



BF

UNIVERZA V LJUBLJANI
Biotehniška fakulteta

ZNANOST O ŽIVLJENJU – ZNANJE ZA ŽIVLJENJE

V. DOKTORSKI DAN BI(O)ZNANOSTI?

Zbornik povzetkov

LJUBLJANA, JUNIJ 2024

Peti doktorski dan Bi(o)znanosti?

Zbornik povzetkov

Ljubljana, 2024

Peti doktorski dan Bi(o)znanosti?

Zbornik povzetkov

Založnik zbornika:

Biotehniška fakulteta
Jamnikarjeva 101
1000 Ljubljana

Uredniki zbornika: Zala Brajnik Kovačič, Maja Hostnik, Anja Kos, Amela Kujović, Nik Mahnič, Jure Mravljje, Ana Pšeničnik

Organizacijski odbor:

Zala Brajnik Kovačič, Maja Hostnik, Anja Kos, Amela Kujović, Nik Mahnič, Jure Mravljje, Ana Pšeničnik, Vesna Ješe Janežič, Valentina Schmitzer in Programski Svet Bioznanosti

Datum in kraj dogodka:

5. junij 2024
Biotehniška fakulteta

Tehnično urejanje zbornika: Maja Hostnik

Zbornik recenziranih prispevkov (Recenzirali člani organizacijskega odbora).

Število strani: 62

Naklada:

Elektronska publikacija

Publikacija je dostopna na povezavi: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=158302>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI](https://cobiss.si)-ID [197590019](https://cobiss.si/197590019)

ISBN 978-961-6379-87-8 (PDF)

KAZALO

AGRONOMIJA

Skubic M. et al. Ali je navadni regrat (<i>Taraxacum officinale</i> agg.) iz vinogradov varen za prehrano s stališča ostankov fitofarmaceutskih sredstev?	1
---	---

BIOINFORMATIKA

Halužan Vasle A. in Moškon M. Računsko ogrodje za računanje z biološkimi rezervoarji	3
---	---

BIOINŽINIRING V ZDRAVSTVU

Abdelmonaem M. E. A. et al. FTIR spectroscopy and chemometrics: a powerful approach to diabetes mellitus research	6
Žunko H. in Vauhnik R. Zanesljivost merjenja gibljivosti dorzalne fleksije skočnega sklepa z mobilno aplikacijo goniometra	8

BIOLOGIJA

Cepec E. et al. Napredne alge tehnologije za čiščenje odpadnih voda in proizvodnjo biostimulansov.....	10
Gabor M. Kemična ekologija strigošev (Cerambycidae: <i>Cerambyx</i>)	13
Hrovat K. et al. Encime ESBL-producirajoči sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> , izolirani iz spodnjih dihal človeka.....	15
Laka J. et al. Optimization of the bacteria-killing assay to evaluate the immune response in salamanders.....	17

BIOTEHNOLOGIJA

Jamnik K. et al. Analiza izražanja mikro RNA ter imunoprecipitacija proteina AGO1 pri vinski trti (<i>Vitis vinifera</i>) ob okužbi z virusi	20
---	----

Kokondoska Grgič V. et al. Characterization and Analysis of 2D and 3D Models of High-Grade Serous Ovarian Cancer.....	22
Mlinarič K. in Luthar Z. Vsebnost fagopirinov v semenih navadne ajde (<i>Fagopyrum esculentum</i> Monch).....	24
Renko G. in Snoj A. Ohranjanje prostoživečih populacij križancev - primer jezerskega ekotipa potočne postrvi (<i>Salmo trutta</i>)	26

EKONOMIKA NARAVNIH VIROV

Dergan T. in Debeljak M. Metoda za ocenjevanje trajnosti agroživilske verige	28
Rudolf J. in Udovč A. Oblikovanje orodja za ocenjevanje uspešnosti kolektivnih kmetijsko-okoljskih shem, ki temelji na večkriterijskem modelu odločanja in oblikovanju SWOT protokola za pomoč odločanju v kmetijski politiki.....	30

HORTIKULTURA

Gačnik S. et al. Fenolni odziv breskev, tretiranih s salicilno kislino na okužbo z glivo <i>Monilinia laxa</i>	32
Ivančič T. et al. Fenolni odziv plodov oljke (<i>Olea europaea</i> L.) po napadu marmorirane smrdljivke (<i>Halyomorpha halys</i> Stål).....	34
Puzović A. in Mikulič-Petkovšek M. Impact of Pulsed Electric Field Technology on phenolic compounds concentration in strawberry nectar during one-month refrigerated storage.....	37

MIKROBIOLOGIJA

Floccari V. A. et al. Aberrant <i>Bacillus subtilis</i> cell morphology emerges as consequence of active lysogeny	39
Fortuna K. et al. Razvoj metode CRISPR/Cas9 za tarčno preurejanje genomov melaniziranih gliv <i>Aureobasidium pullulans</i> in <i>Hortaea werneckii</i>	41
Jakin Lazar J. et al. Vpliv mucinov na interakcije med bakteriofagi in gostiteljsko bakterijo	43

Popović M. in Dragoš A. Nepričakovane posledice prekinitve bakteriofagnega integracijskega gena pri bakteriji *Bacillus subtilis* 45

Radolič A. et al. Rastlinski izvlečki kot alternativa antibiotičnim krmnim dodatkom za zmanjševanje emisij metana pri prežvekovalcih: mikrobiomski pogled 47

NANOZNANOSTI

Kejžar J. et al. Razvoj in karakterizacija liposomskega dostavnega sistema učinkovin na osnovi lipidov arheje *Aeropyrum pernix* K1 49

Rozman I. et al. Preučevanje (geno)toksičnost večfunkcionalnih nanocimov na osnovi kovinskih oksidov *in vitro* 51

PREHRANA

Drašler V. et al. Antioksidativne lastnosti poliaminov in njihovih derivatov v oljih in emulzijah..... 53

ZNANOSTI O CELICI

Blažič A. et al. Raziskovanje vpliva modulatorjev ionskih kanalov na odziv celic po elektroporaciji..... 55

Fajdiga L. et al. Deformabilnostna citometrija celic Jurkat za celično imunoterapijo 57

Lazar D. Vpogled v vidno prepoznavo gostiteljev navadne slinarice (*Phlaenus spumarius*) 59

ŽIVILSTVO

Zahija Jazbec I. et al. Vpliv koncentracije sladkorja na tvorbo aflatoksina B1 na modelnih mesnih gojiščih..... 61

AGRONOMIJA

Ali je navadni regrat (*Taraxacum officinale* agg.) iz vinogradov varen za prehrano s stališča ostankov fitofarmacevtskih sredstev?

Maruša SKUBIC^{1*}, Helena BAŠA ČESNIK², Špela VELIKONJA BOLTA², Denis RUSJAN¹, Helena ŠIRCELJ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

² Kmetijski inštitut Slovenije, Centralni laboratorij, Ljubljana, Slovenija

* marusa.skubic@bf.uni-lj.si

Uvod: V zadnjih desetletjih se je zanimanje za uživanje užitnih samoniklih rastlin izrazito povečalo. Ena izmed pogosto nabiranih samoniklih rastlinskih vrst je tudi navadni regrat (*Taraxacum officinale* agg.), ki ga najdemo skoraj na vseh kmetijskih površinah, predvsem v trajnih nasadih. Uporablja se v tradicionalni medicini, predvsem pa v kulinariki za pripravo nadevov, omlet, liste se je sveže v solati. Pri regratu se običajno nabira mlade liste pred cvetenjem, najpogosteje spomladi. Kljub številnim pozitivnim učinkom regrata na zdravje ljudi, pa lahko uživanje predstavlja tveganje, ko je nabran v agroekosistemih, v katerih se uporabljajo različna fitofarmacevtska sredstva (FFS). Pridelava grozdja je v primerjavi s pridelavo drugih kmetijskih rastlin ena izmed večjih porabnikov fungicidov v številnih evropskih državah. Dosedanje raziskave so večjo pozornost namenjale ostankom FFS v grozdju in vinu, medtem ko v nam dostopni literaturi nismo zasledili študij o ostankih FFS v regratu iz vinogradov. Namen naše raziskave je ugotoviti, ali se v listih regrata iz vinogradov kopičijo ostanki izbranih FFS in s tem ali je regrat nabran spomladi v vinogradih z različnimi načini pridelave grozdja primeren za prehrano. Prav tako želimo preveriti, ali se vsebnosti izbranih FFS v integriranih vinogradih bistveno spreminja v različnih sezonah nabiranja.

Material in metode: V raziskavo smo vključili regrat rastoč v vinogradih z različnimi načini pridelave grozdja, in sicer pet vinogradov z integrirano pridelavo (IPG), pet ekoloških (EKO) in štiri biodinamične vinograde (BIODIN) v Goriških brdih. Da bi preverili ostanke FFS v različnih sezonah nabiranja regrata, smo v petih vinogradih IPG vzorčili listne rozete regrata trikrat v sezoni, ko so bile rastline necvetoče, z mladimi listi, ki so potencialno primerni za prehrano. Prvič smo liste regrata vzorčili spomladi (marca), drugič ob obnovi vegetacije po prvem mulčenju poleti (začetek julija) in tretjič po trgatvi po zadnjem mulčenju jeseni (začetek

oktobra). Nabirali smo po dva združena vzorca na vinograd, skupno smo nabrali 48 vzorcev (28 ob prvem vzorčenju spomladi, 10 ob drugem vzorčenju in 10 ob tretjem vzorčenju). Sveži rastlinski vzorci so bili homogenizirani in potem shranjeni na -20 °C do ekstrakcije. Analizirali smo sledeča FFS, ki so bila uporabljena v vinogradih IPG: boskalid, difenokonazol, dimetomorf, kresoksim-metil, mandipropamid, metalaksil-M, tebukonazol in triadimenol. Izbrane ostanke FFS smo analizirali z GC-MS/MS in LC-MS/MS sistemoma. Metodi sta bili predhodno validirani v vzorcih regrata za vsa izbrana FFS.

Rezultati in razprava: Spomladi je bil zgolj v enem vzorcu listov regrata iz vinograda IPG zaznan tebukonazol, na njegovi meji detekcije, pod mejno vrednostjo ostankov (MRL). Kot pričakovano v vzorcih iz EKO in BIODIN pridelave grozdja ni bilo zaznanih nobenih FFS, saj je v takih načinih pridelave prepovedana uporaba vseh v naši študiji analiziranih fungicidov. Na podlagi naših rezultatov bi lahko rekli, da je v spomladanskem času nabiranje regrata v vinogradu za prehrano relativno varno, kar pa ne velja za nabiranje v kasnejšem obdobju. Pri drugem vzorčenju, ko je v vinogradih intenzivno zdravstveno varstvo trt, je bilo pričakovano v vseh vzorcih iz IPG zaznано od dva do šest različnih ostankov FFS. V vzorcih so bili najdeni vsi izbrani analizirani fungicidi z izjemo triadimenola. V tretjem vzorčenju, ko je od zadnjega varstva trt minilo več kot dva meseca, ni bilo v regratu določenih nobenih ostankov FFS. Pri drugem vzorčenju je bila MRL vrednost presežena zgolj pri potencialno kancerogenem kresoksim-metilu v štirih vzorcih (od 10). Na podlagi naše študije lahko rečemo, da listi regrata med najbolj intenzivnim zdravstvenim varstvom trt v vinogradih IPG (maj-julij) niso primerni za prehrano, saj smo določili ostanke FFS nad mejo MRL, ki predstavljajo veliko tveganje za zdravje ljudi.

BIOINFORMATIKA

Računsko ogrodje za računanje z biološkimi rezervoarji

Ana HALUŽAN VASLE^{1*}, Miha MOŠKON¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana, Slovenija

* ana.haluzanvasle@fri.uni-lj.si

Uvod: Široka uporabnost umetnih nevronske mreže spodbuja težnje k njihovem prenosu na nekonvencionalna računalniška ogrodja. Molekularno računalništvo se je tako posvetilo pripravi sinteznobioloških nevronske mreže (Halužan Vasle in Moškon, 2024; Kieffer idr., 2023; Nagipogu idr., 2023). Te zahtevajo uporabo arhitektur umetnih nevronske mreže, ki izkoriščajo prednosti in zmanjšujejo vpliv omejitev bioloških sistemov. Ena takšnih arhitektur so računski rezervoarji (angl. *reservoir computing*), ki zajemajo štiri plasti medsebojno povezanih nevronov: vhodno plast, rezervoar, plast za odčitavanje in izhodno plast. Vhodna plast sprejme vhodne signale in jih posreduje rezervoarju, ki jih pretvori v večdimenzionalen prostor. Dimenzionalnost prostora se v plasti za odčitavanje zmanjša, na osnovi česar izhodna plast tvori izhodne iz mreže (Cucchi idr., 2022). Povezave med gradniki plasti so usmerjene in utežene. Utež posamezne povezave definira pomembnost posameznega vhoda. Večina uteži je pri računanju z rezervoarji fiksna, učenje pa poteka le na utežeh povezav med plastjo za odčitavanje in izhodno plastjo. To močno olajša proces učenja, saj lahko zgolj s spreminjanjem plasti za odčitavanje dosežemo učenje različnih funkcij pri enakih vhodnih signalih (Cucchi idr., 2022; Echlin idr., 2018). Zaradi možnosti izkoriščanja obstoječe notranje dinamike uporabljenih sistemov, nespremenljivosti povezav v določenih plasteh in enostavnega učenja je arhitektura računanja z rezervoarji uporabna za načrtovanje in izvedbo sinteznobiološkega molekularnega računalništva (Cucchi idr., 2022; Echlin idr., 2018; Haluszczynski idr., 2020; Snyder idr., 2013).

Material in metode: V programskem okolju Python smo vzpostavili ogrodje za načrtovanje modelov bioloških rezervoarjev. Pri načrtovanju modelov smo želeli v čim večji meri upoštevati biološke razsežnosti uporabljenih modelov. Rezervoarji temeljijo na bioloških gradnikih logičnih vrat, katerih nabor smo priredili glede na kompleksnost izvedbe sinteznobiološkega omrežja.

Rezultati in razprava: Pripravljen ogradjen omogoča postopno razvijanje modela biološkega rezervoarja, ki je zmožen reševanja izbranih računskih problemov. Ogradje najprej zgradi osrednji del – rezervoar, ki se nato poveže z vhodno plastjo in plastjo za odčitavanje. Na koncu dodamo še izhodno plast. Med izgradnjo rezervoarja upoštevamo želeno število delcev, število logičnih vrat za povezovanje delcev ter omejimo največje število vhodnih in izhodnih povezav za posamezne delce. Ta omejitev omogoča bolj realistično načrtovanje z uporabo sinteznobioloških gradnikov. Do sedaj je bilo razvitih le nekaj orodij za načrtovanje modelov bioloških rezervoarjev, ki pa so bila osredotočena na specifične gradnike, zagotavljanje ortogonalnosti signalnih molekul, maksimalno število genov v posameznem rezervoarju in prostorsko porazdeljenost celic, ne pa na omejitve posameznih delcev. Naše delo bo usmerjeno v analizo pripravljenih rezervoarjev z vidika vzpostavljenih metrik. Skupaj z rezultati simulacij želimo izvesti primerjalno analizo med različnimi modeli in pristopi implementacije. Na podlagi obstoječih pristopov izvedbe bioloških procesnih gradnikov, kot so sinteznobiološka genska regulatorna omrežja, bomo pripravili predloge implementacij robustnih in skalabilnih bioloških rezervoarjev, ki bodo zmožni reševanja izbranih računskih problemov. Vzpostavljene metrike in pristope za načrtovanje bomo naknadno vgradili v računsko ogradje, ki bo zmožno avtomatizirane gradnje in uporabe bioloških rezervoarjev z vnaprej definiranimi funkcionalnostmi.

Viri in literatura:

- Cucchi, M., Abreu, S., Ciccone, G., Brunner, D. in Kleemann, H. (2022). Hands-on reservoir computing: A tutorial for practical implementation. *Neuromorphic Computing and Engineering*, 2(3), 032002. <https://doi.org/10.1088/2634-4386/ac7db7>
- Echlin, M., Aguilar, B., Notarangelo, M., Gibbs, D. in Shmulevich, I. (2018). Flexibility of boolean network reservoir computers in approximating arbitrary recursive and non-recursive binary filters. *Entropy*, 20(12), 954. <https://doi.org/10.3390/e20120954>
- Haluszczynski, A., Aumeier, J., Herteux, J. in R  th, C. (2020). Reducing network size and improving prediction stability of reservoir computing. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 30(6), 063136. <https://doi.org/10.1063/5.0006869>
- Halu  an Vasle, A. in Mo  kon, M. (2024). Synthetic biological neural networks: From current implementations to future perspectives. *BioSystems*, 237, 105164. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2024.105164>
- Kieffer, C., Genot, A. J., Rondelez, Y. in Gines, G. (2023). Molecular computation for molecular classification. *Advanced Biology*, 7(3), 2200203. <https://doi.org/10.1002/adbi.202200203>
- Nagipogu, R. T., Fu, D. in Reif, J. H. (2023). A survey on molecular-scale learning systems with relevance to DNA computing. *Nanoscale*, 15(17), 7676–7694. <https://doi.org/10.1039/D2NR06202J>

Snyder, D., Goudarzi, A. in Teuscher, C. (2013). Computational capabilities of random automata networks for reservoir computing. *Physical Review E*, 87(4), 042808. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.87.042808>

BIOINŽINIRING V ZDRAVSTVU

FTIR spectroscopy and chemometrics: a powerful approach to diabetes mellitus research

Mohamed Elwy Abdelhamed ABDELMONAEM^{1,3*}, Chiedozie Kenneth UGWOKÉ², Amin ALIBEGOVIĆ⁴, Erika CVETKO², Jože GRDADOLNIK¹, Anja ŠERBEC², Nejc UMEK^{2*}, Barbara ZUPANČIČ^{1*}

¹ National Institute of Chemistry, Theory Department, Laboratory for Molecular Structural Dynamics, Ljubljana, Slovenia

² University of Ljubljana, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy, Ljubljana, Slovenia

³ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Ljubljana, Slovenia

⁴ University of Ljubljana, Faculty of Medicine, Institute of Forensic Medicine, Ljubljana, Slovenia

* Mohamed.Abdelmonaem@ki.si

Introduction: Skeletal muscle is critically involved in carbohydrates, protein, and lipid metabolism, since it mediates about four fifths of the glucose uptake stimulated by insulin. This extensive physiological functioning makes it one of the tissues most affected by metabolic disorders, particularly diabetes mellitus. Thus, a detailed characterization of diabetes-induced changes in the macromolecular composition of skeletal muscle is highly demanded for a deeper understanding of the underlying pathophysiological mechanisms. In this regard, histochemical assays traditionally used for tissue composition analysis have some evident drawbacks, which we aim to overcome through exploiting the efficiency, high molecular sensitivity, and specificity of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in conjunction with appropriate chemometric tools.

