju deluje tako provnetno kot protivnetno. Izražanje petih citokinskih genov (*IFNB1*, *TNF*, *IL6*, *CXCL10* in *IL1A*) se je namreč v vzorcih z induciranim izražanjem *TLR10* znatno povečalo, medtem ko se je izražanje dveh citokinskih genov (*IL1B*, *IL8*) zmanjšalo. Regulacija izražanja *TLR10* bi bila lahko zanimiva za razvoj novih metod zdravljenja pacientov s COVID-19, saj bi lahko preko imunomodulatornega delovanja (npr. vpliva na izražanje citokinov, kot so *IFNB1*, *CXCL10*, *IL1B* in *IL8*) nadzorovali vnetni odziv in preprečili pojav t.i. citokinske nevihte. Namreč, nedavne študije so pokazale, da so pacienti, ki so inhalirali pripravek z  $IFN\beta$ , imeli 79% manjšo možnost za razvoj težje oblike bolezni v primerjavi s placebo skupino (Monk in sod., 2021). Med drugim je *CXCL10* povezan z migracijo celic T in hkrati zavira pretiran vnetni odziv, povezan s COVID-19 (Zhang in sod., 2020). Medtem ko ima zaviranje vnetnih citokinov družine IL1 terapevtski učinek pri številnih vnetnih boleznih (Florindo in sod., 2020), pa zmanjšanje izražanja *IL8* nakazuje na manjšo migracijo nevtrofilcev na mesto vnetja in posledično manjšo možnost za citokinsko nevihto (Maxwell in sod., 2020). Po drugi strani pa lahko TLR10 deluje tudi pro-vnetno, saj poveča izražanje *TNF*, *IL6* in *IL1A*, kar lahko vodi do zagona vnetnega sindroma (Angelopoulou in sod., 2020).

Raziskave kažejo, da je povečanje izražanja *TLR10* v celični liniji THP-1 (Lee in sod., 2018) in HEK-293 (Jiang in sod., 2016) inhibiralo produkcijo  $IFN\beta$ , kar je v nasprotju z rezultati, ki smo jih pridobili na celični liniji A549. Prekomerno izražanje *TLR10* je namreč povečalo izražanje *SARM1* in zmanjšalo izražanje *TLR3*, kar je skladno z rezultati na celični liniji THP-1. Domneva se, da TLR10 tekmuje s TLR3 za vezavo ligandov v endosomu, kar naj bi vodilo do indukcije interferonov (Lee in sod., 2018). Podobna sinergija med TLR3 in TLR10 je bila predlagana v primeru okužb z virusom gripe (Lee in sod., 2014).

Nasprotujoči si rezultati so lahko posledica uporabe različnih celičnih tipov. Poleg tega bi bile lahko različne vloge TLR10 posledica mehanizma navzkrižnega sodelovanja med TLR10 in TLR3 (Lee in sod., 2018) ali interakcij TLR10 s TLR2, TLR1 in TLR6 (Guan in sod., 2010). Na povezavo med delovanjem TLR2 in TLR10 bi lahko nakazovali tudi naši rezultati, saj se je izražanje *TLR2* ob povečanem izražanju *TLR10*, zmanjšalo, kar morda nakazuje, da TLR10 za prepoznavo dsRNA tvori homodimere ali heterodimere z drugimi TLR. Zanimivo je tudi povečanje izražanja TLR4, za katerega ni znano, da bi vezal dsRNA ali tvoril dimere s TLR10.

#### 4 SKLEPI

Z raziskavo želimo osvetliti vlogo TLR10 ob virusnih okužbah, ki na celicah pljučnega epitelija še ni bila opisana. V ta namen smo z vnosom eksogenega TLR10 pripravili celično linijo s prekomerno izraženim *TLR10* in preučevali potencialni vpliv na gene udeležene v vnetnem odzivu. Preliminarni rezultati podajajo vpogled v signalizacijsko pot TLR10, hkrati pa odpirajo številna vprašanja. Za modulacijo TLR signalizacije v terapevtske namene, bi bilo potrebno natančno opredeliti vlogo genov, vpletenih v imunsko signalizacijo ob okužbah. Zato je nujna široka analiza TLR-posredovanega signaliziranja, določitev natančnega nabora regulatorjev TLR signalnih poti, kot tudi genov in molekul, ki so aktivirani kot posledica aktivacije TLR poti ter njihovih efektorskih funkcij. Glede na pridobljene preliminarne rezultate, se zdi, da bi



bil TLR10 lahko eden od pomembnih imunomodulatorjev prirojenega vnetnega odziva, vendar pa je potrebno natančneje opredeliti njegove ligande, lokalizacijo v celici in možne mehanizme delovanja.

## 5 VIRI

- Angelopoulou, A., Alexandris, N., Konstantinou, E., Mesiakaris, K., Zanidis, C., Farsalinos, K., & Poulas, K. (2020). Imiquimod - A toll like receptor 7 agonist - Is an ideal option for management of COVID 19. *Environmental Research*, 188(June), 109858. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109858>
- Arora, S., Ahmad, S., Irshad, R., Goyal, Y., Rafat, S., Siddiqui, N., Dev, K., Husain, M., Ali, S., Mohan, A., & Syed, M. A. (2019). TLRs in pulmonary diseases. *Life Sciences*, 233, 116671. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116671>
- Chen, K., Liu, J., & Cao, X. (2017). Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.008>
- Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M. C., Fridman, W. H., Damotte, D., Sautès-Fridman, C., & Cremer, I. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1285–1297. <https://doi.org/10.1172/JCI36551>
- Florindo, H. F., Kleiner, R., Vaskovich-Koubi, D., Acúrcio, R. C., Carreira, B., Yeini, E., Tiram, G., Liubomirski, Y., & Satchi-Fainaro, R. (2020). Immune-mediated approaches against COVID-19. *Nature Nanotechnology*, 15(8), 630–645. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0732-3>
- Fore, F., Indriputri, C., Mamutse, J., & Nugraha, J. (2020). TLR10 and its unique anti-inflammatory properties and potential use as a target in therapeutics. *Immune Network*, 20(3), 1–10. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e21>
- Govindaraj, R. G., Manavalan, B., Lee, G., & Choi, S. (2010). Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in toll-like receptor signaling. *PLoS ONE*, 5(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012713>
- Guan, Y., Ranoa, D. R. E., Jiang, S., Mutha, S. K., Li, X., Baudry, J., & Tapping, R. I. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *The Journal of Immunology*, 184(9), 5094–5103. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901888>
- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, 369 (6504), 718-724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
- Henrick, B. M., Yao, X. D., Zahoor, M. A., Abimiku, A., Osawe, S., & Rosenthal, K. L. (2019). TLR10 senses HIV-1 proteins and significantly enhances HIV-1 infection. *Frontiers in Immunology*, 10 (MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00482>
- Jiang, S., Li, X., Hess, N. J., Guan, Y., & Tapping, R. I. (2016). TLR10 is a negative regulator of both MyD88-dependent and -independent TLR signaling. *The Journal of Immunology*, 196(9), 3834–3841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502599>
- Khanmohammadi, S., & Rezaei, N. (2021). Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *Journal of Medical Virology*, October 2020, 1–5. <https://doi.org/10.1002/jmv.26826>
- Lee, S. M. Y., Kok, K. H., Jaume, M., Cheung, T. K. W., Yip, T. F., Lai, J. C. C., Guan, Y., Webster, R. G., Jin, D. Y., & Malik Peiris, J. S. (2014). Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), 3793–3798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324266111>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maxwell, A. J., Ding, J., You, Y., Dong, Z., Chehade, H., Alvero, A., Mor, Y., Draghici, S., & Mor, G. (2021). Identification of key signaling pathways induced by SARS-CoV2 that underlie thrombosis and vascular injury

- in COVID-19 patients. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(1), 35–47. <https://doi.org/10.1002/JLB.4COVR0920-552RR>
- Mojtabavi, H., Saghazadeh, A., & Rezaei, N. (2020). Interleukin-6 and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *European Cytokine Network*, 31(2), 44–49. <https://doi.org/10.1684/ecn.2020.0448>
- Monk, P. D., Marsden, R. J., Tear, V. J., Brookes, J., Batten, T. N., Mankowski, M., Gabbay, F. J., Davies, D. E., Holgate, S. T., Ho, L. P., Clark, T., Djukanovic, R., Wilkinson, T. M. A., Crooks, M. G., Dosanjh, D. P., Siddiqui, S., Rahman, N. M., Smith, J. A., Horsley, A., ... Rodrigues, P. M. (2021). Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 9(2), 196–206. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30511-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30511-7)
- Nagashima, H., Cruz, M., Abreu, J. A. J., Uchida, T., Mahachai, V., Vilaichone, R. K., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2015). Toll-like Receptor 10 in *Helicobacter pylori* Infection. Nagashima, Hiroyuki Iwatani, S. *Journal of Infectious Diseases*, 212(10), 1666–1676. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv270>
- Oosting, M., Cheng, S. C., Bolscher, J. M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T. S., Verschueren, I. C., Arts, P., Garritsen, A., Van Eenennaam, H., Sturm, P., Kullberg, B. J., Hoischen, A., Adema, G. J., Van Der Meer, J. W. M., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), E4478–E4484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410293111>
- Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., MacSharry, J., & Brint, E. (2013). Identification of TLR10 as a Key Mediator of the Inflammatory Response to *Listeria monocytogenes* in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*, 191(12), 6084–6092. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203245>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Tokairin, Y., Shibata, Y., Sata, M., Abe, S., Takabatake, N., Igarashi, A., Ishikawa, T., Inoue, S., & Kubota, I. (2008). Enhanced immediate inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in the lungs of mice with pulmonary emphysema. *Respirology*, 13(3), 324–332. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01229.x>
- Van Le, H., & Kim, J. Y. (2016). Stable toll-like receptor 10 knockdown in THP-1 cells reduces TLR-ligand-induced proinflammatory cytokine expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms17060859>
- Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>
- Warringa, R., Koenderman, L., Kok, P., Kreukniet, J., & Bruijnzeel, P. (1991). Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood*, 77(12), 2694–2700. <https://doi.org/10.1182/blood.v77.12.2694.2694>
- Zhang, N., Zhao, Y. D., & Wang, X. M. (2020). CXCL10 an important chemokine associated with cytokine storm in COVID-19 infected patients. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(13), 7497–7505. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202007\\_21922](https://doi.org/10.26355/eurrev_202007_21922)
- Zheng, Y., Zhuang, M. W., Han, L., Zhang, J., Nan, M. L., Zhan, P., Kang, D., Liu, X., Gao, C., & Wang, P. H. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00438-7>

## Koncentracije sproščeni kovinskih ionov nesnemnih ortodontskih aparatov ne povzročajo oksidativnega stresa v normalnih fizioloških pogojih

Vito KOVAČ<sup>1\*</sup>, Borut POLJŠAK<sup>1</sup>, Matic BERGANT<sup>2</sup>, Janez ŠČANČAR<sup>2</sup>, Jasmina PRIMOŽIČ<sup>3</sup>, Polona JAMNIK<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorij za proučevanje oksidativnega stresa, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Oddelek za znanosti o okolju, Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Katedra za čeljustno in zobno ortopedijo, Medicinska fakulteta, Hrvatski trg 6 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [vito.kovac@zf.uni-lj.si](mailto:vito.kovac@zf.uni-lj.si)

### **Koncentracije sproščeni kovinskih ionov nesnemnih ortodontskih aparatov ne povzročajo oksidativnega stresa v normalnih fizioloških pogojih**

**Izveček:** Nesnemni ortodontski aparati se uporabljajo za zdravljenje malokluzij, ki pa lahko tekom zdravljenja korodirajo in sproščajo v svojo okolico redoks aktivne kovinske ione Fe, Cr, Co, Ni, Ti, in Mo, sposobne ustvarjanja oksidativnih poškodb okoliškega tkiva. Za ortodontske nosilce in obročke iz zlitine nerjavnega železa, kot tudi za šest različnih zlitin žičnih lokov smo določili kovinsko sestavo z ICP-MS in ovrednotili sproščanje kovinskih ionov iz njih tekom 90-dnevne inkubacije v umetni slini. Sestavo zlitin smo simulirali z mešanicami kovinskih kloridov v 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  in 1000  $\mu\text{M}$  koncentracijah in preverili njihovo citotoksičnost ter generiranje oksidativnega stresa po 24-urni inkubaciji kvasne celične suspenzije. Skupna koncentracija sproščeni ionov aparatov ni presegla meje 10  $\mu\text{M}$  koncentracije po 90 dneh, prav tako ni bilo zaznanih citotoksičnih pojavov in generiranje oksidativnega stresa v celicah kvasovk pri tej koncentraciji.

**Ključne besede:** kovinski ioni; sproščanje ionov; ortodontski aparati; biokompatibilnost; oksidativni stres; kvasovke

### **Concentrations of released metal ions from fixed orthodontic appliances do not induce oxidative stress under normal physiological conditions**

**Abstract:** Depending on the type of orthodontic alloy used for malocclusion treatment, oxidative stress triggering metal ions of Fe, Cr, Co, Ni, Ti, and Mo could be released from fixed orthodontic appliances and induce oxidative damage to the surrounding tissue. Stainless steel brackets, stainless steel bands and six different alloy types of archwires had their composition assessed with ICP-MS and were incubated in artificial saliva up to 90 days. The concentration of released metal ions was measured with ICP-MS. Simulated metal alloy mixtures with concentrations of 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$  were prepared with metal chlorides and used for 24-hour yeast cells treatment to assess cytotoxicity and oxidative stress induction. Cumulative metal release of orthodontic alloys did not surpass 10  $\mu\text{M}$  concentration after 90 days. At 10  $\mu\text{M}$  concentrations no cytotoxic or oxidative stress observations on yeast cells were recorded.

**Key words:** metal ion; metal ion release; orthodontic appliance; biocompatibility; oxidative stress; yeast

## 1 UVOD

Zaradi genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja prihaja do odklonov normalnega razvoja obraza, čeljusti in zob. Če zobje niso v anatomsko pravilnem položaju in se ne prilegajo z zobmi nasprotnega loka, govorimo o malokluziji, za katero je potrebno ortodontsko zdravljenje. Pri ortodontski obravnavi ortodont v večini primerov namesti na zobe nesnemnimi ortodontski aparat, ki je sestavljen iz nosilcev, obročkov in žičnih lokov. Ti so lahko narejeni iz različnih ortodontskih zlitin; nerjavnega jekla, nikelj-titan zlitine (Ni-Ti),  $\beta$ -titan zlitine ( $\beta$ -Ti) in kobalt-krom zlitine (Co-Cr) (Abdallah in sod.. 2019). Vsi uporabljeni kovinski materiali naj bi bili biokompatibilni, ampak v ustni votlini se konstantno spreminja fiziološka in biološka sestava okolja (Barrett, Bishara in Quinn 1993), kar lahko privede do korodiranja kovinskega aparata in sproščanja kovinskih ionov (Sifakakis in Eliades 2017). Dodatno sproščanje kovinskih ionov je povzročeno tudi na račun trenja med nosilci in žičnim lokom aparata (Black, 1999), kar še dodatno degradira ortodontski aparat. Sproščeni ioni ortodontskih zlitin železa (Fe), niklja (Ni), kroma (Cr), kobalta (Co), molibdena (Mo) in titana (Ti) sodijo med prehodne kovine, ki so sposobne preko Fentonove reakcije (Valko, Morris, & Cronin, 2005) generirati reaktivne kisikove zvrsti (ROS) (Kanti Das, Wati in Fatima-Shad 2014). Ker v organizmu obstaja redoks ravnovesje, se v primeru prevelike produkcije ROS to poruši in privede do nastanka oksidativnega stresa (Galaris, Barbouti in Pantopoulos 2019) kar lahko vodi v nastanek oksidativnih poškodb DNA, proteinov in lipidov (Thanan in sod. 2014).

Študija se je osredotočila na določitev koncentracije sproščenih kovinskih ionov iz ortodontskih aparatov (nosilcev, žičnih lokov in obročkov), narejenih iz ortodontskih zlitin nerjavnega jekla, Ni-Ti, Co-Cr in  $\beta$ -Ti po 90-dnevni inkubaciji v umetni slini. Potencialno citotoksičnost in pojav oksidativnega stresa ortodontskih zlitin smo dokazovali na kvasnem celičnem modelu s 24-urnim tretiranjem kovinskih mešanic zlitin.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Sproščanje kovinskih ionov in določitev sestave zlitin

Žične loke iz nerjavnega železa (Damon .016  $\times$  0,25, Ormco, ZDA), Ni-Ti zlitine (BioStarter® .016", Forestadent, Nemčija and rematitan® super elastic .016" Dentaurum, Nemčija),  $\beta$ -Ti zlitine (rematitan® SPECIAL, Dentaurum, Nemčija) in Co-Cr zlitine (Elgiloy® .036" Rocky Mountain Orthodontics, ZDA in remaloy® .036" Dentaurum, Nemčija) ter nosilce iz nerjavnega železa (Discovery® Dentaurum, Nemčija) in obročke iz nerjavnega železa (W-Fit Form Forestadent, Nemčija) smo inkubirali v 250 mL umetne sline z pH 6,7–6,8 za 90 dni pri temperaturi 37°C. Vzorčenje tekočine je sledilo po naprej določeni časovnici; po 12 urah, 24 urah, 48 urah, 7 dneh, 30 dneh, 60 dneh in 90 dneh. Približno 10 mg ortodontskega material smo raztopili v 5 ml močne kisline pri 90°C. Koncentracijo sproščenih kovinskih ionov in raztopljene dele aparata smo analizirali na masnem spektrometru z induktivno sklopljeno plazmo (Agilent 7700x ICP-MS instrument, Tokyo, Japan)

## 2.2 Citotoksičnost in oksidativni stres

### 2.2.1 Kvasni model in tretiranje s kovinskimi mešanici

Kovinske mešanice smo pripravili v 0,2 M založni raztopini iz čistih kloridov;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Nemčija) in TraceCERT® titanega in molibdenovega standarda (Merck, Darmstadt, Nemčija) po naprej določeni kovinski sestavi (Kovač, Poljšak, Primožič, & Jamnik, 2020). Raztopili smo jih v sterilni ddH<sub>2</sub>O in umerili pH vrednost na 7. Divji tip kvasovke *S. cerevisiae* ATCC 204508 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, United States) smo gojili v tekočem gojišču iz glukoze, kvasnega ekstrakta in peptona na stresalniku pri 220 obr./min pri 28°C do zgodnje stacionarne faze rasti. Sledil je prenos celic v pufer PBS v koncentraciji  $1 \times 10^7$  celic/mL in 24-urno tretiranje z 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  in 1000  $\mu\text{M}$  koncentracijami kovinskih mešanic.

### 2.2.2 Kultivabilnost in metabolna aktivnost

Po 24 urah tretiranja s kovinami smo celično suspenzijo primerno razredčili s pufrom PBS ter 10  $\mu\text{L}$  redčenega vzorca nakapljali na petrijevko z YPD gojiščem. Sledila je 48-urna inkubacija pri temperaturi 28°C. Po inkubaciji je sledilo štetje nastalih kolonij. Za določanje metabolne aktivnosti smo uporabili komercialni kit BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega, San Luis Obispo, ZDA) in meritev izvedli po navodilih proizvajalca. Celični suspenziji in dodanim reagentom smo po 5 minutah inkubacije pomerili luminiscenco in optično gostoto (650 nm) na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan (Männedorf, Švica).

### 2.2.3 Oksidativni stres in oksidacija lipidov

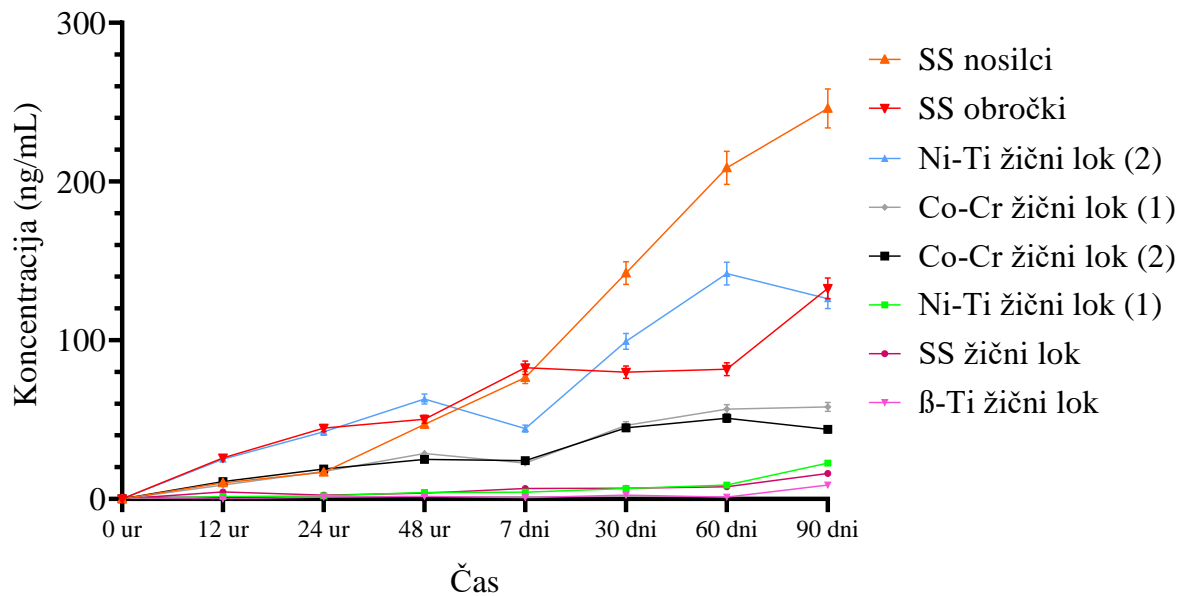
Za detekcijo znotrajceličnih ROS smo uporabili fluorescentno barvilo 2',7'-diklorofluorescein diacetat ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) (Tetz in sod., 2013), ki smo ga v 10  $\mu\text{M}$  koncentraciji dodali kvasni suspenziji takoj po tretiranju s kovinskimi mešanici. Po 24-urni inkubaciji smo spirali kvasne celice s PBS in na čitalcu mikrotitrskih plošč Varioskan™ LUX (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, ZDA) pomerili fluorescenco (ekscitacija/emisija = 488/520 nm) in optično gostoto (650 nm). Oksidacijo lipidov smo določali z metodo reaktivnih substanc tiobarbituratne kisline (TBARS) (Ohkawa, Ohishi in Yagi 1979), ki temelji na detekciji označevalca oksidativnega stresa malondialdehida (MDA). Po 24-urnem tretiranju kvasnih celic je sledilo spiranje s pufrom PBS. Dodali smo TBARS reagent (Kovač in sod. 2020) ter oksidirane lipide ločili z butanolom. S čitalcem mikrotitrskih plošč smo pomerili fluorescenco (ekscitacija/emisija = 515/555 nm) in optično gostoto (650 nm).

## 2.3 Statistična analiza

Statistično analizo podatkov smo naredili z programom GraphPad Prism (verzija 8.02 za Windows, GraphPad Software, La Jolla California, ZDA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Analiza normalne porazdelitve podatkov je bila narejena s Shapiro-Wilk in D'Agostino & Pearson testoma. Podatki normalne porazdelitve so bili analizirani z enosmerno analizo variance (ANOVA), kateri je sledil Dunnett's post hoc test za večkratno primerjavo podatkov. Za asimetrično porazdeljene podatke smo uporabili Kruskal–Wallis test, kateremu je sledil Dunn's post hoc test. Statistično značilna razlika je bila pri  $p < 0,05$ .

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Sproščanje kovinskih ionov iz delov ortodontskih aparatov je prikazano na Sliki 1. Nosilci iz nerjavnega jekla (Dentaurum) so sprostili največ, 246 ng/mL kovinskih ionov, sledili so obročki iz nerjavnega jekla (Forestadent) z 132 ng/mL, Ni-Ti žična loka (Forestadent) z 126 ng/mL, oba tipa Co-Cr žičnih lokov (RMO in Dentaurum) in v manjši meri drugi tip Ni-Ti žičnega loka (Dentaurum), nerjavna žična loka (Ormco) in  $\beta$ -titan žična loka (Dentaurum), ki sta sprostila najmanjšo koncentracijo kovinskih ionov.



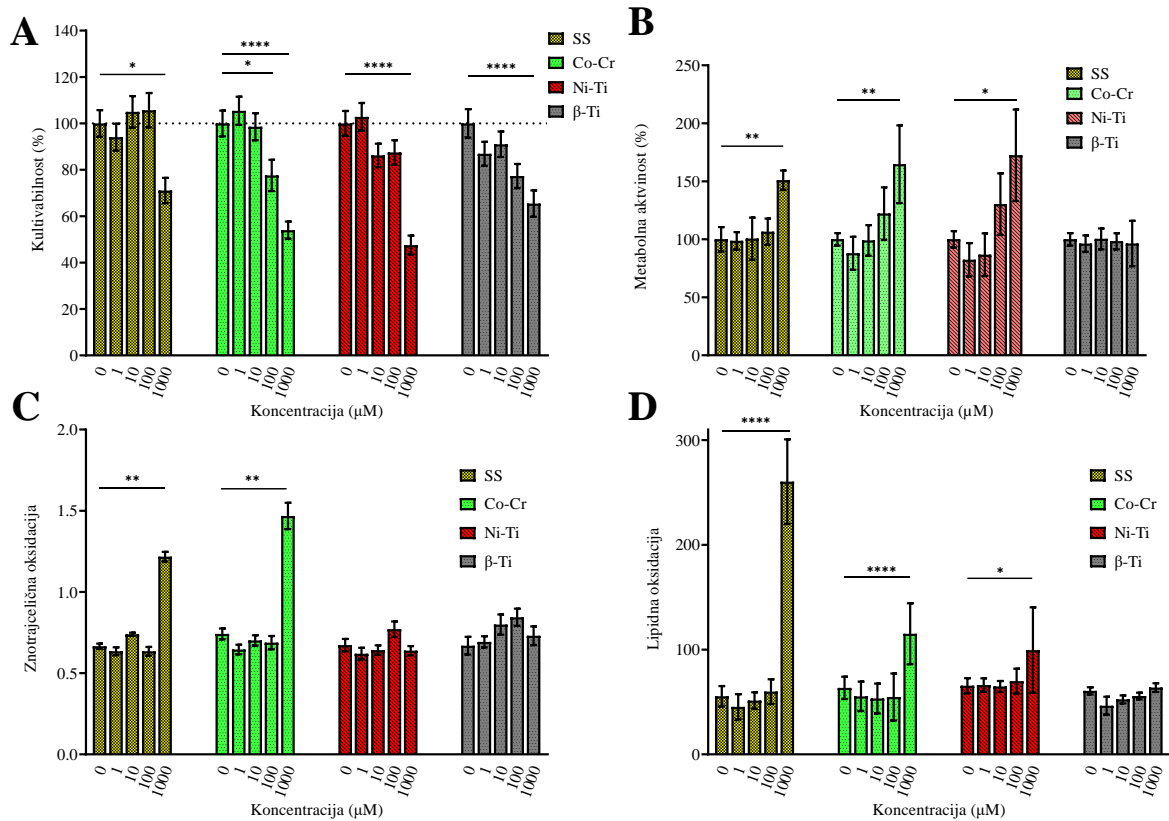
**Slika 12:** Sproščanje kovinskih ionov iz delov nesnemnih ortodontskih aparatov tekom 90-dnevne inkubacije v umetni slini.

Kovinske sestave (Fe, Ni, Cr, Co, Ti, in Mo) posameznih delov ortodontskega aparata so predstavljene v Preglednici 1, kjer v večini zlitin ni opaznih velikih odstopanj med posameznimi deli aparata, razen v primeru Co-Cr zlitine. Tam se sestava nekoliko spreminja glede vsebnosti posameznih kovinskih ionov.

**Preglednica 1:** Kovinska sestava delov ortodontskih aparatov zapisana v masnih deležih (%).

Del ortodontskega aparata	Zlitina	Specifikacija produkta	Število vključenih vzorcev	Fe (%)	Ni (%)	Cr (%)	Co (%)	Mo (%)	Ti (%)
Žični lok	SS	Damon.016 x 0,25 Ormco, USA	2	5,3	14,6	27,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Ni-Ti	Biostarter® .016” Forestadent, Germany	2	<0,1	73,8	<0,1	<0,1	<0,1	26,2
	Ni-Ti	rematitan® super elastic .016” Dentaurum, Germany	2	<0,1	73,2	<0,1	<0,1	<0,1	26,8
	β-Ti	rematitan® SPECIAL .032” Dentaurum, Germany	2	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	8,18	91,8
	Co-Cr	Elgiloy® .036” Rocky Mountain Orthodontics, USA	2	6,12	19,9	1,6	9,7	2,65	<0,1
	Co-Cr	remaloy® .036” Dentaurum, Germany	2	1,42	26,1	19,4	53,2	<0,1	<0,1
Nosilci	SS	Discovery® Dentaurum, Germany	24	55,4	17,8	24,9	<0,1	1,95	<0,1
Obročki	SS	W-Fit Form Forestadent, Germany	4	57	18,2	24,9	<0,1	<0,1	<0,1

Tretiranje celic s 1000 μM koncentracijami kovinskih mešanic je povzročilo statistično značilen padec v kultivabilnosti (Slika 2A), v primeru Co-Cr pa tudi pri 100 μM koncentraciji. Metabolna aktivnost celic je bila prav tako povišana po tretiranju s 1000 μM koncentracijami mešanic SS, Co-Cr in Ni-Ti, medtem ko tretiranje z β-Ti ni povzročilo nobenih statistično značilnih sprememb (Slika 2B). Nastanek ROS smo s statistično značilno razliko zabeležili po tretiranju s 1000 μM koncentracijo SS in Co-Cr mešanice (Slika 2C). Oksidativne poškodbe lipidov so bile povzročene po tretiranju s 1000 μM koncentracijo SS, Co-Cr in NiTi mešanice (Slika 2D).



**Slika 13:** (A) Kultivabilnost, (B) metabolna aktivnost, (C) znotrajcelična oksidacija in (D) lipidna oksidacija kvasnih celic po tretiranju s kovinskimi mešanici nerjavnega jekla (SS), kobalt-kroma (Co-Cr), nikelj-titana (Ni-Ti) in β-titana (β-Ti). Statistično značilne razlike so označene z \* (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , in \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Rezultati so posodobljeni po Kovač in sod. (Kovač in sod. 2020).

#### 4 DISKUSIJA

Skoraj vsi nesnemni ortodontski aparati so sestavljeni iz kovinskih zlitin. Med najpogostejše uporabljenimi so zlitine nerjavnega jekla, nikelj-titan zlitine, kobalt-krom zlitine in zlitine β-titana. Predhodne študije so pokazale, da tako v *in vitro* kot tudi *in vivo* pogojih pride do sproščanja kovinskih ionov iz ortodontskih aparatov (Quadras in sod. 2019). Kljub temu pa primerjave oziroma ekstrapolacije med njimi niso možne, saj ni vzpostavljenega enotnega temelja poteka eksperimenta. Prav zato rezultati med študijami variirajo, saj se uporabljajo različni ortodontski materiali, uporabljajo drugačni imerzni mediji, drugačna analitska oprema in različni pogoji inkubiranja. Mikulewicz in sod. (Mikulewicz, Chojnacka in Wołowiec 2014) so poročali o doseženi koncentraciji 3056 ng/mL sproščenih Fe, Ni in Cr kovin iz nerjavnega jekla celega ortodontskega aparata po 30 dneh, kar je v primerjavi z rezultati naše študije skoraj 10x več. Do takšnih koncentracij je lahko privedla 30-dnevna inkubacija na stresalniku, kjer lahko trenje materiala prispeva do večjih sproščanj (Staffolani in sod. 1999). Tudi pH in temperatura v veliki meri vplivata na samo sproščanje ionov iz materiala (Kuhta in sod. 2009). Študija je bila zastavljena tako, da nismo spodbujali dodatnega trenja materiala, ohranjali konstantno temperaturo in vrednost pH. Iz rezultatov je razvidno, da kumulativne koncentracije sproščenih kovinskih ionov ne presegajo predpisanih zgornjih mej vnosov (UL) za posamezne kovinske ione ( $UL_{Ni} = 1 \text{ mg/d}$ ,  $UL_{Fe} = 45 \text{ mg/d}$ ,  $UL_{Mo} = 2 \text{ mg/d}$  and  $UL_{Ti} = 1,1 \text{ mg/d}$  in  $UL_{Cr} = 200 \text{ µg/d}$ ) (Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, 2001). Kljub temu pa se je potrebno zavedati obstoja hipersenzitivnosti na določene kovine, kot je na primer nikljeva hipersenzitivnost, katere škodljivi učinki se pokažejo že pri nizkih koncentracijah (Santos



Genelhu in sod. 2005). Prav tako pa je pomembno narediti oceno tveganja ne samo za posamezne kovine Fe, Cr, Ni, Co, in Mo, ampak tudi za kombinacije teh kovin.

Za določanje potencialne citotoksičnosti sproščenih kovinskih ionov je potrebno poleg koncentracije upoštevati tudi kovinsko sestavo. Z uporabo mešanic kovinskih kloridov, ki posodablajo sestavo ortodontskih zlitin, se lahko ustvari kontrolirano okolje, kjer se vsi kovinski ioni zlitin enakomerno sproščajo. Uporabili smo koncentracije kovin med 1  $\mu\text{M}$  in 1000  $\mu\text{M}$ , z namenom doseči najnižjo stopnjo škodljivih učinkov, ki je še opažena (National Research Council (US) Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology, 2007). Za modelni organizem smo uporabili kvasne celice *S. cerevisiae*, saj imajo pogosto enako občutljivost na citotoksične snovi in enak obrambni odziv na oksidativni stres kot sesalčje celične linije. To tega zaključka so prišli Limberger in sod. (Limberger in sod. 2011), ko so med sabo primerjali toksične odzive kvasovk in sesalčjih linij. Po tretiranju kvasovk se je izkazalo, da kultivabilnost sicer pada z naraščanjem koncentracije, izrazit padec pa je bil zaznan le pri najvišji 1000  $\mu\text{M}$  koncentraciji. El Medawar in sod. (El Medawar in sod. 2002) so na epitelijskih celicah pokazali padec viabilnosti pri  $\text{LC}_{50\text{Ni}} = 425 \mu\text{M}$  in  $\text{LC}_{50\text{Ni-Ti}} = 3750 \mu\text{M}$ . Issa in sod. (Issa in sod. 2008) so prav tako testirali padec viabilnosti sesalčjih celic za posamezne kovinske ione  $\text{LC}_{50\text{Co}} = 705 \mu\text{M}$ ,  $\text{LC}_{50\text{Ni}} = 828 \mu\text{M}$  in  $\text{LC}_{50\text{Cr}} = 1971 \mu\text{M}$ . Informacije o toksičnosti posameznih kovinskih ionov so pomembne, vendar pri oceni tveganja taki rezultati ne morejo nadomestiti celokupnega učinka kombinacij kovin, kar sta Terpilowska in Siwicki (Terpilowska in Siwicki 2018)(Terpilowska in Siwicki 2019) tudi dokazala. Merjenje metabolne aktivnosti celic kvantificira količino molekul ATP v celicah, ki je proporcionalna s številom metabolno viabilnih in aktivnih celic. Do povečanja ravni ATP pa lahko pride tudi zaradi odziva celic na oksidativni stres, saj se potreba po prepisovanju antioksidativnih genov zviša in se ustavijo vsi ostali nepotrebni procesi, ki porabljajo ATP (Akhova in Tkachenko 2014). Ti podatki se navezujejo na dejstvo, da 1000  $\mu\text{M}$  koncentracija mešanice SS in Co-Cr sproži nastanek ROS, kar je bilo tudi prikazano z merjenjem znotrajcelične oksidacije. Barvilo  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  je sposobno prehajati membrane celic, kjer ga znotrajcelične esteraze cepijo in se preko ROS oksidira v fluorescenčno barvilo, čigar intenziteta je sorazmerna s količino nastanka ROS (Wang in Roper 2014). Nastanek oksidativnega stresa pa lahko tudi opazamo kot nastanek lipidnih poškodb (Lu in sod. 2016), v našem primeru tvorbo MDA, čigar koncentracija je bila opazno zvišana po tretiranju celic s SS, Co-Cr in Ni-Ti mešanicami. Tretiranje kvasovk z mešanico  $\beta\text{-Ti}$  pa ni povzročilo ne metabolnih sprememb in ne pojava oksidativnega stresa ter lipidnih poškodb. Ti podatki niso bili skladu s pričakovanji, saj so prejšnje študije prikazovale inducirano nastanka ROS in lipidnih poškodb na račun Ti (Gholinejad, Khadem Ansari in Rasmi 2019) in Mo (Siddiqui in sod. 2015).

## 5 SKLEPI

Globalni trg ponuja številne ortodontske materiale, ki pa se lahko razlikujejo po svoji biokompatibilnosti. Sproščanje kovinskih ionov iz materiala lahko privede do lokalnih ali pa celo sistemskih poškodb. Izkazalo se je, da lahko le visoke koncentracije kovinskih ionov povzročijo citotoksičnost in ustvarijo oksidativni stres, ki pa jih pod normalnimi fiziološkimi pogoji ne moremo doseči. Med testiranimi se je kot najbolj biokompatibilni material izkazala  $\beta\text{-titanova}$  zlitina, ki je tekom 90-dnevne inkubacije sprostila najmanj kovinskih ionov in niti najvišja koncentracija ionov zlitine ni privedla do pojava oksidativnega stresa.

## 6 VIRI

- Abdallah, M.-N., Lou, T., Retrouvey, J.-M., & Suri, S. (2019). Biomaterials used in orthodontics: brackets, archwires, and clear aligners. In *Advanced Dental Biomaterials* (pp. 541–579). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102476-8.00020-7>
- Akhova, A. V., & Tkachenko, A. G. (2014, April). ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 353, pp. 69–76. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12405>
- Barrett, R. D., Bishara, S. E., & Quinn, J. K. (1993). Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 103(1), 8–14. [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(93\)70098-9](https://doi.org/10.1016/0889-5406(93)70098-9)
- Black, J. (1999). *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility* (3rd ed., r). New York: Taylor & Francis.
- El Medawar, L., Rocher, P., Hornez, J. C., Traisnel, M., Breme, J., & Hildebrand, H. F. (2002). Electrochemical and cytocompatibility assessment of NiTiNOL memory shape alloy for orthodontic use. *Biomolecular Engineering*, 19(2–6), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(02\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(02)00041-2)
- Galaris, D., Barbouti, A., & Pantopoulos, K. (2019, December 1). Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1866, p. 118535. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118535>
- Gholinejad, Z., Khadem Ansari, M. H., & Rasmi, Y. (2019). Titanium dioxide nanoparticles induce endothelial cell apoptosis via cell membrane oxidative damage and p38, PI3K/Akt, NF-κB signaling pathways modulation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.03.008>
- Issa, Y., Brunton, P., Waters, C. M., & Watts, D. C. (2008). Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dental Materials*, 24(2), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.09.010>
- Kanti Das, T., Wati, M. R., & Fatima-Shad, K. (2014). Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. *Archives of Neuroscience*, 2(3), 1–8. <https://doi.org/10.5812/archneurosci.20078>
- Kovač, V., Poljšak, B., Primožič, J., & Jamnik, P. (2020). Are metal ions that make up orthodontic alloys cytotoxic, and do they induce oxidative stress in a yeast cell model? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21217993>
- Kuhta, M., Pavlin, D., Slaj, M. M., Varga, S., Lapter-Varga, M., & Slaj, M. M. (2009). Type of archwire and level of acidity: Effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthodontist*, 79(1), 102–110. <https://doi.org/10.2319/083007-401.1>
- Limberger, K. M., Westphalen, G. H., Menezes, L. M., & Medina-Silva, R. (2011). Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dental Materials*, 27(5), e81–e86. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.01.001>
- Lu, B., Hu, Y., Huang, W., Wang, M., Jiang, Y., & Lou, T. (2016). Effect of Transition Metal Ions on the B Ring Oxidation of Sterols and their Kinetics in Oil-in-Water Emulsions. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep27240>
- Micronutrients, I. of M. (US) P. on. (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. <https://doi.org/10.17226/10026>
- Mikulewicz, M., Chojnacka, K., & Wołowicz, P. (2014). Release of metal ions from fixed orthodontic appliance An in vitro study in continuous flow system. *Angle Orthodontist*, 84(1), 140–148. <https://doi.org/10.2319/113012-911.1>
- National Research Council (US) Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology. (2007). *Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and*

Risk Assessment. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10201/>

- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Quadras, D., Nayak, U., Kumari, N., Priyadarshini, H., Gowda, S., & Fernandes, B. (2019). In vivo study on the release of nickel, chromium, and zinc in saliva and serum from patients treated with fixed orthodontic appliances. *Dental Research Journal*, 16(4), 209–215. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.261155>
- Santos Genelhu, M. C. L., Marigo, M., Alves-Oliveira, L. F., Cotta Malaquias, L. C., & Gomez, R. S. (2005). Characterization of nickel-induced allergic contact stomatitis associated with fixed orthodontic appliances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 128(3), 378–381. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2005.03.002>
- Siddiqui, M. A., Saquib, Q., Ahamed, M., Farshori, N. N., Ahmad, J., Wahab, R., ... Pant, A. B. (2015). Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.014>
- Sifakakis, I., & Eliades, T. (2017). Adverse reactions to orthodontic materials. *Australian Dental Journal*, 62, 20–28. <https://doi.org/10.1111/adj.12473>
- Staffolani, N., Damiani, F., Lilli, C., Guerra, M., Staffolani, N. J., Beicastro, S., & Locci, P. (1999). Ion release from orthodontic appliances. *Journal of Dentistry*, 27(6), 449–454. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(98\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(98)00073-6)
- Terpilowska, S., & Siwicki, A. K. (2018). Interactions between chromium(III) and iron(III), molybdenum(III) or nickel(II): Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity studies. *Chemosphere*, 201, 780–789. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.062>
- Terpilowska, S., & Siwicki, A. K. (2019). Pro- and antioxidant activity of chromium(III), iron(III), molybdenum(III) or nickel(II) and their mixtures. *Chemico-Biological Interactions*, 298, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.028>
- Tetz, L. M., Kamau, P. W., Cheng, A. A., Meeker, J. D., & Loch-Caruso, R. (2013). Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67(2), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.j.vascn.2013.01.195>
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., ... Murata, M. (2014, December 24). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 16, pp. 193–217. <https://doi.org/10.3390/ijms16010193>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Wang, X., & Roper, M. G. (2014). Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Analytical Methods*, 6(9), 3019–3024. <https://doi.org/10.1039/c4ay00288a>

## Tailoring properties of hydrogels for their use as biocatalyst immobilization matrices

Tadej MENEGATTI<sup>1\*</sup>, Tilen KOPAČ<sup>1</sup>, Matjaž KRAJNC<sup>1</sup>, Polona ŽNIDARŠIČ PLAZL<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> Chair of Microprocess Engineering and Technology—COMPETE, University of Ljubljana, Večna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [tadej.menegatti@fkkt.uni-lj.si](mailto:tadej.menegatti@fkkt.uni-lj.si)

### Tailoring properties of hydrogels for their use as biocatalyst immobilization matrices

**Abstract:** Hydrogels with their porous structure can be used as efficient biocatalyst immobilization matrices. However, to achieve successful retention of enzymes, the support (matrix) must have suitable properties such as favourable pore size and good mechanical and chemical stability. Therefore, characterization of hydrogels must be carried out to obtain these features. In this work, rheological analysis of various hydrogels consisting of sodium alginate and polyvinyl alcohol (PVA) was performed with the aim of obtaining the hydrogel with suitable pore sizes as well as shear modulus required for an effective enzyme immobilization matrix. The addition of PVA resulted in smaller average pore sizes and improved chemical stability compared to the commonly used alginate hydrogels, making them more suitable for enzyme immobilization purposes.

**Keywords:** hydrogel; immobilization; alginate; PVA; rheology; pore size; shear modulus

### Prilagojevanje lastnosti hidrogelov za njihovo uporabo kot matric za imobilizacijo biokatalizatorjev

**Izveček:** Hidrogeli se lahko zaradi svoje porozne strukture uporabljajo kot učinkovite matrice za imobilizacijo biokatalizatorjev. Vendar pa mora imeti nosilec (matrica) za uspešno zadrževanje encimov ustrezne lastnosti, kot so ustrezna velikost por ter dobra mehanska in kemijska stabilnost. Zato je za pridobitev teh lastnosti potrebno okarakterizirati strukturo hidrogelov. V našem delu smo izvedli reološke analize hidrogelov iz natrijevega alginata in polivinil alkohola (PVA), da smo dobili nastale vrednosti velikosti por ter strižnega modula, ki sta zelo pomembna dejavnika pri delovanju hidrogela kot matrice za imobilizacijo encimov. Dodatek PVA k alginatu privede do nastanka manjših por v hidrogelu ter obenem izboljša njegovo kemijsko stabilnost v primerjavi s pogosteje uporabljenimi alginatnimi hidrogeli, zato je PVA-alginat kopolimerni hidrogel mnogo bolj primeren za imobilizacijo encimov.

**Ključne besede:** hidrogel; imobilizacija; alginat; PVA; reologija; velikosti por; strižni modul

## 1 INTRODUCTION

Biocatalysis, along with continuous processing, has been identified as one of the key areas of green engineering for sustainable production and circular economy (Žnidaršič-Plazl, 2021). Biocatalyst immobilization that enables the use of enzymes in a continuous processes due to their retainment in the reactor is the key enabling technology to push biocatalysis into flow chemistry (Bolivar & López-Gallego, 2020). On the other hand, low conversions and enzyme leakage can be observed over longer operational times because of the potential rendering of

enzyme structure during the immobilization process (Guisan *et al.*, 2020). One of the simplest and non-invasive immobilization techniques is entrapment in porous structures *via* crosslinking of different (bio)polymers (Kim *et al.*, 2017, Tan & Lee, 2015). Among them, alginate, an anionic polysaccharide extracted from seaweeds composed of  $\beta$ -D-mannuronic acid and  $\alpha$ -L-guluronic acid, which forms hydrogels with multivalent cations such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , or  $\text{Fe}^{3+}$ , is the most widely used for biocatalyst immobilization (Onbas & Yesil-Celiktas, 2019), in drug delivery (Benfattoum *et al.*, 2018), or as three-dimensional cell-hydrogel scaffold for tissue engineering (Cuadros *et al.*, 2015). As an immobilization matrix, calcium alginate hydrogel is mostly used to entrap whole cells, since enzymes are too small and prone to leakage from the hydrogel. The same problem is reported for PVA hydrogels obtained *via* freeze-thawing technique (Fernandes *et al.*, 2009). Calcium alginate hydrogels are also unstable in solutions with pH higher than pKa of their substituent groups as it disrupts the crosslinked 3D structure (Kopač *et al.*, 2021), thus making them non-applicable in biotransformations such as aminations with  $\omega$ -transaminase where amine donors demonstrate high pKa values (Miložič *et al.*, 2018). Recently, a novel hydrogel has been reported (Menegatti & Žnidaršič-Plazl, 2019) where PVA and alginate were mixed to form a copolymer hydrogel, showing better stability and thereby higher suitability for biocatalyst immobilization. Characterization with rheological measurements of hydrogels provide a better and more accurate insight into the hydrogel structure enabling to obtain parameters such as the pore size, which is the most important factor in enzyme immobilization as it directly affects the leakage of the enzyme from the hydrogel structure, and the shear modulus from frequency sweep analysis. The methodology for rheological experiments was already shown by (Kopač *et al.*, 2020) who have already presented the average mesh size and the shear modulus for alginate hydrogels of various compositions.

In this work, the PVA-to-alginate ratio was varied to obtain the best properties in terms of the pore size and the shear modulus, while also comparing the chemical stability of alginate hydrogel to PVA/alginate copolymeric hydrogel in amine solution with a high pKa value to determine the degradation rate of the hydrogel.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

Sodium alginate (SA) and phenylboronic acid (PBA) were from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA),  $\text{CaCl}_2$  was from Carlo Erba reagents (Milan, Italy), polyvinyl alcohol (PVA, MW = 13,000–23,000 Da) was purchased from Acros organics (Morris Plains, NJ, USA). + MBA, HEPES?

### 2.2 Preparation of hydrogels

Sodium alginate was dissolved in distilled water to get a 2% (w/v) sodium alginate solution by heating and mixing. After cooling to room temperature, a fixed volume of sodium alginate solution was poured into a circular mould and sprayed on top with 2% (w/v)  $\text{CaCl}_2$  to initiate the crosslinking process. After 1 h, the crosslinking was stopped, and the resulting calcium alginate was washed with distilled water and stored for further use. Copolymeric hydrogels were prepared by mixing a 2% (w/v) sodium alginate with different percentages of PVA in distilled water. Both polymers were mixed and heated to 80°C to complete the dissolution of PVA and after cooling down to room temperature the copolymeric hydrogel was prepared as described above, with the crosslinking solution also containing 2% (w/v) of PBA to initiate the

crosslinking process for the PVA chains *via* boron ions. The list of all hydrogels used is presented in Table 1.

**Table 1:** Composition of the tested hydrogel.

<i>Hydrogel name</i>	<i>Sodium alginate concentration [% (w/v)]</i>	<i>PVA concentration [% (w/v)]</i>	<i>Crosslinking solution</i>
Alg	2	0	CaCl <sub>2</sub>
2-2	2	2	CaCl <sub>2</sub> + PBA
4-2	2	4	CaCl <sub>2</sub> + PBA
6-2	2	6	CaCl <sub>2</sub> + PBA
8-2	2	8	CaCl <sub>2</sub> + PBA
10-2	2	10	CaCl <sub>2</sub> + PBA
12-2	2	12	CaCl <sub>2</sub> + PBA

### 2.3 Chemical stability test

The chemical stability test was performed by submerging the prepared hydrogels into a 50 mM solution of  $\alpha$ -Methylbenzylamine (MBA) in HEPES buffer. At different contact durations, they were taken out of the solution and washed with distilled water for further rheological measurements. The chosen compositions of hydrogels for the comparison of the chemical stability in this highly basic (pKa > 8) solution were Alg and 8-2.

### 2.4 Rheological measurements

First, the amplitude sweep tests were performed to determine the linear viscoelastic region of the hydrogels. Frequency sweep tests were then performed at a constant strain (0.1%) and the oscillation frequencies varied from 100 to 0.01 Hz at 25°C. To describe the experimental data, the generalized Maxwell model was applied, which consists of the equilibrium modulus of  $G_e$  and Maxwell elements  $G_i$  (relaxation modules). The generalized Maxwell model equations for describing the frequency dependence of viscoelastic modules are:

$$G' = G_e + \sum_{i=1}^n \frac{G_i \lambda_i^2 \omega^2}{1 + \lambda_i^2 \omega^2} \quad (1)$$

$$G'' = \sum_{i=1}^n \frac{G_i \lambda_i \omega}{1 + \lambda_i^2 \omega^2} \quad (2)$$

where  $\lambda_i$  is the corresponding relaxation time of the  $i^{\text{th}}$  Maxwell element,  $n$  is the number of considered Maxwell elements and  $\omega$  is the frequency.

The mechanical spectra results ( $G'$  and  $G''$ ) were then used to determine the shear modulus ( $G$ ) and the average mesh (pore) size ( $\epsilon$ ). The shear modulus is estimated from the sum of Maxwell's elastic elements  $G_e$  and  $G_i$ :

$$G = \sum_{i=1}^n G_e + G_i \quad (3)$$

The average mesh (pore) size ( $\epsilon$ ) is then estimated from the Flory's theory:

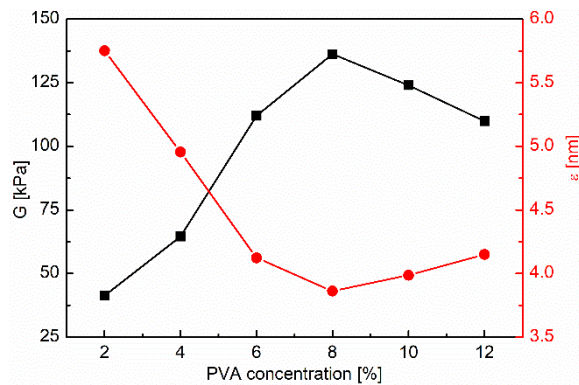
$$\varepsilon_{\text{rheo}} = \sqrt[3]{\frac{6RT}{\pi G \left(\frac{\varphi_p}{\varphi_{p0}}\right)^{2/3} N_A}} \quad (4)$$

where  $N_A$  is the Avogadro number,  $R$  is a gas constant,  $T$  is the temperature in K while  $\varphi_{p0}$  and  $\varphi_p$  are polymer volume fractions in the crosslinked conditions and rheological measurement conditions (Kopač *et al.*, 2020).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 PVA effect on shear modulus and average pore size

The hypothesis that the addition of PVA to alginate hydrogel matrix improves its properties have already been verified by (Menegatti & Žnidaršič-Plazl, 2019) who immobilized yeast cells inside a copolymeric hydrogel in a microreactor without noticeable loss in productivity of the system over a longer period of time. But for the enzyme immobilization, additional rheological tests had to be carried out to determine the shear modulus ( $G$ ) and the average pore size ( $\varepsilon$ ). From it is evident that the shear modulus grows with the increasing PVA share in the copolymer hydrogel topping the 136 kPa mark at 8% of PVA which is a three-fold increase from the pure 2% alginate hydrogel. An additional increase of the PVA share to 12% yields a decrease of the shear modulus to 110 kPa. As the shear modulus and the pore size are interdependent, the  $\varepsilon$  manages to get below 4 nm at 8% PVA, making it the most suitable for successful immobilization of enzymes larger than the pore size.



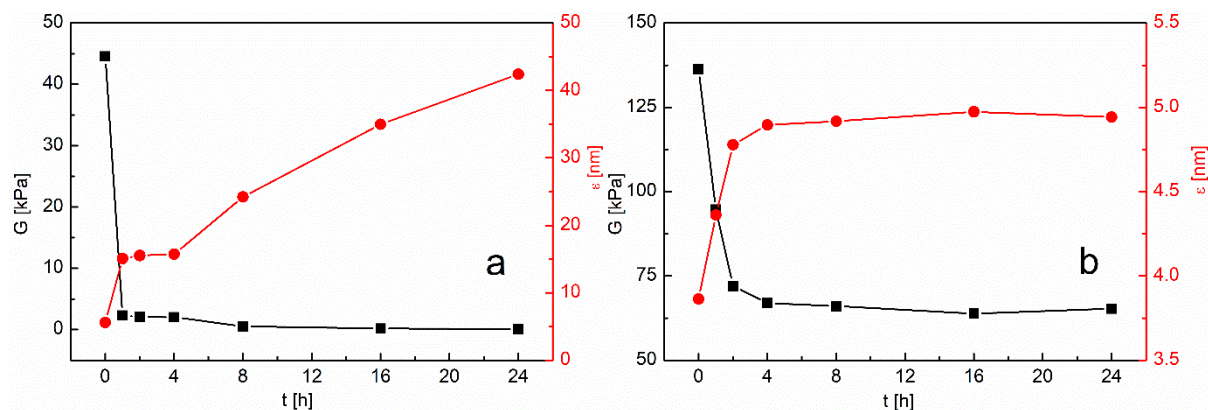
**Figure 1:** The effect of PVA concentration on the shear modulus  $G$  and the average pore size  $\varepsilon$ .

To test the chemical stability of the prepared hydrogels, the samples were immersed in a 50 mM MBA solution. This amine with high pKa is commonly used in biotransformations with  $\omega$ -transaminase, where it acts as an amino donor (Miložič *et al.*, 2018). Kopač *et al.* (2021) have reported that alginate hydrogels in basic environment exhibit deprotonation of carboxyl groups by hydroxide ions. In this case, the substituent groups are repelled, resulting in a reflective electrical force that expands the polymer chains in the hydrogel network and allows additional diffusion of water into the interior of the hydrogel network (swelling). Figure a shows the rapid degradation of the alginate hydrogel within one hour of contact. Furthermore, the average pore size increases with time and reaches the final size of 42 nm after 24 h, which would lead to a complete enzyme leakage from the hydrogel structure. On the other hand, Figure b shows the degradation to a much lesser extent. Both the shear modulus and the average pore size remain constant after 4 h contact time, with the pore size remaining at < 5 nm, which would theoretically successfully retain the immobilized enzyme. After 24 h, the shear modulus

remained at 50% of the initial value, with no significant decrease after 4 h contact time. The copolymeric hydrogel of PVA and alginate shows a much higher chemical resistance to the MBA solution, while the alginate hydrogel loses its structure after only 1 h of contact, confirming the initial hypothesis that the addition of PVA results in hydrogels much more suitable for the enzyme immobilization matrix.

**Figure 2:** Shear modulus  $G$  and the average pore size  $\varepsilon$  in relation to the contact duration of the hydrogel with 50 mM MBA for a) Alg and b) 8-2.

#### 4 CONCLUSIONS



Alginate hydrogels are often used in drug delivery as they are easily manipulated by pH change. But for enzyme immobilization, the hydrogel must maintain its properties in various environments. The addition of PVA to form a copolymer hydrogel not only improves the chemical stability in basic environments, but also decreases the average pore size, resulting in more efficient retention of enzymes within the porous hydrogel matrix. The 8-2 ratio of PVA to alginate was found the best in terms of average pore size and shear modulus. The chemical stability was vastly improved by the PVA addition, while the alginate hydrogel degraded rapidly in basic environment (50 mM MBA). Therefore, tailoring the hydrogel properties by PVA addition improves its suitability as an enzyme immobilization matrix.

#### 5 REFERENCES

- Benfattoum, K., Haddadine, N., Bouslah, N., Benaboura, A., Maincent, P., Barillé, R., Sapin-Minet, A., & El-Shall, M. S. (2018). Formulation characterization and in vitro evaluation of acacia gum–calcium alginate beads for oral drug delivery systems. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(2), 884–895. <https://doi.org/10.1002/pat.4199>
- Bolivar, J. M., & López-Gallego, F. (2020). Characterization and evaluation of immobilized enzymes for applications in flow reactors. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 25, 100349. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.010>
- Cuadros, T. R., Erices, A. A., & Aguilera, J. M. (2015). Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 46, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.08.026>
- Fernandes, P., Marques, M. P. C., Carvalho, F., & Cabral, J. M. S. (2009). A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(4), 561–564. <https://doi.org/10.1002/jctb.2080>
- Guisan, J. M., López-Gallego, F., Bolivar, J. M., Rocha-Martín, J., & Fernandez-Lorente, G. (2020). The Science of Enzyme Immobilization. *Methods in Molecular Biology*, 2100, 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_1)



- Kim, H. J., Jin, J. N., Kan, E., Kim, K. J., & Lee, S. H. (2017). Bacterial cellulose-chitosan composite hydrogel beads for enzyme immobilization. In *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 22(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0381-4>
- Kopač, T., Krajnc, M., & Ručigaj, A. (2021). A mathematical model for pH-responsive ionically crosslinked TEMPO nanocellulose hydrogel design in drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 695–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.126>
- Kopač, T., Ručigaj, A., & Krajnc, M. (2020). The mutual effect of the crosslinker and biopolymer concentration on the desired hydrogel properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 557–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.088>
- Menegatti, T., & Žnidaršič-Plazl, P. (2019). Copolymeric hydrogel-based immobilization of yeast cells for continuous biotransformation of fumaric acid in a microreactor. *Micromachines*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/mi10120867>
- Miložič, N., Stojkovič, G., Vogel, A., Bouwes, D., & Žnidaršič-Plazl, P. (2018). Development of microreactors with surface-immobilized biocatalysts for continuous transamination. *New Biotechnology*, 47, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.004>
- Onbas, R., & Yesil-Celiktas, O. (2019). Synthesis of alginate-silica hybrid hydrogel for biocatalytic conversion by  $\beta$ -glucosidase in microreactor. *Engineering in Life Sciences*, 19(1), 37–46. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800124>
- Tan, I. S., & Lee, K. T. (2015). Immobilization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* on  $\kappa$ -carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue. *Bioresource Technology*, 184, 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.146>
- Žnidaršič-Plazl, P. (2021). Let the Biocatalyst Flow. *Acta Chimica Slovenica*, 68(1), 1–16. <https://doi.org/10.17344/acsi.2020.6488>

## Izolacija in karakterizacija novih keratinolitičnih mikroorganizmov

Blaž PETEK<sup>1\*</sup>, Maša ZOREC<sup>1</sup>, Maša VODOVNIK<sup>1</sup>, Lijana FANEDL<sup>1</sup>, Polona ZALAR<sup>2</sup>, Romana MARINŠEK LOGAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Domžale, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [blaz.petek@bf.uni-lj.si](mailto:blaz.petek@bf.uni-lj.si)

### Izolacija in karakterizacija novih keratinolitičnih mikroorganizmov

**Izveček:** Odpadna ovčja volna v državah srednje Evrope danes večinoma predstavlja odpadni organski material bogat s težko razgradljivim keratinom. Z namenom pospeševanja biološkega recikliranja odpadne ovčje volne, načrtujemo razvoj mikrobnih starterskih kultur za kompostiranje, gnojenje in proizvodnjo bioplina. V tej raziskavi smo iz kupa surove ovčje volne in iz zemlje pod njim, pri dveh različnih temperaturah (21 °C in 30 °C), izolirali in uspešno identificirali (identifikacija po profilih membranskih dolgoveržnih maščobnih kislin, tarčno sekvenciranje PCR pomnožkov za gen 16S rRNA in ITS regije) 5 bakterijskih izolatov iz rodu *Bacillus*, 3 bakterijske izolate iz rodu *Stenotrophomonas*, 1 bakterijski izolat iz rodu *Pseudomonas*, 1 aktinobakterijski izolat iz rodu *Streptomyces* in 1 glivni izolat iz rodu *Chrysosporium*. Zmožnost razgradnje keratina smo pri vseh izoliranih sevih testirali kvantitativno z določanjem keratinolitične aktivnosti v supernatantih mikrobnih kultur preko sprememb koncentracije topnih proteinov in pri 8 od 11 izolatov dokazali višjo keratinolitično aktivnost kot pri uporabljenih pozitivnih kontrolah. Kvalitativno pa smo aktivnosti določali s spremljanjem con proteinske hidrolize na selekcijskih gojiščih s keratinom v prahu kot edinem viru ogljika in dušika, s svetlobno mikroskopijo volnenih vlaken pred in po inkubaciji z izolati ter z ločevanjem proteinov supernatanta mikrobnih kultur na SDS-PAGE in encimogramu, pri čemer smo prav tako dokazali obstoj keratinolitičnih encimov pri vseh izolatih.

**Ključne besede:** odpadna volna, keratin, keratinolitični mikroorganizmi, keratinaze

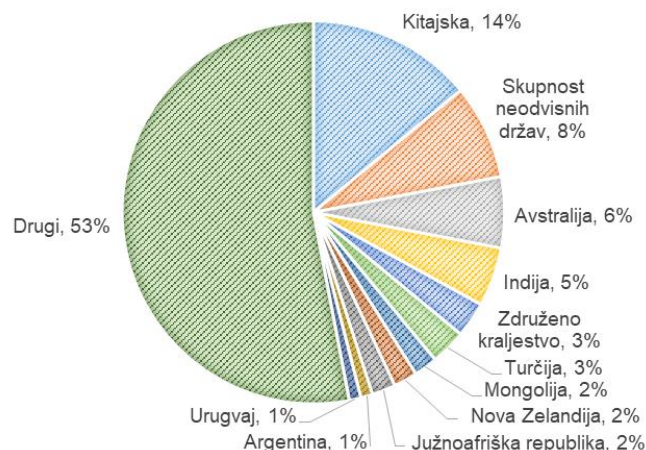
### Isolation and characterization of new keratinolytic microorganisms

**Abstract:** In the countries of Central Europe today, sheep waste wool represents mainly organic waste, rich in non-degradable keratin. To promote the biological utilization of sheep wool waste, we plan to develop microbial starter cultures for composting, fertilization and biogas production. In this study, we isolated and successfully identified 5 bacterial isolates of the genus *Bacillus*, 3 bacterial isolates of the genus *Stenotrophomonas*, 1 bacterial isolate of the genus *Pseudomonas*, 1 actinobacterial isolate of the genus *Streptomyces* and 1 fungal isolate of the genus *Chrysosporium* (identification by membrane long-chain fatty acid profiles and target sequencing of PCR-amplified 16S rRNA gene and ITS regions), from the pile of raw sheep wool and from the soil underneath, at two different temperatures (21 °C at 30 °C). The ability to degrade keratin in all isolated strains was quantitatively tested by determining keratinolytic activities in microbial culture supernatants via soluble protein concentration, and 8 of 11 isolates showed higher keratinolytic activity than the positive controls used. Qualitative activities were determined by monitoring protein hydrolysis zones on selective media with keratin powder as the sole carbon and nitrogen source, by light microscopy of wool fibers before and after incubation with isolates, and by separating proteins of the microbial culture supernatant on SDS -PAGE and enzymogram, where we also demonstrate the existence of keratinolytic enzymes in all isolates.

## 1 UVOD

Ovčja volna je s keratinom bogat stranski produkt, ki nastaja pri reji ovac in kot odpadek v tekstilni industriji. Zaradi kompleksne in trdne strukture keratina je odpadna volna zelo odporna na razgradnjo in pri nepravilnem odstranjevanju predstavlja resen problem v okolju. Industrijsko odpadno volno pogosto predelajo v različne hidrolizate, ki so pripravljene na okolju neprijazne fizikalno kemijske načine, kar vodi v razgradnjo nekaterih aminokislin in izgubo energije. Uporaba biotehnoloških načinov, kot so mikrobnna ali encimska obdelava volne, lahko učinkovito zmanjša vpliv na okolje in proizvede uporabne produkte, kot so gnojila, bioplin in drugi produkti z dodano vrednostjo (peptidi, aminokislina, keratinolitični encimi). Ne glede na kompleksno in trdno strukturo keratina so ga nekatere bakterije in glive v okolju sposobne počasi razgraditi. Keratinolitične mikroorganizme lahko izoliramo iz zemlje, kjer se kopiči keratinski material, izolirali pa so jih tudi iz surove volne ali drugih keratinskih materialov (dlaka, perje). Keratinolitični mikroorganizmi so bili odkriti tako v aerobnih, kot tudi v anaerobnih okoljih, vse od vročih vrelcev do antarktične prsti (Petek in Marinšek, 2021).

Mednarodna organizacija za volneni tekstil (angl. International wool textile organization; IWTO) poroča, da je bilo v letu 2017 na svetu v reji več kot 1,18 milijarde ovac (Slika 1) in pridelane 2,15 milijona ton surove ovčje volne od tega 1,16 milijona ton ekvivalentov čiste volne (IWTO, 2018). Evropska unija – 28 držav (EU-28), ima drugo največjo populacijo ovac na svetu. Njihovo število je bilo v decembru 2018 ocenjeno na približno 84 milijonov (Eurostat, 2020). Ovce v EU večinoma redijo zaradi pridelave mesa in, v majhnem deležu, zaradi mleka (večinoma v mediteranskih regijah). Ne glede na to, je letna proizvodnja surove ovčje volne v EU ocenjena na preko 200 tisoč ton (1,5-3 kg surove volne na ovco letno), ki pa je zelo groba in slabše kvalitete (Zoccola in sod., 2015). Zaradi nizkih odkupnih cen ovčje volne slabše kvalitete, predstavlja ovčja volna v EU kmetijski odpadki in se zato velikokrat kopiči, sežge ali odvrže v naravo, kar pa je netrajnostno in okolju škodljivo ravnanje. Zaradi navedenih razlogov je potrebno razviti trajnostne načine ravnanja z odpadno ovčjo volno v smislu biotehnološkega recikliranja s keratinolitičnimi mikroorganizmi in keratinolitičnimi encimi ter proizvodnje produktov z visoko dodano vrednostjo.



**Slika 1:** Porazdelitev populacije ovac po Svetu v letu 2017 (IWTO, 2018).

Keratinaze so večinoma zunajcelični mikrobnni encimi, obstajajo pa tudi zapisi o pritrjenih na celico ter znotrajceličnih. Spadajo med serinske in metalo proteaze, neodvisno od mikroorganizmov in so edina skupina proteaz, ki so sposobne razgrajevati keratin. Imajo zelo široko pH in temperaturno območje delovanja. Optimalno pH območje delovanja večine bakterijskih, aktinomicetnih in glivnih keratinaz je med nevtralnimi in bazičnimi, z nekaj

poznanimi ekstremno alkalofilnimi keratinazami z optimalnim območjem pH preko 12. Optimalne temperature večine keratinaz se gibljejo med 30 °C in 80 °C. Le nekaj bakterijskih, aktinomicitnih in glivnih vrst je sposobnih uporabljati keratin kot edini vir ogljika, dušika, žvepla in energije. Večinoma pripadajo bakterijskim rodovom *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Serratia* in *Stenotrophomonas*, nekaterim aktinomicitam (*Streptomyces* spp.) in nekaterim glivam (*Chrysosporium* spp., *Aspergillus* spp.). Razgradnja keratina zaradi njegove kompleksne strukture poteka v dveh delih; sulfitolitičnem in proteolitičnem delu. V sulfitolitičnem delu pride do cepitve disulfidnih vezi v keratinu, pri čemer sodelujejo disulfidne reduktaze. V proteolitičnem delu pa pride do cepitve peptidnih vezi, pri čemer sodelujejo substratno specifične mikrobne proteaze – keratinaze. Pri celotni razgradnji keratina sodelujejo endopeptidaze, eksopeptidaze in oligopeptidaze (Callegaro in sod., 2019). Keratinaze se pogosto uporabljajo v usnjarski industriji pri obdelavi živalskih kož, v tekstilni industriji pri proizvodnji volne, odporne proti krčenju, pri predelavi keratinskih odpadkov v prehransko bogate krmne dodatke, v medicinske in kozmetične namene, pri odstranjevanju prionov, itd. (Singh in Bajaj, 2017; Vidmar in Vodovnik, 2018). V tem prispevku predstavljamo rezultate izolacije novih sevov različnih keratinolitičnih mikroorganizmov, ki aktivno razgrajujejo ovčjo volno, in začetne karakterizacije njihovih encimov.

## 2 MATERIAL IN METODE

Keratinolitične mikroorganizme smo izolirali iz surove ovčje volne in iz zemlje pod kompostirano volno. Mikrobne seve smo izolirali z uporabo selekcijskih gojišč z drobljeno volno ali keratinom v prahu, kot edinim virom ogljika in dušika v gojišču. Keratinolitično aktivnost smo preverjali z različnimi kvantitativnimi in kvalitativnimi testi. Kvantitativno smo keratinolitično aktivnost določali s spremembo koncentracije topnih proteinov po dvourni inkubaciji encimov z 1 % (w/v) raztopino keratina v prahu pri 45 °C, z metodo po Lowryju (Iglesias in sod., 2017). Kot vir encimov smo uporabili ustrezno redčene supernatante mikrobnih kultur v gojiščih s surovo ovčjo volno kot edinim virom ogljika in dušika. Rezultate smo podali kot enoto keratinolitične aktivnosti na mg proteinov supernatanta (KAU/mg), kjer je ena enota keratinolitične aktivnosti definirana kot količina encima, ki pri danih pogojih reakcije sprosti 1  $\mu$ mol tirozina na minuto.

Kvalitativno smo keratinolitično aktivnost ugotavljali s svetlobno mikroskopijo volnenih vlaken (keratin Azure) pred in po inkubaciji s keratinolitičnimi izolati. Spremljali smo nastanek con encimske hidrolize na trdnih selekcijskih gojiščih KAA-WK (1,5 g/l  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ ; 0,025 g/l  $MgSO_4 \times 7H_2O$ ; 0,025 g/l  $CaCl_2$ ; 0,015 g/l  $FeSO_4 \times 7H_2O$ ; 0,005 g/l  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ; 20 g/l agarja) z 0,2 % (w/v) keratinom v prahu, kot edinim virom ogljika in dušika po 3 dnevni inkubaciji pri izbrani temperaturi (s prilagojeno metodo po Iglesias in sod., 2017). Proteine supernatanta mikrobnih kultur smo ločili s poliakriamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE) in keratinaze zaznali na encimogramu. Ločevanje proteinov je potekalo na 12 % ločevalnem gelu in 4 % nabijalnem gelu (Laemmli, 1970). Vzorce smo zmešali s 5X nalagalnim pufrom in segrevali 5 min pri 98 °C. Encimogram je bil pripravljen na enak način kot SDS-PAGE z dodanim keratinskim substratom (0,2 % keratin v prahu) v ločevalnem gelu in z nativnimi vzorci. Encimogram smo po ločevanju 1 h spirali v 2,5 % (v/v) raztopini Triton X-100 in nato preko noči inkubirali v Tris-HCl pufri (pH 9,0) pri 55 °C. Oba gela smo pobarvali z 1 % raztopino Coomassie Brilliant Blue R-250 v raztopini destilirane vode, očetne kisline in metanola, ter razbarvali v enaki raztopini brez barvila (Fang in sod., 2013).

Za identifikacijo izolatov smo izolirali DNA s kompletom DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Nemčija). Bakterijske izolate smo preliminarno identificirali s tarčnim

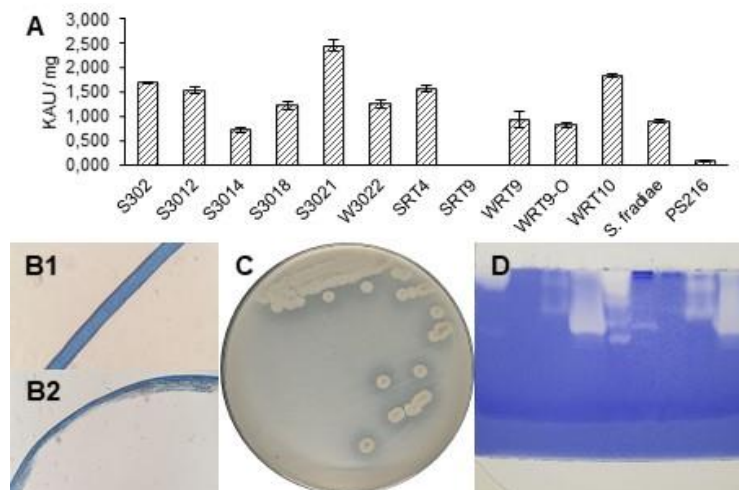
sekvenciranjem PCR pomnožkov gena za 16S rRNA z začetnima nukleotidoma fD1 in 149R (Wisburg in sod., 1991; Lane, 1991). Za identifikacijo gliv smo analizirali PCR pomnožke regije notranjih prepisnih vmesnikov (ITS) rRNA z začetnimi nukleotidi ITS4 in ITS5 (White in sod., 1990). Nukleotidna zaporedja smo primerjali z NCBI podatkovno bazo 16S rRNA ter ITS zaporedij tipskih in referenčnih sevov, ter jih dodatno analizirali s programom MEGA 7.0 (Kumar in sod., 2016). Izolate smo identificirali tudi s prilagojeno plinsko-kromatografsko metodo (Chen in Liu, 2019) po profilih membranskih dolgoveržnih maščobnih kislin (Sasser, 1990). Iz kultur keratinolitičnih izolatov smo najprej ekstrahirali celične dolgoveržne maščobne kisline in jih derivatizirali v metilne estre (FAMES). Te smo analizirali s plinsko kromatografijo (Agilent GC6890 z vodikom kot nosilnim plinom) in profile izolatov primerjali v bazi profilov poznanih aerobnih mikroorganizmov RTSBA6 (Sherlock™ Microbial Identification System, Newark, ZDA).

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Iz kupa volne in zemlje pod njim smo skupaj izolirali 11 aktivnih keratinolitičnih sevov, od tega 5 izolatov pri 21 °C in 6 izolatov pri 30 °C. Pri kvantitativnem določanju keratinolitične aktivnosti smo pri 8 od 11 izolatov dokazali višjo aktivnost (0,93 – 2,45 KAU/mg) kot pri pozitivnih kontrolah, ki so znane, predhodno opisane keratinolitične bakterije (Kunert, 1989; Štefančič in Mandić-Mulec, 2009) *Streptomyces fradiae* (0,9 KAU/mg) in *Bacillus subtilis* PS216 (0,08 KAU/mg) (Slika 2A). Rezultati obeh metod preliminarne identifikacije se na nivoju rodov popolnoma ujemajo, tako smo uspešno identificirali 5 bakterijskih izolatov iz rodu *Bacillus*, 3 bakterijske izolate iz rodu *Stenotrophomonas*, 1 bakterijski izolat iz rodu *Pseudomonas*, 1 aktinobakterijski izolat iz rodu *Streptomyces* in 1 glivni izolat iz rodu *Chrysosporium*.

Svetlobna mikroskopija volnenih vlaken pred (Slika 2B1) in po inkubaciji s keratinolitičnimi izolati (Slika 2B2) je pokazala vidne poškodbe na vlaknih, tako na povrhnjici, kot tudi globlje v notranjih plasteh volnenega vlakna, kar vizualno dokazuje keratinolitično aktivnost izolatov. Na vlaknih so prav tako jasno vidni skupki pritrjenih mikroorganizmov.

Pri rasti na selekcijskih gojiščih KAA-WK so se pri večini izolatov pojavile jasno vidne cone proteinske hidrolize (Slika 2C). Prisotnost zunajceličnih keratinolitičnih encimov pa smo dokazali tudi s preliminarnimi ločevanji supernatantov mikrobnih kultur na SDS-PAGE in encimogramih (Slika 2D).



**Slika 2:** Kvantitativna keratinolitična aktivnost v supernatantih mikrobnih kultur (A). Mikroskopski posnetki volnenega vlakna (povečava 400X). Nepoškodovano vlakno-negativna kontrola (B1), vidne poškodbe na vlaknu, s pritrjenimi mikroorganizmi (B2). Cone proteinske hidrolize na agarški plošči s keratinom v prahu okoli kolonij keratinolitičnih izolatov (kvalitativno spremljanje keratinolitične aktivnosti) (C). Encimogram supernatantov keratinolitičnih mikrobnih kultur na poliakrilamidnem gelu z 0,1 % keratinom v prahu, pobarvan z raztopino Coomassie Brilliant Blue (D).

Ker je naravna razgradnja ovčje volne počasna, jo v različnih aplikacijah želimo pospešiti z zelo aktivnimi keratinolitičnimi mikroorganizmi in/ali njihovimi encimi. Okolje je vir številnih še neodkritih ali neraziskanih mikroorganizmov, zato smo se lotili izolacije in identifikacije keratinolitov, kar je časovno precej zahtevno delo in se ga danes raziskovalci ne lotevajo zelo pogosto. Prikazani rezultati dokazujejo, da smo izolirali nekaj keratinolitično zelo aktivnih mikroorganizmov, ki jih bomo še bolj detajlno preučili v nadaljevanju raziskave. Keratinolitični izolati in njihovi encimi so biotehnološki potencial, ki ga nameravamo preizkusiti v procesu pospešenega kompostiranja ovčje volne (bioaugmentacija) in v proizvodnji bioplina iz ovčje volne kot kosubstrata.

Odpadna volna in drugi keratinski odpadki (npr. perutninsko perje, živalske kože...) so obnovljivi materiali, ki nastajajo pri reji živali in v živilsko-predelovalni industriji v velikih količinah, zato jih bomo v prihodnje vse bolj izkoriščali tudi za proizvodnjo produktov in materialov z visoko dodano vrednostjo. Pričakujemo, da bodo rezultati naših nadaljnjih raziskav izoliranih keratinolitičnih mikroorganizmov, predvsem pa njihovih encimov in genov, ki jih kodirajo, prispevali k novim načinom uporabe teh odpadkov v inovativnih biotehnoloških proizvodnjah, ki se bodo vklapljale v sodobne trende bioekonomije in krožnega gospodarstva.

#### 4 SKLEPI

- Izolirali smo 11 keratinolitičnih sevov, ki sodijo v različne bakterijske, aktinobakterijske in glivne rodove.
- Keratinolitično aktivnost izbranih izolatov smo dokazali z različnimi kvalitativnimi in kvantitativnimi metodami.
- 8 od 11 izolatov je pokazalo višjo keratinolitično aktivnost kot uporabljene pozitivne kontrole z znano visoko keratinolitično aktivnostjo.

## 5 VIRI

- Callegaro, K., Brandelli, A., Daroit, D.J. (2019). Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. *Waste Management*, 95, 399-415.
- Chen, Q., & Liu, S. (2019). Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2171.
- Eurostat. (2020). Sheep population-annual data. *European Union, European Commission*. pridobljeno s [https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro\\_mt\\_1ssheep&lang=en](https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mt_1ssheep&lang=en)
- Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G., Chen, J. (2013). Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, 166-172.
- Iglesias, M.S., Sequeiros, C., Garcia, S., Olivera, N.L. (2017). Newly isolated *Bacillus* sp. G51 from Patagonian wool producers an enzyme combination suitable for felt-resist treatments of organic wool. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40, 833-842.
- IWTO. (2018). *IWTO Market Information, 13th ed.*, Brussels, Belgium: International Wool Textile Organisation.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7), 1870-1874.
- Kunert, J. (1989). Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *Journal of Basic Microbiology*, 29(9), 597-604.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. V Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Ur.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (115-148). Chichester, Anglija: John Wiley & Sons.
- Štefančič, P. & Mandić-Mulec, I. (2009). Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of bacteriology*, 191(6), 1756-1764.
- Petek, B., & Marinšek, L.R. (2021). Management of waste sheep wool as valuable organic substrate in European Union countries. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 23, 44-54.
- Sasser, M. (1990). *Identification of Bacteria by gas Chromatography of Cellular Fatty acids. MIDI Technical Note 101*, Newark, ZDA: MIDI Inc.
- Singh, S. & Bajaj, K.B. (2017). Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy, Ecology and Environment*, 2, 370-386.
- Vidmar, B., & Vodovnik, M. (2018). Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 312-328.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.J., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173, 697-703.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Ur.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (315-322). San Diego, CA: Academic Press.
- Zoccola, M., Montarsolo, A., Mossotti, R., Patrucco, A., Tonin, C. (2015). Green hydrolysis as an emerging technology to turn wool waste into organic nitrogen fertilizer. *Waste and Biomass Valorization*, 6, 891-897.

## EKONOMIKA NARAVNIH VIROV

### Analiza odločanja zasebnih lastnikov gozdov o sanaciji gozdov po ujmah

Darja STARE<sup>1\*</sup>, Petra GROŠELJ<sup>2</sup>, Špela PEZDEVŠEK MALOVRH<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [darja.stare@gozdis.si](mailto:darja.stare@gozdis.si)

#### Analiza odločanja zasebnih lastnikov gozdov o sanaciji gozdov po ujmah

**Izveček:** Ujme povzročajo vedno večji obseg poškodb gozdov tako v Evropi kot tudi v Sloveniji. Posledično se zasebni lastniki gozdov zaradi različnih ciljev in prioritete gospodarjenja z gozdom različno odzivajo na nenadne dogodke in škodo, ki jo le-ti povzročijo. V študiji smo analizirali odločanje zasebnih lastnikov gozdov po ujmah, z upoštevanjem socio-demografskih, tehnoloških in tržnih dejavnikov ter preteklih izkušenj z gospodarjenjem. Opravili smo telefonsko anketiranje s 16 zasebnimi lastniki gozdov v revirju Vodice, da bi testno ovrednotili dejavnike, ki so vplivali na odločitev o sanaciji gozdov po ujmah. Na podlagi dejavnikov je bil postavljen večkriterijski model odločanja. Zaradi kvalitativnih značilnosti podatkov je bila uporabljena metoda DEX. Nadalje smo za anketirane zasebne lastnike gozdov izračunali stroške poseka in spravila ter vrednost posekanih GLS. Na podlagi teh podatkov je bil izdelan linearni optimizacijski program, pri katerem je bila ciljna funkcija maksimalni dobiček. V zadnjem koraku smo s povezavo večkriterijskega modela odločanja DEX in linearnega optimizacijskega programa preverili vpliv dejavnikov na odločitev za sanacijo gozdov po ujmah. Rezultati modela so pokazali, katera odločitev naj bi bila ekonomsko najbolj optimalna za posameznega zasebnega lastnika gozda. Takšni modeli bi lahko predstavljali pomembno podporo pri sprejemanju odločitev povezanih s sanacijo gozdov po ujmah v prihodnje.

**Ključne besede:** zasebni lastniki gozdov; ujme; sanacija; odločanje o gospodarjenju; večkriterijski model

#### Analysis of decision making by private forest owners in salvage logging after natural disasters

**Abstract:** Natural disasters cause more and more forest damage in Europe and also in Slovenia. As a result, due to different forestry objectives and priorities, private forest owners react differently to sudden events and the associated damage. The study analyzed the decision-making of private forest owners after natural disasters, taking into account socio-demographic, technological and market factors as well as past management experiences. A telephone survey was conducted with 16 private forest owners in the Vodice forest district to assess the factors that influence decision-making in salvage logging after natural disasters. Based on the factors, a multi-criteria decision model was created. Due to the qualitative characteristics of the data, the method DEX was used. In addition, we calculated felling and harvesting costs as well as the value of the felled forest wood assortments for the surveyed private forest owners. Based on these data, we developed a linear optimization program in which the objective function was



maximum profit. In the final step, we investigated the influence of factors on the decision to salvage logging after disasters by linking the multicriteria decision model DEX and the linear optimization program. The results of the model showed which decision should be economically most optimal for an individual private forest owner. In the future, such models could be an important support for decisions related to salvage logging after natural disasters.

**Key words:** Private forest owners, natural disasters, salvage logging, management decision-making; multicriteria model

## 1 UVOD

Vse vidnejši vplivi podnebnih sprememb se v zadnjem desetletju odražajo v vedno pogostejšem pojavljanju izjemnih dogodkov, kar ima negativen vpliv na gozdove (Lindner in sod., 2010; Seidl in sod., 2017; Mori in Poljanec, 2019). Izjemni dogodki ali ujme v gozdovih povzročajo veliko škodotako za družbo kot tudi lastnika gozda. Razvrednoten les pomeni nižje odkupne cene in zmanjšan ekonomski donos, vpliva pa tudi na tokove lesa in stroške proizvodnje oziroma izvedbe del (Kinnucan, 2016; Sohngena in Tianb, 2016; Humar in sod., 2018; Stare in Ščap, 2019).

Sanacija poškodovanega gozda je nujna (Pravilnik o varstvu gozdov (UL RS, 114/09, 31/16) in zahteva organizirano izvedbo v čim krajšem času, saj se z ustreznim ukrepanjem lahko zelo zmanjša potencialna škoda ali prepreči njeno nadaljnje širjenje (Triplat in sod., 2013). Vendar pri sanaciji pogosto prihaja do oteženega hitrega in učinkovitega ukrepanja (Poljanec in sod., 2014), zaradi prevladujoče majhne in razdrobljene zasebne gozdne posesti. V Sloveniji v zasebnih gozdovih prihaja do nižje realizacije sanitarnega poseka kot v državnih gozdovih, saj se le-ti soočajo z neznanjem in pomanjkanjem primernih tehnologij za delo v poškodovanih gozdovih, kot tudi s premajhno ekonomičnostjo pridobivanja lesa (Poročilo..., 2019). Kot ugotavljajo raziskave je sanacija v veliki meri odvisna od naravnih razmer gozda, socialno ekonomskih razmer zasebnega lastnika gozda in interesa vključenih deležnikov (Weiss, 2004; de Groot in sod., 2021).

Zasebni lastniki gozdov se različno odzivajo na motnje (npr. vetrolom, snegolom, žledolom, prenamnožitev podlubnikov) in tudi različno razumejo problematiko poškodb v gozdovih (Fischer, 2012). Razumevanje ovir s katerimi se zasebni lastniki gozdov soočajo pri sanaciji in vpliv različnih dejavnikov ostaja v Sloveniji neraziskano področje. Odločanje o sanaciji poškodovanih gozdov in optimiranje posegov v gozd je večkriterijski proces, na katerega vplivajo različni dejavniki oziroma cilji, zato so še kako pomembni modeli za podporo odločanju, ki omogočajo strukturiranje in rešitev problema (Grošelj in Zadnik Stirn, 2015). S tovrstnim pristopom bi lahko bistveno izboljšali učinkovitost odzivanja na posledice naravnih motenj, pomembno prispevali k hitri in bolj organizirani sanaciji in okrepili podporo pri odločanju v sonaravnem upravljanju gozdov in gozdnih ekosistemov.

