

## POVZETKI PROJEKTHNIH NALOG IZ PREDMETA BIOTEHNOLOGIJA 2013

### **Ajda Čampa in Kaja Špruk: Banke za shranjevanje človeških tkiv in celic z namenom zdravljenja**

Strokovna mentorica: Janja Dobravec, dipl. mikrobiol.

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, dipl. biol.

V projektnem delu sva se posvetili predvsem matičnim celicam: kaj so, kakšna je njihova naloga, zakaj so pomembne ter za kaj se jih v Sloveniji in po svetu uporablja.

Matične celice so nediferencirane celice v zarodku, ki se lahko dolgotrajno nesimetrično delijo in so samoobnovljive. Značilna vrsta so mezenhimske in hematopoetske matične celice, ki se nahajajo v kostnem mozgu, v popkovnični krvi, v maščobnem tkivu pa samo mezenhimske. Zaradi njihove dobre prilagoditve se dobro ohranijo tudi v drugem okolju. Glede na potencial matične celice lahko delimo na totipotentne, pluripotentne, mutipotentne in unipotentne. Odvzem matičnih celic iz pokovnične krvi je preprost postopek, ki je neboleč tako za mater kot za otroka. Pridobimo jih tudi iz mlečnih zob, kostnega mozga in maščobnega tkiva.

Poznamo dve vrsti transplantacije matičnih celic, in sicer avtologno in alogeno. Avtologna pomeni uporabo pacientu lastnih celic. Ta postopek je najbolj varen, saj ne prihaja do zavrnitvenih reakcij. Alogena pa pomeni uporabo tujih matičnih celic, ki so najbolj primerne za pacienta.

Danes se z matičnimi celicami zdravi različne vrste krvnega raka, bolezni kostnega mozga, motenj hemoglobina in metabolizma. V Sloveniji imajo eno javno banko in nekaj zasebnih. Javne shranjujejo za alogene namene, zasebne za avtologne.

V Sloveniji sta zakonsko določeni kakovost in varnost človeških tkiv in celic.

### **Blaž Zupančič in Jure Mlekuž: Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom pri sevih bakterije *Staphylococcus pseudintermedius* in *Staphylococcus aureus* pri psih**

Strokovna mentorica: dr. Irena Zdovc dr. vet. med.

Šolska mentorica: prof. Irena Štrumbelj Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

V bolnišnicah in podobnih ustanovah je vse več problemov z bakterijami vrste *Staphylococcus aureus*. Nevarne so zato, ker so dobro odporne proti številnim antibiotikom, med drugim tudi proti penicilinu in meticilinu.

V projektni nalogi sva ugotavljala, ali so bakterije, ki predstavljajo mikrofloro nosne sluznice, odporne proti meticilinu in drugim antibiotikom, ter ali je med predstavnicami nosne mikrobiote tudi *S. aureus*.

Najprej sva vzela brise iz nosov ljudi in njihovih domačih živali. Brise sva nacepila na krvni agar ter v tekoče selektivno in obogatitveno gojišče. Zanimive bakterije s krvnega agarja in bakterije, ki so zrastle na tekočem gojišču, sva precepila na novo ploščo krvnega agarja. Najbolj hemolitične bakterije sva precepila na gojišče MRSA, na katerem zrastejo le bakterije, odporne proti antibiotiku meticilinu.

Da bi izvedela, na kateri antibiotik so bakterije, ki so zrasle na MRSA gojišču, odporne, sva naredila še antibiogram.

### **Črt Košir in Matej Vidic: Proizvodnja etanola iz obnovljivih virov**

Strokovna mentorja: dr. Petar Djinović, dr. Gasan Osojnik

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

Pri projektni nalogi proizvodnja etanola iz obnovljivih virov smo varili pivo. Ugotavljali smo, kako koncentracija sladkorja vpliva na koncentracijo nastalega alkohola pri fermentaciji in pri kateri temperaturi lahko kvasovke delujejo. Opazovali smo izhajanje mehurčkov v reaktorju. Mehurčki so predstavljali nastanek ogljikovega dioksida. Nastajal je do konca fermentacije, kar smo lahko opazili, ko mehurčki niso bili več vidni.

Pri prvem delu naloge smo uporabili navaden namizni sladkor, pri drugem delu smo poskušali sladkor pridobiti iz pomaranč. Najprej smo se pozanimali, katere sladkorje vsebujejo pomaranče in v kolikšni koncentraciji. Tudi pivino smo pripravili na drugačen način. Nismo uporabili sterilne vode, temveč pomarančni sok, in sicer v tolikšni količini, da je bilo dovolj sladkorja za fermentacijo.

Pri delu smo uporabili naslednje metode: sterilizacijo reaktorja, pripravo fermenta, vzorčenje, polnjenje steklenic, merjenje direktnega sladkorja po Fehlingu, določanje sladkorja z refraktometrom, sušenje soka pomaranč z rotavaporjem, plinsko kromatografijo in opazovanje.

Fermentacija je potekala v zaprtem reaktorju, zato smo morali z merilniki nadzorovati temperaturo, pH vrednost ter tlak. Ko smo pivino prečrpali v reaktor, je bila temperatura okoli 30 °C, do konca fermentacije pa se je spustila na približno 23 °C. Tudi pH vrednost je bila sprva višja, in sicer okoli 6, a se je proti koncu fermentacije spustila na 4. Naraščala je tudi koncentracija etanola, in sicer sorazmerno s časom fermentacije. Narastla je do približno 5 %.

