

Mikrobi in zdravje

Mikrobi in analitika

Mikrobi in protimikrobne učinkovine

Mikrobi in biotehnologija

Mikrobi in okolje

Mikrobi in molekularne interakcije

A vibrant, high-magnification microscopic image of a microbial community. The image shows a dense collection of various bacterial cells, including many small, spherical cocci and some larger, elongated rod-shaped bacteria. The cells are stained in a variety of colors, including bright red, orange, yellow, green, and blue, creating a complex and colorful pattern.

Knjiga povzetkov

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva

23.–25. september 2020

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva

23.-25. september 2020, Slovenija

Knjiga povzetkov

Urednici:

Urška Jamnikar Ciglencečki, Darja Kušar

Izdajatelj:

Slovensko mikrobiološko društvo, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

Leto izida:

2020

Naklada:

200 izvodov

Elektronska objava:

Spletna izdaja dosegljiva na www.smd.si

Fotografija na naslovnici:

Obarvana slika celice (modro), izolirane iz vzorca pacienta, ki je močno okužena z virusom SARS-CoV-2 (rdeče). Slika je bila posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom na NIAID Integrated Research Facility (IRF), Fort Detrick, Maryland. Avtor: NIAID

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

579(082)

SLOVENSKO mikrobiološko društvo. Kongres (8 ; 2020 ; online)

Knjiga povzetkov : 8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 23.-25. september 2020 : kongres SMD, 23.-25. 9. 2020 : virtualni kongres / [urednici Urška Jamnikar Ciglencečki, Darja Kušar]. - Ljubljana : Slovensko mikrobiološko društvo, 2020

ISBN 978-961-90346-8-2

1. Jamnikar Ciglencečki, Urška

COBISS.SI-ID 29246467



Knjiga povzetkov

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva

23.–25. september 2020

Kazalo vsebine

POZDRAVNI NAGOVOR	12
ORGANIZACIJA KONGRESA	13
SPONZORJI	14
PROGRAM KONGRESA	16
PLENARNA PREDAVANJA ZOISOVIH NAGRAJENK	19
NA ČRNEM LEDU GRENLANDIJE CVETIJO ALGE IN GLIVE Laura Perini, Polona Zalar, Cene Gostinčar, Rok Kostanjšek, Jens C. Frisvad, Christopher Williamson, Alexandre M. Anesio, Nina Gunde-Cimerman	20
SKRIVNOSTI PRIROJENEGA IMUNSKEGA ODGOVORA NA OKUŽBE Mojca Benčina	21
MEHANIZMI IN POSLEDICE SOCIALNIH INTERAKCIJ V BIOFILMU Ines Mandić-Mulec , Barbara Kraigher, Iztok Dogša, Polonca Štefanič, Tjaša Danevčič, Mihael Špacapan, Katarina Belcijan, Andi Erega, Eli Podnar, Katarina Šimunović, Maja Bolješič, Eva Kovačec, Mojca Kranjc, David Stopar, Sonja Smole Možina	22
VABLJENA "KORONA" PREDAVANJA	23
SARS-CoV-2 IN COVID-19 Mateja Logar	24
UGOTOVLJENE KORONAVIRUSNE OKUŽBE PRI ŽIVALIH V SLOVENIJI Ivan Toplak	25
OKUŽBE Z VIRUSOM SARS-CoV-2 – KAKO NAPREJ? Tjaša Žohar Čretnik	26

VABLJENA SEKCIJSKA PREDAVANJA

27

Mikrobi in zdravje

MIKROBIOLOGIJA IN 'ENO ZDRAVJE'
Maja Rupnik

29

Mikrobi in analitika

PORAJAJOČE SE ZOONOZE - VEČNI IZZIV
Tatjana Avšič-Županc

31

Mikrobi in protimikrobne učinkovine

ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM – STARI IN NOVI IZZIVI
Mateja Pirš

33

Mikrobi in biotehnologija

RAZVOJ IN PROIZVODNJA BIOLOŠKEGA MATERIALA ZA ZAČETEK KLINIČNE ŠTUDIJE
Frenk Smrekar, Barbara Hubad

35

Mikrobi in okolje

OD EPIDEMIOLOGIJE RASTLINSKIH VIRUSOV DO SARS-CoV-2
Maja Ravnikar, Denis Kutnjak, Katarina Bačnik, Nataša Mehle, Anja Pecman, Magda Tušek Žnidarič, Olivera Maksimović Carvalho Ferreira, Ion Gutierrez Aguirre

37

Mikrobi in molekularne interakcije

MALI PROTEINI KOT PIKA NA I ODZIVA SOS
Anja Pavlin, Nadine Fornelos, Nathanael Caveney, Gregor Bajc, Douglas F. Browning, Zdravko Podlessek, Miha Bahun, Margarita Salas, Natalie C. J. Strynadka, **Matej Butala**

39

IZBRANA SEKCIJSKA PREDAVANJA

41

Mikrobi in zdravje

PROPADANJE LESK V SLOVENIJI ZARADI OKUŽBE S '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA FRAGARIAE' IN Z IZOLATI SORODNIMI POVZROČITELJICI ZLATE TRSNE RUMENICE
Nataša Mehle, Nejc Jakoš, Mojca Rot, Miro Mešl, Jože Miklavc, Boštjan Matko, Alenka Ferlež Rus, Maja Ravnikar, Marina Dermastia

43

ADHEZIJA BAKTERIJ *CAMPYLOBACTER* NA ABIOTSKO TER BIOTSKO POVRŠINO IN VKLJUČENI MEHANIZMI
Anja Klančnik, Dina Ramič, Katarina Šimunovič, Jerica Sabotič, Maja Šikić Pogačar, Darinka Vučković, Maja Abram, Meta Sterniša, Magda Tušek Žnidarič, Sonja Šmole Možina

44

IZSLEDKI RAZISKAV NEMATICIDNIH BAKTERIJ VRSTE *BACILLUS FIRMUS* IN OZKO SORODNIH SEVOV *BACILLUS* SP. NA ZDRAVJE RASTLIN
Nik Susič, Saša Širca, **Barbara Gerič Stare**

45

Mikrobi in analitika

POTRDITEV UPORABNOSTI BIOMIMETIČNEGA *IN VITRO* MODELA PRAŠIČJEGA UROTELIJA ZA OCENITEV PATOGENOSTI SEVOV BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*
Luka Predojevič, Mateja Erdani Kreft, Darja Keše, Peter Veranič, Taja Železnik Ramuta, Darja Žgur Bertok, Marjanca Starčič Erjavec

47

Mikrobi in protimikrobne učinkovine

- PROTIMIKROBNI POTENCIAL HIDROLATA SMILJA *HELICHRYSUM ITALICUM* 49
Katja Bezek, Katja Kramberger, Darja Barlič Maganja

- ŠIROKOSPEKTRALNO PROTIMIKROBNO DELOVANJE HOMOGENATA HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE
 NA UROPATOGENE BAKTERIJE 50
Taja Železnik Ramuta, Tina Sket, Katja Seme, Marjanca Starčič Erjavec, Mateja Erdani Kreft

Mikrobi in biotehnologija

- DVIG DONOSA OKSITETRACIKLINA V BAKTERIJI *STREPTOMYCES RIMOSUS* S POVEČANJEM ŠTEVILA
 KOPIJ CELOTNE OTC GRUČE BIOSINTEZNIH GENOV 52
Špela Piki, Lucija Slemc, Martina Avbelj, Andrés Felipe Carrillo Rincón, Dušan Goranovič, Krešimir Gjuračić, Hilda Sucipto, Andriy Luzhetskyy, Hrvoje Petković, Vasilka Magdevska

- IZGUBA GENOV KOT EVOLUCIJSKA PREDNOST BIPOLARNO BRSTEČIH KVASOVK 53
Neža Čadež, Diego Libkind, Miha Tome

Mikrobi in okolje

- ŠTUDIJ VPLIVA BAKTERIJ NA RAST ŽELEZO OKSID HIDROKSIDNIH KAPNIKOV (FeOOH-POLIMORFI)
 Z UPORABO SEM-EDS IN ATR-FTIR SPEKTROSKOPIJE 55
Minka Kovač, Marjan Bele, Leon Korošec, Miha Kovač, Nataša Toplak, Simon Koren, Anja Veronovski, Mateja Kokalj, Barbara Jeršek, Miha Jeršek, Boris Orel, Anton Kovač

- KO SE TUDI BLIŽNJI SORODNIKI NE MARAJO – SORODSTVENA DISKRIMINACIJA PATOGENIH BAKTERIJ
CAMPYLOBACTER JEJUNI 56
Katarina Šimunović, Sonja Smole Možina, Ines Mandić Mulec

- DESETLETJE GENOMIKE GLIV IZ EKSTREMNIH OKOLIJ 57
Cene Gostinčar, Metka Lenassi, Janja Zajc, Martina Turk, Jerneja Zupančič, Ana Plemenitaš, Polona Zalar, Zewei Song, Nina Gunde-Cimerman

- ODZIV MIKROBNE ZDRUŽBE NA MNOŽIČNO POJAVLJANJE IN ODMIRANJE MEDUZ V MORJU 58
Tinkara Tinta, Zihao Zhao, Alvaro Escobar, Katja Klun, Barbara Bayer, Chie Amano, Gerhard J. Herndl

POSTRI 59**Mikrobi in zdravje**

- PROBIOTIKI ZA NADZOR KONTAMINACIJE REJ PERUTNINE S KAMPILOBAKTRI IN SALMONELAMI 61
Jana Avberšek, Darja Kušar, Maja Kavalič, Jasna Mičunović, Igor Gruntar, Bojan Papič, Olga Zorman Rojs, Tina Pirš, Matjaž Ocepek

- PREGLED *IN VITRO* ŠTUDIJ IN ŠTUDIJ, NAREJENIH NA ŽIVALIH, O UČINKOVITOSTI UPORABE
 PROBIOTIKOV KOT ANTAGONISTOV PROTI PATOGENOM KOŽNIH RAN 62
Sabina Fijan, Anita Frauwallner, Tomaž Langerholc, Bojan Krebs, Jessica A. ter Haar, Adolf Heschl, Dušanka Mičetić Turk, Irena Rogelj

- DEJAVNIKI VIRULENCE IN ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM PRI HUMANIH KLINIČNIH ENTEROKOKIH 63
Majda Golob, Urška Dermota, Helena Ribič, Jana Avberšek, Mateja Pate, Darja Kušar, Bojan Papič, Irena Zdovc

- VPLIV RAZNOLIKOSTI NABORA POVRŠINSKIH PROTEINOV NA SPOSOBNOST TVORJENJA BIOFILMOV
LISTERIA SPP. NA ABIOTSKIH POVRŠINAH 64
Nika Janež, Blaž Škrli, Jerica Sabotič

ZNAČILNOSTI KOLONIZACIJE ZDRAVE IN AKNASTE KOŽE Z BAKTERIJAMI <i>CUTIBACTERIUM ACNES</i> IN <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> TER NJIHOVIMI BAKTERIOFAGI Nika Janež, Maja Štokelj, Jasmina Tušar, Kristina Nemec, Silvija Špehar, Valerija Balkovec, Matjaž Peterka	65
ANALIZE GENOMSKIH ZAPOREDIJ ZA SLEDNJE PRENOSOV MEDICINSKO POMEMBNIH MIKROORGANIZMOV Sandra Janežič , Aleksander Mahnič, Alenka Štorman, Marija Trkov, Maja Rupnik	66
DETEKCIJA SARS-CoV-2 RNK V BOLNIŠNIČNIH ODPADNIH VODAH Tom Koritnik , José Gonçalves, Verica Mioč, Marija Trkov, Katarina Prosenc Triar, Metka Paragi, Bojana Beović	67
GENOTIPIZACIJA SEVOV VRSTE <i>ESCHERICHIA COLI</i> , IZOLIRANIH IZ KRAŠKIH VODONOSNIKOV Kaja Kotnik , Janez Mulec, Jerneja Ambrožič Avguštin	68
RAZNOLIKOST IZOLATOV <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> ZNOTRAJ ISTEGA ČEBELARSTVA Darja Kušar , Bojan Papič, Alenka Žugelj, Mira Jenko Rogelj, Urška Zajc, Jana Avberšek, Majda Golob, Maja Lepen, Metka Pislak Očepek, Matjaž Očepek, Irena Zdovc	69
RAZLIČNI TIPI DISBIOZE V ČREVESNI MIKROBIOTI Aleksander Mahnič , Maja Rupnik	70
ANALIZE ODPADNIH VODA ZA SPREMLJANJE EPIDEMIJE NOVEGA KORONAVIRUSA V SLOVENIJI Olivera Maksimović Carvalho Ferreira, Katarina Bačnik , Zala Kogej, Denis Kutnjak, Nataša Mehle, Mojca Milavec, Maja Ravnikar, Ion Gutiérrez-Aguirre	71
HIGIENSKO STANJE V IZBRANIH ENOTAH VRTCEV Maša Štraki , Urška Jamnikar-Ciglencečki, Stanka Vadjal, Majda Biasizzo, Urška Henigman, Mojca Jevšnik	72
POJAVLJANJE GLIVE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> SENSU LATO NA DREVESNIH VRSTAH V SLOVENIJI Rok Tomazin , Nika Božič, Tadeja Matos	73
UPORABA METODE SEKVENCIRANJA NASLEDNJE GENERACIJE V JAVNOZDRAVSTVENEM LABORATORIJU Marija Trkov , Tamara Kastrin, José Gonçalves, Tom Koritnik, Verica Mioč, Metka Paragi	74
RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA qPCR TESTOV ZA DOLOČANJE GLIVE <i>PHYLOSTICTA CITRICARPA</i> V VZORCIH ZRAKA IN DEŽJA Janja Zajc, Sara Fišer, Maja Ravnikar, Antonio Vincent, Neil Boonham, Polona Kogovšek	75
TIPIZACIJA IZOLATOV <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> Z METODO ERIC-PCR V SLOVENIJI Alenka Žugelj , Darja Kušar, Bojan Papič, Urška Zajc, Majda Golob, Olga Kosar, Jerica Vreček Šulgaj, Lucija Žvokelj, Maja Kavalič, Jana Avberšek, Metka Pislak Očepek, Irena Zdovc	76
ODZIV IMUNSKEGA SISTEMA NA IZBRANE SEVE BAKTERIJE <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN VPLIV NA CIRKADIANO URO Zala Žužek , Urša Kovač, Katka Pohar, Miha Moškon, Alojz Ihan, Damjana Rozman, Marjanca Starčič Erjavec	77
Mikrobi in analitika	
MEDNARODNA PRIMERJALNA ŠTUDIJA MOLEKULARNIH TESTOV ZA DOLOČANJE ZA RASTLINE PATOGENE BAKTERIJE <i>PANTOEAE STEWARTII</i> SUBSP. <i>STEWARTII</i> V SEMENU KORUZE Špela Alič , Manca Pirc, Tadeja Lukežič, Maja Ravnikar, Tanja Dreo	79
PRIMERJAVA DVEH METOD ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJE <i>ESCHERICHIA COLI</i> V VODI PODPEŠKEGA IN RAKIŠKEGA JEZERA IN DOKAZOVANJE NJENIH VIRULENTNIH SEVOV Maša Ceglar, Tatjana Rupel, Karmen Godič Torkar	80

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI NACIONALNIH REFERENČNIH LABORATORIJEV ZA MOLEKULARNO DOLOČANJE BAKTERIJE <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> V OKVIRU REFERENČNEGA LABORATORIJA EU ZA ŠKODLJIVE ORGANIZME RASTLIN NA BAKTERIJAH Tanja Dreo , Manca Pirc, Špela Alič	81
ŠTUDIJA RAZŠIRJENOSTI BAKTERIJE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>AESCULI</i> V DIVJIH KOSTANJH: ZNANOST IN PROJEKT ZA DRŽAVLJANE Tanja Dreo , Dušan Jurec, Peter Smolnikar, Boštjan Kukovec, Aleksander Benčič, Nataša Toplak, Simon Koren, Špela Alič, Barbara Piškur, Marina Dermastia	82
VZPOSTAVITEV POSTOPKA PRESKUŠANJA MEDICINSKIH MASK: UČINKOVITOST BAKTERIJSKE FILTRACIJE Katja Fric , Mojca Janc, Nika Savodnik, Tamara Košir, Arijana Filipič, Miha Zakotnik, Primož Hafner, Polona Kogovšek	83
KORELACIJA ANALITIČNIH METOD UPORABLJENIH NA PODROČJU GENSKE TERAPIJE Mojca Janc , Kaja Ževnik, Magda Tušek Žnidarič, Maja Šalekar, Nejc Košir, Rebecca Vollmeier, Tjaša Jakomin, Polona Kogovšek, Jana Žel, Maja Ravnikar, David Dobnik	84
PLAZMID pRK100: SEKVENCIRANJE, SESTAVA IN ANALIZA CELOTNEGA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA Karmen Jeseničnik , Andrej Kastrin, Tatyana Sysoeva, Lauren Elam, Tim Johnson, Marjanca Starčič Erjavec	85
PRIMERJAVA RAZLIČNIH KOMPLETOV ZA OSAMITEV NUKLEINSKIH KISLIN BAKTERIJE <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i> IZ MESA IN MESNIH PRIPRAVKOV Katarina Pavlin , Majda Biasizzo, Stanka Vadjal, Urška Henigman, Andrej Kirbiš, Urška Jamnikar-Ciglencečki	86
MEDLABORATORIJSKA PRIMERJAVA TESTOV ZA DIAGNOSTIKO VIRUSA PEGAVOSTI IN UVELOSTI PARADIŽNIKA Ana Vučurovič, Nejc Jakoš, Maja Ravnikar, Nataša Mehle	87
UPORABA VISOKOZMOGLJIVOSTNEGA SEKVENCIRANJA ZA ODKRIVANJE VIRUSOV, KI POVZROČAJO BOLEZEN PREJ NEZNANE ETIOLOGIJE NA <i>IRIS</i> SP. V SRBIJI Ana Vučurovič, Denis Kutnjak, Nataša Mehle, Zala Kogej , Ivana Stanković, Branka Krstić, Maja Ravnikar	88
INDUKCIJA EKSPRESIJE PROTEINOV Z METANOLOM IN pH PROFILIRANJE Z UPORABO APARATA BIOLECTOR® PRO Anna Korona , Roland Weis, Aid Atlic	89
Mikrobi in protimikrobne učinkovine	
DOLOČANJE REZISTOMA V VZORCIH IZMEČKOV IZ PLJUČ Z UPORABO VISOKOZMOGLJIVEGA SEKVENCIRANJA Aleksander Benčič , Nataša Toplak, Simon Koren, Viktorija Tomič, Dane Lužnik, Tanja Dreo	91
ODPORNOST OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ PROTI IZBRANIM ANTIBIOTIKOM IN ŠIBKIM ORGANSKIM KISLINAM Eva Cepec , Lora Klanfar, Jure Škraban, Janja Trček	92
IN VITRO RAZISKAVA ANTAGONISTIČNE UČINKOVITOSTI PROBIOTIKOV PROTI PATOGENIM SEVOM <i>ESCHERICHIA COLI</i> Sabina Fijan , Dunja Šulc, Andrej Steyer	93
PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SLOVENSKEGA MEDU RAZLIČNEGA POREKLA Mateja Kokalj , Nika Horvat, Tanita Kranjc, Tomaž Samec, Nataša Lilek, Andreja Kandolf Borovšak, Sonja Smole Možina	94
GENI ZA DEJAVNIKE VIRULENCE IN ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM UČINKOVINAM PRI SEVIH BAKTERIJE <i>ESCHERICHIA COLI</i> , IZOLIRANIH IZ MORSKE IN JEZERSKE KOPALNE VODE IN SEDIMENTOV Veronika Ana Kralj , Jerneja Ambrožič Avguštin	95

PROTI ANTIBIOTIKOM ODPORNI IZOLATI <i>ESCHERICHIA COLI</i> IZ PREHRNSKE VERIGE SO LAHKO ODPORNI TUDI PROTI RAZKUŽILOM IN TEŽKIM KOVINAM Manja Križman , Majda Golob, Irena Zdovc	96
PREVERJANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI SEVA ŽP NA PATOGENIH SEVIH Aleksander Lesar, Sara Petrin , Grégory Jubelin, Mateja Erdani Kreft, Marjanca Starčič Erjavec	97
VPLIV POSTOPKA PRIPRAVE ETERIČNEGA OLJA SIVKE (<i>LAVANDULA HYBRIDA</i>) NA BIOLOŠKO AKTIVNOST PROTI BAKTERIJI <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> Janja Ogrizek , Dina Ramič, Sonja Smole Možina	98
ODPORNOST BAKTERIJSKIH CELIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> NA SONOLIZO Žiga Pandur , Matevž Dular, David Stopar	99
MEHANIZEM DELOVANJA ETERIČNEGA OLJA SIVKE NA MUTANTO <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> 11168Δ <i>luxS</i> Dina Ramič , Anja Klančnik, Barbara Jeršek, Nataša Toplak, Minka Kovač, Urban Kunej, Sonja Smole Možina	100
HIGIENA POVRŠIN IN PRIPOMOČKOV ZA VEČKRATNO UPORABO V ZDRAVSTVENI USTANOV Urška Rozman , Darja Duh, Mojca Cimerman, Sonja Šostar Turk	101
OBČUTLJIVOST MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN BIFIDOBAKTERIJ IZ AGRO-ŽIVILSKÉ VERIGE ZA PROTIMIKROBNE SPOJINE Vita Rozman , Petra Mohar Lorbeg, Tomaž Accetto, Bojana Bogovič Matijašič	102
PROTIMIKROBNA IN CITOTOKSIČNA AKTIVNOST IZVLEČKOV GOB Meta Sterniša, Urša Pečar Fonovič, Tine Grebenc, Anja Klančnik, Jerica Sabotič	103
FILMOTVORNOST BAKTERIJE <i>PSEUDOMONAS FRAGI</i> NA JEKLENI POVRŠINI IN NJENO OBVLADOVANJE S POLIMERNO-MoO ₃ NANOKOMPOZITNO PREVLEKO Meta Sterniša, Urška Gradišar Centa, Maja Remškar, Sonja Smole Možina	104
FOTOAKUSTIČNO ODSTRANJEVANJE BIOFILMOV <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> IZ TITANOVH POVRŠIN Z LASERJEM Er:YAG S SUPER KRATKIMI PULZI Saša Terlep , Michaela Hympanova, Iztok Dogša, Franja Pajk, David Stopar	105
Mikrobi in biotehnologija	
BIOMETANSKI POTENCIAL KISLE SIROTKÉ IN MOŽNOSTI NJENE UPORABE V PROIZVODNJI BIOPLINA IZ ODPADNEGA BIOLOŠKEGA BLATA Lijana Faneli , Blaž Petek, Maruša Lah, Marjetka Levstek, Romana Marinšek Logar	107
OPIS NOVIH VRST OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ <i>KOMAGATAEIBACTER MELACETI</i> SP. IN <i>KOMAGATAEIBACTER MELOMENUSUS</i> SP., IZOLIRANIH IZ JABOLČNEGA KISA Leon Marič , Ilse Cleenwerck, Tomaž Accetto, Peter Vandamme, Janja Trček	108
PROIZVODNJA NIZINA V OSIROMAŠENI KISLI SIROTKI IN PRIMERJAVA DVEH METOD IZOLACIJE S HPLC Jernej Oberčkal , Diana Paveljšek, Neja Pristovšek, Marko Kete, Maja Zupančič Justin, Bojana Bogovič Matijašič	109
MIKROBNO RECIKLIRANJE ODPADNE OVČJE VOLNE Blaž Petek , Romana Marinšek Logar	110
KEMIJSKE IN MIKROBIOLOŠKE SPREMEMBE V POZABLJENI STEKLENICI VISKIJA Ajda Pristavec , Simon Koren, Barbara Jeršek, Anja Veronovski, Leon Korošec, Miha Kovač, Minka Kovač, Nataša Toplak	111

RAZNOLIKOST VODOTOPNIH ZUNAJCELIČNIH HETEROPOLISAHARIDOV OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN NJIHOVE VISKOELASTIČNE LASTNOSTI Tadeja Vajdič , Jure Škraban, Kim Fijok, Nina Jančič, Iztok Dogša, David Stopar, Janja Trček	112
Mikrobi in okolje	
DVA NOVA RODOVA BAZIDIOMICETNIH GLIV IZ SVALBARDSKIH IN GRENLANDSKIH LEDENIKOV: <i>CALLIZYMA</i> GEN. NOV. IN <i>PSYCHROMYCES</i> GEN. NOV. Kristina Andrejašič, Laura Perini, Nina Gunde-Cimerman, Cene Gostinčar, Polona Zalar	114
METAGENOMSKA ANALIZA VIRUSNE RAZNOLIKOSTI V VZORCIH JAMSKIH VODA Katarina Bačnik , Denis Kutnjak, Monika Novak Babič, Martina Turk, Rok Kostanjšek, Polona Zalar, Cene Gostinčar, Janez Mulec, Nina Gunde-Cimerman, Maja Ravnikar, Ion Gutierrez Aguirre	115
EVOLUCIJA SOCIALNIH INTERAKCIJ MED ROJI SEVOV <i>B. SUBTILIS</i> Katarina Belcijan , Polonca Štefanič, Ines Mandić Mulec	116
PRIMERJAVA FENOTIPSKIH LASTNOSTI SEVOV OPORTUNO PATOGENE GLIVE <i>AUREOBASIDIUM MELANOGENUM</i> IN SORODNIH VRST Anja Černoša , Cene Gostinčar, Nina Gunde-Cimerman	117
PROUČEVANJE RAZNOLIKOSTI IN ŽIVOSTI GLIVNE ZDRUŽBE NA SLIKAH NA PLATNU Mitja Gajšek, Martina Turk, Polona Zalar	118
GLOBALNA BIOTSKA RAZNOVRSTNOST TAL IN EKOSISTEMSKE STORITVE TAL - KAKO DOBRO JIH POZNAJAMO? Carlos A. Guerra, Anna Heintz-Buschart, Johannes Sikorski, Antonis Chatzinotas, Nathaly Guerrero-Ramírez, Simone Cesarz, Léa Beaumelle, Matthias C. Rillig, Fernando T. Maestre, Manuel Delgado-Baquerizo, François Buscot, Jörg Overmann, Guillaume Patoine, Helen R. P. Phillips, Marten Winter, Tesfaye Wubet, Kirsten Küsel, Richard D. Bardgett, Erin K. Cameron, Don Cowan, Tine Grebenc , César Marín, Alberto Orgiazzi, Brajesh K. Singh, Diana H. Wall, Nico Eisenhauer	119
NOV ROD ČREVESNIH BAKTERIOFAGOV IN NJIHOV MEHANIZEM ZAMENJAVE GOSTITELJA Stina Hedzet , Tomaž Accetto, Maja Rupnik	120
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IN GLIV IZ TRIGLAVSKEGA LEDENIKA IN LEDENIKA POD SKUTO Maša Jarčič , Polona Zalar, Nina Gunde-Cimerman	121
VISKOELASTIČNE LASTNOSTI NOVO NASTAJAJOČIH PELIKLOV BAKTERIJE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NA INTERFAZI TEKOČINA/ZRAK Mojca Krajnc , Polonca Štefanič, Ines Mandić-Mulec, David Stopar, Iztok Dogša	122
ČRNA ŽILAVKA KAPUSNIC (<i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PV. <i>CAMPESTRIS</i>) V SLOVENIJI: SPREMEMBA PATOGENA? Janja Lamovšek , Neja Marolt, Irena Mavrič Pleško	123
ANALIZA VODE ZA NAMAKANJE V PROIZVODNJI PARADIŽNIKA V SLOVENIJI IN SRBIJI Olivera Maksimović Carvalho Ferreira , Katarina Bačnik, Denis Kutnjak, Maja Ravnikar, Ion Gutierrez-Aguirre	124
MIKROBIOLOŠKA ZBIRKA Ex (IC MYCOSMO) Mojca Matul , Polona Zalar, Nina Gunde-Cimerman	125
VIRUSI VINSKE TRTE V SLOVENIJI – STARI IN NOVI ZNANCI Irena Mavrič Pleško , Ivan Žežlina, Mojca Viršček Marn	126
2020 – MEDNARODNO LETO ZDRAVJA RASTLIN Irena Mavrič Pleško , Janja Lamovšek, Primož Žigon, Zala Kogej, Nataša Mehle, Maja Ravnikar, Tanja Dreo, Mojca Viršček Marn	127

KARAKTERIZACIJA BAKTERIJ VRSTE <i>ESCHERICHIA COLI</i> , IZOLIRANIH IZ NETOPIRSKEGA GVANA IN POHODNIH POVRŠIN IZ KRAŠKIH JAM Ana Migliranza , Janez Mulec, Jerneja Ambrožič Avguštin	128
GLIVE V PESKU PLAŽ – DIVERZITETA IN POTENCIALNI VPLIV NA ZDRAVJE Monika Novak Babič , Nina Gunde-Cimerman, João Brandão	129
INTERAKCIJE MED BAKTERIJAMA <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SEROVAR TYPHIMURIUM IN <i>BACILLUS SUBTILIS</i> V BIOFILMU Eli Podnar , Andi Erega, Tjaša Danevčič, Bram Lories, Eva Kovačec, Hans Steenackers, Ines Mandić-Mulec	130
MIKROBNA ZDRUŽBA REKE KAMNIŠKE BISTRICE IN FREKVENCA KONJUGACIJSKEGA PRENOSA PLAZMIDA pKJK5 MED DVEMA SEVOMA BAKTERIJE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Urška Skamen , Nataša Mori, Tatjana Simčič, Marjanca Starčič Erjavec	131
TEMPERATURNI ODVISNOST TVORBE BIOFILMA IN POTENCIALA ZA KVAR ŽIVIL BAKTERIJ <i>PSEUDOMONAS</i> IZ RIB Meta Sterniša , Neža Čadež, Sonja Smole Možina	132
MIKROBIOM SEČOVELJSKIH SOLIN Ivana Strmečki, Martina Turk, Cene Gostinčar, Nina Gunde Cimerman, Polona Zalar	133
VPLIV PLAZME IN IZBRANIH EKOLOŠKIH PRIPRAVKOV NA MIKROBNO ZDRUŽBO KORUZNH SEMEN Valerija Tkalec , Aleksander Mahnič, Primož Titan, Peter Gselman, Nina Recek, Maja Rupnik	134
OSAMITEV IN IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZMOV S ČLOVEŠKE RIBICE (<i>PROTEUS ANGUINUS</i>) IZ NARAVE IN UJETNIŠTVA Polona Zalar, Martina Turk, Ana Gubenšek, Ivana Bokan, Cene Gostinčar, Rok Kostanjšek, Jani Mulec, Nina Gunde-Cimerman	135
Mikrobi in molekularne interakcije	
POVEZAVA MED TVORBO SURFAKTINA IN GENETSKO KOMPETENCO SPODBUJA HORIZONTALNI PRENOS GENOV PRI BAKTERJI <i>BACILLUS SUBTILIS</i> Tjaša Danevčič , Anna Dragoš, Mihael Špacapan, Polonca Štefanič, Iztok Dogša, Ákos T. Kovács, Ines Mandić-Mulec	137
MEDSEBOJNI VPLIVI NESOČASNIH VIRUSNIH OKUŽB V RASTLINAH Denis Kutnjak , Régis L. Corrêa, Paula Agudo, Francisca de la Iglesia, Santiago F. Elena	138
KAZALO AVTORJEV	141

Pozdravni nagovor

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

Tole leto 2020 je bilo prelomno v marsičem, tako tudi v tem, da smo prvič organizirali kongres Slovenskega mikrobiološkega društva kot virtualno konferenco in posledično tudi pripravili zbornik prispevkov kot e-zbornik. V njem je 97 prispevkov, ki zrcalijo novo pridobljene rezultate na področju mikrobiologije v Sloveniji v obdobju 2017-2020. Kot se boste lahko sami prepričali, je bilo to obdobje za slovensko mikrobiologijo zelo plodno in raznoliko.

V upanju, da bo vsak izmed vas v e-zborniku našel številne prispevke, ki ga bodo pritegnili, pa tudi navdihnili za nadaljnje delo, vam želim vse dobro za prihodnost in predvsem, da se bomo kmalu spet lahko srečali in družili na kongresu Slovenskega mikrobiološkega društva v resničnem svetu.

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

Organizacija kongresa

SLOVENSKO MIKROBIOLOŠKO DRUŠTVO

www.smd.si

VODJA PROGRAMSKO ORGANIZACIJSKEGA ODBORA

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

PROGRAMSKO ORGANIZACIJSKI ODBOR

doc. dr. Tomaž Accetto
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

doc. dr. Tjaša Cerar Kišek
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

doc. dr. Urška Jamnikar Ciglencečki
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

dr. Polona Kogovšek
Nacionalni inštitut za biologijo

znan. sod. dr. Darja Kušar
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

prof. dr. Darja Barlič Maganja
Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju

prof. dr. Hrvoje Petković
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

prof. dr. Janja Trček
Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko

Sponzorji

ZLATI



BRONASTI





JAVNO PODJETJE
CENTRALNA ČISTILNA NAPRAVA
DOMŽALE-KAMNIK d.o.o.



mediline



SAFIRNI



METTLER TOLEDO



JANTARNI



Program kongresa

Sreda, 23. september, 2020

08:45 - 09:00		Otvoritev kongresa in navodila	
09:00 - 09:35	PPr	Na črnem ledu Grenlandije cvetijo alge in glive	Nina Gunde-Cimerman
SEKCIJI: Mikrobi in zdravje/Mikrobi in analitika			
09:40 - 10:05	VPr	Mikrobiologija in 'Eno zdravje'	Maja Rupnik
10:10 - 10:35	VPr	Porajajoče se zoonoze – večni izziv	Tatjana Avšič-Županc
10:40 - 10:50		Naključni klepeti	
10:40 - 11:10		Odmor	
11:15 - 11:30	Pr	Propadanje lesk v Sloveniji zaradi okužbe s ' <i>Candidatus Phytoplasma fragariae</i> ' in z izolati sorodnimi povzročiteljici zlate trsne rumenice	Nataša Mehle
11:30 - 11:45	Pr	Adhezija bakterij <i>Campylobacter</i> na abiotsko ter biotsko površino in vključeni mehanizmi	Anja Klančnik
11:45 - 12:00	Pr	Izsledki raziskav nematocidnih bakterij vrste <i>Bacillus firmus</i> in ozko sorodnih sevov <i>Bacillus</i> sp. na zdravje rastlin	Barbara Gerič Stare
12:00 - 12:15	Pr	Potrditev uporabnosti biomimetičnega <i>in vitro</i> modela prašičjega urotelija za ocenitev patogenosti sevov bakterije <i>Escherichia coli</i>	Luka Predojevič
12:20 - 12:45	VPr	SARS-CoV-2 in covid-19	Mateja Logar
12:50 - 13:00		Odmor	
13:00 - 14:00		Postrske predstavitve	
14:00 - 15:00		Razstavljalci	

Četrtek, 24. september, 2020

08:45 - 09:00		Kratek pozdrav in navodila	
09:00 - 09:35	PPr	Skrivnosti prirojenega imunskega odgovora na okužbe	Mojca Benčina
SEKCIJI: Mikrobi in protimikrobne učinkovine/Mikrobi in biotehnologija			
09:40 - 10:05	VPr	Odpornost bakterij proti antibiotikom – stari in novi izzivi	Mateja Pirš
10:10 - 10:35	VPr	Razvoj in proizvodnja biološkega materiala za začetek klinične študije	Frenk Smrekar
10:40 - 10:50		Naključni klepeti	
10:40 - 11:10		Odmor	
11:15 - 11:30	Pr	Protimikrobni potencial hidrolata smilja <i>Helichrysum italicum</i>	Katja Bezek
11:30 - 11:45	Pr	Širokospektralno protimikrobno delovanje homogenata humane amnijske membrane na uropatogene bakterije	Železnik Ramuta Taja
11:45 - 12:00	Pr	Dvig donosa oksitettraciklina v bakteriji <i>Streptomyces rimosus</i> s povečanjem števila kopij celotne otc gruče biosinteznih genov	Špela Pikl
12:00 - 12:15	Pr	Izguba genov kot evolucijska prednost bipolarno brstečih kvasovk	Neža Čadež
12:20 - 12:45	VPr	Ugotovljene koronavirusne okužbe pri živalih v Sloveniji	Ivan Toplak
12:50 - 13:00		Odmor	
13:00 - 14:00		Postrske predstavitve	
14:00 - 15:00		Razstavljalci	

Petek, 25. september, 2020

08:45 - 09:00		Kratek pozdrav in navodila	
09:00 - 09:35	PPr	Mehanizmi in posledice socialnih interakcij v biofilmu	Ines Mandić Mulec
SEKCIJI: Mikrobi in okolje/Mikrobi in molekularne interakcije			
09:40 - 10:05	VPr	Od epidemiologije rastlinskih virusov do SARS-CoV-2	Maja Ravnikar
10:10 - 10:35	VPr	Mali proteini kot pika na i odziva SOS	Matej Butala
10:40 - 10:50		Naključni klepeti	
10:40 - 11:10		Odmor	
11:15 - 11:30	Pr	Študij vpliva bakterij na rast železo oksid hidroksidnih kapnikov (FeOOH-polimorfi) z uporabo SEM-EDS in ATR-FTIR spektroskopije	Minka Kovač
11:30 - 11:45	Pr	Ko se tudi bližnji sorodniki ne marajo – sorodstvena diskriminacija patogenih bakterij <i>Campylobacter jejuni</i>	Katarina Šimunovič
11:45 - 12:00	Pr	Desetletje genomike gliv iz ekstremnih okolij	Cene Gostinčar
12:00 - 12:15	Pr	Odziv mikrobne združbe na množično pojavljanje in odmiranje meduz v morju	Tinkara Tinta
12:20 - 12:45	VPr	Okužbe z virusom SARS-CoV-2 – kako naprej?	Tjaša Žohar Čretnik
12:50 - 13:00		Odmor	
13:00 - 14:00		Mikronostalgija	
14:00 - 15:00		Zaključek kongresa z razglasitvijo priznanj SMD	

Plenarna predavanja Zoisovih nagrajenk

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2020

Na črnem ledu Grenlandije cvetijo alge in glive

Laura Perini¹, Polona Zalar², Cene Gostinčar², Rok Kostanjšek², Jens C. Frisvad³, Christopher Williamson⁴, Alexandre M. Anesio¹, Nina Gunde-Cimerman²

¹ Department of Environmental Science, Aarhus University, 4000 Roskilde, Denmark

² Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

³ Dept. of Microbial Ecology and Chemistry, Fungal Chemodiversity, Technical University of Denmark, Søtofts Plads, Building 221, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark

⁴ Bristol Glaciology Centre, School of Geographical Sciences, University of Bristol, BS8 1SS, Bristol, UK

nina.gunde-cimerman@bf.uni-lj.si

Več kot tretjino Grenlandije pokriva temno obarvan led. Temna obarvanost zmanjšuje odboj sončne svetlobe oz. albedo in pospešuje taljenje ledu. Led je temno obarvan predvsem zaradi cvetenja ledeniških alg *Ancylonema nordenskiöldii* in *Mesotaenium berggrenii* (Zygnametophyceae, Chrolophyta), filogenetsko najbližjih sorodnic kopenskih rastlin. Trenutno o ledeniških algah vemo zelo malo, še manj pa o z njimi povezani mikrobnih združbi, npr. glivah, ki bi lahko pomembno vplivale na razgradnjo ali pa na zaščito in razširjanje ledeniških alg. V letih 2017 in 2018 smo prvi vzorčili glive grenlandskega črnega ledu, s pomočjo visokozmogljivega sekvenciranja analizirali njihovo raznolikost in z gojenjem pridobili preko 200 izolatov. Med njimi sta prevladovali dve za znanost novi vrsti, *Penicillium anthracinoglaciei* in *Articulospora* sp.. Vsako od obeh vrst smo pet mesecev gojili skupaj z grenlandskimi algami in med poskusom na različne načine preučevali morebitne interakcije med algami in glivami. Gliva *P. anthracinoglaciei*, ki je s celicami alg oblikovala tesne lihenoidne skupke, je bila sposobna razgrajevati črni fenolni pigment alg, purpurogalin karboksilno kislino-6-O-b-D-glukopiranozid (C₁₈H₁₈O₁₂), in uporabiti pripeti sladkor kot vir hranil. Gliva je tudi statistično značilno povečala maksimalno fotosintetsko kvantno učinkovitost alg in njihovo odpornost na stres ter preko sinteze različnih sekundarnih metabolitov pomembno vplivala na ostale, v skupkah prisotne mikroorganizme. V nasprotju s tem *Articulospora* sp. ni razgrajevala črnega barvila alg, temveč je oblikovala lišajem podobno omrežje hif, v katero so bile vključene celice alg. Te raziskave so pomembne ne le zaradi vse hitrejšega taljenja grenlandskega ledenega pokrova, pri katerem igra cvetenje črnih alg pomembno vlogo, temveč tudi v luči t.i. »bele teorije«, po kateri so glive in alge prve interakcije vzpostavile pred okrog 500 milijoni let, ko je bila Zemlja prekrita z ledom. Ledeniško ozmotsko aktivno okolje naj bi pri zoospornih glivah sprožilo evolucijski nastanek glivnih hif in omogočilo prehod gliv na kopno. Cvetenje temno obarvanih grenlandskih ledeniških alg tako poleg negativnih posledic na dviganje gladine morja predstavlja tudi obsežen naravni eksperiment, ki simulira evolucijska dogajanja iz daljne zemeljske preteklosti.

Ključne besede: črni grenlandski led; ledeniške alge; glive

Skrivnosti prirojenega imunskega odgovora na okužbe

Mojca Benčina

Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana

mojca.bencina@ki.si

Življenjsko okolje človeka naseljuje milijone mikroorganizmov, med katerimi so tudi nam nevarni virusi in bakterije. Človek je tekom evolucije razvil več mehanizmov zaščite pred patogeni. Poleg mehanske pregrade, kot sta koža in telesne tekočine, je za zaščito pred okužbami pomemben imunski sistem, ki se deli na prirojen in pridobljen imunski odgovor. Ob okužbi se najprej vzpostavi podedovan prirojen imunski odgovor, ki ga poznamo kot vnetje. Kot posledica aktivacije prirojene imunosti se aktivira pridobljena imunost, ki spodbudi nastanek obrambnih celic in protiteles proti mikroorganizmu, ki je okužbo povzročil. Pri ljudeh z imunskim sistemom v dobri kondiciji so okužbe s patogeni razmeroma redke.

Levkociti so glavni mediatorji prirojenega imunskega odgovora. Receptorji prirojene imunosti pri levkocitih prepoznajo molekule značilne za mikroorganizme. Vezava take molekule na receptor sproži aktivacijo vnetja, to privede do sproščanja vnetnih faktorjev, kar predstavlja signal za nevarnost in aktivacijo pridobljenega imunskega odgovora. Tollu podobni receptorji (TLR) so skupina membranskih receptorjev prirojene imunosti, ki zaznavajo molekule, kot so: nukleinske kisline, flagelin, ki je osnovni gradnik bakterijskih bičkov in ga zaznava receptor TLR5, receptor TLR4 zaznava lipopolisaharid, ki je značilen za Gram-negativne bakterije.

Večja skupina človeških receptorjev TLR prepoznava nukleinske kisline, ki pa niso prisotne samo pri virusih in bakterijah, temveč tudi v naših lastnih celicah. Za razliko od človeške enoverižne RNA, receptor TLR3 prepoznava samo dvoverižno RNA, ki nastaja v času razmnoževanja virusov. Receptor TLR9 prepoznava krajše fragmente enoverižne DNA, ki vsebujejo nemetilirano dinukleotidno zaporedje CpG. Taki fragmenti DNA nastanejo ob razgradnji bakterij, ki jih požrejo fagocitne celice. Za človeško DNA je značilno, da je citozin iz motiva CpG metiliran, kar prepreči aktivacijo imunskega odziva. Sintetična DNA, ki je sposobna aktivacije receptorja TLR9, se že uporablja kot registrirana sestavina zdravila v imunoterapiji raka in kot dodatek cepiv. V predavanju bomo razkrili, kako deluj aktivacija prirojenega imunskega odgovora preko receptorja TLR9 in kaj nam to znanje prinaša.

Mehanizmi in posledice socialnih interakcij v biofilmu

Ines Mandić-Mulec¹, Barbara Kraigher¹, Iztok Dogša¹, Polonca Štefanič¹, Tjaša Danevčič¹, Mihael Špacapan¹, Katarina Belcjan¹, Andi Erega¹, Eli Podnar¹, Katarina Šimunovič¹, Maja Bolješič¹, Eva Kovačec¹, Mojca Kranjc¹, David Stopar¹, Sonja Smole Možina²

¹ Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000, Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varstvo živil, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

ines.mandicmulec@bf.uni-lj.si

Mikroorganizmi živijo v večceličnih skupnostih kjer s kemičnim signaliziranjem, sorodstvenim prepoznavanjem, sodelovanjem in tekmovanjem krogijo svoje preživetje, prilagoditve, kolonizacijo površin in posledično sestavo mikrobnih združb. Fokus naših raziskav so sporogene in človeku koristne bakterije vrste *Bacillus subtilis* z zelo raznolikim socialnim življenjem, ki jih preučujemo v genetsko homogenih in heterogenih biofilmih in v interakcijah s patogenimi mikroorganizmi.

Primer sodelovanja bakterij je rojenje, ki je skupinsko in od surfaktantov odvisno gibanje po površini. Kako bakterije izbirajo s kom bodo sodelovale? Ugotovili smo, da so naravni sevi *B. subtilis* selektivni pri povezovanju v roje in se prostorsko združujejo le z genetsko visoko sorodnimi sevi, medtem ko manj sorodne izključijo iz roja. Ta sorodstvena diskriminacija, ki vključuje antagonizem med genetsko različnimi sevi, omeji potencial za izkoriščanje surfaktantov le na sorodnike in s tem stabilizira sodelovanje bakterij. Kako antagonizem vpliva na razporejanje celic v biofilmu ali na stiku dveh rojev? Ugotovili smo, da na stiku dveh genetsko različnih rojev aktivira gene za sprejem DNA in poveča horizontalni prenos genov med manj sorodnimi, kar bi lahko bilo pomembno za evolucijo vrste.

Naravna kompetenca za sprejema DNA iz okolja je regulirana tudi s signalnimi peptidi. Ti pri kritični koncentraciji aktivirajo poleg kompetence še razvoj spor, sintezo antibiotikov, surfaktantov in proteaz. Zanimivo je, da je sinteza signalnega peptida ComX uravnavana s koncentracijo kisika, kar omogoča učinkovito zaznavanje ekspanzije populacije in posledično učinkovito prilagajanje na manj ugodne razmere. ComX komunikacijski sistem vpliva tudi na interakcije z drugimi vrstami. Na primer, sevi *B. subtilis*, ki imajo okvarjeno medcelično signaliziranje, izgubijo sposobnost inhibicije rasti patogene bakterije *Campylobacter jejuni* v biofilmu.

Socialne interakcije mikroorganizmov vplivajo na prostorsko razporejanje, fiziološke lastnosti in preživetje mikrobnih celic v večceličnih skupnostih, kar so pomembni uvidi za razvoj probiotikov in biognojil ter za zagotavljanje varne hrane.

Ključne besede: socialne interakcije bakterij; biofilm; sorodstvena diskriminacija; zaznavanje kvoruma; antibiotiki; horizontalni prenos genov; sporulacija; *Bacillus subtilis*

Vabljena "korona" predavanja

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2020

SARS-CoV-2 in covid-19

Mateja Logar

Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja Ljubljana, UKC Ljubljana, Japljeva 2, 1525 Ljubljana; Katedra za infektivne bolezni in epidemiologijo, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

mateja.logar@kclj.si

V začetku decembra 2019 so se pričeli pojavljati prvi opisi hudih pljučnic, povzročenih z do sedaj neznanim povzročiteljem v kitajskem mestu Vuhan. 7. januarja 2020 so potrdili, da gre za novega povzročitelja, ki so ga najprej poimenovali novi koronavirus 2019 in ga kasneje preimenovali v SARS-CoV-2 (angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Virus spada v družino *Coronaviridae*, rod betakoronavirusi. Virus se prenaša pretežno kapljično, možno pa je tudi širjeno preko aerosola in posredno preko stika s kontaminiranimi površinami.

Bolezen covid-19 je posledica okužbe s SARS-CoV-2. Virus vstopa v celice preko ACE receptorjev, ki so pretežno na sluznicah v dihalnih poteh, najdemo pa jih tudi v drugih tkivih in organih. Inkubacija traja v povprečju nekaj več kot 5 dni. Najpogostejši klinični znaki okužbe so vročina, suh kašelj in občutek težkega dihanja. Najpogostejši zapleti so nastanek covid pljučnice, hipoksemija in sindrom akutne dihalne odpovedi pri odraslih. Prizadetost pljuč in hipoksemija se večinoma pojavita okrog 8. dneva bolezni.

Akutno okužbo potrdimo z dokazom genskega materiala virusa v brisu nosno-žrelnega prostora s pomočjo verižne reakcije s polimerazo. Serološke preiskave nam pri dokazu akutne okužbe niso v pomoč, saj se protitelesa pričnejo pojavljati šele med 7. do 10. dnevom bolezni.

Večino bolnikov zdravimo simptomatsko in podporno. Pri tistih s težjim potekom ali dejavniki tveganja za težji potek pa se odločamo tudi za specifično zdravljenje. Po trenutnih priporočilih za zdravljenje uporabljamo remdesivir, favipiravir in deksametazon.

Pri preprečevanju širjenja covid-19 moramo upoštevati vse ukrepe za preprečevanje kapljičnega načina širjenja okužbe ter pri posegih, kjer lahko nastaja aerosol tudi ukrepe za preprečevanje aerogenega prenosa.

Ključne besede: SARS-CoV-2; covid-19; klinična slika; preprečevanje; zdravljenje

Ugotovljene koronavirusne okužbe pri živalih v Sloveniji

Ivan Toplak

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Večina koronavirusov (CoV) je vrstno specifičnih in se ne prenaša na človeka, vseeno pa imajo posameznimi živalski CoV sposobnost okužbe človeka. Redki so sevi živalskih CoV, ki povzročajo hude okužbe ljudi in se nato hitro širijo v populaciji, kot so primeri okužb s SARS, MERS in še posebej okužbe z novim SARS CoV-2. Ta pri človeku v večini primerov povzroči klinično nezaznavno obliko okužbe, pri določenih rizičnih skupinah ljudi pa od blažje do hude oblike bolezni dihal, poimenovane COVID-19. V času zadnje pandemije so naravni prenos SARS CoV-2 iz okuženega človeka zabeležili tudi že na nekaj dovzetnih vrst živali.

CoV so uvrščeni v veliko družino *Coronaviridae* in številni so endemično razširjeni pri domačih in prostoživečih vrstah živali, kjer povzročajo od blagih do hujših oblik obolenja dihal ali prebavil. CoV okužujejo vrste živali, ki lahko živijo zelo blizu človeka, ali jih človek različno uporablja za svoje potrebe, kot so govedo, konji, prašiči, mačke, psi, dihurji, perutnina, kamele, netopirji. Od leta 2009 naprej smo pri več živalskih vrstah v Sloveniji opravili dokazovanje in genetsko analizo nukleotidnega zaporedja CoV v delu, ki kodira zelo ohranjen del virusnega genoma za RNA polimerazo ali ugotovljenim sevom določili zaporedje celotnega genoma. V Sloveniji smo leta 2009 prvič ugotovili SARS-u podobne koronavirus, v 38,8% vzorcih fecesa vrste netopirja mali podkovnjak (*Rhinolophus hipposideros*), ki so imeli med seboj od 99,5 do 100% identičnost nukleotidnega zaporedja in so uvrščeni v isto skupino *betacoronavirusov* kot SARS. Prve primere poginov in klinične driske pri pujskih, povzročene z virusom prašičje epidemične diareje (PEDV), smo odkrili na večji farmi v decembru 2014. Z metodo RT-PCR v realnem času in sekvenciranjem smo v nadaljevanju isti virus potrdili še v številnih rejah prašičev na območju cele Slovenije. Določitev in filogenetska primerjava celotnega genoma slovenskega seva PEDV (SLO/JH-11/2015, KU297956) s sevi v genski banki je pokazala zelo veliko sorodnost s sevi iz Francije, Nemčije in Belgije ter s sevom OH851, prototipa SINDEL, prvič izoliranim v letu 2014 v ZDA. Pri 133 pregledanih govedih s pljučnico, ugotovljenih med leti 2014 in 2016, smo pri 12,03% pregledanih vzorcih nosnih brisov dokazali goveji koronavirus (BCoV), ki povzroča obolenja dihal in tudi pogine govedi. Genetska primerjava ugotovljenih slovenskih sevov govejih BCoV in človeških HCoV-OC43 je pokazala, da imajo med seboj 96,4%-97,1% identičnost nukleotidnega in 96,9%-98,5% identičnost aminokislinskega zaporedja. CoV okužbe živali niso pomembne samo zaradi ekonomskih škod, ki jih povzročajo rejcem živali, ampak jih moramo imeti pod nadzorom tudi zaradi vnosa novih CoV in spremljanja epizootiološkega stanja v državi.

Ključne besede: koronavirus; živali; okužba; dokazovanje; tipizacija; prenos

Okužbe z virusom SARS-CoV-2 – kako naprej?

Tjaša Žohar Čretnik

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

tjasa.zohar.cretnik@nlzoh.si

Od objave prvega primera atipične pljučnice neznane etiologije 30. decembra 2019 in objave odkritja koronavirusa SARS-CoV-2 7. januarja 2020, se je bolezen COVID-19 razširila po vsem svetu. Soočamo se s pandemijo, kakršne nismo doživeli od pandemije španske gripe pred stotimi leti. Na dan 4. avgusta 2020 Svetovna zdravstvena organizacija poroča o več kot 18 milijonih okuženih oseb v 216 državah in 691.013 smrtih.

Koronavirusi so kot povzročitelji okužb pri živalih prisotni že dobrih 1000 let in so znani po tem, da lahko okužijo širok nabor gostiteljev, se mutacije v njihovem genomu relativno hitro kopičijo, spreminjajo tropizem, prehajajo med gostitelji in se prilagajajo novim okoliščinam. Zadnji med sedmimi znanimi humanimi koronavirusi pa je pridobil še dodatne lastnosti, ki so mu omogočile hitro širjenje in visoko stopnjo obolevnosti.

V laboratorijih Centra za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano, smo s testiranjem na prisotnost nukleinskih kislin virusa SARS-CoV-2 pričeli že 27. januarja 2020 in do konca julija opravili več kot 60.000 testiranj, kar predstavlja do polovice vseh opravljenih testov. Uspešno smo obvladovali naraščajoče potrebe po testiranju, spremembe v organizaciji dela, pomanjkanje reagentov, aparaturne in drobnega laboratorijskega materiala. Velika zahvala gre vsem sodelavcem, ki v svoje delo vlagajo vse svoje moči in znanje, pa tudi dobaviteljem in vsem, ki so nam v teh časih ponudili in nudili pomoč.

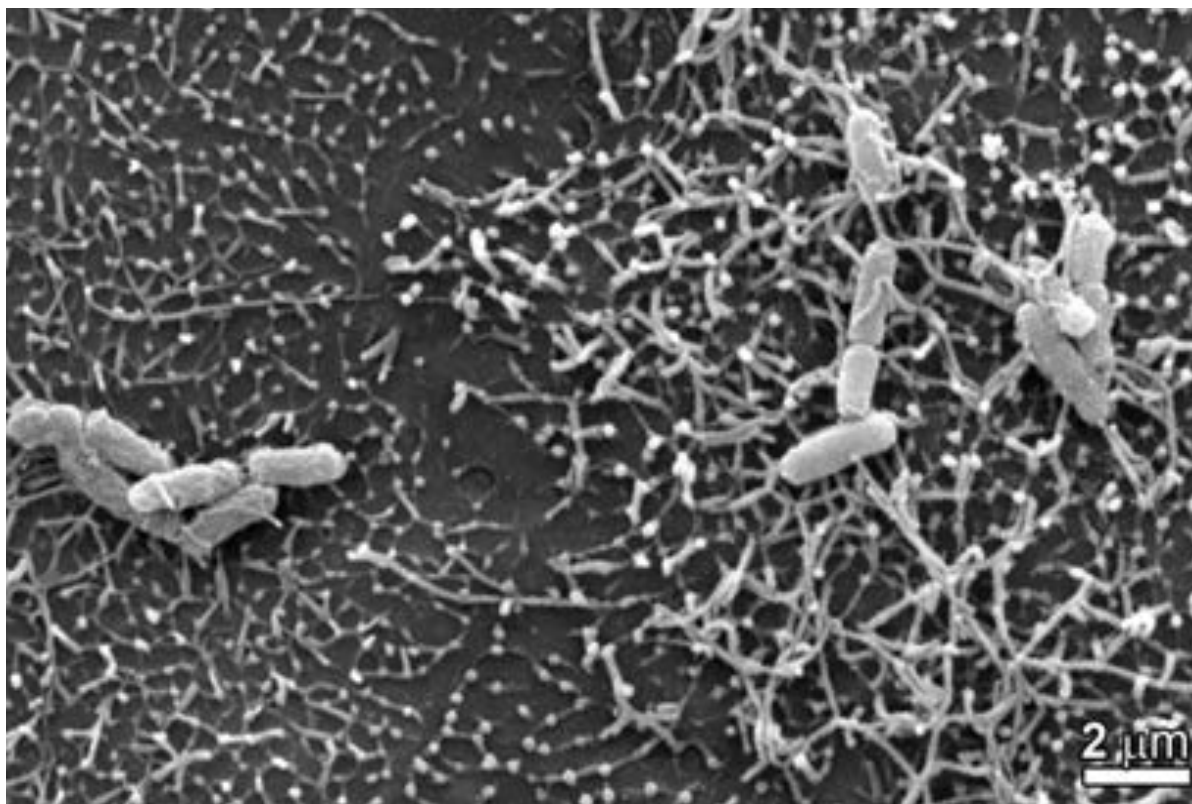
Kljub temu, da nam je znanost, hitreje kot kadarkoli, priskrbela številne kritične informacije, pa bodo o nadaljnjem poteku pandemije in njenih posledicah odločali odgovori na vprašanja kot so: ali smo sposobni razviti učinkovito cepivo, ali in v kolikšni meri smo sposobni ljudi pridobiti za izvajanje preventivnih ukrepov, ali se bo virus v bodoče pojavljal endemsko, kako bomo uravnotežili izvajanje ukrepov in gospodarsko škodo, ki zaradi njih nastaja, in kako bomo kot družba uporabili nauke, ki nam jih daje pandemija.

Ključne besede: SARS-CoV-2; pandemija; ukrepi

Vabljeni sekcijška predavanja

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2020

Mikrobi in zdravje



Bakterije uropatogenega seva J96 na površini celične kulture prašičjega urotelija (zgoraj, vrstična elektronska mikroskopija) in v citoplazmi propadajoče urotelijske celice (spodaj, presečna elektronska mikroskopija). Sliki sta nastali na Inštitutu za biologijo celice, UL MF (Luka Predojevič, Taja Železnik Ramuta, Peter Veranič, Marjanca Starčič Erjavec, Mateja Erdani Kreft).

Mikrobiologija in 'Eno zdravje'

Maja Rupnik^{1,2}

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

² Medicinska fakulteta Maribor, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

maja.rupnik@nlzoh.si

Eno zdravje (ang. One Health) je pojem, ki se je pričel uporabljati v zadnjem desetletju. Opisuje pristop, pri katerem smo sprva upoštevali, da je za optimalno zdravje človeka pomembno tudi zdravje živali in okolja. Kasneje se je v konceptu Eno zdravje pričelo pojavljati tudi zdravje rastlin. Čeprav se je paradigma Eno zdravje oblikovala najprej predvsem kot odgovor na naraščanje zdravstvenih problemov povezanih z nalezljivimi boleznimi, se mikroorganizmi oz. mikrobiote šele sedaj vključujejo kot pomemben del Enega zdravja.

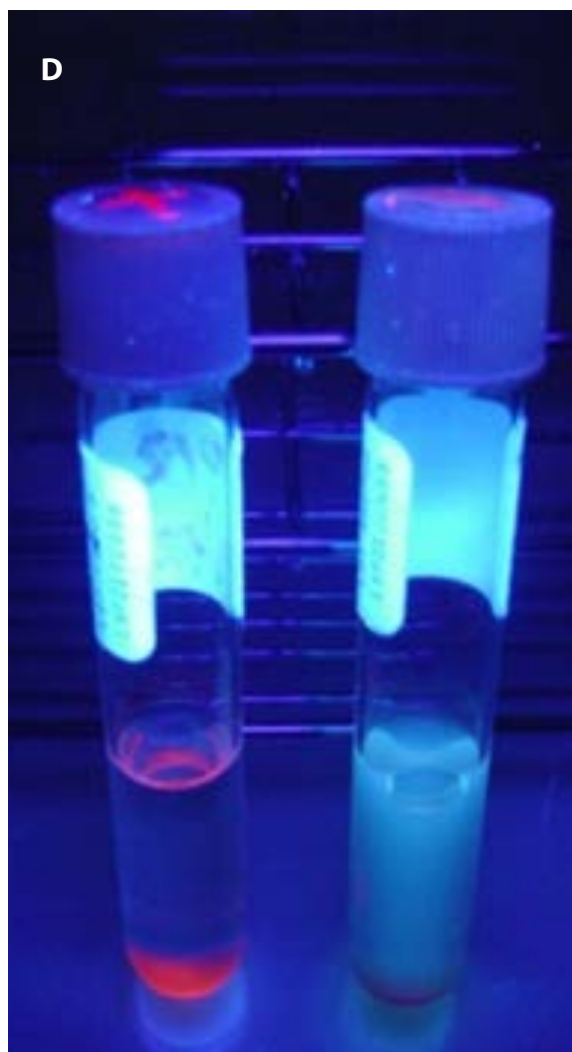
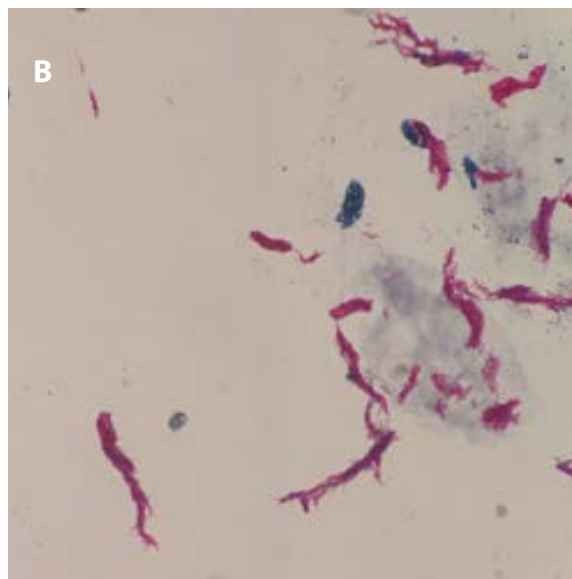
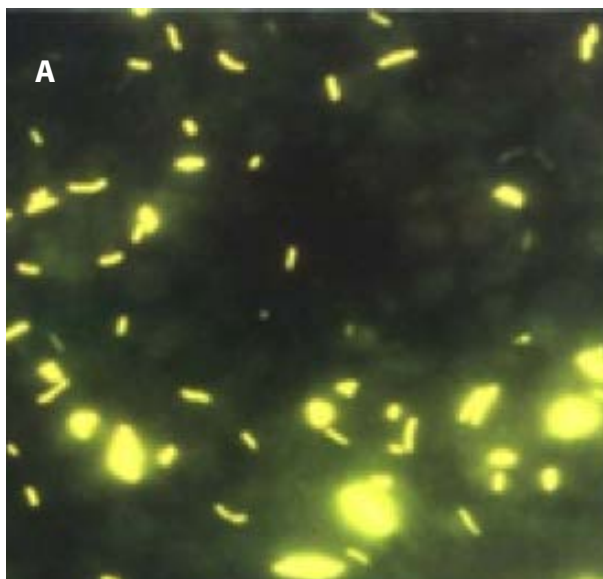
Koncept Eno zdravje uporablja pristope, ki so interdisciplinarni in medsektorski. To pomeni predvsem dvoje: potrebujemo interdisciplinarna znanja in sodelovanje; ne le med znanstvenimi disciplinami, temveč tudi horizontalno in vertikalno znotraj upravnih in odločevalskih struktur. Akademsko skupnost, inštitucije in države so se na razvoj področja Eno zdravje odzvali z oblikovanjem posebnih medresorskih skupin, nacionalnih in mednarodnih iniciativ, z oblikovanjem študijskih programov, specializiranih znanstvenih srečanj in specializiranih revij.

Tipični primeri s področja Enega zdravja so raziskave zoonoz, porajajočih se bolezni in protimikrobne odpornosti. V idealnem primeru te raziskave razen mikrobioloških komponent vključujejo tudi klinične, veterinarske, javnozdravstvene, prehransko-agronomske, okoljske, sociološke, ekonomske in politične vidike.

Čeprav so patogeni mikroorganizmi motivirali nastanek Enega zdravja, bodo koristni mikroorganizmi tisti, ki bodo postali najpomembnejša povezovalna komponenta med človekom, živalmi, rastlinami in okoljem: Eno zdravje – Ena mikrobiota.

Ključne besede: protimikrobna odpornost; porajajoče bolezni; zoonoze

Mikrobi in analitika



Bacili tuberkuloze pod fluorescentnim mikroskopom, povečava $1000\times$ (a) in obarvani po Ziehl-Neelsenu pod svetlobnim mikroskopom, povečava $1000\times$ (b). Kolonija bacilov *Mycobacterium tuberculosis* spominja na krušno drobtino (c). Mikobakterije v tekočih gojiščih z detektorjem rasti, ki fluorescira pod UV lučjo ob zmanjšani koncentraciji kisika (d). Slike so nastale na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik (Manca Žolnir-Dovč – slike (a),(c) in (d), Eva Sodja – slika (b)).

Porajajoče se zoonoze - večni izziv

Tatjana Avšič-Županc

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

Zoonoze so nalezljive bolezni, ki se prenašajo iz okuženih ali bolnih živali na ljudi. Zoonoze (po)ostajajo nenehno rastoča grožnja, nerešena uganka, ki predstavlja senčnik pod katerim se skrivajo številne nalezljive bolezni. Pojavnost in epidemiologija zoonoz je kompleksna in aktivna, saj je odvisna od raznolikih dejavnikov, ki jih lahko opredelimo kot antropogeni, podnebno-okolijski in dejavniki povezani z lastnostmi mikroorganizmov. V zadnjih desetletjih se soočamo s povečano globalizacijo ljudi, živali in njihovih produktov. Tovrstni premiki omogočajo izredno hitro širjenje infekcij, kar zahteva najstrožje mere kontrole in nadzora. Človek nenehno posega v naravne habitate, najpogosteje s povečevanjem populacije ali turizma. Da bi nahranili vedno bolj rastočo populacijo ljudi imamo zvečano potrebo po pridelavi hrane. To pogosto vodi v temeljite spremembe v kmetijskih postopkih, ki nemalokrat vključujejo ogromne količine živali ali celo različne vrste živali, ki sobivajo na istem, omejenem prostoru, pogostokrat skupaj z ljudmi. Takšen način življenja omogoča mikroorganizmom preskok iz ene živalske vrste na drugo in nenazadnje na človeka. Izjemno pomemben dejavnik so podnebne spremembe, saj dovoljujejo širitev ugodnih življenjskih pogojev nekaterim prenašalcem kakor tudi naravnim rezervoarjem zoonotičnih mikroorganizmov. Eden vidnejših primerov je vnos, ohranitev in obsežna razširitev invazivne tropske vrste komarja *Aedes albopictus* (tigrasti komar) v zadnjih dveh desetletjih v Italiji, od koder se je znatno razširil v sosednje države, vključno s Slovenijo. Pogoste mutacije in genetske rekombinacije mnogokrat vodijo v take oblike patogenih mikroorganizmov, ki imajo spremenjeno, najpogosteje povečano raven sposobnosti ohranitve in širjenja v naravnem okolju. Spremembe v ekologiji in pestrosti patogenih mikroorganizmov nedvoumno vodijo v nastanek novih genetskih različic, ki imajo spremenjen patogenetski potencial. Le-ta se kaže v povečani invazivnosti, zmožnosti hitrega širjenja v ogroženi populaciji, izdelovanju toksinov in pridobivanju protimikrobne odpornosti. Z neprestanimi spremembami v demografiji ljudi in živali, ter s spremembami v okolju in povzročiteljih lahko pričakujemo vedno nove in ponovno pojavne, znane zoonoze.

Mikrobi in protimikrobne učinkovine



Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin z E-testom (zgoraj). Difuzijski antibiogrami za bakterije, izolirane iz prebavnega trakta kopenskega raka enakonožca. Sliki sta nastali na Oddelku za biologijo BF UL (Jerneja Ambrožič Avguštin, Brigita Nograšek).

Odpornost bakterij proti antibiotikom – stari in novi izzivi

Mateja Pirš

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

mateja.pirs@mf.uni-lj.si

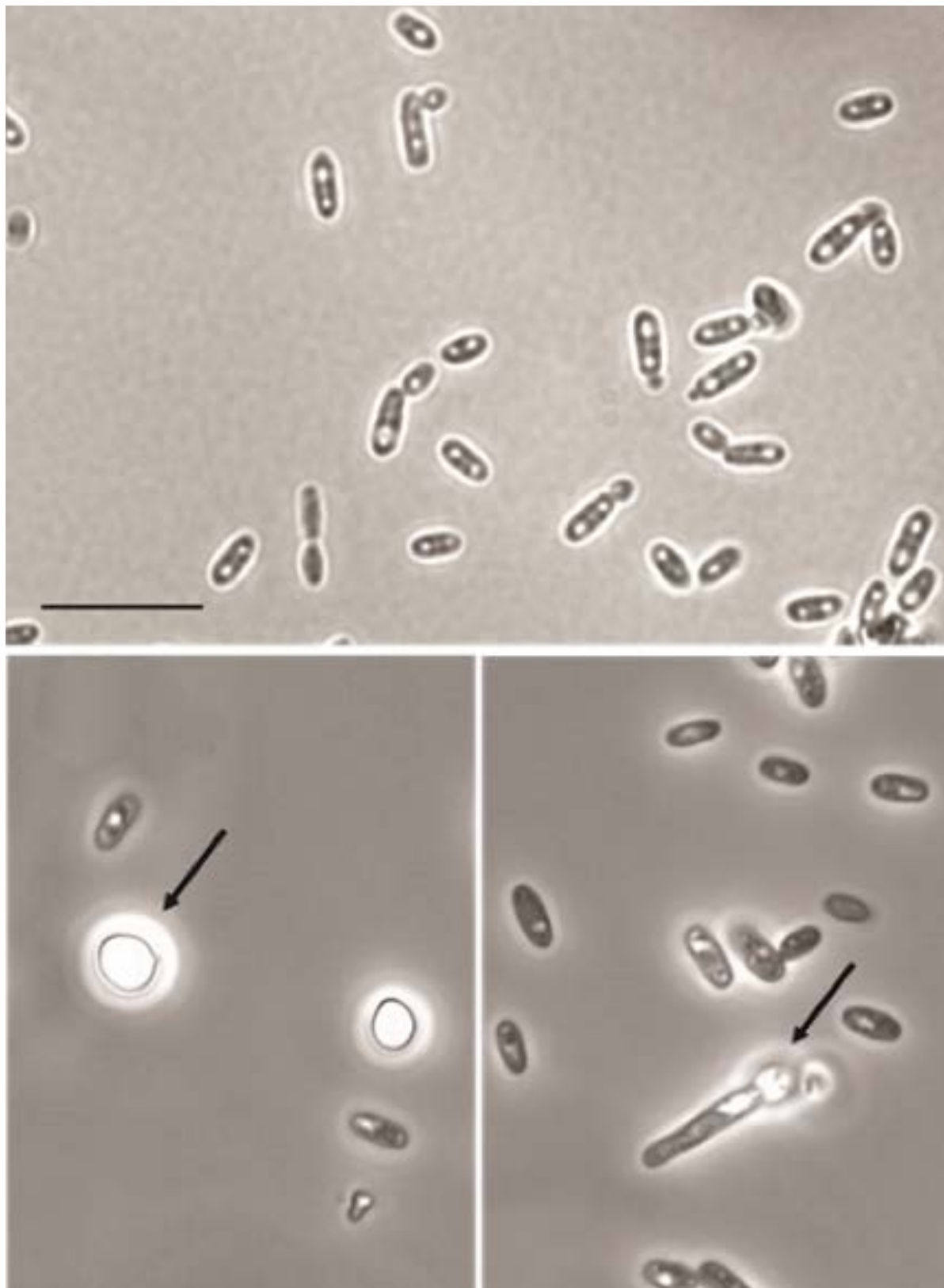
Odpornost številnih klinično pomembnih bakterijskih vrst proti antibiotikom narašča po vsem svetu in je eden izmed pomembnih javnozdravstvenih problemov. Svetovna zdravstvena organizacija med kritično pomembne antibiotike (*angl.* critically important antimicrobials, CIA) z najvišjo prioriteto uvršča cefalosporine 3. do 5. generacije, glikopeptide, makrolide, polimiksine in kinolone, med CIA z visoko prioriteto pa med drugimi uvršča karbapeneme, aminoglikozide, protipseudomonasne peniciline ter peniciline v kombinaciji z zaviralci betalaktamaz.

S problematiko odpornih bakterij se srečujemo tako v zunajbolnišničnem kot tudi v bolnišničnem okolju. Posebej pomembne so t.i. večkratno odporne bakterije (VOB), to so bakterije, ki so odporne proti trem ali več različnim skupinam antibiotikov. Okužbe z VOB so lahko vzrok za zapoznelo uvedbo ustreznega antibiotičnega zdravljenja, dolgotrajnejšo hospitalizacijo, večjo smrtnost in večje stroške zdravljenja. Težave povzročajo predvsem uspešni kloni VOB z visokim tveganjem za širjenje, ki so odporni proti ključnim klinično pomembnim antibiotikom, se učinkovito prenašajo med bolniki, povzročajo dolgotrajno kolonizacijo oziroma hude in/ali invazivne okužbe. Vnos novih klonov VOB z novimi rezistentnimi ali virulentnimi determinantami v bolnišnico lahko vodi v bolnišnične izbruhe, vnos v domače okolje pa prispeva k širjenju bakterij VOB v zunajbolnišničnem okolju.

Med najbolj problematičnimi VOB, predvsem v bolnišničnem okolju, so gramnegativne bakterije kot sta *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae*, ki izločata encime ESBL, v zadnjem desetletju tudi karbapenemaze. Med pomembnimi bolnišničnimi VOB so tudi neferementativni gramnegativni bacilli, kot sta *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii*, odporna proti večini betalaktamskih antibiotikov, med grampozitivnimi bakterijami pa proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* in proti glikopeptidom odporen *Enterococcus faecium*. S problemom odpornosti proti antibiotikom se srečujemo tudi v zunajbolnišničnem okolju; med pomembnejšimi patogeni je *E. coli*, ki izloča encime ESBL, pomembni pa so tudi npr. salmonеле, kampilobaktri in gonokoki.

Spremljanje pojavljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom je ena od ključnih aktivnosti za pripravo priporočil za izkustveno zdravljenje in sprotno prilagajanje trenutni situaciji. Omogoča pripravo ustreznih strategij za upočasnitev naraščanja odpornosti bakterij proti antibiotikom, pomaga pri razvoju novih protimikrobnih učinkovin in odkrivanju novih inovativnih načinov boja proti bakterijam. Ključnega pomena je, da se sočasno trudimo upočasniti nadaljnji razvoj in širjenje odpornosti proti obstoječim antibiotikom z racionalno rabo antibiotikov v humani medicini, ter preprečiti širjenje odpornih sevov med bolniki z ukrepi bolnišnične higiene. Za ohranjanje učinkovitosti obstoječih antibiotikov in preprečevanje širjenja odpornih sevov pa je ključno, da strategije niso omejene le na humano medicino, temveč da k reševanju problematike pristopimo celostno v okviru Enega zdravja (*angl.* One health).

Mikrobi in biotehnologija



Novo opisana vrsta kvasovk izolirana iz grozdja *Starmerella vitis* sp. nov. (zgoraj, vegetativne celice zrasle na gojišču bogatem z enostavnimi sladkorji). Na gojiščih s kompleksnimi viri ogljika tvori z lipidi bogate strukture, klamidospore (spodaj, klamidospore, označene s puščico, nastale na gojišču bogatem s krompirjevim škrobom). Povečava, 1000x; dolžina merila, 10 μm . Slike so nastale na Oddelku za živilstvo, BF UL (Neža Čadež).

Razvoj in proizvodnja biološkega materiala za začetek klinične študije

Frenk Smrekar, Barbara Hubad

JAFRAL, Stegne 13A, 1000 Ljubljana

frenk.smrekar@jafral.com

V zadnjih letih se povečuje število kliničnih testiranj, kjer se preverja varnost in učinkovitost različnih bioloških zdravil. JAFRAL se ukvarja z razvojem proizvodnih procesov in proizvodnjo bioloških zdravil za začetne faze kliničnih testiranj, ki temeljijo na osnovi virusov, pDNA ali rekombinantnih proteinov.

Pri razvoju biološkega zdravila v začetnih predkliničnih in začetnih kliničnih fazah je pomembno osnovno poznavanje bioloških lastnosti zdravilne učinkovitosti. Pri tem je nujno potrebno za dobro sledljivost podatkov dobro dokumentirati vso raziskovalno-razvojno znanje.

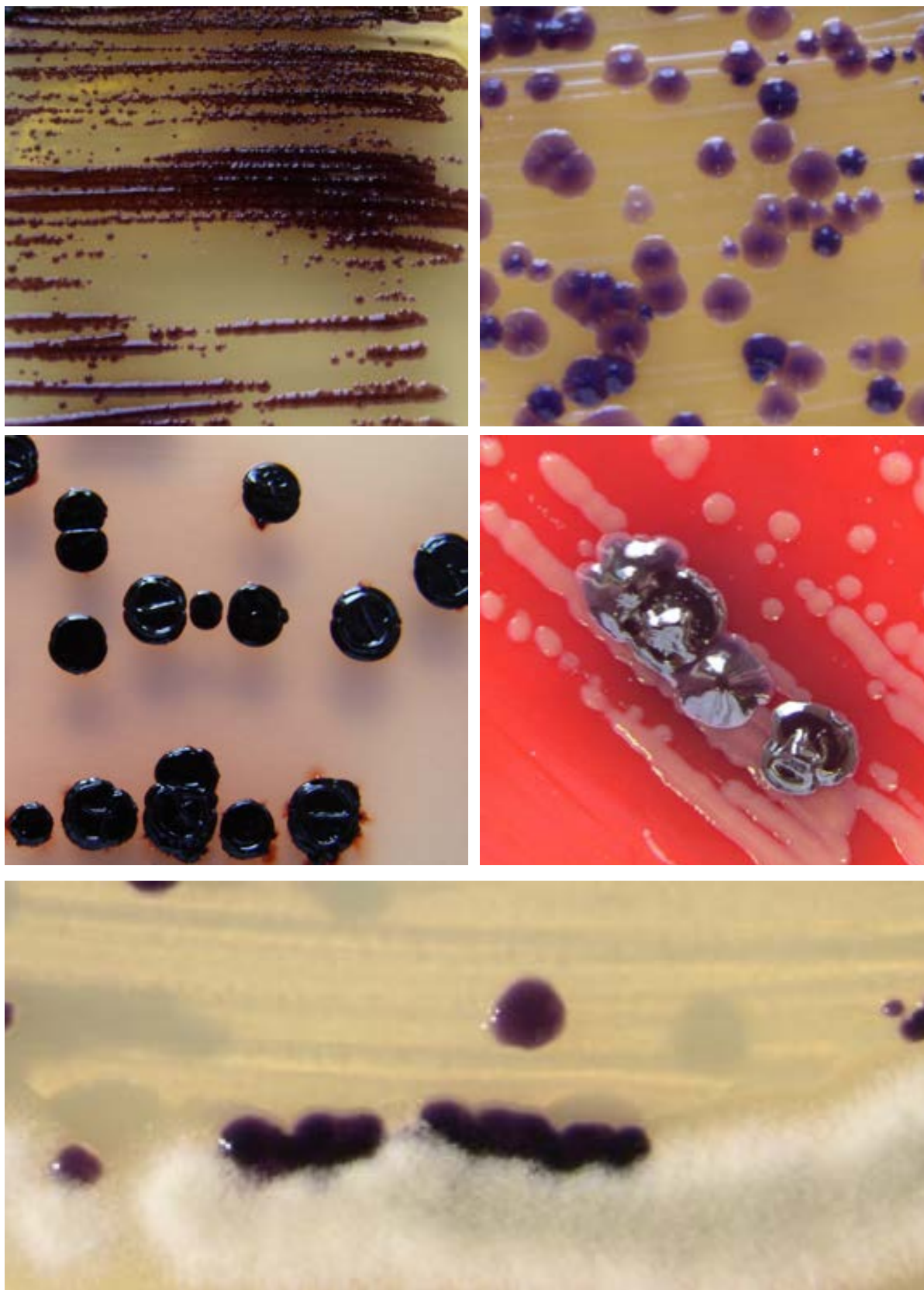
Iz proizvodnega stališča je najprej potrebno razumeti zahteve za končno kakovost produkta, da so v skladu z GMP in ICH smernicami. Nadalje je potrebno razviti proces, ki bo omogočal proizvodnjo takega produkta, ga bo seveda istočasno mogoče tudi izvesti v industrijskem merilu, bo robusten in bo vključeval surovine, ki so varne za uporabo.

Tako razviti proces je potrebno nato izvesti v čistih prostorih z vso potrebno GMP dokumentacijo, ki je kasneje tudi predmet pregleda regulatornih institucij.

Kratek opis razvoja in proizvodnje biološkega materiala bo predstavljen na dveh primerih bioloških molekul: zdravilo na osnovi bakteriofagov ter plazmidna DNA.

Ključne besede: biološka zdravila; GMP proizvodnja; bakteriofagi; pDNA

Mikrobi in okolje



Različni fenotipi arktičnega izolata bakterije *Janthinobacterium swalbardensis* (zgoraj in v sredini). Bakterija *Janthinobacterium swalbardensis* v družbi z glivo (spodaj). Slike so nastale na Oddelku za biologijo BF UL (Jerneja Ambrožič Avguštin).

Od epidemiologije rastlinskih virusov do SARS-CoV-2

Maja Ravnikar^{1,2}, Denis Kutnjak¹, Katarina Bačnik^{1,3}, Nataša Mehle¹, Anja Pecman^{1,3}, Magda Tušek Žnidarič¹, Olivera Maksimović Carvalho Ferreira^{1,3}, Ion Gutierrez Aguirre¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana;

² Univerza Nova gorica, Vipavska 13, 5000 Nova gorica

³ Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Jamova cesta 39, Ljubljana, Slovenija

maja.ravnikar@nib.si

Virusi so najštevilčnejši mikrobi na zemlji in bivajo v tako rekoč vseh tipih organizmov. Za prenos med gostitelji uporabljajo različne prenašalce ali pa se prenašajo s kontaktom. Za nekatere vemo, da se prenašajo preko aerosolov ali dosežejo svojega gostitelja preko vode.

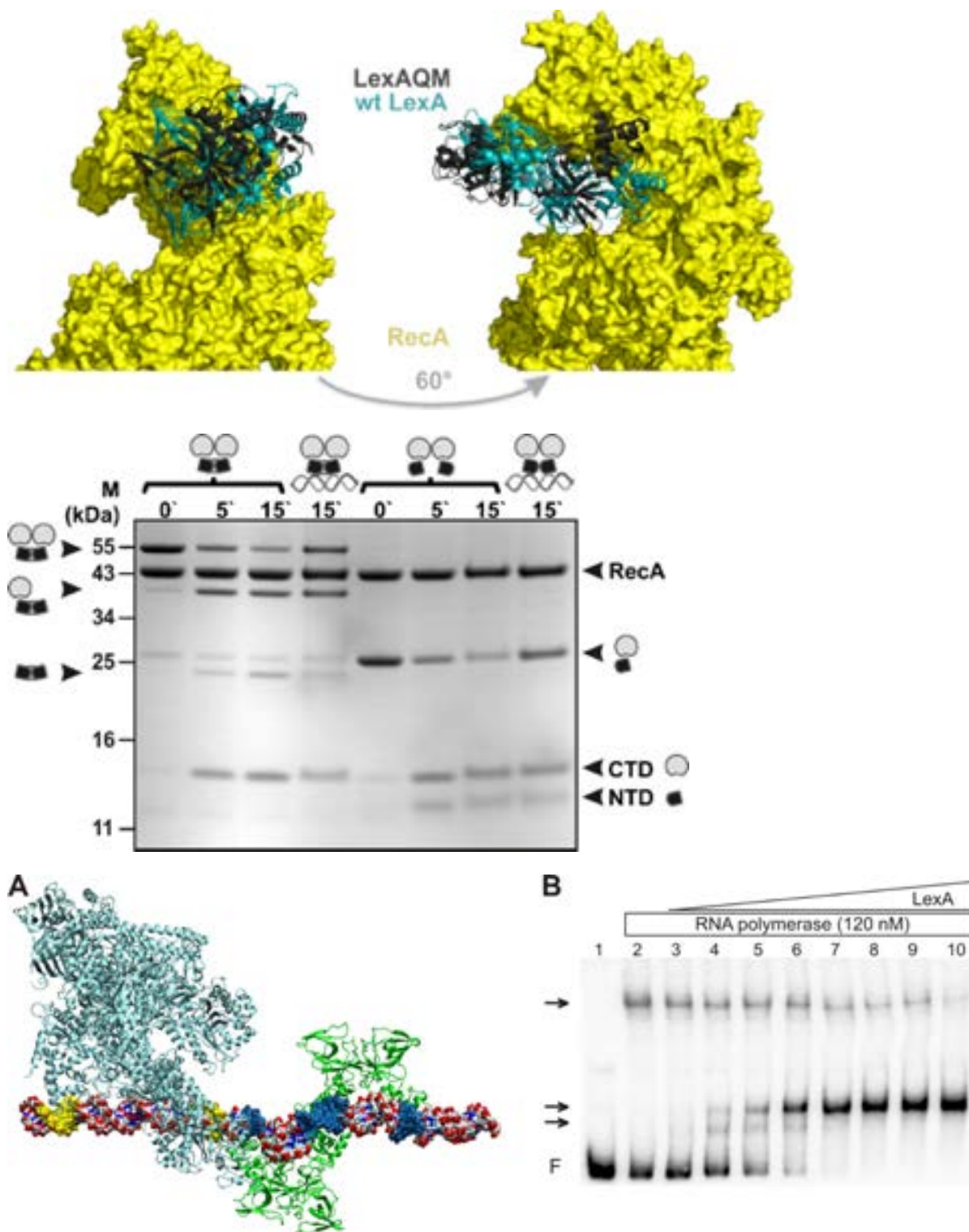
Če so prisotni v zelo nizkih koncentracijah, jih moramo koncentrirati in za njihovo zaznavo uporabiti zelo občutljive metode, kot sta kvantitativni in digitalni PCR. Za iskanje vseh prisotnih virusov pa so najbolj uveljavljene metode visoko zmogljivega sekvenciranja (HTS). To so metode, ki nam omogočajo tudi opazovanje virusnih populacij v gostitelju, ločevanje različnih genotipov ter sledenje spremembam virusnih genomov po prehodu med gostitelji ter metagenomske študije. HTS uporabljamo za odkrivanje celotnega viroma gostiteljev, od patogenih pa do nepatogenih virusov. Kljub napredku molekularne biologije pa elektronska mikroskopija ponovno postaja nezamenljiva metoda za dopolnitev študija in karakterizacije virusov.

Ugotovili smo, da so nekateri virusi oziroma njihove nukleinske kisline, kljub svoji nanometerski velikosti in izpostavljenemu proteinskemu ali lipidnemu ovoju, neverjetno stabilni v ekstremnih okoljih, kot so odpadne vode, jamske vode ali prst. To pomeni, da lahko z pregledom virusov v vodotokih ugotovimo prisotnost novih virusov na področju, ki ga vodotok pokriva, kar raziskujemo v okviru EU MSCA ITN projekta INEXTVIR. Analiza odpadnih voda nam odkrije tudi tako nove viruse kot je SARS-CoV-2 in pomaga pri njegovem sledenju v populaciji.

Kroženje virusov v naravi je kontinuirano in šele v zadnjih desetletjih ugotavljamo kako virusi menjavajo medije kot sta voda in zrak ter gostitelje. Takšen primer je virus blage lisavosti paprike (PMMoV), ki preko prehranjevanja infektiven prečka humani prebavni trakt, se odplakne v odpadne vode in po prehodu čistilne naprave končna v rekah, ki se lahko uporabljajo za namakanje. Tako ponovno pride v kontakt s primarnim gostiteljem in krog je sklenjen.

Ključne besede: virusi; okolje; epidemiologija

Mikrobi in molekularne interakcije



Model proteina LexA (cian, črno) v kompleksu z aktivnim filamentom proteina RecA (rumeno) (zgoraj). NaDS PAGE analiza produktov cepitve proteina LexA ter mutanta LexA s povezano DNA vezavno domeno. Po sprožitvi cepitve LexA z RecA so bili proteini prečno povezani z glutaraldehidom (v sredini). Model holoencima RNA-polimeraza (cian) ter dveh dimerov LexA (zeleno) vezanih na DNA (spodaj levo) Test zamika elektroforezne mobilnosti odseka DNA v kompleksu z RNA-polimerazo in LexA (spodaj desno). Slike so nastale na Oddelku za biologijo BF UL v sodelavi s kolegi iz Kemijskega inštituta ter iz Inštituta Jožef Stefan (Matej Butala, Lidija Kovačič, Milan Hodošček).

Mali proteini kot pika na i odziva SOS

Anja Pavlin¹, Nadine Fornelos², Nathanael Caveney³, Gregor Bajc¹, Douglas F. Browning⁴, Zdravko Podlesek¹, Miha Bahun¹, Margarita Salas⁵, Natalie C. J. Strynadka³, Matej Butala¹

¹ Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, ZDA

³ University of British Columbia, Canada

⁴ University of Birmingham, Velika Britanija

⁵ Universidad Autónoma de Madrid, Španija

Matej.butala@bf.uni-lj.si

V odziv na poškodbe genomske DNA večina bakterij sproži odziv SOS. Ključna regulatorna proteina tega odziva sta: (i) represor odziva, transkripcijski faktor LexA ter (ii) aktivator odziva, protein RecA. Poleg genov, katerih produkti služijo za popravilo DNA, protein LexA v nekaterih bakterijah omogoči vzpostavitev lizogenega cikla bakteriofagov.

Z bioinformatičnimi, molekularno biološkimi ter pristopi strukturne biokemije smo pred leti dokazali, da konformacijska sprememba v proteinu LexA, omogoči specifično interakcijo tega represorja z DNA. Pomena te konformacijske spremembe takrat nismo povsem razumeli.

Pri bakterijah *Bacillus thuringiensis* ter *Acinetobacter baumannii* smo nedavno dokazali obstoj malih proteinov velikosti ~50 aminokislin, ki interagirajo direktno s homologi proteina LexA ter izboljšajo DNA vezavne lastnosti represorja odziva SOS. Dokažemo, da ti mali proteini povzročijo, da protein LexA prevzame DNA vezavno konformacijo.

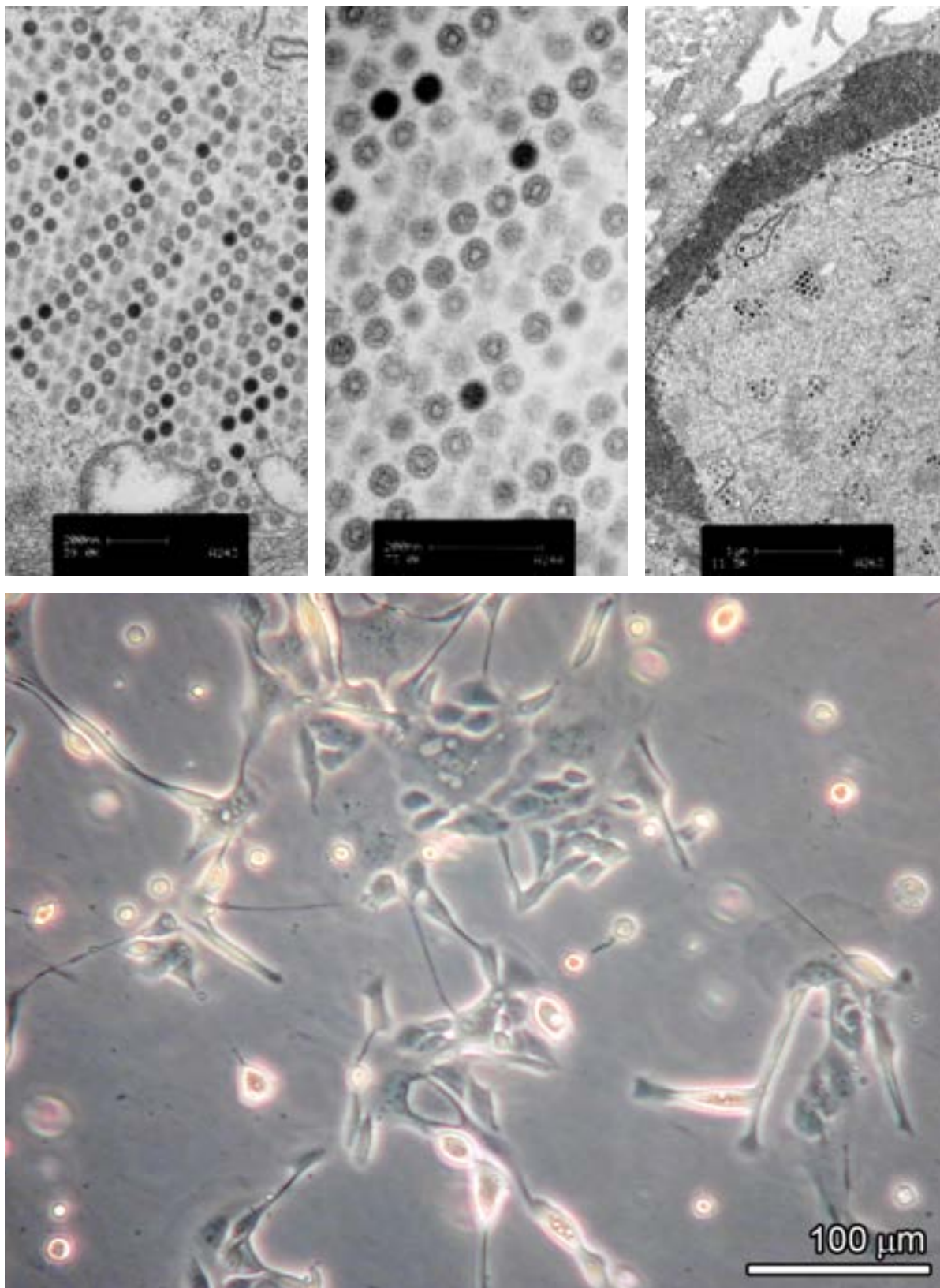
Naše raziskave nakazujejo, da poleg sistema LexA/RecA obstaja dodaten nivo uravnave odziva SOS. Mali proteini z vezavo na LexA omogočajo represorju prepoznavo dodatnih vezavnih mest na genomu bakterije ter tako npr. časovno usklajen prepis poznih genov bakteriofaga GIL01 s sprožitvijo popravljivih mehanizmov v bakteriji *B. thuringiensis*, komunikacijo med več bakteriofagi v tej bakteriji ter skrbno uravnavano sprožitev prepisa genov za mutagene polimeraze v patogenu *A. baumannii*.

Ključne besede: bakteriofag; odziv SOS; poškodba DNA

Izbrana sekcijska predavanja

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2020

Mikrobi in zdravje



Nov sev adenovirusa PAdV-SVN1 prvič dokazan v prašičjih urotelijskih celicah sečnega mehurja (zgoraj, presevna elektronska mikroskopija). Zaradi okužbe s sevom PAdV-SVN1 propadajoče celice v kulturi prašičjega urotelija (spodaj, fazno-kontrastna mikroskopija). Slike so nastale na Inštitutu za biologijo celice, UL MF (Urška Dragin Jerman, Mateja Erdani Kreft).

Propadanje lesk v Sloveniji zaradi okužbe s '*Candidatus Phytoplasma fragariae*' in z izolati sorodnimi povzročiteljici zlate trsne rumenice

Nataša Mehle¹, Nejc Jakoš¹, Mojca Rot², Miro Mešič³, Jože Miklavc³, Boštjan Matko³, Alenka Ferlež Rus⁴, Maja Ravnikar^{1,5}, Marina Dermastia¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² KGZS – Zavod Nova Gorica, Pri hrastu 18, 5000 Nova Gorica

³ KGZS – Zavod Maribor, Vinarska ulica 14, 2000 Maribor

⁴ Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec

⁵ Univerza v Novi Gorici, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri, Glavni trg 8, 5271 Vipava

natasa.mehle@nib.si

Leska (*Corylus avellana*) predstavlja 2,8% površine intenzivnih sadovnjakov v Sloveniji. V zadnjih nekaj letih v nekaterih nasadih lesk v Sloveniji opazimo propadanje posameznih vej ali celih grmov.

Da bi ugotovili ali so s propadanjem lesk v Sloveniji povezane fitoplazme, smo ekstrahirali DNA iz korenin in/ ali poganjkov grmov z in brez bolezenskih znamenj po postopku, ki temelji na vezavi DNA na magnetne kroglice. Za ugotavljanje prisotnosti fitoplazem smo uporabili test na osnovi verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Identifikacijo in genetsko karakterizacijo fitoplazem, ki smo jih zaznali, smo proučevali na genih 16S rRNA, *secY*, *map* in na operonu za ribosomski protein.

V rastlinskem materialu iz grmov lesk brez izraženih bolezenskih znamenj, prisotnosti fitoplazem nismo dokazali. V rastlinskem materialu iz grmov lesk, vzorčenih v različnih nasadih v Sloveniji z izraženimi bolezenskimi znamenji, smo dokazali prisotnost treh različnih fitoplazem (Mehle in sod., 2019, European Journal of Plant Pathology 155: 1117-1132). Ugotovili smo, da sta v nasadih leske najbolj razširjeni '*Candidatus Phytoplasma fragariae*' (fitoplazma podskupine 16SrXII-E) in fitoplazma iz skupine 16SrV, ki sta tudi odgovorni za propadanje leske. Fitoplazme iz teh dveh skupin smo zaznali tudi pri drugih rastlinskih vrstah v Sloveniji. Molekularna karakterizacija dela gena 16S rRNA, *secY*, *map* in operona za ribosomski protein, ki smo jo izvedli na izolatih fitoplazme iz skupine 16SrV odkritih na leskah, kaže, da so ti izolati identični karantenskim fitoplazmam, ki na vinski trti povzročajo zlato trsno rumenico. Za določitev epidemioloških poti smo ovrednotili potencialne žuželčje prenašalce (Mehle in Dermastia, 2019, Phytopathogenic Mollicutes 9: 49-50). Zdi se, da je vzhodnjaški škržatek (*Orientus ishidae*) verjeten prenašalec fitoplazme 16SrV med grmi lesk, možnega prenašalca '*Candidatus Phytoplasma fragariae*' pa še nismo identificirali.

Za določitev in uvedbo ustreznih ukrepov, ki bodo učinkovito preprečevali širjenje propadanja v nasadih lesk zaradi okužbe s fitoplazmami, so potrebne nadaljnje raziskave epidemiologije teh fitoplazem.

Ključne besede: fitoplazme; leske; propadanje

Adhezija bakterij *Campylobacter* na abiotsko ter biotsko površino in vključeni mehanizmi

Anja Klančnik¹, Dina Ramič¹, Katarina Šimunovič¹, Jerica Sabotič², Maja Šikić Pogačar¹, Darinka Vučković³, Maja Abram³, Meta Sterniša¹, Magda Tušek Žnidarič⁴, Sonja Smole Možina¹

¹ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza na Reki, Braće Branchetta 20, 51000 Reka, Hrvaška

⁴ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 1111, 1000 Ljubljana, Slovenija

anja.klancnik@bf.uni-lj.si

Bakterije *Campylobacter* so s hrano prenosljivi vodilni povzročitelji črevesnih okužb ljudi v razvitih državah. Njihova odpornost predstavlja aktualni problem v proizvodnji obstojne in varne hrane. Eden od mehanizmov odpornosti je biofilm, ki bakterije ščiti pred neugodnimi dejavniki in imunskim odzivom gostitelja. Razvoj novih alternativnih načinov omejevanja kontaminacij in/ali zdravljenje mikrobnih okužb je usmerjen v preprečevanje adhezije na abiotske površine za zmanjšanje okužb ter na biotske površine za zmanjšanje patogenosti bakterij.

Izhodišče je kvantitativno ovrednotenje adhezije *C. jejuni* NCTC11168 na abiotsko površino polistirena. Virulentnost bakterij smo ovrednotili preko adhezije na biotsko površino celičnih linij Caco-2 v časovnem intervalu od 3 ur do 120 ur. V nadaljevanju smo pojasnili osnovne mehanizme, vključene v adhezijo in sicer (i) na nivoju metabolizma preko karakterizacije rasti, gibljivosti, morfologije ter biomase mutant ter (ii) adhezinov celice preko vezave lektinov na površino bakterij. Pri tem smo zaradi nespecifične vezave ter vključenosti zunajceličnega sloja EPS, ki ga tvori *C. jejuni* izbrali model abiotske površine polistirena.

Po prvotni fazi adhezije na polistirenu v prvih 12 urah, števila celic še malo naraste do 24 ur, nato število celic v formiranem biofilmu pada. Obratno, adhezija ter posledično virulentnost celic na Caco-2 se povečuje do 72 ur, a ne spreminja v živalskem modelu mišk. Preko modela adhezije na polistiren smo dokazali:

vpliv celičnih mehanizmov, saj lahko preko vpliva na izlivne črpalke moduliramo tudi adhezijo ter virulentnost, ter preko vpliva na sisteme signalizacije moduliramo stresni odgovor celice ter posledično zmanjšamo adhezivnost.

vključenost specifičnih adhezinov ter določili nove molekule zunajceličnega matriksa, ki so vpletene v adhezijo, kot so: flagelin A, poglavitni protein zunanje membrane, tirozin kinaza zunanje membrane, fibronektin-vezavni protein zunanje membrane, periplazemski protein, ki veže aminokisline.

Adhezija je nova potencialna tarča alternativne strategije za zmanjševanje kontaminacij in infekcij z bakterijami *Campylobacter*.

Ključne besede: *Campylobacter jejuni*; adhezija/virulentost; mehanizem

Izsledki raziskav nematicidnih bakterij vrste *Bacillus firmus* in ozko sorodnih sevov *Bacillus* sp. na zdravje rastlin

Nik Susič, Saša Širca, Barbara Gerič Stare

Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana

barbara.geric@kis.si

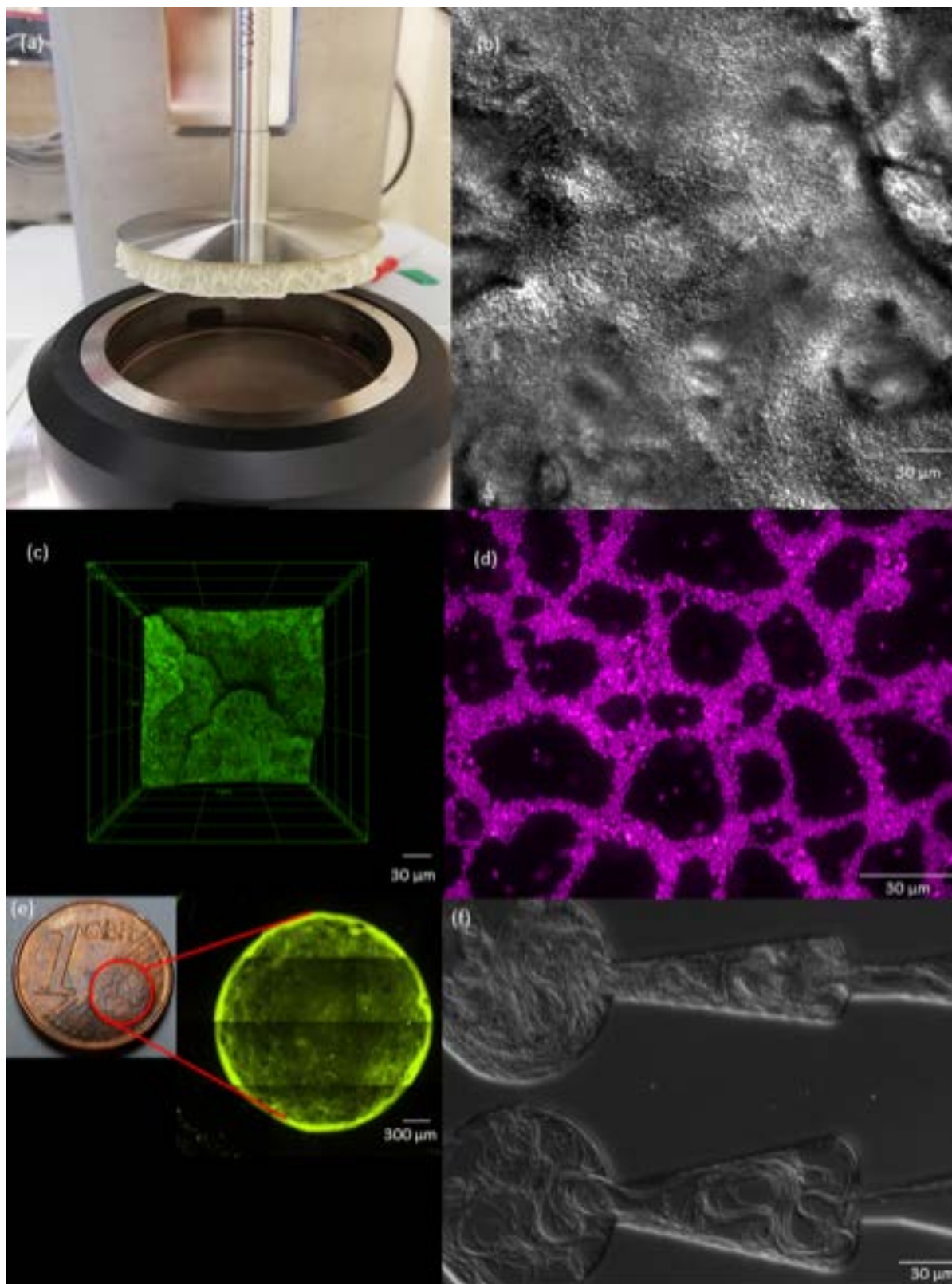
Bakterije *Bacillus firmus* so Gram-pozitivne paličaste sporogene bakterije, ki jih izoliramo predvsem iz tal. V kmetijstvu jih uporabljamo za obvladovanje rastlinsko-parazitskih nematod. Največ se uporablja sev *B. firmus* I-1582 v obliki biopesticida VOTiVO®, ki znatno zmanjša napad različnih vrst nematod pri kmetijskih rastlinah.

