

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sandra ŽULIČ

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH  
NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV REDU  
DOTHIDEALES IN IZBRANIH KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sandra ŽULIČ

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH  
NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV REDU  
DOTHIDEALES IN IZBRANIH KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN AQUEOUS  
EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT  
FUNGI FROM THE ORDO DOTHIDEALES AND SELECTED  
YEASTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov in Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Komisija za študijske zadeve univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je za mentorico imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico prof. dr. Kristino Sepčič in recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor ANDERLUH  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPCIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: \_\_\_\_\_

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sandra Žulič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- UDK 577.2:582.28 (043.2) = 163.6
- KG halofilne in halotolerantne glive/vodni ekstrakti/biološko aktivne snovi/hemoliza/hemaglutinacija/inhibicija acetilholinesteraze/protibakterijska aktivnost/lektini
- AV ŽULIČ, Sandra
- SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentor)/SEPČIČ, Kristina (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2013
- IN BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV IZ REDU DOTHIDEALES IN IZBRANIH KVASOVK
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 54 str., 9 pregl., 12 sl., 49 vir.
- IJ sl
- Jl sl/en
- AI Pred desetletjem so raziskovalci odkrili halofilne in halotolerantne glive, ki so se zmožne prilagoditi na širok spekter koncentracij slanosti. Ta skupina gliv, ki živi v skrajno slanih okoljih, je še slabo raziskana, in zato lahko predstavlja še neodkrit vir potencialno zanimivih biološko aktivnih spojin. V naši diplomski nalogi smo se osredotočili na vpliv slanosti gojišč na produkcijo vodotopnih biološko aktivnih snovi ter iskanje aktivnih spojin v vodnih ekstraktih gliv. Izbrali smo 36 različnih vrst gliv, ki pripadajo redu *Dothideales* in izbranim kvasovkam, izoliranim iz različnih okolij Arktike in solin. Ugotovili smo, da številni vodni ekstrakti vsebujejo biološko aktivne spojine, ki bi lahko bile potencialno farmakološko uporabne. Najbolj zanimiv za nadaljne raziskave je vrsta redu *Fusarium sp.*, ki je kazala šibko protibakterijsko aktivnost proti *Bacillus subtilis*, ter hemaglutinacijsko aktivnost. Slanost je na bioaktivnost pri tej vrsti vplivala zaviralno. Sol v gojišču je hemaglutinacijo zavirala tudi pri sevu kvasovke vrste *Cryptococcus liquefaciens*, kjer je bila aktivna snov verjetno proteinskega izvora. Pri sevu črne kvasovke vrste *Aureobasidium pullulans* pa je sol v gojišču spodbujala sintezo hemaglutinizirajočih snovi. Hemaglutinacijska aktivnost seva *Aureobasidium pullulans* še ni bila opisana. Biološko aktivne vodotopne spojine, ki so povzročile hemaglutinacijo, so verjetno lektini.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- UDC 577.2:582.28 (043.2) = 163.6
- CX halophilic and halotolerant fungi/aqueous extracts/biologically active compounds/  
hemolysis/hemagglutination/acetylcholinesterase inhibition/antibacterial activity/  
lectins
- AU ŽULIČ, Sandra
- AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/SEPČIČ, Kristina (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2013
- TI BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN AQUEOUS EXTRACTS OF  
SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI FROM THE ORDO  
DOTHIDEALES AND SELECTED YEASTS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 54 p., 9 tab., 12 fig., 49 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB A decade ago, researchers have discovered halophilic and halotolerant fungi, that are able to adapt to a wide range of salt concentrations. These fungi, living in extremely saline environments, have not yet been extensively investigated. It is assumed that they might produce yet undiscovered, potentially interesting biologically active compounds. Our thesis is, accordingly, focused on searching for these compounds in their aqueous extracts and the influence of salt on their production. We chose 36 strains of fungi belonging to different species of the order *Dothideales* and to selected species of yeasts, isolated from different environments, ranging from Arctic to salterns. We discovered that many extracts contain biologically active compounds, which might be used in pharmacology. It turned out that the most interesting genus species for further research is *Fusarium sp.*, which had a mild inhibitory effect on Gram positive *Bacillus subtilis* as well as hemagglutinating activity. Addition of salt in the growth medium seemed to prevent any kind of biological activity of genus *Fusarium sp.*, as well as on the strain of yeast species *Cryptococcus liquefaciens*, which lost its hemagglutinating potential. However, that was not the case with the strain of black yeast species *Aureobasidium pullulans*, where salt in the growth medium seemed to induce synthesis of hemagglutination-promoting molecules. Hemagglutinating activity, exerted by the strain *Aureobasidium pullulans*, had not yet been described. Bioactive water-soluble compounds triggering hemagglutination, are most probably lectins.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI) .....	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine .....	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VIII
Seznam okrajšav .....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....</b>	<b>4</b>
2.1 NAMEN DELA.....	4
2.2 HIPOTEZE .....	4
<b>3 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>5</b>
3.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI GLIV .....	5
3.2 SEKUNDARNI METABOLITI GLIV .....	5
3.3 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV ...	6
<b>4 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>12</b>
4.1 SEZNAM GLIV .....	12
4.2 PRIPRAVA GOJIŠČ IN RAZTOPIN .....	13
4.3 KEMIČALIJE .....	15
4.4 LABORATORIJSKA OPREMA.....	15
4.5 METODE DELA.....	16
<b>4.5.1 Gojišča in pridobivanje biomase.....</b>	<b>16</b>
<b>4.5.2 Priprava vodnih ekstraktov.....</b>	<b>17</b>
<b>4.5.3 Določanje koncentracije suhe snovi v vzorcih .....</b>	<b>18</b>
<b>4.5.4 Določanje koncentracije proteinov v vzorcih.....</b>	<b>18</b>
<b>4.5.5 Testi za določanje biološke aktivnosti.....</b>	<b>19</b>
4.5.5.1 Hemaglutinacijski test.....	19
4.5.5.2 Test protibakterijske aktivnosti .....	19
4.5.5.3 Test inhibicije encima acetilholinesteraze.....	20
4.5.5.4 Hemolitični test .....	20

<b>5</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>22</b>
5.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV IN EKSTRAHIRANE SUHE SNOVI V VZORCIH .....	22
<b>5.1.1</b>	<b>Proteini.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Suha snov.....</b>	<b>24</b>
5.2	REZULTATI TESTOV HEMAGLUTINACIJE .....	29
5.3	REZULTATI TESTA PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI .....	33
5.4	REZULTATI TESTA INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE.....	34
5.5	REZULTATI TESTA HEMOLIZE.....	34
<b>6</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>35</b>
6.1	RAZPRAVA.....	35
<b>6.1.1</b>	<b>Primerjava biološke aktivnosti vodnih in organskih vzorcev.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Primerjava biološke aktivnosti vodnih vzorcev .....</b>	<b>37</b>
6.1.2.1	Protibakterijska aktivnost .....	37
6.1.2.2	Hemaglutinacija .....	38
<b>6.1.3</b>	<b>Primerjava koncentracij proteinov v vodnih vzorcih.....</b>	<b>39</b>
6.1.3.1	Primerjava koncentracij proteinov v vzorcih glede na druge parametre gojenja... 39	
6.1.3.1.1	Nizka temperatura gojenja .....	39
6.1.3.1.2	Visoka koncentracija glukoze v gojišču.....	40
<b>6.1.4</b>	<b>Primerjava koncentracij suhe snovi v vodnih vzorcih .....</b>	<b>41</b>
6.1.4.1	Primerjava koncentracij suhe snovi v vzorcih glede na druge razmere v gojišču .41	
6.1.4.1.1	Visoka koncentracija glukoze v gojišču.....	41
6.1.4.1.2	Nizka temperatura gojenja .....	43
6.2	SKLEPI.....	44
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>49</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1:	Podatki iz literature o odkritih naravnih učinkovinah izoliranih iz izbranih rodov morskih gliv..... 8
Pregl. 2:	Seznam uporabljenih sevov iz zbirke EXF Katedre za biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo in MZKI iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta..... 12
Pregl. 3:	Seznam uporabljenih kemikalij ..... 15
Pregl. 4:	Seznam uporabljene laboratorijske opreme ..... 15
Pregl. 5:	Koncentracije proteinov v surovih glivnih ekstraktih..... 22
Pregl. 6:	Koncentracije suhe snovi v surovih ter kuhanih glivnih ekstraktih. .... 25
Pregl. 7:	Rezultati hemaglutinacijskega testa. Prikazane so samo vrste gliv, ki so v testu dale pozitiven rezultat. .... 30
Pregl. 8:	Rezultati hemaglutinacijskega testa. Prikazane so vse vrste gliv..... 31
Pregl. 9:	Rezultati testa protibakterijske aktivnosti proti po Gramu pozitivni bakteriji <i>B. subtilis</i> . Prikazane so samo vrste gliv, ki so v testu dale pozitiven rezultat..... 34



## KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Primerjava koncentracij proteinov pri surovih ekstraktih gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	24
Sl. 2: Primerjava suhих tež svežih vodnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	27
Sl. 3: Primerjava suhих tež svežih in kuhanih ekstraktov gliv, gojenih na gojišču brez soli. ....	27
Sl. 4: Primerjava suhих tež kuhanih ekstraktov gliv, gojenih na gojišču brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	28
Sl. 5: Primerjava suhих tež svežih in kuhanih ekstraktov gliv, gojenih na gojišču z dodatkom soli. ....	28
Sl. 6: Primerjava poprečne aktivnosti hemaglutinacije v različnih razmerah gojenja gliv. ....	33
Sl. 7: Primerjava koncentracij proteinov pri svežih ekstraktih gliv, gojenih na sobni temperaturi ali na nizki temperaturi (4 °C). Primerjamo naše vzorce ter vzorce Ive Rappl (Rappl, 2011). ....	40
Sl. 8: Primerjava koncentracij proteinov pri surovih ekstraktih gliv, gojenih na gojišču z normalno koncentracijo glukoze 2 %, ter povišano koncentracijo glukoze (40 %). ....	41
Slika 9: Primerjava koncentracij suhe snovi pri svežih ekstraktih gliv, gojenih na gojišču z normalno koncentracijo glukoze (2 %), ter povišano koncentracijo glukoze (40 %). ....	42
Sl. 10: Primerjava koncentracij suhe snovi pri kuhanih ekstraktih gliv, gojenih na gojišču z normalno koncentracijo glukoze 2 %, ter povišano koncentracijo glukoze (40 %). ....	42
Sl. 11: Primerjava koncentracij suhe snovi pri svežih ekstraktih gliv, gojenih na sobni ali na nizki temperaturi (4 °C). ....	43

Sl. 12: Primerjava koncentracij suhe snovi pri kuhanih ekstraktih gliv, gojenih na sobni ali na nizki temperaturi (4 °C) .....	44
--	----

## SEZNAM OKRAJŠAV

YNB	yeast nitrogen base (kvasna dušikova osnova)
YNB S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču
YNB K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču
YNB + NaCl S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z dodatkom NaCl
YNB + 17 NaCl S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču s 17 % NaCl
YNB + NaCl K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z dodatkom soli
YNB + 17 NaCl K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču s 17 % NaCl
YNB + NT	ekstrakti gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi
YNB + G	ekstrakti gliv, ki so rasle na gojišču s povišano koncentracijo glukoze
S	sveži ekstrakti gliv (uporabljeno v preglednicah)
K	kuhani ekstrakti gliv (uporabljeno v preglednicah)
SS	koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu
P	koncentracija proteinov, uporabljenih v testu
Ha	hemaglutinacija
IC	širina inhibicijske cone
AChE	acetilholinesteraza
t <sub>50</sub>	polovični čas hemolize
NaCl	natrijev klorid
Glc	glukoza

## 1 UVOD

Biotehnologija gliv je ena najhitreje razvijajočih se bioloških znanosti, saj je njeno področje raziskovanja, kraljestvo gliv, izjemno bogat vir najrazličnejših biološko aktivnih snovi. Posebno zanimanje velja izkazati raziskovanju ekstremofilnih gliv; njihovih encimov, ter farmacevtsko pomembnih sekundarnih metabolitov, saj je njihov biotehnološki potencial še premalo raziskan, kaj šele izkoriščen. Proučevanje neraziskanih gliv je zato obetavno področje za prihodnji razvoj panoge.

Še pred nekaj leti je bilo splošno sprejeto dejstvo, da se evkarionti, z nekaj izjemami, niso sposobni prilagoditi na ekstremne okoljske razmere, ter da takšne habitate poseljujejo večinoma bakterije in arheje. Vse glive, ki so rasle na substratih z nizko vodno aktivnostjo, so poimenovali kot kserofile, saj so verjeli, da njihov fenotip ne determinira kemijska sestava substrata, ampak nizek vodni potencial medija.

Leta 2000 pa so Gunde-Cimerman in sodelavci v naravnih hiperslanih okoljih (npr. soline) odkrili veliko diverzitetu halofilnih in halotolerantnih gliv, ki so se zmožne prilagoditi na širok razpon koncentracij slanosti, od sladke vode do skoraj nasičene raztopine natrijevega klorida (NaCl).

Ekstremofilne glive so našli tudi v globinah oceanov, na površinah hladnih in vročih skal, v zelo kislih vodah in v izjemno slanih vodah (Sonjak, 2006). Ugotovili so, da so tu živeči sevi adaptirani na življenje in razmnoževanje v ekstremnem okolju.

Glive, ki med postopkom izolacije rastejo na slanih medijih pri slanostih nad 10 % in *in vitro* pri 17 % NaCl in so pogosto izolirane iz ekstremno slanih okolij, so Gunde-Cimerman in sod. (2000, 2005) uvrstili med halofilne oz. ekstremno halotolerantne. Med halotolerantne pa so uvrstili glive, ki so jih izolirali iz manj slanih voda in so *in vitro* prav tako rasle na gojiščih z največ 17 % NaCl.

Halofilne in halotolerantne glive, ki jih obravnavamo v tej nalogi, spadajo v debli Ascomycota in Basidiomycota. Izolirali so jih predvsem iz solin, nekaj pa tudi iz različnih

ekoloških niš v Arktiki. Poglavitne značilnosti hladnih območij Arktike so ekstremno nizke temperature (do  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ter pomanjkanje biološko dostopne vode, saj je le-ta v obliki ledu. V takšnih okoljih tako prihaja do znižane vodne aktivnosti, visokih pritiskov, nizkih temperatur in nizke koncentracije hranil. Ti življenjski pogoji so glavni omejujoči fizikalno-kemični dejavniki, ki vplivajo na aktivnost mikroorganizmov (Sonjak, 2006).

Soline kot habitat so ekstremno slano območje, kjer prihaja do nizke koncentracije kisika, pH-vrednosti okoli nevtralnega in visoke koncentracije hranil v vodi, koncentracije morske soli v kristalizacijskih bazenih pa lahko dosežejo nasičenost (Gunde-Cimerman in sod., 2001). Znižanje vodne aktivnosti v tem okolju je posledica visoke koncentracije raztopljenih soli, ki znižuje osmotski potencial raztopine ter tako povzroča izhajanje vode iz celic. Čeprav sta si obe okolji na prvi pogled različni, v obeh kot ključni skupni dejavnik deluje nizka vodna aktivnost.

