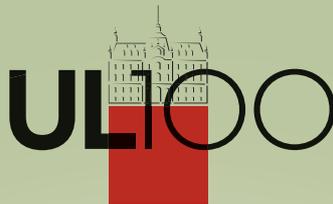


Univerza v Ljubljani



Prvi doktorski dan

# Bi(o)znanosti?

karierno-družabni dogodek

Zbornik  
povzetkov

Ljubljana, 2019

*Znanost o življenju – znanje za življenje*



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,  
ZNANOST IN ŠPORT



EVROPSKA UNIJA  
EVROPSKI  
SOCIALNI SKLAD  
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST

EVROPSKA UNIJA  
EVROPSKI SKLAD ZA  
REGIONALNI RAZVOJ  
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST



SRIP  
ZDRAVJE  
MEDICINA

Karierni centri Univerze v Ljubljani – kompas  
na vaši karierni poti

*Naložbo sofinancirata Republika Slovenija in  
Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.*

*Naložbo sofinancirata Republika Slovenija  
in Evropska unija iz Evropskega sklada za  
regionalni razvoj.*

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

**Zbornik povzetkov**

**Ljubljana, 2019**

**Prvi doktorski dan Bi(o)znanosti  
Zbornik povzetkov**

**Založnik zbornika:**

Biotehniška fakulteta  
Jamnikarjeva 101  
1000 Ljubljana

**Urednik zbornika:**

Prof. dr. Peter Dovč

**Organizacijski odbor:**

Študenti Bioznanosti (Urban Bogataj, Blaž Ferjančič, Urša Pečan, Vladka Petrovič Šenk, Mihael Špacapan), Programski svet Bioznanosti in Karierni center Biotehniške fakultete v sodelovanju z SIS EGIZ (SRIP Zdravje)

**Datum in kraj prireditve:**

16. maj 2019  
Biotehniška fakulteta  
Jamnikarjeva 101  
1000 Ljubljana

**Tehnično urejanje zbornika:**

Urban Bogataj

**Prva izdaja:**

Ljubljana, 2019

**Število strani:**

105

**Naklada:**

Elektronska publikacija

**Publikacija je dostopna na povezavah:**

<http://www.bioznanosti.si/>

<https://www.sis-egiz.eu/>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani COBISS.SI-ID=300062208 ISBN 978-961-6379-51-9 (pdf)
---

Način dostopa (URL): [http://www.bioznanosti.si/images/novice/Zbornik\\_povzetkov-doktorski\\_dan/Bioznanosti-2019-e-zbornik.pdf](http://www.bioznanosti.si/images/novice/Zbornik_povzetkov-doktorski_dan/Bioznanosti-2019-e-zbornik.pdf)

## KAZALO

<b>AGRONOMIJA .....</b>	<b>1</b>
<b>Anamarija Jagodič</b>	
MULTITROFIČNE INTERAKCIJE MED RASTLINAMI, TALNIMI ŠKODLJIVIMI ŽUŽELKAMI IN ENTOMOPATOGENIMI OGORČICAMI .....	2
<b>AGROŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA .....</b>	<b>4</b>
<b>Katarina Belcijan</b>	
SEKS IN EVOLUCIJA <i>B. subtilis</i> .....	5
<b>Maja Bolješić</b>	
MIKROBNE INTERAKCIJE MED SEVOMA <i>Bacillus subtilis</i> v BIOFILMIH .....	7
<b>Andi Erega</b>	
MEDVRSTNE MIKROBNE INTERAKCIJE.....	9
<b>Žiga Pandur</b>	
STABILNOST LIPIDNIH VEZIKLOV NA RAZLIČNE FIZIKALNO-KEMIJSKE DEJAVNIKE .....	11
<b>Dina Ramić</b>	
POTENCIAL RASTLINSKIH PRIPRAVKOV PROTI BAKTERIJI <i>Campylobacter jejuni</i> .....	13
<b>BIOLOGIJA .....</b>	<b>15</b>
<b>Janez Kermavnar</b>	
SPREMEMBE GOZDNE VEGETACIJE PO POSEKU DREVES: POMEN FUNKCIONALNIH LASTNOSTI RASTLIN .....	16
<b>Vesna Oražem</b>	
IZOBRAŽEVANJE ZA TRAJNOSTNO SOBIVANJE Z VELIKIMI ZVERMI .....	18
<b>Shakira G. Quiñones-Lebrón</b>	
TEST NARAVNIH IN SPOLNIH SELEKCIJSKIH PRITISKOV PRI VRSTI PAJKA Z IZRAŽENIM VELIKOSTNIM SPOLNIM DIMORFIZMOM.....	20
<b>Nina Ražen</b>	
ZAZNAVANJE VOLČJIH LEGEL: ZNANOST NI LE ZA IZBRANCE - K NJEJ LAHKO VSAKDO POMEMBNO PRISPEVA.....	22
<b>Eva Turk</b>	
BIOGEOGRAFIJA PAJKOV IZ DRUŽINE NEFILIDOV .....	24
<b>Lars Zver</b>	
ARHEOGENETIKA STARODAVNIH BIZONOV IN ŽELEZNODOBNEGA GOVEDA V SLOVENIJI ..	26
<b>BIOINFORMATIKA.....</b>	<b>28</b>
<b>Maja Vodopivec</b>	
SLEDENJE METABOLNIM TOKOVOM V BIOPROCESU CELIC CHO .....	29

<b>BIOTEHNOLOGIJA.....</b>	<b>31</b>
<b>Stina Hedžet</b>	
BAKTERIJSKI PREDATORJI, KI LAHKO MODULIRAJO ČREVESNO MIKROBIOTO .....	32
<b>Jernej Horvat</b>	
ALI LAHKO DODATEK AMINOKISLIN V HRANILIH IZBOLJŠA PRODUKT IN UČINKOVITOST CELIC CHO V BIOPROCESU? .....	34
<b>Ajda Marič</b>	
KAJ IMAJO SKUPNEGA MIKROORGANIZMI IN UPORABNIŠKA IZKUŠNJA? .....	36
<b>Tadej Menegatti</b>	
IMOBILIZACIJA CELIC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> V MIKROREAKTORJU Z UPORABO HIDROGELA .....	38
<b>Sandra Omejec</b>	
PRIPRAVA ČLOVEŠKEGA PROTITELESA PROTI HEPATITISU B IZ KRVI CEPLJENIH DAROVALCEV .....	40
<b>Eva Praprotnik</b>	
LABORATORIJSKO OCENJEVANJE VIRULENCE ENTOMOPATOGENIH GLIV ZA NADZOR STRUN ( <i>Agriotes</i> sp. L.) .....	42
<b>Mihael Špacapan</b>	
KOMUNIKACIJA SLUZASTIH BAKTERIJ V TLEH.....	44
<b>Tanja Tesovnik</b>	
VPLIV PESTICIDOV IN PATOGENOV NA IMUNSKI SISTEM MEDONOSNE ČEBELE ( <i>Apis mellifera</i> ).....	46
<b>Beti Vidmar</b>	
MIKROBNA RAZGRADNJA KERATINA .....	48
<b>EKONOMIKA NARAVNIH VIROV .....</b>	<b>50</b>
<b>Ilona Rac</b>	
SKUPNA KMETIJSKA POLITIKA EU IN OKOLJE.....	51
<b>HORTIKULTURA .....</b>	<b>53</b>
<b>Saša Gačnik</b>	
VPLIV SALICILNE IN METIL-SALICILNE KISLINE NA RAST MICELIJA RAZLIČNO AGRONOMSKO POMEMBNIH GLIV TER NA OKUŽBO JABOLK Z GLIVO <i>Monilinia laxa</i> L.....	54
<b>Mateja Šenica</b>	
ZDRAVJU KORISTNE IN ŠKODLJIVE SNOVI V NEKATERIH SADEŽIH.....	56
<b>KRAJINSKA ARHITEKTURA .....</b>	<b>58</b>
<b>Andrej Bašelj, Tadej Bevk, Barbara Kostanjšek</b>	
ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTNEGA RAZVOJA KRAJIN POD SODOBNIMI RAZVOJNIMI PRITISKI .....	59
<b>LES IN BIOKOMPOZITI .....</b>	<b>61</b>

<b>Jaka Levanič</b>	
NANOCELULOZNI HIDROGELI – BIOMEDICINSKI POTENCIAL DREVES .....	62
<b>Jaša Saražin</b>	
LEPILA NA OSNOVI TANINA IN LIGNINA .....	64
<b>Jure Žigon</b>	
UPORABA PLAZME ZA BOLJŠO KOMPATIBILNOST POVRŠINE LESA S PREMAZI .....	66
<b>NANOZNANOSTI</b> .....	<b>68</b>
<b>Manca Pajnič</b>	
PROBLEMATIKA RAZISKOVANJA S ČLOVEŠKO KRVJO – PREDANALITIČNI IZZIVI .....	69
<b>Neža Repar</b>	
LIPIDNE KAPLJE – ODZIV CELICE NA STIK Z NANODELCI .....	71
<b>Matevž Tomaževič</b>	
PORAZDELITEV KOLČNEGA TLAKA PRI UMETNEM KOLČNEM SKLEPU – NAPOVEDNI DEJAVNIK IZPAHA KOLČNE PROTEZE .....	73
<b>PREHRANA</b> .....	<b>75</b>
<b>Blaž Frejančič</b>	
IŠČE SE: PREHRANSKA VLAKNINA APLIKACIJA METODE AOAC 2011.25 ZA DOLOČANJE PREHRANSKE VLAKNINE IN NJEN VPLIV NA OCENO VNOSA Z ŽIVILI .....	76
<b>Živa Lavriša</b>	
OGLAŠEVANJE ŽIVIL OTROKOM V MEDIJIH .....	78
<b>Diana Paveljšek</b>	
KOMUNIKACIJA KORISTNIH BAKTERIJ S ČREVESNIMI CELICAMI .....	80
<b>UPRAVLJANJE GOZDNIH EKOSISTEMOV</b> .....	<b>82</b>
<b>Barbara Žabota</b>	
ALPSKI GOZDOVI SO »ROCK« ZVEZDE .....	83
<b>ZNANOSTI O CELICI</b> .....	<b>85</b>
<b>Tjaša Potočnik</b>	
VPLIV ZUNAJCELIČNEGA pH NA USPEŠNOST GENSKE TRANSFEKCIJE Z ELEKTROPORACIJO <i>in vitro</i> .....	86
<b>Luka Predojevič</b>	
OCENITEV PATOGENEGA POTENCIALA HUMANIH SEVOV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> NA BIOMIMETIČNEM <i>in vitro</i> MODELU PRAŠIČJEGA UROTELIJA .....	88
<b>Tina Smolič</b>	
VPLIV STRESNIH DEJAVNIKOV NA BIOGENEZO LIPIDNIH KAPLJIC V ASTROCITIH .....	90
<b>Angelika Vižintin</b>	
VPLIV DOLŽINE PAVZE NA PERMEABILIZACIJO IN PREŽIVETJE CELIC PO ELEKTROPORACIJI Z VISOKOFREKVENČNIMI BIFAZNIMI PULZI .....	92

<b>ZNANOST O ŽIVALIH.....</b>	<b>94</b>
<b>Jakob Leskovec</b>	
IMAJO POLIFENOLI OLJK VPLIV NA ANTIOKSIDATIVNO OBRAMBO TUDI PRI PRAŠIČIH? .....	95
<b>ŽIVILSTVO .....</b>	<b>97</b>
<b>Polona Megušar</b>	
RAZVOJ BREZGLUTENSKEGA PEKOVSKEGA IZDELKA .....	98
<b>Meta Sterniša</b>	
ZMANJŠANJE MIKROBIOLOŠKE KONTAMINACIJE RIB PRIMER – NAVADNI KRAP.....	100
<b>Luka Šturm</b>	
KAPSULACIJA PROPOLISA KOT REŠITEV NJEGOVE SLABE VODOTOPNOSTI.....	102
<b>Polona Zabukovec</b>	
VPLIV KVASOVKAM DOSTOPNEGA DUŠIKA IN RAZMERJA VRST KVASOVK V ZDRUŽENI STARTERSKI KULTURI NA KAKOVOST VINA.....	104

## **AGRONOMIJA**

## MULTITROFIČNE INTERAKCIJE MED RASTLINAMI, TALNIMI ŠKODLJIVIMI ŽUŽELKAMI IN ENTOMOPATOGENIMI OGORČICAMI

Anamarija JAGODIČ<sup>1</sup>, Žiga LAZNIK<sup>2</sup>, Iztok Jože KOŠIR<sup>3</sup>

**Povzetek:** Multitrofične interakcije, ki se nanašajo na varstvo rastlin pred herbivori opisujejo ekološke vplive treh ali več trofičnih ravni. Te ravni zavzemajo rastlino, škodljive žuželke in naravne sovražnike škodljivih žuželk. Predatorji, patogeni organizmi in parazitoidi, ki napadejo herbivore, imenovani tudi naravni sovražniki v kontekstu multitrofičnih interakcij, koristijo rastlinam tako, da odstranijo ali ovirajo prehranjevalne navade herbivorov. Entomopatogene ogorčice (EO) so organizmi, ki se uporabljajo v programih biotičnega varstva rastlin. Uvrščamo jih med parazite žuželk. Tla predstavljajo naravni habitat EO. Žuželke parazitirajo samo infektivne ličinke (IL) EO, ki v črevesnih veziklih nosijo simbiotske bakterije. Entomopatogene ogorčice simbiotskim bakterijam predstavljajo vektor, s pomočjo katerega vstopijo v gostiteljevo telo, pri čemer pričnejo izločati toksine, zaradi katerih žuželka po 24 – 72 h pogine. EO se pri gibanju v tleh orientirajo tako, da sledijo kemičnemu signalu (kemotaksija). S pomočjo kemotaksije zaznajo gostitelja v okolju, oz. zaznajo področje kjer je večja verjetnost, da se bo le-ta nahajal. Entomopatogene ogorčice se lahko uporablja za zatiranje škodljivcev brusnic, artičok, jablan, travne ruše in drugih gojenih rastlin. Kljub širokemu spektru uporabe EO pa se moramo zavedati dejstva, da je njihova učinkovitost v primerjavi s kemičnimi sredstvi manjša. Učinkovitost uporabe biotičnih agensov je lahko zelo variabilna, vendar pa ne predstavlja tveganja za okolje. Raziskovalci so dokazali, da so rastline razvile številne obrambne mehanizme za obrambo pred škodljivci. In sicer rastline lahko izločajo določene hlapljive snovi, ki privabljajo naravne sovražnike škodljivcev. Z regulacijo hlapljivih snovi pri rastlinah lahko dosežemo mnogo boljše rezultate v biotičnem varstvu, zlasti v primeru uporabe EO. Področje poznavanja trofičnih interakcij tako omogoča številne nove možnosti v biotičnem varstvu rastlin. Namen naših raziskav je ugotoviti kako hlapljive organske snovi (HOS), ki jih izločajo poškodovane korenine rastlin, zaradi napada talnih herbivorov, vplivajo na odzivnost entomopatogenih ogorčic. Metodika našega raziskovanja poteka v treh stopnjah, in sicer na prvi stopnji raziskav najprej vzgojimo preučevane rastlinske vrste nato sledi faza vzorčenja za namen biokemijskih analiz. Na drugi stopnji raziskav sledijo biokemijske analize vzorcev. Na tretji stopnji raziskav sledi preučevanje kemotaksije, kjer opazujemo preferenčno gibanje EO na agarnem gojišču (Preučevanje kemotaksije temelji na metodologiji, ki so jo razvili O'Halloran in Burnell (2003) ter modificirali Laznik in Trdan (2013)).

Delovanje EO je v veliki meri odvisno od interakcij med biotičnimi in abiotičnimi dejavniki v okolju. V raziskavah preučujemo interakcije med pomembnejšimi dejavniki (vrsta rastline, vrsta škodljivca, onesnaženost tal, vrsta HOS).

Naša vizija je, da bi z znanjem o delovanju multitrofičnih sistemov (rastlina-herbivori-koristni organizmi), ki smo ga pridobili v zadnjih letih, uspeli optimizirati implementacijo biotičnega varstva rastlin v kmetijstvu.

**Ključne besede:** multitrofične interakcije, entomopatogene ogorčice, talni škodljivci, indirektna obramba rastlin, hlapljive organske snovi

---

<sup>1</sup>Avtorica: Anamarija JAGODIČ, mag. inž. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [anamarija.jagodic@gmail.com](mailto:anamarija.jagodic@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Žiga LAZNIK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [Ziga.Laznik@bf.uni-lj.si](mailto:Ziga.Laznik@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>doc. dr. Iztok Jože KOŠIR, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, Žalec, e-mail: [iztok.kosir@ihps.si](mailto:iztok.kosir@ihps.si)

## MULTITROPHIC INTERACTIONS BETWEEN PLANTS, SOIL INSECT PESTS AND ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES

**Abstract:** Multitrophic interactions related to plant protection against herbivores describe the ecological effects of three or more trophic levels. These levels represent plant, harmful insects and natural enemies of harmful insects. Predators, pathogens and parasitoids that attack herbivores, also called natural enemies in the context of multitrophic interactions, use plants to remove or obstruct feeding habits of herbivores. Entomopathogenic nematodes (EPNs) are organisms used in biological plant protection programs. They are classified as insect parasites. Soils represent a natural habitat of EPNs. Insects are parasitized only by infective juveniles (IJ) of entomopathogenic nematodes, which carry symbiotic bacteria in intestinal vesicles. Entomopathogenic nematodes are vectors for symbiotic bacteria which helps them to enter the host, where they start to excrete toxins causing the insect death after 24 - 72 h. EPNs find their way in soil by following the chemical signals (chemotaxis). Through chemotaxis they detect their hosts in the environment or detect the area in which the host is more likely to be present. Entomopathogenic nematodes can be used to control pests in cranberries, artichokes, apple trees and other cultivated plants. Despite the wide range of EPNs applications, we must be aware of the fact that their effectiveness is lower compared to chemical plant protection products. The effectiveness of the use of biotic agents can be very variable, but it does not present a risk for the environment. Researchers have proven that plants have developed many defense mechanisms to protect against pests. Namely, plants can emit certain volatile compounds that attract natural enemies of pests. With the regulation of volatile substances in plants, much better results can be achieved in biological protection, especially in the case of the use of EPNs. The field of knowledge of trophic interactions thus enables many new possibilities in the biotic protection of plants. The purpose of our research is to determine how volatile organic compounds (VOCs) secreted by damaged plant roots due to the attack of soil herbivores affect the responsiveness of entomopathogenic nematodes. The methodology of our research is carried out in three stages in the first stage of the research we cultivate the studied plant species, followed by the sampling phase for the purpose of biochemical analyzes. Biochemical analyzes of samples follow the second stage of research. The third stage of research is followed by the study of chemotaxis, where we observe the preferential movement of EPNs in the agar medium (The study of chemotaxis is based on the methodology developed by O'Halloran and Burnell (2003) and modified by Laznik and Trdan (2013)).

The effectiveness of the EPNs depends to a large extent on the interactions between biotic and abiotic factors in the environment. In research, we examine the interactions between the most important factors (plant species, type of pest, soil contamination, type of VOCs).

The knowledge acquired in this way will further enable improvement of sustainable practices in agriculture.

**Keywords:** multitrophic interactions, entomopathogenic nematodes, soil insect pests, indirect plant defense, volatile organic compounds

## **AGROŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA**

## SEKS IN EVOLUCIJA *B. subtilis*

Katarina BELCIJAN<sup>1</sup>, prof. dr. Ines MANDIĆ – MULEC<sup>2</sup>, dr. Polonca ŠTEFANIČ<sup>3</sup>

**Povzetek:** *B. subtilis* je nepatogena bakterijska vrsta, ki je prisotna tako rekoč povsod, predvsem v tleh, v zraku, v vodi, ... Lahko tvori spore, ki jim omogočajo preživetje neugodnih pogojev, nekateri sevi pa so sposobni tudi koordiniranega premikanja po površini poltrdega agarkega gojišča – rojenja, s pomočjo katerega lahko kolonizirajo nove niše v okolju. Med rojenjem tudi razlikujejo med bolj sorodnimi (kin sevi) in manj sorodnimi (non-kin sevi) predstavniki vrste, kar imenujemo sorodstveno razlikovanje.

Štefanič in sod. (2009) so iz tal obrežja reke Save izolirali seve *B. subtilis* subsp. *subtilis* in ugotovili sorodstvene skupine, med katerimi prihaja do sorodstvenega razlikovanja. Tako med roji teh sevov prihaja do nastanka mejnih linij (non-kin sevi), na območju<sup>4</sup> srečanja rojev sevov iste sorodstvene skupine pride do združevanja rojev (kin sevi). Mi smo na mejnih linijah in na stiku rojev ugotavljali frekvenco izmenjave DNA. Rezultati nakazujejo, da je frekvenca izmenjave pogostejša na liniji med roji manj sorodnih non-kin sevov, pri čemer je povečano izražanje genov odgovornih za sintezo aparata za sprejem DNA iz okolja. Prejemnice DNA so pretežno bakterije iz enega roja, kar nadalje tudi potrjuje hipotezo, da ima sorodstveno razlikovanje vpliv na izmenjavo genov med sevi.

S pomočjo bakterijskega seksa oz. bolj natančno - horizontalnega genskega prenosa se lahko prenašajo najrazličnejši geni za prilagoditve bakterijskih vrst, vključno z antibiotičnimi odpornostmi, ki predstavljajo veliko težavo v medicini in medicinski mikrobiologiji. Poleg tega bi lahko prišlo tudi do prenosa determinant, ki sevom omogočajo ločevanje med kin in non-kin. Zato nas pri nadaljnjem delu zanima tudi, kako sorodstveno razlikovanje in frekvenca horizontalnih genskih prenosov vpliva na evolucijo sevov *B. subtilis* ter na njihov socialni odnos do starševskih sevov.

Boljši vpogled v socialne interakcije bakterijskih vrst, prenos genov in vpliv socialnosti na evolucijo bakterij bi lahko pomembno pripomogel k razvoju novih načinov zdravljenja okužb s patogenimi bakterijami, učinkovitosti uporabe mikroorganizmov v biotehnologiji (npr. uporaba sevov *B. subtilis* za izboljšanje rasti rastlin ali preprečevanje okužb z rastlinskimi patogeni), ter tudi k boljšemu razumevanju razvoja novih bakterijskih sevov in vrst.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, rojenje, sorodstveno razlikovanje, izmenjava genov, evolucija

---

<sup>1</sup>Avtorica: Katarina BELCIJAN, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [katarina.belcijan@gmail.com](mailto:katarina.belcijan@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Ines MANDIĆ – MULEC, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [Ines.MandicMulec@bf.uni-lj.si](mailto:Ines.MandicMulec@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Soavtorica: dr. Polonca ŠTEFANIČ, Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [polonca.stefanic@gmail.com](mailto:polonca.stefanic@gmail.com)

## SEX AND EVOLUTION OF *B. subtilis*

**Abstract:** *B. subtilis* is non-pathogenic bacterial species recognised as safe (GRAS) and is ubiquitous in our environment (soil, water, air...). Ability to form spores enables them to survive unfavourable environmental conditions. Some strains are also able of swarming – coordinated movement on semisolid agar surface, which is important for new niche colonisation. While swarming they are able to distinguish between more related (kin strains) and less related strains (non-kin strains) of the species. This phenomenon is called kin discrimination.

Štefanič et al. (2009) isolated new strains of *B. subtilis* subsp. *subtilis* from Sava riverbank and determined kin discrimination groups. Strains of different kin discrimination groups growing on semisolid agar form boundary lines between their swarms (non-kin strains). More related strains belonging to the same kin discrimination group merge at swarm meeting point (kin strains). We determined the frequency of DNA exchange i.e. bacterial sex between strains. Our results show more frequent DNA exchange between less related non-kin strains and increased expression of DNA uptake genes. DNA recipients are predominantly bacteria belonging to one of the swarming strains. This further confirms our hypothesis, which predicts kin discrimination having an effect on gene transfer between strains.

Bacterial sex (horizontal gene transfer) enables transfer of diverse array of genes important for bacterial environment adaptation, including antibiotic resistance genes. The latter represent large issue in medicine and medical microbiology. Furthermore kin discrimination determinants which enable differentiation between kin strains and non-kin strains could also be transferred. Therefore our research also focuses on how kin discrimination and frequency of horizontal gene transfer effects evolution of *B. subtilis* strain and their social interactions with parental strain.

Better insight into social interactions between bacterial species, gene transfer and effect of social behaviour on evolution might aid with development of new ways of bacterial infection treatments, advancement in biotechnological use of *B. subtilis* (e.g. use of *B. subtilis* strains as plant growth promoting bacteria or as prevention of plant pathogen infections), and better understanding of species and strains evolution.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, swarming, kin discrimination, gene exchange, evolution

## MIKROBNE INTERAKCIJE MED SEVOMA *Bacillus subtilis* V BIOFILMIH

Maja BOLJEŠIĆ<sup>1</sup>, Ines MANDIĆ-MULEC<sup>2</sup>

**Povzetek:** Bakterije v naravnih okoljih predvsem živijo v večceličnih skupnostih, ki se imenujejo biofilmi. V biofilmu so celice ovite v zunajcelični matriks, ki je zgrajen iz različnih polimerov. Biofilmi zasedajo številne abiotične in biotične površine in so izjemno pomembni za preživetje mikroorganizmov. Prav tako, so značilni tudi na številnih ravneh našega življenja – tako iz ekonomskega kot iz medicinskega ter industrijskega vidika. Imajo koristne ali škodljive posledice za človeka. Na primer, imajo veliki pomen pri biološkem čiščenju odpadnih vod, proizvodnji biogoriv in zaščiti rastlin ter ljudi pred patogeni. Po drugi strani pa predstavljajo veliko tveganje za javno zdravje, ker se naselijo na medicinske naprave, katetre, vsadke, povečujejo odpornost patogenov proti antibiotikom in tudi mašijo vodne sisteme. V biofilmih celice živijo v neposredni bližini in se vključujejo v različne socialne interakcije. Te se temeljijo na zunajceličnih molekulah (antibiotiki, encimi, signali, polimeri) ki so na voljo tudi sosednjim celicam in tudi “goljufom”, ki zunajcelične produkte uporabljajo, a ne vlagajo energije za njihovo sintezo. Talna bakterija *Bacillus subtilis* je modelni organizem in ima probiotično delovanje ter proizvaja številne biotehnološko koristne spojine. Biofilme *B. subtilis* najdemo tudi na površini korenin, kjer ščitijo in spodbujajo rast rastlin. Raznolikost sevov znotraj vrste *B. subtilis* je velika in njihove interakcije so slabo raziskane. Bakterija *B. subtilis* je sposobna razlikovanja med bolj in manj sorodnimi celicami (sorodstvena diskriminacija) kar bi lahko vplivalo tudi na interakcije sevov v biofilmih. V sklopu doktorske disertacije preučujem interakcije sevov *B. subtilis* različne stopnje sorodnosti v mešanih biofilmih. Predpostavila sem, da bodo bolj sorodni sevi bolje sodelovali kot manj sorodni. Temeljni pristop mojih raziskav je kokultivacija dveh sevov *B. subtilis* enake/različne stopnje sorodnosti in z/brez kooperativne lastnosti, ki je potrebna za zasedanje niše z največ kisika (mejno območje tekočina-zrak). Za zasedanje te niše morajo bakterije izločati zunajcelični matriks - lepilo (EPS), ki celice zlepi v plavajoč biofilm. Pri svojih raziskavah uporabljam seve, ki so označeni s fluorescenčnimi označevalci in različnimi geni za antibiotično odpornost, kar mi omogoča da v mešanih biofilmih lahko ovrednotim število celic v izbranih časovnih točkah. Konfokalna mikroskopija pa mi tudi nudi možnost, da zaznam prostorsko razporeditev različnih celic v biofilmu. Ugotovila sem, da bakterije nesebično pomagajo zelo sorodnim sevom, čeravno ne prispevajo k sintezi skupnih dobrin (EPS) in da je to sodelovanje manj učinkovito med nesorodnimi sevi.

Po končanem doktorskem študiju, si želim še naprej raziskovati mikrobne interakcije in njihovo uporabo v biotehnologiji.

**Ključne besede:** biofilmi, *Bacillus subtilis*, mikrobne interakcije, sorodstvena diskriminacija

---

<sup>1</sup>Avtorica: Maja BOLJEŠIĆ, mag. ing. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [maja.boljesic@bf.uni-lj.si](mailto:maja.boljesic@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si](mailto:ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si)

## MICROBIAL INTERACTIONS OF *Bacillus subtilis* STRAINS IN BIOFILMS

**Abstract:** In natural environments most bacteria live in multicellular communities termed biofilms. In biofilm cells are embedded in an extracellular matrix, which is composed of various polymers. Biofilms occupy many abiotic and biotic surfaces and are extremely important for the survival of microorganisms. Likewise, they are also significant on many levels of our lives - from economical to medical and industrial point of view as well. They have beneficial or harmful effects on humans. For example, they have a great importance in the biological treatment of wastewater, biofuel production and protection of plants and people against pathogens. On the other hand, they represent a great risk to public health, because they are formed on medical devices, catheters, implants, increase the resistance of pathogens to antibiotics and clog water systems. In biofilm cells live in close proximity and engage in various social interactions. They are based on extracellular molecules (antibiotics, enzymes, signals, polymers) that are available to adjacent cells and also to "cheaters" that use extracellular products but do not invest in energy for their synthesis. Soil bacteria *Bacillus subtilis* is a model organism and has probiotic activity and produces many biotechnologically useful compounds. *B. subtilis* biofilms are also found on the surface of the roots, where they protect and stimulate plant growth. The variety of strains within *B. subtilis* species is large and their interactions are poorly investigated. *B. subtilis* is able to differentiate between more and less related cells (kin discrimination) which could also affect the interactions of strains in biofilms. As part of the doctoral dissertation, I study interactions of *B. subtilis* strains with different degrees of relatedness in mixed biofilms. I assumed that more related strains would better cooperate than less related. The basic approach of my research is cocultivation of two *B. subtilis* strains of the same/different degree of relatedness and with/without cooperative properties required to occupy the niche with the highest oxygen (air-liquid interface). To occupy this niche, bacteria must produce an extracellular matrix - an adhesive (EPS) that glues cells into floating biofilm. In my research I use strains labeled with fluorescence markers and different antibiotic resistance genes, which allows me to evaluate the number of cells in selected time points in mixed biofilms. Confocal microscopy also gives me the opportunity to detect the spatial distribution of different cells in the biofilm. I have found that bacteria altruistically help more related strains, although they do not contribute to the synthesis of common goods (EPS) and that this cooperation is less effective among less related strains. After completing this study, I would like to further explore microbial interactions and their use in biotechnology.

**Keywords:** biofilms, *Bacillus subtilis*, microbial interactions, kin discrimination

## MEDVRSTNE MIKROBNE INTERAKCIJE

Andi EREGA<sup>1</sup>, Sonja SMOLE MOŽINA<sup>2</sup>, Ines MANDIĆ-MULEC<sup>3</sup>

**Povzetek:** Skrb za zdravje ljudi je ena od pomembnih nalog Evropske unije (EU), ki zahteva tudi zagotavljanje varne hrane in zdravja živali. Zoonoze predstavljajo velik problem za javno zdravje in več kot polovica je povzročena s strani bakterij. Po Gramu negativne bakterije iz rodu *Campylobacter* (*C. jejuni*) so najpogostejše povzročiteljice črevesnih bakterijskih okužb pri ljudeh v razvitih državah, tudi v Sloveniji. Razmah bakterijske odpornosti na antibiotike predstavlja dodaten in pereč problem, še posebej, če patogeni rastejo v biofilmih, zato danes iščemo nove strategije za njihovo obvladovanje. Ena teh strategij temelji na aplikaciji probiotikov (npr. sporogenih bakterij iz rodu *Bacillus*), kjer imajo še posebej pomembno vlogo medvrstne mikrobne interakcije. Vendar je razumevanje teh interakcij še vedno zelo pomankljivo.

Že v sklopu magistrske naloge sem preučeval, kako izboljšati nadzor in preventivno zagotoviti večjo varnost hrane. Tematika moje doktorske disertacije je tudi vezana na raziskave, pomembne za zagotavljanje varne hrane, saj preučujem medvrstne interakcije med patogeno bakterijo *C. jejuni* in koristno sporogeno bakterijo *Bacillus subtilis*. Kot eksperimentalni model uporabljam ko-kultivacijo. Ugotovil sem, da je *B. subtilis* antagonist *C. jejuni*. Poleg tega da opazujem dinamiko rasti obeh vrst bakterij v ko-kulturah, merim tudi adhezijo na površine in s pomočjo navadne in konfokalne mikroskopije opazujem in dokumentiram razvoj biofilma v ko-kulturah omenjenih dveh vrst. Želim ugotoviti: I) Ali je vzrok za negativni rezultat kompeticije med *C. jejuni* in *B. subtilis* posledica direktnega stika obeh bakterijskih vrst oziroma ali imajo pri kompeticiji vlogo difuzibilni kemični antagonisti in direktni stik ni potreben; II) Kakšen je odnos med bakterijskimi sevi v večceličnih strukturah oz. biofilmih, ki imajo zelo velik pomen v industriji in medicini, in ali ima pri tem vlogo kompeticija obeh bakterij za kisik? III) Kakšen je odnos med sevi pri pritrjevanju na abiotično površino?; in IV) Ali *B. subtilis* izloča spojine, ki vplivajo v subinhibitornih koncentracijah negativno na razvoj biofilma *C. jejuni*? Po končanem študiju si želim še naprej raziskovati medvrstne mikrobne interakcije in raziskovalne pristope aplicirati na druge, za človeka pomembne zoonoze (npr. patogene bakterije kot so *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*). Želim razviti nove biotehnoške rešitve za obvladovanje in nadzor za človeka patogenih bakterij v prehranski verigi.

**Ključne besede:** zoonoza, bakterijska interakcija, ko-kultura, biofilmi

---

<sup>1</sup>Avtor: Andi EREGA, mag. ing. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [andi.erega@bf.uni-lj.si](mailto:andi.erega@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [sonja.smole-mozina@bf.uni-lj.si](mailto:sonja.smole-mozina@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si](mailto:ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si)

## INTERSPECIES MICROBIAL INTERACTIONS

**Abstract:** Taking care for human health is one of the important tasks of the European Union (EU), which also requires to ensure animal health and prevent food-borne illnesses. Zoonoses are a major public health problem and more than half of them are caused by bacteria. Gram negative bacteria from genus *Campylobacter* (*C. jejuni*) are the most common causes of human bacterial intestinal infections in developed countries, Slovenia included. The extent of bacterial resistance to antibiotics represents an additional problem, particularly for pathogens that grow in biofilms. For that reason, we are searching for new strategies for their control. One of these strategies is based on the application of probiotics (e.g., from sporogenous bacteria from genus *Bacillus*), where interspecies microbial interactions play a particularly important role. However, understanding of these interactions is still lacking.

During my master's thesis, I worked in the area of control and prevention in food safety management. Likewise, the topic of my doctoral dissertation is related to research important for ensuring safe food, studying interactions between pathogenic *C. jejuni* and beneficial sporulating bacteria *Bacillus subtilis*. Co-cultivation is used as an experimental model. I have found that *B. subtilis* is an antagonist of *C. jejuni*. In addition to observing the dynamics of the growth of both types of bacteria in co-cultures, I also measured their adhesion to surfaces and, through bright-field and confocal microscopy, I observed and documented co-cultured biofilm development of these two species. I wanted to find out: I) If the basic principle behind the result of the competition between *C. jejuni* and *B. subtilis* is a direct contact between the two bacterial species or diffusible chemical antagonists in competition play a significant role, thus not requiring direct contact; II) What is the relationship between bacterial strains in multicellular structures, i.e. biofilms, which have a very important role in industry and medicine, and if oxygen competition plays a role; III) What is the competing influence on the abiotic surface adhesion; and IV) Does the *B. subtilis* excrete compounds that has a negative influence, at the sub-inhibitory concentration levels, on the development of *C. jejuni* biofilm? After completing this study, I would like to further research the interspecific microbial interactions and scientific approaches focusing at the important human zoonoses (e.g. pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*). I would like to develop new biotechnological solutions for control and management of human pathogenic bacteria involved in the food chain.

**Keywords:** zoonosis, bacterial interaction, co-culture, biofilms, interspecies microbial interactions

## STABILNOST LIPIDNIH VEZIKLOV NA RAZLIČNE FIZIKALNO-KEMIJSKE DEJAVNIKE

Žiga PANDUR<sup>1</sup>, David STOPAR<sup>2</sup>, Matevž DULAR<sup>3</sup>

**Povzetek:** Lipidni vezikli so sferične strukture narejene iz fosfolipidnega dvosloja, ki ločuje notranjo tekočino od okolice. Lipidni vezikli so podobni biološkim membranam, zato služijo kot osnovni model za preučevanje lastnosti membran in transporta molekul skozi membrane. Poleg tega se lipidni vezikli uporabljajo kot transportni sistemi za zdravila, gene, encime in barvila. Njihova stabilnost na okoljske dejavnike je posledično ključna za njihovo funkcijo.

Pri laboratorijskem delu se srečujemo s kemijskimi in fizikalnimi dejavniki, ki vplivajo na stabilnost lipidnih veziklov. Za veliko teh dejavnikov ne poznamo vpliva na stabilnost lipidnih veziklov. Zato smo v laboratoriju pripravili velike enoslojne vezikle sestavljene iz DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:1) fosfolipida in spreminjali njihovo stabilnost in prepustnost po tretiranju z različnimi fizikalno-kemijskimi dejavniki. Posamezne lipidne vezikle z inkorporiranim fluorescentnim barvilom fluorescein smo opazovali s pomočjo DIC in fluorescentne mikroskopije. Z analizo mikroskopskih slik smo določili porazdelitev velikosti, število, skupno intenziteto fluorescence in intenziteto fluorescence v posameznih veziklih. Preverili smo vpliv dodatka mono- in več valentnih ionov ter spremembe v osmolarnosti ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , glukoza), vpliv prostih radikalov, strižnih sil (pipetiranje, vorteksiranje, rotacijske strižne sile), visokega tlaka, elektroporacije, centrifugiranja, dodatka površinsko aktivnih snovi (Triton X-100, etanol), vpliv mikrovalov, segrevanja, zamrzovanja in taljenja in vpliv ultrazvoka (ultrazvočna banja in ultrazvočna palica). Preverili smo tudi vpliv hidrodinamske kavitacije na stabilnost lipidnih veziklov. Rezultati kažejo na širok razpon stabilnosti lipidnih veziklov na različne fizikalno kemijske dejavnike, bodisi da izbran dejavnik nima vpliva (npr. pipetiranje) ali pride do popolnega uničenja (npr. detergent). Analiza dobljenih rezultatov omogoča tudi oceno preferenčnega mehanizma razpada lipidnih veziklov. S podrobnim razumevanjem vpliva različnih dejavnikov na vezikle lahko reguliramo stabilnost veziklov, kar je pomembno pri uporabi lipidnih veziklov.

Te raziskave so del evropskega projekta CABUM, kjer je cilj projekta natančno razumevanje vpliva hidrodinamske kavitacije na različne biološke in kemijske kontaminante. Hidrodinamska kavitacija se že uporablja v aplikativne namene, kot je čiščenje kontaminiranih voda, vendar je bazično razumevanje vpliva na biološke celice slabo poznano. Razumevanje delovanja osnovnih fizikalno-kemijskih dejavnikov na lipidne vezikle predstavlja pomembno vmesno stopnjo pri proučevanju mehanizmov na bolj kompleksnih bioloških modelnih sistemih.

**Ključne besede:** vezikli, DOPC, stabilnost, kavitacija, fluorescein

---

<sup>1</sup>Avtor: Žiga PANDUR, mag. mikrobiol., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo, Aškerčeva cesta 6, Ljubljana; Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [ziga.pandur@fs.uni-lj.si](mailto:ziga.pandur@fs.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. David STOPAR, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [david.stopar@bf.uni-lj.si](mailto:david.stopar@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: prof. dr. Matevž DULAR, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo, Aškerčeva cesta 6, Ljubljana, e-mail: [matevz.dular@fs.uni-lj.si](mailto:matevz.dular@fs.uni-lj.si)

## LIPID VESICLE STABILITY TO DIFFERENT PHYSICO-CHEMICAL STRESS FACTORS

**Abstract:** Lipid vesicle is a rolled up lipid bilayer into spherical shell with enclosed liquid separated from the solution. Because of this fundamental similarity to the biological cell membrane, lipid vesicles have been used extensively as model systems to study properties and stability of lipid bilayers to different physico-chemical or biochemical parameters. Due to their biological significance and applications in different industries and medicine, lipid vesicles and their stability remain an active area of research. Liposomes have wide variety of possible application in research field and in industry, i.e. as model systems for cell membranes, drug delivery systems, contrasting agents, enzyme and nutrition supplements, and delivery of dyes to textile.

Here we present comprehensive experimental review of lipid vesicle stability to chemical, physical and mechanical factors. Fluorescein loaded DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:1) lipid vesicles were treated with various factors and were examined with DIC and fluorescence microscopy. Vesicles were challenged with different stress factors such as ionic strength and osmolarity agents (glucose,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Fe}^{3+}$ ), free radicals, shear stresses (pipetting, vortex mixing, rotational shear stress), high pressure, electroporation, centrifugation, surface active agents (Triton X-100, ethanol), microwave irradiation, heating, freezing-thawing, and ultrasound (ultrasonic bath, sonotrode). Here, we showed for the first time the effect of hydrodynamic cavitation on fluorescein loaded DOPC lipid vesicles. The fluorescence intensity of individual fluorescein loaded lipid vesicles was measured with confocal laser microscopy. With microscopic images we determined the distribution of lipid vesicle size, fluorescence intensity and number of fluorescein loaded vesicles after treating with different stressors. From the results of treating lipid vesicles with different physico-chemical stressors, it follows that there is a wide variety of experimental tools to fine tune lipid vesicle stability. This work provides a benchmark for lipid vesicle robustness to a variety of different physico-chemical parameters.

This research is part of ERC CABUM project, where the overall objective is to understand and determine the fundamental physics of the interaction of cavitation bubbles with different contaminants. Application of hydrodynamic cavitation for chemical and biological contaminants have already been used (i.e. waste water treatment), but there is still significant gap between application process and basic understanding of phenomena. Understanding effect of the fundamental physico-chemical stressors on lipid vesicles is important part as it will enable study of cavitation phenomena on more complex biological models.

**Keywords:** vesicles, DOPC, stability, cavitation, fluorescein

## POTENCIAL RASTLINSKIH PRIPRAVKOV PROTI BAKTERIJI *Campylobacter jejuni*

Dina RAMIĆ<sup>1</sup>, Sonja SMOLE MOŽINA<sup>2</sup>

**Povzetek:** *Campylobacter jejuni* je najpogostejši bakterijski povzročitelj črevesnih okužb pri ljudeh. Okužimo se večinoma zaradi uživanja kontaminiranega, termično nezadostno obdelanega perutninskega mesa. Večina izbruhov je posledica uživanja kontaminiranega surovega mleka ali vode. *C. jejuni* je kljub svoji izredni občutljivosti nevarnost v živilstvu, med drugim tudi zaradi tvorbe biofilmov na različnih površinah, kot so nerjavno jeklo, plastika ter steklo. Zelo pomembni lastnosti bakterij, ki vplivata na filmotvornost, sta gibljivost in medcelično signaliziranje. V času aktivnega iskanja novih metod in strategij zaščite obetaven način predstavlja uporaba rastlinskih pripravkov z močnim zaviranjem bakterijske rasti, pa tudi subinhibitornim zaviranjem medceličnega signaliziranja, gibljivosti in filmotvornosti bakterij. V okviru raziskav številnih rastlinskih pripravkov, vključno s testiranjem bioaktivnega delovanja stranskih proizvodov agroživilstva in sorodnih panog, smo raziskali tudi protibakterijski učinek etanolnih izvlečkov smilja (*Helichrysum arenarium*). Vzorce smo pridobili pred in po destilaciji eteričnega olja. Analize teh vzorcev torej nakazujejo potencialno uporabnost stranskega proizvoda pridobivanja eteričnega olja smilja. Raziskali smo učinek izvlečkov proti medceličnemu signaliziranju, gibljivosti in pritrjevanju celic *C. jejuni* na površino polistirena. Minimalno inhibitorno koncentracijo smo določili z metodo mikrodilucije in v nadaljnjih poskusih uporabljali subinhibitorne koncentracije izvlečkov smilja zaradi izključitve vpliva na hitrost rasti bakterij. Za ugotavljanje učinka proti medceličnemu signaliziranju bakterij *C. jejuni* smo uporabili posredno metodo merjenja relativnega zmanjšanja bioluminiscence poročevalskega seva *Vibrio harveyi* BB170 po dodatku izrabljenega gojišča *C. jejuni*, ki je bil gojen z ali brez dodatka izvlečkov. Rezultati kažejo na različen učinek etanolnih izvlečkov smilja. Močnejši protibakterijski učinek je imel etanolni izvleček smilja, ki je pridobljen po destilaciji rastlinskega materiala, z vrednostjo MIK 500 mg/L. Prav tako je etanolni izvleček smilja, ki je bil pridobljen po destilaciji statistično značilno zmanjšal adhezijo bakterij *C. jejuni* na površino polistirena, medtem ko etanolni izvleček iz izhodnega rastlinskega materiala ni zmanjšal adhezije. Zanimivo je, da etanolni izvleček smilja, ki je bil pridobljen po destilaciji, ni statistično značilno zmanjšal medceličnega signaliziranja bakterij *C. jejuni*, etanolni izvleček iz izhodnega materiala pa je statistično značilno zmanjšal medcelično signaliziranje bakterij *C. jejuni*. Noben testirani izvleček smilja ni zmanjšal gibljivosti bakterij *C. jejuni*. Iz rezultatov sklepamo, da način priprave vzorcev (brez ali z destilacijo rastlinskega materiala) vpliva na protibakterijski učinek, kot tudi na mehanizem delovanja proti bakteriji *C. jejuni*. Etanolni izvleček smilja, ki je pridobljen po destilaciji rastlinskega materiala, predstavlja stranski proizvod, ki kaže potencialno uporabnost pri obvladovanju bakterij *C. jejuni*.

**Gljučne besede:** *Campylobacter jejuni*, rastlinski pripravki, protibakterijski učinek, medcelično signaliziranje, filmotvornost

---

<sup>1</sup>Avtorica: Dina RAMIĆ, mag. mikrobiolo., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, [Dina.Ramic@bf.uni-lj.si](mailto:Dina.Ramic@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, [Sonja.Smole-Mozina@bf.uni-lj.si](mailto:Sonja.Smole-Mozina@bf.uni-lj.si)

## POTENTIAL OF PLANT MATERIALS AGAINST BACTERIA *Campylobacter jejuni*

**Abstract:** *Campylobacter jejuni* is the most common causative agent of bacterial gastrointestinal diseases in humans. Infections arise mostly due to consumption of contaminated, thermally untreated poultry meat. The main sources of outbreaks are contaminated raw milk and contaminated water. Although *C. jejuni* is a very sensitive microorganism, it presents a large problem in the food industry where it is capable of forming biofilms on different surfaces, such as stainless steel, plastic or glass surfaces. Very important properties of bacteria, which influence biofilm formation, are motility and quorum sensing (QS). Researches are intensely searching for new approaches that would help in control of this pathogen. Plant materials present a promising alternative in the fight against foodborne pathogens. They have a strong antibacterial effect, as well as antiadhesive effect and the effect against bacterial QS and motility. The aim of this study was to determine the antibacterial effect of two different ethanol extracts, which are gained from the plant material of *Helichrysum arenarium*, on *C. jejuni*. The effect of ethanol extracts on QS and motility of *C. jejuni*, as well as antiadhesive effect on polystyrene surface was determined, too. Minimal inhibitory concentrations were determined by the microdilution method. Subinhibitory concentrations of the plant materials were used in further experiments, where the effect on QS, motility and adhesion was observed without influencing the growth rate of bacteria. To determine the effect of plant materials against QS of *C. jejuni*, bioluminescence measurement of the reporter strain *V. harveyi* BB170 was used, after the addition of the spent medium of *C. jejuni* cultivated with or without the plant material. Results have shown varying effects of ethanol extracts. Stronger antibacterial effect was measured in ethanol extract of *H. arenarium*, gained after the distillation of plant material, with MIC value of 500 mg/L. Ethanol extract of *H. arenarium*, gained after the distillation of plant material also showed statistically significant reduction of adhesion of *C. jejuni* on polystyrene surface, while ethanol extract of *H. arenarium*, gained before the distillation of plant material showed no reduction of adhesion. It is interesting that the ethanol extract of *H. arenarium*, gained after distillation of plant material, showed no statistically significant effect on the reduction of QS of *C. jejuni*, while the ethanol extract of *H. arenarium*, gained before distillation of plant material showed a statistically significant effect on the reduction of QS of *C. jejuni*. No effect against motility of *C. jejuni* was observed in either ethanol extract of *H. arenarium*. In conclusion, the method of preparation (e.g. with or without distillation of plant material) has an impact on the antibacterial effect, as well as on the mechanism of action against *C. jejuni*. Ethanol extract of *H. arenarium*, gained after distillation of plant material presents waste material and has antiadhesive potential against *C. jejuni*.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, plant material, antibacterial effect, quorum sensing, biofilm formation

## **BIOLOGIJA**

## SPREMEMBE GOZDNE VEGETACIJE PO POSEKU DREVES: POMEN FUNKCIONALNIH LASTNOSTI RASTLIN

Janez KERMAVNAR<sup>1</sup>, Lado KUTNAR<sup>2</sup>, Klemen ELER<sup>3</sup>

**Povzetek:** Posek drevja v gozdu je eno od ključnih orodij za usmerjanje razvoja gozdov, ki v Sloveniji zagotavljajo številne proizvodne, ekološke in socialne funkcije. V naši raziskavi želimo ugotoviti, kako lahko različne jakosti poseka dreves vplivajo na vrsto sestavo rastlinske združbe in zastopanost funkcionalnih znakov rastlin v združbi. Biološko-funkcionalne lastnosti v veliki meri določajo odzive rastlin na okoljske razmere in dolgoročno delovanje ekosistemov. Uporaba funkcionalnih pristopov pripomore k temeljitejšemu razumevanju ekoloških zakonitosti in omogoča posplošitve ter primerjavo rezultatov študij med različnimi območji sveta. V dinarskih jelovo-bukovih gozdovih (*Omphalodo-Fagetum*), ki pri nas pokrivajo več kot 10 % vseh gozdnih površin, smo na eksperimentalen način odstranili različen delež dreves: (1) brez poseka – kontrolne razmere, (2) posek polovice lesne zaloge gozdnega sestaja, (3) posek celotne lesne zaloge na določeni površini. Spremembe gozdne vegetacije so bile najizrazitejše na ploskvah, kjer so bila posekana vsa drevesa. Na teh površinah smo v prvih letih po sečnji popisali številne rastlinske vrste, ki praviloma ne rastejo v gozdovih s strnjenim sklepom krošenj. Med njimi so predvsem ruderalne vrste, ki so prilagojene na motena okolja, in rastline, značilne za negozdne oblike vegetacije (npr. travniške vrste). S posekom drevja se je značilno povečalo število in stopnja zastiranja trav in travam podobnih rastlin (šaši, ločkovke). Podobno so se odzivale tudi vrste s krajšo življenjsko dobo (enoletnice, dvoletnice) in visoke steblike. Na gozdnih posekah se pojavljajo nekatere svetloлюбne pionirske vrste ter vrste, ki se najpogosteje razširjajo z lažjimi semeni in so anemohorne. V strnjenih, nepresvetljenih gozdnih sestojih so vrste pritalnih plasti vegetacije prilagojene na bolj stresne razmere, saj sta zaradi tesnega sklepa drevesnih krošenj dotok svetlobe in razpoložljivost virov (hranila, voda) omejena. Pogostejše so pozno-sukcesijske vrste z daljšo življenjsko dobo (trajnice), nižjo rastjo in s pretežno vegetativnim načinom razmnoževanja, saj je cvetenje/plodenje v omejenih svetlobnih razmerah običajno oteženo. Kljub izrazitim spremembam ekoloških razmer na posekanih površinah, so vrste značilne za strnjene gozdne sestoje uspele preživeti, domnevno zaradi njihove dokaj široke ekološke prilagodljivosti. Pomemben je bil tudi blažilni vpliv zastora visokih steblik in grmovnic ter lokalni topografski dejavniki (oblikovanost kraških vrtač) in mikoreliefne razmere. V okviru naše študije smo merili tudi vpliv različnih intenzitet sečnje na temperaturo zraka in zračno vlago v gozdnih sestojih. Najbolj neugodne razmere (visoka temperatura, nizka vlaga) za uspevanje večine rastlin so na severni strani kraških vrtač. Svetloba se je izkazala kot ključen abiotični dejavnik pri pojasnjevanju sprememb proučevane vegetacije in mikroklima. Izsledki raziskave so osnova za načrtovanje gozdnogojitvenih ukrepov. Raziskovalni objekti služijo kot laboratoriji v naravi, kjer lahko odzive gozdne vegetacije in njen sukcesijski razvoj ter naravno pomlajevanje drevesnih vrst spremljamo v daljšem časovnem obdobju. Poznavanje odzivov je pomembno z vidika razvoja gozdov po številnih naravnih ujmah in velikopovršinskih motnjah, ki so prizadele slovenske gozdove v zadnjem obdobju, in od njih odvisnih načinov gospodarjenja z gozdovi. V širšem smislu so ugotovitve relevantne tudi v kontekstu podnebnih sprememb, katerim so dinarski jelovo-bukovi gozdovi zaradi kombinacije neugodnih dejavnikov (npr. zmanjšana mehanska in biološka stabilnost sestojev, poletne suše, vodoprepusten kraški teren, pogosto plitva tla z majhno sposobnostjo zadrževanja vode) še posebej izpostavljeni.

**Ključne besede:** dinarski jelovo-bukovi gozdovi, sestojne vrzeli, funkcionalni znaki rastlin, pritalna gozdna vegetacija, ekološke razmere

---

<sup>1</sup>Avtor: Janez KERMAVNAR, mag. inž. gozd., Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za gozdno ekologijo, Večna pot 2, Ljubljana, e-mail: [janez.kermavnar@gozdis.si](mailto:janez.kermavnar@gozdis.si)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Lado KUTNAR, Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za gozdno ekologijo, Večna pot 2, Ljubljana, e-mail: [lado.kutnar@gozdis.si](mailto:lado.kutnar@gozdis.si)

<sup>3</sup>Somentor: doc. dr. Klemen ELER, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [klemen.eler@bf.uni-lj.si](mailto:klemen.eler@bf.uni-lj.si)

## CHANGES OF FOREST VEGETATION AFTER TREE FELLING: IMPORTANCE OF PLANT FUNCTIONAL TRAITS

**Abstract:** Tree felling is one of the key management activities affecting the development of forest ecosystems, which in Slovenia provide many economical, ecological and social functions. In this study, we aim at investigating how different felling intensities affect the species composition and abundance of plant functional traits in plant community. These biological/functional characteristics decisively determine how plants respond to environmental factors and have strong impacts on ecosystem processes. The use of functional approaches contributes to a thorough understanding of ecological mechanisms and enables generalizations. Vegetation ecologists have widely used functional traits as a universal language to overcome the problems of comparing results across regions with different species pools. In Dinaric fir-beech forests (*Omphalodo-Fagetum*), covering more than 10% of Slovenian forest area, we experimentally implemented different levels of overstory canopy removal: (1) no felling – control, (2) 50% felling of stand growing stock, (3) 100% felling of growing stock in a treated area. The changes in understory vegetation were most significant in the most intensively felled plots where all trees were cut down. In the initial stage after the felling we recorded plant species, which are usually unable to establish in forests with dense canopy cover. Among those, ruderal species, adapted to disturbed habitats, and species typical of non-forest vegetation (e.g. grasslands) were identified. After the felling, graminoids (grasses, sedges, rushes) most significantly increased in diversity and abundance. Similar response was evident for species with short life span (annuals, biennials) and for tall forbs. In canopy gaps, some light-demanding pioneer species and plants with small and light seeds, which are easily dispersed by wind, were present. Under dense canopy, plants in the understory layers are more stress-tolerant due to the limited resource availability (light, nutrients, water). Species growing in mature forests are mainly late-successional species with long life span (perennials), smaller in stature and they mostly reproduce vegetatively as the flowering and fruiting periods are limited due to low light availability. Despite significant changes in ecological conditions after the felling, understory species characteristic of mature stands were able to persist, most likely due to their relatively broad ecological niche. The cover of tall forbs and shrubs positively contributed to their short-term survival, as well as the influence of local topography (geomorphology of karst sinkholes) and specific micro-topographic conditions. We have measured the effects of felling on abiotic conditions, i.e. air temperature and relative humidity. We found that most harsh conditions (high temperature, low humidity) occur in northern, south-facing sides of the sinkholes. The amount of sun light is the best predictor of observed changes in studied vegetation and microclimate. The main findings of our research are useful for silviculture and forest management planning. Our experimental plots serve as natural laboratories where responses of vegetation to forest management, its post-treatment succession and natural regeneration of tree species can be studied in a long term. Better understanding of these responses is valuable in terms of forest stand development after natural disasters and large-scale disturbances that damaged Slovenian forest in the last few years, and related silvicultural operations. In a broader sense, results are also relevant in the context of climate change, which are expected to strongly influence the Dinaric fir-beech forests in the future due to the combination of unfavourable factors, such as reduced mechanical and biological stability of forest stands, prolonged summer droughts, water-permeable karst terrain and associated shallow soils with low water storage capacity.

**Keywords:** Dinaric fir-beech forests, canopy gaps, plant functional traits, understory vegetation, ecological conditions

## IZOBRAŽEVANJE ZA TRAJNOSTNO SOBIVANJE Z VELIKIMI ZVERMI

Vesna ORAŽEM<sup>1</sup>, Iztok TOMAŽIČ<sup>2</sup>

**Povzetek:** Velike zveri ogrožajo različni dejavniki. Poleg razdrobljenosti habitatov in smrtnosti v prometu (rjavi medved) in parjenja v sorodstvu (evrazijski ris), glavno grožnjo ohranjanju teh vrst, predvsem rjavemu medvedu in volku, predstavljajo konfliktna situacija s človekom. Ohranjanje in upravljanje z velikimi zvermi mora tako temeljiti na pozitivnih stališčih javnosti, predvsem lokalnih prebivalcev na območjih stalne prisotnosti omenjenih vrst. Ker pa so konflikti vsake vrste s človekom različne narave, morajo biti akcije ohranjanja in upravljanja s posamezno vrsto ciljno načrtovane. Stališča, izkušnje ljudi in na splošno sprejemanje živali pomembno vplivajo na izoblikovanje javnega mnenja. Velike zveri spadajo med t. i. karizmatične vrste, ki v ljudeh vzbujajo tako strah, kot tudi občudovanje, kar lahko privede k manj stabilnemu izoblikovanju stališč. Poleg strahu pa na izoblikovanje stališč vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so spol, starost, območje bivanja, pripadnost različnim interesnim skupinam (lovci, rejci, naravovarstveniki, ...), neposredne izkušnje z živalmi, izobrazba in znanje o velikih zvereh. Eno izmed pomembnih orodij, ki vplivajo na izoblikovanje stališč je zagotovo izobraževanje, katerega je tudi združenje za varstveno biologijo kot enega najpomembnejših ciljev za ohranjanje vrst. Večina študij stališč in sprejemanja velikih zveri se je osredotočala na splošno javnost ali različne ciljne skupine. Niso pa bili obravnavani mladostniki oziroma šolske skupine. Prav tako ni podatkov o učinkih izobraževanja na stališča do in znanje mladostnikov o velikih zvereh. V raziskavi smo se zato osredotočili na omenjeno problematiko. V enem od sklopov doktorskega dela smo se odločili za primerjavo vpliva različnih smeri strokovnega srednješolskega izobraževanja (veterinarski tehnik, kmetijsko-podjetniški tehnik, naravovarstveni tehnik) na stališča in znanje anketirancev o volkovih ter za analizo učinka delavnic (izobraževanja) na znanje in stališča dijakov različnih smeri (gimnazije in srednje veterinarske šole) o volkovih. V raziskavi uporabljamo različne anketne vprašalnike, s katerimi preverjamo stališča anketirancev do velikih zveri in preizkuse znanja, ki nam služijo za primerjavo stališč glede na poznavanje problematike. Hkrati z izbranim načinom preverjanja lahko ugotovljamo vpliv izobraževanja na, znanje, stališča in sklepamo na pro-okoljsko delovanje posameznika. Prvi rezultati študije kažejo, da na stališča in znanje pomembno vpliva smer izobrazbe. Prav tako izkustveno učenje (preko dela z materiali na delavnicah) v primerjavi s tradicionalnim načinom poučevanja, pomembno vpliva na učenje in izoblikovanje pozitivnih stališč do velikih zveri. Z analizo vpliva izobraževanja na znanje in stališča posameznikov želimo zapolniti vrzel v znanju in prispevati k oblikovanju pozitivnih stališč do velikih zveri tako pri učencih, dijakih kot širši javnosti. Projekti, ki temeljijo na ohranjanju, varstvu in upravljanju z velikimi zvermi, imajo tudi cilj bolje izobraziti širšo javnost ali posamezne ciljne skupine za boljše sprejemanje teh vrst in lažje sobivanje z njimi. Dokler ne vemo v kolikšni meri izobraževanje vpliva na stališča in s tem vedenje posameznika, je težko predvideti smiselne aktivnosti.

**Ključne besede:** velike zveri, stališča, znanje, poučevanje, izkustveno učenje

---

<sup>1</sup>Avtorica: Vesna ORAŽEM, prof. biol. in gosp., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [vesna.orazem7@gmail.com](mailto:vesna.orazem7@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Iztok TOMAŽIČ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [iztok.tomazic@bf.uni-lj.si](mailto:iztok.tomazic@bf.uni-lj.si)

## EDUCATION FOR SUSTAINABLE COEXISTENCE WITH LARGE CARNIVORES

**Abstract:** Large carnivore populations are threatened by various factors. Besides habitat fragmentations, vehicle collisions (especially brown bears), and inbreeding (refers to Eurasian lynx), one of the most influential factor regarding their conservation is human-large carnivore conflict. Conservation and management actions should therefore be directed toward forming positive attitudes, especially of local residents from core areas. Nevertheless, those actions should not be unified, but targeted. General public opinion is greatly influenced by human attitudes, experiences and general acceptance of animals. Large carnivore species, classified as charismatic species, often arouse bipolar emotions, such as fear and admiration. As a consequence, those emotions can contribute to unstable attitude formation. In regards to the emotional component, attitudes are influenced by various factors, such as gender, age, place of residence, different target groups (e.g. hunters, livestock breeders, environmentalists, ...), direct experiences with animals, education and knowledge about large carnivores. One of very important approaches to influence attitude formation is certainly education. The majority of the studies regarding human attitudes and acceptance of large carnivores focused on general public of various target groups. Only a few studies focused on assessing school students' and adolescents' attitudes and knowledge of large carnivores. There are also no available data about the influence of different teaching approaches on students' attitudes and knowledge about large carnivores. In present research, we focused on these issues. In one part of the doctoral thesis, influence of different vocational upper secondary study programs (e. g. veterinarian, environmentalist and agricultural technician) on students' attitudes towards and knowledge of wolves were assessed. Besides aforementioned influencing factor, also the impact of different instruction types (i.e. working with realia vs. traditional teaching) on general high school and veterinarian technician students' attitudes and knowledge was assessed. Within the research, different questionnaires for testing attitudes and knowledge were prepared. Besides attitudes and knowledge assessment, the questionnaires can serve for the determination of the impact of different types of instructions on students' knowledge, attitudes and their pro-environmental behavior. Preliminary results of the doctoral thesis showed, that attitudes and knowledge are greatly influenced by the study program. In contrast to the traditional teacher-centered instructions, the experiential learning through the guided workshops, contribute to more positive attitudes toward large carnivores. With the assessment of the effect of different instruction types on participants' attitudes and knowledge, our results will fill the knowledge gap that is now present. The results will inform the scientific community about the approaches that have the highest impact on attitudes and knowledge of students in different education levels and also of general public. Projects dealing with conservation and management of large carnivore species, often aim to raise awareness among general public or different stakeholder groups to ensure higher acceptance of those species and strive to long-term coexistence. But until the influence of education on attitudes and knowledge is not properly evaluated, appropriate activities cannot be planned.

**Keywords:** large carnivores, attitudes, knowledge, instructions, experiential learning

## TEST NARAVNIH IN SPOLNIH SELEKCIJSKIH PRITISKOV PRI VRSTI PAJKA Z IZRAŽENIM VELIKOSTNIM SPOLNIM DIMORFIZMOM

Shakira G. QUIÑONES-LEBRÓN<sup>1</sup>, Matjaž KUNTNER<sup>2</sup>, Simona KRALJ-FIŠER<sup>3</sup>

**Povzetek:** Spolni velikostni dimorfizem (SSD) je pojav, pri katerem je eden od spolov bistveno večji od drugega, in je begal znanstvenike odkar ga je Darwin prvič opisal leta 1871. Proces, na katerih temelji evolucija SSD, so bili obsežno raziskovani pri vretenčarjih, kjer spolna selekcija (tekmovanje med samci in samičina izbira) običajno favorizira večjo velikost pri samcih. V številnih skupinah členonožcev pa so samice večje od samcev, kjer najdemo ekstreme v družini pajkov Nephilidae. Medtem ko je SSD, kjer so večji spol samci, lahko razložiti s spolno selekcijo (npr. večji samci premagajo ostale samce in imajo višji reproduktivni izplen), je SSD, kjer so večji spol samice, veliko bolj zapleten pojav, ki ga ni mogoče razložiti zgolj s spolno selekcijo. Tako ostaja nejasno kako so naravni in spolni selekcijski pritiski oblikovali njegovo evolucijo. Glavni cilj moje doktorske disertacije je test večih naravnih in spolnih selekcijskih pritiskov na vrsti pajkov iz družine Nephilidae, pri kateri je izražen spolni velikostni dimorfizem: *Nephilingis cruentata*. Samci te vrste prav tako kažejo širok razpon variabilnosti v velikosti, kar omogoča testiranje relativnega biološkega fitnesa samcev različne velikosti. Ker se ta vrsta naravno pojavlja v tropih, sem morala najprej vzpostaviti populacijo v laboratoriju, zato sem se seznanila s tehnikami vzreje. Osredotočil sem se na testiranje 1) ali je velikost samcev povezana s sposobnostjo razširjanja, saj morajo odrasli samci aktivno iskati samice, 2) ali in kako na variacijo v velikosti samcev vplivajo okoljski dejavniki, kot so socialni dražljaji in/ali razlike v razpoložljivih dobrinah, 3) ali in kako spolna selekcija vpliva na velikost samcev. Delo z živimi živalmi, ki izkazujejo visoko asinhronost v spolnem dozorevanju, je predstavljalo velik izziv, saj je bilo za uspeh eksperimentov ključnega pomena stalno vzdrževanje laboratorijske populacije in skrbno načrtovanje vzreje. Zaradi kompleksne narave bioloških podatkov sem se v programu R naučila izvajati t.i. modele linear mixed effects regression in modele Markov chain Monte Carlo (MCMC). Pričakujem potrditev, da na velikost samcev vplivajo tako okoljski dejavniki kot socialni dražljaji in, da samci odraščajo v kontekstu pričakovane konkurence in glede na razpoložljive okoljske dobrine. Poleg tega pričakujem, da se razlike v velikosti samcev ohranjajo z ravnovesjem podedovane velikosti in uspehi parjenja, ki jih uravnavajo alternativne strategije parjenja. Čeprav se lahko evlucijski vzorci odkrijejo le s primerjalnimi filogenetskimi analizami na skali makro-evolucije, je testiranje evlucijskih hipotez na ravni vrst nujno za določitev selekcijskih pritiskov, njihove moči in smeri selekcijskih gradientov. Po zaključku tega projekta želim nadaljevati s testiranjem hipotez, povezanih s spolno selekcijo, in/ali s kompromisi (ang. trade-offs) v biologiji pajkov ali drugih taksonomskih skupin z zanimivimi in pretirano izraženimi lastnostmi.

**Ključne besede:** spolna selekcija, naravna selekcija, spolni velikostni dimorfizem, pajki, selekcijski pritiski

---

<sup>1</sup>Avtorica: Shakira G. QUIÑONES-LEBRÓN, mag. Biol., Biološki Inštitut Jovana Hadžija, Novi trg 2, Ljubljana, e-mail: [shakiguani@gmail.com](mailto:shakiguani@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentor: izr. prof. dr. Matjaž KUNTNER, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [kuntner@gmail.com](mailto:kuntner@gmail.com)

<sup>3</sup>Somentorica: doc. dr. Simona KRALJ-FIŠER, Biološki Inštitut Jovana Hadžija, Novi trg 2, Ljubljana, e-mail: [simonakf@gmail.com](mailto:simonakf@gmail.com)

## TESTING NATURAL AND SEXUAL SELECTION PRESSURES ON A SPIDER SPECIES EXHIBITING SEXUAL SIZE DIMORPHISM

**Abstract:** Sexual size dimorphism (SSD), a phenomenon where one of the sexes is significantly larger than the other, has puzzled scientists since Darwin first described it in 1871. The processes underlying the evolution of SSD have been extensively studied in vertebrates, where sexual selection (male-male competition and female-choice) commonly favour larger size in males. In many arthropod groups, however, females are larger than males, with extreme examples in the spider family Nephilidae. While male-biased SSD is readily explained by sexual selection (e.g. larger males outcompete other males and have a higher reproductive output), female-biased SSD is a much more complex phenomenon that cannot be explained by sexual selection alone, and it remains unclear which and how natural and sexual selection pressures have shaped its evolution. The main goal of my PhD thesis is to test several natural and sexual selection pressures on a spider species of the Nephilidae family that exhibits an extreme case of sexual size dimorphism: *Nephilingis cruentata*. Males of this species also show a wide range of size variability, making it possible to test for the relative fitness of differently sized males. Because this species naturally occurs in the tropics, I first had to establish a population in the laboratory, thus I became acquainted with breeding techniques. I focused on testing 1) whether male size is related to dispersal ability as males have to wander to find females, 2) whether and how male size variation is influenced by environmental factors such as social cues and/or differences in resource allocation, 2) whether and how sexual selection acts on male size. Working with live animals with a large sex-related asynchrony in sexual maturation posed a great challenge since the constant maintenance of the laboratory population and the careful planning of breeding was vital for the success of the experiments. Because of the complex nature of biological data, I learned to perform linear mixed effects regression models and Markov chain Monte Carlo (MCMC) methods in R program. I expect to confirm that male size is influenced by both environmental factors and social cues, and that males mature according to the expected competitive context and the available environmental resources. Furthermore, I expect male size variation to be maintained by a balance of inherited size and mating successes mediated by alternative mating strategies. Although evolutionary patterns can only be detected in a macro scale through comparative phylogenetic analyses, testing evolutionary hypotheses at the species scale is necessary to identify selection pressures, their strength, and the direction of selection gradients. Upon the completion of this project I aim to continue testing hypotheses related to sexual selection and/or life history trade-offs in either spiders or other taxonomic groups with interesting exaggerated traits.

**Keywords:** sexual selection, natural selection, sexual size dimorphism, spiders, selection pressures

## ZAZNAVANJE VOLČJIH LEGEL: ZNANOST NI LE ZA IZBRANCE - K NJEJ LAHKO VSAKDO POMEMBNO PRISPEVA

Nina RAŽEN<sup>1</sup>, Ivan KOS<sup>2</sup>, Hubert POTOČNIK<sup>3</sup>

**Povzetek:** V svetovnem merilu se Slovenci lahko ob bok postavimo le izbranim in redkim državam, ter se pohvalimo s prisotnostjo šakalov (*Canis aureus*), risov (*Lynx lynx*), medvedov (*Ursus arctos*) in volkov (*Canis lupus*) na istem območju. Vendar pa se je s širjenjem prebivalstva in aktivnosti se je začel krčiti prvotni gozdni prostor teh zveri, ki zdaj zasedajo tudi druga območja. Izginjajo zaprte gozdne krajine, širijo se kmetijske površine in mesta, ki jih povezujejo ceste in prometnice. Naravni habitati divjih živali se izgubljajo in na dane razmere so se prilagodili tudi volkovi. Po prvotnem padcu populacije, h kateremu je pripomoglo tudi njihovo iztrebljanje sta se njihova številčnost in prostorska razširjenost začeli počasi povečevati tudi na območjih njihove nekdanje razširjenosti. Številke in informacije, ki jih prebiramo v medijih in na spletu, so običajno plod večletnih raziskav ter na tisoče ur vloženega dela. Vseeno pa raziskave niso le plod raziskovalcev in znanstvenikov, temveč lahko vsak posameznik pripomore k njim. Od leta 2010 tudi v Sloveniji beležimo bolj celosten pristop k spremljanju populacije volkov, med katerimi med drugim dokazujemo tudi reproduktivne trope volkov in zaznavamo volčja legla z metodo popisa volkov z izzivanjem oglašanja. S svojo aktivnostjo pomembno prispevajo pri pridobivanju podatkov tudi sodelujoči lovci in prostovoljci, ki se sprva udeležijo osnovnega izobraževanja. V sistematičnem popisu se nato prostovoljce sočasno razporedi po kvadrantih velikosti 3x3km, da v treh zaporednih poletnih nočeh oponašajo tuljenje volkov in poslušajo volčje odzive. Od leta 2010, smo tako z njihovo pomočjo, pregledali 1944 km<sup>2</sup>-3924 km<sup>2</sup> območja na noč. V sedmih sezonah v obdobju 2010–2012 in 2015–2018 smo zabeležili 118 volčjih odzivov, od tega 53 odzivov mladičev in 65 odzivov odraslih volkov, s čimer smo potrdili minimalno prisotnost 6-12 reproduktivnih tropov volkov na sezono v poletnem času. Vsem prostovoljcem se ob tej priložnosti zahvaljujemo za pomoč in sodelovanje pri popisu volkov in zbiranju podatkov.

**Ključne besede:** volk (*Canis lupus*), popisi volkov, izzivanje tuljenja, volčja legla, prostovoljci

---

<sup>1</sup>Avtorica: Nina RAŽEN, dipl. biol., prof. biol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [nina.razen@gmail.com](mailto:nina.razen@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Ivan KOS, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [ivan.kos@bf.uni-lj.si](mailto:ivan.kos@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: dr. Hubert POTOČNIK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [hubert.potocnik@bf.uni-lj.si](mailto:hubert.potocnik@bf.uni-lj.si)

## DETECTING WOLF LITTERS : SCIENCE IS NOT JUST FOR SCIENTIEST – EVERYONE CAN MAKE AN IMPORTANT CONTRIBUTION TO IT!

**Abstract:** On a global scale, Slovenia is one of rare countries, where jackals (*Canis aureus*), lynxes (*Lynx lynx*), bears (*Ursus arctos*) and wolves (*Canis lupus*) are present in the same area. However, with the spread of human population and activity, their original forest area began to shrink. Forests are disappearing, agricultural land and cities are spreading and connecting with roads and motorways. Natural habitats of wild animals are extinguishing and wolves have adapted to the given situation. After the initial decline in wolf population, due to their eradication, wolf abundance and spatial distribution began to increase slowly to the areas of their former prevalence. Information we read about in the media are usually the result of many years of research and thousands of working hours involved. Nonetheless, research is not only the result of qualified researchers and scientists, but also of citizens. Every individual can contribute to it. Since 2010 we used multiple methods to provide a holistic approach to wolf population monitoring in Slovenia. We use howling surveys for detection of territorial packs and wolf litters across the entire wolf range. In Slovenia wolves have been studied with the help of hunters, volunteers and interested public. After organized seminars and workshops, volunteers were divided into groups, that occupied 3x3km<sup>2</sup> quadrants for three consecutive summer nights. They howled and listened to the wolf's responses. Since 2010 we were covering 1944 km<sup>2</sup>-3924km<sup>2</sup> per night. In seven seasons from 2010-2012 and 2015-2018 we recorded 118 vocal responses, of which 65 were from adults and 53 from wolf pups. We confirmed the minimal presence of 6-12 reproductive packs of wolves per summer season. On this occasion, we would like to thank all volunteers for their assistance and cooperation in the monitoring of wolves and data collection.

**Keywords:** wolf (*Canis lupus*), wolf monitoring, wolf howling, wolf litter, citizen science

## BIOGEOGRAFIJA PAJKOV IZ DRUŽINE NEFILIDOV

Eva TURK<sup>1</sup>, Simona KRALJ-FIŠER<sup>2</sup>, Matjaž KUNTNER<sup>3</sup>

**Povzetek:** Nefilidi so družina pajkov, znani po ekstremnih fenotipih, med katerimi je najočitnejši močno izražen velikostni spolni dimorfizem. Samice so lahko kar petstokrat težje od samcev, kar predstavlja najekstremnejši primer velikostnega spolnega dimorfizma med vsemi kopenskimi živalmi. Razširjeni so predvsem v tropskih in subtropskih habitatih, areal nekaterih vrst pa seže tudi v zmerne klimate. Distribucija nekaterih vrst je za nevretenčarje netipično široka, druge so endemiti majhnih otokov zahodnega Indijskega oceana. Znanost o trenutni in pretekli geografski distribuciji taksona se imenuje biogeografija. Sklepanje o preteklih biogeografskih pojavih je pogosto težavno, a zadnja desetletja so prinesla velike metodološke napredke z integracijo dobro podprtih filogenij in podatkov o trenutni distribuciji vrst. Nefilidi predstavljajo primerno modelno skupino za biogeografske analize zaradi svoje starosti (verjeten izvor že v mezozoiku pred 133 milijoni let), široke trenutne distribucije na večini kontinentov in medvrstnih razlik v sposobnosti disperzije. V tej študiji na podlagi robustne filogenije rekonstruiramo geografski izvor nefilidov in interpretiramo njihovo biogeografsko zgodovino ter potek disperzije na druge kontinente. Specifično testiramo dve alternativni hipotezi glede njihove predniške distribucije na Gondvani. Prva hipoteza sledi teoriji, da je območje razširjenosti prednikov tisto območje, kjer se je od izvora taksona do danes ohranila največja taksonomska pestrost. Po tej teoriji bi se morala kot izvorno območje optimizirati današnja tropska Afrika. Alternativna hipoteza sledi najdbi fosila v burmanskem jantaru, ki je bil na podlagi morfoloških značilnosti prepoznan kot verjeten predstavnik izvornih nefilidov. Če so se nefilidi razvili na tektonski plošči, imenovani 'West Burma Block', kjer danes najdemo burmanski jantar, bi se morala kot izvorno območje optimizirati Indomalaja. Naši preliminarni rezultati s seta različnih statističnih modelov kažejo na Afrotrope kot najbolj verjetno izvorno območje nefilidov. Po tem scenariju so se nefilidi razvili na območju današnje Afrike v zgodnji kredi in se nato ob razpadanju Gondvane razširili in diverzificirali na drugih kontinentih. Do kolonizacije ameriškega kontinenta je prišlo trikrat v dveh rodovih, medtem ko so Indomalajo in Avstralazijo sčasoma kolonizirali vsi rodovi razen dveh. Naše nadaljnje delo bo obravnavalo povezavo teh preteklih biogeografskih dogodkov z nivoji speciacije, izumiranja ter evolucije ekstremnih fenotipov.