Namen raziskave je predstaviti problematiko z vidika zasebnih lastnikov gozdov na primeru revirja Vodice (GGE Medvode), da bi ocenili dejavnike, ki so vplivali na odločitve o poseku po ujmah. S pomočjo večkriterijske metode DEX smo za zasebne lastnike gozdov ocenili, kakšna naj bi bila izvedba sanacije glede na izbrane dejavnike, nadalje pa izračunali optimalno pot sanacije ter preverili, ali je modelna napoved boljša od dejanske izvedbe sanacije.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Anketiranje zasebnih lastnikov gozdov

V juliju 2019 je bilo v revirju Vodice opravljeno telefonsko anketiranje zasebnih lastnikov gozdov, ki so bili naključno izbrani iz baze »indeks lastnikov gozdov«. V vzorec je bilo vključenih zgolj 16 zasebnih lastnikov gozdov, saj je šlo za testno anketiranje in preverjanje delovanja večkriterijskega modela odločanja in linearnega optimizacijskega programa. Revir Vodice je v letu 2014 prizadel žledolom, kateremu so sledili napadi podlubnikov, kar se izraža v visokem sanitarnem poseku. Zato revir Vodice predstavlja reprezentativen primer za testiranje postavljenega modela, hkrati pa je reprezentativna enota slovenskega zasebnega lastništva gozdov, saj je v njem kar 87 % gozdov v zasebni lasti, povprečna velikost gozdne posesti je 1,9 ha, posest pa je razdrobljena (Iveta, 2017).

Anketa je vsebovala štiri sklope vprašanj, in sicer socio-ekonomske značilnosti anketirancev, značilnosti gozda, vpliv ujm na gozd, ter gospodarjenje z gozdom. Ti podatki so bili dopolnjeni s količinami poseka zaradi sanitarne sečnje v zadnjih desetih letih za posameznega zasebnega lastnika gozda (vir podatkov revirni gozdar, ZGS). Pridobljeni podatki so predstavljali vhodne podatke za DEX model in linearni optimizacijski program.

### 2.2 Dejavniki odločanja o sanaciji gozdov po ujmah

Na podlagi opravljenih anket in pregleda obstoječe literature s področja obravnavanega problema (Stare in sod., 2020) smo oblikovali skupine dejavnikov, ki naj bi vplivale na odločanje zasebnih lastnikov gozdov o sanaciji gozdov po ujmah, jim določili zalogo vrednosti in postavili odločitveno drevo (Slika 1). Model smo postavili v računalniškem programu DEXi.

Kriterij	Zaloga vrednosti
<b>Odločitev za sanacijo</b>	<b>ne sanira</b> ; delno sanira; <b>sanira</b>
— Sociodemografske značilnosti	<b>pasiven lastnik</b> ; lastnik z raznolikimi motivi; <b>proizvodno usmerjen lastnik</b>
— Spol	moški; ženski
— Izobrazba	osnovnošolska; srednješolska; visokošolska
— Zaposlitev	delovno neaktiven; kmet; zaposlen
<b>Posestne značilnosti</b>	<b>zelo neugodne</b> ; <b>neugodne</b> ; <b>ugodne</b> ; <b>zelo ugodne</b>
— Velikost posesti	<b>manj kot 1 ha</b> ; 1-5 ha; <b>5-10 ha</b> ; <b>več kot 10 ha</b>
— Oddaljenost od kraja bivanja	<b>več kot 10 km</b> ; 5-10 km; 1-5 km; <b>manj kot 1 km</b>
— Urejenost lastništva	<b>neurejeno</b> ; <b>urejeno</b>
<b>Trg</b>	<b>neugodno stanje</b> ; povprečno stanje; <b>ugodno stanje</b>
— Cena lesa	<b>nizka</b> ; povprečna; <b>visoka</b>
— Cena storitve	<b>nizka</b> ; povprečna; <b>visoka</b>
<b>Gospodarjenje</b>	<b>slabo gospodarjenje</b> ; povprečno gospodarjenje; <b>zelo dobro gospodarjenje</b>
— redno gospodarjenje z gozdom	<b>ne gospodarji</b> ; občasno gospodarji; <b>redno gospodarji</b>
— sodelovanje z institucijami	<b>ne</b> ; <b>da</b>
— vključenost v združenja	ne; da
— povezovanje z lastniki gozdov	ne; da

**Slika 1:** Odločitveno drevo z zalogami vrednosti v računalniškem programu DEXi.

S pomočjo DEX modela smo za posameznega zasebnega lastnika gozda določili, kako lahko pričakujemo, da bi zasebni lastnik gozda saniral svoj gozd glede na vplivne dejavnike. Za testiranje delovanja modela smo iz posamezne skupine glede na sanacijo gozda (delno sanira ali sanira) izbrali štiri reprezentativne zasebne lastnike gozdov (dva iz skupine »delno sanira«, v nadaljevanju označeno z L1 in L2, in dva iz skupine »sanira«, v nadaljevanju označeno z L3 in L4), ki so predstavljali vhodne podatke za linearni program.

### 2.3 Linearni optimizacijski program

Z linearnim optimizacijskim programom smo želeli poiskati najbolj optimalno pot sanacije za zasebnega lastnika gozda, upoštevajoč maksimalni dobiček ter minimalne stroške. Najprej smo za izbrane zasebne lastnike gozdov, glede na količino njihovega sanitarnega poseka, izračunali

stroške poseka in spravila ter prihodke od prodaje GLS in GLS namenjenih lastni rabi. Cene GLS smo pridobili iz podatkovnih baz Statističnega urada RS. S pomočjo orodja za izračun stroškov WoodChainManager (wcm.gozdis.si) smo izračunali strošek lastnega dela za zasebnega lastnika gozda, stroške izvajalcev del pa pridobili iz baz podatkov Gozdarskega inštituta Slovenije.

Nadalje smo postavili linearni optimizacijski program. Za reševanje smo uporabili Excel-ov dodatek Reševalnik (Excel Solver); cilj je predstavljal maksimalni dobiček (v €), odločitvene spremenljivke pa so bile količine posekanega lesa v posameznem letu (v m<sup>3</sup>). V zadnjem koraku je sledil še modelni izračun za različne načine izvedbe sanacije gozda (povezava linearnega optimizacijskega programa z DEX modelom). V modelnih izračunih smo za varianto »delno sanira« upoštevali 80 % dejanskega poseka in za varianto »sanira«, upoštevali 110 % dejanskega poseka. Modelni izračuni so se nanašali na alternativne načine upoštevanja stroškov in prihodkov pri sanaciji: A1 = prihodki od prodanih GLS, pri čemer zasebni lastnik gozda ne upošteva stroška lastnega dela; A2 = prihodki od GLS (prodaja na trgu in domača raba), pri čemer zasebni lastnik gozda ne upošteva stroška lastnega dela; B1 = prihodki od prodanih GLS, pri čemer zasebni lastnik gozda upošteva strošek lastnega dela; B2 = prihodki od GLS (prodaja na trgu in domača raba), pri čemer zasebni lastnik gozda upošteva strošek lastnega dela; C1 = prihodki od prodanih GLS, pri čemer zasebni lastnik gozda ne upošteva stroška lastnega dela, in upošteva strošek najema izvajalcev del; C2 = prihodki od GLS (prodaja na trgu in domača raba), pri čemer zasebni lastnik gozda upošteva strošek lastnega dela in najema izvajalcev del.

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Med anketiranci prevladujejo moški zasebni lastniki gozdov, povprečna starost znaša 62,6 let, s prevladujočo obliko lastništva en lastnik, in živijo v povprečju 2 km od svojega gozda. Sečnjo in spravilo v največji meri opravijo sami z družinskimi člani. Pri gospodarjenju z gozdom sodelujejo z ZGS in tudi nekaterimi drugimi institucijami, vendar niso povezani v organizacijske oblike na lokalnem nivoju.

Na podlagi rezultatov DEX modela ugotavljamo, da se je hitra in učinkovita sanacija zgodila na večji gozdni posesti z urejenim lastništvom, ki se nahaja bližje kraju bivanja. Kot pomemben dejavnik sanacije se je izkazalo preteklo gospodarjenje in razmere na trgu (predvsem cena GLS) ter sodelovanje z institucijami (Slika 2). Delno sanacijo opravijo zasebni lastniki gozdov, ki z gozdom gospodarijo tudi v razmerah, kadar gozd ne prizadenejo ujme, njihov glavni motiv pa ni zgolj proizvodnja GLS, ampak so njihovi motivi bolj raznoliki. Za gozdove, kjer se sanacija ne izvede, pa so značilni pasivni zasebni lastniki, ki z gozdom ne gospodarijo in predvsem nimajo urejenega lastništva.

Kriterij	Zasebni lastnik gozda, ki ne sanira	Zasebni lastnik gozda, ki delno sanira	Zasebni lastnik gozda, ki v celoti sanira
Odločitev za sanacijo	<b>ne sanira</b>	delno sanira	<b>sanira</b>
Sociodemografske značilnosti	<b>pasiven lastnik</b>	lastnik z raznolikimi motivi	<b>proizvodno usmerjen lastnik</b>
Spol	moški	ženski	moški
Izobrazba	visokošolska	srednješolska	srednješolska
Zaposlitev	delovno neaktiven	zaposlen	kmet
Posestne značilnosti	<b>zelo neugodne</b>	<b>ugodne</b>	<b>zelo ugodne</b>
Velikost posesti	<b>manj kot 1 ha</b>	1-5 ha	<b>več kot 10 ha</b>
Oddaljenost od kraja bivanja	<b>več kot 10 km</b>	1-5 km	<b>manj kot 1 km</b>
Urejenost lastništva	<b>neurejeno</b>	<b>urejeno</b>	<b>urejeno</b>
Trg	<b>neugodno stanje</b>	povprečno stanje	<b>ugodno stanje</b>
Cena lesa	<b>nizka</b>	povprečna	<b>visoka</b>
Cena storitve	<b>visoka</b>	povprečna	<b>nizka</b>
Gospodarjenje	<b>slabo gospodarjenje</b>	povprečno gospodarjenje	<b>zelo dobro gospodarjenje</b>
redno gospodarjenje z gozdom	<b>ne gospodarji</b>	občasno gospodarji	<b>redno gospodarji</b>
sodelovanje z institucijami	<b>ne</b>	<b>da</b>	<b>da</b>
vključenost v združenja	ne	ne	da
povezovanje z lastniki gozdov	ne	ne	da

Slika 2: Rezultati vrednotenja treh različnih variant sanacije z uporabo DEX modela v programu DEXi.

S pomočjo DEX modela in rezultatov anketiranja smo napovedali, kako lahko pričakujemo, da bi zasebni lastniki sanirali svoj gozd. Ugotovili smo, da se zasebni lastnik gozda, ki ni opravil sanacije, uvrsti v skupino »ne sanira«, enajst zasebnih lastnikov gozda se uvrsti v skupino »delno sanira« in štirje lastniki v skupino »sanira«. S temi rezultati smo vstopili v linearni program, da bi poiskali pričakovani dobiček glede na lastnosti posamezne skupine zasebnih lastnikov gozdov. Rezultati linearnega programa za izbrane štiri reprezentativne zasebne lastnike gozdov (L1, L2, L3 in L4) so prikazani v Preglednici 1, kjer »+« pomeni, da model poišče boljšo pot sanacije (pričakovani dobiček je višji), »-« pa pomeni, da je modelna sanacija slabša od dejansko opravljene sanacije (pričakovani dobiček je nižji). V skupini »delno sanira« so z linearnim programom izračunani pričakovani dobički pri sanaciji nižji, kot je bila dejansko opravljena sanacija, vendar zgolj v primerih, kadar ne upoštevamo vrednosti GLS namenjenih lastni rabi. V vseh ostalih primerih je z modelnimi izračuni mogoče poiskati pot sanacije, ki daje višje dobičke.

**Preglednica 1:** Rezultati modelnih izračunov za izbrane reprezentativne zasebne lastnike gozdov za različne načine sanacije gozda, glede na možne načine upoštevanja stroškov in prihodkov pri sanaciji.

	<i>Skupina »delno sanira«</i>		<i>Skupina »sanira«</i>	
	<i>Zasebni lastnik gozda L1</i>	<i>Zasebni lastnik gozda L2</i>	<i>Zasebni lastnik gozda L3</i>	<i>Zasebni lastnik gozda L4</i>
<i>A1</i>	+	+	+	+
<i>A2</i>	+	-	+	+
<i>B1</i>	+	+	+	+
<i>B2</i>	+	-	+	+
<i>C1</i>	+	+	+	+
<i>C2</i>	+	-	+	+

#### 4 SKLEPI

V študiji smo DEX model povezali z linearnim optimizacijskim programom. To se je izkazalo za dobro, saj nam model DEX omogoča napoved za posameznega zasebnega lastnika gozda, kako naj bi glede na izbrane dejavnike saniral svoj gozd. S tem smo zmanjšali čas, ki ga potrebujemo za razumevanje odločitev posameznega zasebnega lastnika gozda in omogočili enakovredno obravnavo vseh zasebnih lastnikov gozdov. Model nam s tem, ko je zasebni lastnik gozda uvrščen v skupino »ne sanira« ali »delno sanira« pove, kdaj bi bila potrebna individualna obravnava zasebnega lastnika gozda, da bi ga spodbudili k izvedbi sanacije. Z rezultati DEX modela pa smo v linearnem optimizacijskem programu preverili, kakšen bi bil lastnikov ekonomski izid. S tem želimo tudi povečati ozaveščenost in razumevanje izračunov stroškov in prihodkov pri sanaciji gozdov ter ponuditi možnost neposredne primerjave alternativnih načinov sanacije.

Iz dobljenih rezultatov se kaže, da značilnosti posameznega zasebnega lastnika gozda, ki smo jih opredelili kot pomembne oz. vplivne na sanacijo, ne pomenijo vedno slabše ali boljše sanacije. Rezultati potrjujejo razlike med posameznimi lastniki gozdov in skupinami lastnikov gozdov, ter njihovo izvedbo sanacije. S predstavljenimi modeli želimo prispevati k boljšemu napovedovanju vpliva različnih dejavnikov na izvedbo sanacije in zasebnim lastnikom gozdov pomagati pri ukrepanju ob sanaciji gozdov. Nadalje bi lahko obstoječo metodologijo nadgradili

z vključitvijo negotovosti. Odprto ostaja tudi vprašanje, kako vrednotiti škodo, ki bi se lastniku gozda zgodila, če ne opravi sanacije.

## 5 VIRI

- De Groot M., Diaci J.j, Kandare K., Krajnc N., Pisek R., Ščap Š., Stare D., Ogris N. Private forest owner characteristics affect European spruce bark beetle management under an extreme weather event and host tree density. *Forests* 2021, 12, 346.
- Fischer P.A. 2012. Identifying policy target groups with qualitative and quantitative methods: the case of wildfire risk on nonindustrial private forest lands. *Forest Policy and Economics*, 25: 62–71.
- Grošelj P., Zadnik Stirn L. 2015. The environmental management problem of Pohorje, Slovenia: A new group approach within ANP – SWOT framework. *Journal of Environmental Management*, 161: 106–112
- Humar M., Kržišnik D., Lesar B. 2018. Lastnosti lesa lubadark. *Gozdarski vestnik*, 76, 5–6: 227–236.
- Iveta N. 2017. Ocena pripravljenosti zasebnih lastnikov gozdov za poslovno sodelovanje pri gospodarjenju z gozdom na primeru revirja Vodice: magistrsko delo - 2. stopnja. (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo). Ljubljana, samozaložba: 137 str.
- Kinnucan W.H. 2016. Timber price dynamics after a natural disaster: hurican Hugo revisited. *Journal of Forest Economics*, 25: 115–129.
- Lindner M., Maroschek M., Netherer S., Kremer A., Barbati A., Garcia-Gonzalo J., Seidl R., Delzon S., Corona P., Kolström M., Lexer M.J., Marchetti M. 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 259: 698–709.
- Mori J., Poljanec A. 2019. Trenutne aktivnosti in izzivi pri preprečevanju škod v gozdovih zaradi ekstremnih vremenskih pojavov. V: *Gozd in les kot priložnost za regionalni razvoj*. (Zbirka Studia Forestalia Slovenica, 164). Bončina A. in Oven P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 99–112.
- Poljanec A., Ščap Š., Bončina A. 2014. Količina, struktura in razporeditev sanitarnega poseka v Sloveniji v obdobju 1995–2012. *Gozdarski vestnik*, 72, 3: 131–147.
- Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2018. 2019. Zavod za gozdove Slovenije [http://www.zgs.si/fileadmin/zgs/main/img/PDF/LETNA\\_POROCILA/2018\\_Porocilo\\_o\\_gozdovih.pdf](http://www.zgs.si/fileadmin/zgs/main/img/PDF/LETNA_POROCILA/2018_Porocilo_o_gozdovih.pdf) (15. 5. 2020)
- Seidl R., Thom D., Kautz M., Martin-Benito D., Peltoniemi M., Vacchiano G., Wild J., Ascoli D., Petr M., Honkaniemi J., Lexer M.J., Trotsiuk V., Mairota P., Svoboda M., Fabrika M., Nagel T.A., Reyser C.P.O. 2017. Forest disturbances under climate change. *Nature Climate Change*, 7: 395–402.
- Sohngena B., Tianb X. 2016. Global climate change impacts on forests and markets. *Forest Policy and Economics*, 72: 18–26.
- Stare D., Pezdevšek Malovrh Š., Grošelj P. 2020. Ovire in rešitve pri sanaciji v ujmah poškodovanih zasebnih gozdov. *Acta Silvae et Ligni* 123: 13–30.
- Stare D., Ščap Š. 2019. Odkupne cene gozdnih lesnih sortimentov iz zasebnih gozdov v Sloveniji. *Gozdarski vestnik* 77, 4: 170–178.
- Triplat M., Piškur M., Humar M. 2013. Posebnosti skladiščenja lesa, pridobljenega pri sanaciji, ter upoštevanje varstveno-sanitarnih posebnosti pri sanaciji velikih poškodb. *Gozdarski vestnik*, 71, 1: 39–50.
- Weiss G. 2004. The political practice of mountain forest restoration-comparing restoration concepts in four European countries. *Forest Ecology and Management*, 195, 1–2: 1–13.

## HORTIKULTURA

### Odziv ameriške borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) sorte 'Brigitta' na gojenje v loncih

Tina SMRKE<sup>1,\*</sup>, Robert VEBERIČ<sup>1</sup>, Metka HUDINA<sup>1</sup>, Jerneja JAKOPIČ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [tina.smrke@bf.uni-lj.si](mailto:tina.smrke@bf.uni-lj.si)

#### **Odziv ameriške borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) sorte 'Brigitta' na gojenje v loncih**

**Izveček:** V pridelavi ameriške borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) se, zaradi specifičnih zahtev po nizkem pH in visokem deležu organske snovi v tleh ter pomanjkanju tovrstnih naravnih rastišč, uvajajo nove tehnologije pridelave. Sajenje rastlin v prilagojen substrat je v zadnjih letih precej pridobilo na priljubljenosti zaradi lažjega nadzora pH vrednosti substrata, ki je lahko eden glavnih omejujočih dejavnikov rasti ameriških borovnic. Leta 2018 smo dvajset rastlin sorte 'Brigitta' posadili v lonce in na greben in leta 2020 izvedli poskus. S kontinuiranimi meritvami smo spremljali temperaturo substrata in količino vode v tleh, merili smo rast in ovrednotili pridelek ter vsebnost sladkorjev, organskih kislin in skupnih fenolnih spojin v plodovih. Temperatura substrata je v loncih dosegla višje vrednosti kot v grebenu, medtem ko je bila količina vode večja v grebenu. V prirastu rastlin, pridelku in vsebnosti sladkorjev, organskih kislin in skupnih fenolnih spojin ter razmerju med skupnimi sladkorji in organskimi kislinami ni prišlo do značilnih razlik med obravnavanjema. Rezultati nakazujejo, da rastline posajene v 60-l loncih niso trpele temperaturnega in sušnega stresa zaradi manjše prostornine substrata, kar je pozitiven obet za nadaljnje raziskave in predvsem intenzivno pridelavo ameriških borovnic. Naša raziskava je prva, ki je primerjala pridelavo ameriških borovnic v loncih in na grebenu in njun vpliv na mikroklimatske razmere substrata, rast, pridelek in vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov v plodovih.

**Ključne besede:** lonci; temperatura substrata; količina vode v substratu; pridelek; kakovost plodov

#### **Response of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) 'Brigitta' variety to container production**

**Abstract:** Due to the specific requirements for low pH value and a high proportion of organic matter in the soil and the lack of such natural habitats, new production technologies are being introduced in the production of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Planting in a custom substrate has gained popularity in recent years due to the easier control of substrate pH value, which may be one of the main limiting factors that affect northern highbush blueberry growth. In 2018, twenty plants of the 'Brigitta' variety were planted in pots and on the ridge and performed an experiment 2020. With continuous measurements, the substrate temperature and the amount of water in the substrate were monitored. Growth, yield and the content of sugars, organic acids and total phenolic compounds in the fruit were measured. The substrate temperature reached higher values in the pots than in the ridge, while the amount of water was higher in the ridge. There were no significant differences between treatments in plant growth, yield, and content of sugars, organic acids and total phenolic compounds and sugar/organic acid ratio. The results suggest that plants planted in 60-liter pots did not suffer from temperature or drought stress due to the smaller substrate volume, which is a positive

conclusion for further researches and, above all, intensive northern highbush blueberry production. Our study was the first to compare the northern highbush blueberry production in pots and on the ridge and their impact on the substrate microclimatic conditions, growth, yield and the content of primary and secondary metabolites in fruits.

**Key words:** container; substrate temperature; substrate water content; yield; fruit quality

## 1 UVOD

Ameriška borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) je sadna vrsta, ki je bila kultivirana konec 19. st. na območju Floride in Nove Anglije, sprva kot posamezne rastline in kmalu kot gojeni nasadi, z namenom žlahtnjenja in intenzivnega gojenja. V Evropi so prve rastline posadili leta 1923 na Nizozemskem, kmalu pa so sledile tudi druge evropske države, kot so Nemčija, Poljska, Italija, Francija in Španija (Retamales in Hancock, 2018). Danes se največ ameriških borovnic v Evropi pridelava na Poljskem, kjer so imeli leta 2018 kar 8089 ha nasadov, medtem ko smo jih imeli v Sloveniji 60 ha (FAOSTAT, 2020).

Ameriška borovnica dosega visoke pridelke in optimalno rast v primeru, da ima zagotovljen nizek pH substrata (4,5 do 5,5), visok delež organske snovi (2 do 3 %) in, da so tla dobro odcedna (Whidden, 2008; Retamales in Hancock, 2018). Vse tri zahteve je v praksi, pri običajnem sajenju v tla zelo težko vzdrževati, zaradi velike raznolikosti v lastnostih tal, zato se v zadnjih letih povečuje zanimanje za sajenje rastlin v prilagojen substrat. Sajenje ameriških borovnic v lonce predstavlja alternativo gojenju v tleh, s čimer lahko preko izbranega substrata in nadzorovanega namakanja ter gnojenja lažje nadzorujemo pH tal, delež organske snovi in preprečujemo zastajanje vode v tleh (Kingston in sod., 2017). Omenjen način pridelave omogoča premikanje rastlin in s tem spreminjanje gostote sajenja, glede na prostornino grmov (Whidden, 2008) in hkrati gojenje na lokacijah z neprimernimi lastnosti tal za pridelavo rastlin, kot so prisotnost škodljivcev, slanost tal, slabo oz. ne rodna tla in prisotnost toksičnih snovi (Olympios, 1999; Voogt in sod., 2014). Slabost gojenja v loncih je omejena rast korenin s čimer se zmanjša absorpcijska površina za sprejem vode in hranil ter vprašljiva možnost pridelave na dolgi rok zaradi krajše življenjske dobe rastlin. Pri izbiri loncev manjših volumnov lahko ob pojavu močnega vetra pride tudi do prevračanja rastlin, kar se pri sajenju v tla načeloma ne bi moglo zgoditi (Whidden, 2008). Sajenje rastlin v lonce hkrati predstavlja dodaten strošek v pridelavi ameriških borovnic (Fang in sod., 2020).

V raziskavah na temo gojenja ameriških borovnic v loncih, so avtorji iskali predvsem optimalno prostornino loncev in preverjali njihov vpliv na pridelek (Motomura in sod., 2016), rast in fiziološke procese (Poorter in sod., 2012) ter na razporejanje vode v substratu (Owen in Altland, 2008). Šota, kokosova vlakna, borovo lubje in perlit so najbolj pogosto raziskane in do danes tudi uveljavljene sestavine substratov, ki se uporabljajo v spremenljivih deležih (odvisno od sorte za pridelavo ameriških borovnic v loncih (Kingston in sod., 2017, 2020). V nekaterih raziskavah so ugotavljali tudi vpliv različne pH vrednosti substrata (Jiang in sod., 2019) in gnojenja (Li in Bi, 2019) na rast, količino pridelka, čas zorenja, vsebnost skupne topne snovi v plodovih, fotosintezo in vsebnost mikroelementov v listih pri rastlinah ameriških borovnic posajenih v lonce.

Dosedanji rezultati o pridelavi ameriških borovnic v loncih navajajo predvsem razlike v odzivu sort na omenjen način pridelave, na nivoju pridelka in časa zorenja (Ciordia in sod., 2002), medtem ko v znanju o primerjavi gojenja rastlin v loncih in na grebenih ostajajo vrzeli. Namen naše raziskave je torej ugotoviti kako sajenje v lonce in na greben vpliva na mikrorastiščne razmere substrata ter primerjati odziv rastlin sorte 'Brigitta' na takšen način sajenja na nivoju rasti in pridelka.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Zasnova poskusa

Poskus je bil izveden leta 2020 na 2-letih starih rastlinah ameriške borovnice na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani (nadmorska višina: 295 m, zemljepisna širina: 46°05' S, zemljepisna dolžina: 14°47' V). Dvajset, vizualno enakih rastlin sorte 'Brigitta' smo maja 2018 posadili v črne 60-l lonce in na greben (10 rastlin v enem obravnavanju), na razdaljo 0,5 m v vrsti ter 2 m med vrstama, z orientacijo S-J. Substrat je bil sestavljen iz šote, smrekove žagovine in poljske zemlje (1/3:1/3:1/3, v/v/v). Tla smo prekrili z belo polipropilensko folijo. Rastline smo po potrebi kapljično namakali z deževnico in gnojili devetkrat v rastni dobi, od začetka aprila do konca junija (šestkrat z amonijevim sulfatom ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in trikrat z monokalijevim fosfatom (MKP)). Po koncu cvetenja (za optimalno oploditev) do začetka odpadanja listov smo rastline prekrili s protitočno mrežo (dvojna črna vzdolžna in dvojna (črna in zelena) prečna vlakna z velikostjo mrežnega okenca 6 x 7 mm) z namenom zaščite pridelka pred točo in ptiči.

### 2.2 Meritve temperature in količine vode v tleh

Temperaturo in količino vode v tleh smo spremljali s kontinuiranimi meritvami s senzorji talne temperature DS18B20 (Dallas Semiconductor, Dallas, Texas) in senzorji talne vlage EC5 (Decagon Devices, Pullman, ZDA). Podatki se shranjujejo v merilnem instrumentu, od koder so avtomatično poslani v IoT oblak, kar nam omogoča neprestano dostopnost ter sprotno kontrolo meritev temperaturnih razmer in vlažnosti v tleh.

### 2.3 Meritve vegetativne rasti in količine pridelka

Velikost rastlin smo v letu 2020 izmerili dvakrat, in sicer spomladi (16. 3. 2020) in jeseni (9. 10. 2020). Z merilnim trakom smo rastlinam izmerili višino (v) in dve širini (v smeri vrste in pravokotno na vrsto) ter nato izračunali prostornino grmov (V) po formuli:

$$V (dm^3) = \frac{\text{višina (cm)} \times \frac{1}{2} \text{ širina 1 (cm)} \times \frac{1}{2} \text{ širina 2 (cm)} \times \pi}{1000}$$

Ob vsakem obiranju smo plodove v laboratoriju stehali na natančni tehtnici (KERN ALS, Balingen, Nemčija) za vsako rastlino posebej. Za skupni pridelek posamezne rastline smo seštelili maso plodov vseh petih obiranj. Plodove istega obravnavanja smo nato združili, da smo dobili povprečen vzorec, jih zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -20 °C.

### 2.4 Ekstrakcija primarnih in sekundarnih metabolitov

Za ekstrakcijo posameznih sladkorjev in organskih kislin smo uporabili v manjši meri spremenjeno metodo avtorjev Mikulic-Petkovsek in sod. (2007). Ekstrakcijo smo naredili iz povprečnega vzorca plodov, obranih ob obiranju z največjim pridelkom, v petih ponovitvah pri vsakem obravnavanju. Sveže plodove smo sesekljali z nožem, 1 gram homogenega vzorca prenesli v centrifugirko in ga prelili s 4 ml dvakrat destilirane vode. Maso vsakega posameznega vzorca smo na štiri decimalke natančno zabeležili za nadaljnje izračune. Vzorce smo premešali na vortexu in jih pustili 30 min, da se ekstrahirajo ob stalnem mešanju (stresalnik Unimax 1010, heidolph) na sobni temperaturi. Po končani ekstrakciji smo vzorce 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 10.000 obr min<sup>-1</sup> in jih prefiltrirali v vialo skozi celulozne filtre (Chromafil A-20/25, Macherey-Nagel, Düren, Nemčija). Vzorce smo shranili na -20 °C do analiz z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC).



Pri ekstrakciji fenolnih spojin smo se izhajali iz metode Mikulic-Petkovsek in sod. (2010) z manjšimi spremembami. Ekstrakcijo smo naredili iz istih vzorcev in enakega števila ponovitev kot pri sladkorjih in organskih kislinah. Svež vzorec smo drobno sesekljali in 2 g zatehtali v 10 ml centrifugirko. Vsakemu vzorcu smo dodali štiri ml ekstrakcijske raztopine (70 % metanol, s 3 % metanojske kisline) in vse premešali. Za ekstrakcijo fenolnih spojin iz celic, smo vzorce za eno uro položili v hlajeno ultrazvočno kopel in nato 10 minut centrifugirali na 10.000 obr min<sup>-1</sup> in 4 °C (Eppendorf 5810 R, Hamburg, Nemčija). Supernatant smo prefiltrirali skozi 0,2 µm poliamidne filtre Chromafil AO-20/25 (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija) v vialo in jih shranili na -20 °C do nadaljnjih analiz.

## 2.5 Analitične metode

Za analizo posameznih sladkorjev smo uporabili Vanquish HPLC (Thermo Scientific), povezan z RI plus (RefractoMax520) detektorjem. Pogoji analize so bili naslednji: temperatura kolone (Rezex RCM-monosaharid Ca + 2 % (300 mm x 7,8 mm), Phenomenex, Kalifornija, ZDA) je znašala 65 °C, hitrost pretoka je bila 0,6 ml min<sup>-1</sup>, volumen injiciranega vzorca je bil 20 µl, uporabljena mobilna faza je bila dvakrat destilirana voda in analiza posameznega vzorca je trajala 30 minut. Sladkorje smo identificirali s primerjavo retencijskih časov z eksternimi standardi za fruktozo, glukozo in saharozo (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švica) in jih izrazili kot mg g<sup>-1</sup> sveže mase.

Organske kisline smo analizirali z Vanquish HPLC (Thermo Scientific) sistemom. Separacija je potekala na koloni Rezex ROA-Organic acid H + 8 % (150 mm x 7,8 mm), ki jo je izdelal Phenomenex, pri temperaturi 65 °C. UV detektor je bil nastavljen na 210 nm in volumen injiciranega vzorca je znašal 20 µl, katerega analiza je trajala 15 minut pri pretoku 0,6 ml min<sup>-1</sup>. Mobilna faza je bila 4 mM žveplova kislina, pripravljena v dvakrat destilirani vodi. Organske kisline smo poimenovali glede na primerjavo retencijskih časov z eksternimi standardi za citronsko, vinsko, jabolčno, kininsko in šikimsko kislino in jih izrazili kot mg g<sup>-1</sup> sveže mase.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih smo ovrednotili z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta. V centrifugirke smo dali 7,9 ml dvakrat destilirane vode, 100 µl ekstrakta in 500 µl Folin-Ciocalteu reagenta. V slepi vzorec smo namesto ekstrakta dodali 100 µl 100 % metanola, ostali reagenti so bili enaki. Centrifugirke smo pustili nekaj minut na sobni temperaturi in nato dodali 1,5 ml 20 % natrijevega karbonata. Vzorce smo dobro premešali in jih nato 30 min segrevali v pečici na 40 °C. Ko so se vzorci ohladili na sobno temperaturo smo jim na spektrofotometru (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific) izmerili absorbanco pri 765 nm. Vsebnost skupnih fenolov smo izrazili v ekvivalentih galne kisline (mg) na 100 g svežega vzorca.

## 2.6 Statistična obdelava podatkov

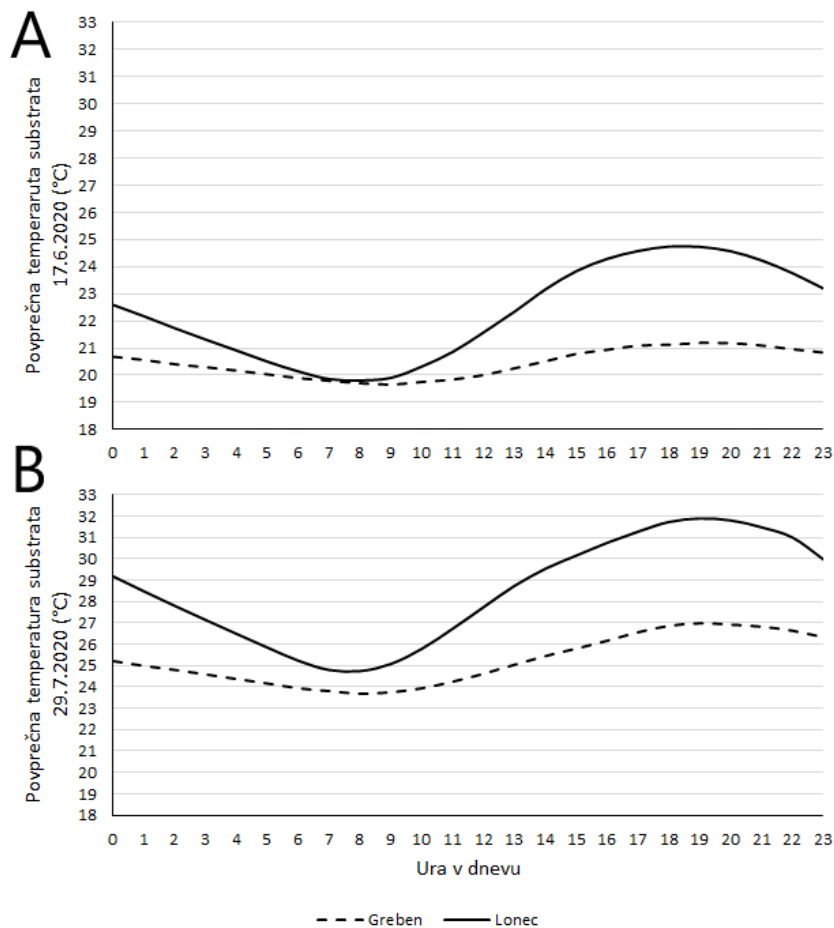
Statistično analizo podatkov smo izvedli v programu R i386 4.0.4 (R-Project.Org, 2021). Statistično značilne razlike med obravnavanji so bile ugotovljene z uporabo enosmerne analize variance (ANOVA) in t-testa, pri  $p < 0,05$ . Značilne razlike med obravnavanji so označene z različnimi črkami.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 Mikrorastiščne razmere substrata

Povprečna dnevna temperatura substrata ( $^{\circ}\text{C}$ ) ter povprečna temperatura substrata od 1. aprila do 30. junija v loncih in grebenu sta prikazani na Sliki 1 in Sliki 2. V poletnem dnevu (17.6.2020) z maksimalno dnevno temperaturo zraka  $26,8^{\circ}\text{C}$  je bila razlika med temperaturo substrata v loncih in grebenu do  $3,5^{\circ}\text{C}$  (A) in v vročem poletnem dnevu (maksimalna dnevna temperatura zraka  $33,2^{\circ}\text{C}$ ) do  $5^{\circ}\text{C}$  (B). Hkrati je opazen večji razpon med minimalno in maksimalno temperaturo v loncih v primerjavi z grebenom, tako v posameznem dnevu kot tudi na mesečni ravni.

Rezultati nepretrganih meritev količine vode v tleh, od začetka aprila do konca junija 2020 (Slika 1), ko smo začeli obirati plodove, kažejo na stalno večjo količino vode v grebenu, vendar so bile te razlike majhne in rastline posajene v loncih, zaradi manjše količine vode niso trpele sušnega stresa.



**Slika 1:** Povprečna temperatura substrata ( $^{\circ}\text{C}$ ) v loncih in grebenu po urah na dan 17. junij 2020 (A) ter 29. julij 2020 (B).

#### 3.2 Rast rastlin

Prirast rastlin v letu 2020 smo izračunali tako, da smo od jesenskih meritev velikosti rastlin odšteli spomladanske meritve (prostornina v  $\text{dm}^3$ ). Med rastlinami obeh obravnavanj nismo ugotovili značilnih razlik v rasti, kljub večjemu povprečnemu prirastu rastlin posajenih v greben ( $138,6 \text{ dm}^3$ ) v primerjavi z rastlinami v loncih ( $108,4 \text{ dm}^3$ ) (Preglednica 1).

**Preglednica 1:** Prirast rastlin ( $\text{dm}^3$ ), pridelek ( $\text{g rastl.}^{-1}$ ) in vsebnost skupnih sladkorjev ( $\text{mg g}^{-1}$ ), skupnih organskih kislin ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ter skupnih fenolnih spojin ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ter razmerje med skupnimi sladkorji in organskimi kislinami v plodovih rastlin posajenih v lonce in na greben. Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako desetih ponovitev za prirast in pridelek ter petih ponovitev za skupne sladkorje, organske kisline, fenolne spojine ter razmerje med skupnimi sladkorji in kislinami pri vsakem obravnavanju. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med obravnavanji glede na t-test pri  $\alpha < 0,05$ .

	<i>Lonce</i>	<i>Greben</i>	
<i>Prirast (<math>\text{dm}^3</math>)</i>	$108,4 \pm 35,1$	$138,6 \pm 55,0$	NS
<i>Pridelek (<math>\text{g rastl.}^{-1}</math>)</i>	$459,1 \pm 110,9$	$565,1 \pm 147,3$	NS
<i>Skupni sladkorji (<math>\text{mg g}^{-1}</math>)</i>	$57,78 \pm 1,25$	$54,17 \pm 3,36$	NS
<i>Skupne organske kisline (<math>\text{mg g}^{-1}</math>)</i>	$17,49 \pm 0,28$	$17,41 \pm 0,33$	NS
<i>Skupne fenolne spojine (<math>\text{mg g}^{-1}</math>)</i>	$1,31 \pm 0,17$	$1,51 \pm 0,17$	NS
<i>Razmerje sladkorji/organske kisline</i>	$3,30 \pm 0,08$	$3,11 \pm 0,21$	NS

### 3.3 Pridelek

Zaradi postopnega zorenja plodov smo rastline obeh obravnavanj obirali petkrat, in sicer od 29.6.2020 do 27.7.2020. V Preglednici 1 je prikazan povprečen pridelek na rastlino pri vsakem obravnavanju ( $\text{g rastl.}^{-1}$ ). Pridelek rastlin posajenih v grebenu ( $565,1 \text{ g rastl.}^{-1}$ ) je bil glede na podatke večji kot pridelek rastlin v loncih ( $459,1 \text{ g rastl.}^{-1}$ ), vendar med njima ni bilo statistično značilnih razlik.

### 3.4 Vsebnost posameznih sladkorjev in organskih kislin v plodovih

Med enostavnimi sladkorji smo v plodovih ameriške borovnice sorte 'Brigitta' identificirali saharozo, glukozo in fruktozo. Po vsebnosti sicer prevladuje fruktoza ( $29,1 \text{ mg g}^{-1}$ ), sledi ji glukozo ( $19,8 \text{ mg g}^{-1}$ ) in nato saharozo ( $7,0 \text{ mg g}^{-1}$ ). Vsebnost saharoze in fruktoze se med plodovi različnih obravnavanj ni značilno razlikovala, medtem ko je bila vsebnost glukoze značilno višja v plodovih rastlin v loncih ( $20,8 \text{ mg g}^{-1}$ ) v primerjavi s plodovi rastlin posajenih v grebenu ( $18,8 \text{ mg g}^{-1}$ ). Vsebnost skupnih sladkorjev se med plodovi rastlin gojenih v loncih in na grebenu ni značilno razlikovala (Preglednica 1).

Pri skupnih organskih kislinah v vsebnosti ni prišlo do značilnih razlik med plodovi različnih obravnavanj (Preglednica 1). Med organskimi kislinami je bila v plodovih najbolj zastopana citronska kislina, kateri so po vsebnosti sledile kininska, vinska, jabolčna in oksalna kislina.

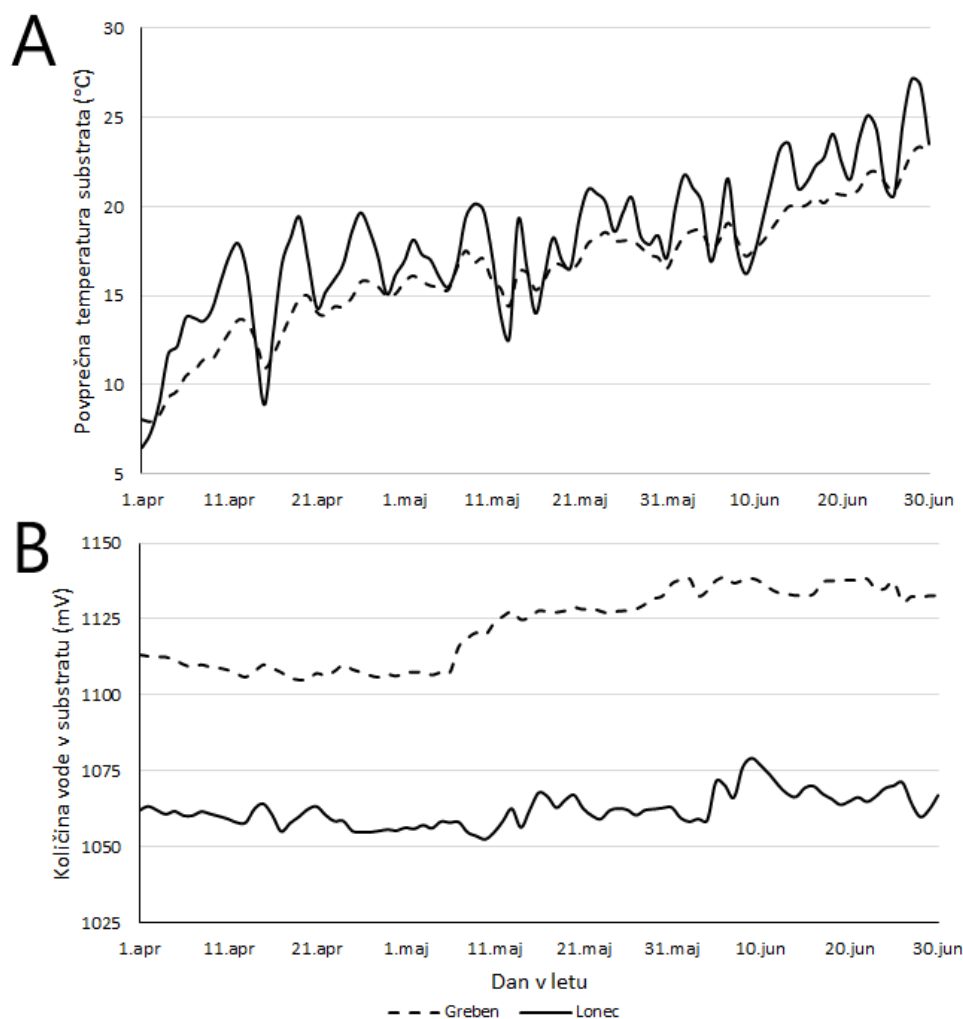
Razmerje med vsebnostjo skupnih sladkorjev in organskih kislin je prikazano v Preglednici 1. V razmerju ni prišlo do značilnih razlik med plodovi obeh obravnavanj.