Sekundarni metaboliti, kot produkti metabolizma, nimajo očitne vloge v celični fiziologiji organizma, in večinoma sodelujejo pri komunikaciji med organizmi (Hale in sod., 1995). Ker halofilni in halotolerantni organizmi, v nasprotju z mezofilnimi, živijo v ekstremnih okoljih, smemo pričakovati, da se sekundarni metaboliti med tema skupinama močno razlikujejo. (Saleem in sod., 2007). Šele nedavno se je izkazalo, da halofilne in halotolerantne glive, živeče v najbolj skrajnih okoljih, proizvajajo potencialno zanimive sekundarne metabolite (Frisvad, 2005, Bhadury in sod., 2006). Biološko aktivne snovi, ki so jih do zdaj izolirali, kažejo protitumorske, protibakterijske, protivirusne, protiplazmodijske in protivnetne lastnosti (povzeto po Bhadury in sod., 2006).

Iz kopenskih gliv so izolirali že mnogo terapevtsko pomembnih spojin, manj raziskan je terapevtski potencial morskih gliv (Saleem in sod., 2007), še manj pa je znanega o glivah, prilagojenih na visoko slanost v okolju. Zato smo se v tej nalogi ukvarjali z iskanjem potencialno zanimivih biološko aktivnih snovi v vodnih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv. Izbrane glive smo gojili na trdnih gojiščih brez soli in z dodatkom 10 % in 17 % NaCl. Iz glivnih kultur smo pripravili vodne ekstrakte, slednjim izmerili hemolitično, hemaglutinacijsko, protibakterijsko aktivnost, ter ugotavljali sposobnost inhibicije encima acetilholinesteraze. Z gojenjem na gojiščih različne slanosti smo želeli

ugotoviti ali znižana vodna aktivnost vpliva na sintezo sekundarnih metabolitov, s prekuhavanjem ekstraktov pa smo ugotavljali ali so te substance proteinskega izvora.

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

### 2.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil testirati biološko aktivnost vodnih ekstraktov izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv, ki smo jih gojili na gojišču brez NaCl in z 10 % NaCl oziroma z 10 % NaCl in 17 % NaCl. Povišana koncentracija soli glivam predstavlja stres, zato nas je zanimalo, ali in kako to vpliva na izločanje sekundarnih metabolitov. Testirali smo hemolitično in hemaglutinacijsko aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost na izbranih po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah. Poleg tega želimo primerjati naše rezultate z rezultati drugih diplomskih nalog, v katerih so se ukvarjali z istimi glivnimi sevi, vendar so jih gojili v drugačnih razmerah: zanima nas primerjava biološke aktivnosti učinkovin v vodnih in organskih ekstraktih; v katerih je več sekundarnih metabolitov in kakšne aktivnosti izkazujejo. S pomočjo podatka o (ne)topnosti v vodi lahko na grobo učinkovine uvrstimo v različne kemijske skupine, kar bi v nadaljnjih raziskavah lahko pomagalo pri lažjem čiščenju in določanju strukture sekundarnih metabolitov. Zanima nas tudi primerjava biološke aktivnosti v vodnih ekstraktih istih glivnih sevov, ki so rasli pri povečani koncentraciji soli, glukoze, ali pri nizki temperaturi. Želeli smo ugotoviti, ali in kako vplivajo spremenjene rastne razmere na biološko aktivnost danih sevov.

### 2.2 HIPOTEZE

Ker so halofilne in halotolerantne glive dokaj neraziskan vir strukturno novih in biološko aktivnih spojin, pričakujemo, da bomo v vodnih ekstraktih glivnih sevov našli nove in zanimive aktivne spojine, ki jih bodo v prihodnjih raziskavah lahko izolirali ter določili. Predvidevamo tudi, da bodo različne koncentracije soli v gojiščih vplivale na produkcijo bioaktivnih susbtanc.

V primerjavi z izsledki drugih diplomskih nalog pa pričakujemo, da bo spreminjanje razmer za rast (temperatura in visoka koncentracija glukoze) ter ekstrakcijskega topila (acetona, metanol ali voda) imelo vpliv na produkcijo sekundarnih metabolitov.

### 3 PREGLED OBJAV

#### 3.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI GLIV

Glive (Fungi) so del nadkraljestva Eukarya. Slednje se nadalje veji v nedefinirano taksonomsko kategorijo Opisthokonta in naprej v kraljestvo Fungi, ki se deli na 6 debel: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Zygomycota in Deuteromycotina (zadnja skupina ni formalna taksonomska kategorija, ker gre za polifiletsko skupino) (Kirk in sod., 2008).

Glive so heterotrofni organizmi, ki živijo saprofitsko, parazitsko in simbiotsko. Živijo v sladkih vodah, na kopnem, redkeje v morju. Celično steno gradijo pri večini skupin hitin in glukani ( $\beta$ -glukan). Glive niso heterotrofi le glede energetske preskrbe in presnove ogljika, ampak tudi glede prehrane z dušikovimi spojinami in drugimi hranili. Rezervne snovi so glikogen, maščobe in še nekatere druge spojine. Razmnoževanje je izredno raznoliko, in to na vegetativni, nespolni in spolni stopnji (Batič in sod. 2004). Pojavljajo se kot enocelični organizmi (kvasovke) ali pa v obliki cevastih nitk imenovanih hife (Hale in sod., 1995).

#### 3.2 SEKUNDARNI METABOLITI GLIV

Sekundarni metaboliti so spojine, ki niso ključnega pomena za rast in razvoj organizma, vseeno pa se za njihovo sintezo porabi veliko energije. Nastajajo v specializiranih celicah ter pomagajo organizmu preživeti v specifičnem okolju. Te spojine učinkujejo na druge organizme v neposredni okolici in s tem glivi omogočajo kompetitivno prednost ter zaščito pred plenilci. Glivni toksini zaščitijo glivo pred plenilci, kot so amebe in gliste, ter pred drugimi nevretenčarji, ki se hranijo z njimi. Glive v simbiozi z rastlino s pomočjo teh učinkovin odganjajo rastlinojede žuželke (Fox in Howlett, 2008).

Velik del snovi s farmakološkimi učinki izvira iz skupine sekundarnih metabolitov. Te nizkomolekularne spojine imajo pogosto zelo močno biološko aktivnost, od glivnih so najbolj poznani penicilin, cefalosporin, ergot alkaloidi ter statini (Keller 2005).

Sekundarne metabolite gliv, ki so toksični za vretenčarje, imenujemo mikotoksini. Te



spojine z nizko molekulsko maso delujejo že v zelo nizkih koncentracijah, kadar vstopijo v telo preko ust, kože ali dihal (Bennett in Klich, 2003).

Čeprav so kot skupina zelo heterogeni, se vsi sekundarni metaboliti sintetizirajo po le nekaj biosintetskih poteh, pogosto v kombinaciji z morfološko fazo razvoja glive (Keller 2005). Sekundarni metabolizem nastopi ob koncu rastne faze ali v stacionarni fazi rasti mikroorganizma. Sekundarni metaboliti lahko inducirajo nastajanje spor in povečujejo njihovo preživetje, zato je ta tip metabolizma pogosto povezan s sporulacijo gliv (Calvo, 2002).

Nedavne raziskave so pokazale, da morske glive sintetizirajo številne naravne produkte z biološko aktivnostjo, ki so potencialno farmakološko zanimivi (Haefner, 2003, Mayer in Lehmann, 2000, Proksch in sod., 2002).

### 3.3 VPLIV SLANOSTI NA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV

Ker se učinkovine, ki jih glive izločajo v morskem okolju, še posebno hitro razredčijo, morajo biti ti metaboliti izredno učinkoviti v že zelo nizkih koncentracijah. Zaradi tega so raziskovalci prepričani, da so morski organizmi potencialen vir velikega števila naravnih bioaktivnih spojin, ki bi jih lahko uporabili v farmaciji (Haefner, 2003, Mayer in Lehmann, 2000, Proksch in sod., 2002).

Kemija spojin morskih gliv se je razcvetela po letu 1990. Do leta 2006 so opisali že več kot 272 učinkovin morskih gliv (Bugni in Ireland, 2004, Bhadury in sod., 2006). Te vključujejo predvsem poliketide, terpene, steroide, alkaloidne in peptide. Do danes so iz morskih organizmov izolirali že skoraj 8500 spojin, od katerih jih velik delež kaže zelo obetajočo biološko aktivnost (Bhakuni 2005).

Sinteza sekundarnih metabolitov je močno odvisna od okoljskih razmer (Madigan in sod., 2003, Kirk in sod., 2008). Dejavniki, ki vplivajo na rast in s tem tudi na produkcijo teh snovi, so kisik, temperatura in vodna aktivnost (Samson in sod., 2004).

Do nedavnega je veljalo, da halofilni in ekstremno halotolerantni organizmi ravno zaradi

skrajnih razmer, v katerih živijo, ne potrebujejo biološko aktivnih spojin, zaradi katerih bi imeli kompetitivno prednost. Nato pa je Frisvad (2005) ugotovil, da se pri slanosti od 0 % do 5 % NaCl, izloča največ in največje število sekundarnih metabolitov. Produkcija se zmanjša šele pri koncentracijah višjih od 5 %, saj morajo za rast pri višjih koncentracijah soli organizmi več energije vlagati v obvladovanje stresa kakor v sintezo sekundarnih metabolitov.

V preglednici 1 smo zbrali podatke o do sedaj opisanih bioaktivnih snoveh obravnavanih gliv.

Preglednica 1: Podatki iz literature o odkritih naravnih učinkovinah izoliranih iz izbranih rodov morskih gliv

Mikroorganizem	Vir	Učinkovina	Tip spojine	Ekstrakcijsko topilo	Bioaktivnost	Referenca
Neidentificiran glivni sev 196S215	tkivo indonezijske morske spužve	Izo-kladospolid B	heksaketid	etilacetat	Ni protimikrobne aktivnosti do 250 µg/ml	Smith C. J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2000, <b>63</b> , 142-145
		Seko-patuloid	heksaketid			
		Pandangolidi 1-2	12-členski makrolid			
		kladospolid	12-členski makrolid			
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Antarktika, prst, voda, rastlinski material, površina kamnin, hiperslani habitati, obalne vode in globokomorsko okolje	Amilaza, proteinaza, lipaza, celulaza, ksilanaza, manaza, transferaza	zunajcelični encimi - beljakovine	Voda, dodatek detergenta	Encimska aktivnost	Chi Z, in sod. 2009, <i>Microbiol. Biotechnol</i> (2009). <b>82</b> , 793-804.
		pululan	Linearni $\alpha$ - D glukan	voda	Antikoagulant, antitrombotik, protivirusno delovanje	
		siderofor	Neribosomalni ciklični peptidi		Transport železa v mikroorganizem, v farmaceutiki: mobilizacija železa v človeškem organizmu, potencialno protimikrobno delovanje	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Japonska morska spužva	Diketopiperazin 1 in 2	Ciklični peptidi	metanol	Ta dva še netestirana (drugi diketopiperazini kažejo protitumorsko, protivirusno, protiglivno in protibakterijsko delovanje)	Shigemori H. in sod. 1998, <i>J. Nat. Prod.</i> , <b>61</b> , 696-698
		orkinotriol	1,3 - dihidroksifenolni derivat		Ni testiran	

se nadaljuje

## Nadaljevanje Preglednica 1

Mikroorganizem	Vir	Učinkovina	Tip spojine	Ekstrakcijsko topilo	Bioaktivnost	Referenca
<i>Cladosporium herbarum</i>	Morska spužva <i>Callyspongia aerizusa</i>	Pandagolidi 2 - 4	makrolidi	etilacetat	Pandagolidi brez protibakterijske aktivnosti, kisline izkazujejo protibakterijsko aktivnost	Jadulco R, in sod. 2001, <i>J. Nat. Prod.</i> , <b>64</b> , 527-530
		Kladospolid B				
		Izo-kladospolid B				
		Sumikijeva kislina	5-hidroksimetil-2-furanokarboksilna kislina			
<i>Cladosporium herbarum</i>	Dva seva <i>C. herbarum</i> iz morskih spužev <i>Aplysina aerophoba</i> in <i>Callyspongia aerizusa</i>	Herbarin A in B	$\alpha$ - piron	etilacetat	Herbarin A: protiglivna aktivnost	Jadulco R. in sod. 2002, <i>J. Nat. Prod.</i> <b>65</b> , 730-733. Wen G. 2009, <i>J. Microbiol Biotechnol</i> , <b>25</b> , 1677-1683
		Citreoviridin A	??	Benzen, etanol, kloroform, eter, etilacetat	Nevrotoksin (inhibira mitohondrijski ATP-sintetazni sistem)	
		Herbarična kislina	ftalid	etilacetat	protiglivna aktivnost	
<i>Cladosporium sp.</i>	Japonska morska alga <i>Actinotrichia fragilis</i>	Sporiolid A in B	12-členski makrolid	etilacetat	Oba kažeta protitumorsko aktivnost, sporiolid A protiglivno in sporiolid B protibakterijsko aktivnost	Shigemori H. in sod. 2004, <i>Mar. Drugs</i> <b>2</b> , 64-169.
<i>Fusarium semitectum</i>	okuženo koruzno steblo	Neofuzapiron	pironi	MeOH : 1 % vodna raztopina NaCl (55:45)	Protiglivna aktivnost proti <i>Geotrichum candidum</i>	Evidente A. in sod. 1994 <i>J. Nat. Tox</i> , <b>2</b> , 4-13
		fuzapiron				
		deoksifuzapiron				
<i>Fusarium sp.</i>	Površina morske vode na Japonskem	Nevrosporaksantin (tudi torularhodin) nevrosporaksantin $\beta$ - D - glukopiranozid	karotenoid glikozil ester (karotenoid)	acetan	ni testirano	Sakai H. in sod. 2002, <i>J. Nat.</i> <b>65</b> , 1683-1684

se nadaljuje

### Nadaljevanje Preglednica 1

Mikroorganizem	Vir	Učinkovina	Tip spojine	Ekstrakcijsko topilo	Bioaktivnost	Referenca
<i>Fusarium</i> sp.	Naplavljen les v mangrovah, Bahami	Magnikoli A-G	Sesterterpeni polioli	metanol / diklorometan	Magnikoli A – F: neselektivno protitumorsko delovanje, Magnikol A in C: inhibicija edema v mišjem ušesu.	Renner M. in sod. 2000, <i>J. Org. Chem.</i> <b>65</b> , 4843-4852.
		Neomagnikoli A-C			Neomagnikol A: protitumorska aktivnost Neomagnikol B: protitumorska in protibakterijska aktivnost proti <i>B. subtilis</i>	Renner M. in sod, 1998, <i>J. Org. Chem.</i> <b>63</b> , 8346-8354
<i>Fusarium</i> sp.	prst	Fuzarielini A-D	poliketidi	Aceton / benzen	Fuzarielin A: protiglivna, protitumorska, protibakterijska aktivnost Fuzarielin B: Ni aktivnosti	Kobayashi H. in sod, 1995, <i>J. Antibiot.</i> <b>48</b> , 42-52
<i>Fusarium</i> sp.	Površina morske trave <i>Halodule wrightii</i>	Sansalvamid	Ciklični pentadepsipeptid	Voda	Protitumorska aktivnost	Belofsky G. N. in sod., 1999, <i>J. Lett.</i> <b>40</b> . 2913-2916
<i>Fusarium</i> sp.	Alga <i>Avrainvillea</i> sp. (mangrove)	N-metilsansalvamid	Ciklični depsipeptid	metanol/diklorometan	citotoksičnost	Cueto M. in sod, 2000, <i>J. Phytochemistry</i> <b>55</b> , 223-226.
<i>Fusarium</i> sp.	Alga <i>Codium fragile</i> subsp. <i>atlanticum</i>	JM47	Ciklični tetrapeptid HC-toksinski analog	etilacetat	Protibakterijska aktivnost	Jiang Z. in sod. 2002, <i>J. Phytochemistry</i> <b>60</b> , 33-38.

