

54. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2020

II. gimnazija Maribor

Trg Miloša Zidanška 1, 2000 Maribor

Bakteriofagi v boju proti bakteriji *Serratia marcescens*

Področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtorja: Miša Pintarič, Kaja Zupanič

Mentorja: dr. Jure Škraban, dr. Sandra Janežič

Maribor, 2020

54. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2020

II. gimnazija Maribor

Trg Miloša Zidanška 1, 2000 Maribor

Bakteriofagi v boju proti bakteriji *Serratia marcescens*

Področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtorja: Miša Pintarič, Kaja Zupanič

Mentorja: dr. Jure Škraban, dr. Sandra Janežič

Maribor, 2020

KAZALO

Kazalo vsebine

KAZALO	5
Kazalo vsebine	5
Kazalo tabel	6
Kazalo slik	6
Kazalo grafov	6
POVZETEK	7
ZAHVALA	8
1. UVOD	9
1.1. Namen	9
1.2. Pregled literature	10
1.2.1. Odpornost bakterij na antibiotike	10
1.2.2. Biofilm	11
1.2.3. <i>Serratia marcescens</i>	12
1.2.4. Bakteriofagi	14
1.2.5. Fagna terapija	15
1.3. Hipoteze	16
2. METODOLOGIJA DELA	17
2.1. Seznam materialov	17
2.1.1. Pufri, gojišča, ostale raztopine	17
2.1.2. Laboratorijski pribor	18
2.1.3. Laboratorijske aparature	18
2.2. Laboratorijski postopki	19
2.2.1. Pridobitev in izolacija fagov	19
2.2.2. Obogatitev bakteriofagov	20
2.2.3. Določanje števila bakteriofagov	20
2.2.4. Testiranje delovanja bakteriofagov na tvorbo biofilma	22
3. REZULTATI	23
4. RAZPRAVA	29
5. ZAKLJUČEK	32
6. VIRI IN LITERATURA	33

Kazalo tabel

Tabela 1: Število plakov (PFU) prešteih na ploščah	21
Tabela 2: Koncentracija fagov v pufri, ki smo jih uporabili v nadaljnjih poskusih	23
Tabela 3: Podatki izmerjene absorbance za fag A	25
Tabela 4: Podatki izmerjene absorbance za fag C.....	26
Tabela 5: Koncentracije faga A uporabljene v poskusu inhibicije tvorbe biofilma.....	26
Tabela 6: Koncentracije faga C uporabljene v poskusu inhibicije tvorbe biofilma	27

Kazalo slik

Slika 1: Kruh z bakterijo (Wikimedia, 2014).....	14
Slika 2: Bakteriofagi, pripeti na bakterijsko celico (GEN, 2018)	14
Slika 3: Bogatitev fagov (lastni vir)	20
Slika 4: Plaki (lastni vir).....	21
Slika 5: Gojišči na katerem so vidni plaki, cone lize, ki vsebujejo bakteriofage (lastni vir) ...	23
Slika 6: Učinek bakteriofaga A in C na tvorbo biofilma <i>S. marcescens</i> (lastni vir)	24

Kazalo grafov

Graf 1: Količina biofilma pri različnih koncentracijah bakteriofagov A	28
Graf 2: Količina biofilma pri različnih koncentracijah bakteriofagov C	28

POVZETEK

Serratia marcescens je po Gramu negativna patogena bakterija, ki sodi v družino enterobakterij. Povzroča bolnišnične in oportunistične okužbe sečil in dihal (Gubina in Ihan, 2002), kjer je sposobna tvorbe biofilma, ki bakterijskim celicam nudi dodatno zaščito pred antibiotiki. Proti okužbam, ki jih povzročajo bakterije, bi lahko uporabljali viruse (bakteriofage), ki napadajo in uničujejo bakterije. V okviru raziskovalne naloge smo preverili ali lahko z bakteriofagi zmanjšamo možnost tvorbe biofilma *S. marcescens* na površinah. Preverili smo še ali lahko bakteriofagi učinkovito uničujejo tudi celice v že nastalih biofilmih. Dva bakteriofaga (A in C) specifična za *S. marcescens* smo izolirali in namnožili iz vode iz čistilne naprave. Bakteriofag A je uspešno preprečil nastanek biofilma *S. marcescens*. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da bakteriofagi poleg učinkovitega uničevanja posamezne planktonske celice, preprečujejo tudi nastanek biofilma.

ZAHVALA

Raziskovalno delo naju je zelo veselilo. Meniva, da sva pridobili ogromno novih znanj in navdiha za nadaljnjo laboratorijsko delo. Bilo je zelo zanimivo in v čast nama je bilo delati s profesionalno opremo v profesionalnem laboratoriju.

Delo pa ne bi bilo uspešno brez najinih mentorjev. Iskreno se zahvaljujema najinemu mentorju, profesorju biologije dr. Juretu Škrabanu za podano biološko znanje, in najini mentorici iz Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano dr. Sandi Janežič, ki je z nama opravljala eksperimentalno delo. Bila nama je pripravljena pomagati tudi pri usmerjanju raziskovalne naloge in naju naučila upravljati z laboratorijskimi pripomočki. Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano nama je omogočil opravljanje eksperimentalnega dela v njihovih prostorih in priskrbel potrebni material.

Prav tako bi se radi zahvalili najinemu mentorju, da nama je priskrbel vodo iz čistilne naprave in naju na najini raziskovalni poti usmerjal ter spodbujal.

1. UVOD

Bakteriofagi (fagi) so virusi, ki okužijo bakterijske celice. Zanje je značilno, da so vrstno specifični, saj lahko inficirajo samo bakterije določene vrste. V osnovi so fagi sestavljeni iz proteinske glave oz. kapside, ki vsebuje dedni material, vratu in nog (Hyman and Abedon, 2009).

Bakteriofagi prepoznajo gostujoč organizem, injicirajo vanj svoj dedni material in uporabijo bakterijske mehanizme za sintezo novih fagov. Po končani sintezi fagnih delcev in sestavljanju le-teh, se fagi z lizo sprostijo bakterijske celice v okolje (Gadagkar in Gopinathan, 1980).

Dandanes se zaradi pretirane in nepravilne uporabe antibiotikov pojavlja vse več bakterij, ki postanejo odporne na antibiotike, zato se intenzivno iščejo nove metode zdravljenja bolezni, ki jih povzročajo bakterije. Bakteriofagna terapija je ena izmed možnih rešitev, ki bi omogočala zdravljenje nevarnih bakterijskih okužb (Bratkovič in Preželj, 2008). Uporaba fagov bi bila v primerjavi z uporabo antibiotikov bolj varna in specifična, saj ne bi imela vpliva na ostale bakterije v gastrointestinalnem traktu (Mizoguchi in sod., 2003).

Serratia marcescens je bakterija, ki povzroča številne težave, ki jih bova obrazložile v nadaljevanju. Zanimalo naju je kakšen učinek imajo bakteriofagi v medsebojnem delovanju z bakterijo *Serratia marcescens*.

1.1. Namen

Cilj raziskovalne naloge je bil poiskati odgovor na vprašanje: Ali lahko bakteriofage specifične za *S. marcescens* izoliramo iz vode iz čistilnih naprav, jih namnožimo v večji količini, ter uporabimo za uničenje bakterijskih celic in nastanek biofilma.

Z raziskovalno nalogo smo najprej želeli ugotoviti, ali se v odpadni vodi, pridobljeni iz čistilnih naprav, nahajajo bakteriofagi proti bakteriji *S. marcescens*. Odpadne vode so običajno tiste, ki vsebujejo največ patogenih mikroorganizmov. Fage najdemo v okoljih, kjer se nahajajo tudi njihove gostiteljske bakterije. Več kot se v določenem okolju nahaja gostiteljskih bakterij, več

je tudi bakteriofagov. Za delovne organizme smo izbrali klinični izolat bakterije *S. marcescens*, ki je pogosta povzročiteljica okužb pri ljudeh, tako v bolnišničnem, kot tudi domačem okolju. Za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo bakterije, se uporabljajo antibiotiki. Vendar pa se danes predvsem zaradi prevelike in nepravilne uporabe antibiotikov pojavlja vedno več bakterij, ki postajajo odporne na antibiotike. Bakterija *S. marcescens* je pogosto odporna na številne antibiotike, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb, in tudi na različna razkužila (opisani so izbruhi okužb v bolnišničnem okolju, vir katerih so bila s *S. marcescens* kontaminirana razkužila (Mahlen, 2011).

Sklepali smo, da se bakterija nahaja v odpadni vodi in da bomo v odpadni vodi našli tudi bakteriofage. Želeli smo eksperimentalno preveriti, ali lahko izolirane bakteriofage namnožimo v dovolj veliki količini in če bakteriofagi preprečijo nastanek biofilma. V primeru, da bi bakteriofagi lahko preprečevali nastanek ali celo uničili biofilme, je to eden od načinov, ki se intenzivno raziskuje kot alternativa antibiotikom za zdravljenje bakterijskih okužb, alternativa razkužilom s katerimi bi dekontaminirali kontaminirane površine ali enostavneje uničili bakterije v biofilmih, ali fagna terapija, pri kateri bi namesto antibiotikov ljudem aplicirali fagne pripravke, ki bi uničili patogene bakterije.

1.2. Pregled literature

1.2.1. Odpornost bakterij na antibiotike

Odpornost bakterij na antibiotike je ena največjih težav v zdravstvu, kar je poudarila tudi Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) leta 2012. Strokovnjaki so namreč ocenili, da naj bi zaradi odpornih bakterij vsako leto v Evropski uniji umrlo okoli 25 000 ljudi, po vsem svetu pa kar 700 tisoč ljudi (NLZOH, 2018; Siol, 2018).

Glavni razlog za tako veliko število žrtev je predvsem neustrezna uporaba antibiotikov, enega najpomembnejših odkritij v medicini 20. stoletja. Odkritje penicilina leta 1928 in njegova široka uporaba v kasnejših letih sta veliko pripomogla k zdravljenju infekcijskih bolezni in pozitivno vplivala na njihov izid, saj se je smrtnost ljudi z bakterijskimi okužbami zaradi uporabe antibiotikov zelo zmanjšala. Okužbe, ki jih najpogosteje zdravimo z antibiotiki, so okužbe sečil,

angina, bakterijska pljučnica, okužbe ran in druge okužbe. Infekcijske bolezni povzročajo mikroorganizmi med katerimi so najpogostejše bakterije in virusi. Vendar antibiotiki delujejo le na prve in se zato uporabljajo le za zdravljenje bakterijskih okužb (NLZOH, 2018).

Prisotnost antibiotikov v telesu nemalokrat sprožijo mehanizme, s katerimi bakterija postane odporna proti njim. Posledično se ob ponovitvi okužbe lahko zgodi, da na odporno bakterijo antibiotik ne bo več učinkoval. Odpornost bakterij proti antibiotikom je znana približno toliko časa kot antibiotiki. Na ta način se bakterija brani pred vplivi okolja in bori za svoj obstanek. O odpornosti govorimo takrat, ko bakterijski sev ni občutljiv za koncentracijo antibiotika, ki jo dosežemo na mestu okužbe z običajnim odmerjanjem (Siol, 2018).

Učinkovitost antibiotikov ogroža hiter razvoj rezistentnih bakterij. Malo manj kot stoletje po prvi uporabi antibiotikov za zdravljenje so bakterijske okužbe ponovno postala grožnja. Bakterije so socialna bitja, kar pomeni, da si informacije zapisane na kromosomih in plazmidih med seboj izmenjujejo in s tem širijo rezistenco na antibiotike. Ta pa se lahko pojavi tudi naključno oziroma z mutacijami. Prav tako pa rezistenco bakterij na antibiotike pripisujejo pomanjkanju razvoja novih zdravil in metod zdravljenja v farmacevtskih podjetjih (Lee Ventola, 2015).

Bakterije postajajo rezistentne na antibiotike zaradi njihove prekomerne in nepravilne rabe. Na odpornost bakterij proti antibiotikom, ki so rešili milijone življenj, delujejo tudi drugi dejavniki, kot so staranje prebivalstva in večanje števila bolnikov z zmanjšano odpornostjo. Zato mora biti uporaba antibiotikov pravilna in racionalna, predpiše pa jih lahko predpiše le zdravnik, ki po pregledu bolnika presodi ali gre za bakterijsko okužbo ali ne (NLZOH, 2018, Siol, 2018).

1.2.2. Biofilm

Biofilmi so večcelične skupnosti bakterij, gliv ali protistov, v kateri so celice zlepljene med sabo ali pritrjene na podlago. Zanje je značilna tvorba matriksa iz zunajceličnih polimernih snovi (EPS), ki mikroorganizmom biofilma omogoča, da ostanejo skupaj. Velikost biofilma je odvisna predvsem od okolja v katerem nastane in vrste organizma, ki EPS producira. Mikroorganizmi v biofilmu so skupaj odpornejši proti spremembam v okolju, kot so

pomanjkanje vode, sprememba pH in njim nevarnim substancam (npr. antibiotikom), saj EPS deluje kot ščit, ki jih varuje. Biofilm lahko nastane iz ene same celice in bi zato moral biti klonaska populacija, vendar ga pogosto sestavljajo fenotipsko različne podpopulacije. Organizmi v biofilmih se fenotipsko razlikujejo od prosto plavajočih predstavnikov iste vrste, ker se pri njih izrazijo geni, ki omogočajo tvorbo EPS, medcelično komunikacijo in prilagajanje na okolje (Lopez in dr., 2010, Vidyasagar, 2016).

Biofilmi se lahko tvorijo na skoraj vsaki površini, zato ni čudno, da vplivajo na številne vidike človeškega življenja. Nastanejo lahko na medicinskih pripomočkih, kot so vsadki ali katetri, kar posledično vodi do okužb, določene vrste pa rastejo na človeških tkivih. Ocenjuje se, da so odgovorni za 80% okužb v telesu, te pa so za razliko od okužb s prostimi organizmi veliko težje odpravljive. Bakterije znotraj biofilma so odpornejše na antibiotike ter druga biološka in kemična sredstva, kar v kombinaciji s splošnim povečanjem odpornosti bakterij na antibiotike predstavlja še dodatno skrb. Vendar biofilmi na človeških površinah niso vedno škodljivi. Na zobnih oblogah pogosto določajo prisotnost ali odsotnost bolezni, z nekaterimi živalmi pa živijo v simbiozi. Uporabljajo se pri čiščenju voda, obdelavi težkih kovin, eksplozivov in radioaktivnih snovi.

V zadnjih desetletjih je vse več raziskav namenjenih proučevanju in razumevanju biofilmov, iskanje novih strategij za boj proti njim pa igra ključno vlogo, saj so okužbe z biofilmi pogoste (Vidyasagar, 2016).

