



Univerza v Ljubljani
Pedagoška fakulteta



BIC
LJUBLJANA

ANTIMIKROBNO DELOVANJE PAJKOVIH MREŽ

RAZISKOVALNA NALOGA

Zunanji mentor:
asist. Tim Prezelj, mag. mol. funkc. biol.

Šolski mentor:
doc. dr. Miha SLAPNIČAR, prof. kem., biol.

Avtorice:
Kaja SIMRAJH
Nika URANIČ
Nikolina NOVAKOVIĆ

Ljubljana, april 2023

POVZETEK

V raziskovalni antimikrobno delovanje pajkovih mrež nas je zanimalo, ali je pajkova svila, v kombinaciji z LB, M9 in FR, primeren substrat za razmnoževanje mikroorganizmov. Na svetu je 50.356 vrst pajkov. Vsaka vrsta pajkov sintetizira pajkovo mrežo z različnimi gradniki, ki uspevajo v različnih okoljih. Svila nastaja v predilnih bradavicah in žlezah. Pajki imajo 3 pare predilnih bradavic, ki se lahko (ni pa nujno) premikajo neodvisno od zadnjega para nog. V notranjosti zadka (predilnih bradavic) ležijo predilne žleze. Vsaka predilna žleza je s posebnim kanalom povezana z 1 predilno bradavico. Na to se vežejo lepljive substance (s katerimi pajki ulovijo plen), ki jih nato z lastno težo razvlečejo. Pajkova svila je zgrajena iz beljakovin, ki vsebujejo veliko nepolarnih in hidrofobnih aminokislin in nič triptofana. V primeru, da se C in N konice ne bi vezale, se mikrobi ne bi mogli zadržati na pajkovih mrežah. Posledično, se mreža ne bi ohranjala in obnavljala. Na pajkovih svilah se torej nahajajo različni mikroorganizmi, ki odnos uporabljajo v kontekstu različnih ekoloških niš. Skozi postopek nabiranja pajkovih svilnih mrež in njihove izolacije na različna gojišča in izolacije DNK, smo ugotovile, da na pajkovih mrežah res živijo različni mikroorganizmi.

KLJUČNE BESEDE: pajkova mreža, pajkova svila, mikrobi, pajkova mreža kot substrat

ABSTRACT

We were interested in researching the antimicrobial properties of spider webs and whether spider silk, in combination with LB, M9, and FR, is a suitable substrate for microbial growth. There are 50,356 species of spiders in the world, each synthesizing their webs with different building blocks that thrive in different environments. Silk is produced in the spinning glands and ducts. Spiders have three pairs of spinning glands that can (but not necessarily) move independently of the last pair of legs. The spinning glands lie inside the abdomen and each gland is connected to one spinning duct through a special canal. Sticky substances (used to catch prey) are attached to the duct and are then pulled out by the spider's own weight. Spider silk is made up of proteins that contain many nonpolar and hydrophobic amino acids and no tryptophan. If the C and N ends didn't bond, microbes wouldn't be able to cling to spider webs. Consequently, the web would not be maintained and repaired. Different microorganisms are found on spider webs, each utilizing their habitat in different ecological niches. Through the process of collecting spider silk webs and isolating them on different growth media and DNK extractions, we have discovered that various microorganisms do live on spider webs.

KEYWORDS: spider web, spider silk, microbes, spider web as a substrate.

KAZALO VSEBINE

.....	Napaka! Zaznamek ni definiran.
POVZETEK	2
ABSTRACT	2
KAZALO VSEBINE	3
KAZALO GRAFOV	5
KAZALO SLIK	5
KAZALO TABEL	6
RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE	7
RAZISKOVALNO VPRAŠANJE	7
HIPOTEZE	7
POGLAVJE TEORIJE	8
SPLOŠNO	8
NOTRANJA ZGRADBA	9
PREDILNE BRADAVICE IN ŽLEZE	12
EKOLOGIJA	13
PLENILCI IN OBRAMBA	13
DVORJENJE IN NEGA ZARODA	14
LEVITEV	15
JADRANJE	15
PREZIMOVANJE	16
PAJKOVE MREŽE	16
MEHANSKE LASTNOSTI	16
ZGRADBA PAJKOVE SVILE	16
PRIMARNA STRUKTURA	17
SEKUNDARNA, TERCIARNA IN KVARTARNA STRUKTURA	17
NAČRT ZA ZGODNJE ZLAGANJE IN OLIGOMERIZACIJO	18
MOLEKULARNI POGLED: KONFORMACIJSKI PREHODI MAS MED SESTAVLJANJEM	19
.....	19
FUNKCIONALNI PREMAZI NA SVILI VLEČNE VRVI	22
STRUKTURA MREŽE	23
ANTIMIKROBNOST PAJKOVIH MREŽ	24
ANTIMIKROBNO DELOVANJE PAJKOVE MREŽE V NARAVI	24
MIKROBIOLOŠKI VIDIK ANTIMIKROBNEGA DELOVANJA PAJKOVE MREŽE	24
UPORABA DEFENZINOV	24
ALI VSE PAJKOVE MREŽE DELUJEJO ANTIMIKROBNO?	25

ZGODOVINA UPORABE PAJKOVIH MREŽ	26
UPORABA ANTIMIKROBNIH LASTNOSTI PAJKOVIH MREŽ V SODOBNI MEDICINI.....	26
METODOLOGIJA	28
OPIS VZORCA	28
METODE IN MATERIALI	28
METODE	28
MATERIALI :	31
OPIS RAZISKAVE	33
OPIS POSTOPKA	33
REZULTATI.....	44
.....	50
POVPREČNA VELIKOST KOLONIJ GLEDE NA GOJIŠČE.....	58
.....	59
POVPREČNO ŠTEVILO KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA	59
ŠTEVILSKA RAZNOLIKOST KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA	61
ŠTEVILSKA RAZNOLIKOST KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ	62
VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA.....	63
.....	65
VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ ..	65
DISKUSIJA.....	67
POVPREČNA VELIKOST KOLONIJ GLEDE NA GOJIŠČE.....	67
POVPREČNO ŠTEVILO KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA	68
ŠTEVILSKA RAZNOLIKOST KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA	68
ŠTEVILSKA RAZNILIKOST KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ	69
VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA.....	70
VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ ..	70
ZAKLJUČEK.....	72
PREDLOGI NADALJNEGA DELA.....	73
LITERATURA	74
SPLETNI VIRI.....	74
VIRI KNJIG:	75
VIRI SLIK:.....	75
ZAHVALA.....	77

KAZALO GRAFOV

Graf 1: povprečna velikost kolonij glede na izbrani tip gojišča na podlag tabele 1	58
Graf 2: povprečna velikost kolonij glede na izbrani tip gojišča na podlagi podatkov iz tabele 2.....	59
Graf 3: skupni prikaz povprečnega števila kolonij glede na izbrani tip gojišča	60
Graf 4: skupni stolpični prikaz povprečnega števila glede na izbrani tip gojišča.....	60
Graf 5: prikaz raznolikost kolonij po številu glede na tip gojišča	61
Graf 6: : prikaz raznolikosti v številu kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij	62
Graf 7: prikaz velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča.....	63
Graf 8: prikaz velikosti posameznih kolonij glede na LB gojišče	63
Graf 9: prikaz povprečne velikosti posamezne kolonije glede na tip gojišča.....	64
Graf 10: prikaz velikosti posameznih kolonij glede na M9 gojišče.....	64
Graf 11: : povprečna velikost kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij.....	66

KAZALO SLIK

slika 1: deli telesa pri pajku.....	8
slika 2: prikaz membrane pajkove povrhnjice.....	8
slika 3: prikaz notranjih organov pajka.....	9
slika 4: strupne žleze pri pajkih	10
slika 5: strupniki	10
slika 6: čutilna dlacica, ki izrašča iz pajkove kože	10
slika 7: položaj oči pri različnih družinah pajkov.....	11
slika 8: različne oblike predilnih bradavic	12
slika 9: različne oblike predilnih žlez	13
slika 10: : prikaz položaja predilnih žlez.....	13
slika 11: predilno tkivo, ki izhaja iz predilnih žlez.....	13
slika 12: varovanje s kamuflažo	14
slika 13: varovanje s »strmoglavljenjem«.....	14
slika 14: jajčeca, ki os zavarovana v mreži	15
slika 15: zibelka, ki jo pajek naredi za svoje mladiče.....	15
slika 16: prikaz niti, ki jo pajek spusti in mu omogoča jadranje	15
slika 17: prikaz gradnikov mreže (proteini)	18
slika 18: podroben prikaz proteinov, ki gradijo mreže.....	19
slika 19: C in N strukture z prikazovanjem sinteze proteinov v pajkovi mreži.....	20
slika 20: svila pajkov pod različnimi mikroskopskimi povečavami	21
slika 21: zgradba mreže po slojih ter struktura vlaken.....	22
slika 22: mrežne niti.....	23
slika 23: shema nabiranja pajkovih mrež	33
slika 24: shema priprave gojišč (LB, M9 in FR)	35
slika 25: shema nacepljanja gojišč in inkubacije	36
slika 26: shema redčitvene vrste.....	36
slika 27: shema vizualnega pregleda dobljenih podatkov	37
slika 28: shema barvanja po Gramu.....	38
slika 29: shema nadaljevanja barvanja po Gramu.....	38
slika 30: shema vizualnega pregleda dobljenih podatkov	39
slika 31: shema izolacije DNK	40
slika 32: shema nadaljnje izolacije DNK	41
slika 33: shema nadaljnje izolacije DNK	41

slika 34: shema nadaljnje izolacije DNK	42
slika 35: shema nadaljnje izolacije DNK	42
slika 36: shema nadaljnje izolacije DNK	43
slika 37: shema nadaljnje izolacije DNK	43
slika 38: shema nadaljnje izolacije DNK	43
slika 43: 2. petrijevka LB	44
slika 42: 1. petrijevka LB	44
slika 41: LB tekoče gojišče	44
slika 40: M9 tekoče gojišče	44
slika 39: FR tekoče gojišče	44
slika 47: 8. petrijevka LB	45
slika 45: 4. petrijevka LB	45
slika 44: 3. petrijevka LB	45
slika 46: 5. petrijevka LB	45
slika 48: 6. petrijevka LB	46
slika 49: 1. petrijevka M9	46
slika 50: 2. petrijevka M9	46
slika 52: 4. petrijevka M9	47
slika 51: 3. petrijevka M9	47
slika 53: 5. petrijevka M9	47
slika 57: 4. petrijevka FR	48
slika 56: 3. petrijevka FR	48
slika 54: 1. petrijevka FR	48
slika 55: 2. petrijevka FR	48
slika 58: 5. petrijevka FR	49

KAZALO TABEL

Tabela 1: uporabljene metode pri projektne delu	28
Tabela 2: prikaz vseh podatkov zbranih tekom raziskovalne naloge	50
Tabela 3: prikaz povprečne velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča in prikaz standardne napake pri merjenju	58
Tabela 4: prikaz števila kolonij v odvisnosti od vrste gojišča	59
Tabela 5: prikaz raznolikost kolonij po številu glede na tip gojišča	61
Tabela 6: prikaz raznolikosti v številu kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij	62
Tabela 7: prikaz povprečne velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča in standardne napake pri merjenju	65
Tabela 8: povprečna velikost kolonij glede na njihove morfološke lastnosti	65

RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE

RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

V seminarski nalogi smo raziskovale kateri (če sploh) mikroorganizmi rastejo na svili pajkovih mrež. Zanimalo nas je ali gradniki pajkove svile lahko služijo kot substrat mikroorganizmom in ali jih izrabljajo za svojo rast in delovanje. Z dodajanjem pajkove svile na različna gojišča (LB, M9, FR) želimo proučiti morfološke značilnosti kolonij različnih vrst mikroorganizmov, ki uspevajo na omenjenih gojiščih in kako pogoji, ki jih ti mikroorganizmi potrebujejo vplivajo na število bakterijskih kolonij. Zanimalo nas bo število kolonij glede na posamezno petrijevko, koliko morfološko različnih kolonij smo pri posameznem gojišču lahko našeli, katera oblika je bila v povprečju najpogostejša, katere kolonije se pojavljajo na vseh treh gojiščih in katere le na določenem gojišču s posameznimi hranili.

HIPOTEZE

HIPOTEZA 1: Na gojišču LB bo največje število kolonij mikroorganizmov.

HIPOTEZA 2: Na gojišču M9 bo manjše število kolonij mikroorganizmov, vendar večje kot na gojišču FR.

HIPOTEZA 3: Na gojišču FR bo najmanjše število kolonij mikroorganizmov.

HIPOTEZA 4: Na gojišču LB bo največ morfološko različnih kolonij mikroorganizmov.

HIPOTEZA 5: Na gojišču M9 bo manj morfološko različnih kolonij kot v LB gojišču.

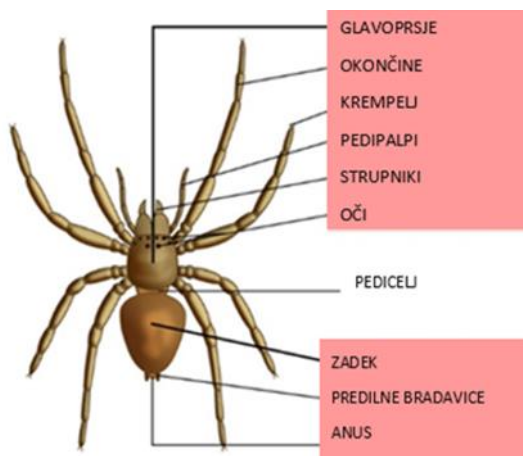
HIPOTEZA 6: Na gojišču FR bo najmanj morfološko različnih kolonij v primerjavi z LB in M9 gojiščem.

POGLAVJE TEORIJE

SPLOŠNO

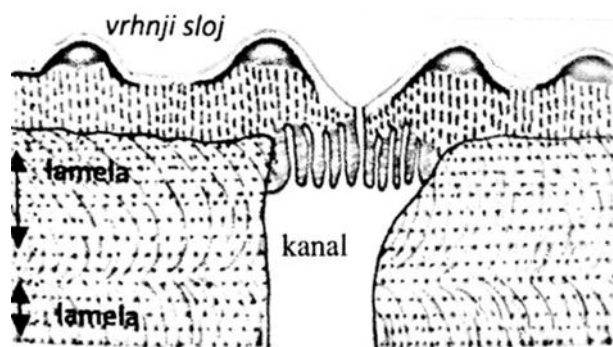
Pajki so vpeti v delovanje v vseh ekoloških nišah našega planeta in jih lahko najdemo povsod na Zemlji, od zelo hladnih področij pa vse do puščav. Najbolj so razširjeni na območjih z bogato vegetacijo. Do avgusta 2022 so taksonomi zabeležili 132 družin, v katerih lahko najdemo 50.356 vrst pajkov, vendar mnogo vrst poznamo le po imenu vrste in po kraju bivanja. Vrste, ki jim je bilo namenjeno več pozornosti, služijo kot praktični modeli in nam pomagajo razumeti kakšna bitja pajki sploh so (M. Tone, Pajki v Sloveniji).

Pajki so red členonožcev, ki ga natančneje uvrščamo v razred pajkovcev. Za členonožce je značilno, da imajo zunanje ogrodje sestavljeno iz trdne a prožne snovi, hitin. Ogrodje pri pajkih je iz 3 plasti: vrhnji sloj, ki je najtrši in najtanjši, srednjega sloja, ki ga pajek ohrani tudi v odrasli dobi (žuželke ga ne) in spodnjega sloja, ki je tako kot srednji sestavljen iz več med seboj povezanih mikrovlaknen. Ti sloji dajejo povrhnjici čvrstost in prožnost. Prožnost je odvisna od razmerja sloja (tukaj se upošteva ali je tega sloja veliko ali malo) in od razmerja osnovnih gradnikov. Pajki imajo poleg hitinastega ogrodja še zunanje ogrodje, ki je tanjše in jih varuje pred udarci in hkrati varuje notranje organe ter preprečuje izsušitev. Pajki imajo 2 telesni regiji: to sta glavoprsje in zadek, ki pa se povezujeta z zožitvenim delom, pedicljem. Glavoprsje je sestavljeno iz 2 polovic hitinastega oklepa; iz zgornje polovice (»karpakas«) in iz spodnje polovice, (»sternum«). Polovici med seboj povezuje mišično tkivo in razne membrane. Imajo 8 oči, ki pa so različno velike in različno razporejene. Zadek ali abdomen, je mehkejši od glavoprsja in se lahko tudi razteza. Na zadku najdemo vzorce različnih barv, po katerih so nekatere vrste posebej prepoznavne (Marinko T. Pajki. Celje: samozaložba; 2015.str. 3).



slika 1: deli telesa pri pajku

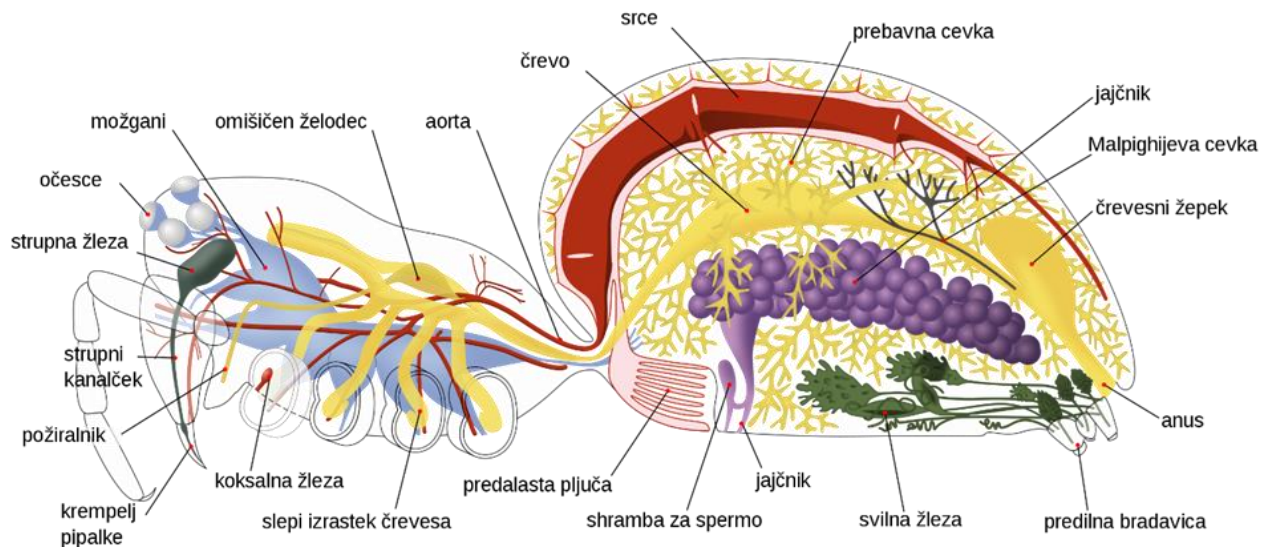
<https://spideridentifications.com/spider-facts/parts-of-a-spider>



slika 2: prikaz membrane pajkove povrhnjice

(MARINKO TONE. 2015. zgradba in videz [skenirano iz knjige]. str.: 3 (5.11.2022))

NOTRANJA ZGRADBA



slika 3: prikaz notranjih organov pajka

(<https://sl.wikipedia.org/wiki/Pajki>)

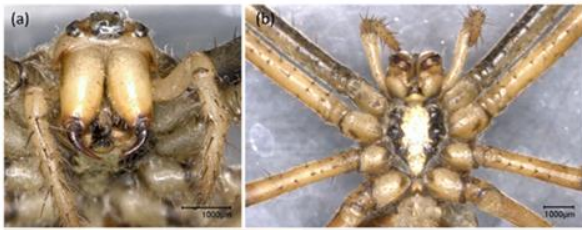
Pajki za dihanje uporabljajo 2 dihalna sistema. Prvi sistem, ki ga najdemo le pri pajkih, so predalasta pljuča, drugi pa so vzdušnice ali traheje.

Pajkov krvni sistem je znan kot odprt krvožilni sistem, kjer ne najdemo krvnih kapilar, ampak hemolimfo (bledo modre barve, zaradi prisotnosti pigmenta, ki prenaša kisik, hemocianina), teče iz arterij neposredno v pajkova tkiva enosmerno. Ko kri prodre med tkiva, se nato zbere na posebnih prostorih od koder se vrne skozi ostije v srce. Ta kri gre nato skozi predalasta pljuča.

Vlogo izločal predstavljajo malpighijeve cevke, ki presnovne produkte predelajo v sečno kislino, sečnino in karbonate ter jih izločijo skozi anus.

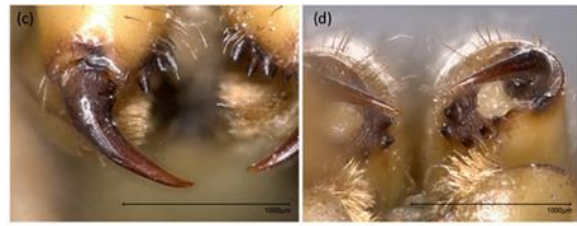
Samci imajo moda, samice pa 2 ovarija. Razmnoževalne celice, torej spermo in jajčeca iztisnejo skozi spolno odprtino, ki je značilna za oba spola in se nahaja na spodnji strani zadka. Samci nimajo penisa, temveč spermo proizvedejo v testisih in jo prenesejo v pedipalp (sekundarni spolni organ). Za ta namen pajek sprede majhno in tanko mrežo, ki je trikotne ali pravokotne oblike. V Evropi obstajata 2 večji skupini, to sta entelegini in haplogini. Razlikujejo se v tem, da spolno odprtino haploginih pajkov ne pokriva hitinasta struktura, tako ko jo pri enteleginih pajkih.

Vsi pajki imajo 2 strupni žlezi, ki se nahajata v glavoprsju. Obe sta cilindrične oblike (po obliki podobne kumaram) iz njiju do konca strupnikov vodi kanal. Okoli strupnih žlez so spiralno pozicionirane mišice, ki hitro izpustijo strup, če pajek napade. Mišično tkivo ima celo svoj motorični živec, ki jih omogoča hitrejšo krčenje mišic in bolj silovit ter močan brizg strupa. Pajki imajo lahko encime prisotne že v strupu, drugi pa jih v plen vbrizgajo naknadno, saj se plen tako omehča in lahko vsebino posesajo iz njega.



slika 4: strupne žleze pri pajkih

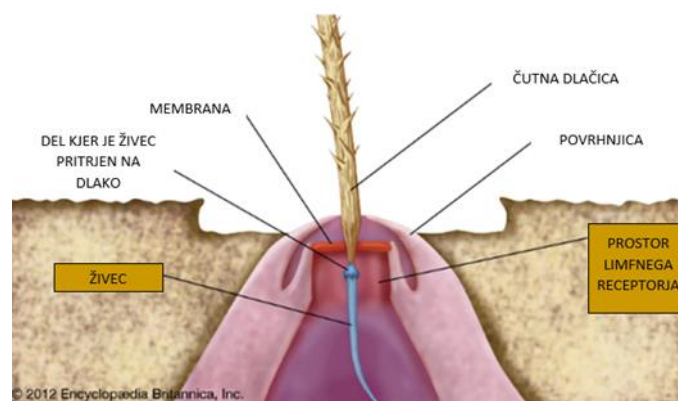
(https://www.researchgate.net/figure/Figures-7-9-Venom-glands-in-Liphistius-bicoloripes-7-Dissection-of-a-chelicera-showing_fig3_259855147)



slika 5: strupniki

(https://www.researchgate.net/figure/Figures-7-9-Venom-glands-in-Liphistius-bicoloripes-7-Dissection-of-a-chelicera-showing_fig3_259855147)

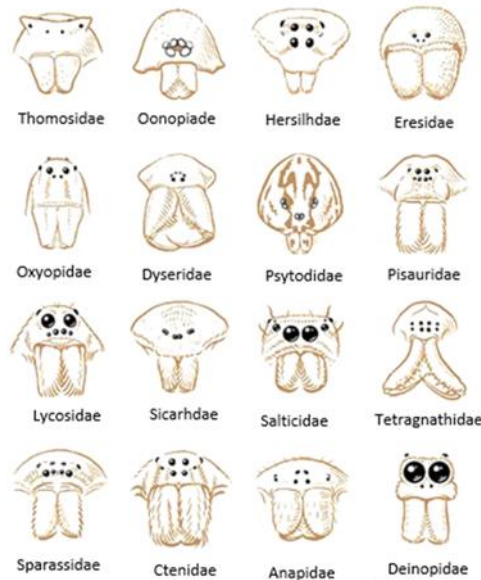
Vsako čutilo je iz 2 delov. Prvi je zunanji del, ki je viden, drugi del pa je pod povrhnjico ter je preko živcev povezan z zunanjim delom in s centralnim živčnim sistemom. Najbolj opazne so čutne dlačice in čutne reže. Čutne dlačice, ki izraščajo iz globoke jamice, so oživčene s 3 živci, ki so pripete na koren dlake in spremljajo gibanje osi dlake. Če se pajka kaj dotakne ali se mu približa, se ta umakne. Imajo tudi posebne čutne organe, trihobotrije na katere so pripeti kar 4 živčni končiči. Zaradi teh dlak naj bi pajek lahko razlikoval ali gre samo za premikanje zraka ali je v njegovi bližini prisotna mušica. Poleg dlak pa ima pajek tudi trdo zunanje ogrodje, ki prenaša mehanske tresljaje iz okolja. Te tresljaje pajek zazna in jih loči med seboj s pomočjo čutil za pritisk. Ta čutila pa imenujemo organi čutilnih mrež in jih je po telesu na tisoče. Okušalne dlačice so najpomembnejši kemoreceptorji pajkov. Vsaka okušalna dlaka je po navadi oživčena z 21 čutilnimi celicami. Kemično občutljive senzorzije uporabljajo tudi v času iskanja partnerja.



slika 6: čutilna dlačica, ki izrašča iz pajkove kože

(<https://www.britannica.com/animal/spider-arachnid/Nervous-system-and-senses>)

Pajki imajo sestavljene oči, kar pomeni, da eno oko sestavlja večje število majhnih očes, ki se jim reče omatidiji. Glede na lego razporeditve ločimo take oči, ki so razporejene v 2 ali 3 vrstah, glede na strukturo in pomen pa ločimo glavne ter sekundarne oči. Glavne oči se po navadi nahajajo spredaj in so lahko večje ter na sredini. Vsa druga očesa so sekundarna očesa. Večina pajkov ima 8 očes. Pajki večinoma ne vidijo dobro in samo na kratke razdalje.



Thomas Swanman

slika 7: položaj oči pri različnih družinah pajkov

(https://www.reddit.com/r/spiders/comments/mp5x1e/the_different_types_of_spider_eye_arrangements/)

Pajki imajo navadno 4 pare nog. Funkcije nog so pri pajkih številne:

- uporaba pri kopanju,
- plavanju,
- grabljenju plena,
- plezanju,
- skakanju,
- prisila plena, da miruje,
- pletenje mrež (bolj podrobno opisano pri predilnih bradavicah in žlezah),
- ovijanje plena,
- grajenje skrivališč,
- skrivanje jajčec...

Običajno je prvi par nog najdaljši, zadnja dva pa sta nekoliko krajša.