se nadaljuje

### Nadaljevanje Preglednica 1

Mikroorganizem	Vir	Učinkovina	Tip spojine	Ekstrakcijsko topilo	Bioaktivnost	Referenca
<i>Hortaea werneckii</i>	Morska spužva <i>Aplysina aerophoba</i>	horrein	Fenol poliketid	etanol	??	Brauers G. in sod. 2001, <i>J. Nat. Prod.</i> <b>64</b> . 651-652
<i>Wallemia sebi</i>	Torta, džem	valeminol	kariofilen	heksan	Mikotoksin, toksičen za praživali	Wood G. M. in sod. 1990, <i>J. Food Add. And Cont.</i> <b>7</b> . 69-77
		valeminon			mikotoksin	
<i>Wallemia sebi</i>	Posušen krompir	UCA 1064-A	azasteroidi	propanol	Protitumorska, protiglivna in protibakterijska aktivnost proti G <sup>+</sup> bakterijam	Takahashi I. in sod. 1993, <i>J. of Anti.</i> <b>48</b> . 1312-1313
		UCA 1064-B				

## 4 MATERIALI IN METODE

### 4.1 SEZNAM GLIV

Preglednica 2: Seznam uporabljenih sevov iz zbirke EXF Katedre za biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo in MZKI iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta

Vrsta glive	Sev	Lokacija vzorčenja
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	soline
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	soline
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	soline
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	soline
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	EXF - 150	soline
<i>Aureobasidium</i> sp. ?	EXF - 922	Arktika
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	Globokomorsko okolje, globina 4000 m
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF - 381	soline
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF - 2504	Arktika
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF - 385	soline
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	soline
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	soline
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	soline
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	soline
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	soline
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	soline
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	soline
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	soline
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	soline
<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	soline
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295 / MZKI B734	soline
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	soline
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	soline
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	soline

se nadaljuje

## Nadaljevanje Preglednica 2

Vrsta glive	Sev	Lokacija vzorčenja
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	soline
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	Sončnično seme
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	Arktika
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	soline
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	Arktika
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	EXF - 513	soline
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	soline
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	Arktika
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	kontrola

Legenda: ? identifikacija ni gotova

Vse glive razen dveh smo gojili na gojišču YNB (Yeast Nitrogen Base) brez dodatka soli (NaCl) ) ter YNB z 10 % dodane soli. Glivi *W. ichthyophaga* in *W. muriae*, ki sta obligatno halofilni glivi, smo izjemoma gojili na gojiščih YNB z 10 % ter z 17 % dodane soli.

## 4.2 PRIPRAVA GOJIŠČ IN RAZTOPIN

### Gojišče YNB brez NaCl (500 mL):

- 0,85g YNB
- 2,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 10g glukoza
- 10g agar
- dH<sub>2</sub>O do 500 mL



Gojišče YNB z 10 % NaCl (500 mL):

- 0,85g YNB
- 2,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 10g Glc
- 10g agar
- 50g NaCl
- dH<sub>2</sub>O do 500mL

Gojišče YNB z 17 % NaCl (500 mL):

- 0,85g YNB
- 2,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 10g Glc
- 10g agar
- 85g NaCl
- dH<sub>2</sub>O do 500mL

Fiziološka raztopina - 0,9 % NaCl (1000 mL):

- 9 g NaCl
- 1000 mL dH<sub>2</sub>O

### 4.3 KEMIKALIJE

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij

Kemikalija	Proizvajalec
AChE iz električne jegulje	Sigma, ZDA
Agaroz	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Celofan	Sigma - Aldrich, Steinheim, Nemčija
EDTA	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Luria Broth (LB)	Sigma, ZDA
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Tris baza	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Tris-HCl	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Bio 101 Systems

### 4.4 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica 4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitska tehtnica MC 210 P max 210g ISO 9001	Sartorius, Nemčija
Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvaška
Centrifuga 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč	Dynex Technologies, ZDA
Dvožarkovni spektrofotometer	Shimadzu, Japonska
Hladilniki (T = + 4 °C)	Gorenje, Electrolux, Slovenija
Hladna soba	Smeva, Valkenswaard, Nizozemska
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Liofilizator Christ	Christ, Nemčija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrne plošče	Nunc, Danska
Polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pH meter Metrohm 713	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Stresalnik Vibromix 301 EVT	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Tehtnica EXACTA 310	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Topla soba	Smeva, Valkenswaard, Nizozemska
Rotacijski stresalnik EV-100	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Zmrzovalnik (T = - 80 °C)	Heto ultra freeze, Češka

## 4.5 METODE DELA

### 4.5.1 Gojišča in pridobivanje biomase

Pripravili smo definirana trda YNB gojišča (Yeast Nitrogen Base) brez, z dodatkom 10 % ter 17 % NaCl: v čaši smo zmešali YNB, destilirano vodo, glukozo,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , željeno količino NaCl, ter mešali, dokler se sestavine niso popolnoma raztopile. Nato smo izmerili pH vrednost raztopine in po potrebi dodali NaOH. Ko je pH gojišča dosegel vrednost 7, smo gojišče prelili v merilni valj in tako izmerili volumen. Če je bil ta manjši od 500 mL, smo dolili destilirano vodo do volumna 500 mL. V erlrmajerico smo dali agar in dolili naše gojišče. Mešanico smo nato avtoklavirali 15 minut pri 121 °C, ter gojišča razlili v dobro označene petrijevke. Ko se je gojišče dovolj strdilo, smo petrijevke obrnili in jih inkubirali dan ali dva v topli sobi pri 37 °C, dokler ni vsa vlaga izhlapela. Nato smo v laminariju na vsa trda gojišča položili košček avtoklaviranega celofana, ki je primeren za rast mikrobov, da bi pri kasnejšem odstranjevanju micelija dobili čisto kulturo brez koščkov gojišča. Gojišča, ki so se med pripravo okužila, smo zavrgli, neokužena gojišča pa smo shranili v hladni sobi pri 4 °C, zavita v plastično folijo.

Pri dodajanju celofana na gojišče ter precepljanju gliv, smo morali delati kar najbolj aseptično: vse smo delali v laminariju, pri delu uporabljali rokavice iz lateksa ter gorilnik, razkužili roke in delovne površine s 70 % etanolom ter obžigali instrumente.

Pripravili smo tudi poševna gojišča (poševnik) v treh koncentracijah soli (0 %, 10 %, ter 17 %), na katera smo iz originalne mikrobiološke zbirke gliv precepili zelene seve. V laminariju smo posamezen sev v en poševnik brez soli ter en poševnik z 10 % soli (NaCl) precepili s pomočjo plastične cepilne zanke za enkratno uporabo. Glivna seva *W. ichtyophaga* in *W. muriae* smo kot izjemi nacepili na YNB poševnik z 10 % NaCl in na YNB poševnik s 17 % NaCl. Nacepljene poševnike smo nato inkubirali pri sobni temperaturi. Na njih smo opazovali rast mikroorganizma z in brez soli, ter ga, ko je dosegel stacionarno fazo rasti (po približno 3 tednih ali kasneje), precepili na trdna YNB gojišča. Po inkubaciji smo glivne kulture na poševnikih v laminariju suspendirali v 5 ml

fiziološke raztopine (0,9 % NaCl). Na trda gojišča z in brez soli smo z avtomatsko pipeto prenašali po 80  $\mu$ L glivne suspenzije, ter razmazali do suhega. Za vsak sev smo uporabili po 10 plošč gojišč brez (ali 10 % soli v primeru rodu *Wallemia*) ter 10 plošč gojišč z 10 % soli (ali 17 % soli v primeru rodu *Wallemia*). Čim več gojišč smo potrebovali, da bi pridobili dovolj biomase. Plošče smo ovili s plastično folijo in glivne kulture inkubirali na sobni temperaturi do stacionarne faze (približno 3 tedni). Ker pa se je veliko gojišč med nacepljanjem okužilo s sporami drugih gliv, smo morali po treh tednih postopek ponoviti za približno polovico sevov.

Ko so glivne kulture dosegle stacionarno fazo rasti, smo jih s sterilno spatulo postrgali z gojišča in jih enakomerno razdelili v dve označeni Eppendorf mikrocentrifugirki (1,5 ali 2  $\mu$ L). Vsak sev smo tako porazdelili v štiri mikrocentrifugirke: YNB S (YNB gojišče brez dodatka soli, surov ekstrakt), YNB K (YNB gojišče brez soli, kuhan ekstrakt), YNB + NaCl S (YNB gojišče z 10 % NaCl, surov ekstrakt), ter YNB + NaCl K (YNB gojišče z 10 % soli, kuhan ekstrakt). Le v primeru *W. ichtiophaga* ter *W. muriae* smo mikrocentrifugirke označili drugače: YNB + NaCl S (YNB gojišče z 10 % NaCl, surov ekstrakt), YNB + NaCl K (YNB gojišče z 10 % NaCl, kuhan ekstrakt), YNB + 17 NaCl S (YNB gojišče z 17 % NaCl, surov ekstrakt) ter YNB + 17 NaCl K (YNB gojišče z 17 % NaCl, kuhan ekstrakt). Mikrocentrifugirke smo nato zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri -80 °C.

#### 4.5.2 Priprava vodnih ekstraktov

Mikrocentrifugirke smo vzeli iz skrinje, jih odprli, ter liofilizirali 48 ur. Od te točke dalje ni bilo več nujno delati v laminariju, pod striktno aseptičnimi pogoji, saj se morebitna okužba supernatanta ne bi mogla razviti ter pomembno vplivati na rezultate testov. V mikrocentrifugirke smo dodali od 500 do 1000  $\mu$ L deionizirane vode, odvisno od količine biomase. Glivni micelij smo nato homogenizirali s stekleno palčko ter ga premešali na rotacijskem stresalniku. Mikrocentrifugirke smo ovili s parafilmom in jih v erlenmajericah dali na stresalnik. Inkubirali smo jih 24 ur pri 600 obratih/minuto in 4 °C. Nato smo mikrocentrifugirke centrifugirali 20 min pri 1300 obratih/minuto in 4 °C. Supernatant smo prepipetirali v nove mikrocentrifugirke, ki smo jih tudi enako označili.

Druga ekstrakcija sedimentov je potekala 3 ure v enakih razmerah. Supernatant in micelij v že uporabljenih mikrocentrifugirkah smo shranili v zamrzovalniku. Supernatante istega seva, pridobljene z enakega gojišča, smo združili in jih ponovno razdelili v nove mikrocentrifugirke, ter označili kot kuhane in sveže vzorce. Svežim vzorcem smo, glede na to, koliko ekstrakta smo kasneje potrebovali za teste, dodali različno količino deionizirane vode, ter premešali. Do uporabe smo jih hranili v zamrzovalniku. Mikrocentrifugirke s supernatantom z oznakami YNB K, YNB +NaCl K, ter YNB + 17 NaCl K smo kuhali v vreli vodi 10 minut. Nato smo jih centrifugirali 20 minut pri 1300 obratih/minuto in 4 °C. Supernatant smo prenesli v sveže in označene mikrocentrifugirke, ter jih shranili v zamrzovalniku.

#### **4.5.3 Določanje koncentracije suhe snovi v vzorcih**

Težo suhe snovi v vzorcih smo določili s tehtanjem posušenega supernatanta. Naredili smo skodelice iz aluminijaste folije, jih označili ter stehtali. Vanje smo odpipetirali 100 µL ekstrakta posameznega vzorca, ter jih sušili 30 minut v sterilizatorju pri 100 °C. Po sušenju smo skodelice ponovno stehtali, ter iz razlike izračunali koncentracijo suhe snovi v mg/mL ekstrakta.

#### **4.5.4 Določanje koncentracije proteinov v vzorcih**

Pripravili smo mešanico reagentov BCA protein reagent A in BCA protein reagent B v razmerju 50:1. Sveže vzorce smo redčili v razmerju 1:5. V mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali po 2 µL ekstrakta vsakega vzorca, ter dodali še 8 µL deionizirane vode. K vsakemu redčenemu vzorcu v mikrotitrski plošči smo dodali 200 µL mešanice reagentov A in B. Pripravili smo še kontrolo: 10 µL deionizirane vode in 200 µL mešanice reagentov A in B.

Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 30 minut pri 37 °C. Nato smo s čitalcem mikrotitrskih plošč določili absorpcijo proteinov pri valovni dolžini 550 nm. Glede na znane koncentracije govejega serumskega albumina (BSA) smo narisali umeritveno krivuljo. Iz umeritvene krivulje za znane koncentracije govejega serumskega albumina

smo odčitali koncentracije proteinov v vzorcih.

#### 4.5.5 Testi za določanje biološke aktivnosti

##### 4.5.5.1 Hemaglutinacijski test

Biološki test hemaglutinacijske aktivnosti smo izvedli na mikrotitrski plošči z vdolbinicami z zaobljenim dnom. Uporabili smo goveje eritrocite, ki smo jih trikrat sprali s fiziološko ratopino, ter dvakrat z eritrocitnim pufrom. Slednji je bil mešanica 140 mM NaCl in 13 mM Tris-HCl, s pH vrednostjo 7,4. Z eritrocitnim pufrom smo pripravili 2 % suspenzijo predhodno spranih eritrocitov. Vdolinice v mikrotitrski plošči smo napolnili s po 100  $\mu$ L eritrocitne suspenzije ter 20  $\mu$ L glivnih ekstraktov. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi, ter vizualno odčitali rezultate.

##### 4.5.5.2 Test protibakterijske aktivnosti

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo določali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Uporabili smo po Gramu pozitivno bakterijo *Bacillus subtilis* in po Gramu negativno bakterijo *Escherichia coli*. Bakterije smo namnožili preko noči v 10 mL LB (Luria Broth) gojišča na stresalniku s stresanjem pri 250 obratih/minuto in 37 °C. Naslednji dan smo izmerili optično gostoto pri 600 nm s pomočjo dvožarkovnega UV/VIS spektrofotometra. Za kontrolo smo uporabili sterilno tekoče LB gojišče. Število bakterij smo določili s standardiziranimi umeritvenima krivuljama.

Nato smo pripravili plošče za difuzijski test: pripravili smo LB gojišče, ga avtoklavirali ter ohladili na 42 °C. Gojišče smo razdelili na pol, ter vsaki polovici dodali toliko kulture (*B. subtilis* ali *E. coli*), da je bila končna koncentracija enaka  $5 \times 10^5$  bakterijskih kolonij/liter. Na vsako od Petrijevih plošč smo razlili 20 ml LB gojišča z bakterijsko kulturo. Ko se je gojišče dovolj strdilo, smo petrijevke obrnili in jih shranili pri 4 °C.

V laminariju smo s pomočjo steriliziranega plutovrta na vsaki plošči zvrtili 8 lukenj

premera 1 cm. V vsako smo za protibakterijski test previdno odpipetirali po 100  $\mu\text{L}$  glivnega ekstrakta. Plošče smo nato inkubirali 48 ur na 37 °C ter odčitali polmere inhibicijskih con okrog lukenj.

#### 4.5.5.3 Test inhibicije encima acetilholinesteraze

Za test inhibicije encima acetilholinesteraze (AChE) smo uporabili Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč. AChE iz električne jegulje smo raztopili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 7.3) v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/mL. Malo pred začetkom testa smo encim 200x redčili v enakem pufru. Uporabili smo Ellmanov reagent, ki je raztopina 91 mg 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline in 37.5 mg  $\text{NaHCO}_3$  v 25 mM fosfatnem pufru, s pH vrednostjo 8. V vdolbinice mikrotitrskih plošč smo odpipetirali 140  $\mu\text{L}$  Ellmanovega reagenta in 10  $\mu\text{L}$  substrata acetiltioholina v končni koncentraciji 1 mM. Nato smo dodali 10  $\mu\text{L}$  vsakega glivnega ekstrakta in tik pred začetkom meritve še 50  $\mu\text{L}$  encima AChE. Enako smo pripravili še kontrolo, le da je namesto vzorca vsebovala 10  $\mu\text{L}$  vode. Merili smo 12 minut pri 412 nm in 25 °C.