**Ključne besede:** evolucija pajkov, biogeografija, razširjenost, filogenetika, disperzija

---

<sup>1</sup>Avtorica: Eva Turk, Master of Science, Združeno kraljestvo, Biološki inštitut Jovana Hadžija, ZRC SAZU, Novi trg 2, Ljubljana, e-mail: [eva.turk@zrc-sazu.si](mailto:eva.turk@zrc-sazu.si)

<sup>2</sup>Mentorica: doc. dr. Simona Kralj-Fišer, Biološki inštitut Jovana Hadžija, ZRC SAZU, Novi trg 2, Ljubljana, e-mail: [simonakf@gmail.com](mailto:simonakf@gmail.com)

<sup>3</sup>Somentor: izr. prof. dr. Matjaž Kuntner, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [matjaz.kuntner@nib.si](mailto:matjaz.kuntner@nib.si)

## BIOGEOGRAPHY OF NEPHILID SPIDERS

**Abstract:** Nephilidae are a spider family renowned for their extreme phenotypes, most notably their pronounced female-biased sexual size dimorphism. In fact, they represent the most extreme case of sexual size dimorphism among all terrestrial animals, with females up to 500 times heavier than males. Their distribution is predominantly tropical and subtropical, with some species ranging into temperate regions. Some species show extremely wide distributions, atypical of invertebrates, while some are endemic to small islands in the western Indian Ocean. The study of a taxon's current and past geographical distribution is called biogeography. Past biogeographical events can be difficult to infer, but recent decades have seen great advances in methodology through the use of well-supported phylogenies coupled with species' distributional data. Nephilid spiders make a suitable model group for biogeographical studies because of their hypothesized ancient origin in the Mesozoic (133 million years ago), their present wide distribution across most continents, and their varying dispersal propensities. Here, we use a recent robust phylogeny of nephilids to reconstruct their geographical origin and interpret their biogeographic history and sequence of intercontinental colonization. Specifically, we test two alternative hypotheses about their Gondwanan ancestral range. Following the rationale that the area that retained the most taxonomic diversity to the present is a taxon's ancestral area, our first hypothesis suggests that present-day Afrotropics should optimize as the most likely nephilid ancestral area. The alternative hypothesis follows the finding of a fossil in Burmese amber, whose morphological details suggest it as a likely stem nephilid. If nephilids originated on the West Burma Block, where Burmese amber is found, present-day Indomalaya should optimize as the ancestral area. Our preliminary biogeographic analyses using a set of statistical models establish Afrotropics as the most likely nephilid ancestral area. While Gondwana was breaking up in early Cretaceous, nephilids have most likely originated in Africa, and subsequently spread, and diversified, also on other continents. Colonization of the Americas occurred three times in two genera, while all but two genera eventually colonized Indomalaya and Australasia. Our future work will address the question of how these past biogeographical events coincide with levels of speciation, extinction, and the evolution of extreme phenotypes.

**Keywords:** spider evolution, biogeography, distribution, phylogenetics, dispersal

## ARHEOGENETIKA STARODAVNIH BIZONOV IN ŽELEZNODOBNEGA GOVEDA V SLOVENIJI

Lars ZVER<sup>1</sup>, Borut TOŠKAN<sup>2</sup>, Elena BUŽAN<sup>3</sup>

**Povzetek:** Rod *Bison* izvira z območja današnje Kitajske in Indije, kjer se je pojavil v zgodnjem pleistocenu in s časom razširil vse do Zahodne Evrope in v Severno Ameriko. V poznem pleistocenu je bil na območju Evrope razširjen stepski bizon (*Bison priscus*), ki ga je na prehodu v holocen zamenjal evropski bizon ali zober (*Bison bonasus*). Kljub temu, da je do leta 1920 zober v divjini izumrl, so z uporabo 12 osebkov v ujetništvo v delih Vzhodne Evrope uspešno vzpostavili lokalne populacije. Na območju Slovenije so odkrili ostanke obeh vrst.

V mlajšem holocenu sta bili v Evropi ob bizonu prisotni še dve vrsti goved (Bovini): domače govedo (*Bos taurus*) in pragovedo (*Bos primigenius*). Za človeka je imelo največji pomen domače govedo. V jugovzhodnoalpskem prostoru se njihov gospodarski pomen med drugim odraža v znatnih količinah najdenih ostankov, saj največ kosti z najdišč iz tega obdobja praviloma pripada prav domačemu govedu. Na podlagi preliminarnih arheozooloških raziskav (predvsem) z območja Ljubljanske kotline izjemo v tem smislu predstavljajo zgodnjerimski konteksti s pomembno (večinsko?) prisotnostjo italskega prebivalstva (npr. vojaška tabora na Tribuni, vadbeni tabor na lokaciji NUK II, območje Starega in Gornjega trga v Ljubljani, Kranj), kjer po številu ostankov prednjači domači prašič (*Sus domesticus*). Ugotovitev bi utegnila kazati na specifične prehranske navade prišlekov, ki so se razlikovale od običajev lokalnih staroselcev. Ob tem je s prihodom Rimljanov zaznati tudi porast povprečne velikosti domačega goveda, ki bi utegnila biti posledica bodisi izboljšanih vzrejnih prijemov bodisi vnosa naprednih pasem. Razumevanje omenjene problematike bi omogočila osvetlitev doslej zanemarjenega segmenta romanizacije tega prostora.

Kljub razmeroma bogatemu številu fosilnih ostankov bizonov vemo razmeroma malo o njihovih medsebojnih filogenetskih odnosih, njihovi paleobiogeografiji in paleoekologiji ter o odvisnosti njihovega ekosistema od spremembe klime in prisotnosti konkurenčnih vrst. Arheogenetika nam z uporabo genomskih podatkov, pridobljenih iz arheozooloških ostankov (v našem primeru kosti), omogoča načrtovanje inovativnega preučevanja problematike razširjenosti vrst/pasem goved, njihove evolucije, genetske raznovrstnosti, ipd.

Arheogenetika temelji na uporabi fosilnih ostankov, iz katerih v posebnem laboratoriju za delo s starodavno DNK (aDNA) izoliramo le-to. Izolirano aDNA nato pomnožimo s PCR in sekvenciramo. Novo pridobljena nukleotidna zaporedja uporabimo za filogenetske raziskave tako, da jih primerjamo s sekvencami nukleotidnih zaporedij iz podatkovnih baz (na primer GenBank). Za raziskave uporabljamo mitohondrijsko DNK, saj je ta prisotna v več kopijah in je zato večja verjetnost nedegradiranih sekvenc.

Cilj raziskave je pridobitev novih podatkov o filogenetskem odnosu med posameznimi vrstami bizonov in njihovi paleobiogeografiji. To znanje bi nam olajšalo razumevanje ekoloških potreb tedanjih populacij, njihovih migracij in – v primeru stepskega bizona – njihovega lokalnega izumrtja. Vzoredna raziskava aDNA domačega goveda iz obdobja tik pred prihodom Rimljanov in iz posameznih zgodnjerimskih kontekstov bo pomagala razumeti dinamiko prehoda z govedoreje lokalnega staroselskega prebivalstva k naprednemu modelu te panoge, značilnem predvsem za podeželske dvorce. S tem bo osvetljen doslej večinoma zanemarjen segment romanizacije jugovzhodnoalpskega prostora.

Poleg prej omenjenih ciljev raziskava služi osvojitvi znanja o delu z aDNA in njeno uporabo za raziskovanje populacijske dinamike in ekologije, ki jih v prihodnosti lahko uporabim za raziskave izumrlih ali živečih vrst.

**Ključne besede:** starodavna DNA, *Bison priscus*, *Bison bonasus*, genetika, zooarheologija

---

1Avtor: Lars ZVER, Master of Science (Republika Avstrija), Inštitut za arheologijo, Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti, Novi trg 2, Ljubljana, e-mail: [lars.zver@zrc-sazu.si](mailto:lars.zver@zrc-sazu.si)

2Mentor: dr. Borut TOŠKAN, Inštitut za arheologijo, Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti, Novi trg 2, Ljubljana, e-mail: [borut.toskan@zrc-sazu.si](mailto:borut.toskan@zrc-sazu.si)

3Somentorica: dr. Elena BUŽAN, Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Glagoljaška 8, Koper, e-mail: [elena.buzan@upr.si](mailto:elena.buzan@upr.si)

## ARCHAEOGENETICS OF ANCIENT BISON AND IRON AGE CATTLE IN SLOVENIA

**Abstract:** The genus *Bison* first appeared in the early Pleistocene in the area that is today's India and China, and through the ages expanded its territory ranging from Western Europe to North America. The first representative of the genus in late Pleistocene Europe was the steppe bison (*Bison priscus*), which was replaced by the European bison or wisent (*Bison bonasus*) during the transition into the Holocene. Wild populations of the wisent became extinct by 1920, but have been restored in some Eastern European locations with the use of 12 zoo specimens. In Slovenia, remains of both species have been found.

Beside the bison, two other bovid species were living in Europe during the early Holocene: cattle (*Bos Taurus*) and aurochs (*Bos primigenius*). Out of these, cattle were the most important for humans. Their economic value in the south-eastern Alps area is reflected in the considerable number of found remains, as most bones found at archaeological sites from this era belong to this species. Based on preliminary archaeozoological analyses, mostly in the Ljubljana Basin, this changed during early Roman times with the presence of an important (major?) population of Italic people (for example: military camps at Tribuna, training camp at NUK II, Kranj, Stari trg and Novi trg in Ljubljana), as most bones from this time belong to the domestic pig (*Sus domesticus*) instead of cattle. These findings could indicate specific dietary habits of the newcomers, which were different from the customs of the native people. The arrival of the Romans also resulted in an observable increase in the average size of cattle, which could be the consequence of either improved husbandry methods or the import of new breeds. Understanding of this topic could give us new insights into this so far neglected segment of the Romanisation of this area.

Despite the numerous bison fossils, our knowledge about their phylogenetic relationships, paleobiogeography and paleoecology, the dependence of their ecosystem on climatic change and the presence of competing species is relatively scarce. By using genomic data obtained from archaeozoological remains (in our case bones), archaeogenetics enables the planning of innovative approaches to topics such as the distribution of species/breeds of bovids, their evolution or genetic diversity.

Archaeogenetics is based on the use of fossils, which serve as the source of ancient DNA (aDNA), which is isolated in specialised laboratories. The extracted aDNA is then amplified using PCR and sequenced. The newly obtained nucleotide sequences are used in phylogenetic analyses by comparing them with sequences in databases (for example GenBank). Mitochondrial DNA is used most commonly in archaeogenetic research, as the large number of copies increases the chances of obtaining undamaged sequences.

The goal of our research is the acquisition of new data on the phylogenetic relationships between bison species and their paleobiogeography, which would make understanding the ecological needs of past populations, their migrations and – in the case of the steppe bison – their local extinctions, easier. The parallel study of cattle aDNA from the time just before the arrival of the Romans and from individual early Roman context will allow us to understand the transition from the native cattle farming to modernised approaches, typical for rural villas, giving us a better understanding of the Romanisation of the south-eastern Alps area.

Beside the aforementioned goals, the research serves the learning of methods to work with aDNA and its use in the study of population dynamics and ecology, which I will be able to use in future research of extinct or extant species.

**Keywords:** ancient DNA, *Bison priscus*, *Bison bonasus*, genetics, zooarchaeology

## **BIOINFORMATIKA**

## SLEDENJE METABOLNIM TOKOVOM V BIOPROCESU CELIC CHO

Maja VODOPIVEC<sup>1</sup>, Mojca NARAT<sup>2</sup>, Tomaž CURK<sup>3</sup>

**Povzetek:** Biofarmacevtika je eno najobetavnejših področij farmacevtske industrije, ki temelji na proizvodnji terapevtskih učinkovin s pomočjo bakterijskih ali evkariontskih rekombinantnih celic. Za namen proizvodnje kompleksnih proteinov najpogosteje uporabljamo sesalske celične linije (NS0, SP2/0, CHO) v katere vstavimo genski vključek, ki kodira terapevtski protein (npr. insulin, protitelo...). Pripravljeno industrijsko celično linijo nato gojimo v bioreaktorju dokler se v njem ne nabere produkt, ki ga po zaključku bioprocasa očistimo iz brozge, ter formuliramo v zdravilo. Vse pa le ni tako enostavno, saj želimo, da bi produkt imel določeno kvaliteto, kar v biokemijskem smislu pomeni prisotnost ali odsotnost določenih kemijskih skupin na izbranih mestih molekule. Ker so sesalske celice kompleksni biološki sistemi, doseganje željene kvalitete produkta zahteva veliko biološkega znanja in razumevanje celičnega metabolizma. Celični metabolizem tekom bioprocasa rutinsko spremljamo z merjenjem nekaterih zunajceličnih metabolitov (npr. glukoza, glutamin, laktat), ki pa včasih ne povedo dovoljo metabolnem stanju kulture. Za boljše razumevanje metabolnega dogajanja v celicah bi potrebovali informacijo o znotrajceličnih metabolitih. Metabolomika je analitska metoda, ki je zmožna izmeriti nabor vseh metabolitov v danem vzorcu in bi jo bilo moč uporabiti za merjenje znotrajceličnih metabolitov celic v bioprocasu. Z merjenjem znotrajceličnih metabolitov ob različnih časovnih točkah bioprocasa, pa bi močno izboljšali razumevanje metabolnega stanja celične kulture, ter pridobili ključne informacije za razumevanje metabolnih poti, povezanih z uravnavanjem kvalitete zdravilne učinkovine. V svojem doktorskem delu bom zato raziskovala metabolno pokrajino celic CHO med bioprocasom z dohranjevanjem, ter z razumevanjem metabolizma celic CHO poskusila optimizirati kvaliteto našega produkta.

Med doktorskim študijem želim razviti poglobljeno razumevanje celičnega metabolizma, ter razširiti svoje veščine uporabe biostatističnih in bioinformatiskih orodij pri analizi bioloških sistemov. Po zaključenem študiju želim nadaljevati pot, kot raziskovalka, v razvoju biofarmacevtske industrije.

**Ključne besede:** bioinformatika, metabolomika, bioprocas, kvaliteta produkta, CHO

---

<sup>1</sup>Avtorica: Maja VODOPIVEC, MRes in Computational Biology., Lek d.d., Biofarmacevtika Mengeš, Kolodvorska 27, Mengeš, , e-mail: [maja.vodopivec@novartis.com](mailto:maja.vodopivec@novartis.com)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Mojca NARAT, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Groblje 3, Domžale, e-mail: [mojca.narat@bf.uni-lj.si](mailto:mojca.narat@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: doc. dr. Tomaž CURK, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Večna pot 113, Ljubljana, e-mail: [tomaz.curk@fri.uni-lj.si](mailto:tomaz.curk@fri.uni-lj.si)

## METABOLIC PROFILE OF CHO IN FED-BATCH

**Abstract:** One of the most promising areas of pharmaceuticals industry is production of therapeutics with the use of recombinant technology. Production of complex proteins is achieved by transfection of mammalian cell lines (NS0, SP2/0, CHO) with genetic sequence of a therapeutic and subsequent cultivation in bioreactors to produce larger quantities of the therapeutic. Resultant cultivation broth is harvested, processed by downstream and formulated into final drug, suitable for administration to patients. All is however not so simple, since the produced therapeutic must be of a certain quality to be safe for the patients. Since therapeutic is produced in mammalian cell lines, which are complex in their nature, expertise in cell biology and metabolism is needed to ensure the right product quality. Culture metabolism is routinely monitored by measurement of some extracellular metabolites (glucose, glutamine, lactate...), which are however not enough to explain complex biochemistry of cellular metabolism. It would be necessary to gain information about the intracellular metabolites to gain deeper understanding of cellular metabolism. Metabolomics is analytical method, which is capable of measuring up to 300 intracellular metabolites and could be used to support bioprocess development. Product quality could then be regulated by metabolism understanding. My PhD will be dedicated to studying metabolism of Chinese hamster ovary (CHO) culture in fed-batch with the goal to support regulation of product quality.

**Keywords:** bioinformatics, metabolomics, bioprocessing, product quality, CHO

## **BIOTEHNOLOGIJA**

## BAKTERIJSKI PREDATORJI, KI LAHKO MODULIRAJO ČREVESNO MIKROBIOTO

Stina HEDŽET<sup>1</sup>, Maja RUPNIK<sup>2</sup>, Tomaž ACCETTO<sup>3</sup>

**Povzetek:** Črevesna mikrobiota predstavlja pestro združbo bakterij, virusov, arhej, gliv in praživali, ki kolonizirajo prebavni trakt. Bakterije v črevesju imajo pomembno vlogo pri metabolizmu hranil, vzdrževanju strukture epitelne bariere in obrambi pred patogenimi mikroorganizmi. Številni dejavniki kot so zdravljenje z antibiotiki, prehranske navade, življenjski slog in različna bolezenska stanja, lahko vplivajo na sestavo črevesne mikrobiote, oziroma porušijo homeostazo med komenzalnimi bakterijami. Neravnovesje črevesne mikrobiote je povezano tako z gastrointestinalnimi boleznimi, kot sta metabolični sindrom in Chronova bolezen, kot tudi s številnimi drugimi boleznimi (nevrološke bolezni, astma ipd.). Razumevanje vzrokov oziroma posledic mikrobne ravnoteže v bolezni in zdravju je ključno, če želimo vzdrževati ali ponovno vzpostaviti zdravo mikrobioto. Možnosti za usmerjeno spreminjanje mikrobiote so predmet številnih raziskav in vključujejo probiotike, prebiotike in fekalno transplantacijo. Ena izmed možnosti pa bi bila tudi uporaba bakteriofagov. Bakterije v svoji številčnosti »premagajo« virusi, ki predstavljajo najbolj zastopano entiteto na planetu. Humani virom sestavljajo virusi živalskih celic, ki povzročajo prehodne ali dolgotrajne okužbe, bakteriofagi (fagi) – »predatorji« bakterij in arhej in endogeni retrovirusi. Pri človeku je še posebej zanimiv splet interakcij virusov in bakterij v črevesju, kjer pa močno dominirajo bakteriofagi. Bakteriofagi so virusi, ki okužijo bakterije, lahko se vgradijo v njihov genom in vplivajo na izražanje genov, ali »ugrabijo« bakterijske mehanizme za pomnoževanje, bakterijo uničijo, sami pa se pomnožijo. V nasprotju z antibiotiki so ozko specifični, po navadi napadajo le določene seve ene bakterijske vrste. Prav ta lastnost prispeva k njihovi uporabnosti v terapevtske namene. Fagna terapija se že vrsto let uporablja v Gruziji in okoliških državah za zdravljenje bakterijskih okužb dihal, prebavil, vedno bolj pa je aktualna tudi v zahodnem svetu.

Podatkovne baze so precej skope s sekvencami in taksonomsko uvrstitvijo fagov pogostih anaerobnih črevesnih bakterij. Številnih črevesnih bakterij ni mogoče gojiti, zato je tudi izolacija njihovih fagov otežena. Vpliv bakteriofagov na dinamiko črevesne mikrobiote in posledično vpliv le te na gostiteljevo zdravstveno stanje je slabo raziskan. V svojem delu se bom osredotočila na delo z anaerobnimi bakterijami in njihovimi bakteriofagi. Z uporabo različnih gojitvenih postopkov bomo izolirali čim več bakterijskih predstavnikov iz fecesa prostovoljcev, vpogled v njihove genome bomo pridobili z metodami sekvenciranja naslednjih generacij. Bioinformatična analiza genomov bo fokusirana na profagne regije in dopolnitev obstoječih podatkovnih baz s fagnimi sekvencami. Iz izoliranih sevov bomo z anaerobnim postopkom metode nakapljana in metode plakov izolirali bakteriofage, katerih genome bomo analizirali, morfologijo bomo preučili z elektronsko mikroskopijo. V drugem delu naloge bomo izolirane bakteriofage uporabili za spreminjanje črevesne mikrobiote v *in vitro* modelu. Spremembam v sestavi bakterijske združbe bomo sledili na podlagi variabilne regije gena za 16S rRNA prisotne bakterijske populacije. Rezultati naše naloge bodo prispevali k razumevanju mehanizmov delovanja in vpliva bakteriofagov v črevesju ter k naboru znanih fagov. Pridobljeno znanje bi lahko bilo v nadaljevanju koristno tudi na področju terapevtske uporabe bakteriofagov za modulacijo bakterijske mikrobiote.

**Ključne besede:** Bakteriofagi, črevesna mikrobiota, fagna terapija, modulacija mikrobiote, gastrointestinalne bolezni

---

<sup>1</sup>Avtorica: Stina HEDŽET, MSc of Molecular Life Sciences., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, Maribor, e-mail: [stina.hedzet@nlzoh.si](mailto:stina.hedzet@nlzoh.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Maja RUPNIK, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za mikrobiološke raziskave, Prvomajska 1, Maribor; Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo, Taborska ulica 8, Maribor, e-mail: [maja.rupnik@nlzoh.si](mailto:maja.rupnik@nlzoh.si)

<sup>3</sup>Somentor: doc. dr. Tomaž ACCETTO, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mikrobiologijo in mikrobnobioteknologijo, Groblje 3, Domžale, e-mail: [tomaz.accetto@bf.uni-lj.si](mailto:tomaz.accetto@bf.uni-lj.si)

## VIRAL PREDATORS OF BACTERIA CAN MODULATE GUT MICROBIOTA

**Abstract:** Human gut microbiota is a dynamic community of bacteria, viruses, archaea, yeast, and protozoans that inhabit our intestine. In addition to metabolic benefits, the intestinal microbiome is an important modulator of health and disease. Dysbiosis of gut microbiota has been associated not only with gastrointestinal diseases such as inflammatory bowel disease, but also with asthma and even neurological disorders like autism and Alzheimer's disease. Several factors influence gut microbiota composition, for example antibiotic treatment, diet and environment. Understanding the mechanisms behind composition of gut microbial community and role of the key players in the intestinal microbiome is crucial when it comes to maintaining and/or establishing balanced gut community. Modulating gut microbiota is currently a hot topic and various approaches are being used or are in development such as faecal transplantation, probiotics and prebiotics. One of the options to modulate gut community could also be the use of lytic bacteriophages.

Viruses outnumber bacteria and as such represent the most numerous entity on the planet. Human virome consists of animal cell viruses - viruses that cause transient or long-term infections, bacteriophages (phages) - "predators" of bacteria and archaea, and endogenous retroviruses. Human gut virome is dominated by bacteriophages, viruses that infect bacteria. Phages can incorporate in bacterial genome and further influence gene expression or lyse bacterial cell. Bacteriophages are much more specific than antibiotics, as they usually lyse only closely related strains, or species within the genus. This feature represents an important advantage for their use in therapeutic purposes. In Georgia and surrounding countries, phage therapy has been widely used for decades. Phage therapy has recently also been gaining more popularity and recognition in the West.

Nonetheless, there is a great lack of information about genomes of bacteriophages of anaerobic gut bacteria in available biological databases. In addition, viral taxonomy remains poorly structured, which in turn makes annotation of viral sequence reads very difficult or sometimes even impossible. Moreover, the vast majority of gut bacteria still cannot be cultured; therefore isolation of their phages is also hardly possible. The research in this field is further restricted by the lack of knowledge about modulation of gut microbiota with bacteriophages.

Our research will focus on anaerobic gut bacteria and their bacteriophages. Using different isolation approaches, in the first stage of the project, we will be isolating representatives of abundant gut bacteria from faecal samples of healthy volunteers and volunteers with gastrointestinal disorders. During the following stage, we will be using the next generation sequencing methods to get an insight into bacterial genomes, and will in silico analyse the prophages in the genomes. Furthermore, the isolated bacterial strains will be used in spot and plaque assays to isolate lytic phages. Obtained bacteriophages will be sequenced and their morphology examined with transmission electron microscopy.

In the final stage of the project, we intend to use the isolated bacteriophages to modulate gut microbiota in in vitro model. We will do this by tracking the changes in the composition of the bacterial abundances, using the 16S rRNA metagenomics sequencing.

With this research, we aim to contribute to better understanding of the role bacteriophages play in the human gut microbiota and also add to the collection of known phages. Furthermore, the acquired knowledge will be beneficial in the field of therapeutic use of bacteriophages for modulation of microbiota.

**Keywords:** bacteriophages, gut microbiota, phage therapy, gut microbiota modulation, gastrointestinal diseases

## ALI LAHKO DODATEK AMINOKISLIN V HRANILIH IZBOLJŠA PRODUKT IN UČINKOVITOST CELIC CHO V BIOPROCESU?

Jernej HORVAT<sup>1</sup>, Mojca NARAT<sup>2</sup>, Oliver SPADIUT<sup>3</sup>

**Povzetek:** V zadnjih tridesetih letih so postale celice CHO vodilni ekspresijski sistem za sintezo rekombinantnih proteinov, kot so monoklonska protitelesa in druga biofarmaceutvska biološka zdravila (Kyriakopoulos, Polizzi, & Kontoravdi, 2013). Omenjena novodobna zdravila se uporabljajo za terapije rakavih obolenj, avtoimunskih bolezni in drugih bolezni, ki so še pred kratkim veljale za neozdravljive (Kyriakopoulos, 2014). Celice CHO so sesalske celice, ki so zmožne sintetizirati biološka zdravila v taki obliki, da so primerna za klinične raziskave na ljudeh in pozneje aplikacijo v terapijah (Walsh, 2014). Razvoj bioprocesa za sintezo določenega biološkega zdravila se začne z vnosom gena za določen protein (zdravilno učinkovino) v celice CHO, pri čemer nastane veliko klonov. Sledijo presejalni testi, kjer se določa najbolj primerne celične klone za nadaljnji razvoj. Pri selekciji klona se presoja nivo (čim višji) sinteze produkta, način in stopnja glikozilacije (primerne in tarčne glikanske strukture), stabilnost klona in še drugi parametri. Na glikozilacijo produkta tekom bioprocesa vplivajo razni parametri kot so temperatura, pH, dolžina bioprocesa ter količina in razmerje med substrati v gojišču in v hranilih (Li, Vijayasankaran, Shen, Kiss, & Amanullah, 2010). Večina bioprocsov v razvoju bioloških zdravil je bioprocsov z dohranjevanjem, kjer se večino uporablja kemijsko definirana gojišča, ki vsebujejo substrate kot so glukoza, aminokislina, mikroelemente, itd. Tekom faze dohranjevanja se uporabljajo kemijsko definirana hranila, ki so v tekoči obliki in večinoma vsebujejo glukozo in aminokislina. Ne glede na to, da hranila že vsebujejo pomembne substrate, se mnogokrat po končanem bioprocusu in analizi aminokislin izkaže, da nekatere aminokislina dosegajo kritično nizke koncentracije (Carrillo-Cocom et al., 2014). V preliminarnih poskusih smo opazili pomanjkanje različnih aminokislin in nekatere celo predstavljajo velik delež aminokislinske sekvence monoklonskega protitelesa. Ta opažanja odpirajo ogromno vprašanj, predvsem kako pomanjkanje aminokislin vpliva na sekvenco tarčnega produkta in ali bi bilo možno izboljšati že obstoječe bioprocse (celična viabilnost, količina produkta) z dodatkom porabljenih aminokislin. Za morebitno izboljšanje donosnosti bioprocesa, smo razvili in testirali hranilo, koncentrirano z aminokislina, ki so zmanjkale tekom bioprocesa z dohranjevanjem. Bioprocso smo vodili tako, da smo začeli z dodajanjem aminokislinskega hranila še preden so določene aminokislina, ki so že bile prisotne v prvotnem gojišču, zmanjkale. Po analizi supernatanta po vsakodnevnem vzorčenju, smo ugotovili, da smo uspešno nadomestili aminokislina in preprečili pomanjkanje le-teh. Dodatek aminokislin je povzročil vzdobuditev centralnega celičnega metabolizma v stacionarni fazi, kar je dokaj neobičajno pri standardnih bioprocsonih opažanjih. Pospešena poraba glukoze je vplivala na povečanje tvorbe laktata, kar je zmanjšalo viabilnost celic in produktivnost. V naslednjem poskusu smo pripravili aminokislinsko hranilo brez serina, kajti ta aminokislina se pretvarja v piruvat in tako pospešuje centralni celični metabolizem. S tem smo se izognili povečani sintezi laktata ter opazili povečanje celične viabilnosti za več kot 10 %, kar nakazuje na to, da z dodanimi aminokislina lahko izboljšamo že obstoječe bioprocse.

**Gljučne besede:** celice CHO, bioprocso z dohranjevanjem, monoklonska protitelesa, aminokislina, celična viabilnost

---

<sup>1</sup>Avtor: Jernej HORVAT, mag. biotehn., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [jero.horvat@gmail.com](mailto:jero.horvat@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Mojca NARAT, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko., Groblje 3, Domžale, e-mail: [mojca.narat@bf.uni-lj.si](mailto:mojca.narat@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somtor: Assoc. Prof. Oliver SPADIUT., Chemical Engineering, Integrated Bioprocso Development, Technical University Vienna, Gumpendorfer Str. 1a, Vienna, Austria, e-mail: [oliver.spadiut@tuwien.ac.at](mailto:oliver.spadiut@tuwien.ac.at)

## CAN AMINO ACID ADDITION IMPROVES PRODUCT AND CHO CELL PERFORMANCE DURING BIOPROCESS?

**Abstract:** In the last thirty years, CHO cells have become the leading expression system for the synthesis of recombinant proteins, such as monoclonal antibodies and other biopharmaceuticals (Kyriakopoulos, Polizzi, & Kontoravdi, 2013). These modern medicines are used for the treatment of cancer, autoimmune disorders and other diseases that were recently considered incurable (Kyriakopoulos, 2014). CHO cells are mammalian cells that are able to synthesize biological medicines in such a form that they are suitable for clinical research and later for application in human therapies (Walsh, 2014). The development of the bioprocess for the synthesis of a particular biological medicinal product begins with the introduction of a gene for a specific protein (monoclonal antibody) into CHO cells, creating a lot of clones. This is followed by screening tests, which determine the most suitable cell clone for further process development. Various parameters such as temperature, pH, bioprocess length, and the amount of substrates in the medium directly effects cells viability, rate of product synthesis and product's glycosylation structures (Li, Vijayasankaran, Shen, Kiss, & Amanullah, 2010). Most bioprocesses in the development of monoclonal antibodies are fed-batch bioprocesses, where expensive chemically defined media and feeding solutions (glucose, amino acids, microelements, etc) are used. Despite the fact that the solutions already contain important substrates, several amino acids can stil reach critical low concentrations (Carrillo-Cocom et al., 2014). These observations opens up several questions, in particular how the lack of amino acids affects the target product sequence and whether it would be possible to improve already existing bioprocesses (cell viability, product quantity) by adding the consumed amino acids. In order to improve the bioprocess performance, we developed and tested a feeding solution with amino acids that were depleted during bioprocess. Analyses of amino acid concentrations during bioprocess showed that we successfully replaced the amino acids and prevented their depletion. The addition of amino acids resulted in the stimulation of central cell metabolism in the stationary phase, which is quite unusual in a standard bioprocess observations. Accelerated glucose consumption increased lactate formation, which reduced cell viability and productivity. In the next experiment, a serine-free amino acid feeding solution was prepared. The amino acid promotes central cell metabolism therefore it was exluded from the feed. With serine exclusion, cells did not show an increase in lactate synthesis and we observed an increase in cell viability by more than 10%, suggesting that addition of amino acids can improve process performance.

**Keywords:** CHO cells, fed-batch bioprocess, monoclonal antibody, amino acids, cell viability

## KAJ IMAJO SKUPNEGA MIKROORGANIZMI IN UPORABNIŠKA IZKUŠNJA?

Ajda MARIČ<sup>1</sup>, Andrej GREGORI<sup>2</sup>, Kristina SEPCIC<sup>3</sup>

**Povzetek:** Ste se kdaj vprašali, kaj imajo skupnega mikroorganizmi in uporabniška izkušnja? Mikroorganizmi komunicirajo med seboj, podobno kot mi, le da oni za razumevanje ne uporabljajo jezika, temveč komunicirajo s pomočjo sekundarnih metabolitov. Znanstveniki veliko časa prebijemo v laboratorju in prebiranju strokovne literature, da spoznamo področje, na katerem bomo delali, zato se včasih komu izmed nas zgodi, da začnemo našemu delovnemu organizmu pripisovati različne človeške lastnosti. Lahko jih primerjamo z otroci: »Veš, ni mu bil všeč tisti dodatek sladkorja... Je postal hiperaktiven!« ali z najstniki: »Vse naredim tako kot piše, dam pravi substrat in hranila, pa se kljub temu zelo čudno obnaša«.

Nekaj podobnega se je pripetilo v mojem primeru, ko sem proučevala rdečo kvasovko riža - *Monascus purpureus*. Za doktorsko nalogo smo se odločili, da pod drobnogled vzamemo sogojenje in kako le-to vpliva na biosintezo sekundarnih metabolitov. Rdeča kvasovka riža biosintetizira kopico različnih metabolitov, med drugimi tudi farmakološko pomemben lovastatin, poznan tudi pod imenom monakolin K, ki sodeluje pri zniževanju holestrola, prisotnega v lipoproteinih nizke gostote (škodljivega holesterola). Vendar lahko pod določenimi pogoji biosintetizira tudi nefrotoksin citrinin. Pri doktorski nalogi smo najprej morali izbrati najboljši delovni organizem. Izmed šestih različnih sevov rdeče kvasovke riža smo izbrali tistega, ki pod izbranimi pogoji ni biosintetiziral nefrotoksina temveč največ lovastatina. Hkrati smo tudi primerjali, kateri je boljši hranilni substrat (proso ali riž) in dolžino gojenja.

V nadaljevanju nas je zanimalo, kako se izbrani sev obnaša v družbi drugih višjih gliv ter kako sprememba temperature ali način cepitve glive na hranilni substrat vpliva na biosintezo sekundarnih metabolitov. Nekako tako kot ljudje se je tudi naša rdeča kvasovka riža različno odzvala na izbranega sogovornika. Pri sogojenju je prišlo do povečane biosinteze lovastatina po treh tednih v primerjavi s kontrolo, medtem ko je bila biosinteza nefrotoksina citrinina nižja po treh tednih gojenja v primerjavi z rezultati po dveh tednih gojenja.

Sogojenje predstavlja novo orodje pri optimizaciji biosinteze sekundarnih metabolitov ali iskanju novih farmakoloških učinkovin. Slednje so potencialno zanimive, zaradi vse večje rezistence proti obstoječim antibiotikom. Komunikacija med mikroorganizmi aktivira speče gene, kar vodi do proizvodnje novih sekundarnih metabolitov pri vrstah med katerimi poteka komunikacija. Sogojenje posnema fiziološke pogoje, ki vključuje tekmovanje in komunikacijo preko izločenih sekundarnih metabolitov. Zato je način gojenja pomemben pri odkrivanju novih zdravnih učinkovin in razumevanju vpliva učinkovin na združbo, med katero poteka komunikacija.

Kot samoplačniška študentka sem sodelovala na različnih projektih. Med drugim sem sodelovala tudi pri oblikovanju trampolin parka WOOP v Ljubljani. Najbolj me je pritegnila metodologija Design thinking oz. dizajnerski način razmišljanja, ki je usmerjen v uporabnika. Predvsem se mi zdi zanimivo, kako lahko izboljšamo obstoječi produkt ali oblikujemo novega, ter povečamo prihodke v podjetju.

Kaj imajo skupnega mikroorganizmi in uporabniška izkušnja? Pri obeh je ključnega pomena razumevanje uporabnika in tematike, s katero se ukvarjamo, bodisi da gre za ljudi ali za mikroorganizme. Metode, ki sem jih uporabila pri oblikovanju trampolin parka, so precej podobne tem, ki sem jih uporabila pri raziskovalnem delu, opazovanje, analiziranje, testiranje, optimiziranje za piko na i še komuniciranje z uporabniki, tako kot mikroorganizmi pri sogojenju.

**Ključne besede:** Komunikacija, sogojenje, novi produkti, uporabniška izkušnja, Design thinking

---

<sup>1</sup>Avtorica: Ajda MARIČ, univ. dipl. biotecnol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [ajda.maric@gmail.com](mailto:ajda.maric@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Andrej GREGORI, Mycomedica d.o.o., Podkoren 72, Ljubljana, e-mail: [andrej.gregori@zanaravo.com](mailto:andrej.gregori@zanaravo.com)

<sup>3</sup>Somentorica: prof. dr. Kristina SEPCIC, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [kristina.sepcic@bf.uni-lj.si](mailto:kristina.sepcic@bf.uni-lj.si)

## WHAT DO MICROORGANISMS AND USER EXPERIENCE HAVE IN COMMON?

**Abstract:** Have you ever asked yourself what microorganisms and user experience have in common? Microorganisms communicate with each other, much like people do, but, instead of language, they use a different means of communication – secondary metabolites. As scientists, we tend to spend a great amount of time in laboratories and reading scientific literature in order to familiarize ourselves with the organisms we work on, and sometimes we start seeing human traits in them. Sometimes we compare them to children: “He didn’t like that addition of sugar, it made it hyperactive,” or to teenagers: “I’m doing everything I’m supposed to be doing, I added the right substrate and nutrients, but it’s still behaving strangely.”

This is exactly what happened to me as I was studying red yeast rice (*Monascus purpureus*). This doctoral dissertation studies cocultivation and the effects of cocultivation on biosynthesis of secondary metabolites. Red yeast rice biosynthesises an assortment of different metabolites; among them is lovastatin, a pharmacologically significant metabolite otherwise known as monacolin K, that plays a part in reducing the level of cholesterol in low density lipoproteins (bad cholesterol). However, under certain conditions, a (specific) nephrotoxin called citrinin can biosynthesise as well. The starting point of this dissertation was choosing which organism was best to work with. Out of six strains of red yeast rice, we chose the one that didn’t biosynthesise nephrotoxin under given conditions but *did* biosynthesise the largest amount of lovastatin. Additionally, the dissertation draws comparisons between proso millet and rice, deciding which is the most nutrient rich substrate of the two, and observes the length and process of cultivation.

As our research progressed, we wanted to see how the chosen strain behaves in the company of other higher fungi and how the change of temperature or the way in which a fungus is inoculated affect secondary metabolite biosynthesis. Much like people would, red yeast rice reacted differently in each communicative situation. During the process of cocultivation biosynthesis of lovastatin increased after three weeks in comparison to the control sample, while biosynthesis of nephrotoxin citrinin decreased after three weeks, compared to the results noted after two weeks of cultivation.

Cocultivation is a new tool that is being used to optimize secondary metabolite biosynthesis and find new (pharmacological) active ingredients. The latter are potentially interesting because of an increase in resistance against existing antibiotics. Communication amongst microorganisms activates dormant genes, which leads to production of new secondary metabolites **in** microorganisms that communicate with each other. Cocultivation imitates physiological conditions, including competitiveness and communication through excreted secondary metabolites, which is why the way in which microorganisms are cultivated is of paramount importance when it comes to the discovery of new curative active ingredients and the understanding of the effects of active ingredients on the group of microorganisms in communication.

As a self-financing student I took part in various projects (including helping design trampoline park WOOP in Ljubljana). While working on these projects, I was most drawn to the concept of design thinking that is focused primarily on the user. It is particularly interesting how we can take an existing product and make it better or create a new one and easily increase a company’s income.

So what do microorganisms and user experience have in common? Understanding the user and the topic with which we are dealing is key, whether we’re dealing with people or microorganisms. The methods I used while designing the aforementioned trampoline park were similar to those I used in my research of microorganism cocultivation (observation, analysis, testing, optimizing and communication with users).

**Keywords:** Communication, cocultivation, new products, user experience, Design thinking.

## IMOBILIZACIJA CELIC *Saccharomyces cerevisiae* V MIKROREAKTORJU Z UPORABO HIDROGELA

Tadej MENEGATTI<sup>1</sup>, Polona ŽNIDARŠIČ PLAZL<sup>2</sup>

**Povzetek:** Namen imobilizacije encimov ali celic je v izboljšanju ekonomičnosti biokatalitskih procesov. Imobilizacija namreč omogoča lažje ločevanje biokatalizatorja od produkta ter njegovo ponovno uporabo, pogosto pa tudi izboljša stabilnost encimov. Med številnimi tehnikami za imobilizacijo je ujetje biokatalizatorjev v hidrogela zaradi cenovne ugodnosti in nedestruktivnosti ena bolj obetavnih [1]. Uporaba mikroreaktorjev z imobiliziranimi biokatalizatorji pa se izkazuje kot zelo učinkovit sistem za izvedbo kontinuirnih bioprosesov in njihovo intenzifikacijo [2].

V tem delu smo za modelno reakcijo izbrali biotransformacijo fumarne v L-jabolčno kislino, ki jo katalizira fumaraza v kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae*. Predhodno permeabilizirane celice kvasovk smo ujeli v plast porozne strukture hidrogela na osnovi alginata in njegovih kopolimerov s polivinil alkoholom (PVA). V začetnih študijah smo proučili vpliv koncentracije PVA ter časa zamreževanja na različne fizikalno-kemijske lastnosti hidrogela, kar smo spremljali z analizo debeline, poroznosti ter s termično analizo hidrogela. V hidrogela različnih sestav smo imobilizirali celice kvasovk in jim v šaržnih procesih določili zadržano aktivnost oz. posredno faktor učinkovitosti imobilizacije. V nadaljevanju smo želeli razviti učinkovit mikroreaktor z imobiliziranim biokatalizatorjem, kjer mora biti plast hidrogela čim tanjša, kar bi omogočilo optimalno uporabo biokatalizatorja v reakcijah z difuzijo skozi porozno strukturo. V ta namen smo plasti hidrogelov različnih sestav vstavili v mikroreaktor iz dveh poli(metil metakrilatnih) plošč in določili učinkovitost permeabiliziranih celic s sledenjem koncentracije substrata na izhodu iz mikroreaktorja. Stabilnost mikroreaktorja smo testirali z izvajanjem večdnevne kontinuirne biotransformacije pri nizkih pretokih substrata.

Rezultati so pokazali, da z višanjem PVA koncentracije dobimo tanjšo plast hidrogela, kar nam posledično poveča razpoložljivost biokatalizatorja za substrat. Optimalni čas zamreževanja je v intervalu med 1 in 4 h. Poroznost hidrogela se prav tako povečuje z večanjem PVA koncentracije na končnih 73 %. Efektivnostni faktor imobilizacije je v vseh primerih znašal nad 0.7, uspešnost pretvorbe v mikroreaktorju pa se je večala z višanjem PVA koncentracije v kopolimernem hidrogelu. Poleg tega smo testirali še delovno stabilnost mikroreaktorja z imobiliziranimi celicami kvasovk v plasti PVA-alginatnega hidrogela. Po 72 h kontinuirnega delovanja mikroreaktorja je ta ohranil 75 % začetne produktivnosti.

**Ključne besede:** alginat, polivinil alkohol, hidrogel, imobilizacija, mikroreaktor, biokataliza

[1] Nunes, M.A.P.; Vila-Real, H.; Fernandes, P.C.B.; Ribeiro, M.H.L. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, 160, 2129–2147

[2] Wohlgemuth, R.; Plazl, I.; Žnidaršič-Plazl, P.; Gernaey, K.V.; Woodley, J.M. *Trends Biotechnol.*, 2015, 33, 302–314

---

<sup>1</sup>Avtor: Tadej MENEGATTI, mag. kemijskega inženirstva, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Večna pot 113, 1000 Ljubljana, e-mail: [tadej.menegatti@fkkt.uni-lj.si](mailto:tadej.menegatti@fkkt.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Polona ŽNIDARŠIČ PLAZL, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Večna pot 113, 1000 Ljubljana, e-mail: [polona.znidarsic@fkkt.uni-lj.si](mailto:polona.znidarsic@fkkt.uni-lj.si)

## IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* CELLS IN A MICROREACTOR USING HYDROGEL

**Abstract:** The main purpose of enzyme and cell immobilization is improved economics of biocatalytic processes. The immobilization enables easier separation of a biocatalyst from the product and its reuse, as well as it improves biocatalyst stability. Regarding the cost-effectiveness and non-destructiveness of the immobilization procedure, entrapment inside a hydrogel is a very promising technique [1]. On the other hand, microreactors with immobilized biocatalysts are considered as very effective systems for continuous biocatalytic processes and their intensification [2].

In this study, the biotransformation of fumaric into L-malic acid was chosen as a model reaction, which is catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* fumarase. Pre-permeabilized yeast cells were entrapped in a layer of the porous structure of the hydrogel based on the alginate and its copolymers with polyvinyl alcohol (PVA). In the initial studies, the influence of the PVA concentration and the crosslinking time on various physico-chemical properties of the hydrogel was evaluated by monitoring the thickness, porosity and thermal properties of the hydrogel. In the hydrogels of various mixtures, the yeast cells were immobilized and retained activity was determined in batch processes revealing also effectiveness factor. In order to develop an efficient microreactor with immobilized biocatalyst the hydrogel film should be as thin as possible, which would allow us the optimal use of the biocatalyst in reactions with substrate diffusion through the porous structure. To this end, films of hydrogels of various components were inserted in a microreactor with two poly(methyl methacrylate) plates and the efficiency of the permeabilized cells was determined by tracing the substrate concentration at the microreactor outlet. The stability of the microreactor was tested by performing multi-day continuous biotransformation at low flows of substrate solution.

The study revealed that the increase in PVA concentration resulted in a thinner layer of hydrogel film, which consequently increased the biocatalyst availability for the substrate. The optimal crosslinking time was set to be between 1 and 4 h. The porosity of the hydrogel has also increased by increasing PVA concentration yielding final value of 73%. In all cases, effectiveness factor was above 0.7 and the conversion in the microreactor has increased by increasing PVA concentration in the copolymer hydrogel. In addition, the operational stability of the microreactor with immobilized yeast cells in the PVA alginate hydrogel film was also tested. After 72 h of continuous operation, 75% of initial productivity was retained.

**Keywords:** alginate, polyvinyl alcohol, hydrogel, immobilization, microreactor, biocatalysis

[1] Nunes, M.A.P.; Vila-Real, H.; Fernandes, P.C.B.; Ribeiro, M.H.L. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, 160, 2129–2147

[2] Wohlgemuth, R.; Plazl, I.; Žnidaršič-Plazl, P.; Gernaey, K.V.; Woodley, J.M. *Trends Biotechnol.*, 2015, 33, 302–314

## PRIPRAVA ČLOVEŠKEGA PROTITELESA PROTI HEPATITISU B IZ KRVI CEPLJENIH DAROVALCEV

Sandra OMEJEC<sup>1</sup>, Vladka ČURIN-ŠERBEC<sup>2</sup>

**Povzetek:** Monoklonska protitelesa predstavljajo veliko skupino bioloških zdravil, ki se vedno bolj uporabljajo za preprečevanje in zdravljenje bolezni. Večina terapevtskih monoklonskih protiteles je še vedno himernih in humaniziranih mišjih monoklonskih protiteles. Ta so za človeka imunogena in lahko sprožijo tvorbo protiteles proti mišjim zaporedjem. Raziskave so zato usmerjene v razvoj in pripravo popolnoma človeških monoklonskih protiteles. Nove strategije izkoriščajo človeški vir, saj lahko monoklonska protitelesa pripravimo iz imunskih celic krvi darovalcev, ki so bili imunizirani zaradi cepljenja, infekcije, nosečnosti ali transfuzije krvi. Nekaj dni po imunizaciji so namreč v krvi prisotne plazmatske celice B, ki producirajo protitelesa, specifična za naš antigen. S to novo tehnologijo je bilo do sedaj objavljenih le nekaj člankov v revijah Nature in Science, kjer so takšna protitelesa pripravili iz krvi s HIV in Ebolo okuženih oseb. Protitelesa iz imunskih celic krvi v telesu afinitetno dozori in so zato visoko specifična za antigen ter imajo široko nevtralizacijsko sposobnost. Za naš model smo si izbrali darovalce krvi, ki so bili cepljeni proti hepatitisu B in jim po 7 dneh odvzeli kri. Iz krvi smo osamili enojedrne celice in jih immortalizirali z virusom Epstein-Barr (EBV), da smo pridobili stabilno celično linijo aktiviranih limfoblastov B. Za določevanje sposobnosti produkcije protiteles proti površinskemu antigenu hepatitisa B (HBsAg) in prisotnost imunoglobulinov (IgG) v supernatantih celičnih kultur smo optimizirali ELISA test. Celice B smo ločevali s celičnim ločevalcem glede na prisotnost in odsotnost označevalca CD20, ki se izraža na spominskih in naivnih celicah B, njegovo izražanje pa se izgubi z diferenciacijo v plazmatske celice. Za ločevanje celic B, ki so specifične za HBsAg, smo uporabili magnetne delce z vezanim antigenom. Ugotovili smo, da po daljšem času gojenja v kulturi (po približno 3 tednih) ali po uporabljeni metodi ločevanja celic, specifičnih za HBsAg, celice izgubijo lastnosti produkcije protiteles. Celice smo bili zmožni po antigen specifičnem sortiranju uspešno namnožiti, zamrzniti in odmrzniti. Pristop bomo spremenili in uporabili rekombinantne tehnike za pripravo monoklonskih protiteles proti HBsAg iz posamične celice B, osamljene iz krvi cepljenih darovalcev. Za ločevanje bomo izbrali učinkovitejše metode kot so na antigen specifično ločevanje celic s pretočnim celičnim ločevalcem ali ločevanje celic v mikrofluidnih kapljicah na mikročipih. Z ločevanjem bomo pridobili posamično celico, ki nosi zapis za specifično protitelo proti izbranemu antigenu. Zapis za mRNA iz posamične celice B bomo sekvencirali in iz pridobljenih zaporedij variabilnega dela težke verige in lahke verige protiteles pripravili vektor za prenos genskega zapisa za specifično protitelo v ekspresijske celice. Razvito tehnologijo bomo lahko uporabili za pripravo različnih človeških monoklonskih protiteles.

**Ključne besede:** človeška monoklonska protitelesa, celice B, antigen virusa hepatitis B (HBsAg), ločevanje celic, rekombinantna tehnologija

---

<sup>1</sup>Avtorica: Sandra OMEJEC, mag. molek. in funkc. biol., Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Center za raziskave in razvoj diagnostičnih reagentov, Šlajmerjeva 6, Ljubljana, e-mail: [sandra.omejec@ztm.si](mailto:sandra.omejec@ztm.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Vladka ČURIN-ŠERBEC, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Center za raziskave in razvoj diagnostičnih reagentov, Šlajmerjeva 6, Ljubljana, e-mail: [vladka.curin@ztm.si](mailto:vladka.curin@ztm.si)

## GENERATING HUMAN ANTIBODY AGAINST HEPATITIS B FROM BLOOD OF VACCINATED DONORS

**Abstract:** Monoclonal antibodies represent a large group of biological therapeutics that are increasingly applied to prevent and treat human diseases. While the majority of therapeutic monoclonal antibodies on the market are still chimeric or humanized antibodies. Those are immunogenic for patients, because they induce human anti-mouse antibody response in patients. Therefore studies have been developing methods to generate fully human monoclonal antibodies. New strategies take advantage of human source to generate human monoclonal antibodies from immune cells isolated from immunized donors, due to vaccination, infection, pregnancy or blood transfusion. Few days after immunization affinity-maturated B cells (plasmablasts) are present in blood sample, which secrete antibodies specific to chosen antigen. Only a few studies up to date published in Science and Nature describe this approach where they generated antibodies from peripheral blood of patients infected with HIV and Ebola survivors. Antibodies from immune blood cells undergo affinity maturation and have high specificity and broad neutralizing properties. For our research model we chose donors, which were vaccinated against hepatitis B and after 7 days collected blood samples. We optimized the protocol for isolating peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood and established immortal cell line of activated B lymphoblasts with Epstein-Barr virus (EBV) transformation. We optimized ELISA for the assessment of the production of hepatitis B surface antigen (HBsAg) specific antibodies in the supernatants of cell cultures and for the presence of immunoglobulins G (IgG). Cells were sorted on cell sorter for the presence of CD20 marker, which is expressed on naïve and memory B cells, expression is lost with differentiation in plasma cells. For HBsAg specific sorting of B cells we used magnetic beads. We observed that after three weeks expansion in the culture or after sorting the cells lose the ability to produce antibodies. After robust antigen-specific selection we were able to efficiently expand, freeze and thaw cells with specific binding to HBsAg. We will change the approach and use the recombinant technology technique to generate monoclonal antibodies against HBsAg from single B cell isolated from vaccinated donors. For cell sorting we tend to use more efficient methods like antigen specific sorting with flow cytometry or sorting cells in microfluidic droplets on microchips. With sorting we will isolate single cell, which encodes antibody specific for the chosen antigen. We will sequence mRNA from single cell and construct a vector with variable region of heavy and light chain for expression cloning of specific antibody. The developed methodology could be used for generating others human monoclonal antibodies of interest.

**Keywords:** human monoclonal antibodies, B cell , hepatitis B surface antigen (HBsAg) specific, cell sorting, recombinant technology

## LABORATORIJSKO OCENJEVANJE VIRULENCE ENTOMOPATOGENIH GLIV ZA NADZOR STRUN (*Agriotes* sp. L.)

Eva PRAPROTNIK<sup>1</sup>, Jaka RAZINGER<sup>2</sup>

**Povzetek:** Strune, talne ličinke hroščev pokalic (Coleoptera: Elateridae), so pomembni škodljivci rastlin kot so pšenica, koruza, sladkorna pesa in razne zelenjave (zlasti korenja in krompirja) v mnogih delih sveta. Učinkovito kemično kontrolo je mogoče doseči z visokimi dozami zrnatih organofosfatov, ki pa so v čedalje več državah prepovedani. To in vse večje zavedanje potrošnikov o kakovostni, zdravstveno neoporečni hrani pospešuje rast trga in raziskav biotičnih sredstev za nadzor strun. Glive, ki pri žuželkah povzročijo bolezen ali smrt, imenujemo entomopatogene glive (EPG) in kot take predstavljajo ustrezno alternativo kemično sintetiziranim insekticidom. Namen naših raziskav je oceniti patogenost in virulenco več vrst gliv, izoliranih iz različnih substratov iz Slovenije. Naši poskusi potekajo na mokaarih, ki so modelni organizmi za tovrstne raziskave. Njihove ličinke so za kratek čas potopljene v suspenzijo spor EPG s koncentracijo  $1 \times 10^8$  konidijev/ml in so nato dane v sterilne posodice z nekaj hrane. Poskus običajno traja 21 dni. Med tem časom je potrebno vsak dan preveriti število mrtvih ali negibnih ličink, pri katerih vzrok smrti določamo z enotedensko inkubacijo na vodnem agarju pri sobni temperaturi. Virulenco smo do sedaj preizkušali na različnih sevih vrst *Metarhizium robertsii*, *M. brunneum* in *Beauveria bassiana*. Najučinkovitejše seve bomo kasneje testirali tudi na strunah, in sicer primarno kot laboratorijski poskus, kasneje pa še kot poljski poskus. Pomembnost tovrstnih raziskav je, da v primeru uspešnih poskusov določen sev lahko predstavlja potencialno okolju prijazno alternativo za nadzor strun, tako v konvencionalnem kot tudi v ekološkem kmetovanju.

**Ključne besede:** entomopatogene glive, talni škodljivci, strune, virulenca, biološke interakcije

---

<sup>1</sup>Avtorica: Eva PRAPROTNIK, mag. varst. biol., Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, e-mail: [eva.praprotnik@kis.si](mailto:eva.praprotnik@kis.si)

<sup>2</sup>Mentor: dr. Jaka RAZINGER, Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, e-mail: [jaka.razinger@kis.si](mailto:jaka.razinger@kis.si)

## LABORATORY ASSESSMENT OF THE VIRULENCE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR WIREWORM CONTROL (*Agriotes* sp. L.)

**Abstract:** Wireworms, click beetle larvae (Coleoptera: Elateridae), are serious soil pests of plants such as wheat, corn, sugar beet and various vegetables (especially carrots and potatoes) in many parts of the world. Effective chemical control can be achieved by high doses of granular organophosphates. However, increasing consumer awareness about quality and healthy food promotes interest for research of biological control of wireworms. Fungi that cause injuries or death of insects are called entomopathogenic fungi (EPF) and as such represent an alternative to chemical insecticides. The aim of our research is to evaluate the pathogenicity and virulence of several species of fungi isolated from different substrates from Slovenia. Our experiments are conducted on mealworms, which represent model organisms for this type of research. Their larvae are submerged in EPF spore suspension with a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/ml for a short period of time and then placed in sterile containers with some food. The experiment usually lasts 21 days. During this time, the number of dead or motionless larvae is evaluated every day and the cause of death is additionally determined by a one-week incubation on water agar at room temperature. So far, virulence has been tested on various strains of the species *Metarhizium robertsii*, *M. brunneum* and *Beauveria bassiana*. The most effective strains will later be tested on wireworms, primarily as a laboratory test, and later as a field experiment. The importance of such research is that, in the case of successful trials, a highly virulent strain can represent a potentially environmentally friendly alternative for controlling wireworms, both in conventional and organic farming.

**Keywords:** entomopathogenic fungi, soil pests, wireworms, virulence, biological interactions

## KOMUNIKACIJA SLUZASTIH BAKTERIJ V TLEH

Mihael ŠPACAPAN<sup>1</sup>, Tjaša DANEVČIČ<sup>2</sup>, Ines MANDIĆ-MULEC<sup>3</sup>

**Povzetek:** Bakterije v naravi najpogosteje najdemo v večceličnih »sluzastih« strukturah iz proteinov in polisaharidov oz. biofilmih. Biofilmi so problem v zdravstvu, saj je sposobnost razvoja biofilma pomemben virulenčni dejavnik in biofilmi so večinski vir persistentnih okužb. Obenem, lahko mašijo pretočne sisteme in povzročajo industrijsko škodo ter vplivajo tudi na kvarljivost živil, po drugi strani so zelo pomembni v čistilnih napravah. *Bacillus subtilis* je bakterija, prisotna v tleh, ki prav tako tvori biofilme. Tam komunicira z različnimi signalnimi molekulami, s katerimi usklajuje porazdelitev dela glede na celično gostoto. Bakterije iz rodu *Bacillus* so zelo pomembne za industrijo tudi zaradi proizvodnje zunajceličnih encimov (npr. proteaz). Pomembno vlogo imajo tudi v zdravstvu, kjer jih uporabljajo kot probiotike. *Bacillus subtilis* je modelni organizem za po Gramu pozitivne bakterije, zato nam znanstvena dognanja pridobljena na tej bakteriji ne nudijo le uvida v fiziologijo bakterij iz rodu *Bacillus*, ampak tudi v širšo skupino bakterij med katerimi so tudi patogene bakterije. Bakterijska komunikacija in porazdelitev dela v biofilmu sta zanimivi tudi iz evolucijskega vidika, zaradi pojava tako imenovanih »goljufov«, ki uživajo ugodnosti dela drugih bakterij navkljub temu, da same ne prispevajo v skupno dobro.

Že v sklopu magistrske naloge, sem preučeval fiziologijo te bakterije v tekočih gojiščih v manjših bioreaktorjih. Delo sem nadaljeval v sklopu doktorske disertacije z večjim poudarkom na bakterijskih biofilmih. Tako sem pridobil mnogo dodatnega znanja o fiziologiji te bakterije, med najpomembnejšimi je to, kako bakterija tvori biofilm, kako tvori toplotno odporne, a dormantne spore, in kako postane genetsko kompetentna. S pridobljenim znanjem heterolognega izražanja proteinov sem lahko proizvedel molekulo, ki jo bakterija *Bacillus subtilis* uporablja za komunikacijo, in jo prečistil s pomočjo visokotlačne tekočinske kromatografije. Naučil sem se genetskih manipulacij, s katerimi sem lahko prekinil ključne gene in pripravil fluorescentne poročevalske seve. S slednjimi sem lahko s pomočjo fluorimetrije in konfokalne mikroskopije spremljal izražanje genov in s tem bakterijsko porazdelitev dela v biofilmih *in vivo*. Naučil sem se tudi pripraviti biosenzorske seve, ki fluorescirajo ob prisotnosti biološko aktivne signalne molekule, s slednjimi sem lahko na preprost način izmeril biološko aktivnost signalne molekule. S pomočjo biokemijskih testov, sem se naučil meriti encimsko aktivnost proteaz, količino sladkorjev in proteinov v biofilmih.

Po končanem študiju si želim še naprej raziskovati fascinanten svet bakterijske fiziologije in pridobiti še kakšno novo spoznanje na tem področju. Tako bi lahko zadostil vrojeni človeški radovednosti, zaradi katere nimamo miru, ko ne razumemo, zakaj je svet takšen kot je. Zelo rad bi tudi predal svoja znanja in veščine na druge, saj bi lahko skupaj naredili še več na tem področju. Pridobljene veščine in znanja bi rad tudi uporabil tako, da bi ustvaril nekaj uporabnega in koristnega za družbo, najsaj bo to boljši način proizvodnje probiotikov, nov biosenzor ali izboljšal industrijski proizvodni postopek za pridelavo zunajceličnih encimov. Za vsa pridobljena znanja sem namreč hvaležen in bi rad to povrnil. Po doktoratu si predvsem močno želim novih izzivov, sicer lahko postane življenje, kot najverjetneje vsi vemo, precej dolgočasno in brez pomena.

**Ključne besede:** *Bacillus subtilis*, bakterijska fiziologija, bakterijska komunikacija, biofilmi, encimi, evolucija

---

<sup>1</sup>Avtor: assist. Mihael ŠPACAPAN, mag. mikrobiol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [Mihael.Spacapan@bf.uni-lj.si](mailto:Mihael.Spacapan@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [Tjasa.Danevcic@bf.uni-lj.si](mailto:Tjasa.Danevcic@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [Ines.MandicMulec@bf.uni-lj.si](mailto:Ines.MandicMulec@bf.uni-lj.si)

## COMMUNICATION OF SLIMY BACTERIA IN THE GROUND

**Abstract:** Most bacteria in natural environments are often found in “slimy” multicellular communities or biofilms, which are formed with extracellular protein and polysaccharides. Biofilms pose a major problem in healthcare, since they are often the main cause of persistent infections. Additionally, biofilms are known to cause congestions in industrial flow systems and considerably contribute to food spoilage. On the other hand, biofilms play a vital role in water purification plants. *Bacillus subtilis* is a bacterium, residing in the soil, which also forms biofilms. This bacterium is often used in industry because of its extracellular degrading enzyme capabilities (e.g. proteases). It is also used as a probiotic. Since this bacterium serves as a model organism for all Gram-positive bacteria, the scientific findings regarding it are very broadly applicable, also on several other pathogenic gram positives. Biofilm formation in *B. subtilis* is often coordinated via intracellular communication. Intra-cellular communication is also interesting from an evolutionary perspective, studying bacteria in such systems helps us understand the emergence of “cheaters” in multicellular communities (individuals which benefit from the intra-cellular communication regulated beneficial public goods, but do not contribute to their synthesis).

I started studying the physiology of this bacterium in smaller batch fermenters during my masters’ thesis. I continued this work during my PhD, but with a greater emphasis on static biofilm growth. This way I familiarized myself with several adaptive processes of this bacterium, specifically with how it forms a biofilm, how it forms metabolically inactive but heat resistant spores and how it becomes genetically competent. I also learned how to produce the signaling peptide molecule ComX in a heterologous expression system and how to purify it with high performance liquid chromatography (HPLC). I also learned the genetic manipulation needed to mutate target genes, and construct fluorescent transcriptional reporter strains. With it I was able to observe gene expression and labor distribution *in vivo* bacterial biofilms. I also constructed reporter strains, which fluoresced in response to the ComX signaling molecule, thus enabling me to quantify the biological activity of ComX. I also optimized some biochemical tests, with which I was able to measure proteolytic activity, biofilm sugars and biofilm protein contents.

After finishing my PhD I would love to further work in the fascinating field of bacterial physiology and gain even more knowledge in this field. This way I hope to satisfy the inborn sense of curiosity we are all born with. The same sense which won’t leave us at peace when there are still unknowns for us to uncover. I would also love it very much to convey my skills and knowledge unto others, because in greater numbers we could work together to achieve even more. I would also love to apply the skills and knowledge gained, in order to produce something useful for the society, be it a better way of producing probiotics, a new biosensor, or maybe just to optimize the way extracellular enzymes are produced. After all I am very grateful for all the opportunities I have been given in order to better myself, so I feel like I should somehow demonstrate my gratitude. The most important wish I have after finishing my thesis however, is to be challenged. I always strive for self-improvement because, as we all know one way or another, life without challenge and purpose can become insanely dull and meaningless.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, bacterial physiology, bacterial communication, biofilms, enzymes, evolution

## VPLIV PESTICIDOV IN PATOGENOV NA IMUNSKI SISTEM MEDONOSNE ČEBELE (*Apis mellifera*)

Tanja TESOVNIK<sup>1</sup>, Mojca NARAT<sup>2</sup>, Aleš GREGORC<sup>3</sup>

**Povzetek:** Medonosna čebela, *Apis mellifera*, ima pomembno vlogo pri oprашevanju in ohranjanju biološkega ravnotežja v okolju. Opráševanje predstavlja interakcijo med žuželkami in rastlinami, od katere je odvisna tako pridelava čebeljih produktov kot pridelava večine poljščin, sadežev ali semen. Zaradi intenzivne pridelave poljščin se je povečala tudi uporaba fitofarmaceutskih sredstev (FFS). Čebele so, kot ne-tarčni organizmi, izpostavljene FFS med vsakodnevnim nabiranjem nektarja in peloda. Pelod, ki je primarni vir hranil odraslih in razvijajočih se čebel, lahko posledično povzroči izpostavitve celotne čebelje družine FFS. Čebele so hkrati izpostavljene tudi številnim škodljivcem kot so bakterije, glive, virusi, mikrosporidiji in pršice. V zadnjem desetletju se je pojavil problem množičnega odmiranja čebeljih družin po celem svetu. Vzroke pripisujejo povečani uporabi FFS, med-vrstnemu prenosu parazitov in patogenov ter interakciji omenjenih stresorjev. Zato je pomembno, da se podrobneje razišče vzroke odmiranja čebel, kot enega od najpomembnejših dejavnikov v tej verigi.

Naše raziskave se nanašajo na vprašanja, kako vplivajo določeni pesticidi (tiametoksam, imidakloprid in prokloraz) in okužba s patogeni (*Varroa destructor* in *Nosema ceranae*) na imunski odziv čebel, kar smo preučevali na nivoju izražanja imunskih genov v različnih razvojnih fazah čebel. Poskuse smo zasnovali na različne načine. Da bi obravnavali učinek pesticidov in škodljivcev v realnem okolju smo v nekaterih eksperimentih obravnavali čebele v družinah. Za izvedbo bolj kontroliranih poskusov, brez dodatnih abiotskih in biotskih vplivov, smo v nadaljevanju raziskav čebele, od ličink do odraslih čebel, gojili tudi v laboratorijskih prostorih. Tretji sistem poskusov pa je potekal v prvem delu v čebeljih družinah do izleganja odraslih čebel in nato v laboratoriju v eksperimentalnih kletkah. Med izvajanjem eksperimentov smo vzorčili različne razvojne faze čebel od belookih bub, rjavookih bub in odraslih čebel.

Imunski sistem žuželk v primerjavi z vretenčarskim ni okrnjen, temveč predstavlja drugačno izpeljavo rešitve za enak problem. Nekateri elementi imunskega sistema so evolucijsko ohranjeni, medtem ko so drugi unikatni za žuželke. Podobno kot vretenčarji, imajo tudi žuželke konstitutivno in inducibilno obrambo, aktivirano ob prisotnosti patogenov in/ali stresa. Zaradi skupnega vpliva več stresnih dejavnikov, so interakcije med posameznimi komponentami imunske obrambe včasih težko predvidljive. Vpliv mnogih zunanjih dejavnikov povzroči v čebelah stres, ki vpliva na izražanje genov, povezanih z imunostjo, razstrupljanjem, razvojem in apoptozo. V pridobljenih vzorcih smo, s pomočjo metode za sledenje pomnoževanje tarčnega gena v realnem času (RT-qPCR), analizirali izražanje genov, ki imajo zapis za proteine, pomembne za imunsko sposobnost čebel. Pridobljene podatke smo nato statistično obdelali in slikovno prikazali na različne načine. Naši poskusi so pokazali, da imajo pesticidi velik pliv na izražanje imunskih genov že v razvojni fazi belookih bub. Ugotovili smo, da lahko pesticidi skupaj s patogeni delujejo aktivacijsko ali zavirajoče na imunski sistem, kar lahko povzroči preobremenitev ali zaviranje obrambe organizma v daljšem časovnem obdobju in posledično preobčutljivost za druge stresne dejavnike.

**Ključne besede:** *Apis mellifera*, pesticidi, *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, imunski geni

---

<sup>1</sup>Avtorica: Tanja TESOVNIK, mag. biotehnol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [tanja.tesovnik@bf.uni-lj.si](mailto:tanja.tesovnik@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Mojca NARAT, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [mojca.narat@bf.uni-lj.si](mailto:mojca.narat@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>prof. dr. Aleš GREGORC, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Pivola 10, Hoče, e-mail: [ales.gregorc@um.si](mailto:ales.gregorc@um.si)

## EFFECT OF PESTICIDES AND PATHOGENS ON HONEY BEE (*Apis mellifera*) IMMUNE SYSTEM

**Abstract:** Honey bees (*Apis mellifera*) have an important role in maintenance of biological balance and as pollinators in almost all terrestrial ecosystems. Pollination is important for the production of honey bee products and production of the crops, fruits and seeds. Intensive crop production requires the use of pesticides. Bees, as one of non-target organisms, are chronically exposed to a cocktail of pesticides during daily harvesting of nectar and pollen. Pollen, which is the primary source of nutrients for adult and developing honey bees can also be the main cause of pesticide exposure for the whole colony. Honey bees are also exposed to numerous pathogens such as bacteria, fungi, viruses, microsporidia and mites. Over the last decade the problem of colony collapses has been observed all over the world. The colony collapses are attributed to the increased use of pesticides, inter-species transmission of parasites and pathogens and interaction of pesticides and pathogens. Therefore it is important to examine more in detail the causes of honey bee declines.

Our research group investigate how honey bee exposure to pesticides (thiamethoxam, imidacloprid and prochloraz) and infection with pathogens (*Varroa destructor* in *Nosema ceranae*) effects their immune response, which we analyzed with expression of immune related genes in different developmental stages. Some of our experiments were carried out in honey bee colonies in order to research real effects of pesticides and pathogens on honey bees. For more controlled experiments with less abiotic or biotic factors we carried out experiments where first instar larvae were artificially reared in laboratory until adult honey bees. Our third system of experiments was consisted of two parts, first part was done in honey bee colonies until honey bee emergence. Second part was done on newly emerged bees transferred into experimental cages in laboratory. During the experiments we sampled various honey bee developmental phases from white-eyed pupae, brown-eyed pupae to adult honey bees.

Insect stress responses show parallels to those found in vertebrates. Therefore, their immune systems should not be viewed as stunted forms of vertebrate immunity, but as different solutions to the same problem. Some aspects of immune defense appear to be evolutionarily conserved and other aspects appear to be unique for insects. Insects have both constitutive defenses and inducible defenses, produced only when a pathogen or other stressor is present. The influence of many external factors cause stress in honey bees which affects expression of genes associated with immunity, detoxification, development and apoptosis. From gathered honey bee samples we analyzed expression of immune related genes with RT-qPCR method. The data obtained was statistically processed and displayed in various graphical manners. We observed that pesticides together with pathogens can activate or inhibit immune system which can result in overloading or inhibiting the immune defense of the organism over the prolonged period of time and consequently cause hypersensitivity to other stress factors.

**Keywords:** *Apis mellifera*, pesticides, *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, immune genes

## MIKROBNA RAZGRADNJA KERATINA

Beti VIDMAR<sup>1</sup>, Maša VODOVNIK<sup>2</sup>, Romana MARINŠEK LOGAR<sup>3</sup>

**Povzetek:** Keratini so netopni strukturni proteini, ki so v primerjavi z ostalimi mehansko stabilnejši in odporni na delovanje mnogih proteolitičnih encimov. Keratinski odpadki predstavljajo velik izziv v agroživilskem sektorju, kjer je najbolj problematičen odpadki perje.

Konvencionalno recikliranje keratinskih odpadkov je povezano z visokimi stroški, hkrati pa pride v postopku proizvodnje perne moke do uničenja nekaterih esencialnih aminokislin. V zadnjem desetletju se razvijajo biotehnološki pristopi za predelavo keratinskih odpadkov, ki temeljijo na mikrobnih encimih. Za razgradnjo keratinskih odpadkov so se začele testirati keratinaze, ki bi lahko z razvojem delno izpodrinile uporabo konvencionalnih postopkov. Keratinaze so edina skupina proteaz, ki omogoča popolno razgradnjo keratinov, zaradi raznolikih biokemijskih in biofizikalnih lastnosti pa jih izkoriščamo za številne aplikacije v biotehnologiji. Peptidi in aminokisliline, ki nastanejo pri hidrolizi s keratinazami, lahko predstavljajo tudi substrat za proizvodnjo bioplina v procesu anaerobne razgradnje.

Mikrobna razgradnja keratina v anaerobnih pogojih je zelo slabo raziskana, o čemer pričča malo število izoliranih anaerobnih keratinolitičnih bakterij, zelo slabo pa so raziskani tudi njihovi keratinolitični sistemi. Zaradi tega razloga smo se usmerili v obogatitev, selekcijo in izolacijo keratinolitičnih anaerobnih bakterij iz anaerobnih metanogenih bioreaktorjev. Selekcijski pritisk v anaerobni metanogeni mikrobnii združbi smo izvedli z dodatkom perja kot prevladujočim virom ogljika. Dodatek keratinskega substrata je obogatil izhodiščno mešano združbo s keratinolitičnimi bakterijami, ki izločajo keratinaze. Prisotnost in aktivnost keratinaz smo spremljali s kvantitativnimi ter kvalitativnimi encimskimi testi. Iz obogatene mikrobne združbe smo z uporabo vrtenih epruvt in selekcijskih gojišč izolirali aktivne anaerobne keratinolitične seve, ki smo jih identificirali z molekularnimi in biokemijskimi metodami. Najbolj aktivnemu izolatu bomo v nadaljevanju dela opisali njegov keratinolitični encimski sistem, prav tako pa bomo z njim bioaugmentirali proces proizvodnje bioplina iz odpadnega perutninskega perja in spremljali njegovo obstojnost v mešani mikrobnii združbi bioreaktorja z molekularnimi metodami.

Pričakujemo, da bomo v okviru doktorske raziskave izolirali, identificirali in opisali najmanj eno še nepoznano anaerobno keratinolitično bakterijo, kar pomeni prispevek k razvoju znanosti na področju mikrobiologije anaerobnih mikroorganizmov in ima hkrati lahko aplikativni potencial. V obdobju sodobnih molekularnih tehnik se le redki raziskovalci lotevajo izolacije mikroorganizmov, še posebej izolacije iz anaerobnih okolij, kjer so tehnike dela zahtevne, potrebna je ustrezna oprema, sam postopek izolacije pa časovno zelo zahteven. Zato so novi, identificirani izolati in njihove lastnosti pomembni in dragoceni, saj dopolnijo evidentirano biološko pestrost mikrobne ekosistema in posledično omogočajo boljše razumevanje delovanja anaerobne mikrobne združbe. S preučitvijo keratinolitičnega sistema najbolj aktivnega keratinolitičnega izolata na ravni genoma in proteoma bomo prišli do novih spoznanj o mehanizmih anaerobne razgradnje keratinskih substratov, za katera upamo, da bodo uporabna tudi v praksi.

**Ključne besede:** Keratin, keratinoliza, mikrobna razgradnja, keratinaze, biotehnološke aplikacije

---

<sup>1</sup>Avtorica: Beti VIDMAR, mag. biotehnol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [beti.vidmar@bf.uni-lj.si](mailto:beti.vidmar@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: doc. dr. Maša VODOVNIK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [masa.vodovnik@bf.uni-lj.si](mailto:masa.vodovnik@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [romana.marinsek@bf.uni-lj.si](mailto:romana.marinsek@bf.uni-lj.si)

## MICROBIAL DECOMPOSITION OF KERATIN

**Abstract:** Keratins are insoluble structural proteins, which are mechanically more stable and resistant to degradation with proteolytic enzymes, comparing to other proteins. Keratin waste represents a major challenge in the agricultural sector, where feather waste is most problematic.

Conventional methods for recycling of keratin waste are expensive, consume large amounts of energy and lead to loss of some essential amino acids important for subsequent production of value-added products or bioenergy. In the last decade the development of biotechnological approaches using microbial enzymes is being explored, from which keratinases are used for degradation of keratin waste. Keratinases are the only group of proteases that allow complete decomposition of keratin and could in time partially supplant the use of conventional processes. Due to their diverse biochemical and biophysical properties, they are exploited for many applications in biotechnology. Peptides and amino acids resulting from hydrolysis with keratinases may also constitute a substrate for the production of biogas in the process of anaerobic decomposition.

Microbial degradation of keratin under anaerobic conditions has been poorly studied, as witnessed by a small number of isolated anaerobic keratinolytic bacteria and poor knowledge of their keratinolytic systems. For this reason, we focused mainly on enrichment, selection and isolation of keratinolytic anaerobic bacteria from anaerobic methanogenic bioreactors. The enrichment and selection in the anaerobic methanogenic microbial community was carried out with the addition of feathers as a predominant source of carbon. The addition of keratin substrate has enriched mixed bacterial community with keratinolytic bacteria that secreted keratinases. The presence and activity of keratinases during selection was monitored by quantitative and qualitative enzyme tests. From an enriched microbial biomass, active anaerobic keratinolytic strains were isolated using roll tube technique and selection media. Keratinolytic strains were identified using molecular and biochemical methods. The most active isolate will be described by its keratinolytic enzyme system, and will be used for bioaugmentation of biogas production from feather waste, during which we will monitor its persistence within microbial biomass using molecular methods.

During doctoral research it is expected to isolate, identify and describe at least one unknown anaerobic keratinolytic bacterium, which will contribute to the development of science in the field of microbiology of anaerobic microorganisms and have an application potential at the same time. In the era of modern techniques only a few researchers are dealing with isolation of microorganisms, especially from anaerobic environments, where work techniques are demanding, adequate equipment is needed and the process of isolation is very time-consuming. Therefore, new identified isolates and their properties are important and valuable, since they complement the recorded biological diversity of the microbial ecosystem and consequently enable a better understanding of the functioning of the anaerobic microbial communities. By examining the keratinolytic system of the most active keratinolytic isolate at the genome and proteome level, we will find new insights on the mechanisms of anaerobic degradation of keratin substrates, which we hope to be also useful in practice.

**Keywords:** Keratin, keratinolysis, microbial degradation, keratinases, biotechnological applications

## **EKONOMIKA NARAVNIH VIROV**

## SKUPNA KMETIJSKA POLITIKA EU IN OKOLJE

Ilona RAC<sup>1</sup>, Emil ERJAVEC<sup>2</sup>, Janet DWYER<sup>3</sup>

**Povzetek:** Približno polovica ozemlja Evropske unije je v kmetijski rabi in vplivi sodobnega kmetijstva na okolje so predmet rastoče družbene in znanstvene kritike. Ključna področja vpliva so onesnaženje voda, tal in zraka (vključno s toplogrednimi plini), spremembe rabe tal ter biotska pestrost. Skupna kmetijska politika EU, ki je tudi najstarejša skupna politika Unije, naj bi se s tem vprašanjem ukvarjala že od leta 1985, ko je bil uveden koncept 'okoljsko občutljivega kmetovanja' (environmentally sensitive farming); leta 1987 pa so okoljska vprašanja uradno postala t.i. horizontalna politika, kar pomeni, da naj bi bila upoštevana pri oblikovanju vseh drugih politik. Četudi EU uradno nima ustave, je slednje načelo zapisano v temeljnih pogodbah EU (Pogodba o delovanju Evropske unije), kar mu torej daje status ustavnega načela.

Kljub načelnemu vse večjemu vključevanju okoljskih vidikov v kmetijsko politiko ( uvedba kmetijsko-okoljskih plačil leta 1992, navzkrižne skladnosti 2003 in zelenega plačila 2013) in tudi izboljšanim praksam, kot so zmanjšanja vnosa mineralnih gnojil, ima kmetijski sektor še vedno močan vpliv na okolje. Številni avtorji slabe rezultate pripisujejo temu, da se kljub vidnim premikom na načelni ravni, torej na ravni strategij in nezavezujočih političnih dokumentov, na ravni izvajanja politik, ta premik dogaja bistveno počasneje oz. se sploh ne dogaja. Študije diskurzov in političnoekonomске študije kažejo, da so bile različne konceptualizacije okolja (npr. 'ekosistemske storitve') skozi zgodovino SKP izrabljene za promocijo politike, ki podpira posamezne interese in ohranja strukturo izplačil čimbolj nespremenjeno. To se pripisuje različnim dejavnikom, kot so lobiranje določenih družbenih skupin, pritiski mednarodne skupnosti po liberalizaciji trgov (zlasti v okviru WTO/STO) ter prevlada drugih strateških ciljev na ravni EU (npr. prehranska varnost).