Imajo strnjen centralni živčni sistem. Pajki imajo samo 2 kompaktna ganglija (živčni vozle oz. skupek živčnega tkiva v živčnem sistemu). Poznamo spodnji in zgornji ganglij, ki sta združena in se nahajata v sprednjem delu telesa, ki mu rečemo prosoma. Vsi nadaljnji živci izhajajo iz

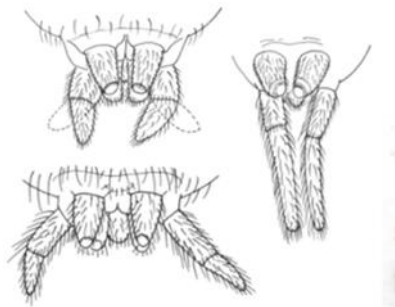
teh 2 ganglijev in skupaj sestavljajo periferni živčni sistem iz katerega živčna vlakna vodijo v vse preostale dele telesa.

PREDILNE BRADAVICE IN ŽLEZE

Predilne bradavice

Pajki imajo 3 pare predilnih bradavic na končnem delu zadka. Po navadi so stožčaste oblike. Vsi trije pari – prednji, srednji (najkrajši) in zadnji se lahko premikajo neodvisno drug od drugega, kar pa omogoča veliko število prisotnih mišic. Predilne bradavice se lahko premikajo izmenično s premikanjem nog. Pajek tako lahko predilne bradavice premika v vse smeri, tudi dviguje in zavija, sposobne pa so delati tudi skupaj, zelo usklajeno.

Nekateri pajki imajo tako imenovani kolulus. To je poseben izrastek. Nekatere vrste pajkov pa imajo kribelum. To je majhna ploščica pred predilnimi bradavicami, ki pa je lahko iz enega ali dveh delov, redkeje pa iz štirih. Kribelatna površina je prekrita z mnogimi drobnimi ter votlimi cevčicami. Mladi pajkci jih imajo manj vendar ob levitvi število hitro raste. Iz teh zelo drobnih cevčic pride zelo tanko predivo veliko 0,015 μm . Tisti pajki, ki imajo kribelum imajo ob zadnji, četrti nogi se strukturo, ki ji rečemo kalamistrum ali bolj pogovorno češelj. Kalamistrum so neke vrste ščetine, s pomočjo katerih pajek lahko ritmično vleče predivo predivo iz kribeluma. Predivo tako ritmično drgne toliko časa, da postane cofasto ali zankasto in šele nato po navadi začne z grajenjem mreže. To predivo ni lepljivo, je pa enako učinkovito. Ko žuželke pridejo v stik z njim se ujamejo in postanejo lahek plen. Mreža, ki je spletena od kribetalnih pajkov je ponavadi modrikaste barve. (Marinko T. Pajki. Celje: samozaložba; 2015. str. 6-7.)



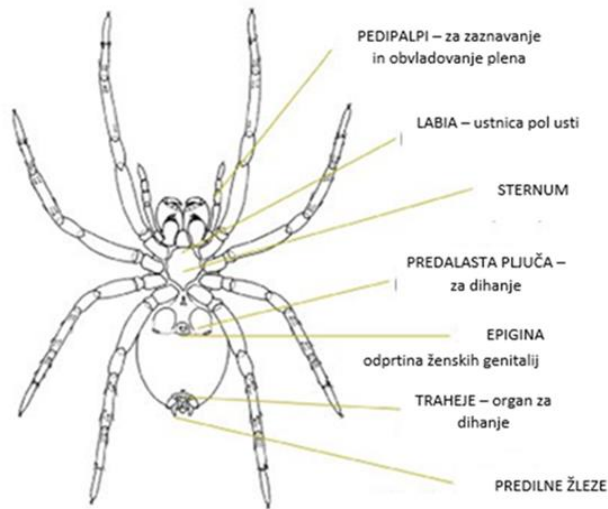
slika 8: različne oblike predilnih bradavic

(<https://research.amnh.org/iz/blackrock2/ky.htm>)

Predilne žleze

Ležijo v notranjosti zadka. Vsaka predilna žleza je s posebnim kanalom povezana s 1 predilno bradavico. Žleze izločajo snov, ki je sestavljena iz aminokislin, ta pa potuje po žlezni predalih do predilnih bradavic. Število predilnih žlez se med vrstami razlikuje. Poznamo 4 različne oblike žlez: cevaste, razraščene, ampulaste in venčaste. Različne žleze proizvajajo drugačne substance iz katerih je predivo, kar daje nitkam pajkov posebno lastnost. Lahko proizvajajo na primer lepljivo substanco za mrežo, na katero se prilepi plen. Predivo prihaja iz pajka tako, da ga iztisne s pomočjo pritiska, lahko ga vleče s predilnih bradavic s zadnjimi nogami, lahko pa ga vleče tudi z lastno težo, če se spušča iz višjega položaja. S stiskanjem bradavic nadzorujejo količino snovi, ki bodo zapustile predilno žlezo. Debelina same niti je odvisna tudi od teže in

velikosti samega pajka. Pajkove predilne bradavice in žleze so organi iz katerih lahko nastaja najmanj 6 vrst različnih niti, katere pa bodo nastajale pa lahko izbira in kombinira sam (Marinko T. Pajki. Celje: samozaložba; 2015. str. 6-7.).



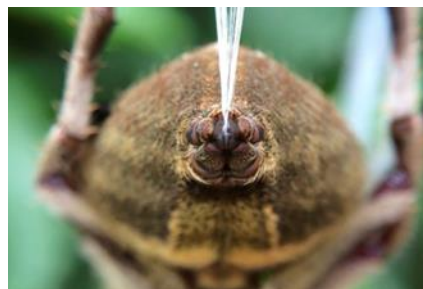
slika 9: različne oblike predilnih žlez

(MARINKO TONE. 2015. po obliki so žleze. Predilne bradavice in žleze [skenirano iz knjige]. str.: 6 (5.11.2022))



slika 10: prikaz položaja predilnih žlez

(<https://australian.museum/learn/species-identification/ask-an-expert/what-is-a-spiders/>)



slika 11: predilno tkivo, ki izhaja iz predilnih žlez

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Spinneret>)

EKOLOGIJA

PLENILCI IN OBRAMBA

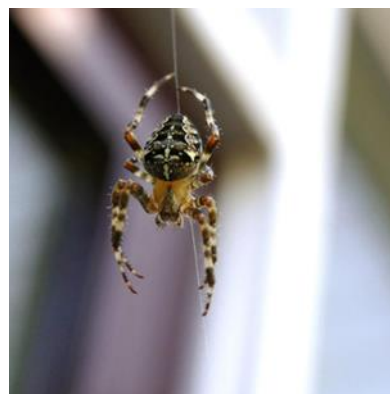
Čeprav so sami zelo dobri plenilci, kdaj postanejo tudi plen. Že med samimi »pajkci« takoj po izvalitvi pride do kanibalizma. Poznamo tudi pajke, ki so specializirani, da se prehranjujejo s pajki. Ostale živali, ki so nevarne za pajke so: kuščarji, žabe, nekatere žuželke (krešiči in plenilske stenice), netopirji, mravlje (po navadi plenijo na jajčeca), veliko vrst ptic, ki hranijo svoje mladiče. Največje »sovražnice« pajkov pa so ose. Pajki imajo mnogo atributov kako njihovim plenilcem uiti:

- varuje jih lahko sama mreža,
- blizu mreže se lahko nahaja bivališče, v katerega se skrijejo,
- pajki skakači odskočijo v travo in se v njej skrijejo,
- varovalna oz. svarilna barva,
- pajki imajo lahko tudi trne,
- imitiranje drugih živalskih vrst (največkrat mravelj),
- nepremičnost,
- »met« iz visoke višine (»strmoglavljenje«) in se nekje na sredi padanja vstavijo s pomočjo nitke.



slika 13: varovanje s »strmoglavljenjem«

(<https://www.shutterstock.com/search/spiked-spider>)



slika 12: varovanje s kamuflažo

(<https://mymodernmet.com/wrap-around-spiders-dolophones/>)

DVORJENJE IN NEGA ZARODA

Naloga samcev je, da najdejo primerno samico in jo oplodijo, pri čemer jih pomaga njihova majhnost, poleg tega pa se tudi lažje premikajo če so manjši. Po zadnji levitvi se začnejo intenzivno sproščati hormoni, ki jih prisilijo, da je edini nagon, najti samico in se pariti. Pri tem se tudi prehranjevanje obsežno zmanjša. Preden se samec in samica parita je obvezno dvorjenje. Dvorjenje je »ritualni« vedenjski vzorec pri katerem samec poskuša prepričati samico, da je on primeren za nov zarod potomcev. Velikokrat se za samico bori več samcev in tudi tako pride do naravne selekcije. Dvorjenje je različno pri različnih vrstah in lahko traja od nekaj ur do nekaj dni, pri tem pa se uporablja veliko čutil. Nekatere vrste se bolj zanašajo na vidno zaznavanje, druge pa na mehansko. Parjenje ima za oba spola pajkov zelo velik pomen. Eden izmed bolj poznanih načinov dvorjenja je proizvodjanje zvokov - stridulacija. Pri tem se sprošča zvok, ko se drgneta telesa obeh pajkov. Po navadi imajo stridulacijski aparat samo samci. Samci na svoji mreži začnejo z zadkom migati, kar proizvaja zvok, ki je podoben, kot če bi z prstom šli čez konice glavnika. Večina samic se na dvorjenje odzove pasivno (svoje zanimanje pokažejo tako, da zelo pozorno opazujejo pajka), nekatere pa npr. vrtijo svoje sprednje noge.

Jajca so obdana z brezbarvno tekočino, ki se potem, ko samica izleže jajčeca utrdi. V jajčecu zarodek raste do faze ličinke in nato jajce uporablja za črpanje energije, vse dokler ni samostojen. Lahko 10 ali pa več tisoč. Odlagajo jih na različnih krajih, saj tako omogočijo večjo verjetnost za preživelost zaroda. Samica jih zaščiti tako, da splete kokon. Kokon je pajčevinasta

vreča, ki ščiti zarod pred škodljivci in okolijskimi vplivi. Kokon je vseeno grajen tako, da ohranja primerne pogoje (najpomembnejša vlažnost). Kokon pajek sprede iz vsaj 6 mrež in uporabi tudi prebavne sokove.



slika 14: jajčeca, ki os zavarovana v mreži

(<https://www.shutterstock.com/search/spider-eggs>)



slika 15: zibelka, ki jo pajek naredi za svoje mladiče

(<https://gilwizen.com/invertebrates/arachnida/spiders/>)

LEVITEV

Zunanja plast v času levitve začne spuščati encime v reže med povrhnjico in plasti pod njo. Ti raztopijo vmesne komponente, ne da bi poškodovali čutne dlačice. Večina pajkov se med levitvijo obesi na mrežo, ki je narejena posebej za to. Najprej počasi prevleka na čelu glavoprsja, nazadnje pa se zlevijo noge. Po koncu levitve ima pajek tudi svetlejšo povrhnjico in je na začetku bolj izpostavljen plenilcem, vse dokler se varovalno ne obarva. Po levitvi ima večje glavoprsje in noge, a manjši zadek.

Če pajke pri nesreči izgubi ud, se mu ta lahko delno povrne. Seveda je to odvisno od njegove starosti – s starostjo se sposobnost obnavljanja slabša, vendar bo nekoliko manjši in tanjši od odtrganega. Na novo zrastle nogi se zmanjša število čutnih senzorjev in število mišičnih vlaken.

JADRANJE

Mladi pajkci so zelo lahki, kar jim daje tudi svoje prednosti. Lahko se postavijo na rob visoke površine, dvignejo zadek in iz njega izstrelijo puhasto nit. Zaradi vzgonskega vetra jih ta ponese in tako zajadrajo. S to metodo se lahko razširjajo po zraku in naseljujejo nova področja. Seveda



slika 16: prikaz niti, ki jo pajek spusti in mu omogoča jadranje

(<https://www.nytimes.com/2018/06/26/science/spiders-ballooning-wind.html>)

jih lahko med jadranjem poje kakšnem plenilec, ali pa pristanejo nekje, kjer se na območje ne morejo prilagoditi. Jadrajo lahko tudi kakšni lažji odrasli pajki, večinoma pa vrste, ki živijo v zemlji tega niso sposobne. (Marinko T. Pajki. Celje: samozaložba; 2015. str. 18).

PREZIMOVANJE

Preživetje v neugodnih razmerah predstavlja za pajke veliko preizkušnjo, zato že prej prodobijo telesno težo. Zatem si poiščejo zavetišče, ki je lahko pod listjem, ki je dober izolator, v travnem odpadku, na podstrešju hiš, skalnih špranjah, podzemnih jamah... zatočišče je miren kraj, kjer lahko preživi daljše obdobje. Kar nekaj pajkov si ustvari pajčevinasto vrečico v katero se zavijejo in jih varuje pred mrazom. Med prezimovanjem lahko zdržijo brez dodatnega prehranjevanja. Ena vrsta pajkov lahko normalno deluje do -20°C . V njihovi hemolimfi se nahajata posebni snovi – glicerol in sorbitol, ki se v času nizkih temperatur povečata in preprečujeta nastajanje kristalov znotraj hemolimfe. Tudi mnoga jajčeca lahko preživijo zimska obdobje, saj jih nekatere samice izležejo šele jeseni.

PAJKOVE MREŽE

Organizmi zagotavljajo več gradnikov, ki so osnova biopolimerov. Monomeri, ki se pojavljajo v naravi, vključujejo nukleotide, sladkorje in aminokislino, ki polimerizirajo v DNK, polisaharide, kot je celuloza, in beljakovine, kot so kolagen, lasje ali pajkova svila. Še posebej dobro opredeljen biopolimer je DNK, ki je sestavljen iz štirih posameznih nukleotidov (adenina, citozina, timina in gvanina). Človeške molekule DNK, ki se nahajajo v skoraj vsaki celici človeškega telesa, so dolge več metrov. DNK je linearni biopolimer, ki je pogosto zavito in zvito, njegova glavna funkcija pa je shranjevanje, podvajanje in prepisovanje dednih informacij. Poleg tega pa lahko DNK, glede na svoj linearni značaj, služi tudi kot "steza", po kateri se določene beljakovine premikajo iz enega dela celice v drugega.

MEHANSKE LASTNOSTI

V milijonih let so se pajki razvili, da bi ujeli plen z uporabo svile, zato imajo vlakna veliko zmogljivost za absorpcijo energije. Poleg tega ima svila majhno gostoto, veliko natezno trdnost in veliko raztegljivost – kombinacija, zaradi katere je izredno trpežna. Žilavost je mogoče v veliki meri pripisati tudi visoki gostoti vodikovih vezi, ki so prisotne v pajkovi svili. Lastnosti svile vlečnih mrež se bistveno spremenijo, če so vlakna mokra ali v zelo vlažnih razmerah.

Izpostavljenost vlaken svile vlečne mreže k vodi (pari ali tekočini) povzroči povečanje premera vlaken in njihovo dolžino. Ta učinek se običajno imenuje superkontrakcija. Dolžina vlaken se lahko skrči do 50 % prvotne dolžine. Ob kemični spremembi okolja se pH postopoma znižuje. Vse spremembe spremljata povečanje vzdolžnega toka in strižne sile, ki ju povzročata zoženje vrtničastega kanala. Kombinacija teh procesov povzroči nastanek sekundarne strukture MAS. Ta učinek drastično poveča hidrofobne interakcije in spodbuja nastanek β -ravnin. Spreminjajoči se kemijski pogoji povzročajo konformacijske prehode, ki zmanjšujejo topnost in omogočajo tesnejše pakiranje molekul MAS.

ZGRADBA PAJKOVE SVILE

Pajkova svila je sestavljena predvsem iz beljakovin, ki imajo veliko nepolarnih in hidrofobnih aminokislin, kot sta glicin ali alanin, vendar na primer nimajo triptofana ali pa ga imajo zelo

malo. V primerjavi z običajnimi celičnimi encimi je očitno, da imajo beljakovine svile precej nenavadno aminokislinsko sestavo. Zapis za nastanek proteinov je v spidroinih I. in II., ki imajo običajno molekulsko maso 250-400 kDa na monomer.

PRIMARNA STRUKTURA

Ponavljajoča se zaporedja pogosto predstavljajo več kot 90 % celotnega proteina pajkove svile in so sestavljena iz kratkih polipeptidnih odsekov s približno 10-50 aminokisljinami. Ti vzorci se lahko v posamezni beljakovini ponovijo več kot stokrat. Vsaka polipeptidna ponovitev ima zato posebne funkcionalne lastnosti, ki so razlog za izjemne mehanske lastnosti niti pajkove svile. Svile MA in Flag (ne lepljiva svila) vsebujejo do štiri tipične oligopeptidne motive, ki se večkrat ponovijo:

[I] (GA)_n/(A)_n,

[II] GPGGX/GPGQQ,

[III] GGX (X = A, S ali Y) in

[IV] "spacer" zaporedja, ki vsebujejo nabite aminokisljine. Oligopeptidi z zaporedjem (GA)_n/(A)_n v raztopini tvorijo α -helikse, v sestavljenih vlaknih pa β -ravninske strukture.

Strukture, ki jih pridobijo oligopeptidi z zaporedji GPGGX/GPGQQ in GGX, še niso bile določene. GPGGX in GGX, sta tista gena, ki sprožita zlaganje v sekundarno obliko proteina.

Poleg ponavljajoče se osrednje domene se neponovljivi predeli nahajajo na koncih proteina. Te neponovljive terminalne domene proteinov so ključne za sestavljanje proteinov pajkove svile v vlakna. Te regije obsegajo približno 100-200 aminokisljin in v nasprotju s ponavljajočim se jedrom kažejo dobro opredeljene sekundarne in terciarne strukture v raztopini. Zaradi ohranjenih cisteinskih ostankov lahko te domene vzpostavijo medmolekularne disulfidne vezi in tako stabilizirajo dimere in multimerne v oksidacijskih pogojih.

V nasprotju z genom za svilo Flag oba gena za svilo MA nimata intronov, namesto njih pa sta sestavljena iz nenavadno velikih eksonov (> 9 000 bp kodirnega zaporedja). Veliki eksoni so lahko posledica podvajanja genov med evolucijo. Poleg tega geni s krajšimi introni na splošno kažejo višjo stopnjo izražanja, kot geni z daljšimi introni.

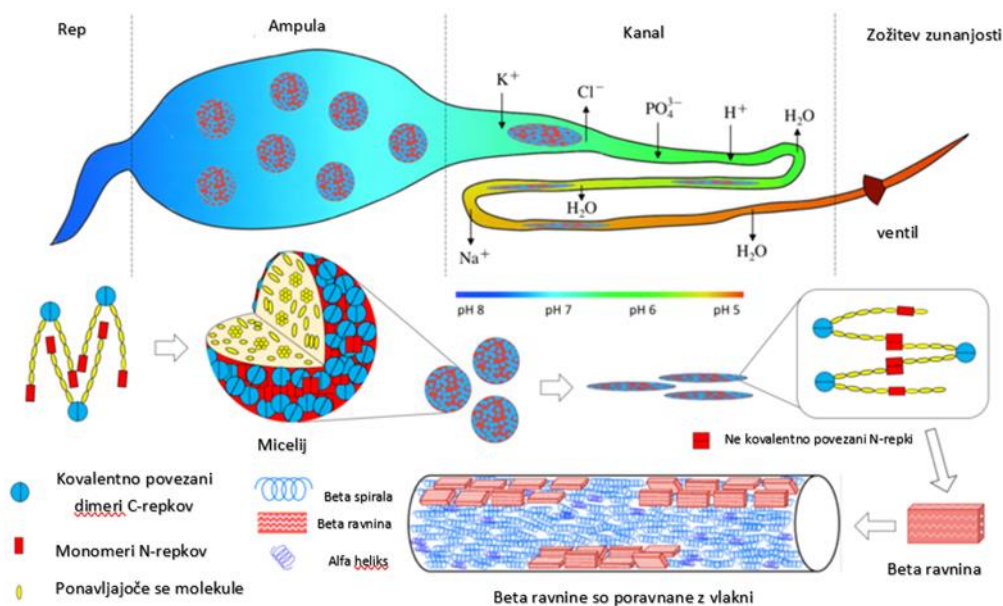
Primarna struktura proteinov pajkove svile kaže poseben vzorec hidrofobnosti z izmeničnimi hidrofili in hidrofobnimi sekvencami v njihovih osrednjih domenah.

SEKUNDARNA, TERCIARNA IN KVARTARNA STRUKTURA

Po izločanju iz svilenih žlez so svileni proteini v vodni raztopini in nimajo pomembne sekundarne ali terciarne strukture. Vendar pa dolga ponavljajoča se zaporedja, zlasti v njihovih ponavljajočih se osrednjih domenah, omogočajo šibke, vendar številne medmolekulske interakcije med proteini pri prehodu skozi predilni kanal. Posledica teh interakcij je nastanek sekundarne, terciarne in kvartarne strukture. Zaradi hitrega postopka, ki poteka skozi predilni kanal, je svila netopna. Rentgenska difrakcijska analiza končne strukture svilenih niti MA je omogočila identifikacijo področij z visoko elektronsko gostoto, ki so vstavljena v področja z nizko elektronsko gostoto. V postuliranem modelu te strukture so območja z visoko elektronsko gostoto sestavljena iz kristaliničnih podstruktur z visoko vsebnostjo listov β . Te podstrukture

naj bi bile odgovorne za mehansko trdnost svilene niti. Elastičnost svile temelji na območjih z nizko elektronsko gostoto, za katera so značilne amorfne strukture z malo opredeljenimi elementi sekundarne strukture. Takšna razporeditev je zelo podobna razporeditvi beljakovinskih hidrogeolov.

Različne vrste svile kažejo različne strukturne porazdelitve (npr. različne sestave kristaliničnih in hidrogelnih delov). MA svila, ki se uporablja za izdelavo ogrodja tkanine, vsebuje veliko kristaliničnih struktur (β -ravnin). V nasprotju s tem je veliko bolj prožna svila Flag sestavljena skoraj izključno iz amorfni hidrogelu podobnih delov. Tako postane očitna povezava med strukturo in funkcijo posameznih beljakovin pajkove svile.



slika 17: prikaz gradnikov mreže (proteini)

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SIA_spider_silk_Fig1.png)

NAČRT ZA ZGODNJE ZLAGANJE IN OLIGOMERIZACIJO

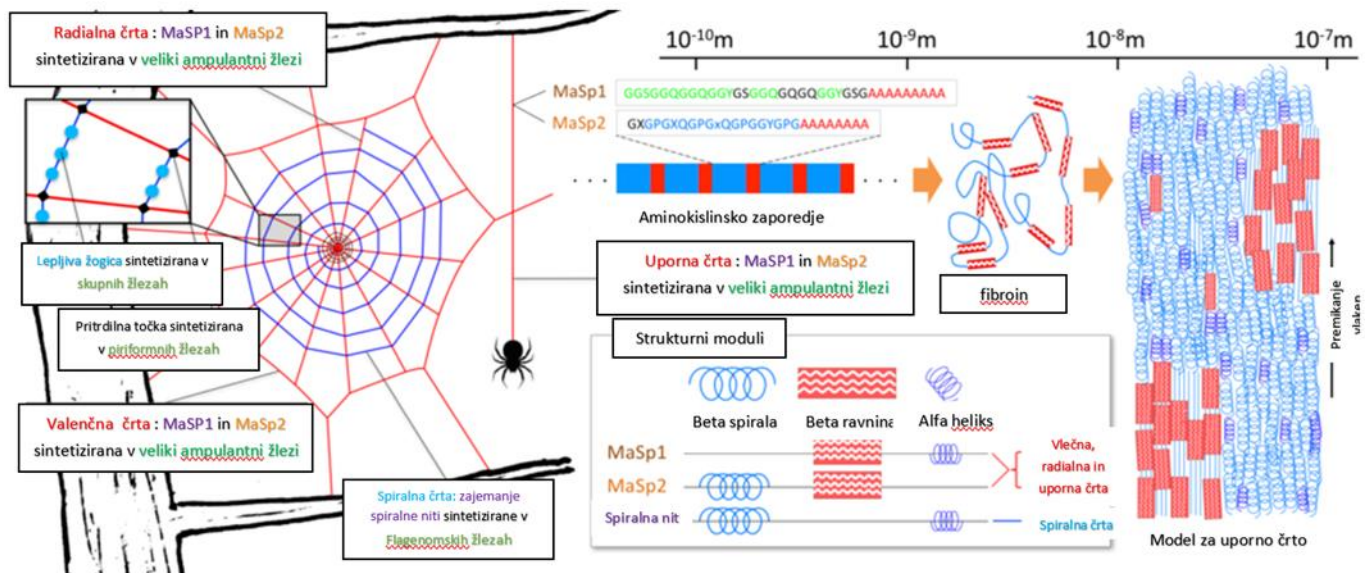
Celotna struktura proteina (sekundarna, terciarna in kvartarna struktura) in s tem njegova sposobnost samozdruževanja ali vključevanja v makromolekularne sklope se neločljivo kaže v njegovi primarni strukturi in jo je treba obravnavati kot prvo hierarhično raven fibrilarne strukture proteina, kot je pajkova svila. Prvo komplementarno zaporedje DNK pajkove svile in sicer glavnega ampuliranega spidroinskega proteina 1 (MaSp1) je bilo objavljeno leta 1990. Drugo glavno beljakovino svile iz ampulijev, ki je bila odkrita, so poimenovali MaSp2.

MaSp1 in MaSp2, ki sta glavni sestavini svile pajkov *N. clavipes*, imata precej podobno primarno strukturo: osnovni beljakovini sestavlja močno ponavljajoča se jedrna domena s ponavljajočimi se domenami, bogatimi z alaninom (A) in glicinom (G). prav tako pa so nam znani še nukleotidi N=asparagin, C=cistein, P = prolin in X pomeni Y = tirozin in L=levcin (ali Q=glutamin). MaSp2 ima še pentapeptidne odseke, ki vsebujejo prolin (P). Jedrno zaporedje MAS obkrožajo evolucijsko zelo ohranjene in precej majhne (v primerjavi z jedrom) končne regije, ki se ne ponavljajo. Primarna struktura določa, kako se beljakovine zložijo v

tridimenzionalno strukturo, in s tem pojasnjuje sposobnost MAS, da se sam sestavi v mehansko stabilno beljakovinsko nit.

V nasprotju s ponavljajočim se jedrom je neponovljiva primarna struktura karboksi-terminalne domene MAS ugodnejša za zlaganje v določeno sekundarno strukturo neposredno po izločanju.

Rekombinantno proizvedena beljakovina pretežno zavzame α -helikalno konformacijo, sestavljena iz 5 α -helices. Najdaljša od teh vijačnic tako prek hidrofobnih interakcij sodeluje s



slika 18: podroben prikaz proteinov, ki gradijo mreže

(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0.Figure.png>)

svojim ustreznikom v drugem monomeru. Poleg tega je dimer stabiliziran z dodatnim mehanizmom, podobnim sponki, med dvema različnima vijačnicama, od katerih vsaka prihaja iz enega od dveh vključenih monomerov.

