

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Miša Mojca CAJNKO

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

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

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

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

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 dne 13. 4. 2007 za mentorico imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman in somentorico prof. dr. Kristino Sepčič.

Mentorica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN

Somentorica: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Recenzent: prof. dr. Tom TURK

Predsednik: prof. dr. Gregor ANDERLUH

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 SEPČIČ

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.

Miša Mojca Cajnko

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD** Dn
- UDK** 577.2:582.28 (043.2) = 163.6
- KG** halofilne in halotolerantne glive/organski ekstrakti/biološko aktivne snovi/hemoliza/  
inhibicija acetilholinesteraze/protibakterijska aktivnost
- AV** CAJNKO, Miša Mojca
- SA** GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentor)/SEPČIĆ, Kristina (somentor)
- KZ** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI** 2010
- IN** BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH NEKATERIH  
HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV IZ REDU DOTHIDEALES IN  
IZBRANIH KVASOVK
- TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP** X, 43 str., 12 pregl., 17 sl., 1 pril., 35 vir.
- IJ** sl
- JI** sl/en
- AI** Dolgo časa je veljalo, da halofilnosti med glivami ni, potem pa so iz naravnih hiperslanih okolij izolirali glive, ki sicer ne potrebujejo soli za preživetje, vendar se lahko prilagodijo na širok razpon koncentracij soli – od sladke vode do skoraj nasičene raztopine natrijevega klorida. Nedavno se je pokazalo, da lahko halofilne in halotolerantne glive, ki živijo v skrajnih okoljih, sintetizirajo potencialno zanimive bioaktivne sekundarne metabolite. Potencial halofilnih in halotolerantnih gliv ni dobro raziskan, zato smo se v pričujoči nalogi ukvarjali z iskanjem aktivnih snovi v organskih ekstraktih 36 gliv, ki so pripadale redu *Dothideales* in izbranim kvasovkam. Izolirane so bile iz različnih okolij Arktike in solin. Testirali smo jih s tremi različnimi testi. To so bili test hemolitične aktivnosti, protibakterijski test ter test inhibicije encima AChE. Uporabili smo metanolne in acetonske ekstrakte liofiliziranih vzorcev. Ugotovili smo, da 21 vrst deluje hemolitično. Na Gram negativno bakterijo *Escherichia coli* je inhibitorno delovalo 13 vrst, na Gram pozitivno bakterijo *Bacillus subtilis* pa 30 vrst. 13 vrst je delovalo na obe bakteriji. Delovanja encima acetilholinesteraze ni inhibirala nobena vrsta. Rezultati so torej pokazali, da vsebujejo nekateri organski ekstrakti biološko aktivne spojine, ki bi bile lahko zanimive v farmakologiji. Najbolj obetavni so bili ekstrakti rodov *Aureobasidium* in *Cladosporium*, ki so kazali tako visoko hemolitično kot tudi protibakterijsko aktivnost proti obem vrstam bakterij *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN** Dn
- UDC** 577.2:582.28 (043.2) = 163.6
- CX** halophilic and halotolerant fungi/organic extract/biologically active compounds/hemolysis/ acetylcholinesterase inhibition/antibacterial activity
- AU** CAJNKO, Miša Mojca
- AA** GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/SEPČIĆ, Kristina (co-supervisor)
- PP** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY** 2010
- TI** BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN ORGANIC EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI FROM THE ORDO DOTHIDEALES AND SELECTED YEASTS
- DT** Graduation Thesis (University studies)
- NO** X, 43 p., 12 tab., 17 fig., 1 ann., 35 ref.
- LA** sl
- AL** sl/en
- AB** It has been long assumed that halophilic fungi do not exist. However, several fungal species have been isolated from natural hypersaline environments. Salt is not essential for their survival, but they are able to adapt to a wide range of salt concentrations – from freshwater to almost saturated concentrations of sodium chloride. It has been discovered recently that halophilic and halotolerant fungi have the ability to produce potentially interesting bioactive secondary metabolites. The potential of halophilic and halotolerant fungi is not yet well investigated, therefore we investigated the presence of bioactive substances in organic extracts of 36 fungi, belonging to the ordo *Dothideales* and to selected species of yeasts. They were isolated from different environments in the Arctic and from a salterns. They were tested for the three activities: hemolytic activity, antibacterial activity and inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. Lyophilised methanol and acetone samples were used. We concluded that 21 species have hemolytic activity. 13 species are inhibitory on Gram negative *Escherichia coli* and 30 species on Gram positive *Bacillus subtilis*. 13 species inhibit both bacterial species. None of the fungi inhibit the enzyme acetylcholinesterase. The results show that some of the extracts contain biologically active substances that could be of interest in pharmacology. The most promising extracts originated from the species of the genera *Aureobasidium* and *Cladosporium*. They showed high hemolytic and antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZNAČILNOSTI GLIV	2
2.2 SEKUNDARNI METABOLITI GLIV IN VPLIV SLANOSTI NA NJIHOVO PRODUKCIJO	2
2.3 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	3
2.3.1 Namen dela	3
2.3.2 Hipoteza	3
3 MATERIALI IN METODE	4
3.1 SEZNAM GLIV	4
3.2 PRIPRAVA GOJIŠČ IN FIZIOLOŠKE RAZTOPINE	5
3.3 KEMIKALIJE	5
3.4 LABORATORIJSKA OPREMA	6
3.5 METODE	6
3.5.1 Gojišča in pridobivanje biomase	6
3.5.2 Priprava organskih ekstraktov	7
3.5.3 Določanje koncentracije suhe snovi	8
3.5.4 Testi za določanje biološke aktivnosti	8
3.5.4.1 Test protibakterijske aktivnosti	8
3.5.4.2 Test inhibicije encima acetilholinesteraze	8
3.5.4.3 Hemolitični test	9
4 REZULTATI	10
4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI	10
4.2 REZULTATI TESTOV INHIBICIJE ENCIMA AChE	13
4.3 REZULTATI TESTOV HEMOLIZE	13
4.4 REZULTATI PROTIBAKTERIJSKIH TESTOV	20
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1 RAZPRAVA	35

5.1.1 Hemolitični test	35
5.1.2 Test protibakterijske aktivnosti	36
5.1.3 Test inhibicije encima AchE	37
5.1.4 Koncentracija suhe snovi v ekstrahiranih vzorcih	37
5.2 SKLEPI	38
6 POVZETEK	39
7 VIRI	40

ZAHVALA

PRILOGA A: Seznam naravnih produktov obravnavanih rodov gliv, izoliranih iz morja

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih sevov iz zbirke EXF iz Katedre za biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo in MZKI iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta.....	4
Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij.....	5
Preglednica 3: Seznam uporabljene laboratorijske opreme. ....	6
Preglednica 4: Koncentracija suhe snovi v ekstraktih gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodatka soli (YNB_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB_10S). ...	11
Preglednica 5: Koncentracija suhe snovi v ekstraktih gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB_17S).....	12
Preglednica 6: Hemolitična aktivnost gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodatka soli (YNB_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB_10S).....	15
Preglednica 7: Hemolitična aktivnost gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB_17S).. ....	16
Preglednica 8: Protibakterijski testi na <i>Bacillus subtilis</i> – vzorci gliv, gojenih gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodatka NaCl (YNB_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB_10S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB_10S (Aceton, 10 % NaCl) oziroma na YNB_BS (Aceton, brez NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB_10S (Metanol, 10 % NaCl) oziroma na YNB_BS (Metanol, brez NaCl), širina inhibicijske cone (IC).....	23
Preglednica 9: Protibakterijski testi na <i>Bacillus subtilis</i> – vzorci gliv, gojenih gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB_17S).....	24
Preglednica 10: Protibakterijski testi na <i>Escherichia coli</i> – vzorci gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodane NaCl (YNB_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB_10S).....	28
Preglednica 11: Protibakterijski testi na <i>Escherichia coli</i> – vzorci gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB_17S).....	29
Preglednica 12: Protibakterijski testi na <i>E.coli</i> in <i>B.subtilis</i> po dodatnem redčenju vzorcev.....	31

## KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava suhih tež acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	12
Slika 2: Primerjava suhih tež metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	12
Slika 3: Primerjava hitrosti hemolize acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	17
Slika 4: Primerjava hitrosti hemolize metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	17
Slika 5: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ). ....	18
Slika 6: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih brez oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ). ....	18
Slika 7: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli.....	19
Slika 8: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli.....	19
Slika 9: Protibakterijski testi na <i>Bacillus subtilis</i> – Primerjava protibakterijske aktivnosti acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli.....	25
Slika 10: Protibakterijski testi na <i>Bacillus subtilis</i> – Primerjava protibakterijske aktivnosti metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli.....	25
Slika 11: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ). ....	26
Slika 12: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ). ....	26
Slika 13: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli.....	27



Slika 14: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli.....	27
Slika 15: Protibakterijski testi na <i>Escherichia coli</i> – Primerjava protibakterijske aktivnosti acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	29
Slika 16: Protibakterijski testi na <i>Escherichia coli</i> – Primerjava protibakterijske aktivnosti metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli ( <i>W. ichthyophaga</i> , <i>W. muriae</i> ) in na višji koncentraciji soli. ....	30
Slika 17: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo <i>Escherichia coli</i> od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli. Legenda: koncentracija suhe snovi uporabljene v testu (SS), širina cone inhibicije (IC) .....	30

## SEZNAM OKRAJŠAV

YNB	yeast nitrogen base
YNB_BS	gojišče brez dodatka natrijevega klorida
YNB_10S	gojišče z 10-odstotnim natrijevim kloridom
YNB_17S	gojišče s 17-odstotnim natrijevim kloridom
SS	koncentracija suhe snovi
IC	širina cone inhibicije pri protibakterijskemu testu
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija pri protibakterijskemu testu
AChE	encim acetilholinesteraza
t <sub>50</sub>	polovični čas hemolize
Aceton, brez NaCl in A_BS	acetonski ekstrakti gliv, gojenih na gojišču brez dodatka natrijevega klorida
Aceton, 10 % NaCl in A_10S	acetonski ekstrakti gliv, gojenih na gojišču z 10-odstotnim natrijevim kloridom
Aceton, 17 % NaCl in A_17S	acetonski ekstrakti gliv, gojenih na gojišču s 17-odstotnim natrijevim kloridom
Metanol, brez NaCl in M_BS	metanolni ekstrakti gliv, gojenih na gojišču brez dodatka natrijevega klorida
Metanol, 10 % NaCl in M_10S	metanolni ekstrakti gliv, gojenih na gojišču z 10-odstotnim natrijevim kloridom
Metanol, 17 % NaCl in M_17S	metanolni ekstrakti gliv, gojenih na gojišču s 17-odstotnim natrijevim kloridom

## 1 UVOD

V zadnjih nekaj letih se je pokazalo, da so nekatere skupine gliv sposobne življenja in razmnoževanja v različnih skrajnih razmerah. Našli so jih namreč na suhih površinah tako hladnih kakor vročih skal, v globinah oceanov, v zelo kislih vodah in v izjemno slanah vodah (Sonjak, 2006). Mnenje, da halofilnosti med glivami ni, je veljalo dolgo časa, vendar so Gunde-Cimerman in sod. (2000) dokazali nasprotno. Iz slanah okolij, kot so npr. soline, so izolirali glive, ki soli za preživetje sicer ne potrebujejo, vendar so se sposobne prilagoditi na širok razpon koncentracij slanosti (vse od sladke vode do ekstremno slane in skoraj nasičene raztopine NaCl). Med halofilne oz. ekstremno halotolerantne so Gunde-Cimerman in sod. (2000, 2005) uvrstili glive, izolirane iz ekstremno slanah okolij. Te so med gojenjem v laboratoriju rastle na gojiščih s slanostjo nad 10 % in pri 17 % NaCl. Med halotolerantne pa so uvrstili glive, ki so jih izolirali iz manj slanah voda in so *in vitro* prav tako rastle na gojiščih s 17 % NaCl.

Halofilne in halotolerantne glive, obravnavane v tej nalogi, spadajo v debli Ascomycota in Basidiomycota. Izolirali so jih predvsem iz solin, nekaj pa jih je tudi z Arktike in drugih ekoloških niš. Za Arktična območja so značilne ekstremno nizke temperature (do  $-50^{\circ}\text{C}$ ). Voda v obliki ledu je organizmom nedostopna, zato v takšnih okoljih prihaja do znižane vodne aktivnosti, visokih pritiskov, nizkih temperatur in nizke koncentracije hranil (Sonjak, 2006). Vse to pa seveda vpliva na aktivnost mikroorganizmov. V ekstremno slanah habitatih, kakršni so soline, 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). Povečana količina raztopljenih soli v vodi zniža ozmotski potencial raztopine (postane bolj negativen), kar povzroči oddajanje vode iz organizmov, kar ima za posledico znižanje vodne aktivnosti.

Lastni sekundarni metaboliti nimajo očitne vloge v celični fiziologiji organizma, in so velikokrat bolj uporabni za ljudi kakor za sam organizem (Hale in sod., 1995). Očitno je, da halofilni in halotolerantni organizmi živijo v močno drugačnem okolju kakor mezofilni organizmi, zato je mogoče pričakovati, da se tudi njihovi sekundarni metaboliti razlikujejo (Saleem in sod., 2007).

Biološki potencial morskih gliv je še malo raziskan (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 iz nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv. Izbrane glive smo gojili na trdnih gojiščih brez soli in z dodatkom 10 % in 17 % NaCl. Pripravljenim organskim glivnim ekstraktom smo izmerili hemolitično aktivnost, ugotavljali protibakterijsko aktivnost in sposobnost inhibicije encima acetilholinesteraze. Poskušali smo ugotoviti, ali se z gojenjem v razmerah nizke in visoke slanosti sproži sinteza sekundarnih metabolitov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZNAČILNOSTI GLIV

Glive (Fungi) spadajo v samostojno kraljestvo, ki se deli na 6 delov: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Zygomycota in Deuteromycotina (zadnja skupina ni formalna taksonomska kategorija, ker gre za polifiletsko skupino) (Kirk in sod., 2008).

Glive se lahko pojavljajo kot enocelični organizmi (kvasovke) ali pa v obliki cevastih nitk imenovanih hife (Hale in sod., 1995). Njihova celična stena je iz hitina in  $\beta$ -glukana. Rezervne snovi v celici so olja in glikogen, nikoli škrob. Razmnožujejo se spolno ali nespolno. Ekološko so pomembni saprofiti, paraziti in simbioanti (Jogan, 2001, Kirk in sod., 2008).

Industrijskega pomena so predvsem plesni (napr. rod *Penicillium*), ki proizvajajo antibiotike in nekatere organske kisline. Številne glive sodelujejo pri procesih pridelave hrane. Ekonomsko so pomembne tudi parazitske vrste, ki povzročajo škodo na gojenih vrstah (Jogan, 2001).

### 2.2 SEKUNDARNI METABOLITI GLIV IN VPLIV SLANOSTI NA NJIHOVO PRODUKCIJO

Sekundarni metaboliti niso bistvenega pomena za rast in razvoj organizma, vseeno pa se za njihovo sintezo porabi veliko energije. Tak tip metabolizma nastopi ob koncu rastne faze ali v stacionarni fazi rasti mikroorganizma. Sinteza 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). Sekundarni metaboliti lahko inducirajo nastajanje spor in povečujejo njihovo preživetje, zato je ta tip metabolizma pogosto povezan s sporulacijo gliv (Calvo, 2002).

Metaboliti lahko delujejo na druge organizme in s tem glivi omogočajo kompetitivno prednost in zaščito pred plenilci. Simbiotske glive na rastlinah s sekundarnimi metaboliti odganjajo rastlinojede žuželke (Fox in Howlett, 2008).

Mikotoksini so sekundarni metaboliti gliv, ki so toksični za vretenčarje. So predvsem molekule z nizko molekulsko maso, ki delujejo toksično že v nizkih koncentracijah (Bennett in Klich, 2003). Morske glive verjetno sintetizirajo številne naravne produkte z biološko aktivnostjo, ki so potencialno zanimivi tudi farmakološko (Haefner, 2003, Mayer in Lehmann, 2000, Proksch in sod., 2002).

Kemija 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.

Splošno mnenje je bilo, da halofilni in ekstremno halotolerantni organizmi zaradi svoje ekstremne ekološke niše ne potrebujejo toliko bioaktivnih molekul, zaradi katerih bi imeli kompetitivno prednost. Frisvad (2005) pa je ugotovil, da se največ in največje število metabolitov izloča pri slanosti 0–5 % NaCl, pri koncentracijah višjih od 5 % pa se produkcija niža. Razlog je v tem, da je za rast pri višjih koncentracijah soli več energije potrebno za obvladovanje stresa kakor za sintezo sekundarnih metabolitov.

V Prilogi A so prikazani do sedaj zbrani podatki o aktivnostih obravnavanih gliv. Zanimalo nas je, ali so bile aktivnosti, ki so jih pokazali naši testi, že prej opisane, ali pa smo odkrili kakšno novo aktivnost.

## 2.3 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

### 2.3.1 Namen dela

Namen naloge je bil testirati biološko aktivnost organskih ekstraktov izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv, ki so bile gojene na gojišču brez NaCl in z 10 % NaCl oziroma z 10 % NaCl in 17 % NaCl. Ker povišana koncentracija soli predstavlja stres, nas je zanimalo, kako to vpliva na izločanje sekundarnih metabolitov. Testirali smo hemolitično aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost na izbranih po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah.

### 2.3.2 Hipoteza

Glede na to, da halofilne in halotolerantne glive predstavljajo neraziskan vir strukturno novih in biološko aktivnih spojin, smo predvidevali, da bomo v pripravljenih organskih ekstraktih našli potencialno zanimive in še neopisane učinkovine, ki jih bo v prihodnosti mogoče izolirati. Poleg tega smo pričakovali, da bo produkcija bioaktivnih spojin v glivah, ki so rastle na gojiščih z različno slanostjo, različna.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SEZNAM GLIV

Preglednica 1: Seznam uporabljenih sevov iz zbirke EXF iz Katedre za biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo in MZKI iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta

Vrsta	Sev	Oznaka	Habitat
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	AltS1	soline
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	AltS2	soline
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	AltS3	soline
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	AlaS	soline
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 150	ApS	soline
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 922	AspA	arktika
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	ApG	morje, 4000 m globine
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 381	CcS1	soline
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 2504	CcA	Arktika
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF - 385	CcS2	soline
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	CdS	soline
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	CvS	soline
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	ChS	soline
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	CsaS	soline
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	ClS	nohti
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	CpS	soline
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	CfS	soline
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	CsS3	soline
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	HwS	soline
<i>Phaeothea triangularis</i>	MZKI 206	PtS	soline
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295 / MZKI B734	TsS	soline
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	F2S	soline
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	F3S	soline
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	WiS	soline
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	Wm	soline
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	Ws	sončnično seme
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	CaA	Arktika
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	CIA	Arktika
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	FfA	Arktika
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	PgS	soline
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	PgA	Arktika
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	EXF - 513	RbS	soline
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	MZKI K650	RdA	Arktika
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	CpS	soline
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	CpA	Arktika
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	ScK	kontrola

Vse glive razen dveh smo gojili na gojišču YNB (Yeast Nitrogen Base) brez dodatka NaCl (YNB\_BS) in YNB z 10 % dodatkom NaCl (YNB\_10S). Glivi *Wallemia ichthyophaga* in *Wallemia muriae* sta obligatna halofila in smo ju zato gojili na gojišču YNB z 10 % dodatkom NaCl (YNB\_10S) in YNB z 17 % dodatkom NaCl (YNB\_17S).

### 3.2 PRIPRAVA GOJIŠČ IN FIZIOLOŠKE RAZTOPINE

Pripravili smo tri različna gojišča: eno z 10 % dodatkom NaCl in drugo s 17 % dodatkom NaCl in tretje brez dodatka NaCl.

#### Za gojišče YNB (Yeast Nitrogen Base) brez NaCl:

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

#### Za gojišče YNB (Yeast Nitrogen Base) z 10 % NaCl oziroma za 17 % NaCl:

- 0,85g YNB
- 2,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 10g Glc
- 10g agar
- 50g NaCl za 10 % in 85g za 17 % raztopino NaCl
- manj kot 500 ml dH<sub>2</sub>O

#### Fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)

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

### 3.3 KEMIKALIJE

Preglednica 2: 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
Metanol	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
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
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija

### 3.4 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica 3: 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
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrške 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

### 3.5 METODE

#### 3.5.1 Gojišča in pridobivanje biomase

V čaši smo zmešali YNB, glukozo, vodo in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in mešali, dokler se sestavine niso popolnoma raztopile. Nato smo izmerili pH in po potrebi dodali NaOH. Ko je bil pH gojišča 7, smo ga prelili v merilni valj in tako izmerili volumen. Če je bil ta manjši od 500 ml, smo dolili destilirano vodo do željenega volumna. V erlermajerico smo dali agar in dolili naše gojišče. Vse skupaj smo nato avtoklavirali 15 minut pri 121°C. Po končanem avtoklaviranju smo gojišča razlili v petrijevke. Ko se je gojišče dovolj strdilo, smo petrijevke obrnili in jih inkubirali v topli sobi na 37°C dokler ni vsa vlaga izhlapela (približno 1 dan). Po inkubaciji v topli sobi smo gojišča, ki so se med pripravo okužila, zavrgli, druge pa shranili v hladni sobi pri 4°C.

Hkrati smo pripravili tudi poševnike, t.j. gojišča v epruветah, na katere smo iz zbirke gliv precepili željene seve, da bi opazovali njihovo rast na gojišču z oziroma brez NaCl in zato, da bi se jih lahko naprej uporabljalo kot inokulum.



Da bi glive kasneje lahko lažje postrgali z gojišča, smo kot podlago za rast uporabili celofan. Tega smo prej narezali na kvadrate s prirezanimi vogali in avtoklavirali. Nato smo ga položili na gojišče v petrijevkah.

Pomembno je, da je bilo delo čim bolj sterilno, kar je v našem primeru pomenilo delo v laminariju, uporabo rokavic, sterilizacijo površin, rok in inštrumentov s 70 % etanolom, delo ob ognju in obžiganje instrumentov. To vse je bilo pomembno tudi pri nacepljanju gliv.

Posamezni sev iz mikrobiološke zbirke smo s plastično cepilno zanko za enkratno uporabo precepili na YNB poševnik brez NaCl in na YNB poševnik z 10 % NaCl ter, v primeru *Wallemia ichthyophaga* in *Wallemia muriae*, na YNB poševnik z 10 % NaCl in na YNB poševnik s 17 % NaCl. Nacepljene poševnike smo nato inkubirali na sobni temperaturi do stacionarne faze (1 do 3 tedni). Po inkubaciji smo glivne kulture na YNB poševnikih suspendirali v 5 ml fiziološke raztopine (0,9 % NaCl). Po 80 µl glivne suspenzije smo s pipeto prenašali na YNB plošče z ali brez NaCl in razmazali do suhega. Da bi pridobili dovolj biomase smo za vsak sev uporabili po 10 plošč. Plošče smo ovili s plastično folijo in glivne kulture inkubirali na sobni temperaturi do stacionarne faze (1–3 tedni).

Vse glive v stacionarni fazi rasti smo s sterilno spatulo postrgali z gojišča in jih enakomerno razdelili v dve označeni Ependorf mikrocentrifugirki (primerne so tako 1,5 kot 2 mikrolitrski). Te smo nato potopili v tekoči dušik in nato do ekstrakcije shranili v skrinji pri -80°C.

### 3.5.2 Priprava organskih ekstraktov

Vse ekstrakte, shranjene v centrifugirkah po Ependorfu, smo zaradi hlapljenja topila vedno oblepili s parafilmom in shranjevali v hladilniku pri 4°C.

Mikrocentrifugirke smo vzeli iz hladilnika, jih odmašili in liofilizirali 48 ur do suhega. Eni polovici vzorcev smo nato dodali metanol, drugi pa aceton. Micelij smo homogenizirali s stekleno palčko ter ga premešali na rotacijskem mešalu. Mikrocentrifugirke smo ovili s parafilmom in jih v erlenmajericah dali na stresalnik. Prva ekstrakcija je potekala 24 ur pri 600 obratih/minuto in pri 37 °C. Nato smo jih centrifugirali 20 min pri 1300 obratih/minuto pri sobni temperaturi. Supernatant smo prestavili v nove mikrocentrifugirke z enako oznako ter ga do uporabe shranili v zamrzovalniku. Druga ekstrakcija sedimentov je potekala 3 ure v enakih razmerah.

Supernatante iz posameznih sevov smo nato združili in iz njih odparili izhodno topilo (metanol ali aceton). Posušeni ekstraktom v mikrocentrifugirkah smo dodali po 1 ml 96 % etanola, dobro premešali na rotacijskem stresalniku, oblepili s parafilmom in shranili pri 4°C.

### 3.5.3 Določanje koncentracije suhe snovi

V posodice s premerom okoli 1,5 cm, ki smo jih naredili iz aluminijaste folije, smo nanесли 100 µl ekstrakta in ga posušili v sterilizatorju pri temperaturi 100°C. Posodice smo pred tem stehali in označili, po sušenju pa smo jih tehtali še enkrat. Iz razlike smo izračunali neto vrednost suhe snovi v 100 µl vzorca. Iz tega smo izračunali koncentracijo suhe snovi in jo izrazili v miligramih na mililiter ekstrakta.

### 3.5.4 Testi za določanje biološke aktivnosti

#### 3.5.4.1 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*) bakterijo. Bakterije smo nagojili preko noči v 10 ml LB (Luria Broth) gojišča na stresalniku s stresanjem z 250 obrati/minuto pri 37°C. Naslednji dan smo število bakterij določili s pomočjo dvožarkovnega UV/VIS spektrofotometra. Optično gostoto smo izmerili pri 600 nm. Za kontrolo smo uporabili sterilno tekoče LB gojišče. Število bakterij smo določili s standardiziranimi umeritvenima krivuljama. Nato smo pripravili plošče s trdnim LB gojiščem z vcepljeno bakterijsko kulturo. Še vroče avtoklavirano LB gojišče z agarjem smo ohladili na približno 42°C in mu dodali toliko kulture, 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 agarjem z vcepljeno bakterijsko kulturo. Do uporabe smo jih shranili pri 4°C. S pomočjo steriliziranega plutovrta smo v vsaki plošči zvrtili 8 lukenj premera 1 cm. V vsako smo za protibakterijski test dodali po 100 µl ekstrakta vzorcev gliv iz preglednice 2. Po 48-urni inkubaciji na 37 °C smo odčitali polmere inhibicijskih con okoli lukenj.

#### 3.5.4.2 Test inhibicije encima acetilholinesteraze

Inhibicijo encima acetilholinesteraze (AChE) z vzorci gliv iz preglednice 2 smo spremljali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč. Uporabili smo AChE iz električne jegulje, ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 7.3) v koncentraciji

500 encimskih enot (EE)/ml. Tik pred začetkom testa smo encim 200 krat redčili v enakem pufru. V vdolbinice mikrotitrne plošče smo nanесли 140  $\mu$ l Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in  $\text{NaHCO}_3$  (37.5 mg) v 25 mM fosfatnem pufru, pH 8) in 10  $\mu$ l substrata acetiltioholina v končni koncentraciji 1 mM. Nato smo dodali 10  $\mu$ l vsakega ekstrakta vzorcev gliv in tik pred začetkom meritve še 50  $\mu$ l encima AChE. Kontrola je namesto vzorca vsebovala 10  $\mu$ l vode. Merili smo 12 minut pri 412 nm in 25 °C.

#### 3.5.4.3 Hemolitični test

Iz sveže goveje krvi smo s centrifugiranjem izolirali eritrocite. Da ni prišlo do strjevanja, smo krvi dodali citrat. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl) in jih do uporabe shranili v Alseverjevem konzervansu v hladilniku. Tako pripravljene eritrocite smo uporabljali, dokler se zaradi hemolize supernatant ni pobarval rdeče. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Pripravili smo pufer za eritrocite, ki je vseboval 0.13 M NaCl in 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4. Suspenzija pufru in eritrocitov je imela pri 630 nm absorpcijo  $10 \pm 0.01$ .

Test hemolize smo izvedli na mikrotitrski plošči. Vdolinice smo napolnili s po 100  $\mu$ l eritrocitnega pufru in 20  $\mu$ l ekstrakta vsakega vzorca gliv iz preglednice 2. Po končanem pipetiranju smo v vsako vdolbinico dodali še 100  $\mu$ l eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot znižanje absorpcije pri 630 nm. Za kontrolo smo uporabili 100  $\mu$ l eritrocitnega pufru, 20  $\mu$ l deionizirane vode in 100  $\mu$ 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.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI

Izmerili smo koncentracije suhe snovi v vzorcih organskih ekstraktov in jih navedli v preglednicah 5 in 6. Najnižje koncentracije suhe snovi sta imela dva acetonska ekstrakta gliv, ki so zrastle na gojišču brez soli (*Pichia guilliermondii* EXF - 518 in *Alternaria tenuissimum* grupa X EXF - 2338), in štirje acetonski ekstrakti gliv, ki so zrastle na gojišču z 10 % soli (*Wallemia murie* EXF - 951, *Wallemia sebi* EXF - 958, *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428 in *Pichia guilliermondii* EXF - 518). Najvišje koncentracije suhe snovi pa so se pojavile v šestih metanolnih ekstraktih gliv, ki so zrastle na gojišču z dodano soljo (*Aureobasidium pullulans* EXF - 150, *Aureobasidium pullulans* var.*melanogenum* EXF - 3233, *Cladosporium halotolerans* EXF - 572, *Cladosporium langeronii* EXF - 1000, *Cladosporium spinulosum* EXF - 334, *Hortaea werneckii* EXF - 225 / MZKI B736) in dveh metanolnih ekstraktih gliv, ki so zrastle na gojišču brez soli (*Aureobasidium pullulans* EXF - 922 in *Cladosporium halotolerans* EXF - 572).

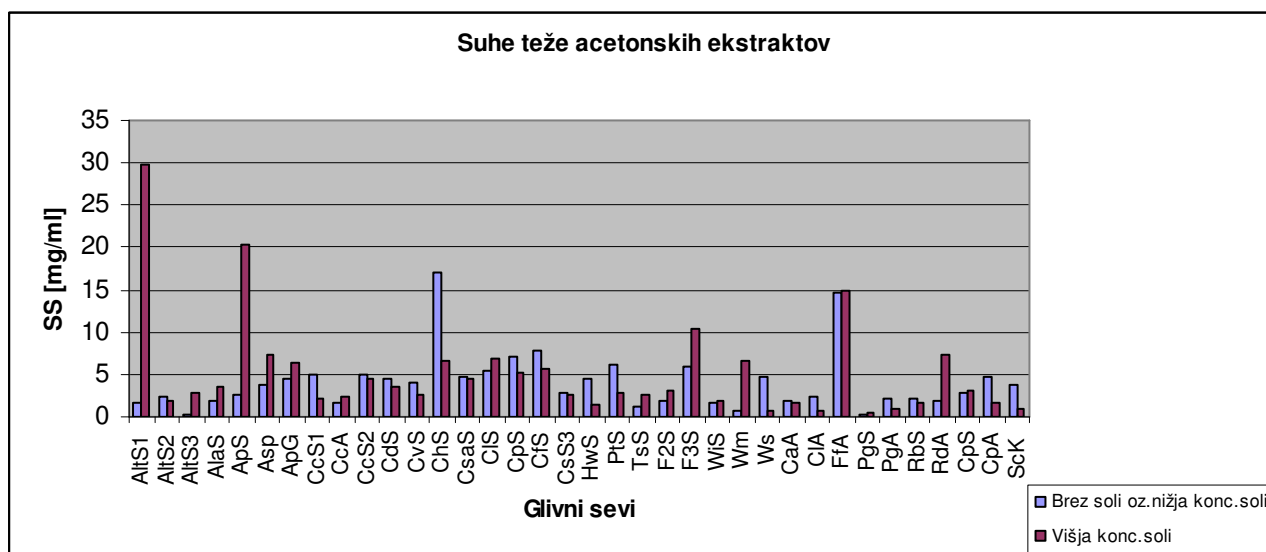
Pri 27 od 36 gliv je bila koncentracija suhe snovi v metanolnih ekstraktih višja, če smo glive gojili na višji koncentraciji NaCl. Enako je veljalo za 19 acetonskih ekstraktov.

Preglednica 4: Koncentracija suhe snovi v ekstraktih gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodatka soli (YNB\_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB\_10S). Legenda: koncentracija suhe snovi (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (Aceton, brez NaCl) oziroma na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (Metanol, brez NaCl) oziroma na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl).

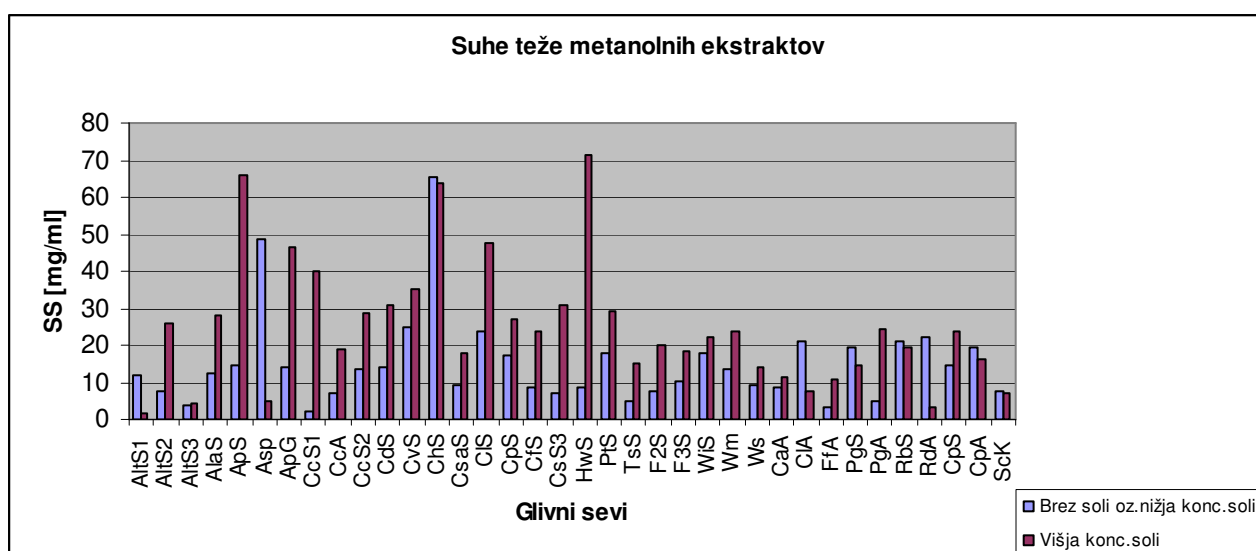
Vrsta	Sev	SS (mg/mL)			
		Aceton, brez NaCl	Metanol, brez NaCl	Aceton, 10 % NaCl	Metanol, 10 % NaCl
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	1,7	11,8	29,8	1,7
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	2,3	7,6	1,8	25,9
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	0,3	3,9	2,8	4,5
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	2,0	12,3	3,5	28,1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 150	2,6	14,7	20,4	65,8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 922	3,8	48,4	7,4	5,0
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	4,4	14,0	6,3	46,6
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 381	4,9	2,0	2,2	39,9
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 2504	1,7	6,8	2,4	19,1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF - 385	4,9	13,4	4,4	28,8
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	4,6	14,0	3,5	30,7
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	4,1	25,1	2,7	35,1
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	17,0	65,3	6,7	63,8
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	4,7	9,2	4,4	18,1
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	5,5	24,0	6,9	47,6
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	7,2	17,3	5,2	26,9
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	7,9	8,8	5,7	23,8
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	2,8	7,1	2,7	30,8
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	4,6	8,5	1,4	71,2
<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	6,1	17,8	2,9	29,2
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295 / MZKI B734	1,2	4,7	2,6	15,4
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	2,0	7,7	3,1	20,2
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	5,9	10,4	10,4	18,2
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	4,7	9,1	0,6	14,3
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	1,9	8,6	1,7	11,3
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	2,4	21,3	0,6	7,7
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	14,7	3,5	14,9	10,7
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	0,3	19,3	0,5	14,7
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	2,2	4,8	1,0	24,4
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	EXF - 513	2,2	21,1	1,7	19,3
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	MZKI K650	1,9	22,2	7,4	3,1
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	2,9	14,8	3,0	23,7
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	4,8	19,4	1,7	16,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	3,9	7,8	1,0	7,1

Preglednica 5: Koncentracija suhe snovi v ekstraktih gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB\_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB\_17S). Legenda: koncentracija suhe snovi (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Aceton, 17 % NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Metanol, 17 % NaCl).

Vrsta	Sev	SS (mg/mL)			
		Aceton, 10 % NaCl	Metanol, 10 % NaCl	Aceton, 17 % NaCl	Metanol, 17 % NaCl
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	1,6	17,7	1,8	22,4
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	0,7	13,6	6,6	23,6



Slika 1: Primerjava suhih tež acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli.



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

## 4.2 REZULTATI TESTOV INHIBICIJE ENCIMA AChE

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

## 4.3 REZULTATI TESTOV HEMOLIZE

Hemolitično aktivnost je pokazalo 41 od 144 vzorcev, kar je vidno iz preglednic 7 in 8. Aktivnih je bilo 14 acetonskih in 13 metanolnih ekstraktov gliv, ki so zrastle na gojišču brez soli, in 8 acetonskih in 6 metanolnih ekstraktov gliv, ki so zrastle na gojišču z 10 % soli. Halofilni glivi *Wallemia ichthyophaga* EXF - 994 in *Wallemia muriae* EXF - 951 in kontrola (*Saccharomyces cerevisiae*) niso pokazale hemolitične aktivnosti.

Ekstrakti gliv, ki so kazali hemolitično aktivnost, so bili izolirani iz naslednjih gliv:

- Glive, gojene na gojišču brez soli (YNB\_BS):
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2329 (acetonski ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 150 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* var *melanogenum* EXF - 3233 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium dominicanum* EXF - 732 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium halotolerans* EXF - 572 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 381 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium sphaerospermum* EXF - 385 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium Salinae* EXF - 335 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium langeronii* EXF - 1000 (acetonski ekstrakt)
  - *Cladosporium psychrotolerans* EXF - 391 (acetonski ekstrakt)
  - *Cladosporium fusiforme* EXF - 449 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium spinulosum* EXF - 334 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Phaeothea triangularis* MZKI 206 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Filobasidium floriforme* MZKI – K560 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Pichia guilliermondii* EXF - 518 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Rhodospiridium babjavae* EXF - 513 (acetonski in metanolni ekstrakt)

- Glive, gojene na gojišču s soljo (YNB\_10S):
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 922 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF - 3233 (acetonski ekstrakt)
  - *Hortaea werneckii* EXF - 225 / MZKI B736 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Phaeotheca triangularis* MZKI 206 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Trimmatostroma salinum* EXF - 295 / MZKI B734 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Pichia guilliermondii* EXF - 518 (acetonski ekstrakt)
  - *Cryptococcus albidus* MZKI K528 (metanolni ekstrakt)
  - *Rhodosporidium babjvae* EXF - 513 (acetonski ekstrakt)
  - *Rhodosporidium diobovatum* MZKI K650 (acetonski in metanolni ekstrakt)

V štirih primerih se je hemolitična aktivnost pri glivi pokazala, ko smo jo gojili tako na gojišču brez soli, pa tudi, ko smo jo gojili na gojišču z 10 % soli. V 10 primerih se je aktivnost pojavila samo, ko smo glivo gojili na gojišču brez soli, in v 5 primerih, ko smo glivo gojili na gojišču z 10 % soli.

Najintenzivnejšo hemolitično aktivnost ( $t_{50}$  od 0 do 5 minut oziroma + + + ) smo zasledili pri 9 acetonskih in 4 metanolnih ekstraktih gliv, ki so zrastle na gojišču brez soli, in pri 4 acetonskih in 4 metanolnih ekstraktih gliv, ki so zrastle na gojišču z 10 % soli. Od tega so bili glede na koncentracijo suhe snovi najbolj aktivni acetonski ekstrakti 5 gliv:

- *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF - 3233 – gojen na gojišču brez soli
- *Aureobasidium pullulans* EXF - 922 – gojen na gojišču z 10 % soli
- *Phaeotheca triangularis* MZKI 206 – gojena na gojišču z 10 % soli
- *Aureobasidium pullulans* EXF - 150 – gojen na gojišču brez soli
- *Cladosporium cladosporioides* EXF - 381 – gojen na gojišču brez soli



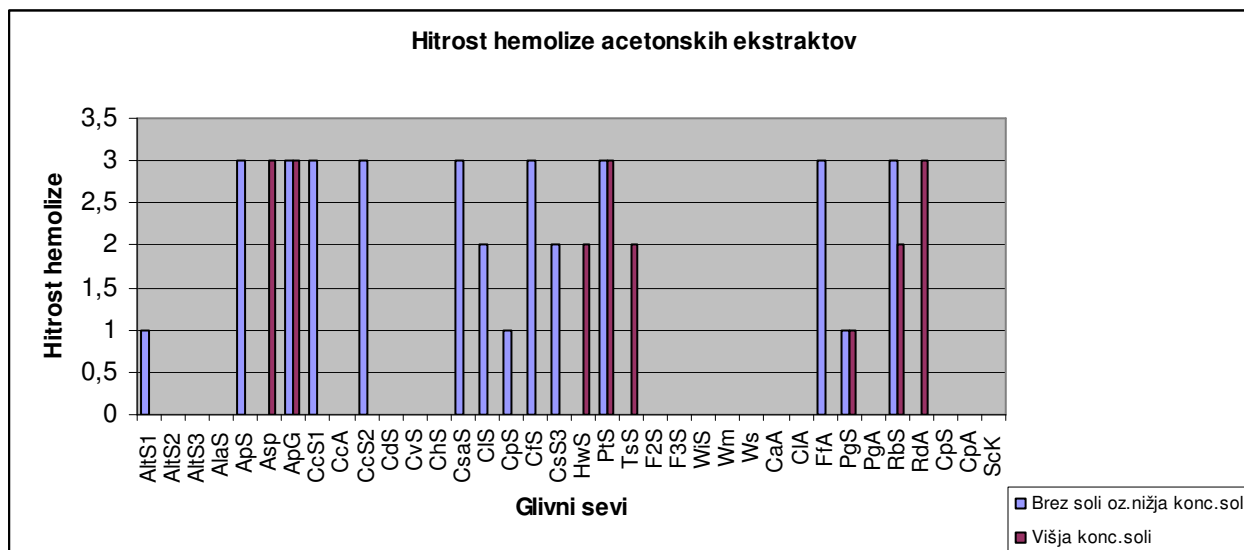
Preglednica 6: Hemolitična aktivnost gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodatka soli (YNB\_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB\_10S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), polovični čas hemolize (t<sub>50</sub>), hitra hemoliza (+++ oziroma 0 do 5 minut), zmerna hemoliza (++) oziroma 6 do 10 minut, počasna hemoliza (+) oziroma 11 do 14 minut), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (Aceton, brez NaCl) oziroma na YNB\_10S (Aceton, 10 %NaCl), Metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (Metanol, brez NaCl) oziroma na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl).

Vrsta	Sev	Aceton, brez NaCl		Metanol, brez NaCl		Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl	
		SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	0,154	11 +	1,072	-	2,709	-	0,154	-
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	0,209	-	0,69	-	0,163	-	2,354	-
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	0,027	-	0,354	-	0,254	-	0,409	-
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	0,181	-	1,118	-	0,318	-	2,554	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 150	0,236	2 +++	1,336	3 +++	1,854	-	5,981	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 922	0,345	-	4,4	-	0,672	1,5 +++	0,454	3 +++
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	0,4	1,5 +++	1,272	3 +++	0,572	3 +++	4,236	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 381	0,445	2 +++	0,181	6 ++	0,2	-	3,627	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 2504	0,154	-	0,618	-	0,218	-	1,736	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF - 385	0,445	2 +++	1,218	7 ++	0,4	-	2,618	-
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	0,418	-	1,272	6 ++	0,318	-	2,79	-
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	0,372	-	2,281	-	0,245	-	3,19	-
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	1,545	-	5,936	10 ++	0,609	-	5,8	-
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	0,427	2 +++	0,836	6 ++	0,4	-	1,645	-
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	0,5	10 ++	2,181	-	0,627	-	4,327	-
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	0,654	12 +	1,572	-	0,472	-	2,445	-
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	0,718	4 +++	0,8	7 ++	0,518	-	2,163	-
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	0,254	7 ++	0,645	11 +	0,245	-	2,8	-
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	0,418	-	0,772	-	0,127	6 ++	6,472	2 +++
<i>Phaeothea triangularis</i>	MZKI 206	0,554	4 +++	1,618	4 +++	0,263	1 +++	2,654	2 +++
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295 / MZKI B734	0,109	-	0,427	-	0,236	6 ++	1,4	3 +++
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	0,181	-	0,7	-	0,287	-	1,836	-
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	0,536	-	0,945	-	0,945	-	1,654	-
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	0,427	-	0,827	-	0,0545	-	1,3	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	0,172	-	0,781	-	0,154	-	1,027	12 +
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	0,218	-	1,936	-	0,0545	-	0,7	-

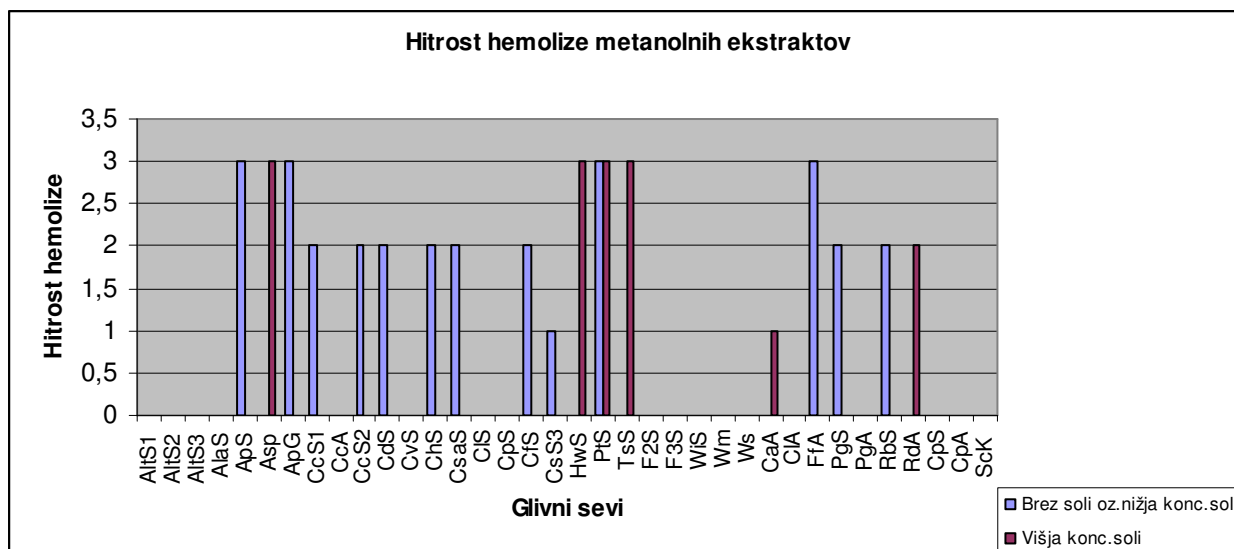
Vrsta	Sev	Aceton, brez NaCl		Metanol, brez NaCl		Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl	
		SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	1,336	2 +++	0,318	3,5 +++	1,354	-	0,971	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	0,0272	14 +	1,754	10 ++	0,0454	12 +	1,336	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	0,2	-	0,436	-	0,0909	-	2,218	-
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF - 513	0,2	5 +++	1,918	6 ++	0,154	10 ++	1,754	-
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	0,172	-	2,018	-	0,672	2 +++	0,281	10 ++
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	0,263	-	1,345	-	0,272	-	2,154	-
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	0,436	-	1,763	-	0,154	-	1,454	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	0,354	-	0,709	-	0,0909	-	0,645	-

Preglednica 7: Hemolitična aktivnost gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB\_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB\_17S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), polovični čas hemolize (t<sub>50</sub>), hitra hemoliza (+ + + oziroma 0 do 5 minut), zmerna hemoliza (+ + oziroma 6 do 10 minut), počasna hemoliza (+ oziroma 11 do 14 minut), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Aceton, 17 % NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Metanol, 17 % NaCl).