### 3.5 Vsebnost skupnih fenolnih spojin v plodovih

Spektrofotometrično izmerjena vsebnost skupnih fenolnih spojin je prikazana v Preglednici 1. Vsebnost se med plodovi obeh obravnavanj ni značilno razlikovala, saj je pri loncih znašala  $1,31 \text{ mg g}^{-1}$  in pri grebenu  $1,51 \text{ mg g}^{-1}$ .

## 4 DISKUSIJA

Na temo pridelave ameriških borovnic v loncih je že bilo opravljenih nekaj raziskav, vendar še nobena ni primerjala gojenja v loncih in na grebenu ter preverjala vpliv takšnega načina gojenja na temperaturo substrata in količino vode v substratu. V loncih se je substrat v povprečju segrel do višje temperature kot substrat v grebenu, z največjimi razlikami v popoldanskih urah (Slika 2). Hkrati se substrat v loncih hitreje segreva in ohlaja, na kar nakazuje večja razlika med minimalno in maksimalno temperaturo v loncih, v primerjavi z grebenom. Lonci imajo napram grebenu večjo površino, ki je izpostavljena soncu glede na prostornino substrata in zato lahko temperatura substrata hitreje ter bolj izrazito niha (Poorter in sod., 2012). Markham in sod. (2011) poročajo, da na višjo temperaturo substrata vpliva tudi črna barva loncev. Količina substrata in hkrati tudi vode je v loncih omejena s samo prostornino loncev, kar pomeni, da je količina razpoložljive vode manjša in se hitreje porabi v primerjavi z grebenom (Poorter in sod., 2012).



**Slika 2:** Povprečna temperatura substrata (°C; A) ter količina vode v substratu (mV; B) v loncih in grebenu po dnevih od 1. aprila do 30. junija 2020.

Prirast rastlin v rastni dobi in povprečen pridelek na rastlino sta bila glede na podatke v korist grebena, vendar so bile razlike majhne in niso bile statistično značilne. Lonci uporabljeni v našem poskusu so bili dovolj veliki, da se lahko po prostornini substrata in posledično razvoju koreninskega sistema, dovolj približajo prostornini v grebenu, kar je rastlinam v loncih zagotavljalo ustrezno preskrbo z vodo. To je vodilo do enako intenzivne rasti in količine

pridelka. Tudi Cantliffe (2018) navaja, da se z večanjem prostornine loncev povečujeta prirast nadzemnega dela rastline in korenin. Spiers (1995) poroča, da temperaturi substrata 27 °C in 38 °C, vplivata na omejeno rast poganjkov ameriške borovnice, do česar pa ni prišlo v našem poskusu, z najvišjimi temperaturami substrata v loncih v poletnih mesecih, ki niso presegale 32 °C. Vpliv pridelave ameriških borovnic v loncih na pridelek je bil do danes ovrednoten le z vidika odziva različnih sort (Ciordia in sod., 2002; Li in Bi, 2019) in odziva rastlin na različne prostornine loncev (Motomura in sod., 2016).

Glede na to, da gojenje v loncih ni značilno vplivalo na prirast in pridelek, je pričakovano, da tudi na nivoju kemične sestave plodov ni prišlo do značilnih razlik. Milivojević in sod. (2016) navajajo, da je vsebnost skupnih sladkorjev in organskih kislin v plodovih v največji meri odvisna od zrelosti plodov in šele nato od okoljskih razmer. Razmerje med vsebnostjo skupnih sladkorjev in organskih kislin vpliva na okus plodov, in sicer, višje kot je razmerje, bolj sladek je plod in obratno. Na samo razmerje vpliva visoka vsebnost sladkorjev ali majhna vsebnost organskih kislin (Zhang et al., 2020) in v naši raziskavi do razlik v okusu med obravnavanema ni prišlo. Dejstvo, da med rastlinami različnih načinov sajenja ni bilo značilnih razlik v vsebnosti skupnih fenolnih spojin v plodovih nakazuje, da rastline v loncih verjetno niso bile izpostavljene temperaturnemu in sušnemu stresu, ki bi lahko nastal kot posledica manjše prostornine substrata napram grebenu. Hkrati so bile rastline v času izvedbe poskusa stare šele 2 leti in še niso razvile polnega rastnega volumna, zato je 60 l substrata več kot zadostovalo potrebam rastlin.

## 5 SKLEPI

Rezultati opravljene raziskave nakazujejo, da je gojenje v 60-l loncih lahko učinkovit način pridelave ameriških borovnic, kjer omejena prostornina substrata nima negativnega vpliva na rast, pridelek in vsebnost primarnih ter sekundarnih metabolitov v plodovih. Ob tem je potrebno poudariti, da ima vsaka tehnologija pridelave določene prednosti in slabosti, vendar njihovo preučevanje ni bil predmet naše raziskave. Za nadaljnje raziskave ostajata odprti dve vprašanji, in sicer: 1.) Kljub obetavnim rezultatom je potrebno spremljati in ovrednotiti opisan način pridelave tudi v prihajajočih letih, 2.) in hkrati se pojavlja vprašanje o življenjski dobi rastlin gojenih na ta način.

## 6 VIRI

- Cantliffe, D. J. (2018). Pre- and Postharvest Practices for Improved Vegetable Transplant Quality. *HortTechnology*, 3(4), 415–418. <https://doi.org/10.21273/horttech.3.4.415>
- Ciordia, M., Díaz, M. B., & García, J. C. (2002). Blueberry Culture Both in Pots and Under Italian-Type Tunnels. *Acta Horticulturae*, 574, 123–127. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2002.574.17>
- Fang, Y., Nunez, G. H., da Silva, M. N., Phillips, D. A., & Munoz, P. R. (2020). A review for southern highbush blueberry alternative production systems. *Agronomy*, 10(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10101531>
- Jiang, Y., Zeng, Q., Wei, J., Jiang, J., Li, Y., Chen, J., & Yu, H. (2019). Growth, fruit yield, photosynthetic characteristics, and leaf microelement concentration of two blueberry cultivars under different long-term soil pH treatments. *Agronomy*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy9070357>
- Kingston, P. H., Scagel, C. F., & Bryla, D. R. (2017). Suitability of sphagnum moss, coir, and douglas fir bark as soilless substrates for container production of highbush blueberry. *HortScience*, 52(12), 1692–1699. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12374-17>
- Kingston, P. H., Scagel, C. F., Bryla, D. R., & Strik, B. C. (2020). Influence of perlite in peat- And coirbased media on vegetative growth and mineral nutrition of highbush blueberry. *HortScience*, 55(5), 658–663.

<https://doi.org/10.21273/HORTSCI14640-19>

- Li, T., & Bi, G. (2019). Container production of southern highbush blueberries using high tunnels. *HortScience*, 54(2), 267–274. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13639-18>
- Markham, J. W., Bremer, D. J., Boyer, C. R., & Schroeder, K. R. (2011). Effect of container color on substrate temperatures and growth of red maple and redbud. *HortScience*, 46(5), 721–726. <https://doi.org/10.21273/hortsci.46.5.721>
- Milivojević, J., Radivojević, D., Nikolić, M., & Maksimović, J. D. (2016). Changes in fruit quality of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*) during the ripening season. *Acta Horticulturae*, 1139, 657–664. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1139.113>
- Motomura, S., Cho, A., Hamasaki, R., Akahoshi, K., Kawabata, A., Kawabata, A., & Nakamoto, S. (2016). Evaluation of pot size for greenhouse production of ‘Misty’ southern highbush blueberry in Volcano, Hawai‘i. *Fruit, Nut, and Beverage Crops, November*, 1–4.
- Olympios, C. M. (1999). Overview of soilless culture: advantages, constraints, and perspectives. *Protected Cultivation in the Mediterranean Region*, 31, 307–324.
- Owen, J. S., & Altland, J. E. (2008). Container height and Douglas fir bark texture affect substrate physical properties. *HortScience*, 43(2), 505–508. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.2.505>
- Petkovsek, M. M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2010). The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2366–2378. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4093>
- Petkovsek, M. M., Stampar, F., & Veberic, R. (2007). Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 114(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.05.004>
- Poorter, H., Bühler, J., Van Dusschoten, D., Climent, J., & Postma, J. A. (2012). Pot size matters: A meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Functional Plant Biology*, 39(11), 839–850. <https://doi.org/10.1071/FP12049>
- r-project.org. (2021). <https://www.r-project.org/>
- Retamales, J. B., Hancock, J. F. (2018). *Blueberries* (2nd editio). Cabi.
- Spiers, J. M. (1995). Substrate temperatures influence root and shoot growth of southern highbush and rabbiteye blueberries. *HortScience*, 30(5), 1029–1030. <https://doi.org/10.21273/hortsci.30.5.1029>
- Voogt, W., Van Dijk, P., Douven, F., & Van Der Maas, R. (2014). Development of a soilless growing system for blueberries (*vaccinium corymbosum*): Nutrient demand and nutrient solution. *Acta Horticulturae*, 1017(December), 215–221. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1017.27>
- Whidden, A. (2008). Commercial blueberry production methods in Hillsborough County. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 121(813), 36–37.
- Zhang, J., Nie, J. yun, Li, J., Zhang, H., Li, Y., Farooq, S., Bacha, S. A. S., & Wang, J. (2020). Evaluation of sugar and organic acid composition and their levels in highbush blueberries from two regions of China. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(9), 2352–2361. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63236-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63236-1)

## The effect of sunlight conditions in the canopy on flower bud sugars, fruit quality and yield of sweet cherry

Matej VOŠNJAK<sup>1\*</sup>, Valentina USENIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Chair for Fruit Growing, Viticulture and Vegetable Growing, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [matej.vosnjak@bf.uni-lj.si](mailto:matej.vosnjak@bf.uni-lj.si)

### The effect of sunlight conditions in the canopy on flower bud sugars, fruit quality and yield of sweet cherry

**Abstract:** Sweet cherry trees (*Prunus avium* L.) of the cultivar 'Grace Star' were either pruned in summer, to manipulate sunlight conditions in the canopy, or not pruned (control). Sunlight conditions were evaluated by measuring photosynthetic photon flux density (PPFD) before and after summer pruning at three canopy sections (inner, outer, and upper). The response of sweet cherry trees to different sunlight conditions in the canopy was investigated by analyzing the sugar content in flower bud at three sections of the canopy using high-performance liquid chromatography. In addition, fruit quality parameters (skin color and weight) and yield were evaluated. The lowest PPFD values were measured in the inner canopy section, followed by the outer and upper sections. Summer pruning influenced significantly higher average PPFD values in the inner canopy section and bud sugar content, especially in the outer and upper canopy. Trees pruned in summer had higher glucose, fructose, sorbitol and sucrose contents in the bud and higher yield. Lower bud fructose and sorbitol contents were measured in the inner canopy compared to the upper canopy. Fruit from the inner canopy was less colored and had a lower weight than fruit from the upper canopy.

**Keywords:** sunlight; canopy section; sugars; fruit weight; skin color; *Prunus avium* L.

### Vpliv svetlobnih razmer v krošnji dreves na vsebnost sladkorjev v rodnih brstih, kakovost plodov in pridelek češnje

**Izveček:** Drevesa češnje (*Prunus avium* L.) sorte 'Grace Star' so bila porezana s poletno rezjo, s čimer se je vplivalo na svetlobne razmere v krošnji, ostala drevesa pa niso bila porezana (kontrola). Svetlobne razmere v krošnji so bile spremljane z meritvami jakosti fotosintetsko aktivnega sevanja (PPFD) pred in po poletni rezi na treh sekcijah v krošnji (notranjost, zunanost in vrh). Odziv na svetlobne razmere v krošnji je bil proučevan z analizo vsebnosti sladkorjev v rodnih brstih, na treh sekcijah v krošnji, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Poleg tega so bili v poskusu ovrednoteni parametri kakovosti plodov (barva kože in masa plodov) ter pridelek. Najmanjše vrednosti PPFD so bile izmerjene v notranjosti krošnje, največje pa v vrhu krošnje. Poletna rez je vplivala na značilno večje vrednosti PPFD v notranjosti krošnje ter na vsebnost sladkorjev v brstih, zlasti na zunanosti in v vrhu krošnje. Boljše svetlobne razmere v krošnji dreves, porezanih s poletno rezjo, so vplivale na značilno večje vsebnosti glukoze, fruktoze, sorbitola in saharoze v brstih ter večji pridelek. V brstih iz notranjosti krošnje so bile izmerjene manjše vsebnosti fruktoze in sorbitola kot v brstih v vrhu krošnje. Plodovi v notranjosti krošnje so bili slabše obarvani ter z manjšo maso kot plodovi iz vrha krošnje.

**Ključne besede:** svetloba; del krošnje; sladkorji; masa ploda; barva kože; *Prunus avium* L.

## 1 INTRODUCTION

Sunlight is one of the most important environmental factors affecting plant growth and development (Passos et al., 2018), sugar accumulation and biomass production (Li et al., 2017) due to altered leaf gas exchange parameters, such as stomatal conductance, transpiration and intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Afonso et al., 2017; Larbi et al., 2015). In general, sunlight conditions vary within the canopy of fruit trees and depend on the rootstock and the training system (Afonso et al., 2017; Larbi et al., 2015; Passos et al., 2018). Photosynthetically active radiation (PAR) is important to stimulate photosynthetic processes, which in turn yield sugars. Sugar is an essential source of energy in fruit trees. As the end product of photosynthesis, it serves as a direct indicator of the plant's photosynthetic performance (Suzuki, 2015). It is also affected by temperature, humidity, light (Farina et al., 2005; Sharma et al., 2018) and pruning (Demirtas et al., 2010; Mediene et al., 2002). Sugar reserves accumulated in the previous year in the differentiation process play a key role in the resumption of bud activity, bud break (Girault et al., 2010) as well as they can influence fruit development and quality (Vitagliano et al., 2000).

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is an economically important and highly valued temperate stone fruit. The use of dwarf rootstocks and suitable training system has resulted in better utilization of available light in orchards (Hampson et al., 2002). In addition, pruning has a significant effect on the distribution of solar radiation in the canopy (Hampson et al., 2002). Generally, pruning can be done during the dormant season or during the period after fruit harvest (Mika, 1986). Summer pruning has been reported to improve the penetration of solar radiation through the canopy and stimulate photosynthesis in apple (Mierowska et al., 2002). Altered sunlight conditions in the canopy due to summer pruning affected quantitative changes in carbohydrate reserves in the trunk and dormant shoots of sweet cherry (Clair-Maczulajtys et al., 1994; Usenik et al., 2008), shoots of peach and almond (İkinçi et al., 2014) and annual shoots of apricot (Demirtas et al., 2010).

However, the effect of canopy sunlight penetration on bud sugar content, fruit quality and yield of sweet cherry is unknown. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of summer pruning on irradiance intensities (PPFD) and bud sugar content, as well as fruit quality at different sections of sweet cherry canopy and yield.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant material and experimental design

The experiment was conducted on sweet cherry trees (*Prunus avium* L.) of the cultivar 'Grace Star' on the rootstock Gisela 5, planted in 2008 at 4 x 3 m at Fruit Growing Center Bilje Slovenia (45°53' latitude; 13°38' longitude, 55 m altitude). The average height and depth of the trees were 3.0 m and 2.5 m, respectively. Trees were trained as free spindle and irrigated as needed. Six of ten trees with similar trunk diameters were included in the experiment for sampling and measurements. Each year from 2017 to 2019, half of the trees were pruned in early August (summer pruning), while the rest were pruned each year during the last phase of dormancy— in March (control trees). The trees were pruned mainly by thinning cuts in the upper part of the canopy and by heading back cuts in the lower part of the canopy.



## 2.2 Samplings and measurements

Samplings and measurements were carried out in 2019 on three sections of the tree canopy: (i) the inner (at 1.3 m height and 20 cm from the trunk), (ii) the outer (at 1.3 m height and 1.2 m from the trunk) and (iii) the upper (at 2.3 m height and 20 cm from the trunk) section.

Measurements of sunlight incidence in the canopy, expressed as photosynthetic radiation intensity (PPFD), were performed twice, on 10 July and 25 August (before and after summer pruning, respectively) at each canopy section (inner, outer and upper) and on both sides of the row to assess light conditions on both sides. The intercepted PPFD was estimated using a Li-180 spectrometer (LI-COR, Lincoln, USA). Four measurements were carried out, with the sensor placed horizontally at each point on the canopy and the average value calculated. Measurements were taken on clear and sunny days, randomly between 10:00 and 12:00. PPFD values were expressed in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Twenty flower buds per each canopy section were sampled in mid-March at phenological stage BBCH 03, side green buds. The material was immediately frozen in liquid nitrogen, lyophilized, ground to a fine powder in a cooled grinder and stored in moisture-proof, dark plastic containers at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Fruits were sampled at commercial maturity on 6 June and the yield of each tree was weighed. In addition, 10 fruits from each canopy section per each tree were used to measure skin color and weight. Skin color was measured using a Color Reader CR-10 (Minolta Co., Osaka, Japan) with a measuring area of 8-mm in diameter. Chroma ( $C^*$ ), a measure of the purity or saturation of color, is obtained from lightness, redness, and greenness ( $a^*$ ) and yellowness and blueness ( $b^*$ ) on the hue circle. The values given for each measurement are the average of 10 measurements taken at equidistant points on each fruit.

## 2.3 Extraction and analysis of sugars

Extraction of sugars was performed as described in Usenik et al. (2015), with some modifications. Briefly, 0.5 g of bud material was homogenized in 4 ml of double-distilled water and left for 30 min at room temperature with frequent stirring. The extracts were centrifuged at  $11\,500 \times g$  for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf Centrifuge 5810R; Hamburg, Germany). The supernatants were then filtered through a  $0.20\text{ }\mu\text{m}$  Chromafil A-20/25 cellulose ester filter (Macherey-Nagel, Düren, Germany), transferred to vials and analyzed on HPLC system using a refractive index detector (Thermo Scientific, Finnigan Spectra System, Waltham, MA, USA). Quantification of the identified compounds was assessed from the peak areas and calculated using a calibration curve of the corresponding standard. The content of individual sugars (sucrose, glucose, fructose and sorbitol) and total sugars (sum of sucrose, glucose, fructose and sorbitol) in the bud was expressed in grams per kilogram dry weight ( $\text{g kg}^{-1} \text{DW}$ ).

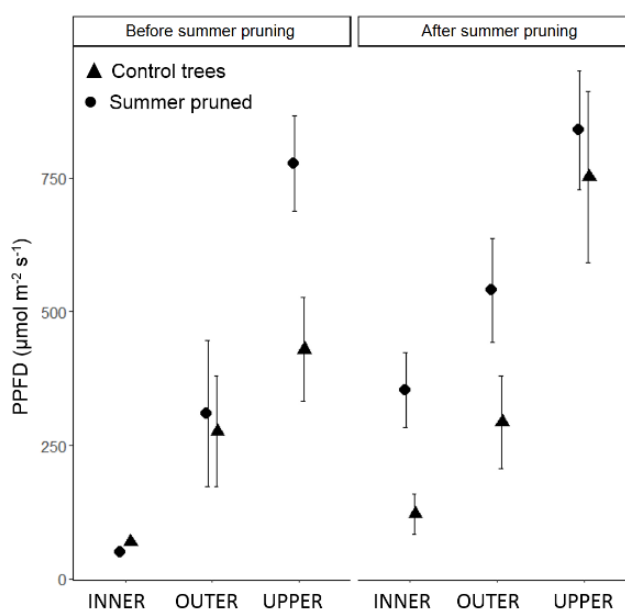
## 2.4 Statistical analysis

The experiment was arranged as a factorial design. Bud sugar data were subjected to a two-factor analysis of variance (ANOVA) with factor pruning and canopy section and PPFD measurement data were subjected to a three-factor ANOVA (factors pruning, canopy section and measurement). The one-factor ANOVA was used to analyze the fruit color measurement data, fruit weight (factor canopy section), and yield (factor pruning). The factor pruning had two levels (control or summer pruning), the factor canopy section had three levels (inner, outer, and upper), and the factor measurement had two levels (before and after pruning). If the analysis of variance showed statistical significance, the contrast analysis was performed, and  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Duncan's multiple range test was performed at a significance level of  $p < 0.05$  for the fruit color measurement, fruit weight and yield data to

determine significant differences between the mean values, where required. Statistical analysis was performed with R statistical environment software version 3.6.1. (R Core Team 2019).

### 3 RESULTS

The average PPFD values at three different canopy sections (inner, outer, and upper) and two measurement time points (before and after summer pruning) of sweet cherry trees are shown in Figure 1. The lowest PPFD values were measured in the inner canopy section, followed by the outer and upper sections. Before summer pruning, no differences were found between summer pruned and control trees in the inner and outer sections, but summer pruning significantly improved canopy light incidence in the inner section ( $p < 0.01$ ).



**Figure 1.** The average PPFD values of summer pruned trees and controls measured on the inner, outer and upper canopy before and after summer pruning. The vertical bars represent  $\pm s_e$  of the mean value ( $n = 12$ ).

**Table 1.** The average ( $\pm s_e$ ) chroma ( $C^*$ ) and weight (g) of fruit from inner, outer, and upper canopy section ( $n=10$ ).

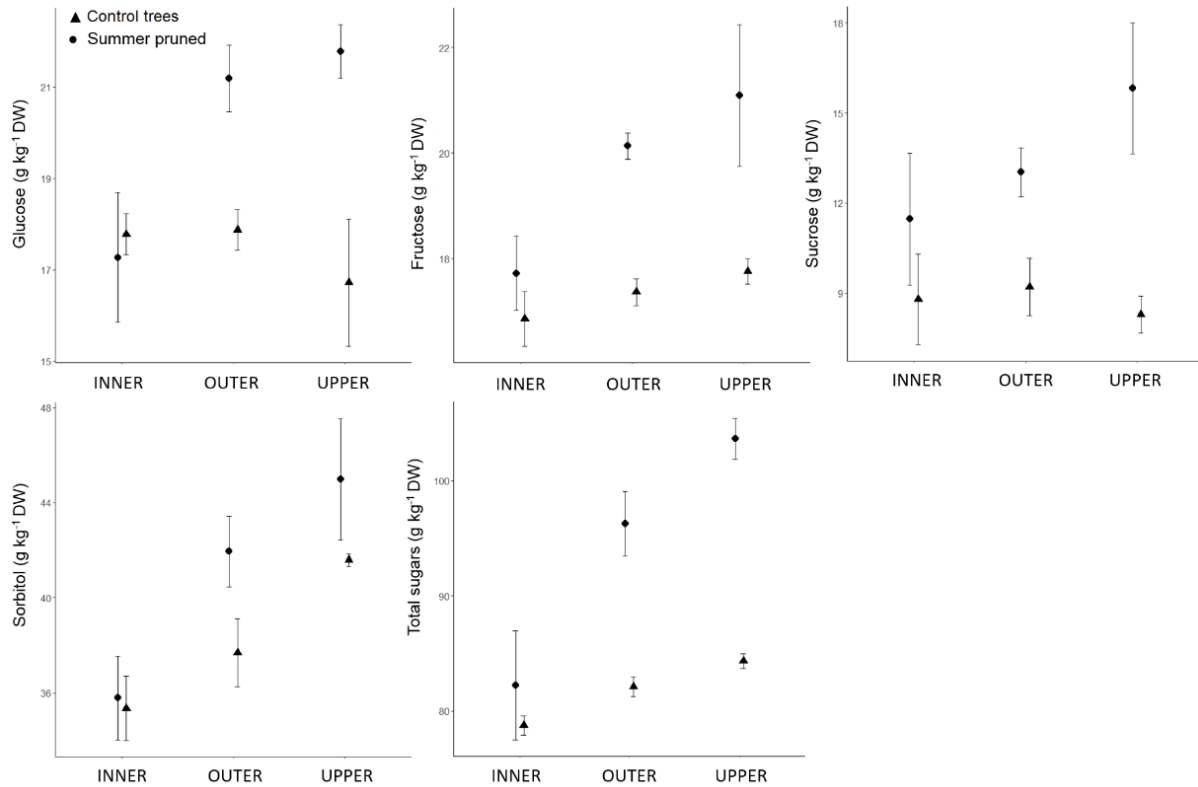
	$C^*$	Weight
<i>Section of the canopy</i>		
Inner	41.2 $\pm$ 0.8 a	89.5 $\pm$ 4.0 b
Outer	38.5 $\pm$ 1.0 ab	91.2 $\pm$ 4.6 b
Upper	39.2 $\pm$ 0.8 b	110.2 $\pm$ 2.0 a
ANOVA <sup>a</sup>		
<i>Section of the canopy</i>	*	**

Means followed by different capital letters in a column indicate statistically significant differences (Duncan test,  $p < 0.05$ ).

<sup>a</sup> – \*, statistically significant differences at  $p < 0.05$ ; \*\*, statistically significant differences at  $p < 0.01$ .

The sugars identified in the sweet cherry bud were sucrose, glucose, fructose, and sorbitol. Glucose accounted for most of the total sugar content measured in sweet cherry fruit. The average total sugar content ( $\pm s_e$ ) in the bud was 87.9  $\pm$  2.3 g kg<sup>-1</sup> DW. Buds from summer

pruned trees had higher content of fructose (Figure 2) and sucrose than buds from control trees. In addition, buds from summer pruned trees had significantly higher average glucose and total sugar contents in the outer and upper sections than buds from trees that were not pruned. Buds from the upper section of all trees had significantly higher average sorbitol and fructose contents than buds from the inner section (Figure 2). Position in the canopy affected fruit quality parameters (chroma and weight) examined in our study. Fruit from the inner canopy section had significantly higher chroma and lower fruit weight than those from the upper canopy (Table 1). In addition, trees pruned in summer had significantly ( $p < 0.05$ ) higher average yield ( $10.5 \pm 1.1$  kg) compared to control trees ( $6.8 \pm 0.5$  kg).



**Figure 2.** The average content of individual sugars (glucose, fructose and sorbitol) and total sugars in sweet cherry flower bud of summer pruned and control trees at inner, outer and upper canopy section. The vertical bars represent  $\pm s_e$  of the mean ( $n = 3$ ).

#### 4 DISCUSSION

The influence of summer pruning of sweet cherry trees was investigated by measuring photosynthetic radiation intensity (PPFD) and analyzing sugar in the bud at three canopy sections (inner, outer and upper). In addition, fruit quality parameters and yield were evaluated.

In our study, differences were observed among canopy sections, with the inner section having the lowest PPFD values and the upper canopy having the highest PPFD values. PPFD values generally decrease with increasing depth in the canopy (Larbi et al., 2015). Summer pruning improved sunlight penetration into the canopy, with higher PPFD values in the inner canopy. Our results agree with those of Mierowska et al. (2002) who reported a similar effect of summer pruning in apple orchards, while no such data were reported for sweet cherry.

Sugar composition in sweet cherry bud is consistent with previous studies (Michailidis et al., 2018), but quantitative comparisons are not possible due to differences in analytical methods.

Our study shows that summer pruning imposed higher sucrose, fructose, and sorbitol content in the bud of each canopy section. Higher glucose and total sugar contents were measured in the bud of the outer and upper sections. The higher sugar content is probably related to improved light conditions after summer pruning. Better light conditions influence photosynthesis, resulting in higher accumulation of sugars in buds and other storage organs (Clair-Maczulajtys et al., 1994; Usenik et al., 2008). A significant influence of canopy section on the content of fructose and sorbitol in buds was also observed. Irradiance plays an important role in this case. Buds from the upper canopy had the highest fructose and sorbitol content, while those from the inner section had the lowest content. The low fructose and sorbitol content in buds from the inner canopy might be related to the low light availability there (Bartolini et al., 2013).

Trees pruned in summer had a higher average yield. Since light availability is the driving source of leaf photosynthesis, it is critical for the production of high-quality fruits. Our results suggest that better light conditions within the canopy after summer pruning influenced higher sugar content in flower buds, which could thus lead to better fertilization and consequently higher and better quality yields the following year. Although we measured sugar in the flower bud, we suspect that similar results would be obtained for the vegetative bud. The higher sugar content in the bud also likely contributes to the early stages of leaf development. As a result, leaves may become photosynthetically active earlier. Fruit set and development are dependent on sugars from storage reserves and ongoing leaf photosynthesis (Breen et al., 2015; Maust et al., 1999). Position in the canopy influenced fruit color and weight. Fruit from the upper canopy were more colored and had higher weight, indicating higher maturity. Light stimulates photosynthesis, resulting in more sugars, which serve as a carbon source for the production of secondary metabolites, such as anthocyanins, which are responsible for the red color of the fruit skin of sweet cherry (Jaakola, 2013). Better fruit coloration from the sun-exposed sections of the canopy has also been observed in peach (Farina et al., 2005; Sharma et al., 2018) and apple (Feng et al., 2014; Jung & Choi, 2010).

## 5 CONCLUSIONS

The present study shows the influence of summer pruning on sunlight conditions in the canopy, sugar content in the flower bud and fruit quality from the inner, outer and upper canopy of sweet cherry 'Grace Star'. The inner canopy received less sunlight than the outer and upper canopy. Summer pruning improved sunlight penetration in the inner parts of the tree canopy. Sunlight conditions within the canopy affected bud sugars and fruit quality, with the most illuminated parts of the canopy having the highest bud sugar content and more colored fruits with higher weight. Our results suggest that summer pruning is an effective technological measure to improve bud sugar content in sweet cherry. A strong, well-nourished flower bud is a good prospect for high quality fruit production next season.

## 6 REFERENCES

- Afonso, S., Ribeiro, C., Bacelar, E., Ferreira, H., Oliveira, I., Silva, A., & Gonçalves, B. (2017). Influence of training system on physiological performance, biochemical composition and antioxidant parameters in apple tree (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 225, 394-398.
- Bartolini, S., Viti, R. & Andreini, L. (2013). The effect of summer shading on flower bud morphogenesis in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Open Life Science*, 8(1), 54-63.

- Breen, K. C., Tustin, D. S., Palmer, J. W., & Close, D. C. (2015). Method of manipulating floral bud density affects fruit set responses in apple. *Scientia Horticulturae*, 197, 244-253.
- Clair-Maczulajtyś, D., Sarthou, C., & Bory, G. (1994). Effects of pruning on carbohydrate distribution in the trunk of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 59, 61-67.
- Demirtas, N. M., Bolat, I., Ercisli, S., İkinci, A., Olmez, H., Sahin, M., . . . Celik, B. (2010). The effects of different pruning treatments on seasonal variation of carbohydrates in Hacihaliloglu apricot cultivar. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 223-227.
- Farina, V., Bianco, R. L., & Inglese, P. (2005). Vertical distribution of crop load and fruit quality within Vase- and Y-shaped canopies of Elegant Lady peach. *HortScience*, 40(3), 587-591.
- Feng, F., Li, M., Ma, F., & Cheng, L. (2014). Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus × domestica*) cultivars. *Horticulture research*, 1(1), 1-7.
- Girault, T., Abidi, F., Sigogne, M., Pelleschi-Travier, S., Boumaza, R., Sakr, S., & Leduc, N. (2010). Sugars are under light control during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, cell & environment*, 33(8), 1339-1350.
- Hampson, C. R., Quamme, H. A., & Brownlee, R. T. (2002). Canopy growth, yield, and fruit quality of 'Royal Gala' apple trees grown for eight years in five tree training systems. *HortScience*, 37(4), 627-631.
- İkinci, A., Kuden, A. & Erol AK, B. (2014). Effects of summer and dormant pruning time on the vegetative growth, yield, fruit quality and carbohydrate contents of two peach cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 13, 84-90.
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in plant science*, 18(9), 477-483.
- Jung, S. K., & Choi, H. S. (2010). Light penetration, growth, and fruit productivity in 'Fuji' apple trees trained to four growing systems. *Scientia Horticulturae*, 125(4), 672-678.
- Larbi, A., Vázquez, S., El-Jendoubi, H., Msallem, M., Abadía, J., Abadía, A., & Morales, F. (2015). Canopy light heterogeneity drives leaf anatomical, eco-physiological, and photosynthetic changes in olive trees grown in a high-density plantation. *Photosynthesis research*, 123(2), 141-155.
- Li, Y., Xin, G., Wei, M., Shi, Q., Yang, F., Wang, X., 2017. Carbohydrate accumulation and sucrose metabolism responses in tomato seedling leaves when subjected to different light qualities. *Scientia Horticulturae*, 225, 490-497.
- Maust, B. E., Williamson, J. G., & Darnell, R. L. (1999). Flower bud density affects vegetative and fruit development in field-grown southern highbush blueberry. *HortScience*, 34(4), 607-610.
- Mediene, S., Jordan, M. O., Pagès, L., Lebot, J., & Adamowicz, S. (2002). The influence of severe shoot pruning on growth, carbon and nitrogen status in young peach trees (*Prunus persica*). *Tree physiology*, 22(18), 1289-1296.
- Michailidis, M., Karagiannis, E., Tanou, G., Sarrou, E., Adamakis, I. D., Karamanoli, K., ... & Molassiotis, A. (2018). Metabolic mechanisms underpinning vegetative bud dormancy release and shoot development in sweet cherry. *Environmental and experimental botany*, 155, 1-11.
- Mierowska, A., Keutgen, N., Huysamer, M., & Smith, V. (2002). Photosynthetic acclimation of apple spur leaves to summer-pruning. *Scientia Horticulturae*, 92(1), 9-27.
- Mika, A. (1986). Physiological responses of fruit trees to pruning. *Horticultural reviews*, 8, 337-378.
- Passos, L. C., da Silva, J. R., Rodrigues, W. P., de Oliveira Reis, F., da Silva Vasconcellos, M. A., Machado Filho, J. A., & Campostriani, E. (2018). Leaf photosynthetic responses of passion fruit genotypes to varying sunlight exposure within the canopies. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 30(2), 103-112.
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna. <https://www.R-project.org> (Accessed 5 March 2020).
- Sharma, Y., Singh, H., & Singh, S. (2018). Effect of light interception and penetration at different levels of fruit tree canopy on quality of peach. *Current Science*, 115(8), 1562-1566.

- Suzuki, Y. (2015). Polyol metabolism and stress tolerance in horticultural plants. In Y. Kanayama & A. Kochetov (Eds.), *Abiotic stress biology in horticultural plants* (pp. 59-73). Springer, Vienna, Austria.
- Usenik, V., Solar, A., Meolic, D. & Stampar, F. (2008). Effects of summer pruning on vegetative growth, fruit quality and carbohydrates of 'Regina' and 'Kordia' sweet cherry trees on Gisela 5. *European Journal of Horticultural Science*, 73(2), 62-68.
- Usenik, V., Stampar, F., Petkovsek, M. M., & Kastelec, D. (2015). The effect of fruit size and fruit colour on chemical composition in 'Kordia' sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 121-130.
- Vitagliano, C., Bartolini, S., & Catania, M. (2000). Summer pruning increases sugar and starch content of peach flower buds, fruit retention and size. *Acta horticulturae*, 121, 125-140.

## LES IN BOKOMPOZITI

### SLOCLIM: baza modeliranih dnevni meteoroloških podatkov za Slovenijo

Nina ŠKRK<sup>1</sup>, Martín DE LUIS<sup>2</sup>, Katarina ČUFAR<sup>1</sup>, Maks MERELA<sup>1</sup>, Zalika ČREPINŠEK<sup>3</sup>, Lučka KAJFEŽ BOGATAJ<sup>3</sup>, Roberto SERRANO-NOTIVOLI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Zaragozi, Oddelek za geografijo IUCA, E-50009, Španija

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Avtonomna univerza v Madridu, Oddelek za geografijo, E-28049, Madrid, Španija

\*korespondenčni avtor: [nina.skrk@bf.uni-lj.si](mailto:nina.skrk@bf.uni-lj.si)

#### SLOCLIM: baza modeliranih dnevni meteoroloških podatkov za Slovenijo

**Izveček :** Za študij učinkov podnebnih sprememb potrebujemo podatke tudi za območja, ki so slabše pokrita z meteorološkimi postajami. V ta namen smo s pomočjo preverjene metodologije rekonstruirali dnevne maksimalne in minimalne temperature zraka ter količino padavin za obdobje 1950–2018 za 20,998 točk v Sloveniji (ločljivost 1 km x 1 km). Poleg tega so bili izračunani še 4 temperaturni in 2 padavinska indeksa, ki prikazujejo geografsko razporeditev minimalnih in maksimalnih temperatur, število hladnih in toplih dni, intenziteto padavin in najdaljše obdobje zaporednih sušnih dni. Podatki so objavljeni in prosto dostopni v bazi Zenodo – <https://doi.org/10.5281/zenodo.4108543>. Za uporabnike smo pripravili tudi spletno stran SLOCLIM <http://www.sloclim.eu>, kjer lahko prosto dostopajo in prenašajo meteorološke podatke za izbrane točke in obdobja.

**Ključne besede:** Slovenija; podnebje; rekonstrukcija; temperature; padavine; podatkovna baza

#### SLOCLIM: A daily gridded meteorological dataset for Slovenia

**Abstract:** To study the effects of climate change, we also need data for areas that lack meteorological stations. For this purpose, we followed the three-step methodology and reconstructed daily maximum and minimum temperatures and amount of precipitation for the period 1950 to 2018 with 20,998 points in Slovenia (resolution 1 km x 1 km). In addition, 4 temperature and 2 precipitation indices were calculated showing the geographical distribution of mean annual absolute minimum and maximum temperatures, mean annual number of frost days and mean annual number of summer days, precipitation intensity, length of dry period. The SLOCLIM dataset is freely available in the Zenodo web repository and can be accessed through <https://doi.org/10.5281/zenodo.4108543>. We have also established the SLOCLIM web page <http://www.sloclim.eu>, where users can access and download meteorological data for selected points and periods.

**Keywords:** Slovenia; climate; reconstruction; temperature; precipitation; dataset

## 1 UVOD

Za proučevanje podnebnih sprememb ter napovedovanje njihovih trendov potrebujemo kakovostne podatke. V geografsko in klimatološko pestri Sloveniji je vzpostavljen dober sistem beleženja meteoroloških podatkov pod okriljem Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO) Ministrstva za okolje in prostor Republike Slovenije. Število meteoroloških postaj, ki redno beležijo meteorološke spremenljivke, se nenehno spreminja in z leti zmanjšuje, posebej malo pa jih je na nenaseljenih in višje ležečih območjih. Veliko raziskav učinkov podnebnih sprememb na drevesa, kulturne rastline in ljudi zahteva lokalne podatke na dnevni ravni, ki izpolnjujejo visoke standarde kakovosti. Pomanjkanje podatkov iz merilnih postaj, ki je posebej pereče na gozdnih in poljedelskih območjih, vse bolj skušamo nadomestiti z modeliranimi podatki.

Po svetu so bile razvite klimatske rekonstrukcije za širša območja in posamezne države, npr. za Norveško (Lussana in sod., 2018), Avstrijo (Hiebl in sod., 2009) in Kanado (Mekis in Vincent, 2011), a so bile večinoma pripravljene v obliki mesečnih povprečij in pri slabši prostorski ločljivosti.

Nedavne izboljšave metodologije klimatske rekonstrukcije za klimatsko in orografsko pestra območja, so bile uspešno uporabljene za rekonstrukcijo dnevnih padavin in temperatur v Španiji ob izboljšani prostorski ločljivosti (Serrano-Notivoli in sod., 2017; Serrano-Notivoli in sod., 2019). V Sloveniji so bili pripravljene mesečni podatki na kilometrski osnovi za obdobje 1961 do 2014 (Dolinar, 2016), nedavno pa so pri ARSO objavili bazo meteoroloških podatkov na dnevni ravni za obdobje 1981 do 2010 s prostorsko ločljivostjo 12 km (ARSO, 2021).

V tem prispevku predstavljamo razvoj in dostopnost baze SLOCLIM, ki vključuje dnevne podatke o minimalni in maksimalni temperaturi ter padavinah za celotno Slovenijo na 1 km x 1 km mreži za obdobje 1950–2018.

## 2 MATERIALI IN METODE

Uporabili smo podatke (dnevne minimalne in maksimalne temperature ter vsoto padavin), pridobljene na 174 klimatoloških, padavinskih in avtomatskih postajah v Sloveniji pod okriljem ARSO.

Za izračun rekonstrukcije smo prilagodili metodologijo, ki so jo predstavil Serrano-Notivoli in sod. (2017, 2019) za rekonstrukcijo meteoroloških podatkov v Španiji. Metoda temelji na kontroli kvalitete originalnih podatkov z meteoroloških postaj ter oceni novih vrednosti, ki nadomestijo manjkajoče podatke v bazah, pri čemer se uporabi vse razpoložljive informacije in lokalne regresijske modele, ter na oceni novih vrednosti na mreži z uporabo rekonstruiranih podatkov.

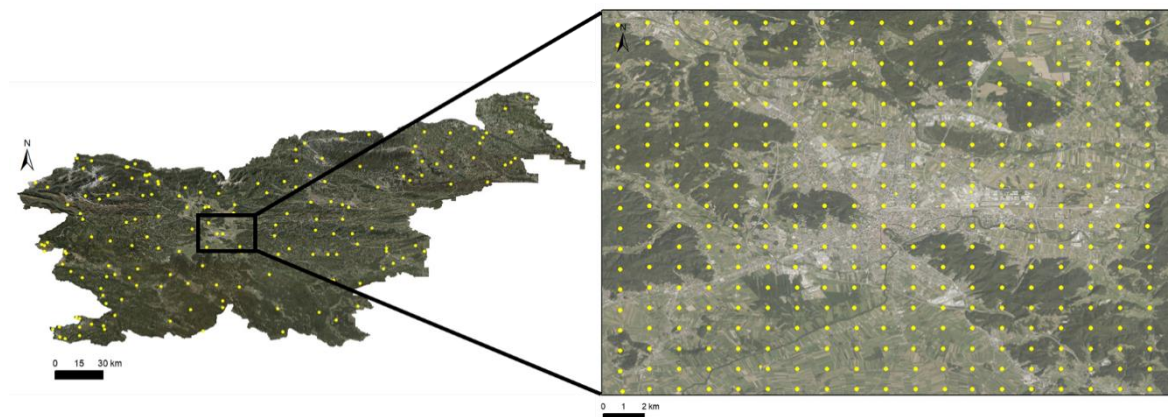
Pri kontroli kvalitete originalnih podatkov z meteoroloških postaj smo pri padavinah upoštevali 5 kriterijev za odstranitev najverjetnejših nepravilnosti podatkov (Škrk in sod., 2021). Prav tako smo tudi pri pregledu temperaturnih podatkov z meteoroloških postaj upoštevali 5 kriterijev za najverjetnejše napake. Referenčne vrednosti smo izračunali glede na podatke desetih najbližjih meteoroloških postaj s pomočjo posplošenih linearnih mešanih modelov (GLMM) in posplošenih linearnih modelov (GLM), pri tem pa so bile padavine oziroma temperature odvisna spremenljivka, geografske značilnosti (zemljepisna dolžina, širina, nadmorska višina in razdalja do morja) pa neodvisne spremenljivke. Tako izračunane referenčne vrednosti smo nato primerjali s podatki meteoroloških postaj, da smo lahko izločili nepravilnosti glede na zgoraj naštetje kriterije (Škrk in sod., 2021).



Izračunali smo devet spremenljivk: (1) dnevne minimalne in (2) maksimalne temperature, (3) dnevno vsoto padavin ter štiri temperaturne in dva padavinska indeksa: 1) največja povprečna letna vrednost maksimalne dnevne temperature; 2) najmanjša povprečna letna vrednost minimalne temperature; 3) povprečno letno število dni, ko je bila minimalna temperatura pod 0 °C; 4) povprečno letno število dni, ko je bila maksimalna temperatura nad 25 °C; 5) najdaljše obdobje neprekinjenih sušnih dni v posameznem letu; 6) dnevna intenziteta padavin.