MOLEKULARNI POGLED: KONFORMACIJSKI PREHODI MAS MED SESTAVLJANJEM

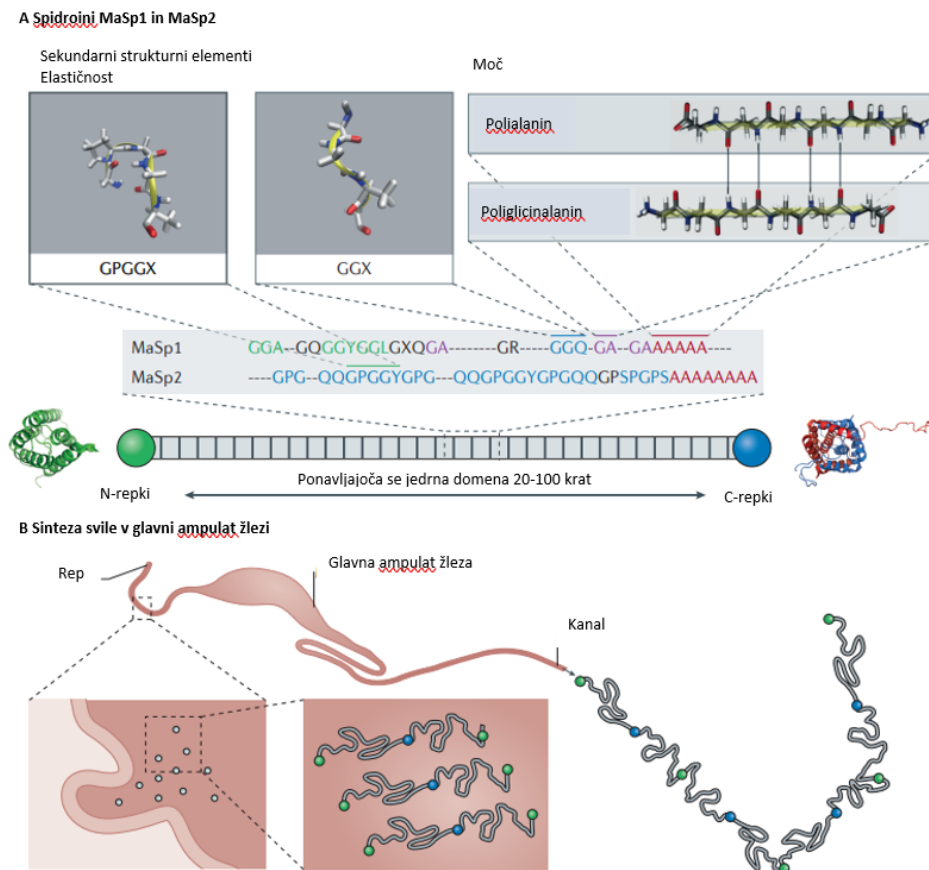
Zaradi amfifilnega značaja MaSp1 in 2 naj bi prvotno nastali oligomeri MAS zavzeli micelsko strukturo in v skladu s tem so v žlezi MA že zelo zgodaj zaznavne majhne kapljice. Hkrati beljakovine opravijo prve konformacijske prehode. Med tem procesom nastane guba, v kateri 6-10 domen, bogatih z A, povezanih z laski, začne tvoriti sekundarno strukturo, ki vsebuje nitke β .

Splošno sprejeta teorija je, da se odseki 6-8 alaninovih ostankov poravnajo in tvorijo tako imenovane kristalite β (tesno zapakirane liste β), ki so vgrajeni v amorfno matrico, sestavljeno predvsem iz motivov MaSp1, bogatih z G, in motivov MaSp2, ki vsebujejo P. Amorfna matrica naj bi ohranjala raztegljivost vlečne svile, saj naj bi tako motivi, bogati z G, kot tudi motivi, bogati s P, sprejeli 3_1 -helično konformacijo, je raztegljivost skupaj s trdnostjo, ki jo dajejo kristaliti β , odgovorna za izjemno žilavost svile. Vendar je odkritje, da sta MaSp1 in MaSp2 nehomogeno razporejena v niti, pokazalo, da ta teorija odraža poenostavitev.

Novejše ugotovitve kažejo, da amorfna matrika ni popolnoma neurejena in vsaj v zmerni meri kaže tridimenzionalni hierarhični red. Izjemne mehanske lastnosti svilenega traku so torej posledica bolj zapletene porazdelitve različnih zaplat, v katerih MAS kažejo različne stopnje organiziranosti, da hierarhična raven različno urejenih podstruktur (od popolnoma kristaliničnih do popolnoma neurejenih) določa razmerje med strukturo in funkcijo pajkove svile.

Skupna dolžina transkripcije je ocenjena na 12 kb (Hayashi et al., 1999). Ponavljajoče se zaporedje MaSp1 je sestavljeno iz odsekov poli-A ali poli-GA, ki so vstavljeni med segmente, bogate z GGX (Xu in Lewis, 1990). Skupna dolžina zapisa MaSp2 je ocenjena na približno 11,5 kb

Nukleotida G in C sta v kodirnem zaporedju DNK v izobilju, zaradi česar je v beljakovini velika količina alanina in glicina. Tako MaSp1 kot MaSp2 kažeta podobno uporabo kodonov, pri čemer dajeta prednost A ali T kot tretjemu nukleotidu. To verjetno zmanjšuje visoko stopnjo sekundarne strukture zapisa.



slika 19: C in N strukture z prikazovanjem sinteze proteinov v pajkovi mreži

(<https://www.nature.com/articles/natrevmats20188>)

STRUKTURE KONIC C IN N

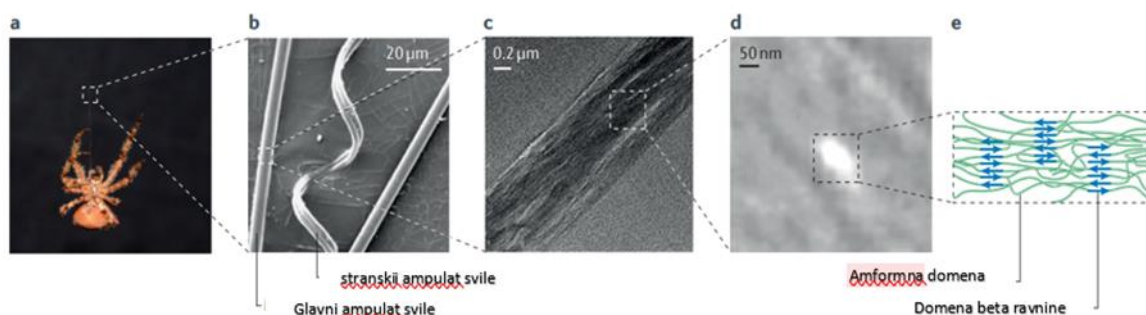
Obdajajoči neponovljivi termini spidroinov, ki se vlečejo, nadzorujejo shranjevanje svilene v žlezi, združevanje svilenih proteinov med tvorbo vlaken in poravnavo strukturnih motivov jedrnih ponovitev. Ti konci so dolgi od 80 do 140 aminokislin in so si med pajki zelo podobni.

Konec N je običajno dolg 120-140 aminokislin medtem ko je C-konec običajno manjši (80-110 aminokislin). Poleg tega termini N imajo običajno več zaporednih homolognih kromosomov, kar je lahko znak bolj ohranjene DNK. Konca N in C imata dobro definirano pet-helično obliko. V stanju raztopine je C-terminal je vzporedno orientiran. Ta dimerska struktura ugodno poravnava dva para nasprotno nabitih ostankov, ki tvorijo intramolekularne sulfidne mostove. Poleg tega je disulfidna DNK vez med C-končnimi monomeri tista, ki še dodatno stabilizira dimer.

C-terminalna domena je močno vplivajo hidrofozne interakcije. To je posledica visoke hidrofobnosti. Dimer skriva te hidrofobne ostanke v jedru. Poravnava spidroinov med tvorbo vlaken nadzorujejo pH, soli koncentracija in delni razklop, ki ga povzroči strižna sila disulfidno vezane dimerne C-terminalne domene.

V pogojih, ki so bili ugotovljeni (visok pH in visoka vsebnost soli), je končna N-domena monomerna. Vendar ta pri nizkem pH tvori antiparalelni dimer v kanalu. Poleg tega so bile za posamezno mesto specifične mutacije nabitih ostankov uporabljene za vzpostavitev tristopenjski mehanizem za dimerizacijo, ki jo poganja pH končnega dela N. To je dokaz, da terminus N preprečuje prezgodnjo agregacijo in omogoča hitro tvorbo vlaken. Vendar ta mehanizem ni splošen pri vseh vrstah.

Simulacije končne domene N v monomernih vlaknih in dimerni obliki kažejo, da dva glutaminska ostanka imata pomembno vlogo v procesu dimerizacije. V območju pH 4-6 sta ostanka glutaminske kisline so protonirani in so zakopani na dimernem vmesniku; pri višjih vrednostih pH ostanka deprotonirata, kar povzroči solvatacijo in strukturne spremembe N-končne domene, ki dajejo prednost monomerni obliki. Pri drugih simulacijah je bilo ugotovljeno, da je visoka koncentracija soli, ki je bistvena za shranjevanje svile, oslabi solne mostove med monomeri, kar neugodno vpliva na dimere.



slika 20: svila pajkov pod različnimi mikroskopskimi povečavami

(<https://www.nature.com/articles/natrevmats20188>)

FUNKCIONALNI PREMAZI NA SVILI VLEČNE VRVI

Zgoraj omenjene strukture MAS se nahajajo v jedru svilene niti. To jedro je prevlečeno z beljakovinsko plastjo (kožo) s svilnato beljakovino, ki se običajno uporablja za ustvarjanje pomožne spirale med izdelavo mreže. Beljakovinsko jedro prekriva plast glikoproteinov, ki naj bi nadzorovala vlažnost svile, s čimer natančno uravnava njene mehanske lastnosti. Poleg tega se zdi, da ima ta plast protimikrobno funkcijo in ščiti svileno nit pred razgradnjo s strani mikroorganizmov. Zunanja, lipidom podobna plast prav tako služi kot protimikrobna zaščita in se uporablja kot sredstvo za spolno komunikacijo, predvsem z vključevanjem feromonov.

Pomembno je omeniti, da lahko pajek aktivno spreminja hierarhično strukturo svilene niti in da torej ni statična. Najpomembnejša je hitrost predenja, ki spreminja mehanske lastnosti svile, saj vpliva na čas, v katerem se morajo molekule MAS poravnati, in tako vpliva na hierarhično strukturo svile. Na hierarhično organizacijo na nano- in mikroravni neposredno vplivajo tudi različni okoljski parametri, kot so temperatura, vlažnost in prehrana pajka.

Prostorska razporeditev svil in njihova medsebojna povezanost poleg posameznih mehanskih lastnosti različnih vključenih svilenih niti določata mehansko obnašanje celotne mreže med lovljenjem plena. Mreže so vedno zgrajene v enakem časovnem kronološkem sosledju: izdelavi ogrodja in prvih radijev iz vlaken MAS nato sledi dokončanje ogrodja in radijev. Nato se sprede pomožna spirala, ki služi kot predloga za izdelavo lovilne spirale iz bičaste svile.

Občutljivo razmerje med arhitekturo in mehansko zmogljivostjo. Vsem pajčevinastim mrežam, ki absorbirajo veliko energije, je skupna značilnost: obešene so pod veliko preDnKpetostjo, imajo povečano število radijev in spiralnih zavojev, razmerje med radiji in spiralnimi zavoji pa je večje od ena. Zaradi relativno velikega števila polmerov je mreža bolj toga na račun sposobnosti premikanja mreže. V nasprotju s tem pa imajo mreže srednje velikih in majhnih tkalcev krogel, ki absorbirajo malo energije, razmerje med polmeri in spiralnimi zavoji manjše od ena.



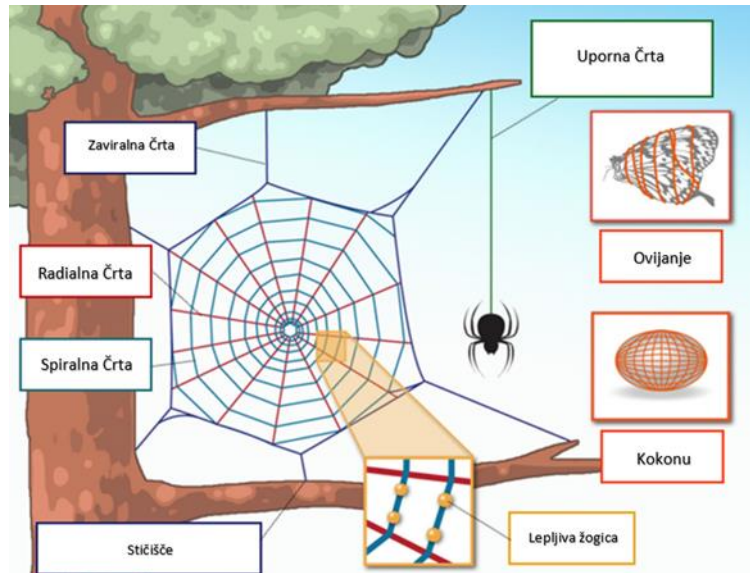
slika 21: zgradba mreže po slojih ter struktura vlaken

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00554/full>

Nižje kinetične energije plena, ki ga prestrežejo srednje veliki ali majhni tkalci krogel, se v veliki meri razpršijo s premikanjem mreže in vlaken ter podaljševanjem svilenih vlaken.

STRUKTURA MREŽE

Mreža je sestavljena iz petkotnika. Sestava tega se začne z sinezo radialnih črt. Nadaljuje se z sinezo valenčne črte, kateri sledijo spiralne črte. Celemu postopku sledi lepljenje (v obliki žogic) ter dodatno pritjevanje na substrat. Pajek prav tako sintetizira uporno črto, katero po končani sintezi svoje mreže poje.



slika 22: mrežne niti

<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/11/2634>

ANTIMIKROBNOST PAJKOVIH MREŽ

ANTIMIKROBNO DELOVANJE PAJKOVE MREŽE V NARAVI

Trenutno je znanih več kot 40 000 različnih vrst pajkov. Pajki uporabljajo svilo za gradnjo mrež in jajčnih vrečk v različnih okoljih, na primer pod zemljo, v gozdovih in pod vodo, kjer pridejo v stik z organizmi, ki si želijo zaužiti visoko-energijski material, ki ga nudi pajkova svila. Nekateri pajki, kot sta vrsti *Cyclosa* in *Nephila* (*Araneidae*), v gradnjo mreže vključijo ostanke listov ali ujetega plena, ki služijo kot kamuflaža ali skladišče energije za kasnejšo uporabo. Pajkova jajčeca sestavljajo energijsko bogate molekule in voda, zaradi česar predstavljajo idealen substrat za patogene in nepatogene mikroorganizme, zato jih pajki odložijo v svileni ovoj, da jih s tem zaščitijo pred kemijskimi in mehanskimi vplivi iz okolja. Ker je svila večinoma sestavljena iz beljakovin in majhnih količin ogljikovih hidratov v obliki glikoliziranih beljakovin v tankih zunanjih lupinah, domnevajo, da jo lahko bakterije in glive uporabljajo kot vir hranil. Domnevajo, da pajki na svilo odlagajo protimikrobne molekule, ki delujejo kot zaščita jajčec in ulovljenega plena pred patogenimi organizmi.

Pajkovo svilo sestavljajo beljakovinska vlakna, ki se povezujejo v mreže različnih oblik in lastnosti mrež kot so: velika mehanska trdnost in odpornost na mehansko razgradnjo. Čeprav je mreža izpostavljena vsem vrstam saprofitnih mikroorganizmov, se ravno zaradi visoke odpornosti na mehanske vplive iz okolja težje razgradi v naravi.

MIKROBIOLOŠKI VIDIK ANTIMIKROBNEGA DELOVANJA PAJKOVE MREŽE

Znanih je več kot 600 različnih peptidov s protimikrobnimi učinkovinami, ki učinkovito delujejo proti različnim mikroorganizmom, vključno z bakterijami, ki so negativne in pozitivne po Gramu, virusi in glivami. Baktericidno delovanje teh molekul se začne z neposredno vezavo peptida na lipidni dvosloj, ki tvori membrano bakterij. Po tem, baktericidni peptidi pridobijo amfifilno tridimenzionalno konformacijo, pri kateri se pozitivno nabite protimikrobne molekule peptidov vežejo z negativno nabitimi glavami fosfolipidnega dvosloja, membrane bakterij. To povzroči nastanek por na bakterijski membrani, skozi katere začnejo izhajati iz bakterij pomembni ioni in hranilne molekule, kar kasneje vodi v propad celice. Cisteinski ostanki sestavljajo kationske defenzine[1]. Pomembna značilnost defenzinov je šest cisteinskih ostankov, ki tvorijo tri disulfidne vezi.

UPORABA DEFENZINOV

Pri človeku imajo poleg tega defenzini pomembno vlogo pri vnetjih in kemotaksiji monocitov in celic T pri aktivaciji sistema iz pridobljenega imunskega odziva. Ti peptidi so pri človeku prisotni tudi pri celjenju ran, saj spodbujajo proliferacijo[2] fibroblastov in epitelijskih celic, inducirajo neovaskulogenezo in mobilizirajo citokine. Človeški α -defenzini so bogati s cisteinom, ki vsebujejo med 29 do 35 aminokislin. Znanih je šest α -defenzinov, človeški nevtrofilni defenzini 1 do 4 (HNP-1, HNP-2, HNP-3 in HNP-4) in človeški defenzini 5 do 6 (HD-5 in HD-6), ki jih izražajo Panethove celice človeških nevtrofilov tankega črevesja in epitelijskih celic ženskih urogenitalnih organov. HNP-2 ima baktericidno delovanje proti Gram+ in Gram- bakterijah. Podoben defenzin zgoraj opisanim defenzinom človeških

nevtrofilcev, je hepcidin, (imenovan tudi LEAP-1 za jetrno izražen protimikrobni peptid) prav tako peptid, bogat s cisteinom. Hepcidinska mRNA je bila najdena predvsem v jetrih in je bila sprva izolirana iz človeške krvi, pozneje pa so jo odkrili tudi v urinu. Hepcidin ima bakteriocidne lastnosti in fungicidno aktivnost z delovanjem proti Gram+ in Gram- bakterijam. Na podlagi protimikrobnih aktivnosti HNP-2, HNP-4 in hepcidina so bili v eni izmed študij ti peptidi izbrani za zlitje s svilenim proteinom pajka, major ampulatnim spidroinskim proteinom (MaSpI). V študiji so s tem dokazali, da bi lahko skupaj s človeškimi defenzini in proteini iz pajkove svile, z genskim inženiringom tvorili protimikrobne učinkovine uporabne v medicini. Svila je bila izbrana kot glavna beljakovinska komponenta, saj se je izkazalo, da zaradi relativno nizke citotoksičnosti, odpornosti na prilagajanje mikroorganizmom in širokega spektra delovanja, nekateri protimikrobni peptidi v njej veljajo za močne kandidate za uporabo v prevlekah polimernih površin za preprečevanje mikrobne kontaminacije.

ALI VSE PAJKOVE MREŽE DELUJEJO ANTIMIKROBNO?

V eni izmed študij, so v testih uporabili svilo različnih vrst pajkov in seve različnih vrst bakterij, na gojiščih pa niso zaznali inhibicijske cone, kar naj bi pri nekaterih vrstah pajkov kazalo na odsotnost antibakterijskih lastnosti pajkovih mrež. Vse bakterije so gojili neposredno na gojiščih Luria-Bertani (polna hranila), fiziološki raztopini s fosfatnim pufrom (brez hranila) in glukozni juhi brez dušika (polna hranila in brez dušika). V gojišču LB so bakterije rastle, v preostalih dveh, gojišču brez hranil in v drugem brez dušika, pa ne enako dobro. Dušik je element, ki je nujno potreben za rast bakterij in bistven za biosintezo beljakovin in nukleinskih kislin, zato v primerih, ko bakterijam ta ni na voljo, omejuje njihovo sposobnost razgrajevanja svile v naravi. Preverjali so sposobnost razgrajevanja dušika štirih bakterijskih sevov, za uporabo pajkove svile kot vira dušika za rast bakterij. Izbrali so Gram+ (*Bacillus subtilis*) in Gram- (*Escherichia coli*) seve in izolirana seva (seva A in G) neposredno iz pajkove mreže.

Ugotovili so, da je rezistenca pajkovih mrež na bakterije povezana z dejstvom, da mreže na bakterije delujejo bolj bakteriostatično [3] in ne toliko bakteriocidno [4] (vseeno nekatere bakterije preživijo na mreži). Laboratorijske študije so pokazale, da je pajkova svila odporna na degradacijo in zavira rast mikrobov. V ta namen so bili izolirani in identificirani protimikrobni peptidi iz pajkove mreže. Mreža hišnega pajka *Tegenaria domestica* (Agelenidae) naj bi zavirala rast po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*. Najdeni so bili na primer agatoksini v strupu lijakastega pajka *Agelopsis aperta* (Agelenidae) in gomezin, majhen protimikrobni peptid, ki je bil ekstrahiran in prečiščen iz hemocitov [5] tarantele *Acanthoscurria gomesiana*. Pajki shranijo odvečno hrano (ulovljen plen), tako, da jo zavijejo v mrežo. Tako hrana ostane nedotaknjena več mesecev in let, brez da bi jo razkrojili saprofitski organizmi, kot so na primer plesni in bakterije. Pajkove mreže naj bi imele takšno delovanje ravno zaradi posebnih aminokislin, kot so naprimer: glicin, alanin in velike količine pirolidina. Te aminokisliline naj bi delovale higroskopično, kar pomeni, da vsa vlaga ostane zadržana znotraj mrež kar preprečuje njihovo izsuševanje. Naravno prisoten kalij na pajkovi mreži preprečuje rast plesni in bakterij.

Raziskovalci so v svili odkrili tudi svilene beljakovine, ki lahko več mesecev stabilizirajo toplotno občutljive biološke molekule pri sobnih temperaturah ali celo bolj vročih okoljih. To

odkritje bi lahko v prihodnosti pomagalo pri proizvodnji zdravil, ki so občutljiva na višje temperature.

Znanstveniki so med drugim vrednotili protiglivični potencial svile, pridobljene iz pajkov *Araneidae*, tj. *Neoscona theisi*, ki tkejo svilo v obliki kroglic. Mreže pajkov so bile neposredno pobrane z riževih polj s pomočjo sterilnih pripomočkov. Svilo so shranili v sterilno posodo, da bi preprečili kontaminacijo. Pripravili so dva kosa kruha (3 x 2 cm). En kos je bil ovit s pajkovo svilo, drugi je bil vzet kot kontrolni. Oba kosa kruha so postavili na prosto in ju en teden vsak dan temeljito pregledovali. Kruh, ki ni bil ovit v pajkovo mrežo je po tretjem dnevu splesnel, medtem ko je tisti ovit v pajkovo mrežo, ostal nekontaminiran cel teden. To lahko primerjamo z zgoraj opisanim primerom, ko pajki svoj plen, ki je zavrt v mrežo ohranijo nedotaknjen pred bakterijami in plesnijo. Pajkova svila je zbirka različnih protimikrobnih spojin, vključno z aminokislinami in različnimi protimikrobnimi peptidi (Wright, 2011). Kalijev hidrogenfosfat, ki je prisoten v svili je protimikrobni peptid, ki sprošča protone v vodni raztopini, zaradi česar je pH približno 4, kar pomeni, da je svila kislina (Heimer, 1988). Nizek pH zavira rast gliv in bakterij, ki bi sicer razgradile beljakovine v svili. Druga spojina kalijev nitrat preprečuje denaturacijo beljakovin v kislem okolju (Heimer, 1988).

Protimikrobne spojine, prisotne v pajkovi svili, inducirajo nastanek območja zaviranja rasti tako pri gram pozitivnih, kot pri gram negativnih bakterijah, npr. *Listeria monocytogenes* in *Escherichia coli* (Rozebahani et al., 2014).

Ugotovljeno je bilo, da je zaviralni učinek pajkove svile večji na gram pozitivnih bakterijah kot na gram negativnih bakterijah (Mirghani et al., 2012). Z uporabo teh lastnosti pajkove svile bi lahko na trg uvedli nov konzervans, ki bi deloval učinkoviteje in bil cenejši. Rok uporabnosti bi bil daljši in stranski učinki v primerjavi s kemičnimi konzervansi manjši. Gene pajkov, ki proizvajajo svilo, je mogoče manipulirati za boljšo kakovost in večji donos svile v industrijskem obsegu.

ZGODOVINA UPORABE PAJKOVH MREŽ

Svila bi lahko bila uporabljena kot potencialni biomaterial v medicini; uporaba za kirurške šive in tkivno ogrodje, saj ima številne zaželjene biomedicinske lastnosti, kot so počasna biorazgradljivost, biokompatibilnost, celjenje ran in regeneracija živcev. Obstaja veliko starodavnih legend o uporabi pajkove svile v medicini. Od uporabe pajkove svile za prekrivanje ran pri kmetih iz Karpatov do uporabe svile na področju kožne onkologije (zdravljenje kožnega raka) v 18. stoletju. V razpravi iz 17. stoletja o naravni zgodovini pajkov je bila svila predstavljena kot terapevtska spojina, na kar nakazujejo številne uporabe v dermatologiji, kjer naj bi sestavine pajkovih mrež delovale antihemoragično (zdravljenje krvnih bolezni), antipiretično (zniževanje vročine) in pospeševale regeneracijo celic.

UPORABA ANTIMIKROBNIH LASTNOSTI PAJKOVH MREŽ V SODOBNI MEDICINI

Mikrobne okužbe po operaciji ali drugem medicinskem postopku so v današnjem svetu še vedno resen zdravstveni problem. Danes so raziskave usmerjene v razvoj novih materialov z antibakterijskimi lastnostmi za preprečevanje ali zmanjšanje tveganja okužb. Pajkova svila je

znana po svojih edinstvenih biomehanskih lastnostih in biokompatibilnosti z drugimi organskimi materiali. Tehnologija rekombinantne DNK omogoča bioinženiring pajkove svile s protimikrobnimi peptidi (AMP). Tako je bil cilj ene izmed študij, bioinženiring proteinov pajkove svile z AMP (6mer-HNP1) kot antibakterijsko prevleko pri komercialnih svilenih šivih (Perma-Hand) za zmanjšanje bakterijskih okužb. Šivi Perma-Hand so bili prevlečeni s 6mer-HNP1. Z in vitro testi na človeških fetalnih pljučnih fibroblastih (MRC5) je bilo ugotovljeno, da so prevlečeni šivi ohranili sposobnost preživetja zdravih celic, prav tako je stik z rdečimi krvničkami (RBC) pokazal združljivost s krvjo. Prav tako so ti premazi znatno zavirali adherenco bakterij in tvorbo biofilma. Vendar je ena od glavnih pomanjkljivosti povezana redkimi protimikrobnimi lastnostmi svilenih šivov, zato jih je treba dodatno obdelati s sredstvi, da bi bilo lahko delovanje res antimikrobno. Pleteni in multifilamentni svileni šivi so namreč lahko bolj dovzetni za pritrjevanje bakterij in posledično za nastanek biofilmov. Poleg tega protimikrobni premaz ne bi smel negativno spreminjati lastnosti šivov, kot so trdnost vozla, površinsko trenje ali lastnosti biokompatibilnosti. Svileni šivi so tako dodatno prevlečeni z različnimi antibiotiki, kot je tetraciklin, gentamicin, levofloksacin, za preprečevanje rasti bakterij in nastanka biofilmov. Tudi druga antibakterijska sredstva, kot so hitozan ali srebrovi ioni, so pokazala, da so podoben učinek pri preprečevanju bakterijske kolonizacije medicinskih material. Rezultati so pokazali, da lahko z uporabo prevlek iz pajkove svile brez poleg antibiotikov izboljšamo antibakterijske lastnosti komercialnih šivov. Poleg tega je bil s tem pridobljen nov razred šivov brez zdravil za zmanjšanje poimplantacijskih okužb.