**Florjan Kavčič in Lenart Košir: Primerjava dveh (elektro)kemiluminiscenčnih testov za ugotavljanje protiteles IgG in IgM proti praživali *Toxoplasma gondii* pri seropozitivnih nosečnicah**

Delovna mentorica: asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikr.

Šolska mentorica: prof. Nada Udovč Knežević, dipl. biol.

Okužba s *Toxoplasma gondii* je ena najbolj razširjenih parazitskih boleznih na svetu. Nevarna je pri nosečnicah, kjer lahko parazit preko placente okuži plod, ali pa pri imunsko oslabljenih osebah. Človek se lahko okuži z zaužitjem premalo termično obdelanega mesa, ki vsebuje tkivne ciste parazita, ali z zaužitjem hrane in vode, okužene z mačjimi iztrebki, kjer je prisotna tkivna cista parazita. Mačka je končni gostitelj parazita.

Nosečnice pregledujejo v prvem, drugem in tretjem trimesečju nosečnosti. Serume pregledujejo na protitelesa IgG in IgM proti *T. gondii*. Če sta oba testa pozitivna, kažeta na svežo primarno okužbo, ki je nevarna za plod. S testom ugotavljamo moč vezave protiteles na toksoplazemski antigen. Na podlagi testa lahko ločimo svežo okužbo in okužbo staro več kot 6 mesecev.

Pri projektni nalogi sva s pomočjo mentorja primerjala dve diagnostični metodi za določanje prisotnosti protiteles IgG in IgM proti parazitu *T. gondii*. Testirala sva 88 serumov nosečnic, pri katerih sva ugotovila prisotnost protiteles IgG in IgM proti parazitu. Aparata sta pri protitelesih IgM pokazala ujemanja v 73 pozitivnih in neujemanja v 15 negativnih rezultatih. Pri protitelesih IgG, pa je bilo 87 vzorcev pozitivnih, do neujemanja je prišlo le pri enem vzorcu, ki je bil negativen.

Menimo, da sta obe metodi primerni za določanje protiteles IgG in IgM proti *Toxoplasma gondii* v diagnostiki toksoplazme.

**Jaka Klenovšek in Pia Lucija Rotar: Spremljanje respiracijskih procesov pri biološki denitrifikaciji podtalnice**

Strokovna mentorica: dr. Anita Jemec

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

Glavni cilj projektne naloge je bil ugotoviti, kakšni so optimalni presnovni pogoji za združbo mikroorganizmov v hibridnem membranskem bioreaktorju. Optimalne pogoje smo določali na podlagi plinov, ki so se sproščali med poskusom. Izvedli smo dva poskusa.

V prvem smo spreminjali razmerje med ogljikom (C) in dušikom (N) (C/N=1, 1,5; 2.3 in 3.5), z namenom da ugotovimo, kakšno je optimalno razmerje za presnovne procese združbe mikroorganizmov, v

drugem pa smo pri optimalnem C/N razmerju (C/N =3,5) testirali, kakšen vpliv ima različna koncentracija nitratnih ionov.

Poskusi so potekali 14 dni. Med poskusom smo vzorčili plinsko in tekočo fazo v reaktorjih ter določili dinamiko plinov N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> ter ionov NO<sup>-3</sup>, NO<sup>-2</sup> in NH<sup>+4</sup>. Potek reakcije smo spremljali s spremljanjem pritiska v steklenicah. Ugotovili smo, da je denitrifikacija najboljša pri C/N=3,5, saj je tu nastalo najmanj NO<sup>-2</sup> in toplogrednega plina N<sub>2</sub>O. Koncentracija obeh je naraščala z manjšanjem razmerja C/N. V drugem poskusu NO<sup>-2</sup> in N<sub>2</sub>O nista nastala, kar potrjuje ugodnost izbranega razmerja C/N.

Ugotovili smo tudi, da se po koncu poskusa v reakcijski mešanici pojavi tudi NH<sup>+4</sup>, kar je posledica razgradnje biomase po koncu poskusa.

### **Jaka Rihar: Predklinične študije zdravil za uporabo v veterinarski medicini**

Strokovna mentorja: prof. dr. Silvestra Kobal, asist. Tomaž Snoj

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, prof. biol.

Projektna naloga zajema podrobno predstavitev poskusa, ki nam je pokazal, kako testirani zdravilni pripravki pomagajo pri zaustavitvi diareje pri podganah. Projektna naloga zajema tudi kratek pregled zakonodaje, ki jo moramo upoštevati.

Preiskušana zdravila so bila: taninska kislina, vlakna iz kostanjevega ekstrakta in kompleks tanina in jajčnega albumina. Za povzročitev diareje smo uporabili ricinusovo olje.

Ugotovili smo, da je bil najučinkovitejši kompleks tanina in jajčnega albumina, ki pa se ni bistveno razlikoval od vlaken iz kostanjevega ekstrakta.