### 3 REZULTATI

Osnovana je bila mreža ločljivosti 1 km x 1 km, ki pokriva celotno Slovenijo in vsebuje 20,998 točk. Za vsako točko so bili za obdobje 1950–2018 izračunani dnevni podatki: maksimalna temperatura, minimalna temperatura in količina padavin ter štirje temperaturni in dva padavinska indeksa (Slika 1).



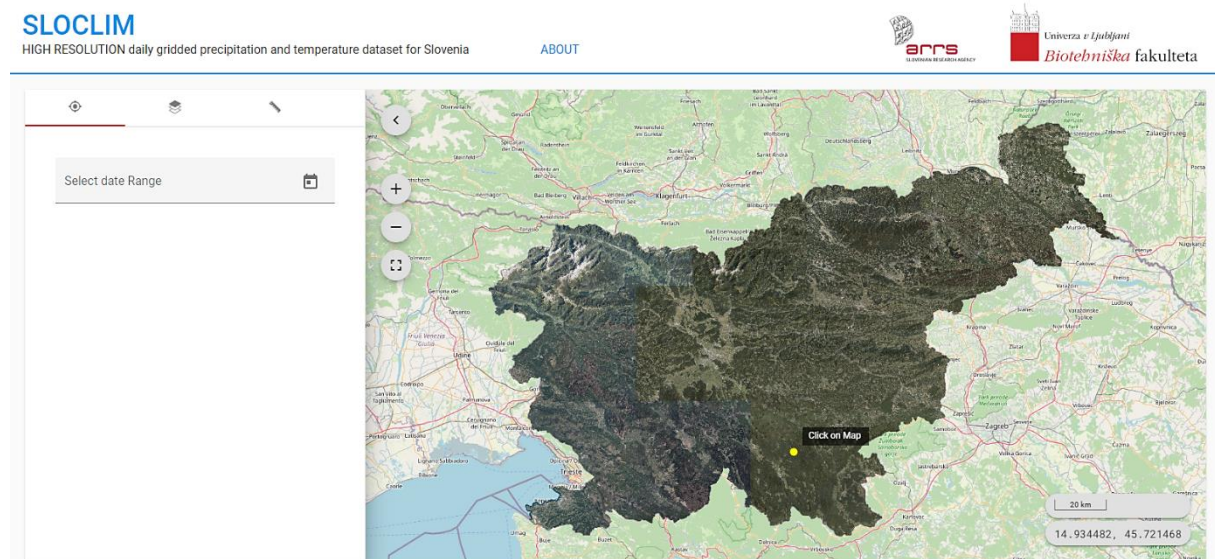
**Slika 14:** Razpored meteoroloških postaj ARSO v Sloveniji, kjer beležijo meteorološke razmere (levo), in podroben prikaz točk nove rekonstruirane mreže ločljivosti 1 km x 1 km, ki pokriva celotno Slovenijo in vsebuje 20,998 točk (desno). Za vsako točko so bili za obdobje 1950–2018 izračunani dnevni podatki: maksimalna temperatura, minimalna temperatura in količina padavin ter štirje temperaturni in dva padavinska indeksa (GURS, 2020).

Modelirane podatke za 20,998 točk, 9 spremenljivk in 25,232 dni, skupaj 4,768,393,824 podatkov, smo shranili v obliki 6 datotek v \*.nc formatu in jih objavili v bazi Zenodo - <https://doi.org/10.5281/zenodo.4108543> v skladu z načeli odprtega dostopa.

Za potencialne uporabnike, ki predvidoma potrebujejo samo delne podatke za izbrano lokacijo in obdobje, smo z informacijskim podjetjem (Nina Prkić Požar, s. p.) razvili uporabniku prijazno spletno aplikacijo za pridobivanje podatkov v obliki \*.csv datotek. Aplikacija je prosto dostopna preko strani <http://www.sloclim.eu> (Slika 2).

Za pridobitev podatkov mora uporabnik v preglednici najprej izbrati želeno časovno obdobje, nato pa s klikom na zemljevidu izbrati lokacijo. Pri tem lahko izbira med klasičnim zemljevidom Slovenije in ortofoto karto, vklopi lahko tudi prikaz meja občin. V pomoč pri iskanju lokacije se nam spodaj izpisujejo koordinate. Zemljevid lahko poljubno približujemo in oddaljujemo. Po potrditvi izbrane lokacije se nam na zemljevidu prikažeta rumena pika, ki označuje izbrano lokacijo, ter rdeča pika, ki prikazuje mesto najbližje točke na mreži rekonstruiranih podatkov, ki od izbrane lokacije ni nikoli oddaljena več kot en kilometer. Za vsako prikazano točko so podane geografske koordinate ter nadmorska višina. Spodaj levo se izpišejo glavni rezultati, ki zajemajo maksimalno in minimalno temperaturo ter količino padavin za izbrano obdobje po dnevih. Podatke lahko enostavno prenesemo v obliki datoteke \*.csv in jih nato obdelujemo z običajno programsko opremo, kot je Excel. Orodje *Measure* na

aplikaciji omogoča tudi merjenje razdalj, površin in polmerov. Pod zavihkom *About* so tudi kratko opisana meteorološka baza SLOCLIM in navodila za uporabo v angleščini in slovenščini.



**Slika 15:** Prikaz spletne strani SLOCLIM <http://www.sloclim.eu> z masko kjer izberemo obdobje želenih podatkov (levo) in interaktivni zemljevid, kjer izberemo želeno lokacijo za pridobitev podatkov (za dnevno maksimalno in minimalno temperaturo ter količino padavin) iz najbližje točke mreže SLOCLIM.

#### 4 DISKUSIJA

SLOCLIM predstavlja prvo rekonstrukcijo dnevni meteoroloških podatkov za Slovenijo za obdobje 1950–2018 z ločljivostjo 1 km x 1 km. Metodologija, uporabljena za izračun SLOCLIM, je prilagojena raznolikim geografskim in klimatološkim značilnostim Slovenije, saj temelji na neodvisni oceni klimatskih parametrov in upošteva geografsko širino, dolžino, nadmorsko višino in oddaljenost od morja vsake posamezne lokacije. Obdobje 1950–2018 je bilo izbrano, ker predstavlja najdaljše skupno obdobje kakovostnih meteoroloških podatkov za večje število meteoroloških postaj.

Statistično preverjanje je pokazalo visoke korelacije med modeliranimi vrednostmi in meritvami z meteoroloških postaj tako za temperature kot tudi za padavine, kar pomeni dobro ponazoritev realnih klimatoloških situacij na posameznih točkah mreže (Škrk in sod., 2021). Korelacija med modeliranimi in merjenimi vrednostmi je slabša za padavine kot za temperature, kar pripisujemo večji variabilnosti padavin v prostoru in času (Cegnar, 2016). Visoka korelacija med meteorološkimi podatki s postaj in rekonstruiranimi podatki potrjuje dobro kvaliteto meteoroloških podatkov ARSO, ki jo redno preverjajo (Bertalanič in sod., 2006). K dobri rekonstrukciji je pripomogla tudi relativno velika gostota meteoroloških postaj v Sloveniji, čeprav so z leti veliko postaj ukinili.

Rekonstrukcijo smo dodatno podprli tudi z izračunom štirih temperaturnih in dveh padavinskih klimatskih indeksov, ki so potrdili največjo intenziteto padavin v severozahodni Sloveniji ter na jugozahodu države na območju Dinarskega gorstva, najmanjšo pa na severovzhodu, kjer so bile zato tudi največje stopnje negotovosti pri izračunih. Najvišje temperature so značilne za jugozahod države, najnižje pa za severozahod, kjer so bile tudi največje stopnje negotovosti za izračunane indekse za maksimalne temperature, kar razložimo z orografskimi značilnostmi površja in razdaljo od morja.

Bazo podatkov SLOCLIM smo razvili, da bi jo lahko uporabili za reševanje praktičnih vprašanj v zvezi s podnebnimi spremembami in za raziskave, osredotočene na osnovna podnebna vprašanja v Sloveniji. Podatki bi bili primerni za analize trendov in projekcije (de Luis in sod., 2014; Dolinar in sod., 2018), rekonstrukcijo preteklih podnebnih in ekstremnih dogodkov na osnovi dendrokronologije (Čufar in sod., 2008; Cook in sod., 2015), proučevanje učinkov podnebnih sprememb na dobro počutje in zdravje prebivalstva (Pogačar in sod., 2019; Pogačar in sod., 2020) in agroklimatskih sprememb, ki vplivajo na preskrbo s hrano (Ceglar in sod., 2012). V gozdnati Sloveniji podnebne spremembe vplivajo na preživetje, produktivnost in fenologijo gozdnih dreves (Čufar in sod., 2012; Čufar in sod., 2015) in na proizvodnjo ključnih drevesnih tkiv, kot sta les in floem (Prislan in sod., 2013; Martinez del Castillo in sod., 2018; Delpierre in sod., 2019). Medtem ko so drevesa izpostavljena ekstremnim vremenskim pojavom, kot je na primer žled (Decuyper in sod., 2020; Klopčič in sod., 2020), se učinki podnebja razlikujejo v odvisnosti od gradientov nadmorske višine (Čater in Levanič, 2019; Jevšenak in sod., 2020) in na ravni mikrorastišč (Kermavnar in sod., 2019; Diaci in sod., 2020). V večini primerov bi lahko uporaba natančnih dnevni meteoroloških podatkov pripomogla k boljšemu prepoznavanju vremenskih vplivov na rast dreves (Jevšenak in Levanič, 2018; Jevšenak, 2019). Spletno stran <http://www.sloclim.eu> smo razvili za lažji dostop in obdelavo podatkov s strani širše strokovne in znanstvene skupnosti.

## 5 SKLEPI

Predstavljena je novo razvita javno dostopna meteorološka podatkovna baza SLOCLIM, ki zajema maksimalne in minimalne temperature zraka ter količino padavin za obdobje 1950–2018 za mrežo 1 km x 1 km, ki pokriva celotno Slovenijo. Prednost predstavljene rekonstrukcije je, da za razliko od doslej razpoložljivih rekonstrukcij ponuja podatke na dnevni ravni z visoko prostorsko ločljivostjo. Celotna podatkovna baza je na voljo za prenos preko spletne strani Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4108543>, spletna stran <http://www.sloclim.eu> pa omogoča pridobitev podatkov za poljubno lokacijo in časovno obdobje.

## 6 VIRI

ARSO 2021. Podnebne spremembe: Meritve 1981–2010, dnevni podatki, ločljivost 0,125°.

Čater, M. in Levanič, T. 2019. Beech and silver fir's response along the Balkan's latitudinal gradient. *Scientific Reports*. **9**(1), pp.1–14.

Ceglar, A., Medved Cvikel, B., Moran Tejeda, E., Vicente Serrano, S.M. in Kajfež Bogataj, L. 2012. Assessment of multi-scale drought datasets to quantify drought severity and impacts in agriculture: a case study for Slovenia. *International Journal of Spatial Data Infrastructure Research*. **7**, pp.464–487.

Cegnar, T. 2016. Ekstremni vremenski dogodki. ARSO. [Online]. [Accessed 12 September 2020]. Available from: <http://kazalci.arso.gov.si/sl/content/ekstremni-vremenski-dogodki-1>.

Cook, E.R., Seager, R., Kushnir, Y., Briffa, K.R., Büntgen, U., Frank, D., Krusic, P.J., Tegel, W., Schrier, G., Vander, Andreu-Hayles, L., Baillie, M., Baittinger, C., Bleicher, N., Bonde, N., Brown, D., Carrer, M., Cooper, R., Čufar, K., Dittmar, C., Esper, J., Griggs, C., Gunnarson, B., Günther, B., Gutierrez, E., Haneca, K., Helama, S., Herzig, F., Heussner, K.U., Hofmann, J., Janda, P., Kontic, R., Köse, N., Kyncl, T., Levanič, T., Linderholm, H., Manning, S., Melvin, T.M., Miles, D., Neuwirth, B., Nicolussi, K., Nola, P., Panayotov, M., Popa, I., Rothe, A., Seftigen, K., Seim, A., Svarva, H., Svoboda, M., Thun, T., Timonen, M., Touchan, R., Trotsiuk, V., Trouet, V., Walder, F., Wany, T., Wilson, R. in Zang, C. 2015. Old World megadroughts and pluvials during the Common Era. *Science Advances*. **1**(10), pp.1–10.

Čufar, K., De Luis, M., Prislan, P., Gričar, J., Črepinšek, Z., Merela, M. in Kajfež-Bogataj, L. 2015. Do variations in leaf phenology affect radial growth variations in *Fagus sylvatica*? *International Journal of Biometeorology*. **59**(8), pp.1127–1132.

- Čufar, K., de Luis, M., Saz, M.A., Črepinšek, Z. in Kajfež-Bogataj, L. 2012. Temporal shifts in leaf phenology of beech (*Fagus sylvatica*) depend on elevation. *Trees - Structure and Function*. **26**(4), pp.1091–1100.
- Čufar, K., Prislán, P., De Luis, M. in Gričar, J. 2008. Tree-ring variation, wood formation and phenology of beech (*Fagus sylvatica*) from a representative site in Slovenia, SE Central Europe. *Trees - Structure and Function*. **22**(6), pp.749–758.
- Decuyper, M., Chávez, R.O., Čufar, K., Estay, S.A., Clevers, J.G.P.W., Prislán, P., Gričar, J., Črepinšek, Z., Merela, M., de Luis, M., Notivoli, R.S., del Castillo, E.M., Rozendaal, D.M.A., Bongers, F., Herold, M. in Sass-Klaassen, U. 2020. Spatio-temporal assessment of beech growth in relation to climate extremes in Slovenia – An integrated approach using remote sensing and tree-ring data. *Agricultural and Forest Meteorology*. **287**, p.107925.
- Delpierre, N., Lireux, S., Hartig, F., Camarero, J. J., Cheaib, A., Čufar, K., Cuny, H., Deslauriers, A., Fonti, P., Gričar, J., Huang, J.G., Krause, C., Liu, G., de Luis, M., Mäkinen, H., del Castillo, E.M., Morin, H., Nöjd, P., Oberhuber, W., Prislán, P., Rossi, S., Saderi, S.M., Treml, V., Vavrík, H. in Rathgeber, C.B.K. 2019. Chilling and forcing temperatures interact to predict the onset of wood formation in Northern Hemisphere conifers. *Global Change Biology*. **25**(3), pp.1089–1105.
- Diaci, J., Rozman, J. in Rozman, A. 2020. Regeneration gap and microsite niche partitioning in a high alpine forest: Are Norway spruce seedlings more drought-tolerant than beech seedlings? *Forest Ecology and Management*. **455**, p.117688.
- Dolinar, M. 2016. Monthly gridded datasets for temperature and precipitation over Slovenia.
- Dolinar, M., Gregorič, G., Honzak, L., Sušnik, A., Vlahović, Ž. in Žust, A. 2018. Ocena podnebnih sprememb v Sloveniji do konca 21. stoletja: povzetek dejavnikov okolja z vplivom na kmetijstvo in gozdarstvo In: Ljubljana: Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje. Available from: <https://meteo.arso.gov.si/uploads/probase/www/climate/text/sl/publications/povzetek-podnebnih-sprememb-agro.pdf>.
- GURS: Orthophoto DOF025 (2017-2019), Free Access Database [online] Available from: [www.gu.gov.si/en/services/free\\_access\\_database/](http://www.gu.gov.si/en/services/free_access_database/) (Accessed 15 November 2020), 2020.
- Hiebl, J., Auer, I., Böhm, R., Schöner, W., Maugeri, M., Lentini, G., Spinoni, J., Brunetti, M., Nanni, T., Tadić, M.P., Bihari, Z., Dolinar, M. in Müller-Westermeier, G. 2009. A high-resolution 1961-1990 monthly temperature climatology for the greater Alpine region. *Meteorologische Zeitschrift*. **18**(5), pp.507–530.
- Jevšenak, J. 2019. Daily climate data reveal stronger climate-growth relationships for an extended European tree-ring network. *Quaternary Science Reviews*. **221**.
- Jevšenak, J. in Levanič, T. 2018. Using the dendroTools R package to analyse the relationships between daily climate and tree-ring data.
- Jevšenak, J., Tychkov, I., Gričar, J., Levanič, T., Tumajer, J., Prislán, P., Arnič, D., Popkova, M. in Shishov, V. V. 2020. Growth-limiting factors and climate response variability in Norway spruce (*Picea abies* L.) along an elevation and precipitation gradients in Slovenia. *International Journal of Biometeorology*.
- Kermavnar, J., Marinšek, A., Eler, K. in Kutnar, L. 2019. Evaluating short-term impacts of forest management and microsite conditions on understory vegetation in temperate fir-beech forests: Floristic, ecological, and trait-based perspective. *Forests*. **10**(10).
- Klopčič, M., Poljanec, A., Dolinar, M., Kastelec, D. in Bončina, A. 2020. Ice-storm damage to trees in mixed Central European forests: damage patterns, predictors and susceptibility of tree species. *Forestry: An International Journal of Forest Research*. **93**(3), pp.430–443.
- de Luis, M., Čufar, K., Saz, M.A., Longares, L.A., Ceglar, A. in Kajfež-Bogataj, L. 2014. Trends in seasonal precipitation and temperature in Slovenia during 1951–2007. *Regional Environmental Change*. **14**(5), pp.1801–1810.
- Lussana, C., Tveito, O.E. in Uboldi, F. 2018. Three-dimensional spatial interpolation of 2 m temperature over Norway. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*. **144**(711), pp.344–364.
- Martinez del Castillo, E., Prislán, P., Gričar, J., Gryc, V., Merela, M., Giagli, K., de Luis, M., Vavrík, H. in Čufar, K. 2018. Challenges for growth of beech and co-occurring conifers in a changing climate context.

*Dendrochronologia*. **52**, pp.1–10.

- Mekis, É. in Vincent, L.A. 2011. An overview of the second generation adjusted daily precipitation dataset for trend analysis in Canada. *Atmosphere - Ocean*. **49**(2), pp.163–177.
- Pogačar, T., Žnidaršič, Z., Bogataj, L. K. in Črepinšek, Z. 2020. Steps towards comprehensive heat communication in the frame of a heat health warning system in Slovenia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **17**(16), pp.1–16.
- Pogačar, T., Žnidaršič, Z., Črepinšek, Z. in Bogataj, L. 2019. Aggravated Occupational Heat Stress Recognition and Mitigation in Slovenia: Managing Risks and Building Resilience to Climate Change *In:*, pp.267–277.
- Prislan, P., Gričar, J., de Luis, M., Smith, K.T. in Čufar, K. 2013. Phenological variation in xylem and phloem formation in *Fagus sylvatica* from two contrasting sites. *Agricultural and Forest Meteorology*. **180**, pp.142–151.
- Serrano-Notivoli, R., Beguería, S. in de Luis, M. 2019. STEAD: A high-resolution daily gridded temperature dataset for Spain. *Earth System Science Data Discussions.*, pp.1–27.
- Serrano-Notivoli, R., Beguería, S., Saz, M.Á., Longares, L.A. in de Luis, M. 2017. SPREAD: A high-resolution daily gridded precipitation dataset for Spain. *Earth System Science Data Discussions.*, pp.1–33.
- Škrk, N., de Luis, M., Čufar, K., Črepinšek, Z., Kajfež Bogataj, L. in Serrano-Notivoli, R. 2021. SLOCLIM: A high-resolution daily gridded precipitation and temperature dataset for Slovenia. *Earth System Science Data Discussions.*, pp.1–23.

## UPRAVLJANJE GOZDNIH EKOSISTEMOV

### Razvoj modela za načrtovanje gospodarjenja z gozdovi z uporabo sivih števil v DEMATELu

Tjaša ŠMIDOVNIK<sup>1</sup>, Petra GROŠELJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana, Slovenija

\*korespondenčni avtor: [tjasa.smidovnik@bf.uni-lj.si](mailto:tjasa.smidovnik@bf.uni-lj.si)

### Razvoj modela za načrtovanje gospodarjenja z gozdovi z uporabo sivih števil v DEMATELu

**Izveček:** Tradicionalno se je gozdove večinoma uporabljalo za proizvodnjo lesa, vendar se z razvojem družbe precej spreminjajo pričakovanja. Načrtovanje upravljanja z gozdovi je zahtevno, saj nanj vpliva veliko različnih dejavnikov, kot so spreminjanje vremenskih razmer ter naraščanje informacij o gozdnih sestojih. V gozdarstvu se je zato povečalo zanimanje za večkriterijske metode, s katerimi iščemo optimalne alternative glede na več izbranih kriterijev. Metodi večkriterijskega odločanja sta tudi AHP (analitični hierarhični proces) in DEMATEL (*Decision Making Trial and Evaluation Laboratory*), ki omogočata ugotavljanje medsebojnih povezav med elementi sistema in ocenjevanje njihove pomembnosti. S pomočjo metode DPSIR (*drivers, pressures, states, impacts, responses*) smo razvili model pomembnosti kriterijev za gozdnogospodarsko načrtovanje. Kriterije modela so z besednimi izrazi ocenili trije strokovnjaki s področja gozdarstva. Njihove ocene so bile izražene s »sivimi« števili, ki so podmnožica intervalnih števil. Nato smo s pomočjo metode AHP izračunali lokalne uteži podkriterijev, z metodo DEMATEL pa lokalne uteži kriterijev. Ocene smo združili v globalne uteži. Rezultati kažejo, da ima največji pomen pri načrtovanju upravljanja z gozdom ekonomski izkupiček, najmanjši pa klimatska funkcija gozda.

**Ključne besede:** DEMATEL; siva števila; načrtovanje gospodarjenja z gozdom

### Development of a model for forest management planning using gray numbers in DEMATEL

**Abstract:** Traditionally, forests have been used for wood production, but expectations have changed as society has evolved. Forest management is complex because it is influenced by many different factors, such as climate changes and increasing information about forest stands. Therefore, there is an increasing interest in multi criteria decision making methods in forest management, which allow to select optimal alternatives according to several selected criteria. AHP (*Analytical hierarchical process*) and DEMATEL (*Decision Making Trial and Evaluation Laboratory*) are two well-known multi criteria decision making methods that allow identifying the relationships between the elements of the system and defining their importance. Using the DPSIR method (*drivers, pressures, states, impacts, responses*), a model was developed to determine the importance of the criteria for forest management planning. The criteria in the model were evaluated by three forestry experts in the field of forestry using linguistic values, which were then expressed in gray numbers. We then calculated the local weights of the sub-criteria using the AHP method and the local weights of the criteria using the DEMATEL method. We combined the local weights into global weights. The results show that economic gain has the highest importance, while climate function has the lowest importance.

**Keywords:** DEMATEL; gray numbers; forest management planning

## 1 UVOD

Upravljanje z gozdovi je zahtevna in odgovorna naloga. Tradicionalno se je gozdove večinoma uporabljalo za proizvodnjo lesa, vendar so se v zadnjih desetletjih pričakovanja družbe močno spremenila (Standovár in sod., 2016). Naraščanje negotovosti pri upravljanju gozdov (zaradi pojavov kot so naravne ujme, škodljivci, nihanje cen lesnih sortimentov ipd.), spreminjanje okoljskih razmer (dvig temperature, spremembe v količini padavin) in naraščanje podatkov o gozdnih sestojih in gospodarjenju z gozdom je povečalo potrebe po sistemih za podporo odločanju (Vacik in Lexer, 2001). To so matematične metode, ki se uporabljajo za iskanje optimalnih alternativ in vključujejo več, lahko tudi nasprotujočih si, ciljev (Eggers in sod., 2019). Pri upravljanju gozdov se uporabljajo različne metode, kot so (ne)linearno programiranje, delno celoštevilsko programiranje ter metode večkriterijskega odločanja, kot so AHP (Analytic Hierarchy Process) ter ciljno programiranje (Belavenutti in sod., 2018).

Več kot je deležnikov vključenih v proces odločanja, več izkušenj, znanj, mnenj, različnih pogledov in osebnih preferenc lahko zajamemo.

Cilj raziskave v prispevku je bil razviti model kriterijev, ki vplivajo na načrtovanje gospodarjenja z gozdom. Podobne modele so že razvijali različni avtorji. Eden izmed njih je tudi Eggers, ki je skupaj s sodelavci ocenjeval 10 različnih scenarijev gospodarjenja z gozdovi na Švedskem (Eggers in sod., 2019).

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 DPSIR model

DPSIR (*drivers, pressures, states, impacts, responses*) je model, ki predstavlja interakcije med okoljem in družbo; vpliv človeka na okolje ter obratno. Lahko ga uporabimo v vseh ekosistemih, najbolj pa je uveljavljen na področju kakovosti vode in zraka. Razvila ga je Evropska okoljska agencija. Metoda DPSIR je sestavljena iz D – gonilna sila, P – pritiski/obremenitve, S – trenutno stanje, I – vplivi ter R – odzivi (Gari in sod., 2015).

### 2.2 Analitični hierarhični proces

Ena najbolj znanih in uporabljenih metod večkriterijskega odločanja je analitični hierarhični proces (AHP). AHP pomaga odločevalcu pri določanju uteži primerjanih elementov. Najprej je potrebno narediti odločitveno drevo. Na vrhu je postavljen cilj, pod njim se nahajajo kriteriji, podkriteriji ter na dnu alternative. Ko imamo odločitveno drevo postavljeno, sledijo parne primerjave elementov na istem nivoju glede na element na višjem nivoju. Pri tem uporabljamo lestvico od 1 do 9. Ocena 1 predstavlja enako pomembnost, ocena 9 pa absolutno razliko pomembnosti (Grošelj in sod., 2016).c.) DEMATEL (*Decision Making Trial and Evaluation Laboratory*)

Metoda DEMATEL (*Decision Making Trial and Evaluation Laboratory*) se uporablja za ugotavljanje medsebojnih povezav med elementi sistema. V prvem koraku izberemo kriterije. Nato narišemo usmerjen graf, kjer vozlišča predstavljajo kriterije, puščice pa predstavljajo neničelni vpliv enega kriterija na drugega (v smeri poteka puščice). Ocenjevalec oceni medsebojni vpliv kriterijev. Ocene zapišemo v obliki matrike (Michnik, 2013).

### 2.3 Siva števila

Siva števila so del intervalnih števil ter predstavljajo zaprti interval  $[I_L, I_U]$ ,  $\{x: I_L \leq x \leq I_U, x \in \mathbb{R}\}$ , kjer je  $\mathbb{R}$  množica realnih števil,  $I_L$  spodnja meja (minimum) in  $I_U$  zgornja meja (maksimum) (Bai in Sarkis, 2013). Sivo število je nedoločeno število, ki ima znano območje, vendar neznan položaj znotraj meja (Voskoglou, 2018). Teorijo sivih števil lahko uporabljamo pri reševanju problemov, kjer imamo nepopolne oziroma negotove informacije (Bai in Sarkis, 2013).

### 2.4 Dermitel

Ocenjevalci ocenijo vpliv posameznega kriterija na drug kriterij z naslednjimi besednimi izrazi: nima vpliva [0; 0], majhen vpliv [0; 0,25], srednje velik vpliv [0,25; 0,5], velik vpliv [0,5; 0,75], zelo velik vpliv [0,75; 1]. Ocene vsakega od ocenjevalcev vpišemo v svojo matriko.

Z enačbami normaliziramo spodnje meje  $\underline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k = \frac{(\underline{\otimes} \beta_{ij}^k - \min_j \underline{\otimes} \beta_{ij}^k)}{\Delta_{min}^{max}}$  in zgornje meje  $\overline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k = \frac{(\overline{\otimes} \beta_{ij}^k - \min_j \overline{\otimes} \beta_{ij}^k)}{\Delta_{min}^{max}}$ , kjer je  $\Delta_{min}^{max} = \max_j \overline{\otimes} \beta_{ij}^k - \min_j \underline{\otimes} \beta_{ij}^k$ . Nato z enačbo  $z_{ij}^k = \min_j \underline{\otimes} \beta_{ij}^k + y_{ij}^k \Delta_{min}^{max}$ , kjer je  $y_{ij}^k = \frac{\underline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k (1 - \underline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k) + \overline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k \times \overline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k}{1 - \underline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k + \overline{\otimes} \tilde{\beta}_{ij}^k}$  sive ocene pretvorimo v običajna števila.

Zatem združimo ocene vseh ocenjevalcev v matriki  $D$ , tako da izračunamo povprečje ocen posameznih ocenjevalcev. Matriko  $D$  kalibriramo tako, da vsak element delimo z vsoto vseh elementov v matriki. Sledi izračun matrike  $T$ , ki predstavlja moč in vplive. To storimo z enačbo  $T = C(I - C)^{-1}$  (Michnik, 2013).

Za vsak kriterij izračunamo vsoto vrstice  $r_i$ , ki predstavlja celoten vpliv, in vsoto stolpca  $c_i$ , ki predstavlja celotno dovzetnost kriterijev. Nato izračunamo  $r_i + c_i$ , ki predstavlja pomembnost kriterijev v sistemu, in  $r_i - c_i$ , ki predstavlja vlogo (pozicijo) kriterija v sistemu; pozitivna vrednost pomeni, da kriterij vpliva na druge dejavnike, negativna vrednost pa, da drugi dejavniki vplivajo nanj (Liu in sod., 2020).

Za boljšo preglednost ter lažjo analizo se lahko rezultate prikaže na garfu  $r_i - c_i$  v odvisnosti od  $r_i + c_i$ . Graf je razdeljen na štiri kvadrante. Skupina vzrokov je razporejena v prvem in drugem kvadrantu, skupina učinkov pa v tretjem ter četrtem kvadrantu. V prvem kvadrantu so ključni dejavniki. Te dejavniki imajo visoko pomembnost. Dejavnike v drugem kvadrantu imenujemo vodilni dejavniki. V tretjem kvadrantu so neodvisni dejavniki, ki so relativno ločeni od sistema. Elementi vpliva se nahajajo v četrtem kvadrantu. Nanje vplivajo drugi dejavniki.

Na podlagi vrednosti  $r_i - c_i$  in  $r_i + c_i$  smo nato z enačbo  $\omega_i = \sqrt{(r_i + c_i)^2 + (r_i - c_i)^2}$  izračunali lokalne uteži kriterijev (Dalalah in sod., 2011).

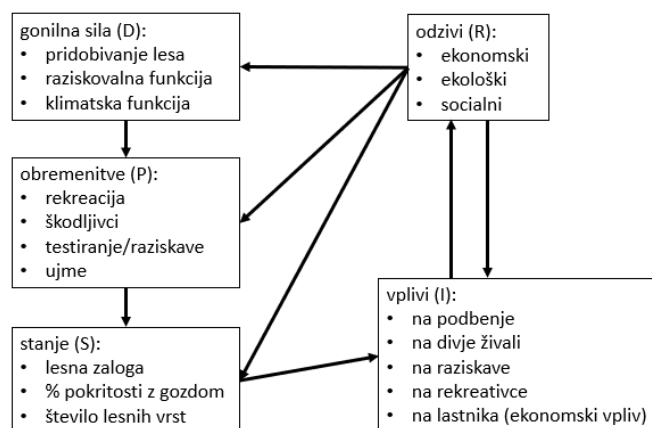
### 2.5 Združevanje uteži AHP in DEMATEL

Uteži kriterijev, pridobljenih z DEMATEL, smo pomnožili z utežmi podkriterijev, ki smo jih pridobili z AHP. Tako smo dobili globalne oziroma skupne uteži za vse podkriterije, ki smo jih nato lahko med seboj primerjali.



## 2.6 Model

S pomočjo metode DPSIR smo naredili model za ocenjevanje kriterijev, ki vplivajo na gospodarjenje z gozdovi (Slika ). Kriterije smo določili na podlagi literature (Gari in sod., 2015) ter pogovorom s strokovnjaki. Določili smo medsebojne povezave (vpliv kriterija na drugega poteka v smeri puščice), ki predstavljajo medsebojno odvisnost komponent. Model je narejen za splošno ocenjevanje mestnih ter primestnih gozdov. Kot gonilno silo (D) smo izbrali različne funkcije gozda (pridobivanje lesa, raziskovalna in klimatska funkcija). Kot neposredne obremenitve (P) smo izpostavili rekreacijo ljudi na gozdnem območju, škodljivce, testiranje oziroma raziskave, ki se izvajajo na tem področju, ter ujme, ki v zadnjih letih v slovenskih gozdovih povzročajo veliko nevšečnosti. Za opis trenutnega stanja (S) smo uporabili lesno zalogo, delež pokritosti območja z gozdom ter število lesnih vrst, ki se trenutno nahajajo v gozdu. Zanimajo nas učinki sprememb (I) na podnebje, divje živali, raziskave, rekreacijo ter lastnika z vidika ekonomskega vpliva. Oceniti želimo tudi, kakšni bodo ekonomski, ekološki in socialni odzivi (R).



**Slika 1:** Model gospodarjenja z gozdom narejen z metodo DPSIR.

V našem primeru smo model uporabili na primeru raziskovalnega gozda Oddelka za gozdarstvo ter obnovljive gozdne vire, Biotehniške fakultete. Izbrani trije strokovnjaki z Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete so z besednimi izrazi (nima vpliva, majhen vpliv, srednje velik vpliv, velik vpliv ali zelo velik vpliv) ocenili medsebojni vpliv kriterijev DPSIR za dani model. S pomočjo DEMATEL smo izračunali uteži za teh pet kriterijev.

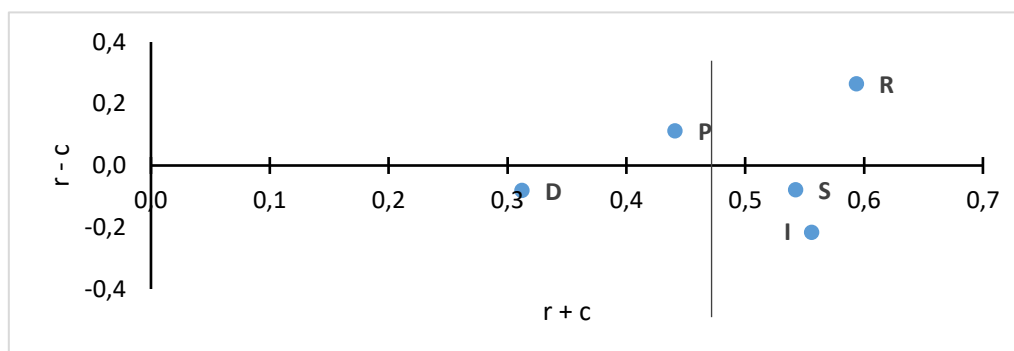
Isti strokovnjaki so nato s pomočjo AHP ocenili tudi pomembnost podkriterijev vseh petih DPSIR kategorij (gonilna sila, obremenitve, stanje, odzivi in vplivi). Ker metoda AHP temelji na subjektivnih ocenah deležnikov, ima izbira le teh vpliv na končne rezultate. Izračuni AHP so bili narejeni s pomočjo Excelove predloge (Geopel, 2018).

Kot zadnji korak smo uteži podkriterijev pomnožili z utežmi kriterijev ter dobili skupne oziroma globalne ocene.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Na Sliki 2 je prikazana razporeditev kriterijev DPSIR modela. Razberemo, da sta v skupini vzročnih dejavnikov elementa P – obremenitve ter R – odzivi. V skupino učinkov sodijo elementi S – stanje, I – vplivi in D – gonilna sila. Ključni element v našem primeru predstavlja R – odzivi. Ta rezultat je pričakovanj, saj načrtovalci gozdov želijo iz gozda pridobiti kar se da veliko dobrin. Vodilni element je P – obremenitve. Zadnje čase, zaradi podnebnih sprememb

ter pojava škodljivcev, ta dva vzroka narekujeta gospodarjenje z gozdom. V skupino neodvisnih dejavnikov spada element D – gonilna sila. Gonilno silo si vsak načrtovalec izbere sam, glede na to, kakšen namen ima izbrano gozdno območje. V četrtem kvadrantu sta v našem primeru elementa S – stanje ter I – vplivi. Sta pomembna in nanje najbolj vpliva R – odzivi.



Slika 2: Grafična razporeditev elementov DPSIR modela.

Preglednica 1 prikazuje izračunane lokalne (za kriterije, ki so elementi DPSIR modela so izračunane z DEMATEL, za podkriterije pa z AHP) in globalne oziroma skupne uteži za podkriterije.

Preglednica 1: Lokalne in globalne uteži kriterijev in podkriterijev.

element DPSIR (lokalna utež)	podkriterij	lokalna utež	globalna / skupna utež
<b>D - gonilna sila</b> (0,13)	pridobivanje lesa	0,55	0,07
	raziskovalna funkcija	0,33	0,04
	klimatska funkcija	0,13	0,02
<b>P - obremenitve</b> (0,18)	rekreacija	0,07	0,01
	škodljivci	0,42	0,08
	testiranje/raziskave	0,16	0,03
	ujme	0,34	0,06
<b>S - stanje</b> (0,21)	lesna zaloga	0,53	0,11
	% pokritosti z gozdom	0,23	0,05
	število lesnih vrst	0,23	0,05
<b>I - vplivi</b> (0,23)	na podnebje	0,21	0,05
	na divje živali	0,21	0,05
	na raziskave	0,21	0,05
	na rekreativce	0,09	0,02
	na lastnika (ekonomski vidik)	0,27	0,06
<b>R - odzivi</b> (0,25)	ekonomski	0,55	0,14
	ekološki	0,35	0,09
	socialni	0,10	0,03

Iz lokalnih uteži, ki smo jih pridobili z AHP, lahko ugotovimo, da ima največji pomen pri gonilni sili pridobivanje lesa, sledi raziskovalna funkcija, kar je pomembno, saj gre za raziskovalni gozd. Največjo obremenitev preučevanemu gozdu predstavljajo škodljivci ter ujme. Pri oceni stanja ima največji vpliv lesna zaloga. Gospodarjenje z gozdom ima največji vpliv na lastnika (iz ekonomskega vidika), nato sledijo vplivi na podnebje, vpliv na prostoživeče živali in raziskave. Najpomembnejši odziv gospodarjenja z gozdom je ekonomski, sledi ekološki. S pomočjo DEMATEL smo izračunali, da ima največjo moč v našem DPSIR modelu element R – odzivi. Sledita elementa I – vplivi ter S – stanje. Najmanjši vpliv ima element D – gonilna sila. Iz rezultatov (globalne oziroma skupne uteži) lahko razberemo, da ima največjo moč vpliv na to, kako gospodarimo z gozdom, ekonomski izkupiček, sledi lesna zaloga. V zadnjih letih je veliko poudarka na ekološkem pomenu gozda ter škodljivcih. Ta dva podkriterija sta se uvrstila na tretje in četrto mesto. Ugotovimo lahko, da načrtovalci upravljanja z gozdovi dajo najmanjši poudarek podkriterijema klimatska funkcija gozda ter rekreacija ljudi.

Kot vidimo, ima še vedno zelo močen vpliv tradicionalna raba gozda. Ker so se pričakovanja družbe spremenila in so postale pomembne tudi druge funkcije gozda, je le tem potrebno dati večji poudarek pri načrtovanju upravljanja z gozdom.

#### 4 SKLEPI

Gospodarjenje z gozdom je zelo zahtevna naloga. S pomočjo DPSIR metode smo razvili model, ki nam pomaga določiti, kateri kriteriji imajo večjo moč pri načrtovanju gospodarjenja z gozdovi. Uporabimo ga lahko za ocenjevanje mestnih ter primestnih gozdov. Elementi, ki sestavljajo DPSIR model, so D – gonilna sila, P – obremenitve, S – stanje, I - vplivi in R – odzivi. Vsakemu elementu smo določili nekaj podkriterijev. V našem primeru smo model aplicirali na raziskovalni gozd Biotehniške fakultete. Ocenili so ga trije strokovnjaki s pomočjo metod večkriterijskega odločanja. Sestavne dele DPSIR modela (kriterije) smo ocenili z DEMATEL, podkriterije pa z AHP. Dobljene ocene smo na koncu združili.

Rezultati AHP kažejo, da ima še vedno največji pomen pridobivanje lesa ter ekonomski izplen. Pridobljeni rezultati kažejo, da ima največjo moč v našem DPSIR modelu element R – odzivi. Njegova podkriterija ekonomski in ekološki odziv sta se po pomembnosti uvrstila na prvo ter tretjo mesto, medtem ko je premalo poudarka na socialnem odzivu. Najmanjši pomen pri načrtovanju upravljanja z gozdom imata kriterija klimatska funkcija ter rekreacija.

V prihodnje je potrebno model testirati na več različnih mestnih ter primestnih gozdov. Prav tako bi modelu lahko dodali različne alternativne scenarije gospodarjenja z gozdom, ki bi jih s pomočjo modela lahko primerjali. Tako bi lahko izbrali optimalni scenarij gospodarjenja z gozdom za izbrano gozdno območje.

#### ZAHVALA

Delo je bilo financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), program za usposabljanje mladih raziskovalcev ter program P4-0059, Gozd, gozdarstvo in obnovljivi gozdni viri.

## 5 VIRI

- Bai, C., & Sarkis, J. (2013). A grey-based DEMATEL model for evaluating business process management critical success factors. *International Journal of Production Economics*, 146(1), 281–292.
- Belavenutti, P., Romero, C., & Diaz-Balteiro, L. (2018). A critical survey of optimization methods in industrial forest plantations management. *Scientia Agricola*, 75(3), 239–245.
- Dalalah, D., Hayajneh, M., & Batieha, F. (2011). A fuzzy multi-criteria decision making model for supplier selection. *Expert Systems with Applications*, 38(7), 8384–8391.
- Eggers, J., Holmgren, S., Nordström, E. M., Lämås, T., Lind, T., & Öhman, K. (2019). Balancing different forest values: Evaluation of forest management scenarios in a multi-criteria decision analysis framework. *Forest Policy and Economics*, 103(October 2016), 55–69.
- Gari, S. R., Newton, A., & Icely, J. D. (2015). A review of the application and evolution of the DPSIR framework with an emphasis on coastal social-ecological systems. *Ocean and Coastal Management*, 103, 63–77.
- Grošelj, P., Hodges, D. G., & Zadnik Stirn, L. (2016). Participatory and multi-criteria analysis for forest (ecosystem) management: A case study of Pohorje, Slovenia. *Forest Policy and Economics*, 71, 80–86.
- Liu, H., Long, H., & Li, X. (2020). Identification of critical factors in construction and demolition waste recycling by the grey-DEMATEL approach: a Chinese perspective. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(8), 8507–8525.
- Michnik, J. (2013). Weighted influence non-linear gauge system (WINGS)-An analysis method for the systems of interrelated components. *European Journal of Operational Research*, 228(3), 536–544.
- Standovár, T., Szmorad, F., Kovács, B., Kelemen, K., Plattner, M., Roth, T., & Pataki, Z. (2016). A novel forest state assessment methodology to support conservation and forest management planning. *Community Ecology*, 17(2), 167–177.
- Vacik, H., & Lexer, M. J. (2001). Application of a spatial decision support system in managing the protection forests of Vienna for sustained yield of water resources. *Forest Ecology and Management*, 143(1–3), 65–76.
- Voskoglou, M. (2018). Application of Fuzzy Numbers to Assessment Processes, 7, 407–420.