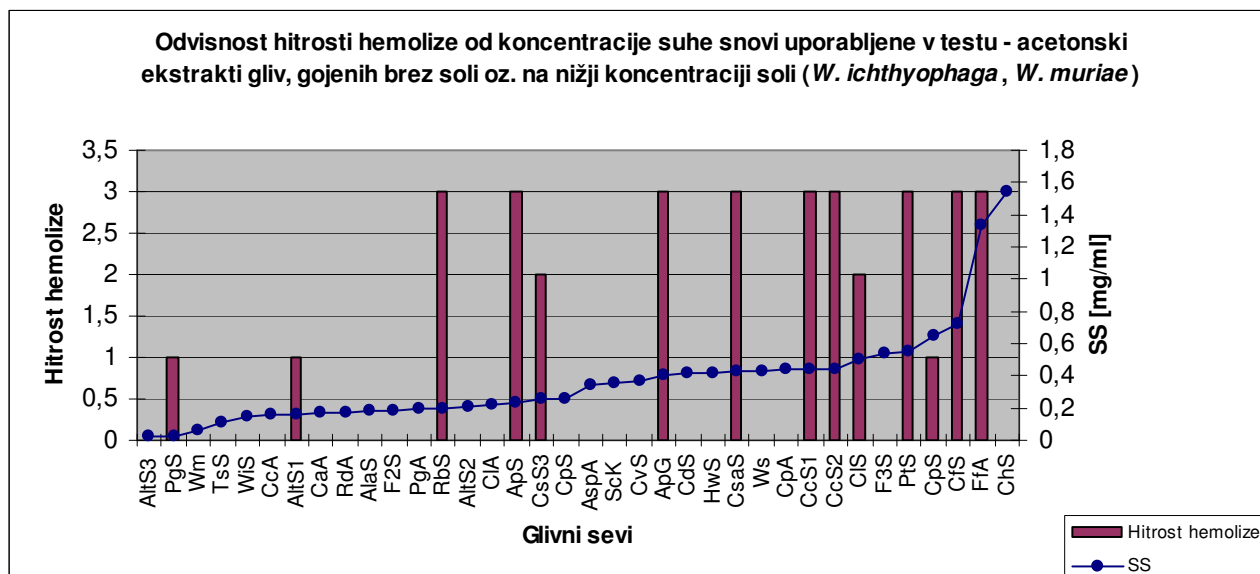
Vrsta	Sev	Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl		Aceton, 17 % NaCl		Metanol, 17 % NaCl	
		SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]	SS [mg/ml]	t <sub>50</sub> [min]
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	0,145	-	1,609	-	0,163	-	2,036	-
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	0,0636	-	1,236	-	0,6	-	2,145	-



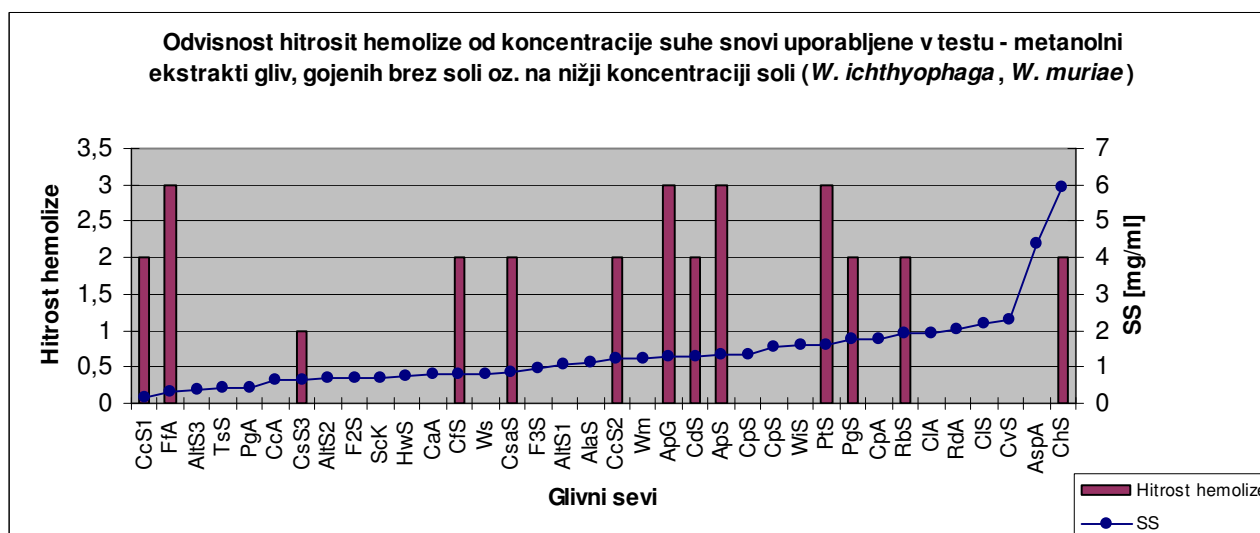
Slika 3: Primerjava hitrosti hemolize acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli. Legenda: ni hemolize (vrednost 0), počasna hemoliza – nad 10 minut (vrednost 1), zmerna hemoliza – od 6 do 10 minut (vrednost 2), hitra hemoliza – od 1 do 5 minut (vrednost 3)



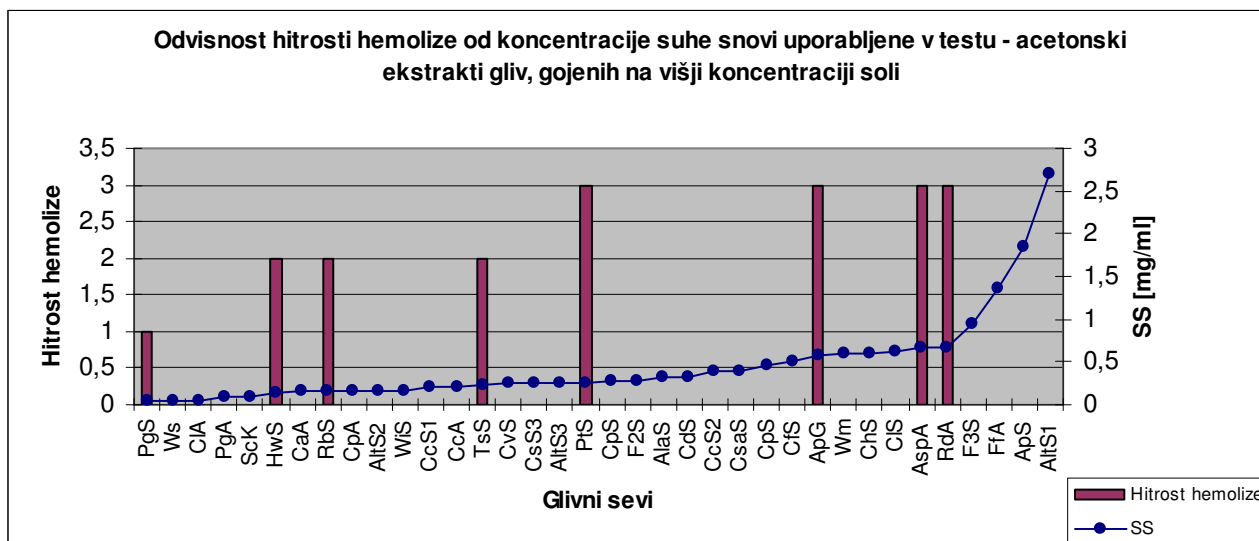
Slika 4: Primerjava hitrosti hemolize metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli. Legenda: ni hemolize (vrednost 0), počasna hemoliza – nad 10 minut (vrednost 1), zmerna hemoliza – od 6 do 10 minut (vrednost 2), hitra hemoliza – od 1 do 5 minut (vrednost 3)



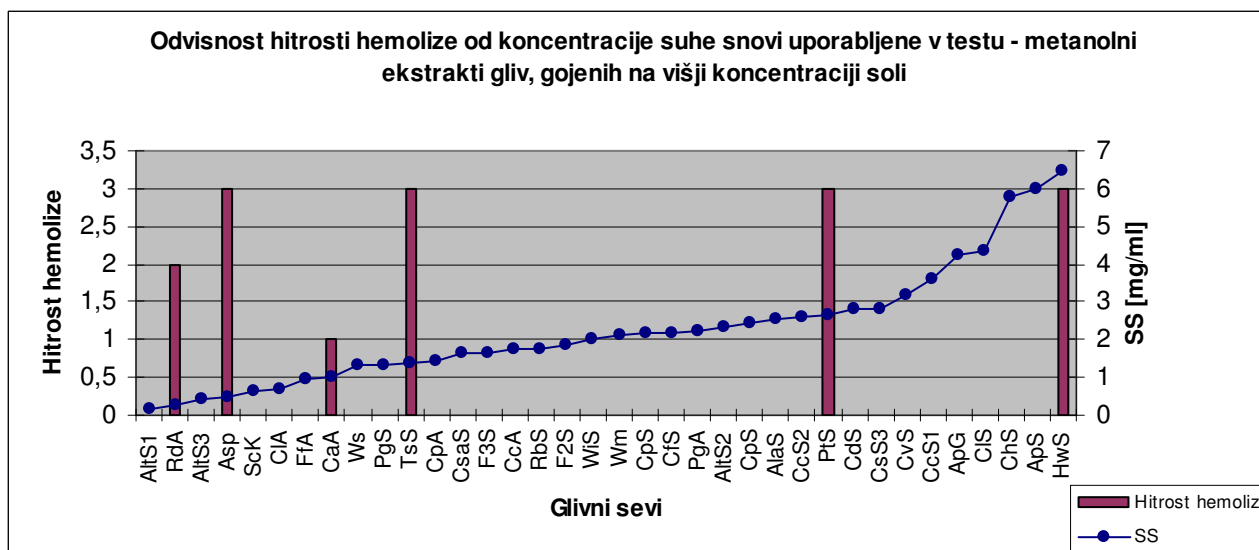
Slika 5: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), ni hemolize (vrednost 0), počasna hemoliza – nad 10 minut (vrednost 1), zmerna hemoliza – od 6 do 10 minut (vrednost 2), hitra hemoliza – od 1 do 5 minut (vrednost 3)



Slika 6: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih brez oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), ni hemolize (vrednost 0), počasna hemoliza – nad 10 minut (vrednost 1), zmerna hemoliza – od 6 do 10 minut (vrednost 2), hitra hemoliza – od 1 do 5 minut (vrednost 3)



Slika 7: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli. Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), ni hemolize (vrednost 0), počasna hemoliza – nad 10 minut (vrednost 1), zmerna hemoliza – od 6 do 10 minut (vrednost 2), hitra hemoliza – od 1 do 5 minut (vrednost 3)



Slika 8: Odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli. Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), ni hemolize (vrednost 0), počasna hemoliza – nad 10 minut (vrednost 1), zmerna hemoliza – od 6 do 10 minut (vrednost 2), hitra hemoliza – od 1 do 5 minut (vrednost 3)

#### 4.4 REZULTATI PROTIBAKTERIJSKIH TESTOV

Rezultati protibakterijskih testov so prikazani v preglednicah 9–12. Protibakterijsko aktivnost proti Gram negativni bakteriji *Escherichia coli* je kazalo 15–144 testiranih vzorcev, medtem ko je bila protibakterijska aktivnost precej bolj izražena proti Gram pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*, saj je 85 testiranih vzorcev inhibiralo njeno rast. Izmed vseh testiranih vzorcev jih je 14 kazalo aktivnost proti obema bakterijama. Od tega je bilo 11 metanolnih in 3 acetonski ekstrakti. Kontrola (*Saccharomyces cerevisiae*) je bila v obeh testih neaktivna.

Glive, ki so inhibirale rast Gram pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*, so naslednje:

- Glive, gojene na gojišču brez soli (YNB\_BS):
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2329 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2318 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria tenuissimum* grupa X EXF - 2338 (metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria aborescens* EXF - 2340 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 150 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 922 (metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF - 3233 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 381 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 2504 (acetonski ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 385 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 732 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium salinae* EXF - 335 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium langeronii* EXF - 1000 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium psychrotolerans* EXF - 391 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium fusiforme* EXF - 449 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium spinulosum* EXF - 334 (acetonski ekstrakt)
  - *Hortaea werneckii* EXF - 225 / MZKI B736 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Phaeothea triangularis* MZKI 206 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Trimmatostroma salinum* EXF - 295 / MZKI B734 (acetonski ekstrakt)
  - *Fusarium* sp. 2 EXF - 2276 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Fusarium* sp. 3 EXF - 2275 (acetonski in metanolni ekstrakt)

- *Wallemia sebi* EXF - 958 (acetonski in metanolni ekstrakt)
- *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428 (acetonski ekstrakt)
- *Filobasidium floriforme* MZKI K560 (acetonski in metanolni ekstrakt)
- *Pichia guilliermondii* EXF - 518 (acetonski ekstrakt)
- *Pichia guilliermondii* EXF - 1496 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  
- Glive, gojene na gojišču z dodatkom 10 % soli (YNB\_10S):
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2329 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2318 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria tenuissimum* grupa X EXF - 2338 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria aborescens* EXF - 2340 (acetonski ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 150 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 922 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF - 3233 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 381 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 2504 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 385 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium salinae* EXF - 335 (acetonski ekstrakt)
  - *Cladosporium langeronii* EXF - 1000 (acetonski ekstrakt)
  - *Cladosporium psychrotolerans* EXF - 391 (acetonski ekstrakt)
  - *Cladosporium fusforme* EXF - 449 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium spinulosum* EXF - 334 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Hortaea werneckii* EXF - 225 / MZKI B736 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Phaeothea triangularis* MZKI 206 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Trimmatostroma salinum* EXF - 295 / MZKI B734 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Wallemia sebi* EXF - 958 (acetonski ekstrakt)
  - *Cryptococcus albidus* MZKI K528 (metanolni ekstrakt)
  - *Cryptococcus liquefaciens* MZKI K428 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Pichia guilliermondii* EXF - 1496 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Candida parapsilosis* EXF - 517 (acetonski ekstrakt)
  
- Glive, gojene na gojišču z dodatkom 17 % soli (YNB\_17S):
  - *Wallemia ichthyophaga* EXF - 994 (acetonski ekstrakt)

Glive, ki so inhibirale rast Gram negativne bakterije *Escherichia coli*, so bile:

- Glive, gojene na gojišču brez soli (YNB\_BS):
  - *Cladosporium fusiforme* EXF - 449 (acetonski in metanolni ekstrakt)
  - *Filobasidium floriforme* MZKI K560 (acetonski ekstrakt)
  
- Glive, gojene na gojišču z dodano soljo (YNB\_10S):
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2329 (metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2318 (metanolni ekstrakt)
  - *Alternaria tenuissimum* grupa X EXF - 2338 (metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 150 (metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* EXF - 922 (metanolni ekstrakt)
  - *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF - 3233 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 391 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium cladosporioides* EXF - 2504 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium sphaerospermum* EXF - 385 (metanolni ekstrakt)
  - *Cladosporium fusiforme* EXF - 449 (acetonski ekstrakt)
  - *Pichia guilliermondii* EXF - 518 (acetonski ekstrakt)
  - *Pichia guilliermondii* EXF - 1496 (metanolni ekstrakt)

V 21 primerih se je sposobnost inhibicije rasti bakterije *Bacillus subtilis* pri glivi izrazila, ko smo jo gojili tako na gojišču brez soli, kakor tudi, ko smo jo gojili na gojišču z 10 % soli. V 6 primerih se je aktivnost pojavila samo, ko smo glivo gojili na gojišču brez soli, v 2 primerih, ko smo glivo gojili na gojišču z 10 % soli, in v enem primeru, ko smo glivo gojili na gojišču z dodatkom 17 % soli. Inhibicija rasti *Escherichia coli* se je v 11 primerih pokazala, ko smo glivo gojili na gojišču z 10 % soli, v 1 primeru, ko smo jo gojili na gojišču brez soli, in v 1 primeru, ko smo jo gojili tako na gojišču brez soli kakor tudi na gojišču z 10 % soli.