#### 4.5.5.4 Hemolitični test

Centrifugirali smo svežo govejo kri, ter tako izolirali eritrocite. Eritroцитom smo dodali citrat, da bi tako preprečili strjevanje. Nato smo jih trikrat spirali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl), ter jih do uporabe shranili v Alseverjevem konzervansu v hladilniku.

Konzervirane eritrocite smo še dvakrat spirali s fiziološko raztopino. Pripravili smo eritrocitni pufer, ki je vseboval 0.13 M NaCl in 0.02 M Tris-HCl, pH vrednost 7.4. naredili smo suspenzijo pufra in eritrocitov, ter izmerili absorpcijo pri 630 nm. Absorpcija je znašala  $1.0 \pm 0.01$ .

Test hemolize smo izvedli na mikrotitrski plošči. Vdolbinice smo napolnili s po 100  $\mu\text{L}$  eritrocitnega pufra in 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta vsakega vzorca gliv. V vsako vdolbinico smo nato dodali še 100  $\mu\text{L}$  eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot znižanje

absorpcije pri 630 nm. Za kontrolo smo uporabili 100  $\mu\text{L}$  eritrocitnega pufra, 20  $\mu\text{L}$  deionizirane vode in 100  $\mu\text{L}$  eritrocitov. Hemolizo smo spremljali 20 minut pri 25 °C. Pri vzorcih, pri katerih smo opazili aktivnost, smo odčitali polovični čas hemolize ( $t_{50}$ ), to je čas, pri katerem absorpcija pade na polovico svoje začetne vrednosti.



## 5 REZULTATI

Rezultati testov so predstavljeni v preglednicah in grafih. V preglednici smo primerjalne vzorce iz diplomske naloge Ive Rappl (Rappl, 2011) zaradi večje preglednosti označili z zeleno barvo.

### 5.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV IN EKSTRAHIRANE SUHE SNOVI V VZORCIH

#### 5.1.1 Proteini

Izmerili smo koncentracije suhe snovi in proteinov v vzorcih vodnih ekstraktov. Koncentracije proteinov smo določali le v svežih ekstraktih, saj kuhani ne vsebujejo proteinov. Opazili smo, da so bile koncentracije proteinov v večini primerov (83 %) v vodnih ekstraktih gliv, ki so rasle na slanem gojišču višje od koncentracij ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču brez soli (glej preglednico 2). 17 % sevov odstopa od tega trenda. Ti so: *Cladosporium halotolerans* EXF – 572, *Wallemia ichthyophaga* EXF – 994, *Wallemia muriae* EXF – 951, *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428, *Pichia guilliermondii* EXF – 518, *Candida parapsilosis* EXF – 517.

Preglednica 5: Koncentracije proteinov v surovih glivnih ekstraktih.

Vrsta	Sev	Koncentracija proteinov [mg/ml]			
		YNB	YNB + NaCl	YNB +NT	YNB + G
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	2,2	4,60	3,4	4,1
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	0,90	1,00	0,6	0,2
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	0,60	1,7	7,0	1,8
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	1,60	2,80	0,4	8,8
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	EXF - 150	1,00	6,0	1,2	9,6
<i>Aureobasidium</i> sp. ?	EXF - 922	0,50	3,40	9,4	8,1
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF – 3233	5,7	6,50	10,2	14,4

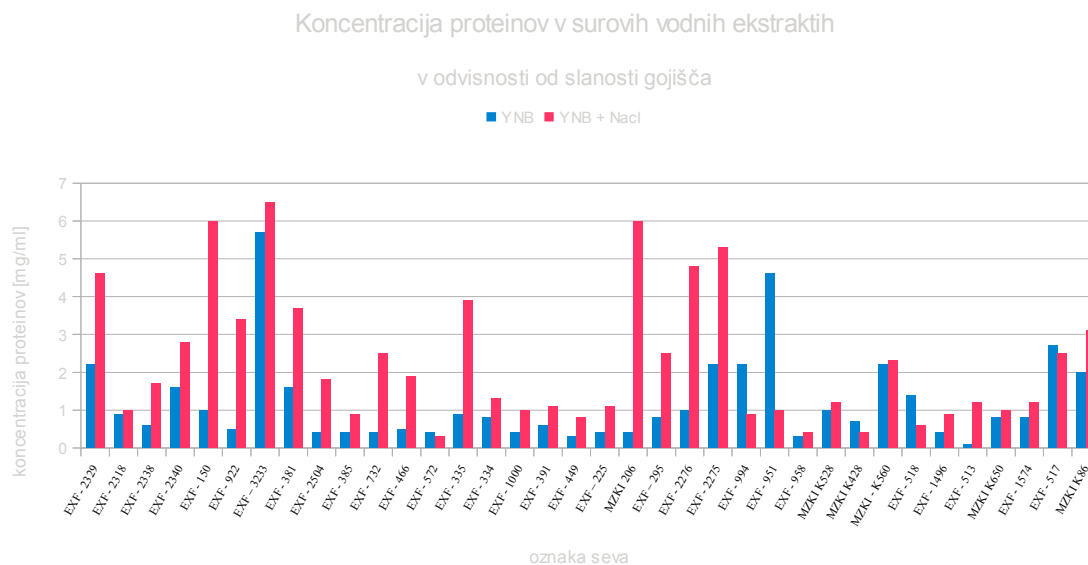
se nadaljuje

## Nadaljevanje Preglednica 5

Vrsta	Sev	Koncentracija proteinov [mg/ml]			
		YNB	YNB + NaCl	YNB +NT	YNB + G
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF - 381	1,60	3,7	1,0	0,6
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF - 2504	0,4	1,80	1,2	9,2
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF - 385	0,40	0,90	0,4	0,4
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	0,4	2,50	2,0	2,2
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	0,50	1,9	0,7	1,6
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	0,4	0,30	1,6	3,1
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	0,90	3,90	0,7	9,7
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	0,80	1,30	0,4	3,4
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	0,40	1,00	0,5	4,9
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	0,60	1,10	0,8	4,1
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	0,30	0,80	0,3	9,0
<i>Hortea werneckii</i>	EXF - 225	0,40	1,10	0,7	0,8
<i>Phaeothecha triangularis</i>	MZKI 206	0,40	6,0	0,5	6,7
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295	0,80	2,5	0,3	0,8
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	1,00	4,8	0	2,2
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	2,2	5,3	2,2	11,5
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	2,2	0,90	8,7	0,7
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	4,6	1,00	9,4	12,1
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	0,30	0,40	6,7	7,9
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	1,00	1,20	2,1	3,8
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	0,7	0,40	0,2	0,9
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	2,2	2,30	4,1	2,7
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	1,4	0,60	4,3	1,8
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	0,4	0,90	0,3	1,6
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF - 513	0,1	1,20	0,4	7,0
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	0,8	1,00	0,9	0,4
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	0,80	1,20	0,7	1,2
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	2,70	2,50	2,0	0,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	2,0	3,1	0,6	2,3

Legenda: ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) (YNB), ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl oz. 17 % NaCl (YNB + NaCl). Z zeleno barvo so označeni primerjalni rezultati Ive Rappl (Rappl, 2011), ki je glive gojila pri nizki temperaturi ter povečani koncentraciji glukoze.

? identifikacija ni gotova.



Slika 1: Primerjava koncentracij proteinov pri surovih ekstraktih gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli.

### 5.1.2 Suha snov

Podoben trend je bilo opaziti tudi pri koncentracijah suhe snovi, kjer pa smo zabeležili več odstopanj pri surovih vzorcih (glej preglednico 1). Višjo koncentracijo suhe snovi v vzorcu, ki je bil odvzet iz slanega gojišča, smo opazili pri 83 % kuhanih vodnih ekstraktih, ter 64 % surovih vodnih ekstraktih.

Sevi, ki odstopajo: *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF – 2329, *Alternaria aborescens* EXF – 2340, *Aureobasidium pullulans* EXF – 150, *Cladosporium cladosporioides* EXF – 381, *Cladosporium cladosporioides* EXF – 2504, *Cladosporium velox* EXF – 466, *Cladosporium langeronii* EXF – 1000, *Cladosporium psychrotolerans* EXF – 391, *Cladosporium fusiforme* EXF – 449, *Wallemia sebi* EXF – 958, *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428, *Filobasidium floriforme* MZKI – K560, *Pichia guilliermondii* EXF – 518, *Pichia guilliermondii* EXF – 1496, *Saccharomyces cerevisiae* MZKI K86, *Fusarium* sp. 2 EXF – 2276. Od zgoraj naštetih sevov trije odstopajo od trenda pri surovem in kuhanem vzorcu hkrati: *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF – 2329, *Wallemia sebi* EXF – 958 ter *Filobasidium floriforme* MZKI – K560. V dveh primerih (*Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428, *Pichia guilliermondii* EXF – 518) je bilo opaziti odstopanja tako pri koncentraciji

proteinov, kot pri koncentraciji suhe snovi, vendar le pri surovih vzorcih (glej preglednici 1 in 2).

Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v surovih ter kuhanih glivnih ekstraktih.

Vrsta	Sev	Koncentracija suhe snovi [mg/ml]							
		S		K		S		K	
		YNB	YNB + NaCl	YNB	YNB + NaCl	YNB +NT	YNB + G	YNB +NT	YNB + G
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	46,0	22,8	106,3	86,90	7,8	59,0	8,0	58,4
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	4,70	7,30	3,80	4,60	3,0	3,4	6,2	142,4
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	1,90	41,00	1,30	34,70	7,0	21,0	7,4	66,8
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	20,30	12,20	14,40	16,90	2,4	95,4	6,0	65,4
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	EXF - 150	166,9	109,1	3,2	100,4	6,4	108,4	12,8	113,6
<i>Aureobasidium</i> sp. ?	EXF - 922	8,90	62,2	5,70	60,4	81,1	169,8	23,4	184,2
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	37,2	126,6	23,2	76,7	23,4	126,8	26,6	137,8
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> ?	EXF - 381	55,8	28,1	3,40	25,7	4,6	3,6	11,2	56,2
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> ?	EXF - 2504	6,80	15,8	13,9	10,1	6,4	52,0	11,2	121,0
<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i> ?	EXF - 385	3,60	29,8	7,30	41,5	4,4	54,6	5,8	79,4
<i>Cladosporium</i> <i>dominicanum</i>	EXF - 732	4,00	24,0	2,20	31,2	5,4	20,8	6,0	85,0
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	47,6	35,8	3,60	44,0	7,6	65,6	6,8	95,6
<i>Cladosporium</i> <i>halotolerans</i>	EXF - 572	2,20	55,3	0,80	39,9	8,4	70,8	7,6	33,4
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	7,60	27,3	1,70	160,8	3,4	97,0	4,6	110,8
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	9,80	15,6	24,30	51,5	2,8	13,0	4,4	125,8
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	26,68	8,32	0,44	3,38	5,0	39,4	8,4	118,2
<i>Cladosporium</i> <i>psychrotolerans</i>	EXF - 391	47,4	39,6	16,7	21,4	3,0	17,6	3,4	27,0

se nadaljuje

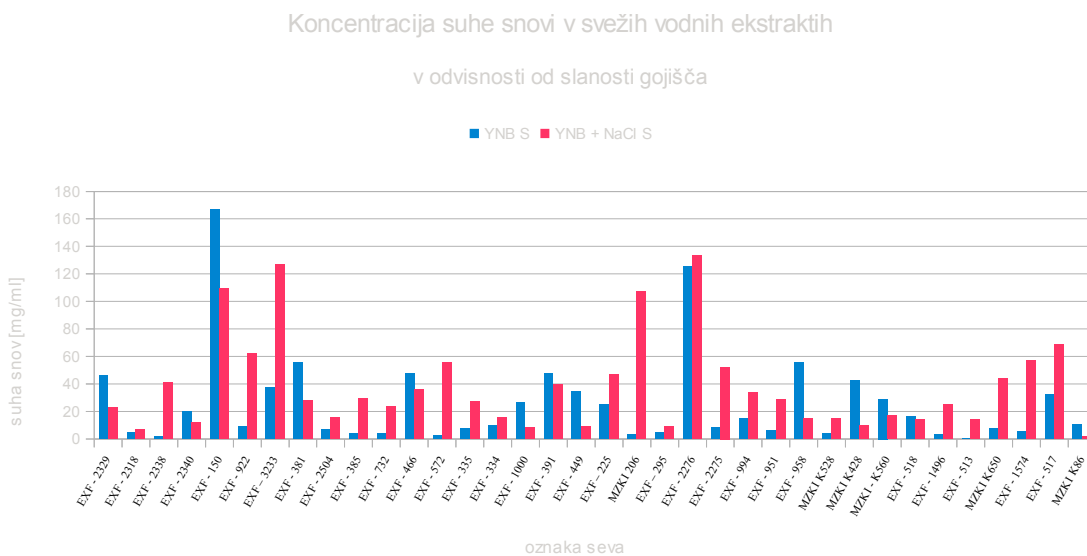
### Nadaljevanje Preglednica 6

Vrsta	Sev	Koncentracija suhe snovi [mg/ml]							
		S		K		S		K	
		YNB + NaCl	YNB	YNB	YNB + NaCl	YNB + NT	YNB + G	YNB + NT	YNB + G
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	34,4	9,10	1,00	27,1	1,4	96,8	5,6	60,2
<i>Hortea werneckii</i>	EXF - 225	25,4	47,2	8,80	92,4	4,4	16,2	4,4	130,0
<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	3,40	107,2	4,20	123,4	4,0	21,2	2,4	146,0
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295	4,40	8,70	41,17	64,3	5,0	6,8	7,2	29,4
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	125,1	133,7	213,5	73,2	3,8	7,8	4,2	87,2
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	8,20	52,4	50,4	52,5	7,4	71,0	8,8	115,2
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	15,0	34,0	12,2	31,2	33,2	7,2	51,2	115,0
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	6,20	28,4	10,0	35,9	53,8	86,6	35,6	100,4
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	55,3	14,9	5,00	3,50	52,4	23,6	115,8	4,8
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	4,00	15,1	7,20	12,1	9,4	11,2	4,6	31,2
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	42,3	10,1	7,70	21,4	4,6	12,4	7,6	9,4
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	29,1	17,0	34,7	20,2	21,8	9,8	21,6	23,4
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	16,2	14,4	16,4	41,3	21,4	6,4	13,4	30,2
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	3,40	25,2	26,1	25,0	3,8	19,8	11,2	41,4
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	EXF - 513	0,80	14,0	4,00	19,5	2,0	24,6	19,2	46,0
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	MZKI K650	7,80	44,2	3,30	60,7	2,8	3,4	6,4	17,6
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	5,40	57,2	3,70	67,1	7,6	9,6	7,0	40,4
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	32,5	68,5	54,7	166,9	13,8	3,6	13,2	47,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	10,3	1,50	5,40	7,10	4,0	13,0	4,2	13

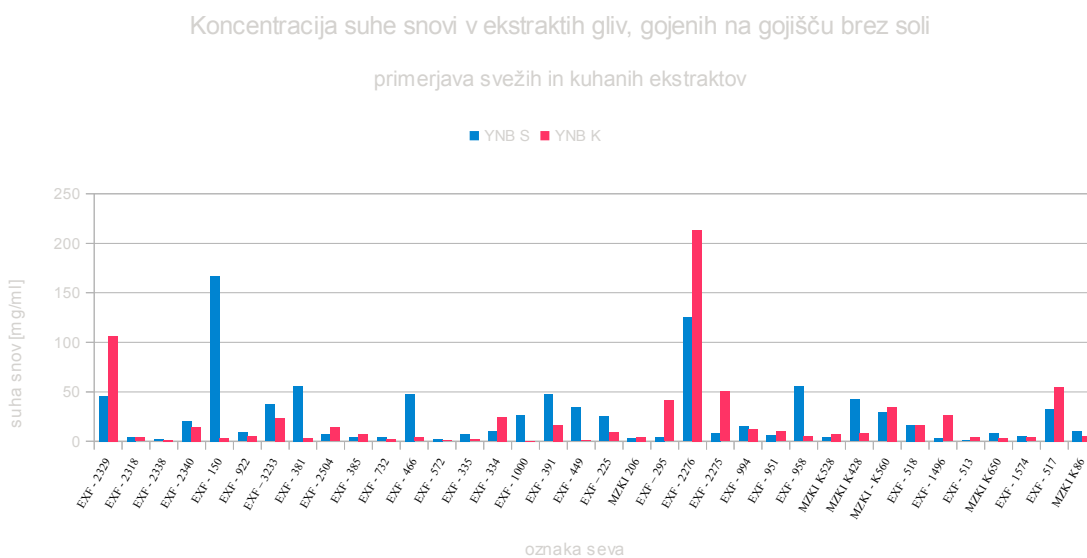
Legenda: sveži ekstrakti gliv (S), kuhani ekstrakti gliv (K), ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (W. ichthyophaga, W. muriae) (YNB), ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl oz. 17 % NaCl (YNB + NaCl).

