

POVZETKI PROJEKTHNIH NALOG IZ PREDMETA BIOTEHNOLOGIJA 2014

Miša RUS: VPELJAVA MOLEKULARNE METODE ZA DOKAZ PATOGENIH IN NEPATOGENIH HANTAVIRUSOV

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

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

Prvič so bili hantavirusi odkriti v času Korejske vojne, okužilo se je več kot tri tisoč vojakov. Leta 1940 so ruski in japonski znanstveniki sumili, da gre za virusno bolezen. Virus je prvič izoliral leta 1976 Ho Wang Lee (korejski virolog). Virus je poimenoval po reki Hantaan, kjer je našel okuženo miš. Hantavirusi povzročajo pri človeku hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS) ali srčno-pljučni sindrom (HCPS), ki se pojavlja samo v Ameriki. Pri nas je HMRS boljše poznane pod imenom mišja mrzlica. Hantavirusi so RNK virusi, ki krožijo v naravi med trajno okuženimi glodavci in žužkojedimi sesalci. V Sloveniji je znanih pet vrst hantavirusov: Puumala, Dobrava, Tula, Saaremaa in Seewis. Hantavirusi pripadajo družini *Bunyaviridae*.

Z verižno reakcijo s polimerazo in z reverzno transkriptazo v realnem času (RT-PCR) smo dokazovali RNK genom hantavirusov v dveh napravah PCR ABI 7500 Fast in Rotor Gene 3000. Metoda se je v obeh primerih izkazala za specifično. Bile pa so razlike v občutljivosti, Rotor Gene 3000 je bil občutljivejši, vendar je časovno trajal dlje. Metodo smo razvijali zato, ker smo želeli imeti PCR, ki bo specifičen in občutljiv za dokaz hantavirusov v vzorcih naravnih gostiteljev. Metoda se bo uporabljala za določanje velike količine vzorcev odvzetih iz živali.

Anja MUC in Anja MAGDIČ: VPLIV MEDU NA FERMENTACIJO MLEKA IN LASTNOSTI JOGURTA

Mentor: Jure Slatner

Pri najini projektni nalogi sva se odločili, da bova ugotovili vpliv medu na fermentacijo mleka in ali med deluje kot antibiotik na bakterije v mleku.

Med ni deloval kot antibiotik, ampak kot hrana za bakterije, saj se je na gojišču, kateremu sva dodali med, namnožilo več bakterij kot pa na tistem brez medu. Izmerili sva pH mleka z metodo za določanje kislosti po Soxhlet-Henklu in s potenciometrično metodo (s pH-metrom). Rezultati pri merjenju pH so bili v skladu s pravilnikom, kar pomeni, da je imelo mleko pH med 6,0 in 6,5. Pripravili sva različne startne kulture iz kozjega in ovčjega jogurta, ki sva jim dodali med kot vir ogljikovodikov.

Sklepali sva, da se bo razvilo več bakterij, ker bodo imele več hrane in bodo imeli jogurti tudi zaradi dodatka medu drugačen okus.

Izdelke sva tudi senzorično testirali. Iz celotne šole sva izbrali 15 oseb, ki so poskusili in senzorično ocenili jogurte. Jogurte so ocenjevali po določenem protokolu. Ocenjevali so jih glede na barvo, strukturo, vonj itd. Izdelki niso bili enaki kupljenim, večina dijakov jih je ocenila za zanimive.

Lara OSTROŽNIK: PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA PROTEINA

Strokovna mentorica: Mirijam Kozorog, univ. dipl. biotehn. in Matic Kisovec, univ. dipl. biol.

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

Gen PfPLP 3 smo s kemijsko transformacijo vstavili v bakterijo *Escherichia coli*. Kemijsko transformacijo smo izvedli s toplotnim šokom. Ko so celice sprejele gen za PfPLP 3, smo jih razmazali na selekcijska gojišča. Zrasle so le tiste celice, ki so sprejele plazmid z genom PfPLP3. Nato smo posamezne kolonije precepili v LBP gojišče in kasneje še v GYSP gojišče. Protein smo očistili z nikljevo afinitetno kromatografijo.

Uspešnost produkcije in izolacije proteina smo dokazali z NaDS-PAGE analizo in hemolizo.

Urša PETROVIČ: VPLIV IZBRANIH RASTNIH DEJAVNIKOV NA RAST CELIČNE LINIJE UT-7

Strokovni mentor: dr. Simon Caserman

Šolska mentorica: Lidija Gnidovec, prof. biol.

Preverjali smo vpliv rastnih dejavnikov GM-CSF, G-CSF in hGH na rast celične linije UT-7.

Celice, shranjene v parah tekočega dušika, smo najprej odtalili, jim zamenjali gojišče ter jih v platenki T25 inkubirali pri 90 % vlagi, 5 % CO₂ in 37 °C. Drugi dan smo celicam zamenjali gojišče in jih nato inkubirali 3 dni. Ko je bilo celic številčno dovolj, smo začeli s poskusom. Celično kulturo smo sprali, saj bi prisotnost GM-CSF v osnovnem gojišču za celice UT-7 vplivala na rezultate. Pripravili smo dvakratnik najvišje koncentracije vsakega rastnega dejavnika (GM-CSF, G-CSF, hGH) iz založnih raztopin. V prvi stolpec mikrotitrne plošče smo odpipetirali 200 µL redčenih dejavnikov, v naslednjih 7 stolpcev pa po 100 µL gojišča brez GM-CSF. Nato smo opravili serijsko redčitev in v robne jamice dali še vodo, da vzorec med inkubacijo v inkubatorju ne bi izhlapeval.

Rast celic UT-7 smo pri vzorcih z dodanimi navedenimi rastnimi dejavniki spremljali tri dni. Uporabili smo dve metodi, in sicer: štetje s pomočjo števne komore in metodo PrestoBlue. Pri štetju s števno

komoro smo vsako jamico v mikrotitrni plošči dobro premešali s pipeto. Zajeli smo 10 μL vzorca in 10 μL barvila tripan modro, vse skupaj dobro premešali, nanесли na števno komoro in prešteli žive in mrtve celice (na mililiter). Pri metodi PrestoBlue pa smo v 100 μL celic z gojiščem iz vsake jamice dodali barvilo PrestoBlue, inkubirali pri 37 °C približno 3 ure in s čitalcem ploščic pomerili fluorescenco.

Dobili smo oceno živih celic na mililiter, a ne mrtvih. S pomočjo teh dveh metod, s katerima dobimo podobno oceno števila celic na mililiter, smo ugotovili, da koncentracija ravnega dejavnika GM-CSF vpliva na rast celične linije. Z večanjem koncentracije dodanega ravnega dejavnika GM-CSF se število celic na mililiter povečuje. Obratno je bilo pri vzorcih z dodanima ravnima dejavnikoma G-CSF in hGH; na rast celične linije UT-7 nimata vpliva.

Simona KNAVS: VPLIV ETERIČNIH OLJ NA BAKTERIJE IZOLIRANE S KOŽE OBRAZA

Mentorica: Lidija Gnidovec, prof. biol.

Eterična olja so zmesi velikega števila lahko hlapljivih, biološko aktivnih kemičnih spojin. Nastajajo v rastlinah kot končni produkt presnove. Imajo izrazit, značilen vonj in okus. Po navadi so brezbarvna ali rumenkasta. V vodi so netopna in običajno lažja od vode, zato plavajo na površini. Delujejo antiseptično in s tem preprečujejo razmnoževanje mikroorganizmov.

Namen naloge je bil ugotoviti, kako izbrana olja vplivajo na bakterije, izolirane iz suhe, mastne in aknaste kože. Pri poskusu smo uporabili metodo difuzijskega antibiograma, na podlagi katerega smo izmerili inhibicijska območja in tako dobili zelene rezultate.

Vanja ANDREJČIČ in Tadeja FERLAN: MORFOLOGIJA IN ANTIOKSIDATIVNOST SEMEN NAVADNE IN TATARSKE AJDE (FAGOPYRUM ESCULENTUM MOENCH IN FAGOPYRUM TATARICUM GAERTN.)

Strokovna mentorica: prof. dr. Zlata Luthar

Šolski mentor: Jure Slatner

Navadna in tatarska ajda že dolgo uspevata na našem območju. Danes se, po upadu njune pridelave v petdesetih letih prejšnjega stoletja, zopet začenjata uveljavljati. Temu je vzrok predvsem to, da imata visoko hranilno vrednost in vsebujeta različne antioksidante.

V raziskavi sva štirinajstim populacijam tatarske in dvema sortama navadne ajde določili maso 1000 semen, dolžino in širino semen. Preučili sva tudi prisotnost antioksidativnih snovi v njihovi moki. Na

podlagi rezultatov sva določili razlike ter podobnosti med semeni in jih razvrstili v statistično značilne skupine, ki se med seboj ločijo.

Pri preučevanju mase semen se je izoblikovalo 9 statistično različnih skupin, pri dolžini semen 6 skupin in za širino semen prav tako 6 statistično različnih skupin. Vsaka od teh statističnih skupin (pri posamezni lastnosti) se prekriva z vsaj še eno skupino.

Število skupin kaže na veliko variabilnost med posameznimi populacijami tatarske ajde; najbolj se razlikujejo v masi, najmanj pa v širini. Semena navadne in tatarske ajde so si najbolj podobna v masi, najmanj pa v dolžini.

Rezultati antioksidativnega testa so pokazali prisotnost antioksidativnih snov v semenih obeh vrst ajd, več jih je bilo v semenih tatarske ajde. Semena tatarske ajde niso lažja in širša v primerjavi s semeni navadne ajde, vendar pa so krajša in vsebujejo več antioksidativnih snovi.

Neli FERME in Teja LEBENIČNIK: IZOLACIJA BAKTERIJ S KOŽE IN VPLIV KREM ZA ROKE NA NJIHOVO RAST

Mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Problem najine naloge je bila ugotovitev normalne bakterijske sestave naše kože, ugotovitev, ali so na naši koži prisotni različni stafilokoki, kot sta *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* in prisotnost *Propionibacterium acnes*. To sva ugotovili tako, da sva vzeli bris iz kože, izolirali bakterije, jih namnožili in z metodo izčrpavanja prišli do čiste kulture, iz katere sva vzeli delček kolonije ter ga prenesli na objektno stekelce, kjer sva naredili razmaz, da sva pod mikroskopom lahko ugotovili prisotnost različnih bakterij.

Ugotovitev, ali kreme z vsebovano sečnino in sama 10 % sečnina res zavirajo prekomerno rast bakterij na naši koži, sva potrdili z antibiogrami, ki so vsebovali različne vzorce bakterij s kože in različne kreme ter sečnino, nato pa sva preučili premer inhibicijske cone okoli diska.

Rezultati so pokazali, da je bila največja inhibicijska cona res pri disku s sečnino.

Domen NAGLIČ: GENSKÉ ATLETSKE SPOSOBNOSTI PRI ČLOVEKU

Strokovni mentor: prof. dr. Peter Dovč

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

Po definiciji je genski polimorfizem pojavljanje dveh ali več različnih oblik gena oz. alelov na istem lokusu v populaciji. Tako je posamezen diploiden osebek lahko homozigot (na homolognih kromosomih se pojavita dve identični obliki gena) ali heterozigot (na obeh homolognih kromosomih pojavljata različna alela).

Za ugotavljanje genskih polimorfizmov uporabljamo metodo PCR (verižna reakcija s polimerazo), s katero ciklično namnožimo delce DNA. Te delce z gelsko elektroforezo ustrezno analiziramo. S pomočjo namnoževanja in analize DNA so ugotovili, da določeni genski polimorfizmi lahko vplivajo na telesne atletske sposobnosti človeka. Raziskovalci so kot udeležence v raziskavah uporabili vrhunske športnike. Zaradi omejenega števila vzorcev je tudi baza podatkov, s katero raziskovalci razpolagajo, majhna. Za bolj natančne raziskave bi potrebovali večje število vzorcev, ki bi pokrili različne segmente populacije. Zavedati se je potrebno, da določen genski polimorfizem pri določenem človeku ni garancija, da bo ta človek postal vrhunski športnik. Odkriti polimorfizmi pomenijo samo fizično in fiziološko predispozicijo nekega človeka, da bi lahko dosegel dobre rezultate v določenem športu. Z upoštevanjem rezultatov analiz genoma bi lahko za določenega atleta pripravili načrt treningov in jedilnik, ki bi mu pomagali pri doseganju športnih ciljev.