## ZNANOST O CELICI

### Izgradnja in preoblikovanje medceličnih stikov v epidermisu členonožca med embrionalnim in postembrionalnim razvojem

Katja KUNČIČ<sup>1\*</sup>, Nada ŽNIDARŠIČ<sup>1</sup>, Polona MRAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

\*korenspondenčni avtor: [katja.kuncic@bf.uni-lj.si](mailto:katja.kuncic@bf.uni-lj.si)

#### **Izgradnja in preoblikovanje medceličnih stikov v epidermisu členonožca med embrionalnim in postembrionalnim razvojem**

**Izveček:** Medcelični stiki so kompleksne proteinske povezave med sosednjimi celicami in so ključni za organizacijo celic v tkivu ter za zagotavljanje različnih funkcij tkiva. Vedno več raziskav kaže, da se lahko znatno preoblikujejo v skladu s spremembami v arhitekturi in delovanju tkiv. Epidermalni epitel členonožcev je ektodermalnega izvora in razmejuje notranje okolje organizma od zunanosti ter izloča eksoskelet. Največjim strukturnim spremembam je izpostavljen med razvojem v skladu z morfogenezo in v času levitve. Analizirali smo strukturne spremembe adherentnih in septiranih stikov v epidermisu med razvojem členonožca *Porcellio scaber* v izbranih fazah embrionalnega in postembrionalnega razvoja. Histološko organizacijo epitela smo analizirali s svetlobno mikroskopijo, ultrastrukturno zgradbo medceličnih stikov pa s presežno elektronsko mikroskopijo. Adherentni stiki so nameščeni subapikalno in se strukturno v analiziranih fazah ne spreminjajo. Na prehodu v pozno embriogenezo je razviden premik adherentnih stikov še bolj proti apikalni površini celic. Med razvojem se izrazito spremeni ultrastruktura septiranih stikov. Posamezne septe so prvič razvidne v fazi poznega embrija, v skladu z diferenciacijo se nizi sept začnejo daljšati med prehodom v postembrionalni razvoj in kasneje v razvoju tvorijo septirane stike iz daljših neprekinjenih nizov sept. Med levitvijo, ki poteče v postembrionalnem obdobju, se spremeni oblika epidermalnih celic in ultrastruktura septiranih stikov, ki se preoblikujejo v krajše in prekinjene nize sept. Naši rezultati kažejo, da se adherentni stiki oblikujejo pred septiranimi stiki, ki se med razvojem še intenzivno preoblikujejo.

**Ključne besede:** epidermis; morfogeneza; adherentni stik; septirani stik; ultrastruktura

#### **Formation and remodelling of cell junctions in arthropod epidermis during embryonic and postembryonic development**

**Abstract:** Cell junctions are complex protein connections between the plasma membranes of neighbouring cells. They are essential for the organization of cells in tissue and perform additional functions. There is an increasing amount of information available on modifications of cell junctions in relation to changes in tissue architecture and function. Arthropod epidermal epithelium is ectodermal in origin. It separates the internal environment of the organism from the external environment and forms the exoskeleton. The epidermis is structurally modified during development in relation to morphogenesis and during molting phase. We have analysed the structural changes of adherens and septate junctions in the epidermis in selected stages of embryonic and postembryonic development of arthropod *Porcellio scaber*. Histological organization of epithelium was imaged by light microscopy and ultrastructural characterization was performed by transmission electron microscopy. Adherens junctions are structurally

similar in all analysed developmental stages. A slight shift in their location is evident at the transition to late embryogenesis, as they are positioned closer to the apical surface of cells than in mid-embryogenesis. The ultrastructure of septate junctions significantly changes during development. The late embryo is the earliest developmental stage in which individual septa between epidermal cells are resolved. Strings of septa become longer during the transition from embryonic to postembryonic stages. In later developmental stages they form long and continuous strings of septa. During the first molt in postembryonic development, the shape of epidermal cells changes, and septate junctions are remodelled into shorter and discontinuous strings of septa. Our results show that adherens junctions are formed earlier in development than septate junctions, and that septate junctions are assembled and intensively remodelled in analysed developmental stages.

**Key words:** epidermis; morphogenesis; adherens junction; septate junction; ultrastructure

## 1 UVOD

Epitelna tkiva prekrivajo zunanje in notranje površine telesa ter omogočajo selektiven prenos snovi. Obe funkciji morata biti zagotovljeni že med razvojem, pri čemer imajo pomembno vlogo medcelični stiki, ki povezujejo epitelne celice v sloj ter omogočajo polarnost celic z razmejitvijo celične membrane na apikalno in bazolateralno domeno (Fristrom 1988). Medcelični stiki so v splošnem zgrajeni iz transmembranskih proteinov, ki se v celici povezujejo s citoskeletom, v medceličnem prostoru pa se vežejo s proteini na sosednjih celicah (Alberts in sod., 2014). Lahko se prilagajajo procesom rasti, razvoja in obnavljanja epitelov, tako da se preoblikujejo ali tvorijo na novo (Alberts in sod., 2014; Takeichi, 2014). V epitelih vretenčarjev so najbolj apikalno nameščeni tesni stiki, proti bazalnemu delu pa jim sledijo adherentni stiki ter dezmosomi. Tesni stiki in adherentni stiki potekajo v splošnem v obliki pasu okoli oboda celice, dezmosomi pa so točkovne povezave. Tesni stiki zagotavljajo selektivno prepustnost paracelularne transportne poti, adherentni stiki pa imajo primarno vlogo v mehanski stabilizaciji (Alberts in sod., 2014; Pavelka in Roth, 2015). V epitelih nevretenčarjev so subapikalno nameščeni adherentni stiki, bolj bazalno pa septirani stiki, za katere velja, da so funkcijsko podobni tesnim stikom pri vretenčarjih (Compère in sod., 2004; Izumi in Furuse, 2014). Razporeditev in ultrastrukturno organizacijo medceličnih stikov lahko opazujemo z elektronskim mikroskopom. Adherentni stiki so sestavljeni iz dveh elektronsko gostih plakov ob lateralnih membranah, v medceličnem prostoru je manj elektronsko gost homogen material (Pavelka in Roth, 2015). Septirane stike gradijo nizi elektronsko gostih pregrad v medceličnem prostoru, kar se v prečnem prerezu odraža kot struktura v obliki lestve med sosednjima celicama (Izumi in Furuse, 2014).

Epidermis nevretenčarjev je enoslojni epitel na površini organizma in predeljuje notranjost organizma in njegovo zunanje okolje. Epidermis rakov je na obeh straneh prekrit z zunajceličnim matriksom, na bazalni strani z bazalno lamino, na apikalni strani pa z mineralizirano hitinsko kutikulo, ki tvori trden eksoskelet (Compère in sod., 2004). Kutikula je namenjena dodatni zaščiti živali, preprečuje izgubo vode in omogoča gibanje, saj se nanjo pripenjajo mišice (Hadley 1981; Compère in sod., 2004). Raki rastejo celo življenje, zaradi česar se v času postembrionalnega razvoja in v odrasli dobi periodično levijo. V času levitve se spremeni oblika epidermalnih celic, poteka tvorba nove kutikule, stara kutikula pa se odstrani s površine telesa (Dillaman in sod., 2013; Mrak, 2015; Mrak in sod., 2015).

Cilj te študije je opredelitev strukturnih značilnosti tvorbe in preoblikovanja medceličnih stikov med morfogenezo epidermisa nevretenčarjev, zaradi česar smo analizirali ultrastrukturno medceličnih stikov pri odraslih živalih in pri izbranih embrionalnih in postembrionalnih

razvojnih fazah modelnega organizma vrste *Porcellio scaber* (Latreille, 1804). Embrionalni razvoj in zgodnji postembrionalni razvoj (marzupijske manke) pri raku *P. scaber* poteka v valilniku, s tekočino napolnjeni vrečasti strukturi samice, nadaljnji postembrionalni razvoj (postmarzupijske manke) pa poteka v zunanjem okolju. Največje spremembe v ultrastrukturi medceličnih stikov pričakujemo med prehodom iz embrionalnega v postembrionalni razvoj, ko se embrij izleže iz jajčnih ovojnic, ter po sprostitvi mank iz valilnika, ko žival preide iz reguliranega vodnega okolja v zunanje okolje.

## 2 MATERIAL IN METODE

Analizirali smo epidermis odraslih živali ter izbranih postembrionalnih (postmarzupijske in marzupijske manke) in embrionalnih razvojnih faz raka enakonožca vrste *P. scaber*. Ta organizem nam omogoča proučevanje preoblikovanja medceličnih stikov v intaktnih epitelih v različnih razvojnih fazah in umeščanje proučevanih procesov v širši *in situ* kontekst normalne morfogeneze tkiva, organa in razvoja celotnega organizma. *P. scaber* je vrsta mokric, ki je splošno razširjena v okolju, njeno vzdrževanje v laboratoriju ni zahtevno, zanimiva pa je tudi z vidika proučevanja prilagoditev členonožcev na življenje na kopnem (Milatovič in sod., 2010).

Odrasle živali smo pridobili iz različnih predelov Slovenije in jih gojili v laboratoriju v steklenem terariju s podlago iz zemlje in listov jelša (25 °C, visoka vlažnost, 12-urni svetlobni cikel). Iz kulture smo za raziskavo izbrali odrasle živali obeh spolov, brez zunanjih znakov levitve, samice brez valilnika. Za analizo epidermalnega epitela odraslih živali smo opravili sekcijo in izolirali tergite (dorzalne plošče) ter jih fiksirali v 2 % formaldehidu in 2,5 % glutaraldehidu v 0,1 M pufru HEPES (pH = 7,2) ali v enakem fiksativu z dodanim 2,5 % EDTA. Postmarzupijske manke smo pridobili 3 ali 14 dni po sprostitvi iz valilnika. Marzupijske manke smo izolirali iz valilnika gravidnih samic in jih po klasifikaciji v članku Mrak in sod. (2014) glede na morfološke značilnosti razvrstili v tri zaporedne faze marzupijskih mank (zgodnja, srednja, pozna). Embrije smo izolirali iz valilnika in jih klasificirali v razvojne faze glede na morfološke značilnosti v skladu s člankom Milatovič in sod. (2010). Za analizo smo izbrali srednji embrij v fazi S13 in pozni embrij v fazi S16. Embrije in manke smo po izolaciji fiksirali v 2,5 % glutaraldehidu v 0,1 M kakodilatnem pufru (pH = 7,2). Vzorce smo po fiksaciji sprali s pufrom, ki smo ga uporabili tudi v fiksativu in postfiksirali 1-2 uri z 1 % osmijevim tetrosidom. Po spiranju s pufrom ali z vodo Milli Q smo vzorce postopoma dehidrirali v raztopinah etanola z naraščajočo koncentracijo od 50 % do 100 % ter nazadnje v 100 % acetonu. Sledilo je vklapljanje vzorcev v smolo. Impregnacija s smolo Agar 100 je potekala v mešanici aceton:smola, najprej v razmerju 2:1 za 2 uri, nato v razmerju 1:2 čez noč, na koncu pa še 24 ur v čisti smoli. Impregnirane vzorce smo prenesli v modelčke za oblikovanje blokcev in jih prekrili s čisto smolo. Polimerizacija smole je potekala vsaj 24 ur pri 60 °C.

### 2.1 Svetlobna mikroskopija

Iz vzorcev, vklopljenih v smolo, smo pripravili poltanke rezine debeline 0,5 µm z ultramikrotomom Reichert Ultracut S (Leica). Rezine smo prenesli v kapljico vode na objektno stekelce in jih posušili na grelni plošči (80 °C). Preparete smo barvali z mešanico barvil Azur II – metilen modro (barvanje po Richardsonu) na grelni plošči ter jih prekrili s krovnim medijem Ultrakitt in krovnim stekelcem. Poltanke rezine smo uporabili za pregled prereza vzorca in histološko analizo s svetlobnim mikroskopom Axioskop (Zeiss) opremljenim z digitalno kamero DFC290HD (Leica) ter programsko opremo LAS V4.0.

### 2.2 Presevna elektronska mikroskopija

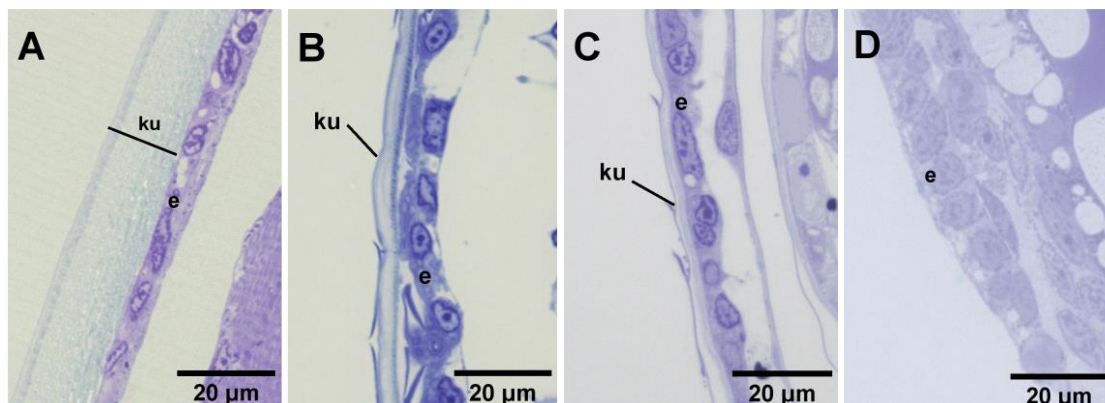
Za presevno elektronsko mikroskopijo smo iz vzorcev v smoli pripravili ultratanke rezine debeline 70 nm z diamantnim nožem in ultramikrotomom Reichert Ultracut S (Leica). Rezine smo prenesli na bakreno mrežico in jih kontrastirali z uranil acetatom 10 minut in s svinčevim citratom 5 minut. Pregled rezin in dokumentiranje rezultatov smo opravili na presevnem elektronskem mikroskopu CM 100 (Philips), opremljenim z digitalno kamero Orius SC200 (Gatan) in programsko opremo Digital Micrograph.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 Spremembe oblike epidermalnih celic med embrionalnim in postembrionalnim razvojem

Epidermalni epitel pri vrsti *P. scaber* je enoslojni epitel. V odrasli fazi epidermis apikalno prekriva mineralizirana večslojna kutikula, ki tvori eksoskelet. Epidermalne celice so sploščene z ovalnimi jedri (Slika 1A).

Epidermalne celice so pri postmarzupijskih mankah (3 in 14 dni po sprostitvi iz valilnika), srednji in zgodnji marzupijski manki ter poznem embriju (S16) po obliki podobne kot pri odrasli živali (Slika 1C). Pri pozni marzupijski manki, ko se žival prvič levi, se spremeni oblika epidermalnih celic, razmerje med višino in širino je večje (Slika 1B). V fazi srednjega embrija se oblika epidermalnih celic v različnih regijah telesne površine razlikuje. Na dorzalni strani telesne površine so celice sploščene, na lateralni strani sploščene ali kubične oblike (Slika 1D), na ventralni strani pa kubične ali prizmatične oblike.



**Slika 1:** A. Histološka zgradba integumenta odrasle živali. Enoslojni ploščati epitel prekriva debela kutikula. B-D. Histološka zgradba integumenta v izbranih razvojnih fazah. B. Pozna marzupijska manka. C. Zgodnja marzupijska manka. D. Srednji embrij, lateralna stran telesne površine. e – epidermis; ku – kutikula.

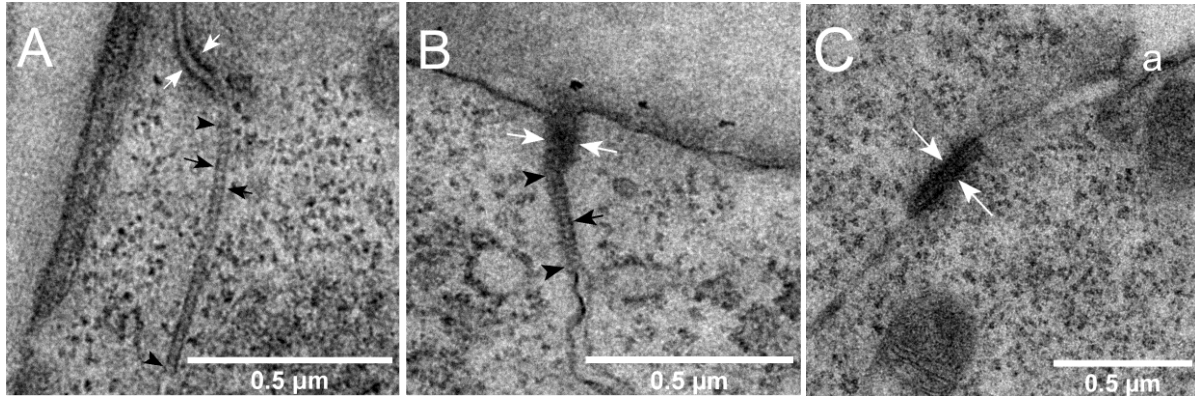
#### 3.2 Ultrastruktura medceličnih stikov v epidermisu odraslih živali in med morfogenezo integumenta

Epidermalne celice so na lateralnih membranah povezane z medceličnimi stiki (Slika 2A). Pri vseh analiziranih vzorcih je subapikalno nameščen adherentni stik z značilno ultrastrukturo – elektronsko gosta plaka ob lateralnih membranah na citosolni strani, med membranama je manj elektronsko gost homogen material (Slika 2). Pri srednjem embriju so adherentni stiki bolj oddaljeni od apikalne površine kot pri ostalih analiziranih razvojnih fazah (Slika 2C).

Bazalno od adherentnih stikov so nameščeni septirani stiki. Elektronsko goste pregrade ali septe v nizih so jasno razvidne med lateralnima membranama v območju stika v epidermisu odraslih živali, postmarzupijskih in marzupijskih mank. Pri odraslih živalih so septirani stiki različno dolgi, večinoma neprekinjeni, prekinjene nize sept opazimo redko (Slika 2A). Pri obeh analiziranih fazah postmarzupijske manke (3 in 14 dni po sprostitvi iz valilnika) so septirani



stiki strukturno podobni kot pri odraslih, vendar krajši. Pri pozni marzupijski manki so stiki pogosteje iz več zaporednih nizov sept, ločenih z odseki membran brez sept. Pri srednji marzupijski manki so stiki krajši kot v odrasli fazi, prekinitve opazimo redko (Slika 2B). V fazi zgodnje marzupijske manke so septirani stiki zelo variabilni, so različnih dolžin ali pa jih sestavljajo zaporedni kratki nizi sept. V fazi poznega embrija so med lateralnima membranama bazalno od adherentnega stika razvidne samo posamezne septe in elektronsko gost material ali pa več kratkih nizov sept. Pri srednjem embriju v epidermisu še niso izoblikovane niti posamezne septe (Slika 2C).



**Slika 2:** Ultrastruktura medceličnih stikov v epidermisu. **A.** Pri odraslih je subapikalno nameščen adherentni stik, bazalno od njega je septirani stik. **B.** Srednja marzupijska manka. Adherentni stik, bazalno od njega krajši, neprekinjen septirani stik. **C.** Srednji embrij (S13). Adherentni stik je bolj oddaljen od apikalne celične membrane (a). bele puščice – adherentni stik, črne puščice – posamezne septe, glave črnih puščic – začetek in konec septiranega stika.

#### 4 DISKUSIJA

Za epidermalni epitel odraslih živali so značilni subapikalni adherentni stiki in bazalno pod njimi nameščeni septirani stiki, ki so večinoma v obliki dolgih neprekinjenih nizov sept, nekatere stike pa sestavljajo prekinjeni nizi sept.

V epidermalnem epitelu so že v fazi srednjega embrija prisotni adherentni stiki, ki so ultrastrukturno podobni kot v kasnejših razvojnih fazah, vendar so krajši ter nameščeni dlje od apikalne površine. Prisotnost adherentnih stikov zgodaj v razvoju se sklada z njihovo vlogo pri vzdrževanju polarnosti epitelnih celic (Vega-Salas in sod., 1987; Fristrom, 1988; Tepass in Hartenstein, 1994). Začetek oblikovanja septiranih stikov v epidermisu je na ultrastrukturnem nivoju razviden pri poznem embriju. Podobno zaporedje oblikovanja medceličnih stikov v epidermalnem epitelu med razvojem je bilo opisano pri vinski mušici *Drosophila melanogaster*. Adherentni stiki se v času embrionalnega razvoja prav tako pomaknejo iz bolj bazalne v subapikalno pozicijo, septirani stiki pa se začnejo tvoriti v pozni embriogenezi ter se med razvojem preoblikujejo do diferencirane oblike v fazi ličinke (Tepass in Hartenstein, 1994). Večje spremembe v ultrastrukturi septiranih stikov pri *P. scaber* sovpadajo z dvema ključnima dogodkoma v razvoju organizma: z izleganjem embrijev iz jajčnih ovojnic in s sprostitvijo iz valilnika. V času izleganja embrijev iz jajčnih ovojnic, ko manka preide v stik s tekočino valilnika (Milatovič in sod., 2010), so adherentni stiki že nameščeni subapikalno ter strukturno podobni kot v epitelih odraslih živali, septirani stiki pa so v obliki kratkih nizov sept. V zgodnjih postembrionalnih razvojnih fazah *P. scaber* so v skladu z morfogenezo epidermisa bolj pogosti daljši in neprekinjeni septirani stiki, kratkih in prekinjenih je vedno manj. Ob sprostitvi iz valilnika, ko je integument prvič izpostavljen pogojem kopenskega okolja, so stiki ultrastrukturno podobni stikom pri odraslih, le krajši.

Naši rezultati analize pozne marzupijske manke kažejo, da na obliko celic in septiranih stikov vpliva tudi levitev, ki poteka v tej fazi. V obdobju levitve se razmerje med višino in širino epidermalnih celic poveča, septirani stiki pa so krajši kot v zgodnejših razvojnih fazah ali pa sestavljeni iz več krajših zaporednih nizov sept.

## 5 SKLEPI

Za diferenciacijo septiranih stikov med razvojem je značilno, da tvorbi posameznih sept v fazi poznega embrija sledi postopno oblikovanje krajših nizov sept, ki jih ločujejo regije brez sept, in na koncu tvorba diferenciranega medceličnega stika iz daljših in neprekinjenih nizov sept na lateralnih membranah. Največje spremembe v ultrastrukturi septiranih stikov v epidermalnem epitelu sovpadajo s prehodom iz embrionalnega v postembrionalni razvoj ter s sprostitvijo iz valilnika. Adherentni stiki v epidermisu imajo podobno strukturo pri vseh analiziranih razvojnih fazah. Naši rezultati kažejo, da na preoblikovanje septiranih stikov vplivajo procesi razvoja organizma in tudi druge večje fiziološke spremembe integumenta, kot je levitev.

## ZAHVALA

Delo v sklopu raziskovalnega programa Integrativna zoologija in speleobiologija P1-0184 je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

## 6 VIRI

- Alberts, B., Johnson, A. D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. New York, NY: Garland Science.
- Compère, P., & Jeuniaux, C., Goffinet, G. (2004). The integument: morphology and biochemistry. In J. Forest, J. C. von Vaupel Klein, F. R. Schram (Eds.), *The Crustacea*, vol. 1 (pp. 59-144). Leiden, NL: Brill.
- Dillaman, R., Roer, R., Shafer, T., Modla, S. (2013). The crustacean integument: Structure and function. In Watling, L., Thiel, M. (Eds). *Functional Morphology and Diversity*, vol. 1. (pp. 140-166). New York, NY: Oxford University Press.
- Fristrom, D. (1988). The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review. *Tissue Cell*, 20(5), 645-690.
- Hadley, N. F. (1981). Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition and waterproofing function. *Biol Rev*, 56, 23-47.
- Izumi, Y., & Furuse, M. (2014). Molecular organization and function of invertebrate occluding junctions. *Semin Cell. Dev. Biol.* 36,186-193.
- Milatovič, M., Kostanjšek, R., Štrus, J. (2010). Ontogenetic Development of *Porcellio Scaber*: Staging Based on Microscopic Anatomy, *J Crust Biol.* 30(2), 225-235.
- Mrak, P., Žnidaršič, N., Žagar, K., Čeh, M., Štrus, J. (2014). Exoskeletal cuticle differentiation during intramarsupial development of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Arthropod struct dev.* 43, 423-439.
- Mrak, P. (2015). Funkcionalna ultrastruktura epidermisa in zunajceličnih matriksov med razvojem kopenskega raka *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Ljubljana: Biotehniška fakulteta UL.
- Mrak, P., Bogataj, U., Štrus, J., Žnidaršič, N. (2015). Formation of the hindgut cuticular lining during embryonic development of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). In Taiti S., Hornung E., Štrus J., Bouchon D. (Eds), *Trends in Terrestrial Isopod Biology* (pp. 93-109). ZooKeys.
- Pavelka, M., Roth, J. (2015). *Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*. 3 ed. Dunaj, AT: Springer.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 397-410.

Tepass, U., & Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.*, *161*, 563–596.

Vega-Salas, D. E., Salas, P. J., Gundersen, D., Rodriguez-Boulan, E. (1987). Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. *J Cell Biol.*, *104*, 905-916.

## Gene electrotransfer by high-frequency short bipolar pulses *in vitro*

Tjaša POTOČNIK<sup>1</sup>, Damijan MIKLAVČIČ<sup>1</sup>, Alenka MAČEK LEBAR<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [alenka.maceklebar@fe.uni-lj.si](mailto:alenka.maceklebar@fe.uni-lj.si)

### Gene electrotransfer by high-frequency short bipolar pulses *in vitro*

**Abstract:** Cell membrane permeabilization and irreversible electroporation were already achieved with high-frequency bipolar pulses (HF-BP) both *in vitro* and *in vivo*. We hypothesize that using HF-BP protocols also successful gene electrotransfer (GET) can be achieved. We compared GET efficiency of monopolar millisecond pulses and HF-BP protocols at various plasmid DNA (pDNA) concentrations. GET efficiency increased with increasing pDNA concentration. With the highest pDNA concentration comparable overall GET was obtained by HF-BP pulse protocols and longer monopolar pulses. However, results suggest that although we were able to achieve similar percent of transfected cells with HF-BP protocols, the number of pDNA copies that were successfully transferred into cells seemed to be lower compared to monopolar pulses. The results of our study confirmed that we can achieve successful GET with bipolar microsecond i. e. HF-BP pulses, at higher pDNA concentrations.

**Key words:** Gene electrotransfer; Electroporation; High frequency pulses; Bipolar pulses

### Genski elektroprenos z visokofrekvenčnimi bipolarnimi pulzi *in vitro*

**Izveček:** Visokofrekvenčni bipolarnimi pulzi (HF-BP) omogočajo permeabilizacijo celične membrane in ireverzibilno elektroporacijo tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. V študiji smo preverjali hipotezo, da lahko s HF-BP pulzi dosežemo tudi uspešen genski elektroprenos (GET). Primerjali smo učinkovitost GET s HF-BP pulzi in monopolarnimi milisekundnimi pulzi pri različnih koncentracijah plazmidne DNA (pDNA). Ugotovili smo, da učinkovitost GET narašča s povečano koncentracije pDNA. Celokupna GET dosežena z najvišjo koncentracijo pDNA s HF-BP pulzi je bila primerljiva s celokupno GET doseženo z daljšimi monopolarnimi pulzi. Čeprav smo uspeli doseči podoben odstotek transfeciranih celic, pa rezultati kažejo, da je bilo število kopij pDNA, ki so bile uspešno prenesene v celice manjše kot ko smo dovajali monopolarne milisekundne pulze. Rezultati naše študije so potrdili, da lahko dosežemo uspešno GET tudi z bipolarnimi mikrosekundnimi i. e. HF-BP pulzi, ampak z višjimi koncentracijami pDNA.

**Ključne besede:** Genski elektroprenos; Elektroporacija; Viskofrekvenčni pulzi, Bipolarni pulzi

## 1 INTRODUCTION

Electroporation is a method in which cells are exposed to external electric field of sufficient amplitude and duration leading to transient destabilization of cell membrane which allows ions and molecules to enter and/or leave the cell (Kotnik, Rems, Tarek, & Miklavcic, 2019; Rems, Tarek, Casciola, & Miklavcic, 2016). In medicine electroporation can be used for efficient delivery of nucleic acids (NA) into cells and tissues as a method named gene electrotransfer (GET) (Rosazza, Haberl Meglic, Zumbusch, Rols, & Miklavcic, 2016). Among the most

promising GET applications in medicine are DNA vaccination and gene therapy (Lambricht et al., 2016).

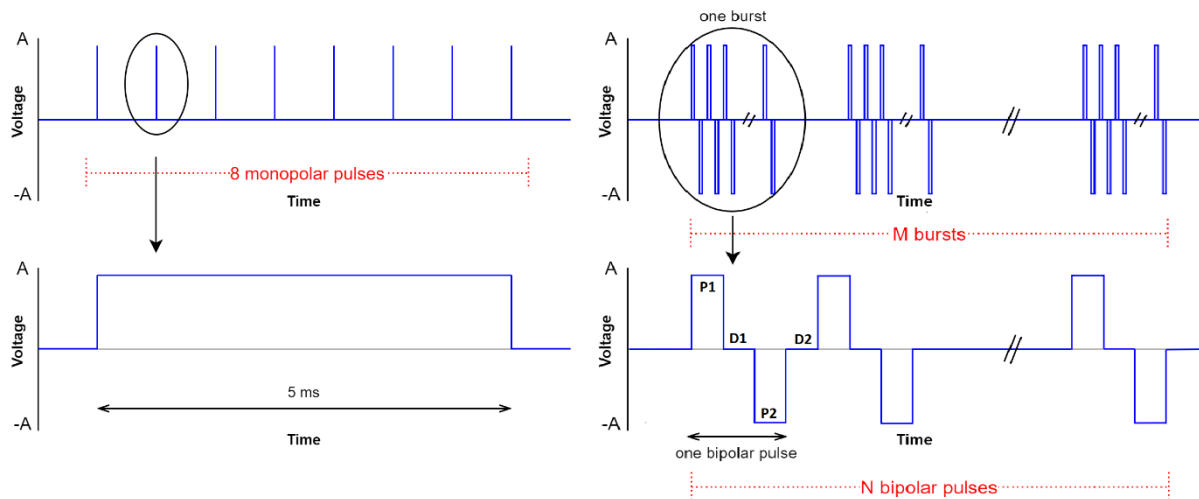
GET is usually obtained using long (100  $\mu$ s – 5 ms) monopolar pulses which can cause muscle contractions and pain and must often be synchronized with electrocardiogram (Kato et al., 2013; Mercadal, Arena, Davalos, & Ivorra, 2017). Therefore application of short (0.25 – 5  $\mu$ s) bipolar pulses delivered in bursts with repetition frequencies over 100 kHz, high-frequency bipolar pulses (HF-BP), was recently proposed (Arena et al., 2011; Sano et al., 2018; Yao et al., 2017). HF-BP pulses are reported to mitigate muscle contractions and reduce pain during electroporation based treatments (Aycock, Zhao, Lorenzo, & Davalos, 2021; Dong, Yao, Zhao, Lv, & Liu, 2018). In GET the role of electric pulses is not only permeabilization of the cell membrane, but also electrophoresis of NA that brings NA in contact with the cell membrane (Teissie, Golzio, & Rols, 2005). During short pulses electrophoretic force acts on NA for shorter period compared to longer pulses (Faurie et al., 2010) meaning that the role of electrophoresis is smaller. When higher NA concentration is used more NA are near cell membrane which can partially compensate the lack of electrophoretic force during delivery of short pulses (Kandušer, Miklavčič, & Pavlin, 2009). We hypothesized that with HF-BP pulses successful GET can be achieved. GET efficiency obtained by HF-BP protocols at various pDNA concentrations was compared to that of monopolar millisecond (8 x 5 ms) pulses.

## 2 MATERIALS AND METHODS

**Cells:** Experiments were done on Chinese hamster ovary cell line CHO – K1, cultured in HAM-F12 growth medium. For experiments cells in exponential growth phase were trypsinized and resuspended in HAM-F12 growth medium to obtain a final cell density of  $6.6 \times 10^5$  cells/ml.

**Plasmid:** A 4.7 kb plasmid pEGFP-N1 encoding green fluorescent protein (GFP) under the control of CMV promotor was used. Plasmid was amplified using *Escherichia coli* and isolated with HiSpeed Plasmid Maxi Kit. pDNA concentration was spectrophotometrically determined at 260 nm.

**Electric pulses:** We tested three different pulse protocols, namely; 8 x 5 ms: 8 pulses, 5 ms duration, 1 Hz repetition frequency, electric field 0.5 kV/cm and two HF-BP pulse protocols. In HF-BP pulse protocols bipolar pulses of 2  $\mu$ s duration of positive (P1) and negative phase (P2) were applied. The delay between positive and negative pulse phase (D1) and delay between bipolar pulses (D2) were 2  $\mu$ s. Number of pulses in each burst and number of bursts were varied, while burst repetition frequency was 1 Hz. Pulse protocol HF-BP 1 consisted of 20 bursts and in each burst 216 pulses with 1 kV/cm electric field were applied. Pulse protocol HF-BP 2 consisted of 50 bursts; in each burst 50 pulses with 1.25 kV/cm electric field were applied. For the application of pulses, a laboratory prototype pulse generator was used (Sweeney et al., 2016). During each experiment voltage and current applied to sample were measured with differential and current probe and monitored on oscilloscope.



**Figure 1:** Scheme of the pulses applied in experiments. On the left is the pulse shape of standard monopolar pulse treatment and on the right is the pulse shape of HF-BP pulse protocols.

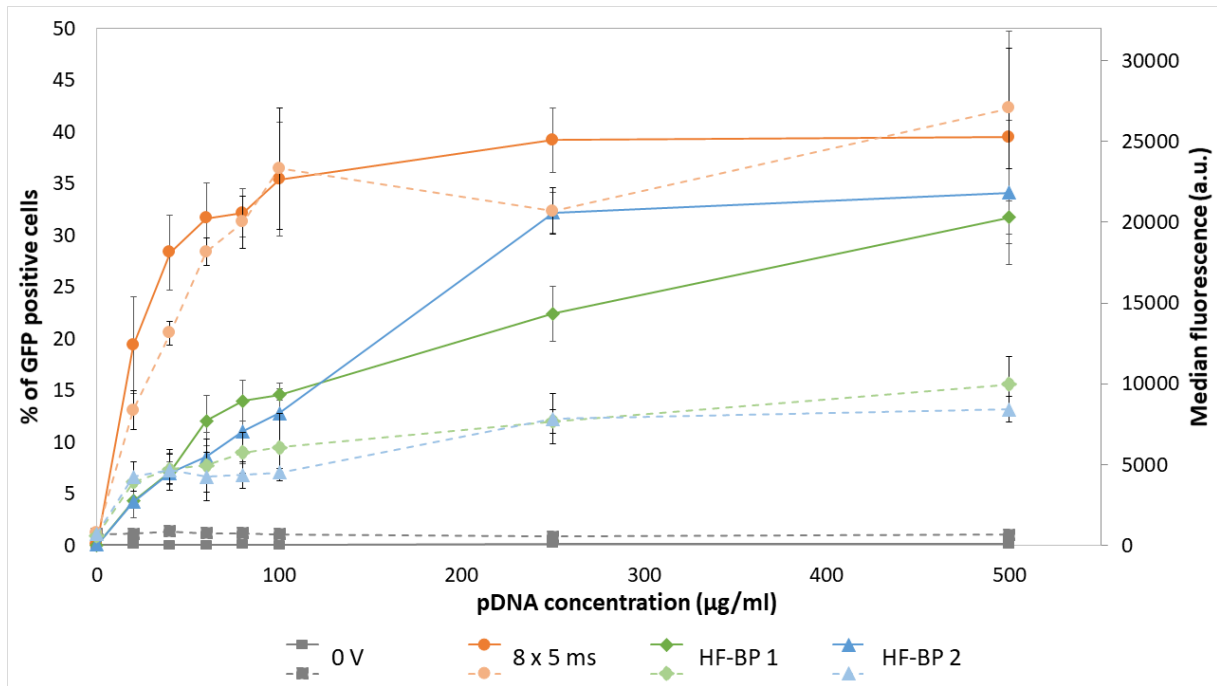
Gene electrotransfer:  $2 \times 10^5$  cells were pipetted into 4 mm disposable cuvette and pDNA was added. We tested final concentrations of 20, 40, 60, 80, 100, 250 or 500  $\mu\text{g/ml}$  pDNA in cell suspension. Cells were incubated with pDNA for 2 min at room temperature then electric pulses were applied. 37.5  $\mu\text{l}$  of fetal bovine serum were added immediately after pulse delivery and cells were incubated for 5 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After incubation  $1 \times 10^5$  cells were transferred to 1 ml of HAM-F12 growth medium in 24 well plate and incubated for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere with a 5%  $\text{CO}_2$ . Afterwards, cells were trypsinized and percent of GFP positive cells and median fluorescence intensity of GFP positive cells were detected using Attune NxT flow cytometer. At every measurement 10,000 events were recorded.

Cell viability:  $2 \times 10^4$  cells were transferred to HAM-F12 growth medium prepared previously in wells of 96-well plate. Three samples were taken from each cuvette. Cells were placed in the incubator (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) for 24 h. Cell viability was determined with the MTS-based Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Absorption at 490 nm wavelength was measured with a Tecan Infinite M200 spectrophotometer.

Statistical analysis: All results are reported as a mean value of 3 to 5 experiments. The spread of the data is given by standard deviation. The significance between the experimental groups was analyzed in SigmaPlot 11.0 and determined using One way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test. The statistically significant difference was assumed at  $p < 0.05$ .

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

In order to investigate if the lack of electrophoretic force during HF-BP pulse delivery can be compensated with higher pDNA concentration we tested the effect of increasing pDNA concentration on GET efficiency and median fluorescence intensity of GFP positive cells. In all three tested pulse protocols percent of GFP positive cells increased with increasing pDNA concentration. Increase was more pronounced when HF-BP protocols were applied. Increasing pDNA concentration above 100  $\mu\text{g/ml}$  if pulse protocol 8 x 5 ms was applied led to almost no increase in GFP positive cells, contrary to HF-BP protocols where the percent of GFP positive cells with highest pDNA concentrations (250 and 500  $\mu\text{g/ml}$ ) increased significantly. There was no significant difference in cell viability between group with no added pDNA and groups with various pDNA concentrations added in cell suspension (data not shown).



**Figure 2:** Overall GET efficiency and median fluorescence intensity for all three pulse protocols, 8 x 5 ms, HF-BP 1 and HF-BP 2, without and with seven pDNA concentrations, 20, 40, 60, 80, 100, 250 and 500 µg/ml, 0 V – no applied pulses. Bars represent standard deviation.

Overall GET in percent was calculated as % of GFP positive cells multiplied by % of viable cells divided by 100. The highest overall GET was achieved with pulse protocol 8 x 5 ms. At the lowest pDNA concentration percent of viable GFP positive cells was significantly higher after GET with pulse protocol 8 x 5 ms compared to both HF-BP protocols, contrary at the highest pDNA concentration there was no significant difference in overall GET among all three pulse protocols tested (Figure 2). Showing that with higher pDNA concentration successful GET is possible also with shorter high voltage pulses where weaker electrophoretic force is present.

Fluorescence intensity of the cell is considered to be indicative of the number of pDNA copies inside the cell that have reached the cell nucleus and have been successfully transcribed and translated into fluorescent proteins (Tsai et al., 2015). Median fluorescence intensity of GFP positive cells was the highest when the highest concentration of pDNA was used. In this case median fluorescence of both HF-BP protocols was similar, while more than double median fluorescence was obtained with pulse protocol 8 x 5 ms. Median fluorescence intensity at the lowest and at the highest pDNA concentrations was significantly higher after GET with pulse protocol 8 x 5 ms compared to both HF-BP protocols. Suggesting that although with the highest pDNA concentration we were able to achieve similar percent of transfected cells, the number of pDNA copies that were successfully transfected into cells was lower when compared to pulse protocol 8 x 5 ms.

#### 4 CONCLUSIONS

The results of our study confirm that with HF-BP protocols we can achieve successful GET with bipolar microsecond pulses *in vitro* at sufficiently high pDNA concentration. GET efficiency and median fluorescence intensity of cells increased with increasing pDNA concentration. However, to achieve GET efficiency comparable to that of longer monopolar pulses (8 x 5 ms pulse protocols) 5 times higher pDNA concentration was needed for GET with

HF-BP protocols. Nevertheless, our results may open completely new field of potential GET applications – less painful and widely accepted GET applications, like nucleic acid-based vaccination.

## 5 REFERENCES

- Arena, C. B., Sano, M. B., Rossmeis, J. H., Caldwell, J. L., Garcia, P. A., Rylander, M. N., & Davalos, R. V. (2011). High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction. *BioMedical Engineering Online*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-10-102>
- Aycock, K. N., Zhao, Y., Lorenzo, M. F., & Davalos, R. V. (2021). A theoretical argument for extended interpulse delays in therapeutic high-frequency irreversible electroporation treatments. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1109/TBME.2021.3049221>
- Dong, S., Yao, C., Zhao, Y., Lv, Y., & Liu, H. (2018). Parameters optimization of bipolar high frequency pulses on tissue ablation and inhibiting muscle contraction. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, *25*(1), 207–216. <https://doi.org/10.1109/TDEI.2018.006303>
- Faurie, C., Rebersek, M., Golzio, M., Kanduser, M., Escoffre, J. M., Pavlin, M., ... Rols, M. P. (2010). Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *Journal of Gene Medicine*, *12*(1), 117–125. <https://doi.org/10.1002/jgm.1414>
- Kandušar, M., Miklavčič, D., & Pavlin, M. (2009). Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses - An in vitro study. *Bioelectrochemistry*, *74*(2), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.09.002>
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., & Baba, Y. (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International*. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-89>
- Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., & Miklavcic, D. (2019). Membrane Electroporation and Electroporation: Mechanisms and Models. *Annual Review of Biophysics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>
- Lambricht, L., Lopes, A., Kos, S., Sersa, G., Pr at, V., & Vandermeulen, G. (2016). Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *13*(2), 295–310. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1121990>
- Mercadal, B., Arena, C. B., Davalos, R. V., & Ivorra, A. (2017). Avoiding nerve stimulation in irreversible electroporation: A numerical modeling study. *Physics in Medicine and Biology*, *62*(20), 8060–8079. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa8c53>
- Rems, L., Tarek, M., Casciola, M., & Miklavčič, D. (2016). Properties of lipid electropores II: Comparison of continuum-level modeling of pore conductance to molecular dynamics simulations. *Bioelectrochemistry*, *112*, 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.03.005>
- Rosazza, C., Haberl Meglic, S., Zumbusch, A., Rols, M.-P., & Miklavcic, D. (2016). Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective. *Current Gene Therapy*, *16*(2), 98–129. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160331130040>
- Sano, M. B., Fan, R. E., Cheng, K., Saenz, Y., Sonn, G. A., Hwang, G. L., & Xing, L. (2018). Reduction of Muscle Contractions during Irreversible Electroporation Therapy Using High-Frequency Bursts of Alternating Polarity Pulses: A Laboratory Investigation in an Ex Vivo Swine Model. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, *29*(6), 893-898.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2017.12.019>
- Sweeney, D. C., Reberšek, M., Dermol, J., Rems, L., Miklavčič, D., & Davalos, R. V. (2016). Quantification of cell membrane permeability induced by monopolar and high-frequency bipolar bursts of electrical pulses. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1858*(11), 2689–2698. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.024>
- Teissie, J., Golzio, M., & Rols, M. P. (2005). Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.006>



- Tsai, Y. C., Tsai, T. H., Chang, C. P., Chen, S. F., Lee, Y. M., & Shyue, S. K. (2015). Linear correlation between average fluorescence intensity of green fluorescent protein and the multiplicity of infection of recombinant adenovirus. *Journal of Biomedical Science*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0137-z>
- Yao, C., Dong, S., Zhao, Y., Lv, Y., Liu, H., Gong, L., ... Sun, Y. (2017). Bipolar Microsecond Pulses and Insulated Needle Electrodes for Reducing Muscle Contractions during Irreversible Electroporation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 64(12), 2924–2937. <https://doi.org/10.1109/TBME.2017.2690624>

## Meritve makroavtofagije v podganjih astrocitih s fluorescenčno mikroskopijo

Petra TAVČAR<sup>1\*</sup>, Jernej JORGAČEVSKI<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorij za endokrinologijo - molekularna celična fiziologija, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Celica Biomedical, Ljubljana, Slovenija

\*korenspondenčni avtor: [petra.tavcar@mf.uni-lj.si](mailto:petra.tavcar@mf.uni-lj.si), [jernej.jorgacevski@mf.uni-lj.si](mailto:jernej.jorgacevski@mf.uni-lj.si)

### Meritve makroavtofagije v podganjih astrocitih s fluorescenčno mikroskopijo

**Izveček:** Avtofagija skupaj s proteasomom sestavlja celični razgradni sistem v sesalskih celicah. Odstranjevanje starih in poškodovanih celičnih komponent z avtofagijo je nujno za vzdrževanje celične homeostaze, avtofagija pa ima pomembno vlogo tudi med razvojem organizma in v stresnih stanjih. Raznovrstni metodološki pristopi se osredotočajo na različne stopnje avtofagne poti in uporabljajo različne tehnike za njeno ovrednotenje. Določanje najustrežnejšega pristopa v veliki meri temelji na cilju raziskave in vrsti preučevanega modelnega sistema. Različni tipi celic se namreč razlikujejo v osnovni ravni avtofagije in jakosti inducirane avtofagne odziva. S konfokalno mikroskopijo in super-ločljivostno fluorescenčno mikroskopijo s strukturirano osvetlitvijo smo preverili ustreznost dveh različnih metod in treh različnih pristopov za ovrednotenje makroavtofagije v podganjih astrocitih v kulturi. Celice smo izpostavili modulatorjem avtofagije s poznanim vplivom na avtofagno pot. Ovrednotili smo količino fluorescenčnih signalov pATG16L1 in LC3, dveh označevalcev avtofagnih struktur, po imunocitokemičnem označevanju z ustreznimi protitelesi, ter ustreznost uporabe plazmida, ki nosi zapis za mRFP-GFP-LC3, za določanje avtofagnega pretoka na ravni posamezne celice. Ugotovili smo: 1.) pri raziskavah avtofagije ima izražanje mRFP-GFP-LC3 številne prednosti pred označevanjem pATG16L1 in LC3 s protitelesi, 2.) najmanjši avtofagni predelki so manjši od ločljivosti pogojene z uklonsko limito (~200 nm) zato je priporočljivo meritve avtofagije izvesti s super-ločljivostnimi mikroskopijami.