Materials and Methods: In our study, we investigated five functionally and structurally diverse skeletal muscles collected from 16 diabetic and 16 non-diabetic (control) male individuals. The FTIR spectra of all skeletal muscles were collected at the attenuated total reflection (ATR) mode. Then the obtained spectra were subjected to a multi-stage spectral decomposition into several distinct spectral components using a multivariate curve resolution approach. The spectral component determined as body water content in the tissue was removed from the spectra, while the solid part of the skeletal muscle was decomposed into the three main spectral components MC1, MC2 and MC3. These spectral components enabled assigning

various absorption peaks to their corresponding molecular entities, such that each spectral component MC1, MC2 and MC3 represented a certain group of macromolecules, and collectively the overall macromolecular composition of muscles. Changes in the macromolecular composition of the diabetic muscles compared with control ones were investigated based on changes in the relative weights (concentrations) corresponding to each spectral component in the muscle spectra.

Results and Conclusions: The multi-stage spectral decomposition allowed to recognise many of the macromolecular species composing skeletal muscle and their proportions. We can comment on the overall protein composition, the ratio of protein secondary structures and protein phosphorylation, the proportion of collagen, glycogen, nucleic acids, lipids and lipid intermediates (Zupančič et al., 2023). As we worked with a relatively small sample size in our pilot study, we could not catch statistically significant differences between diabetic and control skeletal muscles. However, we found general trends of diabetes-related changes in skeletal muscle composition and laid the methodological foundation to extract many compositional details from the vibrational spectra. The established approach can be applied to a larger sample set for obtaining more definitive information on the alterations in the macromolecular composition of human skeletal muscles affected by diabetes mellitus. The main contribution of our preliminary work is the demonstration of the ability of FTIR in combination with chemometrics to obtain many indicators of the macromolecular composition of tissues simultaneously in a single experiment with minimal sample preparation. This represents one of the main advantages of the analytical capabilities compared to traditional histochemical techniques and paves the way for the use of vibrational spectroscopy in biomedical research.

References:

Zupančič, B., Ugwoke, C. K., Abdelmonaem, M. E. A., Alibegović, A., Cvetko, E., Grdadolnik, J., Šerbec A., & Umek, N. (2023). Exploration of macromolecular phenotype of human skeletal muscle in diabetes using infrared spectroscopy. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1308373.

Zanesljivost merjenja gibljivosti dorzalne fleksije skočnega sklepa z mobilno aplikacijo goniometra

Helena ŽUNKO^{1*}, Renata VAUHNİK²

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Oddelek za fizioterapijo, Ljubljana, Slovenija

* helena.zunko@gmail.com

Uvod: Ne zadosten obseg gibljivosti dorzalne fleksije (OGDF) neposredno vpliva na posameznikovo funkcioniranje, ima pa tudi posreden vpliv kot dejavnik tveganja za pojav poškodb spodnjega uda in padce pri starejših osebah (Gehlsen in Whaley, 1990), ter drugih sekundarnih zapletov zaradi spremenjene biomehanike in kompenzatornih gibalnih vzorcev (Dinh in sod., 2011). Izboljšanje OGDF je zato pogosto pomemben cilj fizioterapevtske obravnave. Za ocenjevanje učinkovitosti terapevtskih postopkov ter nadaljnje načrtovanje zdravljenja potrebujemo veljavne, zanesljive in natančne goniometrične meritve dorzalne fleksije skočnega sklepa (Wilken in sod., 2011; Jones in sod., 2005). Zaradi svoje vsestranskosti je najpogosteje uporabljen univerzalni goniometer, ki je veljavno in zanesljivo merilno orodje, vendar je opazen trend naraščanja uporabe različnih mobilnih aplikacij na pametnih telefonih namesto standardnih merilnih orodij. Namen raziskave je bil ugotoviti zanesljivost merjenju obsega gibljivosti OGDF v stoječem položaju in pri pokrčenem kolenu z mobilno aplikacijo goniometra Spirit Level Plus, nameščeno na pametnem telefonu z operacijskim sistemom Android.

Material in metode: V raziskavi je sodelovalo 32 preiskovancev. Postopek merjenja je bil povzet po raziskavi avtorice Williams in sod. (2013). Med meritvami je pri posameznem preiskovancu minilo najmanj 24 ur, zanesljivost preiskovalke in zanesljivost med preiskovalkama pa je bila ocenjena s koeficientom intraklasne korelacije (ICC) in dodatno ovrednotena z upoštevanjem standardne napake meritve ter upoštevanjem najmanjše zaznavne spremembe pri 95-% intervalu zaupanja.

Rezultati in razprava: Zanesljivost posamezne preiskovalke je sprejemljiva za desno nogo (ICC = 0,72) in odlična za levo nogo (ICC = 0,82). Zanesljivost med preiskovalkama je sprejemljiva tako za desno (ICC = 0,73) kot levo nogo (ICC = 0,65). Rezultati so le delno

primerljivi z rezultati raziskave, ki so jo izvedli Williams in sod. (2013), v kateri so sicer merili dorzalno fleksijo v stoječem položaju s pomočjo druge mobilne aplikacije goniometra (TiltMeter App), nameščene na drugačnem pametnem telefonu z drugim operacijskim sistemom (iOS), in ugotovili, da je zanesljivost meritev odlična pri pokrčenem in iztegnjenem kolenu (ICC 0,8 ali več). Vzroki za razlike v zanesljivosti so lahko tudi razlike v merilnih postopkih, neizkušenost preiskovalke (druga preiskovalka je bila absolventka fizioterapije) in razlike v postopkih kalibracije. Metoda je zmerno zanesljiva in uporabna, kadar jo želimo uporabiti za oceno funkcijske zmožnosti posameznika in kadar obremenjevanje spodnjih udov ni kontraindicirano. Preden jo lahko priporočamo za uporabo v kliničnem okolju, je potrebna standardizacija postopka merjenja dorzalne fleksije ter določitev normativnih vrednosti pri različnih starostnih skupinah, kar bo omogočilo tudi to, da se bodo lahko raziskave, ki bodo preverjale učinkovitost terapevtskih postopkov za izboljševanje OGDF, ustrezno primerjale med seboj. Trenutni dokazi o učinkovitosti terapevtskih postopkov so namreč omejeni predvsem zaradi odsotnosti uveljavljenega standardiziranega ocenjevanja OGDF ter enotne definicije fizioloških normativnih vrednosti OGDF (Young in sod., 2013).

Viri in literatura:

- Dinh, N. V., Freeman, H., Granger, J., Wong, S., & Johanson, M. (2011). Calf stretching in non-weight bearing versus weight bearing. *International journal of sports medicine*, 32(3), 205–210. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1268505>
- Gehlsen, G. M., & Whaley, M. H. (1990). Falls in the elderly: Part II, Balance, strength, and flexibility. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 71(10), 739–741.
- Jones, R., Carter, J., Moore, P., et al. (2005). A study to determine the reliability of an ankle dorsiflexion weight-bearing device. *Physiotherapy*, 91, 242–249.
- Wilken, J., Rao, S., Estin, M., Saltzman, C. L., & Yack, H. J. (2011). A new device for assessing ankle dorsiflexion motion: reliability and validity. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, 41(4), 274–280. <https://doi.org/10.2519/jospt.2011.3397>
- Williams, C. M., Caserta, A. J., & Haines, T. P. (2013). The TiltMeter app is a novel and accurate measurement tool for the weight bearing lunge test. *Journal of science and medicine in sport*, 16(5), 392–395. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2013.02.001>
- Young, R., Nix, S., Wholohan, A., Bradhurst, R., & Reed, L. (2013). Interventions for increasing ankle joint dorsiflexion: a systematic review and meta-analysis. *Journal of foot and ankle research*, 6(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1757-1146-6-46>

BIOLOGIJA

Napredne alge tehnologije za čiščenje odpadnih voda in proizvodnjo biostimulansov

Eva CEPEC^{1*}, Tjaša GRIESSLER-BULC^{1,2}, Urška ŠUNTA¹, Darja ISTENIČ^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Ljubljana, Slovenija

* eva.cepec@zf.uni-lj.si

Uvod: Komunalna odpadna voda povzroča onesnaževanje površinskih voda in podtalnice zato upravljanje s komunalno odpadno vodo, ki predstavlja tudi vir vode in hranil, zahteva razvoj okolju prijaznejših tehnologij ter optimizacijo pristopov. Alge tehnologije omogočajo čiščenje komunalne odpadne vode ter proizvodnjo produktov iz alge biomase za ponovno rabo. Raziskave na tem področju doživljajo intenziven napredek, saj je komunalna odpadna voda bogata s hranili in primerna za gojenje alge biomase, ki v zadnjem času privablja pozornost zaradi številnih uporabnih lastnosti (Wollman in sod., 2019; La Bella in sod., 2022; Amaro in sod., 2023). Po drugi strani je implementacija iz praktičnega in ekonomskega vidika še vedno težavna, še posebej pomembno pa je pri tem preprečiti morebitna zdravstvena in okoljska tveganja. Visoko-pretočni algi bazeni predstavljajo alternativo konvencionalnim metodam čiščenja odpadne vode in so primerni za proizvodnjo zelenih produktov, npr. organskih gnojil in biostimulansov (Calabi-Floody in sod., 2018; Kapoore in sod., 2021; Škufca in sod., 2021; Li in sod., 2022). V prispevku predstavljamo ugotovitve pregleda literature na temo čiščenja odpadnih voda z algami in proizvodnje biostimulansov za uporabo v kmetijstvu ter rezultate preliminarne kalilnega testa, s katerim smo preverjali biostimulativen učinek izbranih vrst alg, pomembnih v procesih čiščenja odpadne vode.

Material in metode: Pregled literature je bil izveden z uporabo podatkovnih baz Scopus in Web of Science in ključnimi besedami: "microalgae", "wastewater", "biostimulants", "agriculture". S kalilnimi testi Phytotestkit Liquid Samples (Microbiotests) smo testirali vpliv treh vrst mikroalga kalitev semen bele gorjušice (*Sinapis alba*) - iz visoko-pretočnega alnega bazena za čiščenje digestata smo pridobili mikroalge vrste *Scenedesmus obliquus*, mikroalge vrste *Chlorella vulgaris* in *Dunaliella tertiolecta* smo gojili v laboratorijskih pogojih v sterilnih erlenmajericah z medijem Bold's Basal Medium (PhytoTechnology Laboratories) in Modified

Johnsons Medium (Borowitzka, M. A., 1990). Nagojeno aljno biomaso smo zbrali s centrifugiranjem (6500 rpm, 10 min) in sprali z ustreznim pufrom (dH₂O in 3 % NaCl). Pripravili smo mešanico puфра z 10 % suhe snovi alg in vzorce do uporabe hranili zamrzovalniku. Za kalilni test smo na testne plošče nanegli aljne pripravke v koncentracijah 0.5, 1, 2 in 5 %, ki smo jih redčili v destilirani vodi, ki je služila kot kontrola. Na posamezno ploščo smo nanegli končnih 20 ml pripravka in 6 semen. Rezultate smo po treh dneh fotografirali in analizirali s programom ImageJ. Biostimulativen učinek smo določili na podlagi izračuna germinacijskega indeksa, kjer smo dolžino korenin v določenem vzorcu in število vzklitih semen primerjali s kontrolo.

Rezultati in razprava: Na podlagi pregleda literature smo ugotovili, da mikroalge proizvajajo številne biostimulativne učinkovine: fitohormone, proteine in aminokisline, polisaharide, antioksidante ter encime (Cepecin sod., 2024). Odpadna voda se je izkazala kot primeren medij za gojenje različnih mikroalg vrst *Synechocystis*, *Phormidium* ter *Scenedesmus*, ki proizvajajo biostimulanse v obliki fitohormonov (Alvarez-Gonzales in sod., 2023). Pridobivanje biostimulansov na osnovi alg za komercialno uporabo ostaja izziv, predvsem zaradi pomanjkanja učinkovitih metod žetja in spremenljivih parametrov, ki vplivajo na končen produkt: aljna kultura ter njeno stanje, sestava odpadne vode, delovanje sistema in okoljski dejavniki. Večina dosedanjih pregledanih raziskav temelji na laboratorijskem nivoju in sintetični odpadni vodi zato je potreben prenos laboratorijskih raziskav na pilotni nivo in uporaba dejanske odpadne vode (Chawla in sod., 2020; Mohsenpour in sod., 2021; Abdelfattah in sod., 2023). S kalilnimi testi smo zaznali biostimulativen učinek na kalitev semen bele gorjušice le v primeru mikroalge *D. Tertiolecta*, kar je lahko posledica pomanjkanja celične stene in učinkovitejšega sproščanja celičnih komponent s pozitivnim učinkom na kalitev semen (Barbosa in sod., 2023). Rezultate laboratorijskih ugotovitev bomo nadgradili s testiranjem dodatnih koncentracij algnih pripravkov in kemijsko analizo biostimulansov ter poskuse izvedli na aljni biomasi pilotnega visoko-pretočnega algnega bazena, ki čisti komunalno odpadno vodo.

Viri in literatura:

- Abdelfattah, A., Ali, S. S., Ramadan, H., El-Aswar, E. I., Eltawab, R., Ho, S. H., ... & Sun, J. (2023). Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects. *Environmental Science and Ecotechnology*, 13, 100205.
- Álvarez-González, A., de Morais, E. G., Planas-Carbonell, A., & Uggetti, E. (2023). Enhancing sustainability through microalgae cultivation in urban wastewater for biostimulant production and nutrient recovery. *Science of The Total Environment*, 904, 166878.

- Amaro, H. M., Salgado, E. M., Nunes, O. C., Pires, J. C., & Esteves, A. F. (2023). Microalgae systems-environmental agents for wastewater treatment and further potential biomass valorisation. *Journal of Environmental Management*, 337, 117678.
- Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1), 99-120.
- Borowitzka, M. A. (1990). The mass culture of *Dunaliella salina*. In *Technical resource papers regional workshop on the culture and utilization of Seaweeds* (Vol. 2).
- Calabi-Floody, M., Medina, J., Rumpel, C., Condrón, L. M., Hernandez, M., Dumont, M., & de La Luz Mora, M. (2018). Smart fertilizers as a strategy for sustainable agriculture. *Advances in agronomy*, 147, 119-157.
- Cepec, E., Griessler-Bulc, T., & Istenič, D. (2024). Uncovering algae biomass potentials: from wastewater to biostimulants. *Proceedings of Socratic Lectures*.
- Chawla, P., Malik, A., Sreekrishnan, T. R., Dalvi, V., & Gola, D. (2020). Selection of optimum combination via comprehensive comparison of multiple algal cultures for treatment of diverse wastewaters. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100758.
- Kapoor, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49, 107754.
- La Bella, E., Baglieri, A., Fragalà, F., & Puglisi, I. (2022). Multipurpose agricultural reuse of microalgae biomasses employed for the treatment of urban wastewater. *Agronomy*, 12(2), 234.
- Li, S., Show, P. L., Ngo, H. H., & Ho, S. H. (2022). Algae-mediated antibiotic wastewater treatment: A critical review. *Environmental Science and Ecotechnology*, 9, 100145.
- Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, 752, 142168.
- Oancea, F., Velea, S., Fătu, V., Mincea, C., & Ilie, L. (2013). Micro-algae based plant biostimulant and its effect on water stressed tomato plants. *Rom. J. Plant Prot*, 6(2013), 104-117.
- Škufca, D., Kovačič, A., Prosenc, F., Bulc, T. G., Heath, D., & Heath, E. (2021). Phycoremediation of municipal wastewater: Removal of nutrients and contaminants of emerging concern. *Science of The Total Environment*, 782, 146949.
- Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 860-871.

Kemična ekologija strigošev (Cerambycidae: *Cerambyx*)

Matic GABOR^{1,2*}

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

* matic.gabor@nib.si

Uvod: Spolni in agregacijsko-spolni feromoni pogosto delujejo kot mehanizem prezigotne reproduktivne izolacije pri simpatričnih sorodnih vrstah, s čimer omejujejo hibridizacijo med vrstami. Za nas lahko feromoni žuželk predstavljajo elegantno orodje za monitoring in proučevanje zavarovanih in ekonomsko pomembnih vrst. Moje doktorske raziskave se osredotočajo na kemično komunikacijo šestih vrst hroščev strigošev (Coleoptera: Cerambycidae: *Cerambyx*), ki so razširjene na Zahodnem Balkanu. Ker se njihove ličinke prehranjujejo z lesom, jih uvrščamo med saproksilne organizme, ki so zaradi sodobnih gozdarskih praks in upravljanja s prostorom ogrožene, poleg tega pa se pogosto znajdejo v vlogi ekonomskih škodljivcev. Za strigoša (*Cerambyx cerdo*) velja oboje, saj je zaradi svoje karizmatičnosti, bioindikatorske vrednosti in vloge ekosistemskega inženirja uvrščen v Priloge II in IV Habitatne direktiv. Hkrati pa je v t.i. dehesah, zavarovanih polnaravnih hrastovih sestojih Iberskega polotoka z izjemno ekološko in družbenogospodarsko vrednostjo, znan kot škodljivec hrastov. Zanima nas, katere vrste strigošev uporabljajo agregacijsko-spolni feromon in kakšne so razlike v sestavi njihovih feromonov. Primerjal bom prispevek različnih ekoloških dejavnikov, kot so kemična komunikacija, sezonska in dnevna aktivnost ter izbira mikrohabitata in hranilne rastline, k prezigotni reproduktivni izolaciji strigošev. Zaradi velike potrebe po zanesljivejši metodi monitoringa strigoša, ki je osnova za njegovo upravljanje, bom tej vrsti namenil posebno pozornost.

Material in metode: Odrasle primerke strigošev, ki so bili uporabljeni v laboratorijskih poskusih, smo z visečimi prestreznimi pastmi vzorčili v Sloveniji. Hlapne snovi, ki jih sproščajo odrasli samci in samice, smo s prezračevanjem osebkov zbirali na filterjih z aktivnim ogljem. Preliminarno analizo in opredelitev kandidatnih spojin smo opravili s plinsko kromatografijo povezano z masno spektrometrijo (GC-MS), kemijsko zgradbo kandidatnih spojin z neznano strukturo pa smo analizirali z jedrsko magnetno resonanco (NMR). Biološko

aktivnost kandidatnih spojin smo določili s plinsko kromatografijo povezano z elektroantenografskim detektorjem (GC-EAD).