1.2.3. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je po Gramu negativna bakterija, ki povzroča infekcije ljudi, rastlin, insektov in živali. Sprva so verjeli, da ni patogena. Trenutno je znano, da *S. marcescens* povzroča okužbe oči, pljuč, sečil in krvnega obtoka. Najnovejša poročila kažejo, da je patogena v 2,5–7,7% okužb, povezanih z urinskim ali žilnim katetrom. Samo v ZDA se vsako leto po ocenah zgodi 80.000 okužb krvnega obtoka preko katetrov, v katerih se bakterije pogosto naselijo v obliki biofilmov. Ti postanejo vir bakterij, ki se konstantno sproščajo v krvni obtok. Biofilmi, kot sva omenili že prej, so odporne strukture sestavljene iz celic in njihovih zunajceličnih metabolitov, ki celicam nudijo dodatno zaščito pred zunanjimi dejavniki.

Sposobnost bakterije *S. marcescens*, da tvori biofilme, prispeva k njeni patogenosti. Bakterije v biofilmih kažejo tudi povečano odpornost na protimikrobna sredstva in različna razkužila (Ray, 2017).

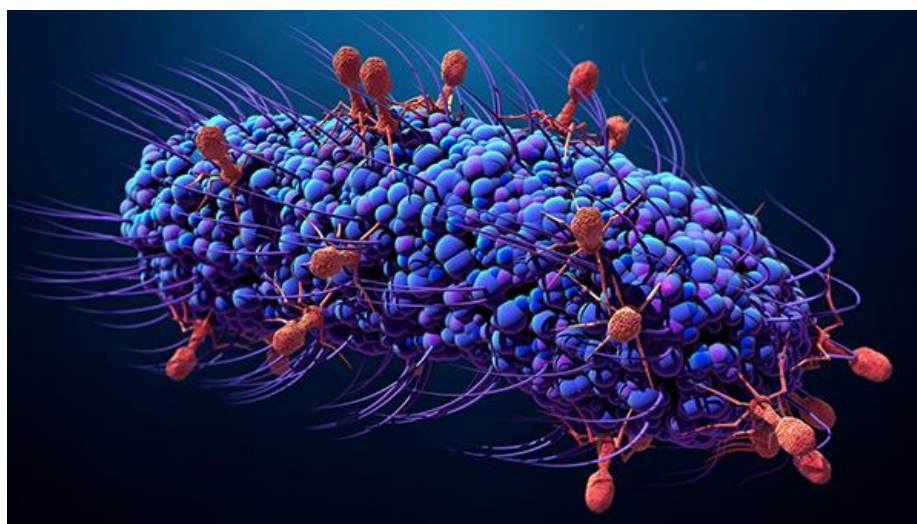
Zanimivo odkritje: V začetku julija 1819 se je v provinci Padove v Italiji zgodil fenomen, ki je zmotil številne kmete na tem območju, zlasti v mestu Legnaro. To poletje je bilo toplejše in bolj vlažno kot običajno, in polenta, jed iz koruzne moke, je postala rdeča. Vraževerni kmetje so se bali »krvave polente«, za katero so verjeli, da je diabolična. Družine niso hotele ostati v domovih, kjer je bila polenta razbarvana, in nek kmet je zaprosil duhovnika, da bi osvobodil njegov dom pred »zli duhovi«. V to so vpletli tudi policijo, in jo prosili, naj ta pojav razišče. Ti so delo naložili komisiji profesorjev z Univerze v Padovi. Farmacevt Bartolomeo Bizio je proučeval pojav ne glede na komisijo Univerze v Padovi in izvedel poskuse, v katerih je ugotovil, da je rdeča pigmentirana polenta naravni pojav. Ugotovitev je objavil anonimno, avgusta 1819. Bizio je v teh in poznejših poskusih uspešno gojil organizem na svežo polento in ugotovil, da se lahko rdečkasto razbarvanje polente pojavi v manj kot 24 urah. Bizio uradno ni objavil svojih rezultatov do leta 1823, ko je v svojem prispevku določil, da je bil vzrok za rdečo polento organizem, za katerega je verjel, da je gliva, ki ga je poimenoval *Serratia marcescens*, po italijanskem fiziku Serafinu Serratiju. Njegov opis rodu *Serratia* je bil "majhne, brez stebelne glive; polkrožne kapsule, ki se pojavljajo v grozdih." Njegov opis *S. marcescens* je bil "zelo tanek mehurček, napolnjen sprva z roza, nato z rdečo tekočino." Bizio je opazil, da se bodo na koruzni moki pojavile majhne rdeče lise, se povečale in se sčasoma združile v rdečkasto maso želatine. Te rdeče lise - kolonije - so očitno izgledale kot "neskladne glive."



Slika 1: Kruh z bakterijo (Wikimedia, 2014)

1.2.4. Bakteriofagi

Bakteriofagi so virusi, ki jih je 1917 odkril d'Herelles. Zanje je značilno, da se podvojujejo izključno v bakterijah. Sestavljeni so iz proteinske kapsule, večinoma z repastim nastavkom, ki v svoji notranjosti vsebuje DNK. Z repastim delom se fag pritrdi na bakterijsko membrano, ki se na tem delu raztopi. Po njem fag spusti v bakterijo svojo DNK, ki takoj sproži sintezo novih fagov. 20-25 minut kasneje se skozi bakterijsko membrano v okolico sprostijo novi fagi (Leksikon Cankarjeve založbe, 1976).



Slika 2: Bakteriofagi, pripeti na bakterijsko celico (GEN, 2018)

Skoraj povsod, kjer so mikrobi, obstajajo bakteriofagi. Ti mikroorganizmi so med najštevilčnejšimi na našem planetu. Zdravila so dobro znana, na primer, s stafilokoknim bakteriofagom, vendar je bil njegov učinek na potek mikrobne okužbe malo raziskan. Nekateri strokovnjaki celo menijo, da je uporaba takšnih zdravil tvegana (Portnov, 2018).

Bakteriofagi so specifični. To pomeni, da lahko okužijo samo bakterije določene vrste oziroma samo točno določene seve. Sevi so skupine organizmov znotraj vrste, ki so si genetsko zelo sorodni. Bakteriofagi niso sposobni samostojnega preživetja, zato se razmnožujejo s pomočjo gostitelja (Tovornik, 2017).

Lahko jih uporabljamo kot dostavne sisteme za proteine, DNA cepiva in za gensko zdravljenje. Fag (običajno M13 fag E.coli) lahko nosi antigen cepiva na površini, t.i. fagni prikaz, ali pa vsebuje DNA zapis za cepivo, ki je vstavljen v genom faga (Cegnar in sod., 2007).

1.2.5. Fagna terapija

Bakteriofagna terapija je terapija, pri kateri uporabljamo fage ali njihove sestavne dele za zdravljenje bakterijskih okužb. Predstavlja alternativo antibiotikom in kaže potencialne zdravljene smrtne bolezni, ki jih povzročajo po gramu negativne bakterije. Na začetku je fagna terapija predstavljala možnost zdravljenja bakterijskih okužb in se je tudi uporabljala v Vzhodni Evropi (Housby in Mann, 2009). Že začetni poskusi leta 1919 so se izkazali za uspešne. Bolniki so si z uporabo fagov opomogli že po 24 – 48 urah. Pa tudi kasnejše raziskave so pokazale, da se bakteriofagi lahko uporabljajo v terapevtske namene (Pires s sod., 2015). Z odkritjem penicilina, kateremu je sledila doba antibiotikov, se je bakteriofagno zdravljenje opustilo (Housby in Mann, 2009). Bakteriofagna terapija se je uporabljala vse do 90ih let prejšnjega stoletja (Sulakvelidze in sod., 2001).