**Ključne besede:** avtofagija; pATG16L1; LC3; mRFP-GFP-LC3; mikroskopija; astrociti

### Macroautophagy measurements in rat astrocytes by fluorescence microscopy

**Abstract:** Autophagy and proteasome represent two major degradation pathways in mammalian cells. Autophagy, which is involved in the clearance of damaged cellular components and nutrient recycling, is crucial for the proper organism development, cell homeostasis and for the efficient stress response. To assess autophagy, different methodological approaches can be used. When choosing the most appropriate approach, one should consider the model system in question and particular aims of the research, as various cell types differ in basal and induced autophagy. We here tested two different methodologies and three different approaches to monitor autophagy in cultured rat astrocytes by using confocal microscopy and structured illumination super-resolution microscopy. After exposing cells to established autophagy modulators, we have performed immunocytochemical staining of pATG16L1 and LC3, which represent two autophagy markers, and determined the proportion of cell area covered by fluorescent signals of pATG16L1- and LC3, respectively. Additionally, we have tested the response of astrocytes, which expressed fusion protein mRFP-GFP-LC3, to the aforementioned autophagy modulators, in order to determine if this system is suitable for assessing autophagic flux in single cells. Our conclusions are: 1.) of the three approaches, the

one, where astrocytes expressed mRFP-GFP-LC3, offers many advantages over immunocytochemical staining of pATG16L1 or LC3, 2.) as some autophagic compartments are smaller than the resolution limit imposed by the diffraction of light (~200 nm for conventional microscopy techniques), super-resolution microscopy should be used when possible for monitoring autophagy.

**Key words:** autophagy; pATG16L1; LC3; mRFP-GFP-LC3; microscopy; astrocytes

## 1 UVOD

Avtofagija je evolucijsko ohranjena pot za razgradnjo znotrajceličnega materiala v lizosomih. Glede na potek ločimo makroavtofagijo, mikroavtofagijo in s šaperoni posredovano avtofagijo (Ravikumar in sod., 2009). Pri makroavtofagiji se del citoplazme obda z dvojno membrano, pri čemer nastane celični predelek, imenovan avtofagosom. Avtofagosom se kasneje v avtofagni poti zlije z lizosomom, pri čemer nastane avtolizosom, v katerem poteče razgradnja celičnih snovi z lizosomskimi encimi. Razgradni produkti se skozi različne transporterje in kanalčke, ki so prisotni v membrani avtolizosoma, vrnejo v citoplazmo in jih celica lahko ponovno uporabi (Yin in sod., 2016; Dikic & Elazar, 2018). Avtofagija je pomembna za odstranjevanje starih in poškodovanih proteinov, skupkov proteinov in nefunkcionalnih organelov, v stresnih stanjih pa celici omogoči pridobivanje osnovnih gradnikov z reciklažo celičnih komponent. S tem pripomore k vzdrževanju znotrajcelične homeostaze in omogoča preživetje celic v kratkotrajnih stresnih razmerah (Yin in sod., 2016). Okvare v avtofagni poti so povezane z različnimi boleznimi, kot so nevrodegeneracija, rakava obolenja in infekcijske bolezni (Ravikumar in sod., 2009; Yamamoto & Yue, 2014; Dikic & Elazar, 2018).

Pri preučevanju avtofagije raziskovalci uporabljajo različne biokemijske in mikroskopske tehnike. S fluorescenčno mikroskopijo lahko sledimo različnim proteinom, ki sodelujejo pri poteku makroavtofagije. Najpogosteje uporabljen označevalec avtofagnih struktur je protein LC3 (angl. »microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3«), ki sodeluje pri biogenezi avtofagosoma in selekciji avtofagnega tovara (Yoshii & Mizushima, 2017; Yang in sod., 2018; Li in sod., 2019). Po iniciaciji avtofagije se citoplazemska oblika proteina (LC3-I) posttranslacijsko modificira v LC3-II, ki se vgradi v obe membrani nastajajočega avtofagosoma. Za razliko od ostalih proteinov povezanih z avtofagijo (ATG; angl. »autophagy-related protein«), ki oddisociirajo od membrane fagoforja pred zaprtjem avtofagosoma, ostane LC3-II vgrajen v notranji membrani avtofagosoma celotno avtofagno pot (do razgradnje v avtolizosomu), iz zunanje membrane pa se lahko proteolitično odcepi med zorenjem avtofagosoma (Kabeya in sod., 2000; Mizushima in sod., 2010; Yoshii & Mizushima, 2017). S fluorescenčno mikroskopijo lahko v celicah določimo spremembe v količini endogenega ali z vektorji vnesenega LC3 (npr. spremembe deleža celične površine, ki jo zaseda avtofagni označevalec) in/ali spremembe števila LC3-pozitivnih struktur po izpostavljenosti različnim testnim razmeram. Poleg LC3 lahko s fluorescenčno mikroskopijo spremljamo tudi druge označevalce avtofagije. V primeru preučevanja biogeneze avtofagosomov lahko sledimo označevalcem, ki so prisotni le na fagoforju (npr. ULK1/2 – angl. »Unc-51 like autophagy activating kinase«, WIPI1/2 – angl. »WD-repeat protein interacting with phosphoinositides«, ATG5 in ATG13) (Orhon & Reggiori, 2017; Yoshii & Mizushima, 2017). Nedavno razvita protitelesa za označevanje fosforilirane oblike proteina ATG16L1 (pATG16L1) (razvili in opisali Tian in sod., 2020), ki je prisoten le na nastajajočih avtofagosomih, omogočajo meritve iniciacije avtofagije, pri čemer spremembe v poznih stopnjah avtofagije ne vplivajo na izmerjene rezultate (Tian in sod., 2020). Čeprav je imunocitokemična detekcija različnih avtofagnih označevalcev uveljavljena in pogosto uporabljena metoda, ne omogoča spremljanja dinamičnih sprememb v avtofagni poti v živih celicah. Namen novodobnih raziskav je meriti

pretok snovi skozi avtofagno pot (angl. »autophagic flux«), pri čemer je potrebno določiti spremembe v številu avtofagnih struktur in tudi morebitne spremembe v razgradnji avtofagnega tovara (npr. zaradi nepravilnosti pri zlivanju avtofagosomov z lizosomi ali zakisanju avtolizosomov) (Yoshii & Mizushima, 2017; Yang in sod., 2018). Obstaja več pristopov, s katerimi lahko sočasno spremljamo različne korake avtofagije. Eden izmed njih je uporaba plazmidnega vektorja ptfLC3, ki nosi zapis za protein LC3 z zaporedno vezanima fluorescenčnima označevalcema mRFP (rdeči fluorescenčni protein) in GFP (zeleni fluorescenčni protein) na N-koncu proteina (mRFP-GFP-LC3) (razvili in opisali Kimura in sod., 2007). Sistem temelji na različni občutljivosti mRFP in GFP na nizek pH. Nižji pH v avtolizosomih (v primerjavi z avtofagosomi) povzroči utišanje fluorescence GFP, ne vpliva pa na fluorescenco mRFP. LC3, ki je vgrajen v avtofagosomih, zato emitira rdečo in zeleno svetlobo, po nastanku avtolizosomov pa le še rdečo svetlobo, kar lahko izmerimo s fluorescenčno mikroskopijo. Na podlagi sprememb števila avtofagosomov in avtolizosomov lahko ocenimo vpliv na avtofagni pretok (Kimura in sod., 2007; Yoshii & Mizushima, 2017).

Pri raziskavah avtofagije se pogosto uporabljajo kemični modulatorji avtofagije. Najpogosteje uporabljen aktivator avtofagije je rapamicin, alosterični inhibitor proteinskega kompleksa mTORC1 (angl. »mammalian target of rapamycin complex 1«), ki uravnava iniciacijo avtofagije (Yang in sod., 2013). Pri inhibitorjih avtofagije ločimo tiste, ki inhibirajo zgodnje stopnje avtofagije, npr. inhibitorji nukleacijskega kompleksa PI3KIII (angl. »phosphatidylinositol 3-kinase class III«), in tiste, ki vplivajo na pozne stopnje avtofagije (npr. inhibitorji lizosomske razgradnje) (Yang in sod., 2013).

## 2 MATERIALI IN METODE

V kolikor ni navedeno drugače, smo uporabili kemikalije proizvajalca Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Nemčija).

### 2.1 Celične kulture

Primarne celične kulture astrocitov smo pripravili iz možganske skorje 2-3 dni starih podgan po uveljavljenem postopku (Schwartz & Wilson, 1992). Priprava primarnih celičnih kultur je potekala v skladu z zakonodajo o delu na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali po 22.a členu Zakona o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3, Uradni list.RS, št. 38/2013 z dne 3. 5. 2013).

Podganje astrocite iz možganske skorje smo nasadili na krovna stekelca s premerom 22 mm, premazana s poli-D-lizinom. Astrocite smo gojili v hranilnem gojišču (DMEM s 4500 mg/l glukoze z dodanim 10 % fetalnim govejim serumom, 1 mM natrijevim piruvatom, 2 mM L-glutaminom, 5 U/ml penicilinom in 5 µg/ml streptomycinom) pri 37 °C, koncentraciji CO<sub>2</sub> 5 % in zračni vlagi 95 %. Po 24 h gojenja so bili astrociti pritrjeni na podlago in ustreznih morfoloških oblik, zato smo ocenili, da so primerni za vnos plazmidne DNA in tretiranje z modulatorji avtofagije pri poskusih označevanja avtofagnih označevalcev pATG16L1 in LC3.

### 2.2 Vnos plazmidne DNA v podganje astrocite v celični kulturi

V astrocite smo vnesli plazmidno DNA, ki vsebuje zapis za mRFP-GFP-LC3 (plazmid ptfLC3) (Kimura in sod., 2007). Uporabili smo transfekcijski reagent FuGENE® 6 (Promega Corporation, ZDA), pri čemer smo postopek izvedli po navodilih proizvajalca. Transfekcijski medij ni vseboval seruma in mešanice antibiotikov. Po transfekciji smo celice 48 h inkubirali

pri 37 °C, koncentraciji CO<sub>2</sub> 5 % in zračni vlagi 95 %. Sledilo je tretiranje z modulatorji avtofagije, fiksacija in priprava preparatov za opazovanje s fluorescenčnim mikroskopom.

### 2.3 Tretiranje celic s kemičnimi modulatorji avtofagije

Za aktivacijo in inhibicijo avtofagije smo uporabili 1 µM rapamicin, 100 nM vortmanin (Cayman Chemical Company, ZDA) in 100 nM bafilomicin A1. Celice smo inkubirali z rapamicinom 3 h. V primeru kombinirane izpostavljenosti inhibitorju in aktivatorju avtofagije, smo celice najprej inkubirali z inhibitorjem (vortmaninom ali bafilomicinom A1) 30 min in nato v hranilno gojišče dodali še rapamicin za 3 h. Kontrolne celice smo inkubirali v hranilnem gojišču brez dodanih aktivatorjev/inhibitorjev. Med izvedbo poskusa smo celice hranili pri 37 °C, koncentraciji CO<sub>2</sub> 5 % in zračni vlagi 95 %.

### 2.4 Imunocitokemija in priprava preparatov

Po tretiranju z aktivatorji in inhibitorji avtofagije smo celice fiksirali v 4 % raztopini formaldehida (Thermo Fischer Scientific, ZDA) v fosfatnem pufri (PBS) 15 min pri sobni temperaturi (ST). Sledila je permeabilizacija s Tritonom X-100, in sicer 10 min pri ST. Po spiranju s PBS smo celice inkubirali v 10 % kozjem serumu in 3 % govejem serumskim albuminom 1 h pri 37 °C. Celice smo sprali s PBS in nanесли primarna protitelesa proti pATG16L1 (1:100; ab195242, Abcam, Združeno Kraljestvo) ali LC3 (1:200; PM036, MBL, ZDA). Inkubacija v raztopini primarnih protiteles je potekala čez noč pri 4 °C. Naslednji dan je sledilo spiranje s PBS in nanos ustreznih sekundarnih protiteles, konjugiranih z Alexa Fluor 488 (1:600; A11008, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, ZDA). Celice smo inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles 45 min pri 37 °C. Po spiranju s PBS smo pripravili preparate z reagentom SlowFade Gold z DAPI-jem (Thermo Fischer Scientific, ZDA), ki preprečuje bledenje fluorescence in označi celična jedra z barvilom DAPI. Za določitev nespecifičnega označevanja smo pripravili kontrolne vzorce, ki so bili inkubirani le s sekundarnimi protitelesi.

Vzorce, ki so bili transfecirani s ptfLC3, smo fiksirali po postopku opisanem zgoraj, preparate pa smo pripravili z reagentom SlowFade Gold (Thermo Fischer Scientific, ZDA).

### 2.5 Fluorescenčna mikroskopija

Slikanje preparatov z označenim pATG16L1 ali LC3 smo izvedli s konfokalnim mikroskopom (LSM800, Zeiss, Nemčija). Uporabili smo oljni imerzijski objektiv s 63× povečavo in numerično aperturo 1,4 (63×/1.4 Oil DIC M27; Zeiss, Nemčija). Barvilo Alexa Fluor 488 smo vzbudili z diodnim laserjem z valovno dolžino 488 nm in zajeli emisijo v območju 510–700 nm. Za vzbujanje barvila DAPI smo uporabili diodni laser z valovno dolžino 405 nm in zajeli emisijo v območju 400–510 nm. Posamezne celice smo posneli v ekvatorialni ravnini, pri čemer je bila dimenzija optične rezine po z-osi ~1 µm.

Meritve na astrocitih, ki so izražali mRFP-GFP-LC3, smo izvedli s super-ločljivostnim mikroskopom s strukturirano osvetlitvijo (SIM; Zeiss ELYRA PS.1, Zeiss, Nemčija). Za opazovanje in zajemanje slik smo uporabili oljni imerzijski objektiv s 63× povečavo in numerično aperturo 1,4 (Plan-Apochromat 63×/1.4 Oil DIC M27; Zeiss, Nemčija). Fluorokroma mRFP in GFP smo vzbujali z laserjema z valovnima dolžinama 488 nm (za GFP) in 561 nm (za mRFP). Zajemali smo emisijo v območju 495–575 nm (zeleni kanal) in 570–650 nm (rdeči kanal). Meritve smo izvedli na astrocitih, ki izražajo mRFP-GFP-LC3. Posamezne celice smo posneli v več ravninah v dimenziji z (debelina posamezne optične rezine je bila 0,5 µm).

Pri vseh poskusih smo ustrezne nastavitve za snemanje določili glede na kontrolne vzorce in jih ohranili znotraj posamezne biološke ponovitve.

## 2.6 Analiza podatkov

S programom Zen (LSM800, Zeiss, Nemčija) smo pri vzorcih z označenim pATG16L1 ali LC3 za posamezno celico določili vsoto zelenih slikovnih elementov (ustreza količini signala pATG16L1 ali LC3) pri pragu 10 % maksimalne intenzitete fluorescence (prag smo izbrali glede na fluorescenco kontrolnih vzorcev). Iz posnetkov s presežno svetlobo smo določili meje celic in izmerili celično površino. Delež površine, zasedene s signalom pATG16L1 ali LC3, smo izračunali kot količnik med površino nadpraznega fluorescenčnega signala in celotno celično površino. Vrednosti deležev smo normirali glede na povprečno vrednost kontrolnih vzorcev v posameznem setu meritev.

S programom ImageJ (JACoP plugin; Bolte & Cordelieres, 2006) smo za posamezen astrocit, ki je izražal mRFP-GFP-LC3, določili število rdečih objektov (mRFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>) in število kolokaliziranih objektov (mRFP<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) v 3D prostoru (upoštevajoč vse rezine v dimenziji z), kar ustreza številu avtolizosomov (samo rdeči objekti) in avtofagosomov (kolokalizirani objekti). Določili smo celokupno število avtofagnih predelkov (vsota avtofagosomov in avtolizosomov) v posamezni celici in podatke normirali na volumsko enoto 1000  $\mu\text{m}^3$ . Celične volumne smo ocenili iz izmerjenih celičnih površin (določene na posnetkih presežne svetlobe) in števila posnetih ravnin v dimenziji z. Za ovrednotenje sprememb v poznih stopnjah avtofagije smo določili razmerje med številom avtofagosomov in avtolizosomov.

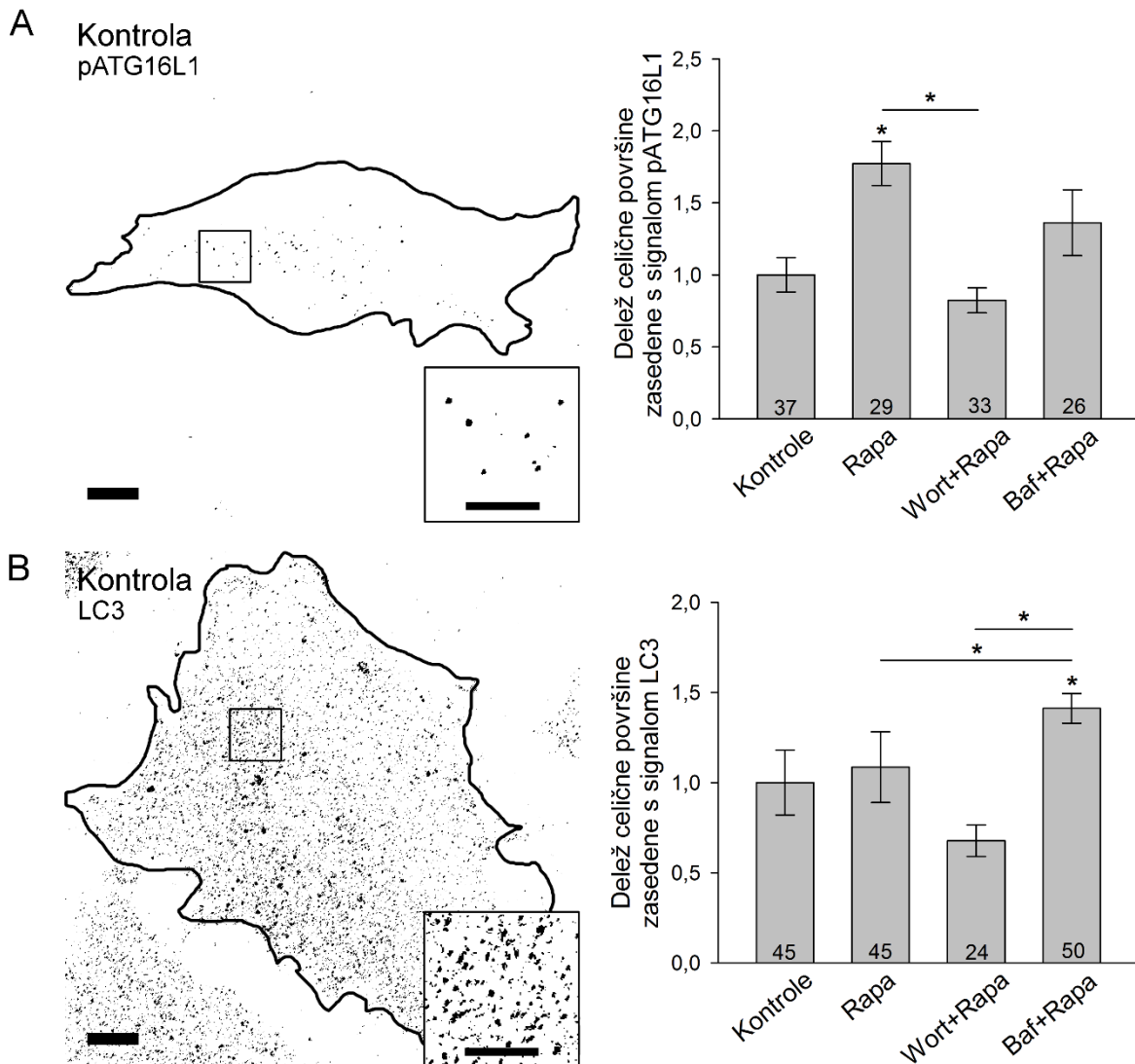
Statistično analizo smo izvedli v programu SigmaPlot (Systat Software Inc, ZDA). Uporabili smo test za primerjavo več skupin in razlike med vzorci označili za statistično značilne pri vrednosti  $p < 0,05$  (ANOVA, Dunnov test). Poskus imunološkega označevanja pATG16L1 smo izvedli v eni ponovitvi, poskus imunološkega označevanja LC3 v dveh, pri poskusu s plazmidom ptfLC3 pa smo izvedli vsaj tri ponovitve za posamezen testiran pogoj. Vse poskuse smo izvedli v paralelkah (dva enako obdelana preparata za posamezen testiran pogoj v posamezni ponovitvi). Rezultati so prikazani kot povprečje  $\pm$  standardna napaka.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Avtofagija je predmet številnih raziskav, ki so bile do sedaj v osrednjem živčnem sistemu osredotočene predvsem na nevrone (Yamamoto & Yue, 2014; Damme in sod., 2015; Nikoletopoulou in sod., 2015), veliko manj pa je znanega o avtofagiji v astrocitih. Naš namen je bil primerjati dve različni metodi in tri različne pristope, ki se pogosto uporabljajo za preučevanje avtofagije s fluorescenčno mikroskopijo. LC3 je označevalec več intermediatov avtofagne poti (fagoforjev, avtofagosomov in zgodnjih avtolizosomov), zato se pogosto uporablja v raziskavah celokupne avtofagije (Kabeya in sod., 2000; Kimura in sod., 2009; Yoshii & Mizushima, 2017; Li in sod., 2019). Za razliko od tega predstavlja označevanje pATG16L1 novejši pristop za identifikacijo zgodnjih intermediatov avtofagne poti (nastajajočih avtofagosomov) in spremljanje iniciacije avtofagije (Tian in sod., 2020). Oceno avtofagnega pretoka in preučevanje avtofagije v živih celicah pa nam omogoča rekombinantni protein mRFP-GFP-LC3, s katerim lahko sočasno detektiramo avtofagosome in avtolizosome.

Najprej smo astrocite izpostavili modulatorjem avtofagije. Za aktivacijo smo uporabili rapamicin, ki sproži avtofagijo prek inhibicije mTORC1 (Yang in sod., 2013). Za inhibicijo iniciacije avtofagije smo uporabili vortmanin, ki je inhibitor encimov PI3K, PI3KCIII pa je ključna komponenta nukleacijskega kompleksa avtofagije (Yang in sod., 2013). Za inhibicijo

poznih stopenj avtofagije smo uporabili bafilomicin A1, ki z inhibicijo protonske črpalke V-ATPaze prepreči zakisanje avtolizosomov, poleg tega pa preprečuje tudi zlitje avtofagosomov z lizosomi (Mauvezin & Neufeld, 2015). Z bafilomicinom A1 preprečimo razgradnjo avtofagnega tovora in s tem blokiramo avtofagni pretok. Po tretiranju smo celice označili s protitelesi proti pATG16L1 in LC3.



**Slika 1:** Vpliv modulatorjev avtofagije na prisotnost avtofagnih struktur označenih s protitelesi proti pATG16L1 (A) in LC3 (B) v podganjih astrocitih.

Podganje astrocite v celični kulturi smo izpostavili znanim modulatorjem avtofagije – rapamicinu (Rapa), kombinaciji wortmanina in rapamicina (Wort+Rapa) ter kombinaciji bafilomicina A1 in rapamicina (Baf+Rapa). Sledilo je imunocitokemično označevanje pATG16L1 (Slika 1A, levo) in LC3 (Slika 1B, levo) z ustreznimi protitelesi in meritve na konfokalnem mikroskopu. Fluorescenčni signal pATG16L1 in LC3 je prikazan v črni barvi. Celici sta obrobjeni z neprekinjeno črno črto, določeno na podlagi slike, posnete s presežno svetlobo. Na slikah so prikazani tudi povečani izseki (desno spodaj), ki ustrezajo označeni regiji celice. Merilo ustreza velikosti 10  $\mu\text{m}$ , merilo na povečanem izseku pa 5  $\mu\text{m}$ . Grafa prikazujeta povprečne deleže celične površine, zasedene s signalom pATG16L1 (Slika 1A, desno) in LC3 (Slika 1B, desno), ki smo jih normirali na kontrolne celice. Podatki so prikazani kot povprečje  $\pm$  standardna napaka. Število analiziranih celic za posamezne testne skupine je podano na dnu

stolpcev. \* $p < 0,05$  (ANOVA, Dunnov test). **Baf, bafilomicin A1; Rapa, rapamicin; Wort, vortmanin.**

Ustreznost označevanja s protitelesi proti pATG16L1 smo najprej preverili z aktivacijo makroavtofagije z rapamicinom (Slika 1A). Ugotovili smo, da je izpostavljenost rapamicinu povečala delež celične površine, zasedene s signalom pATG16L1, v primerjavi s kontrolnimi celicami ( $p < 0,05$ , ANOVA, Dunnov test), kar nakazuje, da rapamicin inducira avtofagijo v podganjih astrocitih, skladno z rezultati na drugih celičnih tipih (Sotthibundhu in sod., 2016; Lin in sod., 2018; Tian in sod., 2020). Hkratna izpostavljenost vortmaninu in rapamicinu je povzročila znižanje količine signala pATG16L1 v primerjavi s celicami, ki so bile tretirane le z rapamicinom ( $p < 0,05$ , ANOVA, Dunnov test), in sicer na raven primerljivo s kontrolnimi celicami. Med skupinama celic, ki so bile izpostavljene rapamicinu in kombinaciji bafilomicina A1 in rapamicina nismo opazili statistično značilnih razlik (ANOVA, Dunnov test). Naši rezultati kažejo, da vortmanin, ki je inhibitor nukleacijskega kompleksa PI3KIII, prepreči indukcijo avtofagije z rapamicinom. Bafilomicin A1, ki sproži inhibicijo poznih stopenj avtofagije, pa v izbranih testnih pogojih ne vpliva na z rapamicinom sproženo iniciacijo avtofagije. Na podlagi rezultatov sklepamo, da je uporaba protiteles proti pATG16L1 ustrezen pristop za določanje sprememb na ravni iniciacije makroavtofagije v podganjih astrocitih.

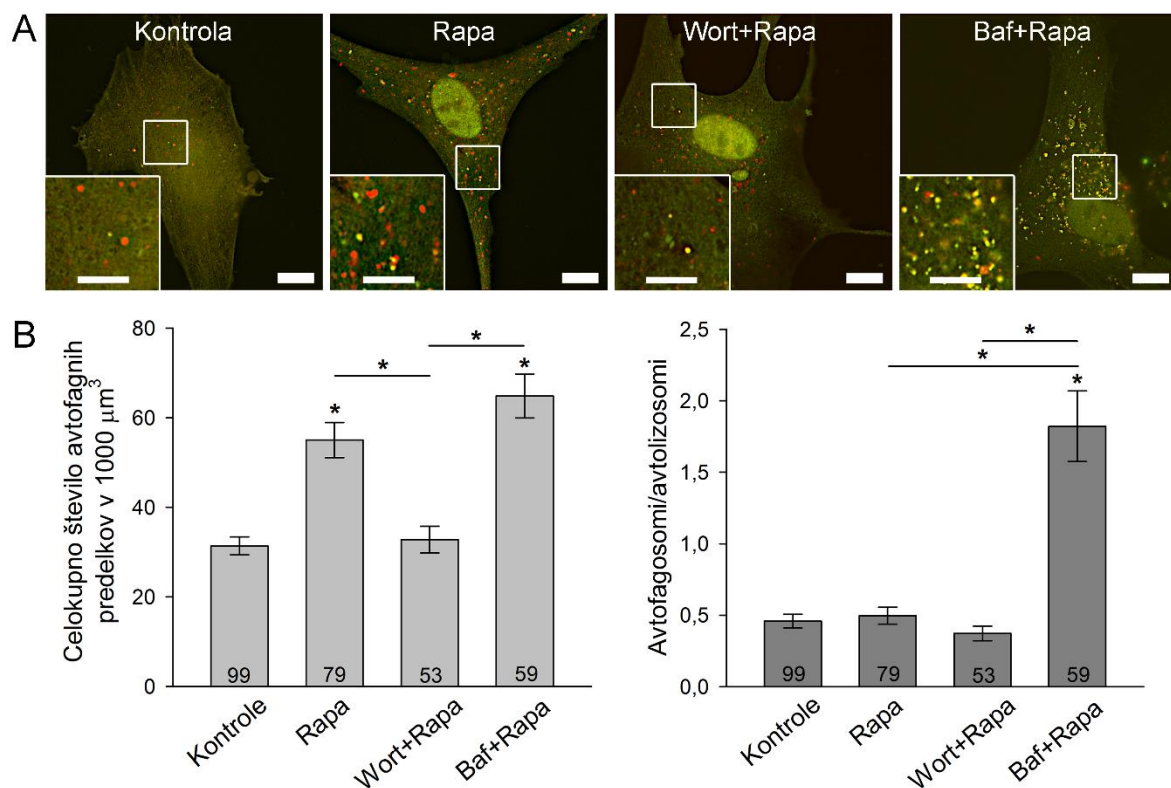
V naslednjem setu poskusov smo ponovili tretiranje astrocitov z istimi kombinacijami modulatorjev avtofagije in ovrednotili spremembe v količini signala po označevanju celic s protitelesi proti LC3 (Slika 1B). Rapamicin ni vplival na količino signala LC3 v primerjavi s kontrolnimi celicami (ANOVA, Dunnov test; Slika 1B). Prav tako nismo opazili statistično značilnih razlik v količini signala LC3 med celicami, ki so bile izpostavljene kombinaciji vortmanina in rapamicina, in kontrolnimi celicami oz. z rapamicinom tretiranimi celicami (ANOVA, Dunnov test). Kombinacija bafilomicina A1 in rapamicina je povzročila ~50 % povečanje deleža celične površine, zasedene s signalom LC3, v primerjavi z vsemi ostalimi testnimi skupinami ( $p < 0,05$ , ANOVA, Dunnov test). Sklepamo, da bafilomicin A1 povzroči kopičenje avtofagnih predelkov prek inhibicije razgradnje v avtolizosomih.

Odsotnost povečanja količine signala LC3 po stimulaciji z rapamicinom je lahko posledica povečanega avtofagnega pretoka, pri čemer se novonastali avtofagni predelki pospešeno razgrajujejo v avtofagni poti, zato ostaja celokupna količina LC3 nespremenjena. Glede na objavljene podatke, je pri poskusih, kjer določamo količino LC3, smiselno za posamezen pogoj pripraviti dva vzorca – v prisotnosti in odsotnosti inhibitorjev lizosomske razgradnje (za ta namen se uporabljajo bafilomicin A1, klorokin, hidrosiklorokin in  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), saj lahko na ta način potrdimo prisotnost morebitnih sprememb v avtofagnem pretoku (Kimura in sod., 2009; Sharifi in sod., 2015; Yoshii & Mizushima, 2017). V našem primeru smo opazili statistično značilno razliko v količini signala LC3 med celicami, tretiranimi le z rapamicinom, in tistimi, ki so bile izpostavljene kombinaciji bafilomicina A1 in rapamicina, kar kaže, da je v našem poskusu rapamicin povečal avtofagni pretok. To je v skladu z meritvami količine pATG16L1, kjer smo potrdili, da rapamicin sproži iniciacijo avtofagije (razloženo zgoraj). Dodatna omejitev pristopov, ki temeljijo na imunocitokemičnem označevanju LC3 je, da protitelesa proti LC3 prepoznajo obe obliki proteina – citosolno obliko LC3-I, ki se ne vgrajuje v avtofagne predelke, in procesirano obliko LC3-II, ki se značilno vgradi v membrane avtofagnih intermediatov. Signal LC3-I je običajno difuzno razporejen po citoplazmi, za razliko od tega pa signal LC3-II prepoznamo kot večje točkovne strukture, ki ustrezajo intermediom avtofagne poti. V raziskavah avtofagije je zato bolj smiselno določiti število objektov, ki so označeni z LC3 nad ustrezno prazno vrednostjo fluorescence (Sharifi in sod., 2015; Yoshii & Mizushima, 2017; Li in sod., 2019). Čeprav je difuzno označevanje LC3 običajno prisotno predvsem v kontrolnih razmerah, ko celice vršijo bazalno avtofagijo (Li in sod., 2019), smo v našem sistemu skoraj v



vseh testiranih pogojih opazili predvsem difuzno označevanje proteina LC3 (izjema so bile celice, ki so bile tretirane tudi z bafilomicinom A1), zato bi bila avtomatska analiza števila objektov s signalom LC3 močno otežena. Glede na opažanja sklepamo, da ima označevanje LC3 s protitelesi nekatere pomanjkljivosti, ki jih moramo pri raziskavah makroavtofagije upoštevati in ustrezno interpretirati.

Ker je makroavtofagija dinamičen večstopenjski proces, novejša raziskava spodbujajo razvoj in uporabo pristopov, ki omogočajo oceno avtofagnega pretoka. Tak primer je uporaba plazmidnega vektorja ptfLC3, ki kodira mRFP-GFP-LC3 ter omogoča razlikovanje avtofagosomov in avtolizosomov. V podganje astrocite smo vnesli omenjeni plazmidni vektor in nato določili celokupno število avtofagnih predelkov ter razmerje med avtofagosomi in avtolizosomi, iz česar smo ocenili spremembe v avtofagnem pretoku. Pri teh poskusih smo uporabili super-ločljivostno mikroskopijo SIM, ki omogoča opazovanje z boljšo ločljivostjo (dosega lateralno ločljivost 100 nm in aksialno ločljivost 300 nm) (Demmerle in sod., 2017).



**Slika 2:** Vpliv modulatorjev avtofagije na število in razmerje avtofagnih predelkov v podganih astrocitih, ki izražajo mRFP-GFP-LC3.

V podganje astrocite smo vnesli plazmidni vektor, ki kodira mRFP-GFP-LC3 in jih tretirali z rapamicinom (Rapa), kombinacijo wortmanina in rapamicina (Wort+Rapa) ter kombinacijo bafilomicina A1 in rapamicina (Baf+Rapa). (Slika 2A) Slike astrocitov, ki izražajo mRFP-GFP-LC3, posnete s super-ločljivostnim mikroskopom s strukturirano osvetlitvijo. Slike so prikazane kot prekrivanje rdeče (mRFP) in zelene (GFP) fluorescence. Na Sliki 2 spodaj levo so povečave z belo obrobo označenih celičnih regij. Rdeči točkasti signali ( $\text{mRFP}^+\text{GFP}^-$ ) ustrezajo avtolizosomom, kolokalizirani (rumeni) signali ( $\text{mRFP}^+\text{GFP}^+$ ) pa avtofagosomom. Merilo ustreza velikosti  $10 \mu\text{m}$ , merilo na povečanem izseku pa  $5 \mu\text{m}$ . (B) Levi graf prikazuje povprečna celokupna števila avtofagnih predelkov v volumski enoti  $1000 \mu\text{m}^3$  po tretiranju podganih astrocitov z različnimi modulatorji avtofagije. Desni graf prikazuje razmerja med številom avtofagosomov in številom avtolizosomov v astrocitih. Podatki so prikazani kot

povprečje  $\pm$  standardna napaka. Število analiziranih celic za posamezne testne skupine je podano na dnu stolpcev. \* $p < 0,05$  (ANOVA, Dunnov test). **Baf, bafilomicin A1; Rapa, rapamicin; Wort, wortmanin.**

Rapamicin je pričakovano povečal število avtofagnih predelkov v podganjih astrociti, ki so izražali mRFP-GFP-LC3 ( $p < 0,05$ , ANOVA, Dunnov test) in ni vplival na razmerje med avtofagosomi in avtolizosomi, kar nakazuje, da rapamicin poveča avtofagni pretok. Izpostavljenost astrocitov wortmaninu in rapamicinu je povzročila zmanjšanje števila avtofagnih predelkov glede na celice, izpostavljene le rapamicinu, kar je prav tako v skladu s pričakovanji. Bafilomicin A1 je v kombinaciji z rapamicinom povzročil povišanje razmerja med avtofagosomi in avtolizosomi, kar ustreza blokiranemu razgradnji intermedietov avtofagne poti. Glede na to, da se podganji astrociti v celični kulturi, ki izražajo mRFP-GFP-LC3, na aktivacijo in inhibicijo avtofagije odzovejo v skladu s pričakovanji, lahko zaključimo, da je plazmidni vektor ptfLC3 primerno orodje za raziskovanje makroavtofagije.

#### 4 SKLEPI

V raziskavi smo testirali tri različne pristope za ovrednotenje makroavtofagije v podganjih astrociti. Z imunocitokemičnim označevanjem pATG16L1 smo v astrociti, ki so bili izpostavljeni znanemu modulatorju avtofagije, potrdili, da je ta pristop ustrezen za določanje stopnje iniciacije makroavtofagije. Imunocitokemično označevanje s protitelesi proti LC3 se je zaradi difuzne razporeditve signala in otežene interpretacije rezultatov izkazalo za manj primeren pristop pri določanju stopnje makroavtofagije v podganjih astrociti. Astrociti, ki so izražali mRFP-GFP-LC3 (ta omogoča razlikovanje med avtofagosomi in avtolizosomi ter tako direktno oceno avtofagnega pretoka), so se pričakovano in ponovljivo odzvali na modulatorje avtofagije. Avtomatizirana analiza števila avtofagnih predelkov je bila najlažje izvedljiva v primeru izražanja mRFP-GFP-LC3, najtežja pa v primeru označevanja s protitelesi proti LC3. Izražanje mRFP-GFP-LC3 je omogočilo tudi enostavno pripravo vzorca za analizo števila avtofagosomov in avtolizosomov, ki bi sicer zahtevala označevanje z več protitelesi hkrati. Dodatna prednost sistemov, ki temeljijo na izražanju mRFP-GFP-LC3 je tudi, da omogočajo preučevanje dinamike makroavtofagije v živih celicah v realnem času (Sharifi in sod., 2015), kar še poveča uporabnost tega sistema.

Izvajanje meritev s konfokalnim mikroskopom in super-ločljivostno mikroskopijo SIM je omogočilo tudi primerjavo obeh mikroskopskih tehnik. V primerjavi s konfokalno mikroskopijo omogoča SIM boljšo ločljivost, kar predstavlja dodano vrednost v raziskavah makroavtofagije, saj na ta način detektiramo tudi manjše intermediate avtofagne poti (npr. nastajajoče avtofagosome). Najmanjše strukture, ki smo jih izmerili z mikroskopom SIM, so imele namreč dimenzije  $\sim 160$  nm, kar daje prednost uporabi super-ločljivostnih mikroskopij pri študiju avtofagije.

#### ZAHVALE

Raziskava je bila financirana iz sredstev Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (iz virov P3 310 in J3 9266).

## 5 VIRI

- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(Pt 3), 213–232. doi: 10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x
- Damme, M., Suntio, T., Saftig, P., & Eskelinen, E. (2015). Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathologica*, 129, 337–362. doi: 10.1007/s00401-014-1361-4
- Demmerle, J., Innocent, C., North, A. J., Ball, G., Müller, M., Miron, E., Matsuda, A., Dobbie, I. M., Markaki, Y., & Schermelleh, L. (2017). Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy. *Nature protocols*, 12(5), 988–1010. doi: 10.1038/nprot.2017.019
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 19(21), 5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 3(5), 452–460. doi: 10.4161/auto.4451
- Kimura, S., Fujita, N., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009). Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods in Enzymology*, 452, 1–12. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03601-X
- Li, W., Li, S., Li, Y., Lin, X., Hu, Y., Meng, T., Wu, B., He, R., & Feng, D. (2019). Immunofluorescence Staining Protocols for Major Autophagy Proteins Including LC3, P62, and ULK1 in Mammalian Cells in Response to Normoxia and Hypoxia. *Methods in Molecular Biology*, 1854, 175–185. doi: 10.1007/7651\_2018\_124
- Lin, X., Han, L., Weng, J., Wang, K., & Chen, T. (2018). Rapamycin inhibits proliferation and induces autophagy in human neuroblastoma cells. *Bioscience reports*, 38(6), BSR20181822. <https://doi.org/10.1042/BSR20181822>
- Mauvezin, C., & Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11(8), 1437–1438. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M. E., & Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell death and differentiation*, 22(3), 398–407. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.204>
- Orhon, I., & Reggiori, F. (2017). Assays to Monitor Autophagy Progression in Cell Cultures. *Cells*, 6(3), 20. <https://doi.org/10.3390/cells6030020>
- Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Narayanan, U., Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., Underwood, B., Winslow, A., & Rubinsztein, D. C. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 11), 1707–1711. <https://doi.org/10.1242/jcs.031773>
- Schwartz, J. P., & Wilson D. J. (1992). Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia*, 5(1), 75–80. doi: 10.1002/glia.440050111
- Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., & Macleod, K. F. (2015). Measuring autophagy in stressed cells. *Methods in molecular biology*, 1292, 129–150. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2522-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2522-3_10)
- Sotthibundhu, A., McDonagh, K., von Kriegsheim, A., Garcia-Munoz, A., Klawiter, A., Thompson, K., Chauhan, K. D., Krawczyk, J., McInerney, V., Dockery, P., Devine, M. J., Kunath, T., Barry, F., O'Brien, T., & Shen, S. (2016). Rapamycin regulates autophagy and cell adhesion in induced pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0425-x>

- Tian, W., Alsaadi, R., Guo, Z., Kalinina, A., Carrier, M., Tremblay, M. E., Lacoste, B., Lagace, D., & Russell, R. C. (2020). An antibody for analysis of autophagy induction. *Nature Methods*, *17*(2), 232–239. doi: 10.1038/s41592-019-0661-y
- Yamamoto, A., & Yue, Z. (2014). Autophagy and its normal and pathogenic states in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, *37*, 55–77. doi: 10.1146/annurev-neuro-071013-014149
- Yang, Y. P., Hu, L. F., Zheng, H. F., Mao, C. J., Hu, W. D., Xiong, K. P., Wang, F., & Liu, C.F. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(5), 625–635. doi: 10.1038/aps.2013.5
- Yang, K. C., Sathiyaseelan, P., Ho, C., & Gorski, S. M. (2018). Evolution of tools and methods for monitoring autophagic flux in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, *46*(1), 97–110. doi: 10.1042/BST20170102
- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell*, *3*(12), 588–596. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>
- Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1865. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>

## Metal release from electrodes after application of electroporation pulses used in clinical practise

Angelika VIŽINTIN<sup>1</sup>, Gregor MAROLT<sup>2</sup>, Damijan MIKLAVČIČ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [damijan.miklavcic@fe.uni-lj.si](mailto:damijan.miklavcic@fe.uni-lj.si)

### **Metal release from electrodes after application of electroporation pulses used in clinical practise**

**Abstract:** Electroporation is the phenomenon of increased cell membrane permeabilization due to exposure of cells/tissue to short electric pulses. Clinical applications based on electroporation include electrochemotherapy, gene electrotransfer and tissue ablation with irreversible electroporation. In electroporation-based applications, the electric field parameters like electric field strength, shape, pulse duration, pulse polarity, delay between pulses, and number of pulses must be adjusted to specific application to achieve the desired outcome. During delivery of electroporation pulses, electrochemical processes such as electrolysis, generation of radicals, and release of the electrode material are taking place at the electrode-electrolyte interface which can cause electrode wear and fouling, sample contamination, and potentially also chemically modify the treated medium and affect cells or food that has been treated. In this study we compared release of metal ions from stainless steel electrodes after delivery of pulse protocols comparable to the ones used in research and clinical practice. The protocol for tissue ablation with irreversible electroporation resulted in a considerably higher release of metal ions because of the higher energy that was delivered through the electrodes, pointing out the need for further optimization of electroporation pulse protocols.