Tekom večletnih raziskav smo raziskovali delovanje bakterijskih sevov *B. firmus* in ozko sorodnih sevov *Bacillus* sp. na zdravje rastlin. Nematicidno aktivnosti treh sevov *Bacillus* spp. smo vrednotili proti parazitskima vrstama *Meloidogyne incognita* in *M. luci* v *in vitro* ter lončnih poskusih. Vsi testirani sevi so pokazali nematicidno aktivnost; v *in vitro* poskusih je bil najbolj učinkovit *Bacillus* sp. ZZV12-4809, ki je popolnoma preprečil izleganje ličink, v lončnih poskusih pa sev *B. firmus* I-1582, ki je za 62% zmanjšal reprodukcijo nematod. Določili smo nukleotidno zaporedje celotnih genomov komercialnega seva I-1582 in nematicidnega slovenskega izolata *Bacillus* sp. ZZV12-4809. S primerjalno genomiko smo pri obeh določili širok nabor možnih virulentnih dejavnikov odgovornih za nematicidni učinek; od proteaz, hitinaz do biosinteznih genskih skupin za sekundarne metabolite kot so antibiotiki, bakteriocini, lantipeptidi, toksini in siderofori. Dodatno smo z analizo povprečne nukleotidne identitete genomov *Bacillus* spp. pokazali, da sev ZZV12-4809 ne spada v nobeno od opisanih vrst in bo verjetno potreben opis nove vrste (Susič et al., 2020, G3, 10(3), 881-890). V lončnih in mikroparcelnih poskusih smo pokazali, da I-1582 na rastline paradižnika napadene z nematodami deluje tako nematicidno kot tudi z mehanizmom spodbujanja rasti rastlin, kar smo pokazali z meritvami morfologije rastlin, relativne vsebnosti klorofila, vsebnostjo elementov in analizo hiperspektralnih posnetkov (Susič et al., 2020, Plants, 9, 592).

Kemični nematicidi kot primarni način varstva pred nematodami v kmetijstvu se zaradi ekotoksičnosti opuščajo, v ospredje pa prihajajo nove strategije zdravstvenega varstva rastlin, vključujoč z biološkim varstvom na osnovi biopesticidov, kjer je aktivna snov bakterijski sev, ki pozitivno vpliva na zdravje in rast rastlin.

Ključne besede: *Bacillus*; nematicidno; zdravje rastlin

Mikrobi in analitika



Določanje strukturnih in površinskih lastnosti biofilmov *Bacillus subtilis*: (a) merjenje visko-elastičnih lastnosti plavajočega biofilma oprijetega na merilni sistem rotacijskega viskozimetra, ki ga sestavljajo gosto povezane celice (b) vidne z DIC mikroskopijo; v konfokalni tehniki lahko opazimo razpokanost in nagubanost biofilmske strukture (d); tekoča kultura adsorbirna na poly-L lizinsko steklo; (e) preučevanje pritrjevanja biofilmov na površino kovanca; (f) nastanek biofilmov v mikropretočnih sistemih. Slike so nastale na Oddelku za živilstvo BF UL (Iztok Dogša in Mojca Krajnc).

Potrditev uporabnosti biomimetičnega *in vitro* modela prašičjega urotelija za ocenitev patogenosti sevov bakterije *Escherichia coli*

Luka Predojevič¹, Mateja Erdani Kreft², Darja Keše³, Peter Veranič², Taja Železnik Ramuta², Darja Žgur Bertok¹, Marjanca Starčič Erjavec¹

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov Trg 2, 1000 Ljubljana

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

lukapredojevic@yahoo.com

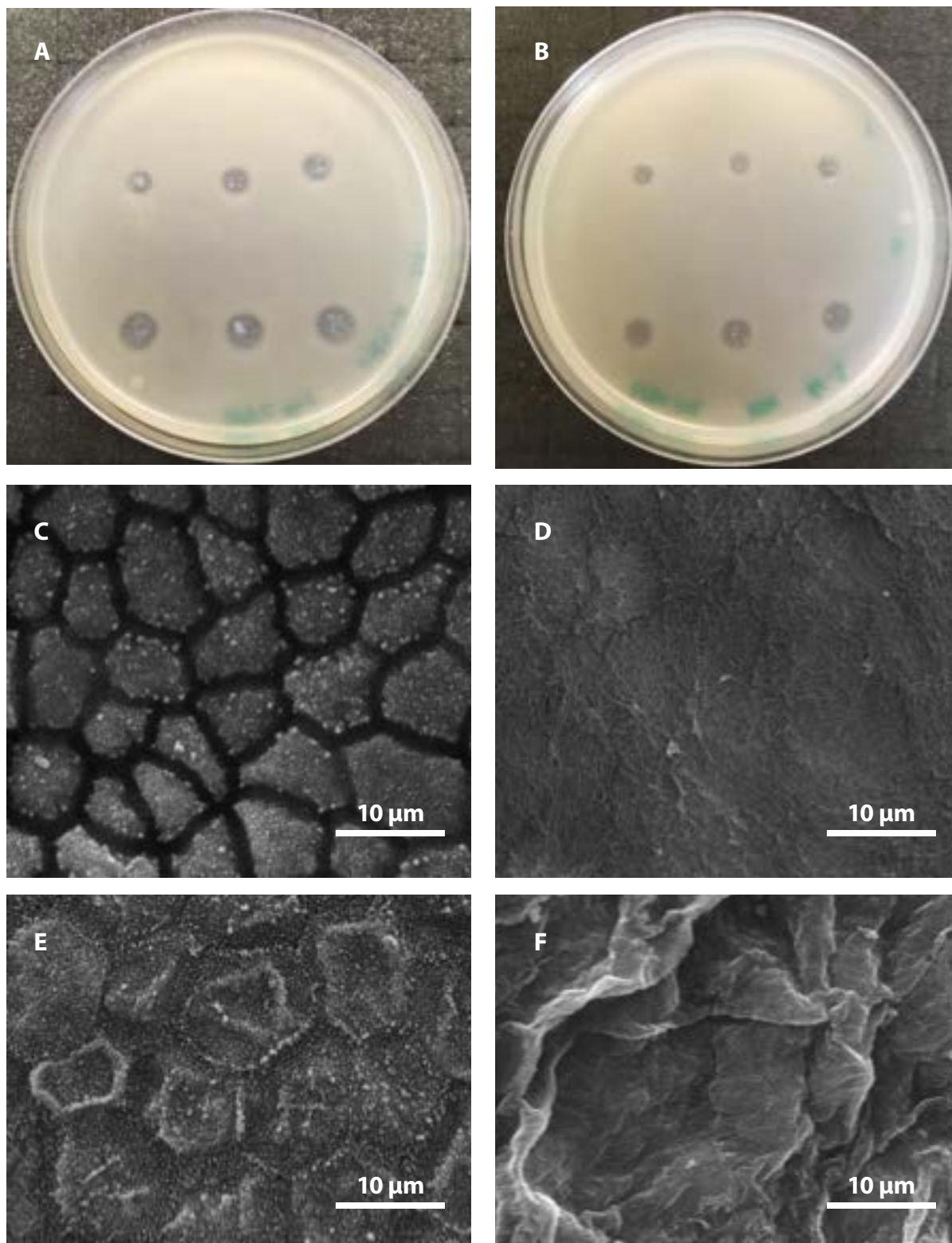
Biomimetični *in vitro* model prašičjega urotelija sečnega mehurja smo uporabili za ocenitev patogenosti sevov bakterije *Escherichia coli*. Model smo najprej testirali z dobro znanimi in opisanimi sevi *E. coli*: uropatogenima sevoma J96 in 536 (pozitivni kontroli), človeškim komenzalnim sevom SE15 ter laboratorijskima sevoma MG1655 in DH5α (negativne kontrole). Stopnjo patogenosti sevov smo ugotavljali z določanjem viabilnosti normalnih prašičjih urotelijskih celic (NPU) tega modela po triurni okužbi s sevi *E. coli*. Ker so rezultati teh prvotnih poskusov nakazali, da model omogoča razlikovanje patogenih od nepatogenih sevov *E. coli*, je bil namen naših nadaljnjih poskusov preveriti uporabnost vzpostavljenega modela na širšem naboru naravnih človeških sevov *E. coli*.

Iz zbirke sevov *E. coli* Skupine za molekularno genetiko, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete smo izbrali 20 različnih sevov: 10 uropatogenih sevov (UPEC), izoliranih iz urinov bolnikov z okužbo sečil, ter 10 komenzalnih sevov, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Celice biomimetičnega modela normalnega prašičjega urotelija smo za 3 ure izpostavili posameznim sevom *E. coli*. Zatam smo celice NPU z encimi ločili od podlage in med seboj, jih obarvali, prešteli žive in mrtve celice in določili odstotek viabilnosti. Morebitne patološke spremembe celic NPU, zaradi adhezije in invazije sevov *E. coli*, smo ugotavljali z elektronsko mikroskopijo. S kompletom Porcine ProcartaPlex™ smo v supernatantu okuženih celic NPU izvedli analizo prisotnosti devetih citokinov (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN-α, IFN-γ in TNF-α).

Rezultati okužbe celic NPU z naravnimi sevi *E. coli* so potrdili učinkovitost modela za ocenitev patogenosti sevov in visoko zmožnost ločevanja med patogenimi in nepatogenimi sevi *E. coli*. Izsledki vrstične in preseвне elektronske mikroskopije so potrdili adhezijo patogenih sevov na površino modela ter invazijo v celice NPU. Razlike v številu in količini izločenih citokinov ob okužbi s sevi *E. coli* kažejo na različen vpliv sevov na urotelij, ki vodi v različno močen imunski odgovor celic NPU.

Gljučne besede: citokini; adhezija; invazivnost

Mikrobi in protimikrobne učinkovine



V prvi vrstici je prikazan protimikrobni učinek (a) svežega in (b) krioshranjenega homogenata humane amnijske membrane na klinični sev uropatogene bakterije *Escherichia coli*. V drugi vrstici sta z vrstično elektronsko mikroskopijo prikazana (c) epitelij in (d) stroma sveže amnijske membrane, v tretji vrstici pa (e) epitelij in (f) stroma krioshranjene amnijske membrane (Taja Železnik Ramuta, Marjanca Starčič Erjavec, Mateja Erdani Kreft).

Protimikrobni potencial hidrolata smilja *Helichrysum italicum*

Katja Bezek, Katja Kramberger, Darja Barlič Maganja

Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju, Polje 42, 6310 Izola

katja.bezek@fvz.upr.si

Sredozemska rastlina smilj (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), predstavlja bogat vir bioaktivnih učinkovin, s protimikrobnimi in protivnetnimi lastnostmi. Namen študije je bil testirati protimikrobno in antioksidativno učinkovitost hidrolata smilja, stranskega produkta ekstrakcije eteričnega olja.

Protimikrobno učinkovitost hidrolata smilja smo testirali z metodo mikrodilucije v mikrotiterski plošči in za določanje živosti uporabili reagent PrestoBlue. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) smo določili za seve *Campylobacter jejuni* 81-176, *C. jejuni* 3B-432 in 3B-425 (klinična izolata, NIJZ, Slovenija), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 in *Staphylococcus aureus* 25923. V nadaljevanju smo hidrolat v koncentraciji 1/8 MIC uporabili za preverjanje protiadhezivnega učinka z metodo barvanja s kristal vijoličnim (KV). Antioksidativen potencial hidrolata smilja smo določili na osnovi analize sposobnosti lovljenja prostih radikalov DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Preverili smo tudi citotoksičnost hidrolata na naslednjih modelih celičnih linij: epitelne celice kolorektalnega adenokarcinoma Caco-2 (ATCC® HTB37™) in primarni črevesni fibroblasti CCD112CoN (ATCC® CRL1541™).

Vsi testirani bakterijski sevi, z izjemo *S. aureus* 25923, so bili na hidrolat občutljivi v razponu najbolj občutljivih sevov bakterij *C. jejuni* (12.5 v/v %), MIC vrednosti za *E. coli* in *P. aeruginosa* pa so bile 100 v/v %. Hidrolat smilja je deloval protiadhezivno v primeru *E. coli* ($p < 0.001$), *P. aeruginosa* ($p = 0.019$) in *S. aureus* ($p = 0.024$), ne pa tudi v primeru sevov *C. jejuni*. Antioksidativen potencial hidrolata je znašal 4,47 µg ekvivalentov askorbinske kisline/mL hidrolata in pri koncentraciji 25 v/v % ni izkazoval toksičnosti za testirane celične linije.

Pridobljeni rezultati nakazujejo na vsestranskost uporabe hidrolata smilja, kot protimikrobnega sredstva naravnega izvora, s hkratnim antioksidativnim potencialom in nizko stopnjo toksičnosti za testirani črevesni celični liniji. Izsledki študije bodo uporabljeni pri nadaljnjem raziskovalnem delu, na področju preprečevanja pojava in širjenja protimikrobne odpornosti.

Ključne besede: hidrolat smilja; protimikrobno; antioksidativno delovanje; citotoksičnost

Širokospektralno protimikrobno delovanje homogenata humane amnijske membrane na uropatogene bakterije

Taja Železnik Ramuta¹, Tina Šket¹, Katja Seme², Marjanca Starčič Erjavec³, Mateja Erdani Kreft¹

¹ Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

taja.zeleznik@mf.uni-lj.si

Okužbe sečil spadajo med najpogostejše bakterijske okužbe, katerih povzročitelji so vse pogostejše odporni proti antibiotikom. Humana amnijska membrana (hAM) obdaja in ščiti zarodek oz. kasneje plod ter vzdržuje homeostazo amnijske tekočine. Naša predhodna raziskava je pokazala, da koščki sveže (svAM) in krioshranjene hAM (kAM) nimajo protimikrobnega učinka na izbrane seve uropatogenih bakterij, zato je bil namen te študije ovrednotiti protimikrobni učinek homogenatov svAM in kAM.

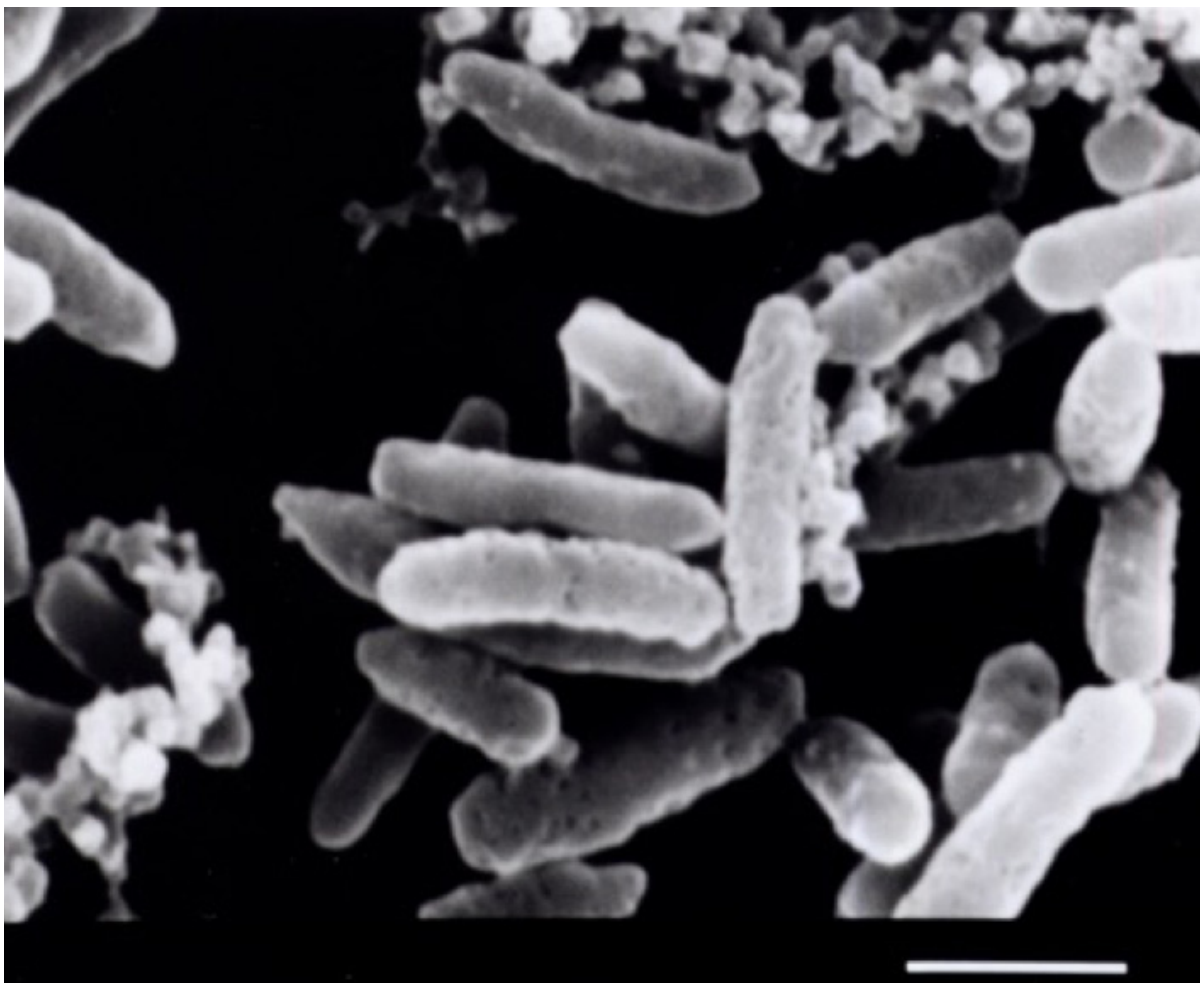
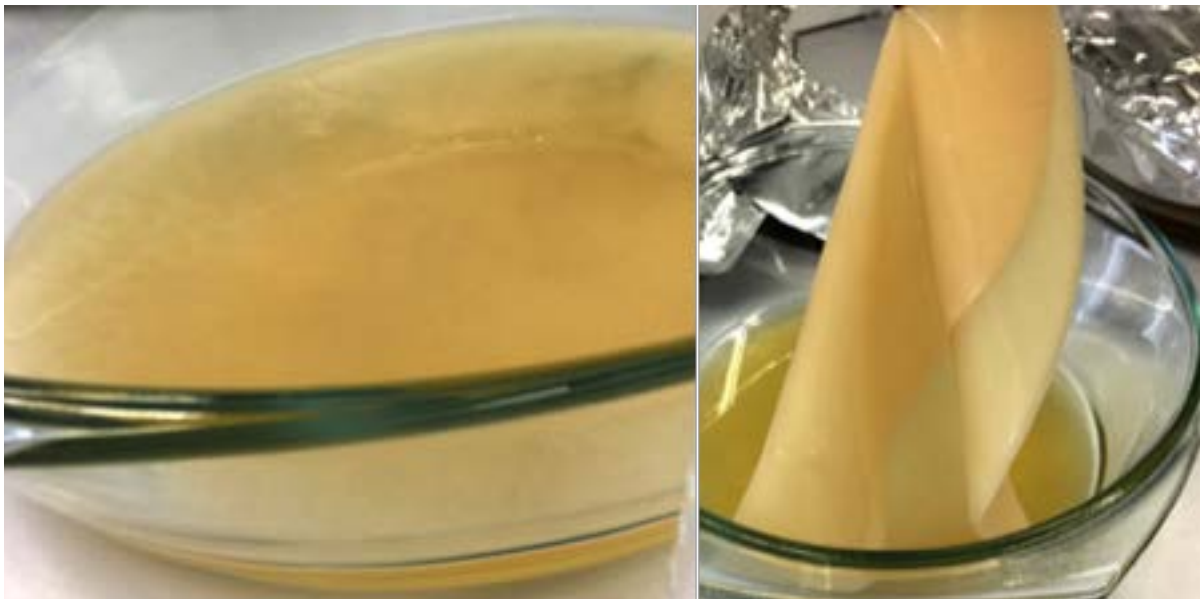
V raziskavi smo uporabili 25 sevov različnih bakterijskih vrst, ki so znane kot povzročiteljice okužb sečil. Na njih smo testirali protimikrobno učinkovitost homogenatov svAM in kAM. Homogenat smo nanesti na mehki agar, inokuliran z bakterijskimi kulturami ter po prekonočni inkubaciji izmerili premer zaviralne cone, poleg tega smo ovrednotili učinek homogenata AM na izbrane seve tudi v tekočem gojišču. Dodatno smo proučili protimikrobni učinek homogenata AM na z bakterijami okuženih modelih normalnega in rakavo spremenjenega urotelija *in vitro*.

Protimikrobni učinek homogenatov svAM in kAM smo ugotovili pri 6 sevih uropatogene bakterije *Escherichia coli*, pri po dveh sevih bakterij *Staphylococcus aureus*, odpornem proti metilicinu, *Acinetobacter baumannii* in *Klebsiella pneumoniae*, ki izloča betalaktamaze širokega spektra delovanja ter pri po enem sevu bakterij *E. coli* DH5α, *E. coli*, ki izloča betalaktamaze širokega spektra delovanja, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* in *Enterobacter* spp. Poleg tega je homogenat deloval protimikrobno tudi v tekočem gojišču ter na z bakterijami okuženih modelih normalnega in rakavo spremenjenega urotelija *in vitro*.

Dokazali smo, da imajo homogenati svAM in kAM zaradi svojega protimikrobnega delovanja na širok nabor po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih uropatogenih bakterijskih sevov ter celo določenih bakterijskih sevov, odpornih proti več antibiotikom, velik potencial za klinično uporabo.

Ključne besede: amnijska membrana; uropatogene bakterije; protimikrobni učinek

Mikrobi in biotehnologija



Ocetnokislinske bakterije tvorijo pri statičnem načinu gojenja na površini zunajcelične polisaharide nanocelulozo, acetan in/ali levan (zgoraj). Vrstična elektronska mikrofografija bakterije *Komagataeibacter europaeus* namnožene v gojišču RAE ob prisotnosti 3 % etanola in 7 % očetne kisline (spodaj, merilo predstavlja 1 μm). Slike so nastale v Laboratoriju za mikrobiologijo Oddelka za biologijo FNM UM (Kim Fijok, Janja Trček).

Dvig donosa oksitetraciklina v bakteriji *Streptomyces rimosus* s povečanjem števila kopij celotne *otc* gruč biosinteznih genov

Špela Pikl¹, Lucija Slemc¹, Martina Avbelj¹, Andrés Felipe Carrillo Rincón¹, Dušan Goranovič², Krešimir Gjuračić², Hilda Sucipto^{3,4}, Andriy Luzhetskyy^{3,4}, Hrvoje Petković¹, Vasilka Magdevska²

¹ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

² Acies Bio, d.o.o., Tehnološki Park, Ljubljana, Slovenija

³ Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Nemčija

⁴ Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Saarbrücken, Nemčija

spela.pikl@bf.uni-lj.si

Bakterije rodu *Streptomyces* predstavljajo bogat vir antibiotikov in drugih aktivnih spojin, vendar jih proizvajajo v koncentracijah, ki so pogosto prenizke za nadaljnje aplikacije. Dvig donosa željenega antibiotika ali drugega ciljnega metabolita je rezultat izvedbe intenzivnih in dolgotrajnih selekcij. Zaradi kompleksnosti metabolnih in regulatornih poti vključenih v biosintezo naravnih učinkovin, se v industriji še vedno najpogosteje uporablja naključna mutagenaza in dolgotrajna selekcija sevov kot pristop za izboljšanje donosa. Z razvojem molekularnih metod in zmožnost kloniranja velikih gruč biosinteznih genov (GBG) so metode biosinteznega inženirstva in sintezne biologije omogočili tudi pristope povečevanja števila kopij določenih ključnih biosinteznih genov ali pa celo celotnih biosinteznih poti. GBG, ki kodirajo biosintezo sekundarnih metabolitov so navadno izjemno velike, in pogosto obsegajo regije velike več kot 50 kb. Tako velike DNK fragmente je izjemno zahtevno gensko spreminjati. Še veliko težje pa je tovrstne genske manipulacije izvajati v visokodonosnih industrijskih sevih, saj so ti sevi selekcionirani že desetletja in so ciljni donosi že izjemno visoki.

Bakterija *Streptomyces rimosus* velja za enega najbolj učinkovitih industrijskih proizvajalcev antibiotika oksitetraciklin (OTC), saj na industrijski skali doseže donos OTC tudi preko 35 g/L.

V obsegu študije smo razvili učinkovita orodja, ki so nam omogočila vnos velikih DNK fragmentov. Klonirali smo celotno GBG za biosintezo OTC. GBG, ki kodira biosintezo OTC smo v nadaljevanju izražali v treh različnih *S. rimosus* sevih; divji sev in dva industrijska seva. Uporabljena industrijska seva, ki sta bila razvita v deselektiranih intenzivne selekcije proizvajata OTC v visokih donosih. V obsegu tega projekta smo pokazali, da lahko z vnosom ene ali dveh dodatnih kopij *otc* genske gruč še dodatno povečamo donos OTC v divjem tipu *S. rimosus*. Zelo zanimivi pa so tudi rezultati, ki kažejo, da je prišlo do dviga donosa tudi v obeh testiranih industrijskih sevih *S. rimosus*,

Ključne besede: *Streptomyces rimosus*; oksitetraciklin; gruča biosinteznih genov

Izguba genov kot evolucijska prednost bipolarno brstečih kvasovk

Neža Čadež¹, Diego Libkind², Miha Tome¹

¹ Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Consejo Nacional de Investigaciones, Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Comahue, 8400 Bariloche, Argentina
neza.cadez@bf.uni-lj.si

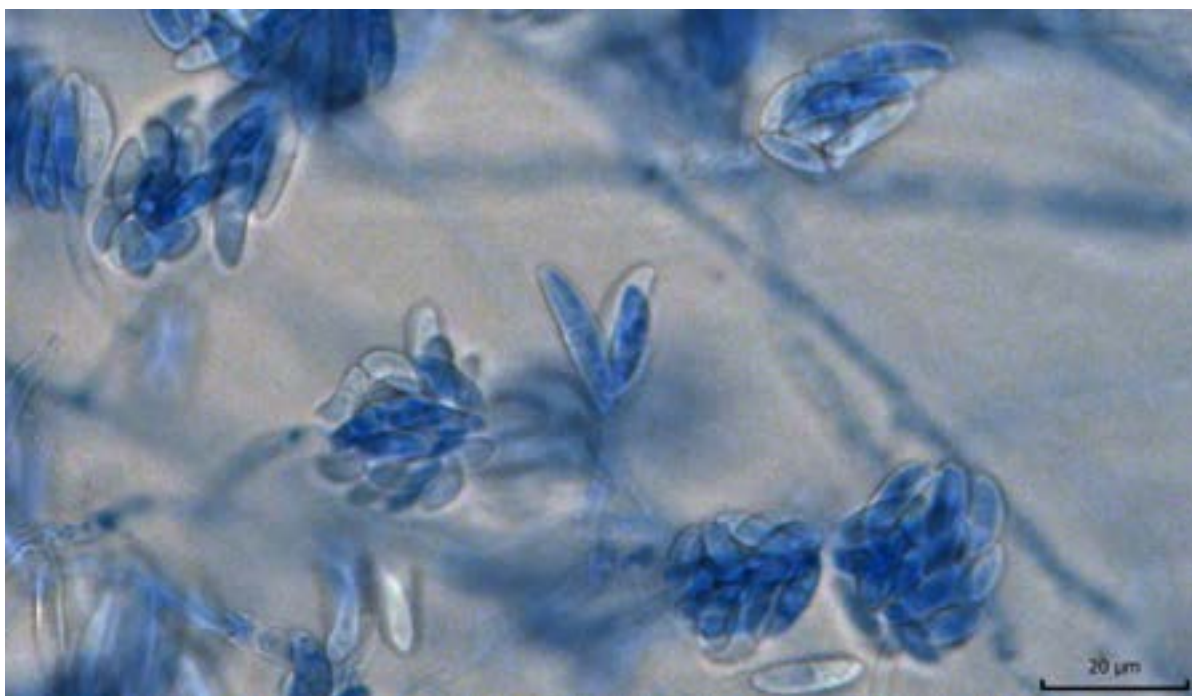
Rod bipolarno brstečih kvasovk *Hanseniaspora* s pospešeno evolucijo predstavlja zanimiv model za razumevanje alternativnih mehanizmov evolucije, saj izgube funkcionalnih skupin genov vodijo v reproduktivno izolacijo oz. v nastanek novih vrst. Dokazali smo namreč, da je rod izgubil številne gene, med njimi največ genov za popravilne mehanizme DNA, zato sklepamo, da je bila pod okoljskim selekcijskim pritiskom adaptivna evolucija *Hanseniaspora* drugačna kot pri kvasovkah rodu *Saccharomyces*.

S sekvenciranjem in analizami genomov 21 vrst rodu *Hanseniaspora* smo lahko postavili robustno filogenijo rodu, postavili genomski koncept vrste z uporabo različnih indeksov sorodnosti genomov in z analizami prisotnosti/odsotnosti genov sklepali na način nastanka novih vrst ter prilagoditve na substrate iz katerih smo jih izolirali. Kot primer adaptacije na fermentativen metabolizem, je izguba mitohondrijskih genov in genov, ki kodirajo proteine elektronske transportne verige pri tipskem sevju vrste *H. valbyensis* v primerjavi s sorodno vrsto *H. smithiae*, ki je izolirana iz naravnih substratov. Z analizami genomov tako poskušamo razumeti mehanizme adaptacije na različne naravne substrate in na človekovo okolje fermentiranih živil.

Uporabnost izsledkov iščemo tudi v uporabni vrednosti poznavanja tega rodu. V zgodnjih fazah fermentacije grozdnega in jabolčnega mošta, namreč kvasovke *Hanseniaspora* spp. močno prevladujejo, njihova vloga pa je povezana z večjo senzorično globino končnega izdelka. Zato smo postavili presejalne teste za določanje industrijskih lastnosti 151 sevov *Hanseniaspora* za uporabo pri proizvodnji piva. Med te lastnosti sodijo na primer toleranca na etanol, sposobnost privzema maltoze in b-liazna aktivnost. Tako smo poleg genomske karakterizacije pripravili še obsežen pregled fenotipskih lastnosti, ki so pomembne pri proizvodnji fermentiranih živil.

Ključne besede: kvasovke; ekologija; genomika; pivo

Mikrobi in okolje



Glive vrste *Fusarium solani* iz peska na plaži (zgoraj), nova vrsta rodu *Penicillium* iz ledu na Grenlandiji (optična mikroskopija v vidni svetlobi; povečavi: zgoraj: 400 x, spodaj: 1000 x). Slike so nastale na Oddelku za biologijo BF UL (Polona Zalar).

Študij vpliva bakterij na rast železo oksid hidroksidnih kapnikov (FeOOH-polimorfi) z uporabo SEM-EDS in ATR-FTIR spektroskopije

Minka Kovač¹, Marjan Bele², Leon Korošec¹, Miha Kovač¹, Nataša Toplak¹, Simon Koren¹, Anja Veronovski¹, Mateja Kokalj³, Barbara Jeršek³, Miha Jeršek⁴, Boris Orel², Anton Kovač¹

¹ Omega d.o.o., Dolinškova 8, 1000, Ljubljana

² Kemijski Inštitut, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana

³ Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

⁴ Prirodoslovni muzej Slovenije, Prešernova 20, 1000 Ljubljana

Minka.kovac@omega.si

V rudniku Sitarjevec pri Litiji so kopali srebrovo, živo srebrovo in cinkovo rudo že v rimskih časih. V nekaterih opuščenih rudniških rovih so zrastle številni Fe-oksidi-hidroksidni kapniki (FeOOH-polimorfi). Različne kapniške strukture najdemo v rovih, nad katerimi se nahajajo žile bogate s sulfidno rudo. Kapniki rastejo zelo hitro (ca 3-5 cm letno) v zelo kislem okolju. pH vode nad kapniki in ob njih je med 3,3 in 3,4, temperatura v rovih je okrog 10 °C, relativna vlažnost je 95 – 99 %. Sklepamo, da h kinetiki rasti kapnikov poleg kemijskega obarjanja, znaten delež prispevajo različni mikroorganizmi prisotni v vodi in rudniškem okolju. Namen raziskave je bil poiskati vzroke za hitro rast kapnikov in poiskati možne interakcije med mikroorganizmi in ioni Fe²⁺ oziroma nukleacijskimi jedri. Kapnik je po prerezu sestavljen iz različnih plasti, na površini prevladujejo močno porozne luskaste plasti - tipične mikrostromatolitne strukture. Posamezna zrna so urejena v grozdaste skupke. Kristali so igličaste oblike, dolgi ca 100-180 nm in široki do 8 -10 nm. Vzorec urejenosti se ponavlja po celotnem prerezu kapnika. Med razpokami in porami najdemo različno dolge mineralizirane paličaste strukture. Elementna analiza kapnika se od mesta do mesta spreminja, večinoma je kapnik sestavljen iz Fe in O. Na mestih, prekritih z mikrobnimi biofilmi je tudi preko 50 % ogljika. Analiza ATR-FTIR je potrdila, da je skorja kapnika prekrita z mikrobo združbo. V notranjosti kapnika je C prisoten v sledovih (okrog 0,2 %). Iz posnetkov SEM opazimo, da se bakterije povezujejo preko zrn in skupkov z EPS (zunaj celične polimerne snovi). Nukleacija oz. obarjanje Fe-kristalov se začne ob ovirah kot so trakovi, mikrobne cevaste tvorbe, kristali soli. Spektri ATR-FTIR nakazujejo interakcije bakterij s površinskimi skupinami FeOOH. Bakterije vplivajo tako na hitrost obarjanja Fe(OH)₃ (kinetiko rasti) kot na morfologijo plasti kapnika.

Ključne besede: FeOOH - polimorfi; SEM-EDS; ATR-FTIR; bakterije; kapniki

Ko se tudi bližnji sorodniki ne marajo – sorodstvena diskriminacija patogenih bakterij *Campylobacter jejuni*

Katarina Šimunović, Sonja Smole Možina, Ines Mandić Mulec

Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

katarina.simunovic@bf.uni-lj.si

Bakterijske interakcije so zanimivo in hitro razvijajoče se področje mikrobiologije. Vendar je znanje na tem področju, in še posebej na področju sorodstvene diskriminacije, kot znotrajvrstne interakcije bakterij, še vedno močno omejeno in v primeru bakterij *Campylobacter jejuni* povsem neraziskano.

Sorodstveno diskriminacijo bakterij *C. jejuni* smo preučili pri kombinacijah 24 sevov, pri katerih smo sorodnost predhodno določili s tipizacijo MLST oz. primerjavo sedmih hišnih genov (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *tkt*, *pgm* in *uncA*). Sevi, ki smo jih najpogosteje osamili iz vzorcev živil, živali in humanih kliničnih vzorcev, so pripadali trem različnim klonskim kompleksom, in sicer ST21, ST45 in ST353. Fenotipsko smo izbranim kombinacijam sevov določili nastanek mejne linije med rojenjem bakterij na mehki agarški plošči (N=24), spremembo koagregacijskega indeksa (N=24) in fitnesa v kokulturi (N=4) glede na monokulturo in raziskali povezavo dobljenih fenotipskih rezultatov in genetske sorodnosti sevov.

Potrdili smo sorodstveno diskriminacijo sevov patogenih bakterij *C. jejuni*, saj so sevi tvorili mejne linije na mehki agarški plošči v odvisnosti od genetske sorodnosti sevov, prav tako se je ta odrazila v povečanem koagregacijskem indeksu v mešanih kulturah manj sorodnih sevov. V kokulturi smo zmanjšanje fitnesa določili pri enem sevu v kombinacijah manj sorodnih sevov.

Rezultati kažejo na sorodstveno diskriminacijo med sevi *C. jejuni* ter tudi tekmovanje med manj sorodnimi sevi. To je novo spoznanje o vedenju patogene bakterije *C. jejuni*, kar je potrebno upoštevati v nadaljnjih študijah bakterijskih interakcij s tem patogenom. Izboljšano razumevanje sorodstvene diskriminacije pri patogenih bakterijah, kot je *C. jejuni*, lahko odpira nove možnosti za omejevanje prenosa kontaminacije in okužb s to bakterijo.

Ključne besede: *Campylobacter jejuni*; znotrajvrstna interakcija sevov; sorodstvena diskriminacija

Desetletje genomike gliv iz ekstremnih okolij

Cene Gostinčar^{1,2}, Metka Lenassi³, Janja Zajc⁴, Martina Turk¹, Jerneja Zupančič¹, Ana Plemenitaš³, Polona Zalar¹, Zewei Song⁵, Nina Gunde-Cimerman¹

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Inštitut za regenerativno medicino Larsa Bolunda, BGI-Qingdao, Qingdao 266555, LR Kitajska

³ Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁵ China National Gene Bank, Dapeng New District, Shenzhen, LR Kitajska

cene.gostincar@bf.uni-lj.si

Sredi leta 2010 smo določili genomsko zaporedje prvega ekstremno halotolerantnega evkarionta. V desetletju, ki je minilo od tedaj, smo od obotavljivih prvih korakov v genomiko prispeli do stopnje, ko po zaslugi hitrega napredka tehnologij visokozmogljivega sekvenciranja hitrosti določevanja glivnih genomov ne določa več dostopnost metod, temveč sta ozko grlo v procesu postala priprava začetnih vzorcev ter znanje in čas, ki ju potrebujemo za analizo podatkov.

Do danes smo v raziskavah gliv iz ekstremnih okolij določili zaporedje več kot 200 genomov. Njihove analize smo se lotili z več pristopi in raziskovalnimi vprašanji. Toleranca na stres, ki je za preživetje v ekstremnih razmerah nujna, je kompleksen fenotip, ki ga zgolj na podlagi genomskega zaporedja ni mogoče razumeti. Zlasti pri iskanju genomske podlage za halotoleranco smo se zato kmalu preusmerili v primerjalno genomiko vrst in sevov z različno sposobnostjo rasti pri visokih koncentracijah soli. Tako smo med drugim ugotovili, da število različnih mehanizmov obrambe pred stresom pri ekstremotolerantnih in ekstremofilnih glivah bistveno presega število pri modelnih vrstah. S pomočjo populacijske genomike smo pokazali, da je razmnoževanje gliv iz ekstremnih okolij ne le zapleteno, temveč tudi zelo raznoliko; in da ta raznolikost vsaj do neke mere sovпада s preživetveno strategijo vrste, ki jo lahko opišemo bodisi kot generalistično, bodisi kot specialistično. Dotaknili smo se tudi uporabnosti genomskega podatkov v biotehnologiji in v taksonomiji.

Eno najpomembnejših spoznanj raziskovalnega dela z genomi je, paradoksalno, da to delo nikakor ne ponuja odgovorov na vsa vprašanja. Kljub temu pa nas lahko s pazljivo izvedenimi analizami in dobro umerjenimi pričakovanji genomika privede do dragocenih odkritij – in še zlasti v primeru slabo raziskanih vrst predstavlja eno najzmogljivejših raziskovalnih orodij, kar jih imamo na razpolago.

Ključne besede: genomika; primerjalna genomika; populacijska genomika; glive; ekstremna okolja

Odziv mikrobne združbe na množično pojavljanje in odmiranje meduz v morju

Tinkara Tinta^{1,2}, Zihao Zhao^{1,3}, Alvaro Escobar¹, Katja Klun², Barbara Bayer^{1,4}, Chie Amano¹, Gerhard J. Herndl^{1,3,5}

¹ Department of Functional and Evolutionary Ecology, Bio-Oceanography Unit, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Althanstrasse 14, 1090 Vienna, Austria

² Marine Biology Station Piran, National Institute of Biology, Piran, 6330, Slovenia

³ Vienna Metabolomics Center, University of Vienna, Althanstrasse, 14, A-1090 Vienna, Austria

⁴ Department of Ecology, Evolution and Marine Biology, University of California, Santa Barbara, CA 93106-9620, USA

⁵ NIOZ, Department of Marine Microbiology and Biogeochemistry, Royal Netherlands Institute for Sea Research, Utrecht University, 1790 AB Den Burg, The Netherlands

tinkara.tinta@nib.si

Oceani in morja, ki predstavljajo največji povezan ekosistem na Zemlji, so nenehno podvrženi številnim naravnim in antropogenim perturbacijam. Kompleksna mešanica raztopljenih organske snovi (ang. DOM) v morju predstavlja enega največjih rezervoarjev ogljika v biosferi in je skoraj izključno dostopna raznolikim skupnostim morskih mikroorganizmov. S svojo visoko presnovno aktivnostjo in številčnostjo mikroorganizmi pomembno vplivajo na biogeokemično stanje oceanov. Za napovedovanje odziva morskih ekosistemov na perturbacije je zato ključno razumevanje mehanizmov razmerja med DOM in metabolnim omrežjem, ki ga upravlja mikrobna skupnost. Eno večjih perturbacij obalnih morskih ekosistemov (in njegovih storitev) predstavlja množično pojavljanje meduz. Zlasti po pojavu množičnih cvetenj, velike količine meduznega detrita predstavljajo pomemben, a sicer močno spregledan, s proteini bogat vir DOM za morske mikroorganizme. Natančni procesi in mehanizmi mikrobne razgradnje detrita meduz ter posledice le-tega za delovanje morskih ekosistemov ostajajo nejasne.

V naši najnovejši raziskavi smo določili sestavo detrita meduze, vrste *Aurelia aurita* s.l., ki se pogosto množično pojavlja v obalnih morjih širom sveta, z uporabo najsodobnejših analitskih orodij. V laboratorijskem eksperimentu smo sledili spremembam sestave meduznega detrita na nivoju posameznih spojin ter jih povezali s presnovnimi procesi, ki jih izvaja mikrobna skupnost, ki razgrajuje meduze, tako da smo združili morską meta- in ekso-proteomiko z metagenomskim pristopom.

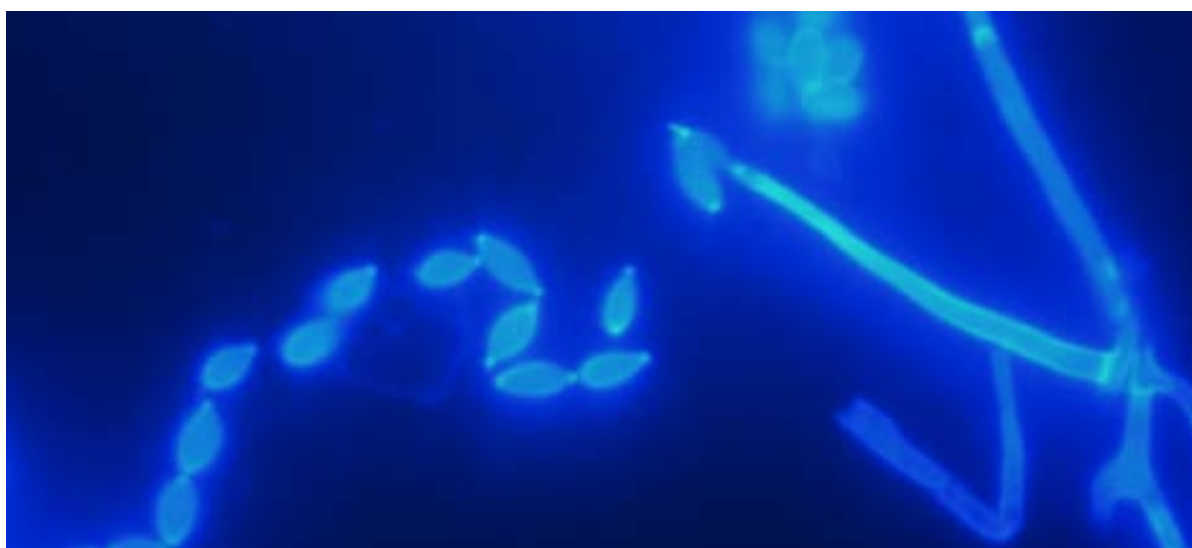
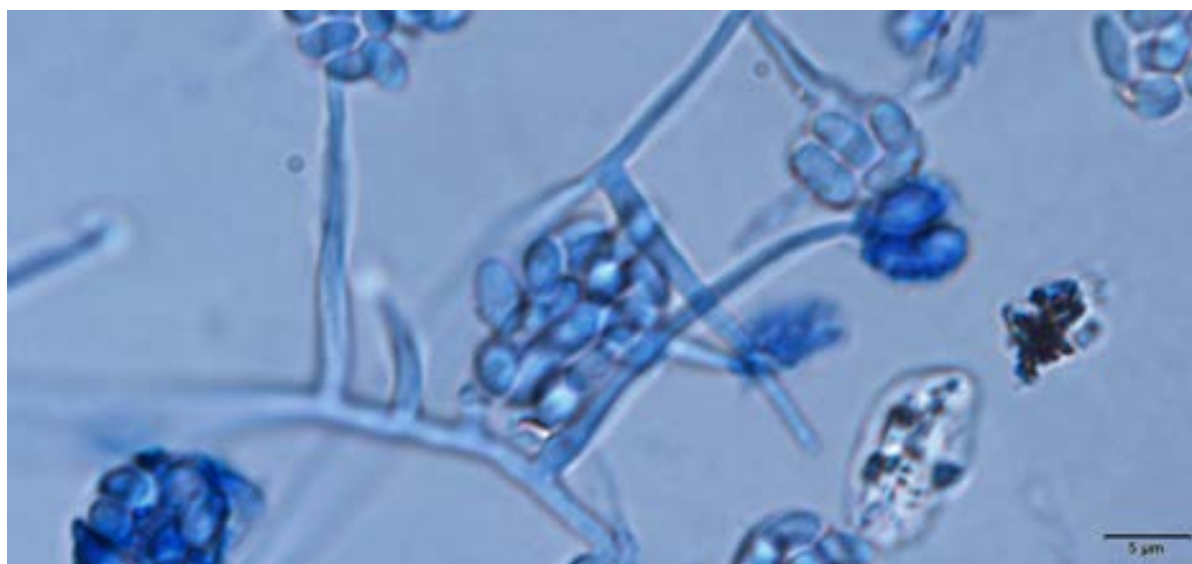
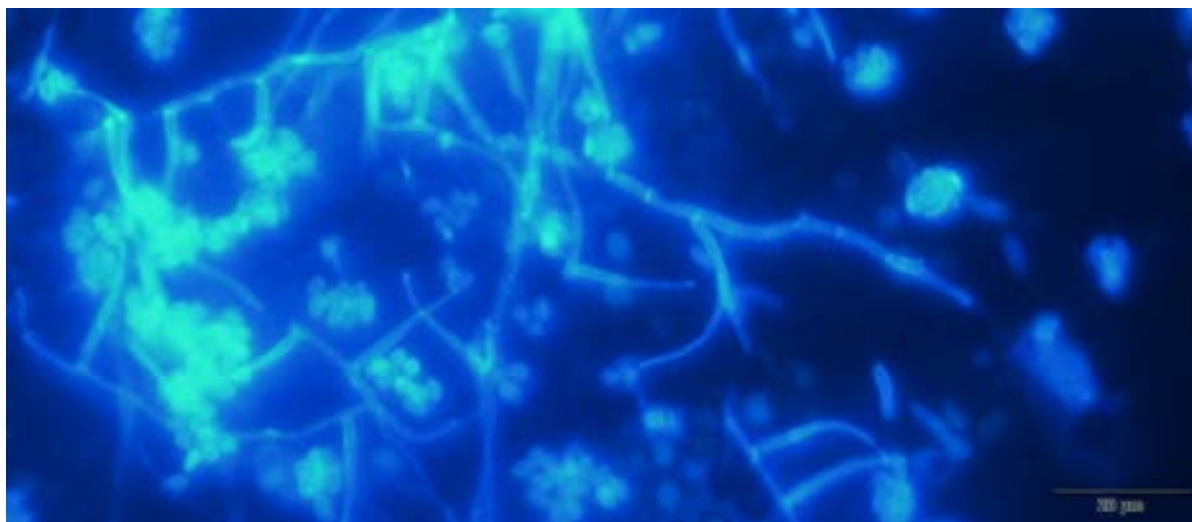
Pokazali smo, da je približno polovica detrita meduz v obliki DOM in torej izključno dostopna mikroorganizmom. Večino labilnega meduznega detrita (> 98% proteinov, ~ 70% aminokislin in celoten raztopljeni organski ogljik) je v < 2 dneh razgradil konzorcij, ki so ga sestavljali *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* in *Vibrio*. Te bakterije, so predstavljale > 90% vseh metabolno aktivnih predstavnikov združbe, ki je razgrajevala meduzni detrit. Naši rezultati kažejo, da se velik del meduznega detrita prenese v biomaso oportunističnih bakterij, z visoko učinkovitostjo rasti, in da mikrobna razgradnja meduznega detrita vodi do kopičenja anorganskih nutrientov, s potencialno pomembnimi posledicami za biogeokemične cikle v morju.

Ključne besede: množični pojav meduz; morske mikrobne skupnosti; biogeokemični cikli

Postri

8. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva - 2020

Mikrobi in zdravje



Glive iz rodu *Acremonium* na odtisu plesnive stene (zgoraj in spodaj: optična mikroskopija s fluorescenco; v sredini: optična mikroskopija v vidni svetlobi; povečave: zgoraj: 400 ×, sredina in spodaj: 1000 ×). Slike so nastale na Oddelku za biologijo BF UL (Polona Zalar).

Probiotiki za nadzor kontaminacije rej perutnine s kampilobaktri in salmonelami

Jana Avberšek, Darja Kušar, Maja Kavalič, Jasna Mićunović, Igor Gruntar, Bojan Papić, Olga Zorman Rojs, Tina Pirš, Matjaž Ocepek

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

jana.avbersek@vf.uni-lj.si

Bakterije iz rodov *Campylobacter* in *Salmonella* so glavni povzročitelji s hrano prenosljivih enteritisov pri ljudeh. Alternativni pristop za zmanjševanje kolonizacije črevesja perutnine s temi bakterijami je uporaba probiotikov. V okviru naše raziskave smo ugotavljali stopnjo kontaminacije s kampilobaktri in *S. Infantis* na farmah brojlerjev v povezavi z dvema različnima aplikacijama probiotika PoultryStar (Biomin).

Izbrali smo dve farmi, vsako s šestimi hlevi, ki smo jih razdelili v tri poskusne skupine. Živalim iz prve skupine smo dodajali probiotik v vodo za pitje in uporabili probiotik za škropljenje piščancev ob vselitvi v hlev, živalim iz druge skupine smo dodajali probiotik v krmo, tretja skupna pa je bila kontrolna (brez probiotika). Pri starosti 3, 8, 20 in 33 dni smo vzorčili cekume brojlerjev ($n = 240$) in vpojne prevleke ($n = 24$) ter izvedli standardno bakteriološko preiskavo na salmonele in kampilobakte. Na koncu vzrejnega cikla brojlerjev smo na klavnici odvzeli po deset vratnih kož piščancev iz posameznega hleva in z metodo PCR v realnem času kvantificirali salmonele in *C. jejuni*.

S. Infantis smo dokazali že pri osem dni starih brojlerjih, medtem ko so bile vpojne prevleke v dveh hlevih pozitivne že po treh dneh vzreje. Kampilobakte smo dokazali po 20. dnevu vzreje. Vpliva dodajanja probiotika na pojav salmonel in kampilobaktrov nismo ugotovili. Vse vratne kože so bile pozitivne na *C. jejuni*, medtem ko smo le v posameznih vzorcih dokazali nizko število salmonel. Ob zakolu živali iz farme 1 je v primeru dodajanja probiotikov število kampilobaktrov v 50 % vzorcev padlo pod mejo kvantifikacije (150 CFU/g kože) v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je bilo število *C. jejuni* v vzorcih iz farme 2 v primerjavi s farmo 1 višje. Po drugi strani pa je bilo v vzorcih iz farme 2 v kontrolni skupini več vzorcev pozitivnih na salmonele v primerjavi s skupinama, ki sta prejemale probiotike.

Pozitiven vpliv probiotikov se kaže predvsem v končni fazi vzreje, tj. pridelavi mesa za potrošnika. Za potrditev preliminarne rezultate in pripravo priporočil za vsakodnevno prakso vzreje perutnine bo treba vključiti še tehnološke posebnosti posameznih rejcev in klavnic, saj se nakazuje njihov pomemben vpliv.

Ključne besede: perutnina; probiotiki; *Salmonella* Infantis; kampilobaktri

Pregled *in vitro* študij in študij, narejenih na živalih, o učinkovitosti uporabe probiotikov kot antagonistov proti patogenom kožnih ran

Sabina Fijan¹, Anita Frauwallner², Tomaž Langerholc³, Bojan Krebs⁴, Jessica A. ter Haar⁵, Adolf Heschl², Dušanka Mičetić Turk^{1,6}, Irena Rogelj⁷

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede, Inštitut za zdravstvo in prehrano, Žitna ulica 15, 2000 Maribor

² Inštitut Allergosan, Gmeinstrasse 13, 8055 Graz, Avstrija

³ Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Pivola 10, 2311 Hoče

⁴ Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 15, 2000 Maribor

⁵ Terhaar Consulting Inc., 36 Anvil Court, Richmond Hill, Ontario L4C 9G6, Kanada

⁶ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Maribor

⁷ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Groblje 3, 1230 Domžale

sabina.fijan@um.si

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki imajo koristne učinke na zdravje gostitelja, kadar jih apliciramo v zadostnem številu. Najbolj poznani so določeni sevi mlečnokislinskih bakterij iz heterogene skupine laktobacilov, ki je z letom 2020 reklasificirana v 25 rodov, in sevi bakterij iz rodu *Bifidobacterium*. Veliko kakovostnih kliničnih študij dokazuje, da probiotiki pomagajo pri različnih prebavnih motnjah, pomagajo lahko tudi pri celjenju ran, anksioznosti, depresiji in luskavici. Mehanizmi delovanja probiotikov vključujejo proizvodnjo bakteriocinov, proizvodnjo kratkoverižnih maščobnih kislin, moduliranje imunskega sistema in drugo. Izvedli smo pregled in analizo literature na tematiko učinkovitosti uporabe probiotikov za inhibicijo patogenov kože, v podatkovnih bazah PubMed/Medline in ScienceDirect. V analizo smo vključili polno dostopne članke in na podlagi vključitvenih in izključitvenih kriterijev smo v končno analizo vključili 14 *in vitro* študij in 8 študij, narejenih na živalih. Najpogosteje uporabljeni probiotični sevi so bili: *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 10241, *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, ter sevi *Limosilactobacillus fermentum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium bifidum*. Njihovo inhibitorno aktivnost so najpogosteje proučevali na patogenih sevih vrst *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus*, osamljenih iz okuženih kožnih ran. V *in vitro* študijah z metodama lise na agarju in metode difuzije na agarju, so ugotovili učinkovito inhibicijo vseh izbranih sevov patogenov. V študijah, narejenih na živalih (miši, podgane, kunci), so na različne vrste ran nanесли patogene bakterije in nato v večini primerov testirali učinkovitost lokalne uporabe probiotikov. Raziskave so pokazale izboljšanje statusa rane živali in zmanjšanje bremenitve s patogeni po aplikaciji mešanice probiotikov. Rezultati kažejo, da imajo lokalno uporabljeni probiotiki potencial proti kožnim patogenom in so zato smiselne nadaljnje raziskave.

Ključne besede: koristni mikroorganizmi; probiotiki; patogeni; antagonizem

Dejavniki virulence in odpornost proti antibiotikom pri humanih kliničnih enterokokih

Majda Golob¹, Urška Dermota², Helena Ribič², Jana Avberšek¹, Mateja Pate¹, Darja Kušar¹, Bojan Papić¹, Irena Zdovc¹

¹ Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, enota Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

majda.golob@vf.uni-lj.si

Enterokoki so pogojno patogeni mikroorganizmi, ki so v zadnjih desetletjih pomembni predvsem kot večkratno odporni povzročitelji z zdravstvom povezanih okužb, povzročajo pa tudi različne okužbe sečil in ran, bakterijski endokarditis, sepso in katetrške okužbe. K njihovi patogenosti pripomorejo tudi številni dejavniki virulence. Zdravljenje enterokoknih okužb je težavno zaradi njihove naravne in/ali pridobljene odpornosti proti številnim skupinam antibiotikom. Najpomembnejši vrsti v humani medicini sta *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*.

V raziskavi smo ugotavljali dejavnike virulence in odpornost proti antibiotikom pri izolatih *E. faecalis* (n = 71) in *E. faecium* (n = 30), pridobljenih iz različnih kliničnih vzorcev ljudi. Proti vankomicinu odporni enterokoki niso bili del raziskave. Z metodo PCR smo ugotavljali prisotnost genov za sedem najpogostejših dejavnikov virulence (*asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, *hyl*, *efaA* in *ace*). Z mikrodilucijsko metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije smo analizirali občutljivost za 12 različnih antibiotikov iz devetih različnih skupin.

Gene za dejavnike virulence smo statistično pogosteje ugotovili pri izolatih *E. faecalis*, razen gena *hyl*. Pri izolatih *E. faecalis* smo ugotovili 14 različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *ace-asa1-cylA-efaA-esp-gelE*, medtem ko smo pri izolatih *E. faecium* ugotovili 6 različnih virulenčnih tipov z najpogostejšim vzorcem *esp-hyl*. Največji delež odpornosti smo ugotovili pri izolatih *E. faecium*, med katerimi jih je bilo več kot 70% odpornih proti trem ali več različnim skupinam antibiotikov (VOB, večkratno odporne bakterije), najpogosteje proti eritromicinu (76,7%), ampicilinu in ciprofloksacinu (oba 70%). V skupino VOB smo uvrstili tudi 29,6% izolatov *E. faecalis*, z največjim deležem odpornosti proti tetraciklinu (78,9%).

Enterokoki kot normalni predstavniki črevesne mikrobiote predstavljajo stalen rezervoar za okužbe ljudi, nabor ustreznih antibiotikov za zdravljenje pa je precej omejen. To velja še posebej za vrsto *E. faecium*, pri kateri smo v raziskavi potrdili zelo velik delež večkratno odpornih izolatov. Manj odpornih sevov je bilo pri vrsti *E. faecalis*, vendar pa smo pri teh izolatih dokazali številne gene za dejavnike virulence, ki igrajo pomembno vlogo pri nastanku okužb.

Ključne besede: klinični humani enterokoki; odpornost proti antibiotikom; dejavniki virulence

Vpliv raznolikosti nabora površinskih proteinov na sposobnost tvorjenja biofilmov *Listeria* spp. na abiotskih površinah

Nika Janež, Blaž Škrlj, Jerica Sabotič

Inštitut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

nika.janez@ijs.si

Površinski proteini so raznolika skupina proteinov, ki se nahajajo na stiku med mikrobno celico in okoljem. Udeleženi so v procesih zaznavanja in obrambe pred zunanjimi vplivi, ključno vlogo imajo tudi pri pritrjevanju na različne površine ter pri invaziji in patogenezi. Bakterije iz rodu *Listeria* so ubikvitarne, najbolj preučena vrsta pa je *L. monocytogenes*, saj povzroča okužbe s hrano, kjer so zapleti zelo pogosti. Njej filogenetsko najbližja vrsta je *L. innocua*, ki pa nima virulenčnih faktorjev, in jo zato pogosto omenjajo kot modelni organizem za *L. monocytogenes*. Obe vrsti sta zelo odporni na okoljske strese, rasteta pri temperaturi hladilnika ter tvorita biofilme na raznovrstnih površinah. Pri procesu pritrjevanja in rasti biofilma so dokazano udeleženi mnogi površinski proteini, *L. monocytogenes* pa je znana po tem, da v genomu nosi največ zapisov za površinske proteine med grampozitivnimi bakterijami. V tem delu smo zato primerjali genoma ter nabor površinskih proteinov, ki jih najdemo v modelnih sevih *L. monocytogenes* ATCC 19115 in *L. innocua* ŽM39. Za obe vrsti smo ugotovili dinamiko rasti biofilma na abiotskih površini ter analizirali sestavo ter zgradbo biofilma. Podatke smo na osnovi genetskih omrežij povezali z literaturnimi podatki in predvideli kako razlike v naboru površinskih proteinov vplivajo na sposobnost tvorbe biofilma ter njegove značilnosti.

Ključne besede: *Listeria*; biofilm; površinski proteini

Značilnosti kolonizacije zdrave in aknaste kože z bakterijami *Cutibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* ter njihovimi bakteriofagi

Nika Janež¹, Maja Štokelj¹, Jasmina Tušar¹, Kristina Nemec¹, Silvija Špehar², Valerija Balkovec³, Matjaž Peterka¹

¹ COBIK, Tovarniška cesta 26, 5270 Ajdovščina

² Hemtouch d.o.o., Podbreznik 15, 8000 Novo mesto

³ Splošna bolnišnica Novo mesto, Šmihelska cesta 1, 8000 Novo mesto

matjaz.peterka@cobik.si

Stabilna mikrobiota človeške kože je pomembna tudi z vidika zaščite pred okužbami, ki so posledica invazije patogenih bakterij, gliv ali virusov. Čeprav še ni popolnoma dokazano, na ravnovesje v kožni mikrobioti vplivajo tudi bakteriofagi. Na zdravi človeški koži prevladujejo bakterije iz rodov *Cutibacterium* in *Staphylococcus* in kljub temu, da gre za nepatogene in stabilne člane združbe, ju pogosto omenjajo kot povzročitelja mnogih ortopedskih okužb in aken.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti značilnosti kolonizacije zdrave in aknaste kože z omenjenima bakterijskima rodovoma ter njunimi bakteriofagi ter potencialni vpliva pri razvoju te kožne bolezni.

V vzorcih zdrave kože (6 prostovoljcev) smo ugotovili prisotnost tako bakterij *C. acnes* kot tudi *S. epidermidis* skupaj z bakteriofagi specifičnimi za *C. acnes*. Le v enem od njih je bil prisoten tudi bakteriofag specifičen za *S. epidermidis*. Genotipizacija pridobljenih sevov je pokazala, da sevi vrste *C. acnes* sodijo v skupino I, prevladujoči MLST tip *S. epidermidis* pa je bil ST73. V vzorcih aknaste kože (13 prostovoljcev) je bila *C. acnes* prisotna le v 38 % primerih in pridobljene bakterije iz rodu *Staphylococcus* smo v vrsto *S. epidermidis* lahko uvrstili le v 69 % primerih. Iz teh vzorcev smo lahko osamili le bakteriofage specifične za *C. acnes*, ki pa so si bili med seboj zelo podobni glede na litični spekter in morfologijo. Ta je bil neobičajno širok, saj so bakteriofagi delovali litično na večino sevov iz te študije. Nasprotno pa je bakteriofag specifičen za *S. epidermidis* deloval litično le proti sevom ST73.

Rezultati študije nakazujejo, da je sestava mikrobiote zdrave človeške kože med različnimi ljudmi, ki ne bivajo skupaj, zelo podobna. Na njej sobivajo tako bakterije *C. acnes*, *S. epidermidis* kot tudi bakteriofagi specifični za *C. acnes*. Na aknasti koži je to ravnovesje porušeno, razloge pa bomo poiskali v nadaljnjih študijah.

Ključne besede: *Cutibacterium*; *Staphylococcus*; bakteriofagi; akne; koža

Analize genomskih zaporedij za slednje prenosov medicinsko pomembnih mikroorganizmov

Sandra Janežič^{1,2}, Aleksander Mahnič¹, Alenka Štorman¹, Marija Trkov¹, Maja Rupnik^{1,2}

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

² Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

sandra.janezic@nlzoh.si

Sekvenciranje in primerjava genomskih zaporedij trenutno predstavlja pristop s katerim lahko zelo natančno opredelimo izolate kot sorodne ali nesorodne. Predvsem na področju javnozdravstvene mikrobiologije je primerjava genomskih zaporedij že postala metoda izbora za tipizacijo izolatov za potrebe raziskovanja izbruhov in sledenja prenosov.

Na Oddelku za mikrobiološke raziskave, NLZOH, uporabljamo primerjave genomskih zaporedij na različnih področjih in za različne mikroorganizme. Raziskovalno nas zanima predvsem epidemiologija bakterije *Clostridioides difficile* v povezavi z iniciativo Eno zdravje. V sodelovanju z drugimi oddelki NLZOH in drugimi inštitucijami pa pristope primerjalne genomike največkrat uporabimo za sledenje prenosov in tipizacije *in silico* medicinsko pomembnih mikroorganizmov. Genome sekvenciramo s sistemom MiSeq (Illumina). Za določanje sorodnosti izolatov pa največkrat uporabljamo pristop analize polimorfizmov posameznih nukleotidov (analiza SNV) ali primerjave alelnega profila jedra genoma (cgMLST). V prispevku predstavljamo nekaj primerov iz naše prakse.

V nedavni raziskavi smo pokazali, da so podplati obuval v bolnišničnem okolju pogosto kontaminirani s sporami bakterije *C. difficile*, ter da lahko podplati igrajo pomembno vlogo pri prenosu spor v bolnišnici. Prav tako pa lahko predstavljajo tudi nevarnost za okužbe hospitaliziranih bolnikov, saj so izolati iz podplatov gensko sorodni z izolati, ki jih izoliramo iz bolnikov. Prav tako raziskujemo ali je povečanje števila okužb s *C. difficile* PCR ribotipom 150 v Sloveniji posledica širjenja določenega klona, ter kaj so potencialni rezervoarji tega ribotipa. S pristopom primerjalne genomike in SNV analizo smo npr. pokazali, da je prišlo do prenosa okužbe z bakterijo *S. aureus* iz matere na dojenčka, vir okužbo pa je bilo materino mleko. V primeru nedavnega izbruha okužb z monofazno *Salmonella* Typhimurium smo potrdili, da je za izbruh v Sloveniji odgovoren en klon, ki pa ni soroden sevom, ki po povzročali izbruhe v drugih evropskih državah. Vpeljano imamo metod genoserotipizacije salmonel. Tekom epidemije COVID19 smo vpeljali tudi metagenomski pristop sekvenciranja SARS-CoV-2.

Ključne besede: NGS; SNV analiza; prenos

Detekcija SARS-CoV-2 RNK v bolnišničnih odpadnih vodah

Tom Koritnik¹, José Gonçalves¹, Verica Mioč¹, Marija Trkov¹, Katarina Prosenc Triar¹, Metka Paragi¹, Bojana Beović²

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano; Center za medicinsko mikrobiologijo, Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo
Ljubljana, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana

² Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

Tom.koritnik@nlzoh.si

Pandemija koronavirusne bolezni (COVID-19) je aktualna tematika. Bolezen povzroča virus SARS-CoV-2, klinično pa jo zaznamo z RT-qPCR. Pomanjkljivost takšne detekcije je, da moramo ciljati na posameznike, ki razvijejo simptome, težje pa je diagnosticirati posameznike, katerih bolezen je asimptomatska. V preteklosti so na primerih virusov SARS-CoV in MERS-CoV dokazali, da se virusni delci in/ali RNK izločajo s človeškimi iztrebki. Za SARS-CoV-2 je že bilo dokazano, da se tako izloča pri simptomatskih in asimptomatskih posameznikih. Za oceno razširjenosti virusa pri določeni populaciji lahko uporabimo epidemiologijo na osnovi odpadnih voda. Ta pristop je bil že uporabljen za odkrivanje RNA SARS-CoV-2 v več študijah na območjih z visoko prevalenco okužb. V času vzorčenja je bilo na preučnem območju le malo posameznikov z diagnozo COVID-19.

Odvzeli smo 15 24-urnih kumulativnih vzorcev na Kliniki za nalezljive bolezni in vročinska stanja v Ljubljani (IK). Vzorce smo analizirali na dva načina: 1) ekstrakcija RNA in detekcija z RT-qPCR neposredno iz odpadne vode; in 2) koncentracija virusnih delcev / RNA s centrifugalnimi filtri Amicon® Ultra-15, čemur je sledila ekstrakcija RNA in detekcija z RT-qPCR.

Testirali smo dve velikosti filtrov (30 kDa in 10 kDa) za katera se je izkazalo, da sta bila uspešna. 10 kDa filtri so bili učinkovitejši od 30 kDa. Virusna RNA je bila zaznana iz bolnišnične odpadne vode, ko je bilo na IK prisotnih le nekaj pozitivnih posameznikov. Preizkušene metode koncentracije so učinkovito orodje za koncentracijo SARS-CoV-2 pred molekularno detekcijo.

To je prva študija opravljena z vzorci odpadne vode iz največje bolnišnice z nalezljivimi boleznimi v Sloveniji, za katere smo pričakovali pozitivne rezultate. Tudi v bolnišnični odpadni vodi je korak koncentracije pred molekularnim odkrivanjem z RT-qPCR ključnega pomena. Testirana metoda koncentracije je učinkovita, vendar je potrebna nadaljnja optimizacija. Kljub temu je uporabna tudi za območja z majhnim številom posameznikov, okuženih s SARS-CoV-2.

Ključne besede: COVID-19; SARS-CoV-2; odpadna voda

Genotipizacija sevov vrste *Escherichia coli*, izoliranih iz kraških vodonosnikov

Kaja Kotnik¹, Janez Mulec², Jerneja Ambrožič Avguštin¹

¹ Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, Titov trg 2, 6230 Postojna

Jerneja.Ambrozic@bf.uni-lj.si

Za ugotavljanje kakovosti in čistosti pitnih vod se navaja število *E. coli*, ne pa podatka o dejanskem patogenem potencialu, ki ga deloma lahko ovrednotimo na osnovi prisotnosti genov za dejavnike virulence (DV). Kraški vodonosniki zagotavljajo kar 50% pitne vode za vodooskrbo Slovenije, vendar so zelo ranljivi za onesnaževanje. V raziskavi smo preverili prisotnost genov za DV pri sevih *E. coli*, ki so bili pridobljeni iz različnih vodnih teles na krasu, med njimi je bilo tudi zajetje pitne vode izvira Malenščica. Vse seve smo fenotipsko testirali za odpornost proti 7 antibiotikom (AB). Z metodo ERIC-PCR smo izločili klonalne izolate, vzorčene na isti lokaciji v istem dnevu. Z reakcijo PCR smo 100 izolatov, ki smo jih vključili v nadaljnje analize, uvrstili v filogenetske skupine. Za vsak izolat smo preverili prisotnost 44 genov za DV.

Ugotovili smo, da se je celokupno največ izolatov uvrstilo v filogenetsko skupino B1 (36%), sledili pa so izolati skupin A (32%), B2 (22%) ter D (10 %). Med najpogostejše potrjenimi geni za DV so bili poleg *fimH* (98%) in *crl* (97%) še *irp2* (41%), *fyuA* (34%), *traT* (26%), *fluA* ter *kpsMTII* (23%), *iroN* (21 %) in *hra* (20 %). Po številu genov za DV so izstopali nekateri izolati, še posebej na lokacijah izvira Malenščice (22 genov), sledijo izolati iz reke Reke (Škocjanske jame) z 20 geni, Raka (Planinska jama) in reke Pivke (Postojnski jamski sistem) z 18 geni. Čeprav je bil delež proti AB odpornih izolatov relativno nizek (10%), je zaskrbljujoče, da je bil edini proti vsem AB odporen sev izoliran iz izvira Malenščice, ki služi za vodooskrbo prebivalstva na Postojnskem in Pivškem. Rezultati raziskave nakazujejo, da so v kraških vodah raznoliki sevi *E. coli*, nekateri tudi s številnimi DV, ki so značilni za humane in živalske patogene.

Ključne besede: *E. coli*; dejavniki virulence; kras

Raznolikost izolatov *Paenibacillus larvae* znotraj istega čebelarstva

Darja Kušar, Bojan Papić, Alenka Žugelj, Mira Jenko Rogelj, Urška Zajc, Jana Avberšek, Majda Golob, Maja Lepen, Metka Pislak Ocepek, Matjaž Ocepek, Irena Zdovc

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

darja.kusar@vf.uni-lj.si

Paenibacillus larvae je povzročitelj hude gnilobe čebelje zalege, zelo nalezljive bakterijske bolezni, ki lahko vodi v propad čebeljih družin. Sekvenciranje celotnega genoma (WGS) se uveljavlja kot metoda izbora za tipizacijo bakterij, vključno s *P. larvae*. Sestavni del preiskav izbruhov je postavitve meje za zamejitev genetsko ozko sorodnih in epidemiološko povezanih izolatov. Raznolikost izolatov *P. larvae* znotraj istega vzorca, čebelnjaka ali čebelarstva je slabo poznana.

V tej raziskavi smo ugotavljali genetsko raznolikost izolatov iz enega čebelarstva s tremi čebelnjaki. Izolate smo pridobili jeseni 2019 iz vzorcev bolne zalege in pripadajočega medu, v sklopu preiskave izbruha hude gnilobe. Pri treh vzorcih medu smo tipizirali po pet izolatov, iz zalege pa po enega. Vse izolate ($n = 40$) smo tipizirali z metodo ERIC-PCR in na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) v celotnem genomu z orodjem Snippy. Filogenetsko drevo smo izrisali z orodjem RAxML.

Vsi izolati so pripadali tipu ERIC II. Povprečna raznolikost znotraj čebelarstva je bila 13 polimorfizmov SNP (razpon 0–27); največja raznolikost (27 SNP) je bila dosežena že znotraj enega čebelnjaka. Povprečna raznolikost znotraj posameznega vzorca medu je znašala od 10, 12 in 16 polimorfizmov SNP. Filogenetsko drevo ni pokazalo jasnega razvrščanja izolatov glede na pridružene podatke (vrsta vzorca, čebelnjak ali panj). Potrdili smo monoklonalno naravo izbruha, kar potrjuje prenos seva *P. larvae* znotraj čebelarstva.

Za opredelitev gruče izolatov, ki je povzročila izbruh, moramo upoštevati ugotovljeno genetsko raznolikost znotraj vzorca, čebelnjaka in čebelarstva. Naše ugotovitve predstavljajo pomemben doprinos k razumevanju genetske raznolikosti epidemiološko in mikrobiološko povezanih izolatov *P. larvae*.

Ključne besede: huda gniloba čebelje zalege; *Paenibacillus larvae*; sekvenciranje celotnih genomov (WGS)

Različni tipi disbioze v črevesni mikrobioti

Aleksander Mahnič¹, Maja Rupnik^{1,2}

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

² Medicinska fakulteta Maribor, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

aleksander.mahnic@nlzoh.si

Črevesna mikrobiota spada med bolj raziskane populacije mikroorganizmov pri človeku. Na Oddelku za mikrobiološke raziskave (NLZOH) imamo postavljeno platformo za analizo kompleksnih bakterijskih in glivnih združb ter obširno bazo sestave črevesne mikrobiote za populacijo zdravih prostovoljcev ter oseb z naborom različnih bolezenskih stanj, vključno s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi.

Mikrobne združbe v celotni bazi so bile primerjane glede na dostopne meta-podatke ter neodvisno od znanih parametrov z uporabo nenadzorovane metode gručenja (strojno učenje) z namenom določanja mikrobnih zapisov značilnih za zdravo ali porušeno mikrobioto.

Porušenje ravnovesja v črevesni mikrobioti je bilo opaženo izključno pri posameznikih z zdravstvenimi težavami in se je kazalo v dveh razločnih tipih disbioze. Tipa sta bila neodvisna od lastnosti posameznika ter osnovnih bolezenskih stanj, temveč povezana predvsem s stopnjo vnetja. Za prvi tip je bil značilen porast enterokokov, za drugi pa porast enterobakterij. Pri obeh tipih smo opazili značilen upad v prisotnosti jedrne združbe. Disbioza je bila v primeru glivne združbe definirana izključno s porastom različnih vrst iz rodu *Candida*. Delež obolelih, med drugim tudi kronični vnetni črevesni bolniki v zagonu, niso kazali očitnih znakov porušanja. Pri teh smo zaznali manjši upad v zastopanosti rodov *Faecalibacterium* ter *Roseburia*, zastopnikov jedrne združbe, katere predlagamo kot potencialne označevalce za zgodnje zaznavanje disbioze.

Oba različna tipa značilne disbioze tako omogočata kolonizacijo tistih skupin, ki imajo velik potencial za razvoj oziroma pridobivanje genov za odpornost proti antibiotikom. To kaže na pomen porušene mikrobiote kot rezervoarja za protimikrobno odpornost ter vzdrževanje zdrave mikrobiote kot tarče za obvladovanje širjenja protimikrobne odpornosti.

Ključne besede: črevesna mikrobiota; disbioza; kronične vnetne črevesne bolezni

Analize odpadnih voda za spremljanje epidemije novega koronavirusa v Sloveniji

Olivera Maksimović Carvalho Ferreira^{1,2}, Katarina Bačnik^{1,2}, Zala Kogej¹, Denis Kutnjak¹, Nataša Mehle¹, Mojca Milavec¹, Maja Ravnikar^{1,3}, Ion Gutiérrez-Aguirre¹

¹ Nacionalni Inštitut za Biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Jamova cesta 39, Ljubljana, Slovenija

³ Univerza v Novi Gorici, Vipavska 13, Nova Gorica, Slovenija

katarina.bacnik@nib.si

Trenutna pandemija COVID-19 je pripeljala do uvedbe številnih ukrepov za preprečevanje širjenja virusa, pri čemer testiranje in zaznavanje virusa predstavljata osnovo za razumevanje poteka epidemije. Nedavna potrditev, da se SARS-CoV-2 izloča z blatom okuženih posameznikov v zgodnjih fazah okužbe in ne glede na simptome bolezni, je odprla možnost za uporabo tako imenovane epidemiologije odpadnih voda, ki temelji na analizah odpadne vode, za spremljanje prisotnosti in širjenja virusa v določenem okolju oziroma populaciji ljudi. Študije iz tujine, večinoma izvedene v regijah z visoko incidenco COVID-19, so potrdile prisotnost virusa v odpadni vodi že zgodaj ob pojavu prvih primerov okužb, vendar vedno v izredno nizkih koncentracijah. Tudi pri nas smo konec marca začeli z vzorčenjem in analizami dotokov šestih čistilnih naprav iz različnih predelov Slovenije. V ta namen raziskujemo različne načine koncentriranja vzorcev vod (Centricone®, Vivacell®, CIM® monolitna kromatografija) ter validirali visoko občutljive qPCR in ddPCR teste, ki temeljijo na različnih tarčnih genih virusnega genoma (N1, N1, E, RdRp). Pri tem smo uporabljali ustrezne referenčne materiale, kot so inaktivirani delci SARS-CoV-2 in virusna RNA. Prve analize aprilskih vzorcev odpadne vode so pokazale nizke koncentracije virusa v odpadni vodi; pozitivnih je bilo le nekaj vzorcev, kar pripisujemo nizkemu številu okužb v Sloveniji. Nadaljujemo z vzorčenjem na različnih lokacijah ter optimizacijo postopkov analize, ki bi omogočala testiranje večjih volumnov odpadne vode, s čimer bi se povečala verjetnost za detekcijo virusa in spremljanje trenda naraščanja oziroma upadanja koncentracij virusa. Glede na trenutno situacijo je razvoj učinkovitih metod za analizo odpadnih voda pomemben, saj ta predstavlja komplementaren način spremljanja zgodnjega pojavljanja okužb, širjenja virusa SARS-CoV-2 ter ugotavljanja učinkovitosti ukrepov, ter upošteva tako simptomatske kot asimptomatske posameznike in je neodvisen od izbire in števila testiranih oseb.

Ključne besede: SARS-CoV-2; odpadne vode; epidemiologija odpadnih voda

Higiensko stanje v izbranih enotah vrtcev

Maša Štrakl¹, Urška Jamnikar-Ciglencečki², Stanka Vadnjal², Majda Biasizzo², Urška Henigman², Mojca Jevšnik¹

¹ Zdravstvena fakulteta Univerze v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana

² Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

strakl.masa@gmail.com

Število otrok v vrtcih nenehno narašča, pri čemer se posledično poveča izpostavljenost mikroorganizmom in nalezljivim boleznim. Vrtci predstavljajo okolje, ki je idealno za širjenje nalezljivih bolezni. Namen raziskave je bil analizirati higiensko stanje površin, opreme, igrač in rok strokovnih delavk ter ugotoviti higienske navade glede umivanja rok pri strokovnih delavcih in otrocih prvega starostnega obdobja.

S pomočjo opazovalne liste smo izvedli opazovanje strokovnih delavk, kako si med delovnim procesom umivajo in po potrebi razkužujejo roke. Istočasno smo pri otrocih prvega starostnega obdobja opazovali, kako izvajajo umivanje rok med bivanjem v vrtcu. V izbranih vrtcih smo z odvzemom vzorcev brisov na snažnost iz vnaprej določenih vzorčnih mest ugotavljali prisotnost bakterij *Staphylococcus aureus*, streptokokov, enterobakterij in SŠMO pred in po izvedenem čiščenju ter morebitnem razkuževanju.

Z odkritim opazovanjem smo ugotovili, da strokovne delavke ustrezno skrbijo za higiensko prakso, prav tako so v veliko pomoč otrokom pri umivanju rok. Iz rezultatov brisov rok vzgojiteljic in pomočnic vzgojiteljic je razvidno, da je bila bakterija *Staphylococcus aureus* poleg streptokokov in enterobakterij najpogostejše prisotna na rokah vzgojiteljic in v enem primeru pri pomočnici vzgojiteljice. Na določenih površinah so bili po čiščenju največkrat najdeni streptokoki, sledile so bakterije *Staphylococcus aureus* in enterobakterije.

V vrtcih je vzdrževanje higiene površin, opreme in igrač zelo pomembno, vključno z doslednim umivanjem in po potrebi razkuževanjem rok strokovnih delavk in umivanjem rok otrok. Tako strokovne delavke kot otroci bi za doseg učinkovito umitih rok morali podaljšati čas umivanja rok. Obstoječa načrta čiščenja in razkuževanja površin, opreme ter igrač sta v izbranih vrtcih ustrezno tehnično pripravljena, vendar izvedba čiščenja v enem vrtcu ni bila dovolj učinkovita.

Ključne besede: vrtci; bakterije; higiena; umivanje rok; razkuževanje rok; čiščenje; razkuževanje

Pojavljjanje glive *Cryptococcus neoformans* sensu lato na drevesnih vrstah v Sloveniji

Rok Tomazin, Nika Božič, Tadeja Matos

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

rok.tomazin@mf.uni-lj.si

Cryptococcus neoformans sensu lato so ene izmed najpomembnejših patogenih kvasovk, ki povzročajo okužbe pri imunokompromitiranih bolnikih. Tradicionalno povezujemo *C. neoformans* sensu lato z golobjimi iztrebki v urbanih okoljih, vendar novejši podatki kažejo, da lahko najdemo to glivo tudi v ruralnem okolju, v povezavi z nekaterimi drevesnimi vrstami. Namen raziskave je bil ugotoviti prisotnost in vrstno zastopanost kriptokokov na drevesih v različnih delih Slovenije.

V raziskavo smo vključili 332 vzorcev, ki so vključevali listje, lubje, plodove, prst v neposredni bližini vzorčenih dreves, ptičje iztrebke na drevesih ter brise votlin in razpok na površini dreves. Vzorčena drevesa so pripadala rodovom *Platanus*, *Pinus*, *Betula*, *Prunus* in *Vitis*. Vzorčili smo v šestih statističnih regijah Slovenije. Odvzeli smo 267 brisov lubja, razpok in votlin. Vzorčili smo z bombažnimi brisi, ki smo jih vstavili v 5mL raztopine kloramfenikola (10mg/L). Po vorteksiranju in usedanju smo 100µL supernatanta konfluentno nanesli na agarne plošče z izvlečkom semen abesinske gizotije (NSA). Odvzeli smo 65 trdih vzorcev (plodovi, prst, listje, lubje): 5g vzorca smo fragmentirali v terilnici in prelili s 50mL raztopine kloramfenikola. Po usedanju smo 100µL supernatanta konfluentno nanesli na NSA. Plošče smo inkubirali 10 dni pri 37°C in jih vsakodnevno pregledovali. Temnorjave kolonije smo identificirali z MALDI-TOF MS po proizvajalčevih navodilih.

Glivo *C. neoformans* sensu lato smo osamili iz treh pinij (*Pinus pinea*) in ene oljke (*Olea europea*) v Obalno-Kraški statistični regiji, kar predstavlja 1,2% vseh vzorcev. Izolate smo identificirali kot *C. neoformans* sensu stricto (prej *C. neoformans* var. *grubii*). Vse izolate smo osamili iz razpok in votlin na površini dreves.

Na drevesih mediteranskega dela Slovenije nam je uspelo dokazati vrsto *C. neoformans* sensu stricto, ki je prisotna v majhnem deležu vzorcev. Submediteranska flora v Sloveniji tako predstavlja potencialni vir kriptokoknih okužb.

Ključne besede: *Cryptococcus*; Slovenija; vir okužb

Uporaba metode sekvenciranja naslednje generacije v javnozdravstvenem laboratoriju

Marija Trkov¹, Tamara Kastrin¹, José Gonçalves¹, Tom Koritnik¹, Verica Mioč¹, Metka Paragi¹

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana

marija.trkov@nlzoh.si

Sekvenciranje naslednje generacije (NGS) se uveljavlja kot osnovna metoda spremljanja javnozdravstveno pomembnih povzročiteljev nalezljivih bolezni, kar je poglavitna naloga Oddelka za javnozdravstveno mikrobiologijo (OJM) Ljubljana, NLZOH. V primerjavi z drugimi metodami genotipizacije ima velik potencial za prepoznavanje porajajočih se nevarnosti za javno zdravje, identifikacijo in tipizacijo bakterij in drugih mikroorganizmov, ugotavljanje sorodnosti, njihove virulence in odpornosti proti protimikrobnim zdravilom.

Na OJM Ljubljana tipiziramo različne javnozdravstveno pomembne povzročitelje nalezljivih bolezni, osamljene iz humanih in drugih vzorcev. Genome bakterij, kot so *Listeria monocytogenes*, verocitotoksigena *E. coli* (VTEC), *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter*, *Brucella*, *Klebsiella*, sekvenciramo s sistemom MiSeq (Illumina). Za ugotavljanje sorodnosti izolatov najpogosteje uporabljamo analizo na osnovi primerjave alelnega profila jedra genoma (cgMLST) in analizo polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP). Iz podatkov celotnega genoma za posamezen izolat pa poleg genetskih študij tipizacije in sorodnosti, analiziramo tudi funkcionalno genomiko, zlasti proučevanje antigenov, povezanih s cepivi in s protimikrobno odpornostjo.

V sodelovanju z laboratoriji NLZOH, Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, medicinskimi laboratoriji nekaterih bolnišnic in Nacionalnim inštitutom za javno zdravje (NIJZ) zbiramo in tipiziramo izolate iz vse države. Tako smo osnovali obsežne zbirke izolatov in baze podatkov o lastnostih izolatov. Podatkom, ki jih pridobivamo z drugimi metodami, stalno dodajamo podatke, ki jih pridobivamo s sekvenciranjem. Za namene nacionalnega spremljanja smo izvedli sekvenciranje celotnega genoma 89 invazivnih izolatov *N. meningitidis*, prejetih v obdobju 2010 – 2020. Naše baze med drugim obsegajo sekvence okrog 140 invazivnih izolatov *L. monocytogenes*, nad 80 izolatov salmonel in 25 izolatov VTEC. Te podatke posredujemo Evropskemu centru za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC), ter z njim tesno sodelujemo pri spremljanju nalezljivih bolezni, hitremu odzivanju, obravnavi in razjasnjevanju izbruhov tako v Sloveniji kot tudi v Evropi in svetu. Analiziranje genomov predstavlja izziv in se že uveljavlja kot metoda izbora za poglobljeno spremljanje javnozdravstveno pomembnih mikroorganizmov.

Ključne besede: NGS; javnozdravstveni laboratorij; spremljanje

Razvoj in optimizacija qPCR testov za določanje glive *Phyllosticta citricarpa* v vzorcih zraka in dežja

Janja Zajc^{1,2}, Sara Fišer¹, Maja Ravnikar¹, Antonio Vincent³, Neil Boonham⁴, Polona Kogovšek¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, Slovenija

³ IMA, Moncada, Spain

⁴ Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

polona.kogovsek@nib.si

Askomicetna gliva *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa je ekonomsko pomemben patogen, ki povzroča črno pegavost vseh vrst agrumov (Citrus black spot, CBS). Bolezen se kaže z lezijami na listih in poganjkih, prezgodnjim odpadanje plodov ter pegavostjo na plodovih, ki niso primerni za trg. Razvoj in epidemiologija bolezni CBS je kompleksna, saj gliva *P. citricarpa* tvori spolne (askospore) in nespolne trose (konidije) kot vir novih okužb. Askospore se do rastne sezone razvijejo na odpadlem listju okuženih dreves in jih na daljše razdalje raznaša veter, medtem ko konidiji nastajajo v pegah okuženih plodov, zelenih listov in poganjkov in se širijo na krajše razdalje v krošnji s škropljenjem dežnih kapelj. Bolezen je prisotna v številnih delih sveta z ugodnimi klimatskimi pogoji, medtem ko v Evropi bolezen še ni bila zaznana. V okviru projekta »SMART-Surveillance« (EFSA) v vzorcih zraka in dežja iz Malte, Španije, Italije in Grčije določamo prisotnost trosov *P. citricarpa* s tarčno specifičnimi qPCR testi in z netarčnim pristopom visoko zmogljivega sekvenciranja metagenoma zraka.

S pripravo in qPCR testiranjem vzorcev zraka in dežja z dodanim znanim številom trosov *P. citricarpa* smo določili mejo detekcije celotnega postopka. Rezultati kažejo, da za zanesljivo zaznavo potrebujemo vsaj 1000 trosov v vzorcu zraka vzorčenega v 1 dnevu. Tudi metagenomski pristop je primeren za določanje nizkih količin glivnih trosov, saj je občutljivost te metode primerljiva z metodo qPCR.

Trenutno objavljeni qPCR testi ne omogočajo ločitve karantenske glive *P. citricarpa* od njene tesno sorodne nekarantenske vrste *Phyllosticta paracitricarpa*. Zato smo razvili specifičen qPCR test, ki ti dve vrsti uspešno loči in tako predstavlja novo orodje pri bolj zanesljivi diagnostiki tega karantenskega organizma.

Rezultati raziskav in optimizirani postopki, poleg ugotavljanja prisotnosti *P. citricarpa* v vzorcih zraka in dežja, prinašajo tudi širše možnosti, ki nam jih ponuja aerobiologija za nadzor in oceno tveganj širjenja drugih škodljivih karantenskih organizmov.

Ključne besede: *Phyllosticta citricarpa*; aerobiologija; qPCR

Tipizacija izolatov *Paenibacillus larvae* z metodo ERIC-PCR v Sloveniji

Alenka Žugelj, Darja Kušar, Bojan Papić, Urška Zajc, Majda Golob, Olga Kosar, Jerica Vreček Šulgaj, Lucija Žvokelj, Maja Kavalič, Jana Avberšek, Metka Pislak Ocepek, Irena Zdovc

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

alenska.zugelj@vf.uni-lj.si

Paenibacillus larvae je najpomembnejši bakterijski patogen čebel, ki povzroča hudo gnilobo čebelje zalege. Za epidemiološki nadzor bolezni je ključna tipizacija pridobljenih izolatov. Tipizacija na osnovi enterobakterijskih ponavljajočih se medgenskih ohranjenih zaporedij (ERIC-PCR) je uveljavljena metoda za tipizacijo *P. larvae*, ki razvršča izolate v pet tipov (I–V). Od teh sta epidemiološko pomembna tipa I in II.

V tej raziskavi smo ugotavljali pojavnost tipov ERIC med izolati *P. larvae* iz različnih slovenskih območij v letih 2017–2019: zahodne ($n = 147$), osrednje ($n = 248$) in vzhodne ($n = 22$) Slovenije. Izolati so izvirali tako iz medu kot zalege iz 255 čebelnjakov. Vse izolate smo tipizirali z metodo ERIC-PCR in pomnožke ločili s kapilarno elektroforezo QIAxcel (Qiagen). V analizo smo vključili do tri izolate istega tipa ERIC iz posameznega čebelnjaka.

Ugotovili smo dva podtipa ERIC I (Ia in Ib), ki sta se od tipa ERIC I ločila v enem pasu. Sekvenciranje celotnih genomov (WGS) je pokazalo, da se podtipa Ia in Ib filogenetsko uvrščata v skupino ERIC I. Skupno je 294/417 (70,5 %) izolatov pripadalo tipu ERIC II, 74/417 (17,7 %) tipu ERIC I, 39/417 (9,4 %) tipu Ia in 10/417 (2,4 %) tipu Ib. V vzhodni Sloveniji je bila pojavnost tipa ERIC II značilno ($p < 0,0001$) nižja kot v osrednji Sloveniji, vendar ne v letu 2018. Pojavnost tipov ERIC se je spreminjala tako po območjih kot skozi čas.

Ta raziskava predstavlja prvi opis pojavnosti tipov ERIC pri bakteriji *P. larvae* v Sloveniji. Spremljanje tipov ERIC je pomembno z vidika napovedi klinične slike bolezni, saj se tipi ERIC razlikujejo glede njihove virulence. Pri preiskavah izbruhov hude gnilobe lahko metodo ERIC-PCR uporabimo kot presejalni test za pripravo nabora izolatov za nadaljnjo tipizacijo z metodo WGS.

Ključne besede: huda gniloba čebelje zalege; *Paenibacillus larvae*; ERIC-PCR

Odziv imunskega sistema na izbrane seve bakterije *Escherichia coli* in vpliv na cirkadiano uro

Zala Žužek¹, Urša Kovač², Katka Pohar³, Miha Moškon⁴, Alojz Ihan³, Damjana Rozman², Marjanca Starčič Erjavec¹

¹ Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

² Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

⁴ Fakulteta za računalništvo in bioinformatiko, Večna pot 113, 1000 Ljubljana

zuzek.zala@gmail.com

Vpliv črevesne mikrobiote na zdravje in počutje v zadnjih letih pridobiva na pomenu. Med drugim črevesna mikrobiota pripomore k ohranjanju homeostaze, uravnava delovanje in sodeluje pri razvoju imunskega sistema ter z zasedanjem ekoloških niš preprečuje okužbe ob stiku s patogenimi mikroorganizmi. Nedavne raziskave pa črevesno mikrobioto povezujejo tudi z motnjami cirkadiane ure gostitelja, ki vpliva na mnogo metabolnih, fizioloških in vedenjskih procesov organizma in tako pomaga ohranяти homeostazo. Dolgotrajne motnje cirkadiane ure vodijo do razvoja srčno-žilnih in rakavih obolenj ter metabolnih motenj.

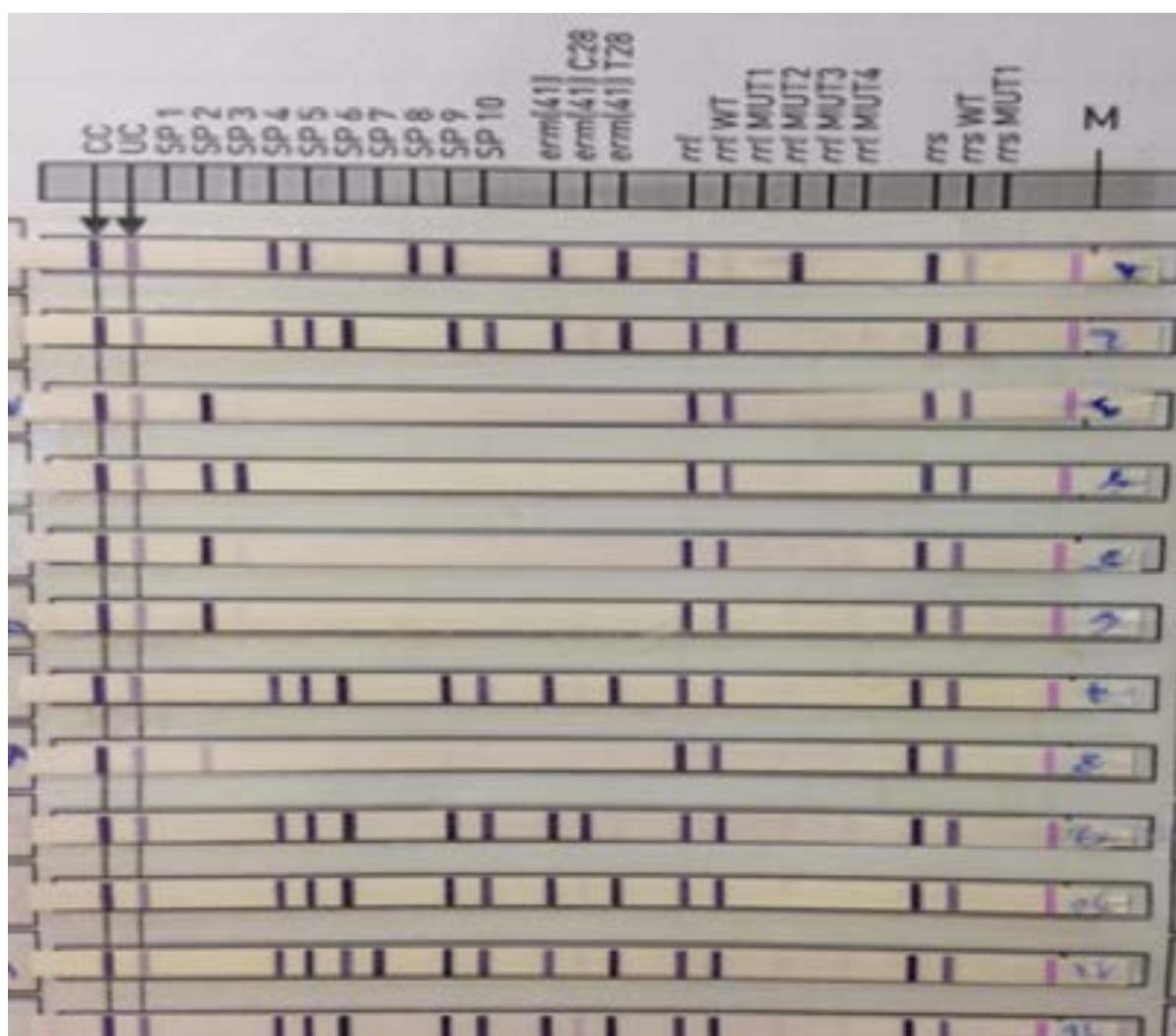
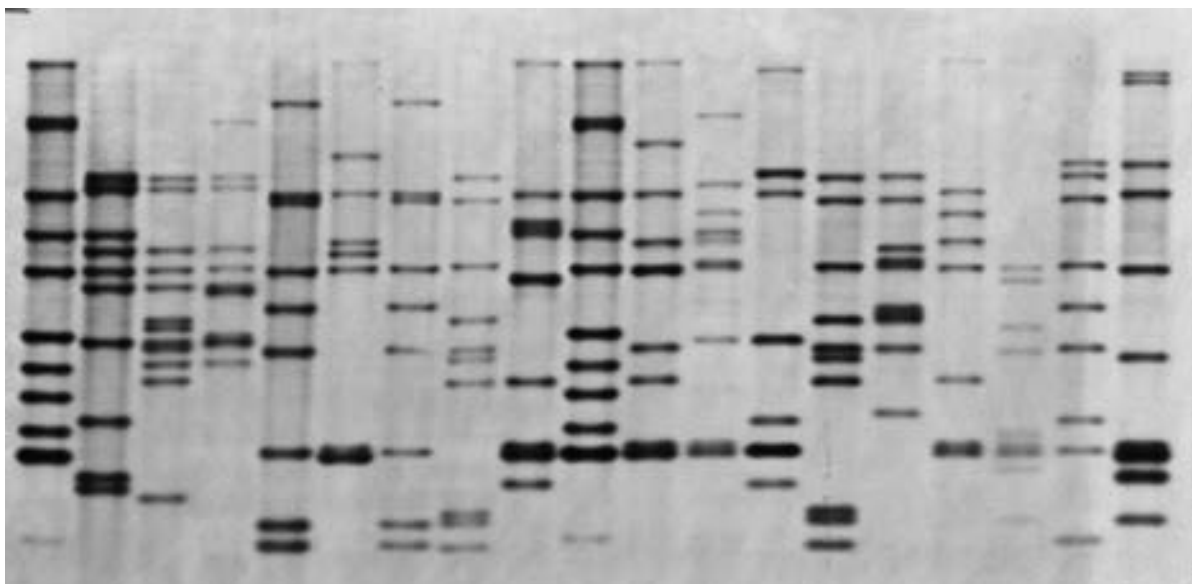
V raziskavi smo se osredotočili na pomembnega predstavnika mikrobiote, bakterijo *Escherichia coli* (*E. coli*), in preiskovali njen vpliv na evkariontsko cirkadiano uro v vzpostavljeni stabilni kokulturi s človeško jetrno celično linijo HepG2. Zaradi tesne povezave mikrobiote z imunskim sistemom in že opisanega vpliva imunskega sistema na cirkadiano uro smo v kokulturi preverili tudi odziv imunskega sistema. Za poskuse smo iz zbirke sevov *E. coli*, pridobljenih iz vzorcev blata zdravih posameznikov, izbrali dva predstavnika te bakterijske vrste, sev BJ23 s številnimi, in sev BJ17 z le nekaj zapisi za z virulenco povezanimi dejavniki. Po 4-urni inkubaciji seva BJ v kokulturi s celično linijo HepG2 smo izpostavljene celice HepG2 vzorčili 72 ur in analizirali količino relativne mRNA cirkadianih (*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* in *Cry2*) ter imunskih genov (*Tlr-4*, *Il-6r*, *Ifn-γ* in *Il-4*) z metodo kvantitativnega PCR v realnem času. Preverili smo tudi koncentracijo citokinov v gojišču.

Ugotovili smo, da bakterijski sev BJ23 po 72-ih urah močneje vpliva na gene cirkadiane ure celic HepG2, medtem ko pri aktivaciji genov imunskega sistema zaradi nizkega izražanja mRNA testiranih imunskih genov v izbrani celični liniji med sevoma ni bilo opaznih razlik, tudi koncentracija citokinov v gojišču je bila zelo nizka.

Z našo raziskavo smo ugotovili, da tudi lastnosti posameznih bakterij, ki so del mikrobiote, odločajo o stopnji vpliva na cirkadiano uro.

Ključne besede: mikrobiota; cirkadiana ura; imunski sistem

Mikrobi in analitika



Genotipizacija 19 izolatov bacilov tuberkuloze z metodo RFLP IS 6110 (zgoraj). Identifikacija mikobakterij z molekularnimi testnimi lističi in določanje občutljivosti proti antibiotikom (spodaj). Sliki sta nastali na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. (Manca Žolnir-Dovč – slika zgoraj, Sara Truden – slika spodaj).

Mednarodna primerjalna študija molekularnih testov za določanje za rastline patogene bakterije *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* v semenu koruze

Špela Alič¹, Manca Pirc¹, Tadeja Lukežič¹, Maja Ravnikar^{1,2}, Tanja Dreo¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Univerza v Novi Gorici, Vipavska cesta, 5000 Nova Gorica

tanja.dreo@nib.si

Bakterijsko uvelost koruze oz. Stewartovo bolezen povzroča bakterija *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Pss). Poglavitna gostiteljska rastlina je koruza (*Zea mays* L.), bolezen pa je razširjena predvsem v določenih državah Ameriške celine. Na območju EU in EPPO regije je bakterija uvrščena na seznam karantensko škodljivih organizmov. Po zadnjih poročilih naj bi bila bakterija prisotna v Italiji, ampak v omejenem obsegu, in prehodno prisotna na območjih med Slovenijo in Ukrajino. Ker le pravočasna detekcija okuženih semen in rastlin omogoča zanesljiv nadzor patogena v okolju, je uporaba dobrih detekcijskih sistemov izrednega pomena.

V EU projektu VALITEST (GA773139) smo v okviru mednarodne primerjalne študije (angl. test performance study, TPS) ovrednotili molekularne teste za detekcijo Pss v semenih koruze. Teste smo izbrali na podlagi izkušenj in literature in sicer 4 teste PCR v realnem času, 2 PCR in 2 LAMP testa. Vsak udeleženec TPS je prejel 20 referenčnih vzorcev, ki so bili po sestavi razdeljeni na: pozitivne vzorce (75% vzorcev, koncentracija Pss od 2,9 do 4,6 log(CFU/mL)), vzorce, ki so vsebovali navzkrižno reaktivne bakterije *P.s.* subsp. *indolgenes* ter negativne vzorce. Vsi vzorci so bili preverjeno stabilni in homogeni. V TPS je sodelovalo 21 udeležencev iz različnih držav. Skupno smo prejeli 114 setov rezultatov, od tega je 90 setov (79%) dosegalo zahtevano kakovost in so bili vključeni v nadaljnje analize.

Največji doprinos izvedenega TPS je izboljšava v pripravi referenčnega materiala t.j. testnih in kontrolnih vzorcev. Referenčni material smo natančno ovrednotili v sklopu določitve koncentracije tarčne bakterije na gojiščih in s pomočjo digitalne PCR reakcije, kar nam je omogočilo absolutno kvantifikacije tarče v referenčnem materialu. Dodatno pa smo določili tudi dolgoročno in kratkoročno stabilnost materiala ter limito detekcije s pomočjo nelinearnega modeliranja. Končne rezultate TPS smo predstavili v obliki diagnostičnih parametrov izračunanih za posamezni test in določili molekularni test, ki najbolj ustreza izhodiščnemu namenu in obsegu študije.

Ključne besede: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*; primerjalna študija; referenčni material

Primerjava dveh metod za ugotavljanje prisotnosti bakterije *Escherichia coli* v vodi Podpeškega in Rakiškega jezera in dokazovanje njenih virulentnih sevov

Maša Ceglar¹, Tatjana Rupel², Karmen Godič Torkar¹

¹ Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

karmen.torkar@zf.uni-lj.si

Mikrobiološko kakovost vode Podpeškega in Rakiškega jezera smo spremljali v vseh štirih letnih časih. V vsakem obdobju smo vzorčili trikrat na dveh odvzemnih mestih obeh jezer in v vzorcih ugotavljali število enterokokov ter koliformnih bakterij, vključno z bakterijo *E. coli*. Za ločevanje kolonij bakterij *E. coli* od ostalih koliformnih bakterij smo primerjali selektivnost dveh standardnih metod z gojišči CCA (Coliforms Chromogenic Agar) in inkubacijo pri 37 °C ter TBX (Tryptone Bile X-Glucoronide Agar) z inkubacijo pri 44 °C. V vodi obeh jezer je bilo povprečno število koliformnih bakterij 1×10^4 CFU/100 mL, termotolerantnih koliformnih bakterij $5,6 \times 10^2$ CFU/100 mL, bakterij *E. coli* 60 CFU/100 mL in število enterokokov 87 CFU/100 mL. Glede na standarde kakovosti za mikrobiološke parametre celinskih voda je 91,7 % vzorcev spadalo v razred z odlično kakovostjo. Ugotovili smo značilne razlike v številu koliformnih bakterij med vsemi štirimi sezonami, med številom bakterij *E. coli* med pomladnim ter jesenskim obdobjem, ter med številom enterokokov v zimskem obdobju glede na ostale sezone. Med obema jezeroma razlike v številu koliformnih nismo ugotovili, potrdili pa smo jih pri številu enterokokov in bakterije *E. coli*. Med obema metodama značilnih razlik v številu bakterij *E. coli* ni bilo, visoko značilne razlike v številu koliformnih bakterij ($p < 0,0001$) pa so verjetno posledica drugačne temperature inkubacije. Izmed 276 za *E. coli* značilnih kolonij smo to vrsto potrdili pri 210 (78,7 %) sevih, pri katerih smo z metodo PCR dobili genska zaporedja *stx* pri 32,2 %, *eaeA* pri 5,4 % in *ipaH* pri 13,7 % vzorcev. Serotip *E. coli* O157 smo ugotovili pri 2 % sevov.

Ključne besede: površinske vode; *E. coli*; virulenca

Preverjanje usposobljenosti nacionalnih referenčnih laboratorijev za molekularno določanje bakterije *Xylella fastidiosa* v okviru Referenčnega laboratorija EU za škodljive organizme rastlin na bakterijah

Tanja Dreó, Manca Pirc, Špela Alič

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

tanja.dreo@nib.si

EU je leta 2019 imenovala referenčne laboratorije EU za škodljive organizme rastlin na bakterijah. Nacionalni inštitut za biologijo je kot eden od štirih partnerjev konzorcija EURL za škodljive organizme rastlin na bakterijah, organiziral prvi test usposobljenosti nacionalnih referenčnih laboratorijev (NRL). Namen testa je bila ocena usposobljenosti NRL za določanje karantenske bakterije *Xylella fastidiosa* z molekularnimi testi.

Pripravili smo 14 vzorcev, mešanic DNK gostiteljskih rastlin (*Olea europaea*, *Coffea arabica*, *Polygala myrtifolia*, *Spartium junceum*, *Lavandula angustifolia*, *Prunus avium* in *Vitis vinifera*) in (za pozitivne vzorce) DNK Xyf iz 6 različnih sevov podvrst *pauca* (3), *multipleks* (2) ali *fastidiosa* (1). Število kopij Xyf DNK je ustrezalo koncentracijam zaznanih v naravno okuženih vzorcih, kar je pomenilo približno 104 kopij DNK/ml. Koncentracija je bila določena s kapljično digitalno PCR reakcijo.

Skupno je 26 NRL sporočilo 364 posameznih rezultatov. Od tega jih je bilo 354 (97 %) ustreznih. Neustrezni rezultati so vključevali kombinacije podvrste *multipleks* in sivke ter podvrste *fastidiosa* in vinske trte. Za podvrsto *pauca*, ki v Italiji povzroča obsežno propadanje oljk, so vis NRL podali 100 % ustrezne rezultate. Primerjalna analiza je pokazala, da pri pravilni optimizaciji in uporabi vse uporabljene metode, PCR v realnem času, PCR in LAMP, omogočajo pravilno določitev vseh testiranih vzorcev. Za sedem udeležencev so bile ugotovljene točke, kjer bi bilo potrebno teste izboljšati.

Rezultati testa PT so pokazali, da NRL laboratoriji iz EU uspešno zaznavajo koncentracije bakterije Xyf, kakršne pričakujemo v naravno okuženih vzorcih, ne glede na to katero metodo, test, aparat, reagent in redčitve vzorcev uporabljajo. To kaže na to, da strokovnost in znanje presegata potrebo po večji standardizaciji.

Ključne besede: referenčni laboratorij; test usposobljenosti laboratorijev; *Xylella fastidiosa*

Študija razširjenosti bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* v divjih kostanjih: znanost in projekt za državljane

Tanja Dreo¹, Dušan Jurc^{2,3}, Peter Smolnikar², Boštjan Kukovec⁴, Aleksander Benčič^{1,5}, Nataša Toplak⁶, Simon Koren⁶, Špela Alič¹, Barbara Piškur², Marina Dermastia¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

³ Inštitut za drevo, Cesta XXII 4, 1260 Ljubljana – Polje

⁴ HeartCode d.o.o., Pod Strahom 30A, 1291 Škofljica

⁵ Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova 39, 1000 Ljubljana

⁶ OMEGA d.o.o., Dolinškova ulica 8, 1000 Ljubljana

tanja.dreo@nib.si

Divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.) je bilo priljubljeno drevo v Sloveniji ob koncu 19. stoletja. Samo v Ljubljani je več kot 1500 dreves, nekatera so zaščitena kot naravni ali kulturni spomeniki. Divji kostanj lahko prizadenejo številne bolezni. Bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Pse) povzroča bolezen kostanjev bakterijski skorjemor, za katero je značilno odmiranje skorje, izcejanje mešanice rastlinskih sokov in bakterij iz nekroz ter odmiranje dreves. V letu 2018 smo prisotnost bolezni v Ljubljani potrdili tudi z laboratorijskimi testi.

Razširjenost skorjemora po Sloveniji smo začeli ugotavljati s projektom Euphresco Urban Trees (2018-C285), v katerem smo tudi optimizirali popis bolezenskih znamenj, postopke vzorčenja in laboratorijskega testiranja. Zaradi številčnosti divjega kostanja smo v okviru projekta NočMoč2020 (www.nocmoc.eu, Horizon 2020 GA955391) v spremljanje bolezni divjega kostanja vključili tudi splošno javnost. Oblikovali smo javno dostopen spletni obrazec (<https://kostanj.nocmoc.eu>), primeren za uporabo na mobilnih telefonih, ki omogoča enostavno beleženje nahajališč in zdravstvenega stanja dreves. Zbrani podatki so javno dostopni in prikazani v obliki posamičnih opažanj, kot galerija slik in v obliki zemljevida.

Pse smo s PCR v realnem času zaznali v 11/25 (44 %) vzorcev dreves z izcedkom iz debla, rjavimi madeži na skorji ali svetlejšo krošnjo. Državlani so v prvem mesecu projekta divji kostanj opazovali 62-krat na 14 lokacijah in v 52 primerih (84 %) opozorili na bolezenska znamenja. Največkrat (34-krat) so bile opažene poškodbe zaradi kostanjevega listnega zavrtača in osemkrat skorjemora. Preverjanje etiologije bolezni v drevesih identificiranih v projektu za državljanje in analize mikrobioma v vzorcih dreves z značilnimi bolezenskimi znamenji in negativnim rezultatom PCR v realnem času, so v teku.

Kostanjev bakterijski skorjemor je prisoten na več lokacijah po Sloveniji. Vključitev splošne javnosti v popis bo povečalo prepoznavnost pomena zdravja rastlin. Večje število podatkov bo omogočilo usmerjeno vzorčenje in izvajanje laboratorijskih analiz, kar bo pomembno prispevalo k oblikovanju ustreznih ukrepov omejevanja bolezni.

Ključne besede: divji kostanj; *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*; kostanjev bakterijski skorjemor

Vzpostavitev postopka preskušanja medicinskih mask: učinkovitost bakterijske filtracije

Katja Fric¹, Mojca Janc¹, Nika Savodnik¹, Tamara Košir¹, Arijana Filipič¹, Miha Zakotnik², Primož Hafner², Polona Kogovšek¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² LOTRIČ Meroslovje, Selca 163, Selca, Slovenija

polona.kogovsek@nib.si

Medicinske maske za obraz so različnih tipov: I, II, IIR in morajo ustrezati zahtevam standarda EN 14683:2019, kjer je predpisanih več različnih parametrov, od zračne prepustnosti, biološke združljivosti oziroma citotoksičnosti, čistosti na mikrobe (bio obremenitev) do učinkovitosti bakterijske filtracije (ang. bacterial filtration efficiency, BFE). BFE pove, koliko odstotkov bakterij ujetih v kapljice s povprečno velikostjo $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ preide masko. Zaradi velike potrebe po preskušanju primernosti medicinskih mask v času epidemije COVID-19, smo na NIB-u, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, v sodelovanju s podjetjem LOTRIČ Meroslovje, vzpostavili preskusni sistem za določanje BFE.

Za preskušanje BFE se uporablja suspenzijo bakterije *Staphylococcus aureus*, ki je kokoidne oblike, velikosti $1 \mu\text{m}$ in tvori skupke po nekaj celic skupaj. Suspenzija bakterij se v prvi fazi aerosolizira tako, da nastanejo kapljice različnih velikosti v rangu od $0,65 \mu\text{m}$ do $7 \mu\text{m}$. Kapljice različnih velikosti smo ulovili na plošče z gojiščem, ki smo jih namestili v 6-stopenjski vzorčevalnik Andersen, v katerem se kapljice sortirajo po velikostnem redu. Med postopkom preskušanja smo vzdrževali konstanten pretok zraka, ki ustreza dihanju (t.j. $28,3 \text{ l/min}$).

Z vzpostavljenim postopkom smo preskusili nabor različnih tipov komercialno dostopnih mask različnih proizvajalcev. Rezultati so v veliki meri ustrezali predpisanim zahtevam za določen tip maske. Tako smo potrdili npr. 99,9 % BFE za maske tipa II. Pri nekaterih maskah smo določili nižji BFE (npr. 80 %), vendar še ustrezajo minimalnim zahtevam za maske za splošno rabo za enkratno uporabo, skladno s slovensko tehnično specifikacijo (SIST-TS 1200:2020).

V prihodnje bomo vzpostavili še preskušanje učinkovitosti virusne filtracije (VFE), kjer bomo uporabili modelni virus (npr. bakteriofag ali koronavirus). S primerjavo rezultatov BFE in VFE bomo lahko pripravili smernice za proizvajalce mask, kot tudi za preskušanje mask.

Ključne besede: *S. aureus*; učinkovitost bakterijske filtracije; 6-stopenjski vzorčevalnik zraka Andersen

Korelacija analitičnih metod uporabljenih na področju genske terapije

Mojca Janc, Kaja Zevnik, Magda Tušek Žnidarič, Maja Šalekar, Nejc Košir, Rebecca Vollmeier, Tjaša Jakomin, Polona Kogovšek, Jana Žel, Maja Ravnikar, David Dobnik

Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

mojca.janc@nib.si

V preteklem desetletju se je močno razvilo področje genske terapije, kjer so se za vnos genetskega materiala v bolnike uveljavili tudi virusni vektorji. Med njimi kažejo izjemne prednosti z adenovirusi povezani virusi (ang. adeno-associated viruses, AAV), na podlagi katerih so nastala tudi genska zdravila trenutno dostopna na svetovnem tržišču. Tekom razvoja zdravil in tudi za ovrednotenje končnega produkta je potrebno vzorce testirati s serijo analitskih metod. Največja težava je, da mnoge analitske metode ne ocenjujejo istih parametrov, njihovi rezultati pa so zato težko primerljivi.

V naši raziskavi smo se osredotočili na dva tipa AAV9 vektorjev (enoverižno in samo-komplementarno obliko). Vektorje, ki so bili proizvedeni z uporabo klasične trojne transfekcije v HEK293T celicah ter očiščeni s pomočjo ultracentrifugiranja v CsCl gradientu smo dobili iz Internacionalnega centra za genetsko inženirstvo in biotehnologijo ICGEB (Trst, Italija). Dobili smo 4 frakcije (težko, srednjo, lahko in polno), ki smo jih nato analizirali s številnimi analitičnimi metodami. Virusni titer smo določili z uporabo digitalnega kapljičnega PCR (ddPCR), pri čemer smo uporabili tri sete oligonukleotidov in sond, ki so ciljale različne dele v virusnem genomu (ITR regijo, CMV promotor in GFP). Prisotnost ostankov gostiteljskih beljakovin in DNA smo ovrednotili s pomočjo komercialno dostopnih kompletov kemikalij (resDNASEQ Quantitative DNA Kit in HEK 293 HCP Elisa Kit). Dodatno smo prisotnost gostiteljskih beljakovin, drugih nečistoč (praznih in poškodovanih virusnih delcev) ter agregatov ocenili še s pomočjo preseвне elektronske mikroskopije (TEM). Z uporabo visoko zmogljivega sekvenciranja (HTS) smo ovrednotili prisotnost neželenih nukleinskih kislin znotraj virusnih delcev.

Rezultati so pokazali velike razlike med preučevanimi frakcijami ter tudi med obema preučevanima vektorjema. S pomočjo sekvenciranja smo potrdili prisotnost neželenih nukleinskih kislin v virusnih kapsidah.

S primerjavo različnih metod smo določili korelacije med rezultati, kar nam bo v prihodnje omogočilo boljše razumevanje rezultatov posameznih metod ter omogočilo uporabo hitrejših metod za enostavnejše ovrednotenje produktov tekom razvoja.

Ključne besede: z adenovirusi povezani virusi; genska terapija; digitalni kapljični PCR

Plazmid pRK100: sekvenciranje, sestava in analiza celotnega nukleotidnega zaporedja

Karmen Jeseničnik¹, Andrej Kastrin², Tatyana Sysoeva³, Lauren Elam³, Tim Johnson⁴, Marjanca Starčič Erjavec¹

¹ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Department of Biological Sciences, University of Alabama in Huntsville, 301 Sparkman Dr, Huntsville, AL 35899 USA

⁴ College of Veterinary Medicine, 1971 Commonwealth Avenue, Saint Paul, MN 55108 USA

karmenjesenicnik96@gmail.com

Plazmidi, izvenkromosomski elementi DNA, lahko kodirajo tudi gene, povezane z virulentnimi dejavniki, kot so adhezini, toksini in sistemi za privzem železa. Preliminarne raziskave in delno sekvenciranje pribl. 150-kb velikega naravnega plazmida pRK100 iz uropatogenega seva bakterije *Escherichia coli* so razkrile, da je ta plazmid podoben plazmidu F, poseduje dve funkcionalni replikacijski regiji (RepFIB in RepFIIA), ima zapisa za dva sideroforja (aerobaktin in salmohelin), za dva bakteriocina (MccV in Colla) ter ima dve insercijski zaporedji, IS2 in IS3, ter transpozon Tn5431, na katerem sta zapisani odpornost proti ampicilinu in tetraciklinu. Ugotovljeno je bilo tudi, da pRK100 poseduje regijo *tra* in se je s konjugacijo sposoben prenesti v recipientsko bakterijsko celico.

V tej študiji smo sekvencirali in sestavili celotno nukleotidno zaporedje plazmida pRK100 z uporabo Illumina, PacBio in Sanger sekvenciranj ter uporabo računalniških programov Unicycler ter BLAST oz. BLAST2n. Za anotacijo dobljenega plazmidnega nukleotidnega zaporedja smo uporabili računalniški program Prokka. Dodatno smo izvedli fenotipsko karakterizacijo na plazmidu na novo odkritih genov *macAB*: pRK100 smo s konjugacijo prenesli v *E. coli* MG1655, ki ima na kromosomu zapis za gen *tolC*, ki je potreben za delovanje proteinskega kompleksa makrolidne črpalke MacAB-TolC. Makrolidna črpalka MacAB-TolC potrebuje za svojo aktivnost namreč tri gene: *macAB-tolC*.

Analiza sestavljenega celotnega nukleotidnega zaporedja pRK100 je pokazala, da ima plazmid 142.357 bp. Določena dolžina je v skladu s predhodno določeno dolžino pribl. 150 kb. Primerjalna analiza z Illumina in PacBio pridobljenimi zaporedji je razkrila 7 neujemanj, ki so bila razrešena s Sanger sekvenciranjem. Potrjene so bile vse na plazmidu predhodno določene regije, z izjemo IS3. Fenotipska analiza genov *macAB* v sevu MG1655 ni potrdila aktivnosti makrolidne črpalke MacAB-TolC, ki je delno kodirana na pRK100.

V celoti sestavljeno nukleotidno zaporedje konjugativnega plazmida pRK100 je tako potrdilo vse predhodne rezultate, z izjemo prisotnosti regije IS3.

Ključne besede: plazmid pRK100; celotno nukleotidno zaporedje; sekvenciranje

Primerjava različnih kompletov za osamitev nukleinskih kislin bakterije *Clostridioides difficile* iz mesa in mesnih pripravkov

Katarina Pavlin, Majda Biasizzo, Stanka Vadjal, Urška Henigman, Andrej Kirbiš, Urška Jamnikar-Ciglencéki

Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

katja.pavlin1@gmail.com

V raziskavi smo primerjali učinkovitost treh komercialnih kompletov reagentov za osamitev DNA bakterije *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) v vzorcih mesa in mesnih pripravkov. Zaradi anaerobne narave se *C. difficile* v hrani nahaja predvsem v obliki spor. Plašč spor je zelo odporen in ga je težko lizirati, zato je sprostitve nukleinskih kislin iz spor omejena. Tudi prisotnost maščob in beljakovin v vzorcih mesa lahko negativno vpliva na osamitev DNA in na potek verižne reakcije s polimerazo (PCR). Z raziskavo smo želeli določiti najbolj učinkovito metodo osamitve DNA, da bi s tem izboljšali občutljivost dokazovanja *C. difficile*.

Za osamitev DNA bakterije *C. difficile* smo uporabili tri različne komercialne komplete reagentov: foodproof Sample Preparation kit II (Biotecon Diagnostics, Nemčija) (FP), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Nemčija) (HP) in DNA Isolation from Complex Samples (Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija) (ICS). Raziskavo smo izvedli v dveh delih. V prvem delu smo uporabili vzorce mletega mesa, katere smo inokulirali s tremi različnimi sevi *C. difficile* in znanim številom bakterij. Da bi ugotovili, ali lastnosti različnih sevov lahko vplivajo na uspešnost metode, smo vzorce mletega mesa inokulirali z vsakim sevom posebej ter pri treh različnih koncentracijah. V drugem delu raziskave smo uporabili vzorce različnih vrst mesa in mesnih pripravkov, ter jih inokulirali z mešanico vseh treh sevov *C. difficile*.

V obeh delih raziskave je bil glede na rezultate metode PCR v realnem času s sondo TaqMan najučinkovitejši komercialni komplet reagentov ICS. Manj učinkovit je bil FP, najmanj pa HP. Z raziskavo smo ugotovili, da je za optimalno osamitev DNA *C. difficile* iz različnih vrst mesa in mesnih pripravkov priporočljivo kombinirati mehanske ter encimsko-kemijske postopke lize, skupaj s toplotno obdelavo vzorcev. Prav tako smo dokazali, da večkratno razbijanje bakterij in spor s kroglicami pripomore h učinkovitejši osamitvi DNA *C. difficile*.

Ključne besede: *C. difficile*; sporulacija; meso in mesni izdelki; liza celic; osamitev DNA

Medlaboratorijska primerjava testov za diagnostiko virusa pegavosti in uvelosti paradižnika

Ana Vučurović^{1,2}, Nejc Jakoš¹, Maja Ravnikar^{1,3}, Nataša Mehle¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Institut za fitomedicino, Katedra za fitopatologijo, Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

³ Univerza v Novi Gorici, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri, Glavni trg 8, 5271 Vipava

natasia.mehle@nib.si

Virus pegavosti in uvelosti paradižnika (ang.: tomato spotted wilt tospovirus; TSWV, *Tospoviridae*) lahko okuži več kot 1000 vrst rastlin in je eden izmed desetih ekonomsko najnevarnejših rastlinskih virusov. Izgube pridelkov, ki nastanejo zaradi okužbe s TSWV ocenjujejo na več kot milijardo dolarjev letno. Zaradi tega je bil TSWV v okviru EU projekta VALITEST (www.valitest.eu) prepoznan kot eden izmed 11 najpomembnejših reguliranih škodljivcev rastlin, ki potrebujejo celovito validacijo diagnostičnih testov.

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo smo v okviru projekta VALITEST na osnovi pregleda literature, in-silico analiz in laboratorijskih raziskav na izbranih izolatih izmed 76 objavljenih testov izbrali osem najprimernejših za ugotavljanje prisotnosti in za določanje TSWV. To so različni encimskoimunski testi (ELISA), obratno prepisovanje in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR), RT-PCR v realnem času in testi, ki se uporabljajo za odkrivanje na terenu.

Izbrane teste smo vključili v medlaboratorijsko primerjalno raziskavo, v kateri je sodelovalo 21 usposobljenih diagnostičnih laboratorijev (18 iz EU in 3 iz držav zunaj EU). Marca 2020 smo sodelujočim laboratorijem poslali do 5 serij s po 22 vzorci; rezultate vseh sodelujočih laboratorijev smo prejeli v začetku julija. Z namenom, da pridobimo boljši vpogled glede validacijskih parametrov pridobljenih v okviru medlaboratorijske primerjalne raziskave je v teku evalvacija rezultatov s pomočjo statističnih analiz.

Rezultati, dobljeni v tej študiji, bodo omogočili izbor hitrih in najzanesljivejših testov za odkrivanje in določanje TSWV. Pravočasno in natančno odkrivanje je ključni prvi korak pri premagovanju bolezni, ki jih povzročajo rastlinski virusi.

Ključne besede: virus pegavosti in uvelosti paradižnika; medlaboratorijska primerjava testov; diagnostika

Uporaba visokozmogljivostnega sekvenciranja za odkrivanje virusov, ki povzročajo bolezen prej neznane etiologije na *Iris* sp. v Srbiji

Ana Vučurović^{1,2}, Denis Kutnjak¹, Nataša Mehle¹, Zala Kogej¹, Ivana Stanković², Branka Krstić², Maja Ravnikar^{1,3}

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Inštitut za fitomedicino, oddelek za fitopatologijo, Univerza v Beogradu – Agronomska fakulteta, Nemanjina 6, Beograd 11080, Srbija

³ Univerza v Novi Gorici, Vipavska 13, 5000 Nova Gorica, Slovenija

zala.kogej@nib.si

Gojenje okrasnih rastlin se v zadnjem desetletju nenehno povečuje, med njimi so tudi perunike (*Iris* sp.), pri katerih patogeni virusi lahko povzročijo znatno škodo. V mestu Krnjača (okrožje Beograda, Srbija) so v letu 2013 na perunikah opazili bolezenska znamenja na 80 % rastlin s tržno izgubo 95%. Bolezenska znamenja, kot so močno zavrta rast in mozaik na listih, je spremljalo tudi zakasnelo cvetenje ali pa rastline sploh niso cvetele.

Zbrani vzorci so bili testirani na prisotnost tospovirusov z uporabo ELISA in RT-PCR metod, vendar noben od teh virusov ni bil zaznan. Zato smo izbrali tri vzorce, jih združili in analizirali z visokozmogljivim sekvenciranjem malih RNA na platformi Illumina HiSeq. Analizo podatkov smo izvedli s programom CLC Workbench (Qiagen) z uporabo avtomatiziranega delotoka, ki smo ga razvili na Nacionalni inštitut za biologijo.

S tem pristopom je bila odkrita prisotnost dveh virusov, ki pripadata rodu *Potyvirus*, virusa mozaika ptičjega mleka (*Ornithogalum mosaic virus*, OrMV), prvič odkritega v Srbiji, in virusa blagega mozaika perunike (*Iris mild mosaic virus*, IMMV). Rezultati so bili potrjeni s klasičnim RT-PCR, ki je razkril mešane okužbe v vseh treh vzorcih.

Ta študija je potrdila, da je visokozmogljivo sekvenciranje zelo močno netarčno orodje za odkrivanje vzrokov bolezenskih znamenj neznanega izvora v rastlinah, kakor smo to že dokazali tudi s prvo najdbo virusa mozaika zobnika (*Henbane mosaic virus*, HMV) v paradižniku (Pecman in sod., 2018).

Ključne besede: *Iris* sp.; visokozmogljivo sekvenciranje; OrMV; IMMV

Raziskava je bila financirana iz projektov: COST FA1407, ArimNet Emaramb (GA_618127), ARRS programa P4 -0165 in projekta 451-03-68/2020-14/200116 Ministrstva za izobraževanje, znanost in tehnološki razvoj, Republika Srbija

Pecman A., Kutnjak D., Mehle N., Žnidarič Tušek M., Gutiérrez-Aguirre I., Pirnat P., Adams I., Boonham N., Ravnikar M. 2018. High-Throughput Sequencing Facilitates Characterization of a "Forgotten" Plant Virus: The Case of a Henbane Mosaic Virus Infecting Tomato. *Frontiers in Microbiology*: 9, 2739. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02739

Indukcija ekspresije proteinov z metanolom in pH profiliranje z uporabo aparata BioLector® PRO

Anna Korona¹, Roland Weis², Aid Atlic²

¹ m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, Germany

² VALIDOGEN GmbH, Raaba -Grambach, Austria

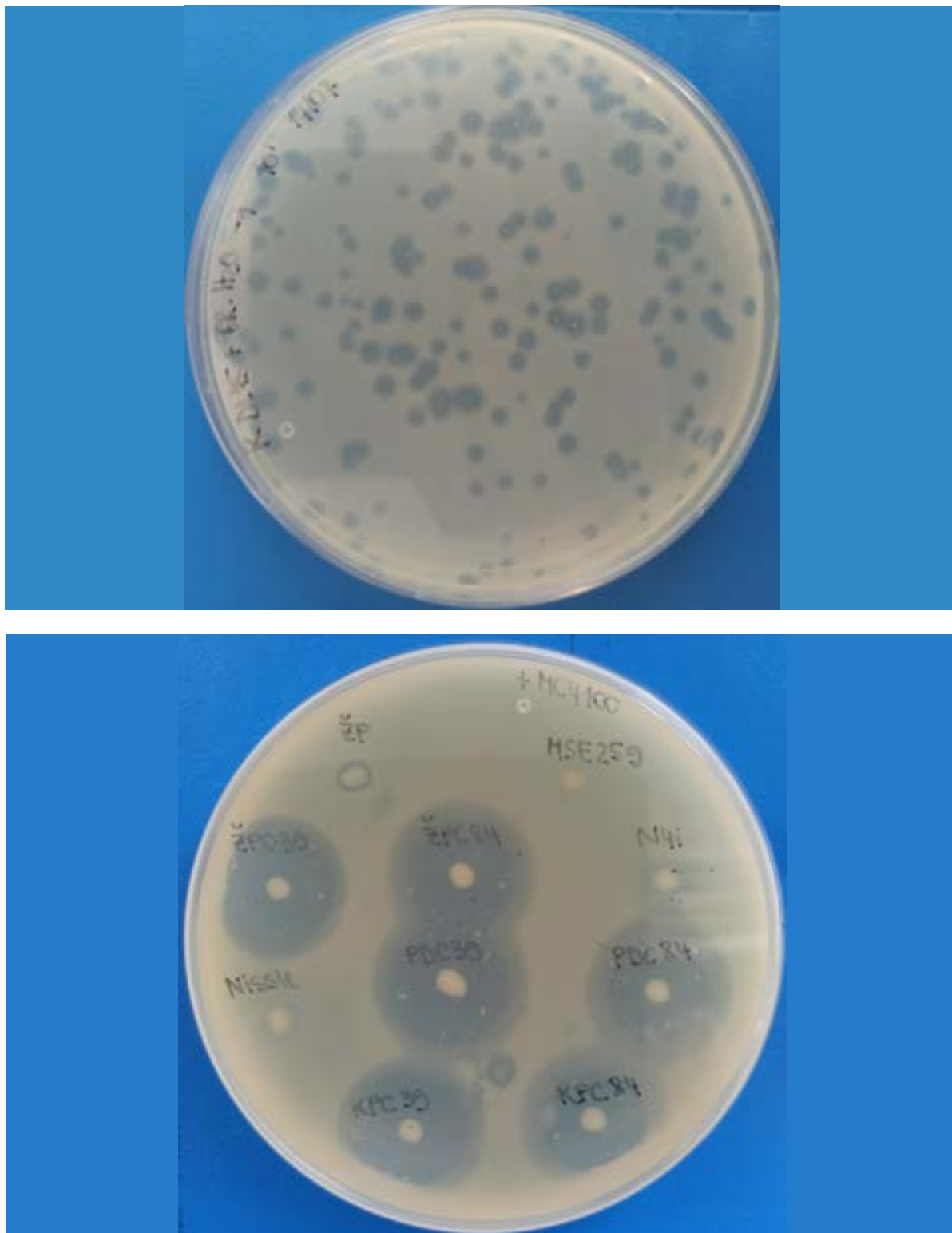
ales@donaulab.com

Metilotrofne kvasovke *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris* so že dobro poznane kot gostiteljski vektor za heterologno gensko ekspresijo. Njihova sposobnost uporabe metanola kot vira ogljika omogoča izolacijo metanolno induciranih promotorjev, kot sta format dehidrogenaza (FMD) in alkoholna oksidaza (AOX 1). Ta lastnost nam s povezavo želenega gena z npr. genom za AOX 1 omogoča ekspresijo tujega proteina v celici kvasovke. Te preferenčno rastejo pri nižjih pH vrednostih, med pH=4 in pH=6. V študiji je za kontrolo optimalne pH vrednosti rasti bil uporabljen princip merjenja pH-ja z optičnimi pH senzorji, kar omogoča precizno kontrolo v kislem območju tudi v zelo majhnem volumnu gojišča.

Cilj študije je najprej bilo merjenje biomase z metanolom, kot virom energije v šaržnem načinu ter tudi v šaržnem sistemu z dohranjevanjem. Nadalje, želeli smo preveriti, kako je rast z indukcijo z metanolom povezana z različnimi pH vrednostmi gojišča. Zanimalo nas pa je tudi, kako je produkcija proteinov inducirana s strani metanola odvisna od različnih načinov dovajanja samega metanola.

Uporaba tehnologije mikro fluidnih čipov, na katerih bazira aparat BioLector® PRO omogoča on-line merjenje biomase, vrednosti pH in DO ter ekspresije GFP fluorescirajočega proteina. Tehnologija omogoča revolucionarno kontrolo pH vrednosti v majhnih volumnih gojišča ter metanolno inducirano ekspresijo proteinov, sočasno na do 32 mikro-reaktorskih pozicijah.

Mikrobi in protimikrobne učinkovine



Protimikrobni učinek bakteriofagov iz vode v greznici na sev MC4100 bakterije *Escherichia coli* (zgoraj – vidni so plaki, ki so nastali zaradi lize z bakteriofagi okuženih celic) in bakteriocinogenih sevov bakterije *E. coli* na sev MC41000 (spodaj – vidne so različno široke cone lize, ki so nastale zaradi produkcije različnih bakteriocinov v različnih sevih; sev MSE259 ni bil bakteriocinogen). Obe sliki sta nastali na Oddelku za biologijo, BF UL (Petra Drčar).

Določanje rezistoma v vzorcih izmečkov iz pljuč z uporabo visokozmogljivega sekvenciranja

Aleksander Benčič^{1,2}, Nataša Toplak³, Simon Koren³, Viktorija Tomič⁴, Dane Lužnik⁴, Tanja Dreo¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova 39, 1000 Ljubljana

³ OMEGA d.o.o., Dolinškova ulica 8, 1000 Ljubljana

⁴ Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4202 Golnik

aleksander.bencic@nib.si

Rezistom je zbirka vseh genov za odpornost na antibiotike (AMR-geni) in njihovih prekurzorjev prisotnih v nekem okolju. Nabor znanih genskih zapisov povezanih z odpornostjo lahko v kompleksnih vzorcih določimo z visokozmogljivim sekvenciranjem. Tarčno sekvenciranje omogoča časovno manj zamudno analizo podatkov v primerjavi s sekvenciranjem celokupne DNA. Cilj naše študije je bila določitev rezistoma v kliničnih vzorcih izmečkov iz pljuč izbranih pljučnih bolnikov na Kliniki Golnik. Tarčno sekvenciranje je bilo izbrano kot dopolnilna metoda metagenomski analizi določanja mikrobioma.

Celokupno DNA smo izolirali iz vzorcev izmečkov iz pljuč s kompletom reagentov Hain GXT NA Extraction Kit. Tarčne regije DNA smo pomnožili s kompletom reagentov Ion AmpliSeq™ Pan-Bacterial Research Panel za detekcijo AMR-genov in z Ion 16S™ Metagenomics Kit za metagenomsko analizo. Knjižnice za sekvenciranje smo pripravili s kompletom reagentov Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0. Pomnožena tarčna zaporedja smo sekvencirali z visokozmogljivim sekvenatorjem druge generacije Ion Torrent, Ion S5™ System. Rezultate sekvenciranja smo analizirali s programsko opremo proizvajalca.

Z zgoraj opisanim pristopom nam je uspelo določiti rezistom in mikrobiom v devetnajstih kliničnih vzorcih izmečkov iz pljuč. Skupno smo v vzorcih zaznali 74 različnih genov povezanih z odpornostjo na antibiotike. Povprečno število na vzorec je bilo 16, vzorci so vsebovali od 4 do 30 genov. Najpogostejše zaznan AMR-gen je bil msr(D)/mel (v 18 vzorcih), ki je odgovoren za odpornost na makrolide. Skupno je bilo v dvajsetih vzorcih zaznanih 334 bakterijskih vrst. Najpogostejše zaznana vrsta je bil *Streptococcus sinensis* (v 18 vzorcih). S kombinacijo pristopov smo v nekaterih vzorcih zaznali znane povzročitelje bolezni, ki s klasičnim pristopom izolacije na gojiščih niso bili zaznani.

S kombiniranjem rezultatov analiz mikrobioma in rezistoma v vzorcih izmečkov iz pljuč smo dobili nov vpogled v mikrobiom spodnjih dihal. Tovrstni podatki so ključnega pomena pri hitri in pravilni diagnozi bakterijskih povzročiteljev bolezni dihal in določanju odpornosti na antibiotike. Nadejamo se, da bo taka tehnologija v bližnji prihodnosti postala del rutinskih diagnostičnih testiranj.

Ključne besede: rezistom; mikrobiom; visokozmogljivo sekvenciranje

Odpornost oacetnokislinskih bakterij proti izbranim antibiotikom in šibkim organskim kislinam

Eva Cepec, Lora Klanfar, Jure Škraban, Janja Trček

Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, Koroška cesta 160, 2000 Maribor

janja.trcek@um.si

Zaradi vse večje ozaveščenosti potrošnikov o uživanju naravnih živil se povečuje povpraševanje po jabolčnem kislu pridobljenem iz neškropljenih jabolk, kot tudi po kislu, ki na koncu tehnološkega procesa ni prefiltriran ter tako vsebuje še bakterije, zaradi česar ga imenujemo motni jabolčni kis. Ta trend pa pred proizvajalca in potrošnika postavlja vprašanje, če so oacetnokislinske bakterije odporne proti antibiotikom, predvsem tistim, ki so klinično relevantni, in če se te lastnosti lahko prenesejo v patogene bakterije. V tej raziskavi smo zato pri 34 izbranih sevih oacetnokislinskih bakterij iz rodov *Komagataeibacter* in *Acetobacter* preučevali odpornost proti naslednjim antibiotikom: ampicilinu, kloramfenikolu, ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu in trimetoprimu. Odpornost smo ocenili s pregledovanjem rasti okrog diskov, prepojenih z znanimi koncentracijami antibiotikov. Šest sevov je bilo odpornih proti vsem testiranim antibiotikom, 16 sevov proti petim antibiotikom, 11 sevov proti štirim antibiotikom in en sev proti trem antibiotikom. V nadaljevanju smo v genomskih sekvencah preiskanih referenčnih sevov poiskali gene, ki potencialno kodirajo proteine za odpornost proti testiranim antibiotikom. Pri tem smo uporabili bazo CARD s poznanimi geni za odpornost proti antibiotikom. Najpogostejša funkcija genov, ki smo jih identificirali, je bila črpalka za transport antibiotikov iz celice. Poleg odpornosti proti antibiotikom smo pri štirih sevih iz rodu *Komagataeibacter* in štirih sevih iz rodu *Acetobacter* preiskali tudi odpornost proti očetni in citronske kisline s testiranjem sposobnosti rasti v tekočem gojišču v prisotnosti 1% etanola in različnih koncentracij ene izmed obeh kislin. Najvišjo odpornost proti očetni kislini (4,5%) smo ugotovili pri sevu *Acetobacter pomorum* LMG 18848T in *Acetobacter pasteurianus* T6K1, najmanjšo (1,5%) pa za sev *Acetobacter aceti* LMG 1504T. Največjo odpornost proti citronske kislini (3,5%) smo ugotovili za sev *Komagataeibacter* sp. AV429, najmanjšo (0,69%) pa za seve *Acetobacter pomorum* LMG 18848T, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1262T in *Acetobacter pasteurianus* T6K1. Zaradi ugotovljene odpornosti oacetnokislinskih bakterij proti klinično relevantnim antibiotikom, bomo v nadaljevanju raziskavo razširili na večje število sevov iz te skupine bakterij.

Ključne besede: oacetnokislinske bakterije; odpornost proti antibiotikom

In vitro* raziskava antagonistične učinkovitosti probiotikov proti patogenim sevom *Escherichia coli

Sabina Fijan¹, Dunja Šulc², Andrej Steyer³

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede, Žitna ulica 15, 2000 Maribor

² GenePlanet, Cesta na Poljane 24, 1000 Ljubljana

³ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana

sabina.fijan@um.si

Escherichia coli je pomembna komezalna bakterija v črevesju, vendar obstaja veliko patogenih sevov, ki lahko povzročajo različne hude črevesne in izven-črevesne okužbe. Zaradi vse večjega pojava odpornosti *E. coli* proti antibiotikom so pomembne raziskave alternativnih protibakterijskih učinkovin in terapij. Ena izmed teh je uporaba probiotikov z antagonističnim učinkom proti patogenim *E. coli*. Večina objavljenih raziskav s področja raziskuje samo en sev *E. coli* in probiotike z enim sevom. Cilj naše raziskave je bil oceniti antagonistično aktivnost izbranih probiotičnih dopolnil, ki vsebujejo različno število sevov, proti izbranim kliničnim patotipom *E. coli* z metodo lise na agaju in metodo sokultiviranja. Za dokazovanje laktobacilov in bifidobakterij ter nekaterih izbranih sevov v probiotičnih dopolnilih smo uporabili molekularne metode. Z metodo lise na agaju smo dokazali, da so večsevni probiotiki učinkovitejši od enosevni. Z metodo sokultiviranja smo ugotovili nasprotni rezultat. Najučinkovitejša probiotika z enim sevom sta bila: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. Najučinkovitejši probiotiki z več sevi so vsebovali laktobacile, bifidobakterije in enterokoke, s čimer dokazujemo, da so mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije najučinkovitejši probiotiki proti patotipom *E. coli*. Skupni rezultati obeh *in vitro* testov razkrivajo, da so vsi izbrani probiotiki imeli antagonistično aktivnost proti vsem patotipom *E. coli*. Z vidika javnega zdravja so se tako probiotiki izkazali za uspešne pri zaviranju rasti *E. coli* in je zato smiselno nadaljnjo raziskovanje uporabe probiotikov kot adjuvantno terapijo pri okužbah z *E. coli*.

Ključne besede: koristni mikroorganizmi; probiotiki, *Escherichia coli*; antagonizem

Protimikrobna aktivnost slovenskega medu različnega porekla

Mateja Kokalj¹, Nika Horvat¹, Tanita Kranjc¹, Tomaž Samec², Nataša Lilek², Andreja Kandolf Borovšak², Sonja Smole Možina¹

¹ Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

² Čebelarstva zveza Slovenije, Brdo pri Lukovici, Slovenija

mateja.kokalj@bf.uni-lj.si

Med se zaradi svojih funkcionalnih lastnosti že od nekdaj uporablja v prehrani, preventivi zdravljenja in zdravljenju različnih bolezni, poškodb, ran, opeklin. Pri tem je ključnega pomena tudi protimikrobno delovanje medu. Podatki o funkcionalnih lastnostih slovenskih medov s poznanim geografskim in botaničnim poreklom so pomanjkljivi, zato smo v okviru aplikativne raziskave karakterizacije čebeljih pridelkov v obdobju maj-julij 2020 preiskali protimikrobno učinkovitost 50 vzorcev medu slovenskih in zamejskih čebelarjev. Z metodo razredčevanja v mikrotitrski plošči in določitvijo vrednosti CFU/ml na trdnem gojišču smo določili minimalno inhibitorno (MIK) in baktericidno (MBK) koncentracijo medov za referenčne seve treh G+ (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* in *Bacillus cereus*) in dveh G- (*Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*) patogenih bakterij. Vsem vzorcem smo z melisopalinološko metodo določili botanično poreklo, električno prevodnost, vsebnost vode in skupnih fenolnih spojin (metoda Folin-Ciocalteu) in antioksidativno aktivnost (metodi DPPH in FRAP). Namen raziskave je ugotoviti povezave med omenjenimi lastnostmi medu.

Največjo protimikrobno aktivnost izkazujejo temni in manini medovi, predvsem proti G+ bakterijam (MIK 16-500 mg/ml, MBK 62,5->500 mg/ml), gozdni mešani in vrstni, kot je kostanjev, hojin, javorjev in lipov med. Zelo dobro protimikrobno aktiven je tudi ajdov med. Slabša je protimikrobna aktivnost svetlejših medov (cvetlični, akacijev in med oljne ogrščice) in proti G- bakterijam (MIK 62,5->500 mg/ml, MBK 125->500 mg/ml). Večina svežih slovenskih medov je proti testiranim sevom izkazala večjo protimikrobno aktivnosti kot primerjalno testirani manuka med MGO 100+. V teku je primerjalna analiza kemijske karakterizacije in protimikrobne aktivnosti preiskovanih vzorcev medu, katere rezultat bo preveritev hipoteze o neposredni povezanosti vsebnosti skupnih fenolnih spojin ter antioksidativne in protimikrobne aktivnosti medov.

Imamo dobre naravne razmere za pridelavo medu z najboljšimi bioaktivnimi lastnostmi, zato bi morali posvetiti več pozornosti tudi proizvodnji in priznanju te kakovosti na trgu. K temu želimo prispevati s pričujočo raziskavo protimikrobne aktivnosti medov različnega porekla.

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

Ključne besede: protimikrobno delovanje, med, funkcionalne lastnosti

Geni za dejavnike virulence in odpornost proti protimikrobnim učinkovinam pri sevih bakterije *Escherichia coli*, izoliranih iz morske in jezerske kopalne vode in sedimentov

Veronika Ana Kralj¹, Jerneja Ambrožič Avguštin²

¹ JAFRAL, Stegne 13A, 1000 Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

jerneja.ambrozic@bf.uni-lj.si

V Sloveniji monitoring kopalnih voda običajno vključuje kvantifikacijo koliformnih bakterij in enterokokov. Čeprav analiza fenotipskih in genotipskih lastnosti ne sodi v redni monitoring, je lahko ključna za ovrednotenje potencialne patogenosti sevov, bremena genov povezanih z odpornostjo proti protimikrobnim učinkovinam v naravnih vodah in za ugotavljanje potencialnega vira onesnaženja. V naši študiji smo raziskovali pojavnost genov za dejavnike virulence (DV) in odpornost proti 7 antibiotikom pri sevih vrste *E. coli*, izoliranih iz vzorcev vode in sedimentov, ki smo jih tekom enega leta 1-krat mesečno pridobili iz 3 lokacij na Blejskem jezeru in kopališča v Portorožu. Z metodo ERIC-PCR smo izločili klonalne izolate, ki smo jih pridobili na isti dan na isti lokaciji vzorčenja. V analizo je bilo vključenih 62 izolatov, ki smo jih smo uvrstili v filogenetske skupine po Clermontu in z metodo PCR preverili prisotnost 27 genov, povezanih z DV. Pri vseh izolatih preverili fenotipsko odpornost proti izbranim antibiotikom, ter genotipsko za skupino genov CTX-M in PMQR. Največ izolatov smo pridobili iz vzorčnega mesta Veslaški center Bled (30) ter kopališča Zaka, najmanj pa iz plaže v Portorožu (1 izolat). Večina izolatov se uvršča v filogenetsko skupino A (39%), sledijo skupine B1 (21%) in D (24%) in B23 (16%). Število genov za DV na izolat se giblje med 1 in 9. Sevi z največ genov za DV so bili izolirani iz vode pri Veslaškem centru in v Zaki. Fenotipsko je bilo proti vsaj eni testirani protimikrobni učinkovini odpornih 28 izolatov, od tega pet proti dvema in deset proti trem ali več hkrati. Pri 6-ih izolatov smo potrdili gene skupine TEM, in CTX-M-1 ter PMQR. Naši preliminarni rezultati nakazujejo, da so sevi *E. coli*, prisotni v kopalnih vodah, zelo raznoliki, od potencialno patogenih in večkratno odpornih do občutljivih, brez ključnih DV. Večkratno odporni, CTX-M pozitivni in izolati z največ genov za DV so bili izolirali v mesecih februar, april in junij v vodi Veslaškega centra. Potencialni vir onesnaženja, glede na genotip izolatov, čas izolacije in mesto vzorčenja, je verjetno kmetijska dejavnost.

Ključne besede: *Escherichia coli*, naravne kopalne vode, dejavniki virulence, odpornost proti protimikrobnim učinkovinam

Proti antibiotikom odporni izolati *Escherichia coli* iz prehranske verige so lahko odporni tudi proti razkužilom in težkim kovinam

Manja Križman¹, Majda Golob², Irena Zdovc²

¹ Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana,

² Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

manja.krizman@vf.uni-lj.si

Pojavljane bakterij vrste *Escherichia coli*, ki so odporne proti glavnim skupinam antibiotikov, v zadnjih dveh desetletjih strmo narašča povsod po svetu. Odporne bakterije pogosto pridobijo gene za odpornost v različnih fazah prehranske verige, imajo pa tudi zoonotični pomen, zato je pri proizvodnji živil zelo pomembno preprečevanje mikrobiološke kontaminacije hrane. Za te namene je nujno potrebna uporaba razkužil, proti katerim bakterije lahko razvijejo odpornost, podobno kot proti antibiotikom. V živinoreji se kot prehranski dodatki uporabljajo tudi spojine, ki vsebujejo težke kovine s protimikrobno aktivnostjo in pospešujejo rast. V naši raziskavi smo pregledali 54 izolatov *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz (ESBL/AmpC) pridobljenih iz različnih virov: i) farme (n=2), ii) živilsko pridelovalna industrija (n=31), iii) in živila živalskega izvora (n=21). Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo glede odpornosti proti razkužilom iz skupine kvartarnih amonijevih spojin določali gene *qacEΔ1*, *qacE*, *qacG*, *qacF* in *sugE(p)*. Gen *qacEΔ1* in *qacF* smo zaznali v 12,9% (n=7), gen *sugE(p)* pa v 25,9% (n=14). S PCR smo preverili tudi gene za odpornost proti težkim kovinam: svincu (*pcoR*, *pcoC*, *pcoA*), arzeniu (*arsA*), kadmiju in cinku (*crzC*) bakru (*copB*), kadmiju (*cadD*) in živemu srebru (*merA*). Skupno je 30 (55,6%) sevov imelo vsaj en gen za odpornost proti težkim kovinam. Najbolj pogosti so bili geni za odpornost proti svincu (40,7% za gen *pcoR* in 29,6% za gena *pcoC* in *pcoA*) in proti živemu srebru (11,1% za gen *merA*). Genov za odpornost proti drugim težkim kovinam nismo zaznali. Živila živalskega izvora so lahko rezervoar za večkratno odporne bakterije *E. coli*. Uporaba razkužil ali kovin za dekontaminacijo v živinoreji in prehranski industriji pa lahko predstavlja dodaten negativni selekcijski pritisk. Nabor dovoljenih razkužil za uporabo v živilski industriji je zelo omejen, zato je ohranjanje občutljivosti bakterij za te snovi še posebej pomembno.

Ključne besede: *E. coli*; razkužila; težke kovine

Preverjanje protimikrobne učinkovitosti seva ŽP na patogenih sevih

Aleksander Lesar^{1,2}, Sara Petrin^{1,3}, Grégory Jubelin², Mateja Erdani Kreft³, Marjanca Starčič Erjavec¹

¹ Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² INRA, MICA - UMR MEDiS, 63122 Saint-Géne-Champanelle

³ Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

aleksander.lesar@gmail.com; sara.petrin.98@gmail.com

V Skupini za molekularno genetiko BF so pripravili sev ŽP, ki vsebuje plazmid, na katerem je gen »kill«, ki omogoča sintezo bakteriocina ColE7, ter ima v kromosomu gen »anti-kill«, ki omogoča sevu ŽP zaščito pred ColE7. S konjugacijo se plazmid prenese v recipienta, kjer se gen »kill« izrazi, to pa vodi v propad recipienta, saj le-ta nima gena »anti-kill«. Sev ŽP tako predstavlja nov tip protimikrobnega dejavnika, ki temelji na konjugaciji. Učinkovitost tega seva smo preizkusili v različnih poskusih.

V poskusih konjugacije z donorskim sevom ŽP oz. kontrolnim sevom MSE259 (sev s konjugativnim plazmidom, a brez gena "kill"), smo kot recipiente najprej uporabili človeške črevesne patogene seve bakterije *Escherichia coli* (EDL933, B2F1 in E2348/69) in mišji črevesni patogen *Citrobacter rodentium*. Poskuse konjugacije smo izvajali v tekočem gojišču LB v aerobnih in anaerobnih razmerah. Izvedli smo tudi poskuse konjugacije seva ŽP oz. MSE259 z recipientskim uropatogenim sevom *E. coli* DL82 in z laboratorijskim sevom *E. coli* RU4405. Te konjugacije smo izvedli v tekočem gojišču LB, v mediju za gojenje celic Caco-2 in na kulturi celic Caco-2.

Konjugacija je bila pri vseh črevesnih patogenih uspešna, a se je frekvenca konjugacije med sevi razlikovala, $1,7 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-5}$ pri EDL933, $3,2 \times 10^{-4} \pm 1,9 \times 10^{-4}$ pri *C. rodentium*, $4,4 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-5}$ pri B2F1 in $4,4 \times 10^{-5} \pm 2,5 \times 10^{-5}$ pri E2348. Frekvenca konjugacije s sevom DL82 je bila v gojišču LB $2,5 \times 10^{-6} \pm 1,9 \times 10^{-6}$, v mediju za celice Caco-2 $2,9 \times 10^{-6} \pm 5,8 \times 10^{-7}$ in na kulturi celic Caco-2 $2,7 \times 10^{-5} \pm 2,0 \times 10^{-5}$. Pri konjugaciji z laboratorijskim sevom RU4405 je bila frekvenca konjugacije v gojišču LB $3,8 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-4}$, v mediju za celice Caco-2 $3,4 \times 10^{-4} \pm 3,3 \times 10^{-4}$ in na kulturi celic Caco-2 $2,7 \times 10^{-5} \pm 2,4 \times 10^{-5}$. V poskusih konjugacije s sevom ŽP nismo dobili transkonjugant.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da ima sev ŽP potencial za uporabo kot protimikrobni dejavnik, saj konjugacija s tem sevom poteka uspešno z različnimi sevi v različnih gojitvenih razmerah.

Ključne besede: protimikrobni dejavnik; konjugacija; bakteriocin

Vpliv postopka priprave eteričnega olja sivke (*Lavandula hybrida*) na biološko aktivnost proti bakteriji *Campylobacter jejuni*

Janja Ogrizek, Dina Ramić, Sonja Smole Možina

Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

ogrizek.janja@gmail.com

Sivka (*L. hybrida*), poznana tudi kot lavandin, je naravni hibrid med vrstama sivke *L. angustifolia* in *L. latifolia*. Eterično olje (EO) pridobivajo s postopkom destilacije iz cvetov sivke in je rastlinski pripravek, potencialno uporaben za obvladovanje s hrano prenosljive črevesne patogene bakterije *C. jejuni*. Ta je v živilstvu problematična z vidika pritrjevanja na kontaktne površine ter posledičnega prenosa kontaminacije.

V raziskavi smo preučili biološko aktivnost dveh vzorcev eteričnih olj sivke *L. hybrida*, pridobljenih s postopkom parne destilacije v destilatorju iz nerjavnega jekla (LHEO 1) in stekla (LHEO 2). Določili smo protimikrobno delovanje z metodo makrodilucije, učinek na začetno pritrjevanje bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 na polistirensko površino ter zaviranje mehanizma medceličnega signaliziranja z merjenjem bioluminiscence s poročevalskim sevom *Vibrio harveyi* MM30 in ovrednotili razlike v biološki aktivnosti obeh vzorcev.

Ugotovili smo enak protimikroben učinek (MIK 250 mg/L). Za nadaljnje poskuse smo uporabili subinhibitorno koncentracijo (1/4 MIK), ki še ne zavira rasti bakterij, a že učinkovito zmanjšuje bakterijsko adhezijo in medcelično signaliziranje bakterij *C. jejuni*. LHEO 2 je pokazal boljši učinek tako pri zmanjšanju adhezije, kot tudi bioluminiscence. Vzorec LHEO 1 je zmanjšal adhezijo za $0,94 \pm 0,09 \log_{10}$ CFU/mL in bioluminiscenco za $31,6 \pm 5,9 \%$, LHEO 2 pa je zmanjšal adhezijo za $2,0 \pm 0,15 \log_{10}$ CFU/mL ter bioluminiscenco za $44,1 \pm 1,2 \%$. Rezultati potrjujejo povezanost obeh lastnosti bakterij in nakazujejo, da je medcelično signaliziranje zanimiva tarča za obvladovanje bakterij *C. jejuni*. Prav tako destilacija eteričnega olja v destilatorju iz različnih materialov vpliva na kemijsko sestavo eteričnih olj, kar posledično določa njihovo biološko aktivnost. V teku je kemijska karakterizacija obeh vzorcev eteričnih olj sivke *L. hybrida*, kar nam bo pomagalo razumeti biološko aktivnost vzorcev in vpletenost njihovih kemijskih komponent v protibakterijsko delovanje.

Ključne besede: eterično olje sivke; protiadhezijsko delovanje; *Campylobacter jejuni*

Odpornost bakterijskih celic *Escherichia coli* na sonolizo

Žiga Pandur^{1,2}, Matevž Dular¹, David Stopar²

¹ Fakulteta za strojništvo, Aškerčeva cesta 6, 1000 Ljubljana;

² Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

ziga.pandur@fs.uni-lj.si

Bakterijske celice imajo kompleksno večkomponentno strukturo celičnega ovoja kjer vsaka plast doprinese h končni stabilnosti celice na različne fizikalno kemijske stresorje. Ultrazvočna sonikacija je široko uporabljena metoda v laboratorijih za lizo celic. Kljub široki uporabnosti soniciranja pa še vedno ni poznan točen mehanizem delovanja sonikacije na posamezne plasti bakterijskih celic. V tem delu smo določali odpornost bakterije *Escherichia coli* s selektivno oslabljenim celičnim ovojem na sonolizo. Uporabili smo bakterijski sev *Escherichia coli* MG1655 in mutanto seva (*eps⁻*), ki je imela okvarjene gene za sintezo komponent zunajceličnega matriksa (kodrov, kolanske kisline in PGA). Celice v eksponentni in stacionarni fazi rasti smo tretirali z različnimi kemijskimi agensi (cefaleksin, lizocim, EDTA in EDTA + lizocim). Tretirane celice smo sonicirali z ultrazvočno sondo in določali spremembe v živosti bakterijskih celic. Za vizualizacijo morfoloških sprememb na celicah smo uporabili konfokalno lasersko mikroskopsko tehniko in transmisijsko elektronsko mikroskopijo. Z daljšanjem časa soniciranja se efekt inaktivacije bakterijskih celic povečuje. Rezultati kažejo, da imajo različni sloji ovoja različne doprinose k stabilnosti celice. Modificiranje peptidoglikanskega sloja s cefaleksinom ima največji vpliv na lizo celic pri soniciranju. Tretiranje z ostalimi kemijskimi agensi in odstranitev komponent zunajceličnega matriksa niso signifikantno vplivale na spremembo stabilnosti pri soniciranju. S spremembo fiziološkega stanja se občutljivost za delovanje ultrazvoka spreminja. Celice v stacionarni fazi so zelo odporne na delovanje ultrazvoka.

Ključne besede: *Escherichia coli*; sonoliza; bakterijski ovoj

Mehanizem delovanja eteričnega olja sivke na mutanto *Campylobacter jejuni* 11168Δ*luxS*

Dina Ramič¹, Anja Klančnik¹, Barbara Jeršek¹, Nataša Toplak², Minka Kovač², Urban Kunej¹, Sonja Smole Možina¹

¹ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija;

² Omega do.o.o., Dolinškova ulica 8, 1000 Ljubljana, Slovenija

dina.ramic@bf.uni-lj.si

Živilsko-prehranska oskrbovalna veriga intenzivno išče rešitve za obvladovanje patogenih bakterij, ki so prenosljive s hrano. V EU veljajo bakterije vrste *Campylobacter jejuni* za najpogostejše povzročitelje črevesnih okužb. Tveganje predstavlja predvsem uživanje nezadostno toplotno obdelanega okuženega perutninskega mesa. Bakterije vrste *C. jejuni* preživijo pri nizki temperaturi v piščančjem soku dlje časa kot v bogatem gojišču. V teh razmerah se bolje izraža gen *luxS*, ki je pomemben za centralni metabolizem bakterij vrste *C. jejuni*, saj uravnava sintezo esencialne aminokisline metionin. Mutanta *luxS* se slabše adherira na abiotske in biotske površine, posledično je manj filmotvorna. Prav tako slabše kolonizira piščance in je bolj podvržena oksidativnemu stresu.

Raziskovali smo mehanizem delovanja eteričnega olja sivke na mutanto *C. jejuni* 11168Δ*luxS* v primerjavi z referenčnim sevom *C. jejuni* NCTC 11168, saj bi z modulacijo izražanja gena *luxS* lahko zmanjšali tveganje za kontaminacijo živilskih proizvodov in okužbe z njimi. V ta namen smo kulture bakterij *C. jejuni* NCTC 11168 in *C. jejuni* 11168Δ*luxS* 30 min tretirali s sub-inhibitorno koncentracijo eteričnega olja sivke in z naslednjo generacijo sekveniranja proučili transkriptom ter ovrednotili mehanizem delovanja. Ugotovili smo, da eterično olje sivke povzroča močnejši oksidativni stres pri mutanti *luxS* kot referenčnem sevu ter da se je 458 genov izražalo drugače pri mutanti *luxS* v primerjavi z referenčnim sevom. Med njimi, 242 genov kaže nižji nivo izražanja in so večinoma del centralnega metabolizma bakterij.

Modulacija izražanja gena *luxS* in genov, ki so pomembni za centralni metabolizem bakterij, predstavlja ključen korak za obvladovanje bakterij vrste *C. jejuni* v živilsko-prehranski oskrbovalni verigi. Eterično olje sivke se je pokazalo kot potencialna alternativna protimikrobna učinkovina pri obvladovanju bakterij vrste *C. jejuni*.

Ključne besede: *Campylobacter jejuni*; mehanizem; eterično olje sivke

Higiena površin in pripomočkov za večkratno uporabo v zdravstveni ustanovi

Urška Rozman¹, Darja Duh², Mojca Cimerman², Sonja Šostar Turk¹

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede, Žitna ulica 15, 2000 Maribor

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za medicinsko mikrobiologijo, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

urska.rozman@um.si

V zdravstvenih ustanovah se za razkuževanje površin, materialov in opreme intenzivno uporabljajo biocidni proizvodi (antiseptiki in razkužila), ki predstavljajo pomoč pri obvladovanju in preprečevanju širjenja mikroorganizmov, ki povzročajo okužbe povezane z zdravstvom in zdravstveno oskrbo. Namen projekta je bil preveriti higieno površin, ki so namenjene večkratni uporabi oskrbovancev ter preveriti prisotno mikrobno populacijo na takšnih površinah. V prostorih fizioterapije, delovne terapije in skupnih prostorih smo popisali protokol in uporabljena dezinfekcijska sredstva za razkuževanje površin 12 pripomočkov za večkratno uporabo. Površine pripomočkov smo vzorčili z metodo jemanja brisov pred uporabo, po uporabi in po razkuževanju. Identifikacija in kvantifikacija mikroorganizmov je potekala z klasičnimi gojitvenimi metodami in metodo MALDI-TOF. Izbrana zdravstvena ustanova je za razkuževanje površin pripomočkov uporablja robčke Incidin alcohol wipe (Ecolab) in Mikrozid sensitive wipes (Schülke). Rezultati so pokazali, da so pripomočki večkrat kontaminirani že pred uporabo ali pa se le ti še dodatno okužijo ob uporabi v stiku s pacientom. Zaskrbljujoče je, da mikroorganizmi ostajajo na pripomočkih tudi po razkuževanju, kjer so bile identificirane naslednje vrste: *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* in *Micrococcus luteus* in sicer v koncentracijah od 1 do 300 cfu/mL. Vzroki za kontaminacijo izbranih pripomočkov bi lahko bili odvisni od protokolov čiščenja, saj le te v prostorih fizioterapije razkužujeta bolničarka ali fizioterapevt enkrat na dan ali po uporabi ob potenju ali vidni kontaminaciji. V prostorih delovne terapije pa pripomočke razkužuje čistilka ali terapevt enkrat na teden oz. po vsakem koloniziranem pacientu. Kontaminirane in neprimerno razkužene površine in pripomočki lahko služijo kot pomemben rezervoar za potencialno patogene mikroorganizme in predstavljajo izvor okužb ter pot prenosa patogenih mikroorganizmov preko neposrednega kontakta. V kompleksnih mikrobnih združbah na površinah in ob intenzivni uporabi razkužil obstaja možnost nastanka pridobljene bakterijske odpornosti proti biocidom, kar lahko posledično vodi tudi do bakterijske odpornosti proti antibiotikom.

Občutljivost mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij iz agro-živilske verige za protimikrobne spojine

Vita Rozman, Petra Mohar Lorbeg, Tomaž Accetto, Bojana Bogovič Matijašič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale

Vita.Rozman@bf.uni-lj.si

Odpornost patogenih bakterij proti protimikrobnim spojinam predstavlja resno grožnjo zdravju ljudi. Nedavne študije so razkrile širok rezervoar genskih determinant odpornosti pri komenzalnih bakterijah iz raznolikih okolij. Namen predstavljenega dela je bil raziskati občutljivost mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij, namerno vnesenih v agro-živilsko verigo, za protimikrobne spojine in prisotnost genskih determinant odpornosti v celih genomih izbranih sevov.

Občutljivost za protimikrobne spojine smo določili za 470 bakterijskih sevov (153 probiotičnih in starterskih kultur, 154 sevov iz fermentiranih mlečnih izdelkov, 90 iz humane črevesne sluznice in 73 iz humanega mleka) z razredčevalno metodo v mikrotiterskih ploščah (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala, Švedska), skladno s standardom ISO 10932. Genske determinante odpornosti smo ugotavljali v celih genomskih zaporedjih, ki smo jih pridobili s sekvenciranjem genomov izbranih predstavnikov ali iz javnih podatkovnih zbirk.

Kot pričakovano smo najvišjo stopnjo fenotipske odpornosti proti vsaj enemu antibiotiku zaznali pri sevih iz humane črevesne sluznice (77,8 %), najnižjo pa pri sevih iz starterskih kultur (40,8 %). Bimodalno razporeditev vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij, ki nakazujejo na pridobljeno odpornost, smo zaznali za 10 antibiotikov. Skupina probiotikov je izkazovala najvišjo stopnjo fenotipske odpornosti proti eritromicinu (9,8 %) in klindamicinu (15,9 %). V celih genomskih zaporedjih izbranih predstavnikov smo zaznali pridobljene gene za odpornost proti aminoglikozidom, kloramfenikolu, makrolidom in tetraciklinom ter številne mutacije v genih, ki so bili predhodno povezani z odpornostjo proti protimikrobnim spojinam. Dodatna *in silico* analiza je pokazala široko razširjenosti gena *tetW* med mlečnokislinskimi bakterijami in bifidobakterijami ter povezavo z mobilnimi genetskimi elementi.

Mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije, namenoma vnesene v agro-živilsko verigo, lahko predstavljajo rezervoar odpornosti proti protimikrobnim spojinam, vendar so rezultati naše raziskave nakazali manjšo pojavnost odpornosti pri namerno vnesenih mlečnokislinskih bakterijah in bifidobakterijah (starterske kulture, probiotiki) kot pri tistih, ki so naravno prisotne v agro-živilski verigi oziroma v vzorcih humanega porekla.

Ključne besede: odpornost proti protimikrobnim spojinam; mlečnokislinske bakterije; bifidobakterije

Protimikrobna in citotoksična aktivnost izvlečkov gob

Meta Sterniša¹, Urša Pečar Fonovič², Tine Grebenc³, Anja Klančnik¹, Jerica Sabotič⁴

¹ Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

³ Gozdarski Institut Slovenija, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

⁴ Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana

jerica.sabotic@ijs.si

Gobe so bogat vir novih bioaktivnih snovi, ki jih lahko uporabimo pri razvoju inovativnih strategij za nadzor pojava biofilmov. Biofilmi predstavljajo nenehen vir kontaminacij v prehranski verigi in hkrati ščitijo bakterije pred neugodnimi pogoji okolja. Med najbolj problematičnimi bakterijami, ki povzročajo zastrupitve s hrano sta *Listeria monocytogenes* zaradi visoke smrtnosti in *Campylobacter jejuni* zaradi visoke pogostnosti.

Analizirali smo vodne izvlečke 24 gob in tartufov glede na njihove protimikrobne in protiadhezivne lastnosti proti grampozitivnim bakterijam *L. monocytogenes* in *Staphylococcus aureus* ter proti gramnegativnim bakterijam *C. jejuni* in *Escherichia coli* s spremljanjem rasti in z uporabo metode štetja kolonij in analize adhezije na polistiren. Za potrditev protimikrobnega delovanja L-aminokislinskih oksidaz smo uporabili test s katalazo. Hkrati smo za izvlečke z najboljšo aktivnostjo proti izbranim bakterijam preverili tudi njihovo citotoksičnost na človeške epiteljske celice Caco-2 s testom MTS in z ustreznim razponom redčitev posameznega izvlečka določili njegovo IC₅₀. Celice smo nadalje inkubirali v prisotnosti citotoksične koncentracije izvlečka ter katalaze in z uporabo 7-AAD s pretočno citometrijo določili, ali je delovanje izvlečka posledica vsebnosti L-aminokislinskih oksidaz.

Protimikrobno delovanje smo ugotovili pri 10 izvlečkih, delovanje je bilo vrstno specifično z večjo dovzetnostjo bakterij *S. aureus* in *C. jejuni*. Na vse štiri bakterije so delovali izvlečki gob *Caloboletus calopus*, *Pseudohydnum gelatinosum* in *Tylopilus felleus*. Noben izvleček v subinhibitorni koncentraciji ni zmanjšal adhezije bakterij. S testom s katalazo smo pokazali, da je protimikrobno delovanje izvlečkov izničeno in tako najverjetneje posledica delovanja L-aminokislinskih oksidaz. Ta aktivnost se je nadalje pri treh izvlečkih pokazala tudi kot toksična za celice Caco-2.

Vodni izvlečki gob so vir protimikrobnih L-aminokislinskih oksidaz, ki delujejo toksično tako na grampozitivne kot na gramnegativne bakterije. Prav tako delujejo toksično na človeške epiteljske celice. To delovanje pa ni povezano z užitnostjo gob, saj so tako užitne kot strupene gobe pokazale podobno stopnjo protimikrobne in citotoksične aktivnosti.

Ključne besede: biofilm; protimikrobno delovanje; citotoksično delovanje

Filmotvornost bakterije *Pseudomonas fragi* na jekleni površini in njeno obvladovanje s polimerno-MoO₃ nanokompozitno prevleko

Meta Sterniša¹, Urška Gradišar Centa², Maja Remškar², Sonja Smole Možina¹

¹ Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Inštitut Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi, Jamova 39, 1000 Ljubljana

sonja.smole@bf.uni-lj.si

Pseudomonas fragi je najpogostejše določena bakterijska vrsta v pokvarjenih beljakovinskih živilih, kot so ribe, meso, mleko in mlečni izdelki. Dobra prilagodljivost na okoljske stresorje, psihotrofnost in enostavne prehranske potrebe ter pritrjevanje in tvorba biofilma na površinah različnih materialov jim omogoča perzistenco v pogojih živilske industrije.

V predstavljenem delu smo določili filmotvornost bakterije *P. fragi* na jekleni površini z določanjem števila kultivabilnih pritrjenih celic pri 5 °C in 15 °C po 1, 3 in 7 dneh inkubacije. Kot medij smo testirali fiziološko raztopino ter homogenata ribjega in piščančjega mesa. Jekleno površino smo prevlekli s polimernim nanokompozitom, ki ga sestavljajo inerten polimer poli(viniliden-fluorid-ko-heksafluoropropilen) (PVDF-HFP) in vodotopen polivinilpirolidon (PVP) ter MoO₃ nanožice. Nanokompozitno površino smo karakterizirali (morfologija, hidrofobnost) in določili protiadhezivno (po 4 h) in proti-biofilmsko (po 24 h) delovanje.

Ugotovili smo, da bakterija *P. fragi* tvori biofilm hitreje pri 15 °C in bolj izrazito pri homogenatu ribjega in piščančjega mesa, a tudi v mediju brez hranil (fiziološka raztopina). Nadalje smo testirali MoO₃ nanokompozitno prevleko, ki je zgladila jekleno površino in povečala hidrofobnost glede na čisto jekleno površino. Topografijo nanokompozitne površine karakterizirajo približno mikronske polkrožne strukture in posamezne manjše strukture. V fiziološki raztopini je nanokompozit izkazal odlično protimikrobno delovanje in po 24 h ni bilo prisotnih živih bakterij, kar povezujemo s padcem vrednosti pH. V homogenatu ribjega in piščančjega mesa ni prišlo do padca pH, a se je po 24 h zmanjšalo število pritrjenih celic za več kot 2 log CFU/cm².

Bakterija *P. fragi* se hitro adherira in tvori biofilm pri nizkih temperaturah na jeklenih površinah. MoO₃ nanokompozitna prevleka deluje protimikrobno, a v odvisnosti od puferske kapacitete medija. Ob prisotnosti kompleksnega medija, kot je homogenat živila, sklepamo, da pride do interakcije med nanokompozitom in bakterijami, kar se odrazi z dobrim proti-biofilmskim delovanjem.

Ključne besede: proti-biofilmsko delovanje; MoO₃ nanožice; *Pseudomonas fragi*

Fotoakustično odstranjevanje biofilmov *Enterococcus faecalis* iz titanovih površin z laserjem Er:YAG s super kratkimi pulzi

Saša Terlep¹, Michaela Hympanova², Iztok Dogša³, Franja Pajk¹, David Stopar³

¹ Fotona d.o.o., Stegne 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Biomedicinski raziskovalni center, Univerzitetna Bolnišnica Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Češka

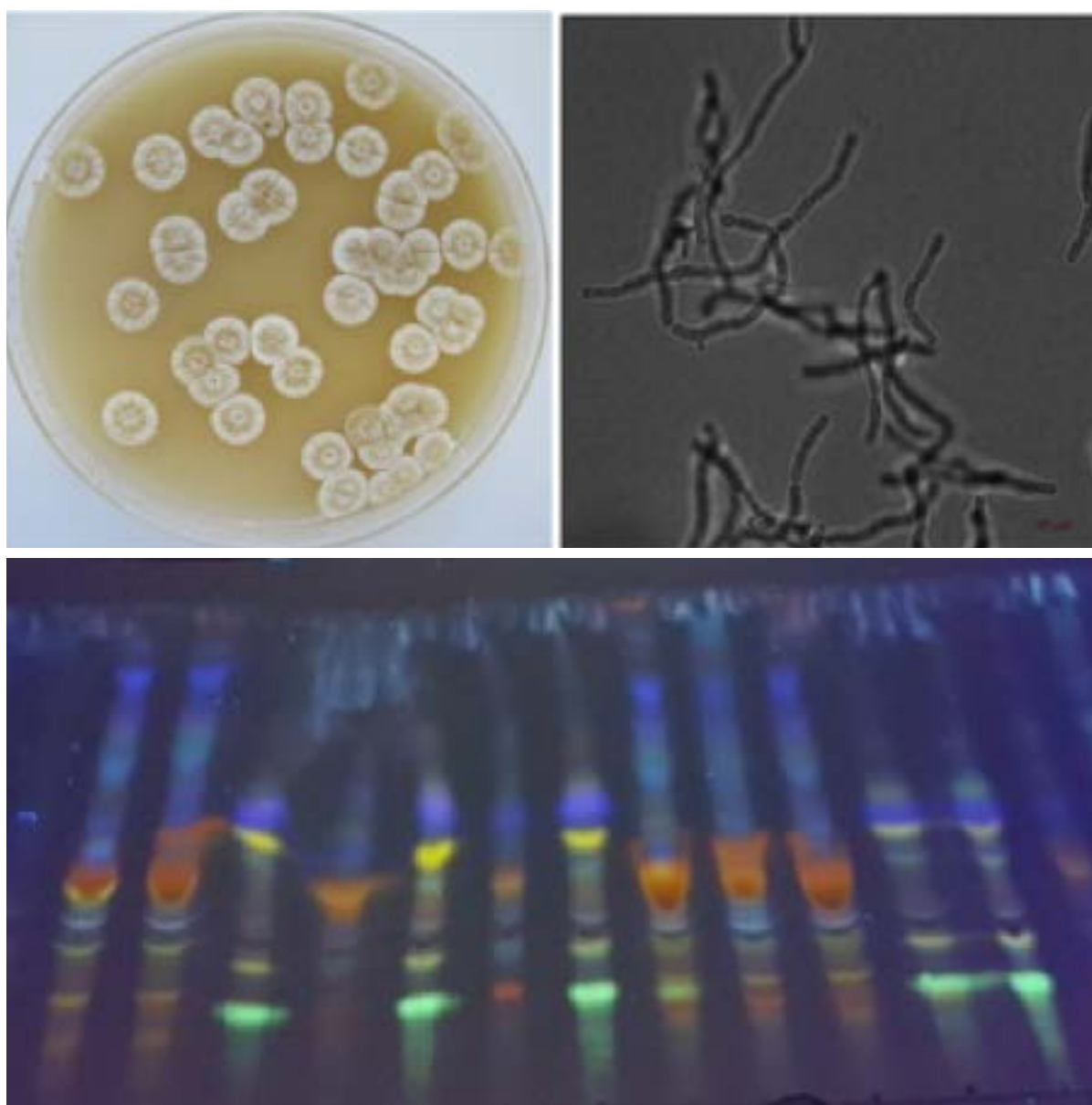
³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

sasa.terlep@fotona.com

Omejena učinkovitost trenutno veljavnih metod zdravljenja peri-implantnih bolezni je v prvi vrsti posledica težko dostopnih mest v peri-implantnem prostoru, ki jih med terapijo ni mogoče neposredno doseči. V tem delu smo za odstranjevanje biofilmov uporabili posredno lasersko metodo, ki uporablja super kratke pulze (Er: YAG-SSP) in temelji na kavitaciji in turbulentnem mešanju irigantov. Biofilme *Enterococcus faecalis* smo gojili na titanovih ploščicah. Odstranjevali smo jih kemijsko z različnimi dezinfekcijskimi sredstvi (npr. klorheksidin in vodikov peroksid) in s kombinacijo dezinfekcijskih sredstev ter Er:YAG-SSP fotoakustičnega pretakanja. Učinkovitost odstranjevanja biofilmov in dezinfekcije površine smo ugotavljali z lasersko konfokalno vrstično mikroskopijo. Rezultati kažejo, da je Er:YAG-SSP fotoakustično pretakanje bistveno učinkovitejše za odstranjevanje biofilmov in dezinfekcijo titanovih površin v primerjavi s kemično obdelavo s standardnimi dezinfekcijskimi sredstvi. Dezinfekcija biofilmov s kombinirano kemično in fotoakustično obdelavo se ni bistveno razlikovala od dezinfekcije biofilmov s fotoakustično obdelavo v fiziološki raztopini, kar kaže, da kemična obdelava ni bila potrebna za odstranjevanje biofilmov in dezinfekcijo titanovih površin. Ker Er:YAG-SSP tehnika uspešno zajema glavne cilje čiščenja in dezinfekcije zobnih vsadkov: 3-D pretakanje iriganta nad biofilmi, povečano penetracijo iriganta v biofilme, brezkontaktno odstranjevanje biofilmov in nekemično dezinfekcijo površine vsadka menimo, da bi to lahko postala obetavna nova metoda pri peri-implantatnem zdravljenju.

Ključne besede: titanove površine; zobni vsadki; biofilmi; Er:YAG laser; *Enterococcus faecalis*; fotoakustično pretakanje

Mikrobi in biotehnologija



Kolonije *Streptomyces* sp. (zgoraj levo), micelij, (zgoraj desno, svetlobna mikroskopija; povečava 2000 x) in identifikacija sekundarnih metabolitov kulture *Streptomyces* sp. s pomočjo tankoslojne kromatografije (spodaj). Slike so nastale na Oddelku za živilstvo BF UL (Martina Avbelj, Lucija Slemc, Špela Pikl, Hrvoje Petković).

Biometanski potencial kisle sirotke in možnosti njene uporabe v proizvodnji bioplina iz odpadnega biološkega blata

Lijana Fanedl¹, Blaž Petek¹, Maruša Lah¹, Marjetka Levstek², Romana Marinšek Logar¹

¹ Biotehniška fakulteta, Groblje 3, 1230 Domžale

² Centralna čistilna naprava Domžale Kamnik, Študljanska cesta 91, 1230 Domžale

Lijana.Fanedl@bf.uni-lj.si

Sirotka je tekoč stranski produkt mlekarske industrije, ki nastaja pri predelavi mleka v sir in druge fermentirane mlečne izdelke. Uporaba neobdelane sirotke ni zelo razširjena, največ se je porabi za krmljenje živali in v živilski industriji. Večina sirotke tako še vedno konča v odpadnih vodah, kjer zaradi visoke vsebnosti organske snovi predstavlja veliko obremenitev. V že obstoječih bioplinskih napravah lahko v procesu anaerobne presnove sirotka predstavlja dodatni substrat, pri čemer vpliv njene nizke alkalinitete in pH na anaerobni proces ni podrobno raziskan.

Namen raziskave je bil izmeriti biometanski potencial (BMP) sirotke v kombinaciji z mešanico biološkega blata iz primarnega in sekundarnega usedalnika Centralne čistilne naprave Domžale-Kamnik d.o.o. pri mezofilnih pogojih, ugotoviti največjo količino dodane kisle sirotke v pilotni bioplinski digestor, ki še omogoča nemoteno delovanje procesa in z metodo TRFLP ugotoviti, ali dodana sirotka vpliva na spremembe v sestavi mikrobne združbe.

Test BMP smo izvajali 32 dni pri 39 °C in ugotavljali, kako dodatek sirotke v kombinaciji z mešanico primarnega in sekundarnega biološkega blata vpliva na proizvodnjo bioplina in delež metana v njem. Ob koncu testa smo največ bioplina izmerili v mešanicah s samo sirotko. Delež metana v proizvedenem bioplinu je bil 65 %. Dodatek sirotke k biološkemu blatu v primerjavi z mešanicami s samim blatom v testu BMP ni povečal proizvodnje bioplina in metana.

Poskus na pilotnem nivoju smo izvajali 238 dni v dveh 200-litrskih digestorjih pri 39 °C. V oba digestorja smo dnevno dodali mešanico primarnega in sekundarnega blata, v eksperimentalni digestor pa smo dodajali tudi različno količino sirotke. Dodatek sirotke v eksperimentalni digestor ni imel večjega vpliva na vrednost pH, vsebnost KMK, suhe in organske snovi, sestavo bioplina in KMK. Opazen je vpliv faktorja redčenja pri alkaliniteti ter vsebnosti amonijevega in Kjeldahlovega dušika. Dnevna proizvodnja bioplina je bila v eksperimentalnem digestorju višja kot v kontrolnem. Analiza spreminjanja mikrobne združbe je pokazala večje premike v arhejski kot v bakterijski mikrobni združbi.

Ugotovili smo, da je sirotka ustrezen substrat za hkratno anaerobno razgradnjo z odpadnim biološkim blatom iz čistilnih naprav, saj dodatek sirotke poveča proizvodnjo bioplina.

Ključne besede: kislá sirotka; biološko blato; bioplin

Opis novih vrst očetnokislinskih bakterij *Komagataeibacter melaceti* sp. in *Komagataeibacter melomenusus* sp., izoliranih iz jabolčnega kisa

Leon Marič¹, Ilse Cleenwerck², Tomaž Accetto³, Peter Vandamme², Janja Trček^{1,4}

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Koroška cesta 160, 2000 Maribor

² BCCM/LMG Bacteria Collection, Laboratory of Microbiology, Ghent University, Faculty of Sciences, Ghent, Belgium

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Domžale, Slovenija

⁴ Univerza v Mariboru, Fakulteta za Kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, Slovenija

janja.trcek@um.si

Iz industrijskih bioreaktorjev za proizvodnjo jabolčnega kisa v Kopivniku smo osamili nove seve očetnokislinskih bakterij. Analiza njihovih medgenskih regij 16S-23S rDNA je odkrila dva seva (AV382 in AV436), ki potencialno predstavljata novi bakterijski vrsti. Fenotipska preiskava je obsegala opazovanje morfologije kolonij, barvanje po Gramu, katalazni in oksidazni test, sposobnost sinteze celuloze in oksidacije očetne kisline, identifikacijo posameznih vrst glukonskih kislin, analizo celokupnih maščobnih kislin, rast na različnih virih ogljika, rast v prisotnosti 30 % glukoze, sposobnost uporabe N iz (NH₄)₂SO₄ ob prisotnosti različnih virov ogljika, rast brez etanola in očetne kisline, rast ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola in različni koncentraciji očetne kisline ter rast v anaerobnih in aerobnih razmerah. Pregledali smo nukleotidna zaporedja genov za 16S rRNA in medgenske regije 16S-23S rDNA ter celotna genomska zaporedja. Genomsko zaporedje seva *Komagataeibacter* sp. AV382 je najbolj podobno vrsti *Komagataeibacter kakiaceti* (ANIb 88,73 %) in seva *Komagataeibacter* sp. AV436 vrsti *Komagataeibacter xylinus* (ANIb 91,55 %). Na podlagi fenotipskih lastnosti lahko sev *Komagataeibacter* sp. AV382 razlikujemo od najbolj sorodnih vrst rodu *Komagataeibacter* po tem, da producira 2-keto in 5-ketoglukonsko kislino, ne raste ob prisotnosti 30 % glukoze, sintetizira maščobno kislino C19:0 cyclo ω8c, ob prisotnosti etanola pa tolerira do 5 % očetne kisline. Sev *Komagataeibacter* sp. AV436 lahko na podlagi fenotipskih lastnosti od najbolj sorodnih vrst rodu *Komagataeibacter* razlikujemo po tem, da tvori 5 keto-glukonsko kislino, dobro raste na propanolu, sintetizira celulozo in v prisotnosti etanola tolerira do 5 % očetne kisline. Na podlagi kombinacij fenotipskih, kemotaksonomskih in filogenetskih lastnosti, predstavljata seva AV382 in AV436 novi vrsti očetnokislinskih bakterij, za kateri predlagamo ime *Komagataeibacter melaceti* in *Komagataeibacter melomenusus*.

Ključne besede: očetnokislinske bakterije; kis; *Komagataeibacter*

Proizvodnja nizina v osiromašeni kisli sirotki in primerjava dveh metod izolacije s HPLC

Jernej Oberčkal¹, Diana Paveljšek¹, Neja Pristovšek¹, Marko Kete², Maja Zupančič Justin², Bojana Bogovič Matijašič¹

¹ Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Biotehniška fakulteta, Groblje 3, 1230 Domžale

² Arhel d.o.o., Pustovrhova ulica 15, 1210 Ljubljana

jernej.oberckal@bf.uni-lj.si

Kisla sirotka nastane kot stranski produkt pri proizvodnji skute in grškega jogurta. Za razliko od sladke sirotke vsebuje kisla sirotka mlečno kislino, ki otežuje nadaljnjo tehnološko obdelavo z ustaljenimi postopki in se zato pogosto obravnava kot odpadke. V naši raziskavi smo osiromašeno kislo sirotko, iz katere smo predhodno odstranili laktoferin in del drugih proteinov, uporabili kot surovino za gojenje laktokokov in proizvodnjo bakteriocina nizina, ki se zaradi svoje robustnosti in široke protimikrobne aktivnosti s pridom uporablja v živilski industriji.

Mikrofiltrirano osiromašeno kislo sirotko smo obogatili z dodatkom 2,5 % kvasnega ekstrakta in jo v treh šaržnih procesih v 2,5-litrskih bioreaktorjih fermentirali z *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IM145, lastnim izolatom iz kislega mleka. Tekom fermentacije smo spremljali pH, optično gostoto in protimikrobno aktivnost proti indikatorskemu sevju *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. Po končani fermentaciji smo brozgo centrifugirali in iz supernatanta izolirali nizin s pomočjo kationsko-izmenjevalne HPLC ali RP-HPLC. Frakcije smo analizirali z NaDS-PAGE in izmerili njihovo protimikrobno aktivnost.

Vzpostavili smo uspešen protokol proizvodnje nizina v večjem merilu s sevom IM145, ki je dosegel stacionarno fazo po 8 h inkubacije. Najbolj primeren čas za zaključek procesa je bil po 8 h, saj je bila takrat bakteriocinska aktivnost najvišja. Po frakcionaciji s HPLC smo na podlagi analize NaDS-PAGE ugotovili, da pri danih pogojih kationsko-izmenjevalna HPLC za čiščenje nizina ni primerna, saj so v nizinski frakciji prevladovali proteini β -laktoglobulin, IgG in BSA. Z metodo RP-HPLC pa smo uspeli pridobiti bolj čist nizin.

Z našo raziskavo smo pokazali, da je kisla sirotka ustrezen medij za gojenje mlečnokislinskih bakterij in tako prikazali nov način izrabe ter zmanjšanja odpadka mlekarske industrije. Uspešno smo razvili dve metodi detekcije in čiščenja nizina s HPLC. Metoda RP-HPLC se je izkazala za bolj uspešno, zato bomo naslednje aktivnosti usmerili v optimizacijo te metode na preparativnem nivoju.

Ključne besede: nizin; kisla sirotka; HPLC

Mikrobno recikliranje odpadne ovčje volne

Blaž Petek, Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Groblje 3, 1230 Domžale

blaz.petek@bf.uni-lj.si

Odpadna ovčja volna v državah srednje Evrope dan danes večinoma predstavlja odpadni organski material bogat s težko razgradljivim keratinom. Z namenom pospeševanja biološkega recikliranja odpadne ovčje volne, načrtujemo razvoj mikrobnihih starterskih kultur za kompostiranje, gnojenje in proizvodnjo bioplina. V tej raziskavi smo iz kompostnega kupa volne in iz zemlje pod njim, pri treh različnih temperaturah (30 °C, 55 °C in sobna temperatura), izolirali 69 keratinolitičnih sevov. Zmožnost razgradnje volne smo pri vseh izoliranih sevih testirali na agarskih ploščah z neobdelano ovčjo volno in keratinom v prahu, kot edinem viru ogljika in dušika. Na plošče s keratinom v prahu smo pridobili jasno vidne čiste cone okrog kolonij. Sev S3018, ki je kazal najboljšo aktivnost pri testih na ploščah, smo dodatno testirali s Keratin azure, kot edinim virom ogljika in dušika, kjer smo razgradnjo volne spremljali tudi s svetlobno mikroskopijo. V nadaljevanju smo pri identifikaciji seva S3018 primerjali sekvenco 16S rRNA s homolognimi sekvencami v GenBank in odkrili 99,8 % homologijo s *Streptomyces coelicoflavus*. Začeli smo s testiranjem keratinolitične aktivnosti izolatov, pri sevih izoliranih pri 55 °C noben sev ni pokazal visoke keratinolitične aktivnosti, pri sevih izoliranih pri 30 °C, je 8 sevov pokazalo visoko keratinolitično aktivnost (6.300 – 25.500 U), pri sevih izoliranih pri sobni temperaturi pa so 4 sevi pokazali visoko keratinolitično aktivnost (5.900 – 35.900 U) tudi višjo od nekaterih pozitivnih kontrol (*Bacillus subtilis*, PS216 – 10.600 U, *Streptomyces fradiae* – 41.000 U) pri čemer je ena enota keratinolitične aktivnosti definirana kot količina encima, ki povzroči dvig koncentracije prostih aminokislin v supernatantu za 0,1 µmol/L v 14 dneh pri izbranih pogojih. Načrtujemo identifikacijo najbolj aktivnih keratinolitičnih izolatov, karakterizacijo njihovih encimov in opis njihovih potencialov za pripravo učinkovitih starterskih ali bioaugmentacijskih kultur.

Ključne besede: ovčja volna; keratin; mikrobno recikliranje

Kemijske in mikrobiološke spremembe v pozabljeni steklenici viskija

Ajda Pristavec¹, Simon Koren², Barbara Jeršek³, Anja Veronovski², Leon Korošec², Miha Kovač², Minka Kovač², Nataša Toplak²

¹ Université catholique de Louvain, Place de l'Université 1, 1348 Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgija

² Omega d.o.o., Dolinškova 8, 1000 Ljubljana

³ Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

ajdapristavec1@gmail.com

Viski je priljubljena in svetovno poznana žgana pijača, ki je tradicionalno proizvedena v več korakih od pridobivanja ječmenovega slada, fermentacije v alkoholno sladico in destilacije, ki ji sledi vsaj 3 leta trajajoče staranje v hrastovih sodih in končna filtracija. Pred končno uporabo in stekleničenjem destilat razredčijo na končno koncentracijo alkohola približno 40%. V postopku fermentacije viskija so ključni mikroorganizmi, a so le-ti lahko hkrati tudi njegovi kvarljivci.

Raziskovalni izziv našega laboratorija je bilo nenavadno okolje za rast mikroorganizmov, in sicer pozabljena odprta in pol prazna steklenica Scotch viskija. Izhajali smo iz stališča, da viski ne predstavlja primerne okolja za rast mikroorganizmov. Odločili smo se za multidisciplinarni pristop. Z meritvijo pH smo ugotovili, da se le-ta tekom let ni spremenil. Spremembe v kemijski sestavi smo preučili z ATR-FTIR spektroskopijo, ki je pokazala, da se je koncentracija alkohola znižala iz začetnih 40 % na približno 30 %. Raznoverstnost in zastopanost članov mikrobne skupnosti je bila analizirana z metagenomsko analizo s kombiniranjem naslednje generacije sekveniranja (NGS) s targetiranjem gena 16S rRNA in podenote D2 gena LSU, ki kodira del rRNA pri glivah. Ugotovili smo, da je v pozabljenem viskiju le zelo malo število aerobnih mezofilnih bakterij (<10 CFU/ml). Metagenomska analiza je razkrila veliko in raznoverstno mikrobno skupnost, ki je živela v pozabljenem viskiju. Med najpogostejšimi mikroorganizmi so bili člani običajne človeške mikrobiote, nekaj potencialno patogenih bakterij kot tudi kvarljivcev hrane, na primer bakterije rodu *Pseudomonas*. Presenetljivo smo potrdili prisotnost tudi nezanemarljivega števila tipično okoljskih vrst. Z metagenomsko analizo podenote D2 gena LSU pa smo dokazali 14 družin različnih gliv. V naši poljubnoznanstveni raziskavi smo prikazali uspešno povezovanje in prepletanje različnih vej bioloških in kemijskih znanosti ter hitro, zanesljivo, občutljivo in cenovno ugodno identifikacijo mikroorganizmov v skupnosti z uporabo NGS.

Ključne besede: viski; bakterije; glive

Raznolikost vodotopnih zunajceličnih heteropolisaharidov očetnokislinskih bakterij in njihove viskoelastične lastnosti

Tadeja Vajdič¹, Jure Škraban¹, Kim Fijok¹, Nina Jančič¹, Iztok Dogša², David Stopar², Janja Trček¹

¹ Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Koroška cesta 160, 2000 Maribor

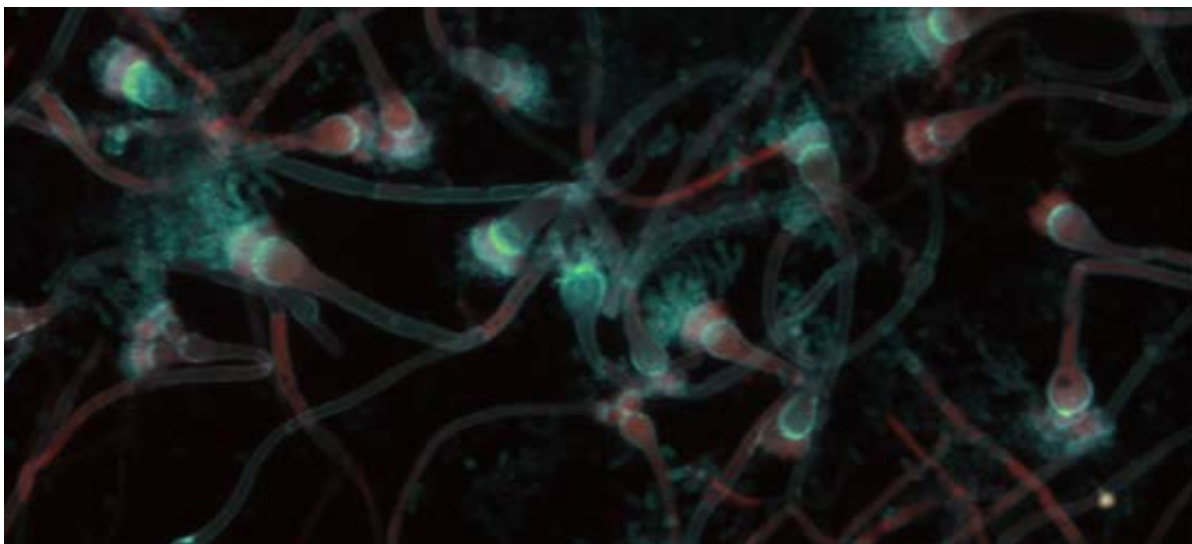
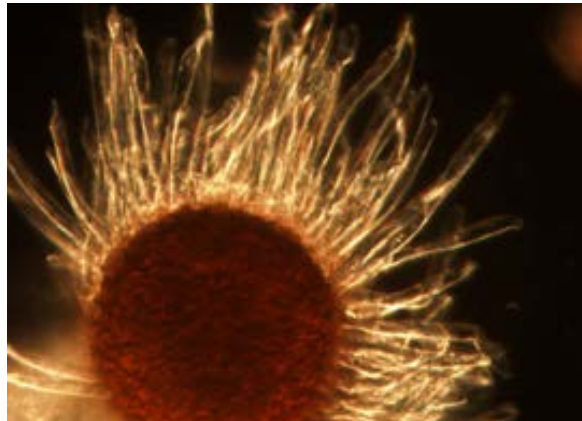
² Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

tadeja.vajdic@um.si

Očetnokislinske bakterije ob produkciji očetne kisline pridobivajo pomen tudi kot varni mikroorganizmi za proizvodnjo zunajceličnih polisaharidov. Med njimi sta najbolj znana homopolisaharida celuloza in levan. Ob teh, očetnokislinske bakterije proizvajajo tudi heteropolisaharidne vodotopne acetane. Heteropolisaharidi zaradi kompleksne in razvejane strukture že pri nizkih koncentracijah povečajo viskoznost tekočih substratov, kar omogoča uporabo v raznih industrijah. V pričujočem delu smo okarakterizirali ter preučevali reologijo vodotopnih zunajceličnih heteropolisaharidov sevov *Acetobacter aceti* LMG 1504T, *Acetobacter pomorum* LMG 18848T ter *Komagataeibacter oboediens* AV380. Monosaharidna sestava (določena s tankoplastno kromatografijo po hidrolizi) je pokazala prisotnost fruktoze, ramnoze, glukoze, manoze, glukuronske kisline ter galaktoze. Sevi so se glede deleža in sestave monosaharidov razlikovali. Reološka analiza viskoznosti in elastičnosti vzorcev z rotacijskim viskozimetrom je bila opravljena s 1,5 % raztopinami v citratno-fosfatnem pufru (pH=2,4 ali 7). Pri vseh heteropolisaharidih smo opazili psevdoplastičnost. Za razliko od heteropolisaharidov *A. pomorum* in *K. oboediens*, ki so kazali obnašanje značilno za viskoelastične trdnine, je heteropolisaharid iz *A. aceti* tvoril viskoelastično tekočino. Največjo viskoznost in viskoelastičnost smo opazili pri heteropolisaharidu seva *K. oboediens*, ki kaže reološke podobnosti s ksantanom. Te lastnosti nakazujejo, da je ta heteropolisaharid zanimiv za uporabo v industriji.

Ključne besede: očetnokislinske bakterije; zunajcelični heteropolisaharidi; viskoelastičnost

Mikrobi in okolje



Izsek kolonije črne kvasovke *Hortaea werneckii* iz solin (levo zgoraj, pod stereomikroskopom). Plodišče pepelaste plesni *Erysiphe* s površine lista hrasta (desno zgoraj, mikroskopija v temnem polju; povečava: 400 x). *Aspergillus destruens* obarvan s fluorescentnimi barvili (v sredini, optična mikroskopija s fluorescenco; povečava: 400 x). Izsek kulture *Penicillium claviforme* (spodaj, pod stereomikroskopom). Slike so nastale na Oddelku za biologijo, BF UL (Polona Zalar, Mitja Gajšek).

Dva nova rodova bazidiomicetnih gliv iz svalbardskih in grenlandskih ledenikov: *Callizyma* gen. nov. in *Psychromyces* gen. nov.

Kristina Andrejašič¹, Laura Perini¹, Nina Gunde-Cimerman¹, Cene Gostinčar^{1,2}, Polona Zalar¹

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Lars Bolund Institute of Regenerative Medicine, BGI-Qingdao, Qingdao 266555, Kitajska

polona.zalar@bf.uni-lj.si

V okviru preučevanja raznolikosti gliv na grenlandski ledeni plošči, na območju temnega ledu in na ledenikih na Svalbardu (Arktika), smo osamili kvasovke iz snega, čistega in temnega ledeniškega ledu, ledeniške vode in kriokonitnih lukenj. Potrdili smo, da bazidiomicetne kvasovke v polarnih območjih prevladujejo nad askomicetnimi kvasovkami. Med bazidiomicetnimi kvasovkami so prevladovali tri filogenetsko sorodne skupine sevov, ki so predstavljale tako polovico vseh osamljenih sevov kot tudi polovico vseh bazidiomicetnih kvasovk določenih na osnovi NGS analize ITS2 v celokupni okoljski DNA. Na osnovi poravnave zaporedij ribosomskih in gospodinjskih genov smo opravili filogenetske analize in ugotovili, da predstavljajo še neopisane psihrofilne vrste. Predlagali smo dva za znanost nova rodova: *Callizyma* in *Psychromyces*. Rodova, ki se v glivnem debelu Basidiomycota uvrščata v poddeblo Pucciniomycotina in razred Microbotryomycetes, sta si filogenetsko tesno sorodna in obsegata tri nove vrste: *Callizyma arctica*, *Callizyma psychrophila* in *Psychromyces glacialis*.

Sevi novih vrst kvasovke rastejo izredno počasi, pri temperaturah med 5 in 15 °C, predvsem na krompirjevem agarju in zelo počasi na ostalih gojiščih. So značilno rožnato obarvani in nagubani, celice so polne vključkov. Njihove morfološke značilnosti smo proučili s pomočjo gojenja, mikroskopije in križanja z namenom določitve zmožnosti spolnega razmnoževanja. Asimilacijo različnih virov ogljika in dušika smo proučili klasično, z API 20C AUX ter Biolog testi (YT, PMA). Zaradi psihrofilne, in oligotrofne narave sevov, počasne rasti in potencialne odvisnosti od prisotnosti ledeniških alg v njihovem naravnem okolju, smo se na nivoju določevanja asimilacijskih sposobnosti soočili s tehničnimi težavami. Zgoraj omenjeni komercialni testi niso primerni za dolge čase inkubacije, kar vodi do lažno pozitivnih rezultatov. S pomočjo dodatnih analize (Biolog PM5) smo pri nekaterih sevih ugotovili avksotrofnost, saj potrebujejo dodatek specifičnih prekurzorjev za aminokisline in vitamine. To priča o tesni povezavi mikroorganizmov v mikrobni združbi, ki je prilagojena na življenje v enem najbolj ekstremnih okolij na Zemlji.

Ključne besede: kvasovka; psihrofili; ledeniški led

Metagenomska analiza virusne raznolikosti v vzorcih jamskih voda

Katarina Bačnik^{1,2}, Denis Kutnjak¹, Monika Novak Babič³, Martina Turk³, Rok Kostanjšek³, Polona Zalar³, Cene Gostinčar³, Janez Mulec⁴, Nina Gunde-Cimerman³, Maja Ravnikar^{1,5}, Ion Gutierrez Aguirre¹

¹ Nacionalni Inštitut za Biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Jamova cesta 39, Ljubljana, Slovenija

³ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

⁴ Inštitut za raziskovanje krasa ZRC Titov trg 2, 6230 Postojna

⁵ Univerza v Novi gorici, Vipavska 13, Nova gorica, Slovenija

katarina.bacnik@nib.si

Virusi v vodnih okoljih so bili v zadnjem desetletju intenzivno preučevani, vendar pa virusi v jamskih vodah ostajajo slabo opisani. Cilj raziskave je bila karakterizacija viroma vode vzorčene v različnih jamah, v katerih živijo tudi predstavniki vrste *Proteus anguinus* oziroma človeške ribice. Predstavniki dvoživk, ki živijo v tako občutljivih vodnih okoljih, so izpostavljeni številnim povzročiteljem bolezni, vključno z virusi. Vzorci jamske vode (5 L) iz sedmih različnih lokacij po Sloveniji so bili najprej koncentrirani z uporabo CIM monolitne kromatografije, metode ki učinkovito koncentriira viruse iz večjih volumnov vodnih vzorcev. Z metodami visokozmogljivega sekvenciranja smo pridobili sekvenčne podatke, ki smo jih analizirali oziroma primerjali z bazo podatkov vseh znanih proteinskih zaporedij in jih taksonomsko klasificirali. Virusne sekvence, ki so se klasificirale kot bakteriofagi iz reda *Caudovirales* so bile najbolj pogosto zastopane v vseh vzorcih jamske vode. Veliki DNA virusi (Nucleocytoplasmic large DNA viruses) iz družin *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Mimiviridae*, *Phycodnaviridae* so bili prav tako pogosto zastopani, skupaj z virofagi (*Lavidaviridae*), ki za okužbo potrebujejo pristnost velikih DNA virusov. ssDNA bakteriofagi iz družin *Inoviridae* in *Microviridae* ter evkariontski CRESS (circular Rep-encoding single-strand) DNA virusi so bili prav tako prisotni v večini vzorcev. Sekvence ssRNA rastlinskih virusov so bile bolj zastopane v nekaterih vzorcih iz bolj kmetijsko obremenjenih lokacij. S tarčno detekcijo (qPCR) nismo ugotovili prisotnosti ranavirusov (družina *Iridoviridae*), pomembnih virusnih povzročiteljev bolezni pri dvoživkah. Ranavirusov prav tako nismo zaznali v metagenomski analizi vzorcev jamske vode. Rezultati opisane študije predstavljajo vpogled v virom jamskih vod in opisujejo najpogostejše predstavnike virusov v podzemnih jamskih vodah ter izpostavijo razlike v prisotnosti patogenov oziroma virusnih indikatorjev zaznanih na različnih lokacijah.

Ključne besede: virom; jamske vode; metagenomska analiza

Evolucija socialnih interakcij med roji sevov *B. subtilis*

Katarina Belcijan, Polonca Štefanič, Ines Mandić Mulec

Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

katarina.belcijan@bf.uni-lj.si

Roječi sevi *Bacillus subtilis* lahko razlikujejo med bolj in manj sorodnimi sevi, kar poimenujemo sorodstveno razlikovanje (KD). Med roji manj sorodnih »non-kin« sevov prihaja do nastanka mejnih linij, a roji bolj sorodnih »kin« sevov se združujejo. Med roji sevov lahko prihaja tudi do izmenjave DNA, kar omogoča povečanje raznolikosti. Ni pa še znano, kako socialne interakcije vplivajo na frekvenco izmenjave DNA med roji sevov in kako le ta vpliva na razvoj novih tipov KD. Zato smo na območju srečanja rojev ugotavljali frekvenco izmenjave DNA med »kin« oz. »non-kin« sevi, pri čemer smo ugotovili, da je frekvenca izmenjave DNA pogostejša na območju srečanja »nonkin« rojev, kar ni posledica povečane koncentracije DNA zaradi antagonizma med »non-kin« sevi na območju mejnih linij, temveč so razlog spremembe v izražanju kompetenčnih genov za transformacijo. Kako razlike v frekvenci transformacije in interakcije vplivajo na evolucijo interakcij smo ugotavljali s periodičnim izpostavljanjem roječega seva PS-216 stiku z roji »kin« ali »non-kin« sevov. Preverjali smo vpliv stika na razvoj novih sevov s spremenjenim tipom KD glede na starševski sev PS-216 (pojav linije med novo evolviranim sevom in starševskim sevom PS-216). Vendar nismo opazili vpliva povišane frekvence transformacije na pojav novih tipov KD. Transformacija ima pomembno vlogo pri bakterijski evoluciji, saj s pridobivanjem novih genov omogoča hitro prilagajanje na nove ekološke niše in prevlado nad drugimi sevi, vendar v primeru evolucije socialnih interakcij verjetno prevladujejo spontane mutacije, ki omogočajo postopno prilagajanje in imajo morda pomembnejšo vlogo pri kompenzaciji negativnih učinkov novo pridobljenih genov. Razumevanje evolucije socialnih interakcij je ključnega pomena pri obvladovanju širjenja odpornost proti antibiotikom, patogenih bakterij, okoljske problematike in biotehnoloških procesov.

Ključne besede: *Bacillus subtilis*; sorodstveno razlikovanje; evolucija

Primerjava fenotipskih lastnosti sevov oportuno patogene glive *Aureobasidium melanogenum* in sorodnih vrst

Anja Černoša, Cene Gostinčar, Nina Gunde-Cimerman

Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

anja.cernosa@bf.uni-lj.si

Aureobasidium melanogenum spada med poliekstremofilne črne kvasovke, saj lahko preživi tako v slanih (do 3.0 M NaCl), bazičnih in kislih (pH 3-10), hladnih (4 °C) in toplih (37 °C) okoljih kot tudi pri oligotrofnih pogojih. Pomembna je iz medicinskega stališča, saj gre za eno izmed porajajočih se oportunističnih gliv, ki okužuje predvsem imunsko kompromitirane osebe. Vrste, sorodne *A. melanogenum*, so vrsta *A. pullulans*, katere sevi se biotehnološko uporabljajo za biokontrolo okužb sadja, vrsta *A. subglaciale*, ki je pomemben predstavnik gliv v polarnih okoljih, ter vrsta *A. namibiae*, ki naseljuje puščavski pesek. Za razliko od *A. melanogenum* te vrste niso znane kot oportunistični patogeni. V okviru raziskave smo želeli določiti fenotipske lastnosti, ki ločujejo patogeno vrsto *A. melanogenum* od nepatogenih vrst.

