

## POVZETKI PROJEKTHNIH NALOG IZ PREDMETA BIOTEHNOLOGIJA 2015

### **Jurij Oblak in Anže Štrukelj: Sinteza in lastnosti koordinacijskih spojin kovin prehoda z biološko aktivnimi ligandi**

Strokovni mentor: Marko Jeran, kem. tehn., UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo in Kemijski inštitut

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. teh., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V raziskovalnem delu opisujemo sintezo, biokemijsko in katalitsko aktivnost katalizatorjev kemiluminiscence luminola, koordinacijskih spojin nekaterih kovin prehoda z biološko aktivnimi ligandi.

Raziskovalno delo opisuje nov pristop h katalizi kemiluminiscence na koordinacijski osnovi, saj omenjeni ligandi igrajo vlogo katalizatorjev reakcij kot funkcijo topnosti v topilu. Pojav emisije svetlobe zasledimo v sami raztopini in heterogeni fazi (neraztopljen katalizator). V osnovi omenjeni kompleksi igrajo vlogo inhibitorjev kemiluminiscence luminola v vodnem mediju. Z biokemijskega stališča pripravljene kompleksi, kot so dimetilglioksim, amonijak, piridin, salicilna kislina, 5-sulfosalicilna kislina in acetilsalicilna kislina (aspirin), na bakterije, izolirane s površine kože lica, niso imeli konkretnih vplivov, kar pogojuje njihovo pozitivno aktivnost. Sama tematika v smislu novih sinteznih strategij in biokemijskih aplikacij odpira nova vprašanja za nadaljnje delo na tem področju.

### **Nika Zakrajšek in Patricija Jereb: Vsebnost antioksidantov in polifenolov v naravnih ekstraktih**

Strokovni mentor: Marko Jeran, kem. tehn., UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo in Kemijski inštitut

Šolski mentor: Jure Slatner, laborant, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Pri projektne delu smo opazovali učinkovitost različnih antioksidantov in kvantitativno vsebnost polifenolov v naravnih materialih. Čaji in vitamin C so bogati z antioksidanti, zato smo kot modelne sestavine vzorcev vzeli japonski dresnik, zeleni in črni čaj ter vitamin C.

V prvem delu, kjer smo uporabili metodo »Apple test«, pokažemo, da je glede na količino izločenega kisika v vzorcu najboljši antioksidant japonski dresnik in najslabši vitamin C. V drugem sklopu eksperimentalnega dela ugotovljamo količino skupnih fenolov v naravnih ekstraktih. Za delo smo uporabili metodo umeritvene krivulje in standardnega dodatka s Folin-Ciocalteu reagentom. Rezultati kažejo, da največ omenjenih komponent vsebuje japonski dresnik (65,5467 mg/g oz. 6,5547 %). Ostali pripravki oz. ekstrakti dosegajo detektirane količine z nekoliko nižjo vsebnostjo. Najnižjo vsebnost smo opazili pri zelenem čaju (0,08707 mg/g oz. 0,008707 %).

### **Žiga Metelko in Katja Mrvar: Študij aktivacije in inhibicije kemiluminiscence organskih hidrazidov v vodnem mediju**

Strokovni mentor: Marko Jeran, kem. tehn., UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo in Kemijski inštitut

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. teh., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Raziskovalno delo obsega kompleksno področje kataliz kemiluminiscenčnih reakcij, ki smo jih opravili v vodnem mediju. Raziskovali smo vpliv reagentov, ki kažejo lastnosti katalizatorjev kemiluminiscence, kot tudi tistih, ki kažejo lastnosti katalitskih pomožnikov na organski osnovi. Kot modelni reagent, ki nam je služil za izvedbo reakcij, je bil uporabljen predstavnik družine hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin – luminol.

Dokazali smo, da so katalizatorji družine lantanoidov visoki inhibitorji kemiluminiscence, saj s svojimi lastnosti »zadušijo« emisijo svetlobe, ki nastane ob reakciji. Organska katalitska pomožnika 1- in 2-naftol sta za reakcijo prav tako neugodna, saj zavirata njeno delovanje. Ker v kemiji osnovni princip delovanja reakcij temelji na stabilnosti oksidacijskega stanja, je tako tudi na področju katalize kemiluminiscence. Pri raziskavi bakrovih komponent so najučinkovitejše Cu(II) zvrsti. Pokazali smo tudi, da ima katalizator tovrstnih reakcij svoje optimalno delovanje – model bakrovih zvrsti deluje v območju 0,96 mmol. Pomembno je tudi območje pH reakcijskega medija, ki mora biti optimalno. Reakcija je najbolj učinkovita v območju pH 9, višje oz. nižje vrednosti pH so za potek reakcije zelo neugodne.

Raziskava kovinske katalize organskih hidrazidov v vodnem mediju ima visoke možnosti aplikacij v medicini, zato omenjeno raziskovalno delo predstavlja uvodni pregled komponent in pogojev, ki bi jih lahko izkoriščali za analizo kovinskih zvrsti ob določenih bolezenskih stanjih.

### **Kogovšek Ana in Korenč Petra: Priprava MSP proteina v bakteriji *Escherichia coli***

Strokovna mentorica: Mirijam Kozorog, univ. dipl. biotehn., Laboratorij za molekularno biotehnologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, prof. biol., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V projektni nalogi z naslovom Pridobivanje MSP proteina v bakteriji *Escherichia coli* je glavni namen pridobiti čisti MSP (membranski ogrodni protein, membrane scaffold protein). Zanimalo nas je, ali bodo celice sprejele plazmid za zapis MSP proteina ter ali se bo protein MSP izrazil in zvil v pravilno obliko po dodatku induktorja IPTG.

Plazmid z genom za MSP smo s toplotnim šokom vnesli v kompetentne bakterijske celice. Plazmid je vseboval gen za MSP protein, histidinsko značko za izolacijo in markersko mesto, kjer je zapis za rezistenco na antibiotik kanamicin. Vse celice, ki so sprejele plazmid, so po nacepiti na selektivno gojišče, ki je vsebovalo antibiotik, tvorile kolonije. Sintezo proteina smo sprožili z dodatkom induktorja IPTG, ki se je vezal na represor na DNK in s tem omogočil prepis gena za MSP. Biomasa smo nato lizirali z ultrazvokom (sonikacijo), odcentrifugirali ostanke membran in netopne proteine ter naš protein ločili od preostalih proteinov z IMAC kromatografijo, ki temelji na afiniteti proteinov do nikljevih ionov, vezanih na kolono. Vezane proteine smo eluirali iz kolone z naraščajočo koncentracijo imidaziola, ki tekmuje za vezavna mesta na nikljevih ionih. Proteini s slabšo afiniteto do nikljevih ionov so se iz kolone sprali prej kot proteini, ki so imeli večjo afiniteto do njih.

Z NaDS-PAGE smo ugotovili, v kateri frakciji je MSP protein in kakšna je njegova količina. Izoliran MSP protein se bo uporabil za tvorbo nanodiskov.

### **Kjara Špoljar in Stela Špoljar: Priprava nanodiskov z vsebnostjo lipidov kot v eritrocitni membrani za poskuse vezave listeriolizina O**

Strokovna mentorica: Mirijam Kozorog, univ. dipl. biotehn., Laboratorij za molekularno biotehnologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Modelni membranski sistemi se uporabljajo za preučevanje membransko proteinskih reakcij. Namen projektne naloge je bila priprava nanodiskov z vsebnostjo lipidov kot v eritrocitni membrani in poskus vezave listeriolizina O na pripravljene nanodiske.

LLO spada med CDC-je, ki se specifično vežejo na membrane, bogate s holesterolom in v njih tvorijo pore. Izražajo jih za človeka patogene bakterije. LLO so izolirali iz bakterije *Listeria monocytogenes*. Uspešnost vezave proteina smo preverili s testom hemolize. Do sedaj še niso bili pripravljene takšni majhni membranski sistemi z dovolj holesterola, da bi se LLO nanje lahko stabilno vezal. Ker je znano,

da LLO uspešno tvori pore v membrani eritrocitov in s tem povzroči njihovo lizo, smo se odločili za pripravo nanodiskov s primerljivo sestavo eritrocitni membrani. Z metodo DLS smo ugotovili, da je bila velikost pripravljenih nanodiskov v dveh frakcijah približno 12 nm, kar je značilno za tvorbo nanodiskov z MSP1E3D1 D73C, ki smo ga uporabili. Z meritvijo vsebnosti holesterola smo ugotovili, da je koncentracija le-tega kljub koncentriranju frakcij nizka. Predvidevamo, da se je v nanodiske vezalo manj holesterola kot pričakovano zaradi tvorbe oborine pri dializi. Po inkubaciji LLO z nanodiski smo izvedli test hemolize, ki je pokazal, da je liza eritrocitov uspešno zavrta pri zelo majhni koncentraciji LLO (manj kot 0,6 µg/mL).

Za optimizacijo razmerij lipidov in MSP bi bilo potrebnih več ponovitev poskusa. Ugotavljamo, da s tako pripravo nanodiskov ne moremo zagotoviti dovolj velikega deleža holesterola za stabilno vezavo LLO.

### **Tomaž Žigon: Biološka razgradnja hormonskih motilcev v pilotnih bioreaktorjih**

Strokovna mentorica: dr. Ester Heath, Laboratorij za organsko analizo, Odsek za znanosti o okolju, Inštitut Jozef Stefan

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Odpadna voda je tista, ki jo zavržemo kot gospodinjski in industrijski odpadki. Ob tem z vodo v okolje prehajajo tudi različne snovi, ki so nevarne za okolje, med katerimi so tudi t. i. hormonski motilci. Če želimo preprečiti njihov izpust v okolje, moramo uporabiti posebne postopke čiščenja odpadnih vod, med katerimi je najbolj razširjeno biološko čiščenje odpadnih vod.

V projektne delu smo želeli z že znanimi biološkimi postopki iz odpadne vode odstraniti izbrane hormonske motilce (bisfenol A, parabeni in triklosan), ki so bili dodani v umetno odpadno vodo v koncentracijah 50 µg/l. Odstranitev je potekala v pilotskih bioreaktorjih, ki simulirajo delovanje čistilnih naprav. Učinkovitost odstranitve izbranih hormonskih motilcev smo določili z analitskim postopkom, ki je vključeval ekstrakcijo na trdnem nosilcu, derivatizacijo in analizo s plinskim kromatografom, povezanim z masnim spektrometrom.

Med postopkom čiščenja so se prav vsi izbrani hormonski motilci med čiščenjem odpadne vode odstranili v večini (> 96,99 %), a so bile njihove koncentracije v odpadni vodi še vedno dovolj visoke, da so potencialno nevarne za okoljske organizme (v povprečju 612 ng/l).

Spremljanje standardnih parametrov, ki smo jih merili v odpadni vodi v pilotnih bioreaktorjih v paralelah (raztopljeni kisik, temperatura, pH, količina biomase, kemijska potreba po kisiku, amonij, nitrat), je pokazalo, da delovanje bioreaktorjev ni optimalno. Učinek čiščenja bi lahko povečali z optimizacijo bioreaktorjev in daljšim časom izpostavitve spojin mikroorganizmom (hidravlični zadrževalni čas).

### **Špela Bradeško in Tjaša Črnjavič: Preživelost probiotičnih bakterij v prebavnem traktu**

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Življenje ljudi danes je izredno hitro in stresno. Večina zato načela zdravega življenja odrine na stranski tir. Ko gledamo reklame, se nam zazdi, da je farmacevtska družba darilo iz nebes. Prepričujejo nas, da lahko vsako telesno pomanjkljivost ali težavo reši nekaj tablet. Pa je teh nekaj tablet zares učinkovitih?

V času vse večjega reklamiranja probiotičnih izdelkov sva preverili, ali probiotične bakterije sploh preživijo zahtevne razmere v našem prebavnem sistemu. S simulacijo razmer v različnih fazah prebave sva testirali preživelost probiotičnih bakterij v enem preparatu, ki vsebuje probiotike. Po izpostavljenosti različnim pH vrednostim sva odvzeli tekoči vzorec, ga obarvali, nato pa bakterije šteli pod mikroskopom z Bürker-Turkovo metodo.

Na podlagi barvanja z barvilom kongo rdeče sva določili razmerje v odstotkih med mrtvimi in vsemi preštetimi bakterijami in tako prišli do ugotovitve in dokaza, da probiotične bakterije preživijo celotno prebavno pot.

### **Rok Ivančič: Vpliv prebiotikov na razmnoževanje probiotičnih bakterij**

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, dipl. inž. živ. tehn., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V projektni nalogi sem preveril vpliv prebiotikov na probiotične bakterije. To sem naredil tako, da sem uporabil dve različni kapsuli s probiotičnimi bakterijami; ena je vsebovala prebiotike, druga pa ne. Obe kapsuli sem dal vsako v svoje tekoče gojišče in po pol ure, eni uri, 24 urah in 48 urah vzel vzorec in mu izmeril motnost s kolorimetrom ter spektrometrom. Na podlagi sprememb v motnosti sem lahko ugotovil, kateri probiotiki se hitreje razmnožujejo.

Ugotovil sem, da prebiotiki res vplivajo na hitrost rasti probiotikov, vendar zaradi majhnega števila prebiotikov se razlika po 24 urah in 48 urah ni poznala.

### **Nejc Kolman in Miha Flere: Določanje števila celic z merjenjem transmitance in viskoznosti**

Šolski mentor: Jure Slatner, laborant, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V projektni nalogi sva poskušala ugotoviti, ali lahko število celic kvasovk izmeriva z merjenjem neke druge lastnosti (nekega drugega parametra) te suspenzije. Merila sva transmitanco in viskoznost vzorcev pri različnih številih celic v mL suspenzije. S temi podatki sva narisala dve umeritveni krivulji, ki ponazarjata viskoznost in transmitanco vzorcev v odvisnosti od števila celic. Umeritveni krivulji nam omogočata, da iz transmitance ali viskoznosti neznanega vzorca lahko sklepamo, kakšno je število celic v vzorcu.

Ugotavljala sva tudi, ali je transmitanca dveh različnih vrst kvasovk (suhi in sveži kvas) pri enakem številu celic enaka. Za oba vzorca sva narisala umeritveni krivulji, s katerima bi lahko prek transmitance določila število celic. Če bi bili transmitanci enaki in bi se krivulji prekrivali, bi lahko sklepala, da lahko za določanje števila celic kateregakoli kvasa uporabimo isto umeritveno krivuljo. Najini rezultati so pokazali, da je transmitanca pri različnih vrstah kvasa drugačna.

Ugotavljala sva tudi, za kolikšno število celic lahko z merjenjem viskoznosti oz. transmitance dovolj zanesljivo sklepava na število celic v vzorcu. Transmitance pri prevelikem ali premajhnem številu celic ne moreva izmeriti. Enako velja tudi za viskoznost. Ugotovila sva, da lahko število celic z viskoznostjo izmeriva na intervalu od 9·10<sup>9</sup> do 9·10<sup>10</sup> št. celic /mL, transmitanco pa na intervalu od 9·10<sup>5</sup> do 9·10<sup>8</sup> št. celic/mL. Med 9·10<sup>8</sup> in 9·10<sup>9</sup> št. celic/mL ne moreva določiti število celic.

### **Erazem Černe Pezdir: Vpeljava metode za določanje maščobnih kislin**

Strokovna mentorica: dr. Zlatka Bajc, UL, Veterinarska fakulteta

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Nova zakonodaja predpisuje navajanje količine nasičenih maščobnih kislin in kot neobvezno tudi navajanje enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin na živilih. Nasičene maščobne kisline povišujejo skupni in LDL-holesterol ter s tem tveganje za srčne in žilne bolezni, katere predstavljajo skoraj 40 % vseh vzrokov smrti. Namen naloge je bil vpeljati metodo za določanje maščobnih kislin v mesnih izdelkih.

V nalogo smo vključili šest vzorcev, v katerih smo s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID) določili 33 različnih maščobnih kislin, kamor so štete tudi različne izomere maščobnih kislin. V vzorcih smo namreč uspeli ločiti tudi cis in trans izomere maščobnih kislin. V

rezultatih tega nismo posebej prikazali, ampak smo sešteli vse izomere. Za ugotavljanje vpliva temperature in časa na tvorbo metilnih estrov maščobnih kislin smo reakcijo izvedli pri različnih temperaturah (40-80 OC) in času (2 ali 5 min). Ponovljivosti metode smo ugotavljali tako, da smo en vzorec analizirali 6-krat v enem dnevu. Natančnosti metode smo preverili tako, da smo za vseh 6 vzorcev primerjali rezultate analize našega laboratorija z rezultati drugega laboratorija. V vseh vzorcih smo določili 16 različnih maščobnih kislin, od tega 7 nasičenih maščobnih kislin. Ugotovili smo, da vzorci mesnih izdelkov vsebujejo povprečno 40 % nasičenih maščobnih kislin.

Na postopek priprave metilnih estrov je vpliv temperature in časa majhen. Reakcija je nekoliko uspešnejša, če damo vzorec za daljši čas v vodno kopel in če je temperatura kopeli višja. Metoda je bila ponovljiva in točna. Vse te ugotovitve kažejo, da je izbrana metoda ustrezna, če želimo določiti vsebnost nasičenih maščobnih kislin v mesnih izdelkih, prav tako pa je ustrezna tudi za določitev vsebnosti enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin.

V prihodnosti bi lahko metodo optimizirali tako, da bi zmanjšali odtehtano maščobo za analizo, kar bi olajšalo določitev površine pod kromatografskim vrhom za izbrane maščobne kisline, ki jih je v mesnih izdelkih veliko. Vendar bi se s tem zmanjšala občutljivost metode in maščobnih kislin, ki jih je v mesnih izdelkih malo, ne bi zaznali.

### **Petra Jelovšek: Dokaz hantavirusne okužbe z imunokromatografskimi testi**

Strokovna mentorica: dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Laboratorij za diagnostiko zoonoz, Medicinska fakulteta

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Leta 1992 so v Sloveniji, blizu vasi Dobrava na Dolenjskem, iz rumenogrole miši, *Apodemus flavicollis*, izolirali novo vrsto hantavirusa. Od tedaj opravljajo znanstveniki vsakoleten ulov malih sesalcev (miši, voluharic itd.), da lahko opazujejo razširjenost hantavirusov v naravi in s tem tveganje za ljudi. V ta namen morajo ujetim glodalcem odvzeti kri iz repne vene, očesa ali tačke, kar je tako za živali kot tudi ljudi precej stresno. Ker na terenu ne morejo opravljati laboratorijskih testov, ne morejo ugotoviti, kateri goodec je okužen in kateri ne, zato morajo ulov žrtvovati. Organe žrtvovanih glodalcev preiskujejo v laboratoriju z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR).

Da bi se temu izognili, so japonski znanstveniki razvili enostavne testne lističe, za katere naj bi bilo dovolj le nekaj mikrolitrov krvi, da dokažemo specifična protitelesa proti hantavirusom. Tako bi lahko zdrave glodalce brez nadaljnjega mučenja vrnil v naravo.

### **Nejc Zaviršek in Domen Cigale: Analiza vode**

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Voda je pomemben del našega življenja in ljudje ne moremo brez nje. Pomembno je, da je čista in da ne vsebuje nevarnih kemikalij, ki ogrožajo zdravje ljudi.

V projektni nalogi sva preučevala in analizirala izvirske vode. Testirala sva deset vzorcev, vsakega iz drugega izvira na različnih območjih v Sloveniji. Merila sva pH, trdoto vode in koncentracijo različnih snovi. V vsakem vzorcu vode sva testirala tudi prisotnost nitratov, nitritov, sulfatov, fosfatov, kloridov in na koncu še koncentracijo amonijevih ionov. Preverjala sva, ali vzorci ustrezajo mikrobiološkim in kemijskim zahtevam Pravilnika o naravni mineralni vodi.

Iz rezultatov je razvidno, da je voda ustrezala dovoljenim količinam, predpisanim v Pravilniku o vodi. Ugotovila sva, da je voda iz vseh desetih izvirov primerna za pitje in vsakdanjo uporabo.

### **Rok Jeram in Žan Žmuc: Proizvodnja piva**

Šolska mentorica: prof. Alma Kapun Dolinar, dipl. inž. živ. tehn., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Namen najine projektne naloge je, da ob varjenju piva spremljava in si zapisujeva lastnosti piva, ki se spreminjajo zaradi fermentacije.

Ob varjenju piva sva naletela na veliko različnih problemov: natančnost pridobivanja podatkov, razvrščanje teh in pozornost na prave pogoje bioreaktorja in vzorcev. Ugotovila sva, da lahko že majhne spremembe pogojev bioreaktorja zelo vplivajo na končno kakovost produkta, zelo pomembna je tudi točnost in natančnost dobljenih rezultatov. Najbolj je na kakovost piva vplivala kakovost kvasovk in njihova slaba odpornost na količino etanola, ki so ga proizvedle. Problem je nastal, ko kvasovke niso bile sposobne preživeti v okolju z več kot 3 odstotke etanola.

Te projektne naloge sva se lotila, ker naju je zanimalo, kakšni so problemi pridelave piva, koliko časa bo trajalo, kakšna bo alkoholna vrednost, zanimala naju je tudi, kakšna je kakovost doma varjenega piva ter težavnost varjenja piva.

### **Ula Ana Leban in Iris Zajc: Odpornost bakterije *Salmonella infantis* proti antibiotikom v slovenski perutninski proizvodnji**

Strokovna mentorica: asist. Majda Golob, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V zadnjih desetletjih se je z razvojem številnih novih antibiotikov uporaba le-teh v humani in v veterinarski medicini močno povečala, kar je zelo olajšalo zdravljenje različnih bakterijskih okužb ljudi in živali. Vendar je dolgotrajna in pogosto tudi nekritična raba antibiotikov privedla do večjega selekcijskega pritiska na povzročitelje okužb in posledično do razvoja pridobljene odpornosti bakterij proti različnim skupinam antibiotikov. Bakterije so se delovanju antibiotikov vedno znova prilagodile z različnimi mehanizmi, kar je privedlo do nastanka odpornih sevov. Odporni sevi se pojavljajo pri različnih rodovih bakterij in proti različnim skupinam antibiotikov. Posebej velik problem predstavljajo večkratno odporne bakterije (MDRB), med katere uvrščamo tudi nekatere serovare salmonel, vključno s *Salmonella infantis*. V zadnjih petih letih ta serovar v Sloveniji močno prevladuje med vsemi salmonelami, ki jih izoliramo pri živalih in živilih v perutninski proizvodnji. Znano je, da ima *S. infantis* zoonotičen potencial, zato je prav zaradi povečane odpornosti proti protimikrobnim zdravilom, v primeru okužb ljudi, zdravljenje pogosto težavnejše, lahko pa tudi neuspešno.

V naši raziskavi smo glede odpornosti proti različnim antibiotikom z mikrodilucijsko metodo testirali serovare *S. infantis*, pridobljene iz vzorcev okolja znotraj in zunaj perutninskega hleva pri enem od nosilcev perutninske dejavnosti. Naš namen je bil določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) za 14 antibiotikov iz devetih različnih skupin ter s tem ugotoviti vzorce odpornosti proti protimikrobnim zdravilom znotraj ene epizootiološke enote. Največji delež odpornosti smo ugotovili v skupinah kinolonov oz. fluorokinolonov, sulfonamidov in tetraciklinov (100 %).

### **Lana Žnidarič in Nika Možek: Vpliv sestave agarne gojišča na sporulacijo seva *Streptomyces tsukubaensis***

Strokovna mentorja: mag. Sašo Kranjc, Diana Draksler, univ. dipl. mikrobiol., LEK, operativni razvoj, Oddelek za mikrobiologijo in fermentacijo

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V projektni nalogi smo iskali optimalno agarno gojišče za rast in sporulacijo seva *Streptomyces tsukubaensis* z namenom, da bi bila produkcija takrolimusa na produkcijskem gojišču čim večja. O tej

tematiki je zelo malo literature, zato smo poizkušali večje število gojišč z različno sestavo, da bi ugotovili vpliv surovin na sporulacijo tega seva.

Na koncu smo ugotovili, katere snovi v gojišču so najpomembnejše. Največji vpliv na sporulacijo je imel vir kalcija. Od mineralov je imel največji učinek na sporulacijo cink, za katerega smo v nadaljevanju naloge ugotovili, da več kot ga je v gojišču, boljša je sporulacija. Prav tako je sporulacija slabša, če odstranimo katerokoli drugo snov, ki je sestavni del standardnega gojišča.

Kakšna je bila kasnejša produkcija takrolimusa, v tej projektni nalogi nismo ugotavljali, ugotovili smo le, kateri so najugodnejši pogoji za rast in sporulacijo streptomicete.

### **Kristina Krnjak: Primerjava hitrosti razmnoževanja probiotičnih bakterij iz preparatov, namenjenih otrokom**

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, dipl. inž. živ. tehn., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Probiotične bakterije so pomemben del mikroflore v prebavnem traktu človeškega organizma. Črevesna mikroflora človeku zagotavlja dober imunski odziv oz. obrambo pred škodljivimi (patogenimi) bakterijami. Najdemo jih v različnih živilih, najbolj priljubljeni so jogurti, ali pa v obliki zdravila oz. dodatka k prehrani, ki vsebuje liofilizirane (osušene pri nizki temperaturi) mlečnokislinske bakterije. Najpogosteje se jih uporablja vzporedno z jemanjem antibiotikov, saj je takrat število mlečnokislinskih bakterij v črevesju zmanjšano in lahko pride do prebavnih motenj.

Rast števila bakterijskih celic opišemo s krivuljo, ki jo razdelimo v več faz. Prva faza je obdobje prilagajanja na okolje, druga je faza eksponentne ali hitre rasti, tretja pa je, ko se njihovo razmnoževanje ustavi zaradi porabljenih hranil iz okolja, t.j. faza mirovanja. Če celice gojimo v bistrem tekočem gojišču, lahko merimo njihovo rast tudi z merjenjem motnosti gojišča. Več kot se je celic v njem namnožilo, bolj je motno. Motnost lahko izrazimo z absorbanco. To je količina svetlobe, ki se absorbira v nekem vzorcu. Naprava za merjenje absorbance je kolorimeter. Bolj kot je vzorec gojišča moten, večja je absorbanca.