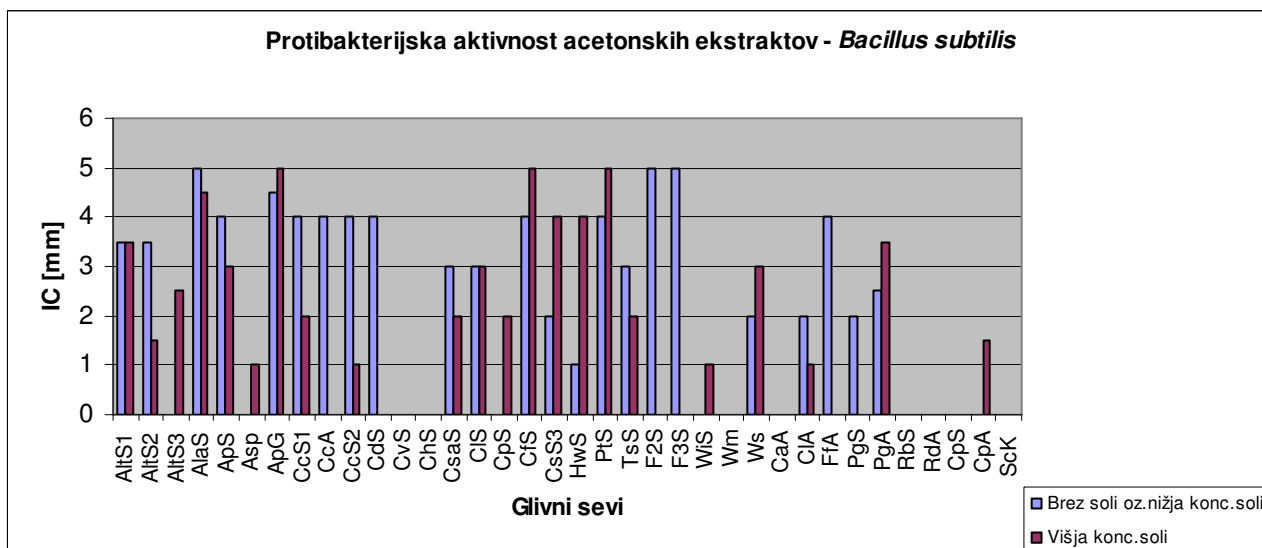
Preglednica 8: Protibakterijski testi na *Bacillus subtilis* – vzorci gliv, gojenih gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodatka NaCl (YNB\_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB\_10S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_BS (Aceton, brez NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_BS (Metanol, brez NaCl), širina inhibicijske cone (IC)

Vrsta	Sev	Aceton, brez NaCl		Metanol, brez NaCl		Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl	
		SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	1,7	3,5	11,8	1,5	29,8	3,5	1,7	1
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	2,3	3,5	7,6	2,5	1,8	1,5	25,9	1,5
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	0,3	-	3,9	3,5	2,8	2,5	4,5	1,5
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	2,0	5	12,3	5	3,5	4,5	28,1	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 150	2,6	4	14,7	4	20,4	3	65,8	4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 922	3,8	-	48,4	1	7,4	1	5,0	1
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	4,4	4,5	14,0	5	6,3	5	46,6	3,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 381	4,9	4	2,0	2	2,2	2	39,9	2,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 2504	1,7	4	6,8	-	2,4	-	19,1	6
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF - 385	4,9	4	13,4	5	4,4	1	28,8	1
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	4,6	4	14,0	4	3,5	-	30,7	-
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	4,1	-	25,1	-	2,7	-	35,1	-
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	17,0	-	65,3	-	6,7	-	63,8	-
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	4,7	3	9,2	3	4,4	2	18,1	-
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	5,5	3	24,0	4	6,9	3	47,6	-
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	7,2	-	17,3	1,5	5,2	2	26,9	-
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	7,9	4	8,8	4	5,7	5	23,8	7
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	2,8	2	7,1	-	2,7	4	30,8	3,5
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	4,6	1	8,5	1	1,4	4	71,2	3,5
<i>Phaeothea triangularis</i>	MZKI 206	6,1	4	17,8	3	2,9	5	29,2	4,5
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295 / MZKI B734	1,2	3	4,7	-	2,6	2	15,4	3
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	2,0	5	7,7	4	3,1	-	20,2	-
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	5,9	5	10,4	7	10,4	-	18,2	-
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	4,7	2	9,1	2	0,6	3	14,3	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	1,9	-	8,6	-	1,7	-	11,3	1
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	2,4	2	21,3	-	0,6	1	7,7	2

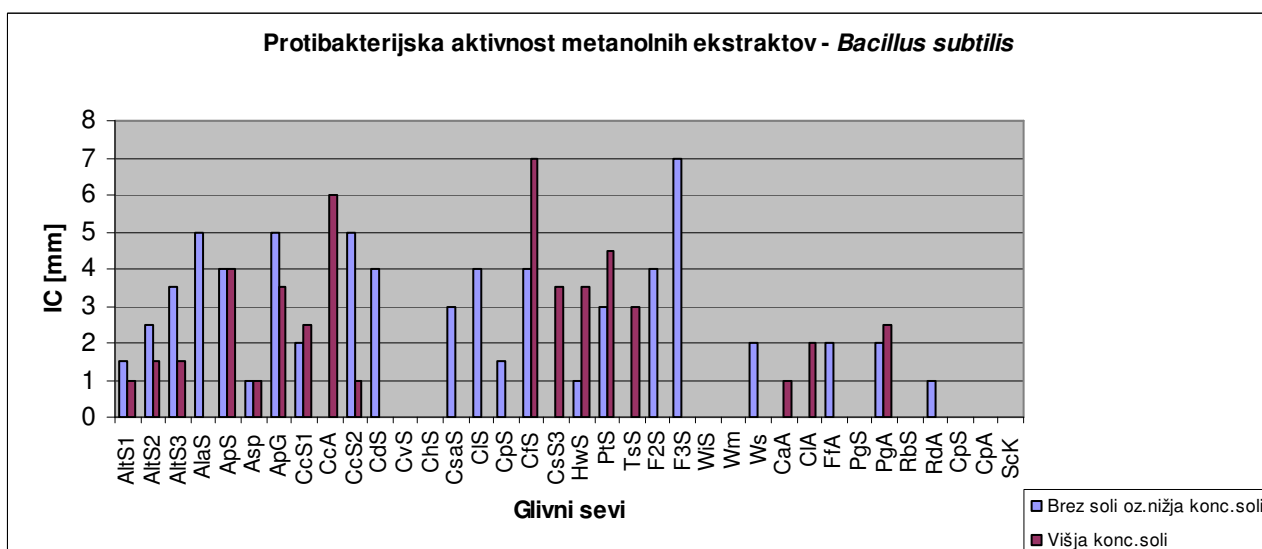
Vrsta	Sev	Aceton, brez NaCl		Metanol, brez NaCl		Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl	
		SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI - K560	14,7	4	3,5	2	14,9	-	10,7	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	0,3	2	19,3	-	0,5	-	14,7	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	2,2	2,5	4,8	2	1,0	3,5	24,4	2,5
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF - 513	2,2	-	21,1	-	1,7	-	19,3	-
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	1,9	-	22,2	1	7,4	-	3,1	-
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	2,9	-	14,8	-	3,0	-	23,7	-
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	4,8	-	19,4	-	1,7	1,5	16,0	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	3,9	-	7,8	-	1,0	-	7,1	-

Preglednica 9: Protibakterijski testi na *Bacillus subtilis* – vzorci gliv, gojenih gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB\_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB\_17S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Aceton, 17 % NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Metanol, 17 % NaCl), širina cone inhibicije (IC).

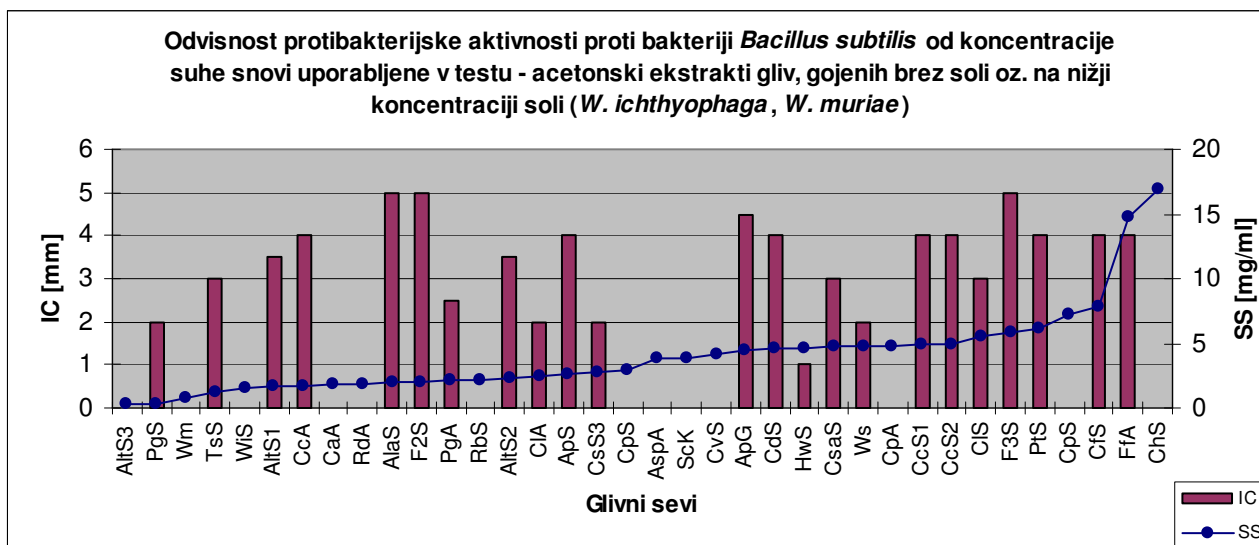
Vrsta	Sev	Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl		Aceton, 17 % NaCl		Metanol, 17 % NaCl	
		SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF - 994	1,6	-	17,7	-	1,8	1	22,4	-
<i>Wallemia muriae</i>	EXF - 951	0,7	-	13,6	-	6,6	-	23,6	-



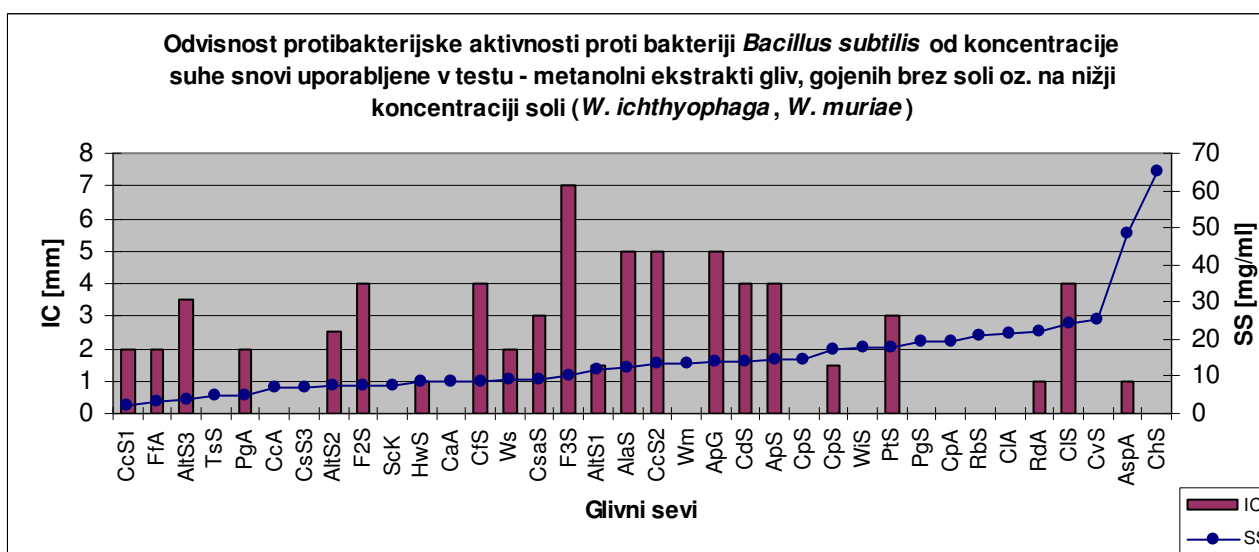
Slika 9: Protibakterijski testi na *Bacillus subtilis* – Primerjava protibakterijske aktivnosti acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli.. Legenda: širina cone inhibicije (IC)



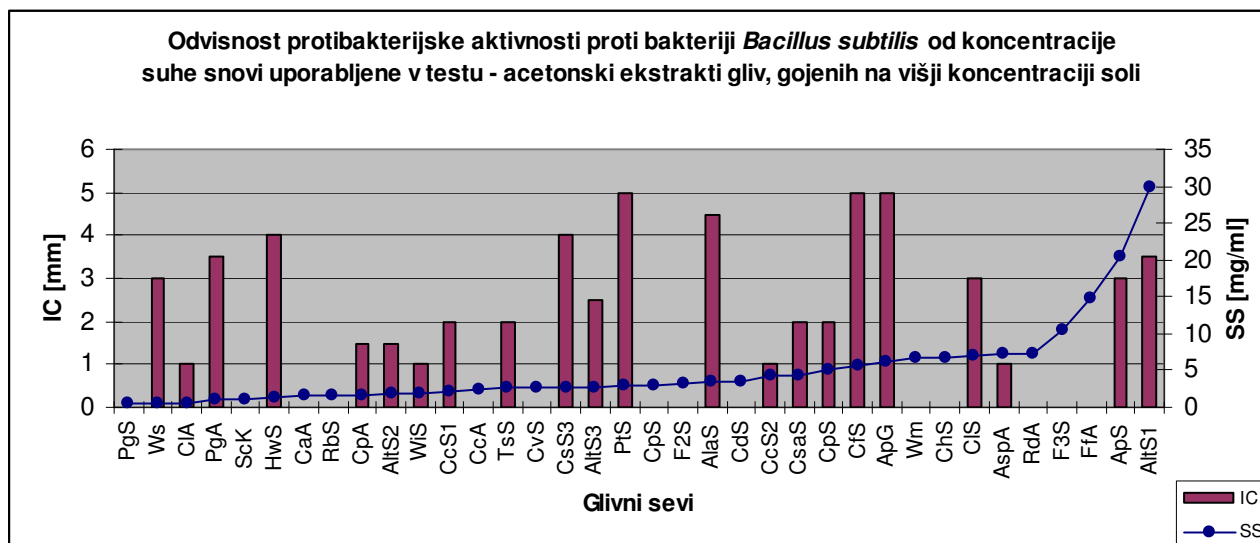
Slika 10: Protibakterijski testi na *Bacillus subtilis* – Primerjava protibakterijske aktivnosti metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli. Legenda: širina cone inhibicije (IC)