### **Jan Kežzar: Funkcija kinaze HwPbs2, aktivatorja ključne kinaze signalne poti HOG, v odzivu na povišano osmolarnost v okolju pri ekstremno halotolerantni glivi *Hortaea werneckii***

Kljub obsežnim raziskavam na *Hortaea werneckii* je njena sposobnost prilagajanja na slana okolja še vedno uganka, zato v tej projektni nalogi skušamo razvozlati vsaj delček te uganke. Namen naloge je ugotoviti funkcijo ter razliko med tremi različicami proteina HwPbs2 v HOG signalni poti (v ta namen smo prekinili vejo signalne poti preko proteina Ste11). Zanima nas predvsem, na kakšen način se na slanostni stres odzovejo transgene kvasovke, ki jim vstavimo ta protein.

Uporabili smo proteine: HwPbs2A, HwPbs2B1, HwPbs2B2, ScPbs2 (kvasovkam lasten protein) in nespremenjene divje kvasovke za referenco. Na podlagi rezultatov kapljičnih testov in metode za

identifikacijo proteinov prenos western bomo sklepali, kako prenos signala preko teh proteinov vpliva na odziv celic na visoke koncentracije soli.

Rezultati so pokazali, da so vse tri različice HwPbs2 kinaze sposobne nadomestiti kvasovki lastno kinazo ScPbs2.

### **Jana Šauperl: Starševsko obnašanje miši brez ene kopije gena SF-1**

Strokovni mentor: prof. dr. Gregor Majdič

Delovna mentorica: Tanja Španić, dr. vet. med.

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol.

V projektni nalogi smo preučevali, ali ena manjkajoča kopija steroidogenega faktorja 1 vpliva na starševsko – materinsko obnašanje miši. Predvidevali smo, da bodo miši SF-1 HET izražale slabše starševsko obnašanje.

Testiranja smo opravili v dveh delih. Najprej smo 20 minut opazovali obnašanje miši, ki pred testiranjem ni imela nobenih izkušenj z mladiči. Naslednji dan smo opazovali isto miš 15 minut, s tem da je takrat že imela eno izkušnjo z mladiči. Testirali smo v polikarbonatnih kletkah, brez hrane in vode, s tremi mladiči moškega spola.

Testne živali so, ne glede na genotip, izražale vzorce starševskega - materinskega obnašanja. Vse so negovale, ovohavale in lizale ter čepele nad mladiči. Pri prvem testiranju smo ugotovili, da je čas od začetka merjenja do dviga prvega in drugega mladiča pri samicah SF-1 HET bistveno daljši kot pri samicah divjega tipa, pri tretjem mladiču pa te razlike ni. Enako razliko smo opazili tudi pri prinosu posameznega mladiča v gnezdo.

Pri drugem testiranju, opravljenem naslednji dan, smo ugotovili statistično značilno razliko pri dvigu vseh treh mladičev in tudi pri prinosu le-teh v gnezdo.

### **Jurij Marinko in Krištof Orešnik: Priprava semen in rastlinskih tkiv za vnos v 'in vitro' razmere**

Mentor: Jure Slatner

Namen naloge je bilo najti najučinkovitejši način priprave semen in rastlinskega tkiva za vnos v in vitro pogoje.

Najprej smo pripravili rastlinska gojišča. Semena smo razkužili s tremi različnimi razkužili: koloidnim srebrom, PPM (zmes izotiazolonov) in varikino. Razkužena semena smo posadili na MS gojišča, jih

postavili na svetlobo in opazovali dogajanje. Poskus je bil izveden v aseptičnih pogojih. Poskus smo ponovili trikrat. V dveh poskusih smo uporabili semena, v enem pa čebulico kanadskega zvončka.

Nobeno seme ni vzkalilo, pri tem se je na večini gojišč pojavila plesen. Zvončki so večinoma vzkalili, vendar so kasneje splesneli. Verjetni razlog, da semena niso vzkalila, je, da se zaradi svoje ovojnice niso dobro razkužila. Pojav plesni na gojiščih je mogoče pripisati ne dovolj natančni izvedbi poskusa (pogoji niso bili aseptični).

### **Robyn Strmšek in Karmen Žbogar: Zdravilni učinki različnih vrst netreskov in netreskovcev na ušesne bakterije živali**

Mentor: Jure Slatner

Netresk je rastlina, ki so jo že v antiki uporabljala za zdravljenje ran, ki se niso rade celile, pri kožnih čirih in opeklinah. Pomagal je tudi pri kačjih ugrizih. Predvsem pa je znan pri zdravljenju ušesnih vnetjih.

V svetu je znanih preko štirideset različnih vrst netreskov. V Sloveniji sta znani le dve vrsti, to sta *Sempervivum tectorum* in *Sempervivum juvanii* in dve vrsti netreskovcev, to sta *Jovibarba hirta* in *Jovibarba arenaria*.

S praktičnim delom sva želeli preveriti, ali vse vrste netreskov podobno učinkujejo na ušesne bakterije. Namnožili sva ušesne bakterije različnih živali in z antibiogrami ugotavljali učinkovitost vseh štirih v Sloveniji rastočih vrst netreskov.

Ugotovili sva, da glede na antibiotični učinek na ušesno floro med različnimi vrstami netreskov ni bistvenih razlik.

### **Kaja Virant in Lara Svet: Molekularna tipizacija sevov *Campylobacter jejuni* izoliranih iz kokoši z metodo PFGE**

Strokovni mentor: dr. Matjaž Ocepek

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol.