[1] Defenzin-majhna kationska beljakovina, ki je prisotna pri vretenčarjih in nevretenčarjih. Beljakovine, ki delujejo proti bakterijam in drugim mikroorganizmom. Tako povečane kot zmanjšane količine defenzivov nakazujejo začetne faze razvoja določenih bolezni.

[2] Proliferacija - proces v katerem se celica množi in deli .

[3] Bakteriostatično delovanje - zavira rast bakterij

[4] Bakteriocidno delovanje - na bakterije deluje uničevalno.

[5] Hemocite - krvne celice nevretenčarjev

METODOLOGIJA

OPIS VZORCA

Pajkove mreže smo nabirale večino ob stenah objektov šole (BIC Ljubljana) ali v bližnji okolici. Pri nabiranju samih pajkovih mrež smo se trudile, da zajamemo največje pajkove mreže. V vsako izmed mikrocentrifirk smo tako dale približno enako količino mrež. Ker smo v okolici šole našle tudi pajkova gnezda, smo v vsako izmed 6 epic nanesele eno.

METODE IN MATERIALI

METODE

Tabela 1: uporabljene metode pri projektne delu

METODA	KAJ HOČEMO Z NJO DOSEČI
Avtoklaviranje gojišč za v mikrocentrifugirke	Zagotavljanje sterilnosti
Avtoklaviranje gojišč za v petrijevke	Zagotavljanje sterilnosti
Redčitvena vrsta	Število celic in mikroskopski pregled
Mikroskopiranje	Mikroskopski pregled
Inkubacija gojišč s pajkovo mrežo na njih	Namnožitev mikroorganizmov s pajkovih mrež
Barvanje po Gramu	Selekcija gram pozitivnih in gram negativnih bakterij
Centrifugiranje	Mehanski separacijski proces
Inkubacija	Namnožitev mikroorganizmov
Pipetiranje z avtomatsko pipeto	Natančnost količine vzorca
Nacepljanje kolonij	Pomoč k namnožitvi vzorca

AVTOKLAVIRANJE GOJIŠČ ZA V EPICE:

1. Pripravimo fiziološko raztopino (0,85 % voDNK raztopina z NaCl),
2. Postavimo jo v avtoklav skupaj s 6 mikrocentrifugirkami,
3. Avtoklav vklopimo in ga pustimo delati na 121°C približno 1h-1,5h,
4. Fiziološko raztopino in mikrocentrifugirke vzamemo iz avtoklava.

AVTOKLAVIRANJE TEKOČIH GOJIŠČ IN GOJIŠČ ZA V PETRIJEVKE:

1. V 6 erlenmajeric nalijemo naše tri vrste gojišč (LB, M9 in FR),
2. Erlenmajerice postavimo v avtoklav (121°C; 1h-1,5h) in ga vklopimo,
3. Erlenmajerice vzamemo iz avtoklava,
4. V eno od erlenmajeric vsakega gojišča dodamo agar.

INKUBACIJA:

Inkubacija je obdobje (od 5 do 7 dni), v katerem se mikroorganizmi razmnožujejo in rastejo, dokler se ne razvije mikrobna kultura (kolonija). Vse skupaj poteka v inkubatorju, ki zagotavlja varen in nadzorovan (možno prilagajati temperaturo, količino kisika, svetlobe, ...) prostor za razvijanje in razmnoževanje mikroorganizmov.

1. Erlenmajerice s tekočim gojiščem in vzorcem in petrijevke s trdnim gojiščem in vzorcem postavimo v inkubator,
2. Inkubator nastavimo na 30°C,
3. Erlenmajerice in petrijevke pustimo v inkubatorju 7 dni.

REDČITVENA VRSTA:

Redčitvena vrsta je mikrobiološka metoda, ki se uporablja za zmanjšanje koncentracije snov v raztopini do bolj uporabne koncentracije. Postopki redčitvenih vrst se večinoma razlikujejo v razmerjih vzorca in redčitvene tekočine. Me smo raziskovalno delo izvajale v razmerju 1:10

1. V stojalo postavimo 5 epruvet in v vsako nalijemo 9 mL fiziološke raztopine,
2. V prvo epruveto, s pomočjo avtomatske pipete, odpipetiramo 1 mL vzorca,
3. Poskrbimo, da je snov v prvi epruveti homogenizirana,
4. 1 mL vzorca iz prve epruvete odpipetiramo v drugo epruveto,
5. Drugo epruveto homogeniziramo,
6. Postopek ponavljamo vse dokler imamo na voljo epruvete (do 5. epruvete).

MIKROSKOPIRANJE:

Mikroskopiranje je biološka in mikrobiološka metoda, katere namen je definiranje, opazovanje in preučevanje vzorcev ali celic. Pri tej metodi se uporablja optično orodje imenovano mikroskop.

1. Vzorec opazujemo na 400-kratni povečavi,
2. Sliko izostrimo s pomočjo vijakov in dodamo imerzijsko olje,

3. Vzorec opazujemo na 1000-kratni povečavi

BARVANJE PO GRAMU:

Barvane po Gramu je empirična metoda za diferenciacijo bakterij v 2 skupini: gram pozitivne in gram negativne bakterije. Pri tej metodi s pomočjo barvil gram pozitivne bakterije obarvajo vijolično, gram negativne pa rdeče.

1. Na objektno steklo nanese vzorec in ga fiksiramo ob ognju,
2. Na vzorec kapnemo 3 kapljice metil-vijoličnega barvila in ga pustimo 5 min,
3. Vzorec speremo z destilirano vodo,
4. Na vzorec kapnemo 2 kapljici lugola in ga pustimo 1 min,
5. Vzorec speremo z destilirano vodo,
6. Na vzorec kapnemo 3 kapljice safranina in ga pustimo 5 min,
7. Vzorec speremo z destilirano vodo in ga pustimo, da se posuši.

CENTRIFUGIRANJE:

Centrifugiranje je mehanski separacijski proces, pri katerem se delci ločujejo glede na gostoto. Po končanem postopku je opaziti najmanj dva sloja, kjer spodnji sloj imenujemo pelet, zgornji pa supernatant. Pri centrifugiranju uporabljamo centrifugo, za čigar delovanje je pomembna in potrebna uravnoteženost.

1. Vzorce iste mase umestimo v centrifugo,
2. Centrifugiramo na 4°C, 4000 obratih za čas 20-ih minut.

PIPETIRANJE Z AVTOMATSKO PIPETO:

1. Na ustrezni avtomatski pipeti nastavimo želeni volumen,
2. Na pipeto namestimo plastični nastavek,
3. Glavni gumb pritisnemo do prve blokade,
4. Nastavek pomočimo v vzorec in gumb spustimo,
5. Vzorec prenesemo na želeno površino,
6. Plastični nastavek izpraznimo s pritiskom gumba do druge stopnje.

NACEPLJANJE:

Nacepljanje je tehnika, pri kateri kolonijo ali vzorec nanese na gojišče z namenom, da bi se ta množila. Poznamo dve tehniki nacepljanja:

- NACEPLJANJE S CEPILNO ZANKO (EZO):

Nacepljanje z ezo uporabljamo takrat, kadar želimo eno kolonijo precepiti na novo gojišče.

1. Ezo razžarimo in počakamo, da se ohladi,
2. Petrijevko odpremo proti gorilniku,
3. Z ezo dotaknemo roba gojišča,
4. Vzamemo želeno kolonijo in jo prenesemo na novo gojišče.

- NACEPLJANJE S SPATULO (HOKEJKO):

Nacepljanje z hokejko uporabimo takrat, kadar na-novo nacepljamo kolonije. V pomoč nam je avtomatska pipeta, iz katere na gojišče naneseemo vzorec.

1. Hokejko (pomočena v etanol) potegnemo skozi ogenj,
2. Počakamo, da etanol zgori in da se hokejka ohladi,
3. Petrijevko odpremo proti ognju in s hokejko narahlo razmažemo vzorec po gojišču,
4. Petrijevko pokrijemo, hokejko pa postavimo nazaj v etanol.

MATERIALI :

Materiali za odvzem vzorcev pajkovih mrež

Za odvzem vzorcev pajkovih mrež smo potrebovali:

- pajkove mreže (enodnevnne mreže),
- pincete s katerimi smo vzele vzorec,
- 96 % etanol za razkuževanje pincete,
- fiziološka raztopina (0,9 % raztopina NaCl),
- čaša v kateri je 96 % etanol,
- vžigalnik,
- sterilne mikrocentrifugirke (epice) v katerih je fiziološka raztopina.

Materiali za pripravo gojišč LB, FR in M9

- sterilne petrijevke,
- plinski gorilnik,
- avtoklav,
- analitska tehtnica,
- digitalna tehtnica,
- laboratorijska žlička,
- papirnate posodice za tehtanje****(nevemo kako se reče temu),
- erlenmajerice (2 L, 1 L, 100 mL-za tekoča gojišča),
- merilni valj (100 ml),
- magnetno mešalo in magnetne uteži,
- sterilna fiziološka raztopina.

Za LB trdo gojišče:

- 16 g gojišča LB v prahu (ima že dodan agar),
- 400 mL sterilne destilirane vode.

Za LB tekoče gojišče:

- 10,04 g dehidriranega gojišča LB v prahu,
- 400 mL sterilne destilirane vode.

Za M9 gojišče:

- 6 g Na₂HPO₄,
- 3 g KH₂PO₄,
- 0,5 g NaCl,
- 1 g NH₄Cl,
- 0,02 g CaCl₂ · 6 H₂O,
- 0,12 g MgSO₄ · 7 H₂O,
- 5 mL 20 % raztopine glukoze.

Za FR gojišče

- 8,5 g NaCl,
- 91,5 g sterilne destilirane vode,
- 16 g agarja.

Materiali za nacepljanje na trda in tekoča gojišča LB, M9 in FR gojišče

- sterilne petrijevke,
- epice z vzorcem pajkovih mrež,
- cepilna zanka (eza),
- avtomatska pipeta (100 µL , 1000 µL),
- gorilnik,
- spatula (hokejka),
- 96 % etanol za aseptično delo,
- čaša za etanol s spatulo,
- čiste erlenmajerice s tekočimi gojišči FR, M9 in LB,
- inkubator.

Materiali za izolacijo DNK mikrobov

- gojišča prerastla z različnimi mikroorganizmi,
- fiziološka raztopina (0,9 % raztopina NaCl),
- cepilna zanka,
- avtomatski pipeti (100 µL, 1000 µL),
- NH₄OAc,
- Glukoza,
- fiziološka raztopina,
- etanol,
- fenol ,
- izoamilalkohol.

OPIS RAZISKAVE

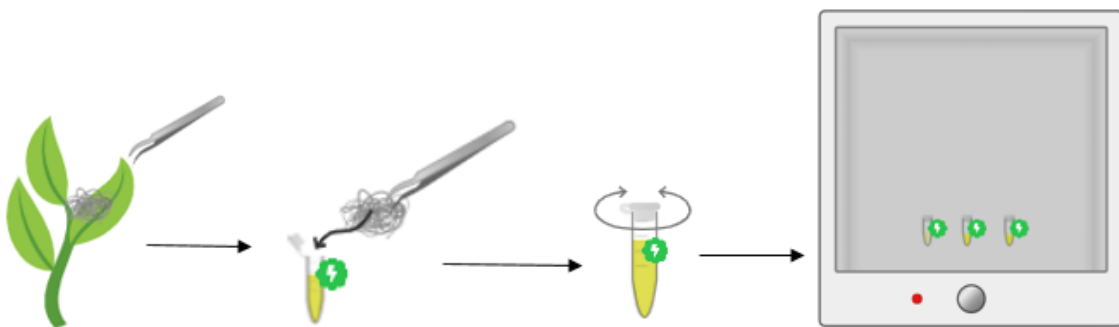
OPIS POSTOPKA

- Priprava epic (za zajetje pajkovih mrež).

6 epic (5 mL), ki smo jih uporabili za nabiranje pajkovih mrež smo pred uporabo sterilizirale na 121°C za 1h-1,5h. V sterilne epice smo na to ob aseptičnih pogojih (ob gorilniku) dodale 2 mL destilirane fiziološke raztopine. Epice so večje zato, da je olajšano samo nabiranje mrež.

- Nabiranje pajkove mreže.

Pajkove mreže smo nabirale večino ob stenah objektov šole (BIC Ljubljana) ali v bližnji okolici. Pri nabiranju samih pajkovih mrež smo se trudile, da zajamemo največje pajkove mreže. V vsako izmed epic smo tako dale približno enako količino mrež. Ker smo v okolici šole našle tudi pajkova gnezda, smo v vsako izmed 6 epic nanesele eno. Kljub temu, da smo pajkove mreže nabirale zunaj smo poskušale ohranjati visok nivo aseptičnosti. Pincete, s katerimi smo nabirale pajkove mreže smo pred uporabo namočile v etanol (96%) in jo približale vžigalniku, da je etanol na nje zgorel. Šele nato smo se lotile nabiranja samih pajkovih mrež. Ko smo pajkovo mrežo nabrali smo ob prižganem vžigalniku odprle epico in pajkovo mrežo iz pincete prenesle vanjo. Za vsako pajkovo mrežo smo postopek ponovile. Če smo ocenile, da ima katera izmed epic očitno manjšo količino pajkovih mrež, smo po potrebi dodale še kakšno manjšo, da smo uravnovesili količino pajkovih mrež v vseh epicah.



slika 23: shema nabiranja pajkovih mrež

- Priprava gojišča za v petrijevke.

Pripravile smo 3 različna gojišča: LB (Luria-Bertani) trdno in LB tekoče, M9 trdno in tekoče gojišče ter gojišče, ki ima za osnovni substrat le pajkovo mrežo.

GOJIŠČE LB

Pripravimo 0,4 L gojišča LB trdno v erlenmajerico z ozkim vratom. Erlenmajerica naj bo vsaj 500 mL, saj drugače se nam lahko zgodi, da se nam bo pri avtoklaviranju gojišče preveč dvignilo in zlilo izven erlenmajerice. Vsebino v erlenmajerici (gojišče in destilirano vodo) zmešamo s stekleno palčko. Pred avtoklaviranjem pokrijemo vrat erlenmajerice z aluminijasto folijo in označimo vsebino v erlenmajerici. Pripravimo 0,4 L gojišča LB tekoče. Vse zlijemo v 500 mL erlenmajerico z ozkim vratom (lahko je tudi večja, manjša pa ne) ter premešamo. Ko

je mešanica lepo premešana, jo pokrijemo z aluminijasto folijo in označimo petrijevko. Obe erlenmajerici z gojišči damo avtoklavirati (1h-1,5h na 121°C).

Ko je avtoklaviranje končano počakamo, da temperatura v avtoklavu pade preden vzamemo gojišča ven. Gojišča vzemamo iz avtoklava previdno, z rokavicami, saj so erlenmajerice vroče. Tekoče gojišče pustimo na sobni temperaturi, da se ohladi in ga nato vlijemo v 100 mL erlenmajerice tako, da je v vsaki 25 mL gojišča. Trdno gojišče je treba vliti v petrijevke. Petrijevke se pred zlivanjem gojišča označi bodisi na spodnjo stran petrijevke na rob bodisi na pokončni del petrijevke. Nikoli se ne označuje na pokrov, saj se lahko pokrovi zamešajo, izgubijo... Ko vlivamo gojišče v petrijevko je pomembno, da pred vsakim zlitjem v novo petrijevko razžarimo vrat petrijevke. Ko zlijemo vsa gojišča počakamo, da se gojišče v petrijevkah ohladi. Če gojišč, ko so hlaDNK še ne potrebujemo, jih spravimo v hladilnik.

M9 GOJIŠČE

Ko vse komponente potrebne za gojišče stehamo ji stresemo v erlenmajerico, katere volumen ne sme biti manjši od litra in pol. Erlenmajerico napolnimo z destilirano vodo do oznake 1 L. Tako imamo osnov za tekoče minimalno gojišče. Za trdno M9 gojišče stehamo vse sestavine po istem postopku še enkrat, le da tokrat dodamo agar v prahu. Ko imamo vse komponente v novi erlenmajerici, dodamo destilirano vodo do oznake 1 L. obe gojišči, tako trdno kot tekoče, prekrijemo z aluminijasto folijo, ju označimo in damo avtoklavirati na 121°C za 1h-1,5h.

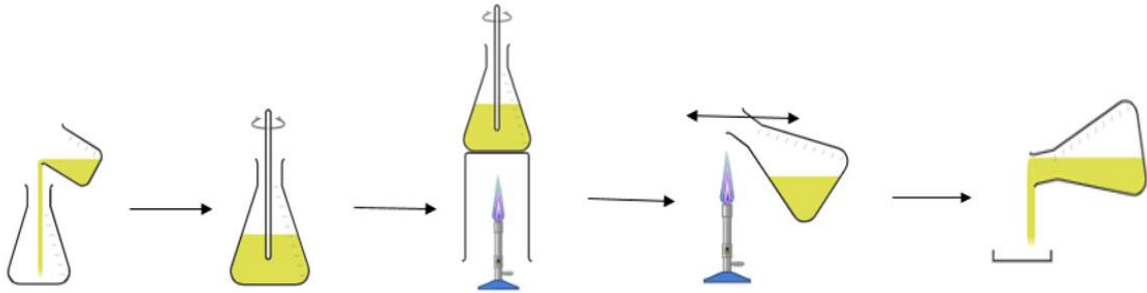
Ko je avtoklaviranje končano počakamo, da temperatura v avtoklavu pade, preden jemljemo gojišča ven. Gojišča jemljemo iz avtoklava previdno, z rokavicami, saj so erlenmajerice vroče. Tekoče gojišče pustimo na sobni temperaturi, da se ohladi in ga nato vlijemo v 100 mL erlenmajerice tako, da je v vsaki 25 mL gojišča. Trdno gojišče je treba vliti v petrijevke. Petrijevke se pred zlivanjem gojišča označi bodisi na spodnjo stran petrijevke na rob bodisi na pokončni del petrijevke. Nikoli se ne označuje na pokrov, saj se lahko pokrovi zamešajo, izgubijo... Ko vlivamo gojišče v petrijevko je pomembno, da pred vsakim zlitjem v novo petrijevko razžarimo vrat petrijevke. Ko zlijemo vsa gojišča, počakamo, da se gojišče v petrijevkah ohladi. Če gojišč, ko so hlaDNK še ne potrebujemo, jih spravimo v hladilnik.

GOJIŠČE Z FIZIOLOŠKO RAZTOPINO

Gojišče z fiziološko raztopino pripravimo tako da zmešamo vse komponente v dve erlenmajerici. Ena izmed erlenmajeric bo po avtoklaviranju služila za tekoče gojišče, drugi pa bomo pred avtoklaviranjem dodali agar. V drugo erlenmajerico dodamo agar. Pazimo, da imajo erlenmajerice ozek vrat in da imajo volumen večji od 700 ml, saj se nam drugače lahko tekom avtoklaviranja zgodi, da se gojišče zlije preko erlenmajerice. Ko pripravimo obe gojišči, jih pokrijemo z aluminijasto folijo in ju primerno označimo. Damo jih avtoklavirati na 121°C za 1h-1,5h.

Ko je avtoklaviranje končano, počakamo, da temperatura v avtoklavu pade preden jemljemo gojišča ven. Gojišča jemljemo iz avtoklava previdno, z rokavicami, saj so erlenmajerice vroče. Tekoče gojišče pustimo na sobni temperaturi, da se ohladi in ga nato vlijemo v 100 mL erlenmajerice tako, da je v eni 25 mL gojišča. Trdno gojišče je treba vliti v petrijevke. Petrijevke se pred zlivanjem gojišča označi bodisi na spodnjo stran petrijevke na rob bodisi na pokončni

del petrijevke. Nikoli se ne označuje na pokrov, saj se lahko pokrovi zamešajo, izgubijo... Ko vlivamo gojišče v petrijevko je pomembno, da pred vsakim zlitjem v novo petrijevko razžarimo vrat petrijevke. Ko zlijemo vsa gojišča počakamo, da se gojišče v petrijevkah ohladi. Če gojišč, ko so hlaDNK še ne potrebujemo, jih spravimo v hladilnik.



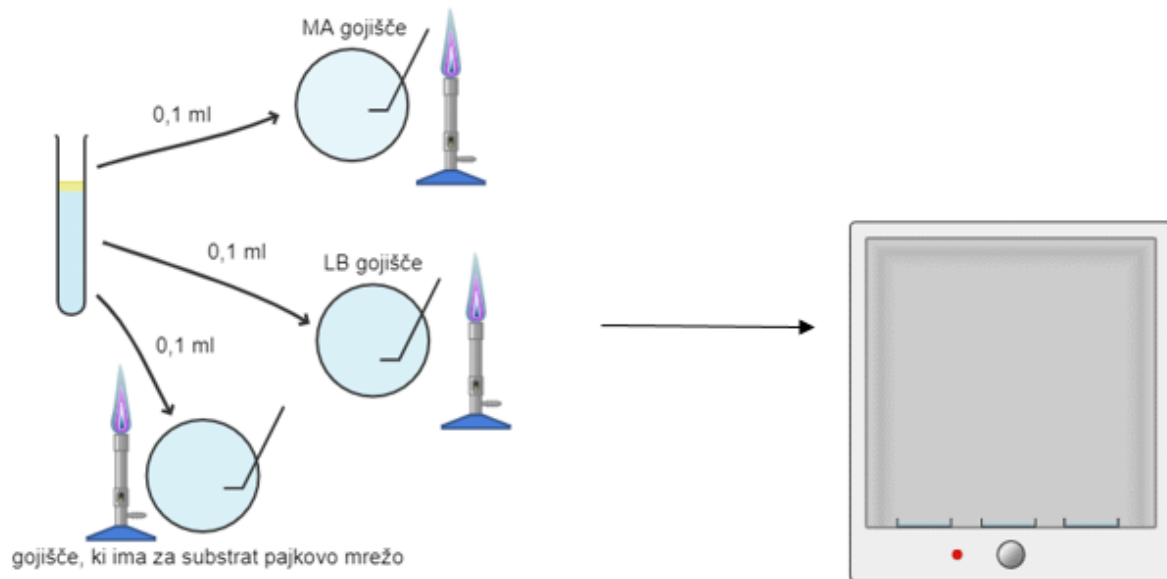
slika 24: shema priprave gojišč (LB, M9 in FR)

- Nanašanje mrež na gojišča

Vzamemo 7 petrijev LB trdnih gojišč, 4 petrijev M9 trdnih gojišč in 5 petrijev gojišč z fiziološko raztopino. Na vsakega izmed njih, prav tako pa tudi v LB tekoče gojišče, z avtomatsko pipeto naneseemo 100 μ L supernatanta iz epic s pajkovimi mrežami. Pomembno je da delamo ob gorilniku, saj tako zmanjšamo možnost okužbe gojišč. V LB tekoče gojišče damo 100 μ L supernatanta. V M9 tekoče gojišče in tekoče gojišče s fiziološko raztopino razdelimo preostanek supernatanta tako, da imata obe gojišči enako količino supernatanta (me smo v vsako izmed gojišč dale 1500 μ L). Prav tako v obeh tekoči gojišči (M9 in gojišče z fiziološko raztopino) razdelimo vso pajkovo mrežo. Pajkovo mrežo ob gorilniku, za zagotavljanje aseptičnosti, postavimo na trdo podlago in ga s skalpelom razrežemo na pol. Skalpel je pred tem treba sterilizirati z alkohol – etanol 96% in ga potegniti čez gorilnik, da etanol na njemu zagori. V obe tekoči gojišči damo razdeljeno pajkovo mrežo. Vsa gojišča pokrijemo z aluminijasto folijo, primerno označimo in damo inkubirati.

- Inkubacija

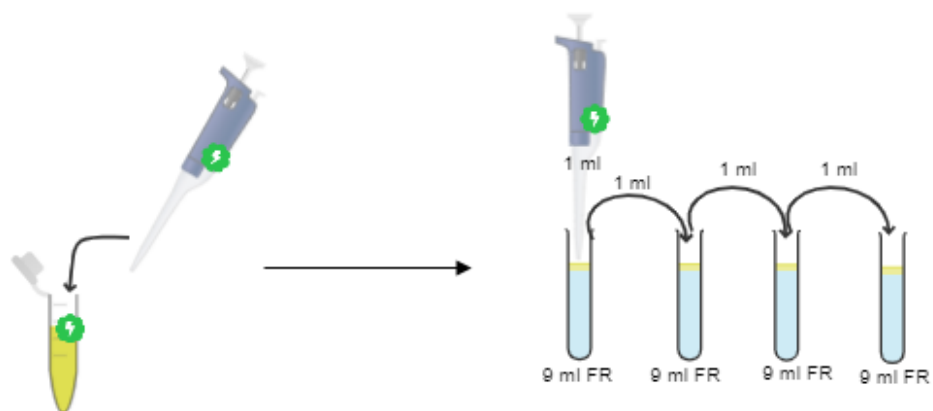
Vsa gojišča bodisi tekoča bodisi trDNK inkubiramo na 37° C teden dni.



slika 25: shema nacepljanja gojišč in inkubacije

- Rečitvena vrsta

Iz tekočih gojišč vzamemo 1 mL in ga zmešamo v epruveto 1 z 9 mL fiziološke raztopine. Nato iz epruvete 1 vzamemo 1 mL mešanice in jo damo v epruveto 2 z 9 mL fiziološke raztopine. Iz epruvete 2 vzamemo 1 mL mešanice in jo damo v epruveto 3 z že prej pripravljano fiziološko raztopino (9 mL). Postopek ponavljamo dokler ni naš vzorec dovolj števen, vendar moramo paziti, da vzorca ne razredčimo preveč.



slika 26: shema redčitvene vrste

- Vizualni pregled vzorca



slika 27: shema vizualnega pregleda dobljenih podatkov

- Barvanje po Gramu

Cel čas izvajanja barvanja po Gramu delamo ob gorilniku, saj tako zagotavljamo aseptične pogoje. Na objektno steklice najprej damo destilirano vodo z ezo. Ezo pred tem razžarimo na najbolj modrem delu gorilnika (na vrhu stožca plamena). Ezo vedno razžarevamo na tem delu plamena. Nato ezo spet razžarimo in z njo zajamemo kolonijo, ki jo želimo določiti. Kolonijo razmažemo čez destilirano vodo na objektnem steklcu. Nato preparat fiksiramo tako, da ga na hitro potegnemo čez plamen. Pazimo, da nismo preveč počasni, saj v takem primeru lahko uničimo celice na preparatu. Čez vzorec na objektnem steklcu nanesemo prvo barvilo – kristal violet. Pustimo ga na vzorcu 1 minuto. Barvilo nato odlijemo in speremo s preparata z destilirano vodo. Po tem na preparat nanesemo lugol, ki ni barvilo, ampak služi kot fiksator barvila. Pustimo ga delovati 1 minuto. Speremo z destilirano vodo. Na preparat nato nanesemo alkoholni acetat in pustimo delovati le par sekund. Nato preparat speremo z destilirano vodo. Preparat prelijemo s drugim barvilom – safraninom. Po 1 minuti delovanja drugo barvilo speremo z destilirano vodo. Pustimo na zraku, da se preparat posuši.

Ko se preparat na objektnem steklcu posuši si lahko vzorec pogledamo pod mikroskopom. grampozitivne bakterije se obarvajo modro-vijoličasto. Približno 90 % celične stene grampozitivnih vsebuje peptidoglikan, medtem ko celična stena gramnegativnih bakterij vsebuje le tanko plast peptidoglikana in tanko plast liposaharidov in se zato obarva rdeče. Ko dodamo kristal violet se vse celice obarvajo modro-vijolično. Ko dodamo lugol nastane kompleksa spojina. Ko to kasneje prelijemo z mešanico alkoholnega acetata se barva spere z gramnegativnih celic, z grampozitivnih pa ne. Ko gramnegativne celice nato obarvamo s safraninom po obarvanju ostanejo rdeče.

- Vizualni pregled



slika 30: shema vizualnega pregleda dobljenih podatkov

- Izolacija DNK

Za izolacijo si prvo pripravimo:

- Mešanica fenola, kloroforma in izoamil alkohola v razmerju 25:24:1. Torej vzamemo 25 mL fenola, 24 mL kloroforma in 1 mL izoamil alkohol,
- Mešanico kloroforma in izoamil alkohola v razmerju 24: 1. Torej pripravimo 48 mL kloroforma in 2 mL izoamil alkohola,
- NH₄O acetat,
- 20 % raztopina glukoze,
- 96 % etanol,
- 80 % etanol.

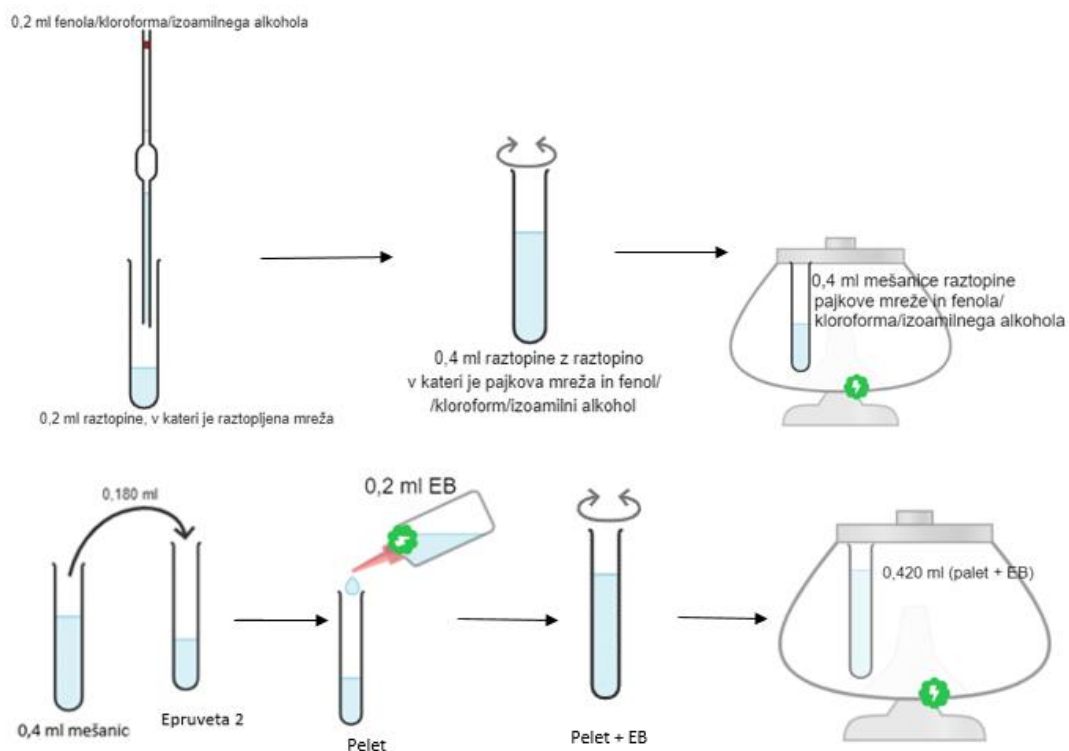
Postopek izolacije DNK je sledeč:

1. Vzamemo 200 μ L materiala iz katerega hočemo izolirati DNK in ga damo v epico 1.
2. Dodamo 200 μ L mešanice fenola, kloroforma in izoamil alkohola v epico 1.
3. Mešamo epico 1 60 sekund
4. Centrifugiramo epruveto 1 na 4000 obratih za 5 minut.
5. Odstranimo približno 180 μ L supernatanta in ga odpipetiramo v epico 2. Tukaj je važno da res z pipeto pobereemo ven iz epice 1 res le zgornjo plast.
6. V epico 1 dodamo 200 μ L destilirane vode.
7. Mešamo epico 1 60 sekund.
8. Centrifugiramo epruveto 1 na 4000 obratih za 5 minut.
9. Odstranimo kar se največ da zgornje plasti (supernatanta), ki smo jo dobili po centrifugiranju. Zgornjo fazo damo nato v epico 2.

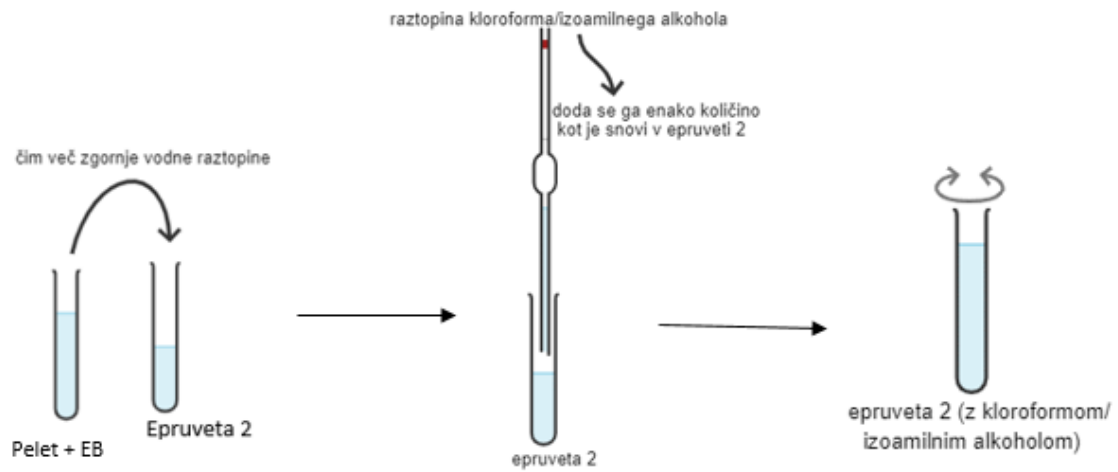
Po končanem centrifugiranju je pomembno, da smo z vzorcem zelo previdni, da ne zmešamo plasti med seboj.

10. V epico 2 dodamo toliko mešanice kloroforma in izoamil alkohola kolikor je v epici 2 prej odvzetega supernatanta.

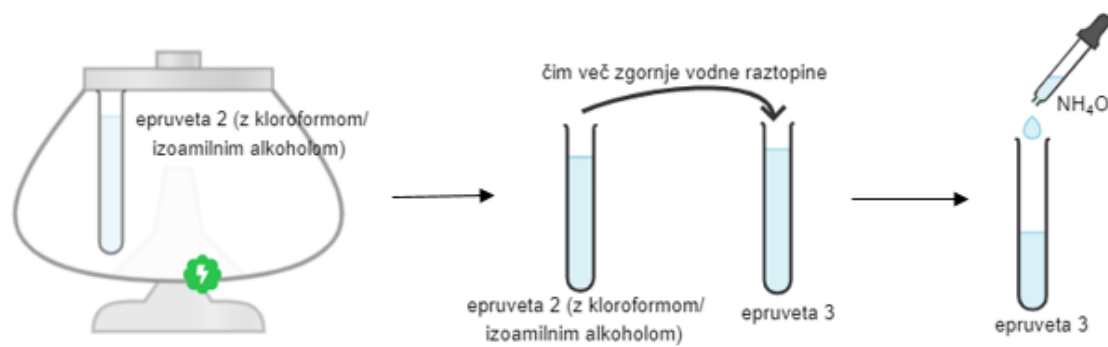
11. Mešamo epico 2 60 sekund.
12. Centrifugiramo epico 2 na 4000 obratih za 5 minut.
13. Odstranimo kar se največ da zgornje plasti (supernatanta), ki smo jo dobili po centrifugiranju. Zgornjo fazo damo nato v epico 3.
14. V vsako epico dodamo toliko NH₄O acetata, da je končna koncentracija v epici 0,75 M.
15. V epico 3 dodamo 1 μ L 20 % glukoze.
16. Dobro premešamo epico 3.
17. Dodamo 2,5-kratni volumen 96 % etanola v epico 3 in dobro premešamo.
18. Centrifugiramo epruveto 3 na 4000 obratih pri 4°C za 20 minut.
19. Previdno odstranimo/odpipetiramo supernatant.
20. V epico 3 dodamo 300 μ L 80 % etanola in premešamo 3-krat.
21. Centrifugiramo epico 3 na 4000 obratih 15 minut na 4°C.
22. Previdno odstranimo/odpipetiramo supernatant.
23. V epico 3 dodamo 300 μ L 80 % etanola in premešamo 3-krat.
24. Centrifugiramo epico 3 na 4000 obratih 15 minut na 4°C.
25. Previdno odstranimo/odpipetiramo supernatant.
26. Posušimo na zraku 1-2 minuti.
27. Če hočemo vzorce shraniti za poznejšo uporabo jih damo v hladilnik na -18°C. Ko hočemo vzorec uporabiti prvo počakamo, da se odtali in ga nato resuspendiramo.
28. Če bomo takoj nadaljevali z delom jih resuspendiramo v destilirani vodi.



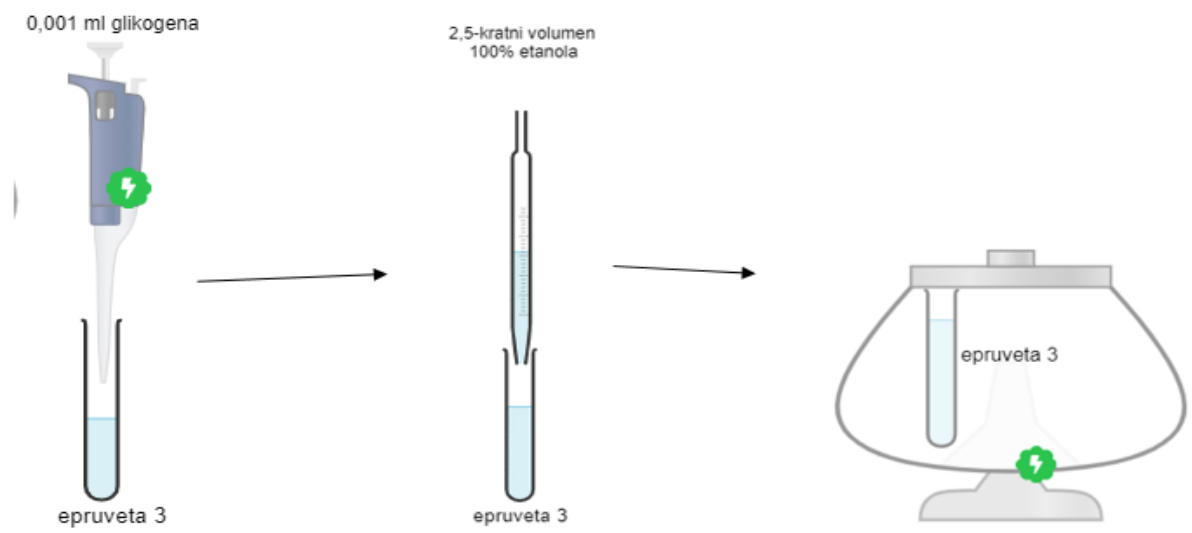
slika 31: shema izolacije DNK



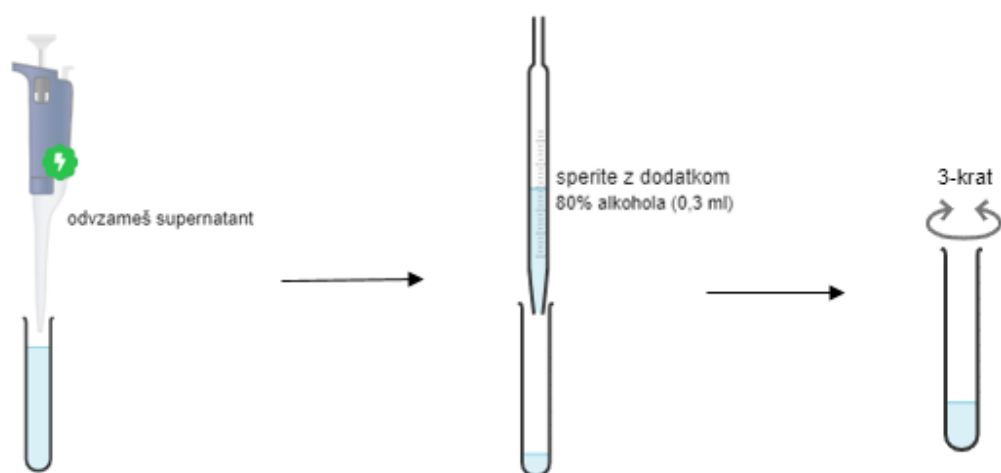
slika 32: shema nadaljnje izolacije DNK



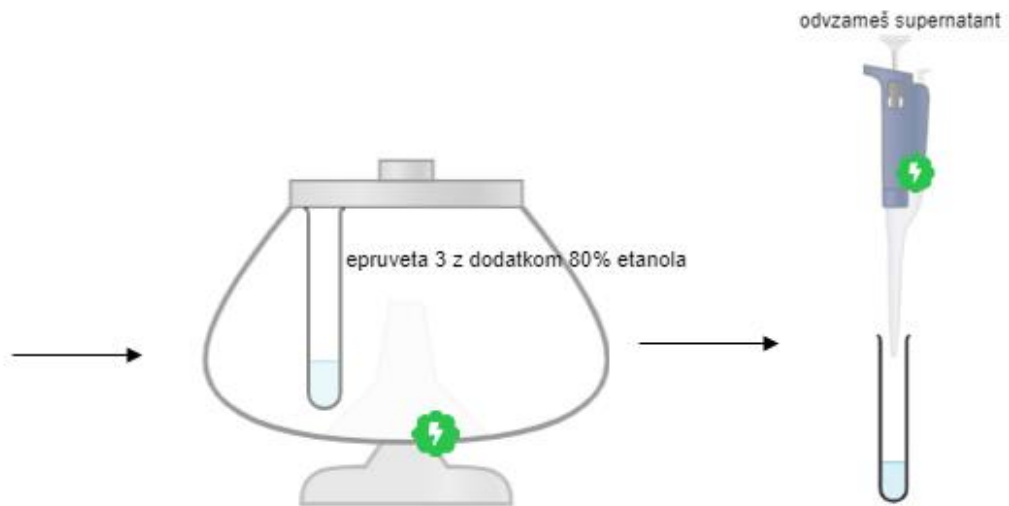
slika 33: shema nadaljnje izolacije DNK



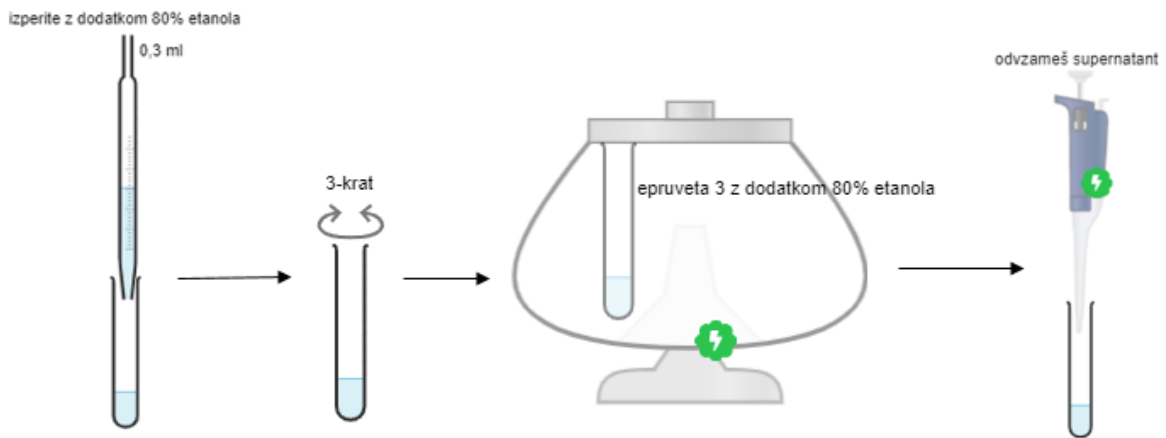
slika 34: shema nadaljnje izolacije DNK



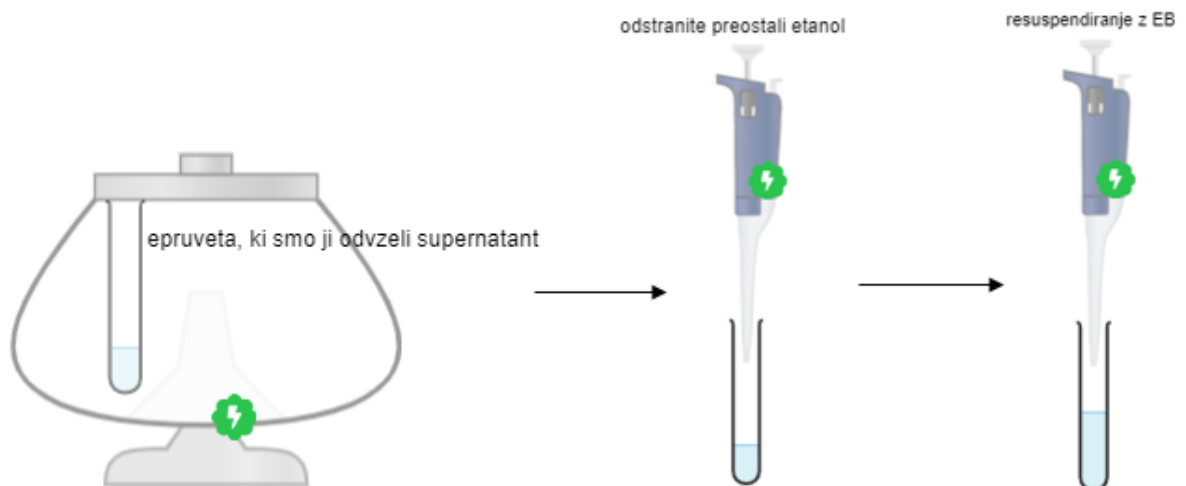
slika 35: shema nadaljnje izolacije DNK



slika 36: shema nadaljnje izolacije DNK



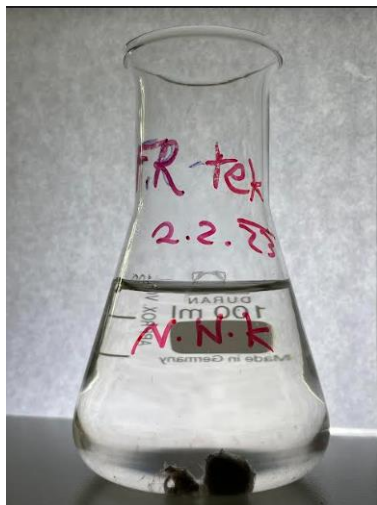
slika 37: shema nadaljnje izolacije DNK



slika 38: shema nadaljnje izolacije DNK

REZULTATI

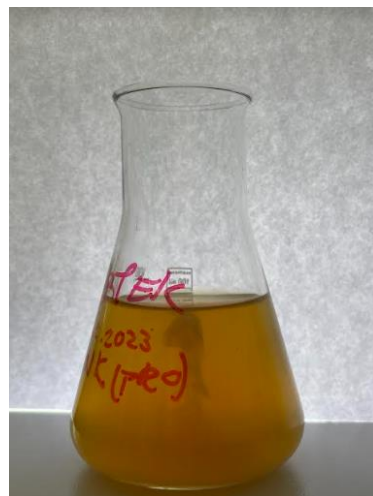
Vsi rezultati prikazujejo stanje po inkubaciji.