Prednost uporabe bakteriofagov je tudi v njihovi specifičnosti za določeno vrsto bakterije, saj ne morejo okužiti evkariontskih celic in ostalih mikroorganizmov v okolici. Tako lahko na primer uničijo patogeno bakterijo v črevesju, ne da bi pri tem vplivali na črevesno floro (komezalne bakterije, ki stalno naseljujejo naše črevesje). Razvoj bakteriofagnega sistema, ki bi ga uporabljali za zdravljenje na antibiotike odpornih bakterij, je hitrejši in cenejši v

primerjavi z razvojem konvencionalnih zdravil. Ob pojavu rezistentnih mutant, ki bi postale odporne, lahko fag tudi mutira. Fagne lizine bi lahko uporabljali kot terapevtska sredstva za zatiranje bakterijskih okužb (Matsuzaki in sod., 2005).

Pomembna prednost bakteriofagov pa je tudi njihova sposobnost razmnoževanja, zaradi česar je za zdravljenje potrebno manj doz fagov v primerjavi z večkratnim jemanjem antibiotikov (Zaletel 2013).

Vsekakor se zanimanje za bakteriofagno terapijo povečuje in tako se že opravljajo klinične študije, v katerih testirajo pripravke fagnih lizatov predvsem proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *E.coli* (Lu in Koeris, 2011).

Bakteriofagna terapija je primerna tudi za živali. Narejeno je bilo že veliko raziskav, ki potrjujejo uspešno zaviranje bakterijskih okužb s *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Vibrio vulnificus* (Housby in Mann, 2009).

Fagi se torej uporabljajo za zdravljenje okužb. Lahko pa bi jih uporabljali tudi za zmanjševanje števila bakterij na različnih površinah in materialih, na primer za dekontaminacijo bolnišničnih sob (Jensen s sod. 2015).

1.3. Hipoteze

1. V odpadnih vodah bomo našli bakteriofage bakterije *S. marcescens*.

Iz že prej navedenih virov sva spoznali, da se bakteriofagi nahajajo tam, kjer so tudi bakterije, ki jih napadajo. Največ različnih bakterij se nahaja v odpadnih vodah, zato so te najboljša izbira, pri izolaciji bakteriofagov proti *S. marcescens*.

2. Bakteriofagi lahko preprečijo nastanek biofilmov.

Biofilmi so skupki bakterij, ki jih povezujejo in obdajajo zunajcelični produkti, ki jim nudijo dodatno zaščito. Lahko se tvorijo na biogenih ali abiogenih površinah. (Encyclopædia Britannica, 2015)

Ker so bakterije v biofilmih zaščitene, so bolj odporne na razna razkužila in protimikrobna sredstva. Bakteriofagi bi lahko bili eden od načinov, s katerim bi preprečili nastanek biofilmov na površinah ali že uničili nastale bilofilme.

2. METODOLOGIJA DELA

2.1. Seznam materialov

2.1.1. Pufri, gojišča, ostale raztopine

Pufri, gojišča in ostale raztopine so bili pripravljene naprej v NLZOH.

Gojišča

- TSA (gojišče triptični soja agar, proizvajalec BioLife), trdo gojišče v petrijevkah
- TSB (gojišče triptični soja bujon, proizvajalec BioLife), tekoče gojišče v epruveh

Pufri

Fagni pufer SM:

- 10 ml 1 M Tris, pH 7.5
- 10 ml 1 M MgSO₄
- 4 g NaCl
- 980 ml destilirane H₂O

Sterilizirano z avtoklaviranjem (pri temperaturi 121 °C, 30 min)

Pufer PBS:

- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄
- destilirana H₂O

Ostalo:

- Ocetna kislina CH_3COOH
- barvilo kristal vijolično

2.1.2. Laboratorijski pribor

- avtomatske pipete, 1-10 μl , 10-100 μl in 100-1000 μl (Eppendorf)
- 0,22 μm membranski filtri za brizgalke (Sarstedt)
- 20 ml brizgalka (BD)
- plastične petrijevke (Eppendorf)
- sterilni tipsi (StarLab)
- 50 ml centrifugirke (Sarstedt)
- 1,5 in 2,0 ml mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- plastične cepilne zanke (Golias)
- razmazovalna palčka (Golias)
- gorilnik
- mikrotirska plošča

2.1.3. Laboratorijske aparature

- inkubator (Binder)
- vibracijski stresalnik (Tehtnica)
- spektrofotometer

Pri delu sva uporabljali naslednjo zaščitno opremo:

- zaščitna halja
- zaščitne rokavice
- sterilizacijsko sredstvo za razkuževanje rok (Incidin)

Da sva v dovolj veliki meri poskrbeli za varnost pri delu, sva delo opravljali v mikrobiološki zaščitni komori ali se poslužili aseptične tehnike dela, ki vključuje delo ob plamenu gorilnika.

2.2. Laboratorijski postopki

Postopek lahko razdelimo na dva dela. V prvem delu smo bakteriofage izolirali iz vode iz čistilne naprave in jih namnožili, v drugem pa testirali, ali lahko z bakteriofagi preprečimo nastanek biofilma bakterije *S. marcescens*.

Eksperimentalno delo smo opravljali v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano.

2.2.1. Pridobitev in izolacija fagov

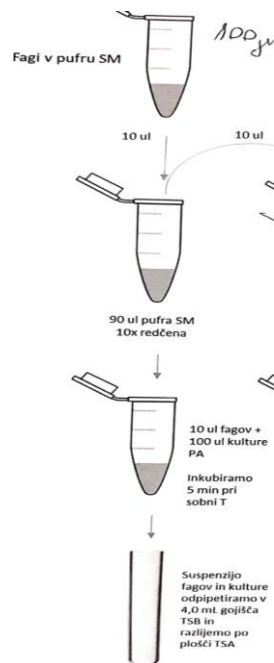
Pred laboratorijskim delom smo iz čistilne naprave pridobili vzorec vode, ki smo ga prefiltrirali z 0,22 µm membranske filtre v 50 ml centrifugirke. S tem smo iz vode odstranili bakterije in ostale snovi, ki bi lahko ovirale poskus, v njej pa so ostali le bakteriofagi, ki so dovolj majhni, da preidejo skozi pore v filtru.

Bakteriofage smo izolirali tako, da smo zmešali 100 µl filtrirane vode in 100 µl prekonočne bakterijske kulture *S. marcescens* in inkubirali 5 minut, da so fagi okužili bakterije. Nato smo dodali 4 mL poltrdega gojišča TSB (0,4% agar) in suspenzijo prelili preko trdega gojišča TSA. Gojišče smo inkubirali na 37 °C preko noči. Naslednji dan smo na gojiščih opazovali plake. Plak je prozorna cona, ki nastane na področju konfluentne bakterijske rasti zaradi popolne ali delne lize bakterij, ki so bile okužene z virusi. En plak je posledica delovanja enega virusa, zato lahko s štetjem plakov ocenimo število infektivnih enot v določeni količini vzorca (PFU-plaque forming units), čemur pravimo tilter.

Posamezne fage smo iz plakov prenesli s konicami tipsov in jih shranili v 100 µL pufra SM.

2.2.2. Obogatitev bakteriofagov

Iz fagov v puftru smo naredili 10-krat redčeno: 90 μ L puftra SM smo dodali 10 μ L fagov puftru. Nato smo dodali 100 μ L bakterij (prekonočno kulturo *S. marcescens*) in centrifugirali. Suspenzijo smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, nato pa jo odpipetirali v 4,0 mL gojišča TBS in razlili po plošči. Plošče smo inkubirali pri 37 °C 24-48 ur.



Slika 3: Bogatitev fagov (lastni vir)

Po prekonočni inkubaciji smo fage iz plakov sprali tako, da smo gojišče prelili s pufrom SM (4 ml) in inkubirali s stresanjem 3 ure. Nato smo z brizgalko posrkali tekočino in jo prefiltrirali skozi 0.22 μ m membranski filter, da smo odstranili bakterijske celice. Fage v puftru SM smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

2.2.3. Določanje števila bakteriofagov

Najprej smo bakteriofage, ki smo jih namnožili, kvantificirali, da smo dobili občutek koliko bakteriofagov imamo. To smo storili tako, da smo si pripravili redčitveno vrsto. Fage smo 10-krat redčili do redčine 10(-5). Pripravili smo si 5 epic. V vsako smo najprej odpipetirali 900 μ L puftra SM. Nato smo v prvo epico odpipetirali 100 μ L fagov v puftru in premešali na stresalniku

(redčina 10(-1)). Nato smo iz prve epice odpipetirali 100 μ L v drugo ter dobro premešali (redčina 10(-2)). Nato smo na enak način pripravili redčine do 10(-5). Število bakteriofagov v suspenzijo smo določili z metodo štetja plakov in sicer smo zmešali 10 μ L fagov in 100 μ L prekonočne kulture bakterije. Inkubirali smo 5 minut pri sobni temperaturi in nato dodali 4 ml poltrdega TSA ter prelili po plošči TSA. Naslednji dan smo prešteli plake in izračunali število enot, ki tvorijo plake na ml (PFU/ml).



Slika 4: Plaki (lastni vir)

Tabela 1: Število plakov (PFU) prešteih na ploščah

oznaka faga	redčina	št. PFU 1 v 10 μ l	št. PFU 2 v 10 μ l	aritmetična sredina
A10x	10 ⁻⁴	86	121	104
A10x	10 ⁻⁵	7	14	11
C10x	10 ⁻³	116	137	127
C10x	10 ⁻⁴	9	14	12
C10x	10 ⁻⁵	1	1	1

Tabela prikazuje podatke, ki smo jih dobili in izračunali. V vseh primerih redčin smo delali v duplikatih, zaradi boljše natančnosti. Nato smo izračunali z aritmetično sredino dveh števil (vsaka iz enega gojišča).

2.2.4. Testiranje delovanja bakteriofagov na tvorbo biofilma

Učinkovitost fagov pri preprečevanju nastanka biofilma smo preverili tako, da smo bakterije inkubirali skupaj s bakteriofagi in spremljali nastanek biofilma. V luknjice mikrotirske plošče smo odpipetirali 100 μ L prekonočne kulture bakterij v gojišču TSB in dodali 10 μ L 10-krat, 100-krat, 1000-krat, in 10000-krat redčene suspenzije fagov. Vključili smo tudi dve kontroli. Negativno kontrolo je predstavljajo sterilno gojišče TSA s katero smo preverili, da barvilo kristal vijoličen ne obarva sten mikrotirske plošče, pozitivno kontrolo pa kultura bakterije, brez dodanih bakteriofagov. Z njo smo dokazali, da bakterije v mikrotirski plošči nastanejo in tvorijo biofilm. Vse poskuse smo izvedli v triplikatih.

Če pride do tvorbe biofilma se celice pripnejo na stene ali dno luknjic v mikrotitrski plošči.

Po prekonočni inkubaciji pri 37°C smo najprej odpipetirali gojišče in s tem tudi nepripete, planktonske, celice.

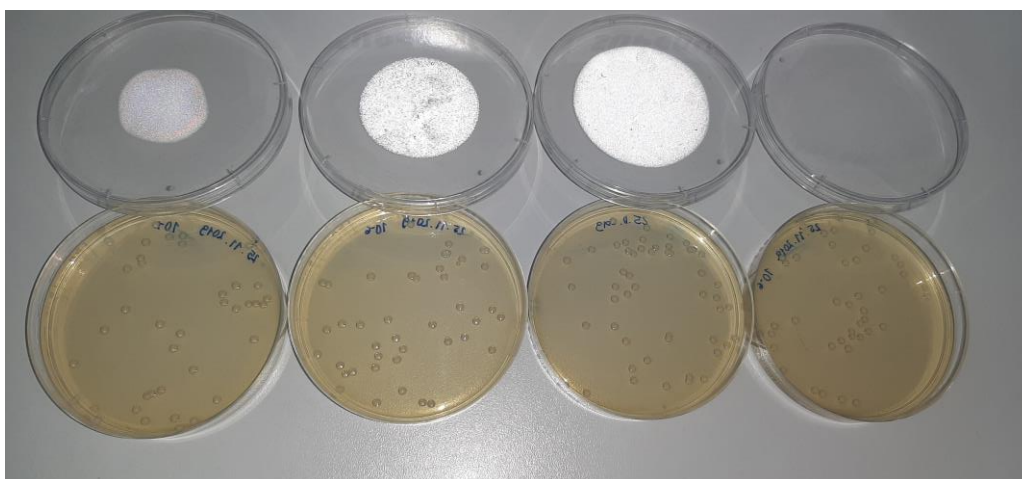
Da pa so bile odstranjene res vse neprijete celice, smo vsako luknjico še dvakrat sprali s pufrom PBS. To smo storili tako, da smo v vsako luknjico odpipetirali 100 μ L PBS in počakali nekaj minut. Nato smo pufer odstranili in postopek ponovili še enkrat. Po spiranju smo celice v biofilmu pobarvali s kristal vijoličnim barvilom, ki obarva le celice. Odvečno barvilo smo dvakrat sprali s pufrom PBS, kot je opisano zgoraj.

Količino nastalega biofilma smo kvantificirali s spektrofotometrom (barvilo smo iz celic izprali z očetno kislino). Izmerili smo absorbanco pri valovni dolžini 620nm.

Poskus smo ponovili še enkrat, da smo preverili zanesljivost.

3. REZULTATI

Iz vode iz čistilne naprave smo uspeli izolirati bakteriofage bakterije *S. marcescens* (Slika 5). Iz vseh plakov, ki so se tvorili smo si za nadaljnje poskuse izbrali 2 plaka. Iz teh dveh plakov smo prenesli bakteriofage v pufer SM. Označili smo ju kot A in C. Bakteriofage smo najprej obogatili, kot je opisano v metodah, potem pa smo določili koncentracijo bakteriofagov, ki smo jo izrazili kot število enot, ki tvorijo plake na mililiter (PFU/ml) (Tabela 1).



Slika 5: Gojišči na katerem so vidni plaki, cone lize, ki vsebujejo bakteriofage (lastni vir)