Anže NEMEC: VPLIV RAZLIČNIH VRST MAŠČOB NA METABOLIZEM KVASOVK

Mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Preverjali smo, kako maščobe, dodane v testo, vplivajo na kvasovke in vzhajanje kruha. Zanimalo nas je, ali zaradi maščobnega ovoja okoli kvasovk le-te proizvedejo manj CO₂, ki bi se ujel v testo, in ga vzhajajo.

Rezultati so pokazali, da testo brez maščobe slabše vzhaja, iz njega pa se v zrak sprosti manj etanola in več CO₂ kot pri vrstah testa z dodano maščobo. Prav tako smo preverjali, kakšna je razlika, če v testo dodamo tekočo (olje) ali trdo maščobo (mast). Testo z mastjo (kakavovim maslom) je boljše vzhajalo in iz njega se je sprostil več CO₂ kot pri vrstah testa, kjer je bilo olje.

Možna pomanjkljivost pri delu je bilo nepravilno razmerje med uporabljenimi surovinami in kulturo kvasovk. Prav tako bi k lažji primerjavi rezultatov pripomogla uporaba več vrst masti in ne samo ene. Pri nadaljnjem delu bi v testo dodali še maščobe živalskega izvora. Delo je potekalo točno in natančno, vsi rezultati so bili v okviru pričakovanj.

Lucija GRIZ: BIOTRANSFORMACIJA FUMARNE KISLINE V L-ASPARAGINSKO KISLINO

Delovni mentor: asist. dr. Miha Vodnik

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

Biotransformacija je postopek, pri katerem iz neke snovi s pomočjo živega organizma sintetiziramo drugo snov. Mi smo fumarno kislino ob dodatku amonijaka transformirali v L-asparaginsko kislino, pri čemer smo uporabili kvasovke in bakterije vrste *Escherichia coli*. Za identifikacijo asparaginske kisline smo uporabili tankoplastno kromatografijo in orositveni reagent ninhidrin, ki je z asparaginsko kislino tvoril vijoličen produkt. Za primerjavo smo uporabili standardno raztopino asparaginske kisline. Razvili smo tudi kolorimetrično metodo za določanje koncentracije nastale asparaginske kisline. Ugotovili smo, da zelen produkt dajo vsi sevi *E. coli*, pri čemer smo največji izkoristek dobili z uporabo seva Top10.

Kvasovke biotransformacije ne opravljajo. Med delom smo na TLC naleteli tudi na nepričakovano dodatno liso, za katero smo ugotovili, da pripada neznanemu produktu reakcije ninhidrina z amonijevim kloridom. Z opravljenim delom smo dosegli zastavljene cilje, odprla pa so se številna nova vprašanja in možnosti za nadaljnje raziskovanje.

Vid ZULJAN: MERJENJE VOLUMSKEGA DELEŽA ETANOLA

Šolska mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.; Adela Žigert, prof. fiz.

Cilj naloge je bil primerjati različne metode in naprave za merjenje volumskega deleža etanola. Za meritve smo uporabili ebulioskop, dva aerometra in senzor za etanol v zraku.

Problemi so se pojavili že pri odstranjevanju metanola iz destilata, kajti vsako sadje ima drugačno vsebnost in celo ista sorta ima različno vsebnost, če je posajena v različnih pokrajinah z različnim podnebjem. Zato je bilo težko določiti delež prvega destilata, ki vsebuje metanol. Nekaj problemov se je pojavilo tudi pri merjenju z etanol senzorjem in ebulioskopom, ki imata omejen delež alkohola, ki ga lahko izmerita. Zato je bilo potrebno vzorce za ti dve napravi razredčiti in pridobljene rezultate pomnožiti z narejeno razredčitvijo.

Pri merjenju z areometroma smo uporabili preglednico, priloženo enemu od areometrov. Preglednica je namenjena dodatnim popravkom rezultatov glede na temperaturo. Kot vzorce smo uporabili prvi, drugi in tretji tok destilata drozge, celoten destilat brez odstranjenega metanola in z odstranjenim metanolom, ter prvi in drugi destilat drugič destilirane drozge. Iz rezultatov je razvidno, da so odstopanja večinoma večja od 7 %, česar nismo pričakovali. Glede na odstopanja smo se odločili, da je najprimernejša naprava za merjenje deleža alkohola areometer.

Lina RECER in Tjaša POVŠE: DOLOČANJE KOLIČINE SLADKORJA V ZORENIH BANANAH

Šolski mentor: Jure Slatner

Splošno znano je, da je okus nezrele zelene banane povsem drugačen od okusa zrele rumene ali celo rjavkaste. Prve vsebujejo več škroba, zato je njihov okus bolj trpek. Med zorenjem se cepijo glikozidne vezi v škrobu in ta razpade na manjše molekule glukoze, zato so dozorene banane slajše. Znano je, da se ob prisotnosti etilena vezi škroba hitreje cepijo.

Najina naloga je bila določiti razliko vsebnosti glukoze pri bananah, ki sva jih zorili, in tistih, ki jih nisva. Banane, ki sva jih zorili, sva razporedili v vreče z razrezanimi jabolki, saj naj bi ta sproščala etilen, preostale pa shranili na mesto z enakimi pogoji, vendar brez jabolk. Poskus je trajal devet dni, vzorčili sva vsak drugi dan. Enostavne sladkorje sva določevali s spektrometrijo in z refraktometrijo. Različne vzorce banan sva pogledali tudi pod mikroskopom, škrob v celicah sva obarvali z jodovico.

Pridobljeni rezultati so pokazali, da prisotnost etilena pospeši zorenje banan, saj je bilo v zorenih bananah več glukoze kot v nezorenih. Iz tega sva sklepali, da etilen vpliva na cepitev glikozidnih vezi v škrobu.