slika 43: FR tekoče gojišče



slika 42: M9 tekoče gojišče



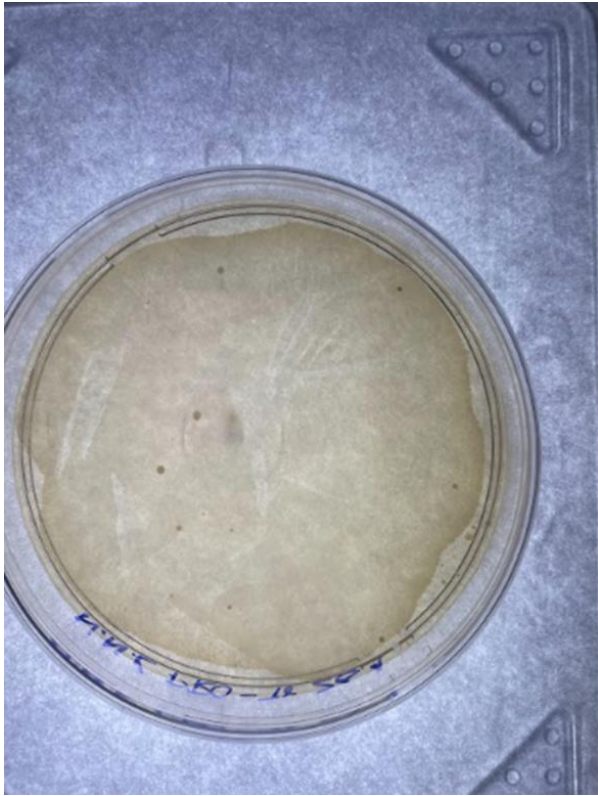
slika 41: LB tekoče gojišče



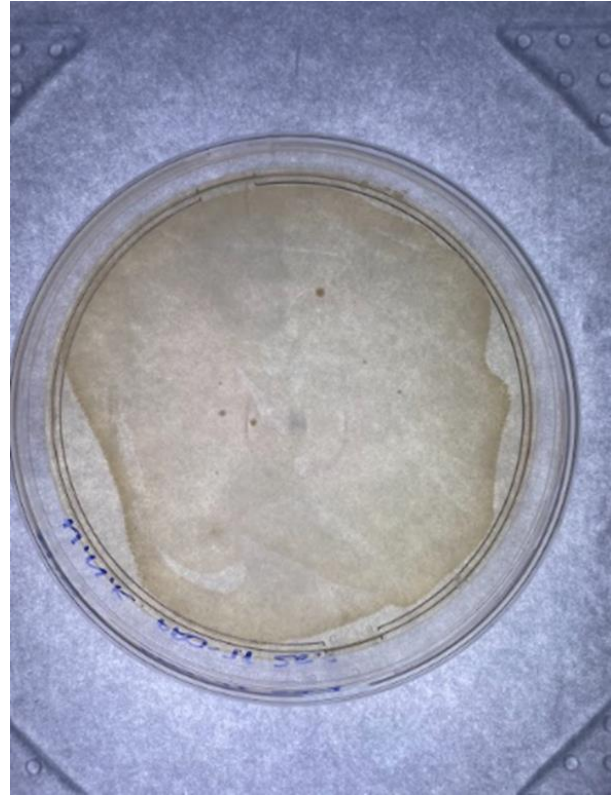
slika 40: 1. petrijevka LB



slika 39: 2. petrijevka LB



slika 46: 3. petrijevka LB



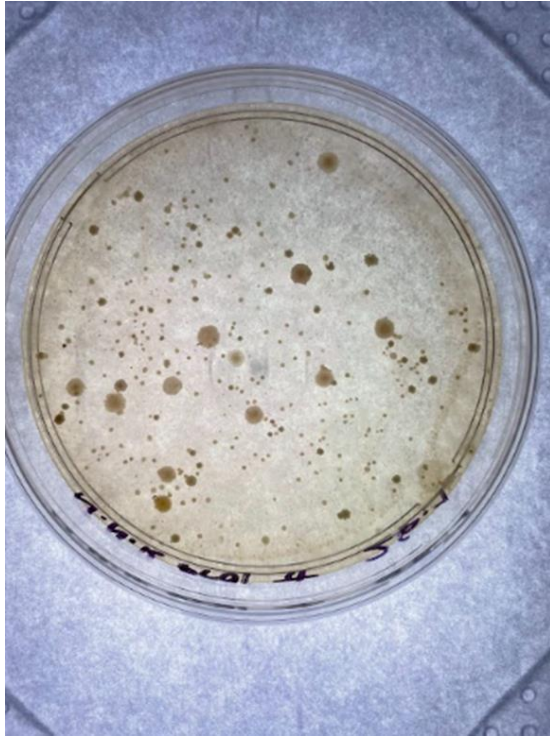
slika 45: 4. petrijevka LB



slika 47: 5. petrijevka LB



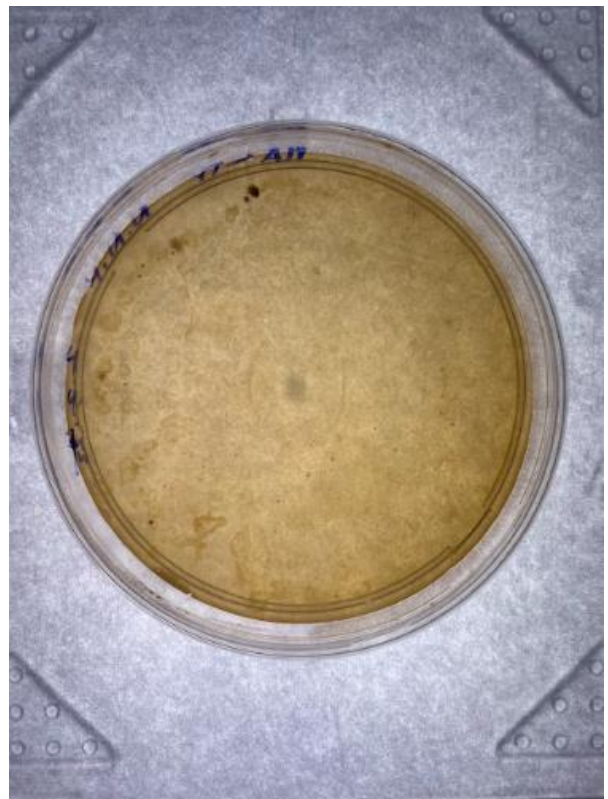
slika 44: 8. petrijevka LB



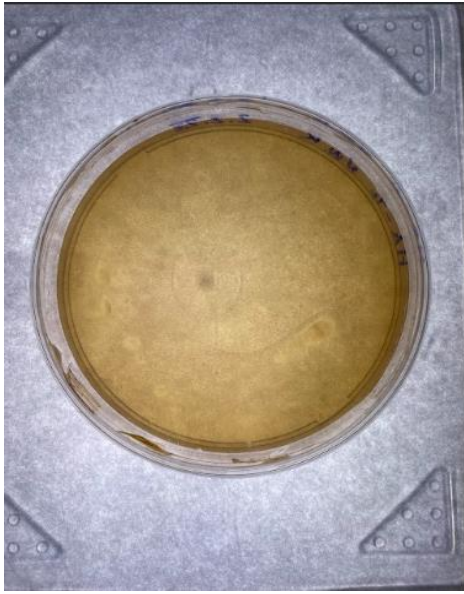
slika 48: 6. petrijevka LB



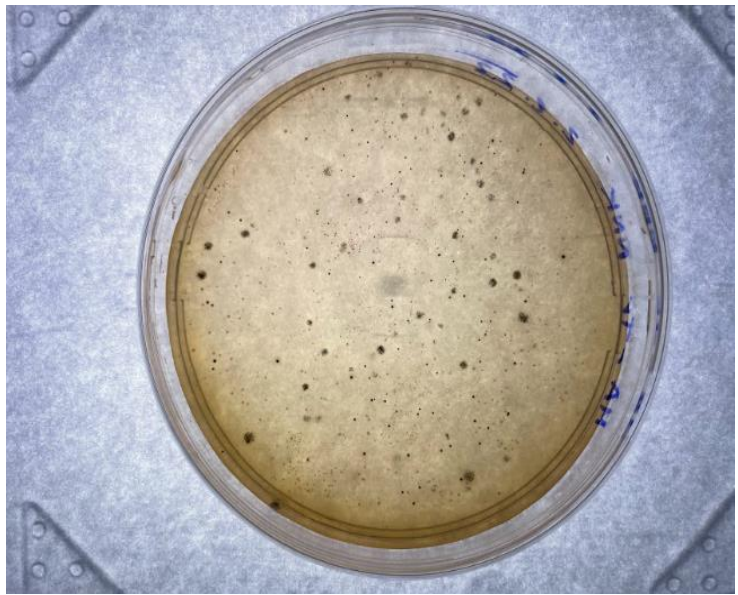
slika 49: 1. petrijevka M9



slika 50: 2. petrijevka M9



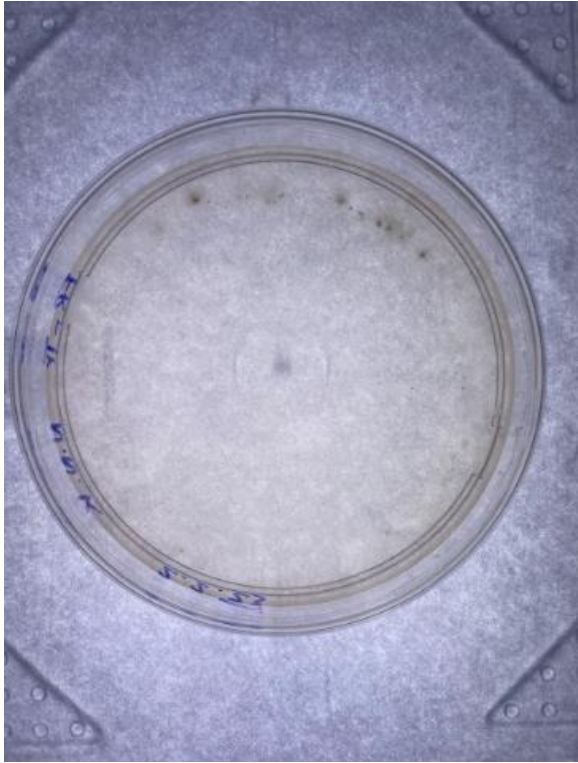
slika 52: 3. petrijevka M9



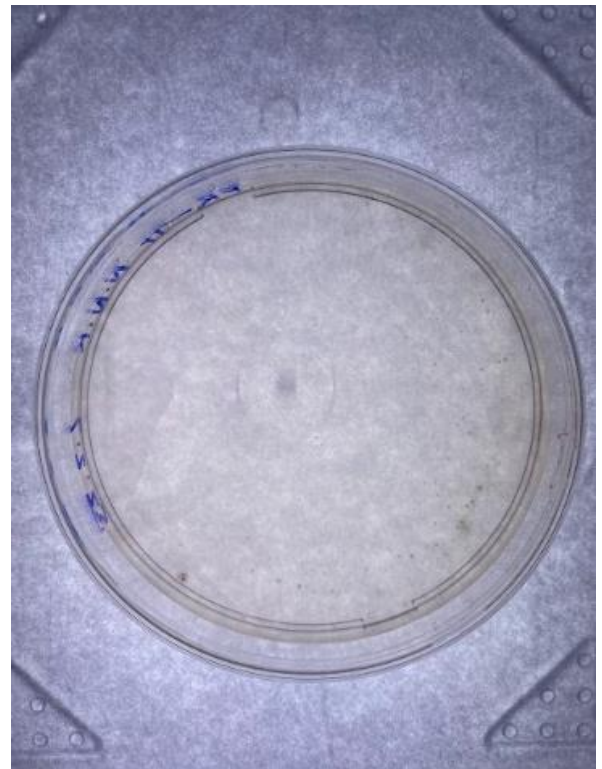
slika 51: 4. petrijevka M9



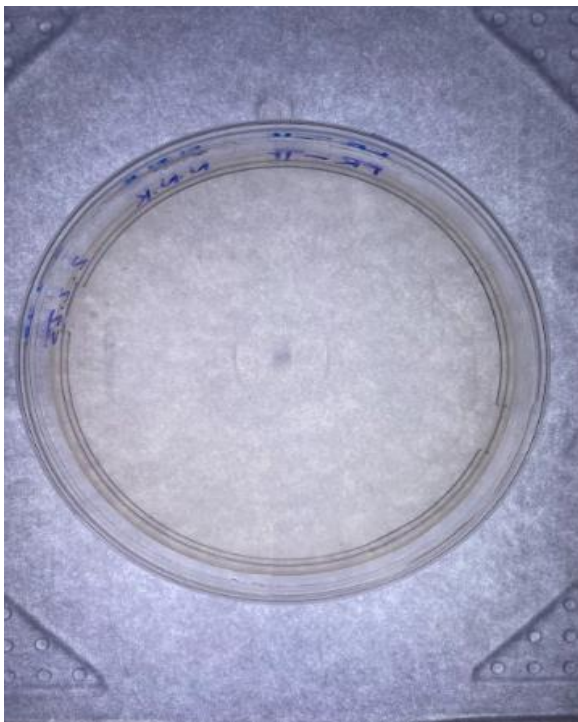
slika 53: 5. petrijevka M9



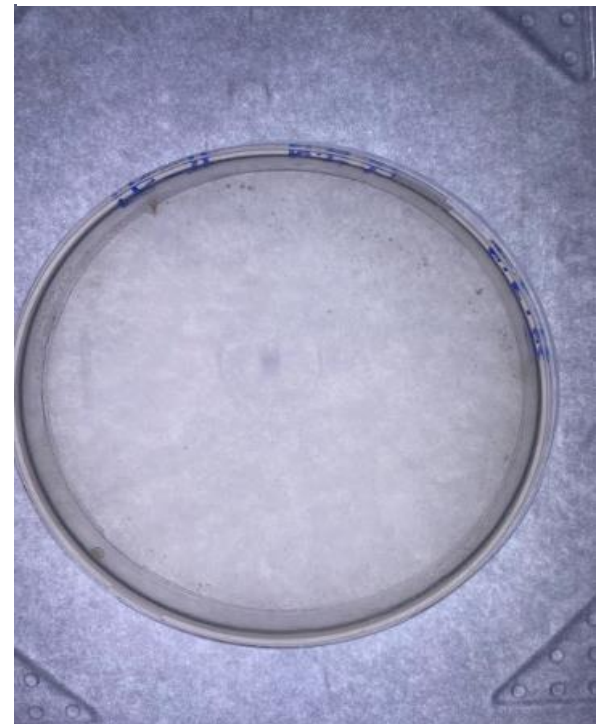
slika 56: 1. petrijevka FR



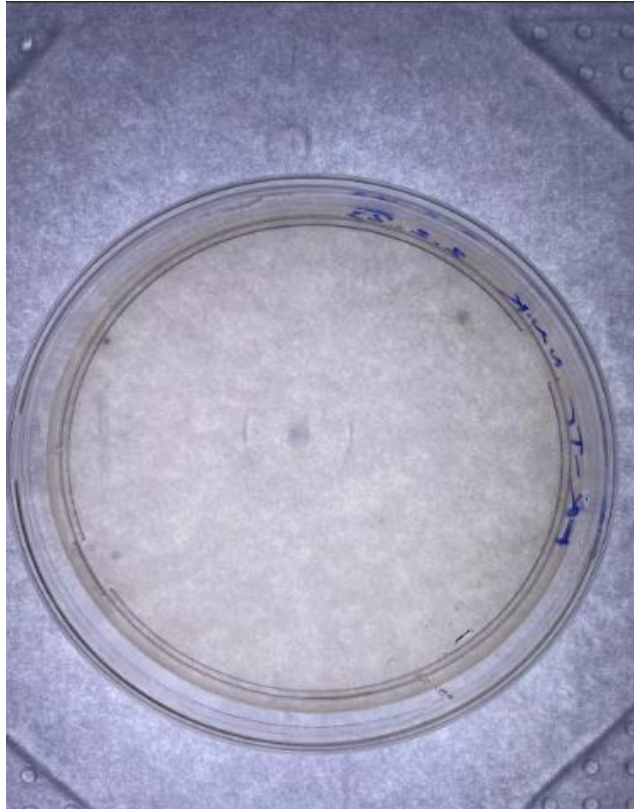
slika 57: 2. petrijevka FR



slika 55: 3. petrijevka FR



slika 54: 4. petrijevka FR



slika 58: 5. petrijevka FR

Tabela 2: prikaz vseh podatkov zbranih tekom raziskovalne naloge

vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
LB	1	1	9	C
LB	1	2	3	B
LB	1	3	3	A
LB	1	4	2,5	Č
LB	1	5	4	A
LB	1	6	11	B
LB	1	7	7	B
LB	1	8	4	B
LB	1	9	5	A
LB	1	10	5	A
LB	1	11	5	A
LB	1	12	4	A
LB	1	13	2	A
LB	1	15	3	A
LB	1	16	3	E
LB	1	17	3	B
LB	1	18	1	B
LB	1	19	4	A
LB	1	20	4	A
LB	1	21	0	A
LB	1	22	0	A
LB	1	23	0	A
LB	1	24	0	A
LB	1	25	0	A
LB	1	26	0	A
LB	1	27	0	A
LB	1	28	0	A
LB	1	29	0	A
LB	1	30	0	A
LB	1	31	0	A
LB	1	32	0	A
LB	1	33	0	A
LB	1	34	0	A
LB	1	35	0	A
LB	1	36	0	A
LB	1	37	0	A
LB	1	38	0	A
LB	1	39	0	A
LB	1	40	0	A
LB	1	41	0	A
LB	1	42	0	A
LB	1	43	0	A
LB	1	44	0	A
LB	1	45	0	A
LB	1	46	0	A
LB	1	47	0	A
LB	1	48	0	A
LB	1	49	0	A
LB	1	50	0	A
LB	1	51	0	A
LB	1	52	0	A
LB	1	53	0	A

...nadaljevane tabele 2

vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
LB	1	54	0	A
LB	1	55	0	A
LB	1	56	0	A
LB	1	57	0	A
LB	1	58	0	A
LB	1	59	0	A
LB	1	60	0	A
LB	1	61	0	A
LB	1	62	0	A
LB	1	63	0	A
LB	1	64	0	A
LB	1	65	0	A
LB	1	66	0	A
LB	1	67	0	A
LB	1	68	0	A
LB	1	69	0	A
LB	1	70	0	A
LB	1	71	0	A
LB	1	72	0	A
LB	1	73	0	A
LB	1	74	0	A
LB	1	75	0	A
LB	1	76	0	A
LB	1	77	0	A
LB	1	78	0	A
LB	1	79	0	A
LB	1	80	0	A
LB	1	81	0	A
LB	1	82	0	A
LB	1	83	0	A
LB	1	84	0	A
LB	1	85	0	A
LB	1	86	0	A
LB	1	87	0	A
LB	1	88	0	A
LB	1	89	0	A
LB	1	90	0	A
LB	1	91	0	A
LB	1	92	0	A
LB	1	93	0	A
LB	1	94	0	A
LB	1	95	0	A
LB	1	96	0	A
LB	1	97	0	A
LB	1	98	0	A
LB	1	99	0	A
LB	1	100	0	A
LB	1	101	0	A
LB	1	102	0	A
LB	1	103	0	A
LB	1	104	0	A
LB	1	105	0	A
LB	1	106	0	A
LB	1	107	0	A

...nadaljevanje tabele 2

vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
LB	1	108	0	A
LB	1	109	0	A
LB	1	110	0	A
LB	1	111	0	A
LB	1	112	0	A
LB	1	113	0	A
LB	1	114	0	A
LB	2	1	2	A
LB	2	2	3	A
LB	2	3	10	D
LB	2	4	3	Č
LB	2	5	4	A
LB	2	6	3	A
LB	2	7	7	C
LB	2	8	2	B
LB	2	9	3	B
LB	2	10	2	B
LB	2	11	3	A
LB	2	12	5	B
LB	2	13	4	B
LB	2	14	4	A
LB	2	15	5	A
LB	2	16	4	A
LB	2	17	4	A
LB	2	18	4	A
LB	2	19	3	B
LB	2	20	3	B
LB	2	21	4	B
LB	2	22	4	B
LB	2	23	4	B
LB	2	24	2	B
LB	2	25	6	C
LB	2	26	2	Č
LB	2	27	0	A
LB	2	28	0	A
LB	2	29	0	A
LB	2	30	0	A
LB	2	31	0	A
LB	2	32	0	B
LB	2	33	0	B
LB	2	34	0	B
LB	2	35	0	B
LB	2	36	0	B
LB	2	37	0	B
LB	2	38	0	B
LB	2	39	0	B
LB	2	40	0	B
LB	2	41	0	B
LB	2	42	0	B
LB	2	43	0	B
LB	2	44	0	B
LB	2	45	0	B
LB	2	46	0	B
LB	2	47	0	B
LB	2	48	0	B
LB	2	49	0	B
LB	2	50	0	B

...nadaljevanje tabele 2

vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
LB	2	51	0	B
LB	2	52	0	B
LB	2	53	0	B
LB	2	54	0	B
LB	2	55	0	B
LB	2	56	0	B
LB	2	57	0	B
LB	2	58	0	B
LB	2	59	0	B
LB	2	60	0	B
LB	2	61	0	B
LB	2	62	0	B
LB	2	63	0	B
LB	2	64	0	B
LB	2	65	0	B
LB	2	66	0	B
LB	2	67	0	B
LB	2	68	0	B
LB	2	69	0	B
LB	2	70	0	B
LB	2	71	0	B
LB	2	72	0	B
LB	2	73	0	B
LB	2	74	0	B
LB	2	75	0	B
LB	2	76	0	B
LB	2	77	0	B
LB	2	78	0	B
LB	2	79	0	B
LB	2	80	0	B
LB	2	81	0	B
LB	2	82	0	B
LB	2	83	0	B
LB	2	84	0	B
LB	2	85	0	B
LB	2	86	0	B
LB	2	87	0	B
LB	2	88	0	B
LB	3	1	2	A
LB	3	2	6	C
LB	3	3	1	A
LB	3	4	1	A
LB	3	5	1	A
LB	3		NA	
LB	4	1	20	F
LB	4	2	2	A
LB	4	3	1	A
LB	4	4	1	B
LB	4	5	1	B
LB	4	6	1	B
LB	5		NA	
LB	6	1	8	C
LB	6	2	3	B
LB	6	3	3	A
LB	6	4	3	E
LB	6	5	5	B
LB	6	6	5	C
LB	6	7	3	B
LB	6	8	3	Č
LB	6	9	5	B
LB	6	10	2	B

...nadaljevanje tabele 2

vrsta	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
LB	6	11	2	Č
LB	6	12	5	B
LB	6	13	3	B
LB	6	14	2	Č
LB	6	15	2	Č
LB	6	16	2	Č
LB	6	17	2	B
LB	6	18	2	B
LB	6	19	1	Č
LB	6	20	1	Č
LB	6	21	1	Č
LB	6	22	1	Č
LB	6	23	1	Č
LB	6	24	1	B
LB	6	25	2	B
LB	6	26	1	B
LB	6	27	1	B
LB	6	28	1	B
LB	7	1	6	B
LB	7	2	6	B
LB	7	3	7	B
LB	7	4	5	B
LB	7	5	5	B
LB	7	6	3	B
LB	7	7	7	B
LB	7	8	7	B
LB	7	9	4	B
LB	7	10	2	A
LB	7	11	3	C
LB	7	12	7	A
LB	7	13	3	A
LB	7	14	5	D
LB	7	15	2	Č
LB	7	16	1	A
LB	7	17	1	A
LB	7	18	1	A
LB	7	19	1	A
LB	7	20	2	A
LB	7	21	3	A
LB	7	22	2	B
LB	7	23	1	A
LB	7	24	1	B
LB	7	25	1	B
LB	7	26	1	A
LB	7	27	1	A
LB	7	28	4	A
LB	7	29	1	A
LB	7	30	1	B
LB	7	31	1	A
LB	7	32	0	A
LB	7	33	0	B
M9	1		NA	
M9	2	2	2	G
M9	2	3	2	G
M9	2	4	1	G
M9	2	5-8	0	G
M9	2		NA	
M9	3		NA	
M9	4	1	30	H
M9	4	2	5	H
M9	4	3	5	H
M9	4	4	5	H
M9	4	5	5	H
M9	4	6	5	H

...nadaljevanje tabele 2

vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
M9	4	7	5	H
M9	4	8	5	H
M9	4	9	5	H
M9	4	10	1	H
M9	4	11	1	H
M9	4	12	1	H
M9	4	13	1	H
M9	4	14	1	H
M9	4	15	1	H
M9	4	16	1	H
M9	4	17	1	H
M9	4	18	1	H
M9	4	19	1	H
M9	4	20	1	H
M9	4	21	1	H
M9	4	22	1	H
M9	4	23	1	H
M9	4	24	1	H
M9	4	25	1	H
M9	4	26	1	H
M9	4	27	1	H
M9	4	28	1	H
M9	4	29	1	H
M9	4	30	1	H
M9	4	31	1	H
M9	4	32	1	H
M9	4	33	1	H
M9	4	34	1	H
M9	4	35	1	H
M9	4	36	1	H
M9	4	37	1	H
M9	4	38	1	H
M9	4	39	1	H
M9	4	40	1	H
M9	4	41	1	H
M9	4	42	1	H
M9	4	43	1	H
M9	4	44	1	G
M9	4	45	1	G
M9	4	46	1	G
M9	4	47	1	G
M9	4	48	1	G
M9	4	49	1	G
M9	4	50	1	G
M9	4	51	1	G
M9	4	52	1	G
M9	4	53	1	G
M9	4	54	1	G
M9	4	55	1	G
M9	4	56	1	G
M9	4	57	1	G
M9	4	58	1	G
M9	4	59	1	G
M9	4	60	1	G
M9	4	61	1	G
M9	4	62	1	G
M9	4	63	1	G
M9	4	64	1	G
M9	4	65	1	G
M9	4	66	1	G
M9	4	67	1	G
M9	4	68	1	G
M9	4	69	1	G
M9	4	70	1	G

...nadaljevanje tabele 2

vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
M9	4	71	1	G
M9	4	72	1	G
M9	4	73	1	G
M9	4	74	1	G
M9	4	75	1	G
M9	4	76	1	G
M9	4	77	1	G
M9	4	78	1	G
M9	4	79	1	G
M9	4	80	1	G
M9	4	81	1	G
M9	4	82	1	G
M9	4	83	1	G
M9	4	84	1	G
M9	4	85	1	G
M9	4	86	1	G
M9	4	87	1	G
M9	4	88	1	G
M9	4	89	1	G
M9	4	90	1	G
M9	4	91	1	G
M9	4	92	1	G
M9	4	93	1	G
M9	4	94	1	G
M9	4	95	1	G
M9	4	96	1	G
M9	4	97	1	G
M9	4	98	1	G
M9	4	99	1	G
M9	4	100	1	G
M9	4	101	1	G
M9	4	102	1	G
M9	4	103	1	G
M9	4	104	1	G
M9	4	105	1	G
M9	4	106	1	G
M9	4	107	1	G
M9	4	108	1	G
M9	4	109	1	G
M9	4	110	1	G
M9	4	111	1	G
M9	4	112	1	G
M9	4	113	1	G
M9	4	114	1	G
M9	4	115	1	G
M9	4	116	1	G
M9	4	117	1	G
M9	4	118	1	G
M9	4	119	1	G
M9	4	120	1	G
M9	4	121	1	G
M9	4	122	1	G
M9	4	123	1	G
M9	4	124	1	G
M9	4	125	1	G
M9	4	126	1	G
M9	4	127	1	G
M9	4	128	1	G
M9	4	129	1	G
M9	4	130	1	G

...nadaljevanje tabele 2

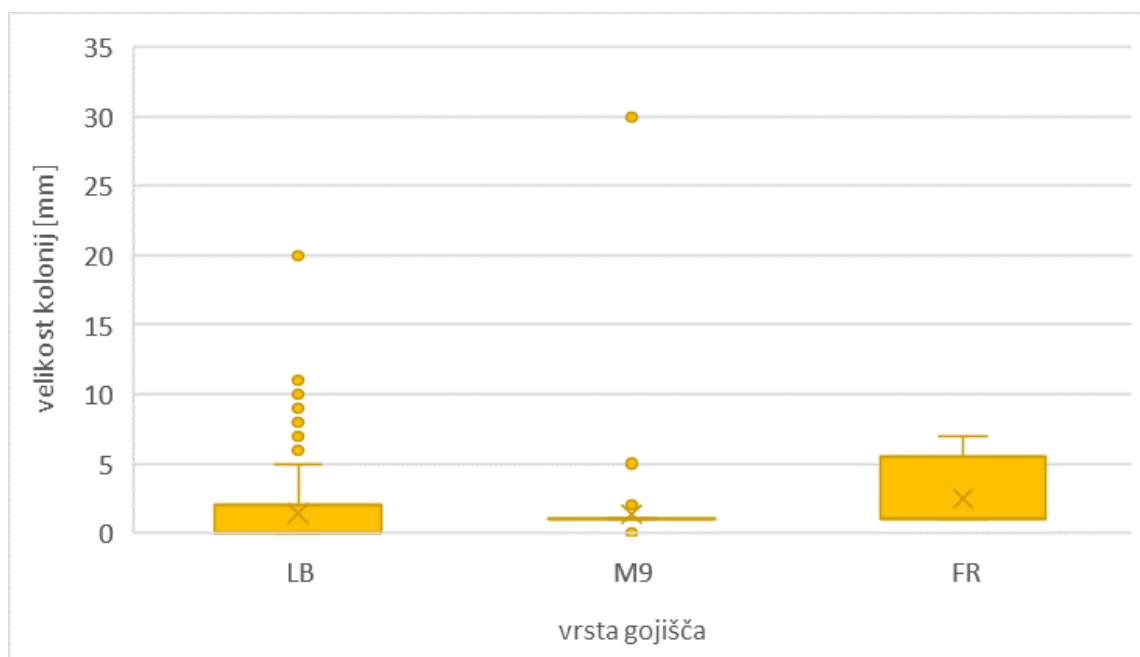
vrsta gojišča	številka petrijevke	številka kolonije	velikost kolonije	morfološke lastnosti
M9	4	131	1	G
M9	4	132	1	G
M9	4	133	1	G
M9	4	134	1	G
M9	4	135	1	G
M9	4	136	1	G
M9	4	137	1	G
M9	4	138	1	G
M9	4	139	1	G
M9	4	140	1	G
M9	4	141	1	G
M9	4	142	1	G
M9	4	143	1	G
M9	4	144	1	G
M9	4	145	1	G
M9	4	146	1	G
M9	4	147	1	G
M9	4	148	1	G
M9	4	149	1	G
M9	4	150	1	G
M9	4	151	1	G
M9	4	152	1	G
M9	4	153	1	G
FR	1		NA	
FR	1	1	1	G
FR	1	2	7	G
FR	1	3	1	G
FR	2	1	1	G
FR			NA	
FR	3	1	1	G
FR			NA	
FR	4		NA	
FR	5	1	28	I
FR	6		NA	
FR	7		NA	

V nadaljevanju naloge smo med seboj primerjale različne parametre, ki nam bodo bolj pomagale razumeti pridobljene podatke.