? identifikacija ni gotova.

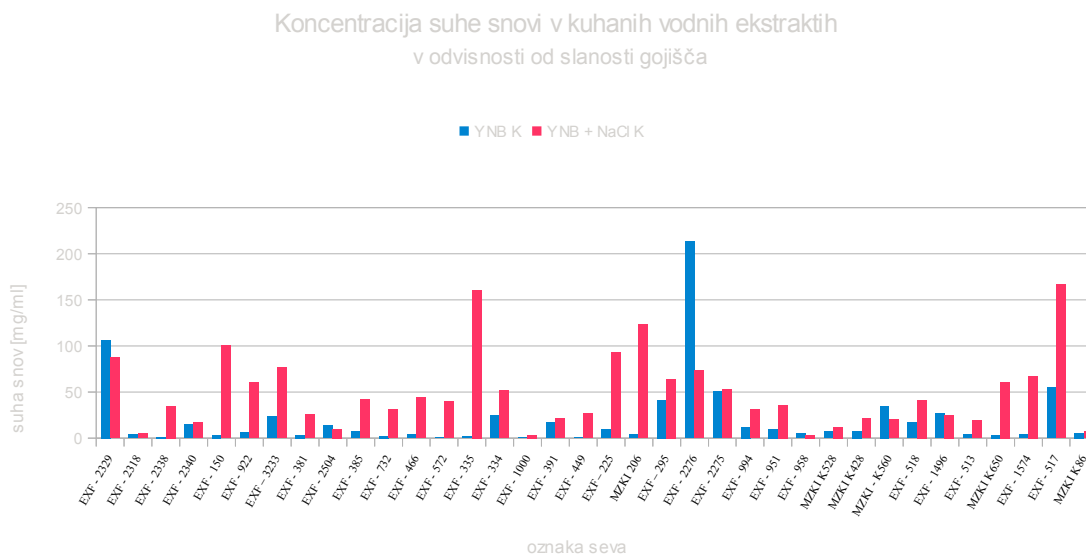
Z zeleno barvo so označeni primerjalni rezultati Ive Rappl (Rappl, 2011), ki je glive gojila pri nizki temperaturi ter povečani koncentraciji glukoze.



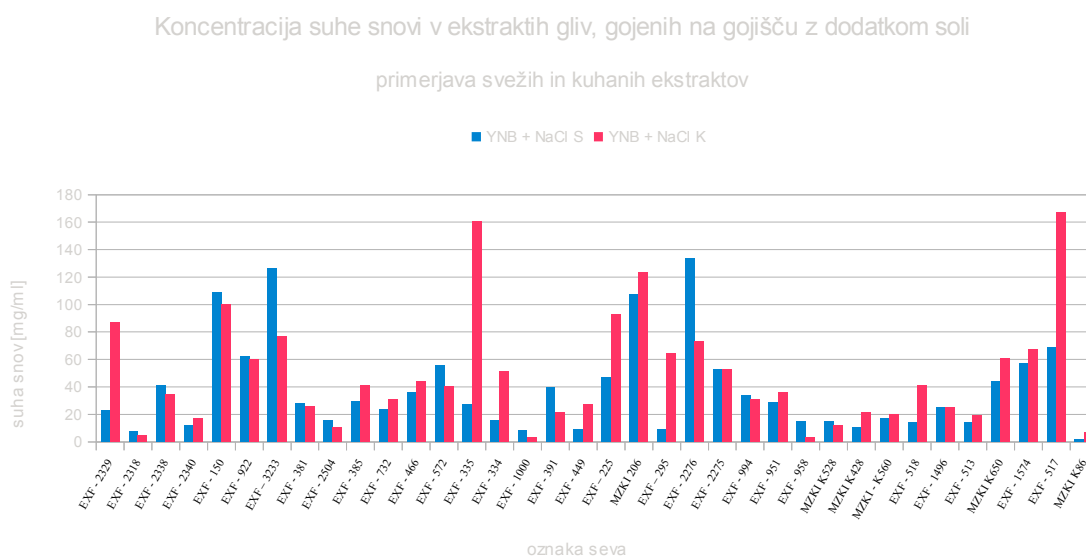
Slika 2: Primerjava suhih tež svežih vodnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli.



Slika 3: Primerjava suhih tež svežih in kuhanih ekstraktov gliv, gojenih na gojišču brez soli



Slika 4: Primerjava suhih tež kuhanih ekstraktov gliv, gojenih na gojišču brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli.



Slika 5: Primerjava suhih tež svežih in kuhanih ekstraktov gliv, gojenih na gojišču z dodatkom soli.

## 5.2 REZULTATI TESTOV HEMAGLUTINACIJE

Hemaglutinacija je pri vodnih vzorcih potekla v treh primerih:

- *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* EXF – 150, izoliran iz solin. Drugi sev te vrste, *Aureobasidium* sp. EXF – 922, iz Arktike, ni kazal te aktivnosti. Hemaglutinacijo smo opazili pri kuhanem ekstraktu glive *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* EXF – 150, ki je rasla na gojišču s soljo. Kot zanimivost smo opazili višjo koncentracijo suhe snovi v svežem ekstraktu te glive, ki je rasla brez soli, kakor pri glivi, ki je rasla na soli. Pri kuhanem ekstraktu je bilo ravno obratno.
- *Fusarium* sp. 2 EXF – 2276, ki je bil izoliran iz solin. Drug sev te vrste, *Fusarium* sp. 3, prav tako iz solin, ni kazal te biološke aktivnosti. Hemaglutinacijo smo opazili pri svežem vzorcu glive, ki je rasla brez soli. Koncentracija suhe snovi in proteinov pri aktivnem vzorcu ni izstopala glede velikosti v primerjavi z ostalimi vzorci tega seva (brez soli kuhani, s soljo surovi, s soljo kuhani).
- *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428, ki je bil izoliran iz Arktike. Sorodni sev, *Cryptococcus albidus* MZKI K528, prav tako izoliran iz Arktike, ni kazal te aktivnosti. Hemaglutinacijo smo opazili pri svežem vzorcu glive, ki je rasla brez soli. Glede velikosti je izstopala le koncentracija suhe snovi v primerjavi z ostalimi vzorci tega seva (brez soli kuhani, s soljo surovi, s soljo kuhani).

Vzorci, pozitivni na test hemaglutinacije, so po 10 kratnem in 100 kratnem redčenju izgubili hemaglutinacijsko aktivnost.

Zaradi premajhnega deleža aktivnih vzorcev ne moremo ugotavljati če, in kako, vpliva slanost gojišča ter koncentracija suhe snovi in proteinov v vzorcu, na aktivnost hemaglutinacije.



Preglednica 7: Rezultati hemaglutinacijskega testa. Prikazane so samo vrste gliv, ki so v testu dale pozitiven rezultat.

Vrsta	Sev	YNB S			YNB + NaCl S			YNB K		YNB + NaCl K	
		SS [mg/ml]	P [mg/ml]	Ha [+/- ]	SS [mg/ml]	P [mg/ml]	Ha [+/- ]	SS [mg/ml]	Ha [+/- ]	SS [mg/ml]	Ha [+/- ]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 150	166,9	1,0	-	109,1	5,95	-	3,2	-	100,4	++
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	125,1	1,00	+	133,7	4,8	-	213,5	-	73,2	-
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	42,3	0,65	++	10,1	0,4	-	7,7	-	21,4	-

Legenda: sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču (YNB S), kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču (YNB K), sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl (Y+NaCl S), kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl (YNB+NaCl K), koncentracija suhe snovi uporabljene v testu (SS), koncentracija proteinov uporabljena v testu (P), hemaglutinacija (Ha), ++ močna hemaglutinacija, + šibka hemaglutinacija, - hemaglutinacije nismo zasledili. Zaradi večje preglednosti so z zeleno barvo označeni rezultati testa hemaglutinacije.

Pri vodnih vzorcih Ive Rappl, ki je v svoji diplomski nalogi preverjala vpliv nizkih temperatur ter povišane koncentracije glukoze na biološko aktivnost istih glivnih sevov, je hemaglutinacija potekla v veliko večjem deležu (glej preglednico). Pri svežih in kuhanih ekstraktih Ive Rappl je bilo opaziti, da je hemaglutinacija bolj pogosta pri nizki temperaturi kakor pri povišani koncentraciji glukoze.

Preglednica 8: Rezultati hemaglutinacijskega testa. Prikazane so vse vrste gliv.

Vrsta	Sev	YNB		YNB + NaCl		YNB + NT		YNB + G	
		S	K	S	K	S	K	S	K
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	-	-	-	-	++	++	-	++
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	-	-	-	-	++	++	-	+
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	EXF - 150	-	-	-	++	++	++	-	++
<i>Aureobasidium</i> sp. ?	EXF - 922	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	-	-	-	-	++	++	-	++
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF - 381	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF - 2504	-	-	-	-	++	-	-	++
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF - 385	-	-	-	-	++	++	-	+
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	-	-	-	-	++	++	+	-
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	-	-	-	-	++	++	+	++
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	-	-	-	-	++	++	+	-
<i>Hortea werneckii</i>	EXF - 225	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	+	-	-	-	++	++	-	+

se nadaljuje

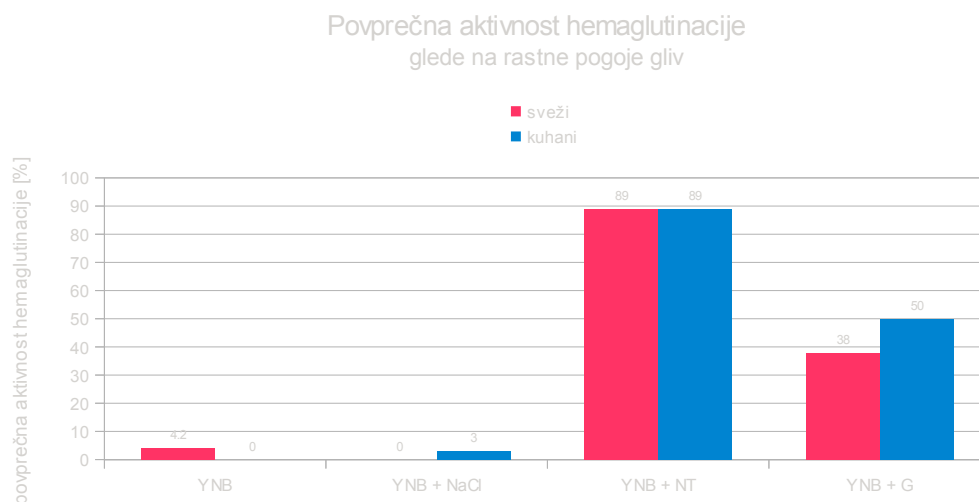
### Nadaljevanje Preglednica 8

Vrsta	Sev	YNB		YNB + NaCl		YNB + NT		YNB + G	
		S	K	S	K	S	K	S	K
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	-	-	-	-	++	++	-	+
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	-	-	-	-	-	++	++	++
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	++	-	-	-	++	++	-	++
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	-	-	-	-	-	++	-	++
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Rhodospidium babjevae</i>	EXF - 513	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Rhodospidium diobovatum</i>	MZKI K650	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	-	-	-	-	++	++	++	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	-	-	-	-	++	++	++	++

Legenda: ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču (YNB), ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl (YNB + NaCl), ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču pri nizki temperaturi (YNB + NT), ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču s povečano koncentracijo glukoze (YNB + G), sveži ekstrakti gliv (S), kuhani ekstrakti gliv(K), hemaglutinacija (Ha), ++ močna hemaglutinacija, + šibka hemaglutinacija, - hemaglutinacije nismo zasledili.

? identifikacija ni gotova.

Z zeleno barvo so označeni primerjalni rezultati Ive Rappl (Rappl, 2011), ki je glive gojila pri nizki temperaturi ter povečani koncentraciji glukoze. Zaradi večje preglednosti so naši vzorci, pozitivni na test hemaglutinacije, označeni z rumeno barvo.



Slika 6: Primerjava poprečne aktivnosti hemaglutinacije v različnih razmerah gojenja gliv

### 5.3 REZULTATI TESTA PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Vzorci na ploščah s po Gramu negativno bakterijo *Escherichia coli* niso pokazali inhibicije (-) bakterijske rasti, zato so prikazani samo rezultati testa s po Gramu pozitivno bakterijo *Bacillus subtilis*. Koncentracije suhe snovi in proteinov v testu z bakterijo *Bacillus subtilis* so bile enake kakor v testu z bakterijo *Escherichia coli*. Inhibicijo rasti po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* so pokazali vodni ekstrakti sevov:

- *Fusarium* sp. 2, EXF – 2276 (izoliran iz solin): YNB S (surov ekstrakt iz gojišča brez soli) in
- *Fusarium* sp. 3, EXF – 2275 (izoliran iz solin): YNB S, YNB K (surov in kuhan ekstrakt iz gojišča brez soli).

Inhibicijo rasti *Bacillus subtilis* smo zasledili le pri treh vzorcih; vsi so bili pridobljeni iz iste vrste, ki je rasla brez dodatka soli. Dva vzorca sta bila surova, eden pa prekuhan. Vzorci, ki inhibirajo rast *B. subtilis*, so po 10 in 100 kratnem redčenju izgubili inhibitorno aktivnost.

Preglednica 9: Rezultati testa protibakterijske aktivnosti proti po Gramu pozitivni bakteriji *B. subtilis*.  
 Prikazane so samo vrste gliv, ki so v testu dale pozitiven rezultat.

Vrsta	Sev	YNB S			YNB + NaCl S			YNB K		YNB + NaCl K	
		SS [mg/ml]	P [mg/ml]	CI [mm]	SS [mg/ml]	P [mg/ml]	CI [mm]	SS [mg/ml]	CI [mm]	SS [mg/ml]	CI [mm]
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF – 2276	125,1	1,00	0,5	133,7	4,8	/	213,5	/	73,2	/
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF – 2275	8,2	2,2	0,5	52,4	5,3	/	50,4	2,0	52,5	/

Legenda: sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču (YNB S), kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču (YNB K), sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl (YNB+ NaCl S), kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10 % NaCl (YNB+NaCl K), koncentracija suhe snovi uporabljene v testu (SS), koncentracija proteinov uporabljena v testu (P), cona inhibicije (CI).

