

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca HORVAT

VPLIV GLUKOZE IN TEMPERATURE NA PRODUKCIJO BIOLOŠKO  
AKTIVNIH SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH NEKATERIH  
HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV REDU DOTHIDEALES  
IN IZBRANIH KVASOVK

DIPLOMSKO DELO

INFLUENCE OF GLUCOSE AND TEMPERATURE ON PRODUCTION  
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN ORGANIC EXTRACTS  
OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI FROM ORDER  
DOTHIDEALES AND CHOSEN YEASTS

GRADUATION THESIS

univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, na Oddelku za biologijo, in sicer na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov in Katedri za biokemijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico imenovala prof. dr. Kristino Sepčić in somentorico prof. dr. Nino Gunde-Cimerman. Za recenzenta je študijska komisija imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Kristina Sepčić, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 17.03.2010

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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca HORVAT

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA****ŠD Dd****DK UDK 561.28(043.2)=163.6****KG** halofilne in halotolerantne glice / naravni produkti / ekstrakti / hemoliza / inhibicija acetilholinesteraze / protibakterijska aktivnost**AV** HORVAT, Mojca**SA** SEPČIĆ, Kristina/GUNDE-CIMERMAN, Nina**KZ** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.**LI** 2010**IN** VPLIV GLUKOZE IN TEMPERATURE NA PRODUKCIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV REDU DOTHIDEALES IN IZBRANIH KVASOVK**TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)**OP** XI, 79, 11 preglednic, 18 grafov, 42 vir.**IJ** sl**JI** sl/en

**AI** Glice zaradi številnih bioaktivnih snovi, ki jih vsebujejo, uporabljamo v medicini, industriji in prehrani. Ker so halofilne in halotolerantne glice šele pred kratