

BAKTERIOFAGI – ALI STE VI NAŠA PRIHODNOST?

**PODROČJE: BIOLOGIJA
RAZISKOVALNA NALOGA**

Avtorici: Olga Hubert, Karmen Writzl

8. razred

Mentorica: mag. prof. Tatjana Keržan

Somentorici: Nina Esih, dipl. mikrobiol. in Urša Nabernik, mag. ind. farm.

Šolsko leto: 2022/2023

OŠ Danile Kumar, Ljubljana

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA	6
POVZETEK	7
1 UVOD.....	8
1.1 MOTIVACIJA.....	8
1.2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE	8
1.3 METODOLOGIJA DELA.....	9
2 TEORETIČNI DEL.....	10
2.1 ANTIBIOTIKI IN SUPERODPORNE BAKTERIJE	10
2.2 BAKTERIOFAGI.....	10
2.2.1 Odkritje bakteriofagov.....	10
2.2.2 Zgradba.....	11
2.2.3 Vrste bakteriofagov	12
2.2.4 Kako poteka okužba bakterije in razmnoževanje fagov.....	12
2.3 BAKTERIOFAGNA TERAPIJA	14
2.3.1 Vrste fagnih terapij	14
2.3.2 Pogostost zdravljenja z bakteriofagi.....	14
2.3.3 Prednosti in slabosti fagne terapije	14
2.4 BAKTERIJA SALMONELA	15
2.5 KAKO LAJKO BAKTERIOFAGI VPLIVAJO NA NAŠO PRIHODNOST ...	17
3 RAZISKOVALNI DEL.....	18
3.1 VARNO RAVNANJE V LABORATORIJU	18
3.2 PRIPRAVA MEDIJA	18
3.2.1 Tekoč medij	18
3.2.2 Priprava plošč	18
3.2.3 Priprava top agarja.....	19
3.3 NACEPITEV BAKTERIJ	19
3.3.1 Gojenje bakterij v tekočem mediju.....	20
3.4 INFICIRANJE BAKTERIJE Z BAKTERIOFAGOM	21
3.5 DODAJANJE BAKTERIJE TOP AGARJU	21
3.6 SERIJSKE REDČITVE BAKTERIOFAGA.....	22
3.7 TITRACIJA FAGA	23

3.7.1	Titer bakteriofaga	23
4	REZULTATI	24
4.1	NACEPITEV BAKTERIJ	24
4.2	LIZA BAKTERIJ	25
5	RAZPRAVA.....	27
6	ZAKLJUČEK	29
	LITERATURA IN VIRI.....	30

KAZALO SLIK

Slika 1: Prve fotografije bakteriofagov z elektronskim mikroskopom.....	11
Slika 2: Zgradba bakteriofaga.....	11
Slika 3: Najbolj poznane družine bakteriofagov	12
Slika 4: Litični cikel	13
Slika 5: <i>Salmonella Typhimurium</i>	16
Slika 6: Vlivanje mešanice v petrijevke.	19
Slika 7: Razmaz na plošče	20
Slika 8: Filtracija lizata.....	21
Slika 9: Serijske redčitve	22
Slika 10: Medij pred in po dodatku bakterije.	24
Slika 11: Plošča z bakterijo salmonelo. Precep do posameznih kolonij.....	25
Slika 12: Liza bakterij z vidnimi nitkami.	25
Slika 13: Plošči s top agarjem in bakterijsko kulturo.	26
Slika 14: Vidni plaki.....	26

ZAHVALA

Pisanje raziskovalne naloge naju je izredno veselilo, pridobili sva mnogo novega znanja in izkušenj, ki nama bodo ostale za življenje. Pri tem nama je pomagalo veliko ljudi in prepričani sva, da brez njih naloga ne bi bila uspešna. Še posebej pa bi se radi zahvalili:

- učiteljici biologije, gospe Tatjani Keržan, najini mentorici, ki nama je od začetka stala ob strani in naju »potiskala«, ko je to bilo najbolj potrebno, saj je bila njena podpora ključna za dokončanje raziskovalne naloge;
- somentoricama Urši Nabernik in Nini Esih za pomoč pri izvajanju eksperimenta, za organizacijo eksperimentalnega dela, odlično predajanje znanja in pripravljenost, da nama pomagata v vsakem trenutku;
- podjetju Jafral, Biotehnološke raziskave in razvoj, d.o.o. za prijaznost in možnost, da pri njih opraviva eksperimentalno delo;
- najinim staršem za spodbudo in vso pomoč;
- Petru Čučku, vodji izobraževalnih programov v Višnjalu, za interes, ki ga je pokazal za najino raziskovalno delo in za koristne nasvete pri pisanju naloge;
- učiteljici slovenščine in zgodovine, gospe Brigitte Praznik Lokar, za lektoriranje raziskovalne naloge.

POVZETEK

Bakteriofagi ali krajše samo fagi so preprosti virusi, ki zajedajo bakterije in jih lahko najdemo povsod okoli nas. Bakterije postajajo vedno bolj odporne na antibiotike in razvile so se že t. i. superbakterije, ki so popolnoma rezistentne, zato znanstveniki pospešeno isčejo načine, s katerimi bi lahko nadomestili antibiotike.

Bakteriofagi niso vključeni v šolski učni načrt, zato jih večina splošne javnosti ne pozna. Na spletu bakteriofagi postajajo popularna vsebina in tako sva jih odkrili tudi midve. Ti nenavadni virusi so naju takoj pritegnili, zato sva se odločili, da jih podrobnejše raziščeva.

V raziskovalni nalogi so predstavljeni ključni pojmi o bakteriofagih, fagne terapije in bakterija *Salmonella* sp., na kateri so bili opravljeni poskusi z ustreznim bakteriofagom. Eksperimentalni del sva opravili v podjetju Jafral, Biotehnološke raziskave in razvoj, d.o.o., kjer sva iz prve roke lahko spoznali potek okužbe bakterije salmonele z bakteriofagom in se seznanili z delom v mikrobiološkem laboratoriju. Pri praktičnem delu sva ugotovili, da ob ustreznih pogojih bakteriofag povzroči lizo bakterije, popokane celice pa se pojavijo v obliki nitk. Delovanje bakteriofaga sva ponovno dokazali z nanašanjem faga na ploščo s top agarjem in bakterijsko kulturo. Pojavili so se t. i. plaki – površine brez bakterije.

Znanstveniki napovedujejo, da je fagna terapija lahko prihodnost medicine in bi z njo lahko nadomestili antibiotike, saj lahko bakteriofagi ciljno uničijo samo določeno vrsto bakterije, s čimer ne vplivajo na dvig odpornosti bakterij. Prav tako nimajo negativnega vpliva na t. i. koristne bakterije, ki jih najdemo v črevesni mikroflori organizmov. Področje se pospešeno razvija in z uvedbo ustreznih protokolov je verjetno le še vprašanje časa, kdaj bo bakteriofagna terapija dostopna tudi pri nas.

Ključne besede: bakteriofagi, fagi, fagna terapija, bakterija *Salmonella* sp., antibiotiki

1 UVOD

Dandanes vedno več uporabljamo antibiotike za najrazličnejše namene, zato so bakterije na njih vedno bolj imune. Vedno bolj popularno pa postaja zdravljenje z bakteriofagi, saj znanstveniki verjamejo, da bi antibiotike lahko zamenjali z bakteriofagi. Bakteriofagi ali krajše samo fagi so preprosti virusi, ki zajedajo bakterije, in so navadno specifični za vrsto ali sev bakterij. Poznamo več vrst ali sevov fagov, ki se razlikujejo na različnih področjih.

1.1 MOTIVACIJA

Bakteriofagi so v zadnjih letih izredno popularna tema. Govori se, da so fagi morda nadomestilo antibiotikov, in razvijajo se razne nove tehnike in tehnologije, povezane z njimi. Na žalost temu ni vključena v šolski učni načrt, zato mnogi teh virusov ne poznajo. Internet, z druge strani, pa je poln videov, radijskih oddaj in člankov o fagih, in prav zaradi tega sva bakteriofage po naključju spoznali. Po ogledu preprostega videa sva odkrili, da obstaja izredno zanimiv virus v biosistemu, ki nam morda lahko spremeni prihodnost. Bakteriofagi so bili v videu predstavljeni kot najnevarnejši virusi na svetu, a vseeno nenevarni za ljudi. Hitro sva o njih začeli raziskovati in tema naju je izredno pritegnila. Prebrali sva različno literaturo in se odločili, da se fagom želiva posvetiti bolj podrobno.

1.2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE

Osnovni namen raziskave je proučiti delovanje bakteriofaga na bakterijo in ugotoviti, ali bi lahko fagi delno ali v celoti nadomestili uporabo antibiotikov pri zdravljenju bakterijskih okužb. Glavni cilj je s pomočjo podatkov, ki jih bova pridobili s pomočjo poskusa in pregleda literature, opisati mehanizem delovanja bakteriofaga na bakterijsko celico in oceniti, ali obstaja možnost, da bi bakteriofagi kmalu nadomestili zdravljenje bakterijskih okužb v splošnem zdravstvenem sistemu.

Pred raziskovanjem sva si zastavili 4 hipoteze:

Hipoteza 1: Bakteriofag bo pri ustreznih pogojih liziral bakterijo salmonelo.

Hipoteza 2: Liza bakterijskih celic se bo pokazala kot bistro gojišče z nitkami.

Hipoteza 3: Salmonelozo lahko pozdravimo z ustreznim bakteriofagom *in vitro*.

Hipoteza 4: Bakteriofagi bi lahko nadomestili uporabo antibiotikov pri zdravljenju bakterijskih okužb.

1.3 METODOLOGIJA DELA

Najina raziskava je umeščena na področje biologije, saj se tema najbolj povezuje s panogo mikrobiologije. Področje bakteriofagov sva najprej predstavili v teoretičnem delu in nato še eksperimentalno raziskali delovanje bakteriofaga na primeru bakterije salmonelle. Opažanja in rezultati poskusa so podlaga za ugotovitve, kako bakteriofagi delujejo na bakterije. Teorija in praktični del sta osnova za oceno možnosti uporabe bakteriofagov v prihodnosti.

2 TEORETIČNI DEL

V nadaljevanju bova opisali nekatere ključne pojme in dejstva, ki so nujno potrebni za razumevanje raziskovalnega dela.

2.1 ANTIBIOTIKI IN SUPERODPORNE BAKTERIJE

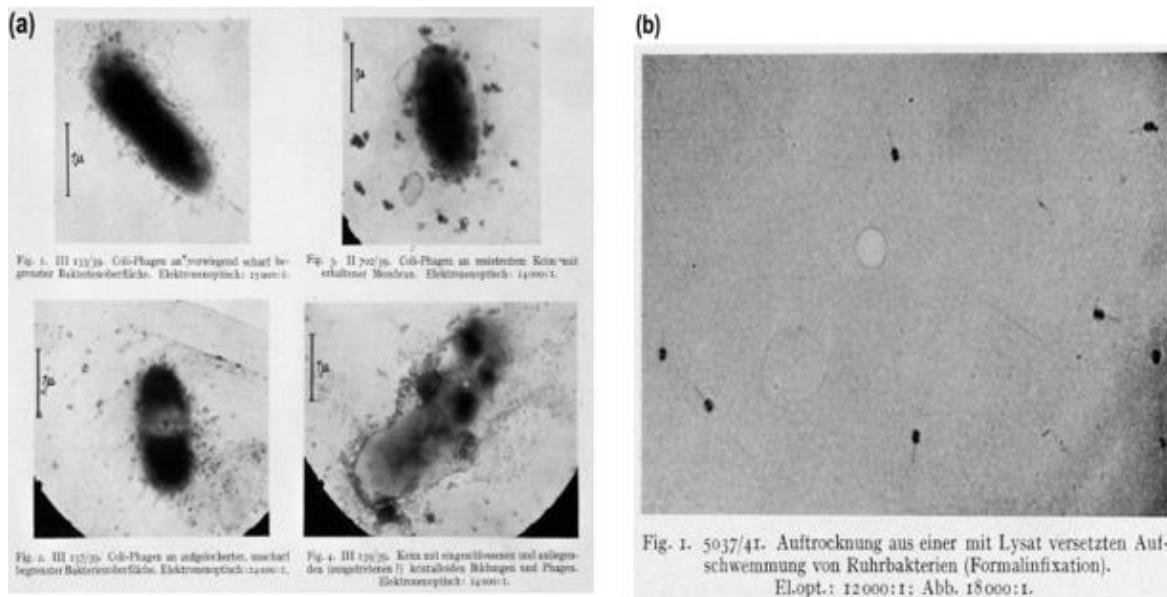
Antibiotike poznamo že skoraj sto let po zaslugu Aleksandra Fleminga, ki jih je odkril povsem naključno. Antibiotiki so zdravila, ki jih uporabljamo za zdravljenje bakterijskih okužb. Dandanes jih uporabljamo za najrazličnejše razloge, včasih tudi takrat, ko niso prav zares potrebni. Zaradi prekomerne uporabe antibiotikov človeštvu grozijo bakterije, ki so razvile rezistenco na prav vse antibiotike – superodporne bakterije. Postajajo globalna grožnja zdravju, za katero nimamo rešitve, vsaj tako se zdi. Ali nas lahko rešijo bakteriofagi?

2.2 BAKTERIOFAGI

Bakteriofagi ali krajše fagi so virusi, ki zajedajo bakterije, ne da bi pri tem poškodovali ali uničili živalske in človeške celice (Drinovec in Stopar 2001).

2.2.1 Odkritje bakteriofagov

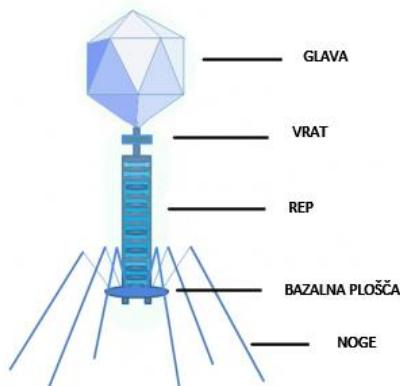
Bakteriofage sta čisto neodvisno odkrila dva znanstvenika. Fage je prvi odkril gospod Frederick Twort leta 1915 in komaj dve leti pozneje je francosko-kanadski mikrobiolog Felix d'Herelle odkril njihov potencial za ubijanje bakterij. Odkril jih je v blatu pacientov, okuženih s črevesno nalezljivo boleznijo, znano tudi kot šigeloza. Hitro je ugotovil, da je filtrat blata zmnožen uničiti bakterijske kulture rodu Shigella. Ker nihče ni točno vedel, kaj je fag, so imeli znanstveniki različne teorije. D'Herelle je trdil, da gre za biološki organizem, ki se razmnožuje in hrani z bakterijami, opisal ga je tudi kot mikroorganizem imunosti in obligatni bakteriofag. Iz njegovega opisa izhaja tudi današnje poimenovanje bakteriofagov, ki pa pomeni »*tisti, ki je bakterije*«. V začetku leta 1919 je d'Herelle izoliral fage iz piščančjih iztrebkov in z njimi uspešno zdravil kugo kokošjega tifusa. Po tem uspešnem poskusu na piščancu se je počutil pripravljenega na prvi poskus na ljudeh. In res mu je uspelo, saj je bil prvi bolnik uspešno ozdravljen griže s fagoterapijo avgusta 1919. Zaradi nezaupanja v fagno terapijo in v d'Herellevo uporabo fagov brez večjih zadržkov je bilo njegovo delo pogosto napadeno, dokler ni prvega faga leta 1939 pod elektronskim mikroskopom opazil Helmut Ruska (Taylor 2014 in Janežič 2019: 2).



Slika 1: Prve fotografije bakteriofagov z elektronskim mikroskopom (<https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/bacteriophages>).

2.2.2 Zgradba

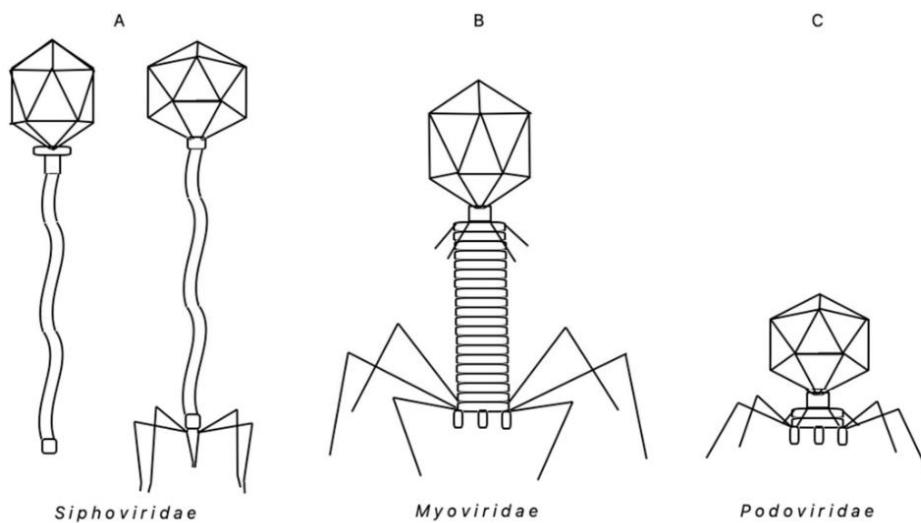
Bakteriofagi merijo med 24 do 400 nm in so tipično sestavljeni iz kapside, repa, vratu in nog (Slika 2). Kapsida je glava, v kateri se nahaja DNA ali RNA. Oblika kapside je ikozaedrična, kar pomeni, da gre za geometrijsko telo, sestavljeno iz 20 ploskev, izmed katerih je vsaka enakostranični trikotnik. Nekateri fagi imajo rep, ki je votla struktura, preko katere, po pričvrstitvi bakteriofaga na bakterijo, genski material pride v gostiteljsko celico (Drinovec in Stopar 2001).



Slika 2: Zgradba bakteriofaga (<https://www.bionet-skola.com/w/Datoteka:Bakteriofagi1.png>).

2.2.3 Vrste bakteriofagov

Poznamo več vrst ali sevov fagov, ki se razlikujejo po različnih lastnostih. Razvrščamo jih v različne kategorije glede na njihove gostitelje in strukturne karakteristike, kot so vrsta genetskega materiala, oblika in velikost, velikost genoma in odpornost na organska topila. Več kot 96 % fagov ima rep in dvooverižno DNA. Večina poznanih fagov spada v družine Myoviridae, Siphoviridae in Podoviridae (Slika 3). V naravnem okolju lahko za vsako bakterijo najdemo bakteriofag, saj so povsod okoli nas (Janežič 2019: 3).



Slika 3: Najbolj poznane družine bakteriofagov
(<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/7/1522>).

2.2.4 Kako poteka okužba bakterije in razmnoževanje fagov

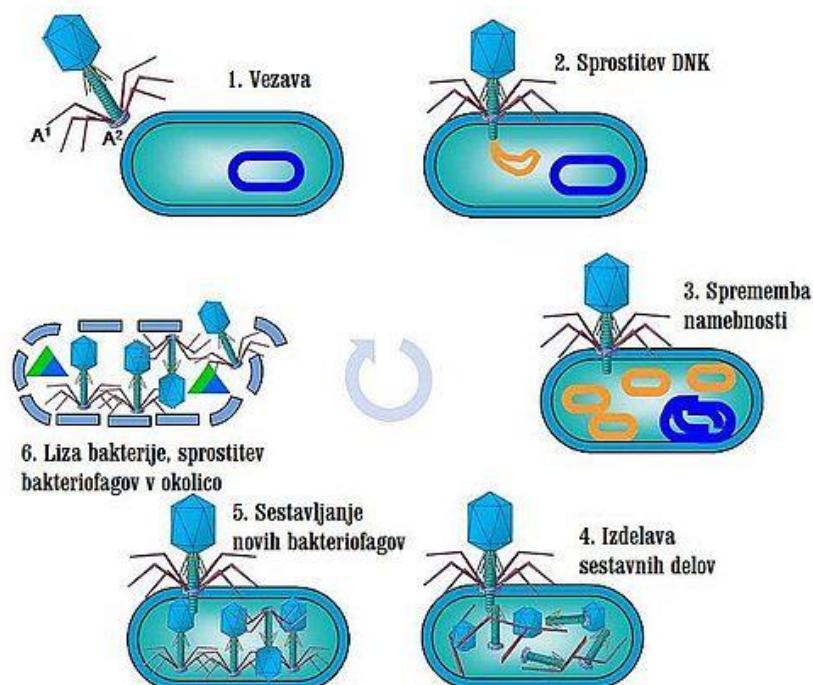
Proces okužbe bakterije in razmnoževanja fagov (Slika 4) poteka v naslednjem zaporedju dogodkov – pripenjanje virusa na celico, njegovo znotrajcelično razmnoževanje, liza celice in sprostitev zrelih virusov. To zaporedje imenujemo litični cikel (Mikrobiološki slovar 2013 ali <https://www.terminia.net/slovarji/mikrobioloski-slovar/5546336/bakteriofag-mu>).

Da bi fag lahko okužil bakterijo, se mora najprej pričvrstiti na gostiteljsko celico. To mu omogočajo površinske strukture oz. receptorji na bakterijski celici (lipopolisaharidi, teihoične kisline, membranski proteini in bički). Bakteriofag lahko okuži le specifične bakterije, kar je odvisno od vrste receptorjev, ki se nahajajo na gostiteljski celici (Janežič 2019: 4).

Med okužbo virusi za preboj celične stene uporabljajo encime. Ko virus predre celično steno, v bakterijsko celico vbrizga svoj genom. Za injekcijo genoma v bakterijo morajo fagi vsebovati dve vrste proteinov: peptidoglikan hidrolaze in polisaharid depolimeraze (Janežič 2019: 4).

Ko se genom virusa znajde v bakterijski celici, se začnejo tvoriti številne kopije virusnih delcev in nukleinskih kislin. V primeru, da virus vsebuje DNA, se ta prepiše v mRNA molekule in s pomočjo bakterijskih ribosomov prevede v beljakovine. Če vsebujejo virusi RNA, pa se ta prepiše v DNA, nato pa poteka isti proces kot pri virusu z DNA zapisom. Proti koncu se novi proteini sestavijo v kapside in repe fagov, nastanejo novi bakteriofagi, ki membrano bakterije pretrgajo oz. jo lizirajo in se sprostijo iz celice. Nastali so novi virusi, ki lahko okužijo nove celice z ustreznim receptorjem in se naprej razmnožujejo. Bakteriofagi, ki se razmnožujejo z litičnim ciklom, so primerni za zdravljenje bakterijskih okužb (Janežič 2019: 4).

Cikel razmnoževanja oziroma replikacijski cikel (od trenutka stika virusa z bakterijo do sprostitev novih fagov iz celice) traja približno 15 do 30 minut.



Slika 4: Litični cikel
(https://sl.wikipedia.org/wiki/Bakteriofag#/media/Slika:Napad_bakterije.jpg).

2.3 BAKTERIOFAGNA TERAPIJA

Bakteriofagna terapija je zdravljenje bakterijske okužbe z bakteriofagi.

2.3.1 Vrste fagnih terapij

Monofagna terapija je terapija, pri kateri se za zatiranje bakterijske okužbe uporablja le ena vrsta bakteriofaga. Ta se je večinoma uporabljala pri eksperimentalnem delu na živalskih modelih. Problem take vrste terapije je, da je možnost pojava bakterijske odpornosti precej velika. V izogib temu pojavi se uporabljajo fagni koktejli oziroma polifagna terapija. Fagni koktejl je mešanica več vrst fagov, ki lahko deluje proti določenemu sevu bakterij, proti več sevom ali proti celotni vrsti bakterij. Priprava mešanice traja dlje časa kakor priprava monofagne terapije, saj je proces priprave, čiščenja in izolacije fagov zahteven. Da bi se izognili nezaželenim učinkom, kot je, recimo, da bakterije razvijajo odpornost na fage, se pacientom dajejo zaporedoma različni fagni koktejli. Tako je možnost, da bakterija razvije odpornost, zelo majhna (Janežič 2019: 6).

2.3.2 Pogostost zdravljenja z bakteriofagi

Zdravljenje s fagi ni dobro znano. Mednarodna literatura vsebuje le nekaj sto poročil o zdravljenju bakterijske okužbe z bakteriofagi pri ljudeh in živalih. Najnovejše objave o terapijah so iz vzhodne Evrope, le nekaj poročil pa je bilo objavljeno v drugih državah. Terapija ni dovolj raziskana in se še vedno porajajo mnoga vprašanja, zato tudi v večini držav ni odobrena. Zdravljenje s fagi je rutinska medicinska praksa v Rusiji, Gruziji in na Poljskem, kjer prav tako lahko nekatere kulture fagov kupimo v lekarni (Štravs 2020, Sulakvelidze, Alavidze in Morris 2001).

2.3.3 Prednosti in slabosti fagne terapije

Prednosti:

- Fag lahko neposredno cilja na bakterijo, ki je povzročitelj bolezni.
- Fagi niso toksični za ljudi, saj ubijajo samo bakterije.
- Izolacija in selekcija vrst fagov je hitra in enostavna, saj jih najdemo povsod v naravi.
- Bakterijske celice počasneje razvijajo odpornost proti bakteriofagom kot proti antibiotikom.
- Virusi so zmožni pogostega mutiranja, tako poskušajo preprečiti odpornost bakterije.
- Fagi večinoma delujejo tudi proti bakterijam, odpornim na antibiotike.

- Med zdravljenjem se fagi razmnožujejo sami, kar pomeni, da je lahko potreben tudi samo en odmerek.
- Bakteriofagi napadajo le telesu nevarne bakterije, le malo motijo telesu potrebne bakterije.
- Fagi niso toksični za rastline, živali in okolje.

Slabosti:

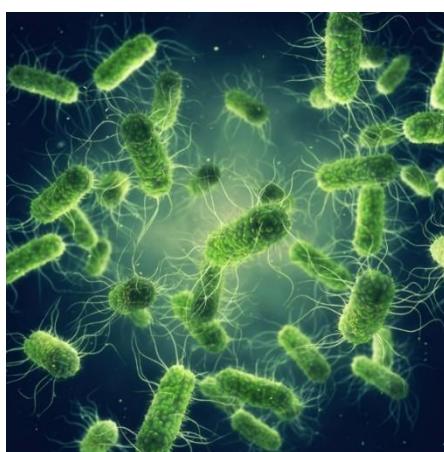
- Primanjkuje ustreznih kliničnih raziskav (ni ustreznih protokolov, ni znano, koliko fagov je treba uporabiti, ni znano, kako dolgo lahko traja zdravljenje, neznani so stranski učinki).
- Fagna terapija lahko povzroči vnetni odziv, ki je lahko tako močan, da se lahko pojavijo hudi stranski učinki, ki lahko pripeljejo do smrti ljudi.
- Včasih je težko najti pravi fag, ki je potreben za zdravljenje.
- Ni znano, ali lahko bakteriofagi škodujejo ljudem in živalim na načine, ki niso povezani s strupenostjo.
- Ni znano, ali lahko terapija s fagi povzroči, da bakterija postane močnejša od bateriofaga, kar lahko v prihodnosti povzroči odpornost na page.
- Priprava fagov za uporabo je lahko zahtevna (Janežič 2019: 12, Seladi-Schulman in Iftikhar 2019).

2.4 BAKTERIJA SALMONELA

Bakterije so skupina enoceličnih mikroskopskih organizmov z dokaj preprosto zgradbo. Sestava bakterijske celice se precej razlikuje od zgradbe celic živali, rastlin in gliv, saj nima celičnega jedra, zato bakterije uvrščamo med prokarionte. Čeprav nimajo jedra, imajo dedno snov, ki se nahaja v citoplazmi. Prav tako so v celicah ribosomi. Imajo tudi membrano (plazmalemo) in celično steno. Nekatere bakterije imajo pile, s katerimi se pritrjujejo na druge celice in si izmenjujejo dedni material in biček, ki je zadolžen za premikanje celice. Bakterije se razmnožujejo v ugodnih življenjskih razmerah, na primer v prostorih, kjer je vlaga, zadostna količina hrane, pomanjkanje kisika ali primerna temperatura. Razmnožujejo se nespolno, torej s cepitvijo (Devetak idr. 2018: 46, <https://ddd.si/bakterije-2/>, <https://ocelici.weebly.com/prokariontska-celica.html>).

Bakterije iz rodu *Salmonella* sp. (Slika 5) so po Gramu negativne palčke. Ime so dobile po bakteriologu Danielu Elmerju Salmonu. Bakterija je velika približno 0,7–1,5 x 2,0 do 5,0 mikrometrov. Kolonije salmonele so okrogle in velike od 2 do 4 mm. Vrsta bakterije iz rodu *Salmonella* sp., ki sva jo uporabljali v eksperimentalnem delu, je *S. Typhimurium*. Salmonela se širi s stikom z okuženimi ljudmi in živalmi. Lahko okuži ljudi, prenaša pa se preko živali. Lahko se recimo okužimo zaradi uživanja okuženega mesa, ki ga pred užitjem toplotno ne obdelamo dovolj. Simptomi, prisotni med obolevanjem, so driska, bolečine v trebuhi, povišana telesna temperatura in bruhanje. Pri večini obolelih simptomi izginejo v nekaj dneh brez večjih zapletov, včasih (pri manj kot 5 % primerov) pa se ne moremo izogniti uporabi antibiotikov, še posebej pri ljudeh iz bolj rizičnih skupin (starejši ljudje, otroci, ljudje s slabšim imunskim sistemom (Farkaš 2016: 10, <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/salmoneloza-okuzbe-s-salmonelami/>).

Za uporabo bakterije salmonele pri eksperimentu sva se odločili, ker je okužba z njo dokaj pogosta. Pogosto se dogaja, da se salmonela nahaja celo v predelanih izdelkih, prodajanih v trgovini. Čokoladni jajčki znanega proizvajalca so zaradi vsebovanja salmonele povzročili ogromno število okužb z omenjeno bakterijo v Evropi. Simptomi so »zoprni« in neprijetni, za bolezen pa ne obstaja zdravilo, ki ga lahko med okužbo zaužijemo, razen antibiotika, ki se za zdravljenje uporablja izredno redko. Uporaba bakteriofagov pri zdravljenju bi nam lahko omogočila preprečevanje simptomov, ki so neprijetni, niso pa dovolj resni, da bi jih redno zdravili z antibiotiki (<https://novice.svet24.si/clanek/novice/svet/62504665e97f2/zaprli-tovarno-ker-se-je-v-jajckih-ni-skrivala-le-igracka-ampak-tudi-salmonela>).



Slika 5: *Salmonella Typhimurium*
(<https://thenativeantigencompany.com/products/salmonella-typhimurium-cells-heat-inactivated/>).

2.5 KAKO LAHKO BAKTERIOFAGI VPLIVAJO NA NAŠO PRIHODNOST

Človeštvu bakterije dandanes predstavljajo ogromno grožnjo, ker so naša zaščita proti njim antibiotiki, ti pa iz dneva v dan zaradi prekomerne uporabe postajajo manj učinkoviti. Bakteriofagi bi nas morda lahko rešili. V prihodnosti bi fage lahko uporabili za zdravljenje bakterijskih okužb, če bi razvili protokole, metode in načine zdravljenja. Tako bi bakterije lahko postale manjša grožnja. Prav tako nam grozijo superbakterije, pred katerimi nimamo zaščite. Fagi bi lahko te bakterije lizirali in jih s tem uničili, zato nam te ne bi več predstavljale nevarnosti in smrt ljudi zaradi njih bi bila manj pogosta. Bakterijske bolezni, ki se sicer ne zdravijo z antibiotiki, kot je recimo salmoneloza, bi lahko zdravili s fagi in s tem torej pridobili zdravilo, ki se lahko uporablja tudi pri okužbah z bakterijami, ki sicer niso smrtno nevarne, simptomi ob okužbi pa so vseeno neprijetni. Bakteriofage bi bilo smiselno vključevati v zdravljenja bakterijskih bolezni v prihodnosti, saj ciljno delujejo na določeno vrsto bakterije in s tem ne povzročajo rezistence bakterij. Laboratorijski testi kažejo na visoko učinkovitost bakteriofagov. Zdravljenje pa bo postalo splošno dostopno šele, ko bodo raziskani vsi dejavniki tveganja fagnih terapij. Nujno je tudi, da se izpostavi ustrezno razmerje med učinkovitostjo in varnostjo takšnega načina zdravljenja.

Mnoga podjetja, med katerimi je tudi slovensko podjetje Jafral, izvajajo različne eksperimente in razvijajo tehnologije, s katerimi bi poskušali bolje spoznati bakteriofage za uporabo v medicini. Po vsem svetu se trudijo postaviti določene protokole, kako zdraviti okužbe s fagi. Z ustreznimi kliničnimi raziskavami bi bakteriofagi morda res lahko zamenjali antibiotike.

3 RAZISKOVALNI DEL

V nadaljevanju bova najprej predstavili postopke in mehanizme dela z bakteriofagi. V drugem delu bova opisali najino eksperimentalno delo v laboratoriju.

3.1 VARNO RAVNANJE V LABORATORIJU

Pri delu v mikrobiološkem laboratoriju sva upoštevali spodaj naštete varnostne napotke.

- Pred vstopom v laboratorij si oblečemo haljo in si nadenemo obujke (laboratorijske natikače).
- Dolge lase spnemo v čop, da nas ne ovirajo pri delu in da jih zaščitimo pred nevarnimi snovmi. Pomembno je zaščititi tudi proizvod pred morebitnim onesnaženjem.
- Med delom nosimo rokavice in si nadenemo zaščitna očala.
- V laboratorij ne prinašamo hrane in pijače.
- Nobenih kemikalij ne uživamo.
- Med eksperimenti se ne dotikamo obraza, ker smo lahko bili v stiku z nevarnimi kemikalijami.

3.2 PRIPRAVA MEDIJA

V nadaljevanju bova predstavili pripravo medijev za izvedbo poskusa.

3.2.1 Tekoč medij

Za pripravo 0,5 l tekočega medija sva uporabili 18,5 gramov BHIB (Brain Heart Infusion Broth) gojišča, ki je za gojenje bakterij zelo bujno gojišče. BHIB-ju sva dodali 0,5 litra destilirane vode in mešanico premešali z magnetnim mešalom. Ko se je medij dodobra premešal in je nastala bistra tekočina brez grudic, sva medij 15 minut avtoklavirali pri 121 °C.

3.2.2 Priprava plošč

Tako kot pri pripravi tekočega medija sva pri pripravi plošč uporabili 18,5 g BHIB in 0,5 l destilirane vode, a sva ji dodali tudi 7,2 g agarja. Tudi to mešanico sva avtoklavirali in jo nato, preden se je strdila, vlili v petrijevke (Slika 4). Pri vlivanju je zelo pomembno, da je

naš prostor sterilен, zato sva vlivanje izvajali ob plinskem gorilniku. Plošče sva pustili na sobni temperaturi, da so se čez noč strdile.



Slika 6: Vlivanje mešanice v petrijevke.

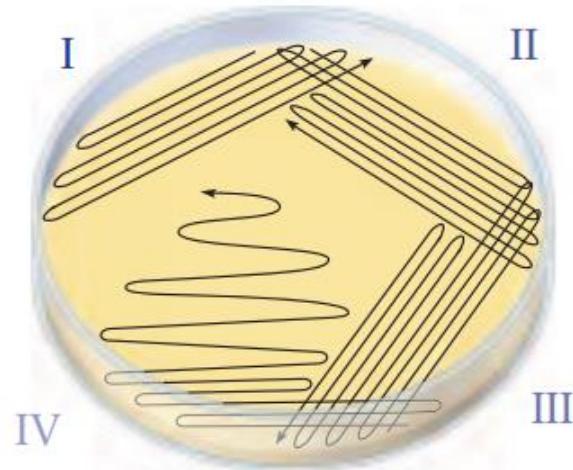
3.2.3 Priprava top agarja

Top agar uporabljamo kot medij za bakterijo, ki jo vlijemo na ploščo, kamor sva kasneje nakapljali bakteriofag. Da bi pripravili top agar, sva uporabili 0,4 grama agarja in temu dodali 100 mL že pripravljenega BHIB medija (18,5 g BHIB + 0,5 l destilirane vode). Medij sva avtoklavirali pri 121 °C za 15 minut in ga shranili na sobni temperaturi do nadaljnje uporabe.

3.3 NACEPITEV BAKTERIJ

Na plošče, ki sva jih pripravili, sva nacepili bakterijo salmonelo. Nacepitev bakterije je potekalo sterilno ob gorilniku. Na ploščo sva bakterije, ki so bile v tekoči kulturi, s sterilnimi ezami (inokulacijske oz. cepilne zanke) razmazali po plošči v štirih smereh (Slika 5). Tak razmaz nam omogoči, da vidimo posamezne kolonije bakterij, zato razmaz imenujemo tudi »razmaz do posameznih kolonij«. Na ta način lahko analiziramo obliko, barvo in strukturo bakterijske celice ter potrdimo, da je zrastla prava bakterija. Nacepljeno ploščo sva čez noč

inkubirali na 37 °C. Po inkubaciji so bile na plošči vidne kolonije bakterij. Te so bile okrogle, rahlo ovalne in bež barve.



Slika 7: Razmaz na plošče
(<https://www.scientistcindy.com/streak-plate.html>).

3.3.1 Gojenje bakterij v tekočem mediju

V predhodno pripravljen medij sva z ezami dodali dve do tri kolonije bakterije s plošče in medij z bakterijo prekonočno inkubirali pri 37 °C in stresali na 220 obratih na minuto, da bi dobili čim večji OD (optical density) oziroma čim večjo gostoto bakterij. Bakterija se je preko noči namnožila, zato je medij postal temnejši. Ker je bila v tem mediju koncentracija bakterij prevelika in sva jo hoteli ujeti v optimalnem delu rasti, sva nekaj prekonočne kulture premestili v novo tekoče gojišče. Da bi vedeli, koliko bakterije je potrebno dodati v nov medij, sva izmerili OD v najinem vzorcu in glede na dobljeno vrednost izračunali, koliko bakterije je treba dodati. Bakterije v mediju sva inkubirali za približno 15 minut in redno merili OD, da bi dobili primerno gostoto bakterij. V najinem primeru je ustrezna vrednost OD 0,5. Naprava za merjenje OD je spektrofotometer. Spektrofotometrija temelji na merjenju absorbcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. V napravi svetloba najprej potuje skozi vzorec, del svetlobe se pri tem absorbira, ostala svetloba pa pride do detektorja. Ko merimo OD, ugotovimo motnost vzorca oziroma koliko bakterije je v vzorcu in v kateri fazi rasti je.

3.4 INFICIRANJE BAKTERIJE Z BAKTERIOFAGOM

Ko sva dobili ustrezен OD v svežem mediju, sva v bakterijsko kulturo dodali bakteriofag in nato mešanico inkubirali pri 37°C in stresali na 220 obratih na minuto. Količino bakteriofaga sva preračunali tako, da je bilo v končni mešanici razmerje med bakterijskimi celicami in bakteriofagom 1 : 1. Že po uri in pol inkubacije je nastopila liza bakterije. Vidne so bile nitke (lizat), ki so bile pravzaprav ostanki bakterije (ko bakterija poči, sprosti ves svoj material). Nastala mešanica se imenuje lizat in je mešanica bakterij ter bakteriofagov. Da sva se znebili ostankov bakterij, sva skozi sterilni filter filtrirali material (Slika 8) in dobili bakteriofag v sterilnem mediju.



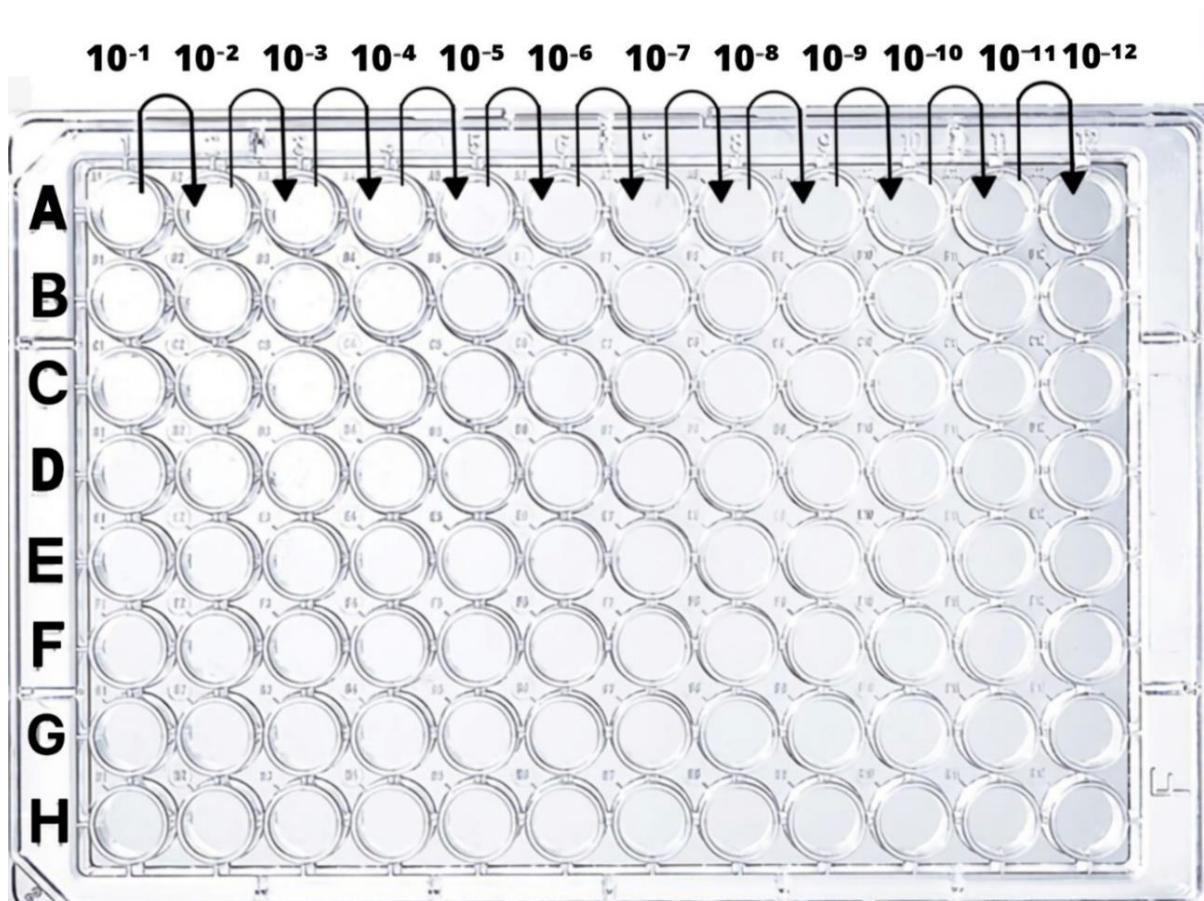
Slika 8: Filtracija lizata.

3.5 DODAJANJE BAKTERIJE TOP AGARJU

Že pripravljen top agar sva segreli v mikrovalovni pečici, da se je popolnoma raztopil, ga nalili v centrifugirke in ga ohladili v vodni kopeli na 55°C . Nato sva top agarju dodali še bakterijo, vsebino premešali in vlili na plošče. Plošče sva pustili na sobni temperaturi in počakali 15 minut, da so se strdile.

3.6 SERIJSKE REDČITVE BAKTERIOFAGA

Uspešnost gojenja bakteriofaga sva žeeli preveriti s testom titracije oz. po angleško Plaque Forming Units (PFU). Najprej je bilo potrebno pripraviti redčitve vzorca (našega faga). Redčenje je postopek, ki zmanjša koncentracijo snovi v raztopini. Redčenje je pomembno zato, da lahko na plošči plake štejemo, sicer to ne bi bilo mogoče. Serijske redčitve sva pripravili v mikrotitrski plošči v sterilnem okolju. Za redčitve sva uporabili mikrotitersko ploščico z vdolbinicami (Slika 9). V 180 µL medija sva dodali 20 µL bakteriofaga, nato pa sva prenašali 20 µL v naslednje vdolbinice z 180 µL medija tako dolgo, dokler nisva dobili sedem vdolbinic z različnimi koncentracijami (v vsaki naslednji vdolbinici je bila koncentracija desetkrat manjša).



Slika 9: Serijske redčitve
(<https://www.ddbiolab.com/product/0C-04-08?language=en>).

3.7 TITRACIJA FAGA

Ko sva do konca pripravili redčitve, sva se lotili titracije. Titracija je proces za določanje titra bakteriofaga. Rezultat je titer (PFU/mL). PFU pomeni »enote za oblikovanje plakov« (PFU – plaque forming units). Na pokrov petrijevk sva narisali mrežo, ki sva jo razdelili na sedem delov. Tako sva ločili različne redčitve, ki sva jih nakapljali na ploščo. V vsak kvadratek sva z mikropipeto dodali tri kapljice redčenega vzorca. Celoten proces sva opravili ob gorilniku. Ko so se plošče posušile, sva jih inkubirali na 37 °C preko noči. Po končani inkubaciji sva lahko opazili predele na ploščah, kjer je bakteriofag, ki sva ga nakapljali, »pojedel« bakterijo. Spremembe so bile vidne kot luknje v plošči. Zaradi redčitev sva plake lahko tudi prešteli in izračunali titer (koncentracijo) bakteriofaga.

3.7.1 Titer bakteriofaga

Titer je koncentracija faga, ki jo lahko izračunamo v enotah za tvorbo plakov (PFU) na mililiter. Izračunamo ga po enačbi:

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{PFU}}{\text{mL}} = \text{število plakov} \times \text{redčitev} \times 200,$$

pri čemer je

- število plakov = povprečje treh rezultatov na eni redčitvi (tri kapljice);
- redčitev = redčitev, na kateri so števni plaki;
- 200 = faktor redčenja, ki ga upoštevamo, da dobimo rezultat v mililitrih (PFU/mL).

4 REZULTATI

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati, ločeni po korakih eksperimentalnega dela.

4.1 NACEPITEV BAKTERIJ

Na spodnjih slikah sta erlenmajerica z BHI medijem pred dodatkom bakterije in erlemajerica po dodatku bakterije ter stresanju na 37 °C preko noči. Medij je pred dodatkom bakterije bistrejši in temnejše barve, po dodani bakteriji pa postane moten in svetlejše barve (Slika 10).



Slika 10: Medij pred in po dodatku bakterije.

Po cepitvi bakterij na plošče so vidne posamezne kolonije salmonele. Kolonije bakterije so okrogle, opazi se tudi dvignjen, ovalen profil, bakterije so rjave/bež (Slika 11).



Slika 11: Plošča z bakterijo salmonelo. Precep do posameznih kolonij.

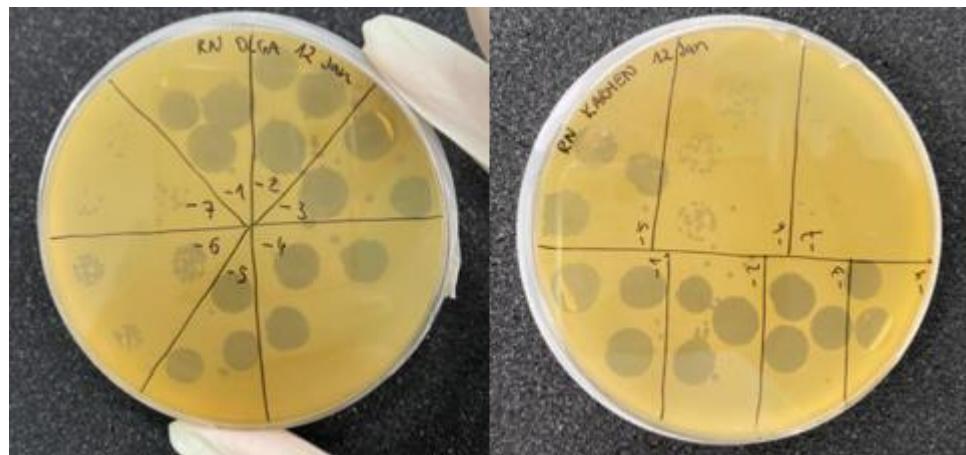
4.2 LIZA BAKTERIJ

Po dodatku faga v medij z bakterijo poteče liza bakterije in medij se zbistri, prisotne so nitke, ki po obliki spominjajo na paglavce (Slika 12). Prisotnost nitk je posledica počene bakterijske stene – bakterija sprosti ves svoj material.



Slika 12: Liza bakterij z vidnimi nitkami.

Na sliki sta plošči s top agarjem in bakterijsko kulturo, na kateri sva nakapljali vzorec z bakteriofagom. Vidimo lahko prisotne plake, ki so nastali zaradi delovanja bakteriofagov na salmonelo (Sliki 13 in 14).



Slika 13: Plošči s top agarjem in bakterijsko kulturo.



Slika 14: Vidni plaki.

Zaradi redčitev sva plake lahko prešteli in izračunali titer po enačbi iz točke 3.7.

Upoštevali sva lahko le zadnji dve redčitvi.

Rezultat 1: $2,27 \times 10^{10}$ PFU/mL

Rezultat 2: $6,13 \times 10^9$ PFU/mL

Koncentraciji sta standardni za izbran bakteriofag.

Zgoraj izračunan titer sodi med visoke titre, kar pomeni, da bakteriofag deluje močno in v *in vitro* pogojih zelo uspešno napade bakterijo salmonelo.

5 RAZPRAVA

Ob zaključku želiva preveriti štiri zastavljene hipoteze.

Hipoteza 1:

Bakteriofag bo pri ustreznih pogojih liziral bakterijo salmonelo. → DRŽI.

S poskusom sva dokazali, da bakteriofag, ki je bil uporabljen v eksperimentu, ob ustreznih (*in vitro*) pogojih lahko lizira bakterijo salmonelo. To je bilo opaženo v bistrem gojišču, kjer so bile vidne nitke oziroma lizat. Liza bakterije je bila zopet dokazana ob titraciji (PFU/mL). Na plošči so po dodajanju faga nastali plaki oziroma prazni prostori, kjer je fag uničil bakterijo.

Hipoteza 2:

Liza bakterijskih celic se bo pokazala kot bistro gojišče z nitkami. → DRŽI.

Ko sva bakteriofage dodali gojišču z bakterijami, se je medij zbistril in nastale so bele nitke. Nitke so ostanki mrtve bakterije. Te nam dokazujejo, da so bakterije zaradi faga lizirale in njihove celice popokale.

Hipoteza 3:

Salmonelozo lahko pozdravimo z ustreznim bakteriofagom *in vitro*. → DELOMA DRŽI.

Z eksperimentom sva dokazali, da bakteriofag res lahko uniči bakterijo salmonelo pod ustreznimi pogoji v laboratoriju. A to ne pomeni, da lahko s tem fagom ozdravimo ljudi, okužene s salmonelo, saj bi za to morali izvajati klinične raziskave na ljudeh. Potrebovali bi ustrezeno fagno terapijo in ustrezen laboratorij. Iz literature sva izvedeli, da lahko fagna terapija ozdravi bakterijske okužbe. V nekaterih državah se ta že uspešno izvaja in ozdravlja ljudi.

Hipoteza 4:

Bakteriofagi bi lahko nadomestili uporabo antibiotikov pri zdravljenju bakterijskih okužb.
→ DELOMA DRŽI.

Večina držav sveta še vedno za zdravljenje bakterijskih okužb uporablja antibiotike, vseeno pa sva v literaturi zasledili, da nekatere vzhodnoevropske države že vključujejo bakteriofagne terapije v humano zdravstvo. Razlog za odsotnost fagnih terapij v splošnem zdravstvu večine držav je zagotovo pomanjkanje kliničnih raziskav na ljudeh. Znanstveniki napovedujejo, da bo ob naraščajoči rezistenci bakterij fagna terapija lahko ustrezeno nadomestila antibiotična zdravljenja. Prednost tega načina terapije je zagotovo to, da ciljno uničijo le določeno vrsto bakterije, kar pomeni, da imajo ničen vpliv na rezistenco bakterij. Poleg tega nasprotno od antibiotikov ohranijo črevesno mikrofloro, ki je ključna za zdravje in dobro počutje človeka, nespremenjeno, brez dodatne uporabe probiotikov. Glede na potek dogodkov je verjetno le vprašanje časa, kdaj bo tovrstna terapija dostopna tudi v Sloveniji.

6 ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi sva izpolnili najine cilje. Spoznali sva bakteriofage in njihovo nalogo v biosistemu ter jih z literaturo in eksperimentalnim delom predstavili v raziskovalni nalogi. Opisali sva eksperimentalno delo z bakteriofagom in bakterijo salmonelo v laboratoriju. S pomočjo literature in poskusa sva raziskali, kako deluje bakteriofag na primeru bakterije salmonele. Odkrili sva, da poteče litični cikel in bakteriofag lizira bakterijo. Lizirane bakterije so bile v eksperimentu vidne kot bele nitke v mediju, to so bili ostanki bakterij. Proučili sva bakteriofagno terapijo in njeni uporabo. Fagna terapija ni dobro raziskana, manjkajo raziskovanja in protokoli, ki bi čez čas omogočili uporabo bakteriofagov v humani medicini. Dosedanje raziskave napovedujejo, da ima fagna terapija za zdravljenje bakterijskih okužb velik potencial, še vedno pa obstajajo pomanjkljivosti in nepopolnosti terapije, saj zaenkrat uspešno lahko potrdimo le delovanje bakteriofagov v *in vitro* pogojih. Ugotavljali sva, ali lahko bakteriofagi v prihodnosti delno ali popolnoma nadomestijo antibiotike. Meniva, da bi fagi lahko v prihodnosti zamenjali antibiotike pri zdravljenju bakterijskih okužb, saj antibiotiki zaradi naraščajoče rezistence bakterij izgubljajo svoj učinek. Z več raziskavami in z napredkom na področju fagnih terapij bi lahko to vrsto virusov uporabljali kot biološko učinkovino za zdravljenje bakterijskih okužb. Tako naraščajoča odpornost bakterij ne bi več predstavljala grožnje, saj so fagi specialisti, ki delujejo ciljno na eno vrsto, prav tako pa so kot bakterije sposobni mutacij. Za uvedbo fagnih terapij je nujno podrobno raziskati dejavnike tveganja terapij. Zelo pomembno je, da se postavi ustrezno razmerje med učinkovitostjo in varnostjo takšnega načina zdravljenja. Področje terapij z bakteriofagi se pospešeno razvija in z uvedbo ustreznih protokolov je verjetno le še vprašanje časa, kdaj bo bakteriofagna terapija dostopna tudi pri nas.

Med raziskovanjem bakteriofagov sva pridobili ogromno novega znanja. Med pisanjem teoretičnega dela sva spoznali mnogo pojmov, pojavov in mikrobiološkega znanja, ki nama bodo prišli prav še velikokrat. Eksperimentalno delo nama je dalo priložnost nove izkušnje, ki jo najstniki sicer doživijo bolj poredko. Naučili sva se varnega dela v laboratoriju, načina izvajanja poskusov in različnih metod, ki se v biologiji uporabljajo. Za izkušnjo sva zelo hvaležni, ker nama je le-ta dala novo znanje, veštine in ambicije, ki nama bodo priše prav v nadalnjem izobraževanju in življenju.

LITERATURA IN VIRI

- *Bakterije.* Dostopno na spletni strani: <https://ddd.si/bakterije-2/> [25. 1. 2023].
- Devetak, I., Rozman, L., Sopotnik, M., Susman, K., Fon, D. (2018). *Dotik narave 7. Učbenik za naravoslovje v 7. razredu osnovne šole.* Ljubljana: Rokus Klett.
- Drinovec, B. in Stopar, D. (2001). *Bakteriofagi: za študente medoddelčnega študija mikrobiologije, študijsko gradivo.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.
- Farkaš, M. (2016). *Izolacija in genotipizacija bakterije Salmonella enterica iz plazilcev v ujetništvu: diplomsko delo.* Univerza v Ljubljani: Pedagoška fakulteta. Dostopno na spletni strani: http://pefprints.pef.uni-lj.si/3852/1/Diplomsko_delo_Metka_Farka%C5%A1.pdf [25. 1. 2023].
- Janežič, T. (2019). *Protibakterijska terapija z bakteriofagi: diplomsko delo.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Dostopno na spletni strani: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=121162&lang=slv> [20. 1. 2023].
- *Litični cikel.* Dostopno na spletni strani: <https://www.termania.net/slovarji/96/mikrobioloski-slovar> [25. 1. 2023].
- Milton, W. T. (2014). *The Discovery of Bacteriophage and the d'Herelle Controversy.* Dostopno na spletni strani: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-07758-1_4 [25. 1. 2023].
- *Prokariontska celica.* Dostopno na spletni strani: <https://ocelici.weebly.com/prokariontska-celica.html> [25. 1. 2023].
- *Salmoneloza – okužbe s salmonelami.* NIJZ. Dostopno na spletni strani: <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/salmoneloza-okuzbe-s-salmonelami/> [22. 1. 2023].
- Seladi-Schulman, J. in Iftikhar, N. (2019). *What is phage therapy?* Dostopno na spletni strani: <https://www.healthline.com/health/phage-therapy> [22. 1. 2023].
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J. G. Jr. (2001). *Bacteriophage therapy.* *Antimicrob Agents Chemother.* Mar; 45 (3): 649–59. doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001. Dostopno na spletni strani: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90351/> [25. 1. 2023].

- Štravs, S. (2020). *Naravna alternativa antibiotikom*. V: Revija Gea. Dostopno na spletni strani: <https://www.mladinska-knjiga.si/revije/gea/clanki/zdravje/naravna-alternativa-antibiotikom> [25. 1. 2023].
- *Zaprli tovarno, ker se v jajčkih ni skrivala le igrača, ampak tudi salmonela*. Novice. Svet 24. Dostopno na spletni strani: <https://novice.svet24.si/clanek/novice/svet/62504665e97f2/zaprli-tovarno-ker-se-je-v-jajckih-ni-skrivala-le-igracka-ampak-tudi-salmonela> [22. 1. 2023].