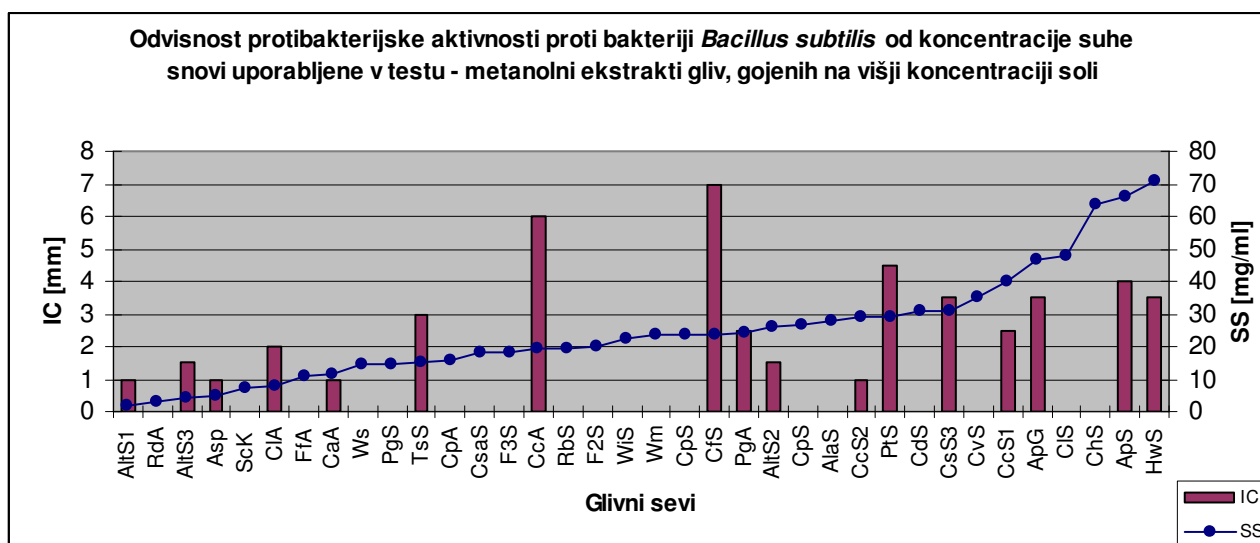
Slika 11: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo *Bacillus subtilis* od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*). Legenda: koncentracija suhe snovi (SS), širina cone inhibicije (IC)



Slika 12: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo *Bacillus subtilis* od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*). Legenda: koncentracija suhe snovi (SS), širina cone inhibicije (IC)



Slika 13: Odkvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo *Bacillus subtilis* od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – acetonski ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli. Legenda: koncentracija suhe snovi (SS), širina cone inhibicije (IC)



Slika 14: Odkvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo *Bacillus subtilis* od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli. Legenda: koncentracija suhe snovi (SS), širina cone inhibicije (IC)

Preglednica 10: Protibakterijski testi na *Escherichia coli* – vzorci gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base brez dodane NaCl (YNB\_BS) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 10 % NaCl (YNB\_10S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (Aceton, brez NaCl) oziroma na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (Metanol, brez NaCl) oziroma na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl), širina cone inhibicije (IC).

Vrsta	Sev	Aceton, brez NaCl		Metanol, brez NaCl		Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl	
		SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2329	1,7	-	11,8	-	29,8	-	1,7	1
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF - 2318	2,3	-	7,6	-	1,8	-	25,9	1,5
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF - 2338	0,3	-	3,9	-	2,8	-	4,5	1,5
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	2,0	-	12,3	-	3,5	-	28,1	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 150	2,6	-	14,7	-	20,4	-	65,8	4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF - 922	3,8	-	48,4	-	7,4	-	5,0	1
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF - 3233	4,4	-	14,0	-	6,3	-	46,6	3,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 381	4,9	-	2,0	-	2,2	-	39,9	2,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 2504	1,7	-	6,8	-	2,4	-	19,1	6
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF - 385	4,9	-	13,4	-	4,4	-	28,8	1
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	4,6	-	14,0	-	3,5	-	30,7	-
<i>Cladosporium velox</i>	EXF - 466	4,1	-	25,1	-	2,7	-	35,1	-
<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF - 572	17,0	-	65,3	-	6,7	-	63,8	-
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	4,7	-	9,2	-	4,4	-	18,1	-
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	5,5	-	24,0	-	6,9	-	47,6	-
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	7,2	-	17,3	-	5,2	-	26,9	-
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	7,9	1	8,8	1	5,7	1,5	23,8	-
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	2,8	-	7,1	-	2,7	-	30,8	-
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	4,6	-	8,5	-	1,4	-	71,2	-
<i>Phaeothea triangularis</i>	MZKI 206	6,1	-	17,8	-	2,9	-	29,2	-
<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF - 295 / MZKI B734	1,2	-	4,7	-	2,6	-	15,4	-
<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF - 2276	2,0	-	7,7	-	3,1	-	20,2	-
<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF - 2275	5,9	-	10,4	-	10,4	-	18,2	-
<i>Wallemia sebi</i>	EXF - 958	4,7	-	9,1	-	0,6	-	14,3	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	1,9	-	8,6	-	1,7	-	11,3	-
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	2,4	-	21,3	-	0,6	-	7,7	-
<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI – K560	14,7	1	3,5	-	14,9	-	10,7	-

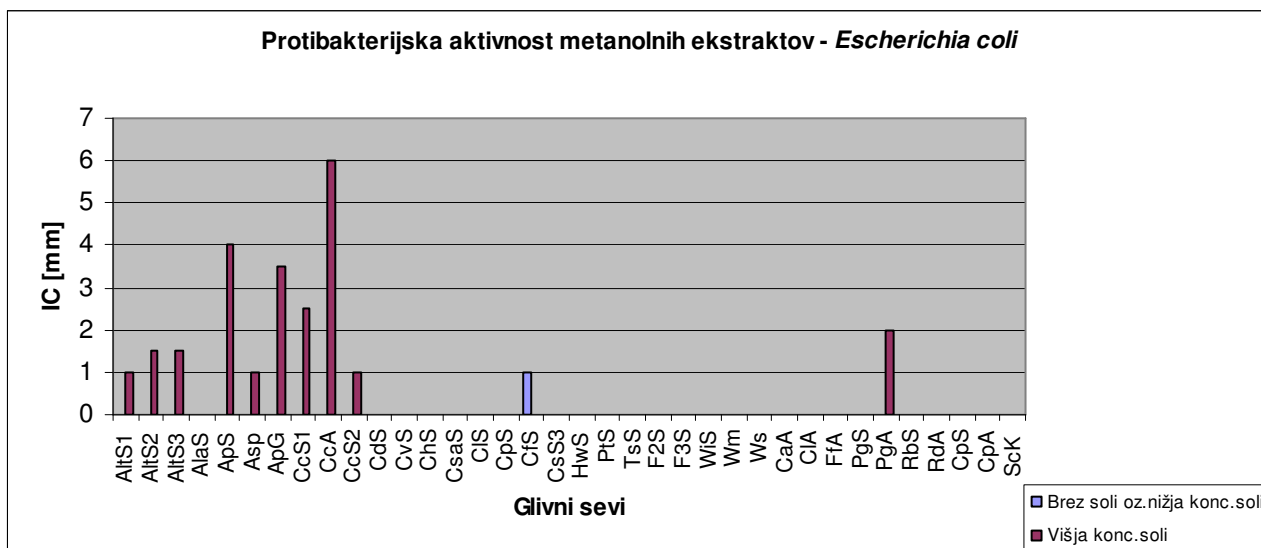
Vrsta	Sev	Aceton, brez NaCl		Metanol, brez NaCl		Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl	
		SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 518	0,3	-	19,3	-	0,5	1,5	14,7	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF - 1496	2,2	-	4,8	-	1,0	-	24,4	2
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF - 513	2,2	-	21,1	-	1,7	-	19,3	-
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	1,9	-	22,2	-	7,4	-	3,1	-
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 1574	2,9	-	14,8	-	3,0	-	23,7	-
<i>Candida parapsilosis</i>	EXF - 517	4,8	-	19,4	-	1,7	-	16,0	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	3,9	-	7,8	-	1,0	-	7,1	-

Preglednica 11: Protibakterijski testi na *Escherichia coli* – vzorci gliv, gojenih na gojiščih Yeast Nitrogen Base z 10 % NaCl (YNB\_10S) in Yeast Nitrogen Base z dodatkom 17 % NaCl (YNB\_17S). Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Aceton, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Aceton, 17 % NaCl), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_10S (Metanol, 10 % NaCl) oziroma na YNB\_17S (Metanol, 17 % NaCl), širina cone inhibicije (IC).

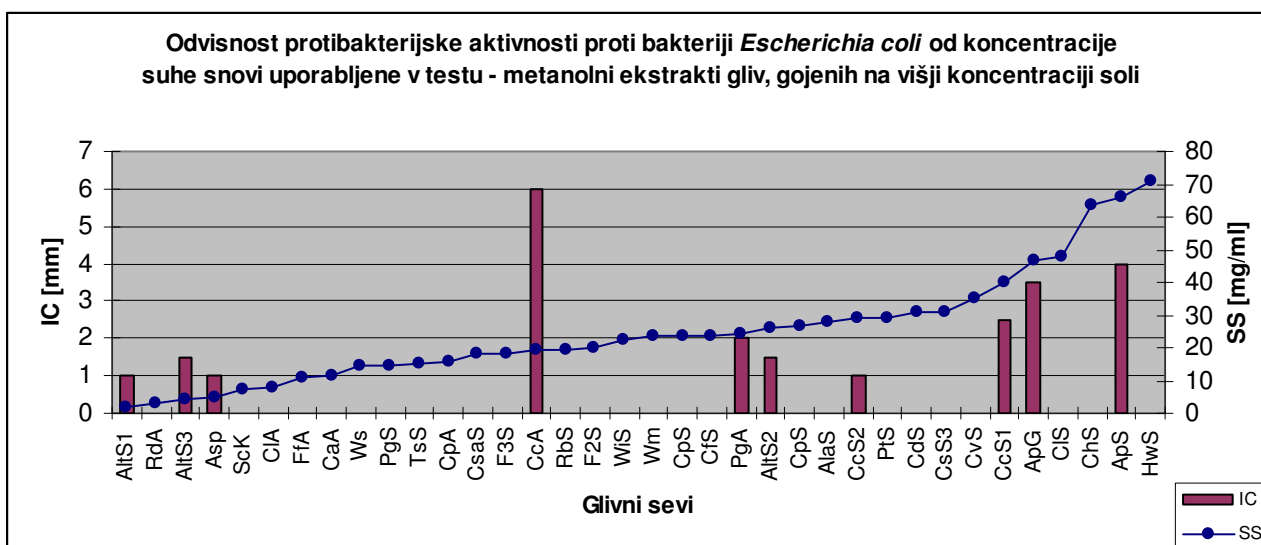
Vrsta	Sev	Aceton, 10 % NaCl		Metanol, 10 % NaCl		Aceton, 17 % NaCl		Metanol, 17 % NaCl	
		SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]	SS [mg/ml]	IC [mm]
<i>Walleimia ichthyophaga</i>	EXF - 994	1,6	-	17,7	-	1,8	-	22,4	-
<i>Walleimia muriae</i>	EXF - 951	0,7	-	13,6	-	6,6	-	23,6	-



Slika 15: Protibakterijski testi na *Escherichia coli* – Primerjava protibakterijske aktivnosti acetonskih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli. Legenda: širina cone inhibicije (IC)



Slika 16: Protibakterijski testi na *Escherichia coli* – Primerjava protibakterijske aktivnosti metanolnih ekstraktov gliv, gojenih brez soli oz. na nižji koncentraciji soli (*W. ichthyophaga*, *W. muriae*) in na višji koncentraciji soli. Legenda: širina cone inhibicije (IC)



Slika 17: Odvisnost protibakterijske aktivnosti (širina cone inhibicije) na bakterijo *Escherichia coli* od koncentracije suhe snovi, uporabljene v testu – metanolni ekstrakti gliv, gojenih na višji koncentraciji soli. Legenda: koncentracija suhe snovi uporabljene v testu (SS), širina cone inhibicije (IC)

Da bi lahko določili minimalno inhibitorno koncentracijo, smo najbolj aktivne vzorce dodatno redčili v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. Rezultati testa so prikazani v preglednici 13. Etanol kot slepi testni vzorec ni kazal protibakterijske aktivnosti. Zelo močno aktivnost je kazala vrsta *Fusarium* sp.3 EXF - 2275.



Preglednica 12: Protibakterijski testi na *E.coli* in *B.subtilis* po dodatnem redčenju vzorcev. Legenda: koncentracija suhe snovi, uporabljene v testu (SS), acetonski ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (A\_BS) oziroma na YNB\_10S (A\_10S), metanolni ekstrakti gliv, gojenih na YNB\_BS (M\_BS) oziroma na YNB\_10S (M\_10S), širina cone inhibicije pri redčitvi 1:10 (1:10, IC [mm]), širina cone inhibicije pri redčitvi 1:100 (1:100, IC [mm]), širina cone inhibicije pri redčitvi 1:1000 (1:1000, IC [mm]), minimalna inhibitorna koncentracija (MIC [mg/ml]).

Vrsta	Sev	Vzorec	SS [mg/ml]	<i>B.subtilis</i> – Redčitve				<i>E.coli</i> – Redčitve			
				1:10 IC [mm]	1:100 IC [mm]	1:1000 IC [mm]	MIC [mg/ml]	1:10 IC [mm]	1:100 IC [mm]	1:1000 IC [mm]	MIC [mg/ml]
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF-2329	A_BS	1,7	-	-	-	1,7	-	-	-	-
		M_BS	11,8	-	-	-	11,8	-	-	-	-
		A_10S	29,8	1,5	-	-	2,98	-	-	-	-
		M_10S	1,7	-	-	-	1,7	-	-	-	1,7
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa C	EXF-2318	A_BS	2,3	-	-	-	2,3	-	-	-	-
		M_BS	7,6	1	-	-	0,76	-	-	-	-
		A_10S	1,8	-	-	-	1,8	-	-	-	-
		M_10S	25,9	-	-	-	25,9	-	-	-	25,9
<i>Alternaria tenuissimum</i> grupa X	EXF-2338	A_BS	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
		M_BS	3,9	-	-	-	3,9	-	-	-	-
		A_10S	2,8	-	-	-	2,8	-	-	-	-
		M_10S	4,5	-	-	-	4,5	-	-	-	4,5
<i>Alternaria aborescens</i>	EXF-2340	A_BS	2,0	-	-	-	2,0	-	-	-	-
		M_BS	12,3	-	-	-	12,3	-	-	-	-
		A_10S	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-
		M_10S	28,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF-150	A_BS	2,6	1	0,5	-	0,026	-	-	-	-
		M_BS	14,7	1	0,5	-	0,147	-	-	-	-
		A_10S	20,4	3	1	-	0,204	-	-	-	-
		M_10S	65,8	1	0,5	-	0,658	1	0,5	-	0,658
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF-922	A_BS	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-
		M_BS	48,4	-	-	-	48,4	-	-	-	-
		A_10S	7,4	-	-	-	7,4	-	-	-	-
		M_10S	5,0	-	-	-	5,0	-	-	-	5,0
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF-3233	A_BS	4,4	1,5	1	-	0,044	-	-	-	-
		M_BS	14,0	1	-	-	1,40	-	-	-	-
		A_10S	6,3	2,5	1	-	0,063	-	-	-	-
		M_10S	46,6	-	-	-	46,6	-	-	-	46,6
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF-381	A_BS	4,9	0,5	-	-	0,49	-	-	-	-
		M_BS	2,0	-	-	-	2,0	-	-	-	-
		A_10S	2,2	-	-	-	2,2	-	-	-	-