Primarni namen raziskave je dokazati neskladje med deklariranimi strateškimi cilji, ukrepi kmetijske politike (zlasti proračunskimi izplačili) ter rezultati v smislu izboljšanih vplivov na okolje. Raziskava kombinira kvalitativne (participativno raziskovanje in diskurzivna analiza) ter kvantitativne (analiza proračunskih izplačil in okoljskih indikatorjev) analitične metode z namenom ugotoviti dejanski domet SKP pri doseganju trajnostnega upravljanja s kmetijskimi ekosistemi. Zanimajo nas torej glavni institucionalni in družbeni faktorji vključevanja okolja v to politiko.

Hipoteze (močno poenostavljene) so naslednje:

- Diskurzi, ukrepi in učinki SKP z vidika varovanja okolja (ohranjanja ekosistemov in njihovih 'storitev') so v neskladju, saj 'denar ne sledi besedam'. To pomeni, da se kljub deklarativni zavezanosti varstvu okolja sredstva za ta namen povečujejo počasi, po drugi strani pa se ukrepi vsebinsko izvajajo polovičarsko, zato so rezultati slabi.
- Kmetijstvo je mogoče razumeti kot kompleksen sistem (ali večnivojske ugnezdene sisteme), kjer se prepletajo družbeni in naravni elementi, zato je mogoče uporabiti in razširiti teoretični okvir 'Socio-ekoloških sistemov' za analizo vpliva ukrepov kmetijske politike na trajnostno upravljanje z ekosistemi.
- Ohranjanje in povečanje zagotavljanja ekosistemskih storitev iz kmetijstva je mogoče doseči tudi s spodbujanjem njihovega vrednotenja skozi kolektivno delovanje, kar lahko zajema tudi sodelovanje države in zasebnikov ter tržne mehanizme.

**Ključne besede:** kmetijstvo in okolje, politika, socio-ekološki sistemi, ekosistemske storitve, diskurzi.

---

<sup>1</sup>Avtorica: Ilona RAC, raziskovalka, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [ilona.rac@bf.uni-lj.si](mailto:ilona.rac@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Emil ERJAVEC, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Groblje 3, Domžale, e-mail: [emil.erjavec@bf.uni-lj.si](mailto:emil.erjavec@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>prof.dr. Janet DWYER, Countryside and Community Research Institute, University of Gloucestershire, UK, e-mail: [jdwyer@glos.ac.uk](mailto:jdwyer@glos.ac.uk)

## INTERACTION OF THE COMMON AGRICULTURAL POLICY OF THE EU AND THE ENVIRONMENT

**Abstract:** Approximately half of the EU's territory is in agricultural use and the effects of modern agriculture are increasingly subject to societal and scientific critique. The main areas of effect are water, air (including GHGs) and soil pollution, land use change and biodiversity loss. The EU's Common agricultural policy (CAP), the Union's oldest common policy, has supposedly been tackling these issues since 1983, when the concept of 'environmentally sensitive farming' was introduced; in 1987, the environment was granted horizontal policy status, meaning that it must be considered when planning all other policies. This principle is enshrined in the EU treaties (Treaty on the functioning of the EU) and is thus a constitutional principle, the lack of a formal constitution notwithstanding.

Despite increasing emphasis on environmental aspects in the CAP (introduction of agri-environmental schemes in 1992, cross-compliance in 2003 and green direct payments in 2013), as well as improved practices, e.g. reduced mineral fertilization, agriculture still seriously affects the environment. Numerous authors ascribe weak policy results to the fact that, while there are apparent shifts in principle, i.e. at the level of strategies and non-binding political documents, transformation at the implementing level is substantially slower or even non-existent. Discourse and political-economy studies indicate that different conceptualisations of the environment (e.g. 'ecosystem services') have been exploited over the years in order to promote a policy that supports particular interests and alters the structure of payments as little as possible. This is attributed to factors such as lobbying by certain social groups, pressure from the international community to liberalize markets (especially within the WTO) and the preponderating power of other strategic interests at the EU level (e.g. food security). The primary aim of the research is to demonstrate the misfit between declared strategic goals, agricultural policy measures (especially budgetary disbursements), and tangible results in terms of decreased negative impacts on the environment. It combines qualitative (participatory research and discourse analysis) and quantitative (analysis of budgetary payments and environmental indicators) methods with the intent of unveiling the purview of the CAP to achieve sustainable management of agroecosystems and exploring the main institutional and societal factors of the environment's inclusion into this policy.

Hypotheses (simplified):

- CAP discourses, measures and effects in terms of environmental protection (preservation of ecosystems and their 'services') are in discord: 'the money does not follow the talk'. This means that, regardless of a declarative commitment to environmental protection, funding for this goal is slow to increase, while the implementation of substantive measures is haphazard, yielding poor results.
- Agriculture can be conceived of as a complex system (or embedded multilevel systems) with intertwined natural and social elements, and thus the theoretical frame of 'Social-ecological systems' can be utilized and expanded to analyse the effects of agricultural policy on the sustainable management of ecosystems.
- It is also possible to maintain and enhance the provision of ecosystems services from agriculture by promoting their valorisation through collective action, which may also entail cooperation between government and private actors, as well as market mechanisms.

**Keywords:** agriculture and environment, policy, social-ecological systems, ecosystems services, discourses.

## **HORTIKULTURA**

## VPLIV SALICILNE IN METIL-SALICILNE KISLINE NA RAST MICELIJA RAZLIČNO AGRONOMSKO POMEMBNIH GLIV TER NA OKUŽBO JABOLK Z GLIVO *Monilinia laxa* L.

Saša GAČNIK<sup>1</sup>, Maja MIKULIČ-PETKOVŠEK<sup>2</sup>, Alenka MUNDA<sup>3</sup>

**Povzetek:** Salicilna kislina (SA) je rastni hormon, ki ima pomembno vlogo v rastlinah kot signalna molekula, ki pripomore k sistemski inducirani odpornosti na stresne razmere. Poznamo različne derivate SA – najbolj znana sta metil-salicilna kislina (MeSA) in acetil-salicilna kislina, ki jo bolje poznamo kot aspirin. Različni avtorji navajajo, da ima SA različne vplive na rast in razvoj različnih sadnih vrst, med drugim večjo maso in trdoto plodov, višjo vsebnost askorbinske kisline, skupnih fenolov in flavonoidov ter boljšo aktivnost nekaterih encimov. Poročajo pa tudi o antifungicidnih učinkih SA na nekatere glive, kot sta *Monilinia fructicola*, in *Botrytis cinerea*. Varstvo rastlin pred boleznimi predstavlja velik izziv zaradi splošnega zavedanja javnosti o škodljivosti učinkovitih fitofarmaceutskih sredstev (FFS) in posledično opuščanja le teh. Tretiranje rastlin s SA bi lahko predstavljalo alternativo uporabi fitofarmaceutskih sredstev. Namen naše raziskave je bil ugotoviti vpliv SA in MeSA na rast različno agronomsko pomembnih gliv (*Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Gnomoniopsis smithogilyvi*, *Colletotrichum fioriniae* in *C. godetiae*) v čisti kulturi na krompirjevem gojišču *in vitro* in na razvoj bolezenskih znamenj *in vivo* na uskladiščenih jabolkih, okuženih z glivo *Monilinia laxa*. Pričakovano so miceliji vseh testiranih gliv najbolj rastli na kontrolnem gojišču brez dodane SA in MeSA. Z dodatkom SA oziroma MeSA pa se je rast gliv značilno zmanjšala. MeSA je imela v primerjavi s SA značilno večji učinek na zmanjšanje rasti gliv. Rezultati so pokazali, da je tretiranje z MeSA (2 in 3 mM) povsem zaustavilo rast micelija gliv *G. smithogilyvi* in *M. fructicola*, s koncentracijo 3 mM pa se je zaustavila tudi rast glive *M. laxa*. Na rast gliv *Colletotrichum* sp. je imela prav tako najboljši učinek 2 mM MeSA, ki je rast 20 dni po inokulaciji v primerjavi s kontrolo zmanjšala za 58 – 100% pri *C. fioriniae* in za 77-100% pri *C. godetiae*. Pri obeh načinih okužbe (vbodna rana preko tipsa – T ali igle – I) je imela MeSA najboljši učinek na zmanjšanje nekroz, ki jih je povzročila gliva *M. laxa*. Štiri dni po infekciji jabolk je bila okužba na plodovih, tretiranih s SA, za do 29 % (T) ali do 35% (I) manjša kot pri kontroli, pri MeSA-tretiranih plodovih pa za 32-52% (T) ali za 48-70% (I) manjša v primerjavi s kontrolo.

**Ključne besede:** salicilna kislina, metilsalicilna kislina, *M. fructicola*, *M. laxa*, *G. smithogilyvi*, *C. fioriniae*, *C. godetiae*

---

<sup>1</sup>Avtorica: Saša GAČNIK, mag. inž. horti., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [sasa.gacnik@bf.uni-lj.si](mailto:sasa.gacnik@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: izr. prof. dr. Maja MIKULIČ-PETKOVŠEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [maja.mikulic-petkovsek@bf.uni-lj.si](mailto:maja.mikulic-petkovsek@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>dr. Alenka MUNDA, Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, e-mail: [alenka.munda@kis.si](mailto:alenka.munda@kis.si)

## EFFECT OF SALICYLATE AND METHYL SALICYLIC ACIDS ON MYCELIAL GROWTH OF DIFFERENT AGRONOMICALLY IMPORTANT FUNGI AND ON INFECTION OF APPLE FRUITS WITH *Monilinia laxa* L.

**Abstract:** Salicylic acid (SA) is an endogenous growth regulator and signal molecule that is important for inducing resistance to biotic and abiotic stress. We know different SA derivatives - the most common are methyl-salicylic acid (MeSA) in acetyl-salicylic acid, which is better known as aspirin. Different authors reported the effectiveness of SA treatments on growth and development of various fruit species, such as higher weight, fruit firmness, content of ascorbic acid, bioactive compounds and better activity of some antioxidant enzymes. They also report about antifungal effects of SA on different fungi, such as *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*. The protection of plants against diseases presents a major challenge due to the general public's awareness of the harmful effects of effective plant protection products and consequently their abandonment. The aim of our study was to determinate the effect of SA and MeSA on the mycelial growth of various agronomically important fungi (*Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *Colletotrichum fiorinae* in *C. godetiae*) in pure culture in potato media *in vitro* and on the development of disease signs *in vivo* on stored apples infected with *M. laxa*. Expectedly, the mycelial of all tested fungi were most grown on the control medium without the addition of SA and MeSA. With the addition of SA and MeSA, the growth of fungi was significantly reduced. MeSA compared with SA had a significantly greater effect on the reduction of fungal growth. Results showed that treatment with MeSA (2 and 3 mM) stopped mycelial growth of *G. smithogilvyi* and *M. fructicola*, 3 mM solution of MeSA stopped aswell mycelial growth of *M. laxa*. On the growth of *Colletotrichum* sp. also had the greater effect 2 mM solution of MeSA, which 20 days after inoculation decreased the mycelial growth of *C. fiorinae* for 58-100% and of *C. godetiae* for 77-100% compared to control. In both methods of apple fruits infection (stab wound via tips - T or needle - I), MeSA had the best effect on the reduction the occurrence of necrosis caused by *M. laxa*. SA-treated apple fruits had 4 days after infection for up to 29 % (tips damaged; T) or up to 35% (needle damaged; I) lower infection compared to control. MeSA-treated fruits had for up to 32-52% (T) or 48-70% (I) lower infection in comparison with control.

**Keywords:** salicylic acid, methylsalicylic acid, *M. fructicola*, *M. laxa*, *G. smithogilvyi*, *C. fiorinae*, *C. godetiae*

## ZDRAVJU KORISTNE IN ŠKODLJIVE SNOVI V NEKATERIH SADEŽIH

Mateja ŠENICA<sup>1</sup>, Franci ŠTAMPAR<sup>2</sup>, Maja MIKULIČ PETKOVŠEK<sup>3</sup>

**Povzetek:** Znano je, da nekatere sadne vrste in njihovi plodovi vsebujejo številne koristne snovi. To so predvsem fenoli, ki imajo na naše telo antioksidativni učinek. Manj poznano pa je, da nekateri plodovi vsebujejo tudi nam manj koristne, ali celo škodljive snovi. Ene izmed teh so cianogeni glikozidi, ki ob prekomernem zaužitju lahko povzročijo vrsto neprijetnosti na naše zdravje. Ob zaužitju hrane z veliko vsebnostjo cianogenih glikozidov najpogosteje prihaja do slabosti, bruhanja, vrtoglavice in driske, žal pa lahko tudi do smrti. Od sadnih vrst, kjer se te snovi pojavljajo, so to predvsem semena marelic, breskev, češenj, sliv in jabolk. Priporočajo se kot prehranski dodatki, saj so brez vsebnosti glutena. Po spletu pa se celo širi zmoto mnenje, da naj bi te snovi zdravila rakava obolenja. Nenazadnje, ne smemo pozabiti, da so njihova semena prisotna tudi pri žganjekuhi in so zato kasneje nekatere njihove snovi prisotne tudi v končnem produktu. Zelo pomembna sadna vrsta, ki prav tako vsebuje tovrstne škodljive snovi, je tudi črni bezeg, katerega cvetovi in plodovi se širom po svetu uporabljajo v zdravilne namene. Na začetku podiplomskega študija smo modificirali obstoječo metodo, s katero smo lahko določili prisotnost in vsebnost cianogenih glikozidov v različnih sadnih vzorcih. Metoda je od predhodnih bolj enostavna, hitrejša, cenovno ugodnejša, ter okolju in zdravju prijaznejša. S spremenjeno metodo smo hkrati preverili tudi vsebnost nam koristnih kot tudi škodljivih snovi. Med sadeži, ki se največ pojavljajo v naših sadovnjakih, so največje vsebnosti ljudem škodljivih snovi vsebovala semena sliv, marelic, breskev in češenj. Semena jabolk so vsebovala precej manjše vsebnosti omenjenih snovi, medtem ko smo v semenih hrušk zaznali najnižje vsebnosti. Velike razlike so se pojavile že med različnimi sortami znotraj istih sadnih vrst. Zelo pomembno je, da so bile vsebnosti cianogenih glikozidov od 2 do 64-krat večje od vsebnosti fenolov. Ena izmed študij je bila tudi ugotoviti, kako okolje vpliva na vsebnost proučevanih snovi. Izkazalo se je da temperatura, nadmorska višina in sončno sevanje močno vplivajo na njihove vsebnosti v sadežu. Bolj je rastlina izpostavljena stresnim okoljskim razmeram (nizka temperatura, večje UV-sevanje,...) več zaščitnih snovi bo kopičila. Te snovi rastlina tvori, da se obvaruje pred negativnimi vplivi okolja. Torej, sadeži nabrani na višjih nadmorskih višinah, oziroma izpostavljeni slabšim vremenskim pogojem so vsebovali več zaščitnih snovi, ki so lahko za nas koristne ali pa tudi škodljive. S spremenjeno metodo ekstrakcije in analize ter nekaterimi dodatnimi študijami smo omogočili boljše poznavanje o rasti in razvoju nekaterih sadnih rastlin. V prihodnje si bi želela še naprej raziskovati in delati na področju rastlinske kemije, še posebej z analizami manj zaželenih in strupenih snovi. Poznavanje manj znanih in nekaterih zdravilnih rastlin je med prebivalstvom ponovno v razmahu, zato menim, da bi bilo potrebno še veliko narediti in preveriti na tem področju. Mnoge izmed zdravilnih rastlin, ki jih ljudje uporabljajo v tradicionalni ljudski medicini, lahko vsebujejo vrsto alkaloidov, ki so lahko za ljudi zelo škodljivi. Moje znanje in navdušenje do dela na tem področju, bi z veseljem delila v kateri izobraževalni ali farmacevtski ustanovi.

**Ključne besede:** Fenoli, cianogeni glikozidi, koščice, pečke, bezeg

---

<sup>1</sup>Avtorica: Mateja ŠENICA, mag.inž.horti., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [mateja.senica@bf.uni-lj.si](mailto:mateja.senica@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Franci ŠTAMPAR, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, email: [franci.stampar@bf.uni-lj.si](mailto:franci.stampar@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: izr.prof. Maja MIKULIČ PETKOVŠEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [maja.mikulic-petkovsek@bf.uni-lj.si](mailto:maja.mikulic-petkovsek@bf.uni-lj.si)

## BENEFICIAL AND HARMFUL COMPOUNDS OF SOME FRUIT SPECIES

**Abstract:** It is well known that many fruit species contain various beneficial compounds. These compounds are mainly phenolics with high antioxidant activity. It is much less well-known that some fruits also contain harmful or even toxic compounds. These are cyanogenic glycosides. Ingestion of larger doses of cyanogenic glycosides can cause nausea, vomiting, weakness, dizziness and even death. Among different fruits, cyanogenic glycosides are mainly found in apricot, peach, cherry, plum and apple seeds. Some people ingest the whole fruit, including seeds, and whole fruits are also used in spirit-based beverages. The seeds are used today as gluten-free food supplements and they have been promoted as an alternative cancer therapy online, although this is completely without scientific basis. In addition to the seeds of some fruit species, black elderberry also contains such harmful compounds. Its flowers and berries are used all over the world for various medicinal purposes. In a postgraduate study, we first modified an existing method for determining the presence of cyanogenic glycosides. The new, modified method is simpler and cheaper than the previous one and is also environmentally and human friendly. This method additionally determines the content of certain beneficial phenolic compounds. Among all the studied fruit species, the highest content of harmful compounds were found in the fruit kernels of plums, apricots and cherries. Apple seeds contained much lower amounts, while pear seeds contained the lowest content of cyanogenic glycosides. Major differences occurred among different cultivars from the same fruit species. In general, the contents of cyanogenic glycosides were from 2 to 46-times higher than phenolics. Environment is an additional factor that influences the studied compounds. A change of temperature and solar irradiation with altitude greatly affects the content of phenolics, such as cyanogenic glycosides, in plants. The more plants are exposed to negative conditions (lower temperature, higher solar irradiation), the more protective compounds they produce. Plants accumulate these compounds to protect themselves against negative conditions. Accordingly, fruits collected at higher altitudes with more negative weather conditions contained the highest levels of the studied compounds. The modified method and some additional studies have enabled a better insight into the growth and development of some fruit species. Further research is needed on various plants, especially their adverse or toxic ingredients. In recent years, interest in various herbal and medicinal plants has greatly increased. Further studies in this area can provide better knowledge for consumers and users of such plants. Many herbs contain alkaloids, which can be highly harmful to human health. I would therefore with pleasure share my knowledge and enthusiasm working in an educational institution or pharmaceutical company.

**Keywords:** Phenolics, cyanogenic glycosides, kernels, seeds, elderberry

## **KRAJINSKA ARHITEKTURA**

## ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTNEGA RAZVOJA KRAJIN POD SODOBNIMI RAZVOJNIMI PRITISKI

Andrej BAŠELJ<sup>1</sup>, Tadej BEVK<sup>2</sup>, Barbara KOSTANJŠEK<sup>3</sup>,  
Mojca GOLOBIČ<sup>4</sup>

**Povzetek:** Čeprav je videti, da je bivalno okolje statično ozadje naših vsakdanjih aktivnosti, se v resnici nenehno spreminja ter je prostor dinamičnih procesov. Hitrost in obseg sta sicer odvisna od vrste spremembe, a vendar se te dogajajo hitreje in intenzivneje kot v preteklosti. Spremembe izhajajo tako iz naravnih procesov kot družbenih potreb in želja. Spremembe lahko upravljamo tako, da zagotovijo čim več koristi ob čim manjšem vplivu. Kako spremembe ovrednotiti ter regulirati je ključna tema treh doktorskih raziskav na Oddelku za krajinsko arhitekturo.

(1) Prostor odraža organizacijo družbe. Z razraščajočim potrošniškim načinom življenja je krajina postavljena v utilitaristično vlogo sredstva na razpolago za doseganje določenih interesov, kar slabi prepoznavanje krajine kot skupne javne dobrine. V tem kontekstu prva raziskava raziskuje metode učinkovitega in ustreznega pristopa urejanja krajin, v katerih potekajo tovrstne spremembe. Zlasti na obrobjih mest spremembe rabe tal in s tem povezana pozidava za namen gospodarskih con predstavljata ključna kazalnika poteka družbenih procesov v krajini, na kar vplivajo razpršenost poselitve, veliko število občin in obstoječa načrtovalska praksa. Cilj raziskave je preveriti, ali dosedanja praksa upravljanja in varovanja krajine ustrezno naslavlja te spremembe ter na podlagi ugotovitev vrednotenja krajin na mestnih obrobjih predlagati ustrežnejši in učinkovitejši pristop k njihovemu upravljanju in načrtovanju.

(2) Opisani procesi ne zadevajo le krajin poselitvenih središč, temveč so opazni tudi v območjih, ki jih smatramo za neokrnjeno naravo in v katerih turizem postaja vse pomembnejši dejavnik prostorskega razvoja. Slovenci smo še posebej ponosni na svoj visokogorski svet in ni presenetljivo, da ga tržimo kot turistično destinacijo. Zastavlja se vprašanje, kako urejati prostorski razvoj v specifičnih razmerah, ki jih določa visokogorje ter na kakšen način uskladiti konkurenčne rabe, ki se v tem prostoru pojavljajo. Druga raziskava išče pristope, ki lahko zagotovijo sinergijo med obstoječimi, tradicionalnimi rabami tega prostora in novimi pobudami. Preučuje kako določiti nosilno sposobnost občutljivega visokogorskega okolja in na kakšen način zavarovati tisto, kar nas v ta prostor v prvi vrsti vleče.

(3) Naraščanje potrošnje pomeni tudi naraščanje potrebe po energiji. Javnost pridobivanje energije iz obnovljivih virov (OVE) sicer na splošno močno podpira, a vendar izvedba konkretnih projektov pogosto naleti na nasprotovanje. Pogost argument nasprotnikov so spremembe krajine, ki so posledica izkoriščanja OVE, saj naj bi takšne krajine izgubile svoje kakovosti. Rezultat te spremembe je nov tip krajine – energetska krajina, ki morda vsebuje druge kakovosti, kot prejšnje stanje. Tretja raziskava išče pomene, ki jih krajine, spremenjene s sončnimi elektrarnami, lahko nosijo ter načine, kako s pomočjo OVE ustvariti vitalne krajine. Ugotovitve kažejo, da se del vrednot, ki jih povezujemo s trajnostjo ob postavitvi sončne elektrarne preljuje tudi v dojemanje takšne krajine, a je to odvisno predvsem od prostorskega konteksta in oblikovanja sončne elektrarne.

Vse tri raziskave se ukvarjajo s procesi, ki intenzivno preoblikujejo bivalno okolje. Ob razumevanju lastnosti procesov iščejo načine uveljavljanja različnih interesov na prostorsko skladen način ter podajajo usmeritve za reševanje treh različnih prostorskih problemov, s ciljem zagotoviti ravnotežje med razvojem novih dejavnosti in ohranjanjem kakovosti krajin.

**Ključne besede:** krajina, spremembe v krajini, kulturna krajina, potrošništvo, prostorsko načrtovanje

---

<sup>1</sup>Avtor: Andrej BAŠELJ, uni. dipl. inž. kraj. arh., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za krajinsko arhitekturo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [andrej.baselj@bf.uni-lj.si](mailto:andrej.baselj@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Avtor: Tadej BEVK, mag. inž. kraj. arh., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za krajinsko arhitekturo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [tadej.bevk@bf.uni-lj.si](mailto:tadej.bevk@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Avtorica: Barbara KOSTANJŠEK, mag. inž. kraj. arh., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za krajinsko arhitekturo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [barbara.kostanjsek@bf.uni-lj.si](mailto:barbara.kostanjsek@bf.uni-lj.si)

<sup>4</sup>Mentorica: prof. dr. Mojca GOLOBIČ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za krajinsko arhitekturo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [mojca.golobic@bf.uni-lj.si](mailto:mojca.golobic@bf.uni-lj.si)

## ENSURING QUALITY DEVELOPMENT OF LANDSCAPES UNDER MODERN DEVELOPMENTAL PRESSURES

**Abstract:** While it seems as if our living environment is a static background to our day-to-day lives, it is in fact constantly changing through dynamic spatial processes. Rate and intensity depend on the type of change, but in general they are happening faster and more intensively than in the past. Changes are caused by both natural processes as well as societal aspirations. We can manage these changes to assure maximum benefits with minimum damages. How to evaluate landscape changes and regulate them is the key theme of three doctoral researches at the Department of Landscape Architecture.

(1) Landscapes reflect societal organisation. Increasing consumerism puts landscape in the role of utilitarian means at our disposal to fulfil certain interests, which in turn decreases acknowledgement of landscape as a common good. In this context the first research explores methods of efficient and appropriate approach to managing landscapes in which this kind of changes are taking place. Especially on city outskirts changes in land use and construction of commercial zones represent key indicators of societal processes in the landscape, effecting dispersion of settlements, size of municipalities and planning practice. The aim of this research is to test if existing practice of managing and conserving landscape address these issues in a suitable manner. Based on evaluation of landscapes at city outskirts improved approaches to management and planning will be proposed.

(2) Described processes do not affect only urban landscapes but can also be noticed in areas considered as unspoiled nature in which tourism is becoming a major factor of spatial development. Slovenians are proud of their mountain landscape, so it is not surprising that it is being marketed as a touristic destination. It is however questionable how spatial development should be managed in the specific conditions of high-mountain areas. The second research seeks approaches to assure synergy between existing traditional uses of this space and new initiatives. It explores how to determine the carrying capacity of this sensitive landscape and ways to protect what draws us in there in the first place.

(3) Increasing consumption also means increasing need for energy. Public generally highly supports production of energy from renewable sources (RES) but concrete projects often face opposition. Often, the argument evoked are landscape changes caused using RES. The result is a new type of landscape – energy landscape, which might have other qualities as the previous state. The third research probes these landscapes for meaning they might acquire after being changed with solar power plants and how to use RES to create vital landscapes. Findings show that some values of sustainability can be also found in perception of landscapes with solar power plants, but this mainly depends on the landscape context and the design of the facility itself.

The three researches delve into processes intensively shaping our living environment. By understanding the properties of these processes, they seek ways of enabling fulfilment of various interests in a manner harmonious with landscape qualities. They provide directions for solving three different spatial planning problems with the common goal of achieving a balance between development and conservation of qualities.

**Keywords:** landscape, landscape changes, cultural landscape, consumerism, spatial planning

## **LES IN BIOKOMPOZITI**

## NANOCELULOZNI HIDROGELI – BIOMEDICINSKI POTENCIAL DREVES

Jaka LEVANIČ<sup>1</sup>, Primož OVEN<sup>2</sup>, Ida POLJANŠEK<sup>3</sup>

**Povzetek:** V današnjem času smo ljudje vedno bolj okoljsko ozaveščeni in zahtevamo, da so materiali, ki jih uporabljamo v vsakdanjem življenju čim manj obremenilni za okolje. To nas znanstvenike spodbuja k odkritju novih naravnih materialov, ki bi nadomestili sintetične. Med najbolj zanimivimi materiali v zadnjih letih je tudi nanoceluloza. Da bi pridobili ta material izjemnih lastnosti, vzamemo enega najpogostejših naravnih polimerov, celulozo, in jo s postopki kemične in mehanske obdelave spremenimo iz celuloznih vlaken, kot jih najdemo v papirju, v celulozne nanofibrile ki imajo 10.000x manjši premer kot material iz katerega izvirajo (50  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  5 nm). Z majhnostjo fibril pridejo tudi izjemne lastnosti (odlične mehanske lastnosti in afiniteta do vode), ki jih lahko izkoriščamo na mnogo področjih. Od izdelave izjemno močnih vlaken, kompozitov in filmov do tudi bolj zahtevnih aplikacij na področju medicine.

Ravno na področju medicine bi lahko nanoceluloza doživela velik preboj. Z materialom, ki je hipoalergen, biokompatibilen ter ljudem in okolju prijazen, lahko pripravimo 3D strukture, ki vsebujejo velike količine vode. Tem strukturam pravimo hidrogeli in imajo izjemen potencial v medicini. Z nekaj premetene kemije nam je uspelo pripraviti strukturno zelo stabilne in močne nanocelulozne hidrogelne z izjemno majhnim deležem suhe snovi (0.5% nanoceluloze, 99.5% vode). Mehanske lastnosti teh nanoceluloznih hidrogelov so boljše od že uveljavljenih izdelkov, ki temeljijo bodisi na sintetičnih ali živalskih virih.

Uporaba tovrstnih hidrogelov na področju medicine je zelo široka. Med bolj perspektivnimi področji so nosilci zdravilnih učinkovin, predvsem če lahko z manipulacijo njihove strukture zagotovimo enakomerno in dolgotrajno sproščanje. Zaradi dobre biokompatibilnosti je možna uporaba na področju vzgoje celičnih kultur za regenerativno medicino oziroma za vzgojo in nadomeščanje poškodovanih tkiv, predvsem v kombinaciji s 3D printanjem. Med bolj preprostimi, vendar ne nepomembnimi aplikacijami, so pa tudi preproste obloge za rane, za zdravljenje površinskih poškodb ali opeklin. Nanocelulozni hidrogeli so zaradi svoje gosto prepletene nanofibrilirane strukture tudi nepropustni za različne mikroorganizme, tako lahko zagotavljamo sterilno okolje in preprečujemo komplikacije med celjenjem odprtih ran in opeklin. Dodatno te hidrogeli z izhlapevanjem vode tudi hladijo in zmanjšujejo bolečino, preprečujejo sušenje rane in zagotavljajo ugodno, vlažno, okolje za celjenje.

Nanoceluloza ima res velik potencial na mnogo področjih, in do zdaj smo raziskali le površje možnega.

**Ključne besede:** Celuloza, Nanoceluloza, Celulozne nanofibrile, Hidrogeli, Nanocelulozni hidrogeli

---

<sup>1</sup>Avtor: Jaka LEVANIČ, mag. inž. les., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [jaka.levanic@bf.uni-lj.si](mailto:jaka.levanic@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Primož OVEN, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [primoz.oven@bf.uni-lj.si](mailto:primoz.oven@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>izr. prof. dr. Ida POLJANŠEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana e-mail: [ida.poljansek@bf.uni-lj.si](mailto:ida.poljansek@bf.uni-lj.si)

## NANOCELLULOSE HYDROGELS – BIOMEDICAL POTENTIAL OF TREES

**Abstract:** Nowadays people are more and more environmentally conscious and demand that everyday products have as little impact on the environment as possible. This forces us scientists to discover and develop new natural materials that would replace their synthetic counterparts. Among the most interesting new developments is nanocellulose. In order to obtain this remarkable new material, we take one of the most common naturally occurring polymers, cellulose, and we convert it, using chemical and mechanical processes, from the commonly found cellulose pulp (used in paper production) to something that is about 10.000 times smaller than its starting material (50  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  5 nm). With its size, come its remarkable properties, such as high mechanical strength and affinity for water. These properties render it exceedingly useful for many applications. For example, from production of high strength filaments, transparent films, nano composites to more demanding application in the field of biomedicine.

Nanocellulose could achieve a breakthrough in the medical field. This material, which is hypoallergenic, biocompatible and both human and environment friendly, can be used to prepare 3D structures with a high water content. These structures are called hydrogels, and they have an enormous medical potential. With some clever chemistry, we were able to prepare highly stable and mechanically strong nanocellulose hydrogels with an extremely low solids content (0.5% nanocellulose, 99.5% water). The mechanical properties of these nanocellulose hydrogels are better than those of already established hydrogel products based on either synthetic or animal based raw materials.

The potential areas of use for these hydrogels are numerous. Among the more prominent fields of application is drug delivery, especially if the hydrogel structure or surface chemistry can be tuned for a more controlled and slower release of the drugs. Due to the good biocompatibility and non-cytotoxic behavior, the hydrogels can be used as scaffolds for cell proliferation in regenerative medicine, i.e. the growth and replacement of damaged tissues, this made even more viable with the advancements in 3D printing technologies. Among the simpler, but not less important, aspects of hydrogels use, is that of a simple hydrogel dressing for the treatment of surface wounds or burns. Due to their tightly interdigitated structure, these hydrogels are impermeable to microorganism and can thus provide a sterile environment which reduces the risk of complications during healing. Furthermore, the hydrogels are capable of cooling down the wound via solvent evaporation which reduces pain, additionally they can keep a moist which promotes healing.

Nanocellulose as a material has great potential and so far we have only scratched the surface of what is possible.

**Keywords:** Cellulose, Nanocellulose, Cellulose nanofibrils, Hydrogels, Nanocellulose hydrogels

## LEPILA NA OSNOVI TANINA IN LIGNINA

Jaša SARAŽIN<sup>1</sup>, Milan ŠERNEK<sup>2</sup>

**Povzetek:** Letno se na svetu proizvede 400 milijonov m<sup>3</sup> lesnih plošč, ki vsebujejo približno 20 milijonov ton lepil. 90 % teh lepil predstavljajo sintetična lepila, ki so narejena večinoma na osnovi formaldehida, ki lahko predstavlja tudi do 50 % lepilne smole. Ta derivat metanola je močno toksičen, kancerogen in mutagen ter se iz lesnih plošč sprošča v bivalno okolje. Zato je težnja po zamenjavi takih lepil, z okoljsko prijaznejšimi alternativami, zelo velika.

Tanini in lignini so v naravi najpogosteje zastopane komponente, ki bi lahko zadostile tem potrebam. Za celulozo in hemicelulozo se uvrščajo na tretje in četrto mesto najpogosteje zastopanih komponent v svetovni biomasi. Lignini so namreč ključni gradniki lesa pri vseh olesenelih rastlinah, tanini pa se v različnih deležih nahajajo v skorji, lesu in listju dreves. Zaradi svojega polifenolnega značaja predstavljajo oboji primeren material za uporabo v lepilih za les. S tanini so zaradi njihove velike reaktivnosti že uspeli izdelati lepilne mešanice, ki so bile uspešne tudi v komercialni uporabi in so vsebovale preko 90 % tanina v lepilni smoli. Lignini potrebujejo nekoliko več energije za potek reakcije in so primernejši kot dodatek drugim lepilom (do največ 50 %). Z uporabo obeh komponent, na okolju prijazen način, les lepimo s produkti, ki izvirajo praktično iz lesa samega. Za popolno nadomestitev najbolj kritičnih sintetičnih lepil bi zadostovalo že, da bi uporabili ostanke lesne in papirne industrije, ki se sedaj skurijo. Za zagotovitev zadostne količine tanina, bi zadostovala skorja, ki je stranski produkt v lesni industriji, zadostne količine lignina pa se trenutno sežgejo kot stranski produkt v papirni industriji.

Konzorcijski partnerji projekta WooBAdh z modifikacijo taninov in ligninov pripravljajo nove perspektivne lepilne mešanice. Delo naše delovne skupine na tem projektu pa je z mehanskega in kemijskega vidika opredeliti kakovost posameznih mešanic, ter za najboljšo med njimi optimizirati postopek lepljenja in stiskanja. Proces utrjevanja lepil raziskujemo s specializirano raziskovalno opremo, ki nam zagotavlja vpogled v energijo in sile, ki se formirajo med procesom utrjevanja v samem lepilu, v različnih temperaturnih okoljih. Na ta način določimo temperaturo in čas stiskanja. Temu sledi priprava lepljenih lesenih preizkušancev, ki jih pred testiranjem izpostavimo različnim klimatskim pogojem, da lahko ugotovljamo trdnost in odpornost lepila za različne namene uporabe.

Lepila na osnovi tanina in lignina so se že večkrat izkazala kot primeren nadomestek lepil za les z največjimi emisijami formaldehida. V konzorciju se trudimo, da bomo z optimizacijo lepilnih mešanic in postopkov lepljenja lahko zagotovili zadostno zanimanje deležnikov iz lesne in papirne industrije ter tako dosegli, da bomo boljše izkoristili surovine, ki nam jih obnovljivi del narave ponuja. Le tako bomo lahko postopno zmanjšali škodljive vplive formaldehida na minimum.

Vizija: Po zaključku doktorskega študija bi se rad še naprej ukvarjal z reševanjem raznovrstnih okoljskih izzivov ter nadaljeval z delom na področju aplikativnih raziskav in razvoja.

**Ključne besede:** tanin, lignin, bio-lepila, lesni kompoziti, formaldehid

---

<sup>1</sup>Avtor: Jaša SARAŽIN, mag. inž. gozd., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [jasa.sarazin@bf.uni-lj.si](mailto:jasa.sarazin@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Milan ŠERNEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [milan.sernek@bf.uni-lj.si](mailto:milan.sernek@bf.uni-lj.si)

## TANNIN AND LIGNIN BASED ADHESIVES

**Abstract:** 400 million m<sup>3</sup> of wood panels are produced globally every year, containing approximately 20 million tons of adhesives. 90 % of those adhesives are synthetic adhesives. The most commonly used among them can contain up to 50 % of formaldehyde in adhesive resin. This methanol derivate is highly toxic, carcinogenic and mutagenic and is released from wood panels in environment. Therefore, the tendency to replace such adhesives with environmentally friendly alternatives is very high.

Tannins and lignins are the most abundant components in nature that can meet these needs. After cellulose and hemicellulose, they are ranked third and fourth as most abundant components of world biomass. Lignin is the key component of wood, while tannins can be mostly found in tree bark, wood and leaves. Because of their polyphenolic character, both are suitable materials for use in wood adhesives. Due to high reactivity of tannins, they have already been present in adhesive resin in quantities higher than 90 %, and were also successful in commercial use. Lignins however need more energy for start of the reaction and are more suitable as the additives to other adhesives (up to 50 %). By using both components, wood can be environmentally friendly bonded with products that originate practically from the wood itself. To completely replace the most critical synthetic adhesives, it would be sufficient to use the waste material of wood and paper industries that is now burned. The tree bark, which is a by-product of the timber industry, would ensure a sufficient amount of tannin, while sufficient quantities of lignin are currently burned as a by-product in the paper industry.

With the modification of tannins and lignins, consortium partners of the WooBAdh project, are preparing new promising adhesive mixtures. The work of our working group on this project is to define the quality of individual mixtures, from a mechanical and chemical point of view and to optimize the process of bonding and pressing for the most promising mixtures. The process of adhesive bonding is investigated by specialized research equipment, which provides insight into the energy and forces formed during the hardening process in the adhesive itself, in different temperature environments. In this way, we determine the required temperature and pressing time. After this the preparation of bonded wooden specimens follows, which are exposed to different climatic conditions prior to testing. That's how the strength and resistance of the adhesive can be determined for various uses.

Tannin and lignin based adhesives have already been proven to be a suitable substitute for the wood adhesives with highest formaldehyde emissions. In the consortium we are trying to optimize the adhesive mixtures and bonding processes, which can provide sufficient interest of stakeholders from the wood and paper industry, and the way to achieve better utilization of the raw materials that the renewable part of the nature is offering to us. Only in this way we can gradually reduce the harmful impact of formaldehyde to a minimum.

Vision: After completing the Ph.D. study, I would like to continue with solving diverse environmental challenges and continue to work in applied research and development.

**Keywords:** tannin, lignin, bio-adhesives, wood composites, formaldehyde

## UPORABA PLAZME ZA BOLJŠO KOMPATIBILNOST POVRŠINE LESA S PREMAZI

Jure ŽIGON<sup>1</sup>, Sebastian DAHLE<sup>2</sup>, Marko PETRIČ<sup>3</sup>

**Povzetek:** Pri uporabi lesa in drugih lignoceluloznih materialov za izdelke različnih vrst, te običajno tudi površinsko zaščitimo s premazi, za kar je potrebna ustrežna priprava površin materiala. Pokazatelji dobre kompatibilnosti med površino lesa in premaznim sredstvom in ustreznih lastnosti kakovostne površinske obdelave so dobra penetracija, razlivanje in omočljivost nanesenih premazov. Površina lesa lahko zaradi inherentnih lastnosti lesa (prisotnost različnih spojin in ekstraktivnih snovi, vlažnosti) in vplivov okolice (oksidacija na zraku, staranje zaradi ultravijolične svetlobe) izkazuje nedovzetnost za interakcije s premazi. Za izboljšanje zelenih lastnosti površin lahko uporabimo različne postopke obdelav (mehanska priprava, uporaba kemikalij), s katerimi vplivamo na njihovo dovzetnost za nanesene premaze. Alternativna metoda za modifikacijo površin lesa za doseganje boljše adhezivnosti pa je tretiranje le-teh z razelektrenim plinom ali plazmo. Plazma predstavlja četrto agregatno stanje snovi, do katerega pridemo z dovajanjem energije snovi v plinastem stanju, za modifikacijo površin materialov pa se običajno uporablja t.i. nizkotemperaturna plazma. Plazmo lahko ustvarimo v različnih plinih, vendar je s praktičnega vidika pri tem uporaba atmosferskega zraka kot plina za razelektritev najbolj enostavna.