Ko podatke po različnih časovnih obdobjih zberemo, dobimo vrednosti, ki nam povejo ali je število bakterij v posameznih intervalih naraslo.

### **Jernej Kenk: Ustne vodice kot antimikotik/antibiotik v gojišču za tkivno vzgojo rastlin**

Šolski mentor: Jure Slatner, laborant, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

S svojo projektno nalogo sem poskušal ugotoviti, ali ustne vodice delujejo kot antimikotik oz. antibiotik na semena paradižnikov, ki sem jih posadil na gojišče. Poskušal sem preveriti učinkovitost antibakterijskega učinka ob hkratnem nevplivu na evkarionte. Ugotovil sem, da so vse snovi (ustne vodice in Varekina – natrijev hipoklorit- $\text{NaClO}$ ) delovale kot antimikotik oz. antibiotik, a so hkrati povzročile, da semena niso vzknila.

Na sterilna gojišča sem posadil semena paradižnika v brezprašni komori, s katero sem zagotovil sterilnost zraka okolja, v katerem sem delal. Ker pa semena niso vzknila po pričakovanih štirih dneh, sem moral semena ponovno posaditi, vendar sem jih posadil le na filtrirni papir. Rezultati so bili enaki.

### **Klara Suhodolnik: Proučevanje in primerjava reproduktivnih značilnosti dveh linij laboratorijskih miši**

Strokovna mentorica: dr. Martina Perše, dr. vet. med., UL, Medicinska fakulteta

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, prof. biol., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V tej projektni nalogi nas je zanimala reprodukcija miši z izbitim genom za tvorbo holesterola. Torej, kako holesterol vpliva na razmnoževanje. Predvidevali smo, da več kot bo izbitega gena za sintezo holesterola, manjša in slabša bo reprodukcija laboratorijskih miši. Torej manj kotitev in manj novorojenih mladičev.

Poskus je bil uspešen in prišli smo do rezultatov, ki so potrdili naša predvidevanja. Holesterol res vpliva na reprodukcijo. Višje kot je pomanjkanje gena, manjša je reprodukcija. Hipotezo smo na koncu potrdili. Prišli pa smo do ugotovitve, da pomanjkanje holesterola bolj izrazito vpliva na reprodukcijo pri ženskem spolu kot pri moškem.

### **Tadej Obreza in Tine Gotar: Merjenje mikrobne biomase**

Strokovni mentor: Benjamin Tome, dipl. biol., LEK, operativni razvoj, Oddelek za mikrobiologijo in fermentacijo

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Glavni namen v najini raziskovalni nalogi je bil ugotoviti, kako meritve za količino biomase, pridobljene z biomasnim monitorjem, korelirajo (sovpadajo) z izmerjeno količino biomase (merjeno z metodo suhe biomase) in z meritvami viskoznosti. Želela sva ugotoviti, kako učinkovita je metoda merjenja biomase izračunane iz viskoznosti v primerjavi z biomasnim monitorjem (naprava znamke Hamilton) v gojišču za proizvodnjo klavulanske kisline.

Meritve sva izvajala v okviru treh različnih poizkusov (prvi poizkus v vzorcih zunaj bioreaktorja, drugi poizkus v tekočem gojišču v bioreaktorju in tretji poizkus v gojišču za proizvodnjo klavulanske kisline). Dobljene rezultate sva uredila v preglednice in narisala grafe ter naredila korelacije za posamezne metode merjenja biomase.

Z analizo rezultatov sva ugotovila, da biomasni monitor v »off line« načinu ne deluje preveč učinkovito. V »on line« načinu smo z njim dobili zelo dobre rezultate, ki nam več povedo o poteku bioprocasa ter lastnostih naše biokulture kot podatek o biomas, izračunani iz viskoznosti, ter količini suhe biomase. Poleg tega sva ugotovila, da je merjenje z biomasnim monitorjem najučinkovitejša metoda za merjenja biomase, saj je omogočeno neprestano merjenje in posledično lažje nadzorovanje procesa.

Končni sklep najine raziskovalne naloge je, da je merjenje biomase z merjenjem viskoznosti učinkovito do maksimalno 40. ure fermentacije, za nadaljnje merjenje biomase pa je edina uporabna metoda merjenje z biomasnim monitorjem.

### **Blaž Ostrež in Maja Vavken: Ugotavljanje sposobnosti in pomen tvorbe biofilma bakterije *Salmonella infantis***

Strokovna mentorja: dr. Štefan Pintarič, dr. vet. med., mag. Jasna Mičunović, dr. vet. med.; Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Biofilmi so mikrobne združbe, s katerim se vsakodnevno srečujemo v veterini, medicini in v industrijskih proizvodnjah.

V industrijskih procesih biofilmi predstavljajo velik problem, zato je veliko raziskav usmerjenih v preučevanje pomena bakterijskih biofilmov. Težave se kažejo v mehaničnih ovirah, slabšem



prevajanju toplote, biološkem obremenjevanju kovinskih delov opreme in delov iz umetne snovi z mikroorganizmi, kar pomeni predvsem v živilski industriji kontaminacije in oporečnost živil z mikroorganizmi.

Problemi z biofilmi se pojavljajo tudi na farmah, namenjenih reji perutnine, saj se piščanci, okuženi s salmonelami, ne smejo prodajati kot mesni pripravki. Kljub različnim dezinfekcijskim sredstev biofilm še vedno ostaja eden glavnih problemov kontaminacije, saj so zelo trdovratni.

V projektni nalogi smo poskušali dokazati, da *Salmonella infantis* tvori biofilme. Ugotovili smo, da mikroorganizmi v biofilmu preživijo, kljub temu da nimajo virov hranilnih snovi.

### **Jan Salvatierra Medved in Jure Terček: Poslovni načrt mikropivovarne**

Šolska mentorja: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. teh., prof. Jože Prosenik, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V zadnjem času je tehnologija na več področjih postala dostopnejša, meje oz. ovire med svetovnimi trgi pa se zmanjšujejo. To velja tudi za tehnologijo, ki je potrebna za pripravo piva. Priprave, kot so fermentorji, sodi in materiali za pripravo tretje najpopularnejše pijače na svetu, so dostopni za kogarkoli, ki je zainteresiran za njihovo uporabo. Prav tako je na spletu na voljo precej informacij, napotkov in izkušenj za uspešno izvajanje tega bioprocasa.

Spremenila se je tudi kultura in način uživanja piva ter pristop ljudi do te pijače. Dandanes večinoma sprejemajo pivo precej drugače kot včasih. Pivo so dojemali kot delavsko pijača, za bolj prefinjene pive pa se je bolj spodobilo pitje vina. Ta trend se je s časom spremenil do te točke, da pivo sedaj uvrščamo med ene bolj prestižnih pijač. Seveda je to odvisno tudi od priprave piva. Pivo se vedno bolj uživa v manjših količinah, kot dražji, bolj prestižen napitek.

Te spremembe v kulturi so spodbudile razvoj mikropivovarn, zato jih v zadnja leta videvamo vedno več. Mikropivovarna je, v nasprotju z navadno pivovarno, manjša verzija le-te. Namen mikropivovarn ni velika proizvodnja piva za distribucijo po vsej državi ali celo celini. Njihov cilj je manjša proizvodnja bolj kakovostnih piv, različnih okusov in načinov priprave.

Zaradi takšnih sprememb v kulturi in pivovarski industriji smo se odločili napisati poslovni načrt za bodočo mikropivovarno.

### **Špela Dolžan in Anja Hren: Tanin v semenih navadne in tatarske ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench in *Fagopyrum tataricum* Gaertn.)**

Strokovna mentorica: prof. dr. Zlata Luthar, Katedra za genetiko, biotehnologijo, žlahtnjenje in statistiko, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Ljubljana

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, prof. biol., BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Navadna in tatarska ajda že dolgo uspevata na našem območju. Danes se, po upadu njune pridelave v petdesetih letih prejšnjega stoletja, zopet začenjata uveljavljati.

V najinem projektnem delu sva desetim vzorcem navadne ajde in desetim vzorcem tatarske ajde določili odstotek tanina v semenih. Pri navadni ajdi sva imeli pet sort in eno populacijo, med tatarskimi ajdami pa vse populacije.

Vsebnost tanina v semenih navadne in tatarske ajde sva določili z vanilin HCl-testom. Semena navadne in tatarske ajde sva zmleli in iz 0,4 g moke z absolutnim metanolom ekstrahirali skupne tanine, ki so se z dodanim vanilinom obarvali. S spektrofotometrom sva izmerili absorbanco in na podlagi katehinske standardne krivulje in enačbe izračunali odstotke tanina. Razlike v vsebnosti tanina sva izračunali z analizo variance in razlike med vzorci potrdili z Duncunovim testom homogenih skupin.

Ugotovili sva, da ima navadna ajda značilno več tanina kot tatarska pri tveganju  $p = 0,05$ . Potrdili sva tudi razlike med vzorci obeh vrst ajde. Največ tanina (3,88 %) je vsebovala sorta Darja, pridelana v letu 2014, najmanj (2,13 %) pa sorta Siva pridelana v letu 2013. Enako (2,13 %) tanina je vsebovala najboljša tatarska ajda z oznako 15, medtem ko je tatarska ajda z oznako 20 vsebovala najmanj (1,43 %) tanina.

### **Žiga Kozjek in Marko Žerjal: Ugotavljanje značilnosti izolatov bakterij *Salmonella enterica subsp. enterica serovar infantis* iz jat brojlerjev**

Strokovni mentorici: dr. Mateja Pate, dr. vet. med. in mag. Jasna Mićunović, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Problematika najine projektne naloge je povezana z naraščanjem prisotnosti bakterije *Salmonella infantis* v jatah brojlerjev, ki ga od leta 2010 opažamo v Sloveniji. Namen naloge je bil raziskati prisotnost *S. infantis* v vzorcih okolja iz rejskega objekta, v katerem je bila *S. infantis* v preteklosti že večkrat ugotovljena, in na podlagi genotipske metode gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) ugotoviti genetsko raznolikost morebitnih pridobljenih izolatov.