V projektni nalogi sva predstavili bakterijo *Campylobacter jejuni*, ki je, kot kažejo dosedanje raziskave, zelo razširjena pri perutnini in predstavlja velik problem v prehranjevalni verigi.

Želeli sva ugotoviti, kakšna je stopnja okuženosti pri 7 dni starih piščancih in s pomočjo pulzne elektroforeze (metoda PFGE) ugotoviti, kakšna je pestrost (raznolikost) sevov *Campylobacter jejuni*.

Rezultati projektne naloge so pokazali nepričakovano veliko pestrost, to pa je spodbudilo nadaljnje in obširnejše raziskave.

### **Lorena Kunc in Maja Spirovska: Spremljanje lokalizacije katepsina C v fuziji z GFP**

Strokovni mentor: Dejan Suban, univ. dipl. inž.

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol.

Za poznavanje procesov razgradnje beljakovin je potrebno znanje o encimih imenovani proteaze. To so encimi, ki razgrajujejo proteine. Proteaze, med njimi tudi katepsin C, se nahajajo tudi v celičnih kisljih veziklih, ki jih imenujemo lizosomi. Te organele so del živalskih in rastlinskih celic.

Z metodami molekularne biologije smo vključek katepsina C v fuziji z GFP vstavili v vektor pEGFP-N21 in ga namnožili v bakterijah. Sev bakterije *Escherichia coli* DH5 je pogosto uporabljen kot sistem za proizvodnjo večjih količin rekombinantnih plazmidov. Katepsin C v fuziji z GFP smo nato uspeli izraziti v celicah HEK 2932.

Na podlagi opazovanj transficiranih celic pod fluorescentnim mikroskopom smo ugotovili, da je izražanje gena za katepsin C v fuziji z GFP v sesalskih celicah HEK 293 dobro optimizirano, saj smo lahko zasledili velike količine fuzijske beljakovine. Dobljeni rezultati so pokazali, da fuzijski protein in normalni katepsin C kolokalizirata.

### **Loti Brus in Sabina Halkič: Genotipizacija kandidatne regije pri kraških ovčarjih**

Zunanji mentor: prof. dr. Peter Dovč

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol.

V populaciji kraškega ovčarja se pojavlja genetska napaka, ki povzroča nenormalen razvoj uretra, posledica česar je, da psički ne morejo zadrževati urina. Prizadete živali imajo pogosto vnetje sečil, kar je pogosto razlog za njihovo izločitev. Z analizo genoma z biočipom smo odkrili tri regije, kjer se utegne nahajati kandidatni gen.

Iz krvi smo izolirali DNA, jo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in jo analizirali z restrikcijskimi encimi. Nato smo z agarozno gelsko elektroforezo ločili fragmente DNA po velikosti. Videli smo, da se skupina zdravih kraških ovčarjev in tistih z ektopičnim uretrom razlikujeta glede na DNA označevalce v bližini kandidatnega gena.

### **Martina Podgoršek: Določanje aflatoksinov z visokoločljivostno kromatografijo**

Strokovna mentorica: doc. dr. Breda Jakovac Strajn, dr. vet. Med.

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

Mikotoksini so sekundarni toksični presnovki plesni, ki so škodljivi za ljudi in živali. Med njimi so posebno nevarni aflatoksini. Njihovo prisotnost v krmi lahko dokažemo na več načinov, vendar je najbolj razširjena metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

S projektnim delom smo želeli dokazati uporabnost tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za dokaz prisotnosti aflatoksina B1v vzorcih krme in aflatoksina M1 v vzorcih mleka. Z mikološko preiskavo smo želeli dokazati prisotnost spor plesni v krmi, čeprav vzorci organoleptično niso bili plesnivi.

Preiskali smo tri vzorce krme za dokaz vsebnosti aflatoksina B1 in en vzorec za dokaz prisotnost aflatoksina M1. Dva vzorca krme sta vsebovala  $54,4 \times 10^{-5}$  mg aflatoksina B1/kg vzorca, tretji pa 0,635 mg aflatoksina B1/kg vzorca. Dovoljeno koncentracijo (0,02 mg/kg pri 12 % vlagi vzorca), ki jo določa Direktiva 2002/32 in Uredba Komisije 574/2011, je presegel en vzorec. V mleku ni bilo prisotnega aflatoksina M1.

Nadalje smo z mikološko metodo na saprofitske plesni preiskali štiri vzorce krme. Skupno število zraslih kolonij plesni se je gibalo od 1 do  $44 \times 10^3$ /g. Največje število zraslih kolonij plesni je vseboval koruzni šrot ( $44 \times 10^3$  CFU/g3). Prevladovale so plesni vrste *Aspergillus* ( $34 \times 10^3$  CFU/g).

### **Karolina Štepec in Maša Zalar: Vpliv giberlinske kisline na kaljenje juvanovega netreska (*Sempervivum juvanii*)**

Mentor: Jure Slatner

Juvanov netresk je ena najredkejših rastlinskih vrst z zelo majhnim arealom in zato izjemno ogrožena vrsta. Množi se pretežno vegetativno, zato je tudi genski sklad vrste sorazmerno skromen. Med botaniki velja mnenje, da se vrsta sploh ne množi s semeni.

Namen projektnega dela je bil ugotoviti, v kakšnih razmerah bodo semena juvanovega netreska najbolje vzkalila. Preizkusili smo tri metode, ki jih uporabljajo gojitelji za kaljenje vrst, ki sicer slabo kalijo: za puščavske rastline, alpske rastline in rastline z dolgotrajno dormanco semen.

Ugotoviti smo želeli, kako hitro bodo semena juvanovega netreska vzkalile s pomočjo giberelinske kisline in učinkovanja  $H_2SO_4$ . Nekoliko večji odstotek vzkaljenih rastlin smo zabeležili le pri tretiranju semen z giberelinsko kislino, sicer pa je bila ugotovljena kaljivost manjša od 10 %.



### **Matevž Štefančič: Tumorigene lastnosti matičnih celic**

Strokovni mentor: prof. dr. Peter Dovč

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, prof. biol.

Matične celice so ključ našega življenja, saj obnavljajo ali nadomestijo tkiva, ki so okvarjena. Imajo možnost neskončne delitve. To jim omogoča encim telomeraza.

Matične celice so lahko hkrati koristne, saj lahko gradijo nova tkiva ali obnavljajo poškodovana, a tudi usodne, saj lahko povzročajo tudi tumorje. Ravno eno najhujših oblik tumorjev, teratokarcinome, povzročajo matične celice.

S pomočjo scid mišk so ugotavljali, zakaj pride do tvorbe tumorjev in kakšni so ti tumorji. Po navadi tumorje povzročajo embrionalne matične celice, pa tudi človeške inducirane pluripotentne matične celice. Scid miška je miška, ki ima močno okvarjen imunski sistem in zato ne zavrača tujih celic.

### **Petra Grampovčan: Identifikacija kofeina v čaju**

Strokovna mentorja: prof. dr. Borut Štrukelj, Eva Tavčar

Šolska mentorica: Irena Štrumbelj-Drussany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Projektna naloga se je navezovala na kofein, ki ga najdemo v čaju. Ugotavljali smo, ali se kofein raztaplja v dveh različnih topilih. Ti dve topili sta bili diklorometan in etil acetat.

Čaj, iz katerega smo izolirali kofein, smo najprej skuhal. Nato smo ga filtrirali skozi filtrni papir, ekstrahirali in destilirali. Nato smo s pomočjo mureksidne reakcije ugotovili, da so kristalčki ksantinski alkaloidi. S tankoplastno kromatografijo smo nato dokazali, da je dobljena snov res kofein.

### **Sara Kokolj: Protimikrobno delovanje različnih vrst medu na ustno mikrofloro**

Strokovna in šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

V projektni nalogi smo raziskovali, kako različne vrste medu vplivajo na ustno mikrofloro. Uporabili sem 5 vrst medu, in sicer: kostanjevega, akacijevega, cvetličnega, lipovega in propolis.

Predvidevali smo, da bo na ustne bakterije najbolje učinkoval propolis, saj vsebuje tudi kanček alkohola in kot je znano, alkohol že sam po sebi uniči bakterije. Drugo predvidevanje je bilo, da bo od medu najbolje učinkoval kostanjev med, najslabše pa bi po našem predvidevanju na ustne bakterije učinkoval

akacijev med. Nazadnje smo predvidevali, da bodo vse vrste medu boljše vplivale na otroško ustno mikrofloro, saj je njihova ustna mikroflora veliko preprostejša in vsebuje veliko manj mikroorganizmov kot ustna mikroflora odraslega človeka.

Končni rezultati so pokazali, da ima najboljši učinek na ustno floro kostanjev med, najslabše pa učinkuje lipov. Raziskava je pokazala presenetljive rezultate glede učinkovitosti propolisa na ustno mikrofloro, saj smo predvidevali, da bo propolis najbolje učinkoval na ustno mikrofloro zaradi majhne vsebnosti alkohola. Rezultati so pokazali ravno nasprotno, saj je propolis dosegel šele predzadnje mesto v učinkovitosti na ustne bakterije. Hkrati je raziskava pokazala tudi to, da učinkovitosti medu in propolisa na ustno mikrofloro ne moremo razporediti po starostnih kategorijah in spolu posameznika, saj je učinkovitost odvisna od vsakega posameznika posebej.

### **Lenart Blažič in Simon Čop: Rdeča barva plodov**

Strokovni mentor: prof. dr. Robert Veberič

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Pri projektne delu smo poskušali ugotoviti prisotnost antocianov v kožici treh različnih sort jabolk: zlati delišes (zeleno rumena do zlato rumena osnovna barva), florina (zelenkasto rumena osnovna barva, ki jo v celoti prekriva rdeča barva) in jonagold (zeleno rumena do zlato zelena osnovna barva, ki jo prekriva rdeča do temno rdeča krovna barva).

Pri projektne delu smo merili vsebnost antocianov kožice jabolk in ugotavljali občutljivost pigmentov na različne pH ekstrakcijske raztopine. Vsebnost antocianov smo merili tako, da smo ekstrahirali antociane iz kožice jabolk in jih analizirali s pomočjo spektrofotometra.

Antociani so vodotopna barvila, ki se nahajajo v vakuolah rastlinskih celic in zajemajo barve od svetlo rožnate do modre barve. Nahajajo se predvsem v kožici (povrhnjici) plodov, listih in venčnih listih cvetov. Njihova naloga je, da ščitijo celice pred intenzivnim UV-sevanjem, privabljajo žuželke in raznašalce semen.

Domnevali smo, da si bodo omenjene sorte po količini antocianov sledile od močnejše obarvanih proti manj obarvanim. Naša domnevanja so bila med delom potrjena. Sorta z največ antociani je bila florina, sledila je sorta jonagold in nazadnje zlati delišes.

### **Rebeka Arhar in Špela Mestinšek Mubi: Barvila v božičnih zvezdah**

Strokovni mentor: prof. dr. Robert Veberič

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj Drusany, prof. univ. dipl. inž. živ. tehn.

V rastlinah se nahajajo fotosintetska barvila. To so barvila, ki obarvajo liste rastlin. V zelenih rastlinah je glavno barvilo klorofil. Poleg njega so v listih prisotna tudi druga barvila. Za obarvanost oranžnih in rdečih jesenskih listov so odgovorni karotenoidi in antociani.

V projektne delu smo na štirih sortah božičnih zvezd (Mars Pink, Mars Red, Mira Red in Mars White), ugotavljali spreminjanje vsebnosti fotosintetskih barvil (klorofila a, klorofila b, karotenoidov, antocianov) v odvisnosti od časa.

Za analizo vsebnosti fotosintetskih barvil v braktejah božičnih zvezd smo uporabljali spektrofotometer. Ugotovili smo, da v času spreminjanja obarvanja božičnih zvezd prihaja do intenzivne razgradnje klorofila. To opazimo kot rumeno barvo listov. Razmerje med barvili v listih se spremeni. Ko se zmanjšuje količina klorofila, se začne povečevati količina antocianov in karotenoidov. To opazimo kot oranžno in rdeče obarvane liste. Posledica vseh teh kemičnih procesov v rastlini so čudovito spreminjajoče se barve listov, kar je posebnega pomena za rastline, ki jih gojimo v okrasne namene.

### **Tilen Simšič: Kakovostno stanje voda na Planinskem polju ob različnih vodostajih**

Strokovna mentorica: dr. Janja Kogovšek

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Ugotavljali smo spreminjanje kemijskih, fizikalnih in mikrobioloških parametrov, ki se spreminjajo med rečnim tokom reke Unice in so odvisni od vodostaja. Na zajemnih mestih smo merili velikost rečnega vodostaja, kjer je bilo to mogoče. Vključili smo tudi analize vodovoda Laze, ki ima zajetje v Lipljah pod Planinsko goro in stoječe vode pod staro kapelico v vasi Jakovica.

Ugotovili smo, da so najbolj občutljivi in variabilni mikrobiološki parametri, najbolj pa so se spreminjali tudi nekateri kemijski parametri nitratov in kloridov. Opravili smo tudi analizo gnoja iz perutninskih farm, ki so ga trosili po polju in bi po nalivih lahko onesnažil Unico. Želeli smo spremljati prenos onesnaženja tudi ob višjih pretokih, a jih zaradi pomanjkanja dežja (ekstremno sušno jesensko-spomladansko obdobje) nismo mogli.

Med drugim smo primerjali mineralno vsebnost reke Unice z minerali bogato vodo Radenska in ugotovili, da reka Unica v vsebnosti kalcija in magnezija ne zaostaja prav veliko za Radensko. Ugotovili

smo, da so vsebnosti fosfatnih ionov v Unici (v času opazovanja) nizke. Najvišje koncentracije do 0,6 mg/L je dosegla Unica na izviru v Planinski jami. Spoznali smo tudi, da moramo za bolj kakovostno vodo reke Unice in Malenščice skrbeti za njuno celotno zaledje (kraška polja: od Babnega, Loškega in Cerkniskega polja, Pivška kotlina). Med drugim je potrebno zmanjšati intenziteto gnojenja polja, saj se vsi kmetje ne držijo okoljevarstvenih normativov za zmerno gnojenje.

### **Tina Kristan in Nika Jesenko: Genetska in morfološka variabilnost populacij pšenice iz genske banke**

Strokovna mentorica: prof. dr. Zlata Luthar

Šolski mentor: Jure Slatner

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je kulturna rastlina, ki v višino zraste do 1,5 metra. Klasje dozori julija ali v začetku avgusta. Pšenica je najpomembnejše žito v zgodovini človeštva, saj je naš glavni vir hrane (zrnje – moka – kruh).

Je vrsta žita, ki spada v družino trav (*Poaceae*). Poznamo 27 različnih vrst, za kmetijstvo sta najpomembnejši dve: *Triticum aestivum*, navadna pšenica, in *Triticum durum*, trda pšenica. Vsebuje veliko glutena in je primernejša za izdelavo testenin, kuskusa itd.

V projektnem delu smo na podlagi fragmentov DNA, izoliranih iz listov pšenice, ugotavljali razlike in podobnosti med 16 populacijami pšenice. Za namnožitev fragmentov smo uporabili PCR metodo, ki omogoča kloniranje fragmentov DNA s pomočjo ustreznih začetnih oligonukleotidov in DNA-polimeraze. Namnožene fragmente smo s pomočjo elektroforeze ločili glede na njihovo velikost.

Ugotovili smo, da ima vseh 16 populacij ITS regijo, prav tako imajo vse prisoten A genom. Edini populaciji, ki imata vse 3 genome ABD, sta 9 in 11 in sta heksaploidni.