Z izpostavitvijo lesa plazmi na njegovi površini pride do kemijskih reakcij zaradi bombardiranja z reaktivnimi delci (atomi, molekulami, ioni, radikali) razelektritve, ki spremenijo kemijsko sestavo površine in povišajo njeno prosto površinsko energijo. Obdelava površin s plazmo pred nanašanjem tekočih sredstev (barv, lakov, lepil) pospeši njihovo vpivanje in izboljša oprijemnost. Izbira plazemskega vira in njegova oblika sta odvisni od zahtev aplikacije.

V okviru doktorske naloge smo izdelali napravo za obdelavo površin s t.i. dielektrično barierno razelektrivno plazmo s plavajočo elektrodo, ki do sedaj v ta namen še ni bila uporabljena. Plazma se v napravi ustvari med substratom in dvema medeninastima elektrodama, ki se nahajata v keramičnih ceveh okroglega preseka. Ob dovajanju izmenične električne napetosti iz napajalnika v elektrodi, med njima pride do razelektritve zraka, ki se nahaja med njima in ustvari se plazma. Les, ki je zaradi vsebnosti vlage delno električno prevoden, potuje pod elektrodama, aktivni delci, prisotni v električno nabiti plazmi, pa ob trku s površino materiala na njej povzročijo spremembe.

Na spremembe, do katerih pride na površinah, vplivajo številni parametri, ki tvorijo plazmo, kot tudi lastnosti tretiranega materiala. Na kemijske in morfološke lastnosti površin različnih substratov vplivajo številni parametri procesa tretiranja, ki jih ugotavljamo z različnimi analitskimi metodami in tehnikami.

Z obdelavo površin lesa s plazmo želimo izboljšati njegovo kompatibilnost z vodo (t.j. hidrofilnost) in s premazi na vodni osnovi. Ob tem želimo ugotoviti, kako na interakcije netretiranih in tretiranih površin vplivajo vrsta materiala, njegova vlažnost in debelina obdelovancev, kot tudi čas tretiranja s plazmo in trajanje učinka tretiranja.

Tehnologija in možnost obdelave lignoceluloznih materialov s plazmo na Oddelku za lesarstvo predstavlja novost, s čimer se odpira vrsta možnosti za nadaljnje raziskovalno delo in aplikacije.

**Ključne besede:** adhezija, les, plazma, površina, premazi

---

<sup>1</sup>Avtor: Jure ŽIGON, mag. inž. les., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [jure.zigon@bf.uni-lj.si](mailto:jure.zigon@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Sebastian DAHLE, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [sebastian.dahle@bf.uni-lj.si](mailto:sebastian.dahle@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: prof. dr. Marko PETRIČ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [marko.petric@bf.uni-lj.si](mailto:marko.petric@bf.uni-lj.si)

## APPLICATION OF PLASMA FOR BETTER COMPATIBILITY OF THE WOOD SURFACE WITH COATINGS

**Abstract:** When using wood and other lignocellulosic materials for different types of products, they are usually also coated, which requires the appropriate preparation of the material surfaces. Indicators of good compatibility between wood surface and coating, as well as the corresponding quality of surface treatment are good penetration, spreading and wettability of applied coatings. Due to the inherent properties of wood (the presence of various compounds, extractives, and humidity) and environmental influences (oxidation by air, aging due to ultraviolet light), a wood surface cannot be susceptible for interaction with coatings. Various treatment processes (mechanical preparation, usage of chemicals) can be used to improve the desired properties of surfaces, with which they influence their susceptibility to the applied coatings. An alternative method for modifying wood surfaces to achieve their better adhesiveness is the treatment of these with gas discharges, i.e. plasma. Plasma represents the fourth state of matter, which is obtained by supplying the energy to matter in a gaseous state. For modification of materials surfaces a so-called cold plasmas are usually used. Plasmas can be generated in various gases, but from a practical point of view, the use of atmospheric air as a working gas is the most straightforward.

During the exposure of wood to plasma, chemical reactions occur on its surface due to the bombardment with reactive species (atoms, molecules, ions, radicals) from the discharge, which change the chemical composition of the surface and increase its surface energy. Treatment of surfaces with plasma prior to the application of liquid agents (paints, varnishes, adhesives) promotes their absorption and increases the level of adhesion. The choice of the plasma source and its shape depend on the requirements of the application.

In the framework of the doctoral thesis, we built a device for treatment of surfaces with the so-called dielectric barrier discharge plasma with a floating electrode, which has not been used for this purpose up to now. The plasma is formed between the substrate and two brass electrodes, which are located in ceramic circular tubes. When supplying alternating voltage from the power supply in the electrodes, a discharge of air between them occurs and a plasma is generated. Wood, which is due to the moisture content partially conductive, travels under the electrodes, and the active particles present in electrically charged plasma, by the collision with the surface of the material cause changes on it.

Changes that occur on surfaces are influenced by a number of plasma-forming parameters as well as the properties of the treated material. The chemical and morphological properties of surfaces of different substrates are influenced by many parameters of the treatment process, which are determined by various analytical methods and techniques.

By treating surfaces of wood with plasma, we want to improve its compatibility with water (i.e. enhance its hydrophilicity) and water-based coatings. Here, we want to find out how the interaction of untreated and treated surfaces is influenced by the type of material, its humidity and workpiece thickness, as well as the time of treatment with plasma and the duration of the treatment effect.

The technology and the possibility of processing lignocellulosic materials with plasma is a novelty at the Department of Wood Science and Technology, which offers a number of possibilities for further research work and applications.

**Keywords:** adhesion, wood, plasma, surface, coatings

## **NANOZNANOSTI**

## PROBLEMATIKA RAZISKOVANJA S ČLOVEŠKO KRVJO – PREDANALITIČNI IZZIVI

Manca PAJNIČ<sup>1</sup>, Veronika KRALJ-IGLIČ<sup>2</sup>, Andrej STARC<sup>3</sup>

**Povzetek:** Pri raziskavah z uporabo krvi zdravih posameznikov *ex vivo* lahko prihaja do nepričakovanih rezultatov pregledanih in analiziranih vzorcev. Po pregledu protokolov se kasneje ugotovi storjene napake pred pričetkom analize vzorca, kar imenujemo predanalitične napake. Ugotovljene predanalitične napake raziskavo lahko podaljšajo in podražijo, vplivajo lahko tudi na samo vzorčenje, saj prostovoljci morebiti ne želijo sodelovati pri ponovitvi eksperimenta. Prvi predpogoj so jasna navodila prostovoljcem za odvzeme venozne krvi. Vzorci krvi se osebam jemljejo na tešče, kar pomeni, da vsaj 12 ur prej ne smejo uživati hrane in tekočine. Kajenje, kava in alkohol so v tem 12-urnem času odsvetovani. Oseba naj ne bi bila fizično aktivna in naj ne bi bila podvržena stresu vsaj 1 dan pred odvzemom (hujši napor, vadbe, ipd.). Vse naštetu vemo, da vpliva na rezultate parametrov krvnih preiskav. Ustrezna predpriprava prostovoljca je predpogoj za odvzem venozne krvi. Na dan eksperimenta se odvzem krvi vrši v jutranjih urah med 7.00-9.00 iz dveh razlogov: a) zaradi teščosti preiskovanca ter b) zaradi referenčnih vrednosti preiskovanih parametrov, ki so določeni iz jutranje krvi. Preiskovanec se mora pred odvzemom umiriti, kar pomeni, naj vsaj 10 minut po prihodu na odvzemno mesto sede počiva. Kri se ljudem jemlje sede ali leže, pri odvzemih v stoje so bile dokazane pomembne razlike v vrednostih nekaterih parametrov. Pri odraslih se najpogosteje poslužujemo kubitalnih ven za odvzem. Nad odvzemnim mestom namestimo prevezo (esmarh), ki ne sme prekiniti arterijskega toka in ne sme biti zažeta več kot 1 minuto. Tesna preveza ter prekoračen čas lahko pomenita, da bo vzorec krvi hemolitičen in s tem neuporaben za analize. Raziskovalna skupina v kateri sodelujem, se ukvarja tudi z raziskovanjem ekstracelularnih veziklov (ECV) v krvi. To so delci celic, ki se prosto gibljejo znotraj krvnega obtoka, izvirajo pa pogosto iz trombocitov in endotelnih celic. V eni izmed raziskav smo dokazali, da sta tako dehidracija, kot prehidracija zdravih odraslih prostovoljcev vplivali na znižanje števila ECV v vzorcih, glede na primerjalno kontrolno skupino. V drugi raziskavi smo ugotavljali ali velikost igle za odvzem krvi (dolžina ter notranji premer), hitrost oziroma čas pretoka krvi preko igel ter količina odvzete krvi vplivajo na število ECV v vzorcih. Dokazali smo statistično pomembno povezavo med številom ECV ter izračunano strižno hitrostjo (shear velocity) in za odvzeme priporočili dolge igle z majhnim notranjim premerom, ki morajo vseeno omogočiti neprekinjen tok krvi. Z eksperimentom in matematičnim modelom smo dokazali, da je optimalna velikost igle za odvzem krvi G21. Pri raziskavah s krvjo so lahko razlogi za predanalitične napake še: temperatura okolja in epruvet, neustrezne epruvete za odvzem, neustrezno/nepravilno označevanje vzorcev, prekoračen čas od odvzema do pričetka analize, transportiranje vzorcev, ipd. Natančno beleženje protokolov nam omogoči, da pri preverjanju rezultatov lahko ugotavljamo morebitne napake in izvedemo korekcijske ukrepe pri naslednjih eksperimentih. Kot raziskovalka pogrešam članke o neuspešnih eksperimentih in ugotovljenih napakah, s katerimi se pogosto vsi srečujemo.

**Ključne besede:** predanalitične napake, odvzemi krvi, raziskovanje s krvjo *ex vivo*, človeški faktor

---

<sup>1</sup>Avtorica: Manca PAJNIČ, dipl. m. s., mag. posl. in ekon. ved., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [manca.pajnic@gmail.com](mailto:manca.pajnic@gmail.com)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Veronika KRALJ-IGLIČ, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, e-mail: [veronika.kralj-iglic@fe.uni-lj.si](mailto:veronika.kralj-iglic@fe.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: doc. dr. Andrej STARC, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, e-mail: [andrej.starc@zf.uni-lj.si](mailto:andrej.starc@zf.uni-lj.si)

## PROBLEMS WITH HUMAN BLOOD EXPERIMENTS – PREANALYTICAL CHALLENGES

**Abstract:** In *ex vivo* experiments including human blood, unexpected results of examined and analysed samples can occur. Later after reviewing the protocols, it is detected that errors were made before analysing the sample, which we call pre-analytical errors. The identified pre-analytical errors can prolong the research and increase the costs, and have influence on the sampling itself, as volunteers may not want to participate in the repetition of experiment. The first prerequisite is clear instructions to volunteers for venous blood sampling. The blood samples are collected after fasting at least 12 hours, which means that they cannot eat food or drink liquids. Smoking, coffee and alcohol are not advised during this 12-hour fasting period. The person should not be physically active and should not be subjected to stress at least 1 day before taking (hard work, exercise, etc.). All factors mentioned above can effect on the blood test parameters. Therefore, the proper preparation of a volunteer is a prerequisite for blood collection. On the day of experiment the blood sampling is performed in the morning between 7.00-9.00 for two reasons: a) because of the volunteers' fasting, and b) due to the reference values of the investigated parameters, which are determined in postprandial stage. Volunteers should rest at sitting position for 10 minutes before sampling. Blood sampling is performed in sitting or back position, in the standing position significant differences in some blood parameters have been demonstrated. Usually cubital veins are used for venipuncture and tourniquet is applied above venipuncture site to distends the veins. Tourniquet must not be so tight to occlude arterial flow and not applied for more than 1 minute, since blood sample can become haemolytic and unusable for analysis. Our research team perform experiments also on identifying extracellular vesicles (ECV) in the blood. ECV are cell-derived microparticles that move freely within the bloodstream and originate often from platelets and endothelial cells. In one of the studies, we have shown that both dehydration and hyperhydration of healthy adult volunteers have contributed to a decrease in the number of ECVs in the samples compared to the control group. In the second study, we determined whether the dimention of the needle for blood sampling (length and inner radius), the flow rate, length of blood flow through the needles, and the amount of blood affect the number of ECVs in the samples. We have shown statistically significant correlation between the number of ECVs and the calculated shear velocity. For collecting venous blood, we recommend a long needle with a small internal diameter, which must nevertheless enable an uninterrupted flow of blood. With experiment and mathematical model was shown that the optimal size of the needle for venipuncture is G21. In blood tests, preanalytical errors may also occur due to: room temperature and tube temperature, inadequate testing tubes, inadequate/incorrect sample labelling, exceeded time from withdrawal to start of analysis, sample transport, etc. Accurate recording of protocols enables to check for possible errors in the verification of results and carry out corrective steps in the following experiments. As a researcher, I miss articles about unsuccessful experiments and records of observed errors that we all face time to time.

**Keywords:** preanalytical errors, blood sampling, *ex vivo* blood experiments, human factor

## LIPIDNE KAPLJE – ODZIV CELICE NA STIK Z NANODELCI

Neža REPAR<sup>1</sup>, Damjana DROBNE<sup>2</sup>

**Povzetek:** Za lipidne kaplje je dolgo veljalo, da so le skladišče maščob, danes pa vemo, da gre v resnici za zelo dinamične celične organele s številnimi funkcijami. Najdemo jih praktično v vseh evkariontskih celicah. Sestavljene so iz sredice iz nevtralnih lipidov, obdane pa s fosfolipidnim monoslojem, v katerega so usidrani različni proteini [1].

Biogeneza lipidnih kapelj je v celicah stimulirana takrat, kadar so celice v redoks ali energetskem neravnovesju. Eden izmed razlogov za povečano sintezo lipidnih kapelj v celicah so lahko tudi različni nanodelci (ND). Izmed devetih študij na različnih celičnih linijah je kar osem študij pokazalo, da ND v celicah povečajo količino lipidnih kapelj [2-11], le pri eni pa se je izkazalo, da ND na količino lipidnih kapelj niso imeli vpliva [12]. Večina študij ni obravnavala vzrokov za povečano količino lipidnih kapelj, je pa ena izmed njih pokazala povezavo med količino lipidnih kapelj in oksidativnim stresom [2].

Z drugega aspekta je zanimivo dejstvo, da je ena izmed pomembnih vlog lipidnih kapelj v celici njihova zaščitna vloga, saj celici pomagajo pri spopadanju s stresom. Mehanizem zaščite je pri določenih tipih stresa že dobro pojasnjen, pri ND pa mehanizem še ni znan in je verjetno odvisen od vrste ND in njihovih karakteristik. Trenutno je že objavljena študija, ki nakazuje, da se je preživetje celic ob izpostavitvi ND izboljšalo, če se bile celice predhodno izpostavljene oleinski kislini, ki je v njih stimulirala sintezo lipidnih kapelj [2].

V okviru našega raziskovalnega dela poskušamo ugotoviti, ali superparamagnetni železooksidni nanodelci (SPIONi) vplivajo na dinamiko sinteze in razgradnje lipidnih kapelj v endotelijskih celicah. Poleg tega nas zanima, ali lahko predhodno inducirana sinteza lipidnih kapelj s pomočjo oleinske kisline zaščiti endotelijske celice pred kvarnimi učinki SPIONov.

Naše dosedanje raziskave *in vitro* so pokazale, da SPIONi lahko vstopajo v endotelijske celice ter v celicah po 24 urah povečajo količino lipidnih kapelj, hkrati pa izzovejo tudi oksidativni stres in povzročajo celično smrt. Zanimalo nas je, ali celice ob izpostavljenosti SPIONom sintetizirajo nove lipidne kaplje ali upočasnijo razgradnjo že nastalih. V ta namen smo v celicah z oleinsko kislino najprej stimulirali sintezo lipidnih kapelj, nato pa smo celice izpostavili SPIONom in jih spremljali nekaj dni. Ugotovili smo, da s časom količina lipidnih kapelj v celicah pada, da pa je upad počasnejši pri tistih celicah, ki so izpostavljene SPIONom. Sklepamo torej, da pri naših eksperimentalnih pogojih ND predvsem zavirajo lipolizo lipidnih kapelj.

Poleg tega nas je zanimalo, ali imajo v primeru izpostavljenosti ND lipidne kaplje za celico zaščitno vlogo. Ugotovili smo, da se je pri celicah, ki so bile predhodno izpostavljene oleinski kislini, ob dodatku SPIONov izboljšalo preživetje, znižala pa se je tudi raven oksidativnega stresa. Če smo ob dodatku oleinske kisline sočasno inhibirali njeno vgradnjo v trigliceride, se je izkazalo, da to ni bistveno vplivalo na preživetje celic, zato sklepamo, da vgradnja oleinske kisline v lipidne kaplje ni ključnega pomena za njeno zaščitno vlogo.

**Ključne besede:** lipidne kaplje, nanodelci, superparamagnetnimi železooksidnimi nanodelci (SPIONi), endotelijske celice, oleinska kislina

- [1] R. V. Farese Jr and T. C. Walther, "Lipid droplets finally get a little RESPECT," *Cell*, vol. 139, pp. 855-860, 2009.
- [2] A. Khatchadourian and D. Maysinger, "Lipid droplets: their role in nanoparticle-induced oxidative stress," *Molecular pharmaceutics*, vol. 6, pp. 1125-1137, 2009.
- [3] D. Maysinger, "Nanoparticles and cells: good companions and doomed partnerships," *Organic & biomolecular chemistry*, vol. 5, pp. 2335-2342, 2007.
- [4] E. Przybytkowski, M. Behrendt, D. Dubois, and D. Maysinger, "Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability," *The FEBS journal*, vol. 276, pp. 6204-6217, 2009.
- [5] M. Davoren, E. Herzog, A. Casey, B. Cottineau, G. Chambers, H. J. Byrne, et al., "In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells," *Toxicology in vitro*, vol. 21, pp. 438-448, 2007.
- [6] P. K. Babele, P. K. Thakre, R. Kumawat, and R. S. Tomar, "Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*," *Chemosphere*, 2018.
- [7] Y. Cao, M. Roursgaard, P. H. Danielsen, P. Møller, and S. Loft, "Carbon black nanoparticles promote endothelial activation and lipid accumulation in macrophages independently of intracellular ROS production," *PLoS One*, vol. 9, p. e106711, 2014.
- [8] T. Tsukahara and H. Haniu, "Nanoparticle-mediated intracellular lipid accumulation during C2C12 cell differentiation," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 406, pp. 558-563, 2011.
- [9] C. Guo, R. Ma, X. Liu, T. Chen, Y. Li, Y. Yu, et al., "Silica nanoparticles promote oxLDL-induced macrophage lipid accumulation and apoptosis via endoplasmic reticulum stress signaling," *Science of The Total Environment*, vol. 631, pp. 570-579, 2018.
- [10] N. Bayat, K. Rajapakse, R. Marinsek-Logar, D. Drobne, and S. Cristobal, "The effects of engineered nanoparticles on the cellular structure and growth of *Saccharomyces cerevisiae*," *Nanotoxicology*, vol. 8, pp. 363-373, 2014.
- [11] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of immunological methods*, vol. 65, pp. 55-63, 1983.
- [12] V. Kononenko, A. Erman, T. Petan, I. Križaj, S. Kralj, D. Makovec, et al., "Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO<sub>2</sub>-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells," *Nanotoxicology*, vol. 11, pp. 419-429, 2017.

<sup>1</sup>Avtorica: Neža REPAR, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [neza.repar@bf.uni-lj.si](mailto:neza.repar@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Damjana DROBNE, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, e-mail: [damjana.drobne@bf.uni-lj.si](mailto:damjana.drobne@bf.uni-lj.si)

## LIPID DROPLETS – A CELL RESPONSE TO NANOPARTICLE EXPOSURE

**Abstract:** Lipid droplets (LDs) have long been considered as just a fat store, but today they are known to be very dynamic cellular organelles with many functions. They are found in almost all eukaryotic cells and consist of a core of neutral lipids, surrounded by a phospholipid monolayer in which different proteins are anchored [1]. LD biogenesis is stimulated in cells when there is a redox or energy imbalance. One of the reasons for the increased synthesis of LDs in cells may be due to various nanoparticles (NPs). Of the nine studies on different cell lines, eight studies have shown that NPs increased the amount of LDs in cells [2-11], but only one showed that NPs had no effect on their amount [12]. Most studies did not address the causes of increased LD amount, but one did show a relationship between LD amount and oxidative stress [2].

From another aspect, it is interesting that one of the important roles of LDs is to protect cells, helping them cope with stress. The mechanism of protection is already well explained in response to certain types of stresses, while for NPs the mechanism is not yet known and is probably dependent on the type of NPs and their characteristics. At present, a study has been published that suggests that cell survival during NP exposure was improved if the cells had been previously exposed to oleic acid, which stimulated LD biogenesis [2].

This research attempts to determine whether superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) influence the dynamic of the synthesis and lipolysis of LDs in endothelial cells. In addition, we are investigating whether inducing the synthesis of LDs with oleic acid can protect endothelial cells against the toxic effects of SPIONs.

Our *in vitro* research has shown that SPIONs can enter endothelial cells and increase the amount of lipid droplets in the cells after 24 hours, while also provoking oxidative stress and causing cell death. We then studied whether SPIONs increase the synthesis of new LDs or slow down the lipolysis of those already formed. To this end, oleic acid was added to stimulate the synthesis of LDs, and then the cells were exposed to SPIONs and monitored for several days. We found that the amount of LDs decreased with time, but that the decline was slower in cells exposed to SPIONs compared to untreated cells. Therefore, we conclude that in our experimental conditions NPs mainly inhibit LD lipolysis.

We were also interested if LDs have a protective role when cells are exposed to NPs. We found that in cells previously exposed to oleic acid, survival was improved after adding SPIONs, and the level of oxidative stress decreased. If we inhibited the incorporation of oleic acid into triglycerides, cell survival was not significantly affected; therefore, we conclude that the incorporation of oleic acid into LDs is not essential for its protective role.

**Keywords:** lipid droplets, nanoparticles, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), endothelial cells, oleic acid

- [1] R. V. Farese Jr and T. C. Walther, "Lipid droplets finally get a little RESPECT," *Cell*, vol. 139, pp. 855-860, 2009.
- [2] A. Khatchadourian and D. Maysinger, "Lipid droplets: their role in nanoparticle-induced oxidative stress," *Molecular pharmaceutics*, vol. 6, pp. 1125-1137, 2009.
- [3] D. Maysinger, "Nanoparticles and cells: good companions and doomed partnerships," *Organic & biomolecular chemistry*, vol. 5, pp. 2335-2342, 2007.
- [4] E. Przybytkowski, M. Behrendt, D. Dubois, and D. Maysinger, "Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability," *The FEBS journal*, vol. 276, pp. 6204-6217, 2009.
- [5] M. Davoren, E. Herzog, A. Casey, B. Cottineau, G. Chambers, H. J. Byrne, et al., "In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells," *Toxicology in vitro*, vol. 21, pp. 438-448, 2007.
- [6] P. K. Babel, P. K. Thakre, R. Kumawat, and R. S. Tomar, "Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*," *Chemosphere*, 2018.
- [7] Y. Cao, M. Roursgaard, P. H. Danielsen, P. Møller, and S. Loft, "Carbon black nanoparticles promote endothelial activation and lipid accumulation in macrophages independently of intracellular ROS production," *PLoS One*, vol. 9, p. e106711, 2014.
- [8] T. Tsukahara and H. Haniu, "Nanoparticle-mediated intracellular lipid accumulation during C2C12 cell differentiation," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 406, pp. 558-563, 2011.
- [9] C. Guo, R. Ma, X. Liu, T. Chen, Y. Li, Y. Yu, et al., "Silica nanoparticles promote oxLDL-induced macrophage lipid accumulation and apoptosis via endoplasmic reticulum stress signaling," *Science of The Total Environment*, vol. 631, pp. 570-579, 2018.
- [10] N. Bayat, K. Rajapakse, R. Marinsek-Logar, D. Drobne, and S. Cristobal, "The effects of engineered nanoparticles on the cellular structure and growth of *Saccharomyces cerevisiae*," *Nanotoxicology*, vol. 8, pp. 363-373, 2014.
- [11] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of immunological methods*, vol. 65, pp. 55-63, 1983.
- [12] V. Kononenko, A. Erman, T. Petan, I. Križaj, S. Kralj, D. Makovec, et al., "Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO<sub>2</sub>-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells," *Nanotoxicology*, vol. 11, pp. 419-429, 2017.

## PORAZDELITEV KOLČNEGA TLAKA PRI UMETNEM KOLČNEM SKLEPU – NAPOVEDNI DEJAVNIK IZPAHA KOLČNE PROTEZE

Matevž TOMAŽEVIČ<sup>1</sup>, Veronika KRALJ IGLIČ<sup>2</sup>, Matej CIMERMAN<sup>3</sup>

**Povzetek:** Vstavitve umetnega kolčnega sklepa velja za najbolj uspešno programsko operacijo v kirurgiji glede na vprašalnike o zadovoljstvu pacientov po prestani operaciji. Uporablja se za zdravljenje prirojenih boleznih, degenerativnih sprememb in popoškodbenih stanj v predelu kolka. Kljub uspešnosti operacije pa po operaciji lahko pride do zapletov, zaradi katerih so potrebne ponovne operacije. Na drugem mestu po pogostosti zapletov, ki potrebujejo kirurško oskrbo je izpah kolčne proteze. Ob izpahu pride do premika glavice kolčne proteze ven iz umetne kolčne ponvice. Da bi lahko znižali pogostost izpaha kolčnega sklepa moramo poznati napovedne dejavnike, ki pripeljejo do izpaha umetnega kolčnega sklepa. Do sedaj so proučevali predvsem vpliv položaja posameznih komponent umetnega kolčnega sklepa na izpah. Raziskave so bile narejene za vpliv velikosti umetne glavice stegenice, za vpliv položaja umetne kolčne ponvice ter za vpliv kota vratu stegenkega dela proteze. Pogostost pojava izpaha je še vedno 2 odstotka kljub temu, da so proteze večinoma v varnih položajih glede na priporočila raziskav. Vsekakor je izpah kolka mehanskega vzroka zaradi sile, ki sili glavico ven iz kolčne ponvice. Zato želimo raziskati biomehanske parametre, ki so v kolku in povzročijo izpah. V ta namen je bila razvita metoda HIPSTRESS. S to metodo lahko iz rentgenske slike medenice in kolkov izračunamo biomehanske parametre v kolčnem sklepu pri stoji na eni nogi. Metoda upošteva položaj stegenkega dela, glavice in kolčne ponvice ter celotnega okolčja za izračun biomehanskih parametrov. Ob zadnji raziskavi z uporabo HIPSTRESS metode o vplivu kolčnega tlaka na obrabo polietilenskega vložka se je izkazalo, da je obraba polietilenskega vložka manjša, kadar je tlak višji na zunanem delu kolčne ponvice, to pa bi lahko pomenilo zvišano tveganje za izpah kolčne proteze. Zato smo si zastavili vprašanje ali so biomehanski parametri izračunani s HIPSTRESS metodo lahko napovedni dejavnik za izpah kolčne proteze.

Za dokaz smo z metodo HIPSTRESS analizirali rentgenske slike medenice in kolkov pri pacientih pri katerih je prišlo do izpaha kolčne proteze in pri pacientih ki so imeli vstavljen kolčno protezo in bili vsaj 10 let brez težav. V študijski skupini z izpahi smo obravnavali 55 kolkov v kontrolni skupini pa 95 kolkov.

Umetni kolčni sklepi z izpahi so imeli 6% višjo rezultanto kolčne sile ( $p=0.004$ ), 11% višji točkovni tlak na nosilno površino ( $p=0.001$ ) in 50% bolj na zunanjo stran postavljen pol tlaka ( $p=0.026$ ) kot kontrolna skupina. Vsi parametri so bili manj ugodni pri umetnih kolčnih sklepih z izpahom. Ni bilo razlik med skupinama v indeksu gradienta kolčnega tlaka in v funkcijskem kotu nosilne površine.

Biomehanski parametri izračunani s HIPSTRESS metodo so lahko napovedni dejavnik za izpah kolčne proteze. Kljub temu, da pri stoji na eni nogi običajno ne pride do izpaha kolka, so biomehanski parametri izračunani v tem položaju napovedni dejavnik za izpah umetnega kolčnega sklepa v drugih položajih. Pri predoperativnem načrtovanju kolčne proteze bi lahko to znanje uporabili za ciljno postavitve in izbor komponent proteze, ki bi bila za posameznega pacienta varnejša.

**Ključne besede:** Artroplastika, Izpah kolčne proteze, Biomehanika, Napovedni dejavniki, Kolčni tlak

---

<sup>1</sup>Avtor: asist. mag. Matevž TOMAŽEVIČ, dr.med., Univerzitetni Klinični Center Ljubljana, Klinični oddelek za Travmatologijo, Zaloška cesta 2, Ljubljana, e-mail: [matevz.tomazevic@kclj.si](mailto:matevz.tomazevic@kclj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Veronika KRALJ IGLIČ, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Oddelek za protetiko / Katedra za biomehaniko, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, e-mail: [veronika.kralj-iglic@zf.uni-lj.si](mailto:veronika.kralj-iglic@zf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor, prof. dr. Matej CIMERMAN, dr.med., Univerzitetni Klinični Center Ljubljana, Klinični oddelek za Travmatologijo, Zaloška cesta 2, Ljubljana, e-mail: [matej.cimerman@kclj.si](mailto:matej.cimerman@kclj.si)

## HIP STRESS DISTRIBUTION IN TOTAL HIP ARTHROPLASTY – PREDICTOR OF HIP DISLOCATION

**Abstract:** Total hip arthroplasty is the most successful elective surgery according to patient reported data. Despite large percentage of successful operations there are still some complications where revision surgery is needed. Dislocation after hip arthroplasty is one of them and it is still a major concern. Recent study of the volumetric wear of the cup has suggested that stresses studied in a one-legged stance model could predispose arthroplasty dislocation. The aim of this work was to study whether biomechanical parameters of contact stress distribution in total hip arthroplasty during a neutral hip position can predict a higher possibility of the arthroplasty dislocating. Biomechanical parameters were determined using 3-dimensional mathematical models of the one-legged stance within the HIPSTRESS method. Geometrical parameters were measured from standard anteroposterior X-ray images of the pelvis and proximal femora. Fifty-five patients subjected to total hip arthroplasty that later suffered dislocation of the head and, for comparison, 95 total hip arthroplasties that were functional at least 10 years after the implantation, were included in the study.

Arthroplasties that suffered dislocation had on average a 6% higher resultant hip force than the control group ( $p=0.004$ ), 11% higher peak stress on the load-bearing area ( $p=0.001$ ) and a 50% more laterally positioned stress pole ( $p=0.026$ ), all parameters being less favorable in the group of unstable arthroplasties. There was no statistically significant difference in the gradient index or in the functional angle of the weight bearing.

Our study showed that arthroplasties that show a tendency to push the head out of the cup in the representative body position - the one-legged stance - are prone to dislocation. Despite the fact that dislocation occurs in other positions of the hip, the calculated values can predict the higher possibility of hip to dislocate. An unfavorable resultant hip force, peak stress on the load bearing and laterally positioned stress pole are predictors of arthroplasty dislocation.

**Keywords:** Arthroplasty, Total hip dislocation, Biomechanics, Prognostic factor, Hip stress

## **PREHRANA**

## IŠČE SE: PREHRANSKA VLAKNINA APLIKACIJA METODE AOAC 2011.25 ZA DOLOČANJE PREHRANSKE VLAKNINE IN NJEN VPLIV NA OCENO VNOSA Z ŽIVILI

Blaž FERJANČIČ<sup>1</sup>, Jasna BERTONCELJ<sup>2</sup>

**Povzetek:** Pojem prehranske vlaknine je v zadnjih desetih letih doživel celovit preporod. Oblikovala se je nova definicija prehranske vlaknine, razvile so se nove metode določanja vsebnosti prehranske vlaknine in njena uporaba kot funkcionalen ter tehnološki dodatek v prehrani in živilstvu. Prehransko vlaknino analitično delimo na netopno frakcijo, topno frakcijo, ki je topna v vodi in netopna v etanolu ter prehransko vlaknino z nizko molekulske maso, ki si je topna v vodi in v etanolu.

Z oblikovanjem nove definicije so se pojavili tudi novi izzivi. Poglavitna sprememba nove definicije prehranske vlaknine je razširitev pojma na širšo skupino neprebavljivih polisaharidov in oligosaharidov. Prvi odgovor na izziv določanja sedaj razširjene družine molekul prehranske vlaknine je bil razvoj metode, ki lahko določi celokupno vsebnost prehranske vlaknine v vseh živilih. Razviti sta bili dve sestrski metodi in sicer AOAC 2009.01. in AOAC 2011.25, ki sta v osnovi enaki, vendar metoda AOAC 2011.25. omogoča delitev prehranske vlaknine na netopno topno in prehransko vlaknino z nizko molekulske maso, medtem kot prva omogoča samo skupno določitev vsebnosti prehranske vlaknine z visoko molekulske maso in prehranske vlaknine z nizko molekulske maso.

Cilj raziskave, ki jo izvajamo je prikazati razlike v določanju prehranske vlaknine z različnimi dvema različnima metodama in sicer z metodo AOAC 991.43. ki je bila referenčna metoda pred spremembo definicije prehranske vlaknine leta 2009 in z novo metodo AOAC 2011.25. ki zajema vse frakcije prehranske vlaknine po novi definiciji. Iz literature je razvidno, da so prve študije na določenih skupinah živil pokazale višjo vsebnost prehranske vlaknine ko so vsebnost določali z novo metodo, kar je razumljivo, saj so zajeli vse tri frakcije prehranske vlaknine, medtem, ko starejša metodologija zajame le dve. Razlike v določanju vsebnosti prehranske vlaknine pomenijo, tudi neskladje med novimi analitskimi podatki v podatkovnih bazah o sestavi živil, kar vpliva na oceno vnosa prehranske vlaknine pri ljudeh. Aplikativno vrednost raziskave se skriva v možnosti posodobitve podatkovnih baz o sestavi živil za podatke o vsebnosti prehranske vlaknine, ponujajo se možnosti pridobitve prehranske trditve za živila glede na vsebnost prehranske vlaknine, ker nekatera živila, analizirana z novo metodo dosežejo zadostno vsebnost prehranske vlaknine.

Analitsko delo določanja prehranske vlaknine je v osnovi encimsko-gravimetrična metoda, kar pomeni, da vzorec najprej prebavimo in vitro (v laboratorijski steklovini), z encimi, ki simulirajo prebavo človeka, vzorec nato prefiltriramo in na osnovi gravimetrije določimo maso netopne in topne prehranske vlaknine. Za določitev prehranske vlaknine z nizko molekulske maso pa uporabljamo tekočinsko kromatografijo sklopljeno z RI (refrakometrični indeks) detektorjem, ki nam omogoča zaznavo oligosaharidov. Pri analizi je pomembna priprava vzorcev (velikost delcev, vsebnost vode, vsebnost maščobe).

Vsekakor je prehranska vlaknina in določanje njene vsebnosti pomemben člen v razvoju in analitiki živil hkrati pa ima izjemen pomen v prehrani človeka. Odpirajo se nova vprašanja o dejanskem vnosu prehranske vlaknine pri ljudeh, ki se navezujejo tudi na priporočila za vnos prehranske vlaknine. Zaključimo lahko, da je prehranska vlaknina »vroče področje« humane prehrane z vznemirljivo prihodnostjo.

**Ključne besede:** prehranska vlaknina, razvoj izdelkov, ocena vnosa, obogatena živila, preoblikovana živila.

---

<sup>1</sup>Avtor: Blaž FERJANČIČ, mag. inž. prehrane, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [Blaz.ferjancic@bf.uni-lj.si](mailto:Blaz.ferjancic@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: izr. prof. dr. Jasna BERTONCELJ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [Jasna.bertoncelj@bf.uni-lj.si](mailto:Jasna.bertoncelj@bf.uni-lj.si)

## **WANTED: DIETARY FIBER APPLICATION OF THE AOAC 2011.25 METHOD FOR DIETARY FIBRE DETERMINATION AND ITS IMPACT ON ESTIMATED DIETARY INTAKE**

**Abstract:** The concept of dietary fiber has undergone a complete revival in the last ten years. A new definition of dietary fiber has been developed, new methods for determining dietary fiber content and its use as functional and technological additive in food and food have been developed. The dietary fiber is analytically divided into an insoluble fraction, a soluble, water-soluble fraction, and insoluble in ethanol, and a low molecular weight dietary fiber that is soluble in water and in ethanol.

New challenges have emerged through the creation of a new definition. The main change in the new definition of dietary fiber is the extension of the term to a wider group of indigestible polysaccharides and oligosaccharides. The first answer to the challenge of identifying the now-expanded fiber dietary fiber family was the development of a method that can determine the total fiber content in all foods. Two sister methods were developed, namely AOAC 2009.01. and AOAC 2011.25, which are essentially the same, but AOAC 2011.25. allows the division of dietary fiber into insoluble, low molecular weight soluble and dietary fiber, while the first allows only the total determination of the high molecular weight dietary fiber content and low molecular weight dietary fiber.

The aim of our research is to show the differences in the determination of dietary fiber with different two different methods using the AOAC method 991.43. which was the reference method before the change in the definition of dietary fiber in 2009 and the new AOAC method 2011.25. which covers all the fiber dietary fractions according to the new definition. It is evident from the literature that the first studies in certain groups of foods showed a higher content of dietary fiber when the content was determined by a new method, which is understandable as they captured all three dietary fiber fractions, while the older methodology involves only two. Differences in the determination of the fiber content mean the discrepancy between the new analytical data in the food composition databases, which influences the estimation of the intake of dietary fiber in humans. The application value of the research lies in the possibility of updating the food composition databases for data on the fiber content, and offers the possibility of obtaining a food claim for foods based on the fiber content, as some foods, analyzed by the new method, reach a sufficient content of dietary fiber.

The analytical work of determining dietary fiber is basically an enzyme-gravimetric method, which means that the sample is first digested in vitro (in laboratory glassware), with enzymes that simulate digestion of a human, the sample is then filtered and the mass of insoluble and soluble dietary fiber is determined on the basis of gravimetry. For the determination of low molecular weight dietary fiber, liquid chromatography coupled with RI (refractometric index) is used to detect the oligosaccharides. Preparation of samples (particle size, water content, fat content) is important in the analysis.

In any case, dietary fiber and determining its content are an important link in the development and food analysts, but at the same time it has an exceptional significance in human nutrition. New questions arise about the actual intake of dietary fiber in humans, which are also related to recommendations for dietary fiber intake. We can conclude that dietary fiber is a "hot area" of a human diet with an exciting future.

**Keywords:** dietary fiber, product development, consumption assay, enriched foodstuff, remodelled food.

## OGLAŠEVANJE ŽIVIL OTROKOM V MEDIJIH

Živa LAVRIŠA<sup>1</sup>, Igor PRAVST<sup>2</sup>

**Povzetek:** Debelost je eden izmed ključnih javnozdravstvenih problemov sodobnega časa. Ne samo v svetu, tudi v Sloveniji smo priča pravi epidemiji debelosti, tako med odraslimi kot tudi med otroci. Dokazano je, da imajo osebe, ki so imele že v otroštvu prekomerno telesno maso več možnosti, da bodo tudi v odrasli dobi trpele za tovrstnimi težavami. Ne le izbira živil z manj ugodno hranilno sestavo, pomemben obesogeni faktor je tudi, kakšnim živilom so osebe izpostavljene v vsakodnevnem okolju. Oglaševanje živil je eden izmed dejavnikov, ki pomembno vplivajo na človekove prehranjevalne navade.