LEGENDA:

- LB – gojišča Luria-Bertanij
- M9 – minimalno gojišče
- FR – gojišča z 0,9 % NaCl in dodatkom pajkove svile

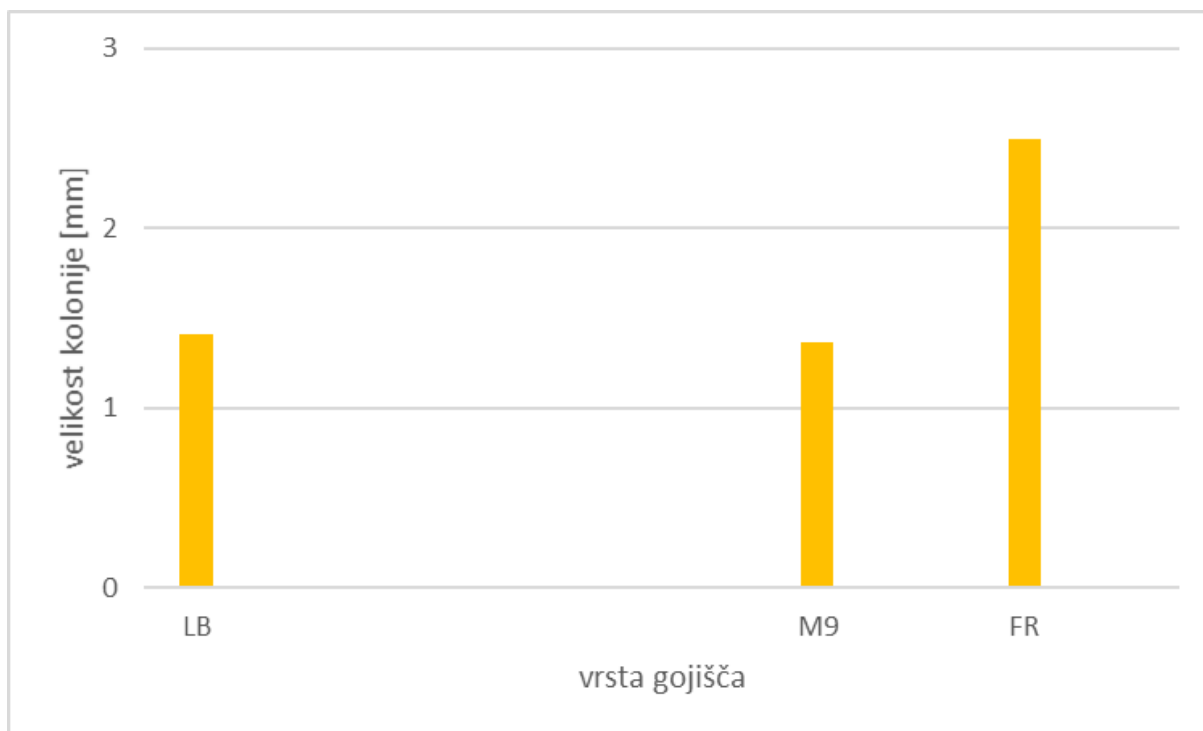
POVPREČNA VELIKOST KOLONIJ GLEDE NA GOJIŠČE



Graf 1: povprečna velikost kolonij glede na izbrani tip gojišča na podlag tabele 1

Tabela 3: prikaz povprečne velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča in prikaz standardne napake pri merjenju

vrsta gojišča	številka petrijevke	povprečna velikost kolonij	standardna napaka
LB	1	0,72	0,177
LB	2	1,15	0,215
LB	3	2,20	0,970
LB	4	4,33	3,138
LB	6	2,54	0,323
LB	7	2,88	0,396
M9	2	0,71	0,360
M9	4	1,40	0,200
FR	1	3,00	2,000
FR	5	1,00	premalo podatkov

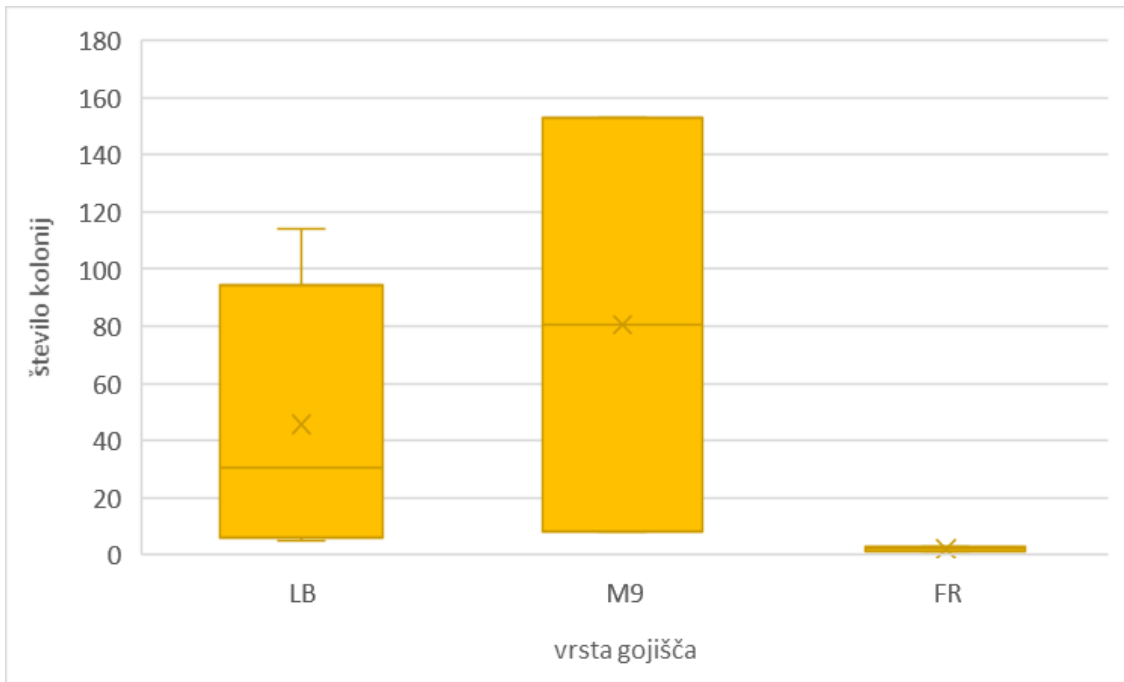


Graf 2: povprečna velikost kolonij glede na izbrani tip gojišča na podlagi podatkov iz tabele 2

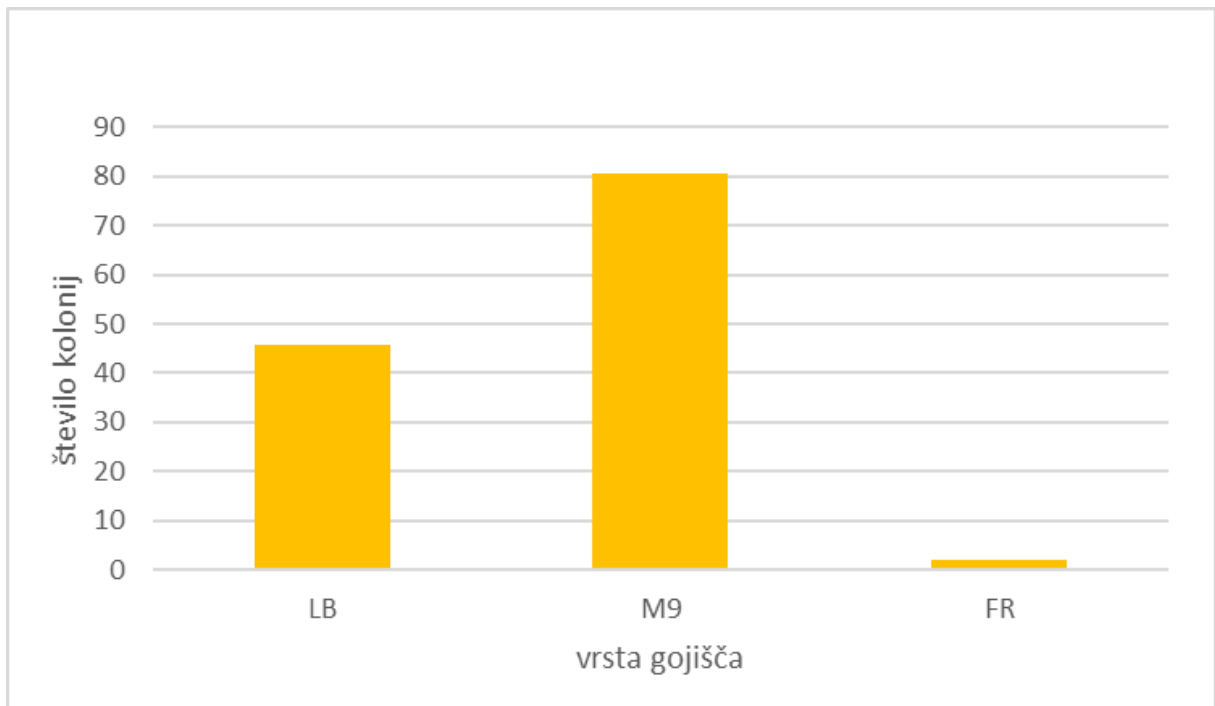
POVPREČNO ŠTEVILO KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA

Tabela 4: prikaz števila kolonij v odvisnosti od vrste gojišča

vrsta gojišča	številka petrijevke	število kolonij
LB	1	114
LB	2	88
LB	3	5
LB	4	6
LB	6	28
LB	7	33
M9	2	8
M9	4	153
FR	1	3
FR	5	1



Graf 3: skupni prikaz povprečnega števila kolonij glede na izbrani tip gojišča

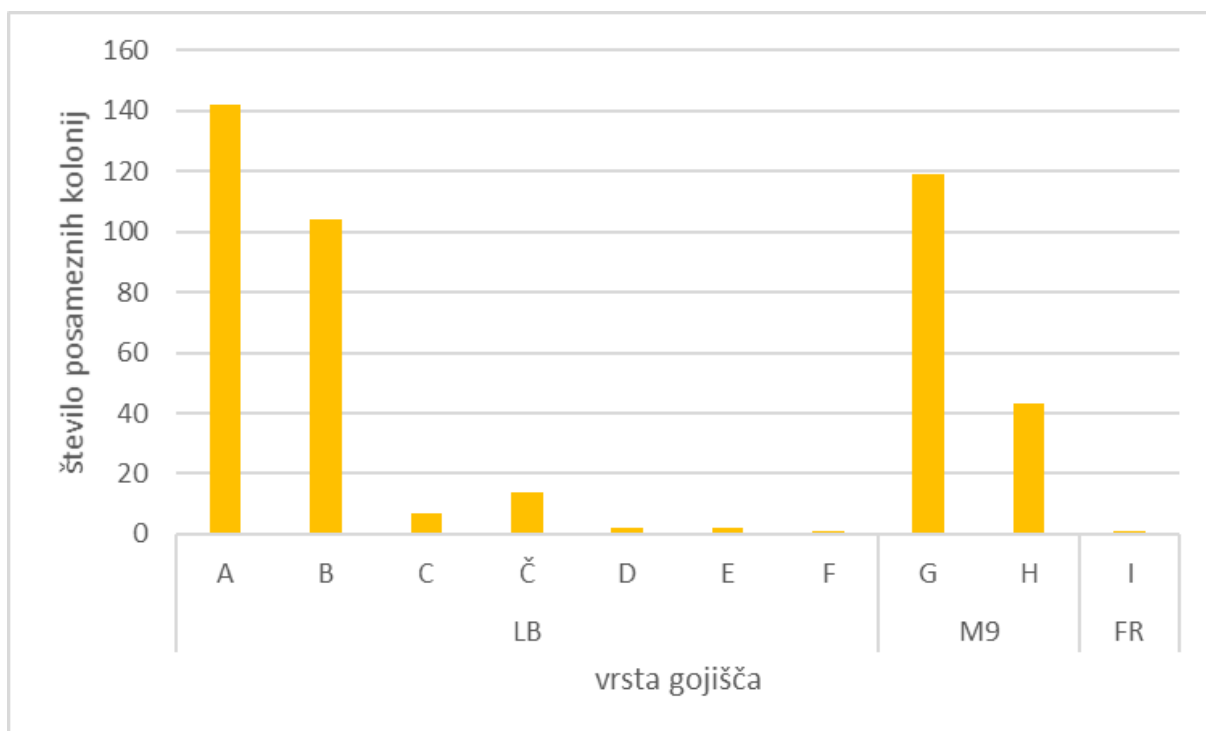


Graf 4: skupni stolpčni prikaz povprečnega števila glede na izbrani tip gojišča

ŠTEVILSKA RAZNOLIKOST KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA

Tabela 5: prikaz raznolikost kolonij po številu glede na tip gojišča

vrsta gojišča	vrsta kolonije	število kolonij
LB	A	142
	B	104
	C	7
	Č	14
	D	2
	E	2
	F	1
M9	G	119
	H	43
FR	I	1

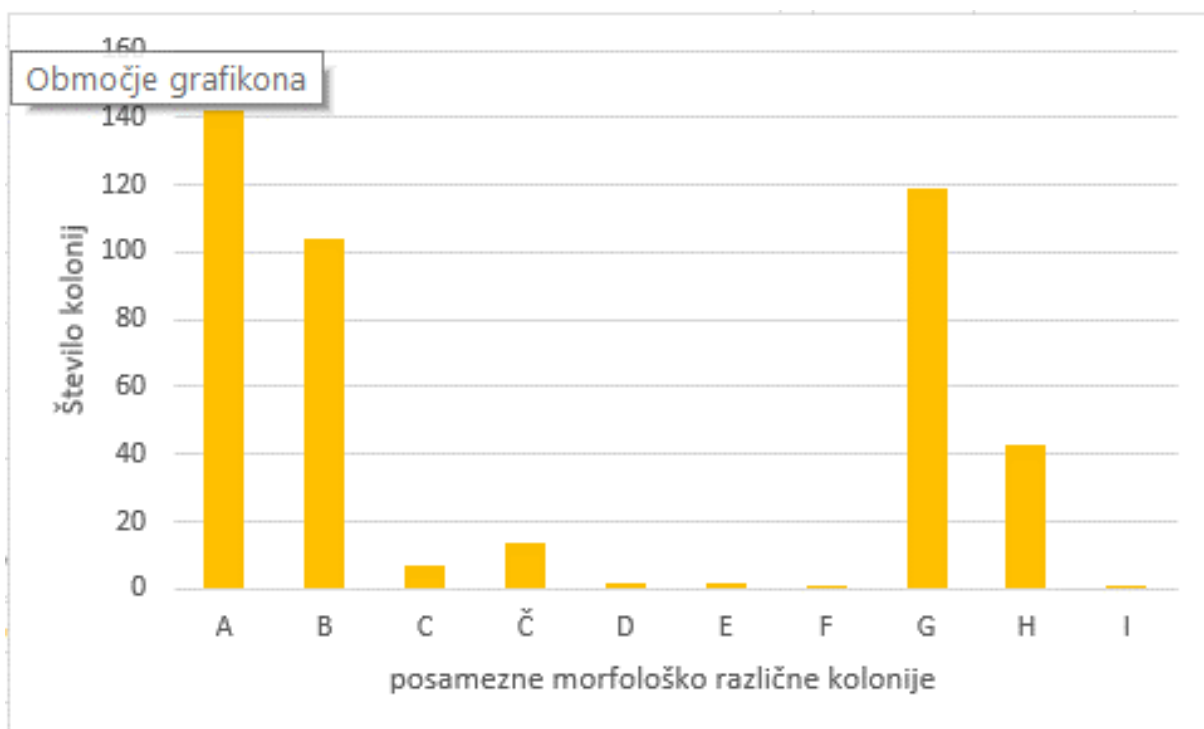


Graf 5: prikaz raznolikost kolonij po številu glede na tip gojišča

ŠTEVILSKA RAZNOLIKOST KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ

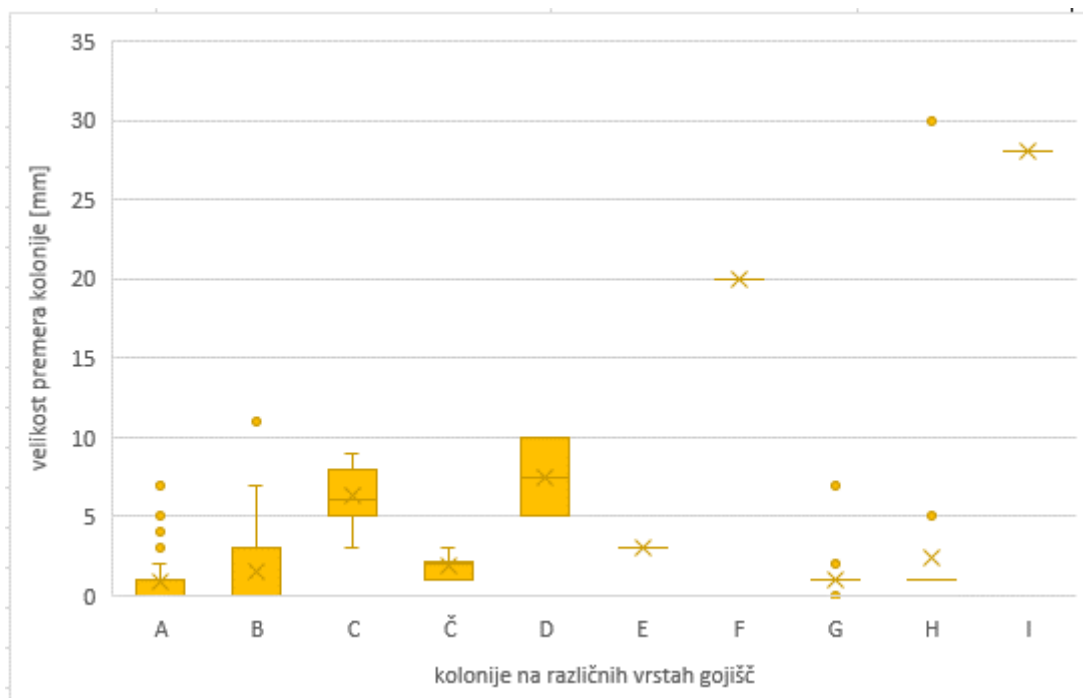
Tabela 6: prikaz raznolikosti v številu kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij

morfološke lastnosti	število kolonij
A	142
B	104
C	7
Č	14
D	2
E	2
F	1
G	119
H	43
I	1

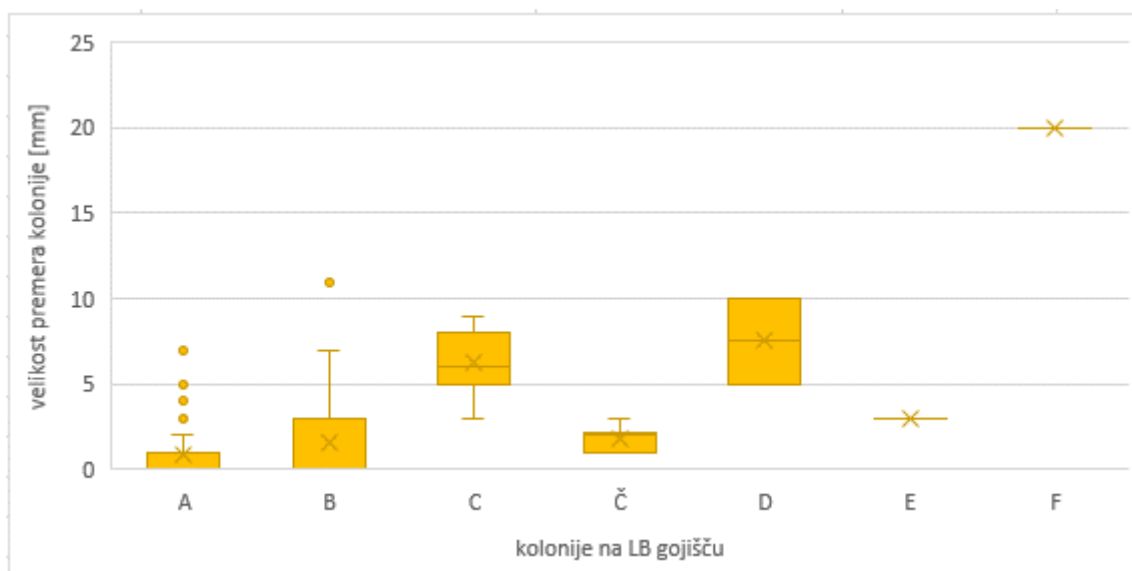


Graf 6: : prikaz raznolikosti v številu kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij

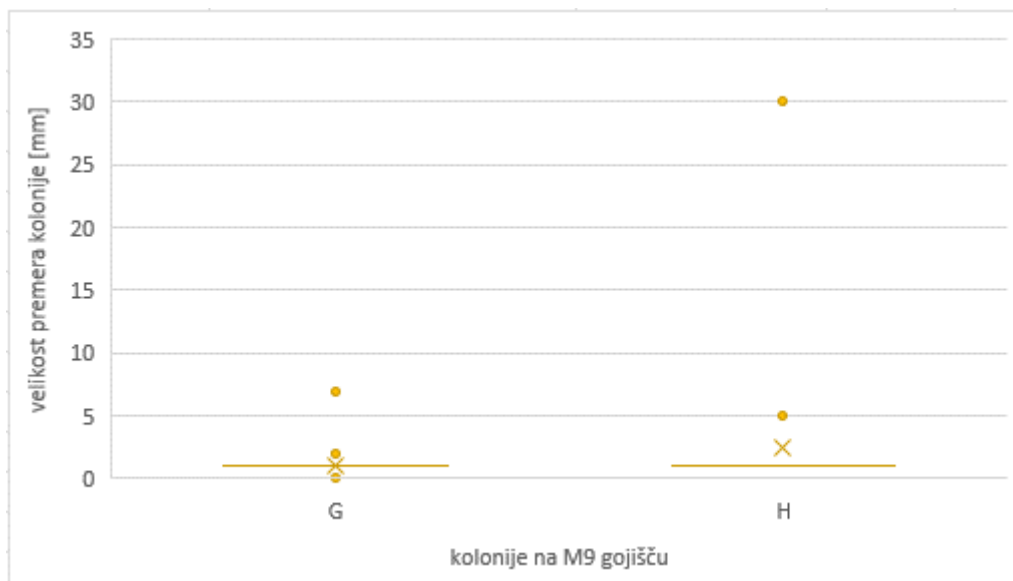
VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA



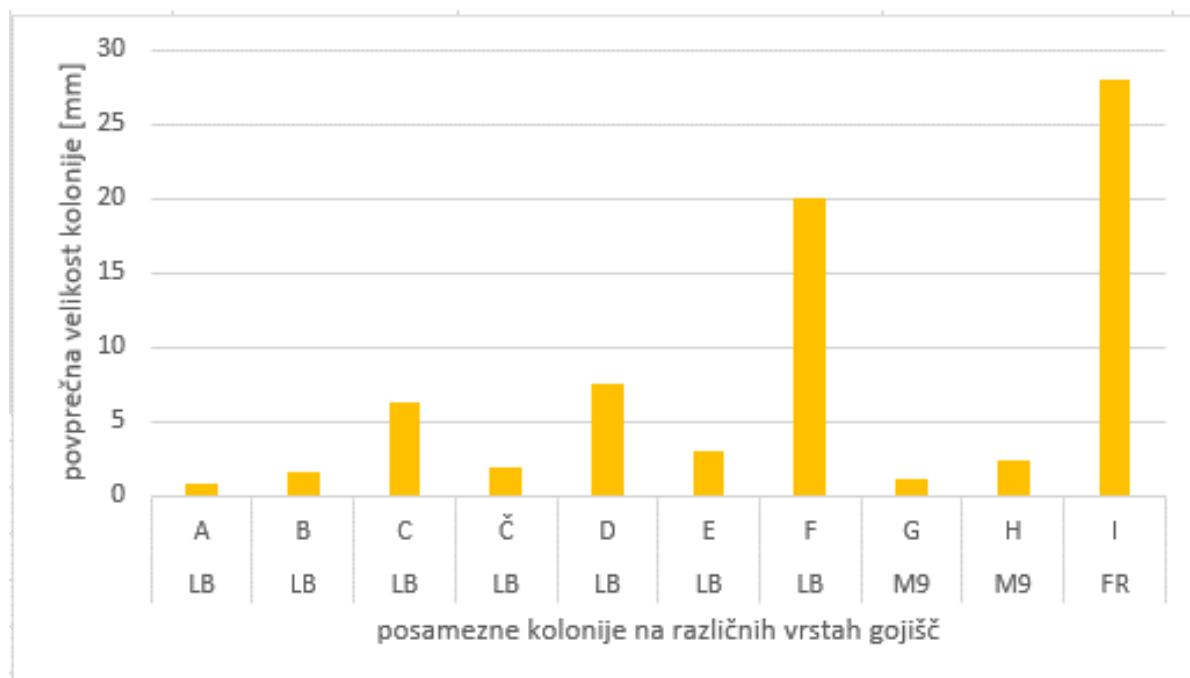
Graf 7: prikaz velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča



Graf 8: prikaz velikosti posameznih kolonij glede na LB gojišče



Graf 10: prikaz velikosti posameznih kolonij glede na M9 gojišče



Graf 9: prikaz povprečne velikosti posamezne kolonije glede na tip gojišča

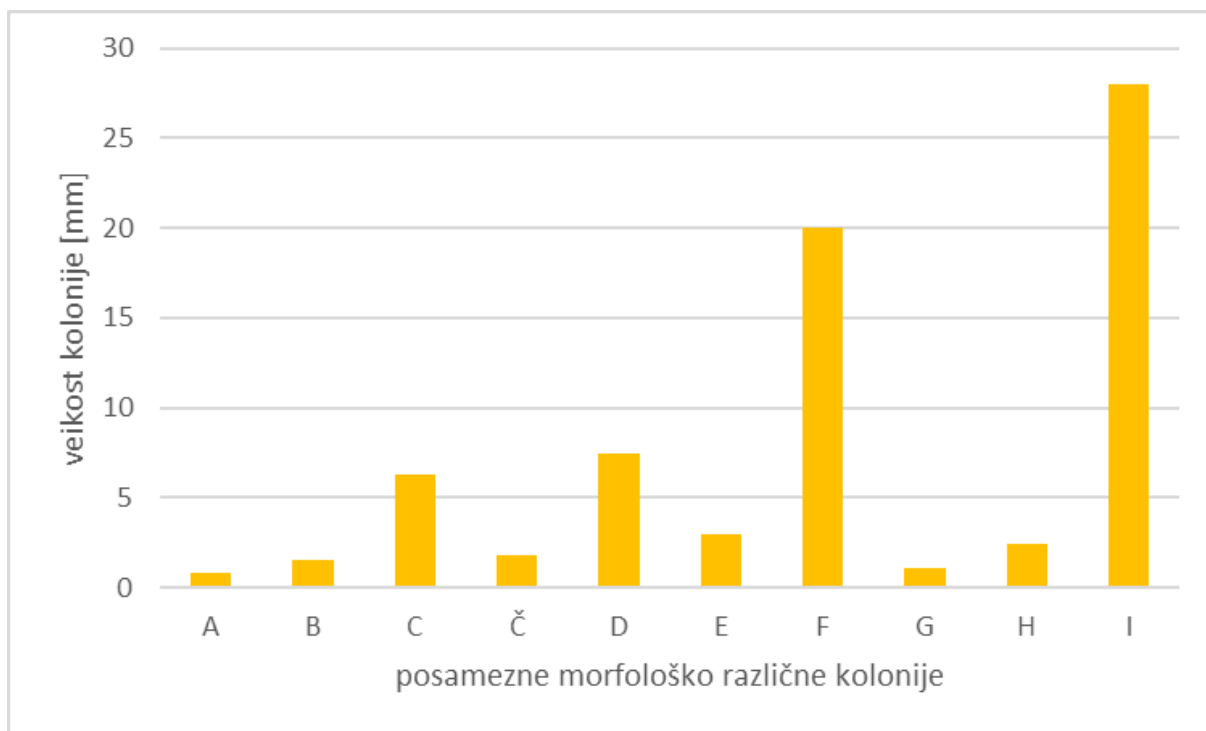
Tabela 7: prikaz povprečne velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča in standardne napake pri merjenju

vrsta gojišča	morfološke lastnosti	povprečna velikost kolonije	standardna napaka
LB	A	0,82	0,128
LB	B	1,51	0,218
LB	C	6,29	0,747
LB	Č	1,82	0,193
LB	D	7,50	2,50
LB	E	3,00	0,00
LB	F	20,00	premalo podatkov
M9	G	1,06	0,052
M9	H	2,42	0,699
FR	I	28,00	premalo podatkov

VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ

Tabela 8: povprečna velikost kolonij glede na njihove morfološke lastnosti

morfološke lastnosti	povprečna velikost kolonij	standardna napaka
A	0,82	0,128
B	1,51	0,218
C	6,29	0,747
Č	1,82	0,193
D	7,50	2,500
E	3,00	0,000
F	20,00	premalo podatkov
G	1,06	0,052
H	2,42	0,699
I	28,00	premalo podatkov



Graf 11: : povprečna velikost kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij

DISKUSIJA

V našem raziskovalnem delu smo se osredotočile na preučevanje pajkovih mrež bolj natančno mikrobov, ki jih poseljujejo. Ker je poznanih veliko vrst pajkovih mrež smo se osredotočile le na ožjo skupino le-te in ji uporabile pri raziskavi.

POVPREČNA VELIKOST KOLONIJ GLEDE NA GOJIŠČE

V grafu 1 je prikazana povprečna velikost kolonij glede na gojišče. Če se prvotno osredotočimo na LB smo predpostavljale, da bo tukaj najbolj ugoDNK rast za mikroorganizme, saj lahko dostopajo do vseh hranil najlažje, saj so hranila že dodana v gojišče. Lahko opazimo, da meri mediana velikosti premera približno 2,0 mm. Iz grafa lahko odčitamo tudi najmanjšo in največjo vrednost. Največja vrednost povprečna velikost kolonije pri LB gojišču je 5 mm. Poleg tega lahko na grafu opazimo tudi pike, ki nakazujejo na večja odstopanja, ki smo jih zabeležile tekom meritev – največja odstopanja torej predstavljajo večjo povprečno velikost kot večina podatkov. Če se sedaj osredotočimo na M9 gojišče, smo bile prvotno mnenja, da bo M9 imel uspešno rast mikroorganizmov, ne pa tako uspešno kot LB, saj vsebuje manj hranil – vsebuje le nujna hranila. Za konec se osredotočimo na FR gojišče. V tem gojišču naj bi rastle le tisti mikroorganizmi, ki so sposobni sami predelati materiale, ki sestavljajo svilo in jo razgraditi v sebi koristne snovi. Če pogledamo velikostno razporeditev kolonij v škatli z brki pri FR gojišču lahko opazimo, da je mediana na približno 2,5 mm. Iz tabele 2 lahko preberemo povprečno velikost kolonij, ki so rastle na posameznem gojišču v posamezni petrijevki. Pri računanju smo upoštevale tudi standardno napako. StandarDNK napaka nam pove, kako natančna je ocena povprečja vzorca v primerjavi s populacijskim povprečjem. Višja kot je standarDNK napaka, manj natančna je ocena povprečja vzorca. StandarDNK napaka nam tudi pomaga določiti, kako zaupanja vredni so podatki, saj višja vrednost standardne napake pomeni večjo stopnjo negotovosti v podatkih.