Rezultati in razprava: Naši dosednji rezultati kažejo, da samci vsaj dveh vrst strigošev sproščajo biološko aktivne spojine. Pri vseh treh vrstah, ki smo jih proučevali doslej, so vzorci hlapnih vonjav dosledno vsebovali spolno specifične spojine v velikih količinah, kar ustreza uveljavljenemu modelu uporabe agregacijsko-spolnih feromonov pri poddružini Cerambycinae, kamor so uvrščeni tudi strigoši. Aeracijski vzorci *C. cerdo* so vsebovali samo eno spolno specifično spojino, medtem ko so vzorci *Cerambyx scopolii* in *Cerambyx miles* vsebovali več tovrstnih spojin. Identificirali smo spojino iz vzorcev *C. cerdo*, obe spojini iz vzorcev *C. scopolii* in eno spojino iz vzorca *C. miles*. Spojine si delijo ogljikov skelet, razlikujejo pa se po funkcionalnih skupinah. Z analizo GC-EAD smo posneli tudi elektrofiziološke odzive anten *C. cerdo* in *C. scopolii* na identificirane spojine. Spojina iz vzorcev *C. miles*, je bila nedavno prepoznana kot agregacijsko-spolni feromon dveh vrst iz poddružine Cerambycinae, kar kaže, da ta spojina lahko učinkuje kot atraktant. Ugotovljene spojine predstavljajo odlične kandidate za agregacijsko-spolne feromone strigošev. V prihodnosti bomo raziskavo razširili na tri simpatrične vrste strigošev (*Cerambyx carinatus*, *Cerambyx nodulosus* in *Cerambyx welensii*) ter preverili vpliv odkritih feromonov strigošev na vedenje ostalih obravnavanih vrst strigošev. To nam bo ponudilo uvid v prispevek njihovih agregacijsko-spolnih feromonov k reproduktivni izolaciji vrst.

Encime ESBL-producirajoči sevi bakterije *Escherichia coli*, izolirani iz spodnjih dihal človeka

Katja HROVAT^{1*}, Katja SEME², Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

* katja.hrovat@bf.uni-lj.si

Uvod: Po oceni študije Murray in sodelavcev, objavljene leta 2022 v reviji Lancet, naj bi zaradi okužb spodnjega dihalnega trakta z odpornimi bakterijami v letu 2019 umrlo kar 1,5 milijona ljudi po svetu (Murray in sod., 2022). Med glavne patogene bakterije, povezane s smrtnostjo zaradi neučinkovitosti antibiotikov, sodijo tudi sevi bakterije *Escherichia coli*, ki proizvajajo β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL-EC) in so v večini primerov hkrati odporni tudi proti fluorokinolonom. Poleg tega imajo lahko različen nabor genov za dejavnike virulence (VAG) ter sposobnost tvorbe biofilma, posledično pa tudi dodatno selekcijsko prednost in povečano stopnjo patogenosti. V prvem delu raziskav smo se osredotočili na molekularne značilnosti izbranih izolatov, povezanih z odpornostjo bakterij proti protimikrobnim učinkovinam ter z dejavniki virulence, nadalje pa smo preverili še sposobnost tvorbe biofilmov ter primerjali fenotipske in genotipske značilnosti sevov pred (pre-COV) in med (COV) obdobjem pandemije COVID-19. Osrednji cilj naših raziskav je bila karakterizacija izolatov ESBL-EC, izoliranih iz vzorcev spodnjih dihal (LRT) v izbranih slovenskih bolnišnicah v obdobju 2002–2022.

Material in metode: Vseh 549 izbranih izolatov ESBL-EC iz LRT smo identificirali z metodo MALDI-TOF ter z disk-difuzijskimi testi fenotipsko testirali njihovo občutljivost za protimikrobna sredstva. Nadalje smo izolate uvrstili v filogenetske, sekvenčne (ST) in klonalne skupine ter z metodo PCR preverili tudi prisotnost genov za izbrane VAG ter gene za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Osredotočili smo se na detekcijo genov, ki posredujejo odpornost proti β -laktamom in kinolonom ter tudi na gene, ki posredujejo odpornost proti kvarternim amonijevim spojinam (QAC). Sposobnost tvorbe biofilmov ob zmanjšani koncentraciji glukoze smo spremljali z gojenjem izolatov v mikrotitrnih ploščah (angl. Calgary biofilm device), ki smo jih po 24 ali 48-ih urah pobarvali s kristal vijoličnim barvilom ter nato spektrofotometrično ovrednotili. Za analizo vseh rezultatov ter primerjavo sevov, izoliranih iz

obdobja pred-COV (2017-2019) s sevi, izoliranimi v obdobju COV (2020-2020), smo uporabili Pearsonov hi-kvadrat test ter kot statistično značilne razlike upoštevali, kadar je bila *p*-vrednost manjša 0,05.

Rezultati in razprava: Večina izolatov je iz filogenetske skupine B2 in ST131, ki velja za dominantno med patogenimi ESBL-sevi. Sevi, izolirani iz različnih pacientov, ki so bili hospitalizirani na različnih oddelkih, celo v lokacijsko oddaljenih ustanovah ter v različnih časovnih obdobjih, so imeli enak profil ERIC-PCR profil fragmentov, kar kaže na perzistentne bolnišnične seve. Pri 549 izolatih smo zaznali visok delež *bla*_{CTX-M-1} ter nižji delež plazmidnih genov, ki posredujejo odpornost proti kinolonom. Med izolati smo potrdili kromosomske (77–100 %) in plazmidne (0–0,73 %) gene, povezane z odpornostjo proti biocidom ter zmožnost tvorbe biofilmov pri 18,1 % izolatih ESBL-EC v gojišču LB in pri 51,7 % v minimalnem gojišču z 0,02 % glukoze (MGglc). Potrdili smo značilno pozitivno povezavo med močno tvorbo biofilma v MGglc ter ST131 ter nekaterimi dejavniki virulence. Primerjava fenotipov in genotipov izolatov pred-COV in COV je pokazala višjo klonalno raznolikost ter statistične razlike za nekatere dejavnike virulence v obdobju COV. Za slednjega je značilen nižji delež izolatov, odpornih proti trimetoprim-sulfametoksazolu ter fluorokinolonom. Z vsemi rezultati smo bolje opredelili izolate ESBL-EC iz spodnjih dihalnih poti ter prikazali več možnih razlogov za uspešno globalno širjenje ST131, zlasti v kliničnih okoljih.

Viri in literatura:

Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* (London, England), 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Optimization of the bacteria-killing assay to evaluate the immune response in salamanders

Janja LAKA^{1*}, Tjaša DANEVČIČ², Rok KOSTANJŠEK¹, Lilijana BIZJAK MALI¹

¹ Department of Biology, Biotechnical faculty, University of Ljubljana, Slovenia

² Department of Microbiology, Biotechnical faculty, University of Ljubljana, Slovenia

* janja.laka@bf.uni-lj.si

Introduction: *Proteus anguinus*, also known as the olm or proteus, is a cave-dwelling urodele amphibian endemic to the Dinaric karst (Sket, 1997). It is classified a vulnerable species (IUCN, 2022), underscoring the importance of comprehending various aspects of its biology, particularly its immune response, is important. Therefore, we want to develop methods that could help us understand it and observe and compare how different factors affect the animal's immunity and overall health. Amphibians share similarities with mammals in their immune system functioning, albeit with certain differences. Notably, their immune response seems to rely significantly on innate mechanisms, particularly macrophages and the complement system, while their adaptive immunity is less pronounced, especially in urodelans (Ruiz & Robert, 2023). In this study, we detail the optimisation of bacteria-killing assay - a common method used to assess the immune response of animal blood or plasma to different bacteria - in *Pleurodeles waltl*, the Iberian ribbed new. This species serves as our model organism before proceeding with the tests involving *Proteus anguinus*.

Materials and Methods: Our protocol and experimental setup were based on Hopkins et al. 2016 and Brown & Shine, 2014. In the bacteria-killing assay (BKA), the blood or plasma of an animal is incubated with bacteria. By comparing the number of bacteria at the beginning and at the end of the incubation or the number between the controls and the treated samples after incubation, we can determine what proportion of bacteria was killed with this treatment (BKA index). About 50-150 µl of blood was collected from several animals and mixed together. Different dilutions of this mixed whole blood (1:5, 1:10, 1:20) and different dilutions of *E. coli* MG1655 (10⁶, 10⁵, 10⁴) were prepared and combined in a 96-well-plate at ratio of 3:1 (diluted blood:diluted bacteria). We searched for the combination of blood dilution and bacteria dilution closest to BKA = 0.5 (50 % of bacteria are killed by the treatment). The incubation time was 30 minutes or 1 hour, and we used two different measurement methods:

1. Spectrophotometry: after incubation, we added TSB (growth medium) and incubated the plate for 24 hours at 37 °C in the microplate reader, while measuring OD600 every 30 minutes. The BKA is measured as $BKA = (A_{\text{control}} - A_{\text{treated}}) / A_{\text{control}}$

2. Plating: Before and after incubation we plated 100 µl of all samples and controls at different dilutions on LB-agar plates, incubated the plates at 37 °C for 24 hours and counted the outgrown colonies. The BKA is measured as $BKA = (N_{\text{before incubation}} - N_{\text{after incubation}}) / N_{\text{before incubation}}$, and when accounting for controls as $BKA = -(N_{\text{after incubation}} - N_{\text{before incubation}}) / N_{\text{before incubation}} - (N_{\text{control after incubation}} - N_{\text{control before incubation}}) / N_{\text{control before incubation}}$

Results and Conclusions: The spectrophotometric method provided a lot of data, but we concluded that it is difficult to determine BKA from it, because at the point where OD600 becomes detectable (the beginning of the exponential growth phase), the bacteria in the controls and the treated samples are at different growth stages, and therefore would not give us accurate results. With the plating method we obtained more precise results, but the blood of the animals often killed almost all bacteria at the end of incubation. This effect was observed with both the plating and in spectrophotometric methods. In the case of plating, only a few or no colonies were formed in treated samples, while the exponential phase of bacterial growth measured by the spectrophotometric method was strongly delayed or absent. The samples of a blood dilution of 1:20 and dilution of 10⁶ bacteria incubated for 30 minutes gave a BKA of 0.4835 (48,35 %) and of 0.6515 (65,15 %) when accounting for controls for the plating out method. The dilutions of samples for plating are 10⁻³ for controls and treated samples before incubation and undiluted, 10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³ for treated samples after incubation. In the future, we intend to optimize this BKA assay for *Proteus anguinus* as well. We then want to compare how certain environmental factors – in particular changes in the temperatures to which the animals are exposed – affect the immune response.

References:

- Brown, G. P., & Shine, R. (2014). Immune response varies with rate of dispersal in invasive cane toads (*Rhinella marina*). PLoS One, 9(6), e99734.
- Hopkins, W. A., Fallon, J. A., Beck, M. L., Coe, B. H., & Jachowski, C. M. (2016). Haematological and immunological characteristics of eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*) infected and co-infected with endo-and ectoparasites. Conservation Physiology, 4(1), cow002.
- IUCN (2022): SSC Amphibian Specialist Group 2022. *Proteus anguinus*. The IUCN Red List

of Threatened Species 2022: e.T18377A89698593.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-2.RLTS.T18377A89698593.en>. Accessed
on 19 September 2023.

Ruiz, V. L., & Robert, J. (2023). The amphibian immune system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 378(1882), 20220123.

Sket, B. (1997). Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: Proteidae) and its possible explanation. *Journal of biogeography*, 24(3), 263-280.

BIOTEHNOLOGIJA

Analiza izražanja mikro RNA ter imunoprecipitacija proteina AGO1 pri vinski trti (*Vitis vinifera*) ob okužbi z virusi

Katja JAMNIK^{1*}, Sabina BERNE¹, Jernej JAKŠE¹, Nataša ŠTAJNER¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

* katja.jamnik@bf.uni-lj.si

Uvod: Vinska trta (*Vitis vinifera* L.) je ena izmed najbolj razširjenih kulturnih rastlin. Vinsko trto ogrožajo številni povzročitelji bolezni, med katerimi so tudi virusi. Do sedaj je bilo odkritih več kot 85 virusov, ki okužujejo vinsko trto. Nekateri virusi povzročajo hujše bolezenske znake in tako vplivajo na zmanjšanje količine in kakovosti pridelka. Okužbe z virusi lahko vplivajo na spremenjeno izražanje malih molekul RNA v rastlini. Male molekule RNA delimo v dve glavni skupini; mikro RNA (miRNA) ter male interferenčne RNA (siRNA). siRNA ter miRNA lahko vodijo do utišanja tarčnih genov preko mehanizma RNA interference. Ob okužbi z virusi lahko v rastlini nastajajo tudi male RNA, ki izhajajo iz virusov (vsiRNA). vsiRNA nato delujejo na podoben način kot endogene male RNA. Vgradijo se v proteine AGO, tvorijo kompleks RISC, vsiRNA pa vodijo kompleks RISC na komplementarno mesto v genomu virusa, v nekaterih primerih pa tudi v genomu gostitelja. V raziskavi smo analizirali, kako okužbe z virusi vplivajo na izražanje miRNA v vinski trti kultivarjev Refošk in Zeleni sauvignon. Z izolacijo malih molekul RNA iz imunoprecipitiranih proteinov AGO1 pa želimo ugotoviti, katere male RNA, ki izhajajo iz vinske trte ter tudi iz virusov, so v rastlini aktivne.

Material in metode: Vzorčili smo mlade liste brezvirusnih ter z virusi okuženih rastlin vinske trte kultivarjev Refošk in Zeleni sauvignon. Za analizo izražanja miRNA smo izolirali male RNA ter pripravili knjižnico za sekvenciranje. Sekvenciranje smo izvedli s sistemom Ion Proton™ (Ion Torrent™; Life Technologies). Z orodjem VirusDetect smo preverili, kateri virusi so prisotni v vzorcih glede na podatke sekvenciranja. Izražanje miRNA smo analizirali z orodjema miRador in miRDeep2. Z uporabo programa R in programskega paketa DESeq2 smo analizirali, katere miRNA so diferencialno izražane med okuženimi ter brezvirusnimi vzorci posameznega kultivarja. Za diferencialno izražane miRNA smo napovedali potencialne tarče v genomu vinske trte. Pri tem smo uporabili orodje psRNA Target. Da bi preučili, katere male RNA so prisotne v proteinu AGO1, smo iz mladih listov vinske trte kultivarja Refošk izolirali

proteine. Vzorec smo prefiltrirali, da smo odstranili ostanke celic, ter nato k filtratu dodali protitelesa za vezavo proteinov AGO1 ter agarozne kroglice z vezanim proteinom A, ki veže protitelesa. Po inkubaciji in centrifugiranju smo odstranili supernatant ter pelet resuspendirali ter iz proteina AGO1 izolirali vezane male molekule RNA. Izolirano RNA smo očistili ter izvedli reakcijo RT-PCR, pri čemer smo uporabili začetne oligonukleotide za pomnoževanje vvi-miRNA 159. Sledilo bo sekvenciranje malih molekul RNA.

Rezultati in razprava: S sekvenciranjem malih molekul RNA smo pridobili med 6.344.090 in 25.041.733 odčitkov. Z orodjem VirusDetect smo potrdili, da v brezvirusnih vzorcih virusi niso prisotni, v okuženih pa smo potrdili prisotnost pričakovanih virusov GPGV, GRSPaV ter GRVfV. Pri Refošku smo glede na orodje miRador zaznali 12 diferenčno izraženih miRNA, glede na orodje miRDeep2 pa je bilo diferenčno izraženih 21 miRNA. Glede na podatke orodja miRador je bilo pri Zelenem sauvignonu diferenčno izraženih 6 miRNA, z orodjem miRDeep2 pa smo zaznali 32 diferenčno izraženih miRNA. Z uporabo orodja psRNA Target smo za vse diferenčno izražene miRNA napovedali tarče v genomu vinske trte. Pridobili smo 111 potencialnih tarč pri kultivarju Refošk in 79 potencialnih tarč pri kultivarju Zeleni sauvignon. Izražanje miRNA ter njihovih tarč bomo v nadaljevanju potrjevali z metodo qPCR. Iz mladih listov smo z imunoprecipitacijo uspešno izolirali proteine AGO1 ter iz njih izolirali male RNA. Uspešnosti izolacije malih RNA smo potrdili s pomnoževanjem vvi-miR159. Uspešno smo jo zaznali tako v brezvirusnem kot tudi v okuženem vzorcu Refoška. Sledilo bo sekvenciranje malih molekul RNA, ki smo jih izolirali iz proteina AGO1. Predvidevamo, da bomo zaznali tako male RNA, ki izhajajo iz vinske trte, kot tudi male RNA, ki izhajajo iz genomov virusov.

Characterization and Analysis of 2D and 3D Models of High-Grade Serous Ovarian Cancer

Vesna KOKONDOSKA GRGIČ^{1,2*}, Katja KOLOŠA³, Maša SINREIH⁴, Tea LANIŠEK RIŽNER¹, Ivana JOVČEVSKA¹

¹ Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Kemomed, Research & Development, Slovenia

³ National Institute of Biology, Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, Ljubljana, Slovenia

⁴ Sandoz, Slovenia

* v.kokondoska@kemomed.si

Introduction: High-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is an extremely deadly form of gynecologic cancer. Traditional studies on HGSOC primarily utilize two-dimensional (2D) cell lines, which only partially replicate the spatial properties of tumors. 3D spheroid models, on the other hand, more accurately mimic the spatial arrangement of tumors, making them a superior model for investigating biochemical changes associated with the disruption of cellular polarity and the development of migratory and invasive characteristics known as epithelial-mesenchymal transition (EMT). Although 2D cell cultures have been widely used to study the molecular processes involved in cancer growth because of their simplicity and cost-effectiveness, they do not fully replicate the complex tumor microenvironments found in living organisms. Therefore, the main aim of the study is to compare the morphological and molecular characteristics of 2D and 3D cellular models.

Materials and Methods: We established and molecularly characterized 2D and 3D models of HGSOC using four cell lines: Kuramochi, COV362, OVCAR-4, and OVSAHO. For the preparation of 3D models, we employed two methods: forced cell levitation in ultra-low attachment (ULA) plates and 3D bioprinting (BIOX, Cellink). The cells were cultured at 37 °C and 5 % CO₂ in the same medium, which was changed every 2-3 days. For characterization, we analyzed morphological features, proliferation, and cytotoxic response following treatment with various drugs (carboplatin and olaparib). Molecular characterization was performed using the qRT-PCR method, including analysis of specific markers for HGSOC cell lines and

mutations. Moreover, we assessed the expression of 22 genes associated with EMT, extracellular matrix proteases, angiogenesis-related factors, mutation and proliferation markers. We established a protocol for spheroid dissociation into single-cell suspensions and additionally examined the proliferation rate using flow cytometry. Qualitative characterization was conducted using immunostaining with antibodies (IHC and ICC) to label tissue sections and *in vitro* cells, respectively.

Results and Conclusions: Generated 3D spheroid models exhibited consistent morphological features, with diameters ranging from 400 μm (Kuramochi) to 1400 μm (OVCAR-4), and roundness values exceeding 0.85 for all cell lines. EMT markers *VIM* and *SLUG* are highly expressed in spheroids, indicating a more invasive phenotype. Increased *WNT11B* expression in spheroids suggested reduced attachment to the ECM. Spheroids also displayed decreased *BRCA1* expression, further supporting their resemblance to *in vivo* tumors. Expression analysis of the proliferation marker Ki67 indicated that cells in 3D cultures are more proliferative than cells in 2D cultures (35.5 % *versus* 14.5 %, respectively). These results suggest a higher proliferative activity in 3D environment compared to traditional 2D cultures, indicating the potential impact of the 3D model on cell proliferation dynamics. Our findings underscore the greater suitability of HGSOc spheroids compared to 2D cell lines. We are currently conducting functional studies to explore differences in cell proliferation, invasiveness, and response to chemotherapy agents between 3D bioprinted and 2D models. Moreover, we are performing drug sensitivity screen for determination of IC_{50} of various chemotherapeutic agents such as olaparib, carboplatin, paclitaxel in 2D and 3D models.

Vsebnost fagopirinov v semenih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Monch)

Katja MLINARIČ^{1*}, Zlata LUTHAR¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

* katjamlinaric@hotmail.com

Uvod: Navadna ajda je nepravo žito in ena od dveh vrst znotraj rodu *Fagopyrum*, ki se uporablja v prehrani ljudi, predvsem kot kaša, zdrob in izdelki iz moke. Zaradi nezahtevnosti je njeno pridelovalno območje razširjeno po vseh celinah tudi v visokogorskih predelih do 3.000 m nadmorske višine, kjer druga žita ne uspevajo. Odlikujejo jo kakovostna aminokislinska sestava in produkti sekundarnega metabolizma. Večina med njimi ima bioaktivne učinke in blagodejno vplivajo na človeški metabolizem. Nekateri pa lahko sprožijo pri občutljivih ljudeh nezaželene reakcije. Eni od teh so fagopirini iz skupine flavonoidov, katerih strukturna formula je zelo podobna hipericinu. V preteklosti so bili predmet proučevanja v zelenih delih in socvetjih, kjer je bilo določenih 6 oblik fagopirinov, medtem ko v semenih samo en vir navaja manjše koncentracije. Za fagopirine je značilno, da imajo majhno gostoto in se težko ekstrahirajo, kar še dodatno otežuje nizke koncentracije v semenih. Za njihovo določitev se uporabljajo različne metode, kot so NMR, UV-Vis absorbcija, HPLC in masna spektroskopija. Svetloba je zelo pomembna za pretvorbo protofagopirinov v fagopirine, katerih fototoksični učinki se kažejo, kot draženje kože, edemi in serozni eksudati. Vsebnost in oblike fagopirinov v semenih navadne ajde smo proučevali pri 4 sortah, treh slovenskih in eni avstrijski.

Material in metode: Po 10 g semen sort: 'Darja', 'Čebelica', 'Črna gorenjska' in 'Bamby' smo ločeno zmleli z laboratorijskim mlinom (Kika® WerkeM20, Germany). Natehtali smo 1 g zmletih semen in jih prelili z 10 ml kombinacije topila aceton/voda (9/1) (HPLC gradient, Sigma-Aldrich) in temeljito mešali 1 min. Suspenzije smo inkubirali 20 ur pri 37 °C. Vzorce smo 1 min mešali in nato centrifugirali pri 1000 rpm, 5 min in 25 °C. Del čistega supernatanta smo odpipetirali v plastične epruvete (TPP, Trasadingen, Switzerland) in filtrirali skozi membranski filter (Millex-GN filters; pore size = 0,2 µm, Millipore). Nato smo 1 ml filtriranega ekstrakta odpipetirali v stekleno vialo in izpostavili 1 uro dnevni svetlobi, da so se protofagopirini pretvorili v fagopirine in nato opravili analizo v štirih ponovitvah s HPLC

analizatorjem (Shimadzu Prominence). Na kromatogramu v območju fagopirinov smo zasledili osem vrhov. Celotna vsebnost fagopirinov je bila določena glede na vsebnost hipericina, ker so njegove spektralne značilnosti in struktura podobne fagopirinom, katerega standardna referenčna spojina ni na voljo. Statistična analiza je bila opravljena z R programom. Značilne razlike v vsebnosti fagopirinov v semenih smo izvedli s Fisherjevim testom in enosmerno analizo variance (ANOVA) ter Duncan-ovim testom večkratnih primerjav ($p \leq 0,05$).

Rezultati in razprava: Analiza skupnih fagopirinov v semenih je pokazala statistično značilne razlike v vsebnosti pri proučevanih sortah ($p \leq 0,05$). V povprečju je največ skupnih fagopirinov naložila avstrijska sorta 'Bamby' ($10,74 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen) in najmanj $8,17 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen sorta 'Črna gorenjska', Medtem ko med sortama 'Darja' $9,52 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen in 'Čebelica' $8,92 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. ni bilo statistično značilnih razlik. V semenih smo določili 8 oblik fagopirinov z delovnimi oznakami: A1, A2, E, F, X1, X2, X3 in X4. Pri vseh štirih sortah je bilo v povprečju največ $5,30 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen fagopirina F in najmanj $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. fagopirina A1. Do sedaj se je, v dostopni literaturi pri navadni ajdi v listih in socvetjih in en samo vir v semenih poročalo o 6 oblikah fagopirinov z oznakami od A do F. Zanimiva je oblika, ki do sedaj ni bila omenjena z delovno oznako X4, katere povprečna vsebnost je $1,64 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. semen, kar je veliko več kot pri ostalih oblikah: X3 ($0,55 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s.), X2 ($0,36 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s.), X1 in A2 ($0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s.). Značilne razlike v vsebnosti fagopirinov med sortami nakazujejo na lastnost, ki je povezana z genotipom.

Ohranjanje prostoživečih populacij križancev - primer jezerskega ekotipa potočne postrvi (*Salmo trutta*)

Gašper RENKO^{1*}, Aleš SNOJ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Ljubljana, Slovenija

* gasper.renko@bf.uni-lj.si

Uvod: Brezobzirni antropocentrizem je vzrok nepopravljivih okoljskih sprememb in obsežnih nepremišljenih prenosov organizmov. Takšne spremembe vodijo do križanja sorodnih vrst in populacij, ki so bile naravno medsebojno ločene. Problem je še posebej viden pri salmonidnih vrstah rib, katere so, zaradi potreb poribljavanja, kot protiukrepa intenzivnemu ribolovu, množično prenašane. Lokalnim populacijam zato grozi izumrtje, saj se križajo z domesticiranim osebki, ki so vneseni. V primeru, če poleg križanih populacij še obstajajo originalne neintrogresirane, se varstvo in zaščita posvečata predvsem slednjim, medtem ko običajno ni težnje po varovanju križancev. Situacija se spremeni, kadar so križane populacije edini preostanek avtohtonih lokalnih genomov - takrat je njihova zaščita večinoma upravičena (Allendorf et al., 2001). V Bohinjskem in Blejskem jezeru živi jezerski ekotip vrste *Salmo trutta* (potočna postrv). V Sloveniji jo zastopa naravno prisotna donavska evolucijska linija. Obstajajo nasprotujoča si mnenja o izvoru jezerskega ekotipa v obeh jezerih, prav tako ni raziskano, ali jezeri naseljuje ista entiteta ali ne. Dejavnosti v smeri zaščite obeh populacij so že v teku, vendar je za pravilno ovrednotenje varstvenega statusa najprej potrebno raziskati njuno genetsko strukturo in tako ugotoviti njun izvor ter preveriti morebitno prisotnost introgresije z genomi vnesenih osebkov.

Material in metode: Uporabili smo 11 mikrosatelitnih markerjev in zaporedje kontrolne regije mitohondrijske DNA, da bi raziskali genetsko strukturo jezerske postrvi v omenjenih jezerih (Bernatchez et al., 1992; Lerceteau-Köhler & Weiss, 2006). Analizirali smo 365 vzorcev iz 14 različnih populacij, ki bi lahko bile povezane z jezersko postrvjo v Blejskem in Bohinjskem jezeru. Za obdelavo podatkov in pridobivanje osnovnih populacijskih parametrov smo uporabili analize v programih STRUCTURE in DAPC.

Rezultati in razprava: V obeh jezerih smo zaznali vpliv tujerodne atlantske linije. Kljub temu v Bohinjskem jezeru prevladuje domorodna donavska linija, ki po naših najnovejših spoznanjih, predstavlja genetsko najbolj ohranjeno populacijo donavske jezerske postrvi v

njenem arealu. Nasprotno pa blejska populacija kaže značilnosti roja križancev (*hybrid swarm*), katerega izvor smo uspeli povezati z dansko ribogojnico. Detekcija križancev z genskimi markerji, ki niso načrtno izdelani za te potrebe, je izredno kočljiva in zahteva obsežno preliminarno vedenje o zgodovini raziskovane populacije. Predvsem se težave pojavljajo pri populacijah križancev ali rojih križancev, ki so v preteklosti doživeli različne demografske spremembe. Najpogosteje uporabljen program STRUCTURE, lahko roj križancev lažno prepozna kot samostojno evlucijsko enoto, zato je rezultate nujno potrebno preveriti še z drugo metodo (npr., DAPC), ki temelji na drugih algoritmihi. Menimo, da je pravilna karakterizacija hibridnih populacij prvi in osnovni korak k izdelavi ustreznih zaščitnih strategij in ohranitvi njihove vloge v ekosistemu. S to raziskavo apeliramo na prekinitev poribljavanja Bohinjskega jezera in predlagamo ustrezno strategijo za zaščito ene izmed zadnjih populacij donavske jezerske postrvi. Obenem odpiramo vprašanje, ali je zaščita hibridne populacije v Blejskem jezeru ustrezna in kako naj se z njo gospodari v prihodnosti.

Viri in literatura:

- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., & Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11), 613–622. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- Bernatchez, L., Guyomard, R., & Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1(3), 161–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00172.x>
- Lerceteau-Köhler, E., & Weiss, S. (2006). Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. *Aquaculture*, 258(1–4), 641–645. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.04.028>

EKONOMIKA NARAVNIH VIROV

Metoda za ocenjevanje trajnosti agroživilske verige

Tanja DERGAN^{1,2*}, Marko DEBELJAK²

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

² Institut Jožef Stefan, Odsek za tehnologije znanja, Ljubljana, Slovenija

* tanja.dergan@ijs.si

Uvod: V sodobnem svetu, ki ga zaznamujejo prepletanje globalnega gospodarstva, družbene odgovornosti in okoljskega ravnotežja, se pogosto soočamo z izzivi, ki zahtevajo celovit in multidisciplinaren pristop. Koncept trajnosti in trajnostnega razvoja se je uveljavil kot ključni kriterij pri načrtovanju prihodnosti na vseh področjih in ravneh družbenega delovanja. Z naraščajočim priznanjem pomena trajnostnih praks za izboljšanje kakovosti življenja je postalo očitno, da mora biti strategija trajnostnega razvoja utemeljena na sodelovanju vseh skupin deležnikov. Posebno pereče trajnostne izzive predstavlja agroživilska veriga, ki kot osnovni steber človekovega obstoja združuje pridelavo, predelavo, distribucijo in potrošnjo hrane. Ob tem moramo upoštevati dinamično naravo okoljskih, socialnih in ekonomskih procesov, ki vplivajo na vsak člen verige. V kontekstu naraščajočega globalnega prebivalstva in zahtev po varni in zdravi hrani postaja trajnostno upravljanje z naravnimi viri ključni izziv za nadaljnji gospodarski in družbeni razvoj. Pomanjkanje učinkovitih metod za celovito oceno trajnosti agroživilskih verig, ki se pogosto osredotočajo le na ekonomske izkoristke in okoljske vplive, zanemarjajo pa socialne razsežnosti in dolgoročne vplive na ekosisteme, nas je spodbudilo k razvoju bolj celovitih metod za ocenjevanje trajnosti, ki upoštevajo ekonomsko, okoljsko in socialno dimenzijo agroživilskih verig ter omogočajo boljše razumevanje njihovih medsebojnih vplivov.

Material in metode: Kot študijski primer smo uporabili agroživilsko verigo iz Prekmurja (Zelena točka), ki zajema pet členov: pridelovalce, predelovalce, distributerje, trgovce in potrošnike. Za vsak člen agroživilske verige smo s pomočjo metodologije DEX (Decision EXpert) strukturirali modele trajnosti. Ti modeli temeljijo na indikatorjih iz Smernic za oceno trajnosti sistemov za prehrano in kmetijstvo (SAFA- Sustainability Assessment of Food and Agriculture systems), ki smo jih kritično preverili in po potrebi dopolnili z novimi, da bi

vzpostavili izboljššan nabor indikatorjev za oceno trajnosti celotne verige. Modele za oceno trajnosti smo zgradili s pomočjo programskega orodja DEXi. Uporabljena metodologija je omogočila primerjavo vzorcev povezav elementov modelov posameznih členov verige, odzive modelov na zunanje dejavnike in odkrivanje dejavnikov, ki najmočneje vplivajo na spreminjanje stanja trajnosti posameznih členov in agroživilske verige kot celote. Odzivnost posameznih vzorcev smo ugotavljali z metodo občutljivosti, oziroma s »kaj-če« analizo. Ta nam je razkrila učinke spreminjanja ene ali več vrednosti vhodnih atributov na rezultate modelov. Rezultate modelov posameznih členov smo integrirali s pomočjo meta modeliranja, ki zagotavlja ohranjanje vstopnih informacij ter njihovo sintezo na višji nivo, s čemer smo omogočili celostno oceno trajnosti agroživilske verige.

Rezultati in razprava: Raziskava je pokazala učinkovitost razvite metode za ocenjevanje trajnosti v agroživilski verigi. Z uporabo prilagojenih trajnostnih indikatorjev in metodologijo DEX smo lahko natančneje ocenili vplive na trajnost posameznih členov in celotne verige. Analiza "kaj-če" je bila ključna pri identifikaciji, kako posamezne spremembe lahko vplivajo na trajnostne rezultate, kar omogoča natančno izboljšanje trajnostnih praks. V študiji 'Zelena Točka' smo ugotovili, da je agroživilska veriga ocenjena kot srednje trajnostna, s poudarkom na izzivih v okoljskem stebru, zlasti v členih predelave, trženja in potrošnje. Glavni vzroki za to oceno so visoka poraba vode in energije, ki izhaja iz neoptimiziranih procesov in pomanjkanja trajnostnih praks, ter težave pri upravljanju odpadkov, ki izhajajo iz neustrezne reciklacije embalaže, ostankov hrane in drugih materialov. Ti izzivi nudijo priložnost za oblikovanje ciljanih politik in strategij, ki bi izboljšale trajnostne prakse v agroživilski verigi. Te strategije lahko temeljijo na trdni podlagi, ki smo jo vzpostavili z našo študijo, in so usklajene s trajnostnimi cilji, kot jih določa Strateški načrt Skupne kmetijske politike (SKP) Slovenije. Rezultati naše študije lahko ponudijo podporo odločevalcem na lokalni, nacionalni in mednarodni ravni in spodbujajo učinkovitejše upravljanje naravnih virov.

Oblikovanje orodja za ocenjevanje uspešnosti kolektivnih kmetijsko-okoljskih shem, ki temelji na večkriterijskem modelu odločanja in oblikovanju SWOT protokola za pomoč odločanju v kmetijski politiki

Janja RUDOLF^{1*}, Andrej UDOVČ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

* janja.rudolf@bf.uni-lj.si

Uvod: Evropska unija (EU) in znanstveni krogi so skupnega mnenja, da je za t.i. zeleni prehod EU in njenih državljanov, zelo pomembno povečevanje kolektivnega povezovanja in kolektivnih interesov po čistejšem, zdravem in trajnostnem okolju. Ena izmed oblik kolektivnega povezovanja, ki stremi neposredno h doseganju tega cilja, je kolektivno povezovanje in sodelovanje pridelovalcev hrane in lastnikov zemljišč, sploh na področju izvajanja kmetijsko-okoljskih in podnebnih (KOP ukrepov. EU pravni okvir predvideva ustanovitev t.i. kolektivne kmetijsko-okoljske (KO) sheme, katere pravila in postopki institucionalizacije so v domeni posamezne države. Pričujoča raziskovalna naloga se sprašuje ali lahko določimo področja okoljskih, ekonomskih, sodelovalnih in pravnih dejavnikov, ki imajo pomemben vpliv na uspešnost zagotavljanja KO javnih dobrin s pomočjo kolektivnega izvajanja (KOP) ukrepov in ali lahko ocenimo njihovo uspešnost. Študijski primeri takih povezovanj so bili izbrani glede na obliko kolektivnega povezovanja, pridelovalne usmeritve in s tem povezanih KOP ukrepov in sposobnosti predstavljati preko uspešnosti delovanja tudi pravno-zakonodajni okvir svoje države, ki omogoča take oblike povezovanja. Iskali smo pestrost v teh treh kriterijih in izbrali primere, s katerimi lahko pokrijemo čim več deležniških skupin, vrst pridelovalnih sistemov in pravnih okvirjev. Izbrali smo osem primerov iz šestih držav: Nemčija, Francija, Nizozemska, Velika Britanija, Danska in Belgija.