Oglaševanje živil otrokom v medijih lahko predstavlja problem, saj so otroci zelo dojemljivi za različne oglaševalske taktike, težje pa tudi ločijo med oglasi in vsebino. Še poseben problem predstavlja oglaševanje živil z manj ugodno hranilno sestavo, saj izpostavljenost otrok oglaševanju tovrstnih živil dokazano vpliva na njihove prehranske preference in navade. Prehranske navade se namreč oblikujejo že v otroštvu, zato je za njihovo dolgoročno zdravje pomembno, da oblikujejo zdrave prehranske navade. V svojem raziskovalnem delu sem raziskovala oglaševanje živil otrokom na televiziji in v tiskanih medijih. Tako na TV, kot v tiskanih medijih smo ugotovili, da se otrokom oglašujejo skoraj izključno živila z manj ugodno hranilno sestavo. Hranilno sestavo smo vrednotili s pomočjo profiliranja živil, ki je uveljavljena metoda ugotavljanja, katera živila so z vidika hranilne sestave bolj in manj ugodna. V oglasih so prevladovala energijsko bogata živila z visoko vsebnostjo sladkorja in maščob. Oglaševana živila so bila večinoma iz kategorij sladkarij, sladkih pijač pa tudi prehranskih dopolnil.

Ugotovitve raziskav so vsekakor alarmantne. Korak naprej zagotovo predstavlja omejitev oglaševanja živil z manj ugodno hranilno sestavo v času otroškega programa na televiziji, vendar ta regulacija zaenkrat velja le za oglaševanje na televiziji. Kaže se potreba po regulaciji tudi ostalih medijskih platform – tiskanih medijev, vse bolj pa tudi internetnih kanalov.

Prehrana je pomembno področje javnega zdravja in ima velik vpliv na zdravje in počutje posameznika. Aktivno delovanje na tem področju je izjemnega pomena, saj z zagotavljanjem zdravega načina prehranjevanja in ustvarjenjem zdravega okolja lahko pomagamo preprečevati številne kronične nenalezljive bolezni, ki so v sodobnem svetu vse večji problem.

**Ključne besede:** prehrana, javno zdravje, oglaševanje živil, otroci, mediji, hranilna sestava živil

---

<sup>1</sup>Avtorica: Živa LAVRIŠA, dipl. inž. živ. tehol., Inštitut za nutricionistiko, Tržaška 40, Ljubljana, e-mail: [ziva.lavrisa@nutris.org](mailto:ziva.lavrisa@nutris.org)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Igor PRAVST, Inštitut za nutricionistiko, Tržaška 40, Ljubljana, e-mail: [igor.pravst@nutris.org](mailto:igor.pravst@nutris.org)

## FOOD MARKETING TO CHILDREN IN MEDIA

**Abstract:** Obesity is one of the key public health issues of the modern world. We are witnessing obesity epidemic not only in other countries but also in Slovenia. Both children and adults suffer from this condition. It is known that children who are obese will more likely have such trouble also in adulthood. Besides choosing foods with poor nutritional composition, an important obesogenic factor is also what is the nutritional composition of foods that are people exposed to in everyday life. Food advertising is one of the factors which importantly influence people's eating habits.

Food advertising to children in media can be a problem as children are very susceptible for different marketing techniques and they hardly differ between advertisements and regular content of the media. Advertising of foods with less favourable nutritional composition pose a great concern as exposure to such advertising importantly influences their eating habits and food preferences. Eating habits are formed in childhood, so this is very important factor for healthy adulthood. In present research work, we studied marketing foods to children on television and in print media. Results show that in both types of media, almost exclusively foods with less favourable nutritional composition are being advertised. Nutritional composition of foods was evaluated with the use of nutrient profiling models, which is an established method for determination of overall nutritional composition of foods. Dominating food category in advertisements were chocolate and sweets, soft drinks and food supplements.

Findings of our studies are alarming. An important step forward was limiting food marketing to children in time of children programme but this regulation currently only applies to television advertising. There is a need for regulation of other media platforms, such as print media and also Internet marketing channels.

Food is an important area of public health and importantly influences health and wellbeing of individuals. Activities on this area are very important as we can prevent many non communicable diseases, which are of great concern in modern world.

**Keywords:** nutrition, public health, food marketing, children, media, nutritional composition

## KOMUNIKACIJA KORISTNIH BAKTERIJ S ČREVESNIMI CELICAMI

Diana PAVELJŠEK<sup>1</sup>, Irena ROGELJ<sup>2</sup>, Roman JERALA<sup>3</sup>

**Povzetek:** Človeški prebavni trakt poseljuje kompleksna in dinamična populacija mikroorganizmov (mikrobiota), ki vplivajo na gostitelja tako v stanju dobrega počutja kot tudi med obolenjem. Mikrobiota ima namreč pomembno vlogo pri prebavi hrane, razvoju in uravnavanju imunskega sistema, pa tudi komunikaciji z možgani preko živčnih celic. Uravnavanje črevesne mikrobiote s prehrano ali koristnimi mikroorganizmi je zato atraktiven pristop k vzdrževanju dobrega zdravstvenega stanja ali preprečevanju obolenj.

Delovanje prebavnega trakta je v veliki meri odvisno od funkcionalne črevesne pregrade. V črevesju je plast epitelija sestavljena iz različnih tipov celic, ki skupaj sestavljajo fiziološko bariero, kjer poteka presnova in absorpcija hranil. Poleg tega pa so epitelne celice tudi pomembna prva obrambna linija pred infekcijami, saj imajo konstanten kontakt z bakterijami in bakterijskimi komponentami na apikalni površini ter so v neposredni bližini imunskim celicam na bazolateralni strani. Črevesni epitelij tako služi kot dinamična bariera, ki jo regulira imunski sistem s pomočjo kompleksne kombinacije odzivov, ki vključujejo naravno in pridobljeno imunost. Probiotiki lahko stimulirajo tako pridobljeni kot tudi naravni imunski odziv. Koristni učinki probiotičnih bakterij pa se kažejo z njihovim vplivom na prisotno mikrobioto, uravnavanjem funkcije črevesne epitelne bariere in regulacijo imunskega odziva.

Naše raziskovalno delo je bilo usmerjeno v proučevanje signalnih poti v črevesju, ki jih vzbudijo probiotiki preko receptorjev naravne imunosti – TLR (Toll-u podobni receptorji). Izhajali smo iz poskusa na mišjem modelu kolitisa v katerem smo preiskovali vpliv različnih probiotičnih bakterij pri črevesnem vnetju. Poskus je pokazal, da imajo probiotiki zaščitno vlogo pri vnetju, nas pa je zanimalo kakšni so mehanizmi, ki stojijo za njihovo učinkovitostjo. Na vzorcih mišjega črevesa smo proučevali izražanje genov in tako dobili namig katere signalne poti bi lahko bile odgovorne za ta zaščitni vpliv. V nadaljevanju smo tako z uporabo pretočne citometrije in spremljanjem prepustnosti monosloja celic pokazali, da probiotiki varujejo črevesne celice pred vnetnimi dejavniki z vplivom na celično preživetje in prerazporejanje proteinov, odgovornih za medcelične povezave. Na koncu smo opazovali celice še pod konfokalnim mikroskopom in ugotovili, da so teoretični mehanizmi vidni tudi na mikroskopskih slikah.

Največji prispevek naše raziskave je razlaga signalnih poti, ki vplivajo na zaščito črevesja in so skupne širši skupini probiotičnih bakterij, kar je nujno za aplikacijo sevov v prehrano ali v zdravstvo. Eden izmed preiskovanih mehanizmov probiotikov vključuje tudi signalizacijo preko TLR10, kar glede na literaturo do sedaj še ni bilo opisano in zato odpira nova vprašanja in možnosti za nadaljnje raziskave.

**Ključne besede:** delovanje probiotikov, signalne poti, zaščita črevesja, zdravstvene trditve, naravna imunost

---

<sup>1</sup>Avtorica: Diana PAVELJŠEK, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [diana.paveljssek@bf.uni-lj.si](mailto:diana.paveljssek@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Irena ROGELJ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, e-mail: [irena.rogelj@bf.uni-lj.si](mailto:irena.rogelj@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: prof. dr. Roman JERALA, Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo, Hajdrihova 19, Ljubljana, e-mail: [roman.jerala@ki.si](mailto:roman.jerala@ki.si)

## COMMUNICATION OF BENEFICIAL BACTERIA WITH INTESTINAL CELLS

**Abstract:** The human digestive tract is inhabited by a complex and dynamic population of microorganisms (microbiota) that have an impact on the host not only in the state of well-being but also in the diseased state. Microbiota plays an important role in digestion of food, development and regulation of the immune system as well as in communication with the brain through the nerve cells. Modulating the gut microbiota with diet or beneficial microorganisms is therefore an attractive approach in health maintenance or disease prevention.

The function of the digestive tract depends largely on the efficient intestinal barrier. The epithelium layer in the intestine is composed of different cell types that together form a physiological barrier, where nutrient digestion and absorption take place. In addition, epithelial cells also provide crucial first line of defence against infection since they have a constant contact with bacteria and bacterial components on the apical surface and are in the close proximity of the immune cells on the basolateral side. The intestinal epithelium thus serves as a dynamic barrier, regulated by the immune system with a complex combination of responses that include innate and adaptive immunity. Probiotics can stimulate the adaptive as well as innate immune response. The beneficial effects of probiotic bacteria are characterised by their impact on the present microbiota, the regulation of the intestinal epithelial barrier function and the regulation of the immune response.

Our research work was focused on the investigation of signalling pathways in the intestine, triggered by probiotics through innate immune receptors – TLR (Toll-like receptors). The starting point was an experiment on a mouse model of colitis, where we examined the influence of various probiotic bacteria in intestinal inflammation. The experiment revealed that probiotics have a protective role in inflammation, and consequently we were interested in mechanisms that lie behind their efficiency. We studied gene expression on mouse intestinal samples and obtained a hint of which signalling pathways could be responsible for this protective effect. With the use of flow cytometry and by monitoring the permeability of the cell monolayer, we next showed that probiotics protect the intestinal cells against inflammatory factors by influencing on cell survival and redistribution of the proteins, responsible for intercellular connections. At the end, we observed the cells under the confocal microscope and found that the theoretical mechanisms are also visible in the microscopic images.

The most important contribution of our research is the explanation of signalling pathways that have an influence on gut protection and are common to a wider group of probiotic bacteria and, therefore, necessary for the application of strains in nutrition or health. One of the studied probiotic mechanisms also includes signalling via TLR10, which has not yet been described before in the literature, and thus opens new questions and possibilities for further research.

**Keywords:** probiotics, signalling pathways, gut protection, health claims, innate immunity

## **UPRAVLJANJE GOZDNIH EKOSISTEMOV**

## ALPSKI GOZDOVI SO »ROCK« ZVEZDE

Barbara ŽABOTA<sup>1</sup>, Milan KOBAL<sup>2</sup>, Frédéric BERGER<sup>3</sup>

**Povzetek:** Skalni podori spadajo med najpogostejše naravne nesreče v alpskih regijah, z njihovo problematiko se soočamo tudi v Sloveniji. V kratkem času lahko skalne gmote dosežejo visoke hitrosti in prepotujejo večje razdalje, pri tem pa pomembno ogrožajo ljudi, naselja in infrastrukturo. Varovalni gozdovi blažijo negativne učinke skalnih podorov, saj lahko drevesa manjše skalne gmote popolnoma zaustavijo, večjim skalnim grotam pa ob trkih z drevesi zmanjšajo kinetično energijo, pri čemer se bodo te ustavile prej ali imele manjši negativni vpliv na okolico. V določenih primerih gozd ni zadostna preventiva pred skalnimi podori, kar pomeni da moramo v teh primerih uvesti dodatne zaščitne ukrepe (npr. podajno-lovilne ograje, zaščitne mreže). Posledično je potrebno opredeliti potencialna območja pojavljanja skalnih podorov in njihove potencialne razsežnosti, ter tudi spremljati njihov razvoj skozi čas. Zaradi manjše prostorske razsežnosti skalnih podorov ter dejstva, da so tudi območja nad infrastrukturo in naselji lahko zaradi razgibanega terena težko dostopna in nevarna za klasične terenske metode proučevanja, so za njihovo proučevanje primerni predvsem brezpilotni letalniki. Z njihovo uporabo namreč lahko daljinsko zajamemo visoko ločljivostne posnetke površja in izdelamo npr. oblake točk, 3D prikaze površja, digitalne modele reliefa, digitalne modele površja in ortofoto posnetke. Ker se uporaba brezpilotnih letalnikov za proučevanje skalnih podorov uveljavlja šele v zadnjem desetletju, trenutno še primanjkuje znanje o možnostih zajema in uporabe daljinskih podatkov s tovrstno tehnologijo. Glavni namen doktorske disertacije je tako proučiti možnosti njihove uporabe za proučevanje in modeliranje skalnih podorov, načrtovanje zaščitnih ukrepov varstva pred skalnimi podori ter spremljanja obsega varovalnih gozdov in učinkovitosti njihove varovalne funkcije. V okviru doktorske disertacije bomo raziskali tri vidike njihove uporabe pri proučevanju skalnih podorov, in sicer i) kateri sistem uvrščanja (georeferenciranja) daljinsko zajetih podatkov v prostor je bolj natančen (direkten, indirekten), ii) vpliv različnih metod zajema podatkov na načrtovanje zaščitnih ukrepov, ter iii) možnosti prepoznavanja poškodovanih dreves na podlagi visokoločljivostnih multispektralnih posnetkov. Doktorska disertacija nastaja v okviru Interreg Alpine Space projekta ROCKtheALPS (ASP 462), v katerega smo aktivno vključeni vsi avtorji prispevka. Rezultati tako projekta kot tudi doktorske disertacije bodo prinesli nova znanja o hitrejšem in varnejšem zajemu podatkov o površju in gozdu na območju skalnih podorov, ter tudi natančnejše in objektivnejše podatke za spremljanje razvoja procesa skozi čas. Hkrati bodo rezultati aplikativni za preučevanje drugih naravnih nevarnosti in erozijskih procesov. Raziskana bo še uporabna vrednost tovrstne tehnologije za izboljšanje in validacijo rezultatov modeliranja skalnih podorov ter uspešnejše načrtovanje in izbiro zaščitnih ukrepov. Nov pristop spremljanja vitalnosti varovalnega gozda na ravni drevesa in varovalnega učinka posameznega drevesa pred skalnimi podori bo lahko služil kot orodje za ocenjevanje sprememb varovalne funkcije gozda in za zagotavljanje trajnosti varovalne funkcije gozda. Raziskovalno področje doktorske disertacije je aplikativne narave, saj pokriva področja varstva pred naravnimi nesrečami, vrlin daljinskega zaznavanja in uporabe geografskih informacijskih sistemov.

**Ključne besede:** varovalni gozd, naravne nesreče, skalni podori, brezpilotni letalniki, daljinsko zaznavanje

---

<sup>1</sup>Avtorica: Barbara ŽABOTA, mag. geog., študentka doktorskega študija Bioznanosti, znanstveno področje Upravljanje gozdnih ekosistemov; Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Večna pot 83, 1000 Ljubljana, Slovenija; [barbara.zabota@bf.uni-lj.si](mailto:barbara.zabota@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Milan KOBAL, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Večna pot 83, 1000 Ljubljana, Slovenija; [milan.kobal@bf.uni-lj.si](mailto:milan.kobal@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: dr. Frédéric BERGER, Laboratory of Mountain Ecosystems and Societies, National Research Institute of Science and Technology for Environment and Agriculture (IRSTEA), 2 rue de la Papeterie - BP 76 - 38402 St-Martin-d'Hères cedex, Grenoble, Francija; [frederic.berger@irstea.fr](mailto:frederic.berger@irstea.fr)

## ALPINE FORESTS ARE “ROCK” STARS

**Abstract:** Rockfalls are one of the most common natural hazards in the alpine regions, and are an important issue also in Slovenia. Rockfalls can achieve high kinetic energies and can travel long distances in short time period, and can pose a great threat to people, settlement and infrastructure. Protection forests have an important mitigation role of negative effects of rockfalls since trees can stop smaller rocks or can reduce the kinetic energy of larger rocks by dissipating their energy through the impact with trees. However, the protection function of forest against rockfalls is in some areas not efficient enough, meaning that in those areas additional protection measures need to be established (e.g. flexible rockfall barriers, protection nets). Consequently, it is necessary that potential areas of rockfall risk are properly recognized, and that their activity is closely monitored. Unmanned aerial vehicles (UAV) are especially suitable for studying and monitoring rockfalls due to their smaller spatial extent, and the fact that potential areas are often located in steep slopes above infrastructure and settlements, where terrain is hardly accessible and dangerous for classical field observations. Remote sensing data obtained with UAV can be used for producing various high-resolution photogrammetric products, such as point clouds, 3D models of the surface, digital terrain models (DTM), digital surface models (DSM), and orthophoto images. Currently, there is still a lack of unified acquisition protocols and possibilities of using UAV remote sensing data for studying rockfalls and their impacts on forest. Therefore, the main purpose of the doctoral dissertation is to study the potential of UAVs for studying and modelling rockfalls, planning rockfall protection measures, and monitoring the extent and efficiency of protection forest. Within the frame of this research we will study three aspects of their use in studying rockfalls: i) which georeferencing method (direct/indirect) of remote sensing data is more accurate, ii) if different data acquisition methods of rockfall features influence the planning of protection measures, and iii) if high resolution multispectral images can be used for identifying trees damaged due to rockfalls. Doctoral dissertation is a part of research within the Interreg Alpine Space project ROCKtheALPS (ASP 462) in which all contributors of this article are involved in. The results of both project work and doctoral dissertation will provide new knowledge on how to acquire field data about surface and forest in rockfall risk areas in safer and faster ways, as well as how to acquire more accurate and objective data for monitoring in time. Additionally, the results will not only be applicable in the field of rockfall studies but also in the case of other natural hazards and erosion processes. The results of our research will also provide new insights on using the UAV remote sensing for validating rockfall modelling results and using those data for improving the planning of rockfall protection measures. A new approach of monitoring protection forest vitality at the level of individual tree could provide a tool for assessing the changes in protection effect of forest against rockfalls and for maintaining rockfall protection forest in long term. The research of this doctoral dissertation is applicatory as it is related to the field of protection against natural hazards, remote sensing of data and geographical information systems.

**Keywords:** protection forest, natural hazards, rockfalls, unmanned aerial vehicles, remote sensing

## **ZNANOSTI O CELICI**

## VPLIV ZUNAJCELIČNEGA pH NA USPEŠNOST GENSKÉ TRANSFEKCIJE Z ELEKTROPORACIJO *in vitro*

Tjaša POTOČNIK<sup>1</sup>, Tadej KOTNIK<sup>2</sup>, Alenka MAČEK LEBAR<sup>3</sup>

**Povzetek:** Elektroporacija je ena uspešnejših metod vnosa snovi v celice. Ko celice za kratek čas izpostavimo električnemu polju dovolj visoke električne poljske jakosti, dosežemo destabilizacijo celične membrane, kar omogoči prehod snovem, ki običajno ne morejo prosto prehajati celične membrane. Genska transfekcija z elektroporacijo (GET) je nevirusna metoda vnosa DNA v celico, ki temelji na elektroporaciji. Uspešna GET je sestavljena iz več korakov. Začne se z elektropermeabilizacijo celične membrane, stikom med celično membrano in DNA, sledi prehod DNA skozi celično membrano in transport DNA po citoplazmi do jedra. DNA mora vstopiti v jedro, da pride do njene ekspresije. Čeprav so bile v zadnjih letih opravljene številne raziskave za pojasnitev osnovnih mehanizmov GET, je pri vseh korakih poteka GET še veliko neznanega. GET tumorskih celic *in vitro* je učinkovita, poglobitna pomanjkljivost GET pa je slaba učinkovitost *in vivo*, še posebej v tumorjih. Na uspešnost GET vpliva vrsta dejavnikov. V mnogih tumorjih je v primerjavi z normalnimi celicami prisoten obraten gradient pH preko celične membrane, ki je posledica znižanja zunajceličnega pH zaradi izločanja mlečne kisline. Glede na to, da lahko pH vpliva na številne biološke funkcije, nas zanima, če je kisel zunajceličen pH, ki je prisoten v številnih tumorjih, eden od vzrokov za slabšo učinkovitost GET. Protonacija negativno nabite DNA povzroči zmanjšanje negativnega naboja DNA kar vodi v zmanjšano elektroforetsko mobilnost DNA med dovajanjem pulzov. Zunajcelično kislo okolje tudi zavira endocitozo, ki je eden od predlaganih mehanizmov vstopa DNA v celico med GET. Uspešnost GET smo določali na pritrjenih CHO celicah, ki smo jih v prisotnosti plazmida pEGFP v kislem ali nevtralnem mediju izpostavili dvema različnima protokoloma pulzov (krajši pulzi: 4x200  $\mu$ s, 1 Hz, 1.2 kV/cm ali daljši pulzi: 4x1 ms, 1 Hz, 0.8 kV/cm). Po 24 urni inkubaciji smo s fluorescentnim mikroskopom posneli 3 fotografije območja med elektrodami in s programom ImageJ določili odstotek GFP pozitivnih celic. Opazili smo zmanjšano stopnjo GET, ko so bile celice med elektroporacijo izpostavljene kislemu mediju. Nižja stopnja GET v kislem mediju je bila opažena pri obeh protokolih pulzov. V nevtralnem in kislem mediju je bil dosežen višji odstotek GFP pozitivnih celic ob dovajanju daljših pulzov. V nasprotju pa je bilo preživetje celic ne glede na protokol pulzov boljše v kislem mediju. Naše ugotovitve kažejo, da je kislo zunajcelično okolje dejavnik, ki lahko vpliva na znižanje uspešnosti GET. V nadaljnjih poizkusih bomo poskušali ugotoviti ali kisel medij zniža uspešnost GET preko vpliva na stabilnost plazmida, vpliva na celične procese ali obeh.

**Ključne besede:** elektroporacija, genska transfekcija z elektroporacijo, električni pulzi, zunajcelični pH, celično preživetje

---

<sup>1</sup>Avtorica: Tjaša POTOČNIK, mag.mol.funkc.biol, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, Ljubljana, e-mail: [tjasa.potocnik@fe.uni-lj.si](mailto:tjasa.potocnik@fe.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Tadej KOTNIK, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, Ljubljana, Ljubljana, e-mail: [tadej.kotnik@fe.uni-lj.si](mailto:tadej.kotnik@fe.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: izr. prof. dr. Alenka MAČEK LEBAR, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biokibernetiko, Tržaška 25, Ljubljana, Ljubljana, e-mail: [alenka.maceklebar@fe.uni-lj.si](mailto:alenka.maceklebar@fe.uni-lj.si)

## EFFECT OF EXTRACELLULAR pH ON EFFICIENCY OF GENE TRANSFECTION BY ELECTROPORATION *in vitro*

**Abstract:** Electroporation is one of the most successful methods used for introducing various molecules into cells. When cells are exposed to electric field of sufficient amplitude and duration transient destabilization of the cell membrane is achieved, enabling the passage of molecules that otherwise cannot pass the cell membrane. Gene transfection by electroporation (GET) is a method which uses electric pulses to enable intracellular DNA delivery. For effective DNA delivery and expression several steps must be successfully achieved, among which are membrane permeabilization, formation of DNA-membrane complex, transfer of DNA into the cell, intracellular trafficking of DNA through cytosol and nuclear import of DNA. Although considerable research has been done in recent years to clarify GET basic mechanisms, there are still unknowns in all steps of GET. The main disadvantage of GET is poor *in vivo* performance especially in tumors, although GET of tumor cells *in vitro* is effective. The efficiency of GET is influenced by a number of factors. In comparison with normal cells a reversal of pH gradient across the cell membrane is present in many tumors caused by decrease in extracellular pH due to lactic acid excretion. Knowing that the pH can influence many biological functions, we are interested in whether the acidic extracellular pH present in many tumors is one of the causes of the lower GET efficiency. Protonation of negatively charged DNA results in a decrease in the negative DNA charge which leads to reduced electrophoretic DNA mobility during pulse delivery. The extracellular acidic environment also inhibits endocytosis, which is one of the proposed DNA entry mechanisms into the cell during GET. In our experiments we used adherent CHO cells which were exposed to two different GET pulse protocols (shorter pulses: 4x200 $\mu$ s, 1Hz, 1.2kV/cm or longer pulses: 4x1ms, 1Hz, 0.8kV/cm) using Electrocell B10 electroporator in presence of pEGFP plasmid in acidic or neutral medium. Cells were incubated for 24h, then three images per well on a distinct area between the electrodes were recorded using a fluorescent microscope and counted by ImageJ program. We observed decreased transfection rates when GET was performed in acidic medium. Lower transfection rates in acidic medium were observed with both pulse protocols. In neutral and acidic medium higher transfection rates were achieved with longer pulses. However, both pulse protocols led to better cell survival if GET was applied in acidic medium. In conclusion, we observed decreased transfection rates when GET was performed in acidic medium, in spite of better cell survival after GET. Further experiments are needed to clarify if acidic medium decreases GET efficiency by modulating plasmid DNA characteristics, cellular characteristics, or both.

**Keywords:** electroporation, gene transfection by electroporation, electric pulse, extracellular pH, cell survival

## OCENITEV PATOGENEGA POTENCIALA HUMANIH SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli* NA BIOMIMETIČNEM *in vitro* MODELU PRAŠIČJEGA UROTELIJA

Luka PREDOJEVIĆ<sup>1</sup>, Marjanca STARČIČ ERJAVEC<sup>2</sup>, Mateja ERDANI KREFT<sup>3</sup>, Darja KEŠE<sup>4</sup>,  
Darja ŽGUR-BERTOK<sup>5</sup>

**Povzetek:** Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je predstavnica enterobakterij. Je del normalne črevesne mikrobiote, a patogeni sevi *E. coli* lahko povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe. Akutne in kronične okužbe sečil (UTI) povzročajo uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC). Raziskave uropatogenosti sevov UPEC so v porastu in vzpostavljeni so številni modelni sistemi, z različnimi prednostmi in omejitvami. Naš cilj je bil pripraviti nov model za študij patogenosti sevov *E. coli*, ki bi bil enostavnejši, izvedbeno manj zahteven in finančno ugodnejši od drugih modelnih sistemov. Biomimetični *in vitro* model prašičjega urotelija je bil razvit kot nova, alternativna metoda za ocenitev patogenosti sevov *E. coli*. Model je zasnovan na celični kulturi normalnih prašičjih (*Sus scrofa domestica*) urotelijskih celic (celice NPU), ki izvirajo iz normalnega urotelija prašičjega sečnega mehurja z enakimi lastnostmi kot celice v intaktnem tkivu v razmerah *in vivo*. Naš biomimetični *in vitro* model prašičjega urotelija temelji na že uspešno vzpostavljenem modelu celične kulture prašičjih urotelijskih celic s strani tima znanstvenikov z Inštituta za biologijo celice v okviru Medicinske fakultete. Prvič do sedaj je ta modelni sistem prilagojen in uporabljen v namene ugotavljanja stopnje patogenosti različnih sevov bakterije *E. coli*. V naši raziskavi smo uporabili 12 sevov UPEC, 11 fekalnih sevov *E. coli* (FEC), izoliranih iz zdravih ljudi, ter dva laboratorijska seva *E. coli* MG1655 in DH5 $\alpha$ .

Metode dela so vključevale preizkuse viabilnosti urotelijskih celic po okužbi s sevi *E. coli*, PCR za odkrivanje nabora genov virulentnih dejavnikov pri bakterijskih sevih ter izvedbo vrstične in preseвне elektronske mikroskopije. Poleg tega smo izvedli tudi analizo nabora citokinov z uporabo komercialnega kompleta kot odgovor celic NPU na okužbo s sevi *E. coli*.

Rezultati poskusov okužbe našega biomimetičnega *in vitro* modela normalnega urotelija kažejo, da model pokaže razliko v stopnji patogenosti med preiskovanimi sevi *E. coli*. Zaradi visoke genetske in fiziološke podobnosti med prašičjim in človeškim urotelijem so ugotovitve pridobljene z uporabo biomimetičnega *in vitro* modela prašičjega urotelija relevantne za humano medicino. Za naš model bi lahko bili zainteresirani mikrobiološki laboratoriji, znotraj ali izven bolnišničnega/kliničnega področja. Naš model bi lahko bil dodatna, potrditvena ali alternativna metoda za ocenjevanje patogenosti sevov *E. coli*.

Poleg klinične, ima biomimetični *in vitro* model prašičjega urotelija tudi potencialno uporabo v bazični znanosti, saj omogoča razlikovanje naravnih sevov *E. coli* glede na stopnjo patogenosti in lahko tako izpostavi nove potencialno patogene seve vredne nadaljnega raziskovanja. Omenjeni model omogoča hitro in enostavno oceno patogenosti sevov *E. coli* in je primerna alternativa drugim bolj zahtevnim modelnim sistemom.

**Ključne besede:** *E. coli*, patogenost, *in vitro*, prašičji urotelij, modelni sistem

---

<sup>1</sup>Avtor: Luka Predojević, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [lukapredojevic@yahoo.com](mailto:lukapredojevic@yahoo.com)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [marjanca.starcic.erjavec@bf.uni-lj.si](mailto:marjanca.starcic.erjavec@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: prof. dr. Mateja Erdani Kreft, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Vrazov trg 1, Ljubljana, e-mail: [mateja.erdani@mf.uni-lj.si](mailto:mateja.erdani@mf.uni-lj.si)

<sup>4</sup>Sodelujoči, izr. prof. dr. Darja Keše, Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, Ljubljana, e-mail: [darja.keše@mf.uni-lj.si](mailto:darja.keše@mf.uni-lj.si)

<sup>5</sup>Sodelujoči, prof. dr. Darja Žgur-Bertok, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [darja.zgur@bf.uni-lj.si](mailto:darja.zgur@bf.uni-lj.si)

## EVALUATION OF THE PATOGENIC POTENTIAL OF HUMAN *Escherichia coli* STRAINS ON BIOMIMETIC *in vitro* MODEL OF PORCINE UROTHELIUM

**Abstract:** *Escherichia coli* (*E. coli*) is a representative of *Enterobacteriaceae*. It is part of the normal intestinal microbiota, but pathogenic strains of *E. coli* can cause intestinal and extra intestinal infections. Acute and chronic urinary tract infections (UTIs) are caused by uropathogenic strains of *E. coli* (UPEC). Uropathogenicity research of UPEC strains is increasing and numerous model systems are already developed, with different advantages and limitations. Our goal was to prepare a new model for the study of UPEC pathogenicity, which would be simpler, less demanding and financially more favorable than other model systems. The biomimetic *in vitro* porcine urothelial model was developed as a new, alternative method for assessing the pathogenicity of *E. coli* strains. The model is based on the cell culture of normal porcine (*Sus scrofa domesticus*) urothelial cells (NPU cells), originating from a normal urinary bladder urothelium, with the same properties as cells in the intact tissue under *in vivo* conditions. Our biomimetic *in vitro* model of porcine urothelium is based on an already established *in vitro* model of porcine urothelial cells by a team of scientists from the Institute of Cell Biology at the Faculty of Medicine in Ljubljana. For the first time, this model system has been adapted and used for the purpose of determining the degree of pathogenicity of various strains of *E. coli*. In our study we used 12 UPEC strains, 11 faecal strains of *E. coli* (FEC) isolated from healthy people, and two laboratory strains of *E. coli* MG1655 and DH5 $\alpha$ .

Methods included the examination of the viability of urothelial cells after the infection with the strains of *E. coli*, PCR for the detection of a set of genes for virulence factors in bacterial strains, and the performance of the scanning and transmission electron microscopy. In addition, we also performed the analysis of certain cytokines as a response of NPU cells to *E. coli* infection, using a commercial kit.

The results of the infection of our biomimetic *in vitro* model of normal urothelium show that the model can display the difference in the degree of pathogenicity between the *E. coli* strains investigated. Due to the high genetic and physiological similarity between the pig and human urothelium, the findings derived from the biomimetic *in vitro* model of the porcine urothelium are relevant to human medicine. For our model, microbiological laboratories could be interested, inside or outside the hospital / clinical area. The model could be an additional, confirmatory or alternative method for assessing the pathogenicity of *E. coli* strains.

In addition to clinical potential, the biomimetic *in vitro* model of the normal urothelium has also a potential to be used in basic science, since it has the ability to distinguish natural strains of *E. coli* with respect to the degree of pathogenicity and thus can expose new potentially pathogenic strains worthy of further research. This model is a quick, cheap and simple method for assessing the pathogenicity of *E. coli* strains and an appropriate alternative to other more demanding model systems.

**Keywords:** *E. coli*, pathogenicity, *in vitro*, porcine urothelium, model system

## VPLIV STRESNIH DEJAVNIKOV NA BIOGENEZO LIPIDNIH KAPLJIC V ASTROCITIH

Tina SMOLIČ<sup>1</sup>, Nina VARDJAN<sup>2</sup>

**Povzetek:** Astrociti so celice glije, ki so-uravnavajo delovanje centralnega živčnega sistema (CŽS). Po morfologiji in funkciji so izrazito heterogene celice. Med drugim aktivno sodelujejo pri uravnavanju energijskega metabolizma v CŽS. S svojimi izrastki, ki so v tesnem stiku z žiljem in nevroni, iz krvnega obtoka privzemajo glukozo, in jo kot vir energije posredujejo nevronom ali pa jo skladiščijo v obliki glikogena. Za razliko od glukoze metabolizma, ki je v astrocitih dobro raziskan in uravnavan predvsem preko aktivacije adrenergičnih receptorjev na površini astrocitov, pa je vloga lipidnega metabolizma v astrocitih manj raziskana. Astrociti lahko pridobijo energijo z oksidativno razgradnjo ketonskih teles in  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin (MK) v mitohondrijih. Poleg tega v patoloških stanjih CŽS lahko kopičijo lipidne kapljice (LK), ki so dinamični in mobilni celični organeli, sestavljene iz sredice iz nevtralnih lipidov (triacilglicerolov in sterolnih estrov), ki je obdana s fosfolipidnim monoslojem in številnimi proteini. V neadipocitnih celicah povezujejo biogenezo LK s stresnimi razmerami (stradanje, oksidativni stres, vnetje), ki so značilne tudi za patološka stanja v CŽS. Mehanizmi nastanka LK in njihova vloga v astrocitih je še nepoznana, zato nas je zanimalo, kako različni stresni dejavniki in aktivacija adrenergičnih receptorjev z noradrenalinom, ki se izloča iz noradrenergičnih nevronov v stresnih stanjih, vpliva na biogenezo LK v astrocitih. Podganje astrocite v kulturi in organotipskih kulturah možganskih rezin odraslih živali smo za 24 ur izpostavili stradanju, presežku prostih MK, presežku L-laktata, hipoksiji in adrenergičnim agonistom kot je noradrenalin, ki se v stresnih situacijah sprošča iz noradrenergičnih nevronov v CŽS. LK smo nato označili s fluorescenčnim markerjem (nilsko rdeče, BODIPY 493/503) in ovrednotili tvorbo LK z uporabo konfokalne mikroskopije. Stradanje, presežek prostih MK, L-laktat, hipoksija in s cAMP-posredovana adrenergična signalizacija je povečala biogenezo LK v astrocitih za več kot 2-krat. S tem smo pokazali, da je biogeneza LK tako *in vitro* kot *in situ* uravnana z zunajceličnimi stresnimi dejavniki in adrenergičnim signaliziranjem. Podobni mehanizmi najverjetneje uravnavajo tudi biogenezo LK v astrocitih *in vivo* v patoloških razmerah.

**Ključne besede:** lipidne kapljice, stres, adrenergična signalizacija, astrociti, konfokalna mikroskopija

---

<sup>1</sup>Avtorica: Tina SMOLIČ, mag. mol. funk. biol., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Laboratorij za nevroendokrinologijo - molekularna celična fiziologija, Zaloška 4, Ljubljana, e-mail: [tina.smolic@mf.uni-lj.si](mailto:tina.smolic@mf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: doc. dr. Nina VARDJAN, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Laboratorij za nevroendokrinologijo - molekularna celična fiziologija, Zaloška 4, Ljubljana in Celica, biomedicinski center, d.o.o., Tehnološki park 24, Ljubljana, e-mail: [nina.vardjan@mf.uni-lj.si](mailto:nina.vardjan@mf.uni-lj.si)

## STRESS STIMULI AFFECT LIPID DROPLET BIOGENESIS IN ASTROCYTES

**Abstract:** Astrocytes are glial cells involved in the regulation of many processes in the central nervous system (CNS). Among others, they participate in the regulation of CNS energy metabolism. With their numerous processes, that are in close contact with blood vessels and neurons, they uptake glucose from blood circulation, which is then transported as an energy source to neurons or it is stored in astrocytes in glycogen, an important brain fuel reserve. Opposed to glucose metabolism, that is in astrocytes highly regulated by adrenergic receptors expressed on their surface, the knowledge on the role of astroglial lipid metabolism is still elusive. Astrocytes can obtain energy from oxidation of ketone bodies and  $\beta$ -oxidation of fatty acids (FA) in mitochondria. In addition, they can in pathological states accumulate lipid droplets (LDs), dynamic cellular organelles, composed of a core of neutral lipids (triacylglycerols and sterol esters) surrounded by a phospholipid monolayer and various proteins. In non-adipose cells LDs presumably form in response to stress such as starvation, oxidative stress, and inflammation, conditions also involved in CNS pathologies. The molecular mechanisms of LD biogenesis and their role in astrocytes are still unknown. Therefore, we were interested in how various stress stimuli and activation of adrenergic receptors by noradrenaline, which is released from noradrenergic neurons in the CNS upon stress, affect LD biogenesis in astrocytes. We exposed rat astrocytes in cell cultures and in adult organotypic brain tissue slice cultures for 24 h to starvation, excess of free FA, excess of L-lactate, hypoxia and adrenergic agonists such as noradrenaline. We labelled LDs with fluorescent markers (Nile red, BODIPY 493/503) and evaluated the formation of LDs using confocal microscopy. Starvation, exposure to excess oleic acid or lactate, hypoxia and cAMP-mediated adrenergic signaling increased LD formation in cultured and tissue astrocytes over 2-fold, indicating LD biogenesis. Our results show that LD formation in astrocytes *in vitro* and *in situ* is regulated by extracellular stress-related stimuli, which may govern LDs formation also *in vivo* during CNS pathologies.