#### 5.4 REZULTATI TESTA INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE

Rezultati testa inhibicije AChE so bili vsi negativni, kar pomeni, da nobeden od testiranih vzorcev ni inhibiral encima acetilholinesteraze.

#### 5.5 REZULTATI TESTA HEMOLIZE

Rezultati testa hemolize so bili vsi negativni, kar pomeni, da noben od testiranih vzorcev ni liziral eritrocitov.

## 6 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 6.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo želeli testirati, kako slanost gojišča, in posledično manjša dostopnost vode, vplivata na izločanje biološko aktivnih snovi pri izbranih halofilnih in halotolerantnih glivah. Vodne ekstrakte teh gliv smo testirali glede na hemolitično in hemaglutinacijsko aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost. Rezultati testov so bili večinoma negativni, kar pomeni, da vodni ekstrakti na splošno nimajo tovrstne biološke aktivnosti. Zato je težko ugotoviti, kakšen vpliv je imela prisotnost soli v gojišču na obseg izločanja vodotopnih biološko aktivnih snovi. Z vodo se v glavnem ekstrahirajo produkti primarnega metabolizma; to so proteini, ogljikovi hidrati in nukleinske kisline. Te snovi v celicah opravljajo osnovne funkcije, so bistvene za presnovo in reprodukcijo celic ter večinoma nimajo funkcije zaščite pred škodljivci in patogenimi organizmi ter s tem farmakološkega potenciala. Za farmakološke učinke rastlin in gliv so odgovorni nepolarni sekundarni metaboliti, ki pa se ekstrahirajo z organskimi topili.

Naše rezultate smo zato primerjali z rezultati drugih diplomskih nalog, v katerih so se ukvarjali z enakimi sevi gliv, vendar so jih gojili ali izolirali v drugačnih razmerah. Nas je zanimala predvsem primerjava biološke aktivnosti učinkovin v vodnih in organskih ekstraktih. V slednjih je namreč več sekundarnih metabolitov in zato bi lahko pričakovali tudi večjo raznovrstnost v biološki aktivnosti. S pomočjo podatka o (ne)topnosti v vodi lahko na grobem učinkovine razvrstimo v različne kemijske skupine, kar bi v prihodnjih raziskavah pomagalo pri lažjem čiščenju in določanju vrste sekundarnih metabolitov.

Zanima nas tudi primerjava biološke aktivnosti v vodnih ekstraktih istih glivnih sevov, ki so rasli pri povečani koncentraciji soli, glukoze, ali pri nizki temperaturi. Želeli smo ugotoviti, ali in kako te spremenjene rastne razmere vplivajo na biološko aktivnost danih sevov. Zmanjšana vodna aktivnost (ob povišani koncentraciji topljencev NaCl ali glukoze v gojišču) naj bi glive prisilila v povečano metabolno aktivnost in prilagajanje

na spremenjene rastne razmere. Poznamo različne strategije za obvladovanje stresa zaradi povišane koncentracije topljencev. Najpomembnejše so: spremembe v sestavi membrane in njenih lastnostih, bolj učinkoviti transportni sistemi za izločanje ionov kakor tudi založni sistemi za ione, ki zmanjšajo toksične učinke v citosolu, akumulacija majhnih organskih molekul, tako imenovanih kompatibilnih topljencev, ter posebnih signalnih transdukcijskih sistemov, ki zaznavajo in se odzivajo na povečane koncentracije soli oziroma glukoze (Plemenitaš in Gunde-Cimerman, 2005).

### **6.1.1 Primerjava biološke aktivnosti vodnih in organskih vzorcev**

Naše rezultate smo primerjali z rezultati diplomskih nalog, v katerih so testirali biološko aktivnost organskih vzorcev enakih glivnih sevov. Miša Cajnko (Cajnko, 2009) je ugotavljala biološko aktivnost organskih ekstraktov gliv, gojenih na gojiščih brez in z dodatkom soli, medtem ko je Mojca Horvat (Horvat, 2010) iste aktivnosti zasledovala v organskih ekstraktih gliv, gojenih pri nizki temperaturi ter na gojišču s povišano koncentracijo glukoze. Če primerjamo delež aktivnih vodnih ekstraktov v določenem biološkem testu z deležem aktivnih organskih ekstraktov v diplomski nalogi Miše Cajnko, ugotovimo, da so vzorci dobljeni z ekstrakcijo z organskimi topili bistveno bolj aktivni od vodnih ekstraktov. Hemolitično aktivnost je imelo 28.5 % organskih vzorcev (Cajnko, 2010), medtem ko nobeden od vodnih vzorcev ni kazal aktivnosti. Protibakterijsko aktivnost proti Gram negativni bakteriji *Escherichia coli* je kazalo 10.4 % organskih ekstraktov (Cajnko, 2010), vsi vodni ekstrakti pa so bili neaktivni. Protibakterijska aktivnost je bila precej bolj izražena proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*, saj je njeno rast inhibiralo kar 59 % organskih (Cajnko, 2010), a le 2.1 % vodnih vzorcev. Pri testu inhibicije AChE so bili vsi, tako organski kakor tudi vodni vzorci, popolnoma neaktivni.

Povišana koncentracija soli v gojišču je vplivala na višjo koncentracijo suhe snovi organskih in vodnih ekstraktov: 75 % vodnih ekstraktov in 64 % organskih je imelo pri povišani koncentraciji soli v gojišču višjo biomaso. Zanimiv trend pa se je pokazal pri organskih ekstraktih: ugotovili so, da povišana koncentracija soli v gojišču pri nekaterih sevih sicer poveča produkcijo sekundarnih metabolitov, vendar kljub večji produkciji

sekundarni metaboliti niso tudi bolj aktivni, ampak izkazujejo manjšo aktivnost (povzeto po Cajnko, 2010). Tudi pri vodnih ekstraktih smo (sicer z veliko manjšim številom aktivnih vzorcev) prišli do podobnega zaključka: dva aktivna vzorca, ki sta kazala rahlo protibakterijsko aktivnost, sta bila odvzeta iz neslanega gojišča. Vzorca istih sevov na slanem gojišču nista bila protibakterijsko aktivna. Pri hemaglutinacijskem testu pa rezultati niso bili enoznačni: dva seva sta kazala aktivnost samo na neslanem gojišču, eden pa samo na slanem.

Tudi ob primerjavi aktivnosti naših vodnih vzorcev ter organskih vzorcev iz diplomske naloge Mojce Horvat pridemo do podobnih zaključkov. 38 % organskih vzorcev (Horvat, 2009) je kazalo hemolitično aktivnost, medtem ko so bili vodni povsem neaktivni, protibakterijsko aktivnost proti *E. coli* je kazalo 11.8 % organskih vzorcev ter nobeden od vodnih, protibakterijsko aktivnost proti po Gramu pozitivni bakteriji *B. subtilis* pa je kazalo 42 % organskih vzorcev, v primerjavi z le 2,1 % aktivnih vodnih vzorcev.

### **6.1.2 Primerjava biološke aktivnosti vodnih vzorcev**

Rezultate testov naših vodnih vzorcev smo primerjali z vodnimi vzorci Ive Rappl (Rappl, 2011), ki je glive gojila v drugačnih razmerah rasti: pri nizki temperaturi ter na gojišču s povečano koncentracijo glukoze. Naši vodni vzorci so kazali biološko aktivnost le pri dveh bioloških testih; protibakterijsko aktivnost proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*, ter hemaglutinacijsko aktivnost.

#### **6.1.2.1 Protibakterijska aktivnost**

Vodni vzorci niso pokazali inhibicije rasti po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli*. Inhibicijo rasti po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* so pokazali vodni ekstrakti sevov *Fusarium* sp. 2, EXF – 2276 (izoliran iz solin) in *Fusarium* sp. 3, EXF – 2275 (izoliran iz solin). Vzorci so bili trije, vsi pridobljeni iz istega rodu *Fusarium* sp., ki je rasla brez dodatka soli. Dva vzorca sta bila surova, eden pa prekuhan. *Fusarium* sp. 2, EXF – 2276 je inhibiral rast bakterije le kot svež vzorec, ki je rasel brez soli v



gojišču. Prekuhan vzorec seva v enakih rastnih razmerah ni imel protibakterijske aktivnosti, zato lahko sklepamo, da je protibakterijsko aktivna snov verjetno proteinskega izvora. Ekstrakt glive *Fusarium* sp. 3, EXF – 2275 je bil prav tako protibakterijsko aktiven le takrat, ko je gliva rasla brez dodatka soli. Za razliko od *Fusarium* sp. 2 pa je ta sev izkazoval protibakterijsko aktivnost tudi v prekuhanem vzorcu, zato lahko sklepamo, da aktivna snov v vzorcih ni proteinskega izvora.

Iva Rappl (Rappl, 2011), ki je v kontrolnem poskusu, ki so bili enak našemu, tudi gojila iste glivne seve, v vzorcih ni ugotovila protibakterijske aktivnosti.

Aktivnost rodu *Fusarium* sp. proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis* je bila že opisana: med snovmi, izoliranimi iz nedoločene vrste rodu *Fusarium*, so Renner in sodelavci (1998) odkrili neomagnikol B z antitumorsko in antibakterijsko aktivnostjo proti *B. subtilis*. Vendar pa ta snov ne more biti prisotna v naših vzorcih, saj je neomagnikol B sesterpen poliol, ki se raztaplja v organskih topilih (metanol, diklorometan). Bolj splošno protibakterijsko aktivnost so Kobayashi in sodelavci (1995) odkrili pri fuzarielinu A, snovi, ki jo prav tako sintetizira rod *Fusarium* sp., in ki izkazuje tudi splošno protiglivno ter protitumorsko aktivnost. Vendar tudi ta snov ne more biti prisotna v naših aktivnih vzorcih, saj je fuzarielin nepolarna kemijska spojina, poliketid, ki se raztaplja v acetonu in benzenu. Tudi snov JM47, ciklični tetrapeptid, ki so ga leta 2002 iz rodu *Fusarium* sp. izolirali Jiang in sodelavci, izkazuje splošno protibakterijsko aktivnost, vendar je topen v etilacetatu, zato verjetno ni bil prisoten v naših vzorcih. V vodi pa je topen sansalvamid, ciklični pentadepsi-peptid, ki pa ima opisano le antitumorsko aktivnost (Belofsky, 1999).

#### 6.1.2.2 Hemaglutinacija

Iva Rappl je pri svojih kontrolnih vzorcih ugotovila hemaglutinacijo pri dveh svežih vzorcih: *Fusarium* sp. 2 EXF – 2276, ter *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428.

Hemaglutinacije vzorcev iz glive *Aureobasidium pullulans* še niso opisali, so pa Chi in sodelavci (2009) iz vodnih ekstraktov te vrste izolirali več zunajceličnih encimov, kot

sta pululan, ki deluje antikoagulacijsko in antitrombotično, ter siderofor, ki sodeluje v transportu železa v mikroorganizem. Pri vrsti *Fusarium solani* so Khan in sodelavci (2007) izolirali lektin, snov, ki ima hemaglutinacijsko aktivnost. Pri vrsti *Cryptococcus liquefaciens*, razen encima superoksid dizmutaze (Kanamasa, 2007), še niso opisali nobenega sekundarnega metabolita. Najpogostejše snovi, odgovorne za aglutinacijo ali zlepljenje krvnih celic, so protitelesa in lektini. Surova ekstrakta, ki sta aglutinirala krvne celice, verjetno vsebujeta lektine. Lektini so proteini ali glikoproteini, sposobni stereospecifičnega prepoznavanja ter reverzibilne vezave na sladkorne ostanke v glikoproteinih. Največ je znanega o rastlinskih in živalskih lektinih, čeprav v zadnjih desetih letih spoznavamo tudi vedno nove lektine glivnega izvora (Khan in Khan, 2011). Z vezavo na celično steno ali membrano lektini vplivajo na fiziologijo le-te in tako povzročijo aglutinacijo celic, mitozo ter druge biokemijske spremembe v celici. Lektini sodelujejo pri celičnem signaliziranju, virulenci patogenov, celičnih interakcijah v imunskem sistemu (Sharon and Lis, 1989). Farmakološko pa so zanimivi zaradi učinkov, ki se kažejo v antitumorskih, antiproliferativnih ter imunomodulatornih aktivnostih (She in sod., 1998).

### **6.1.3 Primerjava koncentracij proteinov v vodnih vzorcih**

Eden od ciljev naše diplomske naloge je bil tudi, da ugotovimo, kako koncentracija soli v gojišču vpliva na vsebnost proteinov v vzorcih gliv. Opazili smo, da so bile koncentracije proteinov v večini primerov (83 %) višje v vodnih ekstraktih gliv, ki so rasle na slanem gojišču od koncentracij ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču brez soli.

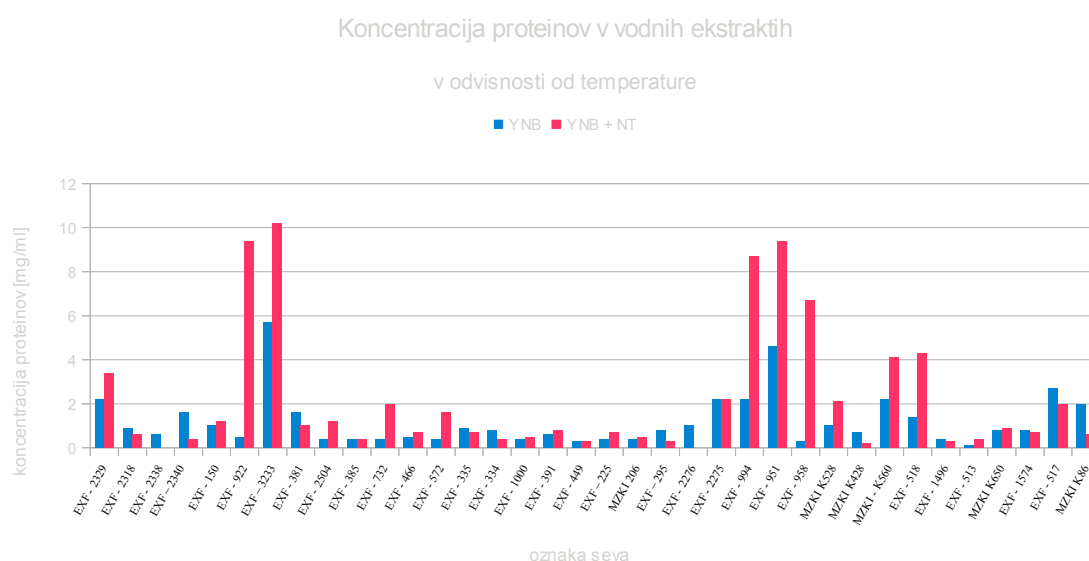
#### **6.1.3.1 Primerjava koncentracij proteinov v vzorcih glede na druge parametre gojenja**

Primerjali smo koncentracije proteinov v naših vodnih vzorcih s koncentracijami v vodnih vzorcih Ive Rappl, ki je glive gojila v drugačnih razmerah rasti.