### **Urša Vide: Določanje viskoznosti krvi z različno vsebnostjo kisika in dušika pri različnih temperaturah**

Strokovna mentorica: prof. dr. Andreja Zupančič Valant

Šolska mentorica: Nada Udovč Knežević, prof. biol.

V projektnem delu smo preučevali vpliv različnih koncentracij kisika in dušika na strižno odvisnost od viskoznosti v človeški krvi. Z izvedbo eksperimenta smo spremljali spremembo viskoznosti krvi glede na količino plinov ( $O_2$  in  $N_2$ ) in spremembo temperature. Zaradi omejitev praktičnega dela s krvjo je eksperimentalno delo izvajala študentka FKKT Metka Primožič. Da je bil eksperiment lahko izveden, smo morali zbrati podatke o sestavi krvi in njenih lastnostih, da smo lahko razumeli, kako se bo kri obnašala v določenih pogojih.

Reološke meritve so bile opravljene z napravo za proučevanje reološkega obnašanja tekočin, reometrom Physica MCR 301, pri treh različnih temperaturah (4 °C, 25 °C in 37 °C). Meritve smo opravljali s šestimi različnimi vzorci krvi, dobljenih od šestih različnih zdravih donorjev (trije dajalci so bili moški, tri pa ženske), ki so si bile med seboj različne po lastnostih. Pri izvajanju poskusov smo krvi izmerili viskoznost pri različnih temperaturah in ugotovili, da se viskoznost teh vzorcev med sabo zelo razlikuje (glede na količino hematokrita). Kri smo enkrat preprihovali s prekomerno količino kisika in drugič z dušikom, zraven pa raziskovali, kaj se z njo dogaja pri različnih temperaturah in strižnih hitrostih. Zanimalo nas je, kaj se zgodi s tokom krvi in z reološkimi lastnostmi (viskoznost) pri 4 °C, pri 25 °C (delovna temperatura za eksperiment) in pri 37 °C (človeška telesna temperatura). Kri smo s kisikom in dušikom preprihovali v za to pripravljeni perfuzijski celici. Po določenem času preprihovanja vseh vzorcev krvi s kisikom se je, ne glede na temperaturo, povečala viskoznost krvi. Viskoznost normalne krvi smo primerjali z viskoznostjo krvi, nasičene s kisikom in ugotovili, da so imeli vzorci z večjo količino vpihanega kisika večjo viskoznost kot krvni vzorci z normalno ravno kisika.

Izkazalo se je, da je viskoznost človeške krvi odvisna od strižnih pogojev ter da z naraščanjem strižne hitrosti viskoznost pada. Pri spreminjanju viskoznosti glede na temperaturo smo ugotovili, da z nižanjem temperature pada tudi viskoznost. Krvni vzorci, nasičeni z dušikom, pa se je viskoznost nižala, saj je trenje med gradniki v krvi postajalo manjše in medmolekulske vezi so postale šibkejše.

### **Ljubomir Milojević in Vid Modic: Izražanje analoga proteina TNF- $\alpha$ v bakteriji *Escherichia coli***

Zunanja mentorica: Mirijam Kozorog, univ. dipl. bioteh.

Šolska mentorica: Nada Udovč-Knežević, prof. biol.

Gen za H7dN6TNF, ki je analog proteina TNF- $\alpha$ , smo s kemijsko transformacijo vstavili v bakterijo *Escherichia coli* (v nadaljevanju *E. coli*). Kemijsko transformacijo smo dosegli s toplotnim šokom, s katerim povečamo kompetenco celic *E. coli*, da so bolj dovzetne za sprejem tuje DNK. Po kemijski transformaciji smo celice razmazali na selekcijske plošče, na katerih so zrasle le tiste celice, ki so vključek sprejele. Posamezne kolonije smo nato precepili v tekoče LBPGamp gojišče. Kulture so se med stresanjem razmnoževale. Po narejeni genski banki smo del kulture precepili v produkcijsko GYSP gojišče, ki smo mu kasneje dodali kemični induktor IPTG. Z njim smo inducirali izražanje vstavljenega gena.

Bakterijska kultura je tako začela proizvajati naš protein, kar smo dokazali z NaDS-PAGE analizo. Le-ta je potrdila, da se v celicah nahaja protein na višini proteina H7dN6TNF $\alpha$ . Z gojenjem transformant na selekcijskem gojišču z antibiotikom ampicilinom smo dokazali uspešnost transformacije, saj so rasle le

bakterije, ki so sprejele vključek z zapisom za rezistenco na ampicilin, z NaDS-PAGE analizo pa smo dokazali, da je IPTG induciralo izražanje proteina H7dN6TNF?.

### **Vita Vidmar: Dokaz virusa Chikungunya z molekularnimi metodami**

Strokovni mentorici: dr. Miša Korva, univ. dipl. mikr., in prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Šolska mentorica: Nada Udovč Kneževič, prof. biol.

Virus Chikungunya se pogosto pojavlja v nekaterih predelih Afrike, v Indiji in jugovzhodni Aziji. Leta 2004 je izbruhnila obširna epidemija na otokih Indijskega oceana, v Indiji in še nekaterih državah jugovzhodne Azije. Po tej epidemiji se je virus pojavil tudi v Evropi in leta 2007 je v Italiji povzročil nov izbruh bolezni. Virus se na nove gostitelje prenaša z vbodom tigrastega komarja (*Aedes albopictus*), ki je prisoten tudi v Italiji. Ker se je tigrasti komar v Slovenijo razširil prav s tega območja, obstaja tudi pri nas tveganje za okužbo z virusom Chikungunya. Zaradi tega je potrebna vzpostavitev hitre diagnostike virusa z molekularnimi metodami.