Vrsta	Sev	Vzorec	SS [mg/ml]	<i>B.subtilis</i> – Redčitve				<i>E.coli</i> – Redčitve			
				1:10 IC [mm]	1:100 IC [mm]	1:1000 IC [mm]	MIC [mg/ml]	1:10 IC [mm]	1:100 IC [mm]	1:1000 IC [mm]	MIC [mg/ml]
		M_10S	39,9	-	-	-	39,9	-	-	-	39,9
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF - 2504	A_BS	1,7	-	-	-	1,7	-	-	-	-
		M_BS	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-
		A_10S	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-
		M_10S	19,1	-	-	-	19,1	-	-	-	19,1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF - 385	A_BS	4,9	1,5	1	-	0,049	-	-	-	-
		M_BS	13,4	-	-	-	13,4	-	-	-	-
		A_10S	4,4	-	-	-	4,4	-	-	-	-
		M_10S	28,8	-	-	-	28,8	-	-	-	28,8
<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF - 732	A_BS	4,6	-	-	-	4,6	-	-	-	-
		M_BS	14,0	0,5	-	-	1,4	-	-	-	-
		A_10S	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-
		M_10S	30,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium salinae</i>	EXF - 335	A_BS	4,7	2	1	-	0,047	-	-	-	-
		M_BS	9,2	1	0,5	-	0,092	-	-	-	-
		A_10S	4,4	-	-	-	4,4	-	-	-	-
		M_10S	18,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF - 449	A_BS	7,9	1	-	-	0,79	-	-	-	7,9
		M_BS	8,8	1	-	-	0,88	-	-	-	8,8
		A_10S	5,7	1	-	-	0,57	1	0,5	-	0,057
		M_10S	23,8	1	-	-	2,38	-	-	-	-
<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF - 1000	A_BS	5,5	1	-	-	0,55	-	-	-	-
		M_BS	24,0	1	-	-	2,4	-	-	-	-
		A_10S	6,9	1	-	-	0,69	-	-	-	-
		M_10S	47,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF - 391	A_BS	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-
		M_BS	17,3	0,5	-	-	1,73	-	-	-	-
		A_10S	5,2	-	-	-	5,2	-	-	-	-
		M_10S	26,9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF - 334	A_BS	2,8	-	-	-	2,8	-	-	-	-
		M_BS	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-
		A_10S	2,7	1	0,5	-	0,027	-	-	-	-
		M_10S	30,8	-	-	-	30,8	-	-	-	-
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF - 225 / MZKI B736	A_BS	4,6	-	-	-	4,6	-	-	-	-
		M_BS	8,5	-	-	-	8,5	-	-	-	-
		A_10S	1,4	1,5	0,5	-	0,014	-	-	-	-





## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Morske glive so do sedaj izolirali iz okoljskih vzorcev morja, naplavljenega lesa in površin različnih morskih organizmov, kakršni so spužve, zelene alge in morska trava in še nekaterih drugih površin kot so steblo koruze in prst. Ti morski organizmi imajo mehko strukturo ali žive pritrjeno in so zato razvili kemično obrambo, ki jo bodisi proizvajajo sami ali jo pridobijo od simbiotskih morskih mikroorganizmov (Haefner, 2003). Ker je verjetno, da sekundarni metaboliti delujejo kot potencialni inhibitorji fizioloških procesov plena, predatorja ali kompetitorja (Haefner, 2003), smo pričakovali, da bomo s testiranjem bioloških aktivnosti organskih ekstraktov izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv, ki naseljujejo skrajnostna okolja, tudi mi odkrili podobne ali nove učinkovine. Zanimalo nas je tudi, kako povišana koncentracija soli, ki predstavlja prevladujoč stresni pogoj, vpliva na sintezo sekundarnih metabolitov.

Z organskimi topili se ekstrahirajo predvsem pigmenti, lipidi in sekundarni metaboliti. Liofilizirane micelije smo ekstrahirali v acetonu in metanolu, ki sta organski topili z različno polarnostjo (dielektrična konstanta za metanol je 33.6, za aceton pa 20.7). Z organskimi topili s podobnimi dielektričnimi konstantami se ekstrahirajo podobne substance in zato naše rezultate lahko do neke mere primerjamo z že objavljenimi. Za preverjanje bioloških aktivnosti organskih ekstraktov smo izbrali tri teste. Spremljali smo hemolitično in protibakterijsko aktivnost vzorcev, testirali pa smo jih še kot inhibitorje encima acetilholinesteraze.

#### 5.1.1 Hemolitični test

Hemolitično aktivnost je pokazalo 41 (28 %) od 144 vzorcev, od pozitivnih vzorcev je bilo 66 % ekstraktov gliv, ki so zrastle na gojiščih brez soli. Najbolj halofilni glivni predstavniki, *Wallemia ichthyophaga* EXF - 994, *Wallemia muriae* EXF - 951 in kontrolni organizem (*Saccharomyces cerevisiae*) niso pokazale hemolitične aktivnosti.

Acetonski in metanolni ekstrakti so si bili podobni po hemolitični aktivnosti. Razlika se je pokazala, če upoštevamo koncentracijo suhe snovi v vzorcu. Ta je bila pri veliki večini acetonskih ekstraktov manjša v primerjavi z metanolnimi, zato lahko sklepamo, da imajo acetonski ekstrakti intenzivnejšo hemolitično aktivnost od metanolnih in da so snovi, ki povzročajo hemolizo bolj nepolarne.

V literaturi nismo zasledili raziskav o hemolitični aktivnosti pri izbranih halofilnih in halotolerantnih glivah. Našli smo le poročila o citotoksičnosti, ki bi sicer lahko bila, a ne nujno, posledica membranske aktivnosti snovi, prisotnih v preučevanih glivah. Med snovmi, izoliranimi iz nedoločene vrste rodu *Fusarium*, so Kobayashi in sodelavci (1995) odkrili citotoksično snov fusarielin A, Renner in sodelavci neomagnikol A (1998) in magnikole A-G (1999), Belofsky in sodelavci (1999) sansalvamid ter Cueto in sodelavci (2000) N – metilsansalvamid. Pri vrsti *Cladosporium* sp. so Shigemori in sodelavci izolirali sporiolida A in B, iz vrste *Wallemia sebi* pa so Wood in sodelavci izolirali valeminol. Fusarielin A je kazal citotoksičnost proti HeLa S3 in NCI – H69 celicam, neomagnikol A proti MCF – 7 celicam človeškega karcinoma dojke in CACO – 2 celicam človeškega raka debelega črevesa, sansalvamid proti HCT – 116 celicam karcinoma dojke, sporiolid A in B proti L1210 celicam mišjega limfoma in valeminol proti jetrnim in BHK ledvičnim celicam podgan. Citotoksičnost v presejalnih testih s 60 različnimi celičnimi linijami so kazali magnikoli A – G in sansalvamid. Od naših 11 sevov rodu *Cladosporium* spp. jih je 9 kazalo hemolitično aktivnost. Sevi *Fusarium* sp. in *Wallemia sebi* v razmerah naših raziskav niso pokazali hemolitične aktivnosti.

### 5.1.2 Test protibakterijske aktivnosti

Rast po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* je inhibiralo 84 (58 %) od 144 vzorcev, rast po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli* pa petnajst (10 %) od 144. Pri prvi se je aktivnost pokazala pri vseh obravnavanih rodovih gliv razen *Saccharomyces* in je bila rahlo večja, ko smo glive gojili na gojiščih brez soli, pa tudi acetonski ekstrakti so bili bolj aktivni kot metanolni. Pri drugi pa je aktivnost kazalo le pet rodov obravnavanih gliv in aktivnost je bila večja, ko smo glivo gojili na gojiščih z 10 % soli. V tem primeru so bili metanolni ekstrakti aktivnejši od acetonskih.

Rezultati niso presenetljivi, saj vemo, da mnoge antibiotike pridobivamo prav iz gliv. Glede na to, da je bila inhibicija rasti pogostejša pri Gram pozitivnih bakterijah, lahko sklepamo na selektivno delovanje ekstrahiranih učinkovin na bakterije.

V literaturi so glivno protibakterijsko aktivnost testirali kot aktivnost proti bakterijam *E. coli*, *B. subtilis* in *S. aureus* ali na splošno kot aktivnost proti po Gramu pozitivnim (G+) in po Gramu negativnim (G-) bakterijam. Iz vrste *Hortaea werneckii* so Brauers in sodelavci (2001) izolirali hortein, vendar se je ta v opravljenih protibakterijskih testih pokazal za neaktivnega. Iz glive *Fusarium* sp. so Renner in sodelavci (1998) izolirali neomagnikol B. Ta je bil aktiven proti bakteriji *Bacillus subtilis*. Smith in sodelavci (2000) so iz neidentificiranega glivnega seva I96S215 izolirali izo-kladospolid B, seko-patuloid, pandangolida 1 in 2 ter kladospolid, od katerih nobeden ni kazal antibiotične aktivnosti proti G+ in G- bakterijam, do končne koncentracije 250 µg/ml. Jadulco in sodelavci (2001) so iz glive *Cladosporium herbarum* izolirali pandagolide 2, 3 in 4, kladospolid B, izo-kladospolid B, Sumikijevo kislino in acetyl-Sumikijevo kislino. Pandagolidi so bili neaktivni proti G+ in G- bakterijam, obe kislini pa sta bili aktivni proti vrstam *Bacillus subtilis* in *Staphylococcus aureus* v koncentracijah nekaj µg/ml in neaktivni proti bakteriji *Escherichia*

*coli*. Shigemori in sodelavci (2004) so iz glive *Cladosporium* sp. izolirali sporiolida A in B. Oba sta kazala protibakterijsko aktivnost. Takahashi in sodelavci (1993) so iz glive *Wallemia sebi* izolirali steroidom podobni spojini UCA 1064 – B in UCA 1064 – A, ki sta obe kazali protibakterijsko aktivnost proti G+ in G- bakterijam pri koncentraciji 40 µg/ml.

### 5.1.3 Test inhibicije encima AchE

Acetilholin (ACh) je nevrottransmitter, (AChE) je encim, ki ga razgrajuje. Od naših 144 vzorcev nobeden ni inhibiral AChE. Tudi v literaturi ni podatkov o nevrotoksičnih sekundarnih metabolitih izbranih gliv.

### 5.1.4 Koncentracija suhe snovi v ekstrahiranih vzorcih

Poleg različnih bioloških aktivnosti nas je zanimalo tudi, kako povišana vsebnost soli v gojišču vpliva na biomaso glive. Pri 27 od 36 gliv je bila koncentracija suhe snovi v vzorcu (SS) v metanolnih ekstraktih višja, ko smo glive gojili na višji koncentraciji soli. Enako je veljalo za 19 acetonskih ekstraktov. Pri kontroli (*Saccharomyces cerevisiae*) je bila koncentracija suhe snovi v vzorcu (SS) tako acetonskih kot metanolnih ekstraktov višja, ko smo glivo gojili na gojišču brez soli (YNB\_BS). Iz tega je razvidno, da povišana koncentracija soli (stresni pogoji) vpliva na povečano sintezo snovi, ki se ekstrahirajo z bolj polarnimi topili (metanol). Pri primerjavi z acetonskimi ekstrakti pri teh nismo opazili istega trenda, zato težko sklepamo, da ima povišana koncentracija soli vpliv na sintezo snovi, ki se ekstrahirajo z manj polarnimi topili (acetón).

Iz prej navedenega lahko ugotovimo, da so organski ekstrakti gliv delovali predvsem hemolitično in protibakterijsko. Po pregledu literature s področja opisanih bioloških učinkov organskih ekstraktov testiranih gliv smo v diplomski nalogi ugotovili precej novosti. Prvi smo odkrili, da so ekstrakti obravnavanih gliv hemolitično aktivni in da ne inhibirajo encima acetilholinesteraze. Pri protibakterijskih testih je bilo v literaturi zaslediti aktivnost pri glivah *Hortaea werneckii*, *Fusarium* sp., *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium* sp. in *Wallemia sebi*. Pri vseh, razen *Cladosporium herbarum*, ki ga v naši nalogi nismo uporabili, smo potrdili protibakterijsko aktivnost. Ostali protibakterijsko aktivni vzorci pa verjetno predstavljajo še neraziskane snovi s potencialno uporabnimi biološkimi aktivnostmi.

Opazili smo, da povišana koncentracija soli v gojišču poveča produkcijo sekundarnih metabolitov pri določenih glivah. Opazili smo tudi, da kljub večji produkciji sekundarni metaboliti niso bili tudi bolj aktivni. To je najboljše vidno iz testa hemolitične aktivnosti, v katerem je 65.8 % aktivnih ekstraktov pridobljenih iz gliv, ki smo jih gojili na gojišču brez soli. Tako opazimo dva trenda, povezana s povišano koncentracijo soli v gojišču. Prvi je povišana produkcija sekundarnih metabolitov in drugi je manjša aktivnost teh metabolitov v izbranih bioloških testih.

## 5.2 SKLEPI

- Povišana koncentracija soli v gojišču je vplivala na koncentracijo suhe snovi metanolnih ekstraktov. Pri 75 % obravnavanih gliv je bila koncentracija suhe snovi metanolnih ekstraktov višja, ko smo glive gojili na višji koncentraciji soli.
- Prvi smo določili hemolitična aktivnost za različne vrste, ki jih uvrščamo v naslednje rodove gliv: *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Hortaea*, *Phaeotheca*, *Trimmatostroma*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Pichia* in *Rodosporidium*.
- Protibakterijsko aktivnost proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis* je kazalo 83,3 % izbranih vrst gliv. Aktivni so bili vsi rodovi razen *Saccharomyces*, torej *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Hortaea*, *Phaeotheca*, *Trimmatostroma*, *Fusarium*, *Wallemia*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Pichia*, *Rhodosporidium* in *Candida*. Protibakterijsko aktivnost proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* je kazalo 36,1 % izbranih vrst gliv. Aktivnih je bilo le pet rodov: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Filobasidium* in *Pichia*. Trinajst vrst gliv je bilo aktivnih proti obema vrstama bakterijam: *Alternaria tenuissimum* grupa C EXF - 2329 in EXF - 2318, *Alternaria tenuissimum* grupa X EXF - 2338, *Aureobasidium pullulans* EXF - 150 in EXF - 922, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF - 3233, *Cladosporium cladosporioides* EXF - 381, EXF - 2504 in EXF - 385, *Cladosporium fusiforme* EXF - 449, *Filobasidium floriforme* MZKI – K560 ter *Pichia guilliermondii* EXF - 518 in EXF - 1496.
- Inhibicije encima acetilholinesteraze ni kazala nobena od preizkušenih vrst gliv.
- Ekstrakti gliv, ki so zrastle na gojišču brez dodatka soli, so pokazali večjo hemolitično in protibakterijsko aktivnost proti bakteriji *Bacillus subtilis* kakor ekstrakti gliv, ki so zrastle na gojiščih z dodatkom soli.
- Acetonski ekstrakti so se v vseh testih izkazali za aktivnejše od metanolnih razen v testu protibakterijske aktivnosti proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli*.



## 6 POVZETEK

Glive so vir velikega števila raznolikih biološko aktivnih spojin, ki se s pridom izkoriščajo v industriji. Ravno zaradi tega so raziskave gliv izredno pomembne pri iskanju novih biološko aktivnih spojin, ki bi lahko delovale kot potencialna zdravila, industrijski reagenti, bioremediacijsko pomembne snovi in drugo.

36 izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv iz redu *Dothideales* in izbranih kvasovk smo testirali s tremi različnimi testi. To so bili test hemolitične aktivnosti, protibakterijski test ter test inhibicije encima AChE. Osredotočili smo se na organske ekstrakte in zato za ekstrakcijo uporabili organski topili aceton in metanol.

Rezultati so pokazali, da nekateri ekstrakti, dobljeni z organskimi topili, vsebujejo biološko aktivne spojine, ki bi lahko bile farmakološko zanimive. Najbolj obetavni so bili ekstrakti rodov *Aureobasidium* in *Cladosporium*, ki so kazali tako visoko hemolitično kot tudi protibakterijsko aktivnost proti bakterijam *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*.

## 7 VIRI

Belofsky GN, Jensen PR, Fenical W (1999). Sansalvamide: a new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Tetrahedron Lett*, 40: 2913–2916.

Bennett J.W., Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16, 3: 497–516

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*. *J. Nat. Prod.*, 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

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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82: 793–804.