Lara KASTELEC in Anja PAVLIN: DOLOČANJE KOLIČINE KOFEINA IN SLADKORJA V ENERGIJSKIH PIJAČAH

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

Ob vsakodnevnem pitju energijskih pijač v telo ne vnašamo le energije, pač pa tudi mnoge telesu škodljive snovi. Mnoge same po sebi niso škodljive, a to postanejo v velikih količinah.

Nalogo sva opravljali z namenom, da bi se na lastne oči prepričali, koliko sladkorja in kofeina užijemo, ko popijemo eno pločevinko energijske pijače. Nekateri raje posežejo po kavi, zato sva vsebnost omenjenih sestavin primerjali prav s to priljubljeno pijačo. Rezultati so pokazali, da količina kofeina v eni pločevinki energijske pijače ustreza količini kofeina 1–2 skodelic turške kave. Zeleni čaj vsebuje nekoliko manj kofeina kot kava, a je lahko prav tako primerno nadomestilo za energijske pijače.

Pri postopku izolacije kofeina iz vzorcev sva naleteli na nekatere nepojasnjene reakcije. Nenavadnega penjenja ob segrevanju nisva mogli pojasniti. Ugotovili sva, da večina pijač vsebuje približno 5 g sladkorja v 100 mL vzorca, mnoge pa tudi več. Ena pločevinka običajno vsebuje 250–500 mL energijske pijače. S pitjem energijskih pijač v svoje telo vnesemo veliko sladkorja, in sicer 7,35–20,35 g s pollitrskimi izdelki in 11,83–22,3 g s četrtlitrskimi izdelki.

Sklepali sva torej, da je bolj zdravo poseči po kavi ali čaju, kjer si lahko količino sladkorja doziramo sami, vsebnost kofeina pa je nekoliko manjša kot v energijskih pijačah.

Katja KUMŠE in Neža PODPEČAN: VPLIV KEMIJSKE SESTAVE ZEMLJE NA POPULACIJO OGORČIC (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE)

Strokovni mentor Tina Birk, prof. biol.

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

Ogorčice so črvičkom podobne živali in se nahajajo v zemlji. Poznamo več vrst. Vrsta entomopatogenih ogorčic živi v sožitju z bakterijami.

Ličinke vstopijo preko naravnih odprtih žuželk in približno po dveh dneh poginejo. V gostitelju torej poteka dvojni razvojni krog, ogorčic in bakterij. Bakterije v zameno za zaščito hitro ubijejo napadene žuželke ter vsebino gostitelja preoblikujejo v hrano, ustrezno za ogorčice in s proizvodnjem antibiotikov odvrčajo druge mikroorganizme od trupla. Za preživetje in razvoj entomopatogenih ogorčic so najpomembnejši dejavniki: svetloba, temperatura, vlaga, struktura in pH tal.

V izvedenih poskusih sva ugotovili, da različnim vrstam ogorčic ustrezajo različna zemlja in dejavniki in da imajo ogorčice pomemben vpliv na tip tal.

Tadeja LUKAN in Karmen POŽLEP: OPTIMIZACIJA IZOLACIJE GENOMSKE DNA IZ RASTLINSKEGA TKIVA PELINOLISTNE AMBROZIJE (AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L.)

Strokovna mentorica: dr. Barbara Pipan

Šolska mentorica: Tina Birk, prof. biol.

Pelinolistna ambrozija je invazivna tujerodna rastlinska vrsta, ki se intenzivno širi po svetu in Sloveniji. Povzroča gospodarske probleme v državah, saj uničuje kakovost pridelkov na poljih. V raziskovalni nalogi smo se lotili izolacije DNA molekule iz rastlinskega tkiva pelinolistne ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.).

Optimizirana metoda izolacije genomske DNA iz rastlinskih tkiv predstavlja ključno osnovo za izvajanje nadaljnjih genetskih analiz znotraj obravnavane rastlinske vrste. Ker želimo dobiti zadostne koncentracije DNA ustrezne kakovosti brez kakršnih koli primesi, ki bi morda v nadaljnjih raziskavah delovale inhibitorno, moramo postopek prirediti do te mere, da bomo po razgradnji celične stene odstranili vse snovi, ki niso DNA in da se nam med samim postopkom in tudi kasneje DNA ne bo razgradila.

Delo ni zajemalo le izolacije DNA, temveč tudi preverjanje uspešnosti izolacije ter kakovosti DNA z uporabo horizontalne elektroforeze in merjenje koncentracije DNA s fluorometrom. Merjenje koncentracije nam je med drugim tudi pomagalo pri ugotovitvah, kako uspešno je bilo naše delo in ali so postopki, katerih smo se lotili za izolacijo genomske DNA iz rastlinskega tkiva, ustrezni. Uspešno izolirana DNA bo lahko vključena v nadaljnje analize genetske strukture obravnavane rastlinske vrste.

Izolacijo DNA iz listov pelinolistne ambrozije smo izvedli na robotu za ekstrakcijo nukleinskih kislin Mag Max po predhodno optimiziranem protokolu. Analiza je zajemala 43 populacij ambrozije iz različnih geografskih območij Slovenije, Hrvaške, Srbije, Madžarske, Francije, Nemčije, Švice in ZDA; vsaka populacija pa je vključevala štiri rastline, iz vsake posamezne populacije smo pripravili izolat DNA, kar je skupno obsegalo 172 vzorcev.

Pri vseh analiziranih vzorcih je bila izolacija DNA uspešna (prisotnost DNA na agaroznem gelu), koncentracije izolirane DNA so variirale med 28 in 288 ng/ μ l, neodvisno od lokacije vzorčenja. Odstopanja v koncentracijah DNA med posameznimi izolati pa so verjetno posledica kakovosti izvornega rastlinskega materiala.

Sabina RAKOVIĆ: RAZGRADNJA RAZLIČNIH SLADKORJEV V PROCESU ALKOHOLNEGA VRENJA

Mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

V projektni nalogi smo preverjali, ali kvasovke zmorejo razgraditi različne sladkorje. Spremljali smo spremembo tlaka v epruveti, v kateri je suspenzija kvasovk v raztopini določenega sladkorja. Tlak se je v epruveti spreminjal kot posledica CO₂, ki nastaja z razgradnjo sladkorja v celicah kvasovk med procesom vrenja.