Material in metode: Ker iščemo in proučujemo več kriterijev naenkrat, ki bi lahko vplivali na uspešnost zadanega cilja, smo poiskali metodo večkriterijske analize, ki omogoča izgraditev večkriterijskega modela odločanja. Za vnosne podatke v model imamo na voljo le opisne podatke iz SWOT analiz študijskih primerov, saj kvantitativnih in primerljivih podatkov ali kazalnikov, na kolektivni ravni, ni bilo mogoče dobiti ali izmeriti. Za vnos kvalitativnih podatkov v večkriterijski model odločanja smo morali izdelat pretvornik in točkovačnik SWOT

analiz, ki je kvalitativne rezultate kodiral in spremenil v številčni skupen jezik (Rudolf in Udovč, 2022). S tem smo omogočili primerjavo med primeri in sočasen vnos rezultatov večih SWOT analiz v model. Z inovativnim postopkom določanja vplivnih področij smo z uporabo SWOT analiz, strokovne in znanstvene literature oblikovali hierarhično drevo kriterijev. S pomočjo DELFI metode smo ločili pomembne kriterije od malo pomembnih. S pomočjo analitičnega hierarhičnega procesa smo pomembne kriterije po področjih utežili na podlagi postopkov individualnega uteževanja. Končna utež področja in kriterija je aritmetična sredina individualnih ocen. V DEXi programu smo oblikovali večkriterijski model, ki je imel hierarhično ogrodje iz uteženih vplivnih kriterijev po področjih. V model smo vnesli primere in njihove podatke v obliki kodiranega številskega jezika. V Excelu smo oblikovali interaktivni obrazec, ki omogoča hkraten vnos novih podatkov v SWOT analizo in simultano pretvarjanje v kodiran jezik. Nato smo oblikovali protokol pridobivanja informacij iz SWOT analiz, s čimer smo povečali objektivnost rezultatov modela in povečali njegovo občutljivost.

Rezultati in razprava: Naši rezultati so: (i) oblikovanje hierarhičnega drevesa pomembnih kriterijev po področjih in določanje njihovih uteži, (ii) oblikovanje pretvornika in točkovalnika SWOT analiz, ki omogoča kodiranje v primerljiv številski jezik (po korakih, shematsko in matematično), (iii) oblikovanje štiristopenjskega SWOT protokola, ki zaradi standardiziranega pridobivanja informacij po področjih omogoča objektivnejše in primerljivejše nove vnose v SWOT analize in nove SWOT analize in omogoča simultano pretvorbo v kodiran številski jezik ter (iv) oblikovanje orodja, ki omogoča ocenjevanje primerov po posameznih področjih, primerjavo med študijskimi primeri glede na vsa področja skupaj (oblikovanje neke skupne ocene uspešnosti primera) in spremljanje napredka posameznega primera oziroma razvoja primera skozi čas. Izkazalo se je, da je interpretacija ocene uspešnosti, ki jo poda model, za odločevalce lahko nejasna, saj ne razumejo kako lahko neposredno uporabijo to informacijo glede na vnosne podatke. Zato smo začeli oblikovati SWOT protokol, ki bi standardiziral prejem informacij preko SWOT analiz, da bi bila interpretacija ocene za odločevalce razumljivejša, SWOT analize primerljivejše in rezultati modela objektivnejši.

Viri in literatura:

Rudolf, J. in Udovč A. (2022). Introducing the SWOT Scorecard Technique to Analyse Diversified AE Collective Schemes with a DEX Model, Sustainability, 14(2), 785. <https://doi.org/10.3390/su14020785>

HORTIKULTURA

Fenolni odziv breskev, tretiranih s salicilno kislino na okužbo z glivo *Monilinia laxa*

Saša GAČNIK^{1*}, Alenka MUNDA², Maja MIKULIČ-PETKOVŠEK¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

² Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija

* sasa.gacnik@bf.uni-lj.si

Uvod: Glive iz rodu *Monilinia* sp. spadajo med najpogostejše povzročiteljice skladiščnih bolezni breskev, ki lahko v vlažnih in vročih rastnih dobah povzročijo več kot 80 % izgube pridelka. Trenutno se za nadzor bolezni pridelovalci poslužujejo preventivnih ukrepov, kot so odstranjevanje poškodovanih ali okuženih poganjkov in plodov, ki so glavni vir okužb, če ostanejo posušeni na drevesu. Poleg tega se uporablja še kemično varstvo s kontaktnimi fungicidi, ki so čedalje manj zaželeni v pridelavi hrane s strani postrošnikov, zaradi njihovega negativnega vpliva na zdravje ljudi in okolje. Temu pa sledi tudi strategija Evropske unije imenovana od “Vil do vilic”, ki narekuje zmanjšanje porabe fitofarmacevtskih sredstev do leta 2030 za 50 %. Prav zaradi tega je iskanje alternativnih, okolju prijaznejših pristopov za varovanje rastlin nujno. Ena izmed možnih zamenjav bi bila lahko uporaba salicilne kisline (SA) in njenih derivatov, ki so v preteklih poskusih že izkazali antifungicidno delovanje proti glivam iz rodu *Monilinia* sp. Ker pa je odziv rastlin na biokemijskem nivoju na okužbo in tretiranje z derivati salicilne kisline manj znan, smo v tej študiji to želeli proučiti.

Material in metode: Poskus je bil zasnovan na breskvah sorte ‘Maria Marta’ (n=6). Ukrepi za varstvo breskev so sledili navodilom integrane pridelave (IP), z izjemo varstva proti glivam *Monilinia* sp., kjer smo rastline razdelili v tri skupine glede na tretma (IP-kontrola – dvakrat tretma s sredstvom Switch 62.5, tri dni pred obiranjem tretma z destilirano vodo; IP-SA1, enako kot IP-kontrola, le da se je vodo nadomestilo z 2,5 mM raztopino SA; IP-SA3 trije tretmaji z 2,5 mM raztopino SA). Ob obiranju smo odbrali po 120 plodov na tretma in vse razkužili z NaClO. Polovico breskev smo pomočili v 1,5 mM SA za 10 min, ostale plodove v bidestilirano vodo. Vse plodove smo ranili z vbodom in na rano nanесли 20 µl bidestilirane vode ali pa 20 µl suspenzije trosov glive *M. laxa* (5x10⁵ trosov/ml). Breskve smo en teden hranili pri temperaturi

20 °C in 100% relativni zračni vlagi. Z meritvami premera nekroz, smo ocenili hitrost rasti lezij (LGR; mm/dan) ter sporulacijo. Zadnji dan smo odvzeli tkivo za vzorčenje odziva rastlin, kjer smo vzeli zdravo tkivo iz zdravih plodov, zdravo tkivo okuženih plodov (10-20 mm pas ob leziji) in robni pas (2 mm) ob leziji. Fenolni odziv plodov smo analizirali s pomočjo HPLC-MS kromatografije.

Rezultati in razprava: Različne sheme škropljenja pred obranjem v kombinaciji z 2,5 mM SA na splošno niso bile uspešnejše pri zatiranju glive *M. laxa* kot standardna integrirana praksa. Po drugi strani pa je preventivno namakanje plodov po obiranju v 1,5 mM raztopino SA pomembno vplivalo na intenzivnost okužbe, saj se je gliva širila 1,8-3,9 mm/dan počasneje. Plodovi breskev, tretirani po obiranju s SA, so imeli tudi znatno nižji delež plodov s sporulacijo (7,8 %) kot plodovi, ki niso bili namočeni v SA (68,9 %). Tretiranje s SA pred in po obiranju je vplivalo na vsebnosti fenolov in njihov delež v različnih tkivih okuženega sadja. Delež hidroksicimetnih kislin in antocianov je bil večji v zdravem tkivu okuženega ploda, delež flavanolov pa v mejnem tkivu okuženega ploda. Ugotovljeno je bilo tudi, da je bil fenolni odziv na okužbo in tretiranje s SA največji v zdravem tkivu, in sicer s povečano vsebnostjo neoklorogenske kisline, cianidin-3-glukozida in cianidin-3-rutinozida. Vsebnost neoklorogenske kisline je bila v zdravem tkivu okuženih plodov, ki so bili potopljani v SA od 5-krat (IP-kontrola) do 7.5-krat (IP-SA3), večja kot v robnem tkivu.

Fenolni odziv plodov oljke (*Olea europaea* L.) po napadu marmorirane smrdljivke (*Halyomorpha halys* Stål)

Tea IVANČIČ^{1*}, Mariana Cecilia GROHAR¹, Jerneja JAKOPIČ¹, Robert VEBERIČ¹, Metka HUDINA¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

* Tea.Ivancic@bf.uni-lj.si

Uvod: Ena glavnih težav pridelovalcev oljk so poškodbe plodov zaradi napada boleznih in škodljivcev. Med temi je tudi marmorirana smrdljivka (*Halyomorpha halys* Stål.), ki je uvrščena na seznam invazivnih vrst (Rice idr., 2014). Marmorirana smrdljivka je polifagna žuželka, ki se prehranjuje z rastlinskimi sokovi (Damos in sod., 2020), pri čemer lahko povzroči morfološke deformacije, nekroze ali spremenjeno rast tkiv. Ob vbodu lahko prihaja do sekundarnih okužb ter onesnaženja plodov z neprijetnim vonjem (Wiman idr., 2015), kar vpliva na slabšo kakovost in izgubo pridelka (Schumm in sod., 2020). Višje rastline imajo za obrambo pred škodljivci razvitih več mehanizmov (Yactayo-Chang idr., 2020), med katerimi je ključna inducirana obramba, s katero rastlina prepozna škodljivca zaradi prisotnosti njegovih specifičnih spojin (Korth, 2003). V ta namen tvori fizične ali kemične ovire, med katerimi je široka paleta sekundarnih metabolitov, ki imajo toksičen in/ali odvračalni učinek na škodljivca (War idr., 2012). Sinteza spojin poteka v poškodovanem tkivu ali v drugih rastlinskih organih (Lattanzio idr., 2006). Razumevanje odziva oljke na napad marmorirane smrdljivke je še neraziskano in ima pomembno vlogo pri nadaljnjih strategijah zatiranja škodljivcev. Cilj poskusa je bil raziskati kemični odziv poškodovanega in nepoškodovanega dela plodov oljke po napadu marmorirane smrdljivke.

Material in metode: Poskus je bil izveden na dveh sortah oljk 'Istrska belica' in 'Pendolino', na treh izenačenih drevesih za vsako sorto. Septembra je bilo na vsako drevo na veje s plodovi nameščenih osem mrežnih vrečk, štiri so vsebovale po tri odrasle osebkje marmorirane smrdljivke, ostale štiri pa so predstavljale kontrolo. Poškodovanim in kontrolnim plodovom smo po obiranju v polni zrelosti izmerili maso, trdoto in barvo. Nato smo iz poškodovanih plodov s plutovrtom izrezali poškodovano (P) in nepoškodovano tkivo (NP). Na enak način je bilo pridobljeno tkivo s kontrolnih plodov (C). Tkivo je bilo nato nemudoma zamrznjeno v tekočem dušiku in do nadaljnjih analiz shranjeno na -20 °C. Za analizo fenolnih spojin smo

zamrznjen rastlinski material zmleli v prah, zatehtali 0,5 g vzorca ga prelili s 7,5 ml 70 % MeOH ter 3 % mravljične kisline in vzorce postavili v ultrazvočno kopel za 30 min. Nato smo vzorce centrifugirali, supernatant filtrirali skozi 0,2 µm poliamidni filter ter ekstrakt uporabili za identifikacijo posameznih in skupnih fenolnih spojin. Posamezne fenolne spojine smo identificirali po metodi Zamljen idr. (2021) s sistemom HPLC. Skupno vsebnost fenolov smo določili s Folin-Ciocalteu reagentom po opisali metodi Singleton idr. (1999).

Rezultati in razprava: Ob obiranju je bilo na poškodovanih plodovih obeh sort zaznati neprijeten vonj, vizualne spremembe tkiva ter zmanjšanje mase plodov v primerjavi s kontrolo. Pri sorti 'Pendolino' so bili plodov trši, kar bi lahko bila posledica sprememb v fizičnih strukturah zaradi hranjenja škodljivca (Holthouse idr., 2017). Ugotovili smo, da se različne sorte oljk ne odzivajo enako na napad marmorirane smrdljivke. Največji fenolni odziv je bil ugotovljen v poškodovanem tkivu poškodovanih plodov sorte 'Istrska belica', kjer je bila vsebnost skupnih fenolov za 10,8 % večja, v primerjavi z drugimi obravnavanji. V plodovih obeh sort je bilo identificiranih 44 posamezni fenolnih spojin iz petih fenolnih skupin. Najmočnejši fenolni odziv je bil opažen pri skupini flavonov in sekoiridoidov. Flavoni so znani kot obrambne molekule rastlin, ki zmanjšujejo njihovo okusnost, hranilnost ter prebavljivost, sekoiridoidi pa imajo odvrčalno delovanje na različne žuželke (War idr., 2012; Hamouda idr., 2015), kar bi lahko vplivalo na odganjanje marmorirane smrdljivke. Antocianini so bili prisotni le v sorti 'Pendolino', kjer se je njihova vsebnost v obeh tkivih poškodovanih plodovih povečala. Z večanjem vsebnosti antocianinov se nevarnost gnitja okuženih plodov zmanjša (Schaefer idr., 2008), zato bi lahko bilo povečanje le teh povezano z zmanjšanjem tveganja za sekundarne okužbe.

Viri in literatura:

- Damos, P., Soulopoulou, P., Thomidis, T. (2020). First record and current status of the brown marmorated sting bug *Halyomorpha halys* damaging peaches and olives in northern Greece. *Journal of Plant Protection Research*. 60, 323–326. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133317>
- Hamouda, A., Boussadia, O., Khaoula, B., Laarif, A., Braham, M. (2015). Studies on insecticidal and deterrent effects of olive leaf extracts on *Myzus persicae* and *Phthorimaea operculella*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 3(6), 294–297.
- Holthouse, M., Alston, D.G., Spears, L.R., Petrizzo, E. (2017). Brown marmorated stink bug [*Halyomorpha halys* (Stal)]. Utah pests fact sheet. <http://www.stopbmsb.org/where-is-bmsb/>
- Korth, K. L. (2003). Profiling the response of plants to herbivorous insects. *Genome Biology*. 4(7), 221. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-7-221>

- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M., Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*. 2, 23-67.
- Rice, K. B., Bergh, C. J., Bergmann, E. J., Biddinger, D. J., Dieckhoff, C., Dively, G., Fraser, H., Garipey, T., Hamilton, G., Haye, T., Herbert, A., Hoelmer, K., Hooks, C. R., Jones, A., Krawczyk, G., Kuhar, T., Martinson, H., Mitchell, W., Nielsen, A.L., Pfeiffer, D. G., Raupp, M. J., Rodriguez-Saona, C., Shearer, P., Shrewsbury, P., Venugopal, P. D., Whalen, J., Wiman, N. G., Leskey, T. C., Tooker, J. F. (2014). Biology, ecology, and management of brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Integrated Pest Management*. 5(3), 1-13. <https://doi.org/10.1603/IPM14002>
- Schaefer, H. M., Rentzsch, M., Breuer, M. (2008). Anthocyanins Reduce Fungal Growth in Fruits. *Natural Product Communications* 3(8), 1267-1272.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Shama, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior*. 7(10), 1306–1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Wiman, N. G., Parker, J. E., Rodriguez-Saona, C., Walton, V. M. (2015). Characterizing Damage of Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) in Blueberries. *Journal of Economic Entomology*. 1(8), 1156–1163. <https://doi.org/10.1093/jee/tov036>
- Yactayo-Chang, J. P., Tang, H. V., Mendoza, J., Shawn, A. C., Block, A. K. (2020). Plant defense chemicals against insect pests. *Agronomy*. 10. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10081156>
- Zamljen, T., Veberic, R., Hudina, M., Slatnar, A. (2021). The brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys* Stål.) influences pungent and non-pungent capsicum cultivars' pre- and post-harvest quality. *Agronomy*. 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112252>

Impact of Pulsed Electric Field Technology on phenolic compounds concentration in strawberry nectar during one-month refrigerated storage

Alema PUZOVIĆ^{1*}, Maja MIKULIČ-PETKOVŠEK¹

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Ljubljana, Slovenia

*Alema.Puzovic@bf.uni-lj.si

Introduction: Pulsed electric field (PEF) is a novel technology for food preservation that employs an external electric field, causing reversible or irreversible electroporation of cell membranes in treated material (Vilas-Boas et al., 2022). It is generally acknowledged that PEF processing facilitates the extraction of various bioactive compounds, including phenolics, while operating at a relatively low-processing temperature (Buckow et al., 2013). Therefore, the aim of this study was to examine the effect of PEF technology on the stability of phenolic compounds in strawberry nectar during treatment and throughout one-month refrigerated storage.

Materials and methods: Strawberry nectar with 40% fruit content, 3,2 pH and 12,2 °Brix was used in this study. Nectar was treated using PEF pilot plant equipped with co-linear treatment chamber, and processing parameters included field strength of 20 kV/cm and specific energy of 100 kJ/L. Phenolic compounds were identified and quantified using HPLC-MS system according to the method described in Mikulic-Petkovsek et al. (2020). The stability of phenolic compounds in treated nectars were evaluated upon applied treatments (0-day) and after one month of refrigerated storage at +4°C (30-day).

Results and conclusions: Average phenolic compounds concentration at 0 day ranged from 1.060 to 1.121 mg/l for control (untreated) and PEF treated samples, respectively. Initially, PEF treatment led to a significant increase in concentration of phenolic compounds by 5,8% in comparison to control samples. Enhanced extraction during PEF treatment is a result of electroporation, which leads to an increase in cell wall permeability and release of phenolic compounds from the cellular matrix, increasing their solubility and extraction efficiency (Ranjha et al., 2021). After one-moth storage at +4°C, average phenolic compounds concentration decreased significantly in PEF 30-day samples by 28,3% in comparison to PEF

0-day samples. This could be a result of the non-aseptic type of packaging used for filling (plastic bottles), or because the treatment did not cause a high inactivation of polyphenol oxidase, for which other authors used higher field strength than what was applied in this treatment (Yang et al., 2004). These results suggest that despite the initial increase facilitated by the treatment, phenolic compounds in PEF-treated nectars were unstable and prone to significant degradation during refrigerated storage.