S pomočjo kompleta QIAamp Viral RNA Mini Kit smo iz vzorcev seruma dveh bolnikov in iz virusa, vzgojenega v laboratoriju, izolirali virusno RNA. Nato smo testirali občutljivost in specifičnost dveh protokolov RT-PCR v realnem času (protokola, ki ga v laboratoriju že uporabljajo in kompleta The RealStar® Chikungunya RT-PCR Kit 1.0) ter z obema metodama poskušali dokazati okužbo z virusom pri bolnikih.

Ugotovili smo, da sta obe metodi enako občutljivi, saj sta obe zaznali enako razredčitev virusne RNA, ter da sta obe metodi enako specifični, saj nista navzkrižno reagirali z RNA drugih virusov. Prisotnost virusne RNA smo dokazali v vzorcu enega izmed treh bolnikov.

### **Živa Kerševan: Določanje grenkobne vrednosti izvlečkov skorje jelke**

Strokovna mentorica: mag. Katja Stojilkovski

Šolska mentorica: mag. Irena Štrumbelj-Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

V okviru projektne dela smo določevali grenkobno vrednost izvlečka skorje jelke glede na oceno okusa posameznika. Za poskus smo uporabili razredčeno raztopino kininijevega hidroklorida, izvlečka iz skorje jelke, ki smo ga razredčili z navadno vodo.

Ugotovili smo, da posamezniki različno zaznavajo grenak okus v ustih, nekateri prej, drugi kasneje, saj imajo različno razvite čutnice za zaznavanje grenkega okusa. Razlike v rezultatih so se pokazale tudi

med kadilci in nekadilci. S pomočjo dijakov in asistentov smo lahko pri izvajanju poskusa določili grenkobno vrednost, ki je odvisna tudi od korekcijskega faktorja posameznika.

### **Peter Babnik in Jakob Puh: Analiza mitohondrijske DNA pri čebelah**

Strokovna mentorja: dr. Tatjana Kavar, prof. dr. Peter Dovč

Šolska mentorica: Nada Udovč Kneževič, prof. biol.

Po slovenski zakonodaji lahko v Sloveniji gojimo samo kranjsko čebelo. Zaradi majhnosti Slovenije vsaj v obmejnih območjih pride do križanj z drugimi podvrstami, obstaja pa tudi sum, da je bilo v zadnjem času veliko vnosa drugih podvrst. Vse to ogroža populacijo kranjske čebele in njeno čistost. Zanimalo nas je, koliko je kranjska čebela dejansko ogrožena in sledove katerih podvrst še lahko najdemo v naši populaciji. Zato smo na podlagi mitohondrijske DNA določali, katere podvrste se pojavljajo.

Iz vzorcev čebel iz vse Slovenije smo izolirali mitohondrijsko DNA. DNA smo izolirali iz nog ali glave, in jo na podlagi petih polimorfnih mest primerjali z DNA čebel, ki se običajno pojavljajo v Sloveniji. Za primerjavo smo uporabljali nukleotidna zaporedja iz literature. Izolacija in namnožitev DNK nam je uspela, prav tako nam je uspela primerjava glede na 5 polimorfnih mest, ki so značilna za posamezne populacije oz. podvrste.

Glede na naše 14 vzorce je kranjska čebela res ogrožena, saj je med temi vzorci samo 6 takih, ki imajo mtDNA značilno za kranjsko čebelo. Za bolj reprezentativne rezultate bi potrebovali večje število vzorcev, vendar se je že pri samo štirinajstih vzorcih izkazalo, da kranjska čebela ni edina podvrsta v Sloveniji, kakor bi po zakonu morala biti, ali pa je genetska struktura populacije bistveno bolj pestra kot smo sprva domnevali.

### **Damjan Kumše: Kolona po Winogradskem**

Mentorica: mag. Irena Štrumbelj Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Kolona po Winogradskem je miniaturni anaerobni ekosistem, ki se lahko uporablja kot dolgoročni vir vseh tipov prokariontov, je gojišče mikroorganizmov. To metodo je razvil ruski mikrobiolog Sergei Winogradsky. V koloni po Winogradskem poteka proces nitrifikacije in metabolizem žvepla.

Kolona je preprosta za pripravo, pripravili smo jo tako, da smo jo napolnili z organsko bogatim muljem in vodo ter z viri ogljika in dušika. Za kolono so pomembni pasovi. To so območja z različnimi mikroorganizmi. Razlikujejo se po barvi in velikosti. Spremembe v koloni smo opazovali in fotografirali 7 tednov.

Hipoteza, da bodo v koloni zelene in vijolične žveplove bakterije ter plesni, je bila potrjena. Za *Thiobacillus* pa ni bilo dokazov. Po več kot dveh mesecih smo kolono še zadnjič pregledali in ugotovili, da so se v njej namnožile glive sluzavke in zavirale rast plesni (*Mucor*). Glive sluzavke so zanimive, ker se premikajo. Kolona je oddajala neprijeten vonj. Na steni kolone se je pojavilo nekaj mehurčkov, penjenja ni bilo.