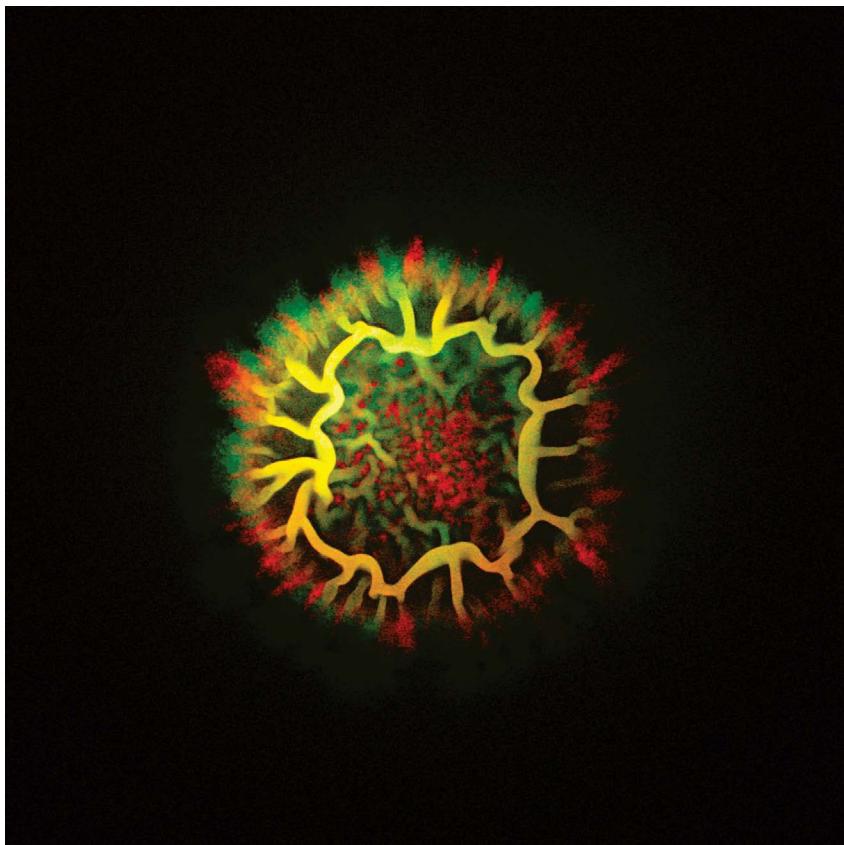




# MIKROBIOLOG.SI

Letnik 2, številka 1  
April 2022



Glasilo Slovenskega mikrobiološkega društva

**ISSN 2784-4463**

## Odgovorna urednica

dr. Marjanca Starčič Erjavec

## Glavna urednica

dr. Polonca Štefanič

## Uredniški odbor

dr. Tomaž Accetto  
dr. Darja Barlič Maganja  
dr. Polona Kogovšek  
dr. Urška Kuhar  
dr. Hrvoje Petković  
dr. Marjanca Starčič Erjavec  
dr. Polonca Štefanič  
dr. Valerija Tkalec  
Rok Tomazin

## Lektoriranje

Rok Dovjak

## Oblikovna zasnova

dr. Polonca Štefanič

## Grafična priprava

dr. Marjanca Starčič Erjavec

## Revija je brezplačna in izhaja 3 x letno

Spletna revija se nahaja v obliki pdf dokumenta na spletni strani SMD:  
[www.smd.si](http://www.smd.si)

Brez pisnega dovoljenja izdajatelja so prepovedani reproduciranje, distribuiranje, javna objava, predelava ali druga uporaba tega avtorskega dela ali njegovih delov v kakršnemkoli obsegu ali postopku.

## Prispevke pošiljajte na naslov

polonca.stefanic@bf.uni-lj.si

## Naslovница

Mešana kolonija dveh visokosorodnih sevov *Bacillus subtilis* (PS-216-RFP in PS-13-YFP), posneto s fluorescentnim stereomikroskopom, MZ FLIII (Leica) – 8x povečava, avtorica Mojca Krajnc.

<b>Novice iz sveta mikrobiologije</b>	<b>3</b>
<i>Ugotavljanje raznolikosti bakterije Paenibacillus larvae znotraj izbruhotov bolezni in prizadetega čebelarstva s sekvenciranjem celotnih genomov</i>	
Bojan Papič, Majda Golob, Irena Zdovc, Jana Avberšek, Metka Pislak Ocepek, Darja Kušar	
<b>Dijaki v svetu mikrobiologije</b>	<b>7</b>
<i>Mikrobi v probiotičnih jogurtih</i>	7
Julija Erjavec	
<i>Vpliv različnih načinov izpostavitve hladni kisikovi plazmi na dekontaminacijo gliv s semen tatarske ajde</i>	12
Barbara Makovec, Rok Sušnik, Eva Šajn, Jure Mravlje	
<i>Droži: od bakterij in divjih kvasovk do kruha</i>	17
Anton Žabkar, Brigit Brajkovič, Neža Čadež, Metka Novak, Sonja Smole Možina	
<i>Verodostojnost testov za SARS-CoV-2</i>	23
Lara Pregelj	
<b>Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19</b>	<b>26</b>
<i>S holesterolom povezani označevalci bolezni COVID-19 ter kamelidna nanoprotitelesa</i>	26
<i>Inhibicija kimotripsinske proteaze 3CL<sup>pro</sup> virusa SARS-CoV-2 z rastlinskimi polifenoli</i>	28
Genski elektroprenos kot platforma za vnos cepiva DNA proti SARS-CoV-2	
Genska elektrotransfekcija z uporabo visokofrekvenčnih kratkih bipolarnih električnih pulzov <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i>	32
Raziskave detekcije okužb, inhibitorjev in cepiva proti SARS-CoV-2	
Molekularna evolucija, integrativna genomika in iskanje zdravil proti COVID-19	34
Nukleinske kisline kot orožje proti SARS-CoV-2	
Odperta platforma za razvoj peptidaznih zaviralcev za zdravljenje okužb s koronavirusi	36
Razvoj pljučnega modela <i>in vitro</i> za testiranje protivnetnih učinkovin, uporabnih pri zdravljenju COVID-19	38
Razvoj aktivnih učinkovin in površin proti virusom z ovojnico	
Modificirana naravna barvila za funkcionalne protivirusne barvne tekstilije	40
<b>Slovenski mikrobiologi v tujini</b>	<b>42</b>
<i>Zagovor doktorske naloge Matevža Rumpreta, mag. mikrobiol., na Univerzi v Utrechtu na Nizozemskem</i>	
Marjanca Starčič Erjavec	
<b>Iskrice v svetu mikrobiologije</b>	<b>48</b>
<i>Mikrobiologija v sliki</i>	51
<i>Mikropesem: Peter Raspor</i>	52
<i>Rešitev mikrokrižanke</i>	54

Pred vami je prva številka novega, drugega letnika glasila Slovenskega mikrobiološkega društva, Mikrobiolog.si, glasila, katerega namen je, da mikrobiologi drug drugemu predstavimo in približamo svoje delo.

V tej številki nadaljujemo predstavitev posameznih prispevkov na dogodeku Raziskovalni programi se predstavijo 2021, ki smo ga izvedli na daljavo v novembru 2021. Takrat so namreč raziskovalni programi s področja virusa SARS-CoV-2 in bolezni COVID-19 predstavili svoje rezultate. V decembrski številki prvega letnika smo tako že objavili povzetke prispevkov iz sekcij Družbeno-pravni vidiki COVID-19, Diagnostika SARS-CoV-2 in Klinični vidiki COVID-19, v tej številki pa boste lahko našli še prispevke iz obeh delov sekcije Pristopi k zdravljenju COVID-19. V rubriki Novice iz sveta mikrobiologije boste prebrali zanimiv prispevek o ugotavljanju raznolikosti bakterije Paenibacillus larvae znotraj izbruhotov bolezni in prizadetega čebelarstva s sekvenciranjem celotnih genomov, ki so jih pripravili kolegi iz Veterinarske fakultete. S to številko pa začenjammo tudi objavljanje prispevkov v dveh novih sekcijah: Dijaki v svetu mikrobiologije, ki prinaša članke o dijaškem raziskovalnem delu, in Slovenski mikrobiologi v tujini, ki prikazuje dosežke slovenskih mikrobiologov na tujih tleh. Seveda pa smo za vas pripravili tudi Iskrice in pa pesem prof. Rasporja.

V upanju, da si boste z veseljem prebrali to številko in tudi prispevali svoje prispevke za naslednjo, vas prav lepo pozdravljam in vam želim lepo pomlad in poletje.

## Novice iz sveta mikrobiologije

### ***Ugotavljanje raznolikosti bakterije *Paenibacillus larvae* znotraj izbruhotov bolezni in prizadetega čebelarstva s sekvenciranjem celotnih genomov***

Bojan Papić, Majda Golob, Irena Zdovc, Jana Avberšek, Metka Pisjak Ocepek, Darja Kušar

Raziskava je bila opravljena v okviru ciljnega raziskovalnega projekta Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo sevov povzročitelja bolezni (V4-1804, trajanje: 1. 11. 2018–30. 11. 2020, vodja: Darja Kušar) in objavljena v reviji Microbial Genomics. Avtorji smo zaposleni na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani oz. Nacionalnem veterinarskem inštitutu, na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele (Enota za zdravstveno varstvo in gojitev divjadi, čebel in akvakultur: M. Pisjak Ocepek) in Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo (Enota za bakteriologijo in mikologijo: preostali avtorji), kjer opravljamo znanstvenoraziskovalno, strokovno in pedagoško delo.

Vir: Bojan Papić, Majda Golob, Irena Zdovc, Jana Avberšek, Metka Pisjak Ocepek, Darja Kušar. Using whole-genome sequencing to assess the diversity of *Paenibacillus larvae* within an outbreak and a beekeeping operation. *Microbial Genomics*. 2021, 7(12):000709.

Povezava do [članka](#).

Čebele imajo zaradi svoje opravevalske funkcije pomembno gospodarsko vlogo, hkrati pa so z ekološkega vidika nepogrešljive pri ohranjanju biotske raznovrstnosti. Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ) je ena od najresnejših bolezni čebelje zalege, ki jo povzroča po Gramu pozitivna bakterija *Paenibacillus larvae*. Ličinke se s sporami *P. larvae* okužijo s kontaminirano hrano. Spore so zelo odpornе proti številnim okoljskim dejavnikom in lahko ostanejo

WGS) je metoda izbora za genotipizacijo mikroorganizmov z veliko močjo razlikovanja. Omenjena metoda v kombinaciji s pridruženimi epidemiološkimi oz. epizootiološkimi podatki omogoča ugotavljanje poti širjenja in opredelitev izbruhotov bolezni. Za namen bioinformacijske obdelave podatkov WGS smo v okviru projekta V4-1804 izdelali stabilno shemo za tipizacijo bakterije *P. larvae* na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma (wgMLST) s 5745

»Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ)  
je ena od najresnejših bolezni čebelje  
zalege, ki jo povzroča po Gramu  
pozitivna bakterija *Paenibacillus  
larvae*.«

infektivne več desetletij. Zaradi bolezni postopoma oboleva in odmira čebelje zalega, kar vodi do popolnega propada čebeljih družin (slika 1). Bolezen se zatira v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje HGČZ (Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20). Okoli na novo ugotovljenega žarišča bolezni se uvede zapora premikov čebel in čebelarske opreme v polmeru tri kilometre (t. i. kužni krog), dokler se žarišče ne sanira in se klinično pregledajo vse čebelje družine znotraj zapore. Če se znotraj zapore pojavi novo žarišče, se kužni krog ustrezno razširi. Bolezen ni ozdravljiva, vse klinično bolne čebelje družine je treba neškodljivo uničiti, zato je za uspešno zatiranje HGČZ najučinkovitejši ukrep preprečevanje širjenja bolezni.

Sekvenciranje celotnih genomov (ang. whole-genome sequencing,

✓ Slika 1: Značilna bolezenska spremembra pri hudi gnilobi čebelje zalege je presledkast oz. nestrijen videz pokrite zaledje s posameznimi vdrtimi pokrovci temnejše barve. Obolele ličinke odmrejo in se spremenijo v vlečljivo maso rjave barve, ki se lahko povleče iz satne celice.

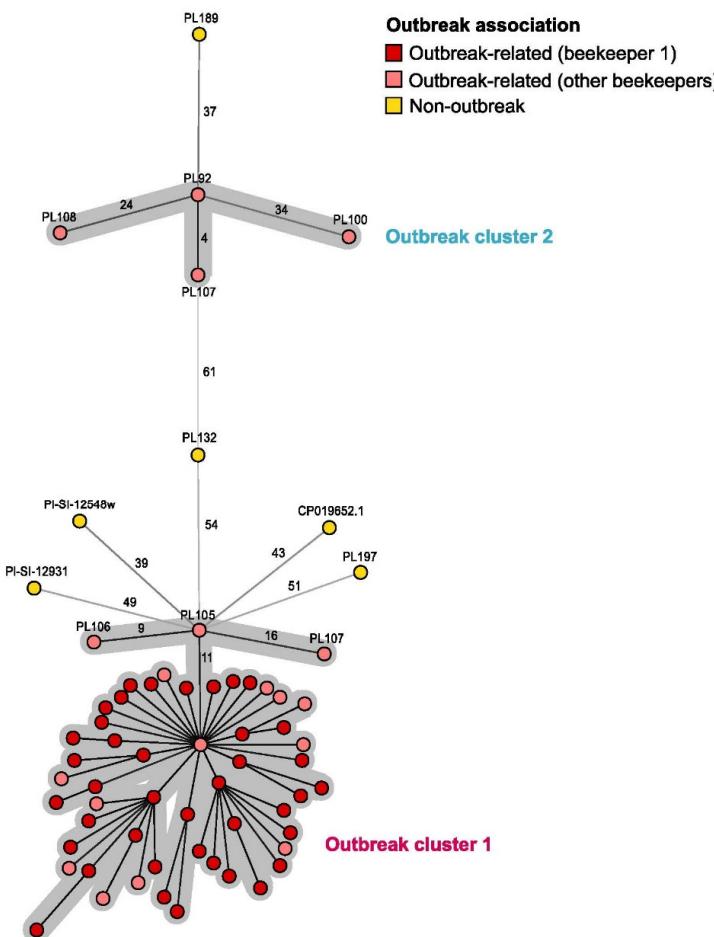


Ugotavljalci smo tudi raznolikost izolatov *P. larvae* znotraj izbruha HGČZ v primerjavi z raznolikostjo znotraj prizadetega čebelarstva, čebelnjaka in čebelje družine (predstavljena raziskava). Za ta namen smo z metodo WGS tipizirali 59 izolatov, povezanih z

izbruhom hude gnilobe v severozahodni Sloveniji v letu 2019 (slika 2). Od tega je 40 izolatov izviralo iz enega čebelarstva s tremi čebelnjaki. Vsi izolati so pripadali tipu ERIC II-ST11, analiza wgMLST pa ni pokazala razvrščanja izolatov glede na vrsto

vzorca (med ali zalega), čebelnjak ali čebeljo družino (panj). V povprečju so se izolati iz istega čebelarstva razlikovali v 10 alelih wgMLST, največja genetska razdalja med pari izolatov pa je bila 22 razlik v alelih. To kaže na znatno genetsko raznolikost med izolati *P. larvae* iz istega čebelarstva, ki jo moramo upoštevati pri opredelitvi klonalnih odnosov med izolati drugi strani lahko v primeru ugotovitve istega klena *P. larvae* na razdaljah, ki znatno presegajo preletno razdaljo čebel (tudi 20 km in več), upravičeno sklepamo na širjenje okužbe z aktivnostjo čebelarjev, npr. zaradi prevoza bolnih čebeljih družin na pašo ali pri prodaji. Znotraj kužnih krogov smo ugotovili tudi prisotnost nesorodnih sevov *P. larvae*, kar kaže na

Slika 2: Minimalno vpeto drevo wgMLST za 59 izolatov *Paenibacillus larvae*, ki so bili povezani z izbruhom (■, □), in šest z izbruhom nepovezanih izolatov (□); 'beekeeper 1' označuje čebelarstvo s tremi prizadetimi čebelnjaki, iz katerega smo pridobili 40 izolatov. Številke na črtah označujejo razlike v alelih (AD, ang. allele differences), dolžine črt so prikazane v logaritemskem merilu. Dolžene razdalje znotraj gruče 1 (ang. outbreak cluster 1) niso označene, vendar so vse ≤ 11 AD. Izolati znotraj genetske meje ≤ 35 AD so obrobljeni sivo.



»Rezultati kažejo, da trikilometrski kužni krog zajame vse prenose okužb, ki so posledica naravne aktivnosti čebel. Po drugi strani lahko v primeru ugotovitve istega klena *P. larvae* na razdaljah, ki znatno presegajo preletno razdaljo čebel (tudi 20 km in več), upravičeno sklepamo na širjenje okužbe z aktivnostjo čebelarjev, npr. zaradi prevoza bolnih čebeljih družin na pašo ali pri prodaji.«

(preiskave izbruhanov in ugotavljanje poti širjenja) in izboru števila kolonij za tipizacijo. Za zanesljivejšo opredelitev klonalnih odnosov med izolatimi so zaželeni izčrpni epizootiološki podatki, tipizacija večjega števila izolatov iz danega okolja (npr. istega čebelarstva) in izdelava statistično podprtrega filogenetskega drevesa, ki temelji na polimorfizmu posameznih nukleotidov (ang. single nucleotide polymorphism, SNP).

Rezultati kažejo, da trikilometrski kužni krog zajame vse prenose okužb, ki so posledica naravne aktivnosti čebel. Po

kompleksne poti širjenja povzročitelja HGČZ in mešane (multiklonalne) izbruhe.

#### Viri:

1. Papić B, Diricks M, Kušar D. Analysis of the global population structure of *Paenibacillus larvae* and outbreak investigation of American foulbrood using a stable wgMLST scheme. Frontiers in Veterinary Science. 2021, 8:582677. URL: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.582677>, zadnji dostop: 21. 6. 2022.
2. Zugelj A, Papić B, Zdovc I, Zajc U, Golob M in sod. ERIC and WGS typing of *Paenibacillus larvae* in Slovenia: investigation of ERIC I outbreaks. Insects. 2021, 12(4):362. URL: <https://doi.org/10.3390/insects12040362>, zadnji dostop: 21. 6. 2022.

## Dijaki v svetu mikrobiologije

### Mikrobi v probiotičnih jogurtih

Julija Erjavec

Zavod sv. Stanislava – Škofijska klasična gimnazija, 1210 Ljubljana-Šentvid

julija.erjavec@stanislav.si

**Ključne besede:** probiotični jogurti, mikrobi, mikrobiota.

Hrana, ki jo zaužijemo, na naše zdravje vpliva ne samo s sestavo živila, ampak tudi s prisotnimi mikrobi. Probiotični jogurti prispevajo k našemu zdravju, saj vsebujejo probiotične bakterije, ki so koristne za naše zdravje.

#### UVOD

Za zdravje vsakega človeka je pomembna sestava živil, ki jih zaužije.

Probiotični jogurti veljajo za živila, ki pozitivno vplivajo na zdravje človeka, in to predvsem, ker vsebujejo probiotične bakterije. Na trgu se tako pojavlja večje število probiotičnih jogurtov, ki

jih izdelujejo različna industrijska podjetja oz. mlekarne [1].

Vemo, da je sestava črevesnih bakterij, ki so del mikrobiote, za zdravje človeka ključna, saj so spremembe v sestavi mikrobiote lahko vzrok za nastanek različnih bolezni (preglednica 1).

▼ Preglednica 1:  
Učinki na zdravje  
gostitelja nekaterih  
bakterijskih vrst, ki so  
del mikrobiote. Po-  
vezeto po [2].

Bakterijska vrsta	Povezanost z zdravjem
<i>Bacteroides</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>povečano število teh bakterij pri debelosti</li> </ul>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij pri debelosti</li> <li>povečano število teh bakterij pri Rettovem sindromu</li> </ul>
<i>Bilophila</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>povečano število teh bakterij pri kolitisu</li> <li>zmanjšano število teh bakterij pri avtizmu</li> </ul>
<i>Clostridium</i> spp	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij pri vnetni črevesni bolezni</li> <li>povečano število teh bakterij pri avtizmu, pri Rettovem sindromu in pri diabetesu tipa 2</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>povečano število teh bakterij pri vnetni črevesni bolezni in pri diabetesu tipa 2</li> </ul>
<i>Eubacterium</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij pri vnetni črevesni bolezni, pri aterosklerozi in pri diabetesu tipa 2</li> </ul>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij pri vnetni črevesni bolezni, pri debelosti in pri diabetesu tipa 2</li> </ul>
<i>Lactobacillus lantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij pri debelosti</li> </ul>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>povečano število teh bakterij pri debelosti</li> </ul>
<i>Roseburia</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij vnetni črevesni bolezni</li> <li>zmanjšano število teh bakterij pri aterosklerozi</li> </ul>
<i>Roseburia intestinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zmanjšano število teh bakterij pri debelosti in pri diabetesu tipa 2</li> </ul>

Na sestavo mikrobiote lahko vplivamo s prehrano, torej tudi z jogurti [2]. Sevi probiotičnih bakterij veljajo za varne in zdravju koristne [1]. V preglednici 2 so

predstavljeni najbolj znani bakterijski rodovi, za katere poročajo, da imajo probiotični potencial, in njihov vpliv na zdravje.

▼ Preglednica 2: Najbolj znani probiotični bakterijski rodovi in njihovi učinki na zdravje. Povzeto po [1].

Bakterijski rod	Učinek na zdravje
<i>Lactobacillus</i> <sup>a</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Izboljšana toleranca laktoze in razgradnja le-te</li> <li>Izboljšano črevesno mikrobeno ravnovesje</li> <li>Zavirjalni učinek na patogeno bakterijo <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>Izboljšanje delovanja črevesa</li> <li>Zmanjšanje količine holesterola</li> <li>Sinteza vitaminov B</li> <li>Zdravljenje in preprečevanje driske</li> <li>Spodbujanje imunskega odgovora</li> <li>Zaščita pred rakom debelega črevesa</li> <li>Zaščita pred vnetjem nožnice in sečil</li> <li>Blažji alergični odziv</li> <li>Blažji vnetni črevesni sindrom</li> </ul>
<i>Bifidobacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Izboljšanje delovanja črevesa</li> <li>Zmanjšanje količine holesterola</li> <li>Sinteza vitaminov B</li> <li>Zdravljenje in preprečevanje driske</li> <li>Spodbujanje imunskega odgovora</li> <li>Zaščita pred rakom debelega črevesa</li> <li>Blažji alergični odziv</li> </ul>
<i>Propionibacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zaščita pred rakom debelega črevesa</li> </ul>
<i>Streptococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Izboljšanje delovanja črevesa</li> <li>Zmanjšanje količine holesterola</li> <li>Sinteza vitaminov B</li> <li>Zdravljenje in preprečevanje driske</li> </ul>

<sup>a</sup> Nekdaj so se v rod *Lactobacillus* uvrščali tudi nekateri predstavniki iz rodov *Levilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Limosilactobacillus* in *Lactiplantibacillus*.

Eden izmed najbolj znanih probiotičnih mikroorganizmov v jogurtih je bakterija *Lactobacillus casei* (*L. casei*). *L. casei* je fakultativno anaerobni po Gramu pozitivni mikroorganizem, ki ne tvori spor ter je katalaza negativen [3]. Zanj je značilno, da spada med najbolj raziskane in uporabljane probiotične vrste laktobacilov. V literaturi se najdejo zapisi, da to bakterijsko vrsto povezujejo s pozitivnimi učinki na različna zdravstvena stanja, od atopijskega dermatitisa do

raka. Mehanizmi, s katerimi te bakterije neposredno ali posredno ugodno vplivajo na zdravje ljudi, še niso popolnoma razumljeni in zatevajo nadaljnje raziskave [4]. Namen moje raziskovalne naloge je bil ugotoviti, koliko bakterij *L. casei* na mlje je prisotnih v probiotičnem izdelku Actimel. Nadalje me je zanimalo, kaj se zgodi s številom probiotičnih bakterij v Actimelu po enomesečni oz. dvo-mesečni inkubaciji pri sobni temperaturi oz. v hladilniku pri +4 °C.

**METODA**

Za ugotavljanje števila bakterij na ml probiotičnega izdelka sem uporabila metodo iz učbenika Janc in Rupnik [5]. Najprej sem si pripravila redčitveno vrsto 9 mikrocentrifugirk s po 900 µl fiziološke raztopine. Iz plastenke Actimel, ki sem jo pretresla, sem nato odpipetirala 100 µl napitka v prvo mikrocentrifugirko in dobro premešala s potresanjem, da sem dobila redčitev  $10^{-1}$ . Iz mikrocentrifugirke z redčitvijo  $10^{-1}$  sem odpipetirala 100 µl v naslednjo mikrocentrifugirko, ponovno pretresla in tako dobila redčitev  $10^{-2}$ . Postopek sem ponavljala, vse dokler nisem dobila redčitve  $10^{-8}$ . Ko sem imela pripravljene vse redčitve izdelka Actimel, sem po 100 µl suspenzije posameznih redčitev prenesla na gojišča LB ter jih z obžgano spatulo po Drigalskem enakomerno razmazala do suhega. Tako sem na ploščah dobila končne redčitve od  $10^{-2}$  do  $10^{-8}$ .

**Preglednica 3:** Število bakterij *Lactobacillus casei* v 1 ml izdelka Actimela ob nakupu ter po eno-oz. dvomesečni inkubaciji pri sobni temperaturi oz. pri +4 °C. NŠT – neštevno.

**REZULTATI Z RAZPRAVO**

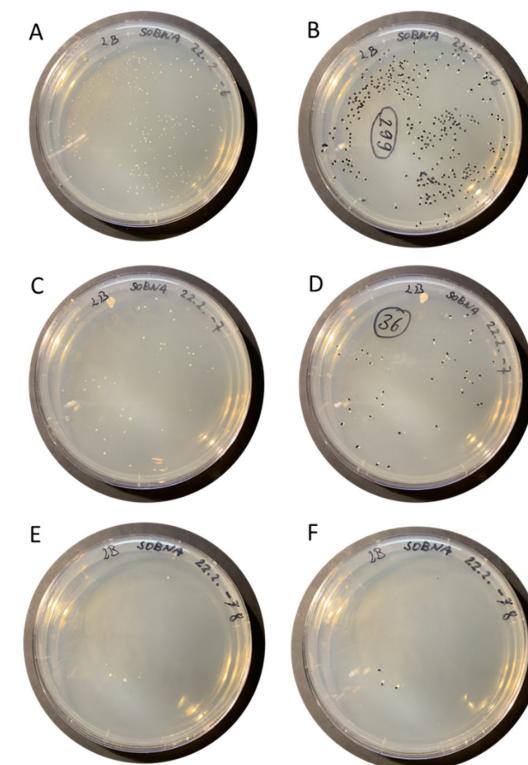
Na ovojnini Actimela piše, da je v posamezni plastenki izdelka 20 milijard bakterij *L. casei*. Ker je navedeno, da je v eni plastenki 94 ml napitka, sem izračunala, da naj bi bilo v 1 ml izdelka

do  $10^{-9}$ . Plošče sem nato inkubirala pri sobni temperaturi, da so porasle kolonije bakterije *L. casei* in sem njihovo število lahko preštel ter na podlagi tega izračunala titer bakterij – kot povprečje števila vseh kolonij na ploščah posameznih redčitev. Pri metodi ugotavljanja titra bakterij je navedeno, da so števne plošče tiste, na katerih zraste med 30 in 300 kolonij in da je titer treba določiti v vsaj dveh ponovitvah. Ker žal nisem imela na razpolago dovolj materiala, sem poskus lahko izvedla samo brez dodatnih ponovitev in pri izračunu titra upoštevala tudi plošče, na katerih je zraslo več kot 300 kolonij, pod pogojem, da se je dalo kolonije med sabo lepo ločiti. Število bakterij sem določala pri izdelku Actimel, kupljenem na dan razmazovanja, inkubiranem pri sobni temperaturi 1 oz. 2 meseca ter inkubiranem v hladilniku pri 4 °C en oz. dva meseca.

Poskus	Št. kolonij na ploščah LB s končno redčitvijo								Titer
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	
22. 1. 2022 – izhodiščna kultura	NŠT	NŠT	NŠT	NŠT	489	37	5	0	$4,2 \times 10^8$
22. 2. 2022 – inkubacija pri sobni temperaturi	NŠT	NŠT	NŠT	NŠT	299	36	4	0	$3,5 \times 10^8$
22. 2. 2022 – inkubacija pri 4 °C	NŠT	NŠT	NŠT	NŠT	232	30	2	0	$2,4 \times 10^8$
22. 3. 2022 – inkubacija pri sobni temperaturi	NŠT	NŠT	238	21	2	0	0	0	$2,2 \times 10^6$
22. 3. 2022 – inkubacija pri 4 °C	NŠT	NŠT	254	49	5	0	0	0	$4,2 \times 10^6$

Izhodiščni titer,  $4,2 \times 10^8$ , je za kupljen izdelek Actimel povsem pričakovani rezultat. Po enomesecni inkubaciji sem ugotovila, da se je titer pri obeh temperaturah inkubacije zelo zmanjšal, in sicer kar za stokrat. Pri sobni temperaturi je padel na  $2,2 \times 10^6$ , pri 4 °C na  $4,2 \times 10^6$ . Ker je med dvomesecno inkubacijo rok trajanja izdelku že potekel, sem pričakovala, da se bo to odrazilo pri številu bakterij. Moja pričakovanja so bila sicer, da bo število padlo samo za ok. desetkrat.

Na ovojnini Actimela je navedeno, da so ob *L. casei* v izdelku tudi druge navadne bakterije, ki se jih najde v jogurtih, česar pa moji rezultati niso pokazali, saj so bile vse kolonije drobne in značilne za *L. casei* (slika 1).



**Slika 1:** Plošča s končno redčitvijo  $10^{-6}$  Actimela po enomesecni inkubaciji pri sobni temperaturi pred štetjem kolonij *L. casei* (A) in po štetju kolonij *L. casei* (B). Plošča s končno redčitvijo  $10^{-7}$  Actimela po enomesecni inkubaciji pri sobni temperaturi pred štetjem kolonij *L. casei* (C) in po štetju kolonij *L. casei* (D). Plošča s končno redčitvijo  $10^{-8}$  Actimela po enomesecni inkubaciji pri sobni temperaturi pred štetjem kolonij *L. casei* (E) in po štetju kolonij *L. casei* (F).

**ZAKLJUČEK**

- V izhodiščnem izdelku Actimel je bilo toliko bakterij, kot jih je proizvajalec navedel, to je 20 milijard.
- Po enomesecni inkubaciji se je titer pri obeh temperaturah inkubacije, sobni temperaturi in temperaturi hladilnika, nekoliko zmanjšal. Pri sobni temperaturi je padel s  $4,2 \times 10^8$  na  $3,5 \times 10^8$ , pri  $4^\circ\text{C}$  na  $2,4 \times 10^8$ .
- Po dvomesecni inkubaciji se je titer pri obeh temperaturah inkubacije zelo zmanjšal, in sicer kar za stokrat. Pri sobni temperaturi je padel na  $2,2 \times 10^6$ , pri  $4^\circ\text{C}$  na  $4,2 \times 10^6$ . Dobljeni rezultati se ujemajo z napovedjo proizvajalca o roku trajanja tega izdelka.

**Viri:**

1. Nyanzi R, Jooste P J, Buys EM. Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. *J Dairy Sci.* 2021 Jan;104(1):1–19. doi: 10.3168/jds.2020-19116. PMID: 33348476.
2. Gomaa E Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek.* 113(12):2019–2040. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33136284.
3. Goldstein E J, Tyrrell K L, Citron D M. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis.* 15:S6 Suppl 2:S98–107. doi: 10.1093/cid/civ072. PMID: 25922408.
4. Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C et al. The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Front Microbiol.* 2018; 9:2107. doi: 10.3389/fmicb.2018.02107. PMID: 30298055; PMCID: PMC6160870.
5. Janc M, Rupnik M. *Splošna mikrobiologija : novodila za voje.* Knjižna zbirka Scripta, Mikrobiologija. Ljubljana: ŠOU, Študentska založba, 1998, str. 26.

**Dijaki v svetu mikrobiologije*****Vpliv različnih načinov izpostavitve hladni kisikovi plazmi na dekontaminacijo gliv s semen tatarske ajde***

Barbara Makovec<sup>1</sup>, Rok Sušnik<sup>1</sup>, Eva Šajn<sup>1</sup>, Jure Mravlje<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gimnazija Vič, Tržaška cesta 72, 1000 Ljubljana

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

jure.mravlje@bf.uni-lj.si

**Ključne besede:** hladna plazma, glice, tatarska ajda.

Glice pogosto kontaminirajo semena rastlin in s tem povzročajo bolezni rastlin ali pa izločajo mikotoksine. Preučevali smo vpliv različnih načinov izpostavitve hladni plazmi na givne združbe semen tatarske ajde. Najvišja raven dekontaminacije je bila dosežena pri neposredni izpostavitevi (ob delovanju reaktivnih kemijskih zvrsti ter UV-sevanja), posredna izpostavitev plazmi (izpostavitev le obstojnejšim kemijskim zvrstem, ne pa tudi UV-sevanju) pa je bila manj učinkovita.

**UVOD**

S strmo naraščajočim svetovnim prebivalstvom bodo za svetovno oskrbo s hrano ključne nove, okolju prijazne tehnologije za zaščito pridelkov ali prehranskih proizvodov pred škodljivci [1]. Eno izmed takšnih alternativ predstavlja tehnologija obdelave semen s hladno plazmo (HP), ki ima potencial za nadomestitev uveljavljenih načinov dekontaminacije semen.

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) ima zelo visoko hranilno vrednost, saj je bogata z antioksidanti, hkrati pa je zelo skromna in nezahtevna rastlina, primerna za ekološko pridelavo [2]. Givne okužbe semen so

problematične, saj lahko povzročajo bolezni rastlin, mikotoksini, ki jih izločajo nekatere glice, pa so nevarni za ljudi in živali. Glice običajno zatiramo s fungicidi, ki so škodljivi za okolje in naše zdravje, zato so potrebne nove metode dekontaminacije biološkega materiala [3].

HP je četrto agregatno stanje snovi, ioniziran plin, ki ga pridobimo z dovajanjem energije plinu (v obliki električnega toka ali toplove) [4]. HP je uporabna kot sredstvo za dekontaminacijo semen, saj ne dosega visokih temperatur, ki bi poškodovale toplotno občutljiv biološki material. Za dekon-

taminacijo ključni komponenti HP sta UV-sevanje in reaktivne kemijske zvrsti, ki učinkujejo na površini obdelovanega materiala [5]. Tega lahko HP izpostavimo na dva načina: pri neposredni izpostavitvi je material v območju nastajanja HP in nanj učinkujejo vse njene komponente (reaktivne kemijske zvrsti ter UV-sevanje), pri posrednem načinu pa je

zunaj razelektritvenega območja in je izpostavljen le obstojnejšim kemijskim zvrstjem, ne pa tudi UV-sevanju [6]. V raziskavi smo preučevali učinkovitost kisikove HP pri dekontaminaciji semen tatarske ajde. Domnevali smo, da se bosta z daljšanjem časa izpostavitve HP zmanjševali tako številnost prisotnih gliv kot tudi njihova raznovrstnost.

## METODE

Semena tatarske ajde, ki so bila ekološke pridelave (pridobljena iz Mlina Rangus), smo kisikovi HP izpostavili neposredno (za 30 in 60 s) in posredno (za 60, 120, 180 in 240 s). HP smo proizvedli z induktivno sklopljenim radiofrekvenčnim napajalnikom (frekvence 27,12 MHz, tlak 50 Pa, delovna moč 700 W). Kontrolna semena niso bila izpostavljena HP (pozitivna kontrola), vakuumski kontrola je bila izpostavljena le vakuumu, kot negativno kontrolo pa smo imeli klasično površinsko sterilizirana semena (20 min v 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Semena smo razporedili na gojišča PDA (*ang. potato dextrose agar*) in jih inkubirali en teden v rastni komori (22 °C, 60 % RH, tema). Zrasle glivne kolonije smo razvrstili glede na njihove morfološke lastnosti v skupine (glivne morfotipe) in po dva predstavnika precepili na sveže plošče, da smo pridobili čiste

kulture. Po enotedenski inkubaciji smo jih postrgali s plošč, zamrznili s tekočim dušikom in strli, nato pa iz njih s komercialnim kompletom izolirali DNA ter v PCR namnožili s specifičnimi začetnimi oligonukletodi zaporedje regije ITS [7]. Uspešnost pomnožitve zaporedja regije ITS smo preverili z gelsko elektroforezo. Uspešno pomnožene vzorce smo poslali na sekvenciranje. Pridobljena zaporedja smo bioinformacijsko obdelali in z orodjem BLAST (NCBI) identificirali glivne morfotipe do ravni rodu ali vrste. Pri vzorcih, za katere nismo pridobili nukleotidnega zaporedja, smo glive določili le glede na morfološke značilnosti. Na koncu smo izvedli še statistično analizo podatkov s programom Statistica StatSoft (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post hoc test), za grafični prikaz podatkov pa uporabili program MS Excel.

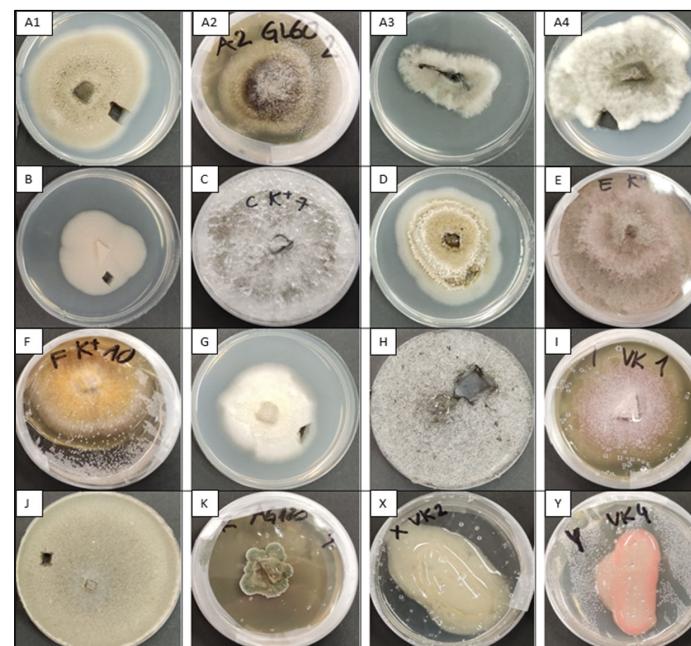
## REZULTATI Z RAZPRAVO

Skupno smo osamili 436 glivnih izolatov, ki smo jih razvrstili v 16 različnih glivnih morfotipov (slika 1). Povprečno število glivnih morfotipov na semu je pri kontrolni skupini znašalo okoli 1,7 (slika 2). Vakuumski kontrola se ni razlikovala od neobdelanih semen, torej sam vakuum nima vpliva. Daljše posredne izpostavitve HP (120,

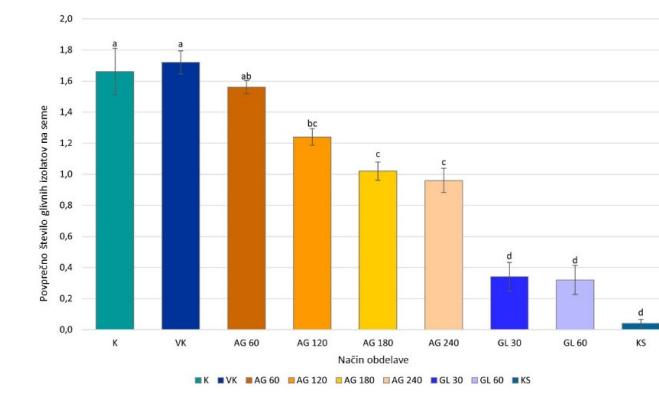
180 in 240 s) so se razlikovale od kontrolnih semen, povprečno število glivnih izolatov na semu se je zmanjšalo za 25–43 % (slika 2). Pri obeh neposrednih izpostavitvah pa se je povprečno število glivnih izolatov zmanjšalo za približno 80 %. Prav tako sta se neposredni izpostavitvi HP izkazali za primerljivo učinkoviti

klasični površinski sterilizaciji semen, saj med njimi ni bilo statistično značilnih razlik. Ugotovili smo, da je neposredna izpostavitev semen tatarske ajde HP učinkovitejša pri dekontaminaciji semen

kot posredna, kar je verjetno posledica izpostavljenosti UV-sevanju, ki velja za enega glavnih mehanizmov dekontaminacije s HP [5].



◀ Slika 1: Različni glivni morfotipi, izolirani iz semen tatarske ajde.

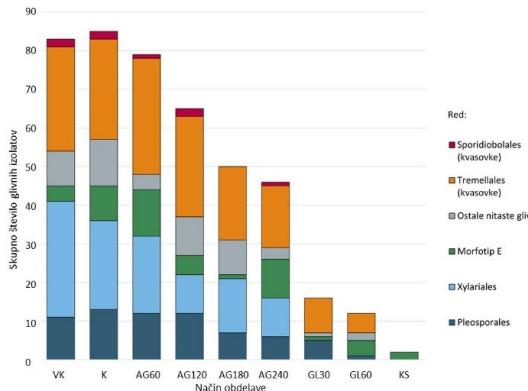


◀ Slika 2: Povprečno število glivnih izolatov na semu tatarske ajde pri različnih izpostavitvah HP. K – kontrola; VK – vakuumski kontrola; GL – neposredna izpostavitev; AG – posredna izpostavitev; KS – površinsko sterilizirana kontrola. Različne črke predstavljajo statistično pomembne razlike med obdelavami ( $p < 0,05$ ; enosmerna ANOVA; Tukeyjev test post hoc).

HP je vplivala tako na številnost glivnih izolatov kakor tudi na njihovo raznovrstnost, in sicer se je ta pri vseh

izpostavitvah zmanjšala, najbolj pri neposredni izpostavitvi (slika 3).

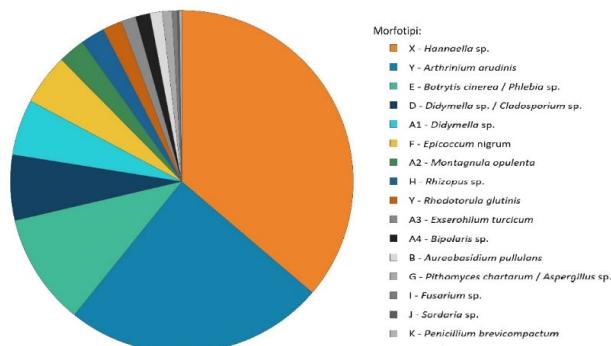
➤ **Slika 3:** Zastopanost glivnih redov glede na različne načine izpostavitev HP. K – kontrola; VK – vakuumnska kontrola; GL – neposredna izpostavitev; AG – posredna izpostavitev; KS – površinsko sterilizirana kontrola.



Trije najpogosteje izolirani morfotipi so skupaj predstavljali 72 % vseh gliv (slika 4). Glive rodu *Hannaella* so epifiti, ki jih

najdemo na površini rastlinskih tkiv [8], in so obsegale kar 36 % vseh glivnih izolatov.

➤ **Slika 4:** Deleži posameznih glivnih morfotipov med osamljenimi izolati s semen. Skupno število analiziranih glivnih izolatov: 436.



Z daljšanjem izpostavitve HP se je okužba s to glivo zmanjševala, najbolj pri najdaljši neposredni izpostavitvi (za 80 % glede na kontrolo), kljub temu pa nam je ni uspelo popolnoma zatreti. Vrsta *Arthrinium arundinis* je rastlinski patogen, povzroča pegavost zrn tatarske ajde [2] in je predstavljala 25 % vseh glivnih izolatov. Z daljšanjem izpostavitve HP njen delež pada, pri neposredni obdelavi se gliva ne pojavi. Vzorca morfotipa E (11 % vseh gliv) smo identificirali kot dve različni vrsti, in sicer

*Phlebia* sp., ki povzroča belo plesen, in *Botrytis cinerea*, ki povzroča sivo plesen na poljsčinah, kot sta koruza in ajda [9]. Izpostavitev HP ni bistveno vplivala na pojavnost tega morfotipa. Prav tako izpostavitev HP ni imela učinka na vrste *Didymella* sp. oz. *Cladosporium* sp. (morfotipa A1 in D) in *Epicoccum nigrum* (morfotip F). Slednja je tipičen endofit in oportunistični patogen [10], zaradi česar je verjetno bolj odporna proti obdelavi s HP, saj se nahaja znotraj rastlinskih tkiv, kamor komponente HP ne prodrejo.

## ZAKLJUČEK

- Ugotovili smo, da je izpostavitev semen HP (predvsem pri neposrednem načinu) učinkovita metoda dekontaminacije semen tatarske ajde, saj je zmanjšala številnost in raznovrstnost osamljenih glivnih izolatov.
- Tehnologija HP je obetavna alternativa klasičnim metodam sterilizacije, naše ugotovitve pa predstavljajo prve tovrstne rezultate na semenih ajde.

## Virji:

1. Plasma in Food and Agriculture. In: Misra N N, Schlueter O, Cullen P J. Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications. Academic Press; 2016, p. 1–17.
2. Germ M, Vombergar M, Vogrinčič M, Golob A, Kreft I. Tatarska ajda v Sloveniji. Proteus. 2019 Jun; 82(1): 15–19.
3. Mravje J, Regvar M, Vogel-Milkuš K. Development of Cold Plasma Technologies for Surface Decontamination of Seed Fungal Pathogens: Present Status and Perspectives. Journal of Fungi. 2021 Aug; 7(8): 650.
4. Introduction to plasmas. In: Goldston RJ. Introduction to Plasma Physics. CRC Press; 2020, p. 1–19
5. Liao X, Liu D, Xiang Q, Ahn J, Chen S et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. Food control. 2017 May; 75 (1): 83–91.
6. Starič P, Grobelnik Mlakar S, Junkar I. Response of two different wheat varieties to glow and afterglow oxygen plasma. Plants. 2021 Aug; 10(8): 1728.
7. Likar M, Regvar M. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. Plant Soil. 2013 Sept (370): 593–604.
8. Miceli M H, Diaz J A, Lee S A. Emerging opportunistic yeast infections. The Lancet infectious diseases. 2011 Jan; 11(2): 142–151.
9. Wang C, Yuan S, Zhang W, Tzibun N, Ye X. Buckwheat antifungal protein with biocontrol potential to inhibit fungal (*Botrytis cinerea*) infection of cherry tomato. Journal of agricultural and food chemistry. 2019 May; 67 (24): 6748–6756.
10. Mohamed A M. One-step functionalization of silver nanoparticles using the orsellinic acid compound isolated from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*: characterization and antifungal activity. International Journal of Nanomaterials and Chemistry. 2015 Jun; 1(3): 103–110.

## Dijaki v svetu mikrobiologije

### Droži: od bakterij in divjih kvasovk do kruha

Anton Žabkar<sup>1</sup>, Brigita Brajkovič<sup>1</sup>, Neža Čadež<sup>2</sup>, Metka Novak<sup>3</sup>, Sonja Smole Možina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod sv. Stanislava – Škofijska klasična gimnazija, 1210 Ljubljana-Šentvid

<sup>2</sup>Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, 1000 Ljubljana

anton.zabkar@gmail.com

**Ključne besede:** droži, kruh, divje kvasovke, mlečnokislinske bakterije.

Droži so naravno fermentirana zmes moke in vode. Ob stalem dodajanju moke in vode se v njej razmnožijo divje kvasovke in mlečnokislinske bakterije. Raziskovali smo vpliv različnih mešanic moke na aktivnost droži. Med gojenjem droži smo merili vrednost pH in volumen zmesi. V vzorcih smo s fluorescentnim mikroskopom opazovali bakterije in kvasovke in določali njihovo koncentracijo s števno metodo na agarskih ploščah. Po številu mikroorganizmov in aktivnosti so izstopale ajdove in ržene droži, ki so se razvile hitreje od drugih in so bolj vzhajale. Kruh s temi drožmi je bil bolj homogenega videza in boljšega okusa.

#### UVOD

Kruh velja za eno najstarejših pripravljenih jedi. Že Sumerci in stari Egipčani so pripravljali kvašen kruh, ker je rahlejši in ga laže jemo [1]. Obstaja več vrst kvašenega kruha, razlikujejo se predvsem po vrsti kvasa, ki ga dodamo testu. Kvas je organska snov iz enoceličnih gliv kvasovk, ki proizvajajo

encime in povzročajo fermentacijo. Eden od možnih načinov pridobivanja naravnega kvasa je gojenje droži.

Droži so fermentirana mešanica moke in vode pri sobni temperaturi, ki se še danes uporablja kot vzhajalno sredstvo pri pripravi testa v pekarstvu, predvsem za peko kruha. Moka

naravno vsebuje različne kvasovke in bakterije. Ko moki primešamo vodo, naravni encim amilaza razgradi škrob na glukozo in maltozo, ki ju lahko presnavljajo prisotne kvasovke [2]. Rečemo jim tudi divje kvasovke, da jih razlikujemo od v živilstvu običajnih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Vse pri fermentaciji proizvajajo ogljikov dioksid, zaradi katerega testo vzhaja. Mlečnokislinske bakterije drožem dajo značilen kiselkast okus, ki ga čutimo tudi v kruhu z drožmi [3]. Kislo okolje v drožeh vpliva na razvoj encimov, ki razgrajujejo proteine in rahljajo glutenske vezje. Kvasovke in bakterije se v drožeh nahajajo približno v razmerju 1 : 100. Število mlečnokislinskih bakterij je okoli  $10^8$ – $10^9$  CFU/g, kvasovk pa okoli  $10^6$ – $10^7$  CFU/g. Droži pravilno delujejo v območju pH med 3 in 6. Z rednim hranjenjem poskrbimo, da pH ni prenizek, kar bi namreč onemogočilo delovanje amilaze in drugih encimov ter uničenje bakterijskih sevov [4]. Kruh z drožmi ima veliko dobrih lastnosti: je boljše kakovosti (senzorične, tehnične in prehranske), vsebuje različne produkte bakterijske fermentacije, ki so koristni debelemu črevesju, omogoča lažjo absorpcijo mineralov [5], povzroča manjša nihanja stopnje krvnega sladkorja kot običajen kruh. Poleg tega je kruh z drožmi obstojnejši, predvsem zaradi zaviranja rasti plesni, kar pa posredno zmanjšuje količino zvrženega kruha in hrane sploh.

#### METODE

Vzorce droži smo pripravili iz različnih mešanic moke. Pripravo droži in peko kruha smo izvedli po receptu K. Dennis [6]. Pripravili smo sedem različnih vzorcev in pri vseh uporabili 70 % sonaravno pridelane pšenične polnozrnate moke Natur pur, le vzorec št. 7 je imel 100 % belo moko. Za preostalih 30 % smo uporabili naslednje znamke moke (vzorce smo oštrevili; oznake v nadaljevanju uporabljamo za poimenovanje vzorcev):

1. Bio pšenična polnozrnata, Natur pur
2. Črna moka, Mlinotest, tip 1100
3. Bio ajdova moka, Natur pur
4. Bio ržena polnozrnata, Natur pur
5. Koruzna moka, Mlinotest
6. Bela posebna moka, Žito, tip 400
7. Bela posebna moka, Žito, tip 400 (brez dodatka polnozrnate)

Pred hranjenjem smo merili prostornino droži, enkrat dnevno tudi vrednost pH. Vzorce droži smo hranili pri sobni temperaturi in konstantni

▼ Slika 1: Kozarci z različnimi vzorci droži.

zračni vlagi 30 % (slika 1).



Da bi kvalitativno ocenili prisotnost bakterij in kvasovk, smo vzorce droži opazovali pod fluorescentnim mikroskopom Nicon Eclipse Ti s kamero Nikon LWd 0.52, in sicer 8 dni stare vzorce, ki smo jih hranili v zamrzovalniku, in en aktiven vzorec, pri katerem je od zadnjega hranjenja minilo 12 ur, enako kot pri zamrznjenih. Vzorce smo odtalili ter od vsakega odvzeli 500 mg droži, jih vstavili v 1,5-millilitrske mikrocentrifugirke in dodali 300 mikrolitrov vode. Vzorce smo nato premesali na vrtinčniku. Po 4 urah posedanja trdnih delcev pri sobni temperaturi smo dobili dovolj jasne vzorce, primerne za mikroskopiranje.

Nanesli smo jih na objektno stekelce ter pred opazovanjem dodali 40 mikrolitrov barvila akridin oranžno, razredčenega v MQ-vodi v razmerju 1 : 100. Akridin oranžno je za nukleinsko kislino selektivno fluorescentno barvilo, ki prehaja skozi celično membrano, kar omogoča interakcijo z DNA. Ko se akridin oranžno veže na DNA, ima fluorescentno barvilo največje vzbujevalno območje od 525 nm (zeleno) do 460 nm (modro). Svetloto pa oddaja pri 650 nm (rdeča). Opazovali smo pod dvajsetkratno povečavo.

Koncentracijo živih kvasovk in mlečnikislinskih bakterij smo določili pri sedmih različnih vzorcih droži:

- Bio ržena polnozrnata moka – 2. dan
- Bio ajdova moka – 2. dan
- Koruzna moka – 2. dan
- Črna moka – 2. dan
- Bio ržena moka – 12. dan
- Bio ržena polnozrnata moka – 12. dan
- Bio ržena polnozrnata moka – 21. dan

Vzorce droži smo stehtali in 1 g droži prenesli v 9 ml sterilne fiziološke raztopine. Nato smo jih serijsko redčili z redčitveno vrsto do  $10^{-4}$ . S pravljjenimi redčitvami smo aseptično

## REZULTATI Z RAZPRAVO

### Prostornina in vrednost pH

Iz podatkov o prostornini droži vidimo, da se je tretji dan drožem prostornina močno povečala. Prostornina se nato naslednjih 5 dni pri večini vzorcev ne poveča bistveno. Izjemi sta vzorec iz ajdove in ržene moke, pri katerih opazimo intenzivnejše vzhajanje že peti in sedmi dan, kar je tri dni prej kot pri preostalih vzorcih. Vse droži, razen droži iz izključno bele moke, nazadnje dosegajo trikratno prostornino, kar pomeni, da bo kruh odlično vzhajal.

nacepili agarske plošče z gojiščem MRS (za mlečnikislinske bakterije, a zrastejo tudi kvasovke, katerih kolonije se morfološko razlikujejo od bakterijskih) v dveh ponovitvah tako, da smo na gojišča odpipetirali po 100 µl redčitve ter razmazali s plastično spatulo po Drigalskem. Nacepljena gojišča smo prenesli v anaerobni lonec ter jim dodali generator anaerobnih razmer in inkubirali 5 dni pri sobni temperaturi.

Po inkubaciji je sledilo štetje kolonij kvasovk in mlečnikislinskih bakterij, ki so zrasle na ploščah MRS. Prešteli smo vse števne plošče posameznih redčitev ter nato izračunali koncentracijo celic (CFU/g, tj. kolonijskih enot na gram vzorca, ki jih interpretiramo kot št. živih celic na g ali ml vzorca) po enačbi:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d} \left[ \frac{CFU}{ml} \right]$$

kjer je:

$N$  ... povprečna koncentracija

$\sum C$  ... vsota kolonij na vseh ploščah

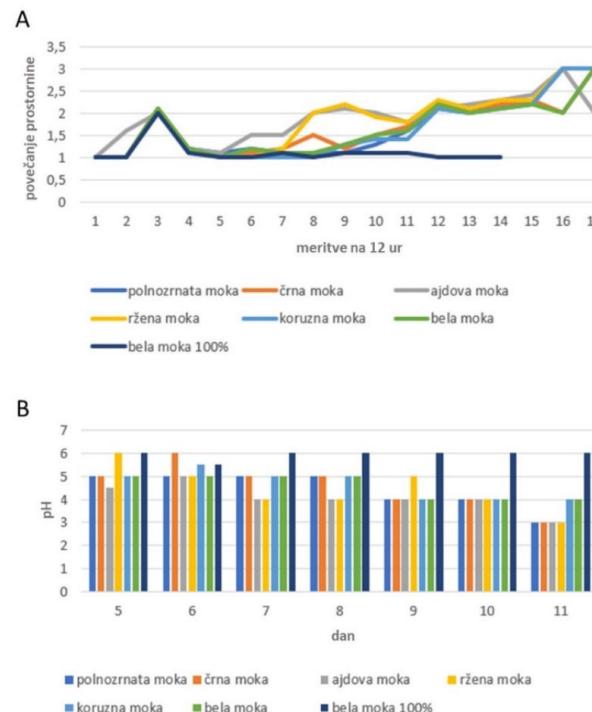
$n_1$  ... število plošč prve redčitve

$n_2$  ... število plošč druge redčitve

$d$  ... razredčitveni faktor prve redčitve

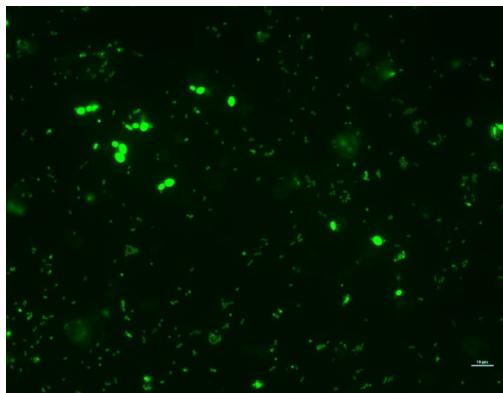
Droži iz zgolj bele moke (vzorec 7) so ves čas povsem neaktivne, torej se kvasovke niso namnožile. To potrjuje tudi mikroskopska slika tega vzorca in rezultat analize živih celic s števno metodo na ploščah.

Na grafu vrednosti pH v odvisnosti od časa opazimo, da pH najhitreje pada ajdovim in rženim drožem, kar kaže na to, da so se bakterije v tem okolju najhitreje razmnožile. Nazadnje vse droži dosežejo pričakovani pH med 3 in 4, razen bele droži, ki imajo pH ves čas 6 (slika 2).



◀ Slika 2: A. Povečanje prostornine vzorcev droži, gojenih na različnih mokah, na vsakih 12 ur inkubacije (v kratniku povečanja prostornine od začetka inkubacije posameznega vzorca). B. pH različnih vzorcev droži v odvisnosti od časa.

➤ **Slika 3:** Mikroskopska slika vzorca droži iz ajdove moke.



#### Koncentracija mikroorganizmov v drožeh

Kot lahko vidimo v preglednici 1, se po

prvih dveh dneh priprave droži v mešanici do meje zaznave razvijejo le mlečnikislinske bakterije.

➤ **Preglednica 1:** Koncentracije mikroorganizmov v različnih vzorcih droži.

Moka	Koncen-tracija (CFU/ml)	Razmerje MKB in kvasovk	Starost (dni)	Zmrznjene/ sveže droži
Bio ajdova, Natur pur	$1,69 \times 10^5$	95 % MKB 5 % kvasovk	2	sveže
Bio ajdova, Natur pur	$1,70 \times 10^6$	85 % MKB 15 % kvasovk	12	zmrznjene
Koruzna, Mlinotest	$9,60 \times 10^4$	100 % MKB	2	sveže
Črna, Mlinotest, tip 1100	$6,20 \times 10^3$	100 % MKB	2	sveže
Bio ržena polno-zrnata, Natur pur	$3,70 \times 10^3$	100 % MKB	2	sveže
Bio ržena polno-zrnata, Natur pur	$4,12 \times 10^6$	93 % MKB 7 % kvasovk	12	zmrznjene
Bio ržena polno-zrnata, Natur pur	$>1,0 \times 10^8$	80 % MKB 20 % kvasovk	21	sveže

Izjema je vzorec ajdovih droži, pri katerem so se na gojišču razmnožile tudi kvasovke in 10–100-krat več mikroorganizmov kot pri drugih primerljivih vzorcih. Poleg tega lahko primerjamo isti vzorec iz droži iz ržene moke različnih starosti razvoja. Opazimo močno povečan delež kvasovk in tudi število mikroorganizmov na splošno. Zmrznjena vzorca nista manj aktivna in v

starosti 12 dni kažeta pričakovane koncentracije kvasovk in mlečnikislinskih bakterij, kar pomeni, da bakterije in kvasovke v drožeh preživijo zamrzovanje. Prav tako imata zelo podobni koncentraciji kvasovk in mlečnikislinskih bakterij, kar kaže na to, da sta ržena in ajdova moka približno enako dobrí za gojenje droži (preglednica 1).

#### Peka kruha

Vsa testa so bila pripravljena iz iste moke, v vsako pa smo dodali druge droži. Vsa testa so vzhajala. V prerezu sta bila najbolj homogena hlebca z drožmi z ajdovo in rženo moko (vzorca 3 in 4). Nekoliko manj homogena sta bila hlebca z drožmi s polnozrnato in črno moko (vzorca 1 in 2). Kruh s koruznimi drožmi je bil v sredini zbit in trd. Najslabši je bil kruh z belimi drožmi (vzorec 6, 30 % bele moke); v prerezu je bil nehomogen in v primerjavi z drugimi izrazito manj rahel. Presenetljiv je tudi vpliv vrste droži na okus kruha. Vsak

hlebec je imel drugačen okus. Razlike smo opazili vsi, ki smo ga okušali. Čeprav je v testu zelo majhna količina (okrog 4 g) različnih vrst moke, ima kruh zelo značilen okus po moki. Sklepamo, da k okusu s svojo metabolno aktivnostjo prispevajo mikroorganizmi, predvidoma mlečnikislinske bakterije. Kruh z drožmi s koruzno moko je imel močan okus koruznega kruha. Enako velja za kruh, pripravljen z drožmi z ajdovo moko. Ta dva vzorca sta bila najizrazitejša, saj imata tudi obe vrsti kruha, iz ajdove in koruzne moke, najznačilnejši okus.

#### ZAKLJUČEK

- Iz rezultatov lahko sklepamo, da sta ajdova in ržena moka najprimernejši vrsti moke za pripravo droži. Droži iz mešanic z dodatkom teh dveh mok so najhitreje vzhajale (meritve prostornine), najhitreje so dosegle vrednost pH 3 in tudi najbolje vzhajale testo – najbolj enakomerno. Pri teh drožeh smo opazili večje število kvasovk in bakterij tudi pod mikroskopom in večje število kolonij na gojiščih.
- Povsem neuspešne so bile bele droži iz stodostotne bele moke, saj se kvasovke niso razmnožile. Droži posledično niso vzhajale in rahlega kruha se iz njih ne bi dalo speči. Preostale droži so si po aktivnosti podobne in jih lahko umestimo med uspešne, saj uspešno vzhajajo kruh. Največje odkritje je vpliv ajdovih droži na intenzivnost vzhajanja testa.
- Če se želimo poigrati z okusi kruha z uporabo navadne moke, lahko le dodamo droži z dodatkom želene moke in bo to zadostovalo za spremembo okusa kruha.

#### Virji:

- Fräberger V, Unger C, Kummerl C, Domig K J. Insights into microbial diversity of traditional Austrian sourdough. LWT – Food Science and Technology, 2020, vol. 127, 109358.
- Dough G. The sourdough for beginners, Independently published 2021, str. 5
- Forkish K. Flour water salt yeast. Ten Speed Press, New York, 2012, str. 82–100.
- Robertson C. Tartine bread. Chronicle Books LLC, San Francisco, 2010, str. 45–50.
- Arora K, Ameur H, Polo A, Di Cagno R, Rizzello G C et al. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. Trends in Food Science & Technology, 2021, p. 70–74, 78–80.
- Dennis K. Notes and Timestamps – sourdough starter from scratch [online]. URL: <https://fullproofbaking.gumroad.com/l/hdAXB>, zadnji dostop: 22. 3. 2022

## Dijaki v svetu mikrobiologije

### Verodostojnost testov za SARS-CoV-2

Lara Pregelj

Gimnazija Brežice, 8250 Brežice

[lara.pregelj06@gmail.com](mailto:lara.pregelj06@gmail.com)

**Ključne besede:** kisline, pufri, antigensko testiranje.

V času epidemije COVID-19 so se po spletu začeli širiti različni nasveti, kako lahko pridobimo pozitiven rezultat v hitrem antigenskem testu za SARS-CoV-2, med drugim tudi ta, da uporabimo pomarančni sok ali pa kokakolo. V svoji raziskovalni nalogi sem preverila, ali ti testi reagirajo s kislinami in bazami. Moji poskusi so tako izkazali pomembnost spoštovanja navodil proizvajalca in vlogo pufra pri testnem postopku.

#### UVOD

Decembra 2020 je avstrijski poslanec Michael Schnedlitz sredi parlamentarne seje na mizo položil test za samotestiranje na SARS-CoV-2 in na testno ploščico nakopal kokakolo. Test je čez nekaj trenutkov pokazal pozitivni rezultat. Schnedlitz je teste takoj razglasil za nezanesljive. Njegov »poskus« so ponovili številni posamezniki in posnetke delili na družbenih omrežjih. Pa so testi za samotestiranje na SARS-CoV-2 res tako nezanesljivi? Testi za samotestiranje so namreč sestavljeni iz treh vrst protiteles, ki se vežejo na virusne antogene; mnoge snovi, ki ob

predvideni uporabi testov niso prisotne, pa lahko motijo njihovo delovanje, kar vodi v lažne rezultate.

Po pregledu literature o biologiji in zgodovini virusov, ter tehnološkem ozadju delovanja testov za samotestiranje [1-6], sem oblikovala dve hipotezi:

1. Test bo ob nanosu kisline (citronska kislina, fosforjeva V kislina, ocetna kislina) neposredno na testno ploščico pokazal pozitiven rezultat.
2. Test bo ob nanosu baze (natrijev hidrogen karbonat) neposredno na testno ploščico pokazal pozitiven rezultat.

#### METODE

Pregledala sem ponudbo testov za samotestiranje na spletnih straneh lekarn in izbrala teste proizvajalca Hotgen (Kitajska) ter se lotila eksperimentalnega dela. Vsem tekočinam, ki sem jih uporabila v eksperimentu, sem izmerila pH. Na testno ploščico sem v prvem delu poskusa na testno ploščico nanesla 3 kapljice kisline, baze ali mešanice kisline in priloženega pufra. Kot kislino sem uporabila pomarančni sok, ki vsebuje citronsko kislino, za bazo pa raztopino sode bikarbune. Rezultate testov sem pregledovala po času, navedenem v navodilih proizvajalca. Naredila sem 4 ponovitve poskusa na nabavljenih testih proizvajalca Hotgen.

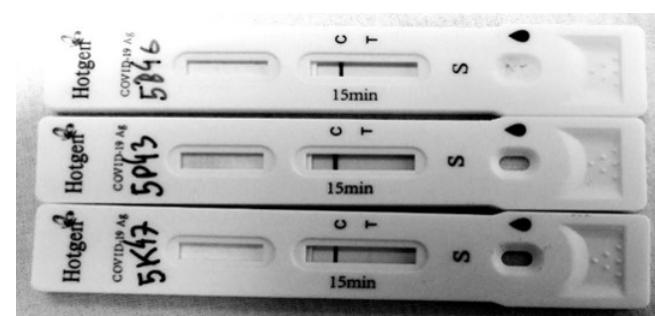
#### REZULTATI Z RAZPRAVO

Pomarančni sok je pri vseh ponovitvah dal pozitivni rezultat, medtem ko sta bili mešanica kisline in priloženega pufra ter raztopina sode bikarbune pri vseh ponovitvah negativni. Kokakola in ocetna kislina sta dali negativni rezultat, kečap pa zaradi večje viskoznosti ni stekel po celuloznem lističu v antigenskem testu in tako ranj nisem dobila rezultata.

Potrdila sem, da se ob upoštevanju

V drugem delu poskusa sem preverjala, ali tudi druga kisla živila vplivajo na rezultate testov proizvajalca Hotgen. Uporabila sem limonin in pomarančni sok (citronska kislina), kokakolo (fosforjeva kislina), raztopino citronske kisline, ocetna kislina, radler (citronska kislina) in kečap (ocetna kislina). Našteto sem s pipeto nanesla na testno ploščico v dveh ponovitvah. Po 15 minutah sem odčitala rezultate in teste fotografirala na naravni svetlobi in s črno-belim filtrom zaradi boljše kontrastnosti. Kot pozitivne rezultate sem upoštevala vse, pri katerih sta se prikazali kontrolna in testna črtica, ne glede na to, kako dobro je bila črtica T vidna.

proizvajalčevih navodil (uporabi priloženega pufra) možnost za lažen pozitivni rezultat znatno zmanjša in ugotovila, da na rezultate testov od preizkušenih snovi vpliva samo citronska kislina, ko je nakapana neposredno na test (slika 1). Prvo hipotezo sem delno potrdila (test je bil pozitiven v primeru uporabe pomarančnega soka in citronske kisline), med tem ko sem drugo hipotezo ovrgla.



◀ **Slika 1:** Rezultati testov, na katere je bila nakapljana raztopina natrijevega hidrogen karbonata (5P46), mešanica kisline in pufra (5P43) ter citronska kislina (5K47).

**ZAKLJUČEK**

- Ugotovila sem, da pomarančni sok (citronska kislina) da pozitiven rezultat hitrega antigenskega testa proizvajalca Hotgen.
- Druge uporabljane tekočine oz. kisla živila niso dala pozitivnega rezultata testa.
- Za pravilne rezultate hitrih antigenskih testov je pomembno spoštovati navodila proizvajalca za uporabo testa.

**Viri:**

1. Kaye AD, Cornett EM, Brondeel KC, Lerner ZI, Knight HE, Erwin A, Charipova K, Gress KL, Urts I, Urman RD, Fox CJ, Kevil CG. Biology of COVID-19 and related viruses: Epidemiology, signs, symptoms, diagnosis, and treatment. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2021 Oct;35(3):269-292.
2. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, Chan RC, Tsang DN. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. J Clin Virol. 2020 Aug;129:104500.
3. Lorch M. (6. 7 2021). *How children are spoofing Covid-19 tests with soft drinks*. Pridobljeno 30.
4. Prinzi A. (31. 8 2020). *How the SARS-CoV-2 EUA Antigen Tests Work*. Pridobljeno 30.3.2022 iz American Society for Microbiology. <https://asm.org/Articles/2020/August/How-the-SARS-CoV-2-EUA-Antigen-Tests-Work>
5. Poljak M, Petrovec M. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2011.
6. Zimmer C. *Planet virusov: Tretja izdaja*. (A. Poznič, Prev.) Brežice: Primus d.o.o., 2021.
3. 2022 iz BBC FUTURE: <https://www.bbc.com/future/article/20210705-how-children-are-spoofing-covid-19-tests-with-soft-drinks>

## *S holesterolom povezani označevalci bolezni COVID-19 ter kameliidna nanoprotitelesa*

Program: Funkcijska genomika in biotehnologija za zdravje

Vodja: Damjana Rozman

Člani: **Eva Kočar\***, **Alja Zottel\***, Neja Šamec, Cene Skubic, Tadeja Režen, Ivana Jovčevska, Petra Bogovič, Gabriele Turel, Tina Fink, Nataša Resnik, Franc Strle, Nataša Skoko, Alessandro Marcello, Gregor Bajc, Roman Jerala, Peter Veranič, Matej Butala, Radovan Komel

**Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta; Univerzitetni klinični center Ljubljana; Kemijski inštitut; Mednarodni center za genetsko inženirstvo in biotehnologijo, Trst; Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta**

**Ključne besede:** holesterol, označevalci, nanotelesa.

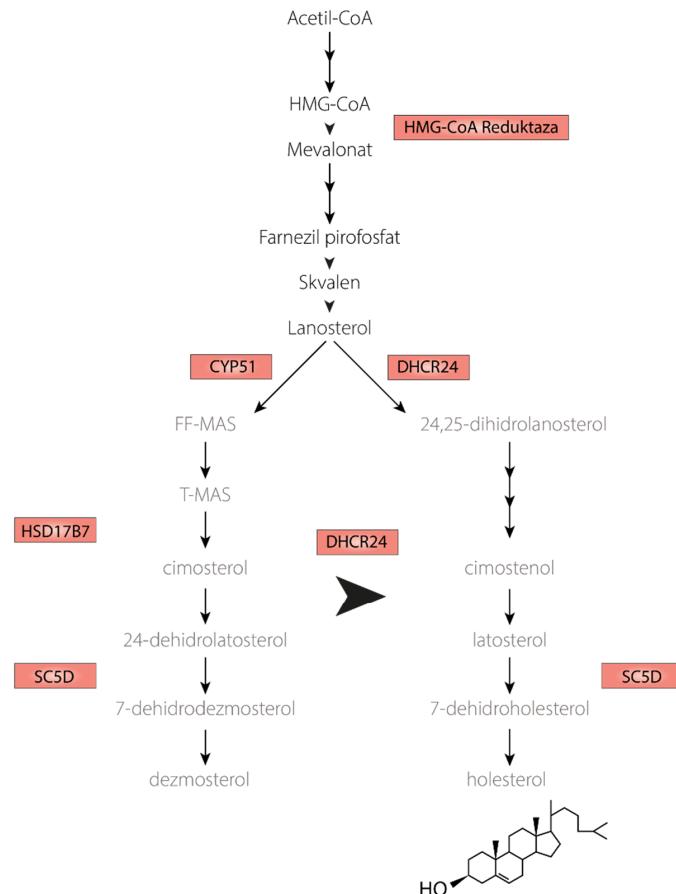
\* prispevek predstavili na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

Holesterol, ključna komponenta celičnih membran sesalcev, vpliva na učinkovitost vstopa SARS-CoV-2 v celice gostitelja. Višja raven holesterola v membranah sovpada z višjo učinkovitostjo vstopa koronavirusov v celice, medtem ko motena lipidna sestava s holesterolom bogatih lipidnih raftov vstop inhibira. Dosedanje raziskave kažejo, da se pri bolnikih s COVID-19 razvije hipo-lipidemija, ki se tekoma bolezni stope-njuje, vendar vlogo celične sinteze holesterola še ni bila temeljito raziskana. V raziskavi smo se osredotočili na holesterol in njegove intermediate v serumu bolnikov hospitaliziranih zaradi COVID-19. Da bi primerjali resnost bolezni pri posameznem bolniku so vzorci odvzeti v večih časovnih točkah. Vlogo holesterola in drugih sterolov pri interakciji spike proteina SARS-CoV-2 preučujemo v nesmrtnih celičnih linijah z moteno sintezo holesterola. Cilj raziskave je oceniti posamezne sterole kot potencialne označevalce napovedi napovedanja in izida bolezni ter njihov vpliv na vstop SARS-CoV-2 v celice. Rezultati kažejo, da se sterolni profili tekomo hospitalizacije spreminjajo ter da se razpon razmerij med njimi razlikuje, vendar končnih zaključkov ne moremo podati, saj je raziskava še vedno v teku. Informacije, v kolikšni meri je neravnovesje krvnega in membranskega holesterola povezano s patologijo COVID-19, bodo dale pomemben vpogled in smernice glede zdravljenja bolnikov z zdravili za zniževanje lipidov. Pri zdravljenju bolezni COVID-19 imajo velik potencial nanotelesa. To so antigen-prepoznavni deli težkoverižnih protiteles, ki jih proizvajajo le nekatere živali, npr. kamele in morski psi. V primerjavi s klasičnimi protitelesi imajo nanotelesa več prednosti, npr. večja stabilnost ter enostavna in ekonomična proizvodanja.

Zaradi edinstvene oblike paratopov lahko nanotelesa v nasprotju s klasičnimi protitelesi dosežejo skrite in konkavne epitope. Razvoj protivirusnih majhnih molekul je namreč zelo dolgotrajen proces, za monoklonska protitelesa pri protivirusnem zdravljenju pa je izkazalo, da imajo nizko učinkovitost, njihova proizvodnja pa je zelo draga. Cilj drugega dela naše raziskave je bil iz naše že obstoječe knjižnice pridobiti nanotel, usmerjeno proti receptorju za

vezavno domeno (RBD) proteina spike virusa SARS-CoV-2. S tremi imunoafinitetnimi obogatitvami smo pridobili dve potencialni nanotelesi proti RBD, ki smo jim vezavno afiniteto določili z metodo ELISA in s površinsko plazmonsko resonanco. Z dosedanji poskusi vezave nismo uspeli pokazati iz česar sklepamo da izbrani nanotelesi nista specifični za prepoznavanje RBD.

➤ Slika 1: shematski prikaz poti sinteze holesterola.



## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Inhibicija kimotripsinske proteaze 3CL<sup>pro</sup> virusa SARS-CoV-2 z rastlinskimi polifenoli

Program: Biokemijska in biofizikalno-kemijska karakterizacija naravnih snovi

Vodja: Nataša Poklar Ulrich

Člani: Miha Bahun\*, Luka Kranjc, Marko Jukić, Domen Oblak, Gregor Bajc, Matej Butala, Krištof Bozovičar, Tomaž Bratkovič, Črtomir Podlipnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Fakulteta za farmacijo; Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

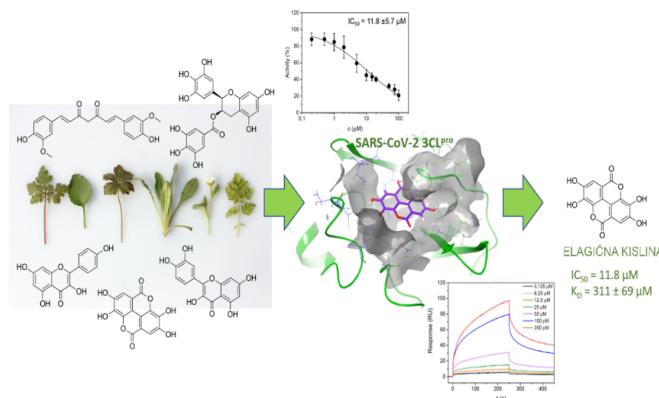
**Ključne besede:** 3CL<sup>pro</sup>, polifenoli, proteazni inhibitor.

\* prispevek predstavljal na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

**P**olifenoli so raznovrstna skupina aromatskih spojin. So pomemben del prehrane, saj so prisotni v užitnih rastlinah in izkazujejo bioaktivno delovanje. Številne raziskave so nakazale koristne učinke polifenolov na zdravje, med drugimi tudi njihovo protivirusno aktivnost. Pandemija COVID-19 je nemudoma sprožila iskanje načinov za zaježitev respiratornega virusa SARS-CoV-2, povzročitelja te bolezni. V našem raziskovalnem programu smo proučili delovanje različnih rastlinskih polifenolov na proteazo 3CL<sup>pro</sup> virusa SARS-CoV-2, ki je ključna za uspešno pomnoževanje virusne RNA v celicah in je torej ena izmed glavnih tarč, upoštevanih pri razvoju virusnih inhibitorjev. Pri raziskavi smo uporabili različne *in silico* ter *in vitro* pristope ugotavljanja vezave polifenolov na proteazo 3CL<sup>pro</sup> in njene inhibicije. Izmed 19 preizkušenih polifenolov so proteazo 3CL<sup>pro</sup> v največji meri inhibirali elagična kislina, kvercetin, kurkumin, epigalokatehin galat ter resveratrol. Koncentracije teh petih najaktivnejših polifenolov za 50%-inhibicijo proteaze 3CL<sup>pro</sup> so bile v mikromolarnem območju. S spremeljanjem cirkularnega dikroizma smo ugotovili, da polifenoli ne porušijo sekundarne zgradbe 3CL<sup>pro</sup>, torej proteazo najverjetneje inhibirajo s stericnim oviranjem njenega aktivnega mesta. To smo potrdili s simulacijami molekulске dinamike, ki so pokazale stabilne interakcije omenjenih polifenolov z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu proteaze 3CL<sup>pro</sup>. Neponovno vezavo polifenolov na proteazo 3CL<sup>pro</sup> smo potrdili tudi s površinsko plazmonsko resonanco. Rezultati raziskave podpirajo možnost uporabe naravnih polifenolov kot izhodiščnih spojin za razvoj inhibitorjev.

proteaze 3CL<sup>PRO</sup> virusa SARS-CoV-2. V sklopu raziskovalnega programa smo v bakterijah *Escherichia coli* ter kvasovkah *Pichia pastoris* za nadaljnje analize skušali proizvesti tudi preostale pomembne proteine virusa SARS-CoV-2, proteazo PL<sup>PRO</sup>, protein E in domeno RBD proteina S.

➤ **Slika 1:** Grafični povzetek raziskave.



Na levem delu slike so prikazane zgradbe nekaj izmed polifenolov, vključenih v raziskavo. V osrednjem delu slike je z vijolično prikazana elagična kislina, vezana v aktivno mesto proteaze 3CL<sup>PRO</sup>. Zgornji diagram prikazuje odvisnost aktivnosti proteaze 3CL<sup>PRO</sup> od koncentracije elagične kislinskega dela, spodaj pa je prikazan senzorogram vezave elagične kislinskega dela na 3CL<sup>PRO</sup> pri različnih koncentracijah.

## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Genski elektroprenos kot platforma za vnos cepiva DNA proti SARS-CoV-2

**Program:** Razvoj in ovrednotenje novih terapij za zdravljenje malignih tumorjev

**Vodja:** Gregor Serša

**Člani:** **Maja Čemažar\***, Maša Bošnjak, Nina Boc, Tim Božič, Erik Brecelj, Nuša Brišar, Andrej Coer, Jasmina Čauševič, Rok Devjak, Ibrahim Edhemović, Blaž Grošelj, Jani Izlakar, Tanja Jesenko, Urška Kamenšek, Tilen Komel, Jerneja Kos, Simona Kranjc Brezar, Urša Lampreht Tratar, Boštjan Markelc, Živa Modic, Tjaša Vaupotič Pečnik, Monika Savarin, Marko Snoj, Barbara Starešinič, Katja Uršič Valentinuzzi, Špela Kos, Urška Matkovič

**Onkološki inštitut Ljubljana; Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju**

**Ključne besede:** genski elektroprenos, plazmidna DNA, vakcinacija, elektroporacija, endotelijске celice.

\* prispevek predstavlja na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitve dostopne na SMD strani

**R**azširitev našega programa temelji na dolgoletnih izkušnjah s področja genske terapije z uporabo plazmidne DNA ter elektro-poracije (genski elektroprenos – GEP) za vnos plazmidov v tumorje in druga tkiva. V sklopu projekta SmartGene.si smo osnovali tehnologijo za pripravo terapevtskih plazmidov, ki jo lahko prilagodimo tudi za primer vakcinacije z DNA-cepivom proti COVID-19.

V prvem sklopu razširitve programa smo razvijali cepljenje, ki temelji na GEP mešanice plazmidne DNA z zapisom za protein bodice (S) in protein nukleokapside (N). *In vitro* smo testirali učinkovitost GEP mešanice plazmidov v mišičnih mioblastih C2C12 in kožnih fibroblastih L929 kot modelnih celičnih linijah za vakcinacijo mišičnega tkiva ali kože. Potrdili smo

GEP mešanice plazmidov, saj smo dokazali izražanje vnesenih genov S in N na ravnji mRNA. Protein N smo zaznali v lizatu, pa tudi v samem gojišču, kar kaže na to, da protein N obstaja tudi v sekretorni obliki. Detekcija proteina S se je izkazala za zahtevenjšo in še poteka. Zaradi uspešnih rezultatov GEP *in vitro* sedaj tečejo poskusi *in vivo*, pri katerih raziskujemo učinkovitost pripravljene vakcine po GEP mešanice plazmidov v kožo ali v mišico.

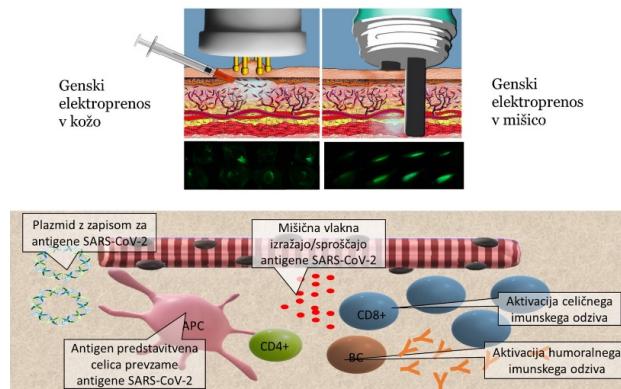
V drugem sklopu razširitve programa smo se osredotočili na raziskovanje učinkov okužbe endotelijskih celic z virusom SARS-CoV-2. Virus SARS-CoV-2 lahko namreč neposredno vpliva tudi na endotelijске celice. Pokazali smo, da tudi *in vitro* gojene humane endotelijске celice Hulec-5a ter Hmec-1 izražajo receptor ACE2, ki je

pomemben za vstop virusa SARS-CoV-2 v celico, medtem ko endotelijске celice EA.hy926 receptorja ACE2 ne izražajo. Za testiranje tropizma virusa SARS-CoV-2 k humanim endotelijskim

celicam smo pripravili psevdo-tipizirane SARS-CoV-2 lenti-virusne delce, ki nosijo zapis za zeleni fluorescenčni protein (GFP), ter pokazali, da ti delci humane endotelijске celice lahko okužijo.

**Slika 1:** Potek vakcinacije proti SARS-CoV-2 na osnovi dostave plazmidne DNA v mišična vlakna. Dostava plazmidne DNA je možna tako v kožo, kot tudi v mišice.

### DNA-vakcinacija na osnovi elektroporacije



### Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

#### Genska elektrotransfekcija z uporabo visokofrekvenčnih kratkih bipolarnih električnih pulzov in vitro in in vivo

Program: Elektroporacija v biologiji, biotehnologiji in medicini

Vodja: Damijan Miklavčič

Člani: **Tjaša Potočnik\***, Eva Pirc, Matej Reberšek, Alenka Maček Lebar, Katja Balantič, Tina Batista Napotnik, Helena Cindrič, Janja Dermol Černe, Tadeja Forjančič, Saša Haberl Meglič, Duša Hodžić, Tomaž Jarm, Bor Kos, Tadej Kotnik, Peter Kramar, Matej Kranjc, Žana Lovšin, Samo Mahnič-Kalamiza, Lea Rems, Lea Vukanovič, Tamara Polajžer, Špela Zver, Angelika Vižintin, Maria Scuderi, Peter Lombergar, Rok Šmrc

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

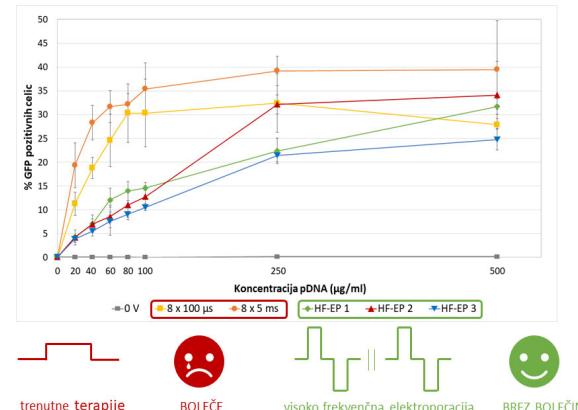
**Ključne besede:** elektroporacija, genska elektrotransfekcija (GET), genski elektroprenos (GEP), visokofrekvenčna elektroporacija, elektroporator.

\* prispevek predstavlja na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

**O**bičajno je razvoj cepiva dolgotrajen proces, a izbruh virusa SARS-CoV-2 nas je prisilil, da čim prej razvijemo cepivo in preizkusimo različne tehnologije cepiv. Razvoj idealnega cepiva naj bi bil hiter, cepivo pa enostavno za uporabo, temperaturno stabilno in cenovno ugodno. Cepiva na osnovi nukleinskih kislin imajo želene lastnosti, zato so bila na voljo med prvimi. Žal pa dosedanje izkušnje kažejo, da ta cepiva vzbudijo razmeroma slabo imunogenost. Elektroporacija olajša vstop tovrstnih cepiv (plazmide DNA in mRNA) v gostiteljsko celico in izboljša njihovo imunogenost. Naprave za elektroporacijo, ki so na voljo, uporabljajo dolge monopolarne električne pulze, ki povzročajo krčenje mišic, nelagodne občutke in bolečino, ter v tkivu sprožijo elektrolizo, kar lahko poškoduje celice in vpliva na obstojnost pDNK. Vse to omejuje splošno rabo tovrstnega cepljenja v preventivne namene. Za ireverzibilno elektroporacijo, ki se uporablja za ablacijo tkiva, so bili nedavno predlagani kratki bipolarni električni pulzi, ki zmanjšujejo naštete težave. Naša raziskovalna skupina je že razvila prototipe naprave, ki generirajo kratke bipolarne električne pulze, namenjene elektroporaciji (HF-BP). Zato smo lahko primerjali učinkovitost GET s HF-BP, monopolarnimi mili- in mikrosekundnimi pulzi pri različnih koncentracijah plazmidne DNA. Potrdili smo, da lahko dosežemo uspešno GET tudi s pulzi HF-BP *in vitro*, ampak z višjimi koncentracijami plazmidne DNA. Tudi preliminarni poskusi *in vivo* so potrdili GET, čeprav nižje učinkovitosti kot pri daljših monopolarnih pulzih. Za predklinični prototip elektroporatorja HF-BP smo pri-

pravili vso potrebno tehnično dokumentacijo ter naredili analizi elektromagnetne kompatibilnosti

in električne varnosti, ki sta potreben za skladnost medicinskih pripomočkov s standardom IEC60601-1.



➤ Slika 1: Genska elektrotransfekcija z uporabo visokofrekvenčnih kratkih bipolarnih električnih pulzov *in vitro* in *in vivo*.

## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Raziskave detekcije okužb, inhibitorjev in cepiva proti SARS-CoV-2

Program: Molekularna biotehnologija

Vodja: Roman Jerala

Člani: Mojca Benčina\*, Monika Avbelj, Sabina Božič Abram, Robert Bremšak, Karen Butina Ogorelec, Miša Mojca Cajnko, Maja Černilec, Manuela Čitar, Vladka Čurin Šerbec, Petra Dekleva, Igor Drobnak, Hana Esih, Tina Fink, Vida Forstnerič, Rok Gaber, Anja Golob Urbanc, Tea Govednik, Helena Gradišar, Iva Hafner Bratkovič, Filip Ivanovski, Karolina Ivičak Kocjan, Vid Jazbec, Lucija Kadunc, Valerija Kovač, Anja Kristl, Duško Lainšček, Fabio Lapenta, Tina Lebar, Katja Leben, Matic Legiša, Ajasa Ljubetič, Jan Lonzačić, Sanjin Lulić, Andreja Majerle, Mateja Manček Keber, Tjaša Marolt, Estera Merljak, Maja Meško, Martina Mohorčič, Sandra Omejec, Sara Orehek, Darija Oven, Gabriela Panter, Anja Perčič, Tina Tinkara Peternelj, Tjaša Plaper, Jelka Pohar, Arne Praznik, Jure Prešeren, Primož Pristovšek, Uroš Rajčević, Erik Rihtar, Tadej Satler, Mojca Seručnik, Anže Smole, Boštjan Smrekar, Jaka Snoj, Bojana Stevović, Žiga Strmšek, Petra Sušjan, Irena Škraba, Tamara Šmidlehner, Anže Verbič, Sara Vidmar, Weijun Zhou

#### Kemijski inštitut

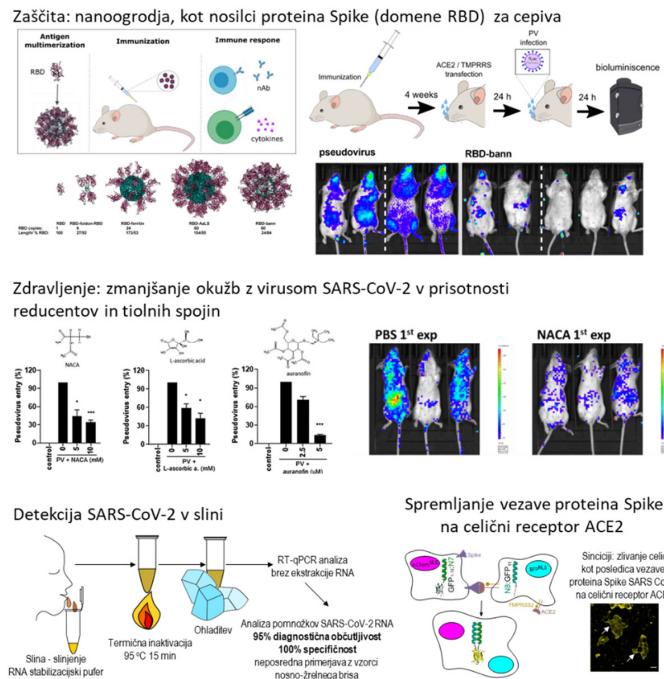
**Ključne besede:** mehanizem fuzije SARS-CoV-2, detekcija okužbe, cepivo.

\* prispevek predstavlja na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

V okviru programa smo testirali registrirana zdravila na osnovi reducentov in tiol-aktivnih spojin kot zaviralcev vezave proteina S (Spike) na receptor ACE2. Dokazali smo, da ima celovitost disulfidnih vezi znotraj receptor vezavne domene (RBD) pomembno vlogo v procesu fuzije membrane, čeprav motnja teh, torej posamezna mutacija, ne preprečuje vezave proteina S na ACE2. Pokazali smo, da N-acetilcistein amid, L-askorbinska kislina, JTT-705 in auranoftin zavirajo vstopanje virusa v celico in nastanek sincicijev ter zmanjšujejo pogostost virusne okužbe pri miškah ([Manček-Keber et al FASEB J. 2021](#)). Na osnovi pomnoževanja RNA z RT-qPCR smo razvili metodo za odkrivanje okužbe s SARS-CoV-2. Slino, zbrano v pufru za stabilizacijo RNA, smo toplotno obdelali in analizirali neposredno, ne da bi RNA iz nje ekstrahirali. Diagnostična občutljivost RT-qPCR na osnovi sline presega 95 % na realnih vzorcih asymptotikih in simptomatskih posameznikov. Test RT-qPCR za odkrivanje virusa v slini je preprost za izvedbo in omogoča visokozmogljivo in hitro testiranje velike populacije ([Raih et al.](#)

[Molecules 2021](#)). Za predstavitev domene RBD proteina S smo primerjali polipeptidna ogrodja različnih velikosti in oligomerizacijskih stanj. Primerjali smo nanoogrodja foldona, feritina, lumazin sintaze in  $\beta$ -anulusa. Titri protiteles in nevtralizacija virusa so bili najmočnejši pri fuziji RBD- $\beta$ -anulusa. Konstrukt je podaljšal zadrževanje domene RBD v bezgavkah in najmočnejšo virusno nevtralizacijo sprožil pri imunizaciji z rekombinantnim proteinom. Rezultati podpirajo uporabo platforme nanoogrodij za načrtovanje cepiva. Razvili smo enostavno in občutljivo metodo za merjenje celične fuzije glede na interakcijo med proteinom S in receptorjem ACE2 ([Plaper et al. Sci Rep 2021](#)).

➤ **Slika 1:** Grafični povzetek raziskave.



## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Molekularna evolucija, integrativna genomika in iskanje zdravil proti COVID-19

Program: Toksini in biomembrane

Vodja: Igor Križaj

Člani: **Uroš Petrovič\***, Matej Butala, Dušan Kordiš, Toni Petan, Gregor Gunčar

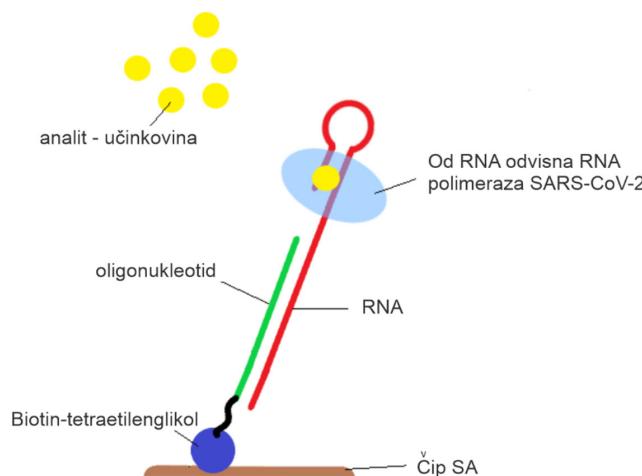
**Institut Jožef Stefan; Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta in Fakulteta za kemijo in kemijsko tehniko**

**Ključne besede:** genomska analiza, molekularna evolucija, integrativna genomika, interaktomika, od RNA odvisna RNA polimeraza (RdRp), suramin.

\* prispevek predstavljal na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitve dostopne na SMD strani

Z uporabo obstoječih zdravil proti drugim boleznim in razvoju novih in učinkovitejših zdravil proti COVID-19 je nujo potrebno podrobno razumevanje molekulskih mehanizmov življenjskega cikla virusa SARS-CoV-2 v človeških celicah. V programski skupini Toksini in biomembrane uporabljamo štiri medsebojno povezane pristope, s katerimi prispevamo k boljšemu razumevanju SARS-CoV-2 oziroma COVID-19. Z raziskavami osvetljujemo epidemiološke, temeljne in klinične vidike bolezni in njenega povzročitelja. V prvem sklopu smo z analizo genomske molekularne evolucije SARS-CoV-2 in drugih koronavirusov sledili sevom virusa, ki so med pandemijo prevladovali v svetu oz. v Sloveniji. Tako smo identificirali gene oz. različice proteinov SARS-CoV-2, ki so najverjetnejši vzrok posebnih značilnosti COVID-19. V drugem sklopu smo z metodo integrativne genomike SARS-CoV-2 pri humanih celicah določili nabor potencialnih tarč proteinov ORF8, ki bi lahko pojasnil njegovo sposobnost aktivacije citokinskega viharja, inhibicije signalne poti IFN tipa 1, pospeševanja nastanka pljučne fiboze oz. zmanjšanja količine izpostavljenih molekul MHC1. Z meritvijo sposobnosti tvorbe binarnih interakcij proteina ORF8 smo potrdili, da zrela oblika proteina ORF8 interagira z zunajceličnimi domenami več humanih proteinov, vključno s TGFB1, ki je bil nedavno opisan kot ključni dejavnik pri hujšem poteku COVID-19. V tretjem sklopu smo uporabili gojene humane celice, s katerimi preko fizioloških učinkov proteinov SARS-CoV-2 preverjamo njihovo vpletjenost v celične procese, ki sodelujejo pri okužbi s SARS-CoV-2. V četrtem sklopu smo s spektroskopijo s površinsko plazmonsko resonanco analizirali interakcije od RNA odvisne RNA polimeraze (RdRp) SARS-CoV-2 s potencialnimi zdravili proti COVID-19. S temi eksperimenti, katerih rezultati so že objavljeni ([Mravinec et al. J Virol Methods 2021](#)), smo pokazali, da suramin prepreči interakcijo RdRp z RNA oz. jo celo aktivno prekine.

➤ Slika 1: Shematski prikaz merjenja učinka potencialnih protivirusnih učinkov na interakcijo med RdRp in RNA z uporabo spektroskopije s površinsko plazmonsko resonanco (Mrvinec et al. J Virol Methods 2021).



## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Nukleinske kisline kot orožje proti SARS-CoV-2

Program: Kemija in struktura bioloških učinkovin

Vodja: Janez Plavec

Člani: Maja Marušič\*, Maria Toplishek\*, Anastasia Nechevska, Jelena Štrbac

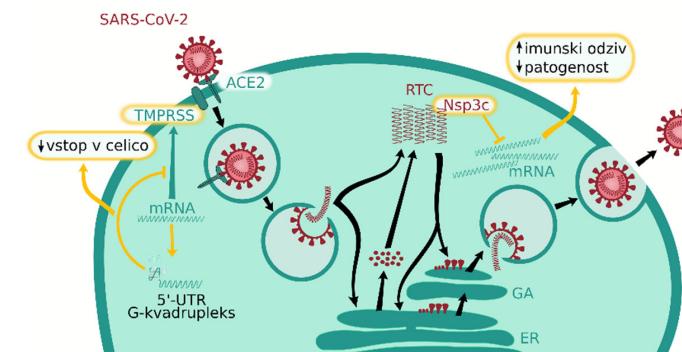
Kemijski inštitut

**Ključne besede:** NMR-spektroskopija, mRNA, struktura, Nsp3c, TMPRSS.

\* prispevek predstavljen na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

Pri razširjanju znanja o delovanju virusa SARS-CoV-2 ter raziskovanju načinov, kako ga oslabiti, se usmerjamo v dva pristopa, pri katerih so udeležene ribonukleinske kisline, s poudarkom na njihovih strukturnih značilnostih in vplivu teh na interakcije. Prvi pristop se osredotoča na receptor TMPRSS2, ki omogoča vstop virusnih delcev v celico in je tako ključen za razvoj in potek okužbe. Naše raziskave slonijo na hipotezi, da obstaja možnost zavirjanja prevoda mRNA-receptora TMPRSS2 v protein z regulacijskimi elementi v 5'-neprevedeni regiji (5'-UTR) mRNA. Ker je pri razvoju pristopov za nadzor

ekspresije TMPRSS2 izredno pomembno natančno poznavanje strukture in dinamike regulacijskih elementov, smo izvedli podrobno analizo z NMR-spektroskopijo. Ugotovili smo, da 5'-UTR mRNA TMPRSS2 vsebuje z gvanini bogato zaporedje, ki tvori več struktur v obliki paralelnih G-kvadruleksov z različno dolžino zank. Na primeru izbranega G-kvadruleksa smo določili strukturne detajle in izvedli titracijo z ligandom PhenDC3. Pokazali smo, da interakcija z ligandom poteka preko nalaganja aromatskih obročev liganda na zunanjji G-kvartet. Nastali kompleks je dobro definiran, kar omogoča nadaljnje strukturne študije.



◀ Slika 1: Vpliv na potek virusne okužbe je mogoč s preprečevanjem interakcije med virusnim proteinom Nsp3c ter celičnimi mRNA oziroma z zavirjanjem izražanja celičnih receptorjev, ki so ključni za vezavo Sars-CoV-2, preko stabilizacije štirivijačnih DNA struktur.

V drugem pristopu proučujemo interakcijo med domeno Mac3 nestrukturnega proteina Nsp3 in 3'-UTR humanih mRNA, ki kodirajo proteine, vključene v regulacijo apoptoze in imunskega odziva celice. Domena Mac3 proteina Nsp3 je prisotna samo v SARS-CoV-2 in drugih zelo podobnih virusih, ki okužijo netopirje, ne pa pri preostalih koronavirusih, zato naj

bi bila povezana z veliko patogenostjo SARS-CoV-2. Naši preliminarni rezultati kažejo, da kratki oligonukleotidni odseki 3'-UTR humanih mRNA vežejo peptide domnevnega vezavnega mesta Mac3 preko lizinskih in tirozinskih aminokislinskih ostankov, nastanek kompleksov pa preprečuje polimorfno obnašanje peptidov in jih stabilizira.

## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### *Odprta platforma za razvoj peptidaznih zaviralcev za zdravljenje okužb s koronavirusi*

Program: Farmacevtska biotehnologija: Znanost za zdravje

Vodja: **Janko Kos\***

Člani: Borut Štrukelj, Boris Rogelj, Jerica Sabotič, Anja Pišlar, Tomaz Bratkovič, Mojca Lunder, Aleš Berlec, Milica Perišić Nanut, Ana Mitrović, Helena Motaln, Urša Pečar Fonović, Nika Janež, Samo Kreft, Tanja Jakoš, Tina Plavec, Zahirović Abida, Ravnikar Matjaž, Emanuela Senjor, Schoss Katja, Urša Čerček

**Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Institut Jožef Stefan**

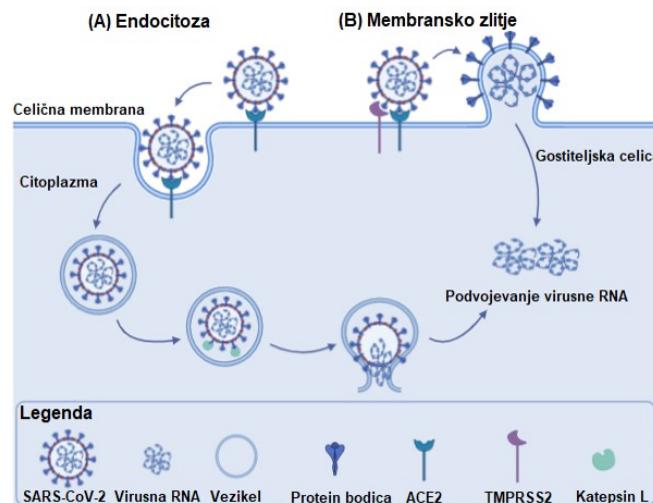
**Ključne besede:** peptidaze, inhibitorji, nitroksolin, protivirusna zdravila.

\* prispevek predstavljal na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

**K**oronavirusi so skupina knjižnic spojin ter načrtovanje zdravil in enoveržnih RNA-virusov z ovojnico. Vsebujejo zapis za poliproteine replikaze, ki se procesirajo z virusnimi peptidazami v kraje nestrukturne proteine, ti pa regulirajo sintezo RNA. Koronavirusne papain podobne cisteinske peptidaze in kimoripsinu podobne 3CL cisteinske peptidaze so esencialne za virusno replikacijo in predstavljajo zanimive tarče za razvoj protivirusnih učinkovin. Po drugi strani pa koronavirusi za vstop v gostiteljsko celico uporabljajo gostiteljske peptidaze za aktivacijo membranskega koničastega glikoproteina. Pri tem sta zelo pomembni cisteinski peptidazi katepsina B in L. Naša programska skupina je razvila platformo za razvoj učinkovitih inhibitorjev cisteinskih in drugih peptidaz za uporabo pri zdravljenju raka, imunske in nevrodegenerativnih bolezni. Vključuje tudi s strukturo podprt načrtovanje zdravil (SBDD), katerega del je digitalno rešetanje

mednarodno projektno skupino, ki bo izvajala in usklajevala raziskave.

➤ **Slika 1:** Mehanizmi vstopa virusa SARS-CoV-2 v gostiteljske celice (Pišlar et al. PLoS Pathogens 2020)



## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Razvoj pljučnega modela in vitro za testiranje protivnetnih učinkovin, uporabnih pri zdravljenju COVID-19

Program: Bio-psiho-socialni model kvalitete življenja

Vodja: Uroš Maver

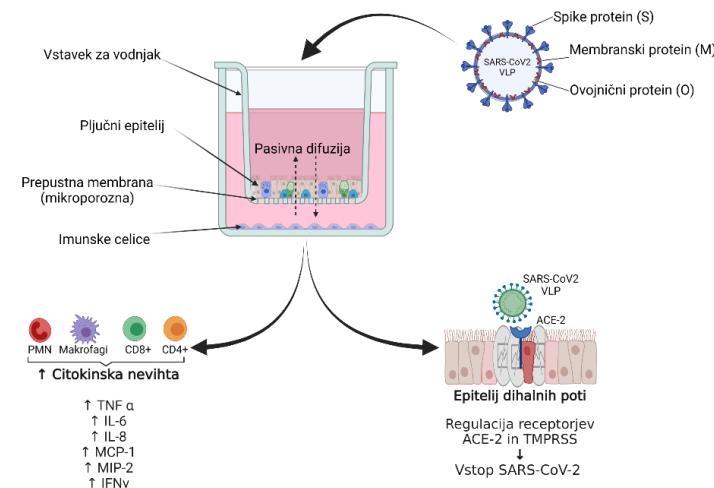
Člani: **Jan Rožanc\***, Marko Milojević, Boštjan Vihar, Eneko Madorran, Mirjam Grebenc

Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta; Univerzitetni klinični center Maribor

**Ključne besede:** pljučni model *in vitro*, virusu SARS-CoV-2 podobni delci, citokinska nevihta, protivnetne učinkovine.

\* prispevek predstavljal na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

**K**oronavirusna bolezen 2019 (COVID-19), ki jo povzroča koronavirus SARS-CoV-2, je povzročila krizo javnega zdravstva po vsem svetu. Okužba se pojavlja pri različnih populacijah in v različnem obsegu kliničnih zapletov in to s še ne povsem napovedljivo incidenco. Na udaru so predvsem starejši bolniki ter tisti z bolezni miha in dihal. Pri slednjih je verjetnost napredovanja bolezni v pljučnicu z vročino, sindrom akutne dihalne stiske, tudi odpoved več organov in smrt, veliko večja.



◀ **Slika 1:** Razvoj pljučnega modela *in vitro*.

Obsežne raziskave v zadnjem letu so privedle do spoznanja, da virus v klinično pomembnem obsegu napada epitelij dihalnih poti, vstopna točka v celice pa so receptorji ACE2 in TMPRSS2. Vsaka okužba z virusom SARS-CoV-2 je tesno povezana s prekomernim vnetjem, pri čemer imajo posebno vlogo monociti/makrofagi in celice T. To se kaže kot nenormalno sproščanje vnetnih citokinov, kar vodi v poškodbo pljuč in odpoved organov (t. i. citokinska nevihta). Za zmanjšanje umrljivosti iz omenjenih vzrokov je zato potrebno opredeliti nove terapevtske pristope, ki imajo ugoden varnostni profil, večnamensko delovanje ter lahko sinergijsko omilijo citokinsko nevihto. Pomembno je, da so njihovi učinki imunomodulatorni ne pa imuno-

supresivni.

Pri testiranju učinkovin v zgodnjih fazah razvoja novih zdravil je pomembna uporaba fiziološko ustreznih sistemov *in vitro*, ki ob podpori gibanja za zamenjavo, zmanjševanje in izboljšanje uporabe poskusov *in vivo* predstavljajo tudi priložnost za personalizirano obravnavo poteka bolezni ter samega zdravljenja. V sklopu projekta razvijamo pljučni model *in vitro*, z uporabo virusu podobnih delcev pa poskušamo posnemati vnetni odziv ob okužbi s SARS-CoV-2. Cilj projekta je pripraviti napreden in funkcionalen bolezenski model, s katerim bi lahko testirali protivnetne učinkovine, in razvoj novih terapevtskih strategij za zdravljenje COVID-19 in drugih respiratornih virusnih obolenj.

## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### *Razvoj aktivnih učinkovin in površin proti virusom z ovojnico*

Program: Mikrobiologija in biotehnologija živil in okolja

Vodja: Ines Mandić Mulec

Člani: **Katja Molan\***, David Stopar, Sonja Smole Možina, Hrvoje Petković, Martina Avbelj, Valentina Malin, Simona Leskovec, Sara Goršek, Katarina Belcijan, Daniel Krklec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

**Ključne besede:** protivirusne učinkovine, virucidne površine, virus HCoV-NL63, surogat bakteriofag Phi6.

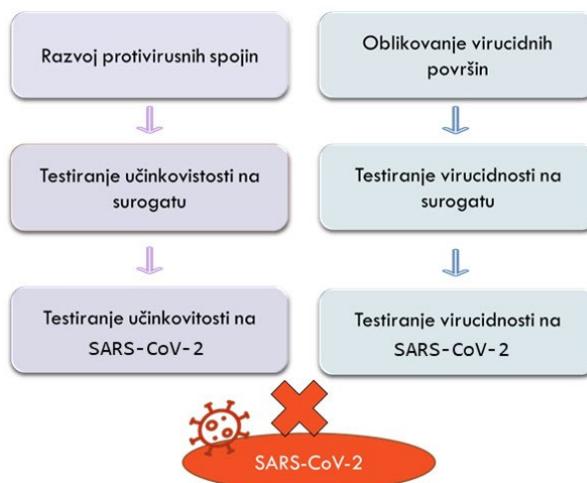
\* prispevek predstavila na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

Za razvoj aktivnih učinkovin in površin, ki bi delovale proti virusom z ovojnico, smo svoje raziskave usmerili v (1) razvoj protivirusnih in inhibitornih učinkovin ter (2) razvoj virucidnih površin. Razvoj novih protivirusnih spojin je temeljil na rastlinski spojini emodin, ki lahko deluje proti proteinu S virusa SARS-CoV-2 in s tem preprečuje združitev virusa z gostiteljsko celico. Obetajoči inhibitorji membranske fuzije med virusom in gostiteljsko celico so tudi surfaktanti, ki jih producirajo bakterije *Bacillus subtilis*. Omenjenim spojinam smo določili njihovo protivirusno delovanje. Kovinske in keramične površine smo pripravili z uporabo novih tehnologij (SLM-SPS), ki omogočajo tridimenzionalno tiskanje kovin. Potencialen virucidni in anti-adhezivni učinek smo preverjali tudi na plastičnih kompozitnih materialih, na katere smo nanesli različne sloje funkcionaliziranih premazov.

Za testiranje učinkovin in površin proti virusu SARS-CoV-2 je zaradi visoke stopnje patogenosti potrebno delo v laboratorijsih s tretjo stopnjo biološke varnosti in primerena usposobljenost zaposlenih. Zato smo v prvi fazi raziskav učinkovine in površine testirali na surogatih, kot je bakteriofag Phi6. Na podlagi rezultatov smo naredili izbor zanimivih spojin in materialov, ki smo jih v nadaljevanju testirali na protivirusno in virucidno delovanje proti virusu SARS-CoV-2.

Raziskave smo izvedli v sodelovanju s Fakulteto za strojništvo Univerze v Ljubljani (dr. Miha Brojan, dr. Ramin Rahmani) in Univerze v Mariboru (prof. dr. Lidija Fras-Zemljic), Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani (dr. Jernej Iskra, Monika Horvat, dr. Andraž Šuligoj) ter Veterinarsko fakulteto Univerze v Ljubljani (prof. dr. Olga Zorman Rojs, dr. Urška Kuhar, dr. Uroš Krapež).

➤ Slika 1: Grafični povztek raziskave.



## Raziskovalne skupine v svetu SARS-CoV-2 in COVID-19

### Modificirana naravna barvila za funkcionalne protivirusne barvne tekstilije

Program: Kemija za trajnosti razvoj

Vodja: Urška Lavrenčič Štangar

Člani: **Jernej Iskra\***, Monika Horvat, Griša Grigorij Prinčič, Rohini A. Khobragade, Tatiparthi Vikram Sagar, Martina Avbelj, Hrvoje Petković, Marija Gorjanc, Mihajlo Banjanac

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Biotehniška in Naravoslovnotehniška fakulteta; Fidelta Ltd.

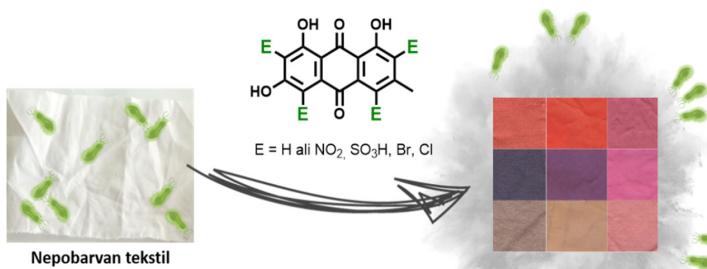
**Ključne besede:** antrakinonska barvila, halogeniranje, emodin, protibakterijske učinkovine, tekstilije.

\* prispevek predstavljal na dogodku »Raziskovalni programi COVID-19 se predstavijo 2021«, predstavitev dostopne na SMD strani

**R**astline so človeku že tisočletja da imajo halogenirani derivati dobro protibakterijsko aktivnost na za meticilin občutljive bakterije *Staphylococcus aureus* (MSSA). Ugotovili smo, da se aktivnost emodinov ohrani ob vezavi na poliamid in volno. Protivirusno aktivnost emodinskih derivatov smo testirali na humanem koronavirusu NL63 (HCoV-NL63), ki povzroča vnetja zgornjih dihal in huda vnetja spodnjih dihalnih poti pri otrocih, krup in bronhitis. HCoV-NL63 je odličen analog virusa SARS-CoV-2, saj se oba vežeta na receptorje ACE2. V naši knjižnici emodinskih derivatov je imel najvišjo aktivnost jodiran emodinski analog, katerega aktivnost je bila primerljiva z aktivnostjo remdesivirja. Za študijo toksičnosti smo uporabili občutljive celice Vero in pokazalo se je, da imajo emodinski derivati neželeno toksičnost, SAR-študija pa je hkrati pokazala pot za nadaljnjo modifikacijo, ki bi vodila v učinkovine z boljšim profilom. Dobre barvne in vezavne

lastnosti kažejo na uporabnost derivatov emodina na funkcionalnih materialih, saj toksičnost v teh aplikacijah ne predstavlja težave.

➤ Slika 1: Dvojna vloga derivatov emodina - barvila za tekstilje in protivirusna aktivnost.



## Slovenski mikrobiologi v tujini

### Zagovor doktorske naloge Matevža Rumpreta, mag. mikrobiol., na Univerzi v Utrechtu na Nizozemskem

Marjanca Starčič Erjavec

D a Matevž Rumpret mika tujina, je bilo razvidno že v času njegovega študija na drugi stopnji mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Že takrat je namreč velik del raziskav za svoje magistrsko delo opravil v tujini, v laboratoriju prof. dr. Josa van Puttna na Veterinarski fakulteti (Faculty of

mesto mladega raziskovalca v skupini prof. dr. Linde Meyaard v Centru za translacijsko imunologijo (Center for Translational Immunology, University Medical Center Utrecht) in pričel raziskave za svojo doktorsko disertacijo na področju imunskega odziva v odnosu mikrob-gostitelj. Proučeval je inhibitorne receptorje

Matevž Rumpret, mlad slovenski mikrobiolog, ki je tako prvo kot drugo stopnjo mikrobiologije zaključil na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, je 17. 3. 2022 uspešno ubranil svojo doktorsko disertacijo z naslovom *Immune inhibitory receptors in host-microbe interaction* na Nizozemskem.

➤ Slika 1: Naslovica doktorske disertacije Matevža Rumpreta



Veterinary Medicine) v Utrechtu na Nizozemskem. Svoj študij na Biotehniški fakulteti je tako končal leta 2014 z uspešnim zagovorom magistrske naloge z naslovom *Conjugal transfer of the plasmid pOX38 with the colicin E7 gene*. Že leta 2014 se je Matevž vrnil na Nizozemsko, v Utrecht, a na Univerzitetni medicinski center (University Medical Center Utrecht), kjer je raziskoval v laboratoriju dr. Nine van Sorge na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo (Department of Medical Microbiology). Leta 2015 je dobil

gostiteljev, ki po prepoznavi svojih mikrobnih ali endogenih ligandov zavirajo imunski odziv. Povod za raziskave so bila odprta vprašanja s tega področja, in sicer, zakaj ima imunski sistem toliko inhibitornih receptorjev, zakaj so različno uravnavani in kakšno prednost ima imunski sistem z inhibitornimi receptorji v primerjavi z imunskim sistemom, ki jih nima.

V 2017 je Matevž za njegovo raziskovalno delo Nizozemsko imunološko društvo (Dutch Society for Immunology) podelilo nagrado bright

▼ Slika 2: Mentorica prof. dr. Linde Meyaard Matevžu Rumpretu podeljuje doktorsko listino.



delo s celičnimi kulturami, a kljub vsemu je Matevž uspelo pridobiti rezultatov za kar 5 člankov, ki so potem tvorili srž njegove doktorske disertacije:

1. Rumpret M, Drylewicz J, Ackermans L J E, Borghans J A M, Medzhitov R, Meyaard L. Functional categories of immune inhibitory receptors. *Nat Rev Immunol.* 2020 Dec;20(12):771-780. doi:

spark, saj je v njem prepoznaло mladega talentiranega znanstvenika. V letu 2018 mu je Evropska organizacija za molekularno biologijo (European Molecular Biology Organisation) podelila štipendijo, da se je lahko pridružil dr. Meytal Landau na Technionu – izraelskemu tehnološkemu inštitutu v Hajfi v Izraelu, kjer je študiral proteinsko strukturo enega izmed inhibitornih receptorjev v kompleksu z ligandom. Pandemija COVID-19 je raziskovanje Matevža sicer nekoliko upočasnila, med drugim se sploh ni več dalo dobiti vseh reagentov za

10.1038/s41577-020-0352-z. PMID: 32612208. (2. poglavje v doktorski disertaciji).

2. Rumpret M, von Richthofen H J, van der Linden M, Westerlaken G H A, Talavera Ormeño C, Low T Y, Ovaa H, Meyaard L. Recognition of S100 proteins by Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1 negatively regulates human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2021 Sep;51(9):2210–2217. doi: 10.1002/eji.202149278. PMID: 34145909; PMCID: PMC8457157. (3. poglavje v doktorski disertaciji).
3. Rumpret M, Salinas N, Barneea E, Meyaard L, Landau M. Distinct structural features of *S. aureus* PSMα3 mediate its diverse functions. V pripravi (4. poglavje v doktorski disertaciji).
4. Rumpret M, von Richthofen H J, van der Linden M, Westerlaken G H A, Talavera Ormeño C, van Strijp J A G, Landau M, Ovaa H, van Sorge N M, Meyaard L. Signal inhibitory receptor on leukocytes-1 recognizes bacterial and endogenous amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. *FASEB J.* 2021 Oct;35(10):e21875. doi: 10.1096/fj.202100812R. PMID: 34533845. (5. poglavje v doktorski disertaciji).
5. Rumpret M, von Richthofen H J, Peperzak V, Meyaard L. Inhibitory pattern recognition receptors. *J Exp Med.* 2022 Jan 3;219(1):e20211463. doi: 10.1084/jem.20211463. PMID: 34905019; PMCID: PMC8674843. (6. poglavje v doktorski disertaciji).

Prvo in zadnje, sedmo poglavje doktorske disertacije predstavlja Uvod in Diskusija. Vmesna poglavja bi lahko povzeli takole. V 2. poglavju je podan pregled znanih inhibitornih receptorjev in njihovih ligandov, njihovo izražanje in uravnavanje izražanja. Uporabljeni so tudi matematični modeli za delovanje inhibitornih receptorjev in predlagan konceptualni okvir, ki predstavlja različne funkcionalne kategorije inhibitornih receptorjev. V 3. poglavju se je Matevž osredotočil na inhibitorni receptor SIRL-1 in razkril njegove prve endogene ligande, družino beljakovin S100 DAMP, ter pokazal, da SIRL-1 po interakciji s temi ligandi zavira sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti v nevtrofilcih. V 4. poglavju so razkrite strukturne in funkcionalne lastnosti v fenolu topnih modulinov, amfipatskih  $\alpha$ -vijačnih peptidov, ki jih izločajo po Gramu pozitivne bakterije iz rodu *Staphylococcus*. V 5. poglavju je razkrito, da so stafilokokni v fenolu topni modulini bakterijski ligandi za SIRL-1 ter da je njim podoben humani protimikrobi peptid katelicidin LL-37 endogeni ligand SIRL-1. Na podlagi ugotovitev, da SIRL-1 prepozna beljakovinsko družino DAMP (3. poglavje) in skupino strukturno in funkcionalno podobnih stafilokoknih in človeških peptidov (5. poglavje), v 6. poglavju Matevž poda

teorijo, da lahko inhibitorni receptorji prepoznajo specifične molekularne vzorce, kar tudi pokaže na molekulah endogenega in mikrobnega izvora in predlaga, da lahko delujejo za uravnoteženje imunskega odziva.

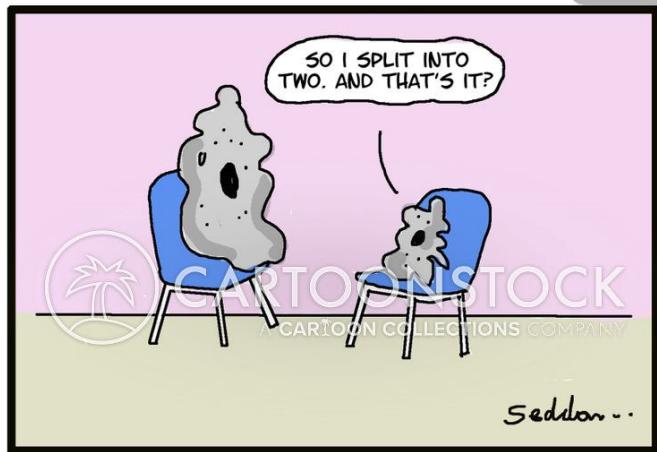
Zagovor doktorske disertacije je potekal na za Nizozemsko neverjetno lep sončen dan v središču mesta v Academiegebouw, kjer je sedež Univerze v Utrechtu. Zagovori tam potekajo po tradicionalnem protokolu pred večlansko komisijo, ki ima na razpolago 45 min, da kandidatu zastavlja vprašanja in tako preveri, ali si zaslubi, da se mu podeli doktorski naziv. Več o poteku zagovora na Univerzi v Utrechtu lahko najdete na tej povezavi: [INSTRUCTIONS TO THE DOCTORAL CANDIDATE \(uu.nl\)](https://www.uu.nl/sites/default/files/aanwijzingen_en_1.pdf)

▼ Slika 3: Academiegebouw – sedež Univerze v Utrechtu, kjer potekajo zagovori doktorskih disertacij.



**Iskrice v mikrobiologiji****Mikrobiologija v sliki**

➤ Tudi bakterije doleti pomlad...  
Na [Cartoonstock](#), lahko najdete še več prisrčnih mikrobioloških ilustracij.



**Harry has the little talk  
about the birds and the bees.**

➤ Pestrost mikrobov iz brisa tesnila pomivalnega stroja. Avtorica: Neja Župančič

**Mikropesem****Vidni in nevidni**

Covidni čas se zdi da usiha  
morebitni virus res še malo diha,  
mogoče tiko se množi.  
A večino politikov to več ne skrbi.

...saj se nova igra že vrti...

So z maskami dobro si postlali,  
od respiratorjev delež prijateljem darovali,  
objubljiali zdravstvu so nagrado,  
zablesteli pred narodom s parado.

...a nova igra ne miruje...

Volitve so kot naročene,  
da pogrejejo stare že kaljene  
in ponudijo obraze smeles,  
da bi narod na limanice ujele.

...in spet si igre nove snuje...

Je vojne treba spet imeti,  
brate in sestre spreti  
in klati bratsko kri,  
da orožarska mafija živi.

...kot kaže igri kraja ni...

Poštenih politika več ne obišče,  
saj parlament spletkarstva je vadišče  
in nabira take v lasten kup.  
da še modreci utonejo v brezup.

## Rešitev mikrokržanke iz prejšnje številke

...ker igra se še bolj zapleta...

Se vam zdi, da mikrobi v svojem svetu ždijo,  
in čakajo na novo ljudsko polomijo,  
z odpadki vred nas bodo v humus spremenili,  
mogoče novi kulturi boljši svet odkrili.

...igra pa še dalje gre...

Ne vem, če igre take res želim.  
Saj z mikrobi že dolgo misel in delo si delim.  
A bolj kot gledam, bolj ko čutim,  
bolj trpim in bolj jasno slutim.  
Sleherniku se tak priskutim

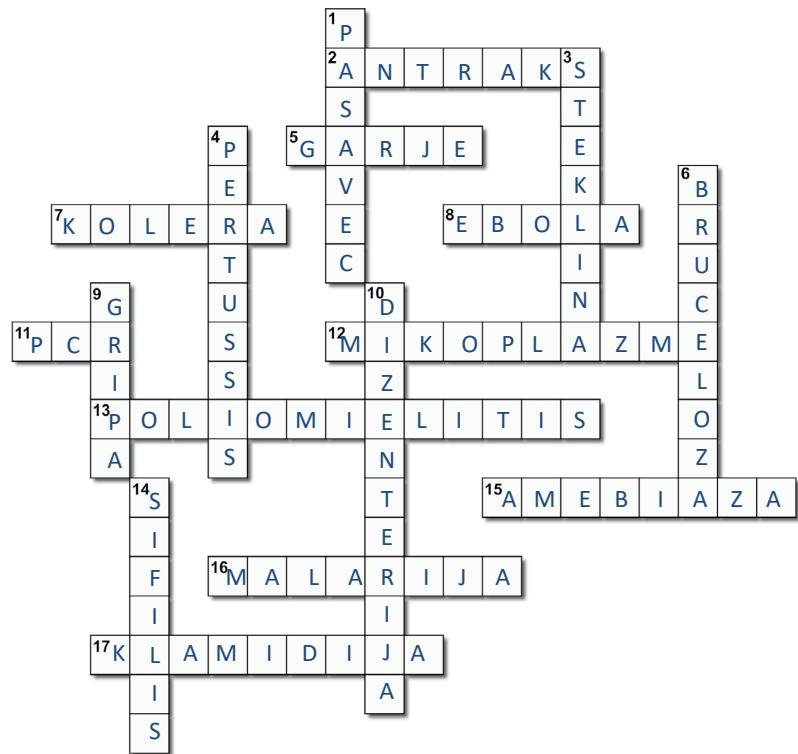
...igra pa še traja, traja...

Vse kaže,  
da gen pogoltnosti nima vrlin narave,  
zato tudi ni nikoli prave sprave.  
Da ohranil bi naravo v ravnotežju,  
ni rešitev v medmrežju.

Človek je iztiril - ne vemo kdaj.  
Saj ko grabež se začne - ni poti nazaj.  
Rešitev, gotovo je nekje,  
V duši. V srcu, če sploh je?

Mogoče v obdobju dolgih zim,  
ko se človek bo zavedal nature vseh prvin.

**(Peter Raspot, 13. 12. 2021)**



### Vodoravno

2. Vranični prisad
5. Parazitska kožna nalezljiva bolezen
7. Nalezljiva epidemična črevesna bolezen, nezdravljenja je smrtna v 25–50 %
8. Povzroči lahko tudi do 83% smrtnost
11. Okrajšava za verižno reakcijo s polimerazo
12. Najmanjše bakterije
13. Nalezljiva virusna bolezen, ki prizadene živčni sistem in povzroča ohromitve
15. Akutna ali kronična črevesna nalezljiva bolezen, ki jo povzroča *Entamoeba histolytica*
16. Je nalezljiva bolezen, ki jo povzročajo nekatere vrste zajedavskih praživali iz razreda trosovcev
17. Najpogostejša bakterijska povzročiteljica spolno prenosljivih okužb

### Navpično

- 1.-Herpes zoster
3. Povzroča jo virus, ki prizadene osrednje živčevje toplokrvnih živali in človeka
4. Oslovenski kašelj
6. Imenovana tudi mediteranska, giblitalska ali maltska bolezen
9. Nalezljiva virusna bolezen dihal, ki jo povzročajo RNA-virusi iz družine *Orthomyxoviridae*
10. Griza
14. *Treponema pallidum*