Metabolno dejavnost kvasovk smo torej merili s sledenjem spremembe tlaka v epruvetah. Anaerobne razmere so potrebne za to, da kvasovke ne opravljajo celičnega dihanja, kjer bi se kisik porabljal z enako hitrostjo, kot bi nastajal CO₂.

Teja ZALAR in Lea Lucija USENIK: POJAVNOST BAKTERIJE *Listeria monocytogenes* V HLADILNIKI IN MOLEKULARNA SUBTIPIZACIJA SEVOV

Strokovna mentorica: asist. Majda Golob, dr. vet. Med.

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

Listeria monocytogenes je patogena bakterija, ki povzroča bolezen listeriozo. Listerioza je zoonoza, ki lahko prizadene tako ljudi kot živali. Pri ljudeh lahko povzroča različne klinične znake, od rahlo

povišane temperature do pojava meningitisa, abortusov in sepse. Stopnja obolevnosti zaradi okužbe z listerijo pri ljudeh je sicer precej nizka, vendar je smrtnost pri bolniki, ki so zboleli za listeriozo, visoka. Glavni vir okužb pri ljudeh je toplotno neobdelana hrana, ki je kontaminirana z *L. monocytogenes*.

Za listerije je značilno, da so zelo odporne proti različnim dejavnikom okolja in da se lahko razmnožujejo tudi pri temperaturi hladilnika ter da so zmožne tvoriti biofilm. Zaradi opisanih razlogov je zelo pomembno, da se redno izvaja nadzor nad hrano in okoljem, ki bi lahko bili viri okužb ljudi. Poleg tega je v primeru izbruhov listerioze pomemben uspešen epidemiološki nadzor, ki nam pomaga pri iskanju izvor okužbe. Pri spremljanju širjenja okužb je najbolj uporabna genotipizacijska metoda pulzna gelska elektroforeza (PFGE), ki nam omogoča subtipizacijo listerij ter primerjavo in iskanje razlik v genomih posameznih bakterijskih izolatov.

Petra MIVŠEK in Veronika VRHOVNIK: POMEN HOMOGENIZACIJE VZORCA PRI ANALIZI ODPADNE VODE

Strokovna mentorica: Barbara Brajer Humar, univ. dipl. biol.

Šolska mentorica: Tina Birk, prof. biol.

V današnjem času je pomen vode zelo velik. Uporabljamo jo kot pitno vodo, njen pomen pa vedno bolj raste tudi v gospodinjstvu in industriji. Z vse večjim naraščanjem prebivalstva narašča tudi količina odpadnih voda. Čiščenje odpadne vode se izvaja na čistilnih napravah, in sicer tako, da odstranjujejo hranila, kot so dušik, ogljik in fosfor. S tem preprečujejo onesnaženost podtalnice, pitne vode in onesnaženost vodnih teles.

Praktični del sva izvedli 12. 12. 2013 v laboratoriju CČN Domžale-Kamnik. Preučevali sva vpliv homogenizacije vzorca na parametre pH, prevodnost, KPK, BPK5 in na amonijev dušik.

Namen najine naloge je bil ugotoviti, ali homogeniziranje vzorca vpliva na naslednje parametre: pH, prevodnost, kemijsko potrebo po kisiku (KPK); biokemijsko potrebo po kisiku (BPK) amonijev dušik.

Peter HROVATIN in Klemen KRAŠEVEC: VPLIV GENOV NA FIZIČNE SPOSOBNOSTI KONJ

Strokovni mentor: prof. dr. Peter Dovč

Šolska mentorica: Tina Birk, dipl. biol.

Iz člankov sva poiskala opise genov, ki vplivajo na atletske lastnosti konjev. S pomočjo nabavljenih »primerjev« (oligonukleotidnih začetnikov) smo s PCR-metodo namnožili fragmente DNK. Te

fragmente so pridobili tako, da so DNK konjev razrezali z določenimi restrikcijskimi encimi in jih ločili po velikosti. S pomočjo standardov so v gelu prepoznali in iz gela izolirali uporabne fragmente DNK.

Zanimali so nas geni, ki imajo zapis za: Actin binding protein [alpha] actinin 3 in angiotenzin converting encim ter Peroxisome proliferator-activated receptor-gama coactivator 1alfa (PGC-1alfa). Ti proteini vplivajo na vzdržljivost in hitrost konjev.

Ugotovili smo, da je namnoževanje fragmentov s PCR metodo ni enako uspešno pri vseh rasah konj. Na vzdržljivost in hitrost konjev ne vplivajo samo genetske lastnosti živali, ampak tudi življenjske razmere in trening.

Domen ŠKULJ in Miha PUH: PROIZVODNJA BIOVODIKA IZ OGLJIKOVIH HIDRATOV

Strokovna mentorja: dr. Ilija Gasan Osojnik Črnivec, Petra Muri univ. dipl. ekol.

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

Pridobivanje bioplina iz organskih odpadkov ima veliko pozitivnih lastnosti, saj se v samem procesu anaerobne mikrobne razgradnje organska snov do določene mere razgradi. Proces je zanimiv prav iz okoljskega vidika, saj so neobdelani organski odpadki vir mnogih polutantov, kot so toplogredni plini in nutrienti. Med projektnim delom smo pridobili znanje, kako iz različnih modelnih substratov, ki so sestavni del organskih odpadkov pridobimo koristne produkte, tj. biovodik. Tako lahko iz organskih odpadkov pridobimo vir energije z visoko ekonomsko vrednostjo, poleg tega pa poskrbimo za čistejše okolje, ki je vse bolj obremenjeno z odpadki in njihovimi razpadnimi produkti.

Namen projektne naloge je ugotavljanje primernosti različnih sladkorjev (monosaharidov, disaharidov in polisaharidov), nižjih alkoholov ter kratkoverižnih maščobnih kislin za pridobivanje bioplina in biovodika kot goriv tretje generacije.

Nalogo smo izvedli v dveh delih: v prvem smo ugotavljali primernost monosaharidov ter kratkoverižnih maščobnih kislin, v drugem delu pa primernost disaharidov, polisaharidov ter nižjih alkoholov.

Mojca ŠENTJURC in Karin LAZNIK: MOLEKULARNA TIPIZACIJA SEVOV CLOSTRIDIUM DIFFICILE IZOLIRANIH IZ PERUTNINE Z METODO PFGE

Strokovni mentor: dr. Matjaž Ocepek

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

V projektni nalogi je predstavljena bakterija *Clostridium difficile*, ki je pri človeku najpogostejši vir bolnišničnih okužb. Kot kažejo dosedanje raziskave so kolonizirane tudi živali, predvsem perutnina in prašiči. Pogosto imajo sevi izolirani iz živali enak ribotip kot sevi, izolirani pri ljudeh, kar nakazuje možnost, da so živali lahko vir okužbe za ljudi. Seve *C. difficile*, izoliranih iz različnih rej perutnine, ki so pripadali enakim ribotipom kot sevi iz ljudi, sva zato dodatno tipizirali z metodo PFGE. Za restrikcijo sva uporabili encim Sma1. Tipizirane seve sva s pomočjo programa BioNumerics primerjali s sevi izoliranimi iz ljudi in ugotovili medsebojno prekrivanje.

Rezultati projektne naloge so pokazali, da imajo izolati iz perutnine in iz ljudi pogosto enake pulzotipe, kar nakazuje na možen prenos bakterije iz živali na človeka. Rezultati kažejo tudi na prenos sevov znotraj farme, tako med perutnino kakor tudi med različnimi vrstami živali in okoljem.

Daša GROS in Edvin LULIČ: TESTIRANJE OBLIŽEV IN ZDRAVILNIH KREM ZA ZDRAVLJENJE KOŽE PLAZILCEV

Strokovna mentorica: mag. Nika Leben, dipl. biol.

Šolska mentorica: Lidija Gnidovec, dipl. biol.

V projektni nalogi sva preverjala najboljše možne načine za oskrbo ran in poškodb plazilcev. Večino živali ne zdravimo na podoben način kot plazilce in ker si nepoučeni ljudje prehitro omislijo plazilskega hišnega ljubljence, prihaja do velikih napak pri oskrbi. Ker se veterinarji vsakodnevno srečujejo z različnimi opeklinami, ugrizninami, ranami ali paraziti na plazilcih, sva se odločila, da raziščeva mikroorganizme na koži plazilcev, katere kreme zavirajo delovanje in rast teh mikroorganizmov ter ali se obliži na plazilcih sploh obnesejo, kako oskrbimo ranjeno žival in kako je najbolje takrat z njo ravnati.

Med nalogo sva ugotovila, da se obliži ne obnesejo najbolje, ker se živali tujkov na svoji koži hočejo znebiti, to pa jim uspeva bolje, kot sva pričakovala. Ugotovila sva tudi, da na raznolikost mikroorganizmov na plazilcih vpliva predvsem podlaga in ravnanje z živalmi. Kot sva predvidevala, rast mikroorganizmov na koži plazilcev najbolje zavirajo antibiotične kreme.

Ana LOKOVŠEK: MIKROSATELITI PRI TIBETANSKIH TERIERJIH

Strokovni mentor: prof. dr. Peter Dovč

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

Genska testiranja so dandanes nepogrešljiv del veterinarske in humane medicine; z njimi lahko pridemo do pomembnih podatkov o izvoru, lastnostih in boleznih psov in drugih živali. Te informacije so izrednega pomena za vzreditelje, veterinarje in lastnike psov. Vzreditelj z njimi lažje načrtuje primerno paritveno kombinacijo in se izogne bolnim mladičem in mladičem z za pasmo neželenimi lastnostmi.

Za odkrivanje sorodstvenih relacij, starševstva in izvora pogosto uporabljajo mikrosatelite, ki imajo vlogo t.i. genskih markerjev, značilnih kratkih odsekov DNA, ki jih lahko najdemo v vsej masi informacij in katerih delovanje lahko sledimo. Mikrosateliti so nekodirajoči del DNA (introni), kar pomeni, da ne vsebujejo zapisa za lastnost. Gre za kratka ponavljajoča zaporedja, običajno dolga 1–4 nukleotide. Zaporedje predstavlja osnovni motiv, ki se lahko ponovi. Število ponovitev osnovnega motiva (npr. AATG) je pri različnih osebkih iste vrste različno in predstavlja polimorfne oz. hipervariabilne lokuse. Verjetnost, da imata dva osebka, ki nista v sorodu, isto število ponovitev, je izredno majhna.

V raziskavi smo s pomočjo mikrosatelitov ugotavljali povezave med v Tibetu živečimi terierji in v Evropi razširjenimi pasmami psov.

Primož MARINIČ in Ana RANZINGER: ANKETA O GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMIH

Mentorja: Uroš Verbovšek, univ. dipl. soc. ped., in Nada Udovč-Knežević, prof. biol.

Rezultati projektne naloge so bili pridobljeni z anketiranjem dijakov tretjih in četrth letnikov Gimnazije in veterinarske šole, BIC Ljubljana.

Naš cilj je bil ugotoviti odnos dijakov do gensko spremenjenih organizmov in ugotoviti njihovo mnenje, znanje in poseganje po le-teh. Poleg tega je bil naš cilj tudi ugotoviti, ali se znanje in mnenje veterinarskih tehnikov in dijakov tehniške gimnazije razlikuje.

Ugotovili smo, da se med dijaki tehniške gimnazije in dijaki veterinarske šole pojavljajo statistično pomembne razlike, do katerih je najverjetneje prišlo zaradi strokovnih predmetov, kot sta biotehnologija in mikrobiologija. Pri delitvi anketirancev glede na znanje smo ugotovili, da znanje statistično ne vpliva na mnenje dijakov, saj je do razlik prišlo samo pri enem od trinajstih vprašanj.

Spoznali smo tudi, da do večjih razlik pri reševanju anketnega vprašalnika glede na spol ni prišlo, izjema je le devetindvajseto vprašanje, pri katerem je prišlo do statistično pomembne razlike.

Mojca AHLIN in Aleksandra COREN: VPLIV KONCENTRACIJE SUBSTRATA NA ENCIMATSKO AKTIVNOST

Mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Na encimatsko aktivnost vpliva mnogo dejavnikov: pH, temperatura in koncentracija substrata.

V projektni nalogi smo se osredotočili na vpliv koncentracije substrata na encimatsko aktivnost kvasovk. Aktivnosti nismo merili s spremljanjem nastajanja kisika, kot je običajno za tak tip poskusa, ampak s spremljanjem nastajanja ogljikovega dioksida. Tako smo merili aktivnost kvasovk in posredno encimatsko aktivnost encima katalaze.

Taja GRUBAR in Hana CIMPERMAN: PARFUMI

Mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Cilj projektne naloge je na drugačen način predstaviti snov, ki jo večina ljudi uporablja vsak dan ter ugotoviti, iz česa je narejen moški in iz česa ženski parfumi, v čem se razlikujeta in kako vplivata na posamezni spol ter katere so najpogostejše sestavine v moških in katere v ženskih parfumih.

Naloga je sestavljena iz devetih točk. V prvi točki je predstavljena definicija parfuma in njegove osnovne sestavine. Druga točka opiše proces aromaterapije in njen namen. Tretja točka govori o zgodovini in razvoju parfumov v različnih civilizacijah. V četrti točki so opisane note parfumov, ki določajo harmonijo vonja po nanosu. Peti del je namenjen razvrstitvi parfumov v družine glede na lastnosti in odtenke vonja. V šesti točki so opisane najosnovnejše sestavine parfumov (eterična olja, živalski izvlečki, alkohol in sintetične snovi). V sedmi točki so podrobno predstavljeni postopki, s katerimi pridobivamo eterična olja. V osmem delu je opis nastanka parfuma, od aromatskega olja pa do končnega izdelka. Zadnja, deveta točka, govori o sestavi dezodorantov, njihovem namenu in uporabi ter nekaj o njegovi podskupini, antiperspirantih.

Miha TOMŠIČ: KOLONSKA KROMATOGRAFIJA PIGMENTOV PAPRIKE

Mentorica: Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

V projektni nalogi smo ločili karoten beta od preostalih pigmentov v papriki s kolonsko kromatografijo. Pri kolonski kromatografiji ločimo vzorec na frakcije s principom adsorpcije.

Po pripravi kolone in vzorca smo vzorec nanесли na stacionarno fazo. Z mobilno fazo smo sprali pigmente skozi stacionarno fazo in s tem ločili karoten beta od preostalih pigmentov. Karoten beta se je premikal skozi stacionarno fazo hitreje kot preostali pigmenti, ker se slabše adsorbira na stacionarno fazo.

Romana DORN: ASEPTIČNO DELOVANJE ČEBELJIH PRODUKTOV

Mentorica: Vesna Grgur

Čebelji produkti so bili že v zgodovini zelo cenjen vir zdravja in dobrega počutja. Iz podatkov v literaturi je razvidno, da ima propolis učinkovito antiseptično delovanje, matični mleček izboljšuje splošno počutje človeka, cvetni prah pa se uporablja za izboljšanje imunske odpornosti.

V eksperimentalnem delu smo opazovali, kako čebelji produkti delujejo na bakterije *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Sallmonela spp.* in bakterije ustne sluznice. Bakterije smo gojili na krvnem in navadnem agarju in nanje nanесли svojo vzorčno učinkovino ter preverjali njihovo antibakterijsko delovanje.

Rezultati so pokazali, da je izmed vseh čebeljih produktov najučinkoviteje delovala alkoholna tinktura propolisa, saj je delovala na vse bakterije, in to v trenutku, ko je bila nanesena na gojišče z določeno bakterijo. Imela je tudi večji učinek kot matični mleček, vodna raztopina propolisa pa ni dosegla pričakovanih rezultatov. Matični mleček je deloval učinkoviteje od zdrobljenega cvetnega prahu. Zdrobljen cvetni prah pa ima v primerjavi s cvetnim prahom v medu manjši učinek.

Martina OSTERMAN STRITIH: VPLIV TEMPERATURE NA DELOVANJE ENCIMA KATALAZA

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

Znano je, da ima temperatura velik vpliv na delovanje encimov, namreč, višja kot je temperatura, hitreje delci potujejo, več je trkov med molekulami in več substratnih molekul se v krajšem času veže na aktivno mesto encima, s tem dobimo več želenega produkta v krajšem času. Naša naloga je bila, da to dokažemo.

Pri metabolizmu celice nastajajo snovi, ki so strupene, zato se morajo razgraditi ali pa jih celica izloči. Eden izmed toksičnih produktov je vodikov peroksid. Reakcije razgradnje katalizira encim katalaza. Vodikov peroksid razpade na kisik in vodo. Temperatura torej vpliva na učinkovitost in hitrost reakcije, saj imajo encimi pri svoji optimalni temperaturi največjo produktivnost. Temu je sledila naša hipoteza, da se z naraščanjem temperature do optimalne aktivnost encima povečuje, kar smo zaznali z Vernierjevim senzorjem, saj je hitrejši metabolizem posledica večjega izločanja CO₂. Manjša aktivnost encima pri nižjih temperaturah je posledica počasnejših trkov med molekulami, manjša aktivnost pri višjih temperaturah pa posledica denaturacije encima, kar povzroči tudi smrt.

S poskusom smo uspeli dokazati, da naša hipoteza drži, torej, da se aktivnost encima z naraščanjem temperature do optimalne povečuje, saj se je CO₂ pri višjih temperaturah sproščal v veliko večji koncentraciji in dalj časa.

Sintija SEVŠEK: VPLIV NATRIJEVEGA TIOSULFATA (STS) IN ČESNOVE SPOJINE (S-ALLYL-L-CYSTEINE) NA SPREMEMBO TELESNE MASE IN METABOLIZMA MIŠI

Strokovni mentor: prof. dr. Simon Horvat

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

Debelost je v zadnjih 50. letih postala velik zdravstveni problem, najprej v razvitejših zahodnih družbah, kasneje tudi v državah v razvoju. Nalaganje maščevja je kompleksna lastnost, ki je pod vplivom številnih genov z manjšimi vplivi, ki se v genomu nahajajo znotraj kvantitativnih lokusov (angl. Quantitative Trait Locus; QTL). Eden od teh lokusov, ki vsebuje kandidatni gen TST, je posebej zanimiv, ker preliminarne genetske in fiziološke študije nakazujejo močne učinke na vitkost in izboljšanje metabolnih parametrov.