Med seboj smo primerjali lastnosti 50 različnih sevov vrste *A. melanogenum*, osamljenih iz različnih okolij, vse od vodovodne vode do pomivalnih strojev, ki smo jih dodatno primerjali s sevi ostalih, zgoraj omenjenih, vrst rodu *Aureobasidium*. Določali smo zmožnost rasti pri temperaturi 37 °C, sposobnost hemolize in produkcije sideroforov, sposobnost rasti na različnih humanih nevrotansmitorjih ter zmožnost rasti na različnih ogljikovodikih kot edinem viru ogljika. Ugotovili smo, da obstajajo pomembne razlike med posameznimi sevi vrste *A. melanogenum* glede sposobnosti rasti na različnih ogljikovodikih ter zmožnosti asimilacije različnih nevrotansmitorjev. Primerjava lastnosti *A. melanogenum* in drugih vrst iz rodu *Aureobasidium* pa je izpostavila kot glavno razliko termotoleranco oz. sposobnost rasti pri telesni temperaturi človeka, ki je tudi glavni indikator potencialne patogenosti za človeka.

Ključne besede: *Aureobasidium melanogenum*; oportunistični patogen; ekstremofilne glive

Proučevanje raznolikosti in živosti glivne združbe na slikah na platnu

Mitja Gajšek, Martina Turk, Polona Zalar

Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

polona.zalar@bf.uni-lj.si

Stare umetniške slike so pogosto okužene s plesnimi, ki se skupaj s prahom in drugimi okoljskimi nečistočami nalagajo na slike. Ob ugodnih mikroklimatskih pogojih in prisotnosti organskih materialov se plesni na slikah razraščajo, biokemijsko razgrajujejo snovi in povzročajo mehanske poškodbe. Posledične estetske spremembe, vidne kot obarvanje ali razbarvanje, zmanjšajo vrednost umetnin in ogrozijo njihov obstoj. Odkrivanje in prepoznavanje okužb s plesnimi na slikah je torej za ohranjanje tovrstne kulturne dediščine izrednega pomena. Omejitev in izziv dela na umetninah so minimalne velikosti vzorcev za analizo in neinvazivnost metod odvzema. Težavo predstavlja tudi razlikovanje med živimi, metabolno aktivnimi ali dormantnimi celicami gliv ter mrtvimi celicami gliv, ki predstavljajo preteklo okužbo.

V okviru projekta smo se osredotočili na: (i) vizualizacijo kontaminacije, (ii) diverzitetu kontaminantnih gliv in (iii) kvantifikacijo glivne okužbe. Viabilnost gliv na slikah smo določali z barvanjem živo/mrtvo, Live/Dead Yeast Viability (Termofischer Scientific), na vzorcih odtisnjenih na lepilni trak (vizualizacija živih in mrtvih celic). Za določitev glivne diverzitete smo uporabili klasično gojenje na izbranih gojiščih (detekcija živih celic), ter NGS sekvenciranje ITS2 celokupne DNA, brez dodatne obdelave, kar omogoča detekcijo celokupne združbe (žive in mrtve celice) ter s predobdelavo celic s propidijevim monazidom PMA (Biotium), kar omogoča detekcijo žive združbe. Kvantifikacijo okužbe smo ocenili z uporabo qPCR na osnovi beta aktinskega gena.

Detekcija gliv na osnovi fluorescentnega barvila kalkofluor belo omogoča uspešno vizualizacijo, težavo predstavljajo melanizirane glive, ki jih lahko spregledamo, zato je nujna tudi vizualizacija pod vidno svetlobo. Barvilo Fun1 ne označuje nedvoumno le živih celic, saj pride tudi pri mrtvih celicah do izražanja difuzno rdečega barvila. Na vidno okuženih delih slik smo mikroskopsko, pa tudi z gojitvenimi in NGS tehnikami prepoznali in identificirali predvsem kserofilne predstavnike rodov *Aspergillus* (sekciji *versicolor*, *restricti*), *Cladosporium* in *Penicillium*.

Ključne besede: NGS sekvenciranje; qPCR; fluorescenca

Globalna biotska raznovrstnost tal in ekosistemske storitve tal - kako dobro jih poznamo?

Carlos A. Guerra^{1,2}, Anna Heintz-Buschart^{1,3}, Johannes Sikorski⁴, Antonis Chatzinotas^{5,1}, Nathaly Guerrero-Ramírez^{1,6}, Simone Cesarz^{1,6}, Léa Beaumelle^{1,6}, Matthias C. Rillig^{7,8}, Fernando T. Maestre^{9,10}, Manuel Delgado-Baquerizo⁹, François Buscot^{3,1}, Jörg Overmann^{4,11}, Guillaume Patoine^{1,6}, Helen R. P. Phillips^{1,6}, Marten Winter^{1,6}, Tesfaye Wubet^{12,1}, Kirsten Küsel^{1,13}, Richard D. Bardgett¹⁴, Erin K. Cameron¹⁵, Don Cowan¹⁶, Tine Grebenc¹⁷, César Marín^{18,19}, Alberto Orgiazzi²⁰, Brajesh K. Singh^{21,22}, Diana H. Wall²³, Nico Eisenhauer^{1,6}

¹ German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv) Halle-Jena-Leipzig, Germany; ² Institute of Biology, Martin Luther University Halle Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ³ Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Soil Ecology; ⁴ Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Germany; ⁵ Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Dep. of Environmental Microbiology; ⁶ Institute of Biology, Leipzig University, Germany; ⁷ Freie Universität Berlin, Institut für Biologie, Berlin, Germany; ⁸ Berlin-Brandenburg Institute of Advanced Biodiversity Research (BBIB), Berlin, Germany; ⁹ Dep. de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica, Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología, Universidad Rey Juan Carlos, Móstoles, Spain.; ¹⁰ Departamento de Ecología and Instituto Multidisciplinar, Universidad de Alicante, Spain; ¹¹ Microbiology, Braunschweig University of Technology, Braunschweig, Germany; ¹² Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Department of Community Ecology; ¹³ Institute of Biodiversity, Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany; ¹⁴ School of Earth and Environmental Sciences, The University of Manchester, UK; ¹⁵ Department of Environmental Science, Saint Mary's University, Halifax, NS, Canada; ¹⁶ Centre for Microbial Ecology and Genomics, University of Pretoria, Pretoria, South Africa; ¹⁷ Slovenian Forestry Institute, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; ¹⁸ Inst. de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad de O'Higgins, Rancagua, Chile.; ¹⁹ Inst. de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile; ²⁰ European Commission, Joint Research Centre (JRC), Ispra, Italy; ²¹ Hawkesbury Institute for the environment, Western Sydney University, Australia; ²² Global Centre for Land-Based Innovation, Western Sydney University, Australia; ²³ School of Global Environmental Sustainability and Department of Biology, Colorado State University, USA

tine.grebenc@gozdis.si

Tla predstavljajo pomemben vir globalne biotske raznovrstnosti in ekosistemskih funkcij. Trenutno poznavanje razporejanja in makroekologije talnih (mikro)organizmov je ključno, tako s stališča potencialnih funkcij, kot tudi za ustrezna prizadevanja za njihovo ohranjanje ter upravljanje njihovih potencialnih uporab.

Za boljše razumevanje trenutnega vedenja in objavljenih znanj o biotski raznovrstnosti tal, in zlasti za namen prepoznavanje vrzeli v razpoložljivih informacijah, smo v študiji analizirali literature podatke za 17.186 vzorčnih mest po vsem svetu in na vseh kontinentih. Primerjali smo geografsko in ekološko porazdelitev vzorčnih mest in ugotavljali v kolikšni meri so za posamezno vzorčno mesto na voljo podatki o biotski raznovrstnosti in/ali ekosistemskih funkcijah tarčnih skupin talne biote.

V analizi smo odkrili bistvene vrzeli v poznavanju vseh taksonomskih in funkcionalnih skupin talnih organizmov, v njihovi prostorski in ekološki razporeditvi, ter popolno odsotnost podatkov pridobljenih v časovni vrsti. Pri primerjavi podatkov biotske raznovrstnosti in ekosistemskih funkcijah tal smo ugotovili, da le 0,3% vseh študij oziroma vzorčnih mest vključuje oba vidika pestrosti, in še v teh primerih so avtorji analizirali različne taksonomske in funkcionalne skupin organizmov. Po pričakovanju je pretežni del študij omejen na področja Evrope, Severne Amerike in JV Azije, medtem ko nekatera območja s prepoznano visoko biotsko raznovrstnostjo (t.i. megadiverse spots) z vidika poznavanja biotske raznovrstnosti in ekosistemskih funkcij še vedno popolna neraziskana. Na podlagi izvedene metanalize lahko izpeljemo tudi prednostne naloge in ciljna področja raziskovanja talne biotske raznovrstnosti in ekosistemskih funkcij za boljše podporo in razširitev makroekoloških raziskav tal.

Ključne besede: biotska raznovrstnost tal; delovanje ekosistema; metaanaliza; globalni pogled

Guerra, C.A., Heintz-Buschart, A., Sikorski, J. et al. Blind spots in global soil biodiversity and ecosystem function research. *Nat Commun* 11, 3870 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17688-2>

Nov rod črevesnih bakteriofagov in njihov mehanizem zamenjave gostitelja

Stina Hedzet¹, Tomaž Accetto², Maja Rupnik^{1,3}

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, NLZOH, Maribor, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

³ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Maribor, Slovenija

stina.hedzet@nlzoh.si

Bakteriofagi predstavljajo pomembno, a zapostavljeno komponento črevesne mikrobiote. Majhno število izoliranih in opisanih predstavnikov močno otežuje analize metagenomskih študij črevesnih viromov. Izolacija novih črevesnih bakteriofagov je tako ključna za razumevanje te kompleksne združbe.

Z metodo dvojnega agarja smo izolirali štiri črevesne bakteriofage, jih karakterizirali in določili nabor gostiteljev. Izoliranim fagom in gostiteljskim bakterijskim sevom smo določili celotno sekvenco genoma.

Izolirani bakteriofagi sodijo v družino repatih bakteriofagov *Siphoviridae* in pripadajo novemu virusnemu rodu – Bacuni. Conelize so povzročali pri treh različnih vrstah bakteroidesov, namnoževali pa smo jih lahko le na sevih *Bacteroides uniformis*. Predstavljajo prve litične bakteriofage, genomi katerih kodirajo »retroelemente, ki generirajo diverzitet«, tako imenovane DGR-je (diversity generating retroelements). Te regije prispevajo k fagni adaptaciji na spreminjajoče se okoljske dejavnike in pripomorejo k širšemu naboru gostiteljev. Podobnost Bacuni fagov na nukleotidni ravni je 99,83%, a kljub temu okužijo različne seve *B. uniformis*. Pokazali smo, da na tropizem Bacuni fagov najbrž vpliva preplet sekvenčnih variacij v fagnih vezavnih proteinih, ki jih povzroča DGR, in mutacij v membranskih proteinih gostitelja. V obstoječih podatkovnih bazah smo našli profage v genomih bakterij rodu *Prevotella* sp. in *B. acidifaciens*, ki se na aminokislinskem nivoju z Bacuni fagi ujemajo v 85%, v več kot polovici genoma. Navkljub pogostosti rodu *Bacteroides* v črevesni mikrobioti, smo Bacuni fage zaznale le v redkih objavljenih črevesnih metagenomih.

Fagi izolirani v tej študiji, ki predstavljajo nov rod, so prvi primer fagov gostitelja *B. uniformis* in so eni izmed redkih litičnih fagov izoliranih iz prebavnega ekosistema ter prvi litični fagi z DGR.

Ključne besede: *Bacteroides*; bakteriofag; DGR (Diversity Generating Retroelement)

Izolacija in identifikacija bakterij in gliv iz Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto

Maša Jarčič¹, Polona Zalar², Nina Gunde-Cimerman²

¹ Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Koroška cesta 160, 2000 Maribor

² Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Masa.jarcic@gmail.com

Dolgo je veljalo, da so ledeniki aseptična okolja. Danes vemo, da ledeniki predstavljajo pomemben rezervoar biološke aktivnosti. Naseljujejo jih raznovrstni mikroorganizmi, od bakterij, arhej, gliv do mikroalg. V svetovnem merilu so bili raziskani predvsem polarni ledeniki, nekaj pa tudi gorskih, predvsem alpskih ledenikov. Slovenski ledeniki so bili doslej povsem nepreučeni. Naša raziskava je bila osredotočena na raziskovanje mikrobni združb obeh slovenskih ledenikov, Triglava in Skute, ki se zaradi globalnega segrevanja vedno bolj krčita in bosta po predvidevanjih v naslednjih letih izginila. Vzorčenje ledu je potekalo septembra 2018. Vzorci so bili preneseni v laboratorij, aseptično staljeni in filtrirani preko membranskih filtrov in inkubirani na različnih selekcijskih mikrobni gojiščih. Čistim kulturam smo izolirali DNA in s PCR pomnožili različne glivne in bakterijske filogenetske označevalce ter sekvencirali pomnožke. Izolirane bakterije so bile identificirane do nivoja vrste na osnovi nukleotidnih sekvenc 16S rRNA, izolirane glive so bile identificirane do nivoja vrst na osnovi pomnoževanja genskih regij ITS, gena za aktin (ACT), beta tubulin (BTB) in D1/D2 domene velike ribosomske podenote (LSU).

Iz Triglavskega ledenika smo celokupno izolirali 45 bakterijskih sevov, iz dvanajstih rodov: *Cryobacterium*, *Duganella*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Glaciimonas*, *Janthinobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*, *Polaromonas*, *Pseudoarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*. Iz ledenika Skuta smo uspešno izolirali 51 bakterijskih sevov, iz desetih rodov: *Bacillus*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Devosia*, *Flavobacterium*, *Iodobacter*, *Janthinobacterium*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Xylophilus*. Iz triglavskega ledenika smo izolirali 57 gliv, iz enajstih rodov: *Alternaria*, *Arthrimum*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Goffeauzyma*, *Microstroma*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sarocladium*, *Visniacozyma*. Iz ledenika Skuta smo izolirali 36 gliv, iz osmih rodov: *Bulleromyces*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Goffeauzyma*, *Mucor*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Trametes*.

Številni mikroorganizmi, ki so se tisočletja razvijali v izoliranih ledeniških okoljih, se s taljenjem ledu sproščajo v okolje in pomembno vplivajo na biogeokemične procese in mikrobno biodiverzitetu mezofilnih okolij s še neznanimi posledicami.

Ključne besede: psihofilni; psihrotolerantni mikroorganizmi; triglavski ledenik

Viskoelastične lastnosti novo nastajajočih peliklov bakterije *Bacillus subtilis* na interfazi tekočina/zrak

Mojca Krajnc, Polonca Štefanič, Ines Mandić-Mulec, David Stopar, Iztok Dogša

Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

mojca.krajnc@bf.uni-lj.si

Bakterijski biofilmi predstavljajo velik gospodarski problem v medicini, industriji in okolju. Bakterija *Bacillus subtilis* lahko tvori biofilm na trdnih površinah kot tudi v tekočinah. V tekočih kulturah se celice na stiku tekočine in zraka povežejo v večcelično strukturo imenovano pelikel. Mehanske lastnosti peliklov niso poznane. V tem delu smo z uporabo modularnega oscilacijskega reometra in interfaznih merilnih sistemov spremljali razlike v mehanskih lastnostih novo nastajajočih peliklov divjega tipa *B. subtilis* seva PS-216 ter različnih mutant seva, ki imajo značilen vpliv na formacijo le-teh. Določili smo modul elastičnosti in viskoznosti. V kombinaciji s fluorescentno mikroskopijo smo določili časovni okvir nastanka in propada pelikla. Rezultati kažejo, da spremenjena genska ekspresija zunajceličnih komponent matriksa značilno vpliva na mehanske lastnosti med fazo rasti in zorenja peliklov, medtem ko na začetek nastanka in propad nima tako velikega vpliva. Med izbranimi vzorci se močno razlikuje debelina in morfologija nastalega pelikla. Kohezivna trdnost pelikla, ki je izražena preko elastičnega modula, se med razvojem biofilma zelo spreminja in se odvisno od faze razvoja lahko bistveno poveča ali zmanjša.

Ključne besede: interfazna reologija; *Bacillus subtilis*; pelikel

Črna žilavka kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) v Sloveniji: sprememba patogena?

Janja Lamovšek, Neja Marolt, Irena Mavrič Pleško

Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

janja.lamovsek@kis.si

Črna žilavka kapusnic je gospodarsko pomembna bakterijska bolezen kapusnic (zelje, cvetača, koleraba, ohrovt), ki se prenaša s semenom in jo povzročajo bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Nanjo so občutljive številne sorte zelja, med njimi tudi avtohtona sorta varaždinsko zelje.

Bakterija v rastlino vstopa skozi hidatode ob listnih robovih, od mesta okužbe pa se širi v rastlini po prevodnem sistemu. Sprva pričnejo odmirati zunanji listi in ko bakterija doseže steblo odmrejo tudi osrčja zeljnih glav. Še pred 30 leti v Sloveniji to ni bila pomembna bolezen, medtem ko je danes ena najpomembnejših. So se v tem času spremenili okoljski pogoji ali se je spremenil patogen ali gostitelj?

Vemo, da Xcc ni homogena temveč izjemno heterogena skupina razdeljena na različne fiziološke rase, serotipe in genotipe. V Sloveniji je patogen razširjen, a podatkov o zastopanosti omenjenih skupin ni. V letu 2020 smo na Kmetijskem inštitutu Slovenije pričeli sodelovati s pridelovalci kapusnic zaradi vse večjih izgub pridelka v letih 2015-2019. Razumevanje epidemiološke slike je prvi korak za razumevanje bolezni in njenih posledic, za kar pa je potrebno dobro poznavanje treh ključnih dejavnikov: patogena, gostitelja in okolja. Pri tem pa so še posebej kritične točke primarni vir patogena, njegova raznolikost, način vzgoje sadik, sortni izbor kapusnic in izbor/izvajanje kolobarja.

Z zbiranjem podatkov o stanju v Sloveniji smo pričeli letos in jih bomo zbirali še v naslednjih letih. V okviru študije bomo identificirali najpogostejše povzročitelje črne žilavke, ter na podlagi nukleotidnega zaporedja ohranjenih genov ocenili raznolikost izolatov Xcc, ki so pri nas razširjeni. Iz objav je namreč razvidno, da se v svetu vedno pogostejše pojavljajo sevi Xcc sposobni povzročanja bolezni na odpornih sortah. Izvor agresivnejših sevov Xcc je najverjetneje okužen semenski material. Rezultati raziskave nam bodo služili za pripravo usmerjenega reševanja in obvladovanja te pomembne bolezni kapusnic v Sloveniji.

Ključne besede: črna žilavka; epidemiologija; *Xanthomonas*

Analiza vode za namakanje v proizvodnji paradižnika v Sloveniji in Srbiji

Olivera Maksimović Carvalho Ferreira^{1,2}, Katarina Bačnik^{1,2}, Denis Kutnjak¹, Maja Ravnikar^{1,3}, Ion Gutierrez-Aguirre¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² Mednarodna podiplomska šola "Jožef Stefan" Jamova cesta 39, Ljubljana, Slovenija

³ Univerza v Novi Gorici, Vipavska cesta, Nova Gorica, Slovenija

olivera.maksimovic@nib.si

Kot posledica škodljivcev in bolezni rastlin letno izgubimo približno 40 % pridelka. Eden od pomembnih povzročiteljev bolezni rastlin so virusi, za katere vemo, da se lahko prenašajo tudi z vodo. Zato je potrebno, da poskušamo razumeti vlogo vode pri prenosu virusov v povezavi z ekonomsko pomembnimi rastlinami. Vendar pa voda predstavlja zahteven matriks za analizo prisotnosti virusov in njihovih nukleinskih kislin, saj so v vodi prisotne različne kontaminante, koncentracije virusov pa so nizke. Številni postopki nam lahko pomagajo pri analizi zahtevnih vodni vzorcev in omejitvah, s katerimi se srečujemo od vzorčenja vode do visokozmogljivega sekvenciranja. Viruse smo z uporabo CIM™ monolitne kromatografije iz začetnih 5 L vzorca skoncentrirali v 25 mL, nato pa smo iz koncentratov izolirali RNA. Pred pripravo knjižnice smo izvedli dodaten korak naključne preamplifikacije, ki poveča količino nukleinskih kislin v vzorcu. Za sekvenciranje vzorcev vode smo uporabili Illumina MiSeq platformo, ki zagotavlja netarčno zaznavanje rastlinskih (RNA) virusov. Z uporabo opisane metodologije smo analizirali 15 vzorcev vode iz 7 lokacij v Sloveniji in dveh lokacij v Srbiji. Voda je bila uporabljena oziroma posredno povezana z namakalnimi sistemi za gojenje paradižnikov v rastlinjakih. Prvi rezultati so pokazali prisotnost številnih družin rastlinskih virusov (*Bromoviridae*, *Tombusviridae*, *Virgaviridae*, idr.) z nekaterimi izstopajočimi virusnimi vrstami (npr. virus mozaika paradižnika), vključno s pomembnimi rastlinskimi patogeni in virusi na seznamu karantenskih škodljivih organizmov. V nekaterih vzorcih smo zaznali tudi sekvence, ki potencialno predstavljajo nove virusne vrste. Za njihovo določitev pa bodo potrebne dodatne analize.

Ključne besede: voda za namakanje; rastlinski virusi; paradižnik

Mikrobiološka zbirka Ex (IC Mycosmo)

Mojca Matul, Polona Zalar, Nina Gunde-Cimerman

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, Ljubljana

nina.gunde-cimerman@bf.uni-lj.si

Mikrobiološka zbirka Ex predstavlja pomemben integralni del infrastrukturnega centra Mycosmo, ki deluje v okviru MRIC UL. Zbirka Ex, ki je bila ustanovljena leta 1998, se nahaja na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete UL. Zbirka trenutno obsega 15400 sevov gliv, 6100 sevov bakterij, 50 sevov arhej in 9 sevov alg. Velika večina sevov je javno dostopna. Podatki o kulturah so objavljeni v katalogu sevov na spletni strani (<http://www.ex-genebank.com/>), ki se sproti dopolnjuje. Za vodenje podatkov o sevih uporabljamo prav za zbirko Ex prirejen računalniški program Biotree.

Zbirka Ex je edinstvena v svetovnem merilu, ker je specializirana na ekstremofilne glive, ki so bile tekom let osamljene iz različnih skrajnostnih okolij. Prevladujejo izredno hladna okolja polarnih in visokogorskih ledenikov in ledenih plošč, sneg, morska voda in izjemno slana okolja solarnih solin ter slanih jezer. Sevi ekstremofilnih gliv so bili osamljeni tudi iz vročih in hladnih puščav, okolice gejzirjev, morskih globin ter s hranilnimi snovmi izredno revnih okolij, kot so kamnine in voda. V zadnjih letih smo zbirko Ex obogatili še s sevi osamljenimi iz ekstremnih okolij naših domov, predvsem iz gospodinjskih naprav in kuhinj. Izvedli smo obsežno vzorčenje predmetov kulturne dediščine in vzorčenje endemitske človeške ribice.

Poglavitna naloga mikrobiološke zbirke Ex je, poleg osamitve mikroorganizmov, tudi identifikacija in shranjevanje mikroorganizmov na genetsko stabilen način. Kulture so shranjene predvsem v tekočem dušiku (-140 do -196 °C), v zamrzovalniku (-80 °C), nekatere pa tudi na poševnih gojiščih. V letu 2020 bomo uvedli nov, dodaten način trajnega shranjevanja kultur z liofilizacijo. Večina kultur v Ex je identificirana na osnovi molekularnih karakteristik. Zbirka Ex nudi naročnikom različne usluge: varno shranjevanje sevov na osnovi zaupne pogodbe, osamitev in identifikacijo mikroorganizmov po naročilu ter izvedbo različnih analiz v sklopu IC Mycosmo.

Ključne besede: Mycosmo; mikrobiološka zbirka Ex; ekstremofili

Virusi vinske trte v Sloveniji – stari in novi znanci

Irena Mavrič Pleško¹, Ivan Žežlina², Mojca Viršček Marn¹

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

² KGZS – Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, Pri hrastu 18, 5000 Nova Gorica

Irena.mavric@kis.si

Vinska trta je ena najstarejših udomačenih rastlin, ki so jo gojili že okrog 6.000 do 8.000 let p.n.š.. Danes imamo v svetu že več kot 10.000 sort pridobljenih z žlahtnjenjem. Dolga življenjska doba vinske trte in vegetativno razmnoževanje sta razlog za kopičenje virusov v vinski trti, zato v rastlinah običajno zaznavamo sočasne okužbe z več virusi. Take mešane okužbe omogočajo interakcije med virusi, tudi sinergistične, posledično pa zato močnejše izražanje bolezenskih znamenj in pojav hujših oblik bolezni.

Kljub temu, da nas trta spremlja že tako dolgo, pa so šele na začetku 20. stoletja predvidevali, da so vzrok nekaterih bolezni vinske trte lahko virusi. Prvi opis virusa vinske trte, virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) pa je sledil šele leta 1960. GFLV je verjetno najpomembnejši virus vinske trte v svetu, sledijo pa mu virusi, povezani z boleznijo zvijanja listov vinske trte. Tudi v Sloveniji sta bolezni, ki ju povzročajo ti virusi, najpomembnejši. V zadnjih dveh letih namreč opažamo v pridelavi vse več težav z močno zmanjšano rodnostjo kot posledico okužbe z GFLV.

Po letu 2000 smo v Sloveniji začeli opazovati še dve bolezni na vinski trti, ki sta kazali na možno vzročno povezavo z virusi. Pri prvi smo opazili značilne linijske vzorce na listih pri sorti Laški rizling. Gre za okužbo z virusom grmičavosti in pritlikavosti malinjaka (RBDV), ki je močno razširjen virus na malinah in robidah, razširjen pa je predvsem v Podravju in Posavju, zelo omejeno pa na Primorskem. Druga bolezen pa se kaže kot močna zakrnelost in deformacije listov vinske trte. Identifikacijo povzročitelja te bolezni pa je prinesla šele tehnologija sekvenciranja naslednje generacije (NGS/HTS).

Dolgoletne raziskave in diagnostika virusov vinske trte, ki potekajo v našem laboratoriju, sta financirali Agencija za raziskovalno dejavnost RS in Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin RS.

Ključne besede: GFLV; RBDV; diagnostika

2020 – Mednarodno leto zdravja rastlin

Irena Mavrič Pleško¹, Janja Lamovšek¹, Primož Žigon¹, Zala Kogej², Nataša Mehle², Maja Ravnikar², Tanja Dreo²,
Mojca Viršček Marn¹

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

² Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

irena.mavric@kis.si

Tako kot vsa živa bitja tudi rastline ogrožajo različni škodljivi organizmi. Številni povzročitelji bolezni in škodljivci negativno vplivajo na vitalnost rastlin, njihovo rast in razvoj, zmanjšujejo odpornost na različne stresne dejavnike ter količino in kakovost pridelka. Vse to je pomembno za zagotavljanje prehranske varnosti držav in dostopnost kakovostne hrane. Zaradi rastlinskih bolezni in škodljivcev vsako leto izgubimo do 40 odstotkov svetovnih prehranskih pridelkov.

Z razmahom globalne mednarodne trgovine, množičnih migracij in transporta se povečuje možnost nenamernega vnosa škodljivih organizmov na območja, kjer le-ti niso prisotni. Tam se lahko ti organizmi nenadzorovano razširijo in povzročijo veliko gospodarsko škodo. Tudi za Slovenijo je zato pomembno spremljanje morebitnega vnosa novega škodljivega organizma, saj lahko le z zgodnjim in odločnim ukrepanjem njihov pojav zaježimo in izkoreninimo.

Po drugi strani pa klimatske spremembe omogočajo širjenje že znanih gospodarsko pomembnih škodljivih organizmov na nova območja, spremenjeni okoljski dejavniki pa pogosto zmanjšujejo odpornost rastlin na te že znane bolezni in škodljivce. Posledično se v kmetijski pridelavi pogosteje srečujemo s škodljivimi organizmi, ki pred desetletji sploh niso veljali za problematične.

Generalna skupščina Združenih narodov je leto 2020 razglasila za Mednarodno leto zdravja rastlin. Aktivnosti, ki v okviru tega projekta potekajo tudi v Sloveniji so namenjene ozaveščanju javnosti o pomenu zdravja rastlin, pridelavi kakovostne in zdrave hrane, pridelave hrane na okoljsko sprejemljiv način ter o pomenu odgovornega obnašanja ob vračanju s potovanj po svetu ali naročanju semen in sadik preko interneta. Tudi turistična potovanja so namreč lahko pomemben vir vnosa novih škodljivih organizmov v državo, njihovega širjenja in posledično velike gospodarske škode.

Gljučne besede: zdravje rastlin; kakovost hrane; škodljivi organizmi

Karakterizacija bakterij vrste *Escherichia coli*, izoliranih iz netopirskega gvana in pohodnih površin iz kraških jam

Ana Miglioranza¹, Janez Mulec², Jerneja Ambrožič Avguštin¹

¹ Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, Titov trg 2, 6230 Postojna

Jerneja.Ambrozic@bf.uni-lj.si

Bakterija *Escherichia coli* je pogojno patogeni prebivalec črevesa toplokrvnih živali, in ljudi, v jamah pa je lahko indikator fekalno onesnažene kraške vode in zunanjega vnosa z obiskovalci oziroma živalmi. Večina sevov *E. coli* je nenevarnih, če pa imajo sevi v svojem genomu gene z zapisi za dejavnike virulence pa lahko pri človeku in živalih povzročijo bolj ali manj težke okužbe. V okviru raziskovalnega dela smo analizirali 75 neklonalnih izolatov *E. coli*, ki so jih na Inštitutu za raziskovanje krasa ZRC SAZU v letih od 2017 do 2019 izolirali iz brisov pohodnih površin (47) in iz netopirskega gvana (28) v kraških jam v Sloveniji (Postojnska jama, Predjama, Škocjanske jame, Županova jama). Za vse izolate smo izdelali profile ERIC-PCR in jih uvrstili v filogenetske skupine. Z metodo PCR smo preverili prisotnost 37 različnih genov za dejavnike virulence in gene z zapisi za različne betalaktamaze ter uvrstitev sevov v sekvenčne skupine ST69, ST73, ST95 in ST131. Ugotovili smo, da se največ sevov, izoliranih iz kontaktnih površin uvršča v skupino B1, sledijo pa skupine B2, D in A. Med izolati iz gvana pa jih je bilo največ iz skupin B2 in D, najmanj pa iz skupine A. V obeh skupinah izolatov, tako iz gvana kot površin, smo ugotovili prisotnost relativno visokega deleža nekaterih genov za pomembne dejavnike virulence (*fluA*, *vat*, *hlyF*, *usp*, *iss*, *fyuA*, *iroN*, *sitA*, *kpsMTII* in *hlyF*). Statistično značilne razlike med skupinama pa smo potrdili za prisotnost genov *vat*, *iss* in *kpsMTII*. Na podlagi primerjanih genotipov za posamezne izolate, ugotavljamo, da je znaten delež *E. coli*, izoliranih iz jam, potencialno patogenih, da imajo sevi iz gvana več pomembnih genov za dejavnike virulence, in da sevi iz gvana niso enaki sevom, ki so bili izolirani iz pohodnih površin. Vnos slednjih lahko poteka preko fekalno kontaminiranih vod ali z obiskovalci jam. Delež odpornih izolatov proti testiranim antibiotikom je bil nizek.

Ključne besede: *Escherichia coli*; dejavniki virulence; kraške jame

Glive v pesku plaž – diverziteta in potencialni vpliv na zdravje

Monika Novak Babič¹, Nina Gunde-Cimerman¹, João Brandão²

¹ Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Avenida Padre Cruz 1649-016, Lisboa

monika.novakbabic@bf.uni-lj.si

Ljudje vseh starostnih skupin namenjamo del časa počitku in rekreaciji. Med priljubljenimi lokacijami so peščene plaže, kjer smo izpostavljeni tudi najrazličnejšim mikroorganizmom, med njimi oportuno patogenim glivam. Čeprav obstajajo smernice in monitoringi kopalne vode, ki temeljijo v glavnem na preverjanju prisotnosti fekalnih indikatorjev, pa le-te ne veljajo za plaže, kjer ljudje v povprečju preživijo več časa kot v vodi. Da bi preučili prisotnost gliv v pesku plaž in njihov potencialni vpliv na zdravje smo v sklopu vseevropskega projekta »Mycosands« med marcem 2018 in februarjem 2019 mesečno vzorčili pesek in morsko vodo na Centralni plaži v Portorožu. Dodatno smo spremljali tudi parametre, kot so temperatura zraka, tal in morja, zračna vlažnost, količina padavin, osvetljenost, zračni pritisk, hitrost vetra, vreme na dan vzorčenja, vlažnost peska, pH ter čiščenje plaže. Vzorce peska smo 20 minut spirali v destilirani vodi, po 100 µL izpirkov pa v triplikatih nanesli na gojišča SDA, Mycosel in MEA z dodanim kloramfenikolom ter jih inkubirali pri 30 in 37 °C, do 21 dni. Porasle kolonije smo prešteli, makromorfološko različne pa nacepili do čistih kultur in jih nadalje identificirali z uporabo uveljavljenih molekularno-genetskih taksonomskih markerjev. V pesku smo identificirali 44 različnih rodov in 75 vrst gliv, od tega je 10 vrst spadalo v 2. stopnjo biološke varnosti. Najpogostejše glive, prisotne skozi vse leto, so bile vrste rodov *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* in *Rhizopus*, v času kopalne sezone pa smo dodatno opazili pojav *Chaetomium*, *Meyerozyma* in *Stachybotrys*. Med naštetimi je predvsem za rod *Aspergillus* znan pojav okoljskih rezistenc, zato smo te seve osamljene tekom kopalne sezone, testirali z diagnostičnim sistemom Sensititre Yeast One. Zmerne rezistence na vorikonazol smo opazili pri *A. flavus* in *A. niger*, na amfotericin B pa pri *A. flavus* in *A. nidulans*. Dobljeni rezultati so primerljivi z evropskimi partnerji »Mycosands« projekta in nakazujejo potrebo po sledenju pojava oportuno patogenih gliv v pesku plaž.

Ključne besede: glivna diverziteta; pesek plaž; vpliv na zdravje

Interakcije med bakterijama *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Bacillus subtilis* v biofilmu

Eli Podnar¹, Andi Erega¹, Tjaša Danevčič¹, Bram Lories², Eva Kovačec¹, Hans Steenackers², Ines Mandić-Mulec¹

¹ Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 20, 3001 Leuven, Belgija

eli.podnar@bf.uni-lj.si

Bakterija *Salmonella enterica* serovar Typhimurium je pogosta povzročiteljica črevesnih okužb pri človeku in prispeva k širjenju odpornosti proti antibiotikom, kar je še posebej problematično v biofilmih. Obetavna strategija pri zmanjševanju tega problema je uporaba probiotikov, ki lahko omejujejo okužbe s patogenimi bakterijami v črevesu. Po Gramu pozitivna in sporogena bakterija *Bacillus subtilis* je že v uporabi kot probiotik, vendar sta narava interakcij z bakterijo *S. enterica* serovar Typhimurium ter vpliv hranil na te interakcije slabo raziskani. Testirali smo kompetitivnost, preživetje in prostorsko razporeditev celic v statičnih kulturah in v gojiščih z različno vsebnostjo hranil.

Bakteriji *Bacillus subtilis* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium smo označili s konstitutivno izraženimi fluorescenčnimi proteini (mKate2 in GFP) in ju gojili v kokulturi v neredčenem, 5 krat redčenem (1/5) in 20 krat redčenem (1/20) gojišču TSB. S konfokalno mikroskopijo smo spremljali razporeditev celic v vzorcu. Preživetje celic smo ovrednotili z določanjem števila kolonijskih enot (CFU).

Rezultati so pokazali, da je inhibicija rasti obojestranska. Vsebnost hranil vpliva na rast in preživetje bakterij v kokulturi ter na pozicioniranje biofilma in razporeditev celic. V neredčenem gojišču TSB je bakterija *B. subtilis* tvorila plavajoči in potopljeni biofilm, bakterija *S. enterica* serovar Typhimurium je oblikovala biofilm le na dnu. Z redčenjem gojišča se je tudi biofilm bakterije *B. subtilis* pozicioniral le na dnu, vendar se s tem učinkovitost inhibicije rasti patogena ni povečala. Kljub tesnejšemu prostorskemu stiku obeh bakterijskih vrst, ki smo ga omogočili z uporabo mutante bakterije *B. subtilis* Δ epsA-O, ki ne tvori polisaharidnega matriksa, se kompetitivni indeks bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium ni zmanjšal v primerjavi s pogoji, ko sta bili vrsti prostorsko bolj ločeni.

Ugotovili smo, da hranila in tvorba polisaharidnega matriksa vplivata na prostorsko pozicioniranje bakterije *B. subtilis* v biofilmu, kar ne vpliva na kompetitivni indeks bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium in protimikrobno učinkovitost protencialnega probiotika.

Ključne besede: biofilm; probiotik; patogen

Mikrobna združba reke Kamniške Bistrice in frekvenca konjugacijskega prenosa plazmida pKJK5 med dvema sevoma bakterije *Escherichia coli*

Urška Skamen¹, Nataša Mori², Tatjana Simčič², Marjanca Starčič Erjavec¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

² Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za raziskave organizmov in ekosistemov, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

urska.skamen.bf@gmail.com

Escherichia coli (*E.coli*) je bakterija, ki je del normalne črevesne mikrobiote ljudi in živali s stalno telesno temperaturo. Iz črevesja se *E. coli* z iztrebki izloča v naravo, kjer se mikroorganizmi zaradi selekcijskega pritiska prilagajajo na spreminjajoče se okolje, vključno na prisotnost antibiotikov. To vodi k hitremu širjenju antibiotičnih rezistenc. Cilj poskusa je bil ugotoviti, ali je *E. coli* zmožna konjugacijskega prenosa plazmida pKJK5 v rečnih sedimentih in kakšna je sestava mikrobne združbe sedimentov reke Kamniške Bistrice.

Da bi lahko ocenili frekvenco konjugativnega prenosa plazmida pKJK5 med sevi *E. coli* v naravi, smo kot medij za konjugacijo uporabili rečni sediment. Poskuse konjugacije smo izvedli pri različnih temperaturah ter ob prisotnosti oziroma odsotnosti dodanih hranil. Izmerjene frekvence konjugacij smo primerjali s frekvencami konjugacij izmerjenimi na trdnem gojišču z in brez hranil, vzporedno pri istih temperaturah kot eksperiment v rečnem sedimentu. Tako smo lahko ugotavljali ne le vpliv temperature in prisotnosti hranil na frekvenco konjugacije, temveč tudi vpliv konjugacijskega medija. Ugotovili smo, da je frekvenca konjugacije tako v rečnem sedimentu kot na trdnem gojišču najvišja pri 34 °C, da pada s temperaturo ter je pri nekaterih temperaturah odvisna od prisotnosti hranil. Frekvenca konjugacije v rečnem sedimentu je pri vseh temperaturah nižja kot na trdnem gojišču, vendar pri višjih temperaturah še vedno znatna. Da povzamemo, rezultati kažejo, da je konjugacija plazmida pKJK5 med sevi *E. coli* v naravi možna, vendar v določenih razmerah.

Poleg frekvence konjugacije nas je zanimala tudi sestava mikrobne združbe sedimentov reke Kamniške Bistrice, ki smo jo določali z metodo sekvenciranja naslednje generacije (tarčno sekvenciranje PCR pomnožkov gena za 16S rRNA). Ugotovili smo, da največji delež mikrobne združbe spada v debela Proteobacteria, Nitrospirae, Bacteroidetes in Cyanobacteria.

Ključne besede: sediment; mikrobne združbe; frekvenca konjugacije

Temperaturna odvisnost tvorbe biofilma in potenciala za kvar živil bakterij *Pseudomonas* iz rib

Meta Sterniša, Neža Čadež, Sonja Smole Možina

Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

meta.sternisa@bf.uni-lj.si

Bakterije *Pseudomonas* so prevladujoči mikroorganizmi, ki povzročajo kvar aerobno shranjenih beljakovinskih živil. Te bakterije proizvajajo zunajcelične polimerne snovi, pigmente in hidrolitične encime, ki vzajemno prispevajo h kvaru živil, pri čemer ima temperatura odločilni vpliv. Bakterije *Pseudomonas* lahko tvorijo biofilm na abiotskih površinah in tudi živilih, zato perzistirajo in so stalen vir mikrobiološkega onesnaženja v živilski industriji. To pospešuje kvar živil in vpliva na preživetje patogenih bakterij - in s tem varnost živil.

Iz pokvarjenega ribjega mesa smo izolirali in molekularno identificirali 30 sevov vrst bakterij *Pseudomonas*. Raziskali smo sposobnost rasti, encimsko aktivnost in tvorbe pigmentov ter biofilma pri 5 °C, 15 °C in 30 °C, po 24 h in 48 h na jeklu in polistirenu z določitvijo števila živih biofilmskih celic in biomase biofilma.

Prevladujoča identificirana vrsta je bila *P. fragi*, sledile so vrste *P. extremaustralis*, *P. baetica*, *P. lactis*, *P. migulae*, *P. graminis*, *P. frederiksbergensis*, *P. helmanticensis* in *P. psychrophila*. Izmed teh vrst je imela skupina fluorescentnih pseudomonasov bolj izraženo proteazno in lipazno aktivnost, ki sta bili najbolj aktivni pri 15 °C. Poleg hidrolitičnih encimov, ki so ključni za kvar živil, so proizvajale tudi želatinazo in lecitinazo, ki sta poznana virulentna dejavnika. Filmotvornosti nismo dokazali korelacije med številom biofilmskih celic in biomaso biofilma, ki pa je bila večja na jeklu kot na polistirenu. Fluorescentni pseudomonasi so tvorili več biomase pri nižjih temperaturah.

Rezultati so jasno pokazali, da temperatura določa fenotip bakterij *Pseudomonas* in njihov pomen za kakovost in tudi varnost živil. Razlika med 5 °C in 15 °C je namreč izrazito pospešila rast, vplivala na sintezo in aktivnost encimov, ob čemer sklepamo na pospešitev kvara živil ob prekinjeni ali neupoštevani hladni verigi. Filmotvornost bakterij *Pseudomonas* lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi in zato bi morala biti ta lastnost v širšem obsegu vključena v oceno tveganj in nadzora živilske proizvodnje.

Ključne besede: *Pseudomonas*; mikrobna ekologija hrane; filmotvornost in mikrobiološki kvar živil

Mikrobiom Sečoveljskih solin

Ivana Strmečki¹, Martina Turk¹, Cene Gostinčar^{1,2}, Nina Gunde Cimerman¹, Polona Zalar¹

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Lars Bolund Institute of Regenerative Medicine, BGI-Qingdao, Qingdao 266555, Kitajska

polona.zalar@bf.uni-lj.si

Sečoveljske soline sestavljajo zaporedni bazeni, v katerih morska voda hlapi in se postopoma gosti. Slanost bazenov je od 3 Bé pa do 35 Bé. Po obarjanju NaCl (halit) ostane v bazenih grenčica oz. matična lužina, kjer prevladujejo magnezijeve soli. Bazene s slanico naseljujejo halotolerantne in halofilne glive, bakterije in arheje. Grenčica je zaradi prisotnih kaoflnih Mg soli do nedavnega veljala za aseptično okolje, inhibitorno za večino mikroorganizmov, zadnje raziskave so pokazale, da jo lahko naseljujejo kaotolerantne glive.

V okviru raziskave mikrobne diverzitete solin smo se osredotočili na slanico in grenčico, s poudarkom na glivah (553/168 izolatov v zbirki Ex od 1997-2019). Uporabili smo klasični pristop, ki temelji na predhodnem gojenju mikroorganizmov in molekularni identifikaciji, ter od gojenja neodvisen metagenomski pristop s sekvenciranjem naslednje generacije (NGS). Poseben izziv je predstavljalo koncentriranje vzorcev za izolacijo DNA.

Najpogostejši predstavniki gliv v Sečoveljskih solinah so črne in druge kvasovke in številne vrste iz rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* in *Wallemia*. Številčnost in pestrost gliv v grenčici je manjša kot v slanici. Iz slanice smo izolirali in identificirali 48, iz grenčice pa le 18 rodov gliv. Med njimi je le 12 takih, ki so prisotni v obeh osmotsko stresnih okoljih: *Alternaria*, *Arthrini*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Hortaea*, *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Phaeotheca*, *Verrucocladosporium*, *Vishniacozyma* in *Wallemia*. Samo v grenčici pa so bili prisotni rodovi: *Cadophora*, *Peroneutypa*, *Pseudotaeniolina*, *Toxicocladosporium* in *Bulleromyces*. Iz grenčice smo leta 2019 na hranilnem agarju (HA) s 25 % NaCl izolirali tudi arheje iz rodov *Halorubrum*, *Haloferax* in *Haloarcula*, nismo pa izolirali bakterij, ki smo jih osamili le iz slanice.

Za razliko od gliv, ki so bile prisotne v širokih razponih slanosti, so se določeni bakterijski rodovi pojavljali le v slanici nižje koncentracije (3 Bé – 16 Bé): *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Larsenimonas* in *Salinicola*, ali pa samo pri visoki koncentraciji: *Salicola*. Rodovi *Bacillus*, *Halomonas* in *Staphylococcus* pa so bili prisotni tako pri nižji kot pri višji slanosti (16 Bé – 35 Bé).

Ključne besede: slanica; grenčica; halofili

Vpliv plazme in izbranih ekoloških pripravkov na mikrobnno združbo koruznih semen

Valerija Tkalec^{1,2}, Aleksander Mahnič¹, Primož Titan³, Peter Gselman³, Nina Recek⁴, Maja Rupnik^{1,2}

¹ Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano (NLZOH), Prvomajska 1, 2000 Maribor

² Medicinska fakulteta, Taborska 8, 2000 Maribor

³ Interkorn d.o.o., Gančani 94, 9231 Beltinci

⁴ Inštitut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

valerija.tkalec@nlzoh.si

Razkuževanje in obdelava semenskega materiala trenutno temelji na uporabi fitofarmacevtskih sredstev, vendar vse večji pomen dobiva razvoj alternativnih in bolj ekoloških metod. V naši raziskavi smo analizirali učinek plazme in izbranih ekoloških pripravkov na bakterijsko in glivno združbo na semenih koruze.

Koruzna semena iz ekološkega in konvencionalnega načina pridelave smo obdelali s kombinacijami dveh vrst plazme in dveh izbranih ekoloških pripravkov. Za primerjavo smo uporabili neobdelana semena in semena obdelana s fitofarmacevtskimi sredstvi. Analiza viabilnih bakterij in gliv je potekala tako z gojenjem kot z visokopretočnim sekvenciranjem (NGS). Skupno 20 vzorcev smo gojili na dveh bakterioloških gojiščih (LB in TSA, po 5 zrn na posamezno ploščo agarja) ter gojišču DG18 za gojenje gliv (po 2 zrna). Rast smo opredelili na osnovi poraslih kolonij (število CFU/ploščo), porasle celokupne kulture pa analizirali z NGS (MiSeq platform; Illumina).

Na koruznih semenih je bilo bistveno manj kultivabilnih bakterij kot gliv. V vseh 20 analiziranih vzorcih koruze smo zaznali 51 bakterijskih OTU-jev ter 70 glivnih OTU-jev. V bakterijski združbi so prevladovali predstavniki debel Firmicutes, Proteobacteria ter Actinobacteria, medtem ko so glivno združbo v večji meri zastopale vrste iz debla Ascomycota. Pri obeh tipih koruznih semen je na pestrost bakterijske združbe najbolj vplival Ekološki pripravek 2, kjer smo določili upad bakterij iz redov *Bacilliales*, *Flavobacteriales*, *Sphingobacteriales* in *Burkholderiales*. Na upad glivnega bremena in pestrosti je najbolj vplivala Plazma 2 v kombinaciji z Ekološkim pripravkom 2, predvsem na predstavnike iz rodu *Penicillium*.

Ključne besede: mikrobiota; okolje; hrana; razkuževanje

Osamitev in identifikacija mikroorganizmov s človeške ribice (*Proteus anguinus*) iz narave in ujetništva

Polona Zalar¹, Martina Turk¹, Ana Gubenšek¹, Ivana Bokan¹, Cene Gostinčar^{1,2}, Rok Kostanjšek¹, Jani Mulec³, Nina Gunde-Cimerman¹

¹ Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Lars Bolund Institute of Regenerative Medicine, BGI-Qingdao, Qingdao 266555, Kitajska

³ Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, Titov trg 2, 6230 Postojna

Nina.gunde-cimerman@bf.uni-lj.si

Človeška ribica, proteus ali močeril (*Proteus anguinus*) je endemitna dvoživka, ki stalno živi le v podzemlju dinarskega krasa. Kot ranljiva vrsta je uvrščena na Rdeči seznam, poleg spreminjanja naravnega okolja grožnja za njen obstoj predstavljajo različne infektivne bolezni.

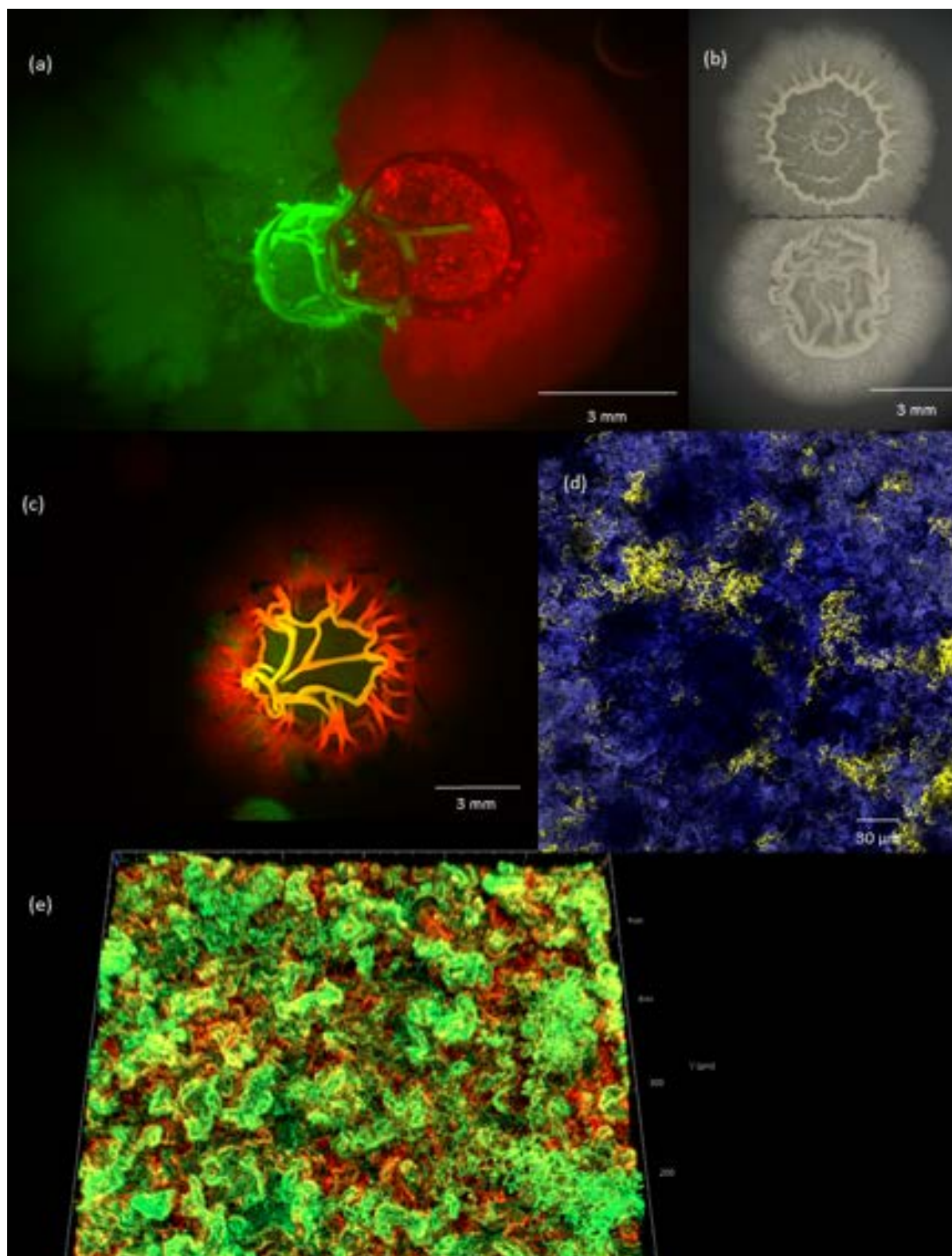
V okviru prve raziskave gliv in bakterij na močerilih in njihovih neposrednih vodnih okoljih smo vzorce vode in brise živali (zdravih in bolnih) jemali v kraškem jamskem sistemu na lokacijah Jelševnik, Vir pri Stični, Krška, Kompoljska, Planinska in Postojnska jama ter v ujetništvu (Oddelek za biologijo BF in Tular). Odvzeli smo brise 40 živali (22/11 zdravih naravno okolje/ujetništvo, 4/3 bolnih naravno okolje/ujetništvo). Z namenom detekcije patogenih hitridnih gliv *Batrachochytrium dendrobatidis* in *B. salamandrivorans*, ki po celem svetu ogrožajo dvoživke, smo analizirali vodo ter vodne vabe (lev kačje kože, ptičje perje, dializna cev). Patogenih hitrid nismo določili ne z gojitvenimi tehnikami ne molekularno.