V objektu smo odvzeli brise vzorcev prostorov in opreme v objektu in jih preiskali z usmerjeno bakteriološko preiskavo na salmonele. Med 24 odvzetimi vzorci je bilo 13 pozitivnih na salmonele. Izolate smo identificirali s serotipizacijo in analizirali z metodo PFGE. Ugotovili smo dva pulzotipa. Eden od teh, ki je bil skupen večini izolatov, je bil opredeljen kot nov v bazi podatkov Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete, drugi pa je bil v preteklosti že ugotovljen in je bil definiran kot prevladujoči pulzotip pri izolatih *S. infantis* iz brojlerjev v Sloveniji.

V nalogi smo potrdili vse zastavljene hipoteze: iz vzorcev okolja in opreme v rejskem objektu smo izolirali *S. infantis*, izolati so bili sicer genetsko precej homogeni, a smo vseeno uspeli odkriti dva pulzotipa. Ugotovitev *S. infantis* v vzorcih okolja in opreme v praznem rejskem objektu po že opravljenem razkuževanju dokazuje neuspešno razkuževanje. Ugotovitev dveh pulzotipov izolatov iz preiskovanih vzorcev nakazuje obstoj različnih tipov *S. infantis* v objektu in njegovi neposredni okolici ter možnost vnosa *S. infantis* v objekt iz različnih virov.

### **Lan Perko: Vpliv elektromagnetnega sevanja na kalitev in razvoj paradižnika in grškega sena**

Šolski mentor: Jure Slatner, laborant, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

Pri projektne delu sem opazoval kalitev in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*) in grškega sena (*Trigonella foenum-graecum*). Opazoval sem učinke različnih vrst elektromagnetnega valovanja na kalitev in razvoj kalčka. Ugotovil sem kvarne vplive sevanja mikrovalovne pečice, medtem ko sevanje mobilnega telefona, internetnega routerja in LCD-televizorja ni vidno vplivalo na kaljenje teh dveh vrst rastlin.

### **Špela Komatar in Sanja Nartnik: Učinkovitost delovanja ustnih vodnic na mikrobnno floro v ustih**

Šolski mentor: Jure Slatner, laborant, BIC Lj., Gimnazija in veterinarska šola

V projektne nalogi sva preizkušali učinkovitost delovanja ustnih vodnic na celotno mikrobnno floro ust. Primerjali sva njihovo delovanje v odvisnosti od časa in kako vsebnost alkohola vpliva na njihovo delovanje.

Ugotovili sva, da ustne vodice ne delujejo zaviralno na vse vrste bakterij, ki se nahajajo v naših ustih, ampak le na nekatere. S praktičnimi poizkusi sva ugotovili, da se s časom učinkovitost vodnic

zmanjšuje. Vodice z vsebnostjo alkohola pa se po učinkovitem delovanju bistveno ne razlikujejo od tistih brez alkohola.

Potrdili sva eno od treh hipotez in ugotovili, da bi za natančnejše rezultate morali izolirati in identificirati posamezne vrste bakterij, vendar bi ti postopki zaradi velikega števila vrst bakterij terjali daljši čas, kot ga imava na voljo v okviru projektne dela.

### **Nino Jelnikar: Nitrifikacija v tropskem in hladnovodnem akvariju**

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. teh.

V projektne nalogi sem predstavil nitrifikacijo in njen namen v okolju. Ta proces je pomemben pri kroženju dušika. Pri nitrifikacijskem procesu pride do oksidacije amonijaka in nitrita, produkt oksidacije amonijaka je nitrit, ta pa oksidira v nitrat. Proces povzročajo avtotrofne bakterije, ki jih delimo v dve skupini, na nitritne in nitratne. Nitrifikacija lahko poteka v zemlji, na kopnem in tudi v vodi. Pogosta predstavnik nitrifikacijskih bakterij sta *Nitrosomonas* in *Nitrobacter*.

V projektne nalogi sem pozornost posvetil nitrifikaciji v akvariju. V tropskih akvarijih je proces nitrifikacije ključnega pomena, saj nitrifikacijske bakterije pretvorijo strupen amonijak in nitrit v nekoliko manj strupen nitrat. Nitrifikacijske bakterije v akvarij naselimo s pripravki, v katerih se nahajajo. Možno jih je kupiti v skoraj vsaki trgovini za živali. Od tukaj izvira ideja za projektne naloge, saj ne moremo zagotovo vedeti, ali ti pripravki res vsebujejo prave nitrifikacijske bakterije. V projektne nalogi sem zato primerjal razliko v količini dušičnih spojin v vodi akvarija, v katerem smo uporabili omenjene pripravke, z vrednostmi količin v akvariju, v katerem jih ni. To sem testiral tako, da sem tri tedne z reagenti meril koncentracije amonija/amonijaka, nitrita in nitrata v obeh akvarijih.

Rezultati so pokazali, da v akvariju, v katerem je uporabljen pripravek, poteka nitrifikacija pravilno, saj so bile vse koncentracije v optimalnih vrednostih. V akvariju brez pripravka pa so bile koncentracije nitrita v toksičnih vrednostih, toda že en teden kasneje so bile te vrednosti v tolerantni meji. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da uporaba pripravkov, ki vsebujejo nitrifikacijske bakterije, ni zamen. Toda, tudi v akvariju brez pripravka so bile koncentracije večino časa na meji tolerantnih vrednosti, ampak, kakor so pokazale meritve, ima tak akvarij zelo nestabilno ravnovesje, kar seveda ni dobro za njegove prebivalce.