Že objavljene študije so ugotovile, da se aktivnost encima TST poviša pri dodatku substrata natrijevega tiosulfata, ni pa znano, ali ima ta substrat tudi učinke na transkripcijo in translacijo tega gena. Natrijev tiosulfat je naravna snov, uporabna v širokem spektru kliničnih situacij. Je poceni in deluje kot močan antioksidant, kelator kalcija in drugih strupenih snovi.

V okviru projektne naloge smo želeli testirati delovno hipotezo, da dodajanje natrijevega tiosulfata v vodo debelim mišim poveča raven mRNA in proteina gena TST v maščobnem tkivu. Posledično pričakujemo tudi zmanjšanje mase maščobnih depozitov in pozitivne učinke na metabolne kazalce v krvi.

Ugotovili smo, da sta tako STS kot česnova spojina že po enem mesecu krmljenja miši s krmo z visoko vsebnostjo maščob imela pozitivne metabolne učinke. Predvidevamo, da je opažen učinek pri STS

posledica aktivacije gena TST, ki deluje v mitohondrijih in ima pri aktivaciji pozitivne metabolne učinke. Česnova spojina S-alil-L-cistein pa je antioksidant in verjetno prispeva k znižanju oksidativnega stresa in s tem izboljšanju metabolne krvne slike.

Jaka POTOČNIK: AKVAPONIKA

Šolska mentorica: Tina Birk, prof. biol.

Aquaponika je neke vrste kmetijstvo, saj hkrati gojimo zelenjavo in ribe. Spada v urbano kmetijstvo in hkrati služi kot čistilna naprava. Solata, posejana nad akvarijem, v katerem gojimo ribe, je povezana z akvarijem tako, da črpalka iz akvarija vodi po cevki vodo do posode z vodo, tako da zalivamo solato z vodo iz akvarija, ki vsebuje iztrebke rib, te pa služijo kot gnojilo za solato.

V nalogi smo raziskovali sestavo vode: kemijsko sestavo, količina prisotnih nitritov in nitratov ter pH. Zanimala nas je tudi mikrobiološka sestava vode, kako hitro se bodo v njej razmnoževali mikroorganizmi in ali bo solata sploh porabila produkte rib. Predvsem nas je zanimalo, ali bo ta projekt res uspel kot čistilna naprava in ali bo na koncu voda tako čista kot na začetku.

Matevž KOCJAN: KANDIDATNI GENI ZA DEDNE BOLEZNI NA KONJSKEM DNA

Mentor: prof. dr. Peter Dovč

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

Konji že tisočletja sobivajo s človekom, zato ni nenavadno, da imajo ljudje poglobljeno znanje o njihovem vedenju, vzgajanju in tudi o njihovem zdravju oz. boleznih, ki jih pestijo. Vendar je danes način, kako pridobivamo novo znanje o slednjih, precej drugačen od tistega včasih. V zadnjih desetletjih so se namreč razvile metode, ki nam omogočajo tisto, kar je bilo prej nemogoče, vpogled v konjski genom.

Danes lahko z določenimi postopki raziščemo do sedaj nepoznane pojave (na konjski DNA). Te raziskave nam omogočajo, da bolje razumemo dedne bolezni.

Tea BOŽIČ: DOLOČANJE TOKSIČNIH ELEMENTOV V HRANI ZA PSE IN MAČKE

Strokovni mentor: doc. dr. Breda Jakovac Strajn, dr. vet. med.

Šolski mentorici: Lidija Gnidovec, prof. biol., Alma Kapun Dolinar, univ. dipl. inž. živ. tehn.

Mikroelementi so anorganske snovi, ki jih živali dobijo s krmo in so lahko za njih esencialni, nujni za rast in zdravje, lahko pa so neesencialni. V obroku je potrebno upoštevati razmerja med posameznimi elementi, saj je pomembno, da jih živali dobijo dovolj in v pravilnem razmerju. Iz teh razlogov se elementi v krmo dodajajo v ustreznih koncentracijah. V krmi najdemo tudi elemente, kot so arzen, svinec, živo srebro in kadmij, ki spadajo med nezaželenne snovi in imajo v zakonskih predpisih določene mejne vrednosti.

Da bi ugotovili, kakšne so vsebnosti nezaželenih snovi v hrani za hišne živali, smo preiskali 32 vzorcev hrane za pse in mačke, ki smo jih kupili v trgovinah. Uporabili smo metodo indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo (ICP-MS) po razklopu vzorcev v zaprtem mikrovalovnem sistemu. Ugotovili smo, da vsebnost omenjenih toksičnih elementov v nobenem primeru ne presega najnižjih dovoljenih mejnih vrednosti. Določili smo tudi, kateri vzorec v preiskovani seriji je vseboval največ oz. najmanj toksičnih elementov.

Maša NARED: MEDLETNA IN SEZONSKA DINAMIKA VOLKOV IZ TROPA MENIŠIJA

Strokovni mentor: doc. dr. Miha Krofel, univ. dipl. biol.

Šolski mentorici: Sava Osole, univ. dipl. biol.; mag. Irena Štrumbelj Drusany, univ. dipl. inž. živ. tehn.

V okviru projektne naloge smo ugotovili, da se število volkov na Menišiji spreminja, kar beremo v zgodovinski literaturi, kot tudi podatek o razpadu tropov in novi vzpostavitvi tropa na istem območju.

Število volkov na tem območju se spreminja zaradi različnih vzrokov smrti (nezakonitega odstrela, povoza ter pogina volkov). Po izgubi reproduktivnega člana se trop razide in na območje pride nov osebek, ki si želi vzpostaviti trop. Ugotovili smo tudi, da se volkovi istega tropa večkrat razdelijo na skupine, za kar naj bi bila odgovorna predvsem alfa samica, saj se, ko polega mladiče, umakne iz tropa. Predvidevali smo tudi, da bo zato številčnost videnih volkov naenkrat povečana v jesenskem času, saj naj bi se takrat mladiči, ki so že dovolj veliki, pridružili tropu. Vendar je iz rezultatov razvidno, da je številčnost večja v spomladanskem času, kar nas je presenetilo.