Osamili pa smo 435 gliv in 2140 bakterij, ki smo jih molekularno identificirali. Med 90 rodovi gliv, s potencialno novimi vrstami (rodovi *Acremonium*, *Cystofilobasidium*, *Geotrichum*, *Paracremonium*), so največji delež izolatov iz vode predstavljale glive rodov *Trichoderma* in *Mucor*. Na osebkih, vabah in v zraku so bile pogostejše zastopane glive rodov *Penicillium* in *Cladosporium*. Iz treh zdravih osebkov iz naravnega okolja smo izolirali potencialno nevarne glive rodu *Pseudogymnoascus*. Samo na osebkih iz ujetništva so bile prisotne potencialno patogene glive rodu *Candida*. Ribe in dvoživke ogrožajoče glive rodu *Saproglenia* smo izolirali iz vod Krške in Planinske jame ter z dveh osebkov (iz narave in ujetništva). Oba sta imela na telesu viden micelij. Pri bakterijah pa je bilo največ izolatov oportunistično patogenih rodov *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* in *Flavobacterium*.

Analiza podatkov nakazuje večjo pestrost glivnih rodov pri bolnih osebkih in pri osebkih v ujetništvu, v primerjavi z zdravimi osebki oz. z osebki v naravnem okolju, pri bakterijah pa tega nismo opazili. Bakterijska združba na živalih je podobna kot v njihovem okolju.

Ključne besede: *Proteus anguinus*; mikroorganizmi; jamski ekosistem

Mikrobi in molekularne interakcije



Biofilmi različnih parov ozkosorodnih sevov *Bacillus subtilis* s konstitutivno izraženimi fluorescenčnimi proteini: (a) kolonija na agarški plošči- seva se slabo mešata; (b) jasno je razvidna ločnica med obema sevoma; (c) seva se dobro mešata; (d) primer preučevanja kokulture v plavajočem biofilmu s konfokalno lasersko mikroskopijo; (e) 3D rekonstrukcija plavajočega biofilma dveh sevov. Slike so nastale na Oddelku za živilstvo BF UL (Iztok Dogša in Mojca Krajnc).

Povezava med tvorbo surfaktina in genetsko kompetenco spodbuja horizontalni prenos genov pri bakteriji *Bacillus subtilis*

Tjaša Danevčič¹, Anna Dragoš^{1,2}, Mihael Špacapan¹, Polonca Štefanič¹, Iztok Dogša¹, Ákos T. Kovács², Ines Mandić-Mulec¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Tehniška univerza na Danskem, Oddelek za biotehnologijo in biomedicino, Skupina za bakterijske interakcije in evolucijo, 2800 Kongens Lyngby, Danska.

tjasa.danevcic@bf.uni-lj.si

Bakterija *Bacillus subtilis* regulira tvorbo surfaktina - lipopeptidnega antibiotika in genetske kompetence preko kooperativnega signaliziranja s sistemom za zaznavanje kvoruma ComQXPA (QS). To je ključnega pomena za horizontalni prenos genov, evolucijo odpornosti proti več različnim antibiotikom in diverzifikacijo mikrobnih združb. Pri modelni bakteriji *Bacillus subtilis* smo preučevali povezavo med zaznavanjem kvoruma, tvorbo surfaktina in genetsko transformacijo. Spremljali smo izražanje promotorja gena za sintezo surfaktina, frekvenco transformacije in količino zunajcelične DNA pri različnih sevih *Bacillus subtilis*. Pokazali smo, da mutante brez signala QS ne razvijejo kompetence za sprejem DNA in so hiperkompetente, ko jih mešamo s producenti signala. To daje celicam prehodno prednost, vendar le pod pogoji, ki favorizirajo pridobitev novih lastnosti. Ugotovili smo tudi, da je občutljivost bakterijskih celic na signal QS regulirana z DegQ, ki ima pomembno regulatorno vlogo pri tvorbi surfaktina in posledično razvoju genetske kompetence. Poleg tega smo odkrili, da ne samo genetska transformacija, temveč tudi tvorba surfaktina vplivata na horizontalni prenos genov. Surfaktin namreč inducira celično lizo v subpopulaciji celic, s čimer spodbuja sproščanje DNA v okolje in izmenjavo genetskega materiala znotraj vrste.

Ključne besede: zaznavanje kvoruma; horizontalni prenos genov; surfaktin

Medsebojni vplivi nesočasnih virusnih okužb v rastlinah

Denis Kutnjak^{1,2}, Régis L. Corrêa^{2,3}, Paula Agudo², Francisca de la Iglesia², Santiago F. Elena^{2,4}

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) - Universitat de València, Paterna, 46980 Valencia, Španija

³ Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 21941-590, Brazilija

⁴ The Santa Fe Institute, Santa Fe, NM 87501, ZDA

denis.kutnjak@nib.si

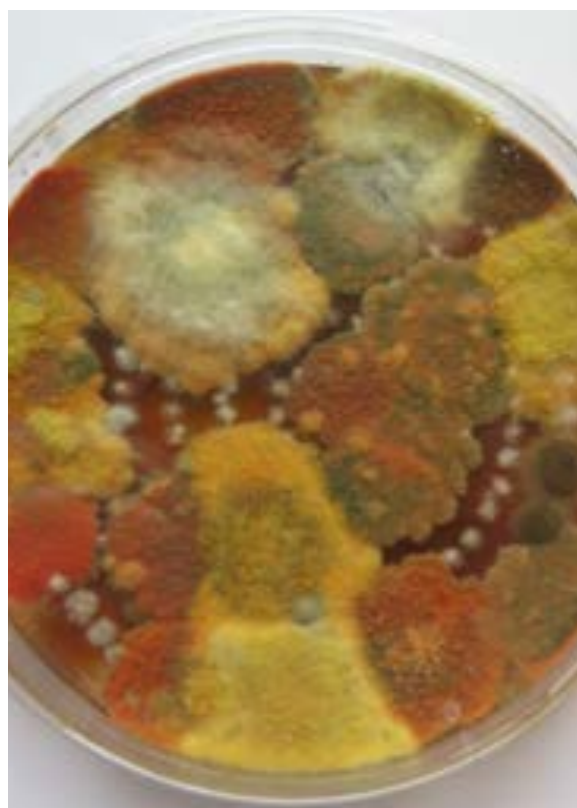
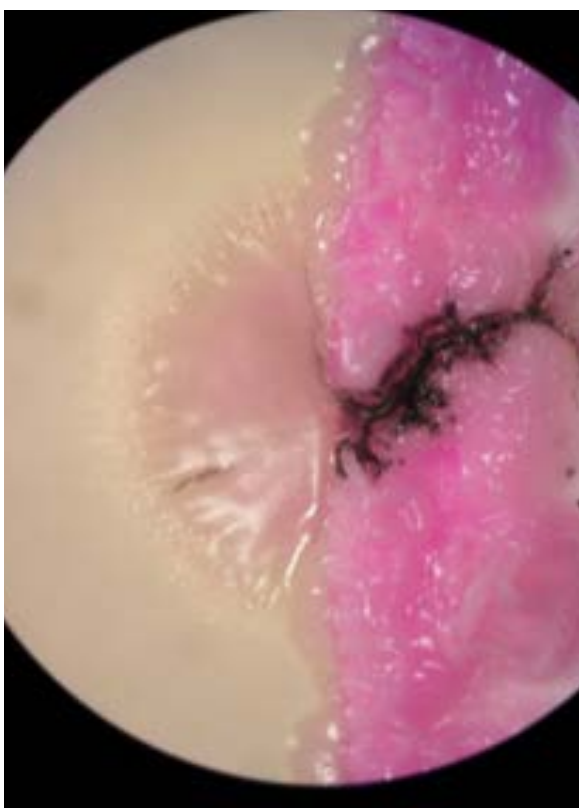
Virusi so eni izmed najpomembnejših patogenih mikrobov rastlin, ki lahko znatno vplivajo na preživetveno sposobnost rastlin. Imunski odziv rastlin na viruse je sestavljen iz omrežja odzivnih mehanizmov, ki vključuje zaznavo napadalca, signalizacijo in spremembe v fiziologiji rastlin. Nekatere spremembe, ki se sprožijo ob okužbi rastline z virusom, se lahko ohranijo, tudi ko virus ni več prisoten v rastlini in se lahko prenesejo tudi na potomce okuženih rastlin. Take spremembe lahko morda omogočijo hitrejši ali močnejši odziv rastlin ob kasnejši okužbi z drugim virusom.

Da bi ugotovili vpliv predhodnih prehodnih okužb rastlin z virusom na odziv rastlin na kasnejšo okužbo z drugim virusom, smo vzpostavili eksperimentalni sistem, ki vključuje navadni repnjakovec in tri različne viruse, ki okužujejo to rastlino. V seriji eksperimentov smo rastline najprej inokulirali z virusom šelestenja tobaka in virusom mozaika tobaka, nato pa smo inokulirane liste odstranili, preden sta se virusa razširila po rastlini. V nadaljevanju smo na tak način inducirane rastline inokulirali z virusom mozaika repe in spremljali infektivnost, virulentnost in titer tega virusa v induciranih in neinduciranih rastlinah.

Rezultati poskusov kažejo zmanjšano infektivnost in/ali virulentnost virusa mozaika repe v rastlinah, ki so bile inducirane s prehodno okužbo z virusom šelestenja tobaka ali virusom mozaika tobaka ter nakazujejo na manjše razlike v titru virusov v nekaterih induciranih in neinduciranih rastlinah.

V seriji poskusov smo zaznali medsebojni vpliv nesočasnih virusnih okužb v rastlinah navadnega repnjakovca: rastline, ki so bile predhodno prehodno okužene s prvim virusom, so spremenile svoj odziv na okužbo z drugim virusom. Z nadaljnjimi analizami obstoječih vzorcev in poskusi bi lahko raziskali mehanizme, ki uravnavajo spremembe odziva rastlin na nivoju rastlinskega imunskega odgovora.

Ključne besede: rastlinski virusi; interakcije; imunski odziv



Izsek iz gojišča z nanešenim brisom pomivalnega stroja: črne kolonije *Aureobasidium melanogenum*, rjave kolonije *Exophiala dermatitidis*, zelene kolonije *Penicillium crustosum*, bele kolonije: *Candida parapsilosis* (levo zgoraj, pod stereomikroskopom). Kultura črne kvasovke *Exophiala dermatitidis*, izolirana iz vodovodne vode na Lofotih, Norveška. Vzorec vodovodne vode na gojišču DRBC, kvasovke in črne kvasovke (spodaj levo, pod stereomikroskopom). Glive iz zraka na gojišču (spodaj desno). Slike so nastale na Oddelku za biologijo, BF UL (Jerneja Zupančič – zgoraj, Monika Novak Babič – spodaj levo, Polona Zalar – spodaj desno).

Kazalo avtorjev

A

Abram, Maja 44
Accetto, Tomaž 102, 108, 120
Agudo, Paula 138
Alič, Špela 79, 81, 82
Amano, Chie 58
Ambrožič Avguštin, Jerneja 68, 95, 128
Andrejašič, Kristina 114
Anesio, Alexandre M. 20
Atlic, Aid 89
Avbelj, Martina 52
Avberšek, Jana 61, 63, 69, 76
Avšič-Županc, Tatjana 31

B

Bačnik, Katarina 37, 71, 115, 124
Bahun, Miha 39
Bajc, Gregor 39
Balkovec, Valerija 65
Bardgett, Richard D. 119
Barlič Maganja, Darja 49
Bayer, Barbara 58
Beaumelle, Léa 119
Belcijan, Katarina 22, 116
Bele, Marjan 55
Benčič, Aleksander 82, 91
Benčina, Mojca 21
Beović, Bojana 67
Bezek, Katja 49
Biasizzo, Majda 72, 86
Bogovič Matijašič, Bojana 102, 109
Bokan, Ivana 135
Bolješič, Maja 22
Boonham, Neil 75
Božič, Nika 73
Brandão, João 129
Browning, Douglas F. 39
Buscot, François 119
Butala, Matej 39

C

Cameron, Erin K. 119
Carrillo Rincón, Andrés Felipe 52
Caveney, Nathanael 39
Ceglar, Maša 80
Cepec, Eva 92
Cesarz, Simone 119
Chatzinotas, Antonis 119
Cimerman, Mojca 101
Cleenwerck, Ilse 108
Corrêa, Régis L. 138
Cowan, Don 119

Č

Čadež, Neža 53, 132
Černoša, Anja 117

D

Danevčič, Tjaša 22, 130, 137
de la Iglesia, Francisca 138
Delgado-Baquerizo, Manuel 119
Dermastia, Marina 43, 82
Dermota, Urška 63
Dobnik, David 84
Dogša, Iztok 22, 105, 112, 122, 137
Dragoš, Anna 137
Dreo, Tanja 79, 81, 82, 91, 127
Duh, Darja 101
Dular, Matevž 99

E

Eisenhauer, Nico 119
Elam, Lauren 85
Elena, Santiago F. 138
Erdani Kreft, Mateja 47, 50, 97
Erega, Andi 22, 130
Escobar, Alvaro 58

F

Fanedl, Lijana 107
 Ferlež Rus, Alenka 43
 Fijan, Sabina 62, 93
 Fijok, Kim 112
 Filipič, Arijana 83
 Fišer, Sara 75
 Fornelos, Nadine 39
 Frauwallner, Anita 62
 Fric, Katja 83
 Frisvad, Jens C. 20

G

Gajšek, Mitja 118
 Gerič Stare, Barbara 45
 Gjuračić, Krešimir 52
 Godič Torkar, Karmen 80
 Golob, Majda 63, 69, 76, 96
 Gonçalves, José 67, 74
 Goranovič, Dušan 52
 Gostinčar, Cene 20, 57, 114, 115, 117, 133, 135
 Gradišar Centa, Urška 104
 Grebenc, Tine 103, 119
 Gruntar, Igor 61
 Gselman, Peter 134
 Gubenšek, Ana 135
 Guerra, Carlos A. 119
 Guerrero-Ramírez, Nathaly 119
 Gunde-Cimerman, Nina 20, 57, 114, 115, 117, 121, 125, 129, 133, 135
 Gutiérrez-Aguirre, Ion 37, 71, 115, 124

H

Hafner, Primož 83
 Hedzet, Stina 120
 Heintz-Buschart, Anna 119
 Henigman, Urška 72, 86
 Herndl, Gerhard J. 58
 Heschl, Adolf 62
 Horvat, Nika 94
 Hubad, Barbara 35
 Hymanova, Michaela 105

I

Ihan, Alojz 77

J

Jakomin, Tjaša 84
 Jakoš, Nejc 43, 87
 Jamnikar Ciglenečki, Urška 72, 86
 Janc, Mojca 83, 84
 Jančič, Nina 112

Janežič, Sandra 66
 Janež, Nika 64, 65
 Jarčič, Maša 121
 Jenko Rogelj, Mira 69
 Jeršek, Barbara 55, 100, 111
 Jeršek, Miha 55
 Jeseničnik, Karmen 85
 Jevšnik, Mojca 72
 Johnson, Tim 85
 Jubelin, Grégory 97
 Jurc, Dušan 82

K

Kandolf Borovšak, Andreja 94
 Kastrin, Andrej 85
 Kastrin, Tamara 74
 Kavalič, Maja 61, 76
 Keše, Darja 47
 Kete, Marko 109
 Kirbiš, Andrej 86
 Klančnik, Anja 44, 100, 103
 Klanfar, Lora 92
 Klun, Katja 58
 Kogej, Zala 71, 88, 127
 Kogovšek, Polona 75, 83, 84
 Kokalj, Mateja 55, 94
 Koren, Simon 55, 82, 91, 111
 Koritnik, Tom 67, 74
 Korona, Anna 89
 Korošec, Leon 55, 111
 Kosar, Olga 76
 Kostanjšek, Rok 20, 115, 135
 Košir, Nejc 84
 Košir, Tamara 83
 Kotnik, Kaja 68
 Kovács, Ákos T. 137
 Kovač, Anton 55
 Kovačec, Eva 22, 130
 Kovač, Miha 55, 111
 Kovač, Minka 55, 100, 111
 Kovač, Urša 77
 Kraigher, Barbara 22
 Krajnc, Mojca 122
 Kralj, Veronika Ana 95
 Kramberger, Katja 49
 Kranjc, Mojca 22
 Kranjc, Tanita 94
 Krebs, Bojan 62
 Križman, Manja 96
 Krstič, Branka 88
 Kukovec, Boštjan 82
 Kunej, Urban 100
 Küsel, Kirsten 119
 Kušar, Darja 61, 63, 69, 76
 Kutnjak, Denis 37, 71, 88, 115, 124, 138

L

Lah, Maruša 107
 Lamovšek, Janja 123, 127
 Langerholc, Tomaž 62
 Lenassi, Metka 57
 Lepen, Maja 69
 Lesar, Aleksander 97
 Levstek, Marjetka 107
 Libkind, Diego 53
 Lilek, Nataša 94
 Logar, Mateja 24
 Lories, Bram 130
 Lukežič, Tadeja 79
 Luzhetskyy, Andriy 52
 Lužnik, Dane 91

M

Maestre, Fernando T. 119
 Magdevska, Vasilka 52
 Mahnič, Aleksander 66, 70, 134
 Maksimović Carvalho Ferreira, Olivera 37, 71, 124
 Mandić-Mulec, Ines 22, 56, 116, 122, 130, 137
 Marič, Leon 108
 Marín, César 119
 Marinšek Logar, Romana 107, 110
 Marolt, Neja 123
 Matko, Boštjan 43
 Matos, Tadeja 73
 Matul, Mojca 125
 Mavrič Pleško, Irena 123, 126, 127
 Mehle, Nataša 37, 43, 71, 87, 88, 127
 Mešl, Miro 43
 Mičetić Turk, Dušanka 62
 Mićunović, Jasna 61
 Miglioranza, Ana 128
 Miklavc, Jože 43
 Milavec, Mojca 71
 Mioč, Verica 67, 74
 Mohar Lorbeg, Petra 102
 Mori, Nataša 131
 Moškon, Miha 77
 Mulec, Janez 68, 115, 128
 Mulec, Jani 135

N

Nemec, Kristina 65
 Novak Babič, Monika 115, 129

O

Oberčkal, Jernej 109
 Ocepek, Matjaž 61, 69
 Ogrizek, Janja 98
 Orel, Boris 55

Orgiazzi, Alberto 119
 Overmann, Jörg 119

P

Pajk, Franja 105
 Pandur, Žiga 99
 Papić, Bojan 61, 63, 69, 76
 Paragi, Metka 67, 74
 Pate, Mateja 63
 Patoine, Guillaume 119
 Paveljšek, Diana 109
 Pavlin, Anja 39
 Pavlin, Katarina 86
 Pecman, Anja 37
 Pečar Fonović, Urša 103
 Perini, Laura 20, 114
 Petek, Blaž 107, 110
 Peterka, Matjaž 65
 Petković, Hrvoje 52
 Petrin, Sara 97
 Phillips, Helen R. P. 119
 Pikel, Špela 52
 Pirc, Manca 79, 81
 Pirš, Mateja 33
 Pirš, Tina 61
 Pislak Ocepek, Metka 69, 76
 Piškur, Barbara 82
 Plemenitaš, Ana 57
 Podlesek, Zdravko 39
 Podnar, Eli 22, 130
 Pohar, Katka 77
 Predojević, Luka 47
 Pristavec, Ajda 111
 Pristovšek, Neja 109
 Prosenc Triar, Katarina 67

R

Ramić, Dina 44, 98, 100
 Ravnikar, Maja 37, 43, 71, 75, 79, 84, 87, 88, 115, 124, 127
 Recek, Nina 134
 Remškar, Maja 104
 Ribič, Helena 63
 Rillig, Matthias C. 119
 Rogelj, Irena 62
 Rot, Mojca 43
 Rozman, Damjana 77
 Rozman, Urška 101
 Rozman, Vita 102
 Rupel, Tatjana 80
 Rupnik, Maja 29, 66, 70, 120, 134

S

Sabotič, Jerica 44, 64, 103
 Salas, Margarita 39

Samec, Tomaž 94
 Savodnik, Nika 83
 Seme, Katja 50
 Sikorski, Johannes 119
 Simčič, Tatjana 131
 Singh, Brajesh K. 119
 Skamen, Urška 131
 Slemc, Lucija 52
 Smole Možina, Sonja 22, 44, 56, 94, 98, 100, 104, 132
 Smolnikar, Peter 82
 Smrekar, Frenk 35
 Song, Zewei 57
 Stanković, Ivana 88
 Starčič Erjavec, Marjanca 47, 50, 77, 85, 97, 131
 Steenackers, Hans 130
 Sterniša, Meta 44, 103, 104, 132
 Steyer, Andrej 93
 Stopar, David 22, 99, 105, 112, 122
 Strmečki, Ivana 133
 Strynadka, Natalie C. J. 39
 Sucipto, Hilda 52
 Susič, Nik 45
 Sysoeva, Tatyana 85

Š

Šalekar, Maja 84
 Šikić Pogačar, Maja 44
 Šimunović, Katarina 22, 44, 56
 Širca, Saša 45
 Šket, Tina 50
 Škraban, Jure 92, 112
 Škrli, Blaž 64
 Šostar Turk, Sonja 101
 Špacapan, Mihael 22, 137
 Špehar, Silvija 65
 Štefanič, Polonca 22, 116, 122, 137
 Štokelj, Maja 65
 Štorman, Alenka 66
 Štrakl, Maša 72
 Šulc, Dunja 93

T

ter Haar, Jessica A. 62
 Terlep, Saša 105
 Tinta, Tinkara 58
 Titan, Primož 134
 Tkalec, Valerija 134
 Tomazin, Rok 73
 Tome, Miha 53
 Tomič, Viktorija 91
 Toplak, Ivan 25
 Toplak, Nataša 55, 82, 91, 100, 111
 Trček, Janja 92, 108, 112
 Trkov, Marija 66, 67, 74
 Turk, Martina 57, 115, 118, 133, 135

Tušar, Jasmina 65
 Tušek Žnidarič, Magda 37, 44, 84

V

Vadnjal, Stanka 72, 86
 Vajdič, Tadeja 112
 Vandamme, Peter 108
 Veranič, Peter 47
 Veronovski, Anja 55, 111
 Vincent, Antonio 75
 Viršček Marn, Mojca 126, 127
 Vollmeier, Rebecca 84
 Vreček Šulgaj, Jerica 76
 Vučković, Darinka 44
 Vučurovič, Ana 87, 88

W

Wall, Diana H. 119
 Weis, Roland 89
 Williamson, Christopher 20
 Winter, Marten 119
 Wubet, Tesfaye 119

Z

Zajc, Janja 57, 75
 Zajc, Urška 69, 76
 Zakotnik, Miha 83
 Zalar, Polona 20, 57, 114, 115, 118, 121, 125, 133, 135
 Zdovc, Irena 63, 69, 76, 96
 Zevnik, Kaja 84
 Zhao, Zihao 58
 Zorman Rojs, Olga 61
 Zupančič, Jerneja 57
 Zupančič Justin, Maja 109

Ž

Železnik Ramuta, Taja 47, 50
 Žel, Jana 84
 Žežlina, Ivan 126
 Žgur Bertok, Darja 47
 Žigon, Primož 127
 Žohar Čretnik, Tjaša 26
 Žugelj, Alenka 69, 76
 Žužek, Zala 77
 Žvokelj, Lucija 76

Izboljšajte homogenizacijo biopsijskih vzorcev s **ProbeAX**



Zagotovite maksimalen izkoristek in zmanjšajte možnost kontaminacije.

Optimizirajte čas – krajša priprava vzorca brez dodatnega čiščenja.

Izboljšana sledljivost – en proces transporta, homogenizacije in shranjevanja.

Validiran za uporabo v avtomatiziranih sistemih za procesiranje mikrobioloških vzorcev.

- Ena posodica za shranjevanje, transport in homogenizacijo vzorca
- Primerno tako za mikrobiološko kot molekularno nadaljno obravnavo
- Na voljo kot enojno, dvojno in blister pakiranje
- Gama steriliziran izdelek

IKA Ultra-TurrAX® Tube Drive

- Na voljo ob naročilu ProbeAX sistema
- Enostaven za uporabo



Axonlab

Headquarters

Axon Lab AG

Täferstrasse 15
CH-5405 Baden-Dättwil
Tel. +41 56 484 80 80
Fax +41 56 484 80 99
info@axonlab.ch

www.axonlab.com

Affiliates

Austria info@axonlab.at
Belgium info@axonlab.be
Croatia info@axonlab.hr
Czech Republic info@axonlab.cz
Germany info@axonlab.de

Luxembourg info@axonlab.lu
Netherlands info@axonlab.nl
Slovenia info@axonlab.si
Switzerland (fr) info_f@axonlab.ch



Axon Biotech GmbH
Im Oberfeld 2
DE-94491 Hengersberg
mail@medco.eu, www.medco.eu
A Company of Axonlab



Iskra PIO, d.o.o. je družba z domačim kapitalom, ki ima sedež in proizvodne prostore v Šentjerneju na Dolenjskem. Osnovna dejavnost družbe je projektiranje in izdelava opreme za čiste in čistilne tehnologije. Družba je bila ustanovljena leta 1991, ko je pričela dejavnost z 18 zaposlenimi. Danes podjetje redno zaposluje 120 delavcev, od tega dobro polovico z najmanj višjo izobrazbo.

Na podlagi dolgoletnih izkušenj, z intenzivnim izobraževanjem in uvajanjem novosti, nenehno razvijamo opremo, največkrat projektne narave za znanega kupca. Iskra PIO je edini proizvajalec tovrstne opreme v Sloveniji, s katero enakovredno nastopamo tudi na tujem tržišču, kateremu je namenjena dobra polovica proizvodnje.

Naš proizvodni program obsega:

- Zaščitne mikrobiološke komore (razred I, razred II, razred III)
- Izolatorje (hermetično zaprti procesi)
- LAF komore (vzorčenje, tehtanje ...)
- Procesna oprema za manipulacijo in obdelavo surovin (dvigala, manipulatorji, mešalniki) in pripadajoča oprema (mlini, sita, tehtnice)
- Čiste sobe
- Ultrazvočni čistilniki
- ALU oprema

Naročniki naših proizvodov so farmacevtska podjetja, medicinske ustanove, lekarne ter raziskovalni inštituti doma in v tujini. Z intenzivnim zaposlovanjem visoko strokovnega kadra v vseh letih se stalno povečuje asortiman in obseg proizvodnje, ter zvišuje nivo kakovosti izdelkov. V projektnem oddelku družbe Iskra PIO je zaposlenih več kot 30 inženirjev, ki se ukvarjajo s projektiranjem opreme, konstrukcijo ter dokumentacijsko pokritost proizvedene opreme. V sklopu razvoja deluje tudi registrirana razvojna skupina s 14 raziskovalci, ki sledijo in odgovarjajo potrebam trga, snujejo in načrtujejo nove izdelke za nove tehnologije mnogih področjih. Tudi v prihodnje bomo v podjetju razvojno naravnani, ter z veliko optimizma in delovne vneme sledili napredku zlasti na tujih trgih.

V podjetju Iskra PIO d.o.o se zavedamo, da so kakovost poslovanja, odgovorno ravnanje z okoljem ter skrb za varnost in zdravje zaposlenih, ključni elementi pri graditvi uspešnosti podjetja. Sistem vodenja stalno nadgrajujemo in izboljšujemo na osnovi prilagajanja zahtevam kupcev, zaposlenih, lokalne skupnosti in drugih zainteresiranih strank ter zakonskim in drugim pravnim zahtevam. Naš cilj je izdelovanje varnih, funkcionalnih in zanesljivih proizvodov za naše kupce, ki si želijo najsodobnejšo opremo. Prizadevamo si, da na vseh področjih procesa, od nabave materialov do prodaje proizvoda, preprečujemo izvore napak, morebitne nastale napake takoj odstranimo in procese stalno izboljšujemo. Kupcem ponujamo celostne rešitve na področju čistih in čistilnih tehnologij. Podjetje je registrirano pri Inženirski zbornici Slovenije, tako lahko zagotavljamo projektno dokumentacijo v skladu z veljavno zakonodajo.

Proizvodnja poteka v lastnih prostorih in poseduje moderno strojno opremo, ki omogoča veliko prilagodljivost in fleksibilnost glede na potrebe. S tesnim sodelovanjem projektne in tehnološkega oddelka je v stalnem izpopolnjevanju postopkov in metod proizvodnega procesa. Proizvodnja izdelkov Iskre PIO se odvija po smernicah kakovosti sistema ISO 9001, kar zagotavlja našim kupcem dodatno sledljivost, kontrolo in končno kakovost izdelkov.

Iskra PIO je kljub stalni rasti in vpeljavi globalnih poslovnih sistemov ostala prilagodljiva potrebam kupcev in fleksibilna v proizvodnih procesih. To ji daje prednost pred konkurenco saj se lahko hitro odziva željam naročnikov opreme v smislu:

- Sodelovanja že pri idejnih zasnovah
- Sprememb v fazi procesa izvedbe
- Dokumentacije in verifikiranja opreme
- Optimizaciji rokov dobave in zagona
- Poprodajnih aktivnostih

Sodelujemo z več kot 100timi podjetji po Evropi in širše. Naša oprema se v teh podjetjih uporablja za manipulacijo s surovinami, zaščito tehnoloških procesov, ter zaščito okolja in ljudi na zelo zahtevnem nivoju. V zadnjem času zlasti na področju varnega rokovanja z aktivnimi surovinami, kjer pride do izraza naš program Izolatorske tehnike. Proces se odvijajo v hermetično zaprtih delovnih okoljih, ki predstavljajo varnost za operaterje in produkt. Predstavljajo tudi veliko omejitev za manipulacije in veliko mero prilagodljivosti. Tako smo razvili in patentirali precizno izolatorsko tehniko, ki ustreza zahtevam procesa, načine rokovanja in deponiranja nevarnih odpadkov, načine varnega vnosa in iznosa surovin. Vse te nove pridobitve plemenitijo naše končne izdelke, postavljajo pred konkurenco in pomenijo dodano vrednost tako za dobavitelja opreme kot za uporabnika.



Iskra PIO d.o.o.

Trubarjeva cesta 5
Si - 8310 Šentjernej

+386 7 3931 400
info@iskra-pio.si
www.iskra-pio.si



MICROBIUM

Detekcija in eliminacija mikrobov

V podjetju Microbium d.o.o. nudimo storitve in izdelke za učinkovito spremljanje mikrobioloških parametrov v tekočinah, trdninah in zraku.



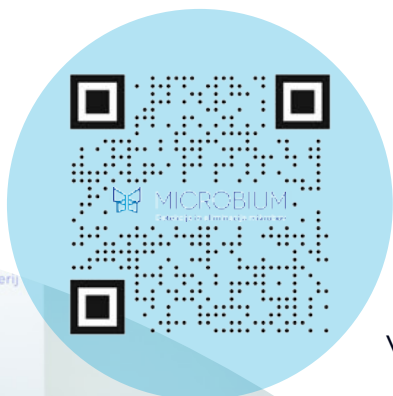
Lasten laboratorij nam omogoča razvoj novih metod za zaznavanje mikrobov glede na potrebe uporabnikov.



Izvajamo mikrobiološke preskuse glede na uveljavljene ISO standarde.



Sodelujemo s številnimi slovenskimi in tujimi vodovodi ter proizvodnimi podjetji na področju mikrobiološkega nadzora kakovosti in odpravljanja mikrobioloških kontaminacij.



Za več informacij nam pišite.
info@microbium.si

Vas zanima delo v našem podjetju?
Predstavite se nam!
hr@microbium.si



M +386 30 255 470
E info@microbium.si
W www.microbium.si

Povečajte učinkovitost v svojem laboratoriju.



Laboratorijski mikroskopi ZEISS

Vsak dan uživajte v udobju laboratorijskih mikroskopov ZEISS za vsakodnevne preglede. Izberite mikroskop, ki je enostaven za uporabo, ima dolgo življenjsko dobo in zagotavlja izjemno kakovost slike. S pametno mikroskopijo spremenite svojo digitalno dokumentacijo in preprosto pospešite svoje dnevne rutine.



Seeing beyond

zeiss.com/routine

ANALITIKA



Agilent Technologies ponuja širok nabor plinskih in tekočinskih kromatografov, masno selektivnih detektorjev ter z GLP skladno kromatografsko programsko opremo. Kjerkoli so potrebni zanesljivi in ponovljivi rezultati, kot jih zahtevajo najnovejši analitski standardi, lahko računate na odlične inštrumente z zanesljivo storitveno podporo.

BIO PROGRAM



Široka ponudba Agilent mikromrež, NGS panelov za selektivno bogatenje tarč, velik izbor zanesljivih reagentov - (Q)PCR, kloniranje CRISPR / Cas, mutageniza - inovativni inštrumenti ter napredna programska oprema omogočajo fleksibilnost in specifičnost bioloških ter genetskih raziskav od genske ekspresije, strukture in funkcije proteinov, pa vse do spremljanja metabolizma živih celic.

PATOLOGIJA



Agilent Dako integrirane rešitve s področja patologije za IHC, H&E, specialna barvanja in FISH zagotavljajo zanesljive diagnostične rezultate. Preverjeni reagenti, protitelesa in barvalci gradijo na zaupanju in prepričanju v to kar vidite. Razvoj molekularne genetike za patologijo vam omogoča ostati v središču ter brez težav slediti najnovejšim trendom s področja PDL-1 in uporabe NGS v patologiji. Premikajte meje mogočega že danes!

REŠITEV ZA VSAK LABORATORIJ



Spremlja namesto vas!

EXACTUM Laboratory za samodejni nadzor parametrov v prostoru ali napravah zagotavlja učinkovito in varno izvedbo postopkov ter brezskrbno shranjevanje vzorcev.

Kako deluje?

STALNO MERJENJE IN DOSTOP NA ENEM MESTU

EXACTUM Laboratory samodejno zajema izmerjene vrednosti iz merilnih mest, opremljenih s senzorji. Upravljanje izvaja pametno senzorsko središče (smart sensor hub).

TAKOJŠNJE OPOZORILO IN REAGIRANJE

V primeri da meritve presežejo nastavljene opozorilne mejne vrednosti, EXACTUM Laboratory sproži zvočni alarm in pošlje elektronsko ali SMS sporočilo. To vam omogoči pravočasen odziv ter ustrezno prilagoditev pogojev.

BAZA PODATKOV ZA OPTIMIZACIJO PROCESOV

EXACTUM Laboratory omogoča samodejno shranjevanje, pregledovanje in izpisovanje zgodovine merenj ter kritičnih dogodkov. Vse zajete podatke lahko izvozite v .pdf in excel obliko ter uporabljate za analize.

POVEZLJIVOST

Izbirate lahko med tremi različnimi možnostmi povezljivosti sistema: Wi-Fi (brezžično), Ethernet (mrežni kabel), preko USB vmesnika. Pogled preko tablice ali mobilnega telefona omogoča hitri pregled delovanja sistema, samo upravljanje pa je mogoče s pomočjo osebnega računalnika.



EXACTUM Laboratory za vas spremlja:

Temperaturo, relativno vlago, tlak, pretok zraka, CO₂, pH, VOC:

- vzorcev in naprav;
 - v hladilnikih in zamrzovalnikih za shranjevanje vzorcev ter reagentov;
 - v pečeh, kopelih in sušilnikih;
 - v avtoklavih;
 - v inkubatorjih;
 - v laboratorijskih in čistih prostorih.
- Druge parametre po vaših željah.





Intelligentne rešitve za vse laboratorijske aplikacije

METTLER TOLEDO precizni instrumenti so bistvo laboratorijev povsod po svetu. Naš širok izbor izdelkov vam omogoča fleksibilnost in preciznost pri vsaki aplikaciji.

- Tehtanje
- Titracije
- Meritve pH
- Karakterizacija materialov
- Fizične lastnosti
- Pipetiranje
- UV/VIS spektroskopija
- Avtomatizirana kemija
- Programska oprema
- Servisne storitve in kalibracija



► www.mt.com/lab

METTLER TOLEDO

Kit Details

Tests Per Kit: 96

Contents:

- Color-Coded Reagent Tubes
- Caps
- Pre-Dispensed and Ready-To-Use Lysis Solution
- Reagent Control (2)
- Negative Control

Storage Conditions: 2–8°C (shelf-life dated on label)

Certifications and Validations

Studies are underway through the AOAC® Research Institute *Performance Tested Method*SM program.

Sample Enrichment

Environmental

1. One (1) sponge/either 225mL or 100mL, or one(1) swab/10mL pre-warmed 3M DFBB*
2. Homogenize thoroughly for thirty (30) seconds
3. Incubate at 37°C (± 1°) for 26–30 hours

Processed Dairy

1. 25g/225mL pre-warmed 3M DFBB*
2. Homogenize thoroughly for two (2) minutes
3. Incubate at 37°C (± 1°) for 24–28 hours

Other Foods

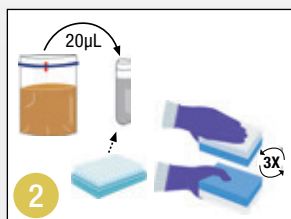
1. 25g/225mL pre-warmed 3M DFBB*
2. Homogenize thoroughly for two (2) minutes
3. Incubate at 37°C (± 1°) for 24–26 hours
4. Transfer 0.1mL into 10mL 3M FBB*
5. Incubate at 37°C (± 1°) for 24–26 hours

*Do not use Demi Fraser Broth Base or Fraser Broth Base containing Ferric Ammonium Citrate (FAC), either already in the broth base or as an added supplement, when using the 3M Molecular Detection Assay *Listeria monocytogenes*.

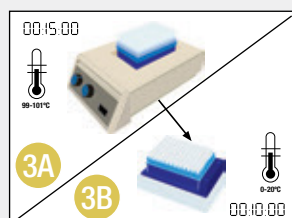
3M™ Molecular Detection Assay Process



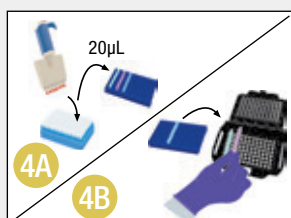
Set up run in software.



Transfer enriched sample to lysis tubes.



Heat lysis tubes, then chill.



Transfer lysate to reagent tubes.



Place speed loader tray into instrument.



Amplification and detection in real time.



3M™ Molecular Detection System Matrix Control

The 3M Molecular Detection System uses continuous amplification by a unique, high fidelity DNA polymerase that makes our system less prone to matrix interference. To assist with your verification process, we offer the 3M™ Molecular Detection Matrix Control to check for sample inhibition. 3M recommends using the Matrix Control during validation periods when adopting the 3M method or testing new or unknown matrices.

Ordering Information

Catalog Number	Description	Qty.
MDALM96NA	3M™ Molecular Detection Assay <i>Listeria monocytogenes</i>	1
MDMC96NA	3M™ Molecular Detection Matrix Control	1
BP0118500	3M™ Demi Fraser Broth Base, 500g (DFBB)	1
BP0118005	3M™ Demi Fraser Broth Base, 5 lb (DFBB)	1
BP0210500	3M™ Fraser Broth Base, 500g (FBB)	1
BP0210005	3M™ Fraser Broth Base, 5 lb (FBB)	1



3M Food Safety

3M Center
Building 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000
USA
1-800-328-6553
www.3M.com/3MMolecularDetectionSystem

3M Canada

Post Office Box 5757
London, Ontario N6A 4T1
Canada
1-800-364-3577

3M is a trademark of 3M. Used under license in Canada. AOAC is a trademark of the Association of Analytical Communities International. Performance Tested Method is a servicemark of the AOAC Research Institute.

Please recycle. Printed in U.S.A. © 3M 2013. All rights reserved.
70-2009-9506-9 Rev-0613



NAPREDNE REŠITVE V BIOTEHNOLOGIJI



Clinical Diagnostics

Autoimmune • Serology • BioPlex[®] 2200 Multiplex Testing • Diabetes Testing • Hemoglobinopathies
Bacteriology / Mycology • Newborn Screening • Quality Control • Special Chemistry
Critical Raw Materials • Remote Monitoring & Support • Access Virology and Antibodies • Immunohematology



Distributer za Slovenijo:

 **diahem**

Diahem d.o.o., Apače 207, 2324, Lovrenc na Dr. polju, Slovenija
+386 51 425 963 • info@diahem.si

Inteligentne platforme za mikro-fermentacijo

Visoko zmogljiva kultivacija večine tipov mikroorganizmov:

- Aerobni
- Mikroaerofilni
- Striktni anaerobi

Aplikacije: Selekcija sevov, presejanje klonov, študije promotorjev rasti in ekspresije proteinov, sintezna biologija, funkcionalna genomika in še veliko več.



Mikrofluidna bioprocena kontrola

Kontinuirna kontrola dovajanja hranil in pH vrednosti ob sočasnem merjenju biomase, pH in DO vrednosti ter fluorescence. Brez ročne manipulacije tekočin in potrebe po dodatnih cevih.



Spremljanje fermentacije v realnem času

Visoko zmogljiva mikro-fermentacija z online merjenjem biomase, pH-ja, DO in fluorescence. BioLector® deluje na principu neinvazivnega optičnega senzorja, sposobnega meritev tudi med samim procesom intenzivnega stresanja.



Avtomatizacija procesa fermentacije

Kombinacija mikro-bioreaktorja z robotsko roko za pipetiranje, RoboLector®, omogoča pripravo medijev, avtomatsko vzorčenje in doziranje, indukcijo ter fed-batch procesiranje.



JP CČN
DOMŽALE-KAMNIK
d.o.o.

SVETOVANJE NA PODROČJU ČIŠČENJA ODPADNIH VOD

nadgradnja ali izgradnja novih
čistilnih naprav

optimizacija procesov

reševanje težav pri
obratovanju

izračuni obremenitve,
zmogljivosti, sprejemljivosti
specifičnih odpadnih vod

SPREJEM V ČIŠČENJE

greznične gošče

blato iz malih čistilnih naprav

biološko razgradljivi
tekoči odpadki

industrijske odpadne vode

IZVAJANJE

pilotni poskusi

zahtevnejše laboratorijske
analize

mikrobioloske preiskave
aktivnega blata

simulacije procesev čiščenja
aktivnega blata

IZOBRAŽEVANJA SEMINARJI

vođenje procesa večje ČN

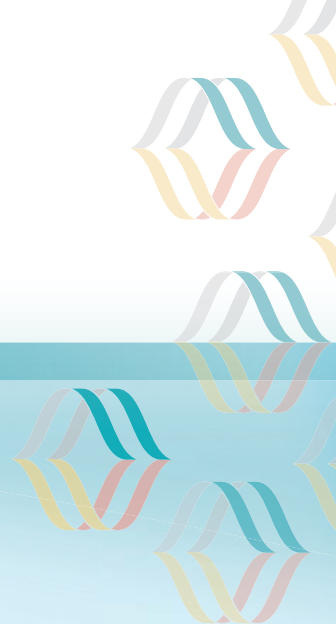
problematika malih ČN

individualna izobraževanja
seminarji tujih strokovnjakov

T: +386 (0)1 724 65 00
F: +386 (0)1 722 04 90
E: info@ccn-domzale.si
W: www.ccn-domzale.si
A: Študijska 91,
1230 Domžale, Slovenija



mediline



Prodaja in servis specializirane laboratorijske opreme, potrošnih materialov in diagnostičnih reagentov.



- Mikrobiologija
- Molekularna biologija
- Celična biologija
- Analitika
- Laboratorijska diagnostika
- Sekvenciranje naslednje generacije (NGS)
- Avtomatizacija
- Bioinformacijske rešitve ...

www.mediline.si



Ultrafree® Spin Filter for Clarification

Clarify your sample fast with high reproducibility

Sterile Ultrafree®-MC and CL centrifugal filter units with microporous membrane

- Easy, pre-sterilized, centrifugal sample units for either 0.5 mL (MC) or 2 mL (CL) maximum volumes
- High recovery Durapore® (PVDF) membrane
- Fast filtration and highly reproducible performance
- Use in fixed-angle rotors for 1.5 mL tubes (MC) or 15 mL tubes (CL)

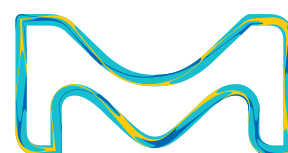
Description	Volume (mL)	Pore Size (µm)	Qty/Pk	Cat. No.
Ultrafree®-MC Filter	0.5	0.22	50	UFC30GV0S
Ultrafree®-CL Filter	2.0	0.22	50	UFC40GV0S

For more details, please visit
[SigmaAldrich.com/ultrafree](https://www.sigmaaldrich.com/ultrafree)

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

© 2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved. Merck, the vibrant M, Ultrafree, Durapore, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

MK_FL5655EN 31068 3/2020



Predstavljamo dobavitelja BIOMÉRIEUX –
pionirja na področju mikrobiologije



DIAGNOSTICS IS POWER

The power to fight infectious diseases

TEMPO
GENE UP
FILMARRAY
VIRTUO
VIDAS



**VRHUNSKI DIAGNOSTIČNI APARATI
INDUSTRIJSKA IN KLINIČNA MIKROBIOLOGIJA**

Obiščite naš virtualni razstavni prostor,
kontaktirajte nas neposredno – 23.9. in 24.9. smo vam
med 14. in 15. uro z veseljem na voljo.



NATAŠA KODRA, mag. biotehn.
T 02 614 33 73, M 030 602 032
E natasa.kodra@mikro-polo.si



NINA LEŠNIK, univ. dipl. biol.
T 02 614 33 02, M 031 374 435
E nina.lesnik@mikro-polo.si



**Z VAMI ŽE VEČ KOT
20 LET**

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

invitrogen

thermo
scientific

gibco

iontorrent

applied
biosystems

Authorised Distributor



analytikjena

An Endress+Hauser Company



PCR in qPCR

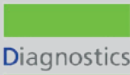
Demo aparat **TAdvanced**
z menljivimi bloki po izredni ceni **4.566 €**

INVITEK
Molecular

Ekstraktorji nukleinskih kislin



qPCR KITI

za živilsko industrijo (**Biotecon**)  **BIOTECON** 
za medicinsko diagnostiko (**Viasure**)



VIVALYTIC

45 min COVID-19 test
po principu qPCR metode

**Sanolabor praznuje 70 let
preverite naše akcije v oktobru!**



**From the
diagnostics
of today**

**to the limitless
potential of tomorrow.**

A clinical laboratory customized to meet
your daily needs, enabling you to get
the most from your time, space and staff.
We make it possible today.

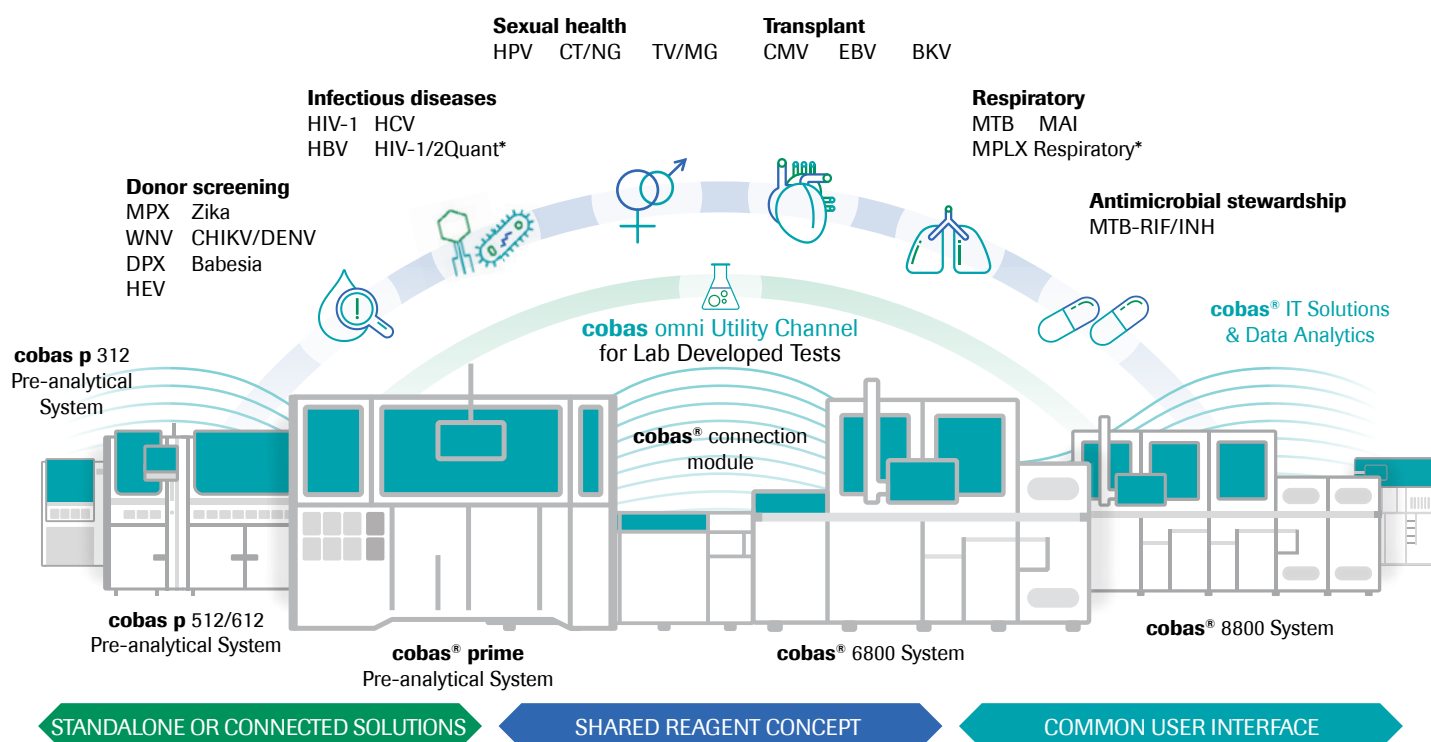
WHERE CARE LEADS

For Healthcare Professionals Only

Roche farmacevtska družba d.o.o.
Stegne 13g, 1000 Ljubljana
T: +386 1 56 80 260
www.roche.si

Roche Molecular Work Area

Partnering to achieve improved outcomes and patient care



* in development



Shift the molecular lab into new dimension of **complete connectivity**



Leverage **absolute automation** to drive increased efficiency



Generate trusted, reproducible results with **proven performance**



Deliver **unmatched flexibility** to meet your molecular testing demands – today and tomorrow

For Healthcare Professionals Only

Roche farmacevtska družba d.o.o.
Stegne 13g, 1000 Ljubljana
T: +386 1 56 80 260
www.roche.si

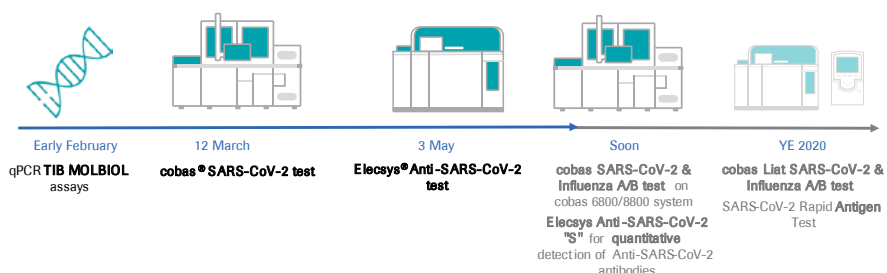
Redefining what is possible in fighting Covid-19 pandemic.

This is where we are going next.

Imagine where we can go next, together.

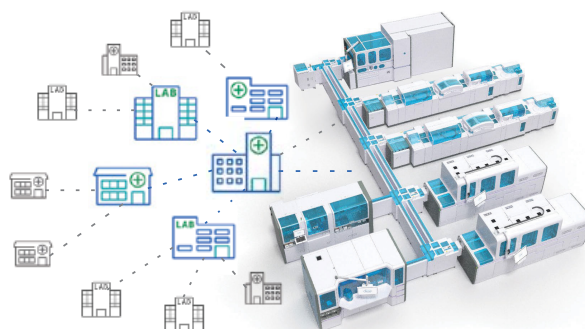
Innovating for the patient

Innovating for you to help you manage Covid-19 related diagnostic challenges efficiently



Integrate beyond the lab

True integration within the lab and beyond through digital solutions is leading the change in patient care



Partnering to deliver value-based care

Supporting you to transform lab as a service into a healthcare information provider for clinical decision support



Navify Symptom Tracker



Digital App



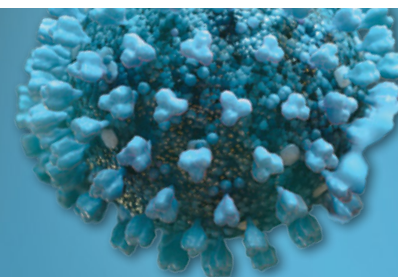
Medical & Scientific education



Roche Healthcare Consultancy

The power to care better

Comprehensive solution for Covid-19 patients management across different indications



For Healthcare Professionals Only