

Mikrobi in biotehnologija

Mikrobi in biofilm

Mikrobi in zdravje

Mikrobi in protimikrobne učinkovine

Mikrobi in okolje

Mikrobi in analitika



**9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva**

14.–16. februar 2024

# **9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva**

## **14.–16. februar 2024, Maribor, Slovenija**

Knjiga povzetkov

### **Urednici:**

Darja Kušar, Urška Jamnikar Ciglencečki

### **Oblikovanje:**

Luka Milčinski

### **Izdajatelj:**

Slovensko mikrobiološko društvo, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

### **Leto izida:**

2024

### **Elektronska objava:**

Spletna izdaja dosegljiva na [www.smd.si](http://www.smd.si)

### **Slika na naslovnici:**

Podroben 3D prikaz bakterijske celice z bički in notranjimi strukturami - ustvarjeno z umetno inteligenco.

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

COBISS.SI-ID 184748803

ISBN 978-961-96562-0-4 (PDF)



# Knjiga povzetkov

**9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva**

14.–16. februar 2024

# Kazalo vsebine

<b>POZDRAVNI NAGOVOR</b>	12
<b>ORGANIZACIJA KONGRESA</b>	13
<b>SPONZORJI</b>	14
<b>PROGRAM KONGRESA</b>	16
<b>PLENARNI PREDAVANJI</b>	19
PT15 vzdržuje optimalno število bakterij <i>Bacillus subtilis</i> v koloniziranih rastlinah krompirja <b>Tjaša Lukan</b> , Karmen Pogačar, Barbara Kraigher, Katja Stare, Teja Grubar, Maja Zagorščak, Marko Petek, Ines Mandić-Mulec, Kristina Gruden	20
Vode - vir informacij o naravi in družbi <b>Maja Ravnikar</b> , Ion Gutierrez-Aguirre, David Dobnik, Arijana Filipič, Katarina Bačnik, Olivera Maksimović, Nina Prezelj, Alexandra Bogožalec Košir, Ana Vučurovič, Mojca Milavec, Anže Županič, Nataša Mehle, Denis Kutnjak	21
<b>VABLJENA SEKCIJSKA PREDAVANJA</b>	23
<b>Mikrobi in biotehnologija</b>	
Mehanizem adaptivne evolucije avtohtone kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za fermentacijo ajdove pивine Martina Podgoršek, Maja Paš, Iztok Jože Košir, <b>Neža Čadež</b>	25
Bakterijska nanoceluloza proizvedena na živilskem odpadu: material s široko uporabno vrednostjo <b>Janja Trček</b> , Urška Jančič, Eva Cepec, Maša Hren, Selestina Gorgieva	26
<b>Mikrobi in biofilm</b>	
Nova analiza prostorske segregacije mikrobov v mešanih biofilmih <b>Iztok Dogša</b> , Maja Bolješič, Barbara Kraigher, Ines Mandić-Mulec	28
Adhezija bakterije <i>Streptococcus mutans</i> na dentalne materiale <b>Anamarija Zore</b> , Nives Matjaković Mlinarič, Petra Virant, Mirjam Kozmos, Anže Abram, Klemen Bohinc	29

Vloga mikrobne glikobiologije pri proučevanju razvoja bakterijskih biofilmov 30  
Nika Janež, Meta Sterniša, Blaž Jug, Tanja Zupan, Aleksandar Sebastijanović, Milica Perišić Nanut, Katarina Karničar, Ajda Taler-Verčič, Dušan Turk, Anja Klančnik, Janez Štrancar, **Jerica Sabotič**

### Mikrobi in protimikrobne učinkovine

Pomen sekvenciranja celotnega genoma za spremljanje in obvladovanje širjenja hipervirulentnih sevov *Klebsiella pneumoniae* v regionalni bolnišnici 32  
**Tjaša Žohar Čretnik**, Tanja Selič Kurinčič, Alenka Petrovec Koščak, Majda Hrastnik, Sandra Janežič

### Mikrobi in okolje

Vzroki in posledice sorodstvenega razlikovanja pri bakteriji *Bacillus subtilis* 34  
**Polonca Štefanič**, Manca Mršol, Eva Stare, Katarina Belcijan, Barbara Kraigher, Mojca Krajnc, Katarina Šimunovič, David Stopar, Ulises Nunes da Rocha, Ines Mandić-Mulec

### Mikrobi in analitika

Uporaba in omejitve molekularnih metod qPCR, LAMP in dPCR za določanje in kvantifikacijo mikroorganizmov 36  
**Polona Kogovšek**

Ugotavljanje virusne kontaminacije živil – je sekvenciranje naslednje generacije res rešitev? 37  
**Urška Jamnikar-Ciglenciči**, Urška Kuhar

## IZBRANA SEKCIJSKA PREDAVANJA 39

### Mikrobi in biotehnologija

Nov pristop za izboljšanje produkcije antibiotika oksitetraciklina s tarčno redukcijo genoma bakterije *Streptomyces rimosus* 41  
**Alen Pšeničnik**, Lucija Slemc, Martina Avbelj, Miha Tome, Martin Šala, Paul Herron, Maksym Shmatkov, Marko Petek, Špela Baebler, Peter Mrak, Daslav Hranueli, Antonio Starčević, Iain S. Hunter, Hrvoje Petković

Genski inženiring vaginalnih laktobacilov in njihova vgradnja v nanovlakna 42  
**Spase Stojanov**, Tina Vida Plavec, Špela Zupančič, Aleš Berlec

Razvoj nove metode za detekcijo razgradnje plastike na primeru ekstremotolerantnih gliv 43  
**Anja Černoša**, Antonio Martínez Cortizas, Tjaša Danevčič, Nina Gunde-Cimerman, Cene Gostinčar

### Mikrobi in biofilm

Sorodstveno razlikovanje v biofilmih pri bakteriji *Bacillus subtilis* 45  
**Mojca Krajnc**, Katarina Šimunovič, Ines Mandić-Mulec, David Stopar, Polonca Štefanič

Prekinitev bakteriofagnega integracijskega gena povzroči nepričakovane spremembe pri *Bacillus subtilis* 46  
**Maja Popovič**, Anna Dragoš

Optodinamsko odstranjevanje biofilmov v modelnih paradontalnih in periimplantnih žepih 47  
Marko Volk, **Katja Molan**, Dominik Šavli, Matija Jezerše, Saša Terlep, Špela Levičnik-Höfferle, Matjaž Lukač, Mojca Trost, Boris Gašpir, David Stopar

**Mikrobi in zdravje**

- Nacionalno spremljanje nekaterih povzročiteljev zoonoz s sekvenciranjem celotnih genomov 49  
**Marija Trkov**, Tom Koritnik, Verica Mioč, Bojan Papič, Mateja Pirš, Eva Kotnik, Živa Petrovič, Aleksander Todorovič, Mateja Ravnik, Samo Jeveřic, Anamarija Juriševič Dodič, Ingrid Berce, Eva Grilc, Tjaša Cerar Kišek, Andrej Steyer
- Sesalski ortoreovirusi iz netopirjev predstavljajo nove možne porajajoče se patogene 50  
**Tina Mikuletič**, Danijela Černe, Peter Hostnik, Tanja Švara, Mitja Gombač, Marko Kolenc, Andrej Steyer
- Prenosi bakterije *Clostridioides difficile* med različnimi rezervoarji v Sloveniji: izsledki genomskih primerjav 51  
**Sandra Janežič**, Urška Dobovišek, Maja Rupnik
- Odkrivanje označevalcev za določanje živalskih virov fekalnega onesnaženja vode z analizo gena za 16S rRNA 52  
**Tanja Žlender**, Lucija Brezočnik, Vili Podgorelec, Maja Rupnik
- Priprava večfunkcionalnih bakterij *Lactococcus lactis* s terapevtskim potencialom 53  
Tina Vida Plavec, Abida Zahirovič, Petr Malý, **Aleš Berlec**
- Razvoj nanovlaken z vgrajenimi sevi rodu *Bacillus* za zdravljenje parodontalne bolezni 54  
**Špela Zupančič**, Nina Katarina Grilc, Anže Zidar, Petra Kocbek, Tomaž Rijavec, Teja Colja, Aleš Lapanje, Matjaž Jeras, Martina Gobec, Julijana Kristl

**Mikrobi in protimikrobne učinkovine**

- Prisotnost večkratno odpornih bakterij v bolnišnični odpadni vodi 56  
**Leon Marič**, Lea Knez, Goran Novak, Maja Rupnik, Sandra Janežič, Andrej Golle
- Večkratno odporne po Gramu negativne bakterije v slovenskih sladkovodnih ribogojnicah 57  
Lana Senič, Sandra Janežič, Marija Seničar, Rosvita Sitar, **Valerija Tkalec**
- Probiotik proti patogenu: boj za obstanek v dobrem in slabem 58  
**Eli Podnar**, Eva Kovačec, Tjaša Danevčič, Bram Lories, Hans Steenackers, Ines Mandić-Mulec
- Biološka aktivnost izbranih izolatov aktinomicet iz kraških jam ter njihova taksonomska uvrstitev 59  
**Martina Avbelj**, Maja Paš, Nuša Papler, Jernej Jakše, Anja Klančnik, Doroteja Vlaj, Janez Mulec, Hrvoje Petkovič
- Razvoj novih zaviralcev bakterijskih topoizomeraz za zdravljenje okužb z rezistentnimi grampozitivnimi bakterijami 60  
**Martina Hrast Rambauer**, Marko Anderluh, Nikola Minovski, Irena Zdovc

**Mikrobi in okolje**

- Populacijska genomika in razširjanje mikroorganizmov 62  
**Cene Gostinčar**, Anja Černoša, Martina Turk, Polona Zalar, Nina Gunde-Cimerman
- Odkrivanje in zaznavanje virusov povezanih s tujerodnimi (invazivnimi) vrstami 63  
**Denis Kutnjak**, Katarina Bačnik, Luka Kranjc, Sandra Hudina, Ivana Maguire, Ana Bielen, Dora Pavič, Leticia Botella, Jiří Patoka, Antonín Kouba
- Sorodstveno razlikovanje med sevi *Bacillus subtilis* lahko vpliva na zmožnost razširjanja surfaktinskih goljufov znotraj populacije 64  
**Katarina Belcijan Pandur**, Barbara Kraigher, Ana Tomac, Jernej Kralj, Zala Vašl, Polonca Štefanič, Ines Mandić Mulec
- Mikrobna razgradnja detrita meduz spodbuja rast fitoplanktona v obalnem morskem ekosistemu 65  
**Tinkara Tinta**, Eduard Fadeev, Mauro Celussi, Katja Klun, Vesna Flander-Putrlje, Patricija Mozetič, Gerhard J Herndl

Epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji 66  
**Tom Koritnik**, Vid Vedlin, Tea Janko, Maja Bolješič, Verica Mioč, Tatjana Jurša, Boštjan Križanec, Natalija Kranjec, An Galičič, Tjaša Cerar Kišek, Andrej Steyer

### Mikrobi in analitika

Izboljšane analitske metode za varnejša in učinkovitejša genska zdravila 68  
**Mojca Janc**, Kaja Zevnik, Jana Deurič, David Dobnik

Oblikovanje in testiranje testov PCR v realnem času za specifično detekcijo bakterij na podlagi genomskih podatkov 69  
**Aleksander Benčič**, Tanja Dreo

Spremljanje razširjenosti respiratornega sincicijskega virusa s pristopom epidemiologije odpadnih voda (WBE): retrospektivna študija na vzorcih iz nacionalnega spremljanja SARS-CoV-2 70  
**Nina Prezelj**, Ion Gutierrez-Aguirre, Nikita Matović, Živa Lengar, Maja Ferle, Irena Bajde, Mojca Milavec, Alexandra Bogožalec Košir, Olivera Maksimović, Anže Županič, Maja Ravnikar, Denis Kutnjak

G-kvadrupeksi v patogenih organizmih 71  
**Melani Potrč**, Irena Drevenšek Olenik, Lea Spindler

## POSTRI 73

### Mikrobi in biotehnologija

Hruškov in jabolčno-grozdni kis: vir industrijsko zanimivih sevov iz rodov *Acetobacter*, *Novacetimonas* in *Komagataeibacter* 75  
**Bernarda Karničnik**, Janja Trček

Uporaba medgenske regije 16S–23S rDNA za neposredno vrstno identifikacijo sestave očetnokislinske bakterijske populacije 76  
**Alja Ribič**, Janja Trček

Metagenom komposta kot vir encimov za proizvodnjo biogoriv 2. generacije 77  
**Maša Vodovnik**, Viktor Zupančič, Ljubomir Radič, Anna M. Alessi, Neil C. Bruce

### Mikrobi in biofilm

Inovativna metoda za kvantifikacijo bakterij *Campylobacter jejuni* znotraj biofilma 79  
**Tjaša Čukajne**, Orhan Sahin, Qijing Zhang, Aleš Berlec, Anja Klančnik

Vpliv gojišča na tvorbo biofilmov pri encime ESBL-producirajočih sevih *Escherichia coli*, izoliranih iz spodnjih dihal človeka 80  
**Katja Hrovat**, Jerneja Čremožnik Zupančič, Katja Seme, Jerneja Ambrožič Avguštin

Mikroplastika in mikrobiološko tveganje v prehranski verigi 81  
**Anja Klančnik**, Živa Kolenc, Manca Kovač Viršek

Sposobnost tvorbe biofilma bakterije *Salmonella* Infantis na različnih površinah in protimikrobno delovanje izbranih biocidov 82  
**Katja Kranjc**, Jana Avberšek, Neva Šemrov, Darja Barlič Maganja, Olga Zorman Rojs

Vpliv mutacij v genih pomembnih pri tvorbi biofilmov bakterij *Campylobacter jejuni* 83  
Pina Osovnikar, Manca Volk, **Anja Klančnik**

Tvorba biofilma pri izbranih sevih bakterije <i>Escherichia coli</i> in korelacije z lastnostmi sevov in njihovo patogenostjo	84
Luka Predojevič, Mateja Erdani Kreft, Darja Keše, Darja Žgur Bertok, <b>Marjanca Starčič Erjavec</b>	
Vpliv mutacij v genih pomembnih za tvorbo biofilma na adhezijo in invazijo bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> v celicah Caco-2	85
<b>Maja Šikić Pogačar</b> , Tjaša Damijan, Tomaž Langerholc, Manca Volk, Anja Klančnik	
Biološki procesi vključeni v tvorbo in razvoj biofilma bakterij <i>Campylobacter jejuni</i>	86
<b>Manca Volk</b> , Anja Klančnik	
<b>Mikrobi in zdravje</b>	
Pilotna študija bakterijskih združb pri bolnikih z rakom sečnega mehurja	88
<b>Tomaž Accetto</b> , Katja Strašek Smrdel, Milena Taskovska, Marjanca Starčič Erjavec, Aleksandar Janev, Tomaž Smrkolj, Katja Seme, Mateja Erdani Kreft	
Pojavljane enterovirusa D68 v kliničnih vzorcih testiranih na NLZOH Maribor med leti 2021 in 2023	89
<b>Mojca Cimerman</b> , Nika Volmajer, Nataša Berginc, Katja Soršak, Emina Bešić, Natalia Abramenko, Andrej Golle	
Dualistična narava mikroorganizmov: po gramu pozitivne bakterije iz rodu <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> in <i>Clostridium</i> kot probiotiki in patogeni	90
<b>Sabina Fijan</b> , Andrej Steyer, Mojca Fifer	
Probiotiki nove generacije – definicije, karakterizacija, mehanizmi delovanja	91
<b>Sabina Fijan</b> , Ana Ungar, Maja Šikić Pogačar	
Razširjenost in molekularna opredelitev strameopile <i>Blastocystis</i> spp. pri ljudeh in psih	92
<b>Diana Jernej</b> , Andrej Steyer, Tina Triglav, Tina Mikuletič, Barbara Šoba	
COVID-19: razvoj materialov s protivirusnim delovanjem in testiranje učinkovitosti filtracije zaščitnih mask	93
Tamara Košir, Katja Fric, Arijana Filipič, Maja Ravnikar, Olivija Plohl, Lidija Fras Zemljič, Ivan Jerman, <b>Polona Kogovšek</b>	
Razširjenost hipervirulentnih sevov bakterije <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94
<b>Dane Lužnik</b> , Vesna Špendal, Nataša Fajfar, Viktorija Tomič	
Rekombinantna mlečnokislinska bakterija <i>Lactococcus lactis</i> z zmožnostjo izločanja heterolognih endolizinov proti patogeni bakteriji <i>Clostridioides difficile</i>	95
<b>Jure Pohleven</b> , Maruša Bizjak, Maja Rupnik, Krištof Bozovičar, Tomaž Bratkovič, Aleš Berlec	
Vpliv škroba na sestavo mikrobioma vampa pri ovcah in razvoj subakutne vampove acidoze (SARA)	96
<b>Alen Radolič</b> , Luka Lipoglavšek, Lijana Fanedl, Gorazd Avguštin	
Ali brakični obalni ekosistemi res predstavljajo nevarnost za nove oblike škodljivih cvetenj alg v Sloveniji?	97
<b>Petra Slavinec</b> , Janja Francé, Patricija Mozetič	
Genomska analiza prvih slovenskih izolatov bakterije <i>Leptospira</i> spp.	98
<b>Katja Strašek Smrdel</b> , Eva Ružič Sabljic, Andraž Celar Šturm, Tjaša Cerar Kišek	
<b>Mikrobi in protimikrobne učinkovine</b>	
Pojavnost protimikrobne odpornosti indikatorjev fekalnega onesnaženja pri različnih fazah čiščenja v dveh komunalnih čistilnih napravah	100
Eva Mežnar, Aneja Štuhec, Darja Istenič, <b>Karmen Godič Torkar</b>	



Primerjava genotipov pri encime ESBL-producirajočih sevih <i>Escherichia coli</i> , izoliranih iz spodnjih dihal človeka, v obdobju pred in med pandemijo COVID-19 (2017-2022)	101
<b>Katja Hrovat</b> , Jerneja Čremožnik Zupančič, Katja Seme, Jerneja Ambrožič Avguštin	
Konsolidacija in integracija genomskih analiz za rutinsko spremljanje večkratno odpornih bakterij v Sloveniji – prvi rezultati projekta SLOSEQ	102
<b>Sandra Janežič</b> , Andrej Golle, Urška Kramar, Maja Rupnik, Helena Ribič	
Okužba totalne kolčne endoproteze z večkratno odpornim <i>Acinetobacter baumannii</i> CRAb – CP: predstavitev primera	103
<b>Erika Jerele</b> , Matevž Bajuk	
Molekularni pristop pri študiju vpliva monoterpenov na bakterijo <i>Campylobacter jejuni</i>	104
<b>Blaž Jug</b> , Dina Jug, Sonja Smole Možina, Anja Klančnik	
Vpliv kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na rast bakterij <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	105
Žana Lovšin, Tadej Kotnik, <b>Anja Klančnik</b>	
Vpliv potencialnega probiotičnega seva ŽP in bakteriofaga AL na uropatogeno <i>Escherichia coli</i> DL82 v <i>in vitro</i> TIM modelih	106
<b>Aleksander Lesar</b> , Carlos Miguel Nobrega Mendonca, Tinkara Šubic, Laura Balta, Tomaž Accetto, Koen Venema, Marjanca Starčič Erjavec	
Strukturni vpogled v encime sinteze polisaharidnega liganda, ki sidrajo S-plast na površino bakterije <i>Clostridioides difficile</i>	107
<b>Nataša Lindič</b> , Aleksandra Usenik, Jure Loboda, Matej Novak, Marinka Horvat, Tjaša Peternel, Jure Borišek, Nikola Minovski, Janez Mravljak, Martina Hrast Rambaher, Marjana Novič, Robert Vidmar, Dušan Turk	
Antibakterijska aplikacija nanomaterialov ZnO in CuO, imobiliziranih v polielektrolitne plasti	108
<b>Nives Matijaković Mlinarić</b> , Anamarija Zore, Aleksander Učakar, Anže Abram, Andrijana Sever Škapin, Klemen Bohinc	
Elektrolizirana oksidativna fiziološka raztopina (EOS) kot nova ustna voda za preprečevanje prenosa virusov, študija <i>in vitro</i>	109
Haris Munjakovič, <b>Tina Mikuletič</b> , Naiera Zayed, Snežana Kramar, Tina Triglav, Katja Seme, Wim Teughels, Andrej Steyer, Aleš Fidler, Rok Gašperšič	
Vpliv pandemije covid-19 na porabo antibiotikov in pojav okužb z bakterijami odpornimi proti antibiotikom	110
Konrad Kranjec, Dominika Vrbnjak, Urška Kramar, Aleksander Šeruga, Sonja Šostar Turk, <b>Urška Rozman</b>	
Zdravljenje okužb umetnih sklepov s fagno terapijo: ocenjevanje učinkovitosti in varnosti na mišjem modelu	111
<b>Vida Štilec</b> , Monika Marušič, Nikolaja Janež, Helena Motaln, Maša Čater, Rihard Trebše, Andrej Coer, Simon Horvat, Matjaž Peterka	
Protimikrobno delovanje različnih vrst slovenskega medu	112
<b>Mateja Šuštar</b> , Ajda Kunčič, Nataša Lilek, Andreja Kandolf Borovšak, Sonja Smole Možina	
<b>Mikrobi in okolje</b>	
Proti protimikrobnim učinkovinam odporne in patogene bakterije <i>Escherichia coli</i> v kraških izvirih Malenščica pri Planini in Rižana	114
<b>Jerneja Čremožnik Zupančič</b> , Katja Hrovat, Manca Gavez, Eva Grm, Miha Derenčin, Ajda Jaklič, Hana Avguštin, Veronika Bezenšek, Klemen Kramar, Irena Zdovc, Janez Mulec, Andreea Oarga-Mulec, Jerneja Ambrožič Avguštin	
Sporogene bakterije in njihova protimikrobna aktivnost v čebeljem pelodu	115
<b>Michelle Berra</b> , <b>Anja Štangar</b> , Gordana Glavan, Janko Božič, Damijana Kastelec, Ines Mandič Mulec, Polonca Štefanič, Anna Dragoš	

Pajčje mreže: naravna alternativa pasivnim lovilcem trosov gliv na primeru jesenove pečljevke ( <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> ), povzročiteljice jesenovega ožiga	116
<b>Maja Ferle</b> , Polona Kogovšek, Nikica Ogris, Matjaž Gregorič, Janko Šet, Denis Kutnjak	
Dokaz norovirusov v pitni vodi ob hidričnem izbruhu	117
<b>Adela Fratnik Steyer</b> , Andrej Steyer, Mojca Cimerman, Nika Volmajer, Mojca Šoštarčič, Matjaž Retelj, Tjaša Frangež, Tatjana Rupel, Katja Zelenik	
Širitev zbirke vampnih <i>Prevotella</i> : opis <i>Prevotella communis</i> , nove vrste ovčjega izvora	118
<b>Eva Grabner</b> , Eva Stare, Lijana Fanelj, Maša Zorec, Dakota S. Jones, Christopher D. Johnston, Gorazd Avguštin, Tomaž Accetto	
Spbetavirusi vplivajo na vedenje bakterije <i>Bacillus subtilis</i> v različnih okoljskih pogojih	119
<b>Virginie Grosboillot</b> , Anna Dragoš	
Izboljšana identifikacija bakterij rodu <i>Xanthomonas</i> izoliranih iz fižola ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) z določanjem informativnih nukleotidov v črtnih kodah DNA	120
<b>Vladimir Grujić</b> , Manca Pirc, Tanja Dreo, Neža Turnšek, Špela Prijatelj Novak, Janja Matičič, Aleksander Benčič	
Razširjen vpogled v prisotnost rastlinskih virusov v ekosistemu s pomočjo analize viroma različnih tipov vzorcev	121
<b>Ion Gutiérrez-Aguirre</b> , Mark Paul Selda Rivarez, Olivera Maksimović, Katarina Bačnik, Zala Kogej, Anja Pecman, Živa Lengar, Nataša Mehle, Ana Vučurović, Maja Ravnikar, Denis Kutnjak	
Vpliv mucinov na interakcije med bakteriofagi in gostiteljsko bakterijo	122
<b>Jaka Jakin Lazar</b> , Katarina Šimunović, Izток Dogša, Ines Mandič Mulec, Mathias Middelboe, Anna Dragoš	
Prenos mikrobnih združb z mikroplastiko: vzorci s slovenske obale	123
<b>Živa Kolenc</b> , Manca Kovač Viršek, Nicol Janecko, Anja Klančnik	
Interakcije med sevi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> in vloga genskega lokusa <i>wapAI</i>	124
<b>Barbara Kraigher</b> , Maja Bolješič, Nurten Tetik, Ivona Viduka, Gennaro Velotto, Gaja Panjtar, Nina Puhan, Polonca Štefanič, Ines Mandič-Mulec	
Preučevanje glivne razgradnje sintetičnih restavratorskih materialov z metodo FTIR-PAS	125
<b>Amela Kujović</b> , Katja Kavkler, Tomaž Skapin, Polona Zalar	
Viromska analiza antičnih vzorcev oliv	126
Dijana Škorić, Renata Šoštarčič, Olivera Maksimović Carvalho Ferreira, Lana Vogrinec, Jurica Bezak, <b>Denis Kutnjak</b>	
Otoki umivalnikov kot potencialni rezervoar večkratno odpornih bakterij v bolnišničnem okolju	127
<b>Aleksander Mahnič</b> , Urška Ajd, Sandra Janežič, Marjanca Starčič Erjavec, Maja Rupnik, Andrej Golle	
Voda in rastni substrat onesnaženi s tobamovirusi - vir okužbe rastlin	128
<b>Nataša Mehle</b> , Irena Bajde, Jakob Brodarič, Adrian Fox, Miha Kitek, Denis Kutnjak, Maja Ravnikar, Ana Vučurović	
Raziskovanje transpeptidazne aktivnosti papainu-podobne cisteinske proteaze CrCEP1 iz zelene alge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	129
<b>Katarina P. van Midden</b> , Pitter Huesgen, Renier A. L. van der Hoorn, Marina Klemenčič	
Človeška črevesna mikrobiota v domačem okolju	130
<b>Urša Miklavčič</b> , Sandra Janežič, Maja Rupnik	
Transkriptomaska analiza genskih skupkov za razgradnjo hemiceluloz in pektinov v dveh vampnih vrstah bakterij <i>Prevotella</i> nakazuje na različne substratne preference	131
<b>Urška Murovec</b> , Tomaž Accetto	

Zmanjševanje emisij metana pri prežvekovalcih: mikrobiomski pogled v učinkovanje rastlinskih izvlečkov kot alternativa antibiotičnim krmnim dodatkom	132
<b>Alen Radolič</b> , Luka Lipoglavšek, Lijana Fanelj, Gorazd Avguštin	
Anotacija in pan-genomska analiza visokosorodnih sevov <i>Bacillus subtilis</i> iz nabrežja reke Save	133
<b>Eva Stare</b> , Jasna Kovač, Ulisses Nunes da Rocha, Ines Mandič-Mulec, Polonca Štefanič	
Longitudinalna stabilnost črevesnih profagov pri bakterijski družini <i>Bacteroidaceae</i>	134
<b>Nejc Stopnišek</b> , Stina Hedžet, Maja Rupnik, Tomaž Accetto	
Učinki in mehanizmi delovanja potencialnega probiotika <i>Bacillus subtilis</i> PS-216 proti patogeni bakteriji <i>Campylobacter jejuni</i>	135
<b>Katarina Šimunović</b> , Polonca Štefanič, Anja Klančnik, Manuela Di Lorenzo, Vida Rezar, Janez Salobir, Tatjana Pirman, Maja Šikić Pogačar, Olga Zorman Rojs, Uroš Krapež, Sonja Smole Možina, Ines Mandič Mulec	
Bakterija <i>Clostridioides difficile</i> v domačih kompostnikih in malih sesalcih	136
<b>Klemen Tršinar</b> , Sabina Mlakar, Franc Janžekovič, Maja Rupnik, Sandra Janežič	
Virulentni potencial sevov rodu <i>Aeromonas</i> s kože človeške ribice in njenega okolja	137
Lea Becner, Nina Gunde-Cimerman, <b>Martina Turk</b>	
Novi virusi morskih kremenastih alg iz slovenske obale	138
<b>Timotej Turk Dermastia</b> , Denis Kutnjak, Katarina Bačnik	
Vpliv lizogenih fagov na genomsko reorganizacijo bakterij na nivoju posameznih celic z uporabo metode CRISPRi-Seq	139
<b>Nina Vesel</b> , Anna Dragoš	
Raziskovanje viromov makrofitov z uporabo dveh različnih pristopov	140
<b>Lana Vogrinec</b> , Katarina Bačnik, Martina Bačič, Zarja Miović, Denis Kutnjak	
Množičen pogin leščurjev ( <i>Pinna nobilis</i> ) v slovenskem morju v letu 2020	141
<b>Urška Zajc</b> , Mitja Gombač, Bojan Papić, Borut Mavrič, Darja Kušar	
<b>Mikrobi in analitika</b>	
<i>Phyllosticta citricarpa</i> povzročiteljica bolezni črna pegavost agrumov: razvoj in validacija metode ter spremljanje njene prisotnosti v sredozemskih nasadih agrumov	143
<b>Tjaša Jakomin</b> , Maja Ferle, Sara Fišer, Maja Ravnikar, Antonio Vicent, Naima Boughalleb-M'Hamdi, Neil Boonham, Polona Kogovšek	
PCR v realnem času za ugotavljanje klonalnih kompleksov bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> v kompleksnih vzorcih DNA	144
<b>Maja Kavalič</b> , Darja Kušar, Jana Avberšek, Benjamin Felix, Bojan Papić	
Rekonstrukcija fitoplazemskih genomov za epidemiološke raziskave s pomočjo sekvenciranja z nanoporami	145
<b>Nataša Mehle</b> , Zala Kogej Zwitter, Denis Kutnjak	
Validacija metode PCR v realnem času za kvantifikacijo bakterije <i>Paenibacillus larvae</i> v čebeljem drobirju	146
<b>Urška Zajc</b> , Jana Avberšek, Maja Kavalič, Tina Pirš, Darja Kušar	
<b>KAZALO AVTORJEV</b>	147

# Pozdravni nagovor

Spoštovani člani Slovenskega mikrobiološkega društva in vsi drugi, ki so vas mikrobi očarali!

V Slovenskem mikrobiološkem društvu smo se v 2023, ko bi sicer minilo tri leta od našega zadnjega kongresa, ki je septembra 2020 potekal kot virtualna konferenca, in je torej bil čas, da organiziramo spet kongres, odločili, da bomo naslednji kongres SMD organizirali v 2024 v zimskem letnem času, da se umaknemo »kongresni septembrski gneči«. Glede na število registracij in poslanih povzetkov za kongres 2024 lahko ocenjujem, da je bila odločitev pravilna in da bi tudi v prihodnje ta letni čas lahko bil primeren za naša kongresna druženja.

Ker je v septembru 2020 kongres SMD potekal virtualno, smo takrat prvič pripravili zbornik prispevkov kot e-zbornik. Ker ste člani društva ta e-zbornik sprejeli z odobravanjem, smo tudi zbornik kongresa SMD 2024 pripravili kot e-zbornik. V njem so 104 prispevki, ki zrcalijo novo pridobljene rezultate na področju mikrobiologije v Sloveniji v obdobju 2021–2023. Kot se boste lahko sami prepričali, je bilo to obdobje za slovensko mikrobiologijo zelo plodno in raznoliko. Prispevke smo tako razdelili v naslednje tematske sklope: Mikrobi in biotehnologija, Mikrobi in biofilm, Mikrobi in zdravje, Mikrobi in protimikrobne učinkovine, Mikrobi in okolje ter Mikrobi in analitika.

V upanju, da bo vsak izmed vas v e-zborniku našel številne prispevke, ki ga bodo pritegnili, pa tudi navdihnili za nadaljnje delo in sodelovanja med nami, vam želim vse dobro za prihodnost in obilo novih, lepih, zanimivih rezultatov, da se bomo lahko tudi čez tri leta spet srečali in družili na kongresu Slovenskega mikrobiološkega društva, ki bo pokazal razvoj naše stroke, na katerega bomo vsi lahko ponosni.

prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec  
Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

# Organizacija kongresa

## SLOVENSKO MIKROBIOLOŠKO DRUŠTVO

www.smd.si

### VODJA PROGRAMSKEGA ODBORA

prof. dr. **Marjanca Starčič Erjavec**

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

### VODJA ORGANIZACIJSKEGA ODBORA

prof. dr. **Maja Rupnik**

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor

### PROGRAMSKI ODBOR

**Marjanca Starčič Erjavec**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Tomaž Accetto**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Jerneja Ambrožič** Avguštin, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Darja Barlič Maganja**, Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem

**Tjaša Cerar Kišek**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ljubljana

**Iztok Dogša**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Urška Jamnikar Ciglencečki**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Polona Kogovšek**, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

**Polonca Štefanič**, Biotehniška fakulteta

**Valerija Tkalec**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor

**Janja Trček**, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru

**Maša Vodovnik**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Anamarija Zore**, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

### ORGANIZACIJSKI ODBOR

**Sandra Janežič**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor

**Maja Rupnik**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor

**Nejc Stopnišek**, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor

**Urška Jamnikar Ciglencečki**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Darja Kušar**, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

# Sponzorji

## SREBRNI

---

**KEMOMED**

## BRONASTI

---

**BGI**

**bia**

ZANESLJIV  
LABORATORIJSKI  
PARTNER

**KOBIS**



Labena

**LOTRIČ** METROLOGY



mediline

**METTLER TOLEDO**

omegac

 **Sanolabor**

 **Semlab**

 **Avantor™**  
delivered by **VWR™**

## BISERNI

---

**ACIES**  **BIO**

 **Axonlab**  
connecting ideas

 **BIOMEDICA**  
BIOMEDIS

 **JAFRAL**  
passion for biosolutions

**LABORMED**

 *Maritim d.o.o.*

 **Roche**

## SAFIRNI

---

 **CHEMASS**  
MERILNI SISTEMI

 **DONAU LAB** Ljubljana  
Member of LPPgroup

 **MEDIASi**

# Program kongresa

## Sreda, 14. februar, 2024

12:00–14:00		Registracija	
14:00–14:15		Otvoritev kongresa	
14:15–15:00	PPr	PT15 vzdržuje optimalno število bakterij <i>Bacillus subtilis</i> v koloniziranih rastlinah krompirja	Tjaša Lukan
15:00–16:25	S1	<b>Mikrobi in biotehnologija</b> Janja Trček, Maša Vodovnik	
15:00–15:20	VPr	Mehanizem adaptivne evolucije avtohtone kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za fermentacijo ajdove pивine	Neža Čadež
15:20–15:40	VPr	Bakterijska nanoceluloza proizvedena na živilskem odpadu: material s široko uporabno vrednostjo	Janja Trček
15:40–15:55	Pr	Nov pristop za izboljšanje produkcije antibiotika oksitetraciklina s tarčno redukcijo genoma bakterije <i>Streptomyces rimosus</i>	Alen Pšeničnik
15:55–16:10	Pr	Genski inženiring vaginalnih laktobacilov in njihova vgradnja v nanovlakna	Spase Stojanov
16:10–16:25	Pr	Razvoj nove metode za detekcijo razgradnje plastike na primeru ekstremotolerantnih gliv	Anja Černoša
16:25–17:30		Odmor za kavo in predstavitev posterjev (S1–S3)	
17:30–19:00	S2	<b>Mikrobi in biofilm</b> Anamarija Zore, Iztok Dogša	
17:30–17:50	VPr	Nova analiza prostorske segregacije mikrobov v mešanih biofilmih	Iztok Dogša
17:50–18:00	Pr	Sorodstveno razlikovanje v biofilmih pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i>	Mojca Krajnc
18:00–18:10	Pr	Prekinitev bakteriofagnega integracijskega gena povzroči nepričakovane spremembe pri <i>Bacillus subtilis</i>	Maja Popović
18:10–18:30	VPr	Adhezija bakterij <i>Streptococcus mutans</i> na dentalne materiale	Anamarija Zore



18:30–18:40	Pr	Optodinamsko odstranjevanje biofilmov v modelnih paradontalnih in periimplantnih žepih	Katja Molan
18:40–19:00	VPr	Vloga mikrobne glikobiologije pri proučevanju razvoja bakterijskih biofilmov	Jerica Sabotič
19:00–22:00		Sprejem (večerja)	

## Četrtek, 15. februar, 2024

09:00–10:30	S3	<b>Mikrobi in zdravje</b> Darja Barlič Maganja, Tjaša Cerar Kišek	
09:00–09:15	Pr	Nacionalno spremljanje nekaterih povzročiteljev zoonoz s sekvenciranjem celotnih genomov	Marija Trkov
09:15–09:30	Pr	Sesalski ortoreovirusi iz netopirjev predstavljajo nove možne porajajoče se patogene	Tina Mikuletič
09:30–09:45	Pr	Prenosi bakterije <i>Clostridioides difficile</i> med različnimi rezervoarji v Sloveniji: izsledki genomske primerjave	Sandra Janežič
09:45–10:00	Pr	Odkrivanje označevalcev za določanje živalskih virov fekalnega onesnaženja vode z analizo gena za 16S rRNA	Tanja Žlender
10:00–10:15	Pr	Priprava večfunkcionalnih bakterij <i>Lactococcus lactis</i> s terapevtskim potencialom	Aleš Berlec
10:15–10:30	Pr	Razvoj nanovlaken z vgrajenimi sevi rodu <i>Bacillus</i> za zdravljenje parodontalne bolezni	Špela Zupančič
10:30–11:30		Odmor za kavo in predstavitev posterjev (S4–S6)	
11:30–13:00	S4	<b>Mikrobi in protimikrobne učinkovine</b> Jerneja Ambrožič Avguštin, Valerija Tkalec	
11:30–11:50	VPr	Pomen sekvenciranja celotnega genoma za spremljanje in obvladovanje širjenja hipervirulentnih sevov <i>Klebsiella pneumoniae</i> v regionalni bolnišnici	Tjaša Žohar Čretnik
11:50–12:05	Pr	Prisotnost večkratno odpornih bakterij v bolnišnični odpadni vodi	Leon Marič
12:05–12:20	Pr	Večkratno odporne po Gramu negativne bakterije v slovenskih sladkovodnih ribogojnicah	Valerija Tkalec
12:20–12:35	Pr	Probiotik proti patogenu: boj za obstanek v dobrem in slabem	Eli Podnar
12:35–12:50	Pr	Biološka aktivnost izbranih izolatov aktinomycet iz kraških jam ter njihova taksonomska uvrstitev	Martina Avbelj
12:50–13:00	Pr	Razvoj novih zaviralcev bakterijskih topoizomeraz za zdravljenje okužb z rezistentnimi grampozitivnimi bakterijami	Martina Hrast Rambaher
13:00–14:30		Kosilo	
14:30–16:00		Okrogla miza: 30 let študija mikrobiologije	
16:00–17:00		Občni zbor SMD in odmor za kavo	
19:00–22:00		Svečana večerja s podelitvijo priznanj SMD	

## Petek, 16. februar, 2024

09:00–9:45	PPr	Vode - vir informacij o naravi in družbi	Maja Ravnikar
09:45–11:20	S5	<b>Mikrobi in okolje</b> Polonca Štefanič, Tomaž Accetto	
09:45–10:05	VPr	Vzroki in posledice sorodstvenega razlikovanja pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i>	Polonca Štefanič
10:05–10:20	Pr	Populacijska genomika in razširjanje mikroorganizmov	Cene Gostinčar

10:20–10:35	Pr	Odkrivanje in zaznavanje virusov povezanih s tujerodnimi (invazivnimi) vrstami	Denis Kutnjak
10:35–10:50	Pr	Sorodstveno razlikovanje med sevi <i>Bacillus subtilis</i> lahko vpliva na zmožnost razširjanja surfaktinskih goljufov znotraj populacije	Katarina Belcijan
10:50–11:05	Pr	Mikrobna razgradnja detrita meduz spodbuja rast fitoplanktona v obalnem morskem ekosistemu	Tinkara Tinta
11:05–11:20	Pr	Epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji	Tom Koritnik
11:20–11:50		Odmor za kavo	
11:50–13:10	S6	<b>Mikrobi in analitika</b> Polona Kogovšek, Urška Jamnikar Ciglencečki	
11:50–12:10	VPr	Uporaba in omejitve molekularnih metod qPCR, LAMP in dPCR za določanje in kvantifikacijo mikroorganizmov	Polona Kogovšek
12:10–12:30	VPr	Ugotavljanje virusne kontaminacije živil – je sekvenciranje naslednje generacije res rešitev?	Urška Jamnikar Ciglencečki
12:30–12:40	Pr	Izboljšane analitske metode za varnejša in učinkovitejša genska zdravila	Mojca Janc
12:40–12:50	Pr	Oblikovanje in testiranje testov PCR v realnem času za specifično detekcijo bakterij na podlagi genomskih podatkov	Aleksander Benčič
12:50–13:00	Pr	Spremljanje razširjenosti respiratornega sincicijskega virusa s pristopom epidemiologije odpadnih voda (WBE): retrospektivna študija na vzorcih iz nacionalnega spremljanja SARS-CoV-2	Nina Prezelj
13:00–13:10	Pr	G-kvadruleksi v patogenih organizmih	Melani Potrč
13:10		Podelitev nagrad za posterje in zaključek kongresa	

# Plenarni predavanji

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## PT15 vzdržuje optimalno število bakterij *Bacillus subtilis* v koloniziranih rastlinah krompirja

Tjaša Lukan<sup>1</sup>, Karmen Pogačar<sup>1</sup>, Barbara Kraigher<sup>2</sup>, Katja Stare<sup>1</sup>, Teja Grubar<sup>1</sup>, Maja Zagorščak<sup>1</sup>, Marko Petek<sup>1</sup>, Ines Mandić-Mulec<sup>2</sup>, Kristina Gruden<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 121, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

tjasa.lukan@nib.si

Ker je krompir tretja najpomembnejša poljščina na svetu, občutljiva na številne patogene organizme, je preučevanje interakcije med krompirjem in *Bacillus subtilis* ključnega pomena za zagotovitev učinkovitega in okolju prijaznega sistema zaščite rastlin. Namen raziskave je bil preučiti odziv rastlin krompirja na kolonizacijo z *B. subtilis*. Spremljali smo izražanje izbranih genov v koloniziranih koreninah in sistemskem tkivu rastlin in pokazali statistično značilno povečanje izražanja genov PT15 in 13LOX. Rezultati RNA-seq analize z *B. subtilis* inokuliranih korenin rastlin krompirja in sistemskega tkiva v različnih časovnih točkah so pokazali razlike tako na nivoju procesov (signalizacijska pot kinaz, sekundarni metabolizem, celični transport, itd.) kot na nivoju posameznih genov. Nadalje smo preučevali odziv rastline na interakcijo sorodnih in nesorodnih sevov *B. subtilis* in pokazali, da interakcije različno uravnavajo transkripcijski odziv rastlin. Da bi raziskali vpliv interakcij na tvorbo biofilma, smo biofilm na koreninah spremljali po inokulaciji z monokulturami in njihovimi kombinacijami. Pri kombinaciji sorodnih sevov ni bilo vidne meje med biofilmoma posameznih sevov, medtem ko smo pri mešanju nesorodnih sevov opazili mejo med biofilmoma in prevlado enega od sevov. Da bi preučili vlogo surfaktina, smo spremljali nastajanje biofilma in transkripcijski odziv v koloniziranem in sistemskem tkivu rastlin po inokulaciji s QS-negativnimi mutantami *B. subtilis*, ki imajo oslABLJENO proizvodnjo surfaktina. Rezultati so pokazali zmanjšano tvorbo biofilma na koreninah mutantov. Poleg tega je bilo izražanje PT15 in 13-LOX v rastlinah, koloniziranih s QS-negativnimi mutantami, manjše v primerjavi z izražanjem v rastlinah, koloniziranih z divjim tipom. Da bi preučili vlogo PT15 v interakciji med *B. subtilis* in krompirjem, smo spremljali nastajanje biofilma in prisotnost *B. subtilis* v sistemskem tkivu v rastlinah z utišanim PT15. Medtem, ko PT15 ni bil vključen v kolonizacijo korenin in nastanek biofilma, pa smo potrdili neposredno povezavo med prisotnostjo *B. subtilis* in PT15, saj smo v rastlinah z utišanim PT15 v sistemskem tkivu zaznali več *B. subtilis*.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, *Solanum tuberosum*, prostorsko-časovna transkriptomika

## Vode - vir informacij o naravi in družbi

Maja Ravnikar, Ion Gutierrez-Aguirre, David Dobnik, Arijana Filipič, Katarina Bačnik, Olivera Maksimović, Nina Prezelj, Alexandra Bogožalec Košir, Ana Vučurović, Mojca Milavec, Anže Županič, Nataša Mehle, Denis Kutnjak

Oddelek za biotehnologijo i sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

maja.ravnikar@nib.si

Kjer je voda, tam je življenje. In prav ta njena značilnost, da je v stiku z živimi agensi in se steka iz ekosistemov v podzemne in nadzemne vire, ter kroži do morja, oblakov in nazaj na zemljo, jo napolni z informacijami o vsem živem, ki ga sreča na poti. Po drugi strani pa so nukleinske kisline, ki tvorijo genome izredno stabilne molekule in lahko preživijo še dolgo po tem, ko je organizem, ki so ga ustvarile že mrtev. Do spoznanja kako pomemben vir informacij so vode, nas je vodil razvoj metod koncentriranja in molekularne diagnostike s katerimi smo uspeli razkriti paleto mikroorganizmov in virusov, ki so se z vodnim vzorcem srečali. Za proučevanje virusov v vodi smo razvili različne metode za učinkovito koncentriranje virusov, zaznavanje in določanje količine le-teh s pomočjo kvantitativne ali digitalne PCR ter visoko zmogljivo sekvenciranje (HTS).

Ugotovili smo, da razumevanje prisotnosti, raznolikosti in preživetja virusov v vzorcih okolja, kot je voda, pomaga razumeti njihove poti prenosa in njihovo vlogo v ekosistemu. Naše znanje na tem področju je omogočilo hitro vzpostavitev monitoringa za SARS-CoV-2, pa tudi za nove karantenske rastlinske viruse, kot je virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV). Analizo vodnega vira lahko uporabimo za sledenje novih rastlinskih, humanih in živalskih virusov, ki jih pri gostiteljih na določenem področju še nismo zasledili in tako dodajamo pomembne informacije k nadzoru epidemij človeka, živali in rastlin. Rezultati so pokazali, da je za ponovno uporabo vode potrebna antimikrobna obdelava saj nekateri virusi preživijo celo prehod preko čistilne naprave, zato smo se poglobili v razvoj metod za ne kemično dezinfekcijo okoljskih voda, vključno z odpadnimi vodami.

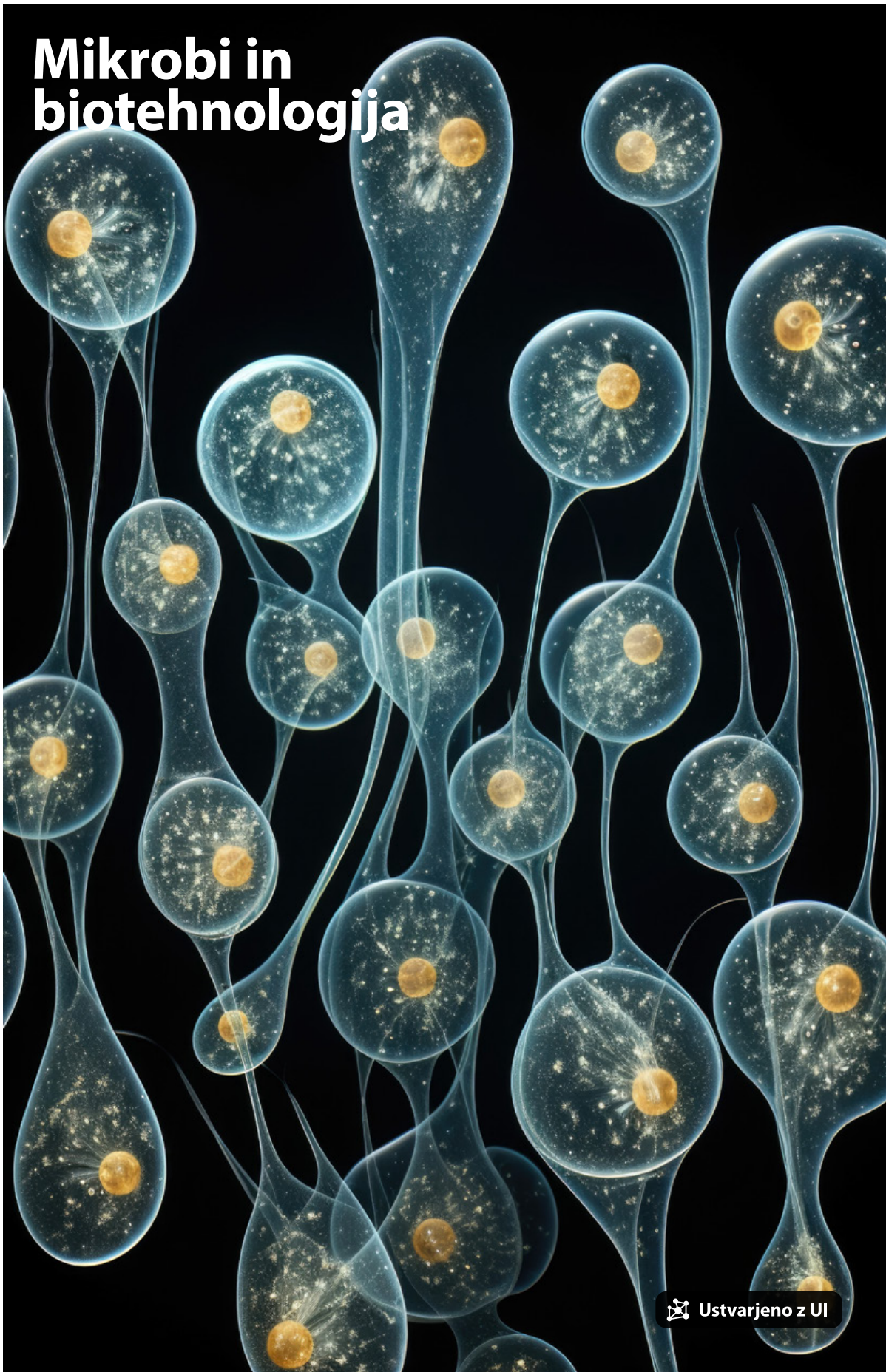
**Ključne besede:** virusi, epidemiologija, vode, Eno zdravje



# Vabljeni sekcijnska predavanja

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

# Mikrobi in biotehnologija



Ustvarjeno z UI



## Mehanizem adaptivne evolucije avtohtone kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* za fermentacijo ajdove pивine

Martina Podgoršek<sup>1</sup>, Maja Paš<sup>1</sup>, Iztok Jože Košir<sup>2</sup>, Neža Čadež<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec

neza.cadez@bf.uni-lj.si

Današnje fermentacije novih živil so namenjene predvsem obogatitvi živil z novimi, edinstvenimi okusi in izboljšanju funkcionalnih lastnosti surovin, ter s tem povečanju prepoznavnosti izdelka na trgu. V naši raziskavi smo razvili novo, pivu podobno pijačo iz ajde, ki zaradi svojih lastnosti, kot so prisotnost polifenolnih spojin in povišane koncentracije mineralov, onemogoča učinkovito fermentacijo ajdove sladice industrijskim sevom pivskih kvasovk. Zato smo izkoristili genetsko pestrost slovenskih avtohtonih kvasovk rodu *Saccharomyces*, izoliranih iz tradicionalnih spontanih fermentacij. Izmed teh so se najbolj izkazale kvasovke iz koroškega jabolčnega vina, ki so pokazale izboljšane fermentacijske sposobnosti in odpornost na hmelj, etanol in nizke temperature. Vendar je bila njihova zmožnost fermentacije maltoze kot glavnega vira ogljika v ajdovi pivini omejena. Zato smo z adaptivno laboratorijsko evolucijo v 30 zaporednih fermentacijah ajdove pивine pod stresnimi pogoji kvasovko prilagodili na nov substrat. Iz skupne biomase smo izolirali morfološko različne klone, ter s tehnologijama sekvenciranja kratkih in dolgih odčitkov določili genetske spremembe, ki sprožijo fenotipske prilagoditve na nove substrate. Uspelo nam je povezati velike strukturne spremembe na kromosomski ravni in polimorfizme posameznega nukleotida v tehnološko pomembnih genih z novimi fenotipi in njihovim vplivom na tvorbo arome. Rezultat našega pristopa je bila pridobitev novega seva kvasovke, primerne za proizvodnjo ajdovega piva.