##### **6.1.3.1.1 Nizka temperatura gojenja**

Ker sta povišana koncentracija sladkorja in nizka temperatura stresna dejavnika za

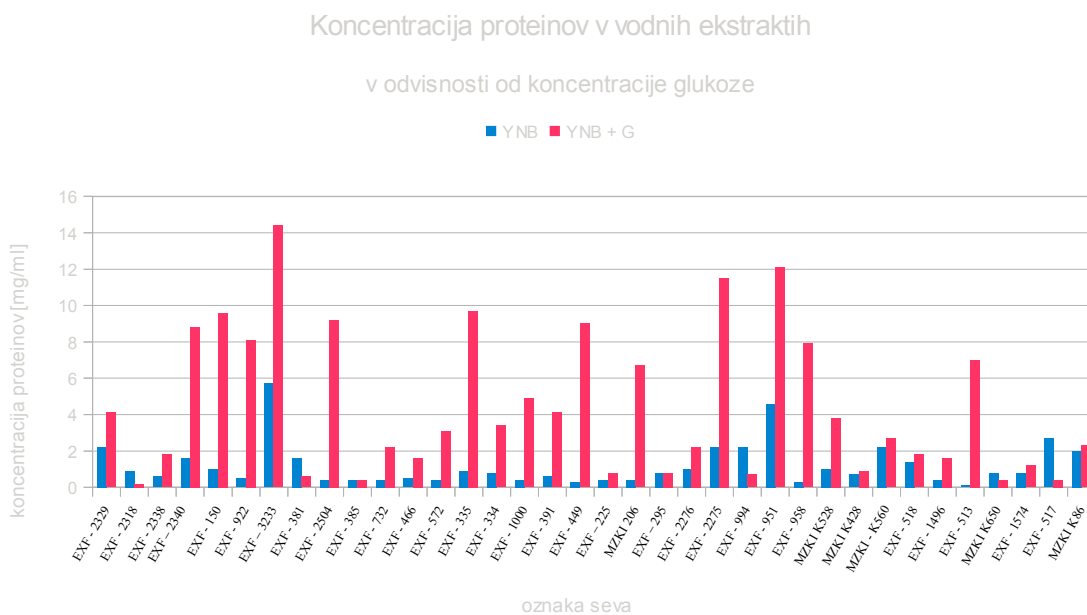
glive, nas je zanimalo, kako ta dva dejavnika vplivata na izločanje biološko aktivnih spojin. Primerjali smo naše rezultate koncentracij proteinov pri glivah, ki so rasle na sobni temperaturi, ter rezultate koncentracij proteinov iz diplomske naloge Ive Rappl (Rappl, 2010), kjer so raziskovali vpliv znižane temperature (NT) 4 °C (pri nekaterih sevih so temperaturo prilagodili) na produkcijo sekundarnih metabolitov. Ugotovili smo, da v večini primerov nizka temperatura korelira z višjo koncentracijo proteinov (glej sliko 7).



Slika 7: Primerjava koncentracij proteinov pri svežih ekstraktih gliv, gojenih na sobni temperaturi ali na nizki temperaturi (4 °C). Primerjamo naše vzorce ter vzorce Ive Rappl (Rappl, 2011).

#### 6.1.3.1.2 Visoka koncentracija glukoze v gojišču

Primerjali smo tudi naše koncentracije proteinov pri glivah, ki so rasle na gojišču z 2 % glukoze, ter rezultate koncentracij proteinov druge diplomske naloge (Rappl, 2010), kjer so raziskovali vpliv povišane koncentracije glukoze v gojišču (40 %) na produkcijo sekundarnih metabolitov. V tej primerjavi pa smo odkrili še močnejšo korelacijo med povišano koncentracijo glukoze v gojišču in koncentracijo proteinov iz biomase (glej sliko 8).



Slika 8: Primerjava koncentracij proteinov pri surovih ekstraktih gliv, gojenih na gojišču z normalno koncentracijo glukoze 2 %, ter povišano koncentracijo glukoze (40 %).

#### 6.1.4 Primerjava koncentracij suhe snovi v vodnih vzorcih

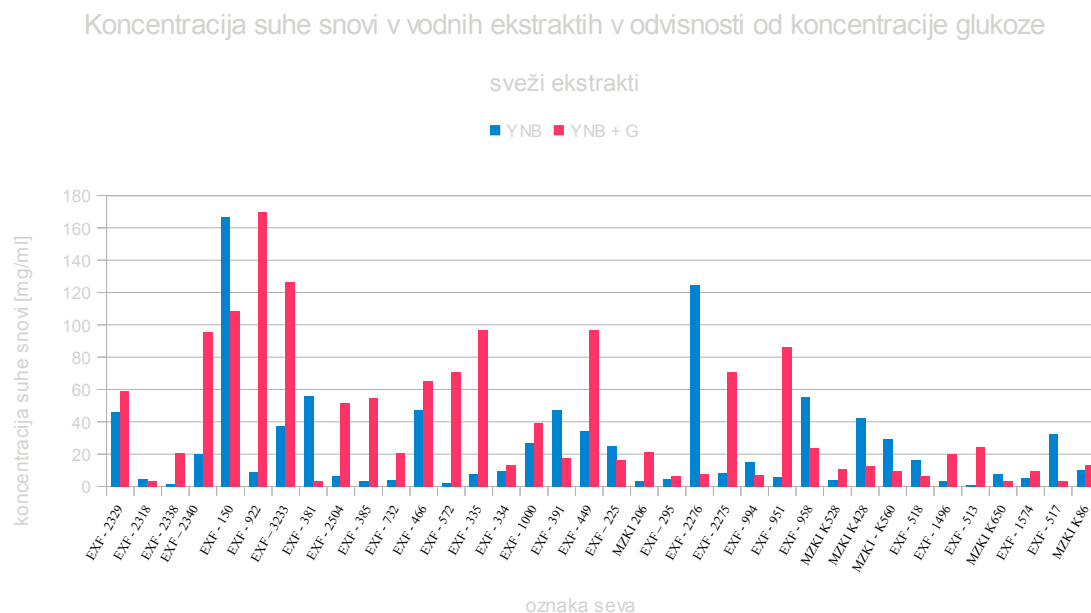
Če primerjamo koncentracije suhe snovi v kontrolnih vodnih vzorcih (sveži, ter kuhani) s koncentracijami v vzorcih odvzetih iz slanih rastišč (sveži, ter kuhani), ugotovimo, da zmanjšana dostopnost vode vpliva na povišano koncentracijo suhe snovi.

##### 6.1.4.1 Primerjava koncentracij suhe snovi v vzorcih glede na druge razmere v gojišču

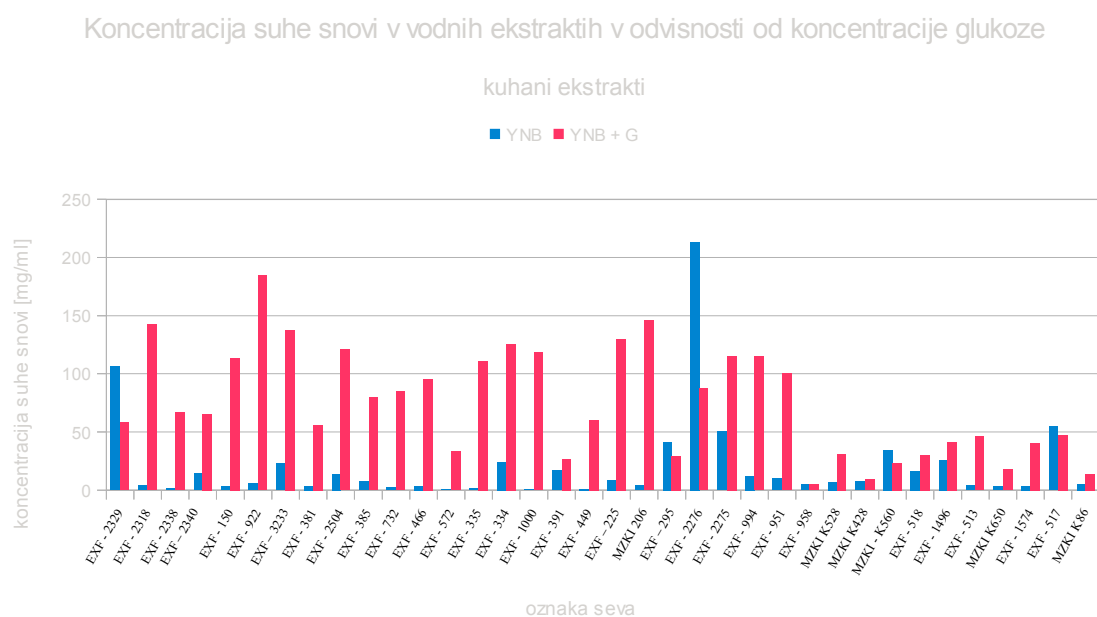
###### 6.1.4.1.1 Visoka koncentracija glukoze v gojišču

Povišana koncentracija katerihkoli topljencev (soli, sladkorji) v okolju organizma predstavlja zanj zmanjšano dostopnost vode, zato ob primerjavi koncentracije suhe snovi v kontrolnih vodnih vzorcih z vzorci, ki so bili odvzeti iz gojišč s povišano koncentracijo glukoze (vzorci Ive Rapp), pridemo do enakih ugotovitev. Sveži in kuhani ekstrakti gliv, ki so bili gojeni pri povišani koncentraciji NaCl ali glukoze, imajo v povprečju višje koncentracije suhe snovi, kakor tisti, ki so rasli v normalnih razmerah

(glej sliko 9 in 10). V obeh primerih močno izstopa sev *Fusarium* sp. 2 EXF – 2276, v enem sev *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* EXF – 150 (slika 9) ter sev *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF – 2329 (slika 10).



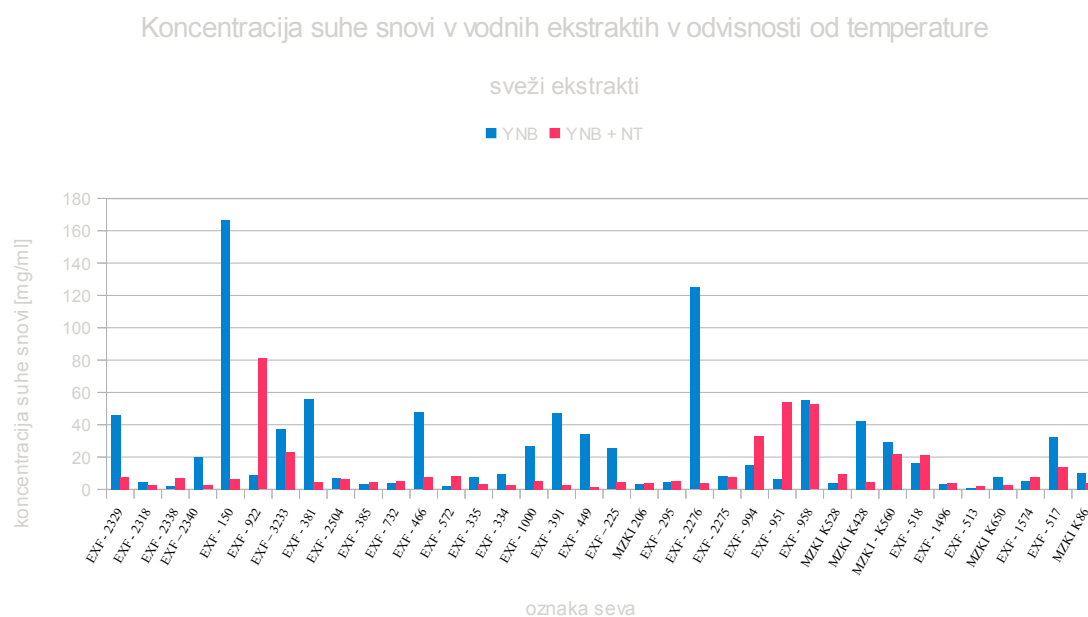
Slika 9: Primerjava koncentracij suhe snovi pri svežih ekstraktih gliv, gojenih na gojišču z normalno koncentracijo glukoze (2 %), ter povišano koncentracijo glukoze (40 %).



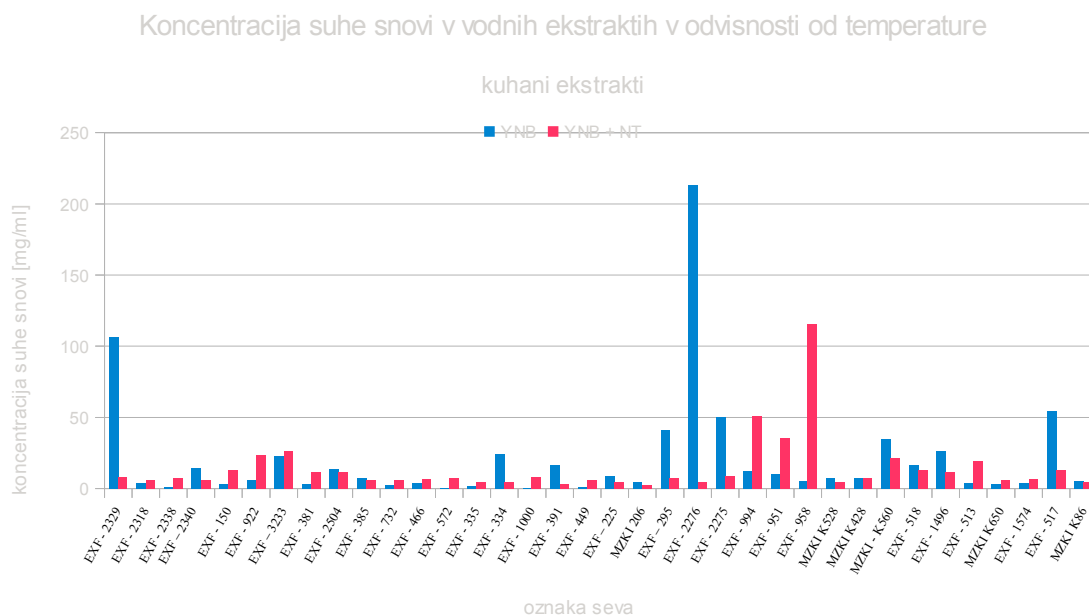
Slika 10: Primerjava koncentracij suhe snovi pri kuhanih ekstraktih gliv, gojenih na gojišču z normalno koncentracijo glukoze 2 %, ter povišano koncentracijo glukoze (40 %).

#### 6.1.4.1.2 Nizka temperatura gojenja

Ob primerjavi vsebnosti suhe snovi v vzorcih, glede na temperaturo gojenja, smo ugotovili, da nizka temperatura tako pri svežih kot pri kuhanih vzorcih botruje zmanjšani koncentraciji suhe snovi (glej sliko 11 in 12). Ker naj bi nižja temperatura predstavljala stres za organizem, smo pričakovali, da se bo organizem nanj odzval s povečano sintezo zaščitnih snovi, vendar tega predvidevanja nismo potrdili. Ta pojav smo v večji meri opazili le pri sevih *Aureobasidium* sp. EXF – 922 (slika 11), *Wallemia muriae* EXF – 951 (slika 11 in 12), *Wallemia sebi* EXF – 958 (slika 12) ter *Wallemia ichtyophaga* EXF – 994 (slika 12).



Slika 11: Primerjava koncentracij suhe snovi pri svežih ekstraktih gliv, gojenih na sobni ali na nizki temperaturi (4 °C).



Slika 12: Primerjava koncentracij suhe snovi pri kuhanih ekstraktih gliv, gojenih na sobni ali na nizki temperaturi (4 °C).

## 6.2 SKLEPI

- Vodni vzorci so kazali biološko aktivnost le pri dveh bioloških testih; protibakterijsko aktivnost proti Gram pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*, ter hemaglutinacijsko aktivnost.
- Vodni vzorci obravnavanih gliv niso pokazali inhibicije rasti po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli*. Protibakterijsko aktivnost proti Gram negativni bakteriji *Escherichia coli* pa je v naših poskusih kazalo 10,4 % organskih ekstraktov (metanolnih in etanolnih), oz. 36,1 % izbranih vrst gliv v predhodni diplomu (Cajnko, 2010), ter 11,8 % organskih ekstraktov iz diplomske naloge kolegice Mojce Horvat (Horvat, 2009).
- Protibakterijsko aktivnost proti Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis* smo zaznali pri 2.1 % vodnih vzorcev oz. pri 5,4 % vrst gliv, aktivnih pa je bilo kar 59 % organskih vzorcev, oz. 83,3 % izbranih vrst gliv (Cajnko, 2010), ter 42 % organskih vzorcev iz diplomske naloge kolegice Mojce Horvat (Horvat, 2009).
- Protibakterijsko aktivnost proti *B. subtilis* je kazal le rod *Fusarium* sp., izoliran iz gojišča brez soli.

- Pri sevu *Fusarium* sp. 2, EXF – 2276 (izoliran iz solin) je aktivna snov verjetno proteinskega izvora, saj je protibakterijsko aktiven le svež ekstrakt, pri sevu *Fusarium* sp. 3, EXF – 2275 (izoliran iz solin) pa snov ni proteinskega izvora, saj sta bila aktivna tako svež kakor tudi kuhan ekstrakt.
- V diplomskem delu prvič poročamo o protibakterijski aktivnosti vodotopnih snovi iz rodu *Fusarium* proti *Bacillus subtilis*.
- Povišana koncentracija soli v gojišču je večinoma (75 %) vplivala na višjo koncentracijo suhe snovi vodnih ekstraktov; ta trend je bil bolj opazen pri kuhanih vzorcih; tam je bil delež 83 %, pri svežih pa 64 %.
- Tudi pri organskih ekstraktih je povešana koncentracija soli v gojišču v večini primerov (64 %) vplivala na višjo koncentracijo suhe snovi (Cajnko, 2010).
- Povišana koncentracija glukoze je prav tako vplivala na višjo koncentracijo suhe snovi vodnih ekstraktov. Močno izstopajo sevi *Fusarium* sp. 2 EXF – 2276, *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* EXF – 150 ter *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF – 2329 (Rappl, 2010).
- Nizka temperatura gojenja pa je, nasprotno, botrovala nižji koncentraciji suhe snovi v vodnih ekstraktih. Povišanje koncentracije suhe snovi je bilo opaziti le pri sevih: *Aureobasidium* sp. EXF – 922, *Wallemia muriae* EXF – 951, *Wallemia sebi* EXF – 958 ter *Wallemia ichthyophaga* EXF – 994 (Rappl, 2010).
- Povišana koncentracija soli v gojišču v večini primerov (83 %) vpliva na povešano koncentracijo proteinov v vodnih vzorcih obravnavanih gliv. Tudi nizka temperatura gojenja, še bolj pa visoka koncentracija glukoze v gojišču, korelirata s povešano koncentracijo proteinov v vzorcih (Rappl, 2010).
- Pri testu inhibicije AChE niso vodni ekstrakti kazali nikakršne aktivnosti, prav tako ne organski (Cajnko, 2010, Horvat, 2009).
- Pri testu hemolize vodni vzorci niso kazali nobene aktivnosti, aktivnost pa je pokazalo 28,5 % organskih vzorcev iz diplomske naloge kolegice Miše Cajnko (Cajnko, 2010), ter 38 % organskih vzorcev iz diplomske naloge kolegice Mojce Horvat (Horvat, 2009).
- Hemaglutinacijo smo ugotovili pri kuhanem ekstraktu *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* EXF – 150, ki je rasel na slanem gojišču, svežem ekstraktu *Fusarium* sp. 2



EXF – 2276, ki je rasel brez soli, ter svežem ekstraktu *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428, ki je prav tako rasel brez soli. Iva Rappl je pri svojih kontrolnih vzorcih ugotovila hemaglutinacijo pri dveh svežih vzorcih: *Fusarium* sp. 2 EXF – 2276, ter *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428.

- Prvi smo opisali hemaglutinacijsko aktivnost pri vrsti *Aureobasidium pullulans*.
- Kemijske spojine, ki so povzročile hemaglutinacijo v svežih ekstraktih, so verjetno lektini.

## 7 POVZETEK

Glede na to, da so glive vir številnih in raznolikih biološko aktivnih snovi, ki se izkoriščajo v industriji ter farmaciji, je izredno pomembno, da se njihov potencial čim bolj izkoristi. Še posebno halofilne in halotolerantne glive, ki so še dokaj neraziskane, verjetno sintetizirajo širok spekter spojin, ki bi jih lahko uporabili v medicini, industriji, bioremediaciji in podobno. V naši diplomski nalogi smo zato predvidevali, da bomo našli nove, še neopisane učinkovine, pomagali določiti optimalne razmere gojenja za produkcijo specifičnih snovi, ter pripomogli k lažji izolaciji potencialno zanimivih spojin.

Osredotočili smo se na 36 izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv iz redu *Dothideales* in izbranih kvasovk ter jih testirali s štirimi različnimi testi; to so bili test hemolitične aktivnosti, hemaglutinacijske aktivnosti, protibakterijski test ter test inhibicije encima AChE. Zanimal nas je vpliv slanosti gojišča na produkcijo vodotopnih biološko aktivnih snovi.

Ugotovili smo, da nekateri vodni ekstrakti vsebujejo biološko aktivne spojine, ki bi lahko bile farmakološko uporabne. Najbolj zanimiv za nadaljne raziskave bi bil rod *Fusarium* sp., ki je kazal šibko protibakterijsko aktivnost proti *B. subtilis* (*Fusarium* sp. 2 in *Fusarium* sp. 3), ter hemaglutinacijsko aktivnost (*Fusarium* sp. 2). Kar se tiče vpliva slanosti na protibakterijsko in hemaglutinacijsko aktivnost pri rodu *Fusarium*, smo ugotovili, da slanost zavira sintezo aktivnih snovi, saj so bili aktivni le tisti vzorci rodu *Fusarium*, ki so rasli brez soli. V primeru *Fusarium* sp. 2 smo potrdili, da so bile aktivne snovi verjetno proteinskega izvora, Pri *Fusarium* sp. 3 pa tega zaključka ne moremo narediti.

Slanost je hemaglutinacijo zavirala tudi pri sevu *Cryptococcus liquefaciens*, kjer je bila aktivna snov verjetno proteinskega izvora. Pri sevu *Aureobasidium pullulans* pa izgleda, da je sol v gojišču spodbujala sintezo aktivnih snovi.

Aktivne spojine, ki so povzročile hemaglutinacijo v svežih ekstraktih, so verjetno

lektini; to so farmakološko zanimivi proteini, ki se stereospecifično in reverzibilno vežejo na sladkorni del glikoproteinov celične stene ali membrane. Temu sledi aglutinacija celic, mitozna ali druge biokemijske spremembe, ki posledično vplivajo na imunomodulacijo ter antitumorske in antiproliferativne aktivnosti (povzeto po Sharon and Lis, 1989).

Glede na to, da je slanost neke vrste stres za mikroorganizem, ker zmanjšuje dostopnost vode, smo pričakovali, da se bodo glive obrambno odzvale s povečanjem sinteze aktivnih in drugih snovi. Zaradi premajhne celokupne aktivnosti vodnih vzorcev pa ne moremo dokončno reči, kakšen vpliv ima slanost gojišča na izločanje biološko aktivnih snovi; ugotovimo lahko le, da definitivno vpliva na povečanje celokupne suhe snovi, kar verjetno pade na kompatibilne topljence, glede aktivnih snovi pa je videti, da zavira njihovo produkcijo.

## 8 VIRI

- Batič F., Šircelj H., Turk B. (2004). Pregled rastlinskega sistema. Skripta. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 119 str.
- Bhadury P., Mohammad B.T., Wright P.C. (2006). The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 33: 325-337
- Belofsky G.N., Jensen P.R., Fenical W. (1999). Sansalvamide: a new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Tetrahedron Letters*, 40: 2913-2916
- Bennett J.W., Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16, 3: 497-516
- Bhakuni D.S., Rawat D.S. (2005). Bioactive marine natural products. New York, New Delhi. Springer and Anamaya Publishers: 382 str.
- Brauers G., Ebel R., Edrada R., Wray V., Berg A., Gräfe U., Proksch P. (2001). Hortein, A new natural product from the fungus *Hortaea werneckii* associated with the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of natural products*, 64: 651-652
- Bugni T.S., Ireland C.M. (2004). Marine derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, 21: 143-163
- Cajnkó M.M. (2010): Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih In halotolerantnih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 43 str.
- Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.K. (2002). Relationship between Secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology*

reviews, 66, 3: 447-459

Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 82: 793-804

Cueto M., Jensen P.R., Fenical W. (2000). N-methylsalsalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Phytochemistry*, 55: 223-226

Ellman G. L., Courtney D., Anders V., Featherstone R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7: 88-95

Evidente A., Conti L., Altomare C., Bottalico A., Sindona G., Segre A.L., Logrieco A. (1994). Fusapyrone and deoxyfusapyrone, two antifungal  $\alpha$  - pyrones from *Fusarium semitectum*. *Natural toxins*, 2: 4-13

Fox E.M., Howlett B.J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current opinion in microbiology*, 11: 481-487

Frisvad, J. C. (2005). Halotolerant and halophilic fungi and their extrolite production. V: *Adaptation to life at high salt concentration in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Gunde Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (eds.). Springer: 425-439

Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog G.S., Plemenitaš A. (2000). Hypersaline water in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *Fems Microbiology Ecology*, 32: 235-240

Gunde-Cimerman N., Cerovac S., Zalar P. (2001). Biotska pestrost gliv Sečoveljskih solin. *Acta biologica Slovenica*, 44: 1-2, 25-30

- Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitaš A. (2005). Halotolerant and halophilic fungi. V: Biodiversity of funghi. Their role in human life. Desmukh S.K., Rai M.K. (eds.). New Delhi, Oxford & IBH Publishing Cp. Pvt. Ltd.: 69-127
- Haefner B. (2003). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8, 12: 536-544
- Hale W.G., Margham J.P., Saunders V.A. (1995). Collins dictionary of biology. 2. izdaja. Glasgow. Harper Collins publishers: 554, 272
- Horvat M. (2009): Vpliv glukoze in temperature na produkcijo biološko aktivnih snovi V organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 79 str.
- Jadulco R., Brauers G., Edrada R., Ebel R., Wray V., Sudarsono, Proksch P. (2002). New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *Journal of natural products*, 65: 730-733
- Jadulco R., Proksch P., Wray V., Sudarsono, Berg A., Gräfe U. (2001). New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbaceum*. *Journal of natural products*, 64: 527-530
- Jiang Z., Barret M.O., Boyd K.G., Adams D.R., Boyd A.S.F., Burgess J.G. (2002). JM47, A cyclic tetrapeptide HV-toxin analogue from a marine *Fusarium* species. *Phytochemistry*, 60: 33-38
- Kanamasa S., Sumi K., Yamuki N., Kumasaka T., Miura T., Abe F., Kajiwara S. (2007): Cloning and functional characterization of the copper/zinc superoxide dismutase gene from the heavy-metal-tolerant yeast *Cryptococcus liquefaciens* strain N6. *Molecular Genetics and Genomics*. 277: 403-412

- Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature reviews, microbiology*. 12: 937-947
- Khan F., Ahmad A., Khan M.I. (2007): Interaction of *Fusarium solani* lectin with monosaccharides and oligosaccharides: a fluorometric study. *Photochemistry and photobiology*. 83: 966-970
- Khan F., Khan M.I. (2011): Fungal lectins: Current molecular and biochemical perspectives. *International journal of biological chemistry*. 5: 1-20
- Kirk P., Cannon P., Minter D., Stalpers J. (2008). *Dictionary of the fungi*. 10. izdaja. Oxon. CABI publishing: 770 str.
- Kobayashi H., Sunaga R., Furihata K., Morisaki N., Iwasaki S. (1995). Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fusarielin A, and related compounds produced by a *Fusarium* sp. *Journal of antibiotics*. 48: 42-52
- Madigan M., Martinko J.M., Parker J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms*. 10. izdaja. Upper Saddle River, NJ. Prentice-Hall: 1019 str.
- Mayer A.M.S., Lehmann V.K.B. (2000). Marine pharmacology. *The Pharmacologist*, 42, 2: 62-69
- Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. (2005). Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortea werneckii* to high environmental salinity. *Nizozemska, Springer*: 453-470
- Proksch P., Edrada R.A., Ebel R. (2002). Drugs from the sea - current status and microbiological implications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59: 125-134
- Rappl I. (2010): Vpliv glukoze in temperature na produkcijo biološko aktivnih snovi v vodnih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk. *Diplomsko delo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška

fakulteta, Oddelek za biologijo: 63 str.

Renner M.K., Jensen P.R., Fenical W. (1998). Neomagnicols: structures and absolute stereochemistries of unprecedented halogenated sesterterpenes from the marine fungus of the genus *Fusarium*. *Journal of organic chemistry*. 63: 8346-8354

Renner M.K., Jensen P.R., Fenical W. (2000). Mangicols: structures and biosynthesis of a new class of sesterterpene polyols from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Journal of organic chemistry*. 65: 4843-4852

Sakai H., Kaneno H., Sumiya Y., Tsusima M., Miki W., Kishimoto N., Fujita T., Matsumoto S., Komemushi S., Sawabe A. (2002). A new carotenoid glycosyl ester isolated from a marine microorganism, *Fusarium strain* T-1. *Journal of natural products*. 65: 1683-1684

Saleem M., Shaiq Ali M., Hussain S., Jabbar A., Ashraf M., Lee Y.S. (2007). Marine natural products of fungal origin. *Natural Product Reports*, 24: 1142-1152

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. (2004). Introduction to food - and airborne fungi. 7. izdaja. Utrecht. Centraalbureau voor Schimmelcultures: 322 str.

Sharon N., Lis H. (1989): Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 246: 227-234

She Q.B., Ng T.B., Liu W.K. (1998): *A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea**. *Biochemical and biophysical research communications*. 247: 106-111

Shigemori H., Kasai Y., Komatsu K., Tsuda M., Mikami Y., Kobayashi Y. (2004). Sporiolides A and B, new cytotoxic twelve-membered macrolides from a marine derived fungus *Cladosporium* species. *Marine drugs*. 2: 164-169



- Shigemori H., Tenma M., Shimazaki K., Kobayashi J. (1998). Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Journal of natural products*. 61: 696-698
- Smith C.J., Abbanat D., Bernan V.S., Maiese W.M., Greenstein M., Jompa J., Tahir A., Ireland C.M. (2000). Novel polyketide metabolites from a species of marine fungi. *Journal of natural products*. 63: 142-145
- Sonjak S. (2006). Biološka raznovrstnost rodu *Penicillium* v ledeniškem ledu Arktike (Svalbard) in genomska variabilnost najpogostejše vrste *P. crustosum*: doktorska Dizertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 72 str.
- Takahashi I., Maruta R., Ando K., Yoshida M., Iwasaki T., Kanazawa J., Okabe M., Tamaoki T. (1993). UCA 1064-B, a new antitumor antibiotic isolated from *Wallemia sebi*: production, isolation and structural determination. *Journal of antibiotics*. 48: 1312-1313
- Wen G. (2009). Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. *World journal of Microbiology and biotechnology*. 25:1677-1683
- Wood G.M., Mann P.J., Lewis D.F., Reid W.J., Moss M.O. (1990). Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. *Food additives and contaminants*. 7: 69-77