References:

- Buckow, R., Ng, S., & Toepfl, S. (2013). Pulsed Electric Field Processing of Orange Juice: A Review on Microbial, Enzymatic, Nutritional, and Sensory Quality and Stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 455–467. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12026>
- Mikulic-Petkovsek, M., Koron, D., & Rusjan, D. (2020). The impact of food processing on the phenolic content in products made from juneberry (*Amelanchier lamarckii*) fruits. *Journal of Food Science*, 85(2), 386–393. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15030>
- Ranjha, M. M. A. N., Kanwal, R., Shafique, B., Arshad, R. N., Irfan, S., Kieliszek, M., Kowalczewski, P. Ł., Irfan, M., Khalid, M. Z., Roobab, U., & Aadil, R. M. (2021). A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents. *Molecules*, 26(16), 4893. <https://doi.org/10.3390/molecules26164893>
- Vilas-Boas, A. A., Magalhães, D., Campos, D. A., Porretta, S., Dellapina, G., Poli, G., Istanbulu, Y., Demir, S., San Martín, Á. M., García-Gómez, P., Mohammed, R. S., Ibrahim, F. M., El Habbasha, E. S., & Pintado, M. (2022). Innovative Processing Technologies to Develop a New Segment of Functional Citrus-Based Beverages: Current and Future Trends. *Foods*, 11(23), 3859. <https://doi.org/10.3390/foods11233859>
- Yang, R. J., Li, S. Q., & Zhang, Q. H. (2004). Effects of Pulsed Electric Fields on the Activity of Enzymes in Aqueous Solution. *Journal of Food Science*, 69(4), FCT241–FCT248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06323.x>

MIKROBIOLOGIJA

Aberrant *Bacillus subtilis* cell morphology emerges as consequence of active lysogeny

Valentina A. FLOCCARI^{1*}, Helge FEDDERSEN², Jaka JAKIN LAZAR¹, Anna MUNK³, Paul KEMPEN³, Robert HERTEL⁴, Tomaž ACCETTO¹, Ákos T. KOVÁCS³, Marc BRAMKAMP², Anna DRAGOŠ¹

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Microbiology, Ljubljana, Slovenia

² Kiel University, Institute of General Microbiology, Germany

³ Technical University of Denmark, Department of Biotechnology and Biomedicine, Denmark

⁴ Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, Institute for Biotechnology, Germany

* valentina.floccari@bf.uni-lj.si

Introduction: Temperate bacteriophage – bacterial host interaction has always been one of the most controversial in the microbial world. It is interesting the interplay between *Bacillus subtilis* spp and the viruses of *Spbetavirus* genus, as these temperate bacteriophages carry genes encoding for bacteriocins, communication systems and regulators of sporulation/germination processes, substantially altering the host phenotype during lysogeny. Furthermore, they are able of active lysogeny (or regulatory switch mechanism, RS), a fascinating alternative lysogenic life cycle characterized by integration into bacterial functional genes, resulting in a peculiar phage-host interaction. While investigating the impact of RS-phages on *Bacillus subtilis* physiology and ecology, we observed a strong influence on cell morphology by a specific *Spbetavirus*, resulting in an aberrant spherical shape as opposed to a conventional rod shape showed by the wild type strain. This phenotype manifests in late exponential phase and sporulation, being surprisingly stable and heritable. We also discovered that superinfection with a second homologous *Spbetavirus* restores the conventional rod-shaped morphology. Our aim is to shed light on the mechanism behind the host morphology change by specific *Spbetaviruses*.

Material and Methods: We performed plaque and growth assays to investigate the consequences of single and double lysogeny by these prophages for the host's fitness.

Additionally, both single and double lysogenic strains have been sequenced to confirm the integration in the target genes and looking for eventual new insights. Moreover, we also investigated potential differences between the wild type and its spherical-shaped lysogenic version through Transmission Electron Microscopy analysis and Fluorescence Microscopy's time-lapse experiments using various reporter fusion constructs, questioning mainly processes like cell division and sporulation.

Results and Conclusions: We observed that the double lysogeny has a strong impact on host fitness, influencing growth dynamics also correlated with spontaneous phage release. Moreover, the sequencing analysis helped to explore the impact of the double lysogeny on the host genome, in comparison with the single lysogens. The combination of these results suggests a potential mixed population of lysogens as a consequence of recombination events between the two integrated prophages. Microscopy analysis highlights potential differences between the two analyzed strains. The outcome of this research will bring us closer to understand the role of prophages in controlling bacterial hosts, highlighting mechanisms still unknown, crucial knowledge to control bacteria for biotechnological and medical application.

Razvoj metode CRISPR/Cas9 za tarčno preurejanje genomov melaniziranih gliv *Aureobasidium pullulans* in *Hortaea werneckii*

Klavdija FORTUNA^{1*}, Adriana OTERO BLANCA², Gisell VALDÉS MUÑOZ², Julia SCHUMACHER³, Ramón ALBERTO BATISTA GARCÍA², Cene GOSTINČAR¹, Nina GUNDE-CIMERMAN¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mehika

³ Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin, Nemčija

* klavdija.fortuna@bf.uni-lj.si

Uvod: Glive iz rodov *Aureobasidium* in *Hortaea* so izjemni organizmi, znani po svoji pojavnosti in sposobnosti preživetja v ekstremnih okoljih, ki jih pogosto karakterizira kombinacija različnih stresnih dejavnikov, kot so ekstremne pH vrednosti, mraz, zmrzovanje, visoke temperature, izsuševanje itd. V teh okoljih omenjene glive niso sposobne le preživetja, ampak celo uspešnega razmnoževanja. Imajo zanimive morfološke lastnosti ter tvorijo melanizirane celice in biofilme, ki poleg drugih molekularnih prilagoditev prispevajo k njihovi zmožnosti preživetja v neugodnih razmerah. Tekom zgodovine so zaradi njihove sposobnosti proizvodnje številnih snovi z visoko dodano vrednostjo pridobile širši pomen v industriji. V naši raziskavi smo opisali razvoj metode CRISPR/Cas9 za ciljno preurejanje genomov gliv *Aureobasidium pullulans* (EXF-150, EXF-3645) in *Hortaea werneckii* (EXF-15, EXF-562).

Material in metode: Za razvoj metode je bilo najprej potrebno s pomočjo encimov, ki razgrajujejo celično steno, pridobiti protoplaste omenjenih sevov gliv. V naslednjem koraku smo protoplaste združili s plazmidi pAMA/ribo in pAMA/tRNA, ki zapisujejo protein Cas9, vodilno RNA molekulo in odpornost proti antibiotiku higromicinu (*hygR*). V genomu smo tako inducirali dvoverižni prelom, nato pa je na mestu le-tega sledila usmerjena integracija matrične DNA, ki nosi zapis za odpornost proti antibiotiku geneticinu (*genR*) in nukleotidno zaporedje za jedrni/citosolni zeleni ali rdeči fluorescentni protein, na obeh koncih pa vsebuje tudi sekvence, ki so homologne regijam navzdol/navzgor od dvojnega preloma, ki ga je v genih *ura3/ade2/leu2* induciral protein Cas9. Po uspešni transformaciji smo dobili avksotrofne seve *A. pullulans* in *H. werneckii* z dvojno antibiotično odpornostjo in izraženo fluorescentno beljakovino. Za preverjanje uspešnosti transformacije smo glive inokulirali na antibiotično

(G418) gojišče brez dodanih aminokislin, s fluorescentnim mikroskopom preverili morebitno fluorescenco ter za preverjanje vstavitve matrične DNA na pravo genomsko lokacijo izvedli PCR presejalno metodo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili glivo *Knufia petricola*, pri kateri smo dvoverižni prelom v DNA vijačnici povzročili v genu *pks1*, kar je privedlo do seva s prekinjeno sintezo melanina in do tvorbe rožnatih kolonij. *Knufia petricola*, ki ima prekinjen tako gen *pks1* kot tudi *phs1*, ni sposobna sinteze melanina niti karotenoidov in posledično tvori kolonije bele barve.

Rezultati in razprava: Proizvodnja avksotrofnih sevov omenjenih gliv z izraženim fluorescentnim proteinom bi lahko bila pomembna pri pojasnjevanju nekaterih doslej nerazjasnenih pojavov, na primer njihove reprodukcijske strategije. Avksotrofni sevi so pomembni tudi pri zmanjšanju uporabe antibiotikov in reševanju težave naraščajoče odpornosti proti antibiotikom pri klinično pomembnih vrstah. Ta metoda bi lahko v kasnejših fazah raziskav vodila do inovativnih rešitev na področjih medicine, kmetijstva in biotehnologije. Tehnologija CRISPR/Cas9 v kombinaciji z ekstremotolerantnimi glivami pa bi se lahko izkazala priročna tudi za preučevanje meja življenja na Zemlji, obenem pa bi lahko potencialna odkritja aplicirali tudi na izven zemeljska okolja.

Vpliv mucinov na interakcije med bakteriofagi in gostiteljsko bakterijo

Jaka JAKIN LAZAR^{1*}, Katarina ŠIMUNOVIĆ¹, Iztok DOGŠA¹, Ines MANDIĆ MULEC¹, Mathias MIDDELBOE², Anna DRAGOŠ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

² University of Copenhagen, Department of Biology, Copenhagen, Denmark

* jaka.jakinlazar@bf.uni-lj.si

Uvod: Bakteriofagi oziroma fagi, so najbolj razširjene biološke entitete na planetu, ki so sposobni okužiti in lizirati bakterijske celice. Zaradi dolgoletne praznine pri odkrivanju novih antibiotikov, znano kot 'The discovery void', zanimanje za uporabo fagov za zdravljenje bakterijskih okužb strmo narašča. Še vedno pa vemo zelo malo o interakcijah med fagi in bakterijami v naravnem okolju. Mucini so glikoproteini, ki predstavljajo največji delež mukusa. Ta se nahaja v prebavnem traktu in na površini nekaterih organov, kjer služi kot prva obramba pred toksini ter patogenimi mikroorganizmi. Na podlagi pregleda literature je poznan model pritrjevanja fagov na mukus (BAM), ki pojasnjuje, kako se litični fagi pritrjujejo na mucine, in da s tem ko se pritrjujejo, nudijo zaščito pred bakterijskimi okužbami, ki ni izvomo gostiteljska obramba. Naša raziskava temelji na modelu BAM, ki predstavlja izhodišče za raziskave novih sistemov fag-gostitelj, vključno s probiotiki ter bakteriofagi, ki so zmožni lizogenije (integracije v bakterijski DNK).

Material in metode: Uporabljali smo gostiteljski bakteriji *Bacillus subtilis* in *Vibrio anguillarum*. *B. subtilis* je po Gramu pozitivna nepatogena bakterija, ki jo običajno najdemo v zemlji, a se uporablja tudi kot probiotik. *V. anguillarum* pa je po Gramu negativna ribja patogena bakterija, ki jo običajno najdemo v morskih okoljih. Uporabljeni fagi so bili litična faga Nf in KVP-40 ter lizogen fag SPβ. Sposobnost pritrjevanja fagov smo preverjali preko inkubacije fagnih lizatov na različnih tipih trdnih gojišč (vključno z gojiščem prekritem z mucini) ter štetjem števila plakov po prekritju površine z indikatorskim bakterijskim sevom. Sposobnost pritrjevanja bakterijskih celic smo preverjali tako, da smo plošče prekrili na enak način kot pri zgoraj opisanem protokolu, nato dodali bakterijske suspenzije, po inkubaciji pa ne-vezane bakterijske celice spirali in jih prešteli s pomočjo pretočnega citometra. Poleg vezave smo analizirali tudi hitrost porabe kisika pritrjenih celic v posebnih epruvetah, ki so

omogočale beleženje porabe kisika. Pri slednjih dveh metodah smo plošče prekrili tudi z mucini in nanje pritrjenimi fagi. Tako smo pridobili informacijo o tem kako fagi vplivajo na pritrjevanje bakterijskih celic na mucin. Pridobljene rezultate smo nato primerjali za oba gostiteljska sistema.

Rezultati in razprava: Rezultati so pokazali, da se tako litični, kot lizogeni *Bacillus* fagi v primerjavi s kontrolnimi površinami bistveno bolj pritrjujejo na površine prekrite z mucini. Poleg tega se je na površine, prekrite z mucini, povečala pritrditev celic *B. subtilis* in *V. anguillarum* v primerjavi s površinami prekritimi z agarjem. Pritrjevanje celic *V. anguillarum* na mucin se je ob prisotnosti fagov zmanjšalo, v nasprotju z bakterijo *B. subtilis*, kjer se je pozitiven učinek mucinov na pritrditev bakterije ohranil tudi ob prisotnosti fagov. Povišano pritrjevanje na mucine je bilo podprto tudi s povečano metabolno aktivnostjo pritrjene bakterijske biomase, merjeno s hitrostjo porabe kisika. Delo podpira prejšnje ugotovitve modela pritrjevanja bakteriofagov na mukus (BAM) in ga razširja na nove koristne in patogene bakterijske vrste. Razkriva tudi, da imajo mucini v različnih sistemih fag-gostitelj različne učinke na interakcije med fagom in gostiteljem, kar lahko vpliva na strategije zdravljenja s fagi ali probiotičnimi zdravili.

Nepričakovane posledice prekinitve bakteriofagnega integracijskega gena pri bakteriji *Bacillus subtilis*

Maja POPOVIĆ^{1*}, Anna DRAGOŠ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

*maja.popovic@bf.uni-lj.si

Uvod: Bakteriofagi so virusi, ki kot gostitelja izrabljajo bakterijske celice. Tako imenovani temperatni bakteriofagi ob okužbi gostitelja lahko vstopijo v lizogeni cikel pri katerem se genom bakteriofaga najpogosteje integrira v genom gostitelja in ta se nato podvaja skupaj z gostiteljem. Določeni temperatni bakteriofagi kot integracijsko mesto v genomu gostitelja uporabljajo funkcionalne genske lokuse, kar lahko vodi v inaktivacijo genov in potencialno spremembo fenotipa bakterije. Primer takšnih genov so geni, ki vplivajo na sporulacijo in tvorbo biofilma pri bakterijah iz rodu *Bacillus* med katere sodi tudi gen *spsM*. Gre za gen, ki funkcionira kot prednostno integracijsko mesto bakteriofaga SP β . Integracija SP β v *spsM*, ki je povezan s tvorbo biofilma ima lahko zanimive posledice za horizontalni prenos bakteriofagov med gostitelji in za interakcije med bakteriofagom in gostiteljem, saj biofilmi bakteriofagom lahko predstavljajo oviro pri okužbi gostitelja. Za pridobitev boljšega vpogleda v vpliv prekinitve *spsM* na biofilm smo med seboj primerjali biofilme sevov divjega tipa in sevov z prekinjenim *spsM*. Pri tem smo pridobili nepričakovane rezultate, ki nasprotujejo do sedaj objavljeni literaturi.

Material in metode: Za analizo vpliva gena *spsM* na biofilm smo uporabili klinični izolat *Bacillus subtilis* in talni izolat *B. subtilis*. Morfologijo biofilmov smo pregledali tako v obliki kolonij kot v obliki plavajočih biofilmov na različnih gojiščih. Slike biofilmov smo zajeli z uporabo lupe Leica MZ FLIII (Mikroskopske raziskave so bile izvedene v Infrastruktumem centru Mikroskopija bioloških vzorcev (IC MBV), (MRIC UL, I0-0022-0481-08) na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani). Na oslABLJENO tvorbo biofilma smo sklepali na podlagi zmanjšane kompleksnosti površine biofilma (manjša nagubanost površine). Seve, pri katerih smo na podlagi morfologije biofilma sumili na prisotnost spontanih mutacij, smo poslali na sekvenciranje celotnega genoma z metodo Illumina in sekvence pregledali za prisotnost polimorfizmov posameznih nukleotidov. Za seve, ki so imeli prisotne spontane mutacije v genih pomembnih za rojenje (način premikanja bakterij po poltrdih površinah), smo nato

preverili sposobnost rojenja na gojišču LB z dodanim 0,7 % agarjem (omogoča rojenje). Sposobnost rojenja smo ocenili preko meritev premera kolonij v različnih časovnih točkah. Za dodatno potrditev vpliva spontanij mutacij v genih, ki vplivajo na rojenje, smo preko genskega inženiringa pripravili tudi seve z namerno prekinjenimi istimi geni in potrdili enako morfologijo biofilma in enako sposobnost ali pomanjkanje rojenja.

Rezultati in razprava: Naši rezultati nakazujejo, da prekinitev gena *spsM* v talnem izolatu *B. subtilis* pri gojenju kolonij spodbuja nastanek spontanij mutacij, ki vodijo v manj naguban tip kolonij z zmanjšano sposobnostjo rojenja. Ta fenotip smo poimenovali »fluffy«. Sekvenciranje celotnega genoma in genski inženiring sta prikazala, da je fenotip »fluffy« posledica mutacije, ki je inaktivirala gen ključen za rojenje. V predhodno objavljenem članku je bilo prikazano, da prekinitev *spsM* pri kliničnem izolatu *B. subtilis* vodi v izrazite spremembe morfologije biofilma (manj naguban tip kolonije). Ko smo *spsM* prekinili sami nismo uspeli reproducirati njihove spremembe v morfologiji biofilma (ne pri kliničnem ne pri talnem izolatu). Ker nas je morfologija kliničnega izolata s prekinjenim *spsM* iz izvirnega članka spominjala na fenotip »fluffy« prisoten pri spontano mutiranem talnem izolatu smo tudi za klinični izolat analizirali rojenje in opazili znižano sposobnost rojenja. Preko sekvenciranja celotnega genoma smo tudi pri kliničnem izolatu s prekinjenim *spsM* potrdili prisotnost spontane mutacije v genu, ki vpliva na rojenje. Rezultati prikazujejo, da prekinitev bakteriofagnega integracijskega gena *spsM* neposredno ne spremenijo oziroma znižajo sposobnost tvorbe biofilma, ampak potencialno spodbuja nastanek spontanij mutacij, ki vplivajo na fenotip biofilma. To razkriva zapleteno medsebojno delovanje med temperatnim bakteriofagom in gostiteljem na nivoju genomske preureditve gostitelja.