**Keywords:** lipid droplets, stress, adrenergic signaling, astrocytes, confocal microscopy

## VPLIV DOLŽINE PAVZE NA PERMEABILIZACIJO IN PREŽIVETJE CELIC PO ELEKTROPORACIJI Z VISOKOFREKVENČNIMI BIFAZNIMI PULZI

Angelika VIŽINTIN<sup>1</sup>, Damijan MIKLAVČIČ<sup>2</sup>

**Povzetek:** Elektroporacija je pojav, pri katerem se zaradi prisotnosti električnega polja poveča prepustnost celične membrane. Uporablja se za različne namene, npr. za transfekcijo/transformacijo, ekstrakcijo snovi iz celic, inaktivacijo mikroorganizmov, elektrokemoterapijo, ablacijo tkiv. Od aplikacije je odvisno ali želimo z elektroporacijo doseči visoko permeabilizacijo z visokim preživetjem (npr. pri transfekciji/transformaciji) ali čim nižje preživetje celic (npr. za ablacijo tkiv). Na učinkovitost elektroporacije vplivajo različni dejavniki, od katerih lahko *in vivo* načeloma spreminjamo le parametre električnega polja kot so električna poljska jakost, oblika pulza, čas trajanja pulza, čas pavze med pulzi, ponavljalna frekvenca in število pulzov. Zato so številne raziskave osredotočene na optimizacijo parametrov električnih pulzov. Pred kratkim so pokazali, da kratki visokofrekvenčni bifazni pulzi povzročajo zmanjšano mišično krčenje v primerjavi z monofaznimi. Mišično krčenje, ki ga sprožijo električni pulzi, je namreč glavni neželeni stranski učinek pri medicinskih aplikacijah elektroporacije. Vendar so raziskovalci pri nano- in mikrosekundnih bifaznih pulzih opazili t.i. učinek preklica pulzov: faza nasprotne polaritete izniči učinek prve faze, če je pavza med njima dovolj kratka. Namen naše raziskave je bil preučiti vpliv dolžine pavze med pozitivno in negativno polariteto/fazo ter dolžine pavze med pulzi na preživetje in permeabilizacijo celične membrane celičnih linij CHO-K1 (ovarijske celice kitajskega hrčka) in H9c2 (podganji kardiomioblasti). Uporabljali smo dva tipa pravokotnih bifaznih pulzov. Pri obeh tipih je pozitivna in negativna faza pulza trajala 1  $\mu$ s. Za pulze tipa 1 je dolžina pavze med pozitivno in negativno polariteto vedno znašala 1  $\mu$ s, spreminjali smo dolžino pavze med pulzi (0,5, 10, 100, 1000 ali 10 000  $\mu$ s). Za pulze tipa 2 pa sta bili pavza med pozitivno in negativno polariteto ter pavza med pulzi enako dolgi (0,5, 10, 100, 1000 ali 10 000  $\mu$ s). Dovajali smo zaporedje 400 pulzov. Preživetje smo določali 24 ur po elektroporaciji pri jakosti električnega polja 2,5 kV/cm s testom MTS. Za določitev permeabilizacije smo celicam v suspenziji dodali propidijev jodid tik pred dovajanjem pulzov ter pomerili njegovo fluorescenco 3 minute po elektroporaciji pri jakosti električnega polja 1,5 kV/cm s pretočnim citometrom. Vrednosti električno poljske jakosti smo izbrali tako, da smo zajeli območje, kjer so bile razlike med pulzi z različnimi pavzami najbolj izrazite. Opazili smo, da preživetje obeh celičnih linij pada s povečevanjem pavze med pozitivno in negativno polariteto in/ali pavzo med pulzi. Preživetje je bilo manjše po uporabi pulzov tipa 2 z daljšimi pavzami v primerjavi s pulzi tipa 1, kar se sklada s predhodnimi opažanji o učinku preklica pulzov. Vendar učinka preklica pulzov nismo opazili pri permeabilizaciji celične membrane, saj je bila za obe celični liniji permeabilizacija nižja pri uporabi pulzov tipa 2 z daljšimi pavzami kot pri pulzih tipa 1. Rezultati naše raziskave, ki bodo predstavljeni na 3. svetovnem kongresu o elektroporaciji, nakazujejo, da lahko višjo učinkovitost elektroporacije (t.j. nižje preživetje) dosežemo s podaljšanjem pavze med pozitivno in negativno polariteto in/ali pavzo med pulzi ter da se višja stopnja permeabilizacija ne odraža vedno v nižjem preživetju.

**Ključne besede:** elektroporacija, visokofrekvenčni bifazni pulzi, učinek preklica pulzov, permeabilizacija celične membrane, preživetje po elektroporaciji

---

<sup>1</sup>Avtorica: Angelika VIŽINTIN, mag. biokem., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, Ljubljana, e-mail: [angelika.vizintin@fe.uni-lj.si](mailto:angelika.vizintin@fe.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Damijan MIKLAVČIČ, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, Ljubljana, e-mail: [damijan.miklavcic@fe.uni-lj](mailto:damijan.miklavcic@fe.uni-lj)

## EFFECT OF PULSE DELAYS ON PERMEABILIZATION AND SURVIVAL OF CELLS AFTER ELECTROPORATION WITH HIGH-FREQUENCY BIPHASIC PULSES

**Abstract:** Electroporation is the phenomenon of increased cell permeabilization due to the effect of an external electric field. It is used in various applications including transfection/transformation, extraction of biomolecules from cells, inactivation of microorganisms, electrochemotherapy, tissue ablation. Depending on the application we want to achieve high permeabilization and high survival (e.g. for transfection/transformation) or high permeabilization and low survival (e.g. for ablation). Of the various parameters that affect the electroporation efficiency, we can usually manipulate *in vivo* only the electric field parameters like electric field strength, pulse shape, pulse duration, delay between pulses, pulse repetition frequency and number of pulses. Numerous studies have therefore focused on optimization of the electric field parameters. Recently, short high-frequency biphasic pulses have attracted attention since they have shown reduced muscle contractions compared to monophasic treatment. Pulse-induced muscle contraction is the major adverse effect of clinical applications of electroporation. However, it was reported (for nano- and microsecond pulses) that the opposite polarity phase of the pulse cancels the effect of the first if the delay between the two is short enough. The scope of our work was to investigate the effect of interphase delay and delay between pulses on survival and cell membrane permeabilization of CHO-K1 (Chinese hamster ovary) and H9c2 (rat cardiomyoblasts) cell lines. We used two types of biphasic square pulse treatments. For both types, the length was 1  $\mu$ s for the positive and 1  $\mu$ s for the negative phase. For pulse type 1, the interphase delay was fixed at 1  $\mu$ s and the delay between pulses was set to 0.5, 10, 100, 1000 or 10 000  $\mu$ s. For pulse type 2, the interphase delay and delay between pulses were of equal duration: 0.5, 10, 100, 1000 or 10 000  $\mu$ s. We treated the cell suspension with 1 burst of 400 pulses with both type 1 and type 2 pulses. Cell survival was evaluated 24 h after pulse treatment at 2.5 kV/cm with MTS assay. To determine cell membrane permeabilization, propidium iodide was added to cells and its fluorescence was measured 3 min after pulse delivery at 1.5 kV/cm by flow cytometry. The electric field strengths were set at a value where the differences between pulse treatments were most obvious. The survival of both cell lines decreased when increasing the interphase and/or delay between pulses and was lower for pulses of type 2 of longer delays compared to type 1 which is in agreement with previously reported cancellation effect. However, we did not observe this cancellation effect for membrane permeabilization – for both cell lines we measured lower permeabilization when cells were treated with pulses of type 2 of longer delays compared to type 1. Results of our work, which will be presented at the 3<sup>rd</sup> World Congress on Electroporation, suggests that higher effectiveness (i.e. lowest survival) could be achieved with increasing the interphase and/or delay between pulses and that higher membrane permeabilization does not always result in lower cell survival.

**Keywords:** electroporation, high-frequency biphasic pulses, cancellation effect, cell membrane permeabilization, survival after electroporation

## **ZNANOST O ŽIVALIH**

## IMAJO POLIFENOLI OLJK VPLIV NA ANTIOKSIDATIVNO OBRAMBO TUDI PRI PRAŠIČIH?

Jakob LESKOVEC<sup>1</sup>, Janez SALOBIR<sup>2</sup>, Alenka LEVART<sup>3</sup>

**Povzetek:** Oljke in njihove polifenole povezuje z mnogimi ugodnimi učinki na zdravje ljudi. Oljke in oljčno olje so tudi eden izmed temeljev mediteranske prehrane, za katero je znano, da ima veliko pozitivnih učinkov, predvsem na manjšo pojavnost kardiovaskularnih bolezni. Ta prestižni status oljkam pripisuje celo EFSA (European Food Safety Authority), ki za polifenole oljk dovoljuje zdravstveno trditev, da le-ti ščitijo LDL (low density lipoproteins) delce pred oksidacijo in posledično varujejo pred nastankom kardiovaskularnih bolezni pri ljudeh. V raziskavi nas je zanimalo, ali polifenoli oljk izkazujejo antioksidativno delovanje tudi pri prašičih ter ali je s strani EFSE sprejeta količina oljčnih polifenolov zadostna (5 mg hidroksitirozola in ekvivalentov na dan). Ker je ta količina izredno nizka, smo v poskus vključili tudi 10- in 25-kratno koncentracijo tiste, ki jo predlaga EFSA. Da bi z gotovostjo potrdili antioksidativno delovanje polifenolov oljk, smo pujskom v obrok vključili laneno olje, ki je znan povzročitelj postprandialnega oksidativnega stresa pri mnogih živalskih vrstah. V izogib neželenim vplivom vključevanja oljčnega olja ali oljčnih listov v krmo živali (kot je to praksa v drugih tovrstnih poskusih na živalih), smo v krmo dodajali ekstrakt oljčnih listov. V poskusu smo spremljali kazalnike oksidativnega stresa in antioksidativne obrambe živali z meritvami produktov oksidacije maščob, poškodb DNK, koncentracije antioksidantov in aktivnosti encimov, vključenih v antioksidativno obrambo. Dokazali smo specifične antioksidativne učinke ekstrakta (aktivnost jetrnega encima gama glutamil transferaza, zmanjšanje poškodb DNK - kometni test ter 8-hidroksi-2-deoksigvanozin), čeprav odziv ni bil koncentracijsko odvisen. Ekstrakt ni omejil rasti in proizvodnosti živali, kot v primeru vključevanja večjih količin oljčnih listov. Oljčne polifenole v obliki ekstrakta bi tako lahko vključili kot potencialno učinkovit prehranski dodatek za izboljševanje zdravja živali, zdravja prebavil ter kakovosti mesa.

**Ključne besede:** polifenoli oljk, oksidativni stres, hidroksitirozol, laneno olje, prašič

---

<sup>1</sup>Avtor: Jakob LESKOVEC, mag. ing zoot., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, e-mail: [jakob.leskovec@bf.uni-lj.si](mailto:jakob.leskovec@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: prof. dr. Janez SALOBIR, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, e-mail: [janez.salobir@bf.uni-lj.si](mailto:janez.salobir@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentorica: doc. dr. Alenka LEVART, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, e-mail: [alenka.levart@bf.uni-lj.si](mailto:alenka.levart@bf.uni-lj.si)

## DO OLIVE POLYPHENOLS IMPACT ANTIOXIDATIVE DEFENSE ALSO IN PIGS?

**Abstract:** Olives and their polyphenols have many beneficial effects on human health. Olives and olive oil are important components of Mediterranean diet, which is known to have many positive effects on human health, especially in conjunction with the lower incidence of cardiovascular diseases. This prestigious status of olives is also acknowledged by the EFSA (European Food Safety Authority), which permits the health claim for olive polyphenols to protect LDL (low density lipoproteins) particles from oxidation and consequently protect against the onset of cardiovascular diseases in humans. In the study, we were interested in whether olive polyphenols also show antioxidant activity in pigs and whether the EFSA accepted amount of olive polyphenols (5 mg of hydroxytyrosol and equivalents per day) is sufficient to prevent oxidative stress. Since this amount is relatively low, the 10- and 25-fold concentration of the one proposed by EFSA was included in the experiment. In order to determine antioxidant action of olive polyphenols on the antioxidative defence with certainty, linseed oil was included in the diet, which is known to cause postprandial oxidative stress in many animal species. In order to avoid undesired effects of the inclusion of olive leaves in animal feed (as was the practice in previous experiments in animals), the extract of olive leaves was added to the feed. In the experiment we monitored selected indicators of oxidative stress and the antioxidant status of the animals by measuring the products of lipid oxidation, DNA damage, antioxidants concentration and levels of enzymes involved in the antioxidant defense. We showed specific antioxidant effects of the extract (gamma glutamyl transferase activity, liver damage reduction, lower lymphocyte DNA damage, and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine) although the response was not concentration dependent. The extract did not restrict the growth and productivity of animals, as it was shown in the case of the dietary inclusion of olive leaves. Olive polyphenols in the form of an extract could therefore be included as a potentially effective dietary supplement to improve animal health, gastrointestinal health and meat quality.

**Keywords:** olive polyphenols, oxidative stress, hydroxytyrosol, linseed oil, pig

## **ŽIVILSTVO**

## RAZVOJ BREZGLUTENSKEGA PEKOVSKEGA IZDELKA

Polona MEGUŠAR<sup>1</sup>, Iztok PRISLAN<sup>2</sup>, Iztok DOGŠA<sup>3</sup>

**Povzetek:** Kruh je glavna hrana za večino svetovnega prebivalstva. Za njegovo proizvodnjo se uporablja vrsto zrn; pšenica pa je najpogostejša. Pšenica vsebuje gluten, ki pri manjšem deležu populacije sproži avtoimunski odziv, zato pripravljamo brezglutenske pekovske izdelke. Priprava kvalitetnih brezglutenskih pekovskih izdelkov je velik izziv, saj gluten tvori močno proteinsko mrežo, ki daje kruhu edinstvene viskoelastične lastnosti. Pri pripravi brezglutenskih pekovskih izdelkov moramo gluten nadomestiti s spojinami, ki bodo oponašale viskoelastične lastnosti glutena in povečale sposobnost zadrževanja plina v testu. Gluten lahko nadomestimo z uporabo brezglutenskih mok (riževa moka), škroba (koruzni, krompirjev) in ustreznih hidrokolooidov. Izdelke pa potem lahko dodatno izboljšujemo z dodajanjem encimov (amilaze, transglutaminaze) in z različnimi sevi kvasovk.

Škrob se zelo pogosto uporablja pri pripravi živilskih proizvodov. Ker pa nima idealnih lastnosti, mu pogosto dodajamo glutenu alternativne hidrokoloide, ki izboljšajo reološke in termične lastnosti sistema. V brezglutenskih izdelkih izboljšajo teksturo, povečajo vsebnost vlage, povečajo sposobnost zadrževanja plinov v testu, modificirajo viskoznost in izboljšajo celotno kvaliteto. Najpogosteje sta v uporabi hidroksipropil metilceluloza (HPMC) in ksantan.

S segrevanjem škroba, ki je dispergirani v vodi, sprožimo proces želiranja. Voda prodira v granule škroba in uniči kristalno strukturo amiloze in amilopektina. Dodatek hidrokolooidov vpliva na proces želiranja škroba, ker hidrokoloidei tekmujejo s škrobom za vezavo vode. Z uporabo hidrokolooidov in drugih dodatkov lahko vplivamo na proces želiranja škroba in posledično tudi na kvaliteto končnega izdelka. Tovrstne interakcije lahko raziskujemo z različnimi eksperimentalnimi tehnikami. Vpliv hidrokolooidov na želiranje škroba preučujemo termično, z diferenčno dinamično kalorimetrijo in reološko, saj so reološke lastnosti odvisne od interakcij topila s posameznimi komponentami sistema.

Kljub temu da so funkcije in lastnosti posameznih komponent v brezglutenskih izdelkih bolj ali manj poznane, so njihove medsebojne interakcije in interakcije s topilom še vedno slabo raziskane. Poznavanje fizikalno-kemijskih interakcij med posameznimi komponentami tekom priprave testa in peke kruha lahko razvoj novega izdelka olajša in vnaprej izloči recepte, ki bi vodili do neustreznega pekovskega izdelka. Tradicionalno se kvaliteta izdelka ovrednoti senzorično. Z identifikacijo fizikalno-kemijskim parametrov, ki nam dajejo najbolj kvaliteten kruh, pa bi se lahko v prihodnosti izognili subjektivni senzorični analiz oz. le te dodali še dodatno metodo za kontrolo kvalitete. Razumevanje interakcij nam omogoča razvoj kvalitetnega brezglutenskega izdelka brez nepotrebnih sestavin.

**Ključne besede:** brezglutenski izdelek 1, fizikalno-kemijske interakcije 2, škrob 3, HPMC 4, ksantan 5

---

<sup>1</sup>Avtorica: Polona MEGUŠAR, mag. mikrobiol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [polona.megusar@bf.uni-lj.si](mailto:polona.megusar@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentor: doc. dr. Iztok PRISLAN, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [iztok.prislan@bf.uni-lj.si](mailto:iztok.prislan@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: doc. dr. Iztok DOGŠA, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [iztok.dogsa@bf.uni-lj.si](mailto:iztok.dogsa@bf.uni-lj.si)

## DEVELOPMENT OF A GLUTEN-FREE BAKERY PRODUCT

**Abstract:** Bread is the main food for most of the world's population. For its production, various types of grains are used; and wheat is the most common. Wheat contains gluten, which can trigger an autoimmune response in small part of population. This is the reason why gluten-free bakery products. Preparation of high-quality gluten-free bakery products is a major challenge since gluten forms a strong protein network that gives the bread unique viscoelastic properties. When preparing gluten-free bakery products, gluten must be replaced by compounds that mimic the viscoelastic properties of gluten and increase the ability to retain gas in the dough. Gluten can be replaced by the use of gluten-free flour (rice flour), starch (maize, potatoes) and suitable hydrocolloids. The products can then be further improved by adding enzymes (amylase, transglutaminase) and various yeast strains.

Starch is often used in the preparation of food products. However, since it does not have the ideal physico-chemical properties, it is often used in a combination with hydrocolloids, which improve the rheological and thermal properties of the system. More specifically, they improve texture, increase moisture content, increase dough's gas-retaining ability, modify viscosity and improve overall quality. The most commonly used hydrocolloids are hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and xanthan.

By heating the starch, which is dispersed in water, the process of gelatinization is initiated. During gelatinization, the amylose is dissolved and progressively released from the granules. The addition of hydrocolloids affects the starch gelatinization process because hydrocolloids are competing with starch for water absorption and hence limiting starch swelling and gelatinization. By using hydrocolloids and other additives, we can influence the process of starch gelatinization and consequently also the quality of the finished product. Such interactions can be investigated by various experimental techniques. The influence of hydrocolloids on starch gelatinization is studied thermally, with differential scanning calorimetry and rheology, as rheological properties depend on the interaction of the solvent with the individual components of the system.

Knowing the physical-chemical interactions between individual components during the preparation of the dough and bread baking can make the development of a new product easier and eliminate the recipes that would lead to an inadequate baking product. Traditionally, the quality of the product is evaluated with sensory analysis. By identifying the physico-chemical parameters that give us the highest quality bread, the subjective sensory analysis could be avoided in the future. In this way one additional method for quality control could be designed. Also the interactions enable us to develop a quality gluten-free product without unnecessary ingredients.

**Keywords:** gluten-free product 1, physical-chemical interactions 2, starch 3, HPMC 4, xanthan 5

## ZMANJŠANJE MIKROBIOLOŠKE KONTAMINACIJE RIB PRIMER – NAVADNI KRAP

Meta STERNIŠA<sup>1</sup>, Sonja SMOLE MOŽINA<sup>2</sup>, Jan MRÁZ<sup>3</sup>

**Povzetek:** Obseg akvakulture narašča in družina krapovci je trenutno ekonomsko najpomembnejša skupina sladkovodnih rib v globalnem merilu in med njimi je navadni krap (*Cyprinus carpio*) najpogosteje gojena vrsta v Evropi. Kljub visoki hranilni vrednosti in relativno nizki ceni pa so v evropskih državah še vedno slabo izkoriščen vir. Velik izziv pri tem predstavlja njihov izgled in hitra pokvarljivost svežega mesa. Sveže ribje meso velja za izredno hitro pokvarljivo živilo zaradi prepleta avtolize, oksidacije in aktivnosti mikroorganizmov – kot glavnega mehanizma kvara. Zmanjšanje mikrobiološke kontaminacije in upočasnitev rasti/aktivnosti mikroorganizmov je odločilnega pomena za upočasnitev kvara, podaljšanje obstojnosti in s tem posledično tudi zmanjšanja izgub in zavržkov rib in ribjih proizvodov. Mikrobiota svežega mesa rib je zelo raznolika, tekom skladiščenja pa prevlada rast specifičnih psihrotrofnih mikroorganizmov – v primeru sladkovodnih rib tako prevladajo bakterije *Pseudomonas*, ki so lahko na ribjem mesu prisotne zaradi primarne kontaminacije ali pa pride do naknadne kontaminacije, saj te bakterije perzistirajo na različnih površinah v proizvodnji predelave rib. Poleg tega imajo te bakterije visok potencial povzročanja kvara s tvorbo hidrolitičnih encimov in pigmentov.

Glavni cilj doktorske naloge je raziskati možnosti zmanjšanja mikrobiološke kontaminacije mesa navadnega krapa, česar se lotevamo na več načinov: (i) z uporaba dodatnega tehnološkega postopka izkrvavitve ob zakolu z namenom zmanjšanja hranil za bakterije in s tem upočasnjevanja njihove rasti ter pozitivnega vpliva na senzorične in oksidativne spremembe; (ii) z uporabo naravnega protimikrobnega dodatka pri pripravi filejev z namenom zaviranja rasti bakterij *Pseudomonas* in s tem posledično podaljšanje mikrobiološke stabilnosti; (iii) s karakterizacijo sposobnosti adhezije in tvorbe biofilma bakterij *Pseudomonas* na različnih površinah in temperaturah predelave rib, s ciljem razumevanja njihove perzistence in posledične kontaminacije; (iv) z oceno prenosa biofilmskih celic bakterij *Pseudomonas* s površine na živilo z namenom karakterizacije navzkrižne kontaminacije. Prvi dve točki sta usmerjeni v zmanjšanje primarne mikrobiološke obremenitve mesa navadnega krapa, drugi dve v pripravo strategij za preprečevanje mikrobne kontaminacije zaradi tvorbe bakterijskega biofilma.

Opravljenе raziskave so izrazito aplikativno naravnane in prenosljive tudi na zmanjševanje mikrobiološke kontaminacije drugih vrst rib oz. drugih živil, kjer imajo bakterije *Pseudomonas* pomembno vlogo pri kvaru oz. zmanjševanju kakovosti živila.

**Ključne besede:** kvar ribjega mesa, navadni krap, *Pseudomonas*, biofilm, mikrobiološka obstojnost

---

<sup>1</sup>Avtorica: Meta STERNIŠA, dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [meta.sternisa@bf.uni-lj.si](mailto:meta.sternisa@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [sonja.smole@bf.uni-lj.si](mailto:sonja.smole@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Somentor: izr. prof. dr. Jan MRÁZ, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Institute of Aquaculture and Protection of Waters, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, e-mail: [jmraz@frov.jcu.cz](mailto:jmraz@frov.jcu.cz)

## REDUCTION OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF FISH MEAT CASE – COMMON CARP

**Abstract:** Aquaculture production is increasing and family Cyprinidae is currently economically most important group of freshwater fish on a global scale, and among them, common carp (*Cyprinus carpio*) is the most commonly cultivated species in Europe. Despite high nutritional value and a relatively low price, it is still poorly exploited food resource. At this, carps appearance and rapid spoilage of fresh meat presents a great challenge. Fresh fish meat is highly perishable food with intertwining of autolysis, oxidation and microbiological activity – as the main spoilage mechanisms. Thus, reducing microbiological contamination and slowing growth/activity of microorganisms is crucial for slowing down the spoilage, prolonging shelf life and consequently reducing losses and wastes of fish and fish products. The microbiota of fresh fish meat is very diverse, and during storage, the growth of specific psychrotrophic microorganisms prevails – in the case of freshwater fish bacteria *Pseudomonas* predominate. These can be present on fish meat from primary material or have source from contamination, as these bacteria persist on various surfaces in fish processing production. In addition, these bacteria have a high spoilage potential with the production of hydrolytic enzymes and pigments.

The main goal of the doctoral thesis is to reduce the microbiological contamination of common carp meat, which has been studied in four points: (i) the use of bleeding as additional technological step during slaughter for the purpose of reducing nutrients for bacteria and thus slowing down their growth and positively affecting sensory and oxidative changes; (ii) the use of a natural antimicrobial for dip treatment after preparation of fillets in order to inhibit the growth of *Pseudomonas* bacteria and consequently the prolongation of microbiological stability; (iii) the characterization of the ability to adhere and form the biofilm of *Pseudomonas* bacteria at various surfaces temperatures of importance in the fish processing, with the aim of understanding their ability to persist and consequently cross-contaminate; (iv) an assessment of the biofilm cells transfer of *Pseudomonas* bacteria from the surface to characterize cross-contamination. The first two points are aimed at reducing the primary microbiological load of common carp meat, and the other two points in the preparation of strategies to prevent bacterial contamination from surface-formed bacterial biofilm.

Performed researches are applicative and transferable also to the reduction of microbiological contamination of other fish, and other foods where *Pseudomonas* play an important role in spoilage and quality reduction.

**Keywords:** fish spoilage, common carp, *Pseudomonas*, biofilm, microbiological quality

## KAPSULACIJA PROPOLISA KOT REŠITEV NJEGOVE SLABE VODOTOPNOSTI

Luka ŠTURM<sup>1</sup>, Nataša POKLAR ULRIH<sup>2</sup>

**Povzetek:** Propolis je zaradi svoje raznolike sestave, visokih vsebnosti biološko koristnih spojin in širokih možnosti uporabe že vrsto let predmet različnih medicinskih, kemijskih in industrijskih raziskav. Dokazano je bilo njegovo protimikrobno, protirakavo, antioksidativno, protivnetno in imuno-stimulativno delovanje. Ker gre za hidrofoben produkt čebel z močnim okusom in aromo, je bila največja omejitev uporabe propolisa prav njegova izredno slaba topnost v vodi in neprijeten okus. Za pridobitev vodotopnega propolisovega produkta je zato potrebna njegova kapsulacija v različne nosilce, oziroma odstranitev v vodi netopnih produktov. Ker pa bi s slednjim postopkom izgubili tudi veliko količino biološko pomembnih molekul, se je kapsulacija pokazala kot idealna rešitev, ki hkrati reši tudi vprašanje obstojnosti produkta in zamaskiranje njegovega grenkega okusa.

Namen raziskave je bil tako pridobiti vodotopni propolisov prah, ki ne vsebuje alkohola, s čim višjimi končnimi koncentracijami kapsuliranih fenolov, s poudarkom na bioflavonoidih. Raziskava je temeljila na razvoju postopka kapsulacije nerazvoskanega ekstrakta propolisa v različne kapsulacijske nosilce (inulin, maltodekstrin, Arabski gumi), s poudarkom na Arabškem gumiju. Propolis smo v nosilec kapsulirali s postopkom liofilizacije in klasičnega ter ultrazvočnega sušenja z razprševanjem. Preizkusili smo tako kapsulacijo razvoskanega kot nerazvoskanega ekstrakta. Pred končno kapsulacijo propolisa smo optimizirali nekatere parametre (čas in moč centrifugiranja; razmerje propolis:nosilec) in izbrali kapsulacijski nosilni material. Pridobljene vzorce smo kasneje, tudi s pomočjo podjetja Medex d.o.o., dobro okarakterizirali in medsebojno primerjali, da smo lahko določili najoptimalnejši postopek kapsulacije. S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) smo določili vsebnost celokupnih bioflavonoidov in nekaterih specifičnih spojin (galangin, krizin in pinocembrin) v tako pridobljenih vzorcih, z drugimi metodami pa smo določili še njihovo topnost v vodi, vodno aktivnost, antioksidativno aktivnost, količino celokupnih fenolov, kapsulacijsko učinkovitost, pH vzorcev v raztopini in velikost njihovih delcev. S pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo pregledali ali je prišlo do močne vezave propolis-nosilec ali ne. Na koncu smo preverili še stabilnost ter kinetiko sproščanja kapsuliranih propolisovih fenolov v vodnih raztopinah z različnim pH in potencial antioksidativnega delovanja kapsuliranega propolisa v olju bogatem z omega-3 maščobnimi kislinami. Ugotovili smo, da je tako pridobljen propolisov prah dobro topen v hladni vodi, obstojen v raztopinah pri različnih pH vrednostih, ima nizko vodno aktivnost ter milejši okus in aromo. Propolisov prah vsebuje tudi visoke količine kapsuliranih fenolov (bioflavonoidov), producirani delci so ustrezne velikosti, ne vsebuje alkohola, je dolgo obstojen, zaradi uporabe nerazvoskanega propolisa pa je postopek enostavnejši z manj izgubami. Zaradi unikatnega in uspešnega postopka kapsulacije nerazvoskanega propolisa smo postopek kasneje tudi patentirali, članek z rezultati pa je bil že poslan v objavo. Pridobljeni vodotopni propolisov prah se lahko uporablja kot prehransko dopolnilo (vmešamo ga v različne pijače), ima pa tudi visok potencial kot dodatek različnim živilom, na primer oljem z visoko vsebnostjo omega-3 maščobnih kislin, kjer jim podaljšuje obstojnost in dvigne njihovo prehransko vrednost.

**Ključne besede:** propolis, kapsulacija, Arabski gumi, vodotopni propolisov prah, prehranska dopolnila

---

<sup>1</sup>Avtor: Luka ŠTURM, mag. mikrobiol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [luka.sturm@bf.uni-lj.si](mailto:luka.sturm@bf.uni-lj.si)

<sup>2</sup>Mentorica: Nataša POKLAR ULRIH, prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [natasa.poklar@bf.uni-lj.si](mailto:natasa.poklar@bf.uni-lj.si)

## ENCAPSULATION OF PROPOLIS AS A SOLUTION TO ITS POOR WATER DISPERSIBILITY

**Abstract:** Propolis is a chemically diverse substance with high levels of biologically beneficial compounds and wide usage potential. It has been the subject of various medical, chemical and industrial research for many years, because of its antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer and immune-stimulating action. Since it is highly hydrophobic and has a strong taste and aroma, the greatest limitation on the use of propolis is its extremely poor solubility in water and unpleasant taste. In order to obtain a water soluble propolis product, it is therefore necessary to encapsulate it into carriers, or to remove water-insoluble compounds. However, since the removal of water-insoluble compounds would also remove a large amount of biologically important molecules, the encapsulation proved to be an ideal solution, which also solves the issue of product stability and masks its bitter taste.

The purpose of the study was to obtain water-soluble propolis powder that does not contain alcohol and has a high concentration of phenols, especially bioflavonoids. The research was based on the development of the encapsulation process of the un-dewaxed propolis extract into various carriers (inulin, maltodextrin, gum Arabic), with an emphasis on gum Arabic. Propolis was encapsulated via lyophilization or conventional and ultrasonic spray-drying process. We tried the encapsulation of the dewaxed and un-dewaxed extracts. Before the final encapsulation, we optimised the parameters (time and power of centrifugation, propolis:carrier ratio) and selected the carrier material. The samples obtained were characterised with the help of Medex d.o.o., and were compared to each other in order to determine the most optimal encapsulation procedure. By means of high performance liquid chromatography (HPLC), the content of total bioflavonoids and specific compounds (galangin, chrysin and pinocembrin) in the samples were determined, while its dispersibility in water, water activity, antioxidant activity, quantity of total phenols, encapsulation efficiency, pH of the samples in water solutions and particle sizes were determined with other methods. Using differential scanning calorimetry (DSC), binding strength between propolis and carrier was determined. Finally, the stability and the release kinetics of the encapsulated phenols in aqueous solutions with different pH, and the potential of the antioxidative action of encapsulated propolis in oil rich with omega-3 fatty acids, were checked. We found that the propolis powder obtained is well-soluble in cold water, doesn't contain alcohol, is stable in solutions with different pH, has a low water activity, a mild flavour and aroma, high amounts of encapsulated phenols and bioflavonoids, its particles are of adequate size, it is long-lasting, and because of the use of un-dewaxed propolis, the process is simpler with less losses. Due to the unique and successful procedure for the encapsulation of un-dewaxed propolis the process was patented, while the research article with the results was already sent for publication. The obtained water soluble propolis powder can be used as a food supplement (mixed in various beverages), but it also has high potential as an additive to various foods, for example oil with a high content of omega-3 fatty acids, where it increases their persistence and raises their nutritional value.

**Keywords:** propolis, encapsulation, gum Arabic, water soluble propolis powder, food supplements

## VPLIV KVASOVKAM DOSTOPNEGA DUŠIKA IN RAZMERJA VRST KVASOVK V ZDRUŽENI STARTERSKI KULTURI NA KAKOVOST VINA

Polona ZABUKOVEC<sup>1</sup>, Neža ČADEŽ<sup>2</sup>, Franc ČUŠ<sup>3</sup>

**Povzetek:** Spontana alkoholna fermentacija (AF) mošta je kompleksen mikrobiološki proces, ki vključuje različne vrste ne-*Saccharomyces* in *Saccharomyces* kvasovk. Spontano AF začnejo askomicetne kvasovke rodov *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* in *Metschnikowia*, ki imajo šibko fermentacijsko sposobnost in prevladujejo na površini grozdne jagode in kletarske opreme. Proti koncu AF prevladujejo različni sevi *Saccharomyces*, ki so odpornejši na večjo vsebnost etanola v vinu. Ne-*Saccharomyces* kvasovke imajo večjo hidrolitično aktivnost, ki je pomembna za tvorbo aromatičnih spojin v vinu. Vse večji poudarek se pripisuje spontanim AF z naravno prisotnimi sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, saj lahko na ta način vinarji pridelajo bolj raznovrstna vina in ohranijo razpoznavne značilnosti svojih vin v povezavi z lastnostmi rastišča. Za naravno prisotne seve je značilna boljša prilagojenost tako kemijskim kot mikrobiološkim značilnostim mošta. Cilj raziskovalne naloge je izolacija naravno prisotnih izolatov kvasovk iz različnih vinorodnih dežel ter njihova uporaba v inokuliranih AF in s tem simulacija spontane AF. Z izborom vrst in sevov kvasovk lahko dosežemo vključevanje naravno prisotne mikrobne združbe v proces AF z namenom izboljšanja senzorične kakovosti vina z bogatim aromatskim potencialom in poudarjanjem rastišča. Do sedaj smo v raziskovalnem delu izvedli 27 spontanih AF z namenom izolacije naravnih sevov ne-*Saccharomyces* in *Saccharomyces* kvasovk iz vseh treh vinorodnih dežel Slovenije. Spontane AF smo izvedli pri sobni temperaturi in izolirali naravno prisotne kvasovke v različnih časovnih obdobjih AF. V moštu smo izmerili kemijske parametre (vsebnosti sladkorja, skupnih kislin, YAN in pH vrednost) z uporabo klasičnih in encimskih metod. Potek AF smo spremljali s tehtanjem fermentorjev (krivulja CO<sub>2</sub>) in nacepljanjem na različna trdna gojišča, Yeast-Malt (YM) in Wallerstein laboratory nutrient agar (WL), z namenom kvantifikacije in ločevanja med *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* kvasovkami. Opravili smo izolacijo *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* izolatov kvasovk DNA s komercialnim kompletom reagentov ter regijo D1/D2 ribosomske 26S DNA in notranje prepisujoče se regije ITS1 in ITS2 ter 5.8S podenoto rDNA pomnožili z reakcijo PCR. Po končani PCR reakciji smo rezultate pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo in očiščenim PCR pomnožkom določili nukleotidno zaporedje v komercialnem genomskem centru. Iz naših vzorcev smo uspešno izolirali 65 vrst kvasovk z uporabo molekularnih metod, 47 izolatov je bilo iz vrste *Saccharomyces cerevisiae* in 18 izolatov iz vrst ne-*Saccharomyces* kvasovk, med katerimi smo identificirali *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bacillaris* (syn. *Candida zemplinina*), *Pichia kudriavzevii*, *Starmerella* aff. *bombicola*, *Saturnispora diversa*, *Saturnispora silvae* in *Hanseniaspora guilliermondii*. Sledilo je ovrednotenje sevne raznolikosti 47 izolatov vrste *Saccharomyces cerevisiae* na podlagi variabilnosti 11-ih mikrosatelitskih regij z reakcijo multipleks PCR ter določitev njihove dolžine in števila s kapilarno gelsko elektroforezo. Delo bomo nadaljevali z izvedbo nadaljnjih inokuliranih (koinokulacija) AF z različnimi kombinacijami mešane naravne mikrobne združbe ne-*Saccharomyces* in *Saccharomyces* kvasovk v realnem moštu z različnimi količinami dušika. Z uvedbo metode pretočna citometrija bomo kvantitativno spremljali populacije kvasovk med inokuliranimi AF. Ob koncu bomo kvantitativno spremljali vsebnosti osnovnih kemijskih parametrov mošta in vina ter izmerili vsebnosti aromatičnih spojin v pridobljenih vinih (višjih alkoholov, estrov, prostih monoterpenskih alkoholov in hlapnih tiolov) z uporabo plinske kromatografije (GC-FID in GC-MS). Sledila bo še senzorična analiza pridobljenih vin s statistično zasnovano. Z izolacijo lastnih, za določeno območje značilnih izolatov kvasovk, želimo izboljšati učinkovitost AF z mešano naravno mikrobno združbo ter tako povečati vsebnosti pozitivnih ne aromatičnih in aromatičnih spojin v vinu. Končni cilj je večja prepoznavnost in izboljšana senzorična kakovost vina iz določenega vinorodnega območja.

**Ključne besede:** kvasovke, ne-*Saccharomyces*, *Saccharomyces*, kvasovkam dostopni dušik, vino, aromatika

---

<sup>1</sup>Avtorica: Polona Zabukovec, mag. inž. preh., Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, e-mail: [polona.zabukovec@kis.si](mailto:polona.zabukovec@kis.si)

<sup>2</sup>doc. dr. Neža Čadež, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, e-mail: [neza.cadez@bf.uni-lj.si](mailto:neza.cadez@bf.uni-lj.si)

<sup>3</sup>Mentor: dr. Franc Čuš, višji znanst. sodelav., Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, e-mail: [franc.cus@kis.si](mailto:franc.cus@kis.si)

## THE INFLUENCE OF YEAST ASSIMILABLE NITROGEN AND THE RATIO OF YEAST SPECIES IN COMBINED STARTER CULTURE ON WINE QUALITY

**Abstract:** Spontaneous alcoholic fermentation (AF) of must is a complex microbiological process that involve various species of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Spontaneous AF begins with the genus of askomycetes yeasts *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* and *Metschnikowia*, which have weak fermentation ability and prevail on the surface of grape berries and cellar equipment. Towards the end of the AF, different *Saccharomyces* yeast strains become predominant, because they are resistant to higher ethanol content in wine. Non-*Saccharomyces* yeasts have a higher hydrolytic activity, which is important for the formation of aromatic compounds in wine. Increasing emphasis is attributed to spontaneous AF with naturally occurring yeast strains of the *Saccharomyces cerevisiae* species, as winemakers can produce more different wines and retain the distinctive characteristics of their wines in conjunction with the properties of the terroir. Naturally present yeast strains are characterized by better adaptation to chemical and microbiological characteristics of the must. The aim of this study is to isolate naturally occurring yeast isolates from different wine-growing regions and their use in inoculated AFs, thereby simulating spontaneous AF. We can achieve the integration of naturally occurring yeasts into the process of AF by selecting yeast species and strains in order to improve the sensory quality of the wine with rich aromatic potential and emphasizing the terroir. To continue, 27 spontaneous AFs were performed with the aim of isolating natural strains of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts from all three wine-growing regions of Slovenia. Spontaneous AFs were performed at room temperature and naturally occurring yeasts were isolated at different time periods of AF. We measured the chemical parameters (sugar, total acidity, YAN and pH value) in must using standard and enzymatic methods. The AFs were monitored by weighing the fermentors (curve of CO<sub>2</sub>) and plating of samples to different solid media, Yeast-Malt (YM) and Wallerstein laboratory nutrient agar (WL), with the purpose of quantification and separation between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. A commercial set of reagents was used for DNA isolation of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts and the D1 / D2 region of the ribosomal 26S DNA and internally transcribed region ITS1 and ITS2 and the 5.8S subunit of rDNA were multiplied by PCR reaction. After completion of PCR reaction, the amplification results were checked by agarose gel electrophoresis and the purified PCR amplifications were determined by nucleotide sequence in the commercial genomic center. In our samples, 65 types of yeasts were identified using molecular methods, of which 47 belong to species *Saccharomyces cerevisiae* and 18 to non-*Saccharomyces* yeasts species, namely the following species *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bacillaris* (syn. *Candida zemplinina*), *Pichia kudriavzevii*, *Starmerella* aff. *bombicola*, *Saturnispora diversa*, *Saturnispora silvae* and *Hanseniaspora guilliermondii*. A total of 47 *Saccharomyces cerevisiae* isolates were further evaluated on the basis of the variability of 11 microsatellite regions and multiplied by multiplex PCR reaction. The length and number of microsatellite regions were determined by capillary gel electrophoresis. We will continue our work with the implementation of further inoculated (coinoculation) AFs with various combinations of naturally occurring non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in real must with different amounts of nitrogen. By introducing the flow cytometry method, we will quantitatively monitor yeast populations between inoculated AFs. At the end we will quantitatively monitor the content of the basic chemical parameters of must and wine and measure the content of aromatic compounds in obtained wines (higher alcohols, esters, free monoterpenes alcohols and volatile thiols) using gas chromatography (GC-FID and GC-MS). To continue, a sensory analysis of the obtained wines with a statistical approach will follow. By isolating our own, for a specific region typical yeast isolates, we want to improve the efficiency of AF with a mixed naturally occurring yeasts, thus increasing the content of positive non-aromatic and aromatic compounds in the wine. The ultimate goal is to increase the visibility and improve the sensory quality of the wine from a particular wine-growing region.

**Key words:** yeast, non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces*, yeast assimilable nitrogen, wine, aroma