**Key words:** electroporation; electrochemistry; metal release

### **Sproščanje kovinskih ionov z elektrod pri elektroporacijskih pulzih, ki se uporabljajo v klinični praksi**

**Izveček:** Elektroporacija je pojav povečane prepustnosti celične membrane zaradi izpostavitve celic/tkiv kratkim električnim pulzom. Med klinične aplikacije elektroporacije sodijo elektrokemoterapija, genska elektrotransfekcija in ablacija tkiv z ireverzibilno elektroporacijo. Pri na elektroporaciji temelječih aplikacijah je za doseganje želenih rezultatov potrebno prilagoditi parametre električnega polja kot so jakost polja, oblika, trajanje in polarnost pulza, pavza med pulzi ter število pulzov specifični aplikaciji. Med dovajanjem električnih pulzov na se na stiku elektrode in elektrolita dogajajo elektrokemijske reakcije kot so elektroliza, nastanek radikalov in sproščanje delcev elektrod, kar lahko vodi do obrabe elektrod, kontaminacije vzorca in potencialno tudi do kemijskih sprememb medija, celic oz. hrane, ki je podvržena električnim pulzom. V pričujoči raziskavi smo primerjali sproščanje kovin iz elektrod iz nerjavečega jekla po dovajanju elektroporacijskih pulzov, primerljivih s tistimi, ki se uporabljajo v raziskavah in klinični praksi. Po dovajanju pulzov kot se uporabljajo pri ablaciji tkiv z ireverzibilno elektroporacijo smo izmerili občutno višje koncentracije sproščenih kovinskih ionov kot posledico velike dovedene energije. Rezultati kažejo na potrebo po nadaljnji optimizaciji elektroporacijskih protokolov.

**Ključne besede:** elektroporacija; elektrokemija; sproščanje kovin

## 1 INTRODUCTION

Electroporation (also sometimes termed electropermeabilization) is the phenomenon of increased cell membrane permeabilization due to exposure of cells/tissue to short electric pulses. It is used in numerous applications in biomedicine, biotechnology, food science and technology, and environmental sciences (Kotnik et al., 2019).

In electroporation-based applications, the electric field parameters like electric field strength, pulse shape, duration, pulse polarity, delay between pulses, and number of pulses must be adjusted to specific application to achieve the desired outcome. Cells are reversibly electroporated if the cell membrane is transiently permeabilized and its integrity is eventually restored, and cells survive. Clinical applications based on reversible electroporation include electrochemotherapy, a local cancer treatment modality based on the combination of permeabilizing electric pulses and cytotoxic drugs, and gene electrotransfer, pulse-mediated delivery of protein-encoding nucleic acids to cells. In electrochemotherapy, eight 100  $\mu$ s pulses at 1 Hz or 5 kHz pulse repetition rate are typically applied (Marty et al., 2006), while for gene electrotransfer, delivery of a short (in the range of microseconds) high-voltage pulse is usually followed by a longer (several milliseconds) low-voltage electric pulse (Geboers et al., 2020). The phenomenon of pulsed-induced cell death is termed irreversible electroporation. In the past decade, irreversible electroporation emerged as a new non-thermal ablation modality. For tissue ablation with electroporation, at least 70-100 pulses of 50–100  $\mu$ s duration and higher amplitudes compared to the ones used in electrochemotherapy are most commonly used (Martin II et al., 2016).

During the delivery of electroporation pulses, electrochemical processes such as electrolysis and consequent bubble formation, generation of radicals, and release of the electrode material are taking place at the electrode-electrolyte interface. These effects are often neglected although they cause electrode wear and fouling, sample contamination and chemical modification of the medium that can affect cells or food that has been treated and even cause experimental errors (Evrendilek et al., 2004; Friedrich et al., 1998; Kotnik et al., 2001; Loomis-Husselbee et al., 1991; Pliquett & Gusbeth, 2000; Roodenburg et al., 2005; Saulis et al., 2005). On the other hand, the chemical interaction between the products of electrolysis and cells are exploited to cause cell death in electrolytic tissue ablation (Nilsson et al., 2000) and in the combination of electroporation and electrolysis termed E2 (Klein et al., 2017).

Electrodes for electroporation procedures are most often made of aluminum, stainless steel or platinum. Metal ions released from electrodes during electroporation can change the solution pH (Friedrich et al., 1998; Saulis et al., 2005), precipitate proteins and nucleic acids (Stapulionis, 1999), impact flavor and mouth feeling of treated food (Evrendilek et al., 2004), and be cytotoxic and/or affect the biochemistry of the exposed cells (Kotnik et al., 2001; Loomis-Husselbee et al., 1991). Released metal ions can also affect the outputs of assays that are used to monitor electroporation, e.g. the measured membrane permeabilization after electroporation with calcein, because metal ions can form complexes with fluorescent dyes and quench their fluorescence (Pliquett & Gusbeth, 2000).

Electrochemical reactions at the electrode-electrolyte interface are complex phenomena, and their extent depends on many factors, including electric pulse parameters, electrode design and treatment medium characteristics. Several strategies have been proposed for reducing the intensity of electrochemical reactions, including reduction of the voltage, shortening of the pulse duration, lowering of medium conductivity or the use of biphasic pulses (Saulis et al., 2015). However, the interplay between the various pulse parameters is complex and the influence of an individual parameter on the overall effect of the electric pulses on

electrochemical reactions is not yet fully understood. For example, although it was experimentally confirmed that shortening of the pulse and/or use of biphasic pulses instead of monophasic indeed limits electrochemical reactions and electrode corrosion (Kotnik et al., 2001; Morren et al., 2003; Vižintin et al., 2020, 2021), stronger electric fields or higher number of pulses must be applied to achieve the same electroporation efficiency when using such pulses (Kotnik et al., 2001; Pucihar et al., 2011; Vižintin et al., 2020, 2021). It remains unclear whether e.g. a lower electric field strength and higher number of pulses would result in a lower rate of electrochemical reactions than fewer pulses applied at a higher electric field strength. The goal of this study was to compare metal release from stainless steel electrodes after delivery of electroporation pulses similar to those commonly used in biomedical electroporation-based applications like electrochemotherapy, gene electrotransfer and tissue ablation with irreversible electroporation.

## 2 MATERIALS AND METHODS

Two parallel rod-shaped stainless steel 304 wire electrodes (cat. no. FE225150, Goodfellow Cambridge, England, UK, composed of 17-20 % Cr, < 2 % Mn, 8-11 % Ni, < 800 ppm C and Fe balance) with 1 mm diameter and distance between the inner edges of the electrodes set at 4 mm were placed in a 2 ml microcentrifuge tube filled with 1.1 ml of 0.9 % NaCl (w/v) solution. The 0.9 % NaCl solution was prepared from water for ultratrace analysis and 99.999 % pure NaCl. Pulse generator Cliniporator Vitae (IGEA, Italy) was used to deliver monophasic rectangular electric pulses: eight pulses of 100  $\mu$ s duration with 1 Hz repetition rate at 500 or 1000 V, 90 pulses in bursts of 10 pulses of 100  $\mu$ s duration at 500 V with 1 Hz pulse repetition rate and 0.1 Hz burst repetition rate or one pulse of 1 ms duration at 500 V. After pulse application, 1 ml of the treated 0.9 % NaCl solution was transferred to a new 15 ml centrifuge and 2.5  $\mu$ l of 65 % HNO<sub>3</sub> was added. Experiments were performed in triplicates. For preparation of reagent blanks, 5  $\mu$ l of 65 % HNO<sub>3</sub> was added to 2 ml of 0.9 % NaCl solution in a 15 ml centrifuge. Samples were kept at 4 °C until analysis. Right before analysis, sample solutions were filtered with 0.45  $\mu$ m filter paper and diluted 6.25-fold with 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>. The concentration of selected metals (<sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>56</sup>Fe, <sup>60</sup>Ni) was then determined by Agilent 7900ce ICP-MS instrument (Agilent Technologies, California, USA) with the use of an internal standard solution (<sup>45</sup>Sc, <sup>72</sup>Ge, <sup>103</sup>Rh, <sup>115</sup>In, <sup>159</sup>Tb). The limit of detection was calculated as the concentration corresponding to a 3-fold standard deviation (3s) of blank determinations.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The measured concentrations of Fe, Ni, Cr and Mn ions in 0.9 % NaCl solution after delivery of different electroporation pulse protocols are shown in Table 1. With all electric pulses, the highest concentration of released metal ions was measured for Fe, followed by Ni, Cr and Mn, which is not proportional to the composition of the stainless steel 304 wire from which the electrodes were made. Beside composition, standard potentials of reduction half reactions and also other factors like medium properties and consequent metal-complex formation seem to affect the quantity of released metal ions from the electrodes during and after delivery of electric pulses.

Not surprisingly, the highest concentrations for all the four metal ions were measured after delivery of 90 pulses of 100  $\mu$ s duration at 500 V, a pulse protocol similar to the ones used in clinics for tissue ablation with irreversible electroporation. This pulse protocol has the longest total pulse on time and higher energy (defined as the product of pulse duration, number of pulses, voltage, and electric current). Perhaps more interesting is the comparison between eight

pulses of 100  $\mu$ s duration at 500 V, a standard electrochemotherapy pulse protocol, and 90 pulses of 100  $\mu$ s duration at 500 V – although the total pulse on time of the later is approximately 11 times longer compared to the first, the concentration of released Fe, Ni and Cr ions is around 13–15-times higher in case of 90 pulses, and the concentration of released Mn is almost 30-times higher compared to when only eight pulses are used. These results suggest that the concentration of released metal ions from the electrodes is not solely dependent on the number of applied electric pulses, having other pulse parameters constant.

The standard electrochemotherapy pulse protocol, e.g. eight pulses of 100  $\mu$ s duration at 1 Hz repetition rate, has a slightly shorter total pulse on time than the 1 ms pulse protocol used in gene electrotransfer. When comparing concentration of the released metal ions between these two pulse protocols at the same applied voltage (500 V), we see that slightly higher concentrations of released metal ions were detected after delivery of the 1 ms pulse. Applying one longer pulses instead of more shorter pulses thus does not seem to greatly affect metal release from electrodes if the total pulse on time is approximately the same.

**Table 2:** Concentrations and relative standard deviations (RSD) of Fe, Ni, Cr and Mn ions in 0.9 % NaCl solution after delivery of different electroporation pulse protocols

Pulse protocol	Concentration of metal ions ( $\mu$ M)							
	Fe	RSD [%]	Ni	RSD [%]	Cr	RSD [%]	Mn	RSD [%]
8 $\times$ 100 $\mu$ s, 1 Hz, 500 V	9.1	12	1.1	12	1.0	20	0.1	40
8 $\times$ 100 $\mu$ s, 1 Hz, 1000 V	25	3.5	2.7	2.4	2.2	7.0	0.4	2.5
90 $\times$ 100 $\mu$ s, 1 Hz, 500 V	140	0.9	15	2.0	13	3.2	2.9	2.3
1 ms, 500 V	14	3.1	1.7	2.4	1.1	5.4	0.2	7.0

In accordance with expectations, more metal ions were released after delivery of eight pulses of 100  $\mu$ s duration at 1000 V than at 500 V. However, as in the case of number of pulses, the relationship between the concentration of released metal ions and the applied voltage does not seem to be completely linear – when a two times higher voltage was applied, the measured concentrations of metal ions were more than two times higher.

After applying the standard eight pulses of 100  $\mu$ s used in electrochemotherapy to a droplet of cell growth medium placed between parallel stainless steel electrodes, Kotnik et al. (2001) determined that the concentration of released Fe ions is in the low millimolar range and showed that Fe ions in this concentration range decrease the cell survival of electroporated and non-electroporated cells. In our experiments, the concentration of released Fe ions was in the micromolar range. The differences in the measured Fe concentration are consequence of different electrode geometries which result also in different contact surface and current densities - the plate electrodes used by Kotnik et al. (2001) provide a relatively homogeneous electric field, while we used wire electrodes immersed in a larger volume (1.1 ml) of medium that produce a nonhomogeneous electric field.

Stainless steel is a commonly used material for electrode fabrication. The effects of other metals from which the stainless steel 304 electrodes are composed (Mn, Cr, Ni) on electroporated cells has not been studied yet. However, these metals are known to be toxic and cancerogenic or to have reproductive and developmental toxicity (Crossgrove & Zheng, 2004; Kasprzak et al., 2003; Lima et al., 2011; O'Brien et al., 2003). Cr(VI) has been shown to decrease the survival of cells *in vitro* already at submicromolar concentration level (Levis et al., 1978; Pascal &



Tessier, 2004). The concentration of different Ni compounds that reduced the cell survival/cloning efficiency and caused transformations in *in vitro* cell studies, was reported to be in the micro- and milimolar range (Babich et al., 1986; Hansen & Stern, 1983; Wlr et al., 1984). In our experiments, the concentration of released Cr from stainless steel electrodes was determined to be in the micromolar range (although the oxidation state of Cr was not determined) and the concentration of released Ni in the micromolar range. Therefore, it is possible that the metal ions released from stainless steel electrodes could affect the treated cells/tissue, especially considering the fact that electroporation transiently permeabilizes the cell membranes also to molecules for which otherwise the membrane is impermeable.

#### 4 CONCLUSIONS

The use of electroporation-based applications in food technology and biomedicine is on the rise. During the delivery of high-voltage electric pulses, electrochemical reactions are taking place at the electrode-electrolyte interface that cause chemical modification of the medium, electrolysis and accompanying bubble formation, and release of electrode material among other effects. Some of the released metal ions can be toxic. The electrochemical processes accompanying electroporation thus should not be neglected. Optimization of the electric pulse parameters can decrease the rate of electrochemical reactions. However, the relationships between electric pulse parameters and the amount of released metal ions from electrodes are complex and other factors beside the pulse parameters (e.g. electroporation medium properties) affect the amount of released metal ions. In this study we compared metal release after the delivery of pulse protocols used in research and clinical practice in applications like electrochemotherapy, gene electrotransfer and tissue ablation with irreversible electroporation. Especially the later resulted in high release of metal ions because of the higher energy that was delivered though the electrodes, pointing out the need for further research and optimization of electroporation pulse protocols.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was funded by Medtronic and the Slovenian Research Agency (ARRS) (research core funding No. (P2-0249)). The work was partially performed within the network of research and infrastructural centres of University of Ljubljana, which is financially supported by Slovenian Research Agency through infrastructural grant IP-0510. A.V. was granted a scholarship from the University Foundation of ing. Lenarčič Milan.

#### 5 REFERENCES

- Babich, H., Shopsis, C., & Borenfreund, E. (1986). In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 11(1), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(86\)90030-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(86)90030-8)
- Crossgrove, J., & Zheng, W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine*, 17(8), 544–553. <https://doi.org/10.1002/nbm.931>
- Evrendilek, G. A., Li, S., Dantzer, W. R., & Zhang, Q. H. (2004). Pulsed electric field processing of beer: microbial, sensory, and quality analyses. *Journal of Food Science*, 69(8), M228–M232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09892.x>
- Friedrich, U., Stachowicz, N., Simm, A., Fuhr, G., Lucas, K., & Zimmermann, U. (1998). High efficiency electrotransfection with aluminum electrodes using microsecond controlled pulses. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 47(1), 103–111. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00163-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00163-9)

- Geboers, B., Scheffer, H. J., Graybill, P. M., Ruarus, A. H., Nieuwenhuizen, S., Puijk, R. S., van den Tol, P. M., Davalos, R. V., Rubinsky, B., de Gruijl, T. D., Miklavčič, D., & Meijerink, M. R. (2020). High-Voltage Electrical Pulses in Oncology: Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotransfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy. *Radiology*, 295(2), 254–272. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020192190>
- Hansen, K., & Stern, R. M. (1983). In vitro toxicity and transformation potency of nickel compounds. *Environmental Health Perspectives*, 51, 223–226. <https://doi.org/10.1289/ehp.8351223>
- Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W., & Salnikow, K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutation Research*, 533(1–2), 67–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.021>
- Klein, N., Guenther, E., Mikus, P., Stehling, M. K., & Rubinsky, B. (2017). Single exponential decay waveform; a synergistic combination of electroporation and electrolysis (E2) for tissue ablation. *PeerJ*, 5, e3190. <https://doi.org/10.7717/peerj.3190>
- Kotnik, T., Miklavčič, D., & Mir, L. M. (2001). Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses: Part II. Reduced electrolytic contamination. *Bioelectrochemistry*, 54(1), 91–95. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00115-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00115-3)
- Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., & Miklavčič, D. (2019). Membrane Electroporation and Electroporation: Mechanisms and Models. *Annual Review of Biophysics*, 48(1), 63–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>
- Levis, A. G., Bianchi, V., Tamino, G., & Pegoraro, B. (1978). Cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium on mammalian cells in vitro. *British Journal of Cancer*, 37(3), 386–396. <https://doi.org/10.1038/bjc.1978.58>
- Lima, P. D. L., Vasconcellos, M. C., Montenegro, R. C., Bahia, M. O., Costa, E. T., Antunes, L. M. G., & Burbano, R. R. (2011). Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature. *Human & Experimental Toxicology*, 30(10), 1435–1444. <https://doi.org/10.1177/0960327110396531>
- Loomis-Husselbee, J. W., Cullen, P. J., Irvine, R. F., & Dawson, A. P. (1991). Electroporation can cause artefacts due to solubilization of cations from the electrode plates. Aluminum ions enhance conversion of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate into inositol 1,4,5-trisphosphate in electroporated L1210 cells. *The Biochemical Journal*, 277 (Pt 3), 883–885.
- Martin II, R. C. G., Durham, A. N., Besselink, M. G., Iannitti, D., Weiss, M. J., Wolfgang, C. L., & Huang, K.-W. (2016). Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: A call for standardization of energy delivery. *Journal of Surgical Oncology*, 114(7), 865–871. <https://doi.org/10.1002/jso.24404>
- Marty, M., Serša, G., Garbay, J. R., Gehl, J., Collins, C. G., Snoj, M., Billard, V., Geertsen, P. F., Larkin, J. O., Miklavcic, D., Pavlovic, I., Paulin-Košir, S. M., Čemažar, M., Morsli, N., Soden, D. M., Rudolf, Z., Robert, C., O’Sullivan, G. C., & Mir, L. M. (2006). Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements*, 4(11), 3–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.002>
- Morren, J., Roodenburg, B., & de Haan, S. W. H. (2003). Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(3), 285–295. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00041-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00041-9)
- Nilsson, E., von Euler, H., Berendson, J., Thörne, A., Wersäll, P., Näslund, I., Lagerstedt, A.-S., Narfström, K., & Olsson, J. M. (2000). Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*, 51(1), 1–11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(99\)00073-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0302-4598(99)00073-2)
- O’Brien, T. J., Ceryak, S., & Patierno, S. R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research*, 533(1–2), 3–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.006>
- Pascal, L. E., & Tessier, D. M. (2004). Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters*, 147(2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.11.004>
- Pliquett, U. F., & Gusbeth, C. A. (2000). Overcoming electrically induced artifacts in penetration studies with

fluorescent tracers. *Bioelectrochemistry*, 51(1), 75–79.

- Pucihar, G., Krmelj, J., Rebersek, M., Napotnik, T. B., & Miklavcic, D. (2011). Equivalent pulse parameters for electroporation. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 58(11), 3279–3288. <https://doi.org/10.1109/TBME.2011.2167232>
- Roodenburg, B., Morren, J., Berg, H. E. (Iekje) I., Haan, S. W. H. De, & de Haan, S. W. H. (2005). Metal release in a stainless steel pulsed electric field (PEF) system: Part II. The treatment of orange juice; related to legislation and treatment chamber lifetime. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(3), 337–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.004>
- Saulis, G., Lape, R., Pranevičiūtė, R., & Mickevičius, D. (2005). Changes of the solution pH due to exposure by high-voltage electric pulses. *Bioelectrochemistry*, 67(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.03.001>
- Saulis, G., Rodaite, R., Rodaitė-Riševičienė, R., Dainauskaitė, V. S., & Saulė, R. (2015). Electrochemical processes during high-voltage electric pulses and their importance in food processing technology. In R. Rai V (Ed.), *Advances in Food Biotechnology* (pp. 575–592). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118864463.ch35>
- Stapulionis, R. (1999). Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48(1), 249–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00206-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00206-2)
- Vizintin, A., Marković, S., Ščančar, J., & Miklavčič, D. (2021). Electroporation with nanosecond pulses and bleomycin or cisplatin results in efficient cell kill and low metal release from electrodes. *Bioelectrochemistry*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107798>
- Vizintin, A., Vidmar, J., Ščančar, J., & Miklavčič, D. (2020). Effect of interphase and interpulse delay in high-frequency irreversible electroporation pulses on cell survival, membrane permeabilization and electrode material release. *Bioelectrochemistry*, 134, 107523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107523>
- Wlr, M. W., Schenley, R. L., Tan, E.-L., Williams, M. W., Schenley, R. L., Perdue, S. W., Hayden, T. L., Turner, J. E., & Hsie, A. W. (1984). The toxicity of sixteen metallic compounds in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 74(3), 330–336. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90286-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90286-2)

## ŽIVILSTVO

### Can we improve the accessibility of bound phenolics of spelt seeds using different biotechnological processes?

Marjeta MENCIN<sup>1</sup>, Petra TERPINC<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology, Ljubljana, Slovenia

\*corresponding author: [petra.terpinc@bf.uni-lj.si](mailto:petra.terpinc@bf.uni-lj.si)

#### Can we improve the accessibility of bound phenolics of spelt seeds using different biotechnological processes?

**Abstract:** The aim of this study was exploring the impact of different biotechnological techniques on the accessibility of spelt antioxidants. Germination, fermentation and enzymatic treatment had a significant effect on phenolic composition of prepared extracts and their reactivity toward Folin–Ciocalteu (FC) reagent, DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals. Regardless of the biotechnological processes, notable differences were found between the content of extractable and bound phenolics. External xylanases and feruloyl esterases had the potential to release insoluble bound phenolics from spelt the most, resulting in the highest content of extractable phenolics. In the case of the germinated seeds, the increased content of extractable phenolics was obviously not only the result of the transformation, since the content of bound phenolics remained very high, but also the result of *de novo* synthesis. Meanwhile, a significant increment in the content of total phenolics in fermented seeds was result of newly synthesized phenolic molecules, the majority of which were able to incorporate into cell wall matrix. Our *in vitro* study suggests that the individual biotechnological processes typically affect the ratio between extractable and bound phenolics and also provide a good opportunity to improve the accessibility and subsequent activity of bound antioxidants in spelt seeds.

**Key words:** germination; fermentation; enzymatic treatment; extractable phenolics; bound phenolics; antioxidant activity

#### Ali lahko izboljšamo dostopnost vezanih fenolov pirinih semen z uporabo različnih biotehnoloških procesov?

**Povzetek:** Cilj raziskave je bil raziskati vpliv različnih biotehnoloških procesov na dostopnost antioksidantov iz semen pira. Kaljenje, fermentacija in encimsko tretiranje so pomembno vplivali na fenolno sestavo pripravljenih ekstraktov in na njihovo reaktivnost v reakciji z reagentom Folin–Ciocalteu (FC) ter DPPH<sup>•</sup> in ABTS<sup>•+</sup> radikali. Ne glede na uporabljen biotehnološki proces so bile ugotovljene opazne razlike med vsebnostjo ekstraktibilnih in vezanih fenolov. Eksterne ksilanaze in feruloil esteraze so najbolj prispevale k sprostitvi netopnih vezanih fenolov iz pira, kar je povzročilo največjo vsebnost ekstraktibilnih fenolov. Pri kaljenih semenih očitno povečana vsebnost ekstraktibilnih fenolov ni bila le rezultat transformacije, saj je vsebnost vezanih fenolov ostala zelo visoka, ampak je bila tudi rezultat *de novo* sinteze. Znatno porast vsebnosti skupnih fenolov v fermentiranih semenih je bil posledica novo sintetiziranih fenolnih molekul, od katerih se jih je večina bila sposobna vgraditi v matriks celične stene. Naša *in vitro* raziskava kaže, da posamezni biotehnološki procesi specifično vplivajo na razmerje med ekstraktibilnimi in vezanimi fenoli, prav tako pa nudijo

tudi dobro priložnost za izboljšanje dostopnosti in aktivnosti vezanih antioksidantov v pirinih semenih.

**Ključne besede:** kaljenje; fermentacija; encimsko tretiranje; ekstraktibilni fenoli; vezani fenoli; antioksidativna aktivnost

## 1 INTRODUCTION

Spelt (*Triticum spelta* L.) is an alternative crop to wheat (*Triticum aestivum* L.). Consumption of spelt seeds has been associated with a lower risk of certain chronic diseases, such as cancer, heart disease, obesity, and diabetes. It has been suggested that these health benefits are not due to a single compound, but to the combined effects of dietary fiber, phenolics and other bioactive components present in cereal seeds (Fardet, 2010). The major phenolics present in spelt seeds are phenolic acids, flavonoids, and tannins. Phenolics can provide health benefits through multifactorial physiological mechanisms that include their antioxidant activities. Phenolics (mainly phenolic acids) are concentrated in the bran fraction of spelt seeds and exist in extractable (free, soluble conjugated) and insoluble bound forms. Ferulic acid is the most abundant phenolic acid in spelt seeds, followed by *p*-coumaric, caffeic and *p*-hydroxybenzoic acids, which are mainly covalently cross-linked with cell wall polymers (Mencin et al., 2021). In order to exhibit their health-related positive impact, phenolic acids must be released from the food matrix and be bioaccessible in the gastrointestinal tract. Therefore, biotechnological processes have been utilized to facilitate the release and to increase the accessibility of bound phenolics in spelt seeds, mainly by degradation of the cereal matrix or fiber polymers. Our recent study (Mencin et al., 2021) showed that germination under various abiotic stresses increased extractable and bound phenolics in spelt seeds. The aim of this study was to evaluate the influence of different biotechnological processes (germination, spontaneous fermentation, enzymatic treatment) on the content of extractable and bound phenolics and their antioxidant activities.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Germination of spelt seeds

Spelt (*Triticum spelta* L. cv. Ostro) seeds were obtained from a local mill in the Dolenjska region of Slovenia. After they were soaked for 2 h, the seeds were mixed with water at a ratio of 1:1.5 (w/v) and germinated under dark conditions in the germination chamber at 20 °C. After 144 h, the samples were cooled with liquid nitrogen, homogenised and freeze-dried.

### 2.2 Spontaneous fermentation of spelt seeds

Native spelt seeds were milled using laboratory mill to obtain a fine powder and freeze-dried to a moisture level < 5%. The spelt seeds were mixed with water at a ratio of 1:2 (w/v) in a 50 mL centrifuge tube. The spelt seeds were spontaneous fermented for 48 h at 30 °C. After fermentation, the samples were immediately frozen and freeze-dried.

### 2.3 Enzymatic treatments of seeds

Milled and freeze-dried native spelt seeds were treated with two different enzymes (xylanase (CAS: 9025-57-4) and feruloyl esterase (CAS: 134712-49-5)). The enzymatic treatment was performed at 40 °C for 4 h in 50 mL centrifuge tubes with continuous stirring. Specifically, spelt seeds were suspended in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 6) at a ratio of 1:4 (w/v)

for treatment with xylanase (5 U/g DW of sample) combined with feruloyl esterase (10 U/g DW of sample). The optimal concentrations of enzymes, time of enzymatic treatments and sample-to-buffer ratio for each enzyme, were selected based on preliminary experiments (data not shown). After this treatment, the sample was collected and freeze-dried.

#### 2.4 Preparation of extractable and bound phenolics

Aliquots of the homogenised and freeze-dried treated seeds were mixed with 99.9% methanol at a ratio of 1:9 (w/v). After shaking for 2 h at room temperature, the samples were centrifuged ( $9793.9 \times g$ , 10 min) and filtered (pore size,  $0.45 \mu\text{m}$ ). These filtered supernatants from the extractions contained the extractable phenolics. The solid residues after methanol extraction were treated by adding 2 M sodium hydroxide (20 mL) and shaking for 4 h at room temperature. After hydrolysis, the samples containing the released phenolics were acidified to pH 3 with concentrated formic acid. These filtered hydrolysates represented solution of bound phenolics.

#### 2.5 Determination of total phenolics content (TPC) and antioxidant activities

The TPCs were determined using the FC method and the antioxidant activities were determined using DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>, according to the method described in our previous publication (Mencin et al., 2021). A standard curve was prepared with Trolox, and the data were expressed as mg Trolox equivalents per g dry weight (mg TE/g DW).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Total phenolic content of spelt seeds treated with different biotechnological processes

The native spelt seeds were used as a control sample. Following the preparation of the extracts, the TPC of the extractable fraction was 2.9 mg TE/g DW and of the bound fraction was 6.0 mg TE/g DW. All samples treated with different biotechnological processes improved the extractable and bound TPCs of spelt seeds compared to the control sample. Here, the germination, spontaneous fermentation and enzymatic treatment significantly increased the TPCs of extractable (181%, 27% and 255%, respectively) and bound fractions (198%, 115% and 116%, respectively), compared to control sample (Figure 1).

Regardless of the biotechnological processes, bound phenolics represented a prevalent proportion of total phenolics. Germination induced the synthesis and activation of different hydrolytic enzymes in seeds, resulting in structural modification or synthesis of new bioactive compounds (Gan et al., 2017). A significant increment in the content of total phenolics was partly consequence of phenolics liberation from spelt cell wall matrix. Since the content of bound phenolics increased the most among different treatments, *de novo* phenolic synthesis is suggested as the main reason.

The spontaneous fermentation yields beneficial effects through direct microbial action and production of metabolites which can affect the action of spelt enzymes by creating conditions that are more conducive to their actions. Through metabolic activities of microbes, fermentation also induces structural breakdown of the cell wall, which leads to synthesis of various bioactive compounds. Equally important are the roles of proteases, amylases, and xylanases derived from fermenting microorganisms, and the cereal grain that contributes to modification of the grain and scission of chemical bonds, which, consequently, releases bound phenolics (Adebo and Medina-Meza, 2020). During fermentation, phenolics are metabolized and modified by spelt native microflora into conjugates and/or glucosides with potential increased bioavailability.

Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids may be decarboxylated by lactic acid bacteria to the corresponding phenol or vinyl derivatives or hydrogenated by phenolic acid reductases (Verni et al., 2019). Contrary to the Katina et al. (2007) who reported that spontaneous fermentation of native rye increased the level of TPCs, mainly due to increases in extractable phenolics, in our study bound fraction had more decisive role.

As mentioned above, phenolic acids are often bound, as dimers, trimers and/or oligomers, to the plant cell wall polysaccharides. Xylanases are hydrolytic enzymes, which randomly cleave the  $\beta$ -1,4 xylan backbone, meanwhile feruloyl esterases are capable of releasing ferulic acid and other cinnamic acid. Therefore, addition of suitable enzymes has the potential to release insoluble bound phenolic acids from cereal bran, thereby improving their bioaccessibility (Coda et al., 2015). The extractable TPC was the highest in the enzymatic treated sample (Figure 1), apparently, xylanases and feruloyl esterases had the potential to release insoluble bound phenolics from seeds, but no phenolics were synthesised during this process and consequently the ratio between extractable and bound TPC was much smaller compared to other samples. The ratio between extractable and bound forms of phenolics stood out in enzymatic treated sample. Obviously, the content of extractable phenolics increased due to the release of bound phenolics. In our previous study (Mencin et al., 2021), we reported that ferulic acid is the most abundant phenolics in spelt seeds, furthermore ferulic acid is mainly esterified to the *O*-5 arabinofuranosyl residues of the arabinoxylans in spelt. Thus, a synergistic interaction occurs: xylanase catalyses the degradation of polysaccharides into lower molecular weight fragments suitable as esterase substrates, and the esterase also releases phenolic groups that facilitate xylanase accessibility (Sancho et al., 2001).

Phenolics biosynthesis is a complex pathway involving a number of different chemical reactions that is endogenously regulated during plant growth. Based on the data presented, we can conclude that the biosynthesis and transformation of phenolics seems to depend on type of the biotechnological process, although not all phenolics are equally susceptible to such changes.

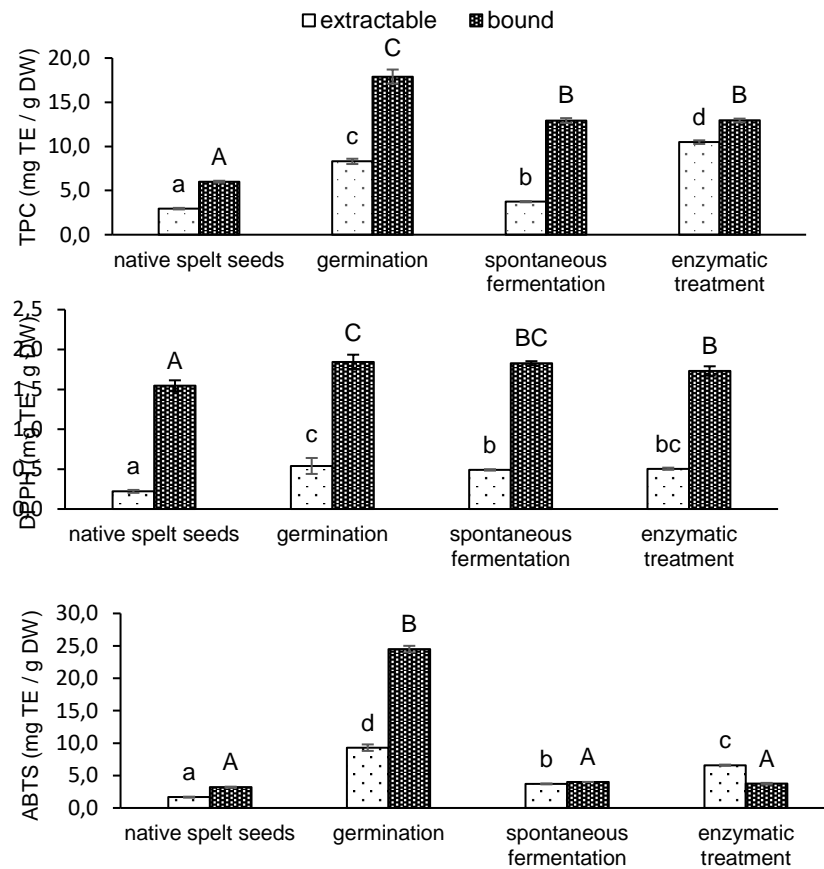
### 3.2 Antioxidant activities of spelt seeds treated with different biotechnological processes

The antioxidant activities of extractable and bound fractions from the different treated spelt seeds were determined using two assays, referred to as DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> scavenging activities. The DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> assays are common radicals used to determine antioxidant activities of individual compounds or complex mixtures in a relatively short time compared to the other methods (Zhou et al., 2004). The DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> assays are based on electron or hydrogen radical transfer mechanisms, and involve reduction of a coloured oxidant; as such, they are similar to the FC assay (Dawidowicz & Olszowy, 2013).

In general, in comparison to control, these free radical scavenging activities of the extractable and bound fractions were higher for the samples treated with biotechnological processes (Figure 1). The germination and enzymatic treatment showed the greatest increase in DPPH<sup>•</sup> (145% and 132%, respectively) and ABTS<sup>•+</sup> (457% and 295%, respectively) scavenging activities of extractable fractions compared to control sample. Here, germination showed the greatest increases in DPPH<sup>•</sup> (19%) and ABTS<sup>•+</sup> (666%) scavenging activities of the bound fraction, compared to control sample. More, contrary to fermented and enzymatically treated samples, germination was the only process with positive effect on the ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity of the bound fraction.

DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> are differently susceptible to phenolics of different chemical composition. Nenadis & Tsimidou (2002) reported that the highest antioxidant activities determined by the

DPPH<sup>•</sup> scavenging activity are expressed by compounds with more than one hydroxyl group, followed by monophenolics with methoxy or alkyl substituents.



**Figure 1.** Total phenolic content (TPC) and antioxidant activities (DPPH and ABTS assays) for the extractable and bound phenolics from the native spelt seeds and seeds treated with different biotechnological processes (germination, spontaneous fermentation, enzymatic treatment). Data are means  $\pm$  standard deviation, and different letters within the same fraction (extractable or bound) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ; Duncan's Multiple Range Test).

Compared to DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> reacts significantly better with monophenolics (e.g., ferulic, *p*-coumaric acids). Due to the high content of ferulic acid and *p*-coumaric acid in spelt seeds (Mencin et al., 2021), a higher ABTS<sup>•+</sup> than DPPH<sup>•</sup> scavenging activity was expected. However, not only phenolic composition and quantities, but also the reaction conditions (e.g., reaction mechanism, time, medium) and data interpretation can have a major impact on the results (Abramovič et al., 2017). It appears that treatments with biotechnological processes had a positive impact on the antioxidant activities of the extractable and bound TPCs.

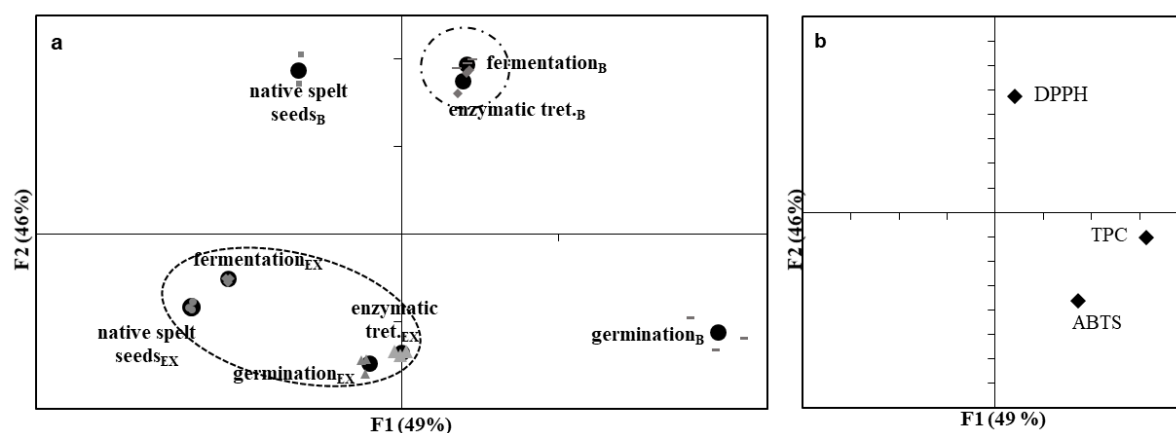
### 3.3 Multivariate analysis

Linear discriminant analysis (LDA) was performed to classify the extractable (EX) and bound (B) extracts of spelt seeds treated with different biotechnological processes based on their TPCs and their *in vitro* antioxidant activities (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>). Overall, the accuracy of classification of each sample into its corresponding group was 96.7%.

Moreover, the first discriminant function (F1) explained 49% and the second discriminant function (F2) explained 46% of the total variance (Figure 2). Very good separation between the extractable and bound fractions was achieved for the samples, the exception being the bound



fraction of germinated spelt seeds (germination<sub>B</sub>) (Figure 2a). The discrimination between these different fractions is shown along the first discriminant function, with TPC and for the second discriminant function, with DPPH and ABTS assays as the most influential standardised canonical discriminant function coefficients. The group of bound fractions is more heterogeneous, in contrast, all samples from the extractable fractions are positioned in the lower left quadrant of the graph (Figure 2a). It can also be seen that the bound fractions of fermented and enzymatic treated spelt seeds are positioned close to each other in the upper right quadrant, suggesting certain similarities in phenolic characteristics, interestingly, the associated extractable fractions are not positioned so close, suggesting that there are greater differences between these two fractions. The other two bound fractions cannot be grouped together, especially that of the germinated spelt seeds. The initial variables in Figure 2b show that significantly higher levels of TPC and ABTS were measured in the bound fractions of germinated spelt seeds compared to other analysed samples.



**Figure 2:** (a) Discriminant score plot (F1 vs. F2) using linear discriminant analysis to classify extractable (EX) and bound (B) fractions of the native spelt seeds and treated with different biotechnological processes (germination, spontaneous fermentation, enzymatic treatment) based on the total phenolic content (TPC), scavenging activities against DPPH• and ABTS•+ radicals; (b) Plot of the correlations between the initial variables and the discriminant factors, here as F1 and F2.

#### 4 CONCLUSIONS

Overall, different biotechnological processes had different effects on the transformations of extractable and bound phenolics in spelt. In comparison to native seeds, the biotechnological treated seeds had higher contents of extractable and bound phenolics. Our *in vitro* study also suggests that germination, fermentation and enzymatic treatment are all approaches that allow improved antioxidant activity of spelt seeds. Contrary to the reaction with FC and DPPH reagents, the ABTS radical-scavenging activity of the bound fraction showed different trend. This can be explained by changes in extract composition, the latter being affected by individual processing technique. The structural changes and the new interactions between different molecules enhanced the bioaccessibility of spelt antioxidants.

#### 5 REFERENCES

Abramovič, H., Grobin, B., Poklar Ulrih, N., & Cigić, B. (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chimica Slovenica*, 64(2), 491–499. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3408>

- Adebo, O. A.; Medina-Meza, G. I. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A Mini Review. *Molecules*, 25 (4), 927. <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
- Chen, Z., Wang, P., Weng, Y., Ma, Y., Gu, Z., & Yang, R. (2017). Comparison of phenolic profiles, antioxidant capacity and relevant enzyme activity of different Chinese wheat varieties during germination. *Food Bioscience*, 20, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.004>
- Coda, R., Katina, K., & Rizzello, C. G. (2015). Bran bioprocessing for enhanced functional properties. *Current Opinion in Food Science*, 1, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.11.007>
- Dawidowicz & Olszowy, M. (2013). The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *European Food Research and Technology*, 236(6), 1099–1105.
- Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: What is beyond fibre? *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 65–134. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000041>
- Gan, R.-Y., Lui, W.-Y., Wu, K., Chan, C.-L., Dai, S.-H., Sui, Z.-Q., & Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>
- Katina, K., Liukkonen, K. H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S. M., Lampi, A. M., Pihlava, J. M., & Poutanen, K. (2007). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.006>
- Mencin, M., Abramovič, H., Jamnik, P., Mikulič Petkovšek, M., Veberič, R., & Terpinč, P. (2021). Abiotic stress combinations improve the phenolics profiles and activities of extractable and bound antioxidants from germinated spelt (*Triticum spelta* L.) seeds. *Food Chemistry*, 344, 128704. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128704>
- Moore, J., Cheng, Z., Su, L., & Yu, L. L. (2006). Effects of solid-state enzymatic treatments on the antioxidant properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9032–9045. <https://doi.org/10.1021/jf0616715>
- Nenadis, N., & Tsimidou, M. (2002). Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), 1191. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0626-z>
- Sancho, A. I., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Williamson, G., & Faulds, C. B. (2001). Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science*, 34(2), 173–179. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0386>
- Verni, M., Verardo, V., Rizzello, C. G. (2019). How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. *Foods*, 8 (9), 362.
- Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., & Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, 107(1), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.018>
- Zhou, Z., Laux, J. J., Yu L. L. (2004) Comparison of swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1118–1123. <https://doi.org/10.1021/jf030640w>