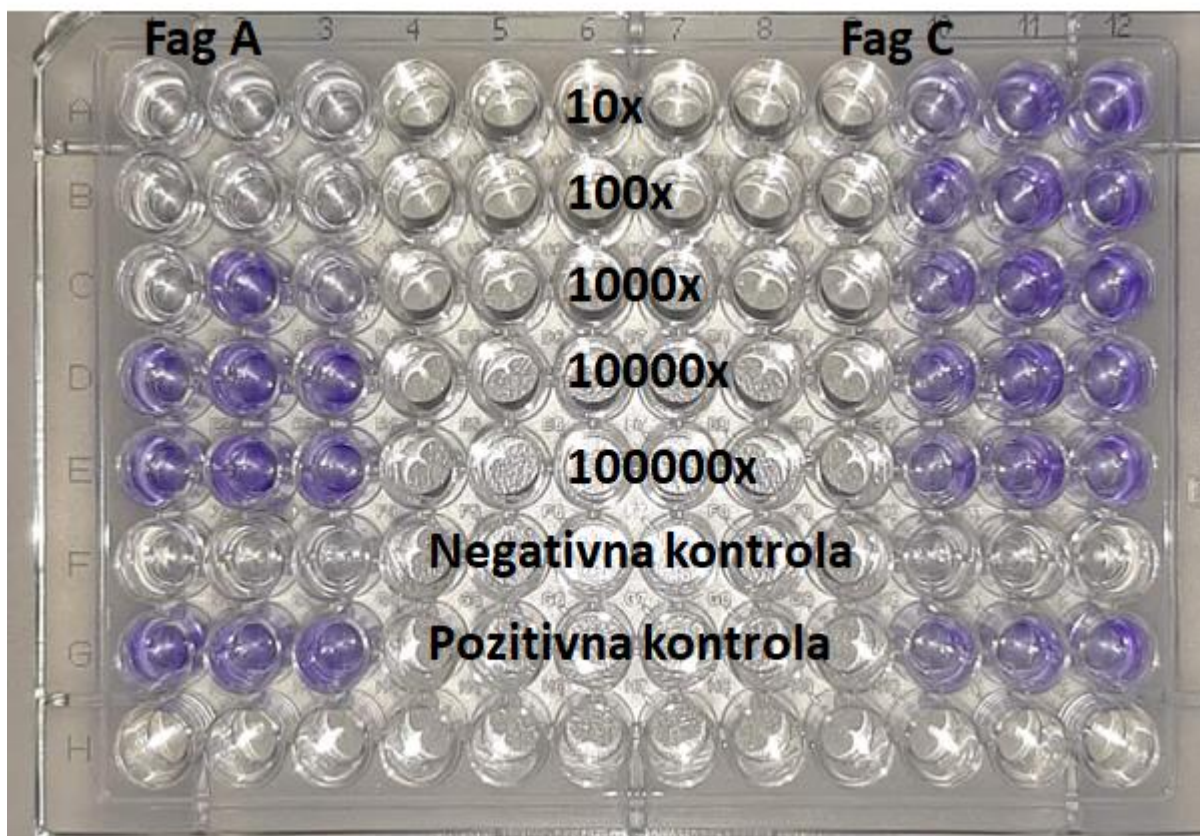
Dobili sva naslednje rezultate za število PFU/ml obeh fagnih suspenzij:

Tabela 2: Koncentracija fagov v pufru, ki smo jih uporabili v nadaljnjih poskusih

oznaka faga	št. PFU/ml
A10x	$1,0 \times 10(8)$ PFU/ml
C10x	$1,2 \times 10(7)$ PFU/ml

V naslednjem koraku smo preverili ali lahko suspenzije faga A in faga B, preprečita nastanek biofilma *S. marcescens*. V mikrotitrskih ploščicah smo gojili kulturo *S. marcescens* skupaj z bakteriofagi (različnimi redčinami) (Slika 2 in slika 3). Suspenzija bakteriofaga A (10x in

100x redčena) je uspešno preprečila nastanek biofilma, medtem ko bolj redčene suspenzije bakteriofaga A niso preprečila nastanka biofilma *S. marcescens*. Prav tako nastanka biofilma ni preprečila suspenzija bakteriofaga C.



Slika 6: Učinek bakteriofaga A in C na tvorbo biofilma *S. marcescens* (lastni vir)

Pri pozitivni kontroli se lepo vidi s kristal vijoličnim obarvan biofilm (celice, ki so se v obliki biofilma pritrdile na stene luknjic in smo jih nato obarvali s kristal vijoličnim). Iz celic v biofilmu smo v zadnjem koraku barvilo sprali dodatkom očetne kisline. V vrsticah nad kontrolo, so označene z redčino bakteriofagne suspenzije (10x do 100000x). Kjer ni prišlo do tvorbe biofilma, ni prišlo do obarvanja s kristal vijoličnim, saj se to barvilo ne veže na PVC. Negativno kontrolo predstavlja sterilno gojišče.

Količino nastalega biofilma smo ovrednotili tudi spektrofotometrično. Iz podatkov, ki sva jih pridobili s spektrofotometrom, smo naredili tabele.

Tabela 3: Podatki izmerjene absorbance za fag A

A (povprečje (1+2+3)/3)	1	2	3	Redčina
0,1680	0,149	0,184	0,171	Poz. kontrola
0,0447	0,044	0,043	0,047	10
0,0473	0,052	0,046	0,044	100
0,0470	0,047	0,184 ¹	0,047	1000
0,1723	0,156	0,186	0,175	10000
0,1720	0,17	0,17	0,176	100000
0,0353	0,034	0,035	0,037	Neg. kontrola

¹ Ne upoštevamo pri izračunu, preveliko odstopanje.

Tabela 4: Podatki izmerjene absorbance za fag C

C (povprečje (1+2+3)/3)	1	2	3	Redčina
0,1837	0,189	0,18	0,182	Poz. kontrola
0,1357	0,145	0,135	0,127	10x
0,1407	0,124	0,156	0,142	100x
0,1710	0,122	0,203	0,188	1000x
0,1470	0,16	0,121	0,16	10000x
0,1283	0,122	0,121	0,142	100000x
0,0353	0,034	0,035	0,037	Neg. kontrola

Na podlagi znane koncentracije fagov v izhodni suspenziji (Tabela 2 in 3 oziroma 4) smo si izračunali koliko fagov je v posamezni redčini (Tabela 3).

Tabela 5: Koncentracije faga A uporabljene v poskusu inhibicije tvorbe biofilma

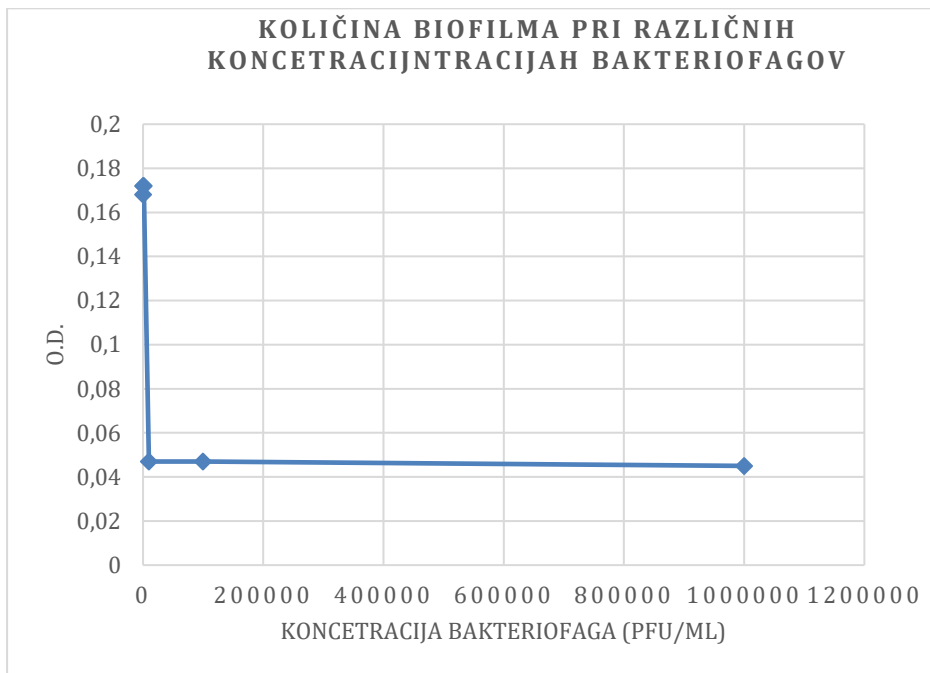
Redčina	PFU/ml	OD (620nm)
10x	1000000	0,0454
100x	100000	0,047
1000x	10000	0,047
10000x	1000	0,172
100000x	100	0,172
Kontrola	0	0,168