Rastlinski izvlečki kot alternativa antibiotičnim krmnim dodatkom za zmanjševanje emisij metana pri prežvekovalcih: mikrobiomski pogled

Alen RADOLIČ¹, Luka LIPOGLAVŠEK¹, Lijana FANEDL¹, Gorazd AVGUŠTIN^{1*}

¹Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Ljubljana, Slovenija

* gorazd.avgustin@bf.uni-lj.si

Uvod: Za obvladovanje naraščajočega trenda globalnega segrevanja se pogosto poudarja potreba po zmanjšanju emisij metana, ki je eden izmed ključnih toplogrednih plinov. Enega najpomembnejših bioloških virov metana predstavljajo prežvekovalci, ki naj bi po ocenah prispevali do 40 % globalnih emisij metana. Razlog za to so metanogene arheje, ki živijo v vampu prežvekovalcev in kot stranski produkt svojega metabolizma tvorijo metan. Kljub temu, da prispevajo k problematiki globalnega segrevanja, pa so metanogene arheje nujen del mikrobioma v vampu. Predstavljajo namreč pomemben ponor vodika, ki bi sicer deloval zaviralno na proces reoksidacije NADH, ključnega prenašalca elektronov v procesu fosforilacije na substratnem nivoju in s tem ogrozil energijsko najpomembnejši proces za gostitelja in delujoč mikrobni ekosistem v vampu. Najučinkovitejši način zniževanja proizvodnje metana v vampu prežvekovalcev predstavlja neposredna manipulacija vampovega mikrobioma z dodajanjem t.i. krmnih dodatkov. Med prve uspešno uporabljene sodijo antibiotiki (npr. monenzin), katerih uporaba pa je zaradi (verjetno upravičenega) strahu pred širjenjem antibiotičnih rezistenc in možnosti akumulacije antibiotikov v mesu in mleku, od 1.1.2006 v Evropski skupnosti prepovedana. Krmne dodatke, ki bi nadomestili antibiotike, iščemo zato med drugim med izvlečki rastlin, ki predstavljajo velikanski vir potencialno uporabnih bioaktivnih učinkovin.

Material in metode: Uporabili smo šaržni anaerobni bioreaktorski sistem GasEndeavour (BPC Instruments), s katerim smo simulirali razmere v vampu ovac in tako *in vitro* preučevali vpliv izvlečkov česna, hmelja in kostanjevih taninov v dveh različnih koncentracijah ter jih primerjali z vplivom ionofornega antibiotika monenzina. Za gojenje vampovih mikroorganizmov smo uporabili modificirano anaerobno gojišče M2, pri katerem smo glukozo zamenjali s karboksimetil celulozo, in ga inokulirali z živim vampovim sokom (5 vol.%). S sistemom GasEndeavour smo med poskusom (72 ur) sproti spremljali proizvodnjo plinov (celokupno),

ob koncu poskusa pa smo s plinsko kromatografijo določili sestavo nastale plinske mešanice (CO_2 , CH_4 , N_2 in H_2) in sestavo kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) z metodama etrske ekstrakcije in derivatizacije mlečne in jantarne kisline. V dveh časovnih točkah (na začetku in koncu) poskusa smo določili tudi pH bioreaktorske mešanice. Pridobljene rezultate smo statistično obdelali z opisno statistiko (povprečje in standardni odklon) ter z enosmerno analizo variance (ANOVA). Z molekularnimi metodami (TRFLP in sekvenciranje 16S rRNA NGS) in bioinformacijsko analizo pa smo preučevali vpliv teh učinkovin na sestavo mikrobioma vampa.

Rezultati in razprava: Ugotovili smo, da dodatek izbranih rastlinskih izvlečkov v primerjavi z vzorci pozitivnih kontrol (gojišče brez dodanih učinkovin), z izjemo alfa kislin iz hmelja, učinkovito zmanjša proizvodnjo celokupnega plina in metana. Ko smo ta učinek primerjali z vplivom monenzina smo ugotovili, da sta česnovo olje in beta kisline iz hmelja pri višji koncentraciji celo bolj učinkovita pri zmanjšanju proizvodnje metana. Za monenzin, česnovo olje in beta kisline iz hmelja v višji koncentraciji lahko domnevamo, da povzročijo inhibicijo metanogeneze, ker se je v vzorcih namesto metana pojavil vodik. Analiza KMK je pokazala, da je večina učinkovin zmanjšala celokupno koncentracijo KMK v primerjavi s pozitivno kontrolo, z izjemo dialil disulfida, ki je koncentracijo KMK celo povečal. Ker so lahko vse te zgoraj opisane ugotovitve posledica spremembe v sestavi mikrobioma, smo to raziskali. Analiza podobnosti profilov TRFLP bakterijskega dela mikrobioma je pokazala, da že samo gojenje povzroči spremembo v bakterijskem delu mikrobioma, kar sklepamo na osnovi jasno ločenih profilov vzorcev, ki tvorijo tri gruče – (i) vzorci vampovega soka, (ii) vzorci z dodanim monenzinom in (iii) preostali vzorci. Podobne razlike opazimo tudi na osnovi analize sekvenc 16S rRNA. V vseh vzorcih se v primerjavi z vampovim sokom močno zniža delež predstavnikov iz debla *Bacteroidota*.

NANOZNANOSTI

Razvoj in karakterizacija liposomskega dostavnega sistema učinkovin na osnovi lipidov arheje *Aeropyrum pernix* K1

Jan KEJŽAR¹, Polona MRAK², Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC¹, Nataša POKLAR ULRIH^{1*}

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

* natasa.poklar@bf.uni-lj.si

Uvod: Liposomi so mikroskopske vezikularne strukture, sestavljene iz enega ali več fosfolipidnih dvoslojev z jedrom iz vodne faze. Za liposome je značilno, da so biokompatibilni, omogočajo tarčno dostavo, zaščitijo občutljive učinkovine, ter zmanjšajo njihovo sistemsko toksičnost kljub izboljšanju farmakokinetkega delovanja. Glavna pomanjkljivost konvencionalnih liposomov je njihova slaba stabilnost in posledično slabša sposobnost dostave učinkovin na tarčno mesto. Navkljub obsežnem številu raziskav in njihovega prenosa v klinične aplikacije, je na trgu manj kot 20 registriranih zdravil na osnovi liposomov. Arheosomi narejeni iz enega ali več tipov etrskih lipidov arhej predstavljajo novo skupino liposomov, ki imajo v primerjavi s konvencionalnimi liposomi, sestavljenimi iz estrskih lipidov, izboljšano stabilnost. Arhealni lipidi so ključni del prilagoditev arhejske celične membrane na ekstremne okoljske pogoje, kot so visoke temperature v termalnih vrelih in podvodnih vulkanih. Arheje so edinstvena skupina organizmov, znanih po svoji široki razširjenosti v ekstremnih okoljih, kar delno omogoča edinstvena lipidna struktura njihove celične membrane. Eden izmed takih organizmov je hipertermofilna arheja *Aeropyrum pernix* K1, ki uspeva v žvepljenih vrelih pri optimalni temperaturi rasti od 90 do 95 °C. Lipidi, izolirani iz *A. pernix* so sestavljeni izključno iz izoprenoidnih verig, ki so na glicerol vezane z etrskimi vezmi.

Material in metode: Arheosome smo pripravili iz mešanice jajčnega sfingomielina (SM), holesterola (CH) in arhealnih lipidov (C_{25,25}) iz *A. pernix*. Analizirali smo dodatek 0, 2, 5, 15, 25, 35 in 45 mol% C_{25,25} lipidov k binarni mešanici SM/CH v konstantnem molskem razmerju 1,5 proti 1. Z metodo tankega filma smo iz mešanic z različnimi deleži lipidov formirali multilamelarne vezikle. Slednje smo naknadno preoblikovali v unilamelarne vezikle z metodo sonikacije ali ekstruzije. Za določanje morfologije in velikosti pripravljenih arheosomov smo

uporabili presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) in tehniko dinamičnega sipanja svetlobe (DLS). Urejenost lipidne membrane smo določili z emisijsko fluorescenčno spektrometrijo z merjenjem polarizacije in anizotropije membranskih prob 1,6-difenil-1,3,5-heksatriena (DPH) in njegovega trimetilamonijevega derivata (TMA-DPH). Neto površinski naboj (zeta potencial) liposomov smo merili z metodo (DLS). Prepustnost (permeabilnost) in stabilnost formulacije s kapsulirano učinkovino smo določali s študijami sproščanja kalceina. Kalcein je fluorescentno barvilo, ki ob presežku določene koncentracije ne fluorescira (ang. »self-quenching«), kar lahko izkoristimo za študije permeabilnosti liposomov ob različnih pogojih. Ob spremembi strukture liposomov pride do sproščanja kalceina, kar zaznamo kot fluorescenco. Metodo smo uporabili za določanje fizikalno-kemijske stabilnosti (dolgoročna hramba pri 4 °C ter prepustnost med 20 – 98 °C), kot tudi biološke stabilnosti ob prisotnosti seruma.

Rezultati in razprava: S študijo smo pokazali znatek vpliv C_{25,25} arhealnih lipidov na lastnosti veziklov iz sfingomielina in holesterola. Izboljšave morfologije so opazne že pri minimalnem dodatku 2 mol%, ki vpliva na zmanjšanje povprečne velikosti, indeksa polidisperznosti in zeta potenciala veziklov C_{25,25}/SM/CH. Poleg tega že 2 mol% dodatek C_{25,25} lipidov omogoča formacijo veziklov s pomočjo sonikacije, kar pri binarni mešanici SM/CH ni mogoče. Pridobitev veziklov s premerom 100 nm ali manj iz binarne SM/CH mešanice namreč zahteva dolgotrajen postopek ekstruzije z uporabo sotopila. Prav tako so vsi vzorci z dodatkom C_{25,25} lipidov imeli zeta potencial pod vrednostjo -30 mV za katero se smatra, da zagotavlja stabilnost koloidnih raztopin. Dodatek C_{25,25} lipidov v mešanico SM/CH je obratno sorazmerno zmanjšal parameter urejanja lipidov (S) v odvisnosti od deleža. Iz vzorcev z dodatkom C_{25,25} lipidov se je ob pogojih hrambe v hladilniku sprostilo manj kalceina kot v kontrolni binarni mešanici SM/CH. Opazili smo, da je pri vzorcu z dodatkom 15 mol% C_{25,25} k SM/CH prišlo do povečanega sproščanja kalceina v prisotnosti govejega seruma. Slednje nakazuje na potencialne imunomodulatorne lastnosti lipidne mešanice, zato bi lahko naša formulacija služila tudi v vlogi adjuvansa pri razvoju naprednih liposomskih sistemov za dostavo cepiv.

Preučevanje (geno)toksičnost večfunkcionalnih nanocimov na osnovi kovinskih oksidov *in vitro*

Iza ROZMAN^{1,2*} Katja KOLOŠA¹, Bojana ŽEGURA^{1,2}, Alja ŠTERN^{1,2}

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

* iza.rozman@nib.si

Uvod: Zanimanje za uporabo nanocimov – nanomaterialov, ki imajo encimom podobne lastnosti – na osnovi kovinskih oksidov je v zadnjih nekaj letih izjemno naraslo, ob tem pa glavni izziv predstavlja njihova varnost. Nanocimi se široko uporabljajo in na splošno veljajo za biokompatibilne, vendar ni veliko poročil, ki bi se osredotočala na njihovo varnost – primanjkuje predvsem študij, ki bi naslavljale genotoksičnost in rakotvornost nanocimov. Veliko pozornosti so nanocimi pritegnili predvsem zaradi svojih izjemnih fizikalno-kemijskih lastnosti, boljše stabilnosti in robustnosti v ekstremnih pogojih v primerjavi z naravnimi encimi ter nizkih stroškov in enostavnega shranjevanja. Nanocimi na osnovi kovinskih oksidov se pogosto uporabljajo na številnih področjih, zlasti v (bio)medicini, pri tem pa je izrednega pomena, da pred klinično uporabo preverimo njihovo varnost in se tako izognemo morebitnim škodljivim učinkom na zdravje človeka. Glavni namen naše študije je preučiti potencialne (geno)toksične učinke treh različnih oblik nanocimov na osnovi kovinskih oksidov (NP) s pridruženim bakrom ($\text{Cu}_{0.3}\text{Fe}_{2.7}\text{O}_4$), cinkom ($\text{Zn}_{0.3}\text{Fe}_{2.7}\text{O}_4$) in manganom ($\text{Mn}_{0.3}\text{Fe}_{2.7}\text{O}_4$) ter oceniti njihovo varnost za uporabo v (bio)medicinskih aplikacijah.

Material in metode: Cito- in genotoksično delovanje nanocimov smo preučevali na naprednih *in vitro* 3D celičnih modelih (sferoidih), pripravljenih iz celične linije humanega hepatocelularnega karcinoma (HepG2). Sferoide smo pripravili s prisilno plavajočo metodo (15.000 celic/mL) ter jih pred uporabo v testih gojili 72 ur pri 37 °C, 5 % CO_2 . Citotoksično delovanje nanocimov smo preučevali s pomočjo luminiscenčnega testa CellTiter-Glo® (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, ZDA), medtem, ko smo genotoksično delovanje preučevali s testom komet. Za izvedbo testa CellTiter-Glo® smo pripravljene sferoide izpostavili naraščajočim koncentracijam nanocimov. Po 24- ali 96-umi izpostavitvi smo sferoide prenesli v mikrotitrsko ploščo z belo neprozorno steno ter dodali 50 μL reagenta CellTiter-Glo. Mešanico reagenta in sferoidov smo nato resuspendirali ter jo

inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi preden smo izmerili luminescenčni signal. Za izvedbo testa komet smo po 24- in 96-urni izpostavitvi nanocimom sferoide prenesli v 1,5 mL Eppendorfovo mikrocetrifugirko (5 sferoidov/koncentracijo) in jih centrifugirali 4 minute pri 134 g. Supernatant smo odstranili in sferoide sprali z 1 mL 1xPBS ter ponovili korak centrifugiranja. Supernatant smo ponovno odstranili, dodali 50-100 µL encimske mešanice (10x razredčena raztopina kolagenaze (50 mg/mL) z medijem brez seruma in TrypLE (Gibco; 12604-013) v razmerju 1:2) ter vse skupaj inkubirali 8-10 minut pri 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji smo sferoide resuspendirali in dodali 500 µL celičnega medija ter jih centrifugirali 4 minute pri 134 g. Odvečen medij smo nato odstranili ter izvedli test komet v skladu s Singh et al. (Singh, 1988) z manjšimi modifikacijami kot so opisali Štampar et al. (Štampar, 2019).

Rezultati in razprava: Citotoksično delovanje testiranih nanocimov smo določali z luminiscenčnim testom CellTiter-Glo®, pri katerem celično živost določamo na podlagi izmerjenega ATP, ki služi kot indikator presnovno aktivnih celic. Količina izmerjenega ATP je tako sorazmerna številu živih, metabolno aktivnih celic. Preliminarni rezultati so pokazali, da vse tri oblike nanocimov znižajo celično živost na od koncentracije odvisen način (0,02 – 40 µg/cm²) pri obeh časovnih izpostavitvah, pri čemer je najočitnejše znižanje celične živosti opaziti pri nanocimih z vsebnostjo bakra (Cu_{0.3}Fe_{2.7}O₄). Poleg tega test komet nakazuje na to, da nanocimi pri necitotoksičnih koncentracijah povzročajo poškodbe DNK, ki so izrazitejšje z naraščajočo koncentracijo (0,4 – 10 µg/cm²), pri čemer je največjo stopnjo poškodb možno opaziti pri nanocimih z vsebnostjo bakra. Test komet je izredno občutljiva in hitra kvantitativna *in vitro* metoda, ki se uporablja za zaznavanje alkalno labilnih mest, navzkrižnega povezovanja DNK-DNK in DNK-proteini ter eno- in dvoverižnih prelomov DNK, ki so lahko posledica neposrednih poškodb, ali pa nastanejo med popravljanjem poškodb DNK, kot v primeru odstranjevanja poškodb, ki nastanejo zaradi reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), in so prehodne narave. Preliminarni rezultati naše raziskave nakazujejo, da testirani nanocimi na HepG2 sferoide delujejo cito- in genotoksično, a je potrebno za dokončno potrditev in natančnejšo opredelitev mehanizma cito- in genotoksičnega delovanja izvesti dodatna testiranja.

Viri in literatura:

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Štampar, M., Tomc, J., Filipič, M., & Žegura, B. (2019). Development of *in vitro* 3D cell model from hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line and its application for genotoxicity testing. *Archives of Toxicology*, 93(11). <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02576-6>

PREHRANA

Antioksidativne lastnosti poliaminov in njihovih derivatov v oljih in emulzijah

Varineja DRAŠLER¹, Helena ABRAMOVIČ¹, Tomaž POLAK¹, Bogdan ŠTEFANE², Blaž CIGIČ^{1*}

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za organsko kemijo, Ljubljana, Slovenija

* blaz.cigic@bf.uni-lj.si

Uvod: Številne raziskave kažejo, da je prehranski vnos poliaminov, še posebej spermidina in spermina, povezan s pozitivnimi učinki na zdravje. Ključno vlogo pri bioloških funkcijah ima polikationski značaj molekul pri fiziološkem pH. Za razliko od njihove prehranske vrednosti, se poliamine v veliko manjši meri obravnava kot molekule s funkcionalnimi lastnostmi, ki lahko vplivajo na oksidativno in strukturno stabilnost živil. Antioksidativni učinek poliaminov je bil že večkrat pokazan na nivoju organizmov in celičnih izolatov, zelo omejeno število raziskav pa je naslovljalo uporabo poliaminov za oksidativno stabilizacijo lipidov v živilskih sistemih. Živila pogosto vsebujejo vodno fazo in v takšnih sistemih je stabilnost lipidov v splošnem slabša kot v čistih triacilglicerolih. Raziskave kažejo, da so v homogenih sistemih bolj učinkoviti polarni antioksidanti, v heterogenih sistemih pa nepolarni in amfifilni antioksidanti. Namen naše raziskave je bil sintetizirati manj polarne acilirane derivate poliaminov ter ovrednotiti antioksidativne lastnosti poliaminov in njihovih derivatov v rastlinskih oljih in emulzijah.

Material in metode: Sintetizirali smo dva acilirana derivata spermina z različno dolžino alkilne verige ter potrdili njuno strukturo z NMR spektroskopijo. Pripravili smo modelni lipidni sistem, rastlinska olja in emulzije, katerim smo dodali poliamine, derivate spermina in nekatere druge antioksidante, ki se pogosto uporabljajo kot živilski aditivi. Vse vzorce smo izpostavili pogojem pospešenega staranja. Tekom inkubacije smo določali primarne in sekundarne produkte oksidacije. Koncentracijo nastalih hidroperoksidov ter konjugiranih dienov in trienov smo določili s spektrofotometrično metodo. Vsebnost aldehydov in ketonov smo določili z ekstrakcijo, derivatizacijo in HPLC analizo z UV-VIS detektorjem. Z metodo rancimat smo

analizirali nastanek hlapnih spojin. Vpliv oksidacije na maščobnokislinsko sestavo smo določili z metodo *in situ* transesterifikacije in GC analizo.