Če na kratko pokomentiramo še stolpčni graf 2 lahko vidimo, da je največja povprečna velikost kolonij prisotna pri FR gojišču. Tega sicer nismo pričakovali saj smo pričakovali, da bodo največje kolonije zrasle na LB gojišču, saj ta vsebuje največ hranil. Posledično smo predvidevale, da bo na njem zrastle največ kolonij, saj bi tako lahko najlažje izrabljale hranila v mediju. Do takih podatkov je po našem mnenju prišlo zaradi tega, ker je bilo v FR prisotnih veliko gliv, ki so bile po premeru zelo velike v primerjavi z ostalimi kolonijami, ki so se pojavljale na LB in M9. Poleg tega je bilo v treh od petih gojišč s FR neštavno število petrijevk, kar pomeni, da smo bile s podatki omejeni, oziroma, da se je povprečna velikost kolonij računala drugače - ko smo seštevale vse premere kolonij pri FR smo jih delili z manjšim številom kot smo delile pri LB, saj smo imele pri FR manj kolonij zaradi česar je posledično tudi rezultat bil večji. Na LB gojišču smo imele izredno velik seštevok premerov kolonij, ki smo jih delile z velikim številom prešteti kolonij zaradi česar je bil rezultat manjši, zaradi česar pride do odstopanja pri povprečni velikosti kolonij. Ker smo omenile, da je bilo pri FR veliko kolonij neštavnih menimo, da je zaradi tega prišlo do odstopanja, saj če pri preštelev vse kolonije v neštavnih petrijevkah bi dobile večji seštevok premerov kolonij in bi jih posledično za izračunanje povprečne vrednosti delili z večjim številom pri čemer bi dobili manjši rezultat. Zato predvidevamo, da je velikost kolonij na LB še vedno največja, saj smo imeli večjo

številčnost podatkov in če bi upoštevale vse premere neštevnih kolonij bi, vsaj predvidevamo dobile manjšo povprečno velikost kolonij na FR.

POVPREČNO ŠTEVILO KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA

V tabeli 3 je prikazano povprečno število kolonij glede na različne tipe gojišča. Lahko vidimo, da so podatki zbrani za vsa 3 gojišč (LB, M9 in FR) in da so povprečne velikosti kolonij razdeljene na petrijevke.

Na podlagi grafa 3 lahko razberemo, da mediana povprečnega števila kolonij na LB gojišču znaša 45,7 kolonij. Po pričakovanjih smo pričakovale, da bodo kolonije najštevilčnejše na LB gojišču, zaradi lahke dostopnosti hranilnih snovi. Če se osredotočimo na graf 3 na katerem je prikazano povprečno število kolonij na M9 gojišču, lahko vidimo, da mediana meri 80,5. Pričakovale smo, da bodo kolonije na M9 manj številčne kot na LB, saj imajo mikroorganizmi v tem mediju prisotna le esencialna hranila. Na grafu 3 je prav tako pokazano povprečno število kolonij glede na FR gojišče. Na FR gojišču bi po naših pričakovanjih moralo biti najmanj kolonij, saj na FR gojišču lahko rastejo in razvijejo le tisti mikroorganizmi, ki lahko presnavljajo pajkovo svilo.

Nazadnje se zazrimo še v graf 4, ki stolpčno prikazuje povprečno število petrijevk na posamezno vrsto gojišča. Kot lahko razberemo iz grafa 4 lahko vidimo, da naj bi po podatkih največje število kolonij dobili na M9 gojišču. Dejanski rezultati pa le niso čisto taki. Pri M9 gojišču je treba upoštevati, da sta bili 2 od 4 petrijevk neštevnih. Poleg tega lahko iz tabele 3 razberemo, da je povprečje kolonij na M9 gojišču v prvi petrijevki prišlo 8 kolonij, medtem ko jih je bilo na drugi 153. Glede na to, da je ta razpor med številčnostjo kolonij na obeh petrijevkah, je tako logično, da bo povprečje teh dveh števil veliko število.

Če se za nekaj časa osredotočimo še na hipoteze lahko hipotezo 1 (Na LB gojišču bo največje število kolonij mikroorganizmov) ovržemo, saj smo kljub našim pričakovanjem, da bo na LB zraslo največ kolonij, saj naj bi bil ta najbolj napolnjen z hranili in tako najbolj ugoden za razmnoževanje, opazili da je večje število kolonij prisotnih na M9 gojiščih. To lahko potrdimo na podlagi grafa 3 in grafa 4, na katerem se lepo vidi, da je povprečno število kolonij na M9 80,5 na LB pa 45,7. Na podlagi tega lahko prav tako ovržemo hipotezo 2 (Na M9 gojišču bo manjše število kolonij mikroorganizmov, vendar večje kot na FR gojišču), saj smo že prejšnji hipotezi ugotovili, da se pridobljeni podatki ne skladajo s prej postavljeno hipotezo. Vidimo da je večje število kolonij (povprečno 80,5) na M9 mediju kot na LB (povprečno 45,7). Hipotezo 3 (na FR gojišču bo najmanjše število kolonij mikroorganizmov) pa lahko potrdimo, saj na podlagi podatkov na grafih 3 in 4 lahko vidimo, da je v primerjavi z M9 gojiščem in LB gojiščem na FR gojišču zraslo daleč najmanj kolonij.

ŠTEVILSKA RAZNOLIKOST KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA

V tabeli 4 so prikazane vrste kolonije in povprečno število kolonij na posameznem gojišču. Ugotovile smo, da se je največ kolonij pojavilo na LB gojišču najmanj pa na LB in FR gojišču. Na grafu 5 smo prikazale raznolikost kolonij po številu glede na tipe gojišča. Z njega lahko preberemo, da je na LB gojišču največ kolonij vrste A, tej sledi vrsta B, nato C, D in E, ki imata enako vrednost (2) in F, ki ima najmanjšo vrednost kolonij. Na gojišču M9 ima največjo vrednost kolonije G in najmanjšo kolonije H, medtem ko na FR imamo samo eno kolonijo z

oznako I. Kolonije tipa A so po izgledu, izbočene, gladke in mlečno bele barve. Vonj imajo po gnojilu. Kolonije tipa B so nepravilne oblike, ki je rahlo vlaknasta, izbočena, trda in oranžno - rjave barve. Vonj imajo isti kakor kolonije tipa A. Kolonije tipa C so vlaknaste, gladke, sploščene in sluzaste. So rjavkaste barve in imajo vonj po gnojilu. Kolonija tipa Č so rahlo nepravilne oblike, rumene barve, izbočene, valovite, prav tako pa trdne in motne. Njihov vonj je enak predhodnim kolonijam - vonj po gnojilu. Kolonije tipa D so nepravilne oblike, belo - sive barve, prav tako so hrapave, izbočene, trdne ter valovite. Kolonija tipa E so glede na izgled nepravilne, vlaknaste, gladke, izbočene in motne. So bež barve in vonj imajo po gnilobi. Kolonije tipa F so sivkaste barve, hrapavega in motnega izgleda, ter vonja po gnojilu. Kolonije tipa G se od kolonij tipa E razlikujejo le v črno - rjavi barve, izbočenosti in v tem, da imajo vonj po vlagi. Vonj po vlagi imajo tudi kolonije tipa H, ki so po izgledu pikčaste, zelene, hrapave, izbočene in zrnate. Unikaten vonj imajo tudi kolonije tipa I, in sicer vonj po soli. Na izgled so križaste, sploščene in prosojne, njihova barva pa je bela. Če se torej vrnemo na graf 5, lahko z njega odčitamo, da je na gojišču LB zraslo največ kolonij, ki so po izgledu razvajene gladke in mlečno bele barve (tip A), najmanj pa kolonij, ki so hrapave in sive barve (tip F). Na M9 gojišču je zraslo največ kolonij tipa G, najmanj pa kolonij tipa H. Na FR gojišču so zrasle kolonije križastega, sploščenega, prosojnega in belega izgleda (tip I), ki imajo Intenziven vonj po soli, kateremu prispeva tudi samo gojišče.

ŠTEVILSKA RAZNILIKOST KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ

Iz tabele 5 lahko razberemo morfološke lastnosti in število kolonij, ki so bile prikazane na naših treh gojiščih. Morfološke lastnosti so iste, kakor iz prejšnjega dela diskusije, prav tako pa tudi število kolonij. Kakor že omenjeno, so najbolj uspešno zrasle kolonije tipa A, najmanj uspešno pa so zrasle kolonije tipov F in I. To bi se lahko zgodilo zaradi vzorca, ki je lahko na sebi ali v sebi imel zelo majhno število omenjenih mikroorganizmov z opisanimi morfološkimi lastnostmi. Iz tabele 5 je razvidno, da je na naših vzorcih bilo prisotno največ kolonij tipov A, G in B, ki so se pa na različnih gojiščih razmnoževale drugače, zato so tudi naši podatki raznoliki. Najmanj uspešne so pri namnoževanju bile kolonije tipov F, I, D in E. Kolonije tipov C, Č in H so na gojiščih zrasle v srednjih vrednostih, kar nam pa vseeno pokaže, da so se uspele razmnoževati in uporabiti pajkovo mrežo kot substrat. Na grafu 6 lahko opazimo odstopanja različnih tipov morfoloških lastnosti glede na število kolonij. V primerjavi števila kolonij tipa A in B je ta navidezno manjši, kot če primerjamo kolonije tipa A in F, kjer je razlika števila kolonij glede na morfološke lastnosti drastično večja. Prav tako če primerjamo kolonije, ki so zrasle na gojišču M9 (tipa G in H) je njuna razlika zelo očitna, vendar še zmeraj ne toliko, kakor v prejšnji primerjavi, naj gojišču LB. Kolonije z gojišča FR med seboj ne moremo primerjati, zaradi pridobljenih podatkov, lahko pa jo primerjamo z drugima dvema gojiščema. V primerjavi kolonij tipa A in tipa I, tipa B in tipa I in tipa G in tipa I, je razlika zelo razvidna, kakor v primerjavi kolonij tipa D in tipa I, tipa E in tipa I, kjer razlika skorajda ni razvidna, vendar s pomočjo tabele 5, izvemo, da je ta zelo majhna. Prav tako na grafu 7 lahko opazimo, da sta si tip F in tip I morfoloških lastnosti zelo podobna, in če ta podatek preverimo v tabeli 5 izvemo, da sta pravzaprav ista. Na osnovi povedanega lahko 4., 5. in 6. hipotezo potrdimo.

VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA TIP GOJIŠČA

Velikost posameznih kolonij glede na tip gojišča lahko preberemo z grafa 7. Kolonije z morfološki lastnostmi tipa A so v povprečju velike, približno 2 milimetra. Na grafu 7 opazimo tudi pikice, ki so znak odstopanj. V primerjavi z tipom B je odstopanj pri tipu A zelo veliko. Tip B ima najnižjo vrednost in prvi kvartil v ničli, povprečno vrednost v 1,5 in tretji kvartil v približno 3. Črtica, ki izhaja iz škatle, in je usmerjena navzgor, je odstopanje najvišje vrednosti od tretjega kvartila. Pri tipu C je prvi kvartil v 5, tretji v 7, povprečna vrednost pa v 6. Pri tipu C imamo odstopanja, ne samo od najvišje, temveč tudi od najnižje vrednosti. Tip Č je zelo podoben tipu A, razlika je le v tem, da ima tip Č nekoliko višji prvi kvartil, in s tem avtomatsko višje postavljeno škatlo z brki. Prav tako tip Č nima odstopanja. Škatla z brki pri tipu D odstopanja nima, prav tako pa sta najnižja vrednost in prvi kvartil enaka, isto kakor tretji kvartil in najvišja vrednost. Tipi morfoloških lastnosti E, F, G in I, imajo povprečne vrednosti, prve in tretje kvartile in najvišje in najnižje vrednosti v istih točkah, ki so zelo lepo razvidne z grafa 7. Tip H je nekoliko drugačen od ostalih, saj ima povprečje vrednost višjo kakor vse ostane vrednosti, ki pa so v isti točki. Iz tega lahko sklepamo, da sta odstopajoča podatka zelo spremenila povprečno vrednost. Velikost posameznih kolonij na LB gojišču (graf 8) je ista kakor v zgornjem primeru. Pri tipu A je največ odstopanj, temu sledi tip B, ter nato vsi ostali. Najbolj primerno škatla z brki opazimo pri tipu C, iz katere lahko preberemo vsak podatek. Ostali tipi (razen tipa F) so nekoliko bolj zahtevni za branje, kar pa ne pomeni, da niso berljivi. Tip F ima svojo vrednost v številki 20, ki je njegova povprečna vrednost, prvi in tretji kvartil in najmanjša in največja vrednost. Uprizoritev podatkov na grafu Velikost posameznih kolonij na M9 gojišču (graf 9) je na izgled skorajda identična. Kolonije tipa G, imajo povprečno vrednost, prvi in drugi kvartil in najnižjo in najvišjo vrednost v isti točki, z zelo majhnimi odstopanji, ki ne spremenijo povprečne vrednosti. To se ne zgodi pri tipu H, pri katerem povprečna vrednost, zaradi podatkov ki odstopajo, tudi sama nekoliko izstopa od v prvih treh kvartilov. Iz tabele 6 lahko opazimo povprečne velikosti posameznih kolonij glede na tip gojišča in standardne napake pri merjenju. Pri LB gojišču je v povprečju največja kolonija, kolonije tipa F. Takoj za njo izsledijo kolonije tipa D in C. Omenjene kolonije imajo povprečna velikost večjo od 5 milimetrov. Ostale kolonije, ki so se pojavila na LB gojišču imajo povprečne velikosti manjše ali enake 3. StandarDNK napaka je bila največja pri tipu D in je znašala 2,50. Najmanjša standarDNK napaka je bila pri tipu E, in sicer 0,00. Na M9 gojišču smo imeli le dva tipa kolonij (G in H). V povprečju so bile večje kolonije tipa H, s standardno napako 0,699, večje. Nekoliko manjšo standardno napako je imel tip G (0,052), vendar je pa imel tudi manjša povprečno velikost kolonij, ki je znašala 1,06 milimetra. Na gojišču fiziološke raztopine je bila povprečna velikost kolonij tipa I 28 milimetrov. To je obenem največja vrednost iz tabele 6. Na grafu 10 je prikazana povprečna velikost posamezne kolonije glede na tip gojišča. Na njemu je izredno lepo vidno, da je v povprečju največjo velikost kolonij imel tip I, sledi pa mu tip F. Tipa D in C sta si tudi na grafu zelo podobna. Najmanjše vidne vrednosti z grafa imata tip A in tip G, ki znašata v povprečju manj kot 1,7 milimetra.

VELIKOST POSAMEZNIH KOLONIJ GLEDE NA MORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ

Izmed vseh vrednosti iz tabele 7 ima najvišjo povprečno velikost kolonij tip I. Temu sledi tip F. Najnižja vrednost povprečne velikosti kolonij ima tip A, in sicer 0,82 milimetra. Iz grafa

povprečnih velikosti kolonij glede na morfološke lastnosti kolonij (graf 11) opazimo, da sta si tipa A in G zelo podobna. S pomočjo tabele pa izvemo, da je tip G nekoliko večji od tipa A. Omenjenima tipoma sledijo tipi B, Č, H in E, ki jih lahko definirano kot srednje vrednosti uspelih kolonij. Srednje - velike in podobne velikosti imata tipa C in D, katerih razlika je, v povprečju, 1,21 milimetra. Največjo uspešnost pa zagotovo predstavljata tipa F in I, ki sta večja ali enaka 20 milimetrov.

ZAKLJUČEK

V naši raziskovalni nalogi smo se odločili preveriti, kateri organizmi kot substrat izrabljajo hranila iz pajkovih mrež. Namen raziskave je bil ugotoviti, katere vrste mikroorganizmov bodo rastle na pajkovih mrežah, kakšne so njihove morfološke lastnosti, koliko jih bo... Z raziskovanjem smo prišli do rezultatov, ki so bili pričakovani in nekateri že predvideni s hipotezami. Uporabljali smo različne postopke : nabiranje mreže, priprava gojišč, nacepljanje na gojišče, izolacija DNK. Kot zadnji korak je bila predvidena še PCR metoda s katero bi natančno določili vrste mikrobov, vendar tega nismo izvedle, ker nismo imele potrebnega materiala za izvedbo postopka. Ključni sklepi naše raziskovalne naloge so, da je na LB gojišču zraslo največ mikroorganizmov, ker to gojišče vsebuje tudi največ hranil, najmanj jih je zraslo na FR gojišča, kar je tudi pričakovano, saj je to gojišče z najmanj hranili. Ker je na FR gojišču zraslo najmanj mikroorganizmov, bi lahko predvidevali da je pajkova mreža podoben substrat kot je FR gojišče. Da bi to potrdili oziroma ovrgli bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

PREDLOGI NADALJNEGA DELA

Tekom raziskovalnega naloge smo raziskovale katere mikroorganizmi, če sploh kakšne, lahko najdemo prisotne na pajkovi mreži oz. pajkovi svili. Tekom samega poskusa smo ugotovili, da so na pajkovi svili prisotni mikroorganizmi, vendar smo jih lahko določili le na podlagi njihovih morfoloških lastnosti. Samo ta metoda je premalo učinkovita, da bi lahko trdili kateri mikroorganizmi se nahajajo na mreži. Da bi poglobile svojo raziskovalno nalogo smo se lotile izolacije DNK mikroorganizmov, ki so pokazali, da lahko izrabljajo pajkovo svilo kot substrat za rast, razvoj in razmnoževanje. Zaradi omejenosti s časom in pomankanja materialnih potrebščin smo uspele DNK le izolirati, nismo pa ga morale uporabiti za analizo v PCR. Kot nadaljevanje projektne naloge bi lahko za boljšo identifikacijo mikroorganizmov, ki presnavljajo pajkovo svilo uporabile PCR metodo in prišle do bolj konkretnih, specifičnih rezultatov. Mikroorganizem bi lahko določile tako, da bi mi našle gen in tako bi vedele kateri vrsti pripada. Če poznamo zaporedje nukleotidov v iskanem genu lahko v laboratoriju sintetiziramo komplementarno zaporedje, ki je nasprotno usmerjeno in ga označimo tako, da nanj vežemo posebno barvilo. Tako postane to naša sonda DNK. Tako se bo sonda DNK ujemala samo z DNK tistega mikroorganizma, ki ima komplementarno zaporedje. Na ta način bi lahko še podrobneje določile vrste mikroorganizmov na pajkovih mrežah oz. svilah.

LITERATURA

SPLETNI VIRI

FanciesOnline. *The elaborate structure of spider silk* [online]; Lin Römer in Thomas Scheibel; 20. november 2008 [obnovljeno 26. novembra 2012]; dostopno na: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/pri.2.4.7490> .

Journal of experimental biology. *Nitrogen inaccessibility protects spider silk from bacterial growth* [online]; Shichang Zhang , Dakota Piorkowski, Wan-Rou Lin, Yi-Ru Lee, Chen-Pan Liao, Pi-Han Wang, I-Min Tso; 23. oktober 2019; dostopno na: <https://journals.biologists.com/jeb/article/222/20/jeb214981/224483/Nitrogen-inaccessibility-protects-spider-silk-from> .

JSTOR. *Spider Webs and Silks* [online]; Scientific American, a division of Nature America, Inc; 1992; dostopno na: <https://www.jstor.org/stable/24938983> .

National center for biotechnology informatoin. *Biological responses to spider silk-antibiotic fusion protein* [online]; Dr. Sílvia Gomes, Dr. Jabier Gallego-Llamas, Dr. Isabel B. Leonor, João F. Mano, Prof., Rui L. Reis in David L. Kaplan; 29. junij 2011; dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335770/> .

National center for biotechnology informatoin. *Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era* [online]; Todd A. Blackledge, Nikolaj Scharff, Jonathan A. Coddington, Tamas Szüts, John W. Wenzel, Cheryl Y. Hayashi in Ingi Agnarssona; 31. marec 2009; dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656561/> .

Royal society of chemistry. *Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins* [online]; Markus Heim , Lin Römer in Thomas Scheibel; 16th October 2009 [posodobljeno 5th January 2010]; dostopno na: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b813273a> .

Sci-hub. *Uncovering the structure–function relationship in spider silk* [online]; Jeffery L. Yarger, Brian R. Cherry in Arjan van der Vaart; 2018; dostopno na: <https://sci-hub.se/10.1038/natrevmats.2018.8> .

ScienceDirect. *Antimicrobial coating of spider silk to prevent bacterial attachment on silk surgical sutures* [online]; Albina R. Franco, Emanuel M. Fernandes, Márcia T. Rodrigues, Fernando J. Rodrigues, Manuela E. Gomes, Isabel B. Leonor, David L. Kaplan in Rui L. Reis; 9. maj 2019 [posodobljeno 9. september 2019]; dostopno na <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1742706119306166> .

ScienceDirect. *Decoding the secrets of spider silk* [online]; Lukas Eisoldt, Andrew Smith in Thomas Scheibel; 5. marec 2011; dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702111700578> .

ScienceDirect. *The myth of antibiotic spider silk* [online]; Simon Fruergaard, Marie Braad Lund, Andreas Schramm, Thomas Vosegaard in Trine Bilde; 16. junij 2021; dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004221010932> .

The royal society. *Social spider webs harbour largely consistent bacterial communities across broad spatial scales* [online]; Carl N. Keiser, Tobin J. Hammer in Jonathan N. Pruitt; 25. september 2019; dostopno na: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsbl.2019.0436> .

VIRI KNJIG:

- Hillyard P. The private life of spiders. London: New Holland Publishers; 2007.
- Marinko T. Pajki. Celje: samozaložba; 2015.
- Preston-Mefham R. in K. Spiders of the world. London: Cassell; 1993.

VIRI SLIK:

AUSTRALIAN MUSEUM. 2016. *Diagram of male spider* [online]. Dostopno na: <https://australian.museum/learn/species-identification/ask-an-expert/what-is-a-spiders/> (8.11.2022)

CHERRY R. BRIAN. 2018. *The molecular structure of spider silk* [online]. Dostopno na naslovu: <https://www.nature.com/articles/natrevmats20188> (12.11.2022).

CHERRY R. BRIAN. 2018. *Spider dragline silk* [online]. Dostopno na naslovu: <https://www.nature.com/articles/natrevmats20188> (13.11.2022).

DUSTAWAY. 2018. *Wrap-Around Spiders' Seamlessly Camouflage Into Their Surroundings* [online]. Dostopno na: <https://mymodernmet.com/wrap-around-spiders-dolophones/> (13.11.2022)

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA. 2013. *spider: trichobothrium* [online]. Dostopno na: <https://www.britannica.com/animal/spider-arachnid/Nervous-system-and-senses> (7.11.2022)

FRONTIERSIN. 2020. *Comparison between spider silk and Kevlar fibers* [online]. Dostopno na naslovu: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00554/full> (13. 11. 2022).

GIL WIZEN. 2022. *Spinning the cradle* [online]. Dostopno na: <https://gilwizen.com/invertebrates/arachnida/spiders/> (15.11.2022)

GUS GARCIA. 2019. *Spooky Spider hanging down from spider web showing close up details of multiple spikes on spider body* [online]. Dostopno na: <https://www.shutterstock.com/search/spiked-spider> (13.11.2022)

JASON7825. 2014. *The spinneret of an Australian garden orb weaver spider (Eriophora transmarina)* [online]. Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Spinneret> (8.11.2022)

JOHN HENRY COMSTOCK. 2011. *Spider internal anatomy* [online]. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Pajki> (5.11.2022)

MARINKO TONE. 2015. *zgradba in videz* [skenirano iz knjige]. str.: 3 (5.11.2022)

MARINKO TONE. 2015. *po obliki so žleze*. Predilne bradavice in žleze [skenirano iz knjige]. str.: 6 (5.11.2022)

MDPI. ASAKURA TETSUO. 2020. *Schematic overview of seven types of spider silks* [online]. Dostopno na naslovu: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/11/2634> (13. 11. 2022).

NEW YORK TIMES. 2018. *How spiders fly* [online]. Dostopno na: <https://www.nytimes.com/2018/06/26/science/spiders-ballooning-wind.html> (15.11.2022)

- RAINER FOELIX. 2010. *Mesothelae have venom glands* [online]. Dostopno na naslovu: https://www.researchgate.net/figure/Figures-7-9-Venom-glands-in-Liphistius-bicoloripes-7-Dissection-of-a-chelicera-showing_fig3_259855147 (15.11.2022)
- SPIDER IDENTIFICATIONS. 2018. *Parts of spider* [online]. Dostopno na: <https://spideridentifications.com/spider-facts/parts-of-a-spider> (5.11.2022)
- THOMAS SHAHAN. 2016. *The different types of spider eye arrangements* [online]. Dostopno na: https://www.reddit.com/r/spiders/comments/mp5x1e/the_different_types_of_spider_eye_arrangements/ (5.11.2022)
- TOMATITO. 2017. *Spider is taking care of its eggs* [online]. Dostopno na: <https://www.shutterstock.com/search/spider-eggs> (15.11.2022) NEW YORK TIMES. 2018. How spiders fly [online]. Dostopno na: <https://www.nytimes.com/2018/06/26/science/spiders-ballooning-wind.html> (15.11.2022)
- VLADIMIR OVTSHARENKO & ANDREI TANASEVITCH. 2002. *The six spinnerets in three rows* [online]. Dostopno na: <https://research.amnh.org/iz/blackrock2/key.htm> (7.11.2022)
- WIKIPEDIA. 2017. *Schematic of the spiders spinning apparatus and structural hierarchy in silk assembly into fibers* [online]. Dostopno na naslovu: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SIA_spider_silk_Fig1.png (12.11.2022).
- ZHAO YUE. 2016. *Schematic of the spider's orb web, structural modules, and spider silk structure* [online]. Dostopno na naslovu: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0.Figure.png> (12.11.2022). <https://www.aithm.jcu.edu.au/funnel-web-spider-venom-could-help-treat-melanoma/>

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo svojim mentorjema, zunanjemu mentorju asist. Timu Prezlju, mag. mol. funkc. biol. in šolskemu mentorju, doc. dr. Mihi Slapničarju, prof. kem., biol.

Za pomoč in usmeritev pri pisanju projektnega dela, podporo in strokovno pomoč ter spodbudne besede pri izdelavi projektnega dela pri predmetu biotehnologije. Zahvaljujemo se dr. Metodu Kovačiču za dobavo potrebnega materiala in omogočeno delo v laboratoriju ter Tjaši Klemen, mag. bioteh., ki nam je omogočila sodelovanjem z zunanjim mentorjem.

Iskreno se zahvaljujemo tudi ravnateljici, gimnazije in veterinarske šole BIC Ljubljana, Marjani Mastinšek Šuštar, ker je omogočila sodelovanje s Pedagoško fakulteto Univerze v Ljubljani.

Zahvala gre Centru KemikUm Univerze v Ljubljani, Pedagoške fakultete.

Raziskavo je podprl ERASMUS+ projekt 'Diversity in Science toward Social Inclusion – Non-formal Education in Science for Students' Diversity (DiSSI)' (612103-EPP-1-2019-1-DE-EPPKA3-IPI-SOC-IN), ki ga financira Evropska Unija.