Tabela 6: Koncentracije faga C uporabljene v poskusu inhibicije tvorbe biofilma

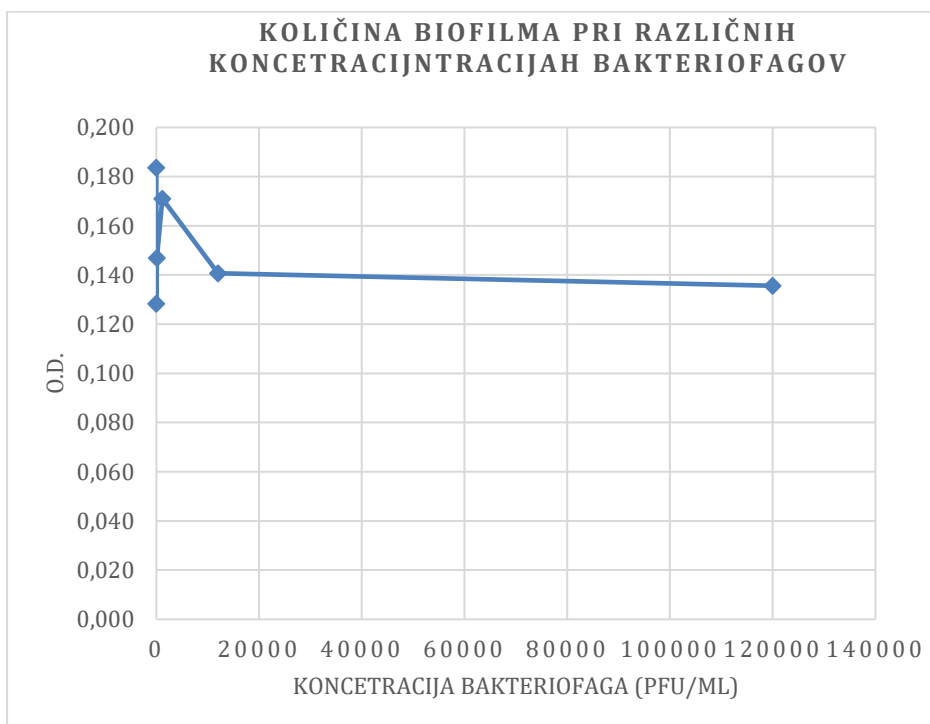
Redčina	PFU/ml	OD(620nm)
10x	120000	0,136
100x	12000	0,141
1000x	1200	0,171
10000x	120	0,147
100000x	10	0,1283
Kontrola	0	0,184

Iz tabel sva naredili grafa, ki prikazuje količino biofilma nastalega po različnih koncentracij redčenih suspenzij bakteriofagov.

Graf 1: Količina biofilma pri različnih koncentracijah bakteriofagov A



Graf 2: Količina biofilma pri različnih koncentracijah bakteriofagov C



Rezultate sva preverili tako, da sva postopek ponovili. Fag C ponovno ni preprečil tvorbe biofilma, fag A pa je, ampak samo do ene redčine. Koncentracija fagov v neredčeni suspenziji

10(5) v 10000x redčeni pomeni, da je prisoten samo en fag, ki pa ne more preprečiti tvorbe biofilma.

4. RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi sva najprej izolirati bakteriofage bakterij *S. marcescens* iz vzorcev vode iz čistilne naprave ter nato poskušali ugotoviti, ali lahko obogateno suspenzijo bakteriofagov, pridobljenih iz odpadnih vod, uporabimo za preprečevanje nastanka biofilmov bakterije *S. marcescens* na površinah. Pred začetkom raziskovanja sva si postavili hipotezi, ki jih bova v nadaljevanju tudi potrdili oziroma ovrgli.

1. V odpadnih vodah bomo našli bakteriofage bakterije *S. marcescens*.

Na podlagi prebrane literature sva sklepali, da bova v odpadni vodi našli bakteriofage bakterije *S. marcescens*. Ta hipoteza **drži**, saj smo iz odpadne vode pridobili bakteriofage in jih uspeli izolirati. Nato smo jih za nadaljnjo delo tudi obogatili.

2. Bakteriofagi lahko preprečijo nastanek biofilma.

Bakterije postajajo vedno bolj odporne na antibiotike in razkužila. Nova alternativa so bakteriofagi, ki so naravni sovražniki bakterij, vendar njihovi biofilmi predstavljajo velik problem. Bakterije so z njimi bolj zaščitene in zato še bolj odporne na antibiotike in razkužila. Zanimalo nas je torej, če lahko bakteriofagi preprečijo nastanek biofilmov in ali bi lahko bakteriofage uporabili kot razkužila.

To hipotezo sva **delno potrdili**, saj je samo en od obeh izoliranih fagov preprečil nastanek biofilma. To je bil fag označen z A. Fag C ni zmanjšal nastanka biofilma. Ena izmed razlag zakaj je prišlo do različnih rezultatov je lahko nestabilnost bakteriofaga v pufri SM.

Z raziskavo smo eksperimentalno pokazali, da lahko iz okolja hitro in enostavno izoliramo bakteriofage, ki jih lahko potem uporabimo za zmanjšanje tvorbe biofilmov bakterije *S. marcescens*. Metoda bi bila uporabna predvsem za zmanjševanje števila bakterij, ki so odporne

na razkužila ali antibiotike, kar bi ne nazadnje lahko pripomoglo k zmanjšanju kontaminacije površin ter s tem razširjanje bakterije. S tem bi zmanjšali tudi možnost prenosa okužbe na človeka. Predvsem je prednost, da lahko bakteriofage, specifične za določeno bakterijsko vrsto ali sev, zelo hitro namnožimo v zadostni količini. S tem bi se lahko v realnem času spopadali tudi z bakterijami, ki b razvile odpornost proti fagnim pripravkom, ki so bili uporabi, saj bi lahko hitro (veliko hitreje kot nove antibiotike ali razkužila) pripravili nov, specifični bakteriofagni pripravek. Takšni pripravki ne le da bi uničili posamezne bakterijske celice ampak bi lahko preprečila tudi nastanek biofilmov.

V prihodnosti bi lahko pripravili bakteriofagne pripravke, ki bili sestavljeni iz različnih vrst bakteriofagov in raziskovali njihov vpliv na razne površine in predvsem nevarne bakterije, ki so že odporne na antibiotike. Bakteriofagi so vrstno specifični, oziroma nekateri lahko uničujejo samo točno določene seve znotraj vrste. Da bi fagne pripravke lahko uporabljali za uničevanje bakterije, bi bilo potrebno vključiti več različnih bakteriofagov; tako bakteriofagov proti različnim sevov iste bakterijske vrste, kot tudi bakteriofagov, ki delujejo na različnih vrst bakterij. Predvsem bi bilo v pri vrsti smiselno izbrati bakterije, za katere je znano, da so odporne na številne antibiotike ali razkužila, ki se vsakodnevno uporabljajo za razkuževanje in dekontaminacijo površin, in ki predstavljajo težavo v bolnišničnem okolju (npr. *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*...).

Prav tako bi bilo smiselno testirati ali lahko bakteriofagi uničijo že nastale biofilme. Tega v okviru te raziskovalne naloge, zaradi časovne stiske, ni uspelo testirati.