Rezultati in razprava: Spermin, spermidin in acilirani derivati spermina so se izkazali kot najbolj učinkoviti antioksidanti v rastlinskih oljih. To potrjujejo nizka koncentracija nastalih hidroperoksidov in sekundarnih produktov oksidacije, majhne spremembe v razmerju med večkrat nenasičenimi in nasičenimi maščobnimi kislinami ter daljši induksijski čas. Za razliko od poliaminov, se je v emulzijah kot učinkovit antioksidant izkazali le eden od derivatov spermina. Rezultati kažejo, da je dolžina alkilne verige pomemben faktor, ki vpliva na antioksidativno učinkovitost derivatov. Antioksidativni učinek v oljih in emulzijah smo dosegli pri manjših koncentracijah poliaminov in njihovih derivatov, kot se sicer uporabljajo za nekatere naravne in sintetične živilske aditive. Naše ugotovitve kažejo, da poliamini in njihovi manj polarni derivati, kot naravno prisotne molekule, predstavljajo novo alternativo za oksidativno stabilizacijo olj in emulzij. To odpira tudi nadaljnje možnosti za potencialno aplikacijo v živilskih sistemih.

ZNANOSTI O CELICI

Raziskovanje vpliva modulatorjev ionskih kanalov na odziv celic po elektroporaciji

Anja BLAŽIČ^{1*}, Tamara POLAJŽER¹, Damijan MIKLAVČIČ¹, Lea REMS¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Ljubljana, Slovenija

* anja.blazic@fe.uni-lj.si

Uvod: Elektroporacija je pojav, ki se izrazi kot povečanje prepustnosti celičnih membran, ko celice izpostavimo visokonapetostnim električnim pulzom. Če celice preživijo izpostavitve, govorimo o reverzibilni elektroporaciji, če odmrejo pa o ireverzibilni elektroporaciji. Tako reverzibilno kot ireverzibilno elektroporacijo uporabljamo v številnih aplikacijah v medicini, biotehnologiji in živilski tehnologiji. Elektroporacija sproži kompleksen odziv celic, saj povečanje prepustnosti membrane med drugim povzroči porušitev ionskega ravnovesja, povečanje znotrajceličnega kalcija in spremembe v transmembranski napetosti (TMN). Kakšno vlogo pri tem igrajo ionski kanali, ostaja odprto vprašanje. V prispevku predstavljamo rezultate dveh študij. V prvi smo z različnimi inhibitorji ionskih kanalov raziskovali mehanizme dolgotrajnih sprememb v TMN po elektroporaciji. V drugi pa smo preverili vpliv lidokaina – inhibitorja natrijevih ionskih kanalov, ki se pri elektrokemoterapiji pogosto uporablja kot lokalni anestetik – na permeabilizacijo in preživetje celic po elektroporaciji.

Material in metode: V prvi študiji smo ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO-K1) in celice humanega glioblastoma U-87 MG izpostavili 100 μ s, 1.4 kV/cm pulzu in s fluorescenčno mikroskopijo spremljali časovni potek sprememb TMN (z barvilom FLIPR membrane potential, FMP), privzem propidijevega jodida (PI) in spremembe v znotrajceličnem kalciju (z barvilom Fluo4-AM), pri dveh temperaturnih pogojih (sobna $T = 25.3 \pm 1.4$ °C, nadzorovana $T = 33 \pm 0.2$ °C). Vpliv ionskih kanalov smo preverjali z dodatkom inhibitorjev kalijevih kanalov tetraetilamonij in Penitrem A ter inhibitorja kalcijevih kanalov Verapamil. Pridobljene eksperimentalne rezultate smo podprli s teoretičnimi izračuni. V drugi študiji smo celice CHO-K1, celice mišjega melanoma B16-F1, mišje mioblaste C2C12 in humane embrionalne ledvične celice HEK, ki stabilno izražajo natrijeve $Na_v1.5$ kanale, izpostavili 8'100 μ s pulzom različnih amplitud. S pomočjo pretočne citometrije in metabolnega testa MTS smo preverili

vpliv 10 mM lidokaina na permeabilizacijo (vnos PI) in 24-urno preživetje celic po elektroporaciji.

Rezultati in razprava: Rezultati prve študije kažejo, da so dolgotrajne spremembe v TMN, ki se zgodijo nekaj minut po izpostavitvi celic električnemu polju, odvisne od temperature in se med posameznimi celičnimi linijami razlikujejo. V prvih minutah po izpostavitvi k spremembam TMN prispeva predvsem neselektivni ionski tok, ki je posledica nastanka por in s tem povečane prepustnosti celične membrane. Kasneje, ko se celična membrana pretežno zaceli, pa k spremembam TMN pomembno prispeva aktivacija ionskih kanalov. Rezultati druge študije pa kažejo, da inhibitorji ionskih kanalov, kot je lidokain, lahko do določene mere vplivajo na permeabilizacijo in preživetje celic po elektroporaciji, pri čemer je vpliv inhibitorja ionskih kanalov pri posameznih celičnih linijah različen. Raziskovanje vpliva modulatorjev ionskih kanalov je zanimivo predvsem zaradi uporabe elektroporacije pri številnih terapijah, ki ciljajo celice s povečanim izražanjem ionskih kanalov (tumorske, vzdražne in matične celice). Temeljne raziskave s preverjanjem vpliva modulatorjev ionskih kanalov na signal TMN, sprememb znotrajceličnega kalcija, permeabilizacije in preživetje celic po elektroporaciji so ključnega pomena za razumevanje vpliva modulatorjev, ki se uporabljajo kot zdravila (npr. antiaritmiki, antihipertenzivi, analgetiki), na uspešnost različnih terapij, ki temeljijo na elektroporaciji.

Deformabilnostna citometrija celic Jurkat za celično imunoterapijo

Lija FAJDIGA^{1*}, Nina BERNAT¹, Lara BETOCCHI¹, Špela ZEMLJIČ JOKHADAR¹, Jure DERGANČ¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biofiziko, Ljubljana, Slovenija

* lija.fajdiga@mf.uni-lj.si

Uvod: Imunoterapija s celicami CAR-T predstavlja enega najpomembnejših nedavnih napredkov pri zdravljenju raka, saj kaže izjemno učinkovitost pri nekaterih podtipih. Kljub temu pa se pojavljajo izzivi, kot na primer neodzivnost pacientov na zdravljenje in zapleti zaradi nespecifičnega delovanja celic CAR-T. Ker ta tehnologija temelji na protirakavem delovanju spremenjenih limfocitov T, je za njen nadaljnji razvoj nujno potrebno poglobljeno razumevanje lastnosti limfocitov T. Trenutne raziskave na tem področju se osredotočajo predvsem na molekularne dejavnike, na primer na antigenske tarče in signalne poti. Po drugi strani pa imajo celice CAR-T tudi kompleksne fizikalne lastnosti, ki lahko pomembno vplivajo na učinkovitost terapije, vendar njihov vpliv ostaja slabo razumljen. Mehanske lastnosti so še posebno ključne za različne celične procese limfocitov T, vključno z migracijo, aktivacijo, ekstravazacijo in citotoksično aktivnostjo. Z našimi raziskavami si prizadevamo poglobiti razumevanje mehanskih lastnosti limfocitov T v različnih okoljih in s tem prispevati k nadaljnjem razvoju terapije CAR-T.

Material in metode: V raziskavah uporabljamo deformabilnostno citometrijo, mikrofluidično metodo za merjenje celične deformabilnosti, za katero je bil na našem inštitutu razvit odprtokodni stroboskopski sistem za slikanje ter sistem za analizo slik s pomočjo strojnega učenja. Osredotočamo se na mehanske lastnosti celične linije Jurkat, kot standardnega modela limfocitov T. Naš cilj je raziskati, kako se deformabilnost celic Jurkat spremeni po njihovi aktivaciji in kako na njihovo mehaniko vpliva citoskelet. Preučiti želimo tudi učinke izpostavljenosti celic Jurkat farmacevtskim izdelkom, kot so lipidne emulzije, ki so del intravenozno aplicirane prehrane za bolnike z rakom. Takšne emulzije, na primer Omegaven (emulzija ribjega olja) in SMOFlipid (emulzija različnih olj), pridejo v neposreden stik z limfociti T in imajo znane imunomodulatorne učinke, vendar pa njihov vpliv na mehaniko limfocitov še ni popolnoma razumljen.

Rezultati in razprava: Prvi rezultati kažejo, da ima destabilizacija aktinskega citoskeleta s citohalazinom D manjši učinek na celice Jurkat kot na adherentne epiteljske celice. Ta rezultat odraža predvsem posebnost celične organizacije celic Jurkat. So namreč majhne in imajo veliko jedro, ki je najtrša celična komponenta. Poleg tega naši rezultati kažejo, da kemična aktivacija celic Jurkat s PMA (forbol miristat acetat) in ionomicinom ne vpliva na deformabilnost celic, medtem ko aktivacija s protitelesi proti CD3 in CD28, ki je bolj podobna fiziološki, nekoliko poveča deformabilnost. Ta ugotovitev poudarja potencialni pomen načina aktivacije celic T v terapevtskem kontekstu. Nazadnje smo pokazali, da lipidni emulziji Omegaven in SMOFlipid kažeta manj izrazit učinek na mehaniko celic, kljub temu pa Omegaven znatno zmanjša viabilnost celic, kar bi lahko bilo povezano s škodljivimi stranskimi učinki, o katerih poročajo tudi v kliničnih študijah. Naši rezultati predstavljajo osnovo za prihodnje študije na primarnih limfocitih.

Vpogled v vidno prepoznavo gostiteljev navadne slinarice (*Philaenus spumarius*)

Domen LAZAR^{1,2*}

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² University of Bari, Plant and Food Sciences (Di.S.S.P.A.), Department of Soil, Bari, Italy

* domen@algen.si

Uvod: Od pojava bakterijskega fito-patogena *Xylella fastidiosa* v Evropi leta 2013, ki predstavlja grožnjo mnogim gospodarsko pomembnim kulturnim rastlinam, se je znatno povečalo zanimanje za razumevanje ekologije te bakterije, njenih odnosov z gostiteljskimi rastlinami in prenašalci. Med glavnimi prenašalci je polifagna žuželka navadna slinarica (*Philaenus spumarius*), razširjena v severni hemisferi. Bakterija se zadržuje v ustnem aparatu slinaric in se med rastlinami prenaša med hranjenjem s ksilemom. Slinarice prepoznavajo gostiteljske rastline tudi s pomočjo vida. Tako kot ostali členonožci, imajo sestavljeno oko iz več sto omatidijev, ki so optično izolirani in organizirani v šesterokotno mrežo. Vsak omatidij obsega 8 fotoreceptornih celic z različnimi vidnimi pigmenti. Signal iz fotoreceptorjev potuje v dva integracijska centra, lamino in medulo, kjer poteka procesiranje informacij z barvno in akromatsko vsebino. V okviru raziskovalnega projekta želim raziskati vidno prepoznavo oljčnih dreves, ki so za bakterijo posebej dovzetna. Razumevanje tega odnosa ne le nadgrajuje osnovno znanost, ampak omogoča iskanje trajnostnih rešitev za omejevanje širjenja bakterijske bolezni. Cilj te doktorske raziskave je celovita karakterizacija barvnega in polarizacijskega vida ter struktur, ki ju omogočajo, pri predstavnikih rodu slinaric. Raziskava zajema tudi analizo vizualnih znakov oljčnih listov, vedenjske študije in integracijo rezultatov z analitičnimi modeli.

Material in metode: Delovanje vidnega sistema slinaric smo preučevali z elektrofiziološkimi metodami. Z znotrajceličnimi meritvami sprememb električnih potencialov v fotoreceptorjih in raznimi načini stimulacije smo pridobili podatke o vizualnem sistemu na ravni retine. Električni odzivi celic ob draženju s svetlobo različnih valovnih dolžin podajo informacijo o njihovi spektralni občutljivosti, odzivi na spremembe v smeri polarizacije svetlobnega dražljaja pa o polarizacijski občutljivosti celic. Z uporabo svetlobne mikroskopije in rentgenske mikrotomografije smo rekonstruirali oko v 3D prostoru. Rekonstrukcija razkriva postavitev in

obliko omatidijev ter določanje regij z različno ostrino vida. Z uporabo transmisijske elektronske mikroskopije smo pridobili informacije o poziciji ter usmerjenosti mikrovilov, ki vsebujejo vidne pigmente, ključne za občutljivost na polarizirano svetlobo in organizacijo fotoreptornih celic v omatidijih. Za raziskave vizualnih lastnosti listov smo uporabili spektrofotometrijske in multispektralne polarimetrijske metode za določanje reflektance in stopnje polarizacije svetlobe, odbite z oljčnih listov različnih sort. Domnevamo, da so to vidni motivi, ki bi jih žuželke lahko izrabljale za izbiro gostiteljske rastline. Na osnovi podatkov o vidnem sistemu žuželk in vizualnih lastnosti oljčnih listov razvijamo in uporabljamo obstoječe modele, ki nam nudijo kvantitativen vpogled v sposobnost vidne prepoznavne gostiteljskih rastlin. Podatki vedenjskih testov s katerimi proučujemo vedenje ob izbiri med dvema ali več vidnimi stimuli in v prisotnosti ali odsotnosti olfaktornih dražljajev, nam omogočajo potrditev ali prilagoditev modelov vidne prepoznavne.

Rezultati in razprava: Z uporabo znotrajceličnih elektrofizioloških meritev smo identificirali tri različne tipe fotoreceptorjev z vrhom občutljivosti v UV, modrem in zelenem delu vidnega spektra. Prisotnost le teh omogoča trikromatski vid, ki ne zajema zaznave v rdečem delu spektra. Posebej visoki odzivi celic na smer polarizacije svetlobe, kažejo na potencialni pomen polarizacije pri razlikovanju med primernimi in manj primernimi gostiteljskimi rastlinami. Analiza z micro-CT je razkrila aerodinamično obliko očesa, verjetno kot prilagoditev na način gibanja in habitat slinaric. Preliminarni izsledki iz TEM analize kažejo, da pravokotna orientacija mikrovilov parov celic v istem omatidiju omogoča oponentno kodiranje polarizacije svetlobe, vendar ni jasno, ali se ta informacija prenaša v višje možganske centre. Pri analizi lastnosti svetlobe, odbite od oljčnih listov, z analitičnimi modeli, smo odkrili, da slinarice verjetno lahko ločijo med različnimi sortami oljk, predvsem na podlagi spektralnih razlik reflektirane svetlobe in morda polarizacije. Nadaljnje vedenjske raziskave bodo ponudile dodatne uvide in omogočile boljše razumevanje pridobljenih rezultatov. Raziskava nakazuje možnost uporabe vidnih signalov v strategijah »pull-push« za preprečevanje širjenja patogena *Xylella fastidiosa*. Prvi del strategije zajema lovljenje vektorjev v pasti (»pull«) in njihovo odvrčanje od občutljivih gostiteljskih vrst (»push«) z uporabo vizualnih maskirnih sredstev. Ta pristop odpira nove možnosti za razvoj trajnostnih metod zaščite rastlin.

ŽIVILSTVO

Vpliv koncentracije sladkorja na tvorbo aflatoksina B1 na modelnih mesnih gojiščih

Iva ZAHIJA JAZBEC^{1*}, Katja VAGAJA¹, Tomaž POLAK¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

* iva.zahija@bf.uni-lj.si

Uvod: Uživanje hrane, kontaminirane z aflatoksini (AF), predstavlja veliko tveganje. AF večinoma proizvajajo plesni rodu *Aspergillus*, ki jih lahko najdemo tudi v suhih fermentiranih mesnih izdelkih. V omenjenih izdelkih je najbolj toksičen aflatoksin B1 (AFB1). Študije, ki vključujejo različne modelne sisteme na osnovi mesa, omogočajo proučevanje različnih dejavnikov na rast plesni in proizvodnjo AF. Glavna prednost tovrstnih študij je, da omogočajo raziskave v nadzorovanem okolju ter medijih, ki so zelo podobni mesnim izdelkom. Glede na to, da je substrat eden najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na biosintezo sekundarnih metabolitov, smo v naši raziskavi proučevali vpliv sladkorja, kot glavnega vira ogljika, na biosintezo AFB1. Povezava med virom ogljika in tvorbo AF je dobro raziskana, saj imajo enostavni sladkorji, kot so glukoza in saharoza, pozitiven vpliv na tvorbo AF. Glukoza, saharoza, lahko tudi laktoza se pogosto uporabljajo v industrijski proizvodnji fermentiranih mesnih izdelkov. Med fermentacijo in zorenjem mlečnokislinske bakterije pretvorijo glukozo (njihov primarni vir energije) v mlečno kislino, glavno spojino odgovorno za zmanjšanje vrednosti pH; dodatek 1 % glukoze zmanjša vrednost pH za 1 enoto. Kisanje substrata ima učinek konzerviranja, zagotavlja varnost in prispeva k razvoju značilnih senzoričnih lastnosti fermentiranih mesnih izdelkov.

Material in metode: Na 4 modelnih sistemih mase za suhe salame (SM) v petrijevkah, inokuliranih s plesnijo *Aspergillus parasiticus*, smo proučevali vpliv koncentracije (0,3 in 1 %) sladkorjev (glukoza in saharoza) na tvorbo AFB1. Vzorce smo med inkubacijo pri temperaturi 25 °C vzorčili 3-krat, in sicer 7., 14. in 21. dan. Pri vzorcih, inkubiranih 21 dni, smo preverili še vpliv kolagenske bariere (ovitka za salame) na tvorbo AFB1. Izmerili smo velikost kolonij ter kvantificirali vsebnost AFB1 z UPLC/MS-MS. Določili smo tudi povezavo med velikostjo kolonije in vsebnostjo AFB1.

Rezultati in razprava: Največji povprečni premer kolonij smo določili na gojišču SM z dodatkom 1 % glukoze (SM-G-1) po 7, 14 in 21 dneh na gojišču SM z dodatkom 1 % saharoze (SM-S-1) in kolagensko bariero pa po 21 dneh. Na rast kolonij plesni *A. parasiticus* na gojišču SM z dodatkom glukoze je večja koncentracija sladkorja vplivala na večji premer kolonij, nasprotno pa večja koncentracija saharoze ni imela bistvenega vpliva na premer kolonij. Na tvorbo AFB1 pri plesnih vrste *A. parasiticus* sta imela značilen vpliv sestava medija in čas inkubacije. Večjo vsebnost AFB1 smo določili v medijih z večjo koncentracijo sladkorja. Na splošno se je največ AFB1 tvorilo na gojišču SM-S-1, razen po 7 dneh, ko smo največjo vsebnost AFB1 določili na gojišču SM-G-1. Kolagenska bariera je vplivala na manjšo tvorbo AFB1 v sami masi. Koeficient korelacije med velikostjo kolonij in vsebnostjo AFB1 je znašal 0,233.