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

De Hoog S., Zalar P., Van Den Ende B.G., Gunde-Cimerman N. (2005). Relation of halotolerance to human-pathogenicity in the fungal tree of life: An overview of ecology and evolution under stress. V: adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (ur.). *Nizozemska, Springer*: 371–395

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*. *Nat. Tox.*, 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

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: *The biodiversity of fungi: their role in human life*. Deshmukh S.K., Rai M.K. (ur.). New Delhi, Oxford & IBH Publishing Cp. Pvt. Ltd.: 69–127

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

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

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*. *J. Nat. Prod.*, 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*. *J. Nat. Prod.*, 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.

Jogan N. (2001). *Navodila za vaje iz sistematske botanike*. 3. izdaja delovne verzije. Ljubljana: 24–29

Kirk P., Cannon P., Minter D., Stalpers J. (2008). *Dictionary of the fungi*. 10. izdaja. Oxon. CABI publishing: 265

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. *The journal of antibiotics*: 42–52

Madigan M., Martinko J.M., Parker J. (2003). Brock Biology of Microorganisms. 10. izdaja. Upper Saddle River, NJ. Prentice-Hall: 1019

Mayer A.M.S., Lehmann V.K.B. (2000). Marine pharmacology. The Pharmacologist, 42, 2: 62–69

Proksch P., Edrada R.A., Ebel R. (2002). Drugs from the sea – current status and microbiological implications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 2,3: 125–134

Renner M., 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*. J. Org. Chem., 65: 4843–4852.

Renner M.K., Jensen P.R., Fenical W. (1998). Neomangicols: structures and absolute stereochemistries of unprecedented halogenated sesterterpenes from the marine fungus of the genus *Fusarium*. J. Org. Chem., 63: 8346–8354.

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. J. Nat. Prod., 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

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. Mar. Drugs, 2: 164–169

Shigemori H., Tenma M., Shimazaki K., Kobayashi J. (1998). Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. J. Nat. Prod., 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. J. Nat. Prod., 63: 142–145.

Sonjak S. (2006). Biološka raznovrstnost rodu *Penicillium* v ledeniškem ledu Arktike (Svalbard) in genomska variabilnost najpogostejše vrste *P. crustosum*: doktorska disertacija

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. *The Journal of Antibiotics*, 48: 1312–1313.

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.

## **ZAHVALA**

Mentoricama prof. dr. Kristini Sepčič in prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za spodbudo in pomoč pri laboratorijskem delu in pisanju.

Martini Turk, Poloni Zalar, Cenetu Gostinčar, Babsi in Gregorju za pomoč pri delu in gašenje požarov.

Škratu in Katarini za lektoriranje ter oblikovanje diplome in obvladovanje računalnika.

Mami in očetu za potrpljenje in nov računalnik.

## PRILOGA A: PREGLED NARAVNIH PRODUKTOV OBRAVNAVANIH RODOV GLIV, IZOLIRANIH IZ MORJA

Priloga A: Iz literature zbrani podatki o doseganju iskanju bioloških aktivnosti v ekstraktih obravnavanih gliv

Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
<i>Hortaea werneckii</i>	Izolirana iz svežih vzorcev morske spužve <i>Aplysina aerophoba</i>	Hortein	Naravni fenolni produkt z unikatnim sistemom obročev	62 dni inkubacije,  27°C,  25 g/l sladni ekstrakt	EtOH	<i>Neaktivna pri E.coli, S. aureus, B.subtilis, C.albicans</i>  Ni insekticidne aktivnosti proti polifagnemu škodljivcu <i>Spodoptera littoralis</i>	Brauers G, Ebel R, Edrada R, Wray V, Berg A, Gräfe U, Proksch P (2001). Hortein, a new natural product from the fungus <i>Hortaea werneckii</i> associated with the sponge <i>Aplysina aerophoba</i> . J. Nat. Prod. 64: 651-652.
<i>Fusarium semitectum</i>	okuženo steblo koruze	Neofuzapiron  fuzapiron  deoksifuzapiron	pironi	25 dni,  25°C,  PDA	MeOH:1 % vodna raztopina NaCl (55:45)	Protiglivna aktivnost proti: <i>Geotrichum candidum</i> : MIC (fuzapiron) = 12.1 µg/disk, MIC (deoksifuzapiron) = 2.4 µg/disk  Ni toksično za morske kozice <i>Artemia salina</i>	Evidente A, Conti L, Altomare C, Bottalico A, Sindona G, Segre AL, Logrieco A (1994). Fusapyrone and deoxyfusapyrone, two antifungal α – pyrones from <i>Fusarium semitectum</i> . Nat. Tox. 2:4-13.
<i>Fusarium sp.</i>	prst	Fuzarielini A-D	poliketidi	20 dni,  20°C,  PDA	Aceton / benzen	<u>Fuzarielin A</u> : protiglivna aktivnost proti <i>A. fumigatus, Alternaria kikuchiana, Colleotricum lindemuthianum, Helminthosporium oryzae</i>	Kobayashi H, Sunaga R, Furihata K, Morisaki N, Iwasaki S (1995). Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fuzarielin A, and related

Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
						<p>in <i>Pyricularia oryzae</i> (MIC = 3.1, 50, 25, 12.5, 25 in 50 µg/ml);</p> <p>citotoksično-st proti HeLa S3 in NCI-H69 celicam (IC<sub>50</sub>s = 54.6 in 48.6 µM);</p> <p>ni inhibicije agregacije mikrotubulov do 200 µM</p> <p><b><u>Fusarielin B:</u></b></p> <p>Ni inhibicije rasti bakterij, gliv ali tumorskih celic</p>	compounds produced by a <i>Fusarium sp.</i>
<i>Fusarium sp.</i>	Vzorec naplavljenega lesa zbranega na Bahamih v mangrovah	Neomagnikoli A-C	sesterterpeni	21 dni, sterilna morska voda, kvasni ekstrakt (0.5 %), pepton (0.5 %), glukoza (1 %) in zmlete rakovice (0.2 %)	MeOH / diklorometan	<p><b><u>Neomagnikol A:</u></b></p> <p>citotoksična aktivnost proti celicam človeškega karcinoma dojke MCF-7 in celicam raka debelega črevesa CACO-2 (IC<sub>50</sub>s = 4.9 in 5.7 µM).</p> <p><b><u>Neomagnikol B:</u></b> IC<sub>50</sub> = 27 µM</p> <p>protibakterijska aktivnost proti <i>B. subtilis</i> (primerljiva z aktivnostjo gentamicina)</p>	Renner MK, Jensen PR, Fenical W (1998). Neomagnicols: structures and absolute stereochemistries of unprecedented halogenated sesterterpenes from the marine fungus of the genus <i>Fusarium</i> . J. Org. Chem. 63: 8346-8354.



Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
<i>Fusarium sp.</i>	Površina morske trave <i>Halodule wrightii</i>	Sansalvamid	Ciklični pentadepsipeptid	Medij na bazi morske vode	Frakcionacija surovega homogenata micelija čez silika gel, precipitacija iz EtOH raztopine z heksanom	Citotoksičnost proti HCT-116 celicam karcinoma debelega črevesa (IC <sub>50</sub> of 9.8 µg/ml).  Povprečen IC <sub>50</sub> = 27.4 µg/ml v presejalnem testu s 60 različnimi celičnimi linijami (posebno proti COLO 205 (rak debelega črevesa) in SK-MEL-2 (melanom): IC <sub>50</sub> 3.5 in 5.9 µg/ml.	Belofsky GN, Jensen PR, Fenical W (1999). Sansalvamide: a new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus <i>Fusarium</i> . Tetrahedron Lett. 40: 2913-2916.
<i>Fusarium sp.</i>	Vzorec naplavljenega lesa zbranega na Bahamih v mangrovah	Mangikoli A-G	Sesterterpeni polioli	21 dni, sterilna morska voda, kvasni ekstrakt (0.5 %), pepton (0.5 %), glukoza (1 %) in zmlete rakovice (0.2 %)	MeOH / diklorometan	Povprečen IC <sub>50</sub> magnikolov A-G v presejalnem testu s 60 različnimi celičnimi linijami: 24.5 (A), 20.4 (B), 17 (C), 24.5 (D), 17.8 (E), 36.3 (F), 25.1 (G). Ni selektivnosti proti izbranim linijam rakastih celic  Mangikola A in C: znatna inhibicija edema v mišjem ušesu.	Renner M, Jensen PR, Fenical W (2000). Mangicol: structures and biosynthesis of a new class of sesterterpene polyols from a marine fungus of the genus <i>Fusarium</i> . J. Org. Chem. 65: 4843-4852.
<i>Fusarium sp.</i>	Vzorec zelenih alg <i>Avrainvillea sp.</i> (mangrove)	N-metilsansalvamid	Ciklični depsipeptid	21 dni, medij na bazi morske vode,	MeOH/diklorometan	Srednja citotoksičnost ( IC <sub>50</sub> of 8.2 µg/ml)	Cueto M, Jensen PR, Fenical W (2000). N-methylsansalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine

Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
				25°C			depsipeptide from a marine fungus of the genus <i>Fusarium</i> . <i>Phytochemistry</i> 55: 223-226.
<i>Fusarium sp.</i>	Alga <i>Codium fragile subsp. atlanticum</i>	JM47	Ciklični tetrapeptid HC-toksinski analog	30 dni, 28°C, medij iz rjavega riža	EtOAc	Antibiotična aktivnost proti <i>S. aureus</i> in vankomicin-rezistentnim enterokokom	Jiang Z, Barret MO, Boyd KG, Adams DR, Boyd ASF, Burgess JG (2002). JM47, a cyclic tetrapeptide HV-toxin analogue from a marine <i>Fusarium</i> species. <i>Phytochemistry</i> 60: 33-38.
Neidentificiran glivni sev I96S215	Vzorec tkiva indonezijske morske spužve	<i>Izo</i> -kladospolid B, <i>Seko</i> -patuloid, Pandangolidi 1-2, kladospolid	1,2: heksaketidi, 3,4: 12-členski makrolidi	7 dni, 22 in 28°C, Rast v različnih medijih: sladni ekstrakt, agar, Czapekov agar, kvasni ekstrakt, pepton dekstrozni agar, agar s polento, PDA	EtOAc	Ni antibiotične aktivnosti proti G+ in G- bakterijam do 250 µg/ml	Smith CJ, Abbanat D, Bernan VS, Maiese WM, Greenstein M, Jompa J, Tahir A, Ireland CM (2000). Novel polyketide metabolites from a species of marine fungi. <i>J. Nat. Prod.</i> 63: 142-145.
<i>Fusarium sp.</i>	Površina morske vode na Japonskem	Nevrosporaksant in in nevrosporaksantin	karotenoid glikozil ester	7 dni, 25°C,	aceton	ni testirano	Sakai H, Kaneno H, Sumiya Y, Tsusima M, Miki W, Kishimoto N, Enito T, Matsumoto S

Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
	Japonskem	$\beta$ – D – glukopiranozid		medij na bazi morske vode medij			Fujita T, Matsumoto S, Komemushi S, Sawabe A (2002). A new carotenoid glycosyl ester isolated from a marine microorganism, <i>Fusarium</i> strain T-1. J. Nat. Prod. 65: 1683-1684.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Japonska morska spužva	Diketopiperazin 1 in 2, orkinotriol	Orkinotriol: novi 1,3-dihidroksifenolni derivat	6 dni, 25°C, PYG (gojišče z 2 % glucoze)	MeOH	ni testirano	Shigemori H, Tenma M, Shimazaki K, Kobayashi J (1998). Three new metabolites from the marine yeast <i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pregled vseh bioproduktov <i>A. pullulans</i>	pululan	Linearni $\alpha$ – D glukan			Antikoagulant, antitrombotik, protivirusno delovanje	Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G, Zhang T (2009). Bioproducts from <i>Aureobasidium pullulans</i> , a biotechnologically important yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 793-804.
<i>Cladosporium herbarum</i>	Morska spužva <i>Callyspongia aerizusa</i>	Pandangolidi 2, 3 in 4, kladospolid B, izo-kladospolid B, Sumikijeva	1: makrolidi; 4,5: 5-hidroksimetil-2-furanokarboksiln a kislina	41 dni, 25°C, 15 g/l kvasnega ekstrakta + 24.4 g/l umetne mešanice morske	EtOAc	Pandangolidi so neaktivni proti G+ in G- bakterijam  Kislina: aktivne proti <i>B. subtilis</i> in <i>S. aureus</i> (v koncentracijah nekaj $\mu$ g/ml), neaktivne proti <i>E. coli</i> in <i>C. albicans</i>	Jadulco R, Proksch P, Wray V, Sudarsono, Berg A, Gräfe U (2001). New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus <i>Cladosporium herbarum</i> . J. Nat. Prod.

Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
		kislina in acetil-Sumikijeva kislina		sol		<i>coli</i> in <i>C. albicans</i>	64: 527-530.
<i>Cladosporium herbarum</i>	Dva seva iz morskih spužev <i>Aplysina aerophoba</i> in <i>Callyspongia aerizusa</i>	Herbarina A in B, Citroviridin A, Herbarična kislina	1: $\alpha$ – pironi, 3: Ftalide	35 dni, kvasni ekstrakt + umetna mešanica soli	EtOAc	Ni testirano vendar je bilo opaženo, da dva glivna seva producirata popolnoma drugačne sekundarne metabolite:  Seva iz <i>A. aerophoba</i> : večinoma pironski derivati  Seva iz <i>C. aerizusa</i> : večinoma makrociklični laktoni	Jadulco R, Brauers G, Edrada R, Ebel R, Wray V, Sudarsono, Proksch P (2002). New metabolites from sponge-derived fungi <i>Curvularia lunata</i> and <i>Cladosporium herbarum</i> . J. Nat. Prod. 65: 730-733.
<i>Cladosporium sp.</i>	Japonska rjava morska alga <i>Actinotrichia fragilis</i>	Sporiolida A in B	12 – členski makrolidi	28°C, 1 4 dni, SC gojišče (1 % škrob + 0.1 % kazein)	EtOAc	Citotoksičnost proti celicam L1210 mišjega limfoma (IC <sub>50</sub> 130 in 810 ng/ml za sporiolida A in B.  Sporiolid A: protiglivna aktivnost proti <i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>A. niger</i> in <i>N. crassa</i> ,  antibakterijska aktivnost proti <i>M. luteus</i> (nekaj desetink $\mu\text{g/ml}$ ).	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 <i>Cladosporium</i> species. Mar. Drugs 2: 164-169.

Gliva	Izvor glive	Ime snovi	Tip snovi	Pogoji za rast	Topilo za ekstrakcijo	Biološka aktivnost	Referenca
<i>Wallemia sebi</i>	Vzorec torte in džema	valeminol valeminon	<i>cis</i> – fuzioniran <i>izo</i> – kariopilen	2-10 tednov, 25°C,  2 % kvasni ekstrakt z 4 % 20 % saharoze	heksan	valeminol: pri 80 µg/ml povzroča smrt 41 % morskih kozic; pri 50 µg/ml smrt protozojev in 50 µg/ml je tudi MIC za citotoksičnost za jetrne in BHK celice podgan  Rast in produkcije toksinov sta bila večja pri 20 % sukroza-kvas mediju	Wood GM, Mann PJ, Lewis DF, Reid WJ, Moss, MO (1990). Studies on a toxic metabolite from the mould <i>Wallemia</i> . Food Additives and Contaminants 7: 69-77.
<i>Wallemia sebi</i>	Posušen krompir	UCA 1064-B in UCA 1064-A	azasteroidi	4 dni, 28°C,  6 % kvasni ekstrakt	propanol	UCA 1064-A in B: protiglivna aktivnost proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MIC = 50 in 390 ng/ml)  Protibakterijska aktivnost proti G+ bakterijam (40 µg/ml)  Antiproliferativna aktivnost proti HeLa S3 celicam (12.7 in 14.8 µM)	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 <i>Wallemia sebi</i> : production, isolation and structural determination. The Journal of Antibiotics 48: 1312-1313.