Naši rezultati tudi nakazujejo, da niso vsi fagi enako stabilni v pufri. Fage, ki smo jih izolirali in obogatili smo za nadaljnje poskuse shranili s fagnem pufri SM. To je pufer, ki ga uporabljajo v različnih študijah, zato smo ga izbrali tudi mi. Ker pa fag C ni imel nobenega učinka na tvorbo biofilma, kljub temu, da smo uporabili isti sev bakterije kot pri koraku izolacije (torej je bil specifični za ta sev in bi pričakovali, da lahko uniči celice), lahko sklepamo, da mogoče fag C v pufri SM ni obstojen in da je v tem času propadel. Stabilnost fagov, v različnih pufrih in časovno, bi bilo potrebno preveriti preden bi fagne pripravke uporabili v praksi.

Kljub vsemu pa so naši rezultati obetavni in nakazujejo, da so bakteriofagni pripravki lahko učinkoviti sredstvo za nadzor bakterijske kontaminacije in bi bilo smiselno voditi raziskave v tej smeri in se ne samo osredotočiti na razvoji novih antibiotikov in razkužil.

5. ZAKLJUČEK

Namen raziskovalne naloge je bil izolirati bakteriofage *S. marcescens* in ugotoviti ali lahko bakteriofagi uničijo nastale biofilme.

V prvem delu raziskovalne naloge smo vzorce vod čistilnih naprav prefiltrirali in na gojiščih izbranih bakterij iskali potencialne bakteriofage iz odpadni vodi, ki bi uničili to vrsto. Predpostavili smo, da ena cona zbistritve oziroma en plak predstavlja en bakteriofag. Domnevne fage smo nato izolirali in preverili, ali se resnično nahajajo na označenih conah zbistritve. Teorijo smo potrdili. Izbrali smo si dva plaka iz katerih smo izolirali fage in jih shranili v pufri SM. Ta bakteriofaga smo tudi obogatili in jih uporabili v nadaljnjih poskusih.

V drugem delu smo želeli preveriti ali lahko bakteriofagi uničijo nastale biofilme bakterije *S. marcescens*. Če pride do tvorbe biofilma, se celice pripnejo na stene ali dno luknjic v mikrotirski plošči. Količino nastalega biofilma smo kvantificirali s spektrofotometrom.

Uporaba bakteriofagov bi bila dobra rešitev za uničevanje bakterij, ki so odporne na razkužila in antibiotike. Ljudje bi morali biti ozaveščeni o možnih načinih okužbe z bakterijo, o njenem prenašanju in rešitvah.. Z nadaljevanjem preiskav bi lahko preverili vpliv bakteriofagov tudi na druge bakterije in poiskali nove načine zdravljenja brez antibiotikov.

6. VIRI IN LITERATURA

1. Bratkovič T., Preželj A. 2008. Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. *Farmacevtski vestnik*, 59: 129-134.
2. Cegnar M., Obermajer N., Kos J., Kristl. 2007. Nosilni sistem za dostavo bioloških učinkovin V: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 210-250.
3. Encyclopædia Britannica. 2015. Biofilm. Dostopno na naslovu: <https://www.britannica.com/science/biofilm> [24.1.2020, 7:31].
4. Fomite Decontaminant. [online] PLOS ONE, 13 strani. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131892> [30.1.2020,15:25].
5. Forward in the Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections. [online] *Journal of Virology*, [online] Volume 89 (number 15), 8 str.. Dostopno na: <https://jvi.asm.org> [23.1.2020, 7:38].
6. Gadakar R., Gopinathan K.P. 1980. Bacteriophage burst size during multiple infection. *Journal of Bioscience*, 2,3: 153-259.
7. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston: 4str. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/> [30.1.2020,15:45].
8. Genetic Engineering and Biotechnology News. (2018). Building Better Bacteriophage with Biofoundries to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. Dostopno na: <https://www.genengnews.com/insights/building-better-bacteriophage-with-biofoundries-to-combat-antibiotic-resistant-bacteria/> [6.2.2020]. [fotografija].
9. Gubina, M., Ihan, A. in Števanec, M. (2002). *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinski razgledi, str. 542.
10. Housby J.N., Mann N.M. 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14, 12: 536-540.
11. Hyman P., Abedon S.T. 2009. Practical methods for determining phage growth parameters.V: *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Clokie M.R.J., Korpinski A.M. (eds.). Mansfield, Humana Press:175-203.
12. Iglewski B.H. 1996. *Pseudomonas*. V: *Medical microbiology*. 4thed. Baron S. (ed.). NCBI. 2011. Taxonomy browser: *Pseudomonas aeruginosa*. Bethesda, NCBI-National Center for Biotechnology Information: 2 str.

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Udef&id=28%207&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f [januar 2020].
13. I live ok. Bakteriofagi so učinkovitejši od antibiotikov. 2018. [23.1.2020; 7:21]. Dostopno na spletnem naslovu: https://sl.iliveok.com/news/bakteriofagi-so-ucinkovitejsi-od-antibiotikov_130075i15817.html.
 14. Jensen, K. C., Hair, B. B., Wienclaw, T. M., Murdock, M. H., Hatch, J. B., Trent, A. T., White, T. D., Haskell, K. J. in Berges, B. K. (2015). Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against MethicillinResistant Staphylococcus aureus and Potential Use as a Siol.net. 2018. Odpornost, ki si je nihče ne želi. Dostopno na: <https://siol.net/novice/slovenija/odpornost-ki-si-je-nihce-ne-zeli-484736> [30.1.2020, 15:39].
 15. Lee Ventola, C. (2015) The Antibiotic Resistance Crisis. [online] US National Library of Medicine National Institutes of Health. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>, [04.02.2020].
 16. Leksikon, 1976. Ljubljana: Cankarjeva založba. str. 21.
 17. López D, Vlamakis H, Kolter R. (2010) Biofilms. Dostopno na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2890205/>, [8.2.2020].
 18. Lu T. K., Koeris M.S. 2011. The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14:524–531.
 19. Mahlen D. Steven. Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. Oct. 2011. str. 755–791.
 20. Matsuzaki S., Rashel M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Ikeuchi M., Tani T., Fujieda M., Wakiguchi H., ImaS. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *The Journal of Infection and Chemotherapy*, 11:211-219.
 21. NLZOH. 2018. Odpornost bakterij proti antibiotikom. Dostopno na: <https://www.nlzoh.si/o-nas/novice/48-novice2/404-novica-44> [30.1.2020, 15:40].
 22. Orožen Adamič A., Sernec K. 2005. *Mikrobiologija*. Ljubljana: DZS. 184-185.
 23. Pires, D. P., Vilas Boas, D., Sillankorva, S. in Azeredo, J. (2015). Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections. [online] *Journal*

- of Virology, [online] Volume 89 (number 15), 8 strani. Dostopno na: <https://jvi.asm.org>, [6.2.2020].
24. Priprava avksotrofne mutante kvasovke *Aureobasidium pullulans* za uporabo v molekularni biologiji. Magistersko delo. 2014. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. str. 10-13.
 25. Ray et al. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* (2017). Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.*
 26. Tovornik, N. (2017). Preučevanje reverzibilne vezave bakteriofagov na bakterije. Magistrski študij - 2. stopnja. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
 27. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45,3: 649-659.
 28. Stevović, B. (2015). Izolacija in opis bakteriofagov bakterije *Sapylococcus epidermidis*. Magistrski študij - 2. stopnja. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
 29. Vidyasagar A. (2016). What are biofilms?. Dostopno na <https://www.livescience.com/57295-biofilms.html> [8.2.2020].
 30. Wikimedia Common. (2014). Bloody bread - *Serratia marcescens* in action. Dostopno na: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Bloody_bread - Serratia_marcescens_in_action.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Bloody_bread_-_Serratia_marcescens_in_action.JPG) [6.2.2020,12:21]. [fotografija].
 31. Zaletel, E. (2013). Optimizacija pridobivanja bakteriofagov v bioreaktorju. Magistrski študij - 2. stopnja. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.