**Ključne besede:** kvasovke, fermentirane pijače, adaptivna evolucija, genomika

## Bakterijska nanoceluloza proizvedena na živilskem odpadku: material s široko uporabno vrednostjo

Janja Trček<sup>1,2</sup>, Urška Jančič<sup>3</sup>, Eva Cepec<sup>1</sup>, Maša Hren<sup>3</sup>, Selestina Gorgieva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, Koroška cesta 160, Maribor

<sup>2</sup>Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Smetanova ulica 17, Maribor

<sup>3</sup>Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru, Smetanova ulica 17, Maribor

janja.trcek@um.si

Bakterijska celuloza (BC) je biomaterial z raznovrstno uporabno vrednostjo v medicini, farmaciji, biotehnologiji, kozmetiki, prehrabeni industriji, proizvodnji embalaže, okoljevarstvu in elektroniki. Čeprav mnoge bakterije sintetizirajo BC, so najbolj učinkovite proizvajalke BC nekatere vrste iz rodov *Komagataeibacter* in *Novacetimonas*. Te bakterije so splošno prepoznane kot varne, kar poenostavi njihovo uporabo v industrijskih bioprocseh. Sinteza BC je znana predvsem iz raziskav vrste *Komagataeibacter xylinus*, ki je postala modelni organizem za preučevanje proizvodnje BC na genetskem in molekularnem nivoju. Celuloza je lahko tudi rastlinskega izvora, vendar BC presega njeno čistost. Proizvodnja BC omogoča tudi vgrajevanje molekul med njeno sintezo, s čimer neposredno proizvajamo funkcionaliziran material. Stroškovna učinkovitost proizvodnje BC je tesno povezana z gojiščem za namnoževanje bakterij in sintezo celuloze. Zato smo analizirali možnost uporabe hidrolizata grozdnih tropin, brez encimske obdelave, kot edinega vira hranil za proizvodnjo BC z oacetnokislinskimi bakterijami. Z namenom doseči največjo vsebnost reducirajočih sladkorjev (10,4 g/l) in minimalno vsebnost fenolov (4,8 g/l) smo z metodo centralnega kompozitnega načrta optimizirali postopek priprave hidrolizata. V nadaljevanju smo z laboratorijsko proizvodnjo celuloznih membran analizirali štiri različno pripravljene hidrolizate in 20 sevov oacetnokislinskih bakterij. Bakterije smo gojili štiri dni, pri čemer smo prvi dan steklenice stresali, za tem pa smo jih še tri dni inkubirali statično. Kot najučinkovitejšo proizvajalko BC na tem gojišču smo identificirali nedavno opisano vrsto *Komagataeibacter melomenus* AV436<sup>T</sup>, ki je proizvedla do 1,24 g/L suhe celulozne membrane, temu pa je sledila vrsta *Komagataeibacter xylinus* LMG 1518 z do 0,98 g/l suhe celulozne membrane. Proizvedene membrane so imele v primerjavi z membranami pridobljenimi na kompleksnem gojišču RAE zmanjšano kristaliničnost, termično stabilnost in trdnost, a so predstavljale primeren nosilni biomaterial za absorpcijo formulacije želatine in nizina. Tako funkcionalizirana membrana je imela v difuznem testu protimikrobno aktivnost za bakterijo *Staphylococcus aureus*.

**Ključne besede:** oacetnokislinske bakterije, nanoceluloza, krožno gospodarstvo

# Mikrobi in biofilm



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Nova analiza prostorske segregacije mikrobov v mešanih biofilmih

Iztok Dogša, Maja Bolješič, Barbara Kraigher, Ines Mandić-Mulec

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, Ljubljana

iztok.dogsa@bf.uni-lj.si

Mikrobne interakcije, bimodalno gensko izražanje ali kakšen drug prostorsko pogojen proces se pogosto odražajo v prostorski segregaciji mikrobov dveh tipov znotraj istega biofilma. Zato je kvantifikacija stopnje prostorske segregacije dveh bakterijskih tipov v mešanih biofilmih pomembna tema v mikrobiologiji. Običajno je informacija o prostorski segregaciji kodirana v digitalni sliki, ki predstavlja binarni sistem, npr. 3D fluorescenčna mikroskopska slika biofilma dveh bakterijskih vrst, kjer je vsaka vrsta označena s svojim fluorokromom. Trenutni pristopi za ekstrakcijo informacije o prostorski segregaciji v biofilmih imajo vrsto pomanjkljivosti: ne upoštevajo prostorske večdimenzionalnosti biofilmov, različnih lokalnih bakterijskih gostot v biofilmih, niso intuitivni, nimajo primerjave s pozitivnimi in negativnimi kontrolami ali ne upoštevajo vpliva različne velikostne skale opazovanja biofilma. Slednje je še posebej zanimivo, saj se lahko zdi, da sta dva seva dobro pomešana, če ju opazujemo od daleč, vendar lahko pogled od blizu razkrije močno ločevanje. Da bi odpravili vse naštetje pomanjkljivosti smo razvili nove mere za segregacijo v biofilmih in jih implementirali v prosto dostopni programski opremi, *MSSegregation*. Nov pristop smo uspešno testirali na sintetičnih binarnih slikah, na nativnih mešanih biofilmih iz dveh sevov ter s sonikacijo prostorsko porušeni biofilmih. S pomočjo novega orodja smo se nato lotili preučevanja prostorske segregacije med različno sorodnimi sevi v mešanih plavajočih biofilmih *Bacillus subtilis*. Po analizi mikroskopskih slik mešanih biofilmov več parov izogenih, ozko in manj sorodnih sevov PS-216 smo prišli do zaključka, da se sorodstvena diskriminacija odraža na prostorski segregaciji v plavajočih biofilmih. Nova analiza prostorske segregacije pa ni omejena zgolj na slike biofilmov, lahko jo uporabimo v vseh primerih, kjer lahko ločimo med dvema komponentama, ki sestavljata bolj ali manj segregirano mešanico.

**Ključne besede:** segregacijska analiza, biofilm, sorodstvena diskriminacija

Viri:

Dogša I, Mandić-Mulec I. Multiscale spatial segregation analysis in digital images of biofilms. *Biofilm* 2023; 6: 100157

Bolješič M, Kraigher B, Dogša I, Jerič Kokelj B, Mandić-Mulec I. Kin discrimination modifies strain distribution, spatial segregation, and incorporation of extracellular matrix polysaccharide mutants of *Bacillus subtilis* strains into mixed floating biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2022; 88: e0087122

## Adhezija bakterije *Streptococcus mutans* na dentalne materiale

Anamarija Zore<sup>1</sup>, Nives Matjaković Mlinarič<sup>1</sup>, Petra Virant<sup>2</sup>, Mirjam Kozmos<sup>3</sup>, Anže Abram<sup>4</sup>, Klemen Bohinc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana

<sup>2</sup>Galeta Bio d.o.o., Pod lipami 35, 1218 Komenda

<sup>3</sup>Zdravstveni dom dr. Adolfa Drolca, Ulica talcev 9, Maribor

<sup>4</sup>Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, Ljubljana

anamarija.zore@zf.uni-lj.si

Ustna votlina je kompleksno okolje s slabo izmenjavo snovi in laminarnim tokom. Poseljena je s številnimi raznovrstnimi mikrobi, obdanimi z razkošjem hranil in naravnim gostiteljevim imunskim sistemom. Zunanji faktorji kot obroki hrane, ustna higiena, uporabljeni restavracijski ali ortodontski dentalni materiali in žvečenje ob sodelovanju prebavnih encimov ter razgradnjih produktov pripomore k še kompleksnejšim pogojem, ki vplivajo na organiziranje mikrobov v kvorumske združbe in nastajanje biofilma in oralnega zdravja ter bolezni. Pri nastanku kariesa igra pomembno vlogo *Streptococcus mutans*.

Zanimalo nas je, kako dentalni materiali (metali in zlitine, polimeri, keramika, kompoziti), v primerjavi z zobno površino, privlačijo bakterije *Streptococcus mutans* in kako njihove fizikalne lastnosti (hrapavost, hidrofobnost, naboj) vplivajo na kolonizacijo in adhezijo bakterij, odgovornih za nastanek zobnega kariesa. Fizikalne lastnosti dentalnih materialov smo določali s profilometrom, s površinsko hidrofobnostjo in s pretočnim potencialom. Uporabili smo standardni referenčni sev bakterije *Streptococcus mutans* ATCC 25175, ki smo ga kultivirali v mediju BHI pri 37°C, da smo dobili prekonočno kulturo. Razredčeno smo nadalje inkubirali z različnimi materiali 10 ur. Adherirane bakterije smo fiksirali in pripravili za SEM. Ugotavljali smo deleže pokritosti opazovanih površin z bakterijami ter ugotavljali vpliv fizikalnih lastnosti posameznega materiala na stopnjo adhezije bakterij. Povprečna hrapavost ( $R_a$ ) je bila najnižja pri polimeru PETG ( $R_a=0,09 \mu\text{m}$ ), kromazitu ( $R_a=0,06 \mu\text{m}$ ), najvišja pa pri zlitini Au-Pt ( $R_a=0,356 \mu\text{m}$ ). Hidrofobnost je bila najnižja pri IPS InLine keramiki, Cr-Co zlitini in PETG polimeru. Pri vseh materialih smo izmerili negativni pretočni potencial (v mV). Adhezija bakterij je bila najnižja na amalgamu in kromazitu. Na zlitini Au-Pt in IPS keramiki in polimeru PETG pa smo zaznali večjo adhezijo bakterij, vendar še vedno manjšo kot na intaktnem zobu. Rezultati kažejo, da je adhezija bakterij odvisna od hrapavosti, hidrofobnosti in naboja površin, od lastnosti površine uporabljene bakterije, kar kaže na pomembnost načina priprave površin, da le te čim bolj preprečujejo bakterijsko adhezijo.

**Ključne besede:** zobni biofilmi, fizikalne lastnosti dentalnih materialov, adhezija *Streptococcus mutans*

## Vloga mikrobne glikobiologije pri proučevanju razvoja bakterijskih biofilmov

Nika Janež<sup>1</sup>, Meta Sterniša<sup>2</sup>, Blaž Jug<sup>2</sup>, Tanja Zupan<sup>1</sup>, Aleksandar Sebastijanovič<sup>3</sup>, Milica Perišić Nanut<sup>1</sup>, Katarina Karničar<sup>4,5</sup>, Ajda Taler-Verčič<sup>4,5</sup>, Dušan Turk<sup>4,5</sup>, Anja Klančnik<sup>2</sup>, Janez Štrancar<sup>3</sup>, Jerica Sabotič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Odesek za biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, Ljubljana

<sup>2</sup>Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelek za živilstvo, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>3</sup>Odesek za fiziko trdne snovi, Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, Ljubljana

<sup>4</sup>Odesek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, Ljubljana

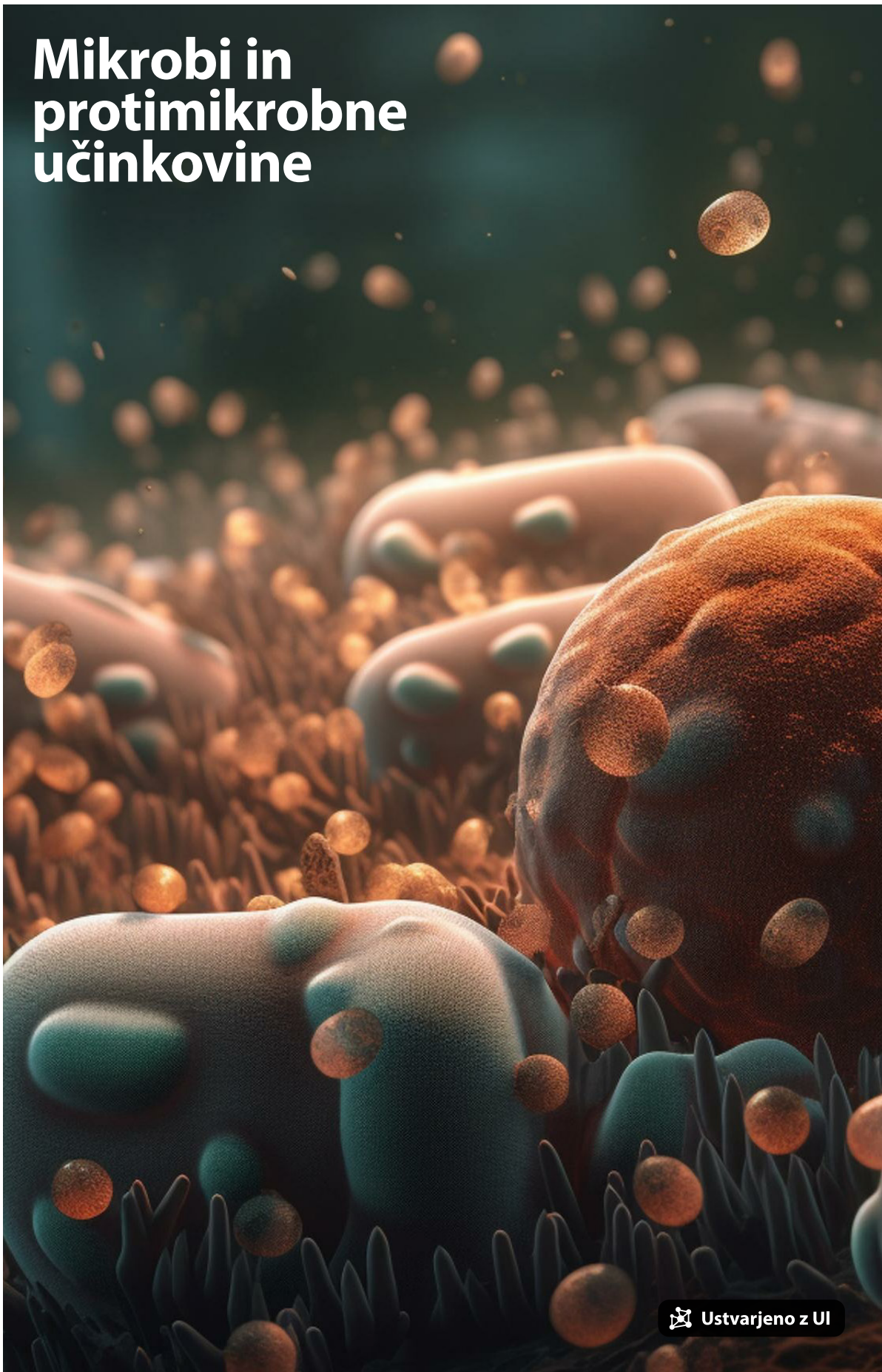
<sup>5</sup>Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Jamova 39, Ljubljana

jerica.sabotic@ijs.si

Biofilmi so kompleksne združbe mikroorganizmov in predstavljajo najpogostejšo obliko njihove rasti v naravi. Življenje v biofilmu jim omogoča preživetje in obstojnost v neugodnih okoljskih razmerah, tudi ob izpostavljenosti antibiotikom ter razkužilom. Zato biofilmi postajajo pomemben vidik v klinični in javnozdravstveni mikrobiologiji. Prvi korak v procesu nastajanja biofilma je adhezija planktonskih bakterij na površino. Ta prvi korak posredujejo nespecifične interakcije med površino ter strukturami, ki so prisotne na bakterijski površini. Temu pa sledi delitev adheriranih bakterij, tvorjenje mikrokolonij in velikokrat tudi sinteza zunajceličnih polimernih snovi kot so polisaharidi, eksogena DNA ter proteini. Ker je bakterijska površina prekrita z oligosaharidi in/ali polisaharidi, ti glikani igrajo pomembno, če ne ključno vlogo, pri interakcijah bakterij z različnimi površinami. Lektini (imenovani tudi hemaglutinini ali adhezini) so proteini, ki vežejo glikane z visoko specifičnostjo ne da bi jih spremenili, in so prisotni pri vseh skupinah organizmov. Lektini glikane vežejo preko številnih šibkih interakcij, kar jim omogoča selektivno vezavo tudi kompleksnih glikanov z visoko specifičnostjo, avidnostjo in/ali afiniteto. S pomočjo modelnih sevov iz bakterijskih vrst *Listeria monocytogenes* in *Listeria innocua* smo ugotavljali kako z lektini iz gliv lahko vplivamo na razvoj njihovih biofilmov. Testirani lektini so se med seboj razlikovali po izvoru, strukturi ter že opisanih tarčnih glikanih in so proti testiranim sevom delovali protibiofilmsko, ne pa tudi protibakterijsko. Njihovo delovanje je bilo pogosto tarčno proti eni od testiranih bakterijskih vrst. Nekateri med njimi so preprečevali adhezijo, drugi pa so imeli vpliv na zrel biofilm. Pridobljeni rezultati kažejo, da glivni lektini modulirajo interakcije med bakterijami ali med bakterijo in površino, kar bi nam dolgoročno lahko omogočilo, da bi z njimi usmerjali razvoj biofilma ter posledično tudi način kolonizacije površin. To bi lahko predstavljalo še neraziskan vidik preprečevanja kontaminacije površin z bakterijami.

**Ključne besede:** bakterijski glikani, lektini, biofilmi, *Listeria*

# Mikrobi in protimikrobne učinkovine



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Pomen sekvenciranja celotnega genoma za spremljanje in obvladovanje širjenja hipervirulentnih sevov *Klebsiella pneumoniae* v regionalni bolnišnici

Tjaša Žohar Čretnik<sup>1</sup>, Tanja Selič Kurinčič<sup>2</sup>, Alenka Petrovec Koščak<sup>2</sup>, Majda Hrastnik<sup>2</sup>, Sandra Janežič<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva 5, 3000 Celje

<sup>2</sup>Splošna bolnišnica Celje, Oblakova 5, 3000 Celje

<sup>3</sup>Oddelek za mikrobiološke raziskave, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska 1, 2000 Maribor

<sup>4</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

tjasa.zohar.cretnik@nlzoh.si

Proti karbapenemom odporne enterobakterije (CRE), ki izločajo karbapenemaze (CP) ogrožajo paciente in povečujejo breme okužb povezano z mikrobno odpornostjo tako po svetu, kot v Sloveniji. V zadnjem letu se v Sloveniji eksponentno povečuje število primerov *Klebsiella pneumoniae* CRE-CP, ki izločajo zlasti encima OXA-48, ki velja za najpogostejši tip encima med OXA encimi pri *K. pneumoniae* in NDM-5, ki spada v skupino B karbapenemaz. Gre za večkratno odporne izolate, ki so občutljivi kvečjemu še za kolistin in cefiderokol. Širjenje tega mikroorganizma je kombinirano, in sicer klonalno, ob tem pa se rezistenčni geni prenašajo tako med pripadniki iste vrste, kot med različnimi bakterijskimi vrstami.

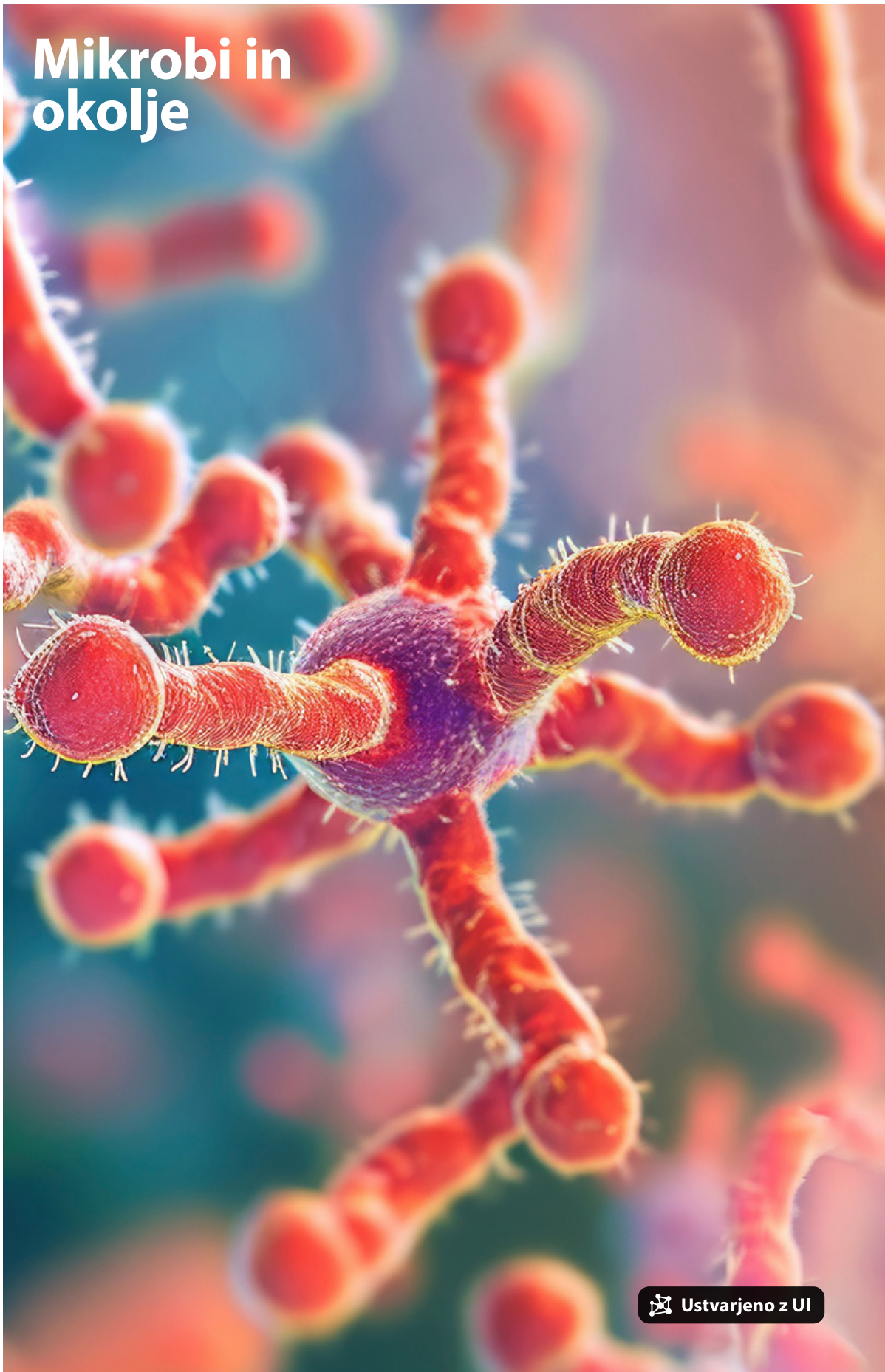
V Splošni bolnišnici Celje smo od avgusta 2022 do septembra 2023 uporabili sekvenciranje celotnega genoma pri izolatih *K. pneumoniae* CRE-CP, ki so se zdravili na različnih oddelkih. Genomske primerjave, skupaj z epidemiološkimi podatki so pokazale, da je prišlo v opazovanem času do vsaj 8 neodvisnih vnosov nove genetske linije in še dveh možnih neodvisnih vstopov iste genetske linije. Ob vsakem novem vnosu je šlo za nov sekvenčni tip z zanj specifičnim profilom rezistenčnih mehanizmov proti karbapenemom. Največ izolatov je pripadalo hipervirulentnemu, MLST-sekvenčnemu tipu ST147, vendar pa so se izolati znotraj te skupine razlikovali glede na občutljivost za kolistin, ter glede prisotnosti mutacij genov za porine. Zabeležili smo tri okužbe sečil, eno okužbo mehkih tkiv in eno septično stanje, preostali pacienti so bili s tem mikroorganizmom le kolonizirani.


S striktnim izvajanjem ukrepov kontaktne izolacije, obsežnim presejanjem s pomočjo nadzornih kužnin, vzorčenjem iz okolja, izobraževanjem in nadzorom nad izvajanjem ukrepov, smo širjenje vsaj začasno omejili in od konca avgusta 2023 nismo zabeležili novega primera. Sekvenciranje celotnega genoma je pomembno prispevalo k razumevanju poti prenosov in identifikaciji lastnosti povzročitelja. Za namene učinkovitega preprečevanja in obvladovanja bolnišničnih okužb bi morali to metodo izvajati redno in dovolj pogosto.

**Ključne besede:** *Klebsiella pneumoniae*, odpornost proti karbapenemom, sekvenciranje celotnega genoma



# Mikrobi in okolje



 Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Vzroki in posledice sorodstvenega razlikovanja pri bakteriji *Bacillus subtilis*

Polonca Štefanič<sup>1</sup>, Manca Mršol<sup>1</sup>, Eva Stare<sup>1</sup>, Katarina Belcijan<sup>1</sup>, Barbara Kraigher<sup>1</sup>, Mojca Krajnc<sup>1</sup>, Katarina Šimunovič<sup>1</sup>, David Stopar<sup>1</sup>, Ulises Nunes da Rocha<sup>2</sup>, Ines Mandić-Mulec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra za mikrobno ekologijo in fiziologijo, Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Oddelek za okoljsko inženirstvo in biotehnologijo, Helmholtz Center za okoljske raziskave, Nemčija

polonca.stefanic@bf.uni-lj.si

Kljub temu, da bakterije nimajo kognitivnih sposobnosti višje razvitih organizmov, so sposobne razlikovati med bolj in manj sorodnimi mikroorganizmi skozi proces, ki se imenuje sorodstveno razlikovanje. Sevi *Bacillus subtilis*, ki smo jih izolirali iz mikroskale tal so sposobni sorodstvene diskriminacije med rojenjem na poltrdnem gojišču, ki ima za posledico bodisi združevanje rojev visokosorodnih sevov (kin) bodisi tvorbo z očesom vidne linije, ki se tvori med manj sorodnimi roji (non-kin). Na podlagi fenotipa rojenja smo seve razporedili v sorodstvene skupine znotraj omenjene zbirke naravnih izolatov tal. Pokazali smo tudi, da mešanje sevov izrazito vpliva na sobivanje sevov na korenini *Arabidopsis thaliana*, na povišan prenosa DNA na liniji med non-kin sevi in na sobivanje v peliklih, kjer kin sevi tvorijo mešane kokulture, non-kin sevi pa se izključujejo. V tej študiji je bila opravljena podrobna analiza genomov 40-ih sevov *B. subtilis*, z namenom iskanja genetskih elementov značilnih za 12 sorodstvenih skupin. Analiza 40 zaključenih genomov *B. subtilis*, ki je vključevala uporabo orodij za anotacijo genomov, kot so Prokka, PGAP, PredicTF in BioAutoML, ter ročno urejanje lokusa za zaznavanje celične gostote *comQXP*, je pripomogla k ustvarjanju novega podatkovnega seta z binarnimi podatki. Ta nabor podatkov je omogočil odkritje posebnih genetskih označevalcev, ki so edinstveni za vsako sorodstveno skupino, in s tem razkril raznoliko genetsko sestavo *B. subtilis*. Identificirani genetski elementi so bili večinoma povezani s sintezo celične stene, odzivom na stres in antibiotičnimi/antimikrobnimi lastnostmi. V študiji so bili poleg tega uporabljeni algoritmi strojnega učenja in analiza povprečne identitete nukleotidov (ANI). Ugotovili smo, da trenutno ANI v učinkovitosti razvrščanja sevov v kin skupine prekaša metodologijo strojnega učenja, vendar pa so za potrditev ustreznosti obeh pristopov pri uvrščanju sevov iz baz podatkov na podlagi genomov in z neznanim fenotipom rojenja v kin skupine nujne dodatne laboratorijske raziskave.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, sorodstveno razlikovanje, strojno učenje

# Mikrobi in analitika



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Uporaba in omejitve molekularnih metod qPCR, LAMP in dPCR za določanje in kvantifikacijo mikroorganizmov

Polona Kogovšek

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 121, Ljubljana

[polona.kogovsek@nib.si](mailto:polona.kogovsek@nib.si)

Molekularne metode so zelo razširjene na področju diagnostike patogenih mikroorganizmov saj omogočajo določanje tarčnih nukleinskih kislin (NK) v različnih tipih vzorcev, obenem pa lahko z njimi določimo tudi količino, t.j. število kopij, tarčnih NK. Metode, ki temeljijo na pomnoževanju NK so tako uporabljene za hitro določanje NK bakterij, virusov in gliv v vzorcih hrane, rastlinskih, živalskih in humanih vzorcih ter okoljskih vzorcih. PCR v realnem času (qPCR), znan kot zlati standard molekularnih metod, omogoča izredno občutljivo in visoko specifično določanje tarčnih NK. Tako smo za določanje spor fitopatogene glive *Phyllosticta citricarpa* razvili visokospecifičen qPCR test, ki na osnovi posameznih mutacij omogoča razlikovanje te karantenske glive od njene bližnje sorodnice *P. paracitricarpa*. Obenem smo uvedli širokospecifičen qPCR test za potrjevanje prisotnosti širše populacije gliv v vzorcih zraka. Vendar pa za analizo vzorcev z metodo qPCR potrebujemo relativno dobro očiščene NK. Izotermalno pomnoževanje z metodo LAMP ni občutljivo na inhibitorne spojine v vzorcih, in lahko za analizo uporabimo grobe neprečiščene vzorce. Ker je aparaturna za izvedbo LAMP enostavna in prenosna, lahko analizo izvedemo tudi na terenu. Tako smo preverjali prisotnost fitoplazme zlata trsna rumenica (FD) in rumenice počrnelosti lesa (BN) v homogenatih listov vinske trte v vinogradih in preverjali prisotnost bakterij *Escherichia coli*, patogenih za perutnino, v brisih kloake piščancev na piščančjih farmah. Metodo LAMP smo uporabili tudi za določanje prisotnosti SARS-CoV-2 v vzorcih sline. Za razvoj in validacijo molekularnih metod pa so potrebni referenčni materiali, s katerimi ocenimo delovanje in občutljivost metode. Ker ti materiali niso vedno na voljo, se poslužujemo lastnih materialov, ki jih okarakteriziramo z digitalnim PCR, ki omogoča absolutno kvantifikacijo NK v vzorcu. Metoda je manj občutljiva na inhibitorne spojine v vzorcih in je še posebej zanimiva za kvantifikacijo virusnih vektorjev, npr. AAV, in lahko služi kot ena izmed metod potrebnih za karakterizacijo končnega produkta za gensko terapijo.

**Ključne besede:** nukleinske kisline, testiranje na terenu, referenčni material, inhibicija

## Ugotavljanje virusne kontaminacije živil – je sekvenciranje naslednje generacije res rešitev?

Urška Jamnikar-Ciglencčki, Urška Kuhar

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

urska.jamnikar@vf.uni-lj.si

Virusi so pogosti povzročitelji bolezni, ki se prenašajo z živali. Ker virusi za svoje razmnoževanje potrebujejo žive celice, se v živilih ne razmnožujejo, zato se njihovo število v kontaminiranih živilih s časom ne povečuje. To bi sicer lahko bila tudi prednost, v primerjavi z detekcijo bakterijske kontaminacije živil, a težava je, da je za okužbo ljudi potrebna že zelo nizka infekcijska doza, po drugi strani pa okužene osebe oz. živali izločajo ogromne količine virusnih delcev, kar poveča verjetnost za kontaminacijo živil. Virusni delci v živilih ne povzročijo organoleptičnih sprememb, to pomeni, da živilo na videz nima spremenjenega vonja, okusa in konsistence, zato je virusno kontaminacijo živil praktično nemogoče prepoznati s prostim očesom. Tako je zelo pomembno, da imamo za ugotavljanje prisotnosti virusov vzpostavljeno specifično in dovolj občutljivo diagnostiko, ki nam omogoča analizo virusov tako v živalih, kot tudi že prej pri samih živalih.

Virusi, ki se najpogosteje prenašajo z živali so enterični virusi in virusi, ki povzročajo hepatitis. Mednje spadajo norovirusi, rotavirusi, virus hepatitisa A, virus hepatitisa E, astrovirusi, sapovirusi, adenovirusi, aichivirusi in drugi. Gre za viruse, ki jih s klasičnimi virološkimi metodami ne moremo dokazati, saj večinoma ne rastejo na celičnih kulturah, zato za njihovo dokazovanje potrebujemo molekularne metode. V zadnjih nekaj letih je močno napredoval razvoj na področju tehnologij sekvenciranja naslednje generacije (NGS), od katerih smo si raziskovalci, ki delujemo na področju živil, veliko obetali. Pomembna prednost NGS je namreč ta, da ni omejeno s predhodno poznanim nukleotidnim zaporedjem nukleinske kisline mikroorganizmov in tako omogoča neposredno odkrivanje neznanih mikroorganizmov ter hkratno odkrivanje več mikroorganizmov v vzorcih. A dosedanje raziskave so pokazale, da ima NGS prenizko občutljivost za uporabo v diagnostiki virusov v živilih, saj je količina virusov v živilih pogosto prenizka. Zato so v razvoju različne izpeljanke NGS, za katere si želimo, da nam bodo v prihodnje na področju diagnostike virusov, ki se prenašajo z živali v veliko pomoč.


**Ključne besede:** živilo, virus, NGS



# Izbrana sekcijska predavanja

# Mikrobi in biotehnologija



 Ustvarjeno z UI



## Nov pristop za izboljšanje produkcije antibiotika oksitetraciklina s tarčno redukcijo genoma bakterije *Streptomyces rimosus*

Alen Pšeničnik<sup>1</sup>, Lucija Slemc<sup>1</sup>, Martina Avbelj<sup>1</sup>, Miha Tome<sup>1,2</sup>, Martin Šala<sup>3</sup>, Paul Herron<sup>4</sup>, Maksym Shmatkov<sup>5,7</sup>, Marko Petek<sup>2</sup>, Špela Baebler<sup>2</sup>, Peter Mrak<sup>6</sup>, Daslav Hranueli<sup>5</sup>, Antonio Starcevic<sup>5</sup>, Iain S. Hunter<sup>4</sup>, Hrvoje Petković<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>3</sup>Kemijski inštitut, Hajdrihova ulica 19, Ljubljana

<sup>4</sup>University of Strathclyde, Glasgow, UK.

<sup>5</sup>University of Zagreb, Zagreb

<sup>6</sup>Sandoz, Antiinfektivi, Mengeš, Slovenia

<sup>7</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

alen.psenicnik@bf.uni-lj.si, hrvoje.petkovic@bf.uni-lj.si

Večina gruč biosinteznih genov (GBG), ki kodirajo biosintezo mikrobnih sekundarnih metabolitov, kot so antibiotiki, se slabo izraža (tihe GBG). Industrijsko pomembni mikroorganizmi ki se uporabljajo v bioprocseh in močno izražajo različne GBG, so skoraj izključno pridobljeni z dolgotrajnimi postopki selekcije in mutageneze. Zato je za aktivacijo tih GBG in odkrivanje novih učinkovin ter njihovo stabilno proizvodnjo potrebno razviti nove pristope za hitro izboljšavo sevov. V predstavljeni študiji smo na podlagi primerjalne analize genoma tipskega seva *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 in dveh industrijskih producentov oksitetraciklina (OTC) izvedli racionalno modifikacijo genoma tipskega seva in dosegli presenetljivo visoko produkcijo antibiotika oksitetraciklina. S sekvenciranjem genomov dveh industrijskih sevov M4018 in R6-500 razvitih iz skupnega prednika (ATCC 10970), smo identificirali večje rearanžmane na koncih kromosomov, ki so se zgodile približno na istem mestu pri obeh industrijskih sevih. Na podlagi teh informacij smo v tipskem sevu s metodo CRISPR-Cas9 ustvarili redukcije genoma. Na ta način, nam je v enem samem koraku uspelo v tipskem sevu povzročiti izjemno visoko produkcijo OTC, ki je primerljiva s titri industrijskih sevov, za katerimi je več kot 30 let intenzivne selekcije. Transkriptomaska analiza ustvarjenih mutantov podpira hipotezo, da je glavni razlog za takšno povečanje biosinteze OTC močno povečanje izražanja *otc* BGC. Poleg tega smo v mutantih opazili tudi spremembe v izražanju drugih tih BGC, ki smo jih s uporabo 3D-MS metode tudi uspešno zaznali. Ta popolnoma nov pristop redukcije genoma k izboljšanju seva kaže velik potencial kot hitra in vsestranska tehnologija za povečanje titra ciljnega sekundarnega metabolita in aktivacijo tih genskih skupin, ki predstavljajo izjemen vir še neraziskanih naravnih proizvodov s potencialno medicinsko in industrijsko vrednostjo.

**Ključne besede:** antibiotik, redukcija genoma, tihe genske skupine

## Genski inženiring vaginalnih laktobacilov in njihova vgradnja v nanovlakna

Spase Stojanov<sup>1</sup>, Tina Vida Plavec<sup>1,2</sup>, Špela Zupančič<sup>2</sup>, Aleš Berlec<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Odesek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

spase.stojanov@ijs.si

Bakterije iz rodu *Lactobacillus* prevladujejo v zdravi človeški vagini in so odgovorne za vzdrževanje normalne homeostaze. Preprečujejo prekomerno rast oportunističnih patogenov, kot so *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* in *Trichomonas vaginalis*, tako da proizvajajo mlečno kislino, vodikov peroksid in bakteriocine. Uporaba vaginalnih laktobacilov kot probiotikov lahko obnovi normalno vaginalno mikrobioto in prepreči napredovanje vaginalnih okužb. V naši raziskavi smo naslovili dve pomanjkljivosti vaginalnih probiotikov, in sicer pomanjkanje optimalne farmacevtske oblike in pomanjkanje orodij za njihovo spremljanje po sproščanju.

Uporabljali smo tri različne vaginalne laktobacile, in sicer *L. crispatus*, *L. gasseri* in *L. jensenii*, medtem ko je *Lactiplantibacillus plantarum* služil kot kontrolni sev. Seve smo gensko spremenili tako, da so izražali fluorescentne proteine z različnimi spektralnimi lastnostmi (IRFP, GFP, mCherry in mTagBFP2) ali encim luciferazo (Nluc), ki omogoča bioluminiscenčno detekcijo. Gensko spremenjene seve smo vgradili v nanovlakna pripravljena z elektrostatskim sukanjem iz polimerne raztopine pri visoki napetosti. Pri pripravi nanovlaken smo uporabili polietilen oksid kot nosilni polimer ter različne pomožne snovi za izboljšanje preživetja bakterij. Laktobacili so preživeli elektrostatsko sukanje in večmesečno shranjevanje, kar kaže na to, da so nanovlakna ustrezna kot dostavni sistem za vaginalne laktobacile.

Laktobacili so ohranili fluorescenco in luminiscenco po vključitvi v in po sprostitvi iz nanovlaken. To nam je omogočilo določitev kinetike njihovega sproščanja iz nanovlaken, pri čemer se je večina bakterij v celoti sprostila v 30 min. S pomočjo fluorescence in luminiscence smo potrdili in ovrednotili adhezijo laktobacilov na površino epitelijskih celic Caco-2, kar kaže, da se bakterije lahko zadržijo na mestu aplikacije. Poleg tega nanovlakna z laktobacili po inkubaciji s Caco-2 celicami niso zmanjšala živosti epitelijskih celic, kar potrjuje njihovo varnost.

Rezultati raziskave predstavljajo korak k razvoju novega dostavnega sistema za vaginalne probiotike in izboljšanju sedanjega zdravljenja vaginalnih okužb.

**Ključne besede:** vaginalni laktobacili, nanovlakna, vaginalne infekcije, dostavni sistem, genski inženiring

## Razvoj nove metode za detekcijo razgradnje plastike na primeru ekstremotolerantnih gliv

Anja Černoša<sup>1,2</sup>, Antonio Martínez Cortizas<sup>3</sup>, Tjaša Danevčič<sup>4</sup>, Nina Gunde-Cimerman<sup>1</sup>, Cene Gostinčar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>InnoRenew CoE, Livade 6a, 6310 Izola, Slovenia

<sup>3</sup>CRETUS, Departamento de Edafología e Química Agrícola, Faculty of Biology, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup>Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

[anja.cernosa@innorenew.eu](mailto:anja.cernosa@innorenew.eu)

Plastični polimeri so zaradi svoje vsestranskosti in trpežnosti v vesplošni uporabi, vendar je njihova obstojnost tudi razlog za kopičenje odpadne plastike v naravi. V naravi nakopičena plastika pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov razpade na manjše delce, znane tudi kot mikroplastika. Mikroplastika se lahko kopiči v prehranjevalni verigi ter posledično vpliva na zdravje živali in ljudi. Kljub tehnološkemu napredku poznamo le malo učinkovitih načinov ravnanja s plastičnimi odpadki. Biorazgradnja plastike s pomočjo mikroorganizmov tako postaja pomembna raziskovalna tema, ki se je različni raziskovalci lotevajo z zelo različnimi in pogosto slabo definiranimi metodološkimi pristopi.

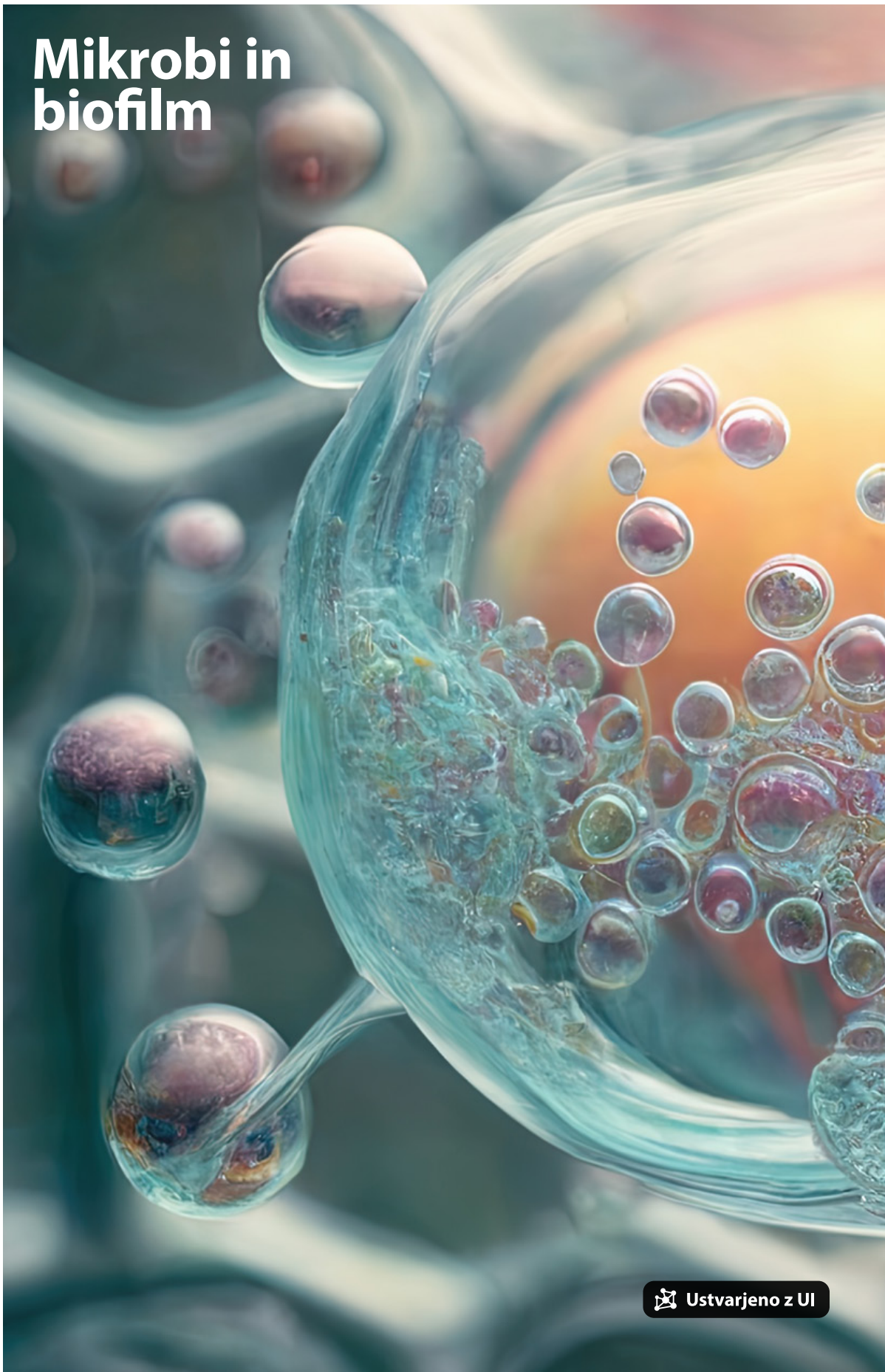
V okviru raziskave smo najprej razvili novo presejalno metodo, ki s pomočjo plinske kromatografije zasleduje proizvodnjo ogljikovega dioksida v prisotnosti različnih tipov plastike (poliamid, polietilen, polietilen tereftalat, polipropilen in poliuretan) kot edinega vira ogljika. Delovanje te metode smo dodatno potrdili z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR). V raziskavo smo vključili več sto sevov gliv iz okolij onesnaženih z dolgoverižnimi ali aromatskimi ogljikovodiki, iz zelo hladnih in/ali zelo slanih oligotrofnih okolij. Preizkusili smo zlasti poliekstremotolerantne glive, ki jih pogosto odlikuje sposobnost razgradnje velikega števila kompleksnih substratov.

Med testiranimi glivami najbolj obetavni potencialni razgrajevalci plastike izvirajo iz okolij, onesnaženih z dolgoverižnimi ali aromatskimi ogljikovodiki. Identificirali smo več sevov različnih vrst, ki so v prisotnosti različnih testiranih plastičnih polimerov proizvedli značilno večje količine ogljikovega dioksida v primerjavi s kontrolnimi gojišči. Z metodo FTIR smo te rezultate potrdili ter pokazali, da je prišlo do značilnih sprememb v različnih kovalentnih vezeh plastičnih polimerov.

V opisani študiji smo tako identificirali več gliv, katerih uporabnost v biorazgradnji plastičnih polimerov bo predmet nadaljnjih raziskav, hkrati smo uspešno ovrednotili metodo presejanja in s tem prispevali k standardizaciji postopkov pri iskanju najboljših mikrobnih razgrajevalcev.

**Ključne besede:** biorazgradnja, plastika, glive

# Mikrobi in biofilm



Ustvarjeno z UI

## Sorodstveno razlikovanje v biofilmih pri bakteriji *Bacillus subtilis*

Mojca Krajnc, Katarina Šimunović, Ines Mandić-Mulec, David Stopar, Polonca Štefanič

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

mojca.krajnc@bf.uni-lj.si

Študije kažejo, da po Gramu pozitivna modelna bakterija, *Bacillus subtilis*, lahko razlikuje med sevi z visoko in nizko genetsko podobnostjo. Vendar pa ni jasno ali sorodstveno razlikovanje sevov vpliva na nastanek in razvoj biofilmov. V tem delu smo v kokulturah gojili biofilme genetsko bolj in manj podobnih sevov *B. subtilis* in določili spremembe mehanskih lastnosti nastalih biofilmov. Pokazali smo, da v kombinacijah manj sorodnih sevov dominantni sev lahko pri začetnem razmerju 1:1 popolnoma zavre rast in razvoj manj sorodnega seva. Dozoreli biofilm je po svojih mehanskih lastnostih enak dominantnemu sevu v monokulturi. Z gojenjem v mikropretočni napravi smo na nivoju posameznih celic pokazali, da se najprej oblikujejo prostorsko razpršeni agregati manj sorodnih sevov do zapolnitve prostora mikrokomore, nato dominantni sev postopno zmanjša gostoto celične populacije manj sorodnega seva in ga izloči. S spreminjanjem začetnega deleža dominantnega seva smo pokazali, da izid interakcije ni enostavno napovedljiv. V kompeticiji za prostor lahko prevlada en ali drugi sev. Za razliko od nesorodnih sevov je izid interakcije pri bolj sorodnih sevih lažje napovedljiv, saj prihaja do mešanja celic in njihove dolgotrajne koeksistence v biofilmu.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, biofilm, sorodstveno razlikovanje

## Prekinitev bakteriofagnega integracijskega gena povzroči nepričakovane spremembe pri *Bacillus subtilis*

Maja Popović, Anna Dragoš

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

maja.popovic@bf.uni-lj.si

Določeni temperatni bakteriofagi uporabljajo funkcionalne genske lokuse za integracijo v bakterijske kromosome, kar lahko vodi v inaktivacijo genov in potencialno spremembo fenotipa bakterije. Bakteriofag SP $\beta$ , katerega gostitelj je bakterija *Bacillus subtilis*, se integrira v gen *spsM*. Gre za gen, ki sodeluje pri tvorbi spor in je povezan tudi s tvorbo biofilma. Integracija SP $\beta$  v gen povezan s tvorbo biofilma ima lahko zanimive posledice za prenos bakteriofagov med gostitelji in za interakcije med fagom in gostiteljem, saj biofilmi bakteriofagom lahko predstavljajo oviro pri okužbi gostitelja. Za boljše razumevanje vpliva prekinitev gena *spsM* na biofilm in njegovo morfologijo smo med seboj primerjali biofilme sevov divjega tipa in sevov z prekinjenim genom *spsM*.

V skladu z prejšnjimi raziskavami je prekinitev gena *spsM* pri kliničnem izolatu *B. subtilis* privedla do znatnih sprememb v morfologiji biofilma. Medtem ko pri *B. subtilis* izolatu iz tal je prekinitev gena *spsM* vodila v manj izrazite spremembe morfologije biofilma. Komplementacija prekinjenega gena *spsM* je povrnila morfologijo divjega tipa samo pri kliničnem izolatu. Pri *B. subtilis* izolatu iz tal smo opazili, da prekinitev *spsM* gena povzročila tudi spontano diverzifikacijo makrokolonij. Sekvenciranje celotnega genoma in nadaljnje gensko inženirstvo sta razkrila, da opažena raznolikost izhaja iz premika bralnega okvirja, ki vodi v inaktivacijo gena nujnega za bakterijsko rojenje. Tako spontana mutacija gena kot namenska prekinitev gena sta pri *B. subtilis* izolatu iz tal vodili v popolno izgubo sposobnosti rojenja in zmanjšano spodobnost plavanja. V laboratorijskih pogojih smo dokazali, da mutacija v genu poveča fitness v primerjavi z divjim tipom istega seva in tako v laboratorijskem okolju predstavlja prednost.

Prikazali smo, da ima prekinitev bakteriofagnega integracijskega gena različne posledice za razvoj in evolucijo gostitelja v odvisnosti od genetskega ozadja gostitelja. Poleg nabora novih genov, profagi vplivajo tudi na fiziologijo in evolucijo gostitelja preko prekinitev funkcionalnih lokusov.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, biofilm, gen *spsM*, spontana diverzifikacija

## Optodinamsko odstranjevanje biofilmov v modelnih paradontalnih in periimplantnih žepih

Marko Volk<sup>1</sup>, Katja Molan<sup>1</sup>, Dominik Šavli<sup>2</sup>, Matija Jezeršek<sup>2</sup>, Saša Terlep<sup>3</sup>, Špela Levičnik-Höfferle<sup>3</sup>, Matjaž Lukač<sup>3,5,6</sup>, Mojca Trost<sup>4</sup>, Boris Gašpirc<sup>4</sup>, David Stopar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Fakulteta za strojništvo, Aškerčeva cesta 6, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Fotona d.o.o., Stegne 7, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup>Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, Ljubljana

<sup>5</sup>Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, Ljubljana

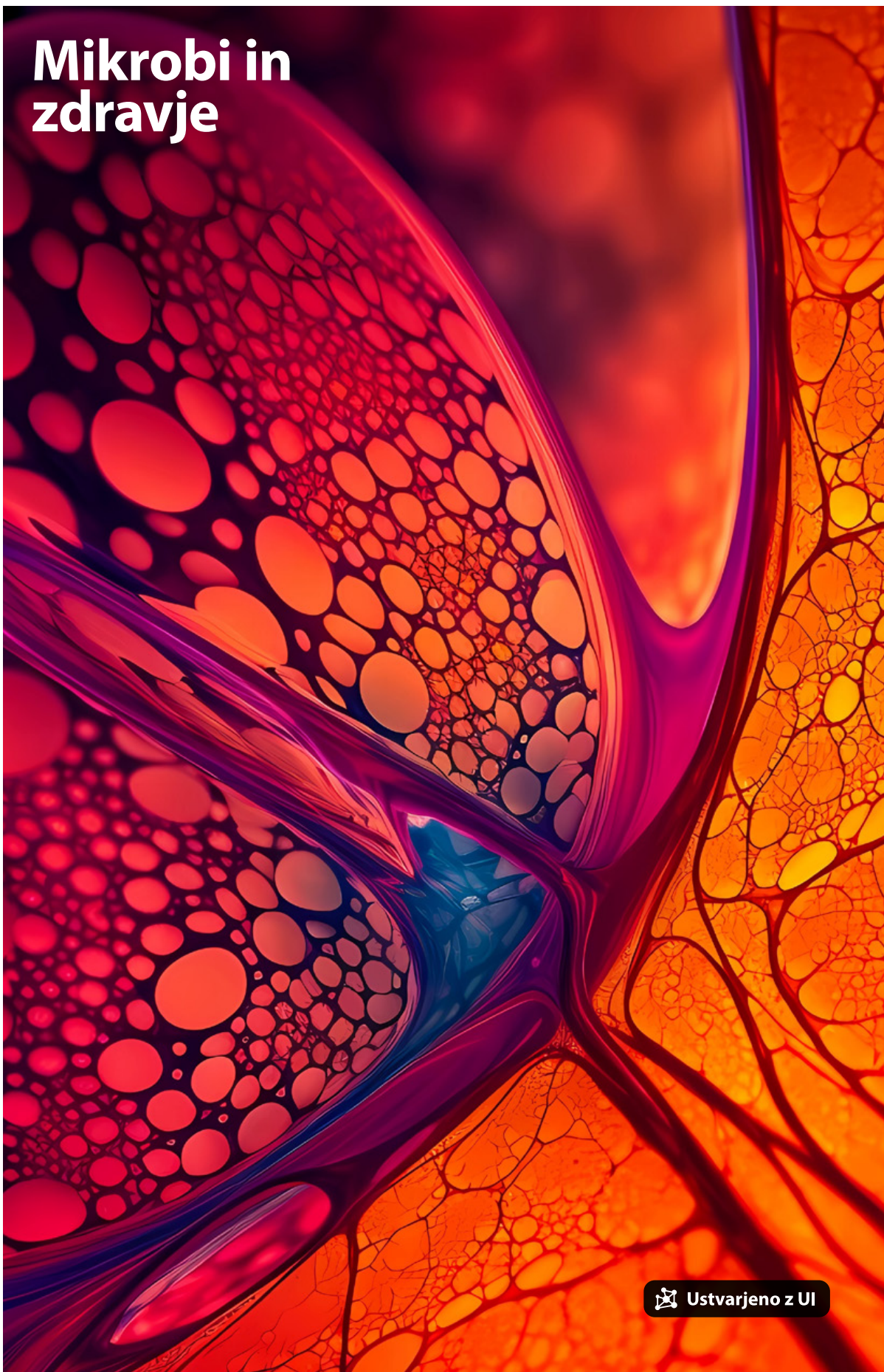
<sup>6</sup>Fakulteta za matematiko in fiziko, Jadranska 19, Ljubljana

[katja.molan@bf.uni-lj.si](mailto:katja.molan@bf.uni-lj.si)

Biofilmi na zobeh in zobnih vsadkih predstavljajo resen zdravstveni problem, ki se iz leta v leto povečuje. Ker je odstranjevanje biofilmov iz apikalne regije paradontalnega ali periimplantatnega žepa z mehanskimi instrumenti težavno, smo v tem delu preizkusili novo metodo odstranjevanja biofilmov s fotoakustično inducirano kavitacijo. Izdelali smo kompozitni modelni sistem mehkega obzobnega žepka s titanom in PDMS. Na modelnem sistemu zdravega in vnetega tkiva smo z lasersko modaliteto Er:YAG USP odstranjevali biofilme *Pseudomonas aeruginosa*, *Rothia dentocariosa* in *Enterococcus faecalis*. Uporabili smo različne energije laserja, položaje vlakenskih konic in trajanje laserskega tretiranja. Postopek čiščenja smo spremljali tudi v realnem času z uporabo hitre kamere po posameznih laserskih bliskih v modelu s transparentno trdno površino. Pridobljeni rezultati kažejo, da je učinkovitost čiščenja biofilma v apikalni regiji paradontalnega in periimplantatnega modelnega žepa neposredno povezana z nastankom sekundarnih kavitacijskih mehurčkov. Pri zdravem tkivu je sekundarna kavitacija enako učinkovita kot direktna laserska ablacija biofilma. Pri vnetem tkivu pa pride do akustične impedance, kar zmanjša učinkovitost fotoakustičnega pretakanja tekočin in indukcije sekundarne kavitacije, vendar lahko z večanjem laserske moči učinek čiščenja signifikantno izboljšamo. Prednost fotoakustične kavitacije v primerjavi z drugimi metodami odstranjevanja biofilmov je v tem, da lasersko sprožena sekundarna kavitacija omogoča odstranjevanje biofilma na oddaljenih lokacijah, ki niso v direktnem kontaktu s konico laserskega vlakna.

**Ključne besede:** odstranjevanje biofilmov, fotoakustično pretakanje tekočin, modelni obzobni žepi

# Mikrobi in zdravje



 Ustvarjeno z UI



## Nacionalno spremljanje nekaterih povzročiteljev zoonoz s sekvenciranjem celotnih genomov

Marija Trkov<sup>1</sup>, Tom Koritnik<sup>1</sup>, Verica Mioč<sup>1</sup>, Bojan Papić<sup>2</sup>, Mateja Pirš<sup>3</sup>, Eva Kotnik<sup>4</sup>, Živa Petrovič<sup>4</sup>, Aleksander Todorovič<sup>4</sup>, Mateja Ravnik<sup>4</sup>, Samo Jeverica<sup>4</sup>, Anamarija Jurišević Dodič<sup>4</sup>, Ingrid Berce<sup>4</sup>, Eva Grilc<sup>5</sup>, Tjaša Cerar Kišek<sup>1</sup>, Andrej Steyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup>Center za medicinsko mikrobiologijo, NLZOH, Celje, Maribor, Murska Sobota, Kranj, Koper, Novo mesto, Nova Gorica

<sup>5</sup>Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana

[marija.trkov@nlzoh.si](mailto:marija.trkov@nlzoh.si)

Okužbe s kampilobaktri, salmonelami, *Escherichia coli* in listerijami so med najpogostejšimi bakterijskimi okužbami, ki se prenašajo s hrano. V zadnjih letih na Oddelku za javnozdravstveno mikrobiologijo (OJM NLZOH) za njihovo tipizacijo uporabljamo sekvenciranje celotnih genomov (WGS). Okužbe z bakterijo *Campylobacter jejuni* so v številnih državah EU na prvem mestu že od leta 2005. Zapleti zaradi okužb z verocitotoksigenimi *E. coli* (STEC) so nevarni predvsem za otroke, medtem ko zaradi invazivnih okužb z listerijami zbolevalo predvsem starejši in imunsko oslabei. Salmonele, zlasti serotipa Enteritidis in Typhimurium, so najpogostejše povzročiteljice izbruhov zaradi uživanja kontaminirane hrane.

V tem prispevku kot primer opisujemo mikrobiološko obravnavo izbruha s *S. Enteritidis*, do katerega je prišlo jeseni leta 2022 na območju skoraj celotne države. Epidemiološka preiskava je postavila sum na okužbo, ki se prenaša s hrano. Z WGS smo tipizirali 87 humanih izolatov *S. Enteritidis* in 7 izolatov *S. Enteritidis* iz živil, ki so jih osamili in identificirali laboratoriji Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in Nacionalnega veterinarskega inštituta Veterinarske fakultete. Izvedli smo tipizacijo na osnovi zaporedij več lokusov (MLST) in na osnovi lokusov osrednjega genoma (cgMLST). Analiza genomskih zaporedij je pokazala, da je bilo 84 humanih izolatov ozko genetsko sorodnih s štirimi izolati iz vzorcev biftka in so se razvrstili v isto gručo 1. En humani izolat je bil ozko genetsko soroden z dvema izolatoma iz vzorca mesa race (gruča 2). Dva humana izolata in en izolat iz vzorca mesa race niso bili ozko sorodni niti z gručo 1 niti z gručo 2.

Opisani primer potrjuje, da WGS-tipizacija bakterijskih izolatov v kombinaciji z izčrpnimi epidemiološkimi podatki omogoča učinkovito ugotavljanje virov okužb pri ljudeh in je tako ključni del molekularno-epidemiološkega spremljanja in preiskav izbruhov. Poleg tega ima WGS potencial, da nadomesti nekatere klasične tipizacijske metode, kot sta serotipizacija in MLST.

**Ključne besede:** zoonoze, spremljanje, sekvenciranje celotnih genomov, *Salmonella* Enteritidis

## Sesalski ortoreovirusi iz netopirjev predstavljajo nove možne porajajoče se patogene

Tina Mikuletič<sup>1</sup>, Danijela Černe<sup>3</sup>, Peter Hostnik<sup>3</sup>, Tanja Švara<sup>4</sup>, Mitja Gombač<sup>4</sup>, Marko Kolenc<sup>1</sup>, Andrej Steyer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana

<sup>2</sup>Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva 44, Ljubljana

<sup>3</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, Ljubljana

<sup>4</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, Ljubljana

tina.mikuletic@mf.uni-lj.si

Pred kratkim so bili sesalski ortoreovirusi (MRV) prvič odkriti pri evropskih netopirjih. Istočasno smo v Sloveniji pri otroku s hudo drisko osamili sev SI-MRV01 serotipa 3 in ugotovili, da je na novo odkritim netopirskim MRV genetsko soroden. Naš cilj je bil ugotoviti razširjenost MRV pri netopirjih, psih in hospitaliziranih otrocih z drisko v Sloveniji ter ugotoviti pojavnost in genetsko variabilnost teh virusov. Uporabili smo širokospektralni PCR in PCR v realnem času za dokazovanje različice SI-MRV01. Viruse smo pomnožili v celični kulturi LLC-MK2 in celotne genome analizirali s tehnologijo NGS. Poleg tega smo pri psih in otrocih raziskali seroprevalenco MRV z virus-nevtralizacijskim testom. Poseben poudarek naših raziskav je bil namenjen pojavnosti različic SI-MRV01 v ciljnih populacijah. Želeli smo pojasniti tudi patogenetski potencial seva SI-MRV01 in z virusi peroralno inokulirali neonatalne miši BALB/c.

Ugotovili smo, da je nova različica netopirskih MRV z 99-odstotno nukleotidno podobnostjo celotnega genoma z izolatom SI-MRV01 prisotna pri slovenskih netopirjih. Poleg tega smo v celični kulturi iz arhivskih vzorcev netopirskega gvana uspešno osamili pet neodvisnih sevov. Poleg različice SI-MRV01 smo dokazali še štiri genetsko bolj oddaljene različice netopirskih MRV. Nevtralizacijska protitelesa proti SI-MRV01 smo dokazali pri 7,5 % otroških serumov in 81,3 % pasjih serumov. Rezultati raziskave patogenosti v poskusnih živalih so potrdili, da se SI-MRV01 širi iz prebavil v druge organe. Elektronska mikroskopija ultratankih rezin je pokazala razpršene virusne delce v možganih, srcu in pljučih. Najbolj prizadeti organ osem dni po okužbi so bili možgani, kar nakazuje na virusni nevrotropizem. MRV so v Sloveniji pri netopirjih pogosto prisotni, kar nakazuje, da so netopirji lahko možen rezervoar krožečih MRV. Serološka analiza pasjih serumov nakazuje možen način okužbe ljudi preko hišnih ljubljencev.

**Ključne besede:** sesalski ortoreovirusi (MRV), analiza NGS, seroprevalenca, patogeneza

## Prenosi bakterije *Clostridioides difficile* med različnimi rezervoarji v Sloveniji: izsledki genomskih primerjav

Sandra Janežič<sup>1,2</sup>, Urška Dobovišek<sup>1</sup>, Maja Rupnik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

sandra.janezic@nlzoh.si

Bakterija *Clostridioides difficile* je črevesna patogena bakterija, ki povzroča okužbe pri ljudeh in tudi številnih živalih. Okužbe s *C. difficile* pri ljudeh se je dolgo povezovalo predvsem z bolnišničnim okoljem, ki še vedno velja za pomemben rezervoar bakterije, vendar pa številne novejšje študije pričajo o vse večjem pomenu zunajbolnišničnega okolja. Tudi incidenca okužb s *C. difficile* pridobljenih v domačem okolju narašča. Naravni rezervoar bakterije je črevesje ljudi in živali, spore bakterije *C. difficile* pa so ubikvitarne, najdemo jih tudi v različnih okoljih (prst, kompost, površinske vode, sedimenti, javne površine, gospodinjstva...) in hrani (meso in mesni izdelki in zelenjava). Na Oddelku za mikrobiološke raziskave, NLZOH, imamo obsežno zbirko izolatov *C. difficile* iz vseh treh glavnih rezervoarjev (ljudi, živali in okolja) in hrane v Sloveniji. Vse izolate tudi tipiziramo s PCR ribotipizacijo. V zadnji primerjavi smo 6220 izolatov, osamljenih med leti 2008 in 2022, uvrstili v 230 različnih PCR ribotipov (RT), od teh pa je bilo 91 RT (40 %) prisotnih v vsaj dveh rezervoarjih, 34 (15 %) pa je bilo skupnih vsem trem rezervoarjem. Isti RT še ne pomeni nujno, da gre za sorodne izolate, izolati istega RT so skupina tako genetsko sorodnih kot tudi nesorodnih izolatov. Da bi boljše razumeli pomen različni rezervoarjev in virov *C. difficile* za okužbe ljudi, izbrane izolate, prevalentnih RT, ki jih najdemo v različnih rezervoarjih, primerjamo tudi s sekvenciranjem in analizo genomskih zaporedij. Z genomskimi primerjavami smo pokazali, da so nekateri izolati RT023 (n=107), RT255/258 (n=86), RT033 (n=19) in RT150 (n=89), izolirani iz ljudi, živali, okolja in tudi hrane klonalni. Klonalni izolati niso nujno časovno niti prostorsko povezani, kar kaže na obstoj nekega stalnega in razpršenega rezervoarja in virov *C. difficile*. Dobro poznavanje rezervoarjev in prenosov je nujno za obvladovanje in preprečevanje prenosov *C. difficile* ter za zmanjševanje števila okužb.

**Ključne besede:** *Clostridioides difficile*, Eno zdravje, genomske primerjave

## Odkrivanje označevalcev za določanje živalskih virov fekalnega onesnaženja vode z analizo gena za 16S rRNA

Tanja Žlender<sup>1,2</sup>, Lucija Brezočnik<sup>3</sup>, Vili Podgorelec<sup>3</sup>, Maja Rupnik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, Maribor

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, Maribor

<sup>3</sup>Fakulteta za elektrotehniko, računalništvo in informatiko, Univerza v Mariboru, Koroška cesta 46, Maribor

[tanja.zlender@nlzoh.si](mailto:tanja.zlender@nlzoh.si)

Fekalno onesnaženje voda predstavlja tveganje za zdravje ljudi ter okoljevarstveni problem. Za uspešno sanacijo in boljšo oceno tveganja za zdravje je potrebno ugotoviti vir fekalnega onesnaženja. Eden od pristopov za ugotavljanje vira fekalnega onesnaženja detekcija označevalcev, ki so izključno ali močno povezani z njegovim gostiteljem (npr. s človekom, prašičem, govedom ali divjimi živalmi). Tovrstne označevalce lahko najdemo tudi v bakterijskem genu za 16S rRNA.

Kljub temu, da se to področje razvija že 20 let, se v glavnem osredotoča na fekalno onesnaženje, ki izhaja iz ljudi. Označevalcev, ki bi dokazovali živalske vire onesnaženja je bistveno manj, sploh kadar govorimo o divjih živalih. Poleg tega so označevalci pogosto geografsko specifični, kar otežuje njihovo uporabo na drugih geografskih območjih.

V okviru naše raziskave smo pripravili zbirko 716 vzorcev ne-humanih fecesov, ki vključuje 29 vrst sesalcev in 23 vrst ptic ter 52 vzorcev goveje in prašičje gnojevke. S sekvenciranjem V3-V4 variabilne regije gena za 16S rRNA smo pridobili zaporedja pomnožkov, dolgih približno 450 bp. S primerjalno analizo smo poiskali zaporedja z visoko specifičnostjo za gostitelja, ki bi jih lahko uporabili kot mesta za naleganje začetnih oligonukleotidov v reakciji PCR. Za izračun specifičnosti smo v analizo vključili tudi zaporedja iz baze humanih črevesnih mikrobiot, s katero razpolaga Oddelek za mikrobiološke raziskave (NLZOH).

Z odkritjem novih označevalcev bi lahko v večji meri določali vire onesnaženja, kot lahko to storimo z obstoječimi testi. Z analizo na lokalni zbirki fecesov bodo markerji, ki so sicer pogosto geografsko specifični primerni za uporabo na območju Slovenije.

**Ključne besede:** fekalno onesnaženje, 16S rRNA, markerji

## Priprava večfunkcionalnih bakterij *Lactococcus lactis* s terapevtskim potencialom

Tina Vida Plavec<sup>1,2</sup>, Abida Zahirović<sup>1</sup>, Petr Malý<sup>3</sup>, Aleš Berlec<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Odesek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Jamova 39, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Laboratory of Ligand Engineering, Institute of Biotechnology of the Czech Academy of Sciences, v. v. i., BIOCEV Research Center, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

ales.berlec@ijs.si

Varno mlečnokislinsko bakterijo *Lactococcus lactis* z uporabo genskega inženiringa razvijajo kot vektor za dostavo terapevtskih proteinov pri vnetni črevesni bolezni, okužbah, alergijah, sladkorni bolezni in raku, pri čemer so nekateri primeri že v kliničnih študijah. V raziskavi smo razvili plazmide za hkratno izražanje več proteinov in jih uporabili za izražanje vezalcev citokinov, citokinskih receptorjev in tumorskih antigenov z namenom ciljane dostave protivnetnih vezalcev in morebiten sinergijski učinek.

Večfunkcionalne bakterije *L. lactis* smo pripravili z uporabo plazmida za dvojno izražanje pNZDual in z uvedbo kloniranja BglBrick za enostavno sestavljanje do treh genskih kaset. Gene za vezalce citokinov IL-6, IL-8, IL-17A in IL-23, citokinskih receptorjev IL-17R in IL-23R ter tumorskih antigenov EpCAM in HER2 smo združili v dvojne ali trojne genske konstrukte. Infrardeči fluorescenčni protein ali fluorescenčni protein mCherry smo sočasno izrazili za lažje spremljanje bakterij. Izražanje vseh proteinov smo potrdili s specifičnimi protitelesi, vezavo ustreznih tarč pa smo ovrednotili z metodo ELISA in pretočno citometrijo. Sposobnost rekombinantnih bakterij *L. lactis* za odstranjevanje citokinov ali vezavo na celice preko tumorskih antigenov smo potrdili na celicah človeškega adenokarcinoma debelega črevesa Caco-2 in HT-29, monocitom podobnih celicah THP-1 in U-937, celicah HEK293, transfeciranih za prekomerno izražanje receptorjev EpCAM ali HER2, in celicah HEK-Blue IL-17. Rekombinantne bakterije *L. lactis* so vezale IL-8 in IL-6 iz človeških celic, pri čemer so iz supernatanta celic Caco-2 in HT-29 odstranile > 65 % IL-8, medtem ko je bilo odstranjevanje IL-6 še učinkovitejše (do 94 % IL-6). Poleg statičnih pogojev smo sposobnost ciljanja rekombinantnih bakterij *L. lactis* pokazali tudi pri pogojih stalnega pretoka v mikrofluidnem sistemu.

S hkratnim izražanjem različnih terapevtsko relevantnih proteinov smo pridobili večfunkcionalne bakterije *L. lactis* s terapevtskim potencialom. Aktivnost rekombinantnih bakterij smo potrdili na različnih celičnih modelih, s čimer smo predstavili novo strategijo za zdravljenje vnetnih črevesnih bolezni in raka debelega črevesa.

**Ključne besede:** *Lactococcus lactis*, genski inženiring, vezalci citokinov, kronična vnetna črevesna bolezen, rak debelega črevesa

## Razvoj nanovlaken z vgrajenimi sevi rodu *Bacillus* za zdravljenje parodontalne bolezni

Špela Zupančič<sup>1</sup>, Nina Katarina Grilc<sup>1</sup>, Anže Zidar<sup>1</sup>, Petra Kocbek<sup>1</sup>, Tomaž Rijavec<sup>2</sup>, Teja Colja<sup>2</sup>, Aleš Lapanje<sup>2</sup>, Matjaž Jeras<sup>1</sup>, Martina Gobec<sup>1</sup>, Julijana Kristl<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, Ljubljana

<sup>2</sup>Odsek za znanosti o okolju, Inštitut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, Ljubljana

spela.zupancic@ffa.uni-lj.si

Parodontalna bolezen je kronična vnetna bolezen obzobnega tkiva, ki nastane zaradi disbioze biofilma in posledičnega disreguliranega imunskega odziva gostitelja. Mehansko odstranjevanje biofilma in antibiotično zdravljenje predstavljata konvencionalna terapevtska pristopa, ki pogosto vodita le do začasnega izboljšane stanja. Ker so za učinkovitejše zdravljenje potrebni novi pristopi, smo razvili membrano na osnovi nanovlaken z vgrajenima potencialno probiotičnima sevoma.

Preučevali smo dva avtohtona bakterijska seva rodu *Bacillus* (27.3.Z in 25.2.M), ki smo ju izolirali iz ustne votline zdravih prostovoljcev. S sekvenciranjem celotnih genomov smo identificirali gene za metabolite s protibakterijskim in imunomodulatornim delovanjem ter genotipsko potrdili varnost uporabe obeh sevov s preverjanjem odsotnosti genov za virulence dejavnike in prenosljivost odpornosti na antibiotike. Protibakterijsko učinkovitost in imunomodulatorno delovanje smo potrdili tudi *in vitro*. Metaboliti obeh sevov so zavirali rast parodontopatogenih bakterij *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* in *Fusobacterium nucleatum*. Imunomodulatorno delovanje pa smo dokazali z zmanjšanjem proliferacije poliklonsko aktiviranih limfocitov T in sproščanja vnetnih citokinov v kulturi mononuklearnih celic periferne krvi *in vitro*. Spore obeh preučevanih sevov smo v kombinaciji uspešno vgradili v nanovlakna na osnovi polietilen oksida in alginata ter ugotovili, da v dostavnem sistemu ohranjajo živost vsaj šest mesecev. Membrane iz polimernih nanovlaken so izkazovale sposobnost nabrekanja, ki preprečuje takojšnje sproščanje spor in s tem zmanjša verjetnost spiranja bakterij z mesta dajanja.

Razvita nanovlakna s sevoma 27.3.Z in 25.2.M izkazujejo veliko verjetnost za vzpostavitev uravnotežene mikrobiote in zaviranje destruktivnega prekomernega vnetnega odziva. Razvit nanodostavni sistem tako predstavlja potencial za učinkovitejše zdravljenje parodontalne bolezni.

**Ključne besede:** probiotiki, parodontitis, nanovlakna

# Mikrobi in protimikrobne učinkovine



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Prisotnost večkratno odpornih bakterij v bolnišnični odpadni vodi

Leon Marič<sup>1</sup>, Lea Knez<sup>2</sup>, Goran Novak<sup>2</sup>, Maja Rupnik<sup>1,3</sup>, Sandra Janežič<sup>1,3</sup>, Andrej Golle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano (NLZOH), Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

<sup>2</sup>Enota za obvladovanje bolnišničnih okužb (EOBO), Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

<sup>3</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

leon.maric@nlzoh.si

Bolnišnične odpadne vode so lahko pomemben dejavnik pri prenosu odpornih sevov v okolje in lahko predstavljajo pomemben vir za sledenje proti antibiotikom odpornih bakterij. V naši študiji smo na primeru velike učne bolnišnice raziskali katere proti antibiotikom odporne bakterijske vrste so najpogostejše v bolnišnični odpadni vodi ter jih primerjali z izolati, ki smo jih s standardnimi postopki osamili pri bolnikih v isti bolnišnici. V nadaljevanju raziskave smo se omejili na primerjavo dveh pogostejših bakterijskih vrst v bolnišničnih vodah pri bolnikih in sicer *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*. K temu smo pristopili z metodo sekvenciranja celotnih genomov, kar nam je omogočilo, da smo uvrstili izolate v sekvenčne tipe (ST), naredili natančno primerjavo genotipov in podrobno raziskali genske zapise, ki bakteriji omogočajo odpornost proti različnim skupinam antibiotikov. V analizo primerjave genotipov bakterije *K. pneumoniae* smo vključili 55 izolatov (20 izolatov iz bolnišnične odpadne vode in 35 izolatov iz bolnikov) in jih uvrstili v 10 sekvenčnih tipov, med katerimi je prevladoval ST147. Vsi izolati ST147 so se uvrščali v skupno klonalno gručo, tako izolati bolnišnične odpadne vode kot tudi izolati iz bolnikov, kar potrjuje, da lahko bolnišnična odpadna voda predstavlja pomembno pot prenosa odpornih sevov *K. pneumoniae* v okolje. Pri izolatih *K. pneumoniae* smo najpogosteje potrdili prisotnost betalaktamaz  $bla_{CTX-M-15'}$ ,  $bla_{OXA-48'}$ ,  $bla_{NDM-5'}$ ,  $bla_{SHV-11}$  in  $bla_{TEM-1}$ . V analizo smo vključili tudi 75 izolatov bakterije *E. coli*, od tega 14 izolatov iz odpadne bolnišnične vode in 61 izolatov iz bolnikov. Izolati bolnikov in izolati odpadne bolnišnične vode se v tem primeru niso uvrščali v večjo skupno klonalno gručo. Najpogosteje smo potrdili prisotnost *E. coli* ST131. Med betalaktamazami je prevladovala betalaktamaza  $bla_{CTX-M-15'}$ , pogosto v kombinaciji z genom  $bla_{OXA-1}$  in  $bla_{TEM-1}$  in tudi betalaktamaza  $bla_{CTX-M-27}$ . Bolnišnične odpadne vode so lahko eden od načinov za spremljanje trendov pojavljanja odpornih bakterij, vendar ne pokažejo celotne slike genotipov, ki jih najdemo v bolnišnici.

**Ključne besede:** odpornost proti antibiotikom, odpadne bolnišnične vode, sekvenciranje celotnega genoma



## Večkratno odporne po Gramu negativne bakterije v slovenskih sladkovodnih ribogojnicah

Lana Senič<sup>1</sup>, Sandra Janežič<sup>1</sup>, Marija Seničar<sup>3</sup>, Rosvita Sitar<sup>3</sup>, Valerija Tkalec<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska 1, Maribor

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta v Mariboru, Univerza v Mariboru, Taborska ul.8, Maribor

<sup>3</sup>Veterinarska fakulteta v Ljubljani, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

valerija.tkalec@nlzoh.si

Ribogojstvo je ena najhitreje rastočih industrij na svetu. Z rastjo ribogojstva se povečuje tudi uporaba antibiotikov za zdravljenje rib.. Posledično tovrstna vodna okolja lahko predstavljajo pomemben rezervoar mikrobne odpornosti. V Sloveniji imamo okrog 100 sladkovodnih ribogojnic; od tega 80 hladnovodnih ribogojnic za vzrejo postrvi, 20 ribnikov za toplovodne vrste in 3 ribogojnice zaprtega tipa za vzrejo afriškega soma. Poleg tega imamo več ribnikov namenjenih rekreacijskemu ribolovu.

Namen naše raziskave je bilo testiranje vode ter sedimentov iz različnih slovenskih sladkovodnih ribogojnic in ribnikov namenjenih športnemu ribolovu na klinično pomembne po Gramu negativne bakterije, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in proti karbapenemom odporne po Gramu negativne bakterije, ki izločajo karbapenemaze (CR-CP). Teh podatkov za slovenske ribogojnice zaenkrat še nimamo.

Po različnih slovenskih regijah smo od maja do oktobra 2023 vzorčili sedimente ter vodo na vtoku in iztoku v dveh hladnovodnih ribogojnicah, treh toplovodnih ribogojnicah ter dveh ribnikih na katerih poteka športni ribolov. Vzorce smo gojili na selektivnih gojiščih, ki se v klinične namene uporabljajo za določanje bakterij ESBL in CR-CP. Skupno smo osamili čez 400 bakterijskih izolatov. Več kot polovica identificiranih bakterij se je uvrščala v rod *Pseudomonas*, sledili so predstavniki iz rodov *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas* in *Escherichia*. S presejalnimi testi, ki so osnovani na disk difuzijskem antibiogramu smo iz vzorcev toplovodnih ribogojnic in ribnikov osamili 9 izolatov *Serratia fonticola* z ESBL in en izolat *Escherichia coli* z ESBL. Fenotipsko določene mehanizme odpornosti smo potrdili še na osnovi analize genomskih zaporedij ter jih primerjali s kliničnimi izolati iz naše obsežne zbirke večkratno odpornih bakterij iz istega obdobja. Naša raziskava nakazuje, da v vodnih okoljih povezanih z ribogojstvom in ribolovom lahko odkrijemo po Gramu negativne bakterije z ESBL, vendar je prisotnost teh bakterij odvisna od vrste ribogojnice.

**Ključne besede:** ribogojnice, ribolov, večkratno odporne bakterije, ESBL, karbapenemaze

## Probiotik proti patogenu: boj za obstanek v dobrem in slabem

Eli Podnar<sup>1</sup>, Eva Kovačec<sup>1</sup>, Tjaša Danevčič<sup>1</sup>, Bram Lories<sup>2</sup>, Hans Steenackers<sup>2</sup>, Ines Mandić-Mulec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Leuven, Kasteelpark Arenberg 20, Leuven, Belgium

eli.podnar@bf.uni-lj.si

Bakterija *Salmonella enterica* serovar Typhimurium je eden najpogostejših patogenov pri ljudeh in živalih, ki se prenaša s hrano. Bakterije iz rodu *Salmonella* so vseprisotne in lahko prebivajo v okoljih zunaj gostitelja, ki so revna s hranili. Razvoj odpornosti proti antibiotikom je pogost med sevi bakterije *Salmonella*, zato so potrebni alternativni pristopi za omejevanje okužb. Probiotične bakterije, kot je bakterija *Bacillus subtilis*, so obetavna nova strategija za boj proti patogenom, ki se prenašajo s hrano. Interakcije med bakterijama *B. subtilis* in *Salmonella* so do sedaj večinoma preučevali in vivo na živalih in niso obravnavali mehanizmov, ki usmerjajo kompeticijo med bakterijama. V tej raziskavi smo preučevali interakcije med bakterijama *B. subtilis* PS-216 in *S. Typhimurium* SL1344 v okoljih z različno vsebnostjo hranil. Rezultati kažejo, da v pogojih obilja bakterija *B. subtilis* PS-216 zavira rast bakterije *S. Typhimurium* SL1344, zmanjša njeno adhezijo in debelino biofilma. Mutanta *B. subtilis*  $\Delta pks$ , ki ne sintetizira poliketidnega antibiotika bacilena, ne zavira rasti patogena. V kokulturi je bakterija *S. Typhimurium* sprožila aktivacijo promoterja  $P_{pksC}$  odgovornega za sintezo bacilena pri bakteriji *B. subtilis*. To kaže, da bakterija *B. subtilis* zaznava in se odziva na prisotnost patogena. Ugotovili smo tudi, da ob pomanjkanju hranil bakterija *B. subtilis* izgubi antagonistični učinek proti bakteriji *S. Typhimurium* in tvori manj spor v kokulturi kot v monokulturi. Inhibicija sporulacije je povezana s pomanjkanjem železa in s stresnim odzivom bakterije *B. subtilis*, ki ga uravnava sigma B (SigB). Inhibicija sporulacije je tudi pogojena z direktnim celičnim stikom obeh vrst in s sistemom za izločanje tipa VI (T6SS) bakterije *S. Typhimurium*.

Delo razkriva nove molekularne determinante kompeticije med probiotikom in patogenom ter izpostavi vpliva okoljskih pogojev in tesnih medceličnih interakcij na izid kompeticije. Razkriva tudi pomen vrednotenja probiotičnih sevov proti patogenom pod pogoji, ki ustrezajo predvideni uporabi, kar je pomembno za izboljšanje kontrole patogenov s probiotiki.

**Ključne besede:** probiotik, patogen, mikrobne interakcije

## Biolška aktivnost izbranih izolatov aktinomicet iz kraških jam ter njihova taksonomska uvrstitev

Martina Avbelj<sup>1</sup>, Maja Paš<sup>1</sup>, Nuša Papler<sup>1</sup>, Jernej Jakše<sup>1</sup>, Anja Klančnik<sup>1</sup>, Doroteja Vljaj<sup>1</sup>, Janez Mulec<sup>2</sup>, Hrvoje Petković<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Inštitut za raziskovanje krasa, Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti, Titov trg 2, 6230 Postojna, Slovenija

[martina.avbelj@bf.uni-lj.si](mailto:martina.avbelj@bf.uni-lj.si)

Problematika vse večje pojavnosti bakterij odpornih proti antibiotikom predstavlja veliko grožnjo javnemu zdravstvu, zato je iskanje novih protimikrobnih učinkovin neizogibno. Mikrobi ekstremnih okolij predstavljajo pomemben vir novih bioaktivnih učinkovin. Eno takih okolij predstavljajo kraške jame, kjer specifične karakteristike jamskih sistemov, kot so tema, visoka vlažnost, nizke temperature in pomanjkanje hranil vplivajo na produkcijo različnih bioaktivnih spojin v mikroorganizmih. Aktinobakterije, med katere spadajo tudi aktinomicete, so glavni vir bioaktivnih spojin. Proizvajajo dve tretjini vseh antibiotikov, ki so dostopni na trgu. Sodobni načini sekvenciranja so pokazali, da vsebujejo genomi aktinomicet mnogo genskih biosinteznih gruč (GBG), ki so v običajnih laboratorijskih razmerah tihe oziroma slabo izražene. Ena od strategij za aktivacijo teh GBG je spreminjanje parametrov gojenja. S spreminjanjem parametrov gojenja, v našem primeru sestave gojišča in pH smo aktinomicetne seve spodbudili k proizvodnji protimikrobnih spojin. Aktinomicetne seve izolirane iz izbranih kraških jam smo gojili v različnih produkcijskih gojiščih iz katerih smo pripravili ekstrakte sekundarnih metabolitov. Protimikrobno aktivnost ekstraktov sekundarnih metabolitov smo testirali proti bakterijam *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ter glivam *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida albicans*. Uporabili smo metodo difuzije v trdnem gojišču z merjenjem con inhibicije. Od sedemintridesetih testiranih ekstraktov sekundarnih metabolitov aktinomicetnih sevov smo v sedemindvajsetih zaznali protibakterijsko in/ali protiglavno delovanje. Na podlagi analize zaporedja gena za 16S rRNK smo aktinomicetne seve tudi taksonomsko razvrstili. Izbranim sevom smo s pomočjo bioinformatične analize ovrednotili biosintetski potencial.

**Ključne besede:** aktinomicete, slovenske kraške jame, protimikrobna aktivnost, taksonomska uvrstitev, gruče biosinteznih genov, sekundarni metaboliti, bioinformacijska analiza

## Razvoj novih zaviralcev bakterijskih topoizomeraz za zdravljenje okužb z rezistentnimi grampozitivnimi bakterijami

Martina Hrast Rambaher<sup>1</sup>, Marko Anderluh<sup>1</sup>, Nikola Minovski<sup>2</sup>, Irena Zdovc<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, Ljubljana

<sup>2</sup>Teoretični odsek, Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, Ljubljana

<sup>3</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

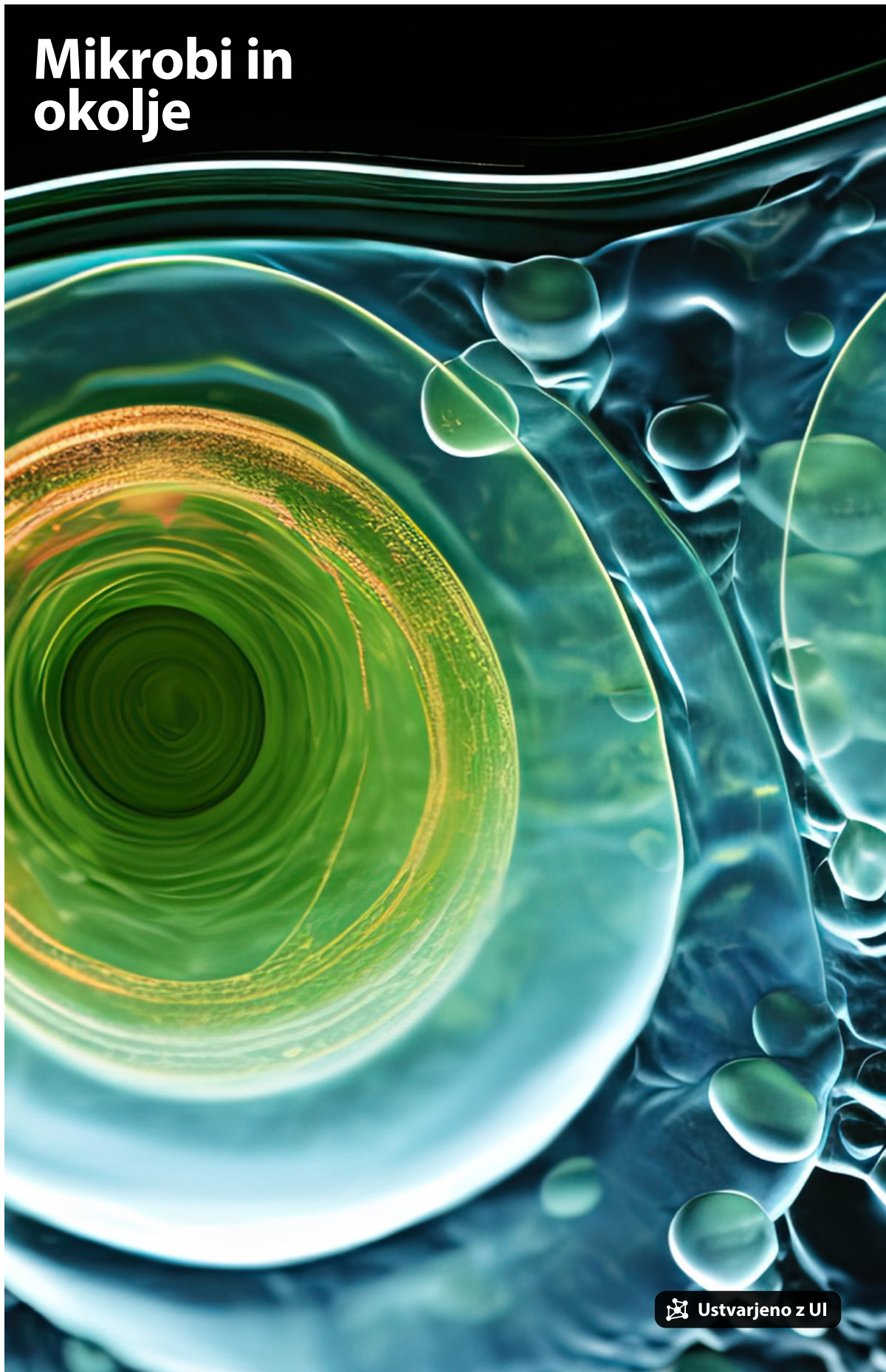
[martina.hrast-rambaher@ffa.uni-lj.si](mailto:martina.hrast-rambaher@ffa.uni-lj.si)


Odpornost bakterij na antibiotike predstavlja enega izmed desetih največjih svetovnih zdravstvenih problemov, povezanih z zaskrbljujočim povečanjem števila bakterijskih okužb, ki jih ni več mogoče zdraviti z razpoložljivimi protibakterijskimi zdravili. Zato je nujno potrebno, da razvijamo nove protibakterijske učinkovine. Na Fakulteti za farmacijo v sodelovanju s Kemijskim inštitutom in Veterinarsko fakulteto razvijamo nove zaviralce bakterijskih topoizomeraz tipa II (NBTI). K bakterijskim topoizomerazam tipa II uvrščamo encima DNA girazo in topoizomerazo IV, ki igrata ključno vlogo pri cepitvi in pravilnem zvitju molekule DNA in sta za preživetje bakterij ključna. Oba encima sta si strukturno zelo podobna, kar nam omogoča načrtovanje majhnih molekul, ki se lahko istočasno vežejo na oba encima hkrati v isti ali različnih bakterijah, zaradi česar je možnost za razvoj rezistence na te spojine bistveno manjši kot pri klasičnih antibiotikih.

Z razvojem in optimizacijo naših spojin smo identificirali spojine, ki izjemno močno zavirajo delovanje obeh topoizomeraz, DNA giraze in topoizomeraze IV hkrati, ter izkazujejo močno protibakterijsko delovanje na širok spekter bakterij. Zelo močno protibakterijsko delovanje imajo na po Gramu pozitivne bakterije, poleg tega pa zavirajo rast tudi po Gramu negativnih bakterij, kot so *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in vrste iz rodu *Enterobacter*. Izjemno učinkovito zavirajo rast na meticilin odpornih *Staphylococcus aureus* (MRSA), ki so glavni povzročitelj bolnišničnih okužb, ter na meticilin odpornih *Staphylococcus pseudintermedius*. Najbolj perspektivne spojine so se izkazale kot varne in učinkovite tudi v in vivo modelih zebra ribic in v nevtropeničnem modelu okužbe stegen pri miših. Inovativne spojine so učinkovitejše od vseh znanih konkurenčnih učinkovin iz iste terapevtsko-kemijske skupine in bi lahko pripomogle k uspešnejšemu zdravljenju bakterijskih okužb ter omogočile tudi zdravljenje okužb z bakterijami, ki so proti večini znanih učinkovin že odporne.

**Ključne besede:** novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (NBTI), bakterijska odpornost, protibakterijske spojine

# Mikrobi in okolje



 Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Populacijska genomika in razširjanje mikroorganizmov

Cene Gostinčar, Anja Černoša, Martina Turk, Polona Zalar, Nina Gunde-Cimerman

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

[cene.gostincar@bf.uni-lj.si](mailto:cene.gostincar@bf.uni-lj.si)

Mnoga vprašanja o sposobnostih in mehanizmi razširjanja mikroorganizmov ostajajo neodgovorjena. Veljavnost odkritij rastlinske in živalske biogeografije na področju mikrogliv je močno vprašljiva, zlasti pri razumevanju povezave med razširjanjem in izjemno raznovrstnimi strategijami razmnoževanja, opaženimi pri različnih vrstah gliv. Posebej zanimiv primer so ekstremotolerantne in ekstremofilne glive, ki naseljujejo raznolike habitate, med katerimi najdemo zelo fragmentirane, na primer slana jezera in geotermalne izvire, pa tudi obsežna in sklenjena območja, kot so puščave in polarni ledeni pokrovi. V kolikšni meri so mikroorganizmi sposobni potovati med razdrobljenimi habitati? Kako enakomerna je njihova razširjenost v sklenjenih habitatih? Kako na razširjanje vpliva njihova sposobnost uspevanja v zmernih razmerah?

Neposredno opazovanje migracij mikroorganizmov je v večini primerov nemogoče. Metode populacijske genomike nam zato nudijo edinstven vpogled v sposobnosti razširjanja posameznih vrst, pa tudi v velike razlike med njimi. Poliekstremotolerantna črna kvasovka *Aureobasidium pullulans* na primer oblikuje globalno mešano populacijo, v kateri poteka intenzivna rekombinacija, kar je v popolnem nasprotju z njeno bližnjo sorodnico *Aureobasidium subglaciale*, ki se razmnožuje nespolno in je pri svojem razširjanju močno omejena. Črni kvasovki *Aureobasidium melanogenum* in *Hortaea werneckii*, še dve vrsti z izključno nespolnim razmnoževanjem, občasno tvorita stabilne diploidne hibride, ki so sposobni prepotovati presenetljive razdalje. Splošno razširjena bazidiomicetna gliva *Wallemia mellicola* kaže omejeno rekombinacijo, presenetljivo pa enako opazimo tudi pri njeni halofilni sorodnici, izjemno redki vrsti *Wallemia ichthyophaga*, ki v zmernih razmerah ne more uspevati.

Zdi se, da se raznolikost sposobnosti širjenja med ekstremofilnimi in ekstremotolerantnimi glivami ujema z raznolikostjo njihovih razmnoževalnih strategij. Četudi marsikaj o razširjanju mikroorganizmov ostaja neznano, opisane ugotovitve orisujejo nepričakovano kompleksno sliko, ki je bistvena za razumevanje povezav med mehanizmi razširjanja in edinstvenimi prilagoditvami glivnih združb ekstremnih okolij ter za razumevanje razširjanja gliv v okolju nasploh.

**Ključne besede:** mikroorganizmi, razširjanje, populacijska genomika

## Odkrivanje in zaznavanje virusov povezanih s tujerodnimi (invazivnimi) vrstami

Denis Kutnjak<sup>1</sup>, Katarina Bačnik<sup>1</sup>, Luka Kranjc<sup>1</sup>, Sandra Hudina<sup>2</sup>, Ivana Maguire<sup>2</sup>, Ana Bielen<sup>3</sup>, Dora Pavič<sup>3</sup>, Leticia Botella<sup>4</sup>, Jiří Patoka<sup>5</sup>, Antonín Kouba<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup>Department for Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>4</sup>Department of Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological Sciences, University of South Bohemia in České Budějovice, Vodňany, Czech Republic

<sup>6</sup>South Bohemian Research Centre of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice, Vodňany, Czech Republic

denis.kutnjak@nib.si

Z gostiteljem povezane mikrobne združbe imajo lahko pomemben vpliv na uspeh kolonizacije tujerodnih vrst. Prenosi predstavnikov mikrobnih združb med domorodnimi in tujerodnimi vrstami pa lahko vplivajo na dinamiko odnosov med gostitelji in patogeni, kar se odraža v povečanem epidemiološkem tveganju, z vplivom na kmetijstvo, akvakulturo, ekosisteme in zdravje človeka. Tveganja in posledice vnosa znanih in neznanih mikrobnih patogenov s tujerodnimi vrstami so slabo raziskani, postopki in metode njihovega odkrivanja pa pomanjkljivi. S pomočjo metagenomskih pristopov, ki temeljijo na uporabi visokozmogljivega sekvenciranja, lahko zaznamo širok spekter mikrobov v različnih tipih vzorcev. V sklopu pretekle študije smo na ta način karakterizirali virom ene izmed najbolj uspešnih sladkovodnih invazivnih vrst nevretenčarjev v Evropi – signalnega raka (*Pacifastacus leniusculus*). Odkrili smo prisotnost novih divergentnih s signalnim rakom povezanih RNA virusov, ki smo jih zaznali v različnih vzorcih iz območja invazije signalnega raka. Nato smo se osredotočili na tri priljubljene vrste eksotičnih rakov, katerih uvoz v Evropo poteka preko trgovine z domačimi živalmi. Trgovina z domačimi živalmi predstavlja eno izmed glavnih poti vnosa invazivnih tujerodnih vrst, a so tveganja, povezana s hkratnim vnosom povzročiteljev bolezni, še vedno slabo raziskana. V testiranih vzorcih eksotičnih rakov smo zaznali več znanih in novih DNA in RNA virusov, med njimi tudi znane povzročitelje bolezni. Predstavljene raziskave opozarjajo na skrita tveganja prenosov virusov s tujerodnimi vrstami in vzpostavljajo nove možnosti uporabe sodobnih pristopov za zaznavanje morebitnih mikrobnih tveganj povezanih s takimi organizmi.

**Ključne besede:** tujerodne vrste, viskozno-mogljivo sekvenciranje, virusi, raki

## Sorodstveno razlikovanje med sevi *Bacillus subtilis* lahko vpliva na zmožnost razširjanja surfaktinskih goljufov znotraj populacije

Katarina Belcijan Pandur, Barbara Kraigher, Ana Tomac, Jernej Kralj, Zala Vašl, Polonca Štefanič, Ines Mandić Mulec

Katedra za mikrobno ekologijo in fiziologijo, Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

katarina.pandurbelcijan@bf.uni-lj.si

*Bacillus subtilis* je zmožen kooperativnega rojenja po površini, za katerega je ključna sinteza surfaktina. Surfaktin lahko izkoriščajo tudi goljufi, ki surfaktina ne proizvajajo in pridobijo prednost pred producenti. Raziskave kažejo, da v skupnem roju seva PS-216, ki proizvaja surfaktin, in izogene mutante, ki ni zmožna tvorbe surfaktina, pride do izkoriščanja surfaktina in posledično do prevlade surfaktinske mutante. Pokazali smo, da prevlada surfaktinske mutante v roju z divjim tipom s časom vodi v kolaps rojenja.

Predhodne raziskave nakazujejo, da lahko sorodstveno razlikovanje stabilizira sodelovanje in prepreči izkoriščanje skupnih dobrin. Sorodstvenega razlikovanja so tekom rojenja zmožni tudi sevi *B. subtilis*, pri čemer visoko sorodni (kin) sevi lahko tvorijo skupni roj, manj sorodni (non-kin) sevi te vrste pa izključijo drugega iz skupnega roja ter ob stiku z manj sorodnim rojem tvorijo mejno linijo. Skladno s teorijo smo v mešani kulturi divjega tipa in surfaktinske mutante opazili, da antagonistične interakcije z non-kin rojem zmanjšajo zmožnost razširjanja surfaktinske mutante znotraj mešane populacije in so skladni z rezultati eksperimentalne evolucije seva PS-216. Tega smo periodično (20 ciklov) izpostavljali stiku z bolj ali manj sorodnimi roji in nato 20. populacijo testirali za prisotnost mutant z okvaro rojenja. V evolviranih populacijah, ki so bile periodično izpostavljene stikom z manj sorodnim rojem je bilo mutant z okvaro rojenja manj kot v tistih, ki smo jih izpostavili bližnjim sorodnikom. Dokazali smo tudi, da mutante z okvaro v rojenju najbolj pogosto nosijo mutacije v genih za sintezo surfaktina. Naši rezultati prvič potrjujejo, da antagonistične interakcije upočasnjujejo prevlado in evolucijo »goljufov«, ki izkoriščajo skupne dobrine, kar je pomembno za razumevanje stabilnosti kooperativnega vedenja v bioloških sistemih.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, sorodstveno razlikovanje, rojenje, surfaktin, eksperimentalna evolucija



## Mikrobna razgradnja detrita meduz spodbuja rast fitoplanktona v obalnem morskem ekosistemu

Tinkara Tinta<sup>1</sup>, Eduard Fadeev<sup>2</sup>, Mauro Celussi<sup>3</sup>, Katja Klun<sup>1</sup>, Vesna Flander-Putrlje<sup>1</sup>, Patricija Mozetič<sup>1</sup>, Gerhard J Herndl<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Morska biološka postaja Piran, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, Slovenia

<sup>2</sup>Department of Functional and Evolutionary Ecology, University of Vienna, Vienna, Austria

<sup>3</sup>Oceanography Division, OGS (Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale), Trieste, Italy

tinkara.tinta@nib.si

Želatinozni zooplankton ali 'meduze' so prisotni v različnih morskih ekosistemih, zaradi značilne presnove in življenjskega cikla pa se lahko nekatere vrste pojavljajo množično. Ko tako številčne populacije odmrejo se v okolico naenkrat sprosti velika količina labilne, pretežno beljakovinske, organske snovi meduznega izvora, ki je potencialno dostopna mikroorganizmom v vodnem stolpcu. Da bi razumeli odziv naravne mikrobne združbe na meduzni detrit in posledice mikrobne razgradnje le-tega za delovanje morskega ekosistema, smo v dvostopenjskem mikrokozmu eksperimentu simulirali scenarij razpada množične populacije invazivne rebrače *Mnemiopsis leidyi* v obalnem morju. V prvi fazi našega poskusa je meduzni detrit omogočil hitro rast oportunističnih bakterij z visoko učinkovitostjo rasti. Razgradnja meduznega detrita je bila večinoma povezana s povečano aktivnostjo bakterijske levčin aminopeptidaze, različnih glikozil hidrolaz in alkalne fosfataze. Posledično smo zabeležili kopičenje anorganskih hranil (zlasti amonija) v morski vodi. Naše metagenomske in metaproteomske analize so pokazale, da je v mikrobni konzorciju, ki razgrajuje meduzni detrit, močno prevladovala populacija *Pseudoalteromonasa* z visoko produkcijo proteolitičnih eksoencimov in povečano presnovno aktivnost. V drugi fazi poskusa smo inkubirali razgrajeni detrit meduz (t.j. 0,2 µm filtriran končni produkt mikrobne razgradnje v prvi fazi) s svežo vzorčeno naravno združbo mikrobnega planktona. Po treh dneh smo opazili znatno povečanje primarne produkcije in biomase fitoplanktona, ki je dosegla vrednosti, podobne tistim, opaženim *in situ* med sezonskimi viški fitoplanktonske biomase v obalnem ekosistemu severnega Jadrana. Naše eksperimentalne ugotovitve smo dodatno potrdili z *in situ* meritvami in tako pokazali, da mikrobna razgradnja meduznega detrita spodbuja rast fitoplanktona v obalnem morju. Množično pojavljanje meduz torej lahko pomeni pomemben, a večinoma spregledan, vir organske in anorganske snovi, ki lahko spodbudi cvetenje fitoplanktona. Rezultati naše študije kažejo na velik pomen meduz v kroženju ogljika v morju in nujnost vključitve te komponente v morske biogeokemične modele, sploh glede na napovedi, da naj bi se želatinozni zooplankton uspešno prilagodil na napovedane spremembe morskih ekosistemov v prihodnje.

**Ključne besede:** morska mikrobna združba, meduze, cvetenje fitoplanktona

## Epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji

Tom Koritnik<sup>1</sup>, Vid Vedlin<sup>1</sup>, Tea Janko<sup>1</sup>, Maja Bolješič<sup>1</sup>, Verica Mioč<sup>1</sup>, Tatjana Jurša<sup>1</sup>, Boštjan Križanec<sup>1</sup>, Natalija Kranjec<sup>2</sup>, An Galičič<sup>2</sup>, Tjaša Cerar Kišek<sup>1</sup>, Andrej Steyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

<sup>2</sup>Nacionalni inštitut za javno zdravje

tom.koritnik@nlzoh.si

Epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah omogoča določitev ocenjenega števila okuženih oseb in spremljanje razširjenosti različic virusa v opazovani populaciji in obdobju. V monitoring je vključenih 16 komunalnih čistilnih napravah (KČN) v 12 statističnih regijah, s čimer zajamemo 34,2 % slovenske populacije.

Vzorčenje je potekalo v obdobju september 2022 - november 2023. Z uporabo časovno sorazmernega vzorčevalnika smo odvzeli 24-urne vzorce vtoka odpadne vode, ter zabeležili podatke o času vzorčenja, pretoku in temperaturi vode.

Postopek določitve koncentracije SARS-CoV-2 je obsegal koncentracijo vzorca, osamitev nukleinske kisline in kvantitativno določitev genomskih kopij. Za ocenitev števila okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev, smo virusno breme normalizirali na kvantificirane vrednosti kemijske potrebe po kisiku, normalizirano vrednost pa s pomočjo pretvorbenega faktorja pretvorili v ocenjeno število okuženih oseb. Faktor je bil opredeljen v pilotnem obdobju (sep 2022-jan 2023) vzpostavitve sistema, s prileganjem virusnega bremena aktivnim primerom okužb. Za to obdobje je bilo ocenjeno, da so podatki testiranja okuženih in zbolelih za klinične namene še prikazovali reprezentativno stanje okužb v populaciji.

V vseh testiranih vzorcih smo s sekveniranjem in bioinformatično obdelavo podatkov (orodje Freyja) izvedli določanje mutacij genoma SARS-CoV-2, značilne za posamezne različice.

Testiranih je bilo 880 vzorcev odpadne vode. Ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev se je gibalo med 0 in 1832, v povprečju je bilo okuženih 245 oseb na 100.000 prebivalcev. Rezultati za posamezno KČN v različnih časovnih točkah so javno dostopni preko spletne strani NIJZ. Ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2, ki temelji na analizi odpadnih vod, je praviloma večje od števila okuženih oseb, ki izvira iz podatkov o kliničnem testiranju.

Iz podatkov o različicah virusa je razvidno, da je v začetnem obdobju prevladovala različica BA.5, kasneje sta se pojavili različici BQ.1 in BA.2.75. Zatem so se pojavile še različice XBB.1.5, XBB.1.9, EG.5 in BA.2.86.

**Ključne besede:** SARS-CoV-2, odpadna voda, epidemiologija

# Mikrobi in analitika



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Izboljšane analitske metode za varnejša in učinkovitejša genska zdravila

Mojca Janc<sup>1,2</sup>, Kaja Zevnik<sup>1</sup>, Jana Deurič<sup>1</sup>, David Dobnik<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova 39, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Niba Labs Ltd., Litostrajska 52, 1000 Ljubljana

mojca.janc@nib.si

Na svetovnem trgu iz leta v leto narašča količina genskih zdravil, s čimer narašča tudi skrb za njihovo učinkovitost in varnost. Omenjena zdravila pogosto vsebujejo virusne vektorji, med katerimi so se uveljavili z adenovirusi povezani virusi (ang. adeno-associated viruses AAV). Trenutno veliko skrb vzbuja pomanjkanje standardiziranih analitskih metod, s katerimi bi lahko natančno ovrednotili celovitost pripravljenih vektorskih genomov.

V naši raziskavi smo se osredotočili na dva tipa AAV9 vektorjev (enoverižno in samokomplementarno obliko), ki so bili proizvedeni v HEK293T celicah in očiščeni z ultracentrifugiranjem v CsCl gradientu. AAV vzorce smo v prvem delu študije podrobno ovrednotili s serijo uveljavljenih analitskih metod (npr. qPCR in dPCR za oceno genomskega titra, ELISA za oceno kapsidnega titra in oceno ostankov gostiteljskih beljakovin, TEM, AUC in SEC-MALS za oceno prisotnosti polnih, delno polnih in praznih virusnih delcev, virusnih agregatov ter drugih nečistoč ter HTS za ovrednotenje prisotnosti neželenih nukleinskih kislin). V drugem delu študije smo se nato osredotočili na izboljšanje obstoječih metod, hkrati pa smo želeli razvijati tudi nove analitske pristope (npr. uporabo cryoEM za podrobnejše in avtomatizirano razlikovanje med polnimi, praznimi in delno polnimi kapsidami, NANOPORE sekvenciranje za podrobnejšo analizo genske vsebine ter večtarčni dPCR za oceno integritete vektorskih genomov).

V prvem delu študije smo pokazali, da ni ene najbolj informativna metode, ki bi hkrati dobro ocenila več parametrov, in da je kombiniranje metod nujno za celostno razumevanje AAV vektorjev. V drugem delu študije smo pokazali, da na uspešnost novo razvitih metod v veliki meri vpliva koncentracija virusnih delcev v vzorcih. Večja kot je koncentracija virusnih delcev, lažja in uspešnejša je priprava knjižnice za sekvenciranje oziroma mrežic za cryoEM, ter analiza pridobljenih rezultatov. Omenjeni metodi zato kažeta potencial v uporabnosti v sklopu analitskega testiranja končnih produktov, za razliko od večtarčnega dPCR-ja, ki kaže potencial za uporabo tudi v začetnih korakih proizvodnje.

**Ključne besede:** genska terapija, z adenovirusi pridruženi virusi, analitske metode

## Oblikovanje in testiranje testov PCR v realnem času za specifično detekcijo bakterij na podlagi genomskih podatkov

Aleksander Benčič<sup>1,2</sup>, Tanja Dreo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Biology, Department of Biotechnology and Systems Biology, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup>Jožef Stefan International Postgraduate School, Jamova 39, Ljubljana 1000, Slovenia

[aleksander.bencic@nib.si](mailto:aleksander.bencic@nib.si)

Molekularne metode kot je verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) imajo številne prednosti pri detekciji različnih mikroorganizmov (MO). Ta omogoča hitro in zanesljivo detekcijo MO pri kateri ni potrebna izolacija v čisti kulturi in ga je mogoče prilagoditi za detekcijo praktično vseh MO. Hkrati je bliskovit razvoj visokopretočnega sekvenciranja v zadnjih letih privedel do generiranja velikih količin genomskih podatkov, ki so javno dostopni v bazah podatkov kot sta GenBank in RefSeq. Te podatke lahko uporabimo za določitev nukleotidnih zaporedij značilnih za določen takson, ki se lahko uporabijo za načrtovanje specifičnega PCR testa. Na začetku bioinformatične analize je potrebno najprej določiti tarčne genome MO, ki jih želimo s testom zaznati in netarčne genome, ki jih s testom ne želimo zaznati in najpogosteje pripadajo sorodnim MO. Programe kot je RUCS (*rapid identification of PCR primers for unique core sequences*) uporabimo za identifikacijo zaporedij edinstvenih za tarčne MO. Ta zaporedja uporabimo za načrtovanje začetnih oligonukletidov in sonde, za kar uporabimo programe kot je PrimerExpress2.

Po zaključenem *in silico* načrtovanju se izvede laboratorijsko testiranje. Pri tem je velikega pomena, da so materiali, ki se uporabljajo za preverjanje delovanja qPCR testov ustrezno ovrednoteni. Za določitev koncentracij MO se pogosto uporablja več metod kot so turbidimetrija, štetje kolonij na ploščah in digitalni PCR. Rezultate testiranja se primerja z rezultati dobljenimi z že uveljavljenimi testi. V prvem koraku testiranja ugotavljamo učinkovitosti pomnoževanja več različnih qPCR testov za kar se lahko uporabi visokopretočne sisteme kot je Fluidigm. V naslednjem koraku se qPCR testom določi specifičnost in občutljivost. Za določitev specifičnosti se preizkuša qPCR test uporabi za določanje tarčnih MO in netarčnih MO, ki utegnejo navzkrižno reagirati. Za določitev občutljivosti se pripravi serijo vzorcev s padajočimi koncentracijami MO na katerih se izvede qPCR teste. Na podlagi teh rezultatov se pripravi izbor najprimernejših testov, ki se jih testira še na realnih vzorcih in pošlje v preverjanje v druge laboratorije. Zanesljivost rezultatov je ključnega pomena v diagnostiki zato morejo biti nove metode pred uvedbo v rutinsko uporabo temeljito ovrednotene in temeljiti na modernih znanstvenih metodah saj to omogoča njihovo dolgotrajno uporabo.

**Ključne besede:** PCR v realnem času, genomski podatki, detekcija mikroorganizmov

## Spremljanje razširjenosti respiratornega sincicijskega virusa s pristopom epidemiologije odpadnih voda (WBE): retrospektivna študija na vzorcih iz nacionalnega spremljanja SARS-CoV-2

Nina Prezelj<sup>1</sup>, Ion Gutierrez-Aguirre<sup>1</sup>, Nikita Matovič<sup>2</sup>, Živa Lengar<sup>1</sup>, Maja Ferle<sup>1</sup>, Irena Bajde<sup>1</sup>, Mojca Milavec<sup>1</sup>,  
Alexandra Bogožalec Košir<sup>1</sup>, Olivera Maksimovič<sup>1,3</sup>, Anže Županič<sup>1</sup>, Maja Ravnikar<sup>1</sup>, Denis Kutnjak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova 39, Ljubljana

nina.prezelj@nib.si

Epidemiologija odpadnih voda (Wastewater based epidemiology, WBE) se je med pandemijo COVID-19 ponovno izkazala kot pomembno orodje epidemiološkega nadzora. Uspešno izvajanje monitoringa ter pozitivne izkušnje spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v številnih državah po vsem svetu odpirajo vrata za spremljanje epidemiološko pomembnih respiratornih in drugih skrb vzbujajočih virusov v odpadnih vodah. Pristop bi epidemiologom pomagal pri napovedovanju vrhuncev sezonskih bolezni in s tem pravočasni administraciji cepiv. Respiratorni sincicijski virus (RSV) je eden od pomembnih sezonskih povzročiteljev bolezni. RSV povzroča okužbo dihalnih poti (bronhiolitis), ki je lahko kritična pri dojenčkih in drugih ogroženih skupinah prebivalstva. Veliko okužb z RSV ni identificiranih, saj ljudje običajno ne potrebujejo zdravniške pomoči, testiranje pa se ne izvaja vedno, kar otežuje delo epidemiologov. V tej raziskavi smo izkoristili shranjene izolate RNA iz vzorcev slovenskega nacionalnega monitoringa odpadnih voda za SARS-CoV-2, vzorčenih v obdobju od januarja 2021 do marca 2023 v eni od slovenskih čistilnih naprav (Velenje-Šoštanj). Izolirane vzorce RNA smo ponovno analizirali s kvantitativnim testom PCR, specifičnim za RSV, pri čemer smo kot korektor fekalne obremenitve uporabili virus blage lisavosti paprike (PMMoV). V vzorcih zbranih v prvi polovici leta 2021, ko so zaradi COVID-19 še vedno veljali strogi previdnostni ukrepi in vladne uredbe, RSV v odpadnih vodah nismo zaznali. V vzorcih zbranih po sprostitvi omejitev smo zaznali sledove RSV pod mejo kvantifikacije. V vzorcih zbranih od oktobra 2022 do marca 2023 smo opazili jesensko-zimski vrh koncentracije RSV z vrednostmi znotraj območja kvantifikacije testa. V raziskavi smo ocenjevali tudi možnost uporabe drugega virusa, to je virusa mozaika paradižnika (ToMV), kot korektorja fekalne obremenitve in potencialno alternativo PMMoV.

**Ključne besede:** respiratorni sincicijski virus (RSV), epidemiologija odpadnih voda, fekalni indikator

## G-kvadrupleksi v patogenih organizmih

Melani Potrč<sup>1,2</sup>, Irena Drevenšek Olenik<sup>3,2</sup>, Lea Spindler<sup>4,2</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, Koroška 160, Maribor

<sup>2</sup>Odsek za kompleksne snovi, Institut Jožef Stefan, Jamova 39, Ljubljana

<sup>3</sup>Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska 19, Ljubljana

<sup>4</sup>Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru, Smetanova 17, Maribor

melani.potrc1@um.si

Nukleinske kisline, ki imajo z gvaninom (G) bogata območja, lahko tvorijo štirivijačne strukture, imenovane G-kvadrupleksi. Njihova osnovna enota je G-kvartet, ki ga tvorijo štiri z vodikovimi vezmi povezane molekule gvanina. G-kvadrupleksi sodelujejo v številnih celičnih procesih, kot so transkripcija, replikacija in rekombinacija, najdemo pa jih tako v celicah prokariotov kot evkariontov in v virusih.

G-kvadrupleksi imajo pomembno vlogo v procesih virulence pri več mikrobnih patogenih. Bolezni bakterijskega izvora, povezane z nastankom kvadrupleksnih struktur, so gonoreja (bakterija *Neisseria gonorrhoeae*), meningokokni meningitis (meningokok *Neisseria meningitidis*) in borelijoza. Prav tako sta s kvadrupleksi povezana tudi virus človeške imunske pomanjkljivosti (HIV) in virus *Epstein-Barr* (EBV), ki povzročata bolezni infektivno mononukleozo. Pri omenjenih patogenih je bilo ugotovljeno, da uporabljajo kvadruplekse za nadzor dinamike DNK ali RNK, slednje pa je podlaga za skupne fenotipe virulence.

Pri našem raziskovalnem delu smo proučevali vpliv zamenjave enega nukleotida pri virusu herpesa simpleksa (HSV-1), ki ima številne  $d(G_4T_2)_n$  in  $d(G_4TC)_n$  ponovitve, na nastanek kvadrupleksnih struktur. V ta namen smo proučili tri zaporedja:  $d(G_4C_2)$ ,  $d(G_4C_2)_2$  in  $d(G_4C_2)_4$ . Meritve smo izvedli s tehniko dinamičnega sipanja svetlobe. Ugotovili smo, da imajo vsa tri zaporedja sposobnost tvorbe G-kvadrupleksov. Zaporedje  $d(G_4C_2)$  tvori izjemno dolge agregate, z dolžinami več kot 80 nm. Pri zaporedju  $d(G_4C_2)_2$  gre za dva kratka naložena G-kvadrupleksa velikosti  $\approx 3$  nm. Zaporedje  $d(G_4C_2)_4$  tvori srednje dolge agregate, z dolžino približno 10 nm, kar ustreza približno sedmim naloženim monomolekularnim kvadrupleksom. Prav tako preliminarne raziskave zgoščenih raztopin za vsa tri zaporedja nakazujejo, da tvorijo tekočerkristalne faze.

G-kvadrupleksi v patogenih organizmih so še zmeraj slabo raziskani, še manj pa je znana njihova povezava z nastankom bolezni. V prihodnje bo zato smiselno temu področju posvetiti več pozornosti, saj bo podrobno razumevanje teh struktur omogočalo hitrejšo diagnozo bolezni, iskanje terapevtskih možnosti in razvoj ustreznih zdravil.

**Ključne besede:** G-kvadrupleksi, patogeni organizmi, dinamično sipanje svetlobe

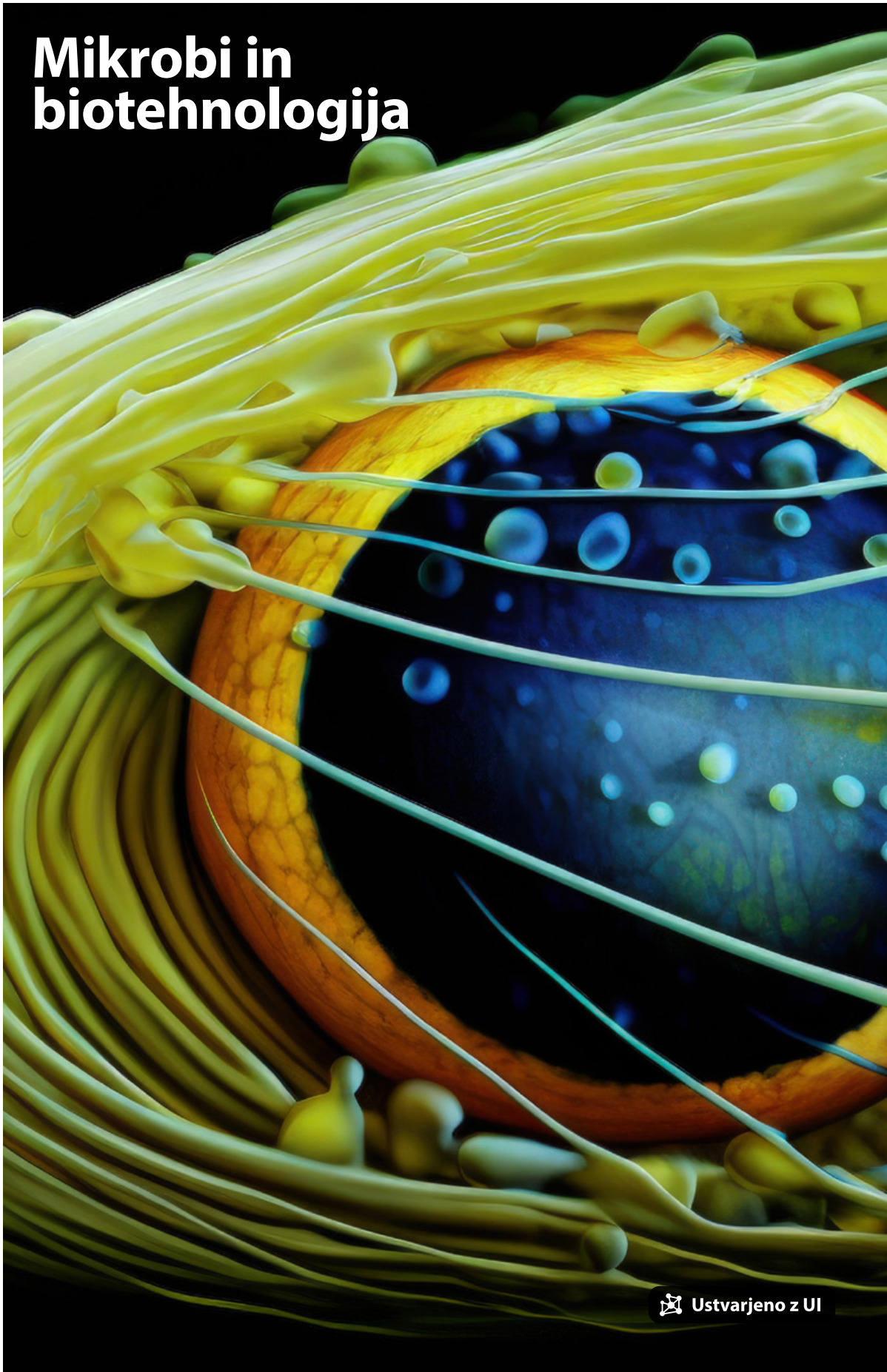




# Postri

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

# Mikrobi in biotehnologija



Ustvarjeno z UI

## Hruškov in jabolčno-grozdni kis: vir industrijsko zanimivih sevov iz rodov *Acetobacter*, *Novacetimonas* in *Komagataeibacter*

Bernarda Karničnik<sup>1</sup>, Janja Trček<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, Koroška cesta 160, Maribor

<sup>2</sup>Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Smetanova ulica 17, Maribor

bernarda.karnicnik@student.um.si

Bakterijske vrste iz rodov *Acetobacter*, *Novacetimonas* in *Komagataeibacter* imajo številne industrijsko zanimive lastnosti, npr. učinkovito proizvajajo nanocelulozo, vodotopne zunajcelične heteropolisaharide iz skupine acetanov ter različne kisline. Bakterijska nanoceluloza je biomaterial s široko uporabno vrednostjo v medicini, kozmetologiji, živilstvu in okoljevarstvu, acetani so zaradi svojih edinstvenih viskoelastičnih lastnosti uporabni kot zgoščevalci in emulgatorji v živilstvu in farmaciji, prisotnost ustreznih kislin pa je pomembna v živilski industriji za proizvodnjo kombuča, kisa in posebnih vrst piva. Industrija se vedno bolj zateka k naravnim virom ter išče nove seve, z optimalnimi lastnostmi za posamezne proizvode. Vsled temu so izolacija, karakterizacija in ohranjanje novih sevov oacetnokislinskih bakterij pomembni za oblikovanje ustreznih zbirk tovrstnih industrijsko pomembnih bakterij. V tej raziskavi smo z metagenomsko analizo pomnožkov medgenskih regij 16S–23S rDNA preiskali dve do sedaj še neraziskani vrsti kisa, t.j. hruškov in jabolčno-grozdni kis. Poleg že znanih vrst oacetnokislinskih bakterij, kot so *Komagataeibacter sucrofermentans*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter syzygii*, *Gluconacetobacter liquefaciens*, *Gluconobacter albidus* in *Komagataeibacter europaeus*, ki so bile zastopane v več kot 0,1% deležu, smo v obeh vrstah odkrili več potencialno novih vrst, največ iz rodu *Acetobacter*. Zastopanost posamezne potencialno nove vrste je bila do 28,9%. Da bi te nove vrste izolirali, smo pripravili redčine kisa, jih nacepili na kompleksno gojišče RAE ter iz morfološko različnih kolonij pridobili več izolatov. V nadaljevanju smo se osredotočili na karakterizacijo treh novih sevov: *Komagataeibacter* sp. Hr1, *Acetobacter* sp. Hr2 in *Novacetimonas* sp. Jurk4. Sevom smo preiskali genome s tehnologijo Illumina in Nanopore ter okarakterizirali njihov potencial za sintezo celuloze in acetanov, rastne karakteristike v kompleksnih gojiščih ter rezistenco proti klinično relevantnim antibiotikom. Predstavljena bo struktura genoma preiskanih sevov, zgradba njihovih operonov za sintezo celuloze in acetanov, primerjava hitrosti rasti pri 30°C in 37°C v kompleksnih gojiščih in laboratorijskih bioreaktorjih, donos laboratorijske proizvodnje celuloze in acetanov ter odpornost proti izbranim antibiotikom.

**Ključne besede:** hruškov kis, jabolčno-jurkin kis, nove vrste oacetnokislinskih bakterij

## Uporaba medgenske regije 16S–23S rDNA za neposredno vrstno identifikacijo sestave oetnokislinske bakterijske populacije

Alja Ribič<sup>1</sup>, Janja Trček<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, Koroška cesta 160, Maribor

<sup>2</sup>Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Smetanova ulica 17, Maribor

alja.ribic@student.um.si

Oetnokislinske bakterije vodijo različne procese v prehrambeni industriji (npr. proizvodnja kisa, kombuče, specialnih vrst piva, kefirja) in kemijski industriji (proizvodnja glukonskih kislin, sorbitola, specifičnih enantiomer sladkorjev idr.). V takšnih bioprocseh nastopajo kot monokulture ali kot mikrobne združbe, ki prispevajo k tipičnim karakteristikam končnega izdelka. V živilski industriji vodijo proces oksidacije sladkorjev in alkohola v različne presnovne produkte, rezultat tega pa sta specifičen okus in vonj končnih izdelkov. Za spremljanje mikrobiološkega razvoja bioprocsov je nujna uporaba neposrednih metod, brez predhodne izolacije bakterij. V ta namen se uporablja metagenomska analiza pomnožkov genov za 16S rRNA. Nukleotidno zaporedje tega gena pa je v skupini oetnokislinskih bakterij zelo ohranjeno, kar nam omogoča identifikacijo le do nivoja rodu. V naši raziskavi smo oblikovali začetne oligonukleotide za amplifikacijo približno polovice regije 16S–23S rDNA ITS za pripravo knjižnic in sekvenciranja s tehnologijo Illumina. Konstruirane začetne oligonukleotide smo testirali za kvalitativno in kvantitativno analizo oetnokislinske mikrobiote z znano vrstno sestavo. Izmed dveh parov začetnih oligonukleotidov in dveh komercialnih kompletov za izolacijo DNA smo izbrali kombinacijo, ki je v laboratorijsko pripravljene združbi v celoti kvalitativno in kvantitativno identificirala sestavo združbe. Nadaljnja uporaba te metode za analizo vrstne sestave oetnokislinske mikrobiote v različnih vzorcih kisa in kombuč je pokazala, da je tak pristop primeren za preiskavo združb, v katerih so oetnokislinske bakterije prevladujoči del mikrobiote.

**Ključne besede:** oetnokislinske bakterije, 16S–23S rDNA ITS, Illumina

## Metagenom komposta kot vir encimov za proizvodnjo biogoriv 2. generacije

Maša Vodovnik<sup>1</sup>, Viktor Zupančič<sup>1,2</sup>, Ljubomir Radič<sup>1,2</sup>, Anna M. Alessi<sup>3,4</sup>, Neil C. Bruce<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Chair of Microbial Diversity, Microbiomics and Biotechnology, Dept. of Microbiology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Domžale, Slovenia

<sup>2</sup>ACIES BIO, Ljubljana

<sup>3</sup>Biorenewables Development Centre, York, UK

<sup>4</sup>Centre for novel agricultural products, University of York, UK

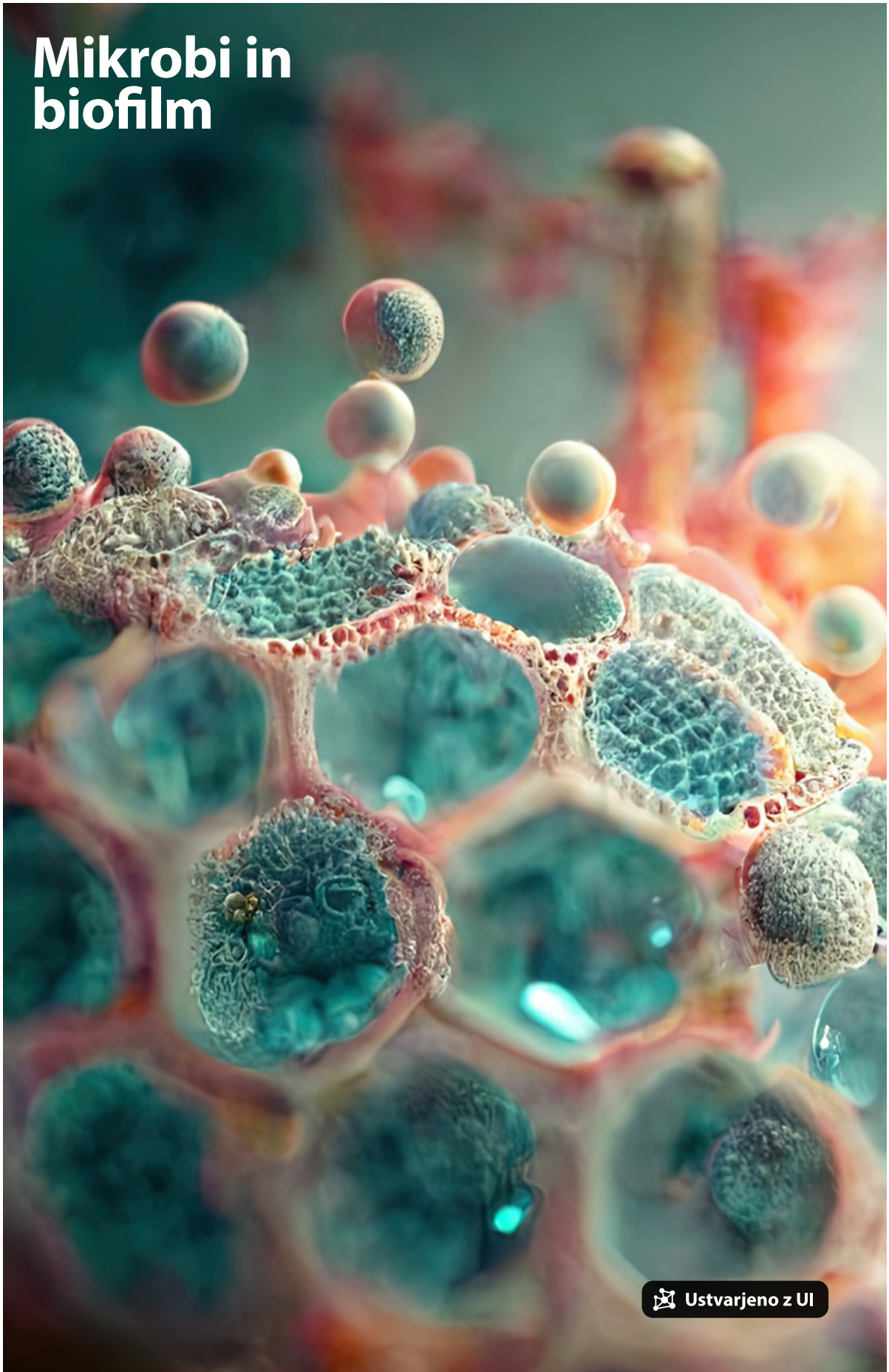
masa.vodovnik@bf.uni-lj.si

Proizvodnja biogoriv 2. generacije se sooča s pomanjkanjem učinkovitih in stroškovno učinkovitih hidrolitičnih encimov, ki so ključni za predobdelavo lignoceluloznih substratov. Ti encimi imajo prav tako potencial v tekstilni, papirni in kemični industriji kot okolju prijaznejša alternativa škodljivim kemikalijam. Okolja, kjer naravno poteka učinkovita razgradnja lignoceluloze predstavljajo idealen vir teh biokatalizatorjev, saj se hidroliza polisaharidov tam pojavlja naravno in poteka s sinergijskim delovanjem večjega števila proteinov.

Metagenomika predstavlja obetaven pristop za raziskovanje raznolikosti in potenciala mikrobnih skupnosti v takih okoljih ter identifikacijo novih zapisov za encime, ki jih s tradicionalnimi metodami morda ne zaznamo. V predstavljeni študiji smo uporabili kombinacijo bioinformatičnih in eksperimentalnih pristopov za karakterizacijo tarčnih »*in silico*« napovedanih encimov za razgradnjo ogljikovih hidratov (CAZymes), ter ocenili njihov potencial za predobdelavo lignoceluloze v primerjavi s komercialno dostopnimi encimi. Od 96 ciljnih genov, ki smo jih klonirali in izrazili, smo uspešno izolirali in karakterizirali 12 novih termofilnih ksilanaz. Eden od njih je bil približno 40 kD protein s katalitično domeno GH10, ki je aktivno razgrajeval ksilan in arabinoxilan. Encim je optimalno aktiven pri 50 °C in pH=8. Njegova ksilanolitična aktivnost je bila povečana v prisotnosti 5 mM Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ali Ca<sup>2+</sup> ionov ter reducirajočih sredstev, kot so 2 mM DTT ali 10 mM β-merkaptetoetanol. Poleg stabilnosti v različnih okoljskih pogojih je ciljni encim učinkovito razgrajeval naravne substrate, bogate z hemicelulozo, kot so pšenični in ječmenovi otrobi. Prav tako je pokazal odpornost v prisotnosti najpogostejših kemikalij, uporabljenih v predobdelavah lignoceluloze, kar kaže na obetaven potencial za uporabo v industrijskih aplikacijah, kot na primer pri proizvodnji bioplina in bioetanola.

**Ključne besede:** encimi, metagenom, (hemi)celuloza, 2. generacija biogoriv

# Mikrobi in biofilm



Ustvarjeno z UI

## Inovativna metoda za kvantifikacijo bakterij *Campylobacter jejuni* znotraj biofilma

Tjaša Čukajne<sup>1</sup>, Orhan Sahin<sup>2</sup>, Qijing Zhang<sup>3</sup>, Aleš Berlec<sup>4,5</sup>, Anja Klančnik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Iowa State University, Ames IA, United States

<sup>3</sup>Department of Veterinary Microbiology and Preventive Medicine, Iowa State University, Ames IA, United States

<sup>4</sup>Odsek za biotehnologijo, Inštitut "Jožef Stefan", Jamova cesta 39, Ljubljana

<sup>5</sup>Katedra za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, Ljubljana

tjasa.cukajne@bf.uni-lj.si

Velik izziv v živilsko predelovalni industriji predstavljajo biofilmi mikroorganizmov, ki posameznim bakterijam omogočajo zaščito, preživetje in večjo odpornost. Posledično predstavljajo tveganje za širjenje patogenih bakterij v prehranjevalni verigi in izbruhe bolezni. Črevesna patogena bakterija *Campylobacter jejuni*, glavna povzročiteljica bakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh, v neugodnih razmerah strukture biofilma ostane živa in aktivna, a preide v nekultivabilno obliko VBNC (angl. viable but not culturable). Zato je zelo aktualen razvoj metod, ki slonijo na novih principih in omogočijo odkrivanje in kvantifikacijo živih ter aktivnih bakterij v biofilmih. V naši raziskavi smo vpeljali in validirali metodo kvantifikacije bakterij v biofilmu, ki je osnovana na reporterskem proteinu luciferazi NanoLuc. S pomočjo inovativne metode smo uspešno kvantificirali adherirane in biofilmske celice na dveh različnih površinah. Vpeljano metodo smo primerjali z obstoječimi metodami kvantifikacije: ovrednotenjem kultivabilnosti celic preko štetja kolonijskih enot, metodo kvantifikacije živih celic z resazurinom in barvanjem biomase biofilma s kristal vijoličnim. Specifičnost vpeljane metode smo dokazali v mešani kulturi s sevom *Salmonella enterica*, uporabnost pa v razmerah *in vitro* v piščančjem soku kot modelu živila. Razvito metodo določanja adhezivnosti ter filmotvornosti smo uporabili po tretiranju celic z antibiotikom ciprofloksacinom in tremi naravnimi protiadhezivnimi snovmi. Pokazali smo, da vpeljana metoda predstavlja pomemben korak pri hitrejši in bolj celoviti kvantifikaciji adheriranih celic *C. jejuni* na površini in v biofilmu. Pri tem največje prednosti metode predstavljajo zaznavanje vseh vrst celic, med katere spadajo tudi celice v živi, vendar ne kultivabilni obliki, tehnična nezahtevnost metode, specifičnost, hitra izvedba in možnost kvantifikacije intaktnega biofilma brez fizične manipulacije celic.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*, biofilmi, kvantifikacija bakterij, bioluminiscenca, stanje VBNC

Zahvala: Delo je bilo narejeno v okviru projektov ARIS J4-3088, J4-4548, J7-4420 in P4-0116, BI-US/22-24-073.

## Vpliv gojišča na tvorbo biofilmov pri encime ESBL-producirajočih sevih *Escherichia coli*, izoliranih iz spodnjih dihal človeka

Katja Hrovat<sup>1</sup>, Jerneja Čremožnik Zupančič<sup>1</sup>, Katja Seme<sup>2</sup>, Jerneja Ambrožič Avguštin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za Biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, Ljubljana

katja.hrovat@bf.uni-lj.si

Po oceni študije, objavljene v reviji Lancet (2022), naj bi zaradi okužb spodnjega dihalnega trakta z odpornimi bakterijami v letu 2019 umrlo kar 1,5 milijona ljudi po svetu. Med glavne patogene bakterije, povezane s smrtnostjo zaradi neučinkovitosti antibiotikov, sodijo tudi sevi bakterije *Escherichia coli*, ki proizvajajo  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL-EC) in so v večini primerov hkrati odporni tudi proti fluorokinolonom. Poleg tega imajo lahko tudi različen nabor genov za dejavnike virulence (VAG) ter sposobnost tvorbe biofilma. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali je sposobnost tvorbe biofilma na različnih gojiščih povezana z genotipom kliničnih izolatov ESBL-EC iz spodnjih dihalnih poti, izoliranih med 2018 in 2022. 116 izbranih izolatov ESBL-EC smo uvrstili v filogenetske, sekvenčne in klonalne skupine ter z metodo PCR preverili tudi prisotnost genov za izbrane VAG ter gene za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Sposobnost tvorbe biofilmov smo spremljali z gojenjem izolatov v mikrotitrni plošči (angl. Calgary biofilm device). Po 24 ali 48-ih urah smo biofilme, ki so se razvili v dveh različnih gojiščih, spektrofotometrično ovrednotili. Po 24-urni inkubaciji smo opazili močno tvorbo biofilma pri 18,1 % izolatih ESBL-EC v gojišču Luria-Bertani (LB) in pri 51,7 % v minimalnem gojišču z 0,02 % glukoze (MG-glc). S Spermanovim koeficientom korelacije smo zaznali statistično značilno pozitivno povezavo med močno tvorbo biofilma v MG-glc po 24 urah inkubacije, sekvenčno skupino ST131, filogenetsko skupino B2, geni za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam (*bla*<sub>CTX-M-9</sub> in *emrE*) in VAG *afa/dra*, *fyuA*, *iha*, *iroN*, *irp2*, *kpsMTII*, *sat* in *usp*. Rezultati naše raziskave kažejo na to, da so zunajčrevesni izolati ESBL-EC iz sekvenčne skupine ST131 sposobni tvorbe biofilmov, še posebej med pomanjkanjem hranil v gojišču, ter da je biofilmotvornost lahko povezana tudi z nekaterimi dejavniki virulence. S temi rezultati smo prikazali enega izmed možnih razlogov za uspešno globalno širjenje ST131, zlasti v kliničnih okoljih.

**Ključne besede:** *Escherichia coli*, spodnje dihalne poti, biofilmi, ST131, virulenca



## Mikroplastika in mikrobiološko tveganje v prehranski verigi

Anja Klančnik<sup>1</sup>, Živa Kolenc<sup>1</sup>, Manca Kovač Viršek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za vode Republike Slovenije, Einspielerjeva 6, Ljubljana

anja.klancnik@bf.uni-lj.si

Mikroplastika se v okolju prenaša med ekosistemi, v človeško telo pa prehaja z vdihavanjem, zaužitjem ali preko kože in sluznic. Mikroplastiko se opredeljuje kot zelo majhne koščke plastike, ki so manjši od pet milimetrov. V letu 2022 je Svetovna zdravstvena organizacija izpostavila možne poti prenosa in vnosa delcev mikroplastike v človeško telo, in sicer prenos preko zraka in kože; ter tudi preko hrane in pitne vode.

Skrb vzbujajoče je predvsem dejstvo, da se mikrodelci plastike pojavljajo v prehranjevalni verigi različnih morskih in sladkovodnih organizmov, preko katerih dosežejo človeško telo. Mikroplastiko so dokazali v številnih živalih in tudi v različnih živilih. Zaradi pomanjkanja standardiziranih analitičnih metod raziskovalci sami vpeljujejo metode za izolacijo, detekcijo in karakterizacijo mikroplastike morskega in zemeljskega ekosistema, izmed katerih je le nekaj usmerjenih na področje hrane. Na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani je naš cilj najprej razviti zanesljive in natančne metode, ki bodo omogočale detekcijo in kvantifikacijo mikroplastike, da bi lahko ovrednotili njeno prisotnost v prehranski verigi, določili vire ter izpostavljenost človeka mikroplastiki v živilih.

Prisotnost mikroplastike v prehranski verigi lahko vpliva na kemijsko in mikrobiološko varnost živil. Zaradi svoje organske sestave mikroplastika omogoča pritrjevanje ostankov hrane ter različnih organskih in anorganskih delcev. To še posebej velja v okolju proizvodnje hrane, kjer mikroplastika povečuje površino za naseljevanje mikrobnih biofilmov, saj prisotni delci hrane nudijo ugodno okolje za njihovo rast. Biofilmi, ki se oblikujejo na mikroplastiki, lahko postanejo vektorji za prenos mikrobnih kontaminacij in okužb. Tako mikroplastika predstavlja potencialno tveganje za mikrobiološko varnost in je lahko vir mikrobnih kontaminacij in okužb v živilski industriji.

**Ključne besede:** mikroplastika, prehranska veriga, biofilm, mikrobiološko tveganje

Zahvala: Delo sta omogočila projekt ARIS J4-4548 in program P4-0116.

## Sposobnost tvorbe biofilma bakterije *Salmonella* Infantis na različnih površinah in protimikrobno delovanje izbranih biocidov

Katja Kranjc<sup>1</sup>, Jana Avberšek<sup>2</sup>, Neva Šemrov<sup>3</sup>, Darja Barlič Maganja<sup>1</sup>, Olga Zorman Rojs<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za vede o zdravju Izola, Univerza na Primorskem, Polje 42, Izola

<sup>2</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

<sup>3</sup>VETERINARSTVO, VET.AM. JATA, d.o.o., Slomškova ulica 30, 1230 Domžale

<sup>4</sup>Inštitut za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

katja.kranjc@fvz.upr.si

*Salmonella* Infantis je najpogosteje izoliran serotip salmonel pri piščancih in v piščančjem mesu, na območju Evropske unije. Ponavljajoča se prisotnost *S. Infantis* na istih gospodarstvih kaže na izjemno obstojnost in sposobnost širjenja tega serotipa v okolju. Namen naše študije je bil določiti sposobnost adhezije predhodno okarakteriziranega izolata *S. Infantis* na različne površine in testirati protimikrobni ter protiadhezivni učinek izbranih biocidov. Uporabljen sev *S. Infantis* 323/19 je izolat iz fecesa piščanca, z določenim rezistotipom (*tet(A)*, *aac(6')-laa*, *aadA1*, *sul1*, *parC* (T57S), *gyrA* (S83Y), *nfsA* (NS159)) in prisotnostjo plazmida pESI (angl. *plasmid of emerging S. Infantis*).

Sposobnost tvorbe biofilma izolata *S. Infantis* 323/19 smo določali na treh površinah, ki se pogosto uporabljajo v reji in klavnici (plastika, jeklo AISI 304 in AISI 316). Število celic v biofilmu smo določali po 24 in 48 urah inkubacije pri temperaturi 20 °C. Za določitev protimikrobne učinkovitosti biocidov *in vitro* smo uporabili metodo mikrodilucije v hranilnem mediju. Testirali smo Virocid®, Calgonit sterizid P12 DES, DioksiLEK®, Interkokask® in aktivno/ionizirano vodo. Za določanje protiadhezivnega učinka biocidov smo slednje uporabili v subinhibitorni koncentraciji (1/8 MIC) in po inkubaciji količino nastalega biofilma določili z metodo barvanja s kristal vijoličnim. Z biocidi smo tretirali tudi že nastali biofilm *S. Infantis* 323/19. Uporabili smo MIK vrednosti biocidov in po 15 min kontaktnem času določili število živih celic v biofilmu.

Rezultati so pokazali, da je bilo število bakterij (CFU/cm<sup>2</sup>) na jeklu AISI 316 statistično značilno nižje kot na ostalima testiranima površinama. V primeru testiranja protiadhezivnega učinka se je ta pokazal ob uporabi biocida Interkokask® in samo po krajšem inkubacijskem času (24 ur). Slednji je bil prav tako najbolj učinkovit pri tretiranju biofilma, v katerem je znižal živost za 12 %.

Rezultati naše študije kažejo, da lahko tudi različne površine ali ostanki biocidov pomembno vplivajo na preživetje in zadrževanje salmonele izven gostitelja.

**Ključne besede:** *Salmonella* Infantis, biofilm, biocidi

## Vpliv mutacij v genih pomembnih pri tvorbi biofilmov bakterij *Campylobacter jejuni*

Pina Osovnikar, Manca Volk, [Anja Klančnik](mailto:anja.klančnik)

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

[pina.osovnikar@gmail.com](mailto:pina.osovnikar@gmail.com), [anja.klančnik@bf.uni-lj.si](mailto:anja.klančnik@bf.uni-lj.si)

Bakterije *Campylobacter jejuni* so glavni vzrok bakterijskih gastrointestinalnih okužb v EU. Kljub občutljivosti na zunanje dejavnike, bakterije *C. jejuni* ostajajo zdravstveni problem, delno zaradi sposobnosti tvorbe biofilmov. Razumevanje mehanizmov pritrjevanja in tvorbe biofilmov ter vpliv mutacij na te procese je ključno za razvoj novih metod nadzora nad temi patogeni.

V naši raziskavi smo se osredotočili na ključne gene bakterij *C. jejuni*, ki vplivajo na tvorbo biofilmov, vključno z geni, povezanimi z medceličnim signaliziranjem, sintezo polisaharidne kapsule, transportom preko membrane, odzivom na oksidativni stres in globalnimi regulatorji. Preučevali smo mutante v genih *luxS*, *kpsM*, *omp50*, *rrpA*, *rrpB* in *csrA*, da bi razumeli njihov vpliv na pritrjevanje in tvorbo biofilmov.

Rezultati so pokazali, da mutacije lahko pozitivno ali negativno vplivajo na sposobnost tvorbe biofilmov. Na primer, mutacija v genu *luxS* je zmanjšala sposobnost pritrjevanja in tvorbo biofilmov, kar kaže na njegovo vlogo pri prilagajanju metabolizma in prehodu iz planktonskega na obliko biofilma. Po drugi strani pa so mutacije v genih *kpsM*, *rrpA* in *rrpB* izboljšale sposobnost pritrjevanja in tvorbe biofilmov, kar lahko kaže na zaščito celic pred stresom in spremembe v odzivu na oksidativni stres.

Zanimivo je bilo tudi odkritje, da mutacije v genu *csrA* zmanjšajo sposobnost tvorbe biofilmov, kar nasprotuje njegovi znani vlogi pri drugih bakterijah. To kaže, da bi lahko bil gen *csrA* vpleten v pozitivno regulacijo tvorbe biofilmov pri bakterijah *C. jejuni*.

Skratka, tvorba biofilmov pri bakterijah *C. jejuni* je kompleksen proces, odvisen od več genov in regulatornih poti. Naša študija je poudarila pomembnost genov, kot so *luxS*, *csrA* in *kpsM*, za razvoj novih strategij nadzora nad temi patogeni.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*, mehanizmi tvorbe biofilma, geni

Zahvala: Delo sta omogočila projekta ARIS J4-3088 in J4-4548 ter program P4-0116.

## Tvorba biofilma pri izbranih sevih bakterije *Escherichia coli* in korelacije z lastnostmi sevov in njihovo patogenostjo

Luka Predojevič<sup>1</sup>, Mateja Erdani Kreft<sup>2</sup>, Darja Keše<sup>3</sup>, Darja Žgur Bertok<sup>1</sup>, Marjanca Starčič Erjavec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana

<sup>3</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana

marjanca.starcic.erjavec@bf.uni-lj.si

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je znana po svoji veliki pestrosti, saj njene seve najdemo tako med komezalnimi kot patogenimi bakterijami. Sevi *E. coli*, ki so sposobni tvorbe biofilma, lahko tvorijo biofilm tako na biotski kot abiotski površini, kot so npr. urinarni katetri, kar je velik zdravstveni problem. Biofilm omogoča težje odstranjevanje bakterij, lažjo kolonizacijo gostitelja in tudi zaščito pred gostiteljevo obrambo ter protimikrobnimi učinkovinami.

V naših poskusih smo na zmožnost tvorbe biofilma testirali nabor različnih človeških sevov *E. coli*, izoliranih bodisi iz urina bolnikov bodisi iz blata zdravih ljudi ter laboratorijski sev MG1655. Pripravljene bakterijske suspenzije sevov smo inkubirali v večpreklatnih plastičnih ploščah ter nastalo biomaso biofilma obarvali s kristal vijoličnim ter zmerili optično gostoto v etanolu ekstrahiranega barvila pri OD<sub>570</sub>. Rezultate sposobnosti tvorbe biofilma smo primerjali s prej izvedeno genotipizacijo sevov (filogenetska skupina, genski zapisi z virulenco povezanih dejavnikov, serotip, tip oligosaharida sredice LPS) profilom LPS ter patogenostjo seva, kot smo jo ugotovili v poskusih na biomimetičnem *in vitro* modelu prašičjega urotelija (Predojevič in sod., 2022a) in ocenitvijo jakosti citokinskega odgovora, kot smo jo ugotovili s komercialnim kompletom Cytokine & Chemokine 9-Plex Porcine ProcartaPlex™ Panel 1, na aparaturi MAGPIX® (Predojevič in sod., 2022b). Primerjave vseh podatkov smo izvedli s pomočjo računalniško posredovanega Fischerjevega eksaktnega testa z naknadno Bonferronijevo korekcijo.

Testirani sevi *E. coli* so se med sabo zelo razlikovali po zmožnosti tvorbe biofilma. Povprečne vrednosti OD<sub>570</sub> so se tako znotraj skupin sevov s podobno patogenostjo in jakostjo citokinskega odgovora razlikovale, a razlika ni bila statistično značilna. Tudi statistična analiza s Fischerjevim eksaktnim testom in Bonferronijevo korekcijo ni razkrila statistično značilnih korelacij med oblikovanimi skupinami sevov glede na njihovo zmožnost tvorbe biofilma in rezultati genotipizacije ter profiliranja LPS.

Naša raziskava tako nakazuje, da stopnja sposobnosti tvorbe biofilma ni napovednik patogenosti seva *E. coli* in jakosti citokinskega imunskega odgovora.

**Ključne besede:** *Escherichia coli*, biofilm, patogenost

Viri:

Predojevič L, Keše D, Žgur Bertok D, Železnik Ramuta T, Veranič P, Erdani Kreft M, Starčič Erjavec M. A biomimetic porcine urothelial model for assessing *Escherichia coli* pathogenicity. *Microorganisms* 2022a; 10: 783, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040783>

Predojevič L, Keše D, Žgur Bertok D, Korva M, Erdani Kreft M, Starčič Erjavec M. Cytokine response of the biomimetic porcine urothelial model to different *Escherichia coli* strains. *Applied Sciences* 2022b; 12: 8567, <https://doi.org/10.3390/app12178567>

## Vpliv mutacij v genih pomembnih za tvorbo biofilma na adhezijo in invazijo bakterij *Campylobacter jejuni* v celicah Caco-2

Maja Šikić Pogačar<sup>1</sup>, Tjaša Damijan<sup>2</sup>, Tomaž Langerholc<sup>2</sup>, Manca Volk<sup>3</sup>, Anja Klančnik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

<sup>2</sup>Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerza v Mariboru, Pivola 10, 2311 Hoče

<sup>3</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

maja.sikic@um.si

Mikroaerofilne bakterije *Campylobacter jejuni* so kljub zahtevnim pogojem rasti razširjeni mikroorganizmi in najpogostejši povzročitelji akutnega bakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh. Predpostavljajo, da ima pri preživetju v naravnem okolju pomembno vlogo tvorba biofilma. Ključni korak, potreben za uspešno tvorbo biofilma, je adhezija bakterij na površino. Sposobnost bakterij *C. jejuni*, da tvorijo biofilm, je bila dokazana na različnih abiotskih površinah (npr. polistiren, steklo in nerjavno jeklo), ki se uporabljajo v živilski proizvodno-distribucijski verigi. Na celičnem modelu humanih črevesnih celic Caco-2 smo opredelili vpliv mutacij izbranih genov, ki so v že opravljenih poskusih pomembno vplivali na adhezijo tega patogena na abiotsko površino.

V raziskavo so bili vključeni referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 in njegovi mutanti z mutacijami v genih *chuA* (prevzem hemina in hemoglobina), *csrA* (regulacija gibljivosti in odzivov na oksidativni stres), *kpsM* (sinteza polisaharidne kapsule), *luxS* (sinteza signalnih molekul v medcelični komunikaciji), *omp50* (fosforilacija membranskih proteinov in zaščita pred ROS), *rrpA* (uravnavanje odziva na aerobni in oksidativni stres), *rrpB* (uravnavanje odziva na aerobni in oksidativni stres), *trpE* (vključenost v sistem medcelične komunikacije) in *Cj1191c* (vključenost v signalno transdukcijo). Vpliv mutacij v izbranih genih na sposobnost adhezije in invazije bakterij *Campylobacter jejuni* je bil ovrednoten z metodo štetja kolonij (CFU/ml). Pred tem je bil ovrednoten vpliv mutantov na metabolno aktivnost celic Caco-2 s kolorimetričnim testom MTT.

Ugotovili smo, da mutacije v genih *chuA*, *csrA*, *luxS*, *omp50* in *rrpB* statistično značilno zmanjšajo sposobnost adhezije bakterij *Campylobacter jejuni* na celice Caco-2. Mutacije v genih *kpsM*, *trpE* in *Cj1191c* so statistično značilno povečale sposobnost adhezije bakterij *Campylobacter jejuni* na celice Caco-2. Sposobnost invazije v celice Caco-2 sta imela samo mutanta z mutacijo v genu *rrpB* in genu *luxS*. Ostali mutanti niso invadirali v celice Caco-2. Potrebne so nadaljnje raziskave za razvoj strategij, ki omejujejo število okužb in omogočajo nadzor bakterij v živilih.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*, tvorba biofilma, adhezija, invazija, celice Caco-2

Zahvala: Delo so omogočili projekti ARIS J4-3088, J4-4548 in J4-2542 ter program P4-0116.

## Biološki procesi vključeni v tvorbo in razvoj biofilma bakterij *Campylobacter jejuni*

Manca Volk, Anja Klančnik

Katedra za biotehnologijo mikrobiologijo in varnost živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška Fakulteta, Ljubljana

manca.volk@bf.uni-lj.si

Bakterije *Campylobacter jejuni* so po Gramu negativne, mikroaerofilne bakterije, prisotne v črevesju perutnine in drugih živali. So glavni vzrok zoonoz v Evropski Uniji, saj predstavljajo 62 % prijavljenih primerov. Bakterije *C. jejuni* potrebujejo za rast specifične pogoje, vendar so kljub občutljivosti vsesplošno razširjene v okolju. Preživetje ter zaščito pred neugodnimi dejavniki jim omogočajo prilagoditveni mehanizmi, med katerimi je tudi tvorba biofilma. Molekularna regulacija tvorbe biofilma pri bakterijah *C. jejuni* ostaja neraziskana.

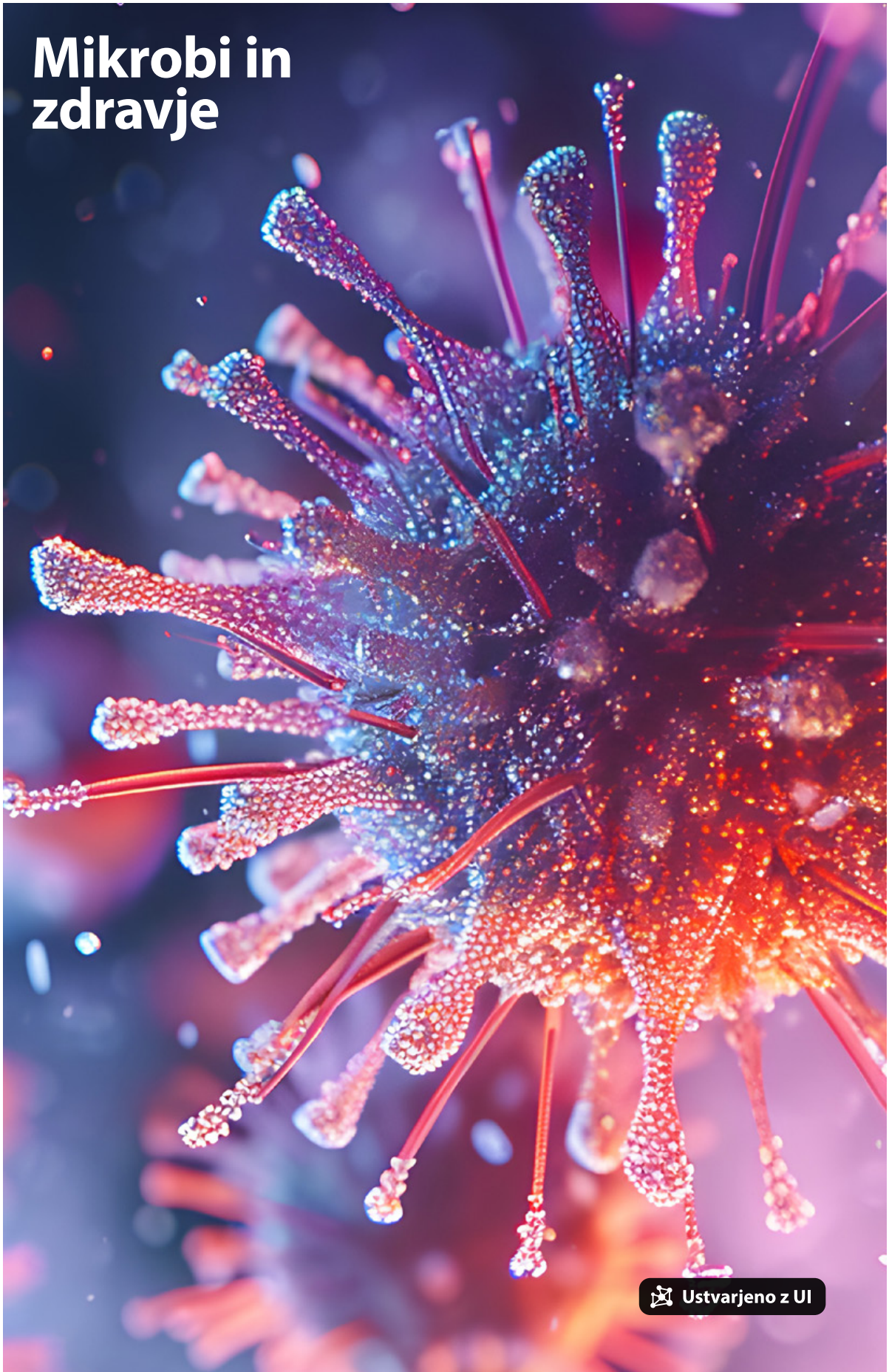
Namen raziskave je bil z metodo sekvenciranja RNA pridobiti vpogled v gene, ki se različno izražajo med biofilmom in planktonsko kulturo ter kako se to izražanje spreminja skozi različne faze razvoja biofilma. Bakterije smo gojili v različnih časovnih točkah (16 h, 24 h, 48 h ter 72 h), sledila je izolacija in sekvenciranje RNA. Za diferencialno izražene gene smo izbrali tiste z absolutno vrednostjo  $\log_2 \geq 1$  in prilagojeno vrednost  $p \leq 0,05$ . Ugotovili smo, da je bilo pri 16 h biofilmu 224 diferencialno izraženih genov, v 24 h biofilmu 443 genov, v 48 h biofilmu 374 genov in v 72 h biofilmu 369 genov. Največji delež diferencialno izraženih genov je bil pri 24 h biofilmu (29,5 %), najmanjši pri 16 h biofilmu (14,9 %). Funkcijska analiza diferencialno izraženih genov je razkrila njihovo vključenost v biološke procese in funkcije. Pri 24 h biofilmu smo opazili največje spremembe pri genih vključenih v različne metabolne procese (metabolizem kofaktorjev in vitaminov, ogljikovih hidratov in aminokislin) in translacije. Pri 48 h in 72 h biofilmu smo zabeležili povišano izražanje genov povezanih z gibljivostjo in translacijo .

Z uporabo metode RNA sekvenciranja smo raziskali biološke procese, ki se odvijajo med nastajanjem in razvojem biofilma. Razumevanje teh procesov je bistveno za razvoj novih tarčnih alternativnih strategij nadzora in preprečevanja nastajanja biofilmov patogenih bakterij *C. jejuni*. To je še posebej pomembno v kontekstu zagotavljanja varnosti hrane v proizvodnih procesih.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*, razvoj biofilma, sekvenciranje RNA, izražanje genov

Zahvala: Delo so omogočili projekti ARIS MR VOLK, J4-3088 in J4-4548 ter program P4-0116.

# Mikrobi in zdravje



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Pilotna študija bakterijskih združb pri bolnikih z rakom sečnega mehurja

Tomaž Accetto<sup>1</sup>, Katja Strašek Smrdel<sup>2</sup>, Milena Taskovska<sup>3,4</sup>, Marjanca Starčič Erjavec<sup>1</sup>, Aleksandar Janev<sup>5</sup>, Tomaž Smrkolj<sup>3,4</sup>, Katja Seme<sup>2</sup>, Mateja Erdani Kreft<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>2</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>3</sup>Oddelek za urologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana

<sup>4</sup>Katedra za kirurgijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>5</sup>Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

tomaz.accetto@bf.uni-lj.si

Urin zdravih ljudi je dolgo veljal za sterilnega, a so študije, ki so uporabljale amplikonsko sekvenciranje gena za 16S ribosomsko RNA, v zadnjih desetih letih dokazale prisotnost mikrobnih združb v urinu. Temu je sledil razvoj gojitvenega pristopa, ki je potrdil obstoj mikrobnih združb urina, ki so sicer dokaj redke, s povprečno  $10^5$  bakterijami/ml urina. Te združbe so precej različne med posamezniki, a z malo raznolikostjo vrst v enem vzorcu. Še največ je znanega o mikrobioti urina zdravih žensk, v kateri pogosto prevladujejo rodovi *Lactobacillus*, *Gardnerella* in *Streptococcus*, veliko pa je tudi vzorcev, v katerih noben rod ne prevladuje. Povezava med bakterijsko združbo urina, njeno dnevno dinamiko in življenjskim slogom, vključno z uživanjem tekočin, prehrano in gibanjem, ni znana. Rak sečnega mehurja je drugi najpogostejši rak urinarnega trakta in je pomemben javno zdravstveni problem. Do sedaj je že nekaj študij proučevalo mikrobioto rakavega tkiva in urina rakavih bolnikov. Študije rakavega tkiva so pokazale na nekaj rodov, ki naj bi bili obogateni, vendar se ti med študijami niso ujemali. Združbe urina bolnikov z rakom sečnega mehurja se v preteklih študijah niso razlikovale od združb zdravih niti na ordinatnih diagramih, kot tudi ne s statističnimi testi. Vendarle pa so te študije pokazale na različno prisotnost nekaterih rodov v vzorcih bolnikov v primerjavi z zdravimi, a so bili med študijami ti rezultati protislovni. V pričujoči študiji smo s kvantitativnim pristopom najprej ovrednotili bakterijsko obremenitev urina in nato s sekvenciranjem gena 16S še raznolikost urinskih združb bolnikov z rakom sečnega mehurja, zdravih prostovoljcev in bolnikov z infekcijo urinarnega trakta. Rezultati kažejo na značilno nižjo gostoto bakterijske združbe v bolnikih z rakom glede na ostali skupini in da najbrž ni le enega, za rak značilnega stanja, urinske mikrobiote.

**Ključne besede:** urin, bakterije, združba, rak sečnega mehurja, sekvenciranje 16S



## Pojavljanje enterovirusa D68 v kliničnih vzorcih testiranih na NLZOH Maribor med leti 2021 in 2023

Mojca Cimerman<sup>1</sup>, Nika Volmajer<sup>1</sup>, Nataša Berginc<sup>2</sup>, Katja Soršak<sup>1</sup>, Emina Bešić<sup>1</sup>, Natalia Abramenko<sup>1</sup>, Andrej Golle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NLZOH, Prvomajska ulica 1, Maribor  
<sup>2</sup>NLZOH, Grablovičeva ulica 44, Ljubljana

mojca.cimerman@nlzoh.si

Enterovirus D68 uvrščamo v rod enterovirusov, soroden je rinovirusom in se prenaša kapljično. Bolezen običajno poteka z znaki blagega prehlada, vendar lahko enterovirusi povzročajo širok spekter simptomov. Enterovirus D68 (EV-D68) so prvič opisali leta 1962, ponovno so ga zaznali leta 2010, pojavlja se večinoma pozno poleti in zgodaj jeseni ter lahko povzroča izbruhe. Povzroča lahko respiratorne in nevrološke simptome ter lahko vodi do akutne ohlapne ohromelosti, podobne otroški paralizi, ki jo povzročajo poliovirusi. Leta 2014 je med avgustom in oktobrom potekal večji izbruh EV-D68 v ZDA in v Kanadi, povečano kroženje pa smo takrat zaznali tudi v Evropi.

V Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko na NLZOH v Mariboru smo v arhivskih vzorcih dihal, prejetih v mesecih avgust, september in oktober 2021, 2022 in 2023, iskali enterovirus EV-D68. V vzorcih smo predhodno dokazali skupino rinovirus/enterovirus, ki je v našem vsakodnevnem testiranju ne razlikujemo. V študijo smo vključili 187 vzorcev iz leta 2021, 249 vzorcev iz leta 2022 in 340 vzorcev iz leta 2023. Izvedli smo molekularni test za potrditev enterovirusov. V vzorcih, kjer smo našli enteroviruse, smo iskali EV-D68. Ugotovili smo, da v vzorcih iz leta 2021, med 42 enterovirusi, nismo potrdili EV-D68. V vzorcih iz leta 2022 smo med 61 enterovirusi našli 36 EV-D68 (59,0 %), od tega 28 (77,7 %) med otroci do 15 leta starosti. V letu 2023 smo med 45 enterovirusi našli 18 EV-D68 (40 %), od tega 6 pri otrocih (33,3 %).

Rezultati kažejo, da se tudi v našem naboru vzorcev pojavlja EV-D68, ki lahko zlasti pri otrocih, povzroča težje poteke bolezni. Zaradi kapljičnega prenosa virusa je potreben hiter odziv pri odkrivanju prvih primerov bolezni, saj lahko tako preprečimo nadaljnje širjenje virusa v populaciji. Prav tako bi bilo smiselno redno spremljanje pojavljanja EV-D68 in tudi drugih tipov enterovirusov.

**Ključne besede:** enterovirusi, EV-D68, okužbe dihal

## Dualistična narava mikroorganizmov: po gramu pozitivne bakterije iz rodu *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* in *Clostridium* kot probiotiki in patogeni

Sabina Fijan<sup>1</sup>, Andrej Steyer<sup>2</sup>, Mojca Fifer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza v Mariboru, Žitna ulica 15, Maribor

<sup>2</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Wohn- und Pflegezentrum Stockberg, Stockbergstrasse 9, 8854 Siebden, Švica

sabina.fijan@um.si

Poznamo patogene, komenzalne, oportunistične in koristne seve mikroorganizmov. Posebna koristna skupina mikroorganizmov so probiotiki, ki so po definiciji 'živi mikroorganizmi, ki pozitivno učinkujejo na zdravje gostitelja, kadar jih apliciramo v zadostnem številu'. Probiotični, oportunistični in patogeni sevi mikroorganizmov se razlikujejo v koristnih učinkih in virulenčnih dejavnikih, ki jih izražajo. S pregledom literature smo analizirali nabor sevov probiotičnih in patogenih mikroorganizmov. Bakterije iz rodu *Enterococcus* in *Streptococcus* so po gramu pozitivni koki, bakterije iz rodu *Bacillus* in *Clostridium* so po gramu pozitivni, sporogeni bacili. Slednja rodova sta se nedavno razdelila na več rodov. Med probiotične seve iz rodu *Enterococcus* in *Streptococcus* spadajo sevi kot so *Enterococcus faecium* CECT 4515, NCIMB 10415 (SF68), LAC7.2, AL41, DSM 7134, ST651ea, ST7319ea, 669, *Enterococcus lactis* YY1, *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1, *Enterococcus durans* A8-1, HS03, *Streptococcus salivarius* K12, DB-B5, APC151. Po drugi strani so med patogenimi sevi znani proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE), *Enterococcus faecalis* OG1RF, *Streptococcus pyogenes* emm3/ST15, *Streptococcus agalactiae* LGMAI\_St\_08, S13 in drugi. Med probiotične seve spadajo sevi *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 9384, CECT 5940, sev *Bacillus cereus* A 05, sevi *Bacillus* (po novem *Alkalihalobacillus*) *clausii* SC109, UBBC-07, SNZ 1971, sevi *Bacillus* (po novem *Weizmannia*) *coagulans* SC208, DSM 17654, MY01, MTCC 5856, VHProbi C08, Unique IS2, GBI-30, SNZ 1969, sev *Bacillus licheniformis* SL307, sevi *Bacillus subtilis* Fa17.2, ANSB060, KD1, PS-216, C-3120, KN-42, R0179, LS 1-2, HU58, MY02, DE111, CU1, SNZ 1972, PB6, sev *Bacillus indicus* HU36 in seva *Clostridium butyricum* FERM-BP 2789 in MIYAIRI 588 (CBM588). Patogeni sevi vključujejo *Bacillus cereus* G9241, 03BB87, 03BB102, Elc2, FL2013, LA2007, LA4726, ATCC 14579, *Bacillus anthracis* Ames, *Clostridioides difficile* NAP1/BI/027, non-27, *Clostridium perfringens* SM101 in druge. Na podlagi rezultatov ugotavljamo, da ne moremo kategorizirati taksonomskih vrst na patogene ali probiotične mikroorganizme, zato je potrebno nujno poznati značilnosti posameznih sevov mikroorganizmov.

**Ključne besede:** probiotiki patogeni, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridioides*, *Escherichia*

## Probiotiki nove generacije – definicije, karakterizacija, mehanizmi delovanja

Sabina Fijan<sup>1</sup>, Ana Ungar<sup>2</sup>, Maja Šikić Pogačar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza v Mariboru, Žitna ulica 15, Maribor

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Maribor, Urgentni center, Ljubljanska ulica 5, Maribor

<sup>3</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, Maribor

sabina.fijan@um.si

Med probiotike nove generacije spadajo posamezni predstavniki črevesne mikrobiote s potencialnim pozitivnim učinkom na zdravje. Sicer ustrezajo definiciji probiotikov, vendar med njimi uvrščamo tiste mikroorganizme, ki se do sedaj še niso uporabljali za promocijo zdravja ljudi. Za njihovo bodočo uporabo mora zanje veljati, da imajo status GRAS (splošno priznani kot varni) za področje ZDA in status kvalificirane domneve o varnosti (QPS) za področje Evrope s strani Evropske agencije za varnost hrane (EFSA). Drug izraz, ki se zanje uporablja so živi bioterapevtski produkti, ki predstavljajo medicinske produkte, ki vsebujejo žive mikroorganizme (bakterije ali kvasovke) za humano uporabo. Med najbolj obetavnimi bodočimi probiotiki nove generacije so bakterije iz vrst *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium butyricum*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Eubacterium hallii*, *Prevotella copri*, *Christensenella minuta*, *Parabacteroides goldsteinii*. Zelo pomembne so natančne informacije o teh potencialnih probiotikih in njihovih metabolitih, pridobljene s sodobnimi molekularnimi metodami sekveniranja, izboljšanimi klasičnimi metodami kultivacije, uporabo proteomike. Najbolj pomembne so s placebom kontrolirane randomizirane klinične študije na ljudeh, ki pokažejo statistično značilno razliko v prid probiotikom nove generacije. Iz dosedanjih *in vitro* raziskav ter raziskav na živalih ugotavljajo, da bakterije nove generacije izločajo metabolite, ki uravnavajo fiziologijo gostitelja, delujejo protivnetno in imunomodulatorno. Tako nekateri predstavniki probiotikov nove generacije stimulirajo sproščanje kratkoverižnih maščobnih kislin, kot so butirrat, acetat in propionat ter protivnetnih proteinov in glikoproteinov kot so mucini in protivnetni citokini (IL-10, IL-4 idr.). Predstavniki probiotikov nove generacije tudi zmanjšuje vnetje z inhibiranjem sproščanja vnetnih citokinov, kot so TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B. Prav tako na splošno zmanjšujejo disbiozo in s tem zmanjšujejo pojavnost nekaterih bolezni. Med različnimi strategijami, kjer so prehranski in terapevtski posegi v kombinaciji, so tako probiotiki nove generacije opredeljeni kot obetavna rešitev, tako v preventivnem kot terapevtskem smislu. Kot probiotik nove generacije se na tržišču že prodaja sev *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588.

**Ključne besede:** probiotiki nove generacije, *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium butyricum*

## Razširjenost in molekularna opredelitev strameopile *Blastocystis* spp. pri ljudeh in psih

Diana Jernej<sup>1</sup>, Andrej Steyer<sup>2</sup>, Tina Triglav<sup>1</sup>, Tina Mikuletič<sup>1</sup>, Barbara Šoba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana

dj8785@student.uni-lj.si

*Blastocystis* je pri ljudeh in živalih eden najbolj razširjenih črevesnih mikrobnih evkariontov z izredno genetsko raznolikostjo. Na osnovi gena za malo ribosomsko podenoto (SSU rRNA) ga delimo na vsaj 30 podtipov. Pri ljudeh so najpogostejši podtipi ST1-ST4. Mnenja o patogenosti tega evkarionta so deljena, saj se pojavlja tako pri bolnikih z gastroenteritisom kot tudi pri zdravi populaciji.

Za ugotavljanje razširjenosti *Blastocystis* spp. pri bolnikih z drisko v Sloveniji smo v raziskavo vključili 249 vzorcev blata bolnikov, ki so bili januarja in februarja letos testirani na povzročitelje gastroenteritisov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, MF, UL. Da bi ugotovili razlike v razširjenosti *Blastocystis* spp. med bolno in zdravo populacijo, smo uporabili 379 izolatov DNK iz blata enakega števila otrok, starih od 0 do 6 let, od tega 292 vzorcev otrok z drisko in 87 vzorcev zdravih otrok brez driske, ki so predstavljali kontrolno skupino. Vzorce smo pridobili med oktobrom 2011 in oktobrom 2012. Razširjenost *Blastocystis* spp. pri psih smo ugotavljali z analizo 79 vzorcev blata psov z drisko. *Blastocystis* spp. smo dokazovali s PCR v realnem času, pri čemer smo pomnoževali specifični del gena za SSU rRNA, podtipe pa opredelili z analizo nukleotidnih zaporedij. *Blastocystis* spp. smo dokazali v blatu 20 (8,0 %) bolnikov z drisko iz začetka letošnjega leta. Od teh smo podtipe uspešno opredelili pri 11 (ST2-ST4). Od 379 vzorcev otrok je bilo pozitivnih devet (3,1 %) vzorcev otrok z drisko in šest (6,9 %) vzorcev otrok iz kontrolne skupine, razlika ni statistično značilna ( $p=0.11$ ). Pri treh otrocih z drisko smo uspešno opredelili podtipe ST2-ST4, pri petih otrocih iz kontrolne skupine pa podtipe ST2, ST3 in ST7. *Blastocystis* spp. smo ugotovili pri sedmih (8,9 %) psih, podtipov pa ni bilo mogoče opredeliti.

**Ključne besede:** *Blastocystis*, ljudje, psi, pojavnost, podtipi

## COVID-19: razvoj materialov s protivirusnim delovanjem in testiranje učinkovitosti filtracije zaščitnih mask

Tamara Košir<sup>1</sup>, Katja Fric<sup>1</sup>, Arijana Filipič<sup>1</sup>, Maja Ravnikar<sup>1</sup>, Olivija Plohl<sup>2</sup>, Lidija Fras Zemljič<sup>2</sup>, Ivan Jerman<sup>3</sup>, Polona Kogovšek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 121, Ljubljana

<sup>2</sup>Fakulteta za strojništvo, Univerza v Mariboru, Smetanova ulica 17, Maribor

<sup>3</sup>Kemijski inštitut, Hajdrihova ulica 19, Ljubljana

polona.kogovsek@nib.si

Na začetku pandemije COVID-19 smo bili soočeni z velikim pomanjkanjem zaščitnih mask, ki so predstavljale ključno linijo obrambe pred razširjanjem virusa SARS-CoV-2. Kot odgovor na povišane potrebe so se na trgu pojavili novi proizvajalci mask, respiratorjev in materialov, namenjenih proizvodnji zaščitne opreme, kar je vodilo v potrebo po določanju njihove kakovosti in učinkovitosti. V ta namen smo razvili postopek testiranja učinkovitosti bakterijske (BFE) in virusne filtracije (VFE) zaščitnih mask in materialov, v skladu z evropskim standardom EN 14683:2019. Pri tem smo uporabili bakterijo *S. aureus* in bakteriofag MS2, ki je nekoliko manjši od virusa SARS-CoV-2. Izvedli smo primerjalne študije na skupno skoraj 400 vzorcih mask in materialov, v katere smo vključili tudi vzorce slovenskih proizvajalcev in uvoznikov. Približno polovica mask in materialov, katerim smo določili BFE je imela visoko filtracijsko učinkovitost, nad 98%. Za izbrane zaščitne maske in respiratorje smo določili tudi VFE, ki je bil nad 99%, medtem ko je VFE materialov znašal 98% in več. Tekom testiranja VFE smo uporabili različne eksperimentalne postavitve in med njimi dokazali enako ponovljive in s tem zanesljive rezultate. Obenem smo razvijali protivirusne spojine, ki se lahko nanesejo na materiale, in preverili njihovo delovanje proti bakteriofagu  $\phi 6$ , modelnemu virusu za SARS-CoV-2. Tako smo ocenili, da imajo nekatere naravne spojine dobro protivirusno delovanje, in sicer lahko hitozani z visoko in nizko molekularno maso pri ustreznih pogojih inaktivirajo več kot 6 logaritmov virusa. Ob aplikaciji spojine na material se učinkovitost inaktivacije zmanjša in pri hitozanu z visoko molekularno maso dosega 1 logaritem. Poleg naravnih spojin smo preučili tudi protivirusno delovanje posebne kombinacije bakra in grafena, ki smo jo nanесли na materiale za izdelavo mask. Pokazali smo močno protivirusno delovanje, saj smo inaktivirali več kot 5 logaritmov virusa.

**Ključne besede:** virusna inaktivacija, protivirusne spojine, maske, BFE, VFE

## Razširjenost hipervirulentnih sevov bakterije *Klebsiella pneumoniae*

Dane Lužnik, Vesna Špendal, Nataša Fajfar, Viktorija Tomič

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, Golnik

dane.luznik@klinika-golnik.si

Pojav hipervirulentnih sevov bakterije *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) predstavlja resen zdravstveni problem, saj so sevi hvKp bolj virulentni kot običajna *K. pneumoniae* in zato zmožni povzročiti okužbe tudi v zdravih posameznikih. Gene hipervirulence najdemo na velikih virulenčnih plazmidih kot tudi na kromosomskih mobilnih genetskih elementih, ki jih lahko uporabimo kot biomarkerje za določitev hvKp. Ti virulenčni faktorji so štiri sideroforni sistemi za privzem železa (enterobaktin (*ent*), yersinabaktin (*ybt*), aerobaktin (*iuc*), salmohelin (*iro*)), toksin kolibaktin in geni za uravnavanje tvorbe sluzi (*rpmA*).

S pilotno raziskavo smo želeli ugotoviti razširjenost hvKP pri izolatih *K. pneumoniae*, izoliranih na Univerzitetni kliniki Golnik (UKG). Iz zbirke sevov smo izbrali 20 CRE-CPE in ESBL+ sevov bakterije *K. pneumoniae*, izoliranih med leti 2013 in 2023. Na aparatu Genie II (OptiGene, VB) smo izvedli test eazyplex hv-K. *pneumoniae* (AmplexDiagnostics, Nemčija), ki deluje na principu LAMP (ang. Loop-mediated amplification) in zaznava gene za virulenčne faktorje, povezane s hipervirulenco *K. pneumoniae*.

Testirali smo 10 sevov bakterije *K. pneumoniae* CRE-CPE. Štirje izolati iz let 2022 in 2023 imajo prisotne gene za različne virulenčne dejavnike hipervirulence (*ybt*, *rmpA*, *iucC*). Dva izolata iz istega obdobja imata prisoten samo gen *ybt*. En izolat z leta 2021 nima prisotnega nobenega iskanega gena za virulenco. Starejši izolati (2013-2018) imajo prisoten samo gen *ybt*. Od 10 testiranih sevov bakterije *K. pneumoniae* ESBL+ smo pri 5 sevih zaznali gen *ybt*, pri ostalih 5 sevih nismo zaznali nobenega iskanega gena.

Rezultati so pokazali, da so zadnja leta sevi hvKp prisotni tudi pri bolnikih na UKG čeprav bi bilo treba za boljše podatke o razširjenosti izvesti večjo študijo z večjim številom testiranih sevov. Še posebej zaskrbljujoč je visok delež hvKp med sevi, odpornimi na karbapeneme. Z nevarnostjo, ki jo hipervirulentni sevi predstavljajo za bolnike, bi morali biti zdravstveni delavci bolj seznanjeni in testiranje za hipervirulenco in antibiotično odpornost izvedeno pogosteje.

**Ključne besede:** hipervirulenca, *Klebsiella pneumoniae*, LAMP

## Rekombinantna mlečnokislinska bakterija *Lactococcus lactis* z zmožnostjo izločanja heterolognih endolizinov proti patogeni bakteriji *Clostridioides difficile*

Jure Pohleven<sup>1</sup>, Maruša Bizjak<sup>1</sup>, Maja Rupnik<sup>2,3</sup>, Krištof Bozovičar<sup>4</sup>, Tomaž Bratkovič<sup>4</sup>, Aleš Berlec<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Institut "Jožef Stefan", Jamova cesta 39, Ljubljana

<sup>2</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, Maribor

<sup>3</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, Maribor

<sup>4</sup>Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, Ljubljana

ales.berlec@ijs.si

*Clostridioides difficile* je patogena črevesna bakterija, ki lahko povzroča smrtno nevarne črevesne okužbe, po drugi strani pa je mlečnokislinska bakterija *Lactococcus lactis* del normalne črevesne mikrobiote, ki preprečuje rast patogenih bakterij. Poleg tega se je gensko spremenjena bakterija *L. lactis* izkazala kot obetaven peroralni dostavni sistem, ki lahko izraža heterologne proteine za zdravljenje različnih bolezni.

Cilj te raziskave je združiti koristi potencialnih probiotičnih lastnosti bakterije *L. lactis* s protimikrobnim delovanjem gensko spremenjene bakterije *L. lactis*, ki izloča heterologne endolizine, specifične za patogeno bakterijo *C. difficile*. Endolizini so bakteriofagni encimi, ki z razgradnjo celične stene lizirajo in uničijo bakterijske celice ter tako omogočijo sprostitvev novonastalih bakteriofagov. Zato so učinkovit in obetaven razred protibakterijskih učinkovin, specifičnih za določeno vrsto bakterij in tako ne vplivajo na gostiteljevo normalno črevesno mikrobioto, poleg tega pa niso podvrženi bakterijski odpornosti. Ti proteini so navadno modularni, zgrajeni iz dveh domen – encimsko aktivne domene (EAD) in domene, ki veže celično steno (CBD). Endolizini so prisotni tudi v profagih, bakteriofagnih genomih vključenih v bakterijsko DNA.

Da bi našli nove endolizine, specifične za *C. difficile*, smo izvedli bioinformacijsko študijo ter tako identificirali in raziskali domnevne profagne endolizine iz 151 genomov različnih sevov *C. difficile*. Pri tem smo uporabili različna orodja, kot so PHASTER za identifikacijo profagov, InterPro za napoved domen EAD in CBD in paket EMBOSS za primerjavo aminokislinskih zaporedij z algoritmom Needleman–Wunsch ter na podlagi tega s programom Orange najdene domene endolizinov razvrstili v skupine in jih vizualno predstavili.

Našli smo 77 novih domnevnih fagnih endolizinov, sestavljenih iz domen EAD in CBD. Na podlagi zaporedja najdenih endolizinov smo na koncu izbrali dva, poimenovana Endo1 in Endo2, ki smo ju klonirali in heterologno izrazili v bakterijskih sistemih za izražanje ter ugotavljali njuno specifično litično aktivnost proti bakterijam, vključno s *C. difficile*.

**Ključne besede:** *Lactococcus lactis*, *Clostridioides difficile*, endolizini, litična aktivnost

## Vpliv škroba na sestavo mikrobioma vampa pri ovcah in razvoj subakutne vampove acidoze (SARA)

Alen Radolič, Luka Lipoglavšek, Lijana Fanedl, Gorazd Avguštin

UL, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Katedra za mikrobnno diverziteteto, mikrobiomiko in biotehnologijo, Groblje 3, Domžale

gorazd.avgustin@bf.uni-lj.si

Subakutna vampova acidoza (SARA) je pogost pojav prehranske motnje pri prežvekovalcih, ki je posledica sestave krme s povečano vsebnostjo lahko razgradljivih ogljikovih hidratov, običajno škroba. V predmikrobiomski dobi so za povzročitelja označili bakterijo *Streptococcus bovis*, ki na škrobu izjemno hitro raste in zaradi fermentacijske proizvodnje mlečne kisline zakisa vamp. Tako omogoči razrast laktobacilov, ki ta proces nadaljujejo do pojava vampove acidoze, ki lahko vodi tudi v smrt živali. Prve mikrobiomske raziskave niso enoznačno potrdile omenjene razlage. V naši raziskavi smo uporabili šaržni anaerobni bioreaktorski sistem Gas Endeavour®, s katerim smo simulirali razmere v vampu ovac in tako *in vitro* preučevali ter primerjali vpliv različnih vrst škroba (krompirjev, koruzni škrob) in različnih koncentracij škroba. Spremembe smo spremljali na nivoju aktivnosti mikrobioma (proizvodnjo plinov in kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK), ter posledično spremembe pH) in na nivoju sestave bakterijskega in arhejskega dela mikrobioma. Z molekularnimi mikrobiomskimi metodami in bioinformacijsko analizo pa smo preučevali vpliv teh učinkovin na sestavo bakterijskega in arhejskega dela vampovega mikrobioma. Ugotovili smo, da se pH zaradi naraščajoče koncentracije škroba v gojišču po zaključku procesa ne spremeni značilno vse dokler koncentracija škroba ne doseže 0,8 (ut.%), ko pride do značilnega padca pH pod 5. Sestava KMK se postopoma spreminja z naraščajočo koncentracijo škroba, največja je prav tako pri najvišji koncentraciji škroba (0,8 %). Naraščajoča koncentracija škroba povzroči povečevanje produkcije CO<sub>2</sub>, sočasno pa zmanjševanje produkcije metana, ki ga v poskusu z 0,8 % škroba v gojišču nismo več zasledili, se je pa pojavil vodik. Sestava bakterijskega dela mikrobioma se z naraščajočo koncentracijo škroba v gojišču vedno bolj spreminja, na arhejski del mikrobioma pa škrob v gojišču nima vpliva vse do koncentracije 0,8 %, ki povzroči opazne spremembe.

**Ključne besede:** SARA, škrob, prežvekovalci, vamp, mikrobiom



## Ali brakični obalni ekosistemi res predstavljajo nevarnost za nove oblike škodljivih cvetenj alg v Sloveniji?

Petra Slavinec<sup>1,2</sup>, Janja Francé<sup>1</sup>, Patricija Mozetič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Morska biološka postaja, Nacionalni inštitut za biologijo, Fornače 41, Piran

<sup>2</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

petra.slavinec@nib.si

Globalni pojav škodljivih cvetenj alg (HAB) povezujemo s strupenimi in škodljivimi vrstami mikroalg, ki povzročajo različne zastrupitve z morskó hrano pri ljudeh, pogine morskih organizmov in druge negativne posledice v vodnih ekosistemih, povečini morskih. V slovenskem morju se redno pojavlja 12 vrst dinoflagelatov, ki so povzročitelji diarejogene in (potencialno) paralitične zastrupitve s školjkami, kot tudi diatomej iz rodu *Pseudo-nitzschia*, v katerem prav tako najdemo potencialno toksične vrste za amnezijško zastrupitev s školjkami. V študiji, ki je potekala med leti 2018 in 2022, smo popisali diverzitetó mikroalg brakičnih in antropogeno spremenjenih okolij vzdolž slovenske obale (Luka Koper, Škocjanski zatok in Stjuža), ki so lahko recipientsko okolje za tujerodne vrste, smo identificirali 28 HAB taksonov, od tega smo tri opazili prvič. Novo opaženi organizmi predstavljajo potencialno nevarnost za nove vrste zastrupitev. Za *Coolio monotis*, pri nas prvič opaženega dinoflagelata, je značilna proizvodnja cooliotoksinov, kateri lahko povzročajo nevrotoksične zastrupitve. Iste tip zastrupitve lahko povzročijo tudi nekatere cianobakterije iz (v morju) prvič opaženega rodu *Anabaena*, ki proizvajajo nekaj različnih toksinov, vključno z anatoksinom in mikrocistinom, ki pa lahko hkrati povzročajo tudi gastrointestinalne težave. Drugi rod cianobakterij, ki smo ga med študijo opazili prvič, *Lyngbya*, pa predstavlja nevarnost za nov tip zastrupitev, saj nekateri predstavniki rodu proizvajajo lyngbyatoksične, ki so dermatotoksični.

**Ključne besede:** mikroalge, HAB, toksini

## Genomska analiza prvih slovenskih izolatov bakterije *Leptospira* spp.

Katja Strašek Smrdel<sup>1</sup>, Eva Ružič Sabljic<sup>1</sup>, Andraž Celar Šturm<sup>1</sup>, Tjaša Cerar Kišek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana

<sup>2</sup>NLZOH, Grablovičeva, Ljubljana

katja.strasek@mf.uni-lj.si

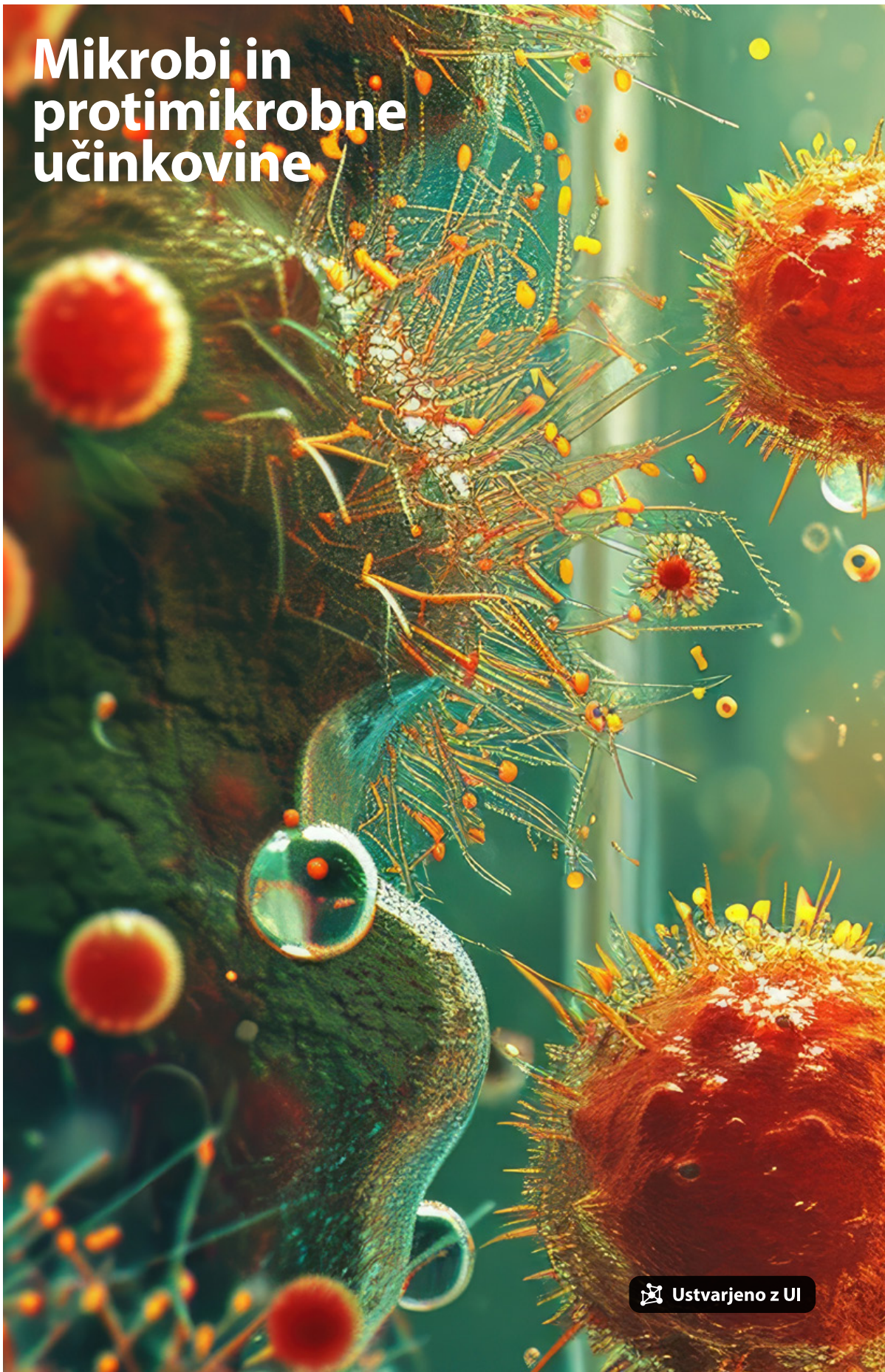
Rod *Leptospira* vsebuje številne patogene in nepatogene vrste. Patogene vrste so prisotne pri številnih domačih in divjih živalih, ki izločajo bakterije preko urina ter tako onesnažijo vodo, travnike in polja. Človek se okuži preko kontaminiranega okolja ali okuženih živali. Prvi primer leptospiroze v Sloveniji je bil poročan leta 1938 v Murski Soboti, povprečna letna incidenca leptospiroze v zadnjih desetih letih pa je znašala 0,89/100.000 prebivalcev, kar predstavlja tretjo najvišjo incidenco v državah EU. Za mikrobiološko potrditev okužbe se v večini uporabljajo serološke metode, bakterijo lahko osamimo iz bolnikove krvi, likvorja ali urina, vendar je metoda nizko občutljiva, zahtevna in dolgotrajna. V obdobju 2004-2023 smo bakterijo osamili iz krvi 12 bolnikov.

Sekvenciranje celotnega genoma je bilo opravljeno pri 9 slovenskih izolatih leptospir. Nukleinsko kislino smo osamili s kompletom DNeasy Blood&Tissue (Qiagen), za pripravo knjižnic smo uporabili komplet Nextera XT(Illumina) in sekvencirali z NextSeq550(Illumina). Kvaliteto odčitkov smo preverili z orodjem FastQC in jih sestavili v genome s programom SPAdes. Identifikacijo vrste smo opravili s spletnim orodjem KmerFinder. Z analizo MLST smo izolatom določili sekvenčni tip po shemah MLST#1/2 v podatkovni bazi PubMLST. Filogenetsko sorodnost smo preverili s shemo cgMLST *Leptospira* Institut Pasteur, ki temelji na 545 dobro ohranjenih genih pri rodu *Leptospira*. Sorodstveno drevo smo izrisali glede na alelne razlike med izolati z orodjem SeqSphere+ (Ridom).

Prvim slovenskim izolatom smo določili naslednje vrste: *Leptospira interrogans* in *L. borgpetersenii* (po trije izolati), *L. kirschneri* (dva izolata), *L. santarosai* (en izolat). Sekvenčne tipe po shemah MLST#1 in #2 smo uspešno določili osmim izolatom, le izolat *L. santarosai* je imel nedoločljiv ST. Pri večini izolatov smo uspešno določili sekvenčni tip (cgST). Pri izolatu *L. santarosai* tudi z analizo cgMLST nismo uspeli določiti cgST. Po podrobnem pregledu odčitkov tega izolata z orodjem Kraken2 smo ugotovili, da večina odčitkov sicer pripada vrsti *L. santarosai*, a je prisotno tudi nekaj odčitkov, ki pripadajo vrstama *L. noguchii* in *L. interrogans*. Izolat smo osamili iz krvi bolnika, ki je potoval preko številnih celin. Predpostavljamo, da je imel bolnik mešano okužbo ali pa je prišlo do kontaminacije med postopkom osamitve borelije.

**Ključne besede:** *Leptospira* spp, WGS, Slovenija

# Mikrobi in protimikrobne učinkovine



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Pojavnost protimikrobne odpornosti indikatorjev fekalnega onesnaženja pri različnih fazah čiščenja v dveh komunalnih čistilnih napravah

Eva Mežnar, Aneja Štuhec, Darja Istenič, [Karmen Godič Torkar](mailto:karmen.torkar@zf.uni-lj.si)

Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana

[karmen.torkar@zf.uni-lj.si](mailto:karmen.torkar@zf.uni-lj.si)

Protimikrobna odpornost je zaradi prekomerne uporabe protimikrobnih sredstev v humani medicini in veterini resen globalni problem. Odpadne vode iz zdravstvenih ustanov, farmacevtske industrije, komunalnih sistemov pogosto vsebujejo visoke vsebnosti protimikrobnih sredstev in tudi proti njim odpornih mikroorganizmov. V dveh izbranih komunalnih čistilnih napravah smo na različnih stopnjah čiščenja ugotavljali prisotnost koliformnih bakterij vključno z bakterijami *Escherichia coli* ter pri 120 sevih določili njihovo protimikrobno odpornost in prisotnost nukleotidnih zaporedij za nekatere najpogostejše tipe  $\beta$ -laktamaz. Zmanjšanje koncentracije koliformnih bakterij se je v prvi čistilni napravi znižalo iz  $8 \times 10^5$  CFU/mL vode v vtoku, do  $7 \times 10^3$  CFU/100 mL vode v iztoku, medtem ko se je v drugi čistilni napravi število znižalo le za 1 log do končnih  $2 \times 10^6$  CFU/100 mL v iztoku. Največ sevov je bilo odpornih proti azitromicinu (81 %) in ampicilinu (78 %), najmanj pa proti trimetoprimu v kombinaciji s sulfometazolom (28,3 %) in tetraciklinu (21,7 %). Čeprav značilnih razlik v odpornosti med sevi, osamljenimi iz obeh čistilnih naprav v povprečju ni bilo, pa je bil delež odpornosti proti gentamicinu, ciprofloksacinu in tetraciklinu pri sevih iz ene čistilne naprave občutno nižji, kot pri sevih iz druge. Izmed genov za  $\beta$ -laktamaze razširjenega spektra (ES $\beta$ L) sta bila v povprečju najbolj pogosta tipa CTX-M 9 (44,55 % sevov) in CTX-M 25 (30,91 % sevov). Najpogostejša gena za karbapenemaze sta bila SPM (38,17 % sevov) in SIM (19,09 % sevov). Med geni tipa OXA sta bila najbolj razširjena OXA-51 (15,45 % sevov) in OXA-23 (11,82 % sevov). Med sevi, pridobljenimi iz obeh čistilnih naprav, so bile v pogostosti in vrstah genov za  $\beta$ -laktamaze opazne značilne razlike. Klasičen postopek čiščenja brez terciarne faze v biološki čistilni napravi ni znižal koncentracije bakterij fekalnega onesnaženja v vodi do te mere, da bi bila primerna za izpust v okolje. Na ta način je omogočen tudi vnos in širjenje odpornih bakterij in genov za odpornost proti protimikrobnim sredstvom v okolju.

**Ključne besede:** protimikrobna odpornost, čiščenje odpadne vode, ES $\beta$ L, karbapenemaze,  $\beta$ -laktamaze AmpC

## Primerjava genotipov pri encime ESBL-producirajočih sevih *Escherichia coli*, izoliranih iz spodnjih dihal človeka, v obdobju pred in med pandemijo COVID-19 (2017-2022)

Katja Hrovat<sup>1</sup>, Jerneja Čremožnik Zupančič<sup>1</sup>, Katja Seme<sup>2</sup>, Jerneja Ambrožič Avguštin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za Biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, Ljubljana

katja.hrovat@bf.uni-lj.si

Okužbe spodnjih dihal so pogoste v sistemih dolgotrajne oskrbe in v bolnišnicah, posebej v enotah intenzivne nege, ter predstavljajo četrti najpogostejši razlog za smrt na svetu. Pri sicer zdravih ljudeh je bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) redke povzročitelj pljučnice, z izjemo bolnikov s kroničnimi obolenji ali kot posledica bakteremij ter vdora bakterij iz prebavil. Zdravljenje tovrstnih okužb je težavno, predvsem pri *E. coli*, ki sintetizirajo  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL-EC) ter so običajno odporne še proti drugim skupinam protimikrobnih učinkovin. Osrednji cilj naše retrospektivne raziskave je bil primerjati genotipe pred (pre-COV; 2017–2019) in med (COV; 2020–2022) obdobjem pandemije COVID-19 pri izolatih ESBL-EC iz spodnjih dihalnih poti. Primerjava izolatov pred ( $n = 114$ ) ter med ( $n = 86$ ) pandemijo COVID-19 je pokazala podobno povprečno starost pacientov, izolati pa so bili v obeh obdobjih največkrat izolirani iz aspiratov trahej. Z uporabo metode ERIC-PCR smo zaznali večjo raznolikost izolatov v obdobju COV, nekatere klonalne skupine pa so smo zaznali samo v enem ali drugem obdobju. Primerjava filogenetskih skupin ni pokazala statističnih razlik med obdobjema, večina izolatov pa je bila uvrščena v skupino B2 in sekvenčno skupino ST131. Med geni, ki posredujejo odpornost proti antibiotikom, smo zaznali visok delež  $bla_{CTX-M-1}$  (pre-COV 86% in COV 74,4%) ter nižji delež  $bla_{CTX-M-9}$  (pre-COV 11,4% in COV 19,8%). Plazmidno zapisane gene za odpornost proti kinolonom smo potrdili pri skupno sedmih izolatih, medtem ko je bil delež genov  $aac(6)-Ib-cr$  višji (pre-COV 39,5% in COV 24,4%). Prisotnost genov za dejavnike virulence med obema obdobjema je bil primerljiv, razen v primeru genov  $afa/dra$ ,  $sat$  in  $tsh$ . V raziskavi smo potrdili višjo klonalno raznolikost ter statistične razlike za dejavnike virulence  $afa/dra$ ,  $sat$  in  $tsh$  v obdobju med pandemijo. V obdobju pred pandemijo smo zaznali statistično značilno povečan delež genov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam ( $aac(6)-Ib-cr$ ,  $bla_{CTX-M-1}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $qac\Delta I$ ).

**Ključne besede:** *Escherichia coli*, dejavniki virulence, rezistenca, pandemija COVID-19

## Konsolidacija in integracija genomskih analiz za rutinsko spremljanje večkratno odpornih bakterij v Sloveniji – prvi rezultati projekta SLOSEQ

Sandra Janežič<sup>1,2</sup>, Andrej Golle<sup>1</sup>, Urška Kramar<sup>1</sup>, Maja Rupnik<sup>1,2</sup>, Helena Ribič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

sandra.janezic@nlzoh.si

Odpornost bakterij proti antibiotikom ostaja pomemben javnozdravstveni in klinični problem, tako v Sloveniji kot tudi globalno. Breme okužb z večkratno odpornimi bakterijami (VOB; bakterije ki so odporne proti vsaj trem različnim skupinam antibiotikov) se kaže v večji smrtnosti, podaljšanem bolnišničnem zdravljenju, večjem številu zapletov in višjih stroških zdravljenja. Odpornost mikroorganizmov pa ni problem samo pri ljudeh, ampak sega tudi na področje veterine, rastlin, hrane in okolja, kar pomeni, da se morajo ukrepi za zmanjševanje odpornosti mikroorganizmov obravnavati medsektorsko. Na nacionalnem nivoju je zato bila tudi sprejeta Državna strategija »eno zdravje« za obvladovanje odpornosti mikrobov, ki naslavlja te ukrepe.

V okviru evropskega projekta »SLOSEQ – Konsolidacija in integracija sekvenciranja celotnega genoma v rutinski monitoring v Sloveniji«, naslavljam vprašanja širjenja večkratno odpornih bakterij v humani medicini s pristopi sekvenciranja in analizami genomskih zaporedij. V okviru projekta bomo vzpostavili in optimizirali postopke in protokole za izvajanje sekvenciranja, za potrebe nacionalnega spremljanja, s čemer bomo prispevali k boljši pripravljenosti in odzivanju na grožnje, povezane z javnim zdravjem.

V prvi šestih mesecih trajanja projekta smo vzpostavili protokole za zbiranje izolatov, pripravo knjižnic in sekvenciranje na platformi NextSeq2000 (Illumina), ter sekvencirali in analizirali genomska zaporedja 550 izolatov bakterij, ki izločajo karbapenemaze in/ali ESBL, iz vrst *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih v letih 2022 in 2023. Proti karbapenemom odporne po Gramu negativne bakterije je Svetovna zdravstvena organizacija uvrstila med bakterije s kritično prioriteto. Pri vseh vrstah, razen *E. coli*, je opazno klonalno razširjanje, tako znotraj posameznih zdravstvenih ustanov kot tudi med ustanovami. Poleg spremljanja genotipov in njihovega širjenja, spremljamo tudi genetske mehanizme, ki so odgovorni za odpornost proti različnim skupinam antibiotikov. Med geni, ki posredujejo odpornosti proti karbapenemom, so najpogostejši *bla*NDM-5/*bla*OXA-48 pri *K. pneumoniae*, *bla*OXA-48 pri *E. coli*, *bla*VIM-2 pri *P. aeruginosa* in *bla*OXA-23 pri *A. baumannii*.

**Ključne besede:** SLOSEQ, odpornost mikroorganizmov, genomske analize

## Okužba totalne kolčne endoproteze z večkratno odpornim *Acinetobacter baumannii* CRAb – CP: predstavitev primera

Erika Jerele, Matevž Bajuk

Ortopedski oddelek, Splošna bolnišnica Novo mesto, Šmihelska cesta 1, 8000 Novo mesto

jerele.erika@gmail.com

Okužba endoproteze je pomemben vzrok obolevnosti in umrljivosti. Pojavi se pri 1 – 2% pacientov po primarni endoprotezi kolka ali kolena. Izziv predstavlja predvsem zdravljenje okužb, ki jih povzročajo večkratno odporne bakterije. *Acinetobacter baumannii* ima sposobnost hitrega pridobivanja odpornosti proti številnim antibiotikom. Povzroča okužbe dihal, ran, opeklin in sečil. Pojavlja se po invazivnih posegih, operacijah in v enotah za intenzivno terapijo.

Predstavlja primer pacientke z omajanjem totalne endoproteze desnega kolka, pri kateri smo s punkcijo izolirali večkratno odporen *A. baumannii*. Vse od primarne operacije je imela gospa v kolku občasne bolečine. 5 let po operaciji je opravila scintigrafijo skeleta, ki je pokazala omajanje femoralne komponente endoproteze. Desni kolk smo punkturali. Iz punktata je bil izoliran: *A. baumannii* CRAb – CP, s prisotno karbapenemazo tip OXA – 24, odporen na imipenem, meropenem, ciprofloksacin, levofloksacin, amikacin, gentamicin in trimetoprim - sulfometoksazol. Citološka analiza punktata je pokazala zvišano število levkocitov z 89% nevtrofilcev. Pri gospe smo odstranili vse komponente endoproteze in vstavili antibiotični distančnik s kolistinom. Iz odvzetih vzorcev med operacijo in sonikacije, z BR – PCR in kultivacijo, bakterij nismo dokazali. Histopatološka analiza tkiva je pokazala zmerno infiltracijo vezivnega tkiva z limfociti in nevtrofilnimi granulociti (gostota več kot 5/HPF), kar je govorilo za odloženo (low grade) okužbo endoproteze. 20 dni po odstranitvi endoproteze je bila gospa ponovno operirana. Odstranjen je bil distančnik in implantirana totalna kolčna endoproteza. Iz tkivnih vzorcev, odvzetih med drugo revizijsko operacijo, bakterije niso porastle. Izvid histopatološke analize ni govoril za okužbo sklepne proteze. Pokazal je granulacijsko tkivo s pomnoženimi limfociti in zgolj posameznimi nevtrofilci ob nekrozi. Do končnega izvida kultur je gospa prejela antibiotično zaščito s trimetoprim – sulfometoksazolom. Po prejemu negativnega izvida smo antibiotično terapijo ukinili. Gospa je 2 leti po revizijski operaciji brez bolečin.

**Gljučne besede:** okužba endoproteze, večkratno odporne bakterije, antibiotično zdravljenje

## Molekularni pristop pri študiju vpliva monoterpenov na bakterijo *Campylobacter jejuni*

Blaž Jug, Dina Jug, Sonja Smole Možina, Anja Klančnik

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

blaz.jug@bf.uni-lj.si

Patogena bakterija *Campylobacter jejuni* je pogost povzročitelj bakterijskega gastroenteritisa in se običajno nahaja v prebavnem traktu perutnine. Ta bakterija lahko v prireji živali in celotni verigi proizvodnje in preskrbe s hrano kontaminira abiotične površine in živila, kar je pogosto posledica neustrezne higiene. Dodaten izziv predstavlja njena naraščajoča odpornost proti antibiotikom in biocidom, ki se redno uporabljajo v živilski industriji.

V naši študiji smo raziskali učinke sub-inhibitornih koncentracij monoterpenov linalola in linalil acetata na transkriptom in proteom bakterije *C. jejuni*. Posebno pozornost smo namenili genu *luxS*, ki ima pomembno vlogo pri filamentoznosti te bakterije. V ta namen smo analizirali vpliv monoterpenov tudi na sev *C. jejuni*  $\Delta luxS$ .

Vpliv monoterpenov na bakterijo *C. jejuni* in mutanto *C. jejuni*  $\Delta luxS$  smo testirali na ravni transkriptoma, kjer smo ovrednotili spremembe v izražanju genov, medtem ko smo na ravni proteoma preučevali sintezo proteinov po eno-urnem tretiranju. Pri tem smo uporabili RNA sekveniranje (RNA-seq) in analizo transkriptoma ter izolacijo celokupnih proteinov, po kateri smo z metodo MALDI-TOF MS identificirali in kvantificirali profile znotrajceličnih proteinov. Analiza transkriptoma ter profila proteinov je razkrila povečano izražanje genov, vključenih v aktivni membranski transport, mehanizme popravljanja DNA, sintezo celične stene in kemotakso, ter zmanjšano izražanje genov, povezanih s flagelarnim kompleksom in stresnim odzivom pri mutanti *C. jejuni*  $\Delta luxS$ .

Gen *luxS* je vpleten v raznolike odzive bakterije *C. jejuni* na neugodne okoljske dejavnike. Presenetljivo njegova odsotnost ne omeji, ampak izboljša stresni odziv po tretiranju s testiranimi monoterpeni. Molekularne metode kažejo na širokospektralni odziv, ki bi lahko prispeval k večji odpornosti bakterije *C. jejuni*  $\Delta luxS$  na stresne razmere v okolju.

**Ključne besede:** *Campylobacter jejuni*, *Lavandula*, gen *luxS*, transkriptomika, proteomika

Zahvala: Delo so omogočili projekti ARIS J4-3088, J4-4548 in J4-2542 ter program P4-0116.



## Vpliv kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na rast bakterij *Lactiplantibacillus plantarum*

Žana Lovšin<sup>1</sup>, Tadej Kotnik<sup>1</sup>, Anja Klančnik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška cesta 25, Ljubljana

<sup>2</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

anja.klancnik@bf.uni-lj.si

Elektroporacija se vse bolj uporablja kot dopolnilna metoda za inaktivacijo bakterij, tudi v kombinaciji s protimikrobnimi spojinami (1). Kratki električni pulzi zadostne jakosti povzročijo povečano permeabilnost bakterijskih membran, kar olajša transport molekul v in iz celice (2). Večina raziskav se osredotoča na snovi, uporabne v prehrambeni industriji, manj pa na klinične antibiotike, saj je njihova uporaba omejena na čiščenje odpadnih voda iz bolnišnic. Predhodne raziskave so pokazale, da se z uporabo kombiniranega pristopa lahko poveča nivo inaktivacije bakterij in da je potenciacija učinka antibiotika odvisna od njegovega mehanizma delovanja in lokacije tarče. Pri Gram-negativnih bakterijah *Escherichia coli* smo dosegli največjo potenciacijo z ampicilinom (inhibicija sinteze peptidoglikana), pri Gram-pozitivnem bakterijah *Lactiplantibacillus plantarum* pa s tetraciklinom (inhibicija sinteze proteinov) (3).

Naš cilj je bil določiti vpliv mehanizma delovanja antibiotika na okrevanje in rast bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji pri sobni temperaturi. Uporabili smo ampicilin, ki deluje na celično steno (zunajcelična tarča), in tetraciklin, ki deluje na sintezo proteinov (znotrajcelična tarča). Elektroporacija sama je povzročila začetno umiranje bakterij in zamik rastne faze preživelih. Naraščanje jakosti električnega polja je povečalo učinek obeh antibiotikov. Elektroporacija sama ni vplivala na hitrost rasti, a je bila končna gostota bakterij po 24 urah pri sobni temperaturi nižja kot v kontrolnih vzorcih. Prisotnost antibiotika pred in po elektroporaciji je povzročila delno ali popolno inhibicijo rasti. Tetraciklin je imel večji vpliv na rast, pri ampicilinu pa so bile potrebne višje koncentracije ali večja jakost električnega polja za popolno inhibicijo rasti.

**Gljučne besede:** elektroporacija, antibiotiki, *Lactiplantibacillus plantarum*,

Zahvala: Delo sta omogočila projekta ARIS J2-50064 in MR ŽL 53516 ter program P4-0116.

Viri:

(1) Garner AL. 2019; <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10067-y>

(2) Kotnik T in sod. 2019; <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>

(3) Lovšin Ž in sod. 2021; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722232>

## Vpliv potencialnega probiotičnega seva ŽP in bakteriofaga AL na uropatogeno *Escherichia coli* DL82 v *in vitro* TIM modelih

Aleksander Lesar<sup>1</sup>, Carlos Miguel Nobrega Mendonca<sup>2</sup>, Tinkara Šubic<sup>1</sup>, Laura Balta<sup>1</sup>, Tomaž Accetto<sup>1</sup>, Koen Venema<sup>2</sup>, Marjanca Starčič Erjavec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Department of Human Biology, University of Maastricht, Campus Venlo, Venlo, Netherlands

aleksander.lesar@gmail.com

Porast bakterijske odpornosti proti antibiotikom predstavlja resen globalni izziv za zdravje in prizadevanj v boju proti antibiotikom odpornim bakterijam je vse več, med drugim vključujejo tudi iskanje alternative antibiotikom. Cilj te študije je bil proučiti vpliv potencialnega probiotičnega seva ŽP in bakteriofaga AL na proti ampicilinu odporno uropatogeno bakterijo *Escherichia coli* DL82 v *in vitro* TNO intestinalnih modelih (TIM-1 in TIM-2) v različnih razmerah. Sev ŽP je potencialni probiotični sev *E. coli* Nissle 1917, ki vsebuje konjugativni plazmid pOX38a: Cm z genom za kolicin E7 ter zapisom za odpornost proti kloramfenikolu, v svojem kromosomu zapis pa ima za imunski protein kolicina E7, ki kolicin inhibira, in tudi gen za odpornost proti gentamicinu. Plazmid pOX38a: Cm se iz seva ŽP prenese s konjugacijo v tarčno recipientsko celico, kjer nato nastane kolicin E7, ki s svojo DNazno aktivnostjo vodi v propad tarčne celice. Bakteriofag AL je bil z namenom možne uporabe v bakteriofagnih terapijah izoliran iz odpadnih vod in je specifičen za *E. coli*. TIM-1 simulira razmere v zgornjem prebavnem traktu in sicer želodec in tri dele tankega črevesja, TIM-2 pa simulira razmere v debelem črevesju in vsebuje tudi človeško mikrobioto. Konjugacija v TIM-1 modelu je sicer bila uspešna, a je bila sama frekvenca konjugacije prenizka, da bi zavrla rast DL82. V TIM-2 modelu, kjer eksperiment traja 4 dni, ni prišlo do konjugacije, saj so anaerobne razmere drastično zmanjšale frekvenco konjugacije. Bakteriofag AL se je izkazal kot neučinkovit tako v TIM-1 kot v TIM-2. V raziskavi smo primerjali tudi rastne krivulje sevov v različnih kombinacijah, pa tudi vpliv na sestavo mikrobiote v TIM-2 tako s sekvenciranjem kot z analizo kratkih maščobnih kislin. Da povzamemo, kljub kislini HCl, prebavnim encimom, žolču, sevu ŽP in bakteriofagu AL je bilo zmanjšanje oz. zaustavitev rasti DL82 neuspešna, kar kaže na njegovo zmožnost prilagajanja razmeram v črevesju.

**Ključne besede:** probiotik, bakteriofag, uropatogena *Escherichia coli*

## Strukturni vpogled v encime sinteze polisaharidnega liganda, ki sidrajo S-plast na površino bakterije *Clostridioides difficile*

Nataša Lindič<sup>1</sup>, Aleksandra Usenik<sup>1,2</sup>, Jure Loboda<sup>1</sup>, Matej Novak<sup>1</sup>, Marinka Horvat<sup>1,2</sup>, Tjaša Peternel<sup>1</sup>, Jure Borišek<sup>3</sup>, Nikola Minovski<sup>3</sup>, Janez Mravljak<sup>4</sup>, Martina Hrast Rambaher<sup>4</sup>, Marjana Novič<sup>3</sup>, Robert Vidmar<sup>1</sup>, Dušan Turk<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Odesek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut "Jožef Stefan", Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup>Kemijski inštitut, Hajdrihova ulica 19, 1000, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup>Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

natasa.lindic@ijs.si

Dolgotrajna uporaba antibiotikov širokega spektra vodi do pojava patogenih bakterijskih sevov, odpornih proti več antibiotikom. Primer take nevarne bakterije je sporogen bolnišnični enteropatogen *Clostridioides difficile*. Vegetativna celica *C. difficile* je obdana s površinsko (S-) plastjo, t.j. v dvodimenzionalno mrežo urejenih proteinov, ki so pomembni virulencijski faktorji in predstavljajo prvi kontakt bakterijske celice z gostiteljsko celico. S-plast je na bakterijsko celico vsidrana preko nekovalentne vezave na sekundarne polisaharide (PSII), ki izraščajo iz peptidoglikana. Insercijska inaktivacija genov za encime, ki sodelujejo pri sintezi PSII, je bila do sedaj neuspešna, kar kaže na njihovo esencialno vlogo pri viabilnosti celice. Utišanje izražanja genov za te encime pa vodi do napak v rasti in difuznosti celične stene, sprememb v sidranju, izločanju in odlaganju PSII, ter sprememb v morfologiji in sestavljanju S-plasti in končno do sprememb v tvorbi biofilmov in v virulenci bakterije. Naš cilj je bil strukturno in biokemijsko okarakterizirati proteine, vključene v sintezo PSII, in jih ovrednotiti kot potencialne tarče za specifično zdravljenje okužb s *C. difficile*.

Z uporabo rentgenske kristalografije smo določili strukturo enega predstavnika iz vsake skupine encimov, ki sodelujejo pri sintezi PSII: glikoziltransferaz (od  $Mg^{2+}$ -odvisna glikoziltransferaza 27760), encimov za pretvorbo manoze (alfa-D-fosfoheksamutaza Pgm2) in encimov, ki pripenjajo PSII na peptidoglikan (fosfotransferaza LcpB). Rešene strukture so razkrile podobnosti v organizaciji domen teh encimov z njihovimi homologi iz sorodnih bakterij in ohranjenost mest za vezavo kationov/ligandov. Prav tako pa smo identificirali razlike, ki bi nam lahko omogočile bolj specifično ciljanje bakterije *C. difficile*. Naše študije smo dopolnili z molekularnimi simulacijami načrtovanja specifičnih ligandov/inhibitorjev za posamezen encim in pojasnjevanja mehanizmov njihove encimske aktivnosti. Naši rezultati nakazujejo možne načine specifičnega zdravljenja okužb s *C. difficile*, predstavljajo pa tudi osnovo za razvoj inhibitorjev homolognih proteinov iz drugih po Gramu pozitivnih bakterij.

**Ključne besede:** *Clostridioides difficile*, S-plast, biosinteza sekundarnih polisaharidov, encimi

## Antibakterijska aplikacija nanomaterialov ZnO in CuO, imobiliziranih v polielektrolitne plasti

Nives Matijakovič Mlinarič<sup>1</sup>, Anamarija Zore<sup>1</sup>, Aleksander Učakar<sup>2</sup>, Anže Abram<sup>2</sup>, Andrijana Sever Škapin<sup>3</sup>, Klemen Bohinc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana

<sup>2</sup>Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, Ljubljana

<sup>3</sup>Zavod za gradbeništvo Slovenije, Dimčeva ulica 12, Ljubljana

nives.matijakovic@zf.uni-lj.si

Bakterije so resen javnozdravstveni problem. Zaradi svojih strukturnih lastnosti se lahko vežejo na površine tkanin (najlon, poliester, bombaž), plastičnih in kovinskih materialov. Pred okužbami, ki se prenašajo s tkaninami in površinami, lahko prebivalstvo zaščitimo z ukrepi za preprečevanje širjenja bakterij, pri čemer je najbolj optimalen način še potrebno poiskati. Veliko tkanin namreč ni mogoče prati pri visokih temperaturah, ki omogočajo dezinfekcijo. Prenos bakterij v bolnišnicah, trgovinah in zgradbah preko površin omogočajo nezadostno razkužene površine. Eno od možnih rešitev za preprečevanje širjenja bakterij predstavlja uporaba kovinskih nanodelcev (NP). Zaradi dobrih lastnosti, kot so vzdržljivost, nizka citotoksičnost in dobra stabilnost, so kovinski NP odlični za uporabo kot antibakterijsko in antivirusno sredstvo. Trenutno so NP iz CuO in ZnO v središču raziskav za antibakterijsko delovanje, hkrati sta Cu in Zn mikroelementa v človeškem telesu in so delci biokompatibilni ter zanimivi za vsakodnevno uporabo.

Nanodelci CuO in ZnO različnih velikosti in morfologij izkazujejo različne površinske lastnosti, spreminjajo lastnosti obdelanih površin (tkanine, teflon in nerjavno jeklo) in kot del polielektrolitnih večslojev kažejo obetavno antibakterijsko delovanje proti bakteriji *Escherichia coli*. Pripravili smo NP, ki so imeli kosmičasto, sferično in paličasto morfologijo ter njim določili velikost nanodelcev. Polielektrolitski večsloji so bili pripravljene z zaporedno adsorpcijo polianiona (alginata), polikationa (polialilamin hidroklorida) in NP, tako da je nastalo 6 plasti, znotraj katerih so bili vključeni NP. Premazi z različnimi NP so pokazali obetavno antibakterijsko delovanje proti bakteriji *Escherichia coli*. Naši rezultati dokazujejo, da imajo velikost, morfologija in vrsta površinskega materiala pomembno vlogo pri antibakterijskem delovanju. Rezultati tudi nakazujejo na najboljši način pristopa pri obdelavi površin za dobre dezinfekcijske učinke s sproščanjem ionov iz polielektrolitskih večslojev. Zaključki raziskave dajejo osnovo za razvoj nove metode dezinfekcije z napraševanjem trdih površin ter namakanjem tkanin v suspenzijo polielektrolitov in nanodelcev.

**Ključne besede:** nanodelci CuO, nanodelci ZnO, polielektroliti, antibakterijska uporaba

## Elektrolizirana oksidativna fiziološka raztopina (EOS) kot nova ustna voda za preprečevanje prenosa virusov, študija *in vitro*

Haris Munjakovič<sup>1</sup>, Tina Mikuletič<sup>3</sup>, Naiera Zayed<sup>4</sup>, Snežana Kramar<sup>3</sup>, Tina Triglav<sup>3</sup>, Katja Seme<sup>3</sup>, Wim Teughels<sup>4</sup>, Andrej Steyer<sup>5</sup>, Aleš Fidler<sup>6,7</sup>, Rok Gašperšič<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center za ustne bolezni in parodontologijo, Stomatološka klinika, UKC, Zaloška 2, Ljubljana

<sup>2</sup>Katedra za ustne bolezni in parodontologijo, Medicinska fakulteta, UL, Hrvatski trg 6, Ljubljana

<sup>3</sup>Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, UL, Zaloška 4, Ljubljana

<sup>4</sup>Department of Oral Health Science, University of Leuven KU Leuven, Leuven, Belgium

<sup>5</sup>Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, NLZOH, Grablovičeva 44, Ljubljana

<sup>6</sup>Center za zobne bolezni in endodontijo, Stomatološka klinika, UKC, Zaloška 2, Ljubljana

<sup>7</sup>Katedra za zobne bolezni in normalno morfologijo zobnega organa, Medicinska fakulteta, UL, Hrvatski trg 6, Ljubljana

tina.mikuletic@mf.uni-lj.si

Zaradi vloge ustnih vod pri preprečevanju prenosa virusov, zlasti med izzivom COVID-19 v zobozdravstvu, se je pojavila potreba po raziskavi protivirusnih lastnosti ustnih vod ter njihovega vpliva na zmanjšanje virusov v ustih in omejitev širjenja virusov z aerosolom. Z oceno protivirusne učinkovitosti različnih aktivnih sestavin ustnih vod smo želeli pridobiti uporabne podatke za pripravo protokola uporabe ustnih vod v zobozdravstvu. To bi prispevalo k večji varnosti tako pacientov kot zobozdravstvenih izvajalcev. V tej raziskavi smo preučili elektrolizirano oksidativno fiziološko raztopino (EOS) kot novo sredstvo za izpiranje ust.

Oceno vpliva učinkovin na virusno infektivnost smo določali s testom pomnoževanja virusov v celični kulturi za modelne viruse z ovojnico in viruse brez ovojnice. V poskusu smo uporabili virus Herpes simplex 1 (HSV-1) in človeški adenovirus (HAdV) v standardnih pogojih in pogojih z umetno slino, ki je simulirala naravno okolje v ustih. Ocenili smo učinkovitost aktivnih sestavin ustne vode, vključno s klorheksidinom (CHX), cetilpiridinijevim kloridom (CPC), etanolom (EtOH), vodikovim peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), natrijevim hipokloritom (NaOCl) in EOS ter ustrezno negativno kontrolo. Poleg tega smo morebitno citotoksičnost ustnih vod testirali na celični liniji človeških ustnih keratinocitov (HOK).

EOS je v primerjavi z drugimi testiranimi ustnimi vodami v pogojih *in vitro* absolutno preprečila okužbe s HSV-1 in HAdV v klinično relevantnemu 1-minutnem času izpostavljenosti, hkrati pa ni bila citotoksična za HOK. Vse druge ustne vode, z izjemo EtOH, so bile učinkovite proti virusu z ovojnico (HSV-1), medtem ko so se le ustne vode na osnovi klora (NaOCl in EOS) izkazale kot učinkovite proti stabilnejšemu virusu brez ovojnice (HAdV). Rezultati so pokazali, da so vse ustne vode, z izjemo EOS, za celice citotoksične.

EOS se je v pogojih *in vitro* izkazala za obetavno ustno vodo pri preprečevanju prenosa virusov in nima toksičnih učinkov na človeške celice. Načrtujemo dodatne raziskave za klinično uporabo te nove ustne vode.

**Ključne besede:** elektrolizirana oksidativna fiziološka raztopina (EOS), ustna voda, preprečevanje prenosa virusov

## Vpliv pandemije covid-19 na porabo antibiotikov in pojav okužb z bakterijami odpornimi proti antibiotikom

Konrad Kranjec<sup>1</sup>, Dominika Vrbnjak<sup>1</sup>, Urška Kramar<sup>2</sup>, Aleksander Šeruga<sup>3</sup>, Sonja Šostar Turk<sup>1</sup>, Urška Rozman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede, Žitna ul. 15, 2000 Maribor

<sup>2</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

<sup>3</sup>Splošna bolnišnica dr. Jožeta Potrča Ptuj, Potrčeva cesta 23, 2250 Ptuj

[konrad.kranjec@student.um.si](mailto:konrad.kranjec@student.um.si), [urska.rozman@um.si](mailto:urska.rozman@um.si)

Pandemija covid-19 je vplivala na celotni zdravstveni sistem s potrebo po spremembi organizacije dela. Poslabšala je razmere v bolnišnicah z vidika pojava bolnišničnih okužb, kolonizacij in njihovega prenosa. Pandemija je zahtevala dodatne prostore za kapljično izolacijo, dodatne prostore za kolonizirane bolnike z odpornimi mikroorganizmi, za bolnike z drugo patologijo, povečano potrebo po zdravstvenem osebju in dodatnih znanjih. Pri sočasni okužbi z virusom SARS-CoV2 se je zaradi sekundarne bakterijske okužbe uvajala antibiotična terapija. Vse to je pospešilo razširjanje bolnišničnih okužb kot globalni izziv za ves svet.

Z raziskavo, ki je temeljila na kvantitativni metodologiji smo proučevali vpliv pandemije covid-19 na porabo antibiotikov in pojav bolnišničnih okužb. Za vzorec smo uporabili zdravstveni zavod na sekundarni ravni v severovzhodni Sloveniji. Podatke smo spremljali v časovnem obdobju pred pandemijo covid-19 (2018, 2019) in med pandemijo covid-19 (2020, 2021), ter jih statistično obdelali z uporabo Mann-Whitney U Testa in Spearmanovega korelacijskega testa.

V času pandemije covid-19 se je povečala poraba antibiotikov in pojav bolnišničnih okužb, vendar razlika ni statistično pomembna. Poraba antibiotikov v letu 2018 je znašala 49,400 DDD/100 BOD, leta 2019 je 47,965 DDD/100 BOD, leta 2020 je 51,020 DDD/100 BOD in leta 2021 je poraba antibiotikov na letni ravni v katerem so vključeni vsi oddelki bolnišnice znašali 54,705 DDD/100 BOD. Statistično nepomembno razliko pripisujemo precejšnjemu upadu porabe nekaterih osnovnih antibiotikov ter hkrati povečani porabi rezervnih antibiotikov med pandemijo, kar je izničilo razlike v porabi med leti. Podobno velja za pojav bolnišničnih okužb in kolonizacije z večkratno odpornimi bakterijami, kjer so zajeti vsi prvi izolati (iz kliničnih vzorcev in nadzornih kužnin) pri posameznem bolniku. Povečala se je pojavnost ESBL za 13,85 %, VRE za 108 %, CRE in CPE za 50 %, CRAB za 106 % in premo sorazmerno zmanjšala pojavnost bolnišničnih okužb z MRSA za 41,67 %, CRPs in CP za 37,93 %.

Pomankanje rezervnih skupin antibiotikov in vse večji porast bolnišničnih okužb postaja vedno večji izziv. Stroka v klinični praksi bo morala posvečati večjo pozornost nad izdajo in premišljeno uporabo antibiotikov ter z večjim vplivom delovati na preventivni dejavnosti bolnišničnih okužb.

**Ključne besede:** Covid-19, antibiotiki, bolnišnične okužbe

## Zdravljenje okužb umetnih sklepov s fagno terapijo: ocenjevanje učinkovitosti in varnosti na mišjem modelu

Vida Štivec<sup>1</sup>, Monika Marušič<sup>1</sup>, Nikolaja Janež<sup>1</sup>, Helena Motaln<sup>1</sup>, Maša Čater<sup>2</sup>, Rihard Trebše<sup>3</sup>, Andrej Coer<sup>3</sup>, Simon Horvat<sup>2</sup>, Matjaž Peterka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>COBIK, Ajdovščina

<sup>2</sup>Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Domžale

<sup>3</sup>Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Ankaran

vida.stivec@cobik.si

Naraščajoča odpornost bakterij proti antibiotikom je resna grožnja javnemu zdravju, saj poslabšuje nadzor nad bakterijami, še posebej, če te rastejo v obliki biofilma. Okužbe s tovrstnimi bakterijami pogosto povzročajo kronične okužbe, npr. okužbe umetnih sklepov (OUS), ki imajo za pacienta lahko dolgotrajne posledice. V okviru razvoja novih protibakterijskih strategij se razvija tudi fagna terapija bodisi kot samostojna metoda zdravljenja bodisi v kombinaciji z antibiotiki. Kljub velikim obetom uporaba fagne terapije v kliniki še vedno ni odobrena v zahodnih državah zaradi pomanjkanja podatkov o učinkovitosti.

*Staphylococcus epidermidis* je po Gramu pozitivna bakterija, sposobna tvorbe biofilma na medicinskih vsadkih. Da bi preverili varnost in učinkovitost fagne terapije proti tej bakteriji, smo na mišji liniji C57BL/6\_OlaHsd razvili model s *S. epidermidis* povzročene kronične OUS. Bakterijski sev za razvoj modela smo izbrali iz zbirke kliničnih sevov na podlagi rezultatov presejanja glede na sposobnost tvorbe biofilma in odpornost proti antibiotikom. Nato smo izbrali še primeren vsadek ter eksperimentalno ugotovili najučinkovitejši način inokulacije testnega seva. Iz zbirke fagov, primernih za terapevtsko zdravljenje (COBIK, Ajdovščina), smo izbrali fag COP-80B ter preučili njegovo protibakterijsko in protibiofilmsko aktivnost na izbranem modelnem sevu *in vitro*. Z genetskimi analizami smo potrdili odsotnost problematičnih genov in s tem potrdili ustreznost za njegovo uporabo *in vivo*. Učinkovitost faga COP-80B smo preizkušali na razvitem mišjem modelu in jo primerjali z učinkovitostjo tretmaja z antibiotikom vankomicinom, ter kombinacijo antibiotika in faga. Kot najučinkovitejša se je izkazala kombinacija vankomicina in faga. Neželenih učinkov nismo opazili pri nobeni od navedenih terapij. Rezultati kažejo, da je razviti model kronične okužbe s *S. epidermidis* primeren za testiranje varnosti in učinkovitosti fagne terapije. Pridobljeni rezultati in model bodo koristili pri načrtovanju nadaljnjih študij ter pri oblikovanju smernic za zdravljenje OUS s fagi.

**Ključne besede:** fagna terapija, *Staphylococcus epidermidis*, okužbe umetnih sklepov

## Protimikrobno delovanje različnih vrst slovenskega medu

Mateja Šuštar<sup>1</sup>, Ajda Kuncič<sup>1</sup>, Nataša Lilek<sup>2</sup>, Andreja Kandolf Borovšak<sup>2</sup>, Sonja Smole Možina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Čebelarstva zveza Slovenije, Brdo pri Lukovici 8, 1225 Lukovica

[mateja.sustar@bf.uni-lj.si](mailto:mateja.sustar@bf.uni-lj.si)

Med je naravno živilo, ki ga medonosne čebele pridelujejo iz nektarja ali iz rastlinske mane. Slovenski med mora po sestavi in lastnostih izpolnjevati merila, ki jih določa Pravilnik o medu in sicer mu ni dovoljeno dodati nobene snovi, niti mu ni dovoljeno odvzeti sestavin, značilnih za to živilo. Med se zaradi svojih funkcionalnih lastnosti že od nekdaj uporablja v prehrani, uporaben pa je tudi v preventivne in terapevtske namene. Pri tem je ključnega pomena tudi protimikrobno delovanje medu, kjer izkazuje dobro aktivnost proti širokemu spektru mikroorganizmov. V okviru aplikativne raziskave karakterizacije čebeljih pridelkov v obdobju 2020 do 2022 smo vključili 118 vzorcev iz 12 statističnih regij Slovenije z različnim botaničnim poreklom. Z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici in določitvijo vrednosti CFU/ml na trdnem gojišču smo določili minimalno inhibitorno (MIK) in baktericidno (MBK) koncentracijo medov proti šestim bakterijskim vrstam (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*). Temnejši medovi so pokazali statistično značilno boljšo protimikrobno aktivnost v primerjavi s svetlejšimi. Najboljšo protimikrobno aktivnost je pokazal hojev med, sledijo mu drugi temni (kostanjev, gozdni, ajdov) med in med oljne ogrščice, medtem ko so drugi svetli (več cvetlični, lipov, akacijev) medovi pokazali manjšo aktivnost. Najboljše protimikrobno delovanje smo potrdili proti bakteriji *Campylobacter jejuni*, najslabše pa proti *Bacillus cereus*. Slovenija je z dolgo tradicijo in dobrimi pogoji za čebelarstvo, visoko biotsko raznovrstnostjo in edinstveno naravo idealna za pridelavo medu z visoko bioaktivnostjo in širokim spektrom uporabe.

**Ključne besede:** protimikrobno delovanje, med, funkcionalne lastnosti

Zahvala: Doseženi rezultati so nastali v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020-2022, ki je bil financiran iz sredstev državnega proračuna in proračuna Evropske unije.



# Mikrobi in okolje



Ustvarjeno z UI

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2024

## Proti protimikrobnim učinkovinam odporne in patogene bakterije *Escherichia coli* v kraških izviroh Malenščica pri Planini in Rižana

Jerneja Čremožnik Zupančič<sup>1</sup>, Katja Hrovat<sup>1</sup>, Manca Gavež<sup>1</sup>, Eva Grm<sup>1</sup>, Miha Derenčin<sup>1</sup>, Ajda Jaklič<sup>1</sup>, Hana Avguštin<sup>2</sup>, Veronika Bezenšek<sup>2</sup>, Klemen Kramar<sup>1</sup>, Irena Zdovc<sup>2</sup>, Janez Mulec<sup>3</sup>, Andreea Oarga-Mulec<sup>4</sup>, Jerneja Ambrožič Avguštin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

<sup>3</sup>ZRC SAZU Inštitut za raziskovanje krasa, Titov trg 2, Postojna

<sup>4</sup>Univerza v Novi Gorici, Vipavska 13, 5000 Nova Gorica

jerneja.zupancic@bf.uni-lj.si

Kraški vodonosniki predstavljajo pomemben vir pitne vode in ker so hkrati tudi habitat za številne ogrožene vrste organizmov, je njihovo varovanje izrednega pomena, k čemer lahko veliko doprinese tudi redno spremljanje pojavnosti patogenih in/ali proti protimikrobnim učinkovinam (PMU) odpornih bakterij. V sklopu študentskega projekta za trajnostni razvoj smo analizirali raznovrstnost bakterij *Escherichia coli*, njihovo potencialno patogenost in odpornost proti PMU, v dveh pomembnih kraških vodnih izviroh, Rižani in Malnih, v sušnem obdobju in po intenzivnih padavinah, junija in avgusta 2023. Med vsemi izolati smo z metodo ERIC-PCR identificirali neklonalne izolate, ki smo jih uvrstili v filogenetske skupine in analizirali za prisotnost genov za 20 dejavnikov virulence (VAG), *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> in allele *qnr*. Pri vseh izolatih smo ugotavljali tudi fenotipsko odpornost proti 9 PMU. Ugotovili smo, da se sevi, izolirani junija in avgusta uvrščajo predvsem v filogenetski skupini A oziroma B1, vendar je bil delež le-teh različen, prisotnost sevov iz skupine A pa se je na obeh lokacijah znižala po intenzivnih padavinah. Delež sevov iz skupin B2 in D je bil razmeroma nizek, v Rižani stalen, v Malnih pa se je povečal po intenzivnih padavinah. V Malnih je presenetil tudi visok delež sevov iz skupin F (20% v sušnem obdobju) in skupine E (24% po padavinah). Slednja je bila pri človeških izolatih redko opisana v visokem deležu. Vsi sevi so bili zelo občutljivi za PMU, največkrat smo potrdili odpornost proti tetraciklinu in proti ampicilinu. Potrdili smo prisotnost genov *bla*, alelov *qnr* nismo zaznali. Sevi so imeli povprečno število genov za VAG med 1 in 5, izstopali so nekateri z do 11 geni, izolirani v izviru Malni, po padavinah. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da analizirana izvira v obdobju odvzema vzorcev nista bila obremenjena z odpornimi sevi *E. coli*, je bilo pa potrjenih nekaj potencialno patogenih, zlasti po obilnih padavinah.

**Ključne besede:** *Escherichia coli*; kraški vodonosniki; geni za dejavnike rezistence in virulence;

## Sporogene bakterije in njihova protimikrobna aktivnost v čebeljem pelodu

Michelle Berra<sup>1</sup>, Anja Štanga<sup>1</sup>, Gordana Glavan<sup>2</sup>, Janko Božič<sup>2</sup>, Damijana Kastelec<sup>3</sup>, Ines Mandić Mulec<sup>1</sup>, Polonca Štefanič<sup>1</sup>, Anna Dragoš<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>3</sup>Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

mb3339@student.uni-lj.si, anja.stanga@bf.uni-lj.si

Nekatere izmed sporogenih bakterij, kot je *Bacillus subtilis*, ugodno vplivajo na zdravje čebel, medtem ko je okužba s *Paenibacillus larvae* usodna za celotno čebeljo družino. Zaradi razširjenosti antagonističnih interakcij med mikrobi imajo izolati peloda lahko protimikrobne učinke proti probiotičnim ali patogenim vrstam.

Vzorci peloda (30) smo pridobili iz petih različnih lokacij po Sloveniji, ki smo jih vzorčili v treh letnih časih. Število sporogenih bakterij v vzorcih se je gibalo med 55 in 1900 CFU /g peloda. 991 izoliranih kolonij smo testirali za protimikrobno aktivnost (PMA) proti *B. subtilis*  $\Delta 6$  in patogeni bakteriji *P. larvae* ATCC 9545. PMA proti obema bakterijama smo odkrili v večini vzorcev (27), in je znašalo 82 % vseh izoliranih bakterij. PMA na izključno *B. subtilis* je kazalo 7 % sevov, medtem ko je PMA proti izključno *P. larvae* kazalo 43 % izolatov. V enajstih vzorcih je vsaj 50 % sevov kazalo PMA izključno proti patogeni *P. larvae*, medtem ko je bila največja izmerjena aktivnost proti izključno *B. subtilis* v vzorcih 28%.

Izmed 815 sevov, ki so pokazali PMA, smo petdesetim sevom z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnožili gen za 16S rRNA in *gyrA* gen. Sevi so pripadli osmim vrstam iz rodu *Bacillus*, en sev pa smo identificirali kot *Paenibacillus woosnogensis*. Posamezno bakterijsko vrsto smo povezali z morfologijo sevov na ChromoSelect gojišču in na podlagi morfologije poizkušali razvrstiti preostale shranjene seve (678). Ugotovili smo, da jih med 26 pregledanimi vzorci 14 vsebuje veliko raznolikih morfologij (6-10 morfologij), 2 vzorca pa sta vsebovala največ 3 morfološke tipe.

V nadaljevanju želimo protimikrobno aktivnost in vrste bakterij v pelodu povezati z njegovo sestavo, geografsko lego in letnim časom nastanka. Predvsem se želimo osredotočiti na prisotnost bakterij *B. subtilis* in na izolacijo fagov ter njihovo aktivnost proti *B. subtilis* in *P. larvae* inducirano z mitomicinom C.

**Ključne besede:** čebelji pelod, protimikrobna aktivnost, *Paenibacillus larvae*, *Bacillus subtilis*, bakteriofagi

## Pajčje mreže: naravna alternativa pasivnim lovilec trossov gliv na primeru jesenove pecljevke (*Hymenoscyphus fraxineus*), povzročiteljice jesenovega ožiga

Maja Ferle<sup>1</sup>, Polona Kogovšek<sup>1</sup>, Nikica Ogris<sup>2</sup>, Matjaž Gregorič<sup>3</sup>, Janko Šet<sup>3</sup>, Denis Kutnjak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Oddelek za varstvo gozdov, Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Biološki inštitut Jovana Hadžija ZRC SAZU, Novi trg 2, 1000 Ljubljana

maja.ferle@nib.si

Jesenova pecljevka (*Hymenoscyphus fraxineus*) je zaprtotrosnica, ki je za Slovenijo in Evropo invazivna tujerodna vrsta. Povzroča bolezen jesenov ožig, ki je za jesene pogubna, najbolj sta za okužbo dovzetni vrsti poljski (*Fraxinus angustifolia*) in veliki jesen (*Fraxinus excelsior*). Gliva je bila v Evropo vnesena iz vzhodne Azije. Okuži lahko tako mlada kot stara drevesa, povzroča venenje in nekroze listov, postopoma začnejo odmirati tudi poganjki, veje in debla. Na odpadlih jesenovih listnih pecljih gliva tvori apotecije, ki so glavni vir širjenja bolezni. Askospore, ki se sproščajo iz apotecijev, se na daljše razdalje širijo z vetrom. Zaradi širjenja bolezni je populacija jesenov v Evropi ogrožena. Tudi v Sloveniji je gliva že razširjena. Njeno prisotnost lahko ugotovljamo z vzorčenjem apotecijev ali z lovilci trossov. Aktivni lovilci trossov (na primer Burkardov lovilec trossov) so učinkoviti, a potrebujejo vir električne energije in več napora za vzpostavitev kot pasivni lovilci trossov. Pasivni lovilci trossov (na primer objektna stekelca, premazana z vazelinom, filter papir v petrijevki) pa so občutljivi na vremenske razmere.

Pajčje mreže poleg žuželk dobro lovijo glivne trosse, cvetni prah in drug rastlinski material, kljubujejo tudi vremenu. V našem poskusu smo želeli ugotoviti, ali so pajčje mreže učinkoviti naravni pasivni lovilci askospor *H. fraxineus* in trossov drugih gliv ter njihovo učinkovitost primerjali z drugimi pasivnimi lovilci trossov. Prisotnost trossov smo ugotavljali s splošnim qPCR testom za glive (FungiQuant) in s specifičnim qPCR testom za *H. fraxineus*. V vzorcih pajčjih mrež, pobranih v mešanem sestoju velikega jesena in črne jelše (*Alnus glutinosa*) in v več časovnih točkah, smo potrdili prisotnost *H. fraxineus*, kar nakazuje, da pajčje mreže lahko služijo kot pasivni lovilci glivnih trossov. V nadaljevanju bomo primerjali učinkovitost lepljivih (kolesastih) in nelepljivih (baldahinastih) pajčjih mrež, ki jih najpogosteje najdemo v tem okolju.

**Ključne besede:** *Hymenoscyphus fraxineus*, pajčje mreže, jesenov ožig, vzorčevalniki trossov, lovilci trossov

## Dokaz norovirusov v pitni vodi ob hidričnem izbruhu

Adela Fratnik Steyer, Andrej Steyer, Mojca Cimerman, Nika Volmajer, Mojca Šoštarič, Matjaž Retelj, Tjaša Frangež, Tatjana Rupel, Katja Zelenik

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

adela.fratnik.steyer@nlzoh.si

V Sloveniji nadziramo mikrobiološko zdravstveno ustreznost pitnih vod po Uredbi o pitni vodi z dokazovanjem indikatorskih bakterij, ki nakažejo fekalno onesnaženje. V primeru onesnaženja vode je ključno določanje vira, ki ga lahko odkrijemo z genetsko diagnostiko fekalnega onesnaženja (GFPD) in tako dokažemo, katere živalske vrste so onesnaženje prispevale. Enteričnih virusov v pitni vodi rutinsko ne določamo, lahko pa epidemiološko indicirane patogene viruse dokazujemo z molekularnimi tehnikami.

V lanskem letu smo ob sumu na hidrični izbruh, povezan z lokalnim vodovodnim sistemom, prejeli dva vzorca pitne vode odvzeta na različnih točkah vodovoda. Poleg analiz na fekalne indikatorske bakterije smo, zaradi epidemioloških indikacij, vzorca testirali tudi na noroviruse genskih skupin I in II (GGI in GGII) z RT-PCR v realnem času. Po sanaciji in izvedbi preventivnih ukrepov na vodovodnem sistemu, smo v analizo prejeli dodatnih 16 kontrolnih vzorcev, tako neobdelane, kot pripravljene pitne vode. Za ugotavljanje vira fekalnega onesnaženja pitne vode smo na obeh vzorcih pred izvedbo ukrepov in nekaterih kontrolnih vzorcih izvedli GFPD z digitalnim PCR.

V enem od dveh vzorcev pitne vode smo dokazali norovirus GGII, kar je prvi dokaz norovirusov ob hidričnem izbruhu neposredno v vzorcu vode pri nas. V obeh vzorcih so bile fekalne indikatorske bakterije prisotne v nizkih koncentracijah, prav tako smo v njih dokazali prisotnost genetskih označevalcev fekalnega onesnaženja človeškega vira. Ti so bili dokazani tudi v nekaterih kontrolnih vzorcih neobdelane vode.

Izkazalo se je, da je v pitni vodi ob epidemiološki indikaciji pomembno preveriti tudi enterične viruse. Ob čemer je pri sumu na hidrični izbruh priporočljivo čimprej odvzeti zadostno količino in število vzorcev ter izvesti najširši nabor preiskav. Kot dober pokazatelj vira onesnaženja pitne vode, ki ima nizke koncentracije fekalnih indikatorskih bakterij, se dokazuje tudi novo uvedena metoda GFPD.

**Ključne besede:** norovirus, hidrični izbruh, pitna voda, RT-PCR v realnem času, GFPD

## Širitev zbirke vampnih *Prevotella*: opis *Prevotella communis*, nove vrste ovčjega izvora

Eva Grabner<sup>1</sup>, Eva Stare<sup>1</sup>, Lijana Fanedl<sup>1</sup>, Maša Zorec<sup>1</sup>, Dakota S. Jones<sup>2</sup>, Christopher D. Johnston<sup>2</sup>, Gorazd Avguštin<sup>1</sup>, Tomaž Accetto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale

<sup>2</sup>Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, 1100 Fairview Ave N., Seattle, WA 98109-4433, USA

eva.grabner@bf.uni-lj.si

Karakterizirali smo 11 bakterijskih sevov, izoliranih iz ovčjega vampa v obdobju osmih tednov v letu 2020. Preučevani sevi so striktno anaerobni in se uvrščajo v rod *Prevotella* (deblo *Bacteroidota*). V rodu predstavljajo šest novih vrst, kar smo ugotovili preko primerjave njihovih celotnih genomov z vsemi znanimi genomi vampnih in črevesnih sevov *Prevotella*. Najbolj zastopano vrsto smo formalno opisali in poimenovali *Prevotella communis*, s tipskim sevom E1-9. V to vrsto se uvršča šest novih preučevanih sevov in dva seva, izolirana iz ovčjega vampa na Japonskem. Preučevani sevi znotraj vrste oblikujejo različne razvojne linije, z izjemo dveh sevov, ki sta identična.

Sevi nove vrste so saharolitični, kot je značilno za vrste rodu *Prevotella* v prebavilih. Rastejo na manjšem naboru polisaharidov v primerjavi z drugimi sorodnimi vampnimi vrstami, kot sta *Prevotella bryantii* in *Prevotella ruminicola*, nabor polisaharidov se razlikuje tudi od preostalih novih preučevanih sevov. Sevi *P. communis* za rast uporabljajo predvsem rastlinske ksilane in pektine in ne razgrajujejo škroba, kar je za prebavne *Prevotella* nepričakovana lastnost. Eden izmed sevov je izgubil zmožnost razgradnje inulina, kar smo lahko potrdili tudi na genomski ravni.

Sevi *P. communis* imajo za rod *Prevotella* značilne lastnosti: fermentativno proizvajajo sukcinat in očetno kislino in ob prisotnosti žolčnih kislin v gojišču ne rastejo. Poleg saharolitičnosti imajo sevi več diferencialnih označevalcev, ki *P. communis* ločijo od ostalih vrst rodu: opisali smo jih z uporabo testov API in analizo membranskih dolgoveržnih maščobnih kislin.

*P. communis* je razširjena: pogosto se pojavi v metagenomskih podatkih iz vzorcev vampov goveda in ovc iz Škotske in Nove Zelandije. Tako gre za univerzalno bakterijo domačih prežvekovalcev, ki se specializira za razgradnjo nekoliko omejenega nabora komponent rastlinskih celičnih sten.

**Ključne besede:** *Prevotella*, primerjalna genomika, lokusi za privzem polisaharidov

## Spbetavirusi vplivajo na vedenje bakterije *Bacillus subtilis* v različnih okoljskih pogojih

Virginie Grosboillot, Anna Dragoš

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 101, Ljubljana

[virginie.grosboillot@bf.uni-lj.si](mailto:virginie.grosboillot@bf.uni-lj.si)

Spbetavirusi imajo velike genome, približno 130 000 bp, in se integrirajo v funkcionalne gene bakterije *Bacillus subtilis*, kot je *spsM*. Ti virusi so sposobni ti. reverzibilne aktivne lizogenije, kar pomeni, da aktivno preklaplajo med znotraj- in zunaj-kromosomsko obliko, ne da bi lizirali gostitelja, in tako vplivajo na vedenje gostitelja z regulacijo bakterijskih tarčnih genov. Vendar pa je o sprožilcih in načinu regulacije bakterijskega obnašanja s fagi, znanega le malo, prav tako je večina funkcij genov Sp $\beta$  še vedno neznana.

Da bi dobili vpogled v interakcije med profagi in gostitelji, smo najprej razvili bioinformacijski program za izdelavo grafične sintenije v skupini sorodnih profagov, ki omogoča identifikacijo ohranjenih genov ali genskih skupin. Nato smo analizirali javno dostopne transkriptomске podatke, da bi ocenili, kateri okoljski pogoji vplivajo na profil izražanja genov profagov znotraj gostiteljskega kromosoma in kateri geni oziroma pogoji bi bili lahko ključni za nadzor gostitelja in izrezovanje profagov. Opazili smo, da bolj ohranjeni geni globalno predstavljajo manjše nihanje stopnje izražanja v različnih pogojih, čeprav večina profagnih genov kaže povečano izražanje v določenih stresnih pogojih. Poleg tega smo opazili, da je izražanje nekaterih genov pod določenimi pogoji močno povečano ali znižano, kar nakazuje na morebiten vpliv teh fagnih genov na vedenje gostitelja v določenih okoljskih pogojih.

Ti podatki kažejo, kateri okoljski pogoji znatno vplivajo na profil izražanja profagnih genov in ali je lahko, glede na ohranjenost teh genov, podobno razmerje mogoče pričakovati tudi pri drugih sorodnih profagih. Raziskava poudarja povezavo med profagnimi geni, njihovo funkcijo in vplivom na gostitelja in nas lahko sčasoma pripelje do razvozlavanja funkcij številnih neznanih fagnih genov.

**Ključne besede:** Spbetavirusi, *Bacillus subtilis*, interakcije med gostiteljem in virusom

## Izboljšana identifikacija bakterij rodu *Xanthomonas* izoliranih iz fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) z določanjem informativnih nukleotidov v črtnih kodah DNA

Vladimir Grujić, Manca Pirč, Tanja Dreo, Neža Turnšek, Špela Prijatelj Novak, Janja Matičič, Aleksander Benčič

Nacionalni Inštitut za Biologijo, Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

vladimir.grujic@nib.si

*Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (XANTPH) in *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (XANFF) so karantenske bakterije, ki povzročajo navadno bakterijsko pegavost fižola. Njihova identifikacija temelji na izolaciji bakterij iz semena fižola, kateri sledi kultivacija bakterij na semi-selektivnem gojišču in končna identifikacija čistih kultur na osnovi morfologije kolonij in uporabe identifikacijskih metod kot so MALDI-TOF, PCR v realnem času ali metoda DNA črtnih kod. Veliko laboratorijev uporablja metodo DNA črtnih kod genov *gyrB* in *avrBs2*, ki je priporočena s strani Evropske organizacije za varstvo rastlin (EPPO). Bakterije XANPH in XANFF identificiramo s primerjavo dobljenih sekvenc s sekvencami v bazi EPPO-Q-Bank (EPPO Bulletin, 2021). Najbolj relevantni podatki za identifikacijo bakterij so % prekrivanja in % podobnosti med sekvencami. Poglobljen način primerjave sekvenc izolatov in referenčnih sekvenc iz EPPO-Q-Bank baze, predstavlja primerjava informativnih nukleotidov. Za namen te raziskave smo identificirali informativne nukleotide v referenčnih črtnih kodah *gyrB* in *avrBs2* bakterij rodu *Xanthomonas* iz EPPO-Q-Bank baze. Identifikacija bakterij XANTPH in XANTF temelji na enem nukleotidu v *gyrB* in petih nukleotidih v *avrBs2* črtni kodi. Informativnost pozicij je bila preverjena na 45 tarčnih in netarčnih izolatih rodu *Xanthomonas*, izoliranih iz 16 vzorcev semena fižola. Od 45 *Xanthomonas* izolatov jih je na osnovi metode informativnih nukleotidov, bilo 35 identificiranih kot XANTPH, 4 kot XANTPH/XANFF, za 6 izolatov identifikacija ni bila možna. Pristop identifikacije XANTPH-XANFF bakterij, izboljšuje zanesljivost tipizacije bakterij, omogoča boljše definiramo avtomatizacijo identifikacije in s tem visoko zmogljivostni pristop. Za naprej so načrtovane dodatne analize za identifikacijo drugih informativnih nukleotidov ali črtnih kod, ki bi bile primerne za zanesljivo ločevanje XANTPH in bolj virulentnih XANFF izolatov.

**Ključne besede:** DNA črtne kode, informativni nukleotidi, *Xanthomonas*, fižol



## Razširjen vpogled v prisotnost rastlinskih virusov v ekosistemu s pomočjo analize viroma različnih tipov vzorcev

Ion Gutiérrez-Aguirre<sup>1</sup>, Mark Paul Selda Rivarez<sup>1,2</sup>, Olivera Maksimović<sup>1,2</sup>, Katarina Bačnik<sup>1,2</sup>, Zala Kogej<sup>1,2</sup>, Anja Pecman<sup>1,2</sup>, Živa Lengar<sup>1</sup>, Nataša Mehle<sup>1,3</sup>, Ana Vučurovič<sup>1</sup>, Maja Ravnikar<sup>1</sup>, Denis Kutnjak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 101, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova 39, Ljubljana

<sup>3</sup>Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Dvorec Lanthieri, Glavni trg 8, 5271 Vipava

ion.gutierrez@nib.si

Pristopi visokozmogljivega sekvenciranja omogočajo analize viromov širokega spektra tipov vzorcev, od gostiteljskih tkiv, do okoljskih vzorcev. Da bi dobili razširjen vpogled v virome izbranih kmetijskih ekosistemov, povezanih s pridelavo paradižnika, smo analizirali virome paradižnika, divjih in samoniklih rastlin, ki rastejo v bližini paradižnika, ter virov namakalne vode, ki se uporabljajo za namakanje pridelkov na analiziranih območjih. V dveh letih smo zbrali več kot 400 vzorcev rastlin in 24 vzorcev vode. Iz vzorcev smo izolirali celokupno RNA in vsako vrsto vzorca ustrezno pripravili za netačno sekvenciranje na platformi Illumina. Po poglobljeni bioinformatični analizi pridobljenih podatkov smo v različnih vrstah vzorcev zaznali številne poznane viruse in še večje število novih virusov. Večino doslej neznanih virusov smo odkrili v divjih rastlinah, nekaj pa smo jih odkrili tudi v vzorcih paradižnika in vode. Nekatere stabilne rastlinske viruse (npr. tobamoviruse) smo zaznali v različnih tipih vzorcev. Dopolnitev informacij pridobljenih z analizo rastlin, z analizo vodnih vzorcev, je omogočila izrazito povečanje znanja o razširjenosti in raznolikosti nekaterih novo odkritih virusov v analiziranih ekosistemih. Razsikava viromov v več različnih vrstah vzorcev prinaša redek vpogled v epidemiološke povezave med rastlinami in okoljskimi vodami ter pomaga bolje razumeti morebitne prihodnje pojave virusnih bolezni na paradižniku in drugih kulturnih rastlinah.

**Ključne besede:** analiza viroma, visokozmogljivo sekvenciranje, HTS, rastlinski virusi

## Vpliv mucinov na interakcije med bakteriofagi in gostiteljsko bakterijo

Jaka Jakin Lazar<sup>1</sup>, Katarina Šimunović<sup>1</sup>, Izток Dogša<sup>1</sup>, Ines Mandić Mulec<sup>1</sup>, Mathias Middelboe<sup>2</sup>, Anna Dragoš<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za Mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Copenhagen, Nørregade 10, 1172 København, Denmark

jaka.jakinlazar@bf.uni-lj.si

Mucini so glikoproteini in 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 in zato je v tem okolju veliko interakcij med različnimi mikrobi. Predhodnje raziskave so pokazale, da se na mucine pritrjujejo tako bakteriofagi, kot bakterije in s tem vplivajo na mikrobnost mukusa. Trenutno ni veliko znanega o mikrobnih interakcijah v mukoznih okoljih. Ta raziskava se je osredotočila na vpliv mucinov na interakcije med bakteriofagi in gostiteljsko bakterijo, in sicer na primerih koristne bakterije *Bacillus subtilis* in patogene bakterije *Vibrio anguillarum*. Rezultati so pokazali, da se litični *Bacillus* fagi v primerjavi s kontrolnimi površinami, bistveno bolj pritrjujejo na površine, prekrite z mucini. Poleg tega, se je na površine, prekrite z mucini, v primerjavi z agarjem, povečala pritrnitev celic *B. subtilis* in *V. anguillarum*. 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 pritrnitev 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. Poleg tega so biofilmi *B. subtilis*, nastali na površinah, prevlečenih z mucini, imeli bolj kompleksno 3D-strukturo v primerjavi s površinami, prevlečenimi samo s fagi, tudi ob prisotnosti mucinov. Delo podpira prejšnje ugotovitve modela pritrjevanja bakteriofagov na mukus (BAM: Bacteriophage Adherence to Mucus) 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.

**Ključne besede:** bakteriofagi, interakcije bakteriofagi-gostitelj, mucini, *Bacillus subtilis*, *Vibrio anguillarum*

## Prenos mikrobnih združb z mikroplastiko: vzorci s slovenske obale

Živa Kolenc<sup>1</sup>, Manca Kovač Viršek<sup>2</sup>, Nicol Janecko<sup>3</sup>, Anja Klančnik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

<sup>2</sup>Inštitut za vode Republike Slovenije, Einspielerjeva 6, Ljubljana

<sup>3</sup>Quadram institute, Rosalind Franklin Road, Norwich Research Park, United Kingdom

[ziva.kolenc@bf.uni-lj.si](mailto:ziva.kolenc@bf.uni-lj.si)

Obalne morske vode se nahajajo na preseku človeškega in naravnega sveta, zato so močno podvržene vplivom antropogenih aktivnosti. Vnos sintetičnih delcev, med katere spada mikroplastika, predstavlja obremenitev za takšna okolja tako s fizikalnega, kot tudi s kemijskega in mikrobiološkega vidika. Na območju školjčičišča na Debelem rtiču, Slovenija, smo pridobili vzorce obalnih morskih voda (n=3) in užitnih klapavic *Mytilus galloprovincialis* (n=226), namenjenih prehrani. Iz vzorcev 3 m<sup>3</sup> vode smo s filtracijo na terenu osamili trdne delce, klapavice pa razdelili na dve skupini. Prvo skupino klapavic (n=100) smo ločili od lupine, kemijsko razgradili in filtrirali, medtem ko smo drugi skupini klapavic (n=126) pregledali mehka tkiva za prisotnost mikroplastike pod stereomikroskopom. Med pridobljenimi trdnimi delci iz morske vode in klapavic smo z vizualno analizo poiskali delce mikroplastike in jih razporedili glede na morfološki razred, velikost, barvo in prosojnost. Iz fragmentov mikroplastike, izoliranih iz morske vode in druge skupine školjk, smo izolirali celotno DNA, pripravili knjižnico DNA in sekvencirali regijo 16S V3-V4. Po končani izolaciji DNA smo fragmentom z ATR-FTIR spektrometrijo določili kemijsko sestavo. V vzorcih morske vode, razgrajenih in svežih klapavicah smo skupno identificirali n=71 delcev mikroplastike, med katerimi so bili filament (n=39), fragmenti (n=31) in film (n=1). Po kemijski strukturi smo med fragmenti največkrat določili PVC, ostali identificirani materiali so bili ABS, PP, PE, PET, PVA, najlon in PEMA. Izolacija DNA je bila uspešna pri šestih fragmentih, pri katerih smo z bioinformacijskimi analizami določili relativno obilnost posameznih mikroorganizmov v vzorcih. V vseh vzorcih smo zaznali mikroorganizme rodov *Pseudomonas* in *Serratia*, v enem izmed njih je bil z najvišjo relativno obilnostjo prisoten morski rod *Pseudoalteromonas*, in v enem smo z >30% gostoto celotne populacije zaznali potencialno patogeni rod *Campylobacter*. Pokazali smo, da so mikrobne združbe na proučevanih delcih raznolike znotraj vsakega vzorca in med vzorci, ter da mikroplastika ni zgolj onesnažilo, temveč tudi vektor za prenos mikroorganizmov.

**Ključne besede:** metataksonomika, mikroplastika, plastisfera

Zahvala: Delo sta omogočila projekt ARIS J4-4548 in program P4-0116.

## Interakcije med sevi bakterije *Bacillus subtilis* in vloga genskega lokusa *wapAI*

Barbara Kraigher, Maja Bolješič, Nurten Tetik, Ivona Viduka, Gennaro Velotto, Gaja Panjtar, Nina Puhan, Polonca Štefanič, Ines Mandič-Mulec

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

barbara.kraigher@bf.uni-lj.si

Mikrobne interakcije odločilno vplivajo na preživetje in diverziteto mikrobov v okolju, pristopi za njihovo proučevanje pa so lahko zelo različni. Bakterijsko rojenje je kolektivno premikanje po površini in predstavlja odličen model za raziskave sodelovalnih in tekmovalnih odnosov med bakterijami. Pokazali smo, da pride med manj sorodnimi talnimi izolati bakterije *Bacillus subtilis* do antagonističnih interakcij na meji med rojema in do kompeticijskega izključevanja pri zasedanju površin z rojenjem, medtem ko je izključevanje med sevi v plavajočem biofilmu manj izrazito. Kompeticija med sevi lahko poteka s pomočjo protimikrobnih spojin, ki jih bakterije izločajo v okolje, ali pa s pobijanjem sosednjih celic, za kar je potreben neposreden kontakt med celicami (npr. encim tRNAza WapA). Rezultati kažejo, da genski lokus *wapAI* vpliva na prepoznavanje med roji sevov, na medsebojno izključevanje iz skupnega roja in tudi na distribucijo sevov v plavajočih biofilmih. Inaktivacija tega lokusa povzroči pojav mejne linije s svojim starševskim rojem oz. s sorodnim sevom in vpliva na izključevanje med sevoma pri zasedanju skupne površine in pri tvorbi plavajočega biofilma. Lokus *wapAI* pa ni edina determinanta sorodstvene diskriminacije med manj sorodnimi sevi, saj se mejne linije med sevi ohranijo kljub inaktiviranemu lokusu v enem ali obeh sevih. Nukleotidna zaporedja genov *wapA* so pri bolj sorodnih sevih identična, medtem ko se pri manj sorodnih sevih razlikujejo. S testiranjem antagonizma na mehkem agarju smo pokazali, da se različno intenzivne cone lize pojavijo okoli manj sorodnih testnih sevov, medtem ko cona lize ob inaktivaciji lokusa *wapAI* ni bila opazna, kar nakazuje na manj intenzivne antagonistične interakcije. Naše raziskave kažejo, da je potrebno interakcije med sevi proučevati v različnih modelnih sistemih, saj so posledice teh interakcij lahko odvisne od eksperimentalnih pogojev. Prostorska strukturiranost bakterij in nehomogeno okolje imajo v naravi ključno vlogo pri kompeticiji, izbira modelnega sistema pa lahko pomembno vpliva na razumevanje ekologije in evolucije bakterij.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, kompeticija, *wapAI*

## Preučevanje glivne razgradnje sintetičnih restavratorskih materialov z metodo FTIR-PAS

Amela Kujović<sup>1</sup>, Katja Kavkler<sup>2</sup>, Tomaž Skapin<sup>3</sup>, Polona Zalar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Restavratorski center, Zavod za varstvo kulturne dediščine Slovenije, Poljanska c. 40, Ljubljana

<sup>3</sup>Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, Ljubljana

amela.kujovic@bf.uni-lj.si

Od leta 1930, ko se je razmahnila proizvodnja sintetičnih materialov, se ti v veliki meri uporabljajo tudi pri konservatorstvu-restavriranju objektov kulturne dediščine. Novi materiali imajo prednosti, vendar se kemično in tehnično razlikujejo od osnovnih materialov, kot so les, kamen, steklo in kovina. Vpliv sintetičnih materialov na umetniške predmete so preučevali v zadnjih desetletjih, vendar njihova kompatibilnost in dolgoročni vpliv še nista povsem razumljena. Poleg morebitnih praktičnih prednosti, kot je npr. stabilnost, uporaba plastika pri restavriranju postavlja pomembno vprašanje o etičnem odnosu do kulturne dediščine, ki mora ostati materialno nedotakljiva.

Glive povzročajo vidne ali/in strukturne poškodbe na umetniških predmetih, predvsem zaradi svoje sposobnosti rasti pri nizki relativni vlažnosti (RH) in proizvodnje različnih encimov in organskih kislin. Naša raziskava se je osredotočila na glivne izolate s slik na platnu. Testirane sintetične materiale (Lascaux Acrylic Glue 303 HV in 498 HV, Acrylharz P550, Laropal A81, Beva 371, Regalrez 1094) smo nanegli na objektna stekla, jih avtoklavirali, ter inokulirali z izbranimi glivam. Inkubirali smo jih v atmosferi 50, 70 in 90% relativne vlage pri temperaturi 22 °C od 2 do 7 mesecev. Testirali smo sveže nanešene materiale in tudi umetno starane (300 ur, UV-A in UV-B svetloba, 22 °C). Rast gliv smo ugotavljali pod stereomikroskopom; glive smo ponovno izolirali in potrdili njihovo identiteto s sekvenciranjem izbranih genetskih markerjev ( $\beta$ -tubulin). Kemijske spremembe proučevanih materialov smo ocenili s FT-IR fotoakustično spektroskopijo (PAS), ki je pokazala nekatere spremembe v molekularni strukturi analiziranih materialov, predvsem vidne kot pojav pasu med 3100 in 3500  $\text{cm}^{-1}$ , značilnega za O-H vibracije, pojav pasu med 1700 in 1550  $\text{cm}^{-1}$ , ki je značilen za nihanje vode ali nenasičene verige in pojav ali spremembe nihanja karbonilnega pasu. Vse te spremembe razkrivajo hidrolitične in oksidativne procese v sintetičnih materialih, ki jih povzročajo glive.

**Ključne besede:** glive, sintetični materiali, slike na platnu

## Viromska analiza antičnih vzorcev oliv

Dijana Škorić<sup>1</sup>, Renata Šoštaric<sup>1</sup>, Olivera Maksimović Carvalho Ferreira<sup>2</sup>, Lana Vogrinc<sup>2</sup>, Jurica Bezak<sup>3</sup>, Denis Kutnjak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

<sup>3</sup>Croatian Conservation Institute, Zagreb, Croatia

denis.kutnjak@nib.si

Olive (*Olea europaea* L.) in njihovi divji sorodniki so del mediteranske diete in trgovskih izmenjav že iz antičnih časov. V jadranskem morju, v bližini otoka Palagruža (Hrvaška), so arheologi odkrili vzorce oliv v dveh amforah v ladijskih razbitinah iz rimskih časov. Z radiokarbonskim datiranjem ocenjena starost izjemno dobro ohranjenih vzorcev je 2200 let. Iz vzorcev oliv smo izolirali celokupne nukleinske kisline, ki smo jih tretirali z DNAzo. Preostalo RNA smo naključno pomnožili, nato pa pomnožke sekvencirali s pomočjo visokozmogljivega sekvenciranja. S pomočjo bioinformatičkih analiz smo v pridobljenih podatkovnih setih poiskali virusom podobna zaporedja. Pridobili smo skoraj popolno zaporedje prej neznanega virusa, ki ga lahko najverjetneje uvrstimo v rod alfakarmovirusov. Primerjava zaporedja od RNA odvisne RNA polimeraze tega virusa s poznanimi virusnimi zaporedji je pokazala, da je novo odkriti virus najbolj podoben virusu cikorije 1 (62% identiteta) in virusu obročkaste pegavosti kovačnika (61% identiteta). Filogenetske analize so potrdile uvrstitev virusa v rod *Alphacarmovirus*, družina *Tombusviridae*. S pomočjo na novo izdelanih tarčnih testov smo potrdili prisotnost virusa v izolatih RNA iz več arheoloških vzorcev oliv. Z nadaljnjimi testi želimo potrditi starodavni izvor virusne RNA, kar bo prineslo doslej neznan vpogled v zdravstveno stanje oliv v antičnem času in potrditev odkritja zaporedja enega izmed najstarejših zaznanih rastlinskih virusov.

**Ključne besede:** olive, virom, viskozno-mogljivo sekvenciranje, arheološki vzorci

## Odtoki umivalnikov kot potencialni rezervoar večkratno odpornih bakterij v bolnišničnem okolju

Aleksander Mahnič<sup>1,2</sup>, Urška Ajd<sup>3</sup>, Sandra Janežič<sup>1,2</sup>, Marjanca Starčič Erjavec<sup>4</sup>, Maja Rupnik<sup>1,2</sup>, Andrej Golle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska 1, Maribor

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, Maribor

<sup>3</sup>Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, Maribor

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

aleksander.mahnic@nlzoh.si

Bolnišnice predstavljajo pomemben rezervoar večkratno odpornih bakterij (VOB). V tej študiji smo preučili odtok umivalnikov kot možen vir VOB v bolnišničnem okolju. Testirali smo biofilme pridobljene iz skupno 25 kolen odtokov umivalnikov iz petih različnih oddelkov na UKC Maribor. Brise smo gojili na naboru selektivnih in diferencialnih gojišč, iz katerih smo uspešno osamili 361 izolatov, ki so pripadali 39 različnim bakterijskim vrstam iz 21 rodov. Skupno 97 izolatov smo s tarčnim PCR določili prisotnost genov, povezanih z determinantami odpornosti proti antibiotikom (VIM, OXA, NDM, KPC, MDS in CTX). Sorodnost izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, ki so bili izolirani v največjem številu, smo preverili s pulzno gelsko elektroforezo (PFGE). Dodatno smo celokupno taksonomsko sestavo bakterijskih združb v brisih določili s sekvenciranjem pomnožka variabilne regije V3-V4 gena za 16S rRNA.

V odtokih smo dokazali visoko pojavnost bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* (60 % odtokov) in *Pseudomonas aeruginosa* (52 % odtokov). Izolati *Pseudomonas aeruginosa* so se glede na profil PFGE razlikovali med odtoki, v določenih primerih pa smo znotraj enega odtoka zaznali tudi več različnih profilov PFGE. V vsaj 20 % odtokov smo zaznali še različne vrste iz rodov *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* in *Enterococcus*. Med testiranimi izolati smo pri 12,4% dokazali prisotnost metalo-beta-laktamaze VIM-1 (*Citrobacter freundii*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mosselii* in *Pseudomonas putida*), pri 31,0% prisotnost metalo-beta-laktamaze VIM-2 (*Pseudomonas aeruginosa*) ter pri 2,1% prisotnost beta-laktamaze CTX-M9 (*Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*). S sekvenciranjem smo pokazali, da v odtokih prevladujejo proteobakterije, ki so v povprečju predstavljale > 80% celokupne združbe, sledili so predstavniki iz debel Firmicutes, Bacteroidetes in Actinobacteria v povprečno manj kot 10% deležu. Tako po relativni zastopanosti kot genetski pestrosti so skladno z rezultati kultivacije prevladovali predstavniki rodov *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* in *Acinetobacter*, medtem ko celokupna sestava bakterijske združbe ni bila značilno povezana s prisotnostjo VOB.

**Ključne besede:** večkratno odporne bakterije, bolnišnično okolje, odtoki umivalnikov

## Voda in rastni substrat onesnaženi s tobamovirusi - vir okužbe rastlin

Nataša Mehle<sup>1,2</sup>, Irena Bajde<sup>1</sup>, Jakob Brodarič<sup>1</sup>, Adrian Fox<sup>3,4</sup>, Miha Kitek<sup>5</sup>, Denis Kutnjak<sup>1</sup>, Maja Ravnikar<sup>1</sup>, Ana Vučurovič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri, Glavni trg 8, Vipava

<sup>3</sup>Fera Science Ltd, Sand Hutton, York, YO41 1LZ United Kingdom

<sup>4</sup>School of Natural and Environmental Sciences, Newcastle University, Agriculture Building, King's Road, Newcastle upon Tyne NE1 7RU, United Kingdom

<sup>5</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

[natasa.mehle@nib.si](mailto:natasa.mehle@nib.si)

Nedavno odkrita virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) in virus lisavosti in mozaika paradižnika (tomato mottle mosaic virus; ToMMV) predstavljata veliko grožnjo svetovni pridelavi paradižnika in paprike. Oba virusa uvrščamo med tobamoviruse, ki so sposobni dolgotrajnega preživetja na različnih površinah in pod različnimi okoljskimi pogoji. Prenašajo se predvsem z okuženimi semeni, sadilnim materialom in mehansko. Naš cilj pa je bil preveriti ali je možna pot prenosa teh dveh tobamovirusov na rastline tudi preko vode ali rastnega substrata.

Rezultati naše študije kažejo, da lahko ToBRFV v vodi, shranjeni pri sobni temperaturi, preživi do štiri tedne, njegovo RNA pa je mogoče v vodi zaznati vsaj štiri mesece. Pokazali smo, da lahko s ToBRFV okužena voda, ki se uporablja za namakanje, okuži rastline paradižnika prek korenin po enem do šestih mesecih izpostavljenosti. Poleg tega smo potrdili, da je s ToBRFV ali ToMMV kontaminiran rastni substrat lahko vir inokuluma za posajene sadike paradižnika in sadike, vzgojene iz semen. Ti rezultati kažejo na novo epidemiološko pot ToBRFV in ToMMV prek vode in rastnega substrata. Rezultati zapolnjujejo obstoječe vrzeli v znanju in kažejo na potrebo po nadzoru prisotnosti novih tobamovirusov ter razkuževanju namakalne vode in rastnega substrata v pridelavi paradižnika in paprike, če pride do okužbe.

**Ključne besede:** tobamovirusi, voda, rastni substrat, vir okužbe



## Raziskovanje transpeptidazne aktivnosti papainu-podobne cisteinske proteaze CrCEP1 iz zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii*

Katarina P. van Midden<sup>1</sup>, Pitter Huesgen<sup>2</sup>, Renier A. L. van der Hoorn<sup>3</sup>, Marina Klemenčič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Večna pot 113, Ljubljana

<sup>2</sup>Department for Electronics and Analytics, Central Institute for Engineering, Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Str, Jülich, Germany

<sup>3</sup>The Plant Chemetics Laboratory, Department of Biology, University of Oxford, South Park Road, Oxford OX1 3RB, UK

katarinapetra.vanmidden@fkkt.uni-lj.si

Proteaze se uveljavljajo kot ključni regulatorji odziva na stres pri rastlinah. Kljub temu njihove funkcije v tem procesu ostajajo nepojasnjene. Zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* je dober modelni organizem za študij funkcije teh proteaz, saj vsebuje predstavnike glavnih proteaznih družin, povezanih s tem procesom. Z uporabo sond na osnovi aktivnosti (ang. activity-based probes) smo tako želeli podrobneje raziskati aktivnosti proteaz v *Chlamydomonas reinhardtii* med oksidativnim stresom, sproženim z vodikovim peroksidom. V nasprotju s pričakovanji so se uporabljene tetrapeptidne sonde močno vezale na tri ne proteolitične proteine - PsbO, PsbP in PsbQ – ki so sestavni del kisik-sproščujočega kompleksa (ang. oxygen-evolving complex, OEC) fotosistema II. Z nadaljnjimi biokemičnimi analizami in eksperimenti z masno spektrometrijo smo odkrili vlogo CrCEP1, prej neraziskane papainu-podobne cisteinske proteaze, pri katalizi te reakcije. Z dodatnimi poskusi z rekombinantno pripravljenimi proteini CrCEP1 in PsbO, smo reakcijo izvedli tudi *in vitro*. Naši rezultati razkrivajo, da ima endopeptidaza CrCEP1 poleg proteolizne tudi transpeptidazno aktivnost, ki omogoča prenos sond in peptidov na N-konce proteinov Psb. Doslej neznana transpeptidazna aktivnost CrCEP1, razkriva kompleksne in vsestranske vloge proteaz v celičnih procesih med odzivi na stres.

**Ključne besede:** zelene alge, proteoliza, sonde na osnovi aktivnosti, papainu-podobne cisteinske proteaze, transpeptidacija

## Človeška črevesna mikrobiota v domačem okolju

Urša Miklavčič<sup>1</sup>, Sandra Janežič<sup>1,2</sup>, Maja Rupnik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska 1, Maribor

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, Maribor

ursa.miklavcic@nlzoh.si

Črevesna mikrobiota človeka opravlja številne naloge, kot so presnova neprebavljivih vlaknin, učenje in regulacija imunskega sistema, zaščita pred kolonizacijo s patogenimi mikroorganizmi ter produkcija sekundarnih metabolitov, ki vzdržujejo tesnost črevesnega epitela in vplivajo na različne organske sisteme. V tej združbi prevladujejo bakterije debel *Bacteriodota* (*Bacteroidetes*) in *Bacillota* (*Firmicutes*), medtem ko so v manjši meri zastopane tudi bakterije debel *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), *Actinomycetota* (*Actinobacteria*), *Verrucomicrobia* in *Fusobacteria*. Čeprav je veliko raziskav narejenih na populacijah z različnimi boleznimi, so tudi raziskave na zdravih prostovoljcih pomembne za razumevanje sestave in dinamike črevesne mikrobiote v domačem okolju.

Podatki vključeni v analizo izhajajo iz dveh študij. Oba seta podatkov sta bila pridobljena s sekvenciranjem V3-V4 variabilne regije gena za 16S rRNA na platformi Illumina. Odčitke smo združili, filtrirali in zmanjšali šum s programom USEARCH ter pridobili predvidena pravilna biološka zaporedja (ZOTU, ang. *zero-radius operational taxonomic unit*) nadaljnja analiza in vizualizacija je bila narejena v RStudiu. V prvi študiji smo spremljali devet posameznikov v obdobju šestih mesecev, vsaka dva tedna so prostovoljci prispevali vzorec blata in odgovorili na osnovna vprašanja o prehrani, stresu in aktivnosti. Ko primerjamo diverziteto črevesne mikrobiote enega posameznika se ta v času spreminja glede na zunanje okoliščine, kot so prehrana, aktivnost, zdravila in predvsem antibiotiki, ki povzročijo začasno porušenje ravnovesja, vendar so vse te razlike znotraj šest mesečnega obdobja veliko manjše kot razlike med posamezniki. V drugo študijo so bili vključeni pari, ki bivajo skupaj. Ljudje si v povprečju delimo 10 do 20% bakterijskih vrst črevesne mikrobiote, ta delež je večji, če primerjamo skupaj živeče partnerje.

**Ključne besede:** črevesna mikrobiota, longitudinalne spremembe, kohabitacija, prenosi

## Transkriptomaska analiza genskih skupkov za razgradnjo hemiceluloz in pektinov v dveh vampnih vrstah bakterij *Prevotella* nakazuje na različne substratne preference

Urška Murovec, Tomaž Accetto

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

[urska.murovec@bf.uni-lj.si](mailto:urska.murovec@bf.uni-lj.si)

Bakterije iz rodu *Prevotella* so ena najbolj dominantnih skupin v mikrobioti vampa. Njihova glavna funkcija je razgradnja hemiceluloz in pektinov rastlinske celične stene ter založnih polisaharidov. Te substrate razgrajajo do končnih produktov s peštrim naborom encimov, ki so kodirani v skupkih odgovornih za razgradnjo polisaharidov (angl. Polysaccharide Utilisation Loci – PULs). To so lokusi ko-lokaliziranih in ko-reguliranih genov, katerih produkti zaznavajo, vežejo, prenašajo in encimsko razgrajajo kompleksne ogljikove hidrate. PUL se aktivira ob zaznavi substrata, katerega produkti so sposobni njegove razgradnje. Bioinformacijske analize vrst *Prevotella* so pokazale, da vsebujejo raznolik nabor PULov v svojih genomih, transkriptomski in genetski pristopi pa so napovedi potrdili na omejenem številu substratov. V tej študiji smo transkriptomsko identificirali različne PULe v dveh vrstah *Prevotella*, *Prevotella ruminicola* KHP1 in *Prevotella bryantii* TF1-3, da bi preiskali raznolikost PULov, ki bi lahko bila prisotna v tem heterogenem rodu. Poleg tega smo preverili substratne preference in ocenili, da specifična hitrost rasti in količina biomase, ki jo sev lahko pridobi na določenem substratu vplivata na izbiro substratov za rast. Preferenca je bolj očitna pri *P. ruminicola* KHP1, medtem ko *P. bryantii* TF1-3 lahko razgraja določene hemiceluloze tudi istočasno.

**Ključne besede:** *Prevotella*, vamp, prežvekovalci, PULs, hemiceluloze, pektini

## Zmanjševanje emisij metana pri prežvekovalcih: mikrobiomski pogled v učinkovanje rastlinskih izvlečkov kot alternativa antibiotičnim krmnim dodatkom

Alen Radolič, Luka Lipoglavšek, Lijana Fanedl, Gorazd Avguštin

UL, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Katedra za mikrobno diverzitetu, mikrobiomiko in biotehnologijo, Groblje 3, Domžale

[gorazd.avgustin@bf.uni-lj.si](mailto:gorazd.avgustin@bf.uni-lj.si)

Prežvekovalci so pomemben vir emisij metana v ozračje, kjer ima ta negativen vpliv na globalno segrevanje. Preverjen in učinkovit način zmanjšanja emisij metana predstavljajo antibiotični krmni dodatki, katerih uporaba je v Evropski skupnosti od l. 2006 prepovedana, zato iščemo alternativo, med drugim v izvlečkih nekaterih rastlin. V raziskavi smo uporabili šaržni anaerobni bioreaktorski sistem Gas Endeavour®, s katerim smo simulirali razmere v vampu ovac in tako *in vitro* preučevali in primerjali vpliv izvlečkov česna, hmelja, kostanjevih taninov in ionofornega antibiotika monenzina na proizvodnjo plinov in kratkoveržnih maščobnih kislin. Z molekularnimi mikrobiomskimi metodami in bioinformacijsko analizo pa smo preučevali vpliv teh učinkovin na sestavo bakterijskega in arhejskega dela vampovega mikrobioma. Pričakovano smo ugotovili, da imajo dodatki izbranih rastlinskih izvlečkov v večini statistično značilen učinek na celotno proizvodnjo plina kot tudi proizvodnjo metana. Največji učinek sta imela dodatek česnovega olja in beta kislin iz hmelja, in ob dodatku višje koncentracije, sta bila celo učinkovitejša od monezina. Dodatek monenzina, česnovega olja in beta kislin iz hmelja je povzročil kopičenje vodika namesto metana, predvidoma zaradi inhibicije metanogeneze. Analiza kratkoveržnih maščobnih kislin je pokazala, da je dodatek izbranih rastlinskih izvlečkov povzročil zmanjšanje koncentracije le-teh, z izjemo česnovega ekstrakta dialil disulfida (DADS), ki je povzročil povečanje celokupne koncentracije KMK. Analiza profilov bakterijskega dela mikrobiomov je presenetljivo pokazala veliko podobnost mikrobiomov iz vzorcev z dodanimi rastlinskimi učinkovinami in vzorcev pozitivnih kontrol, medtem ko je dodatek monenzina bakterijski del mikrobiomov močno spremenil. Drugačna razporeditev je značilna za arhejski del mikrobiomov, na katere je najbolj vplival dodatek dialil disulfida.

**Ključne besede:** globalno segrevanje, metan, prežvekovalci, vamp, mikrobiom

## Anotacija in pan-genomska analiza visokosorodnih sevov *Bacillus subtilis* iz nabrežja reke Save

Eva Stare<sup>1</sup>, Jasna Kovač<sup>2</sup>, Ulisses Nunes da Rocha<sup>3</sup>, Ines Mandić-Mulec<sup>1</sup>, Polonca Štefanič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra za mikrobno ekologijo in fiziologijo, Oddelek za mikrobiologijo, Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Department of Food Science, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA

<sup>3</sup>Department of Environmental Microbiology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany

eva.stare@bf.uni-lj.si

V letu 2009 sta Štefanič in Mandić-Mulec izolirali 40 visokosorodnih sevov *Bacillus subtilis* iz vzorcev tal peščenega nabrežja reke Save. Sevi so bili med socialnim premikanjem po poltrdnem agarju sposobni razlikovati med bolj in manj sorodnimi sevi, pri čimer je med bolj sorodnimi sevi prišlo do zlitja rojev, med manj sorodnimi pa do tvorbe mejne linije. Izkaže se, da pri tej vrsti sorodstveno razlikovanje ni pogojeno z variacijami v eni sami skupini genov, temveč s širokim naborom genov, ki kodirajo predvsem sekundarne metabolite ali komponente celične površine. Da bi pridobili vpogled v genomske razlike in identificirali gene, vključene v sorodstveno razlikovanje, potrebujemo visoko genomsko resolucijo izolatov, zato smo le-te sekvencirali z kombinacijo sekvenciranja kratkih kot in dolgih odčitkov.

Sestavljene genome smo anotirali z tremi orodji za mikrobno anotacijo tj. Prokka, Bakta in PGAP in primerjali razmerje med hitrostjo, enostavnostjo uporabe, deležem hipotetičnih proteinov in deležem uspešno anotiranih genov z izbranimi orodji.

Po anotaciji smo uporabili orodje za pan-genomsko analizo bakterijskih genomov, Roary, da bi identificirali sestavo pan-genoma naših simpatričnih sevov *B. subtilis*. Primerjali smo ga s pan-genomom, ki je bil ustvarjen na podlagi obsežnega nabora javno dostopnih in visokokakovostnih genomov *B. subtilis*, izoliranih po vsem svetu. Primerjava pan-genomov nam omogoči ugotavljanje, ali obstajajo posebnosti naše simpatrične populacije glede na globalno raznolikost vrste.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, primerjalna genomika, pan-genom, anotacija

## Longitudinalna stabilnost črevesnih profagov pri bakterijski družini *Bacteroidaceae*

Nejc Stopnišek<sup>1</sup>, Stina Hedžet<sup>1</sup>, Maja Rupnik<sup>1,2</sup>, Tomaž Accetto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor, Slovenija

<sup>2</sup>Katedra za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor, Slovenija

<sup>3</sup>Katedra za mikrobno diverzitetu, mikrobiomiko in biotehnologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale, Slovenija

nejc.stopnisek@nlzoh.si

*Bacteroidaceae* je pomembna družina črevesnih bakterij, ki igrajo ključno vlogo pri ohranjanju zdravja črevesja. Te bakterije pomagajo pri razgradnji zapletenih ogljikovih hidratov, proizvajajo vitamine in druga hranila ter ščitijo pred patogeni. Profagi so virusi, ki lahko okužijo bakterije in vgradijo svoj genetski material v bakterijsko genom. V nekaterih primerih lahko profagi koristijo bakterijam gostiteljicam tako da povečajo virulentnost ali odpornost proti antibiotikom. Vendar pa lahko profagi povzročijo tudi lizo bakterijskih gostiteljev. V tej študiji smo preučevali stabilnost profagov v črevesnih bakterijah *Bacteroidaceae* v daljšem časovnem obdobju. Izolirali smo člane družine *Bacteroidaceae* iz fekalnih vzorcev, pridobljenih iz dveh zdravih posameznikov v dveh časovnih točkah, eno ali dve leti narazen (skupno 74 izolatov). Ugotovili smo, da so bili profagi v teh bakterijah zelo specifični za posameznika, kar pomeni, da so bili najdeni samo pri enem posamezniku in nikoli pri obeh. Ena tretjina identificiranih profagov je bila prisotna v obeh časovnih točkah, kar kaže, da je večina profagov časovno specifičnih in so nestabilni. Identificirali smo tudi tri profage, ki so imeli širok razpon gostiteljev in niso bili specifični za določen sev. Te profage smo našli pri različnih vrstah bakterij *Bacteroidaceae*, kar kaže, da lahko okužijo več sevov črevesnih bakterij. Nekateri od teh profagov so nosili tudi funkcionalne gene gostitelja, kar kaže, da imajo lahko pomemben vpliv na fiziologijo bakterij gostiteljev. Uporabili smo tudi metagenomske podatke iz prejšnje študije, da bi ugotovili, ali so ti profagi aktivirani in potencialno prisotni pri katerem drugem gostitelju. Ugotovili smo, da so bili ti profagi aktivirani, do 9% metagenomskih odčitkov pa je bilo mogoče preslikati nazaj na regije profaga. To kaže, da lahko ti profagi igrajo aktivno vlogo v črevesnem okolju.

Na splošno ta študija zagotavlja nove vpoglede v raznolikost in stabilnost profagov v črevesnih bakterijah *Bacteroidaceae*. Ugotovitve kažejo, da imajo profagi lahko bolj dinamično vlogo v črevesnem okolju, kot smo sprva predvidevali. A potrebne so nadaljnje raziskave, da bi razumeli polni vpliv profagov na zdravje črevesja.

**Ključne besede:** črevesje, bakteroidete, profagi, longitudinalna študija, sekvenciranje, bioinformatika

## Učinki in mehanizmi delovanja potencialnega probiotika *Bacillus subtilis* PS-216 proti patogeni bakteriji *Campylobacter jejuni*

Katarina Šimunović<sup>1</sup>, Polonca Štefanič<sup>1</sup>, Anja Klančnik<sup>1</sup>, Manuela Di Lorenzo<sup>1</sup>, Vida Rezar<sup>1</sup>, Janez Salobir<sup>1</sup>, Tatjana Pirman<sup>1</sup>, Maja Šikić Pogačar<sup>2</sup>, Olga Zorman Rojs<sup>3</sup>, Uroš Krapež<sup>3</sup>, Sonja Smole Možina<sup>1</sup>, Ines Mandić Mulec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor, Slovenija

<sup>3</sup>Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

katarina.simunovic@bf.uni-lj.si

Odpornost na antibiotike in širjenje bakterij *Campylobacter* sp. v verigi proizvodnje in preskrbe s perutninskim mesom je vse večji problem, ki povzroča ogromne gospodarske izgube. Strogi predpisi o uporabi antibiotikov ter zdravstveni in ekonomski pomisleki so odprli vrata intenzivnejšim raziskavam alternativnih rešitev tega problema, kot je uporaba probiotikov za kontrolo patogenih bakterij.

Osredotočili smo se na raziskave medvrstnih interakcij bakterij *Campylobacter jejuni* in potencialnega probiotika *Bacillus subtilis* za kontrolo patogenih bakterij *C. jejuni* pri piščancih.

Z *in vitro* presejalnimi testi smo izbrali sev *B. subtilis* PS-216 z najboljšim inhibitornim delovanjem proti bakterijam *C. jejuni*. Z mikroaerofilno ko-kultivacijo smo z *B. subtilis* PS-216 zavrli rast sevov *C. jejuni* različnega izvora (N=20, 1,5 - 6,5 log redukcije) ter določili dinamiko interakcije teh dveh vrst v različnih pogojih. Potrdili smo, da sta v mehanizmu delovanja *B. subtilis* PS-216 proti *C. jejuni* vključeni protimikrobni spojini bacilizin in plipastatin. Med mehanizmi odpornosti sevov *C. jejuni* proti *B. subtilis* smo identificirali delovanje izlivnih črpalk in sekrecijskega sistema tipa 6.

Učinkovitost *B. subtilis* PS-216 za zatiranje *C. jejuni* smo potrdili *in vivo* pri pitovnih piščancih starih do 21 dni. Potrdili smo značilno zmanjšanje ravni *C. jejuni* v slepem črevesju piščancev (1,4 log,  $p < 0,05$ ), ki so prejeli spore *B. subtilis* PS-216 v vodi v koncentraciji  $10^6$  spor/mL. Pri pitovnih piščancih starih do 43 dni, ki so prejeli spore *B. subtilis* PS-216 v vodi ( $10^6$  spor/mL), v manjši koncentraciji v krmi ( $10^6$  spor/kg) ter večji koncentraciji v krmi ( $10^9$  spor/kg krme) ugotovili povečanje telesne mase, učinkovitejše izkoriščanje krme ter povečanje mase timusa, kar kaže na močan pozitiven vpliv dodatka spor na samega gostitelja.

Sklepamo, da ima *B. subtilis* PS-216 močan probiotični potencial, ki izboljšuje zdravstveno stanje živali, ekonomičnost prireje in končno tudi varnost in kakovost mesa.

**Ključne besede:** probiotik *Bacillus subtilis* PS-216, *Campylobacter jejuni*, pitovni piščanci

## Bakterija *Clostridioides difficile* v domačih kompostnikih in malih sesalcih

Klemen Tršinar<sup>1,2</sup>, Sabina Mlakar<sup>1,3</sup>, Franc Janžekovič<sup>2</sup>, Maja Rupnik<sup>1,3</sup>, Sandra Janežič<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, Maribor,

<sup>2</sup>Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, Koroška cesta 160, Maribor

<sup>3</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborška ulica 8, Maribor

klemen.trsinar@student.um.si

*Clostridioides difficile* je po Gramu pozitivna bakterija, ki raste striktno anaerobno, in ob neugodnih razmerah tvori spore. Toksigeni sevi tako pri ljudeh kot pri številnih živalih povzročajo črevesne okužbe. Čeprav je glavni rezervoar bakterije *C. difficile* najpogosteje bolnišnično okolje, jo lahko najdemo tudi drugod. Bolnišnično okolje je bilo z obsežnimi študijami že dobro raziskano, medtem ko so podatki o prisotnosti *C. difficile* v drugih rezervoarjih še vedno precej skopi. Ker v zadnjih letih narašča število okužb v izven bolnišničnem okolju, je pomembno poiskati tudi druge možne vire bakterije *C. difficile*. V tej študiji smo raziskali pogostnost *C. difficile* v domačih kompostnikih in iztrebkih malih sesalcev, ulovljenih ob kompostnikih. Vključili smo kompostnike treh različnih gospodinjstev in iz vsakega odvzeli po tri vzorce komposta. Pri vsakem kompostniku smo nastavili 6-10 živolovnih pasti za male sesalce. Ulovljene male sesalce smo popisali in za nadaljnjo analizo uporabili le njihove iztrebke. Za osamitev *C. difficile* smo uporabili bogatitvena in selektivna gojišča. Izolate smo identificirali z MALDI-TOF ter jih podrobneje okarakterizirali s PCR ribotipizacijo in toksinotipizacijo. Ugotovili smo, da je bil *C. difficile* prisoten v vseh treh kompostnikih, medtem ko sta bila od 16 vzorcev iztrebkov malih sesalcev na *C. difficile* pozitivna samo dva (13 %). Iz kompostnikov smo osamili 91, iz iztrebkov malih sesalcev pa 16 izolatov. S PCR ribotipizacijo smo izolate uvrstili v 9 različnih PCR ribotipov, in sicer 8 netoksigenih ter enega toksigenega (toksinotip 0). Od 9 PCR ribotipov so bili štirje že opisani pri človeku. Oba PCR ribotipa, izolirana iz malih sesalcev, sta bila najdena tudi v vzorcih komposta. V enem primeru smo isti PCR ribotip našli v iztrebku malega sesalca in komposta, kar nakazuje na možen prenos *C. difficile* med kompostom in malimi sesalci. Ali gre res za klonalna izolata pa bomo potrdili s sekvenciranjem in analizo genomskih zaporedij.

**Gljučne besede:** *Clostridioides difficile*, kompost, mali sesalci, PCR-ribotipizacija, rezervoarji



## Virulentni potencial sevov rodu *Aeromonas* s kože človeške ribice in njenega okolja

Lea Becner, Nina Gunde-Cimerman, [Martina Turk](mailto:martina.turk@bf.uni-lj.si)

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

[martina.turk@bf.uni-lj.si](mailto:martina.turk@bf.uni-lj.si)

Obstoj človeške ribice (*Proteus anguinus*), največje obligatno jamske živali ter edinega jamskega vretenčarja v Evropi, je ogrožen zaradi onesnaževanja njenega vodnega okolja kot posledice človeške dejavnosti. Raziskave mikrobioma kože človeških ribic in njihovega okolja (kraške ter akvarijske vode) so potrdile prisotnost za dvoživke potencialno patogenih sevov bakterij rodu *Aeromonas*, povzročiteljev t.i. sindroma rdečih nog. Izolirane seve tega rodu smo do vrste natančno identificirali s filogenetsko analizo na podlagi konkateniranih nukleotidnih zaporedij hišnih genov *dnaJ*, *dnaX*, *gyrB*, *recA* in *rpoD* ter gena za 16S rRNA. Na podlagi gena za 16S rRNA prepoznane izolate najbolj patogene vrste *A. hydrophila* smo identificirali kot *A. media*, potrdili pa smo prisotnost za ribe in druge vodne živali potencialno patogeni vrsti *A. salmonicida* in *A. veronii*. Vrsta raznolikost aeromonasov v kožni mikrobioti zdravih človeških ribic je bila večja v primerjavi z bolnimi. Dokazovali smo prisotnost genov za virulentne dejavnike *act*, *alt*, *ast*, *aerA*, *ahpA*, *epr*, *hlyA* in *GCAT* ter s povprečno 2,13 omenjenih genov na sev rodu *Aeromonas* potrdili nizek virulentni potencial izoliranih sevov. Kljub temu smo odkrili 2 potencialno citotoksična seva z genotipom *act<sup>+</sup>/alt<sup>+</sup>/aerA<sup>+</sup>/hlyA<sup>+</sup>*, 19 potencialno citotoksičnih sevov genotipa *act<sup>+</sup>/alt<sup>+</sup>/aerA<sup>+</sup>* in 4 potencialno zelo virulentne seve genotipa *alt<sup>+</sup>/aerA<sup>+</sup>/hlyA<sup>+</sup>*. Kar 93 % sevov je bilo odpornih proti vsaj enemu testiranemu antibiotiku, proti gentamicinu (93,49 % sevov), imipenemu (49,11 % sevov), eritromicinu (34,91 % sevov), ceftriaksonu (34,32 % sevov), aztreonamu (2,96 % sevov) in enrofloksacinu (2,96 % sevov). Seve z največjim povprečnim številom antibiotikov, proti katerim so bili odporni, smo izolirali iz lokacije, kjer je v preteklosti prišlo do onesnaženja s težkimi kovinami, kar se sklada s konceptom navzkrižne odpornosti. Ugotovitve nakazujejo na verjetno onesnaženje kraških vod z odpadnimi vodami, živinorejo in človeškimi fekalijami ter posledično širjenje genskega materiala, ki vsebuje zapise za mehanizme odpornosti in virulence med bakterijami.

**Ključne besede:** dejavniki virulence, *Proteus anguinus*, voda, *Aeromonas*

## Novi virusi morskih kremenastih alg iz slovenske obale

Timotej Turk Dermastia<sup>1</sup>, Denis Kutnjak<sup>2</sup>, Katarina Bačnik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Morska biološka postaja Piran, Nacionalni inštitut za biologijo, Fornače 41, 6330 Piran

<sup>2</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana.

timotej.turkdermastia@nib.si

Kremenaste alge (diatomeje) so skupina enoceličnih mikroalg, ki je v svetovnih oceanih odgovorna za približno 40% primarne produkcije. Tvorijo silikatne celične stene, ki delujejo kot balast in so zato tudi pomembne pri kroženju tako silicija kot ogljika. Pomembno vlogo pri kroženju snovi in mikrobiološki zanki v morjih imajo virusi, ki okužujejo (in lizirajo) diatomejske celice ter vplivajo na razgradljivost raztopljenih organske snovi. Le nekaj virusov diatomej je bilo izoliranih in okarakteriziranih. V tej raziskavi smo se lotili iskanja novih diatomejskih virusov predvsem rodu *Pseudo-nitzschia*, ki je eden najbolj razširjenih diatomejskih rodov in je znan tudi po tem da tvori škodljiva cvetenja alg, nevarna tudi človeku ob zaužitju kontaminiranih školjk. Do zdaj virusi tega rodu niso bili poznani. Iz koncentriranega vzorca morske vode iz Tržaškega zaliva smo izolirali več novih diatomejskih virusov. Virus PnGalRNAV, je nov virus, ki okužuje diatomeje vrste *Pseudo-nitzschia galaxiae*, zelo razširjene v Tržaškem zalivu. Virus smo s pomočjo metagenomskih metod in transmisijske elektronske mikroskopije okarakterizirali kot enoverižni RNA virus, podoben pikornavirusom («picorna-like»), ki okužujejo tudi druge diatomejske vrste. Virus smo nato iskali še v javno dostopnih zbirkah metagenomskih podatkov, da bi poskušali ugotoviti, če je bil tak ali podoben virus že kdaj prej zaznan. Našli smo podobne viruse še vsaj iz dveh lokacij - Sredozemlja in Kitajske. Poleg PnGalRNAV smo uspeli izolirati še virus, ki okužuje diatomejo *Chaetoceros tenuissimus*. Gre za enoverižni DNA virus iz družine *Bacilladnaviridae*. Virus sodi, glede na podobnost replikaznega proteina, v isto vrsto kot že opisan virus ChTenDNAV type-II iz Japonske, vendar je glede na celotno genomsko zaporedje precej drugačen in lahko govorimo o novem genotipu tega virusa. Gre sploh za prvi diatomejski virus, ki je bil izoliran na dveh različnih lokacijah. Z izolacijo novih vrst in lokalnih sevov diatomejskih virusov se odpirajo vrata v raziskovanje interakcij med diatomejami, bakterijami in virusi in vplivom teh na kroženje snovi v morju.

**Ključne besede:** virusi, diatomeje, kroženje snovi, morje, *Pseudo-nitzschia*

## Vpliv lizogenih fagov na genomsko reorganizacijo bakterij na nivoju posameznih celic z uporabo metode CRISPRi-Seq

Nina Vesel, Anna Dragoš

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, Ljubljana

nina.vesel@bf.uni-lj.si

Bakteriofagi ali fagi so obvezni bakterijski paraziti in eno glavnih gonil bakterijske evolucije. Fagi ponavadi sledijo litičnemu ali lizogenemu ciklu. Medtem ko litični cikel povzroči lizo bakterijskih celic, se fag med lizogenim ciklom vključi v bakterijski kromosom in podvojuje skupaj z bakterijsko DNK. Poleg konvencionalnega litičnega in lizogenega cikla, pa je malo znanega o alternativnih življenjskih slogih fagov. Lizogene fage, ki so se zmožni izrezati (in ponovno vključiti) iz njihovih tarčnih genov na strogo nadzorovan način in pod določenimi okoljskimi pogoji, imenujemo fagna regulatorna stikala, njihov življenjski cikel pa aktivna lizogenija. Takšni fagi lahko uravnavajo ekspresijo tarčnih genov in nadzirajo različna bakterijska vedenja, kot so sporulacija, razvoj biofilma, patogenost itd. Natančna regulacija fagnih regulatornih stikal na molekularnem nivoju pa je zaenkrat še večinoma neraziskana.

Za sledenje dinamiki preklapljanja med intra- in ekstra-kromosomsko obliko faga  $\text{SP}\beta$  v bakteriji *Bacillus subtilis* trenutno razvijamo fluorescenčni reporterski sev, ki nam bo omogočil vizualizacijo fagnega ekstra-kromosomskega stanja. Takšen reporterski sev nam bo v prihodnje omogočil identifikacijo okoljskih pogojev, potrebnih za preklapljanje fagov, in raziskovanje tega procesa na ravni posameznih celic z uporabo konfokalne fluorescenčne mikroskopije. CRISPRi-Seq metoda na reporterskem sevu nam bo omogočila identifikacijo nujnih genetskih bakterijskih in fagnih komponent, ki so potrebne za fagno preklapljanje.

Ker fagna regulatorna stikala regulirajo bakterijske preživitvene strategije, kot so pobeg iz fagosomov, sporulacija, tvorba biofilma itd., so pogosto povezana z bakterijsko patogenezo. Boljše razumevanje fagnih regulatornih stikal na molekularnem nivoju bo zato pomembno doprineslo tudi k nadzoru bakterij na medicinskih in biotehnoloških področjih.

**Ključne besede:** lizogeni fagi, bakterijsko vedenje, konfokalna mikroskopija, CRISPRi-seq, molekularni mehanizmi

## Raziskovanje viromov makrofitov z uporabo dveh različnih pristopov

Lana Vogrinec<sup>1,2</sup>, Katarina Bačnik<sup>1</sup>, Martina Bačič<sup>3</sup>, Zarja Miovič<sup>1</sup>, Denis Kutnjak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Jamova cesta 39, 1000, Ljubljana

<sup>3</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

lana.vogrinec@nib.si

Makrofiti so taksonomsko raznolika skupina vodnih rastlin, vidnih s prostim očesom, ki naseljujejo različne sladkovodne in morske ekosisteme. Zaradi svoje raznovrstnosti in razširjenosti bi lahko bili pomembni virusni rezervoarji, zlasti zato, ker so neposredno povezani z vodnimi telesi, ki imajo potencial za prenos virusnih delcev na daljše razdalje. To je še posebej zaskrbljujoče pri združbah makrofitov, ki rastejo v bližini kmetijskih površin ali vodnih virov, ki se uporabljajo za namakanje. Kljub njihovi možni vlogi pri kopičenju in prenosu patogenih rastlinskih virusov, so viromi makrofitov slabo raziskani.

Namen te raziskave je bil razširiti trenutno omejeno znanje o virusih makrofitov z uporabo dveh različnih pristopov: (1) s podatkovnim rudarjenjem smo poiskali virusna zaporedja v javno dostopnih podatkih iz zbirke tisočih transkriptomov rastlin, pri čemer smo analizirali 81 različnih vrst,<sup>(2)</sup> z visokozmogljivim sekvenciranjem RNA smo določili prisotnost virusnih nukleinskih kislin v rastlinskem materialu različnih vrst makrofitov, ki smo jih dobili iz različnih virov (lastna zbirka, akvaristične trgovine).

Z obema metodama smo v številnih analiziranih vodnih rastlinah zaznali zaporedja znanih rastlinskih virusov. Nekatere izmed teh pripadajo virusom, ki okužujejo gospodarsko pomembne rastline, med drugim so to virusi iz rodov *Crinivirus* (virus kloroze solate, LCV), *Cucumovirus* (virus mozaika kumare, CMV), *Ilarvirus* (virus progavosti tobaka, TSV) in *Polerovirus* (virus rumenice repe, TuYV). Poleg tega smo odkrili veliko zaporedij, ki bi glede na zmerno podobnost z znanim rastlinskih virusi lahko pripadale novim virusnim vrstam. Primer je zaporedje skoraj celotnega genoma virusa, ki je najbolj podobno članom rodu *Potyvirus*. Ta virus smo zaznali tako s podatkovnim rudarjenjem v podatkovnem setu povezanem z rastlino *Sagittaria latifolia*, kot tudi s sekvenciranjem pri sorodni vrsti *Sagittaria subulata*.

**Ključne besede:** makrofiti, rastlinski virusi, podatkovno rudarjenje, visokozmogljivo sekvenciranje

## Množičen pogin leščurjev (*Pinna nobilis*) v slovenskem morju v letu 2020

Urška Zajc<sup>1</sup>, Mitja Gombač<sup>1</sup>, Bojan Papič<sup>1</sup>, Borut Mavrič<sup>2</sup>, Darja Kušar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

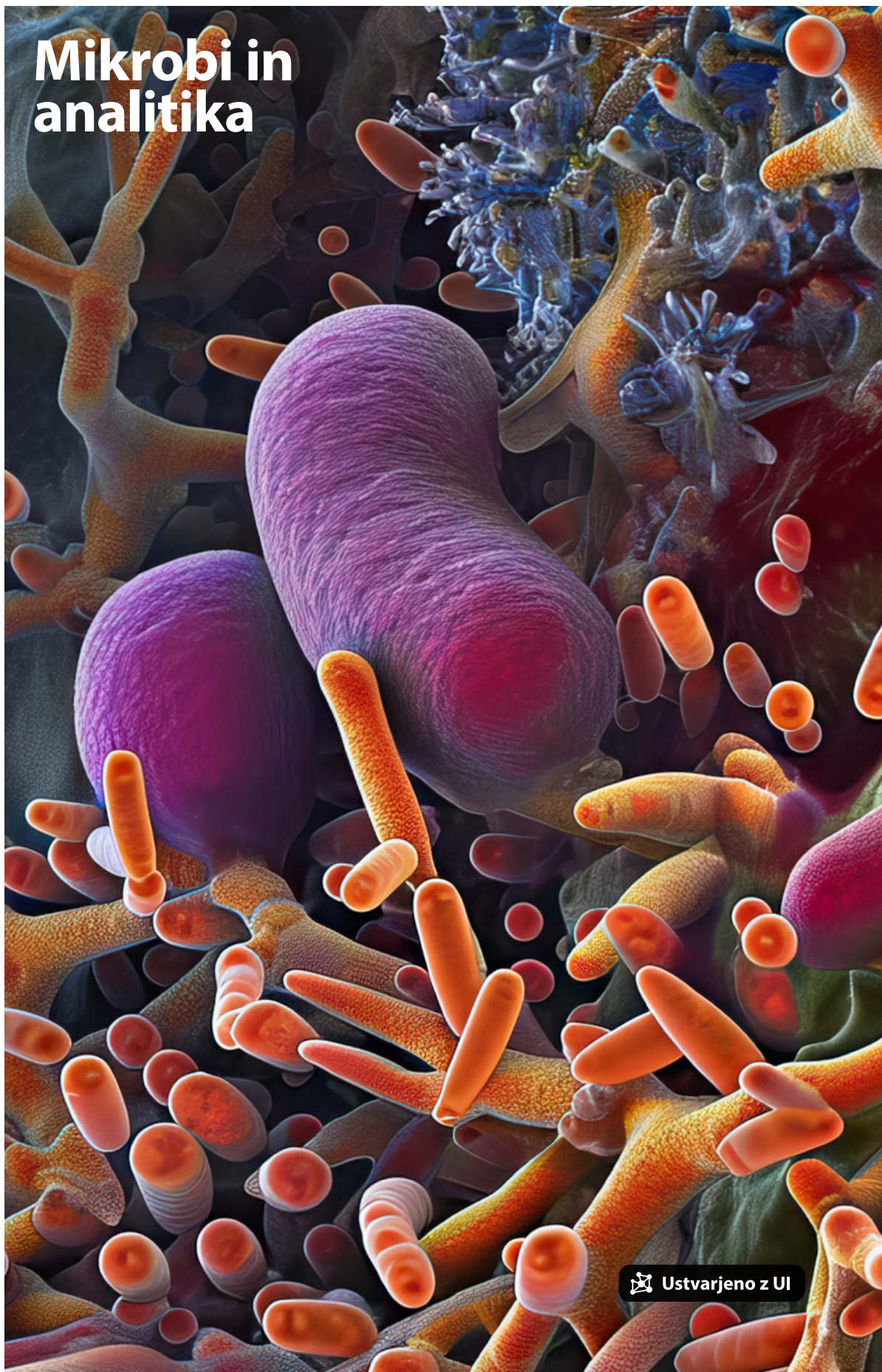
<sup>2</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran, Fornace 41, Piran

urska.zajc@vf.uni-lj.si

Veliki leščur (*Pinna nobilis*) je največja mediteranska morska školjka in endemit Sredozemskega morja. V slovenskem morju živi pretežno na morskih travnikih in sodi med zaščitene vrste. Zaradi masovnih poginov, ki so se v Sredozemlju začeli leta 2016, je leščur uvrščen med kritično ogrožene vrste. Masovne pogine navadno pripisujemo protozojskemu parazitu *Haplosporidium pinnae*, vendar so lahko sočasno prisotni tudi drugi patogeni. V avgustu 2020 smo v slovenskem morju prvič opazili množičen pogin leščurjev, ki je do konca leta privedel do skoraj 100-odstotne smrtnosti populacije. V laboratoriju smo analizirali devet poginjenih leščurjev. S histopatološko preiskavo smo ugotovili močno invazijo s posledično nekrozo tubulov prebavnih žlez in gonad ter blago invazijo vezivnega tkiva leščurjev s haplosporidiji različnih razvojnih stopenj. Z metodo PCR in sekvenciranjem po Sangerju (gen za SSU rRNA) smo potrdili prisotnost parazita *H. pinnae*. Predvsem v vezivnem tkivu plašča, prebavnih žlez in gonad smo ugotovili tudi številne makrofage, ki so vsebovali acidorezistentne bacile. Slednje smo z gojiščno metodo in barvanjem po Ziehl-Neelsenu ter identifikacijo z metodo MALDI-TOF potrdili kot *Mycobacterium* sp. Sekvenciranje celotnega genoma enega izolata je pokazalo, da ta pripada kandidatni novi vrsti mikobakterij, ki je najsorodnejša vrsti *M. peregrinum*. Veliki leščur je v slovenskem morju še vedno prisoten. Populacija je sicer majhna, vendar je še vedno sposobna razmnoževanja, na kar kažejo majhni, juvenilni osebki odkriti v letih 2022 in 2023. Njihova smrtnost je precejšnja, kar je posledica plenjenja, v nekaterih poginulih primerkih pa smo potrdili tudi prisotnost parazita *H. pinnae*. To kaže, da je še naprej potrebno spremljati stanje populacije samih leščurjev kot tudi prisotnosti parazitov in patogenov.

**Ključne besede:** veliki leščur (*Pinna nobilis*), *Haplosporidium pinnae*, *Mycobacterium* sp.

# Mikrobi in analitika



Ustvarjeno z UI

## ***Phyllosticta citricarpa* povzročiteljica bolezni črna pegavost agrumov: razvoj in validacija metode ter spremljanje njene prisotnosti v sredozemskih nasadih agrumov**

Tjaša Jakomin<sup>1</sup>, Maja Ferle<sup>1</sup>, Sara Fišer<sup>1</sup>, Maja Ravnikar<sup>1</sup>, Antonio Vicent<sup>2</sup>, Naima Boughalleb-M'Hamdi<sup>3</sup>, Neil Boonham<sup>4</sup>, Polona Kogovšek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 121, Ljubljana

<sup>2</sup>Centre de Protecció Vegetal i Biotecnologia, Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA), Moncada, Valencia, Španija

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences and Plant Protection, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, Sousse, Tunizija

<sup>4</sup>School of Natural and Environmental Sciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, VB

tjasa.jakomin@nib.si

Okužba z ascomicetno glivo *Phyllosticta citricarpa* povzroča razvoj bolezni črna pegavost agrumov ki vodi v veliko gospodarsko škodo, saj okuženi agrumi niso primerni za prodajo. Bolezen je najbolj razširjena v vlažnih geografskih območjih, to je v Avstraliji, Braziliji, na Kitajskem, v južni Afriki, vendar so pred nekaj leti prisotnost *P. citricarpa* potrdili tudi v bližnji Tuniziji. Slednje je zelo zaskrbljujoče za sredozemske države Evropske unije, saj je bilo do sedaj razumljeno, da podnebni pogoji v Sredozemlju niso primerni za širjenje te glive. Za zanesljivo spremljanje prisotnosti te glive na agrumih, ki so uvoženi v države članice EU, je nujna uporaba specifičnih in občutljivih metod. Razvili in validirali smo metodo qPCR, ki omogoča specifično določanje te karantenske glive in temelji na genu za TEF-1. Delovanje te metode (Pc-TEF1) in metode Pc, ki temelji na regiji ITS, smo ovrednotili v okviru testa usposobljenosti laboratorijev (TPS). Najprej smo preverili in zagotovili homogenost in stabilnost vzorcev DNA gliv (tarčnih in ne-tarčnih), ki smo jo dodali v DNA izolirano iz olupka agrumov (pomaranča, limona, pomelo). V TPS je sodelovalo 13 laboratorijev iz držav članic EU, Brazilije in Tunizije. Rezultati so pokazali izredno visoko diagnostično občutljivost (99%) in specifičnost (>98%) obeh qPCR metod. Obe metodi sta dosegli visoko ponovljivost znotraj laboratorija (repeatability, >95%) in med laboratoriji (reproducibility, >98%), in sta tako primerni za uporabo v diagnostičnih laboratorijih, ki določajo *P. citricarpa* v simptomatičnih in ne-simptomatičnih vzorcih agrumov. Metodi sta uporabljeni tudi v študiji epidemiologije *P. citricarpa*, kjer analiziramo vzorce zraka in deževnice zbrane v nasadih simptomatičnih limonovcev v Tuniziji. Z dosedanjo analizo smo pokazali časovno variabilnost v relativni količini *P. citricarpa* spor, ki je odvisna od temperature in relativne vlažnosti zraka. Študija epidemiologije bo omogočila boljše razumevanje širjenja glive po sredozemskem prostoru in s tem pravočasno ukrepanje v primeru izbruha bolezni v Evropskih nasadih.

**Ključne besede:** *Phyllosticta citricarpa*, qPCR TEF-1, test usposobljenosti laboratorijev

## PCR v realnem času za ugotavljanje klonalnih kompleksov bakterije *Listeria monocytogenes* v kompleksnih vzorcih DNA

Maja Kavalič<sup>1</sup>, Darja Kušar<sup>1</sup>, Jana Avberšek<sup>1</sup>, Benjamin Felix<sup>2</sup>, Bojan Papič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

<sup>2</sup>EURL *Listeria monocytogenes*, Anses, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort, Francija

maja.kavalic@vf.uni-lj.si

Bakterija *Listeria monocytogenes* se prenaša s hrano in povzroča listeriozo, ki je resno obolenje ljudi in živali z visoko smrtnostjo. Incidenca bolezni pri ljudeh je nizka, vendar v zadnjih letih narašča. Ker se posamezni klonalni kompleksi (CC) *L. monocytogenes* razlikujejo glede na virulenco in tropizem, je sestavni del epidemiološkega spremljanja listerioze tudi genotipizacija bakterije. Pred kratkim je EURL za *L. monocytogenes* razvil metodo GenoListeria, ki temelji na določanju 30 najpogostejših *L. monocytogenes* CC iz prehranske verige v Evropi z metodo PCR v realnem času (qPCR). Metoda omogoča hitro tipizacijo izolatov, zlasti na visoko zmogljivih platformah qPCR. V našem laboratoriju smo preskusili uporabnost metode GenoListeria za določanje CC v vzorcih DNA, ki smo jo izolirali iz kompleksnih (kliničnih) vzorcev. Kot matriks smo uporabili homogenizat abortiranega tkiva goveda, ki smo ga umetno kontaminirali z mešanico šestih sevov *L. monocytogenes* (CC1, 2, 5, 6, 9 in 11) v osmih različnih koncentracijah in petih bioloških ponovitvah. Po izolaciji DNA smo izvedli qPCR za ugotavljanje tarčnih CC (4x triplex qPCR, 8 tarč) po protokolu EURL GenoListeria. Meja zaznavnosti (LOD) se je gibala med 4000 (CC2) in 40 CFU/qPCR (ostali CC). S tem smo dokazali, da metoda GenoListeria omogoča zanesljivo in občutljivo ugotavljanje *L. monocytogenes* CC v kompleksnih vzorcih. V nadaljevanju bomo metodo preskusili še na naravno kontaminiranih kliničnih vzorcih. Dve dodatni potencialni aplikaciji metode sta tudi ugotavljanje mešane kontaminacije živil z različnimi *L. monocytogenes* CC in presejalno testiranje izolatov pred njihovo tipizacijo po konvencionalni poti (pridobitev izolatov in sekvenciranje celotnih genomov).

**Ključne besede:** *Listeria monocytogenes*, klonalni kompleks (CC), PCR v realnem času (qPCR)



## Rekonstrukcija fitoplazemskih genomov za epidemiološke raziskave s pomočjo sekvenciranja z nanoporami

Nataša Mehle<sup>1,2</sup>, Zala Kogej Zwitter<sup>1,3</sup>, Denis Kutnjak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, Ljubljana

<sup>2</sup>Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri, Glavni trg 8, Vipava

<sup>3</sup>Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Jamova cesta 39, Ljubljana

natasa.mehle@nib.si

Tehnologija sekvenciranja z nanoporami (Oxford Nanopore Technologies) se v zadnjih nekaj letih hitro razvija in kaže velik potencial za ekonomično uporabo visokozmogljivega sekvenciranja (HTS), tako z vidika časa kot denarja. Poleg tega sekvenciranje z nanoporami, v nasprotju z večino drugih trenutno najpogosteje uporabljenih platform HTS, omogoča sekvenciranje dolgih fragmentov genoma. Sekvenciranje z nanoporami, v kombinaciji s sekvenciranjem na platformi Illumina, smo uporabili tudi za reševanje epidemioloških težav v patologiji rastlin. Kot primer smo uporabili nedavno odkrite fitoplazme v leskah (*Corylus avellana*), ki smo jih primerjali s fitoplazmami, ki povzročajo zlato trsno rumenico.

Za sekvenciranje potrebujemo primerno čisto DNA fitoplazem v zadostni količini. Primerjava različnih ekstrakcij DNA iz vzorcev listnih žil vinske trte je pokazala, da najbolj obogatimo DNA fitoplazem (v primerjavi z gostiteljsko DNA), če pred ekstrakcijo s CTAB postopkom fitoplazme obogatimo z diferencialnim centrifugiranjem. Protokol smo nadgradili še s korakom obogatitve mikrobioma, ki poteka na podlagi razlike v metilaciji med gostiteljsko rastlinsko DNA in nemetilirano DNA fitoplazem. Z namenom, da pridobimo zadostno količino DNA, ki je potrebna za sekvenciranje z nanoporami, smo uvedli še korak v katerem pomnožimo vse prisotne nukleinske kisline v vzorcu. S kombinacijo sekvenciranja z nanoporami in na platformi Illumina smo uspeli pridobiti obsežne genomske podatke o fitoplazmah skupine 16SrV odkritih na leskah in vinski trti. Nadaljnja primerjava delov genoma fitoplazme iz različnih vzorcev vinske trte in lesk pa nam je omogočila boljši vpogled v pestrost izolatov fitoplazem, ki okužujejo vinsko trto in leske.

**Ključne besede:** sekvenciranje z nanoporami, visokozmogljivo sekvenciranje, fitoplazme, vinska trta, leska

## Validacija metode PCR v realnem času za kvantifikacijo bakterije *Paenibacillus larvae* v čebeljem drobirju

Urška Zajc, Jana Avberšek, Maja Kavalič, Tina Pirš, Darja Kušar

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

urska.zajc@vf.uni-lj.si

Preiskave v imenovanih in akreditiranih diagnostičnih laboratorijih morajo biti primerne za namen, za katerega se uporabljajo (angl. *fit-for-purpose*). Laboratorij to dokazuje z validacijo ali z verifikacijo metod. Validacija je testiranje metode za dokazovanje, da karakteristike metode kot so merilno območje, pravilnost, natančnost, meja zaznavnosti [LOD] in druge ustrezajo zahtevam glede na predvideno uporabo. Verifikacija je postopek za dokazovanje, da laboratorij določeno standardizirano ali že veljavno validirano metodo ustrezno izvaja. Pri postopkih je potrebno upoštevati tudi namembnost metode, tj. uporabo metode za merjenje količine tarče ali samo za dokazovanje njene prisotnosti. Metoda PCR v realnem času (qPCR) običajno omogoča relativno kvantifikacijo tarče, v diagnostične namene pa je lahko potrebna tudi absolutna kvantifikacija, kar pomeni spremembo statusa metode iz kvalitativne v kvantitativno. V tem primeru je potrebno metodo qPCR umeriti z neko metodo, ki omogoča zanesljivo štetje tarče. Kot najbolj zanesljiva metoda, ki temelji na enakem principu kot qPCR, se je izkazala metoda digitalni PCR (dPCR). V našem laboratoriju smo tako umerjanje uporabili že za več tipov vzorcev, tudi za štetje spor bakterije *Paenibacillus larvae* v čebeljem drobirju. Za namen izvajanja metode kot akreditirane po standardu ISO 17025 je potrebno umerjanje qPCR izvajati z metodo, ki je dokazano zanesljiva. Vrzel smo premostili s pomočjo Nacionalnega inštituta za biologijo, ki je nosilec nacionalnega etalona za področje množina snovi/bioanalize nukleinskih kislin. Inštitut je z dPCR določil število spor *P. larvae* v izbranem čebeljem drobirju, ki nam je nato služil kot kontrolni material za pripravo standardne krivulje pri validaciji qPCR. Z umerjeno metodo qPCR v laboratoriju sedaj lahko vrednosti C<sub>q</sub> prevajamo v število spor na vzorec, kar nam omogoča opredelitev panjev/čebelnjakov, ki zahtevajo poostren nadzor.

**Ključne besede:** *Paenibacillus larvae*, PCR v realnem času (qPCR), digitalni PCR (dPCR), množina snovi, validacija

# Kazalo avtorjev

## A

Abram, Anže 29, 108  
Abramenko, Natalia 89  
Accetto, Tomaž 88, 106, 118, 131, 134  
Ajd, Urška 127  
Alessi, Anna M. 77  
Ambrožič Avguštin, Jerneja 80, 101, 114  
Anderluh, Marko 60  
Avbelj, Martina 41, 59  
Avberšek, Jana 82, 144, 146  
Avguštin, Gorazd 96, 118, 132  
Avguštin, Hana 114

## B

Bačič, Martina 140  
Bačnik, Katarina 21, 63, 121, 138, 140  
Baebler, Špela 41  
Bajde, Irena 70, 128  
Bajuk, Matevž 103  
Balta, Laura 106  
Barlič Maganja, Darja 82  
Becner, Lea 137  
Belcijan, Katarina 34  
Belcijan Pandur, Katarina 64  
Benčič, Aleksander 69, 120  
Berce, Ingrid 49  
Berginc, Nataša 89  
Berlec, Aleš 42, 53, 79, 95  
Berra, Michelle 115  
Bešič, Emina 89  
Bezjak, Jurica 126  
Bezenšek, Veronika 114  
Bielen, Ana 63  
Bizjak, Maruša 95  
Bogožalec Košir, Alexandra 21, 70  
Bohinc, Klemen 29, 108  
Bolješič, Maja 28, 66, 124  
Boonham, Neil 143  
Borišek, Jure 107

Botella, Leticia 63  
Boughalleb-M'Hamdi, Naima 143  
Bozovičar, Krištof 95  
Božič, Janko 115  
Bratkovič, Tomaž 95  
Brezočnik, Lucija 52  
Brodarič, Jakob 128  
Bruce, Neil C. 77

## C

Celar Šturm, Andraž 98  
Celussi, Mauro 65  
Cepec, Eva 26  
Cerar Kišek, Tjaša 49, 66, 98  
Cimerman, Mojca 89, 117  
Coer, Andrej 111  
Colja, Teja 54

## Č

Čadež, Neža 25  
Čater, Maša 111  
Černe, Danijela 50  
Černoša, Anja 43, 62  
Čremožnik Zupančič, Jerneja 80, 101, 114  
Čukajne, Tjaša 79

## D

Damijan, Tjaša 85  
Danevčič, Tjaša 43, 58  
Derenčin, Miha 114  
Deurič, Jana 68  
Di Lorenzo, Manuela 135  
Dobnik, David 21, 68  
Dobovišek, Urška 51  
Dogša, Iztok 28, 122  
Dragoš, Anna 46, 115, 119, 122, 139  
Dreo, Tanja 69, 120

Drevenšek Olenik, Irena 71

## E

Erdani Kreft, Mateja 84, 88

## F

Fadeev, Eduard 65  
 Fajfar, Nataša 94  
 Fanedl, Lijana 96, 118, 132  
 Felix, Benjamin 144  
 Ferle, Maja 70, 116, 143  
 Fidler, Aleš 109  
 Fifer, Mojca 90  
 Fijan, Sabina 90, 91  
 Filipič, Arijana 21, 93  
 Fišer, Sara 143  
 Flander-Putrlje, Vesna 65  
 Fox, Adrian 128  
 Francé, Janja 97  
 Frangež, Tjaša 117  
 Fras Zemljič, Lidija 93  
 Fratnik Steyer, Adela 117  
 Fric, Katja 93

## G

Galičič, An 66  
 Gašperšič, Rok 109  
 Gašpir, Boris 47  
 Gavez, Manca 114  
 Glavan, Gordana 115  
 Gobec, Martina 54  
 Godič Torkar, Karmen 100  
 Golle, Andrej 56, 89, 102, 127  
 Gombač, Mitja 50, 141  
 Gorgieva, Selestina 26  
 Gostinčar, Cene 43, 62  
 Grabner, Eva 118  
 Gregorič, Matjaž 116  
 Grilc, Eva 49  
 Grilc, Nina Katarina 54  
 Grm, Eva 114  
 Grosboillot, Virginie 119  
 Grubar, Teja 20  
 Gruden, Kristina 20  
 Grujič, Vladimir 120  
 Gunde-Cimerman, Nina 43, 62, 137  
 Gutiérrez-Aguirre, Ion 21, 70, 121

## H

Hedžet, Stina 134  
 Herndl, Gerhard J 65  
 Herron, Paul 41  
 Hoorn, Renier A. L. van der 129

Horvat, Marinka 107  
 Horvat, Simon 111  
 Hostnik, Peter 50  
 Hranueli, Daslav 41  
 Hrastnik, Majda 32  
 Hrast Rambaher, Martina 60, 107  
 Hren, Maša 26  
 Hrovat, Katja 80, 101, 114  
 Hudina, Sandra 63  
 Huesgen, Pitter 129  
 Hunter, Iain S. 41

## I

Istenič, Darja 100

## J

Jakin Lazar, Jaka 122  
 Jaklič, Ajda 114  
 Jakomin, Tjaša 143  
 Jakše, Jernej 59  
 Jamnikar-Ciglencčki, Urška 37  
 Janc, Mojca 68  
 Jančič, Urška 26  
 Janecko, Nicol 123  
 Janev, Aleksandar 88  
 Janežič, Sandra 32, 51, 56, 57, 102, 127, 130, 136  
 Janež, Nika 30  
 Janež, Nikolaja 111  
 Janko, Tea 66  
 Janžekovič, Franc 136  
 Jeras, Matjaž 54  
 Jerele, Erika 103  
 Jerman, Ivan 93  
 Jernej, Diana 92  
 Jeverica, Samo 49  
 Jezeršek, Matija 47  
 Johnston, Christopher D. 118  
 Jones, Dakota S. 118  
 Jug, Blaž 30, 104  
 Jug, Dina 104  
 Juriševič Dodič, Anamarija 49  
 Jurša, Tatjana 66

## K

Kandolf Borovšak, Andreja 112  
 Karničar, Katarina 30  
 Karničnik, Bernarda 75  
 Kastelec, Damijana 115  
 Kavalič, Maja 144, 146  
 Kavkler, Katja 125  
 Keše, Darja 84  
 Kitek, Miha 128  
 Klančnik, Anja 30, 59, 79, 81, 83, 85, 86, 104, 105, 123, 135  
 Klemenčič, Marina 129

Klun, Katja 65  
Knez, Lea 56  
Kocbek, Petra 54  
Kogej, Zala 121  
Kogej Zwitter, Zala 145  
Kogovšek, Polona 36, 93, 116, 143  
Kolenc, Marko 50  
Kolenc, Živa 81, 123  
Koritnik, Tom 49, 66  
Košir, Iztok Jože 25  
Košir, Tamara 93  
Kotnik, Eva 49  
Kotnik, Tadej 105  
Kouba, Antonín 63  
Kovačec, Eva 58  
Kovač, Jasna 133  
Kovač Viršek, Manca 81, 123  
Kozmos, Mirjam 29  
Kraigher, Barbara 20, 28, 34, 64, 124  
Krajnc, Mojca 34, 45  
Kralj, Jernej 64  
Kramar, Klemen 114  
Kramar, Snežana 109  
Kramar, Urška 102, 110  
Kranjc, Katja 82  
Kranjc, Luka 63  
Kranjec, Konrad 110  
Kranjec, Natalija 66  
Krapež, Uroš 135  
Kristl, Julijana 54  
Križanec, Boštjan 66  
Kuhar, Urška 37  
Kujović, Amela 125  
Kunčič, Ajda 112  
Kušar, Darja 141, 144, 146  
Kutnjak, Denis 21, 63, 70, 116, 121, 126, 128, 138, 140, 145

## L

Langerholc, Tomaž 85  
Lapanje, Aleš 54  
Lengar, Živa 70, 121  
Lesar, Aleksander 106  
Levičnik-Höfferle, Špela 47  
Lilek, Nataša 112  
Lindič, Nataša 107  
Lipoglavšek, Luka 96, 132  
Loboda, Jure 107  
Lories, Bram 58  
Lovšin, Žana 105  
Lukač, Matjaž 47  
Lukan, Tjaša 20  
Lužnik, Dane 94

## M

Maguire, Ivana 63

Mahnič, Aleksander 127  
Maksimović Carvalho Ferreira, Olivera 126  
Maksimović, Olivera 21, 70, 121  
Malý, Petr 53  
Mandić-Mulec, Ines 20, 28, 34, 45, 58, 64, 115, 122, 124, 133, 135  
Marič, Leon 56  
Martínez Cortizas, Antonio 43  
Marušič, Monika 111  
Matičič, Janja 120  
Matijaković Mlinarić, Nives 29, 108  
Matović, Nikita 70  
Mavrič, Borut 141  
Mehle, Nataša 21, 121, 128, 145  
Mežnar, Eva 100  
Middelboe, Mathias 122  
Midden, Katarina P. van 129  
Miklavčič, Urša 130  
Mikuletič, Tina 50, 92, 109  
Milavec, Mojca 21, 70  
Minovski, Nikola 60, 107  
Mioč, Verica 49, 66  
Miović, Zarja 140  
Mlakar, Sabina 136  
Molan, Katja 47  
Motaln, Helena 111  
Mozetič, Patricija 65, 97  
Mrak, Peter 41  
Mravljak, Janez 107  
Mršol, Manca 34  
Mulec, Janez 59, 114  
Munjaković, Haris 109  
Murovec, Urška 131

## N

Nobrega Mendonca, Carlos Miguel 106  
Novak, Goran 56  
Novak, Matej 107  
Novič, Marjana 107

## O

Oarga-Mulec, Andreea 114  
Ogris, Nikica 116  
Osovníkar, Pina 83

## P

Panjtar, Gaja 124  
Papič, Bojan 49, 141, 144  
Papler, Nuša 59  
Paš, Maja 25, 59  
Patoka, Jiří 63  
Pavič, Dora 63  
Pecman, Anja 121  
Perišić Nanut, Milica 30

Petek, Marko 20, 41  
 Peterka, Matjaž 111  
 Peternel, Tjaša 107  
 Petkovič, Hrvoje 41, 59  
 Petrovec Koščak, Alenka 32  
 Petrovič, Živa 49  
 Pirc, Manca 120  
 Pirman, Tatjana 135  
 Pirš, Mateja 49  
 Pirš, Tina 146  
 Plavec, Tina Vida 42, 53  
 Plohl, Olivija 93  
 Podgorelec, Vili 52  
 Podgoršek, Martina 25  
 Podnar, Eli 58  
 Pogačar, Karmen 20  
 Pohleven, Jure 95  
 Popovič, Maja 46  
 Potrč, Melani 71  
 Predojevič, Luka 84  
 Prezelj, Nina 21, 70  
 Prijatelj Novak, Špela 120  
 Pšeničnik, Alen 41  
 Puhan, Nina 124

## R

Radič, Ljubomir 77  
 Radolič, Alen 96, 132  
 Ravnikar, Maja 21, 70, 93, 121, 128, 143  
 Ravnik, Mateja 49  
 Retelj, Matjaž 117  
 Rezar, Vida 135  
 Ribič, Alja 76  
 Ribič, Helena 102  
 Rijavec, Tomaž 54  
 Rocha, Ulisses Nunes da 34, 133  
 Rozman, Urška 110  
 Rupel, Tatjana 117  
 Rupnik, Maja 51, 52, 56, 95, 102, 127, 130, 134, 136  
 Ružič Sabljic, Eva 98

## S

Sabotič, Jerica 30  
 Sahin, Orhan 79  
 Salobir, Janez 135  
 Sebastijanović, Aleksandar 30  
 Selda Rivarez, Mark Paul 121  
 Selič Kurinčič, Tanja 32  
 Seme, Katja 80, 88, 101, 109  
 Seničar, Marija 57  
 Senič, Lana 57  
 Sever Škapin, Andrijana 108  
 Shmatkov, Maksym 41  
 Sitar, Rosvita 57  
 Skapin, Tomaž 125

Slavinec, Petra 97  
 Slemc, Lucija 41  
 Smole Možina, Sonja 104, 112, 135  
 Smrkolj, Tomaž 88  
 Soršak, Katja 89  
 Spindler, Lea 71  
 Starcevic, Antonio 41  
 Starčič Erjavec, Marjanca 84, 88, 106, 127  
 Stare, Eva 34, 118, 133  
 Stare, Katja 20  
 Steenackers, Hans 58  
 Sterniša, Meta 30  
 Steyer, Andrej 49, 50, 66, 90, 92, 109, 117  
 Stojanov, Spase 42  
 Stopar, David 34, 45, 47  
 Stopnišek, Nejc 134  
 Strašek Smrdel, Katja 88, 98

## Š

Šala, Martin 41  
 Šavli, Dominik 47  
 Šemrov, Neva 82  
 Šeruga, Aleksander 110  
 Šet, Janko 116  
 Šikić Pogačar, Maja 85, 91, 135  
 Šimunović, Katarina 34, 45, 122, 135  
 Škorić, Dijana 126  
 Šoba, Barbara 92  
 Šostar Turk, Sonja 110  
 Šoštarič, Mojca 117  
 Šoštarič, Renata 126  
 Špendal, Vesna 94  
 Štangar, Anja 115  
 Štefanič, Polonca 34, 45, 64, 115, 124, 133, 135  
 Štilec, Vida 111  
 Štrancar, Janez 30  
 Štuhec, Aneja 100  
 Šubic, Tinkara 106  
 Šuštar, Mateja 112  
 Švara, Tanja 50

## T

Taler-Verčič, Ajda 30  
 Taskovska, Milena 88  
 Terlep, Saša 47  
 Tetik, Nurten 124  
 Teughels, Wim 109  
 Tinta, Tinkara 65  
 Tkalec, Valerija 57  
 Todorović, Aleksander 49  
 Tomac, Ana 64  
 Tome, Miha 41  
 Tomič, Viktorija 94  
 Trček, Janja 26, 75, 76

Trebše, Rihard 111  
Triglav, Tina 92, 109  
Trkov, Marija 49  
Trost, Mojca 47  
Tršinar, Klemen 136  
Turk Dermastia, Timotej 138  
Turk, Dušan 30, 107  
Turk, Martina 62, 137  
Turnšek, Neža 120

## U

Učakar, Aleksander 108  
Ungar, Ana 91  
Usenik, Aleksandra 107

## V

Vašl, Zala 64  
Vedlin, Vid 66  
Velotto, Gennaro 124  
Venema, Koen 106  
Vesel, Nina 139  
Vicent, Antonio 143  
Vidmar, Robert 107  
Viduka, Ivona 124  
Virant, Petra 29  
Vlaj, Doroteja 59  
Vodovnik, Maša 77  
Vogrinc, Lana 126, 140  
Volk, Manca 83, 85, 86  
Volk, Marko 47  
Volmajer, Nika 89, 117  
Vrbnjak, Dominika 110  
Vučurovič, Ana 21, 121, 128

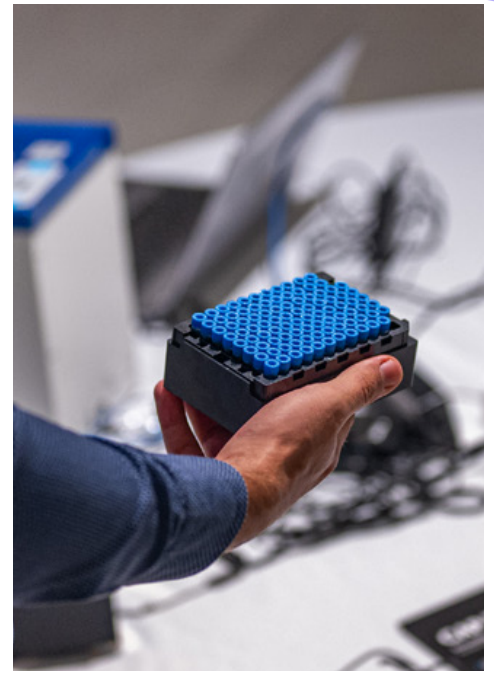
## Z

Zagorščak, Maja 20  
Zahirovič, Abida 53  
Zajc, Urška 141, 146  
Zalar, Polona 62, 125  
Zayed, Naiera 109  
Zdovc, Irena 60, 114  
Zelenik, Katja 117  
Zevnik, Kaja 68  
Zhang, Qijing 79  
Zidar, Anže 54  
Zore, Anamarija 29, 108  
Zorec, Maša 118  
Zorman Rojs, Olga 82, 135  
Zupančič, Špela 42, 54  
Zupančič, Viktor 77  
Zupan, Tanja 30

## Ž

Žgur Bertok, Darja 84  
Žlender, Tanja 52  
Žohar Čretnik, Tjaša 32  
Županič, Anže 21, 70

# THE SCIENCE CORNER



## Creating an impact in science

Kemomed d.o.o.

Kemomed is an innovative company that has been offering solutions in the field of biomedicine and analytical chemistry for 25 years.

Currently Kemomed offers products from the fields of genetics, biotechnology, molecular biology, cell biology & 3D bioprinting, in-vitro diagnostics, genome editing, biobanking, small lab inventory and equipment, analytical chemistry instruments and consumables.



Our accredited calibration laboratory is ISO17025 and ISO 13485 certificates holder that takes care of the accuracy of your volumetric devices.

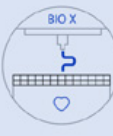
The KEMOMIND science platform for sharing knowledge is one of the region's most creative and interactive educational platforms. One of the current open projects is COLIBRY, which supports Slovenian scientists in sequencing within Slovenia.

More info about COLIBRY project :



PRINAŠAMO  
REŠITVE,  
PODPIRAMO  
ZNANOST



 **MAR 8**  
3D Bioprinting  
The Bioprinting workshop in Slovenia

 **JUNE 20**  
The Kemomind Science conference - Cell Biology

 **JULY 15**  
Imaging tips & tricks with Biotech Experts

 **SEP 20**  
Workshop - Synthetic Biology

Find all our next webinars and past presentations at [www.kemomind.com](http://www.kemomind.com)

 **OCT 16**  
BIBANKING SLOVENIJA



# bia

www.bia.si



TRUSTED  
LAB  
PARTNER

# INFORS

We bring life to your laboratory

# biolog



# KNAUER

# LabTech




# Advion Interchim scientific



# Bio-Works

 [www.bia.si](http://www.bia.si)

 [sales@bia.si](mailto:sales@bia.si)

 Cesta v Gorice 34,  
1000 Ljubljana

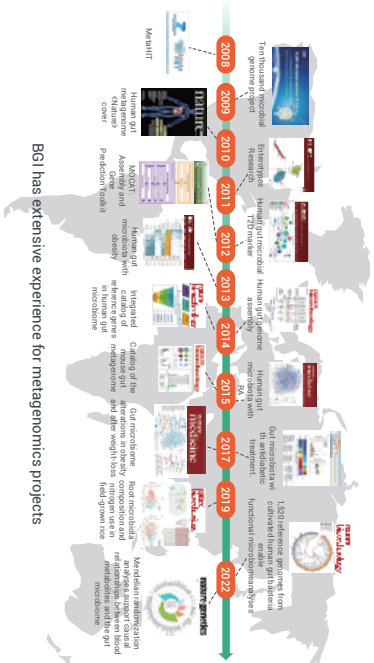
# DNBSEQ™ SERVICE OVERVIEW

## Metagenomic Sequencing



### Service Description

Metagenomics studies of genetic material that is directly recovered from environmental samples have benefited greatly from advanced NGS technology as a method for the exploration of microbial biodiversity. BGI's metagenomics survey service applies whole genome shotgun sequencing of DNA isolated from environmental samples, with the advantages of high throughput and high coverage. It can provide information not only on species composition and abundance, but also on functional genes, gene differences between samples, metabolic pathways and gene resource mining for bioactive products.



BGI has extensive experience for metagenomics projects

### Sequencing Service Specification

DNBSEQ Metagenomics Survey Sequencing services are executed with the DNBSEQ sequencing system.

#### Sequencing Service

- 150bp Paired-End sequencing
- Data output, standard and custom data analysis
- Available data storage and bioinformatics applications

#### Sequencing Quality Standard

- Guaranteed  $\geq 80\%$  of bases with quality score  $\geq Q30$

#### Turnaround Time

- Typical 18 working days from sample QC acceptance to filtered raw data availability
- Expedited services are available, contact your local BGI specialist for details



Quality Data



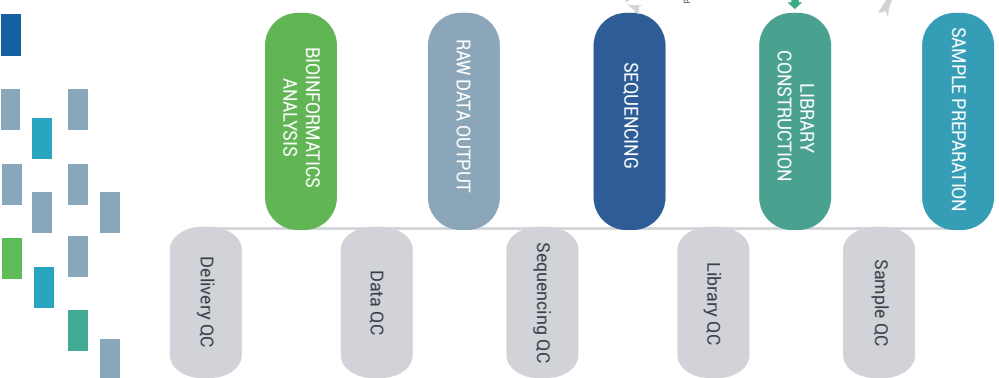
Fast TAT



Cost Effective

### Project Workflow

We care for your samples from the start through to the result reporting. Highly experienced laboratory professionals follow strict quality procedures to ensure the integrity of your results.



### DNBSEQ Sequencing System

DNBSEQ is an innovative high-throughput sequencing solution, developed by BGI's Complete Genomics subsidiary in Silicon Valley. The system is powered by combinatorial Probe-Ancor Synthesis (cPAS), linear isothermal Rolling-Circle Replication and DNA Nanoballs (DNB™) technology, followed by high-resolution digital imaging.



The combination of linear amplification and DNB technology reduces the error rate while enhancing the signal. The size of the DNB is controlled in such a way that only one DNB is bound per active site on the DNBSEQ flow cell. This densely patterned array technology provides optimal sequencing accuracy and increases flow cell utilization.

#### STANDARD ANALYSIS

- Data filtering
- Alignment
- Metagenomic De Novo assembly
- Non-redundant gene catalogue
- Prophage transposable element prediction
- Functional annotation based on KEGG, CAZY, eggNOG, CARD
- Species composition and diversity analysis
- Quantitative and differential analysis of gene abundance
- Principal component analysis

#### CUSTOMIZED ANALYSIS

Further customization of bioinformatics analysis to suit your unique project is available. Please contact your BGI technical representative.

#### SAMPLE REQUIREMENTS

We can process your extracted genomic DNA from a variety of environmental samples with the following general requirements:

SAMPLE	DNA AMOUNT AND CONCENTRATION	MINIMUM SAMPLE VOLUME
Regular	Intact genomic DNA $\geq 200$ ng concentration $\geq 8$ ng/ $\mu$ L	15 $\mu$ L

### Request for Information or Quotation

Contact your BGI account representative for the most affordable rates in the industry and to discuss how we can meet your specific project requirements or for expert advice on experiment design, from sample to bioinformatics.

info@bgi.com

www.bgi.com

#### BGI Offices

BGI Americas	BGI Europe	BGI Asia	BGI Australia
One Broadway, 14th Floor Cambridge, MA 02142, USA	Jutrzenki 12 A, 02-230 Warszawa Poland	Building NO.7, BGI Park, Yantian District, Shenzhen, Guangdong Province, China	L6, CBRC, 300 Herston Road, Herston, Brisbane, Queensland 4006, Australia

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures (except as specifically noted).

Copyright© BGI 2023. All trademarks are the property of BGI or their respective owners. This material contains information on products targeted to a wide range of audiences and could contain product details or information otherwise not accessible or valid in your country. Please be aware that we do not take any responsibility for accessing such information, which may not comply with any legal process, regulation, registration, or usage in the country of your origin. Unless otherwise informed, certain sequencers and sequencing reagents are not available in selected countries or regions. Please get in touch with a representative for regional availability. The company reserves the right of final interpretation.



BGI Genomics



We Sequence. You Discover

# KOBIS

Your Samples

Our Experience

## ANALYTICAL EQUIPMENT REAGENTS

MOLECULAR  
BIOLOGY

MOLECULAR  
SPECTROSCOPY

CLINICAL  
DIAGNOSTICS

REOLOGY

MASS  
SPECTROMETRY

CHROMATOGRAPHY



[info@kobis.si](mailto:info@kobis.si)  
[www.kobis.si](http://www.kobis.si)



# Complete Solutions in Laboratory and Process Analytics

- PCR, qPCR, Droplet Digital PCR
- BioSpectrometers
- Light and AFM microscopy
- Cell Imagers
- Cell Counters/Sorters
- Washers/Readers
- Electrophoresis
- Western blotting
- Antibodies
- “Single Cell” Sequencing
- Spatial Transcriptomics
- In Situ Hybridisation
- Fish, Karyotyping
- Microscopy
- Laboratory Grade Water Systems (Type 1, 2, 3)
- Centrifuges
- PH Meters
- Analytical Balances
- Pipettes
- Biological Safety Cabinets
- Laboratory Refrigerators & Freezers
- Other Laboratory Equipment

## Ko pomislite na merjenje, pomislite na LOTRIČ Metrology.

### NADZORNI SISTEMI PO MERI

Za 100 % nadzor in avtomatizacijo proizvodnih procesov. Akreditacija po ISO 9001.

### PRESKUŠANJA

Pet preskusnih laboratorijev z najsodobnejšo opremo. Odobreni s strani koncerna VW.

### ZASTOPSTVA

Več kot 30 ponudnikov vrhunske merilne opreme za področje industrije, laboratorijev, farmacije, medicine, lekarn, mobilnosti.

### UGOTAVLJANJE SKLADNOSTI

Ugotavljanje skladnosti s predpisi nacionalne in evropske zakonodaje, s harmoniziranimi in drugimi standardi ter z zahtevami proizvajalcev.

### KALIBRACIJE

464 metod, od tega 225 akreditiranih. Akreditacija po ISO/IEC 17025.

### CERTIFICIRANJE

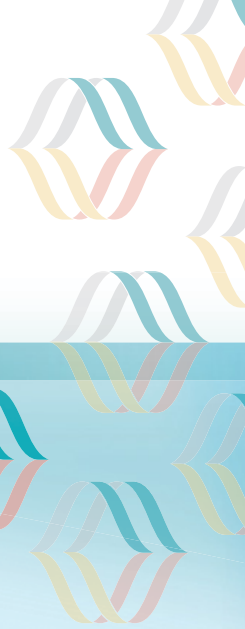
Priglašen organ (NB) 2897 za področje osebne varovalne opreme.

Že več kot 30 let se kot družinsko podjetje ukvarjamo z razvojem in izvedbo meroslovnih rešitev. Zrasli smo v evropsko skupino LOTRIČ Metrology, ki združuje več kot 190 strokovnjakov s področja meroslovja, zaposlenih v 10 podjetjih v 8 državah.





mediline



## Prodaja in servis specializirane laboratorijske opreme, potrošnih materialov in diagnostičnih reagentov.

- Mikrobiologija
- Molekularna biologija
- Celična biologija
- Analitika
- Laboratorijska diagnostika
- Sekvenciranje naslednje generacije (NGS)
- Avtomatizacija
- Bioinformacijske rešitve ...

[www.mediline.si](http://www.mediline.si)



# Looking for the Right Laboratory System? Our GEP Recommendation Can Help

Our team of experts will guide you through a few simple questions to provide a customized recommendation specific to your requirements.

With GEP-R, we provide:

- Tailored system recommendation
- Risk-based routine testing plan
- Corresponding service plan

All in one concise design qualification document.

Request your customized  
GEP Recommendation

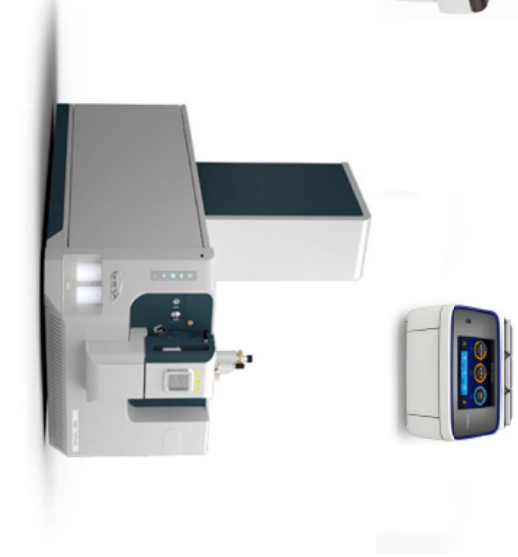
► [www.mt.com/GEP](http://www.mt.com/GEP)



**METTLER TOLEDO**

# omega

Že skoraj 30 let ponujamo rešitve na področju kemije, molekularne biologije in mikrobiologije, farmacije, imunologije, onkologije, forenzike in diagnostike



revvity



**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

Authorized  
Distributor

Thermo Scientific  
Applied Biosystems  
Invitrogen  
Gibco  
Ion Torrent



- **Mikrobiologija**

- Predpripravljena in dehidrirana gojišča
- Selektivni dodatki in obogatitve
- Mikrobiološka filtracija
- Membranski filtri
- Vzorcevalniki zraka
- Diluterji
- Sistemi za anaerobe

- **Laboratorijski aparati in oprema**

- **Dozirna tehnika**

- **Kemikalije in reagenti**

- **Diagnostika**

- **Čisti prostori (Cleanroom)**

- **Izdelki za varno delo v laboratoriju**

## SERVIS

- MEDICINSKE IN LABORATORIJSKE TEHNIKE



## PRODAJA

- MEDICINSKE IN LABORATORIJSKE TEHNIKE
- ČISTILNIH IN DEZINFEKCIJSKIH SREDSTEV



059 025 910  
051 385 888  
031 511 241



info@sem lab.si



Peruzzijeva ulica 50, 1000 Ljubljana





[www.aciesbio.com](http://www.aciesbio.com)

# BIOTEHNOLOŠKE INOVACIJE ZA TRAJNOSTNO PRIHODNOST



# Discover Avantor's solutions for microbiology

Avantor offers a wide range of solutions for microbiological control, from sample preparation to final identification of microorganisms, dedicated to the industrial market sector.

---

**CONTACT:**

[inbound.slovenia@avantorsciences.com](mailto:inbound.slovenia@avantorsciences.com)

---

**MORE:**

Visit page [Microbiology | VWR](#)





**Mast  
Group**

**CHROMagar**



**SSI  
DIAGNOSTICA**



*Maritim*



**Abbott**



**TECHLAB®**

# Izboljšajte homogenizacijo biopsijskih vzorcev: **ProbeAX Evolution**

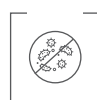


**Nov namizni sistem za homogenizacijo tkivnih vzorcev.** Izboljšana diagnostika v epruvetah za enkratno uporabo.



## **Edinstvena visokokakovostna rešitev**

Homogenizacija z mletjem vzorca z veliko hitrostjo sprosti bakterije, glive in biofilme s tkiv. Primerno za subkultiviranje in molekularno diagnostiko.



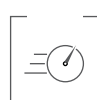
## **Zmanjšajte možnost kontaminacije**

Vzorec tkiva se homogenizira neposredno v vzorčni epruveti, brez dodatne obdelave, ni nevarnosti kontaminacije.



## **Enostavna uporaba**

Nizka raven hrupa med homogenizacijo. Dodatna varnostna funkcija safety lock med obdelavo.



## **Prihranite stroške in čas**

Epruvete za enkratno uporabo, hitra obdelava vzorcev, ni potrebe po čiščenju epruvet ali posod.

## Sepsa – urgentno stanje z možnimi resnimi zapleti

Axonlab ponuja, širok nabor potrošnega materiala, za varen odvzem vzorca, vse do visokotehnoloških diagnostičnih metod za mikrobiološke laboratorije.

Inovativna diagnostika lahko skrajša čas od odvzeta vzorca do rezultata. To lahko pripomore k **izboljšanju preživetja in rešuje življenja!**

### Diagnostika iz polne krvi

Molekularna detekcija bakterij, gliv in rezistentnih genov



### Cube Dx HYBORG s tehnologijo HYBCELL

Inovativni cilindrični microrray za detekcijo do 100 mikroorganizmov in rezistentnih genov v treh urah iz samo 0,5ml polne krvi. Resnična inovativnost v diagnostiki sepse.

### Hiter antibiogram iz pozitivne hemokulture

MIC v 4-6 urah



### QuantaMatrix dRast™

Hiter, popolnoma avtomatiziran MIC skluden z EUCAST. Randomiziran dostop z do 12 vzorci. Na voljo panel za gram pozitivne in gram negativne bakterije.



**JAFRAL**

passion for biosolutions

Bodi radoveden

[www.jafRAL.com](http://www.jafRAL.com)





**JAFRAL**  
passion for biosolutions

Bodi vztrajen

[www.jafral.com](http://www.jafral.com)



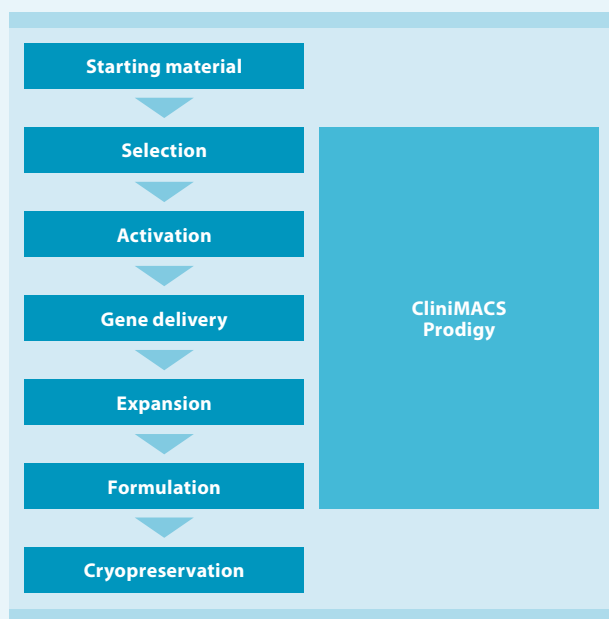
# The CliniMACS Prodigy<sup>®</sup>

Mastering the complexity of cell processing

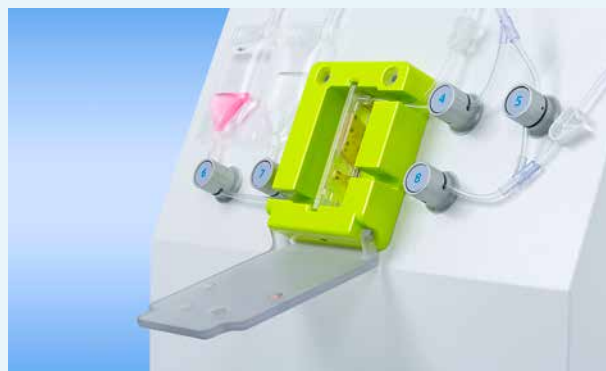
- A single closed system from starting material to final cellular product
- Full automation of complex procedures, including manufacturing of gene-engineered T cells
- Integrated electroporation system for non-viral gene delivery
- Multiple sampling pouches for convenient IPC/QC

The promise of cell and gene therapy is great, but not without its challenges. Complex processes, such as CAR T cell manufacturing, often require multiple steps that are performed across several devices. With the introduction of hands-on manipulations like cell transfer between vessels, the risk of contamination, human error, and cell loss increases.

The CliniMACS Prodigy® automates cell processing from starting material to final cellular product in a single benchtop instrument. All major cell manufacturing steps are automated and standardized for increased reproducibility in a closed system to enable the production of GMP-compliant cell products.



**Figure 1:** The CliniMACS Prodigy TCT Process for the manufacturing of gene-engineered T cells integrates and automates critical steps of the procedure.



**Figure 2:** Critical steps in the cell manufacturing process, including electroporation, are performed in the closed system of the CliniMACS Prodigy.

A variety of cell manufacturing procedures are made possible by the CliniMACS Prodigy, including:

- **Automated generation of CAR T cells**
  - Verified workflow with MACS® GMP Products
  - Enrichment step for the generation of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> or CD62L<sup>+</sup> cells
  - Easy sample collection for IPC/QC
- **Ex vivo GMP-compliant antigen loading of DCs**
- **Automated manufacturing of antigen-specific T cells**
- **Custom processes**
  - Density gradient centrifugation
  - Volume reduction
  - Buffer exchange
  - Selection and cultivation of hematopoietic stem cells and induced pluripotent stem cells

The CliniMACS Prodigy also enables the translation of individual cell product manufacturing procedures into automated GMP-compliant processes through Miltenyi Biotec's customized programming service.

**Ask your local Miltenyi Biotec representative for more information or visit [www.miltenyibiotec.com/prodigy](http://www.miltenyibiotec.com/prodigy)**



**Miltenyi Biotec GmbH** | Friedrich-Ebert-Straße 68 | 51429 Bergisch Gladbach | Germany | Phone +49 2204 8306-0 | Fax +49 2204 85197  
 macs@miltenyibiotec.de | [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)

Miltenyi Biotec provides products and services worldwide. Visit [www.miltenyibiotec.com/local](http://www.miltenyibiotec.com/local) to find your nearest Miltenyi Biotec contact.

Unless otherwise specifically indicated, Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for therapeutic or diagnostic use. MACS® GMP Products are for research use and *ex vivo* cell culture processing only, and are not intended for human *in vivo* applications. For regulatory status in the USA, please contact your local representative. MACS GMP Products are manufactured and tested under a quality system certified to ISO 13485 and are in compliance with relevant GMP guidelines. They are designed following the recommendations of USP <1043> on ancillary materials. The CliniMACS® System components, including Reagents, Tubing Sets, Instruments, and PBS/EDTA Buffer, are designed, manufactured and tested under a quality system certified to ISO 13485.

In the EU, the CliniMACS System components are available as CE-marked medical devices for their respective intended use, unless otherwise stated. The CliniMACS Reagents and Biotin Conjugates are intended for *in vitro* use only and are not designated for therapeutic use or direct infusion into patients. The CliniMACS Reagents in combination with the CliniMACS System are intended to separate human cells. Miltenyi Biotec as the manufacturer of the CliniMACS System does not give any recommendations regarding the use of separated cells for therapeutic purposes and does not make any claims regarding a clinical benefit. For the manufacturing and use of target cells in humans the national legislation and regulations – e.g. for the EU the Directive 2004/23/EC ("human tissues and cells"), or the Directive 2002/98/EC ("human blood and blood components") – must be followed. Thus, any clinical application of the target cells is exclusively within the responsibility of the user of a CliniMACS System.

In the US, the CliniMACS CD34 Reagent System, including the CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Sets TS and LS, and the CliniMACS PBS/EDTA Buffer, is FDA approved; all other products of the CliniMACS Product Line are available for use only under an approved Investigational New Drug (IND) application or Investigational Device Exemption (IDE). In the US, the CliniMACS Prodigy® T Cell Transduction Process is available for research use only. CliniMACS MicroBeads are for research use only and not for human therapeutic or diagnostic use.

CliniMACS, CliniMACS Prodigy, MACS, and the MACS logo are registered trademarks or trademarks of Miltenyi Biotec GmbH and/or its affiliates in various countries worldwide. Copyright © 2018 Miltenyi Biotec GmbH and/or its affiliates. All rights reserved.

LightCycler®



# Sistem LightCycler® PRO

Osvetlite pot od raziskav do klinične diagnostike z naslednjim razvojem v Rochevem PCR portfelju.





**know now**

*what the next steps are to protect her from **cervical cancer***

# Roche Cervical Cancer Solutions

SCREEN

**cobas**<sup>®</sup>  
HPV TEST

TRIAGE

**CINtec**<sup>®</sup> **PLUS**  
CYTOLOGY

DIAGNOSE

**CINtec**<sup>®</sup>  
HISTOLOGY

MC-SI-00486  
For HCPs only

Roche farmacevtska družba d.o.o  
Stegne 13G  
1000 Ljubljana  
[www.roche.si](http://www.roche.si)  
[www.zdravjezensk.si](http://www.zdravjezensk.si)

[zdravjezensk.si](http://zdravjezensk.si)



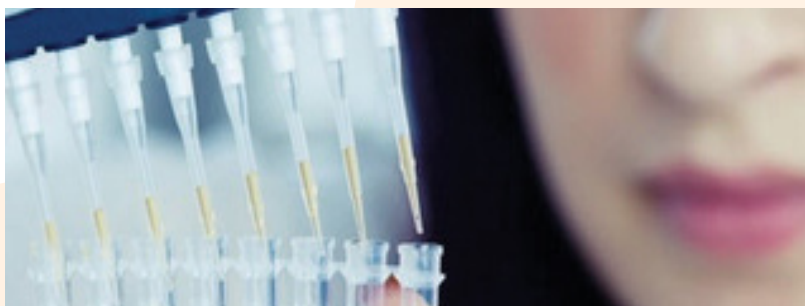
## ANALITIKA

**UNBELIEVABLY  
POWERFUL**  
REMARKABLY SMALL



Agilent Technologies ponuja širok nabor plinskih in tekočinskih kromatografov, masno selektivnih detektorjev ter z GLP skladno kromatografsko programsko opremo. Kjerkoli so potrebni zanesljivi in ponovljivi rezultati, kot jih zahtevajo najnovejši analitski standardi, lahko računate na odlične inštrumente z zanesljivo storitveno podporo.

## BIO PROGRAM



Široka ponudba Agilent mikromrež, NGS panelov za selektivno bogatenje tarč, velik izbor zanesljivih reagentov - (Q)PCR, kloniranje CRISPR / Cas, mutageniza - inovativni inštrumenti ter napredna programska oprema omogočajo fleksibilnost in specifičnost bioloških ter genetskih raziskav od genske ekspresije, strukture in funkcije proteinov, pa vse do spremljanja metabolizma živih celic.

## PATOLOGIJA



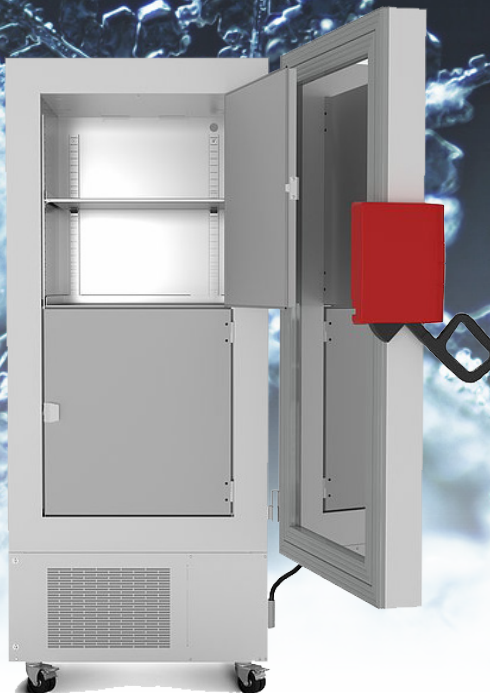
Agilent Dako integrirane rešitve s področja patologije za IHC, H&E, specialna barvanja in FISH zagotavljajo zanesljive diagnostične rezultate. Preverjeni reagenti, protitelesa in barvalci gradijo na zaupanju in prepričanju v to kar vidite. Razvoj molekularne genetike za patologijo vam omogoča ostati v središču ter brez težav slediti najnovejšim trendom s področja PDL-1 in uporabe NGS v patologiji. Premikajte meje mogočega že danes!

# Globoki zamrzovalniki serija UF V -90°C

**UF V 350**



**UF V 500**



**UF V 700**



Stojala, kasete in predalniki  
iz nerjavečega jekla,  
aluminija ali kartona za vsak  
zamrzovalnik !



Stojala so primerna za:

- Vse proizvajalce
- Vse modele, pokončne in ležeče
- Krioškafle ali MPT

**Donau Lab d.o.o., Ljubljana**  
Tbilisijska 85  
SI-1000 Ljubljana  
[www.donaulab.si](http://www.donaulab.si)  
[office-si@donaulab.com](mailto:office-si@donaulab.com)



**DONAU LAB** Ljubljana  
Member of LPPgroup



**MEDIAS i**

*Skrbimo za kvaliteto  
vašega zdravljenja!*



*Prednost kvaliteti  
že več kot*

**30**  
LET



**BD BIOTEHNOLOGIJA**

- Pretočni citometri
- Monoklonska protitelesa
- Celične kulture
- Falcon laboratorijska plastika
- Molekularna diagnostika

**BD MIKROBIOLOŠKI SISTEMI**

- Bactec sistemi za hemokulture
- Sensi diski
- Gojišča (Difco, BBL) in reagenti
- Identifikacijski sistemi Crystal, Phoenix ID/AST
- MGIT za TBC sistem

**BD MEDICAL**

- Diabetes - insulinke in igle za peresnike
- IV terapija
- Injekcijski sistemi
- Anestezija

**BD VACUTAINER**

- Sistemi za odvzem krvi
- Urinski sistemi

MEDIAS i je zastopnik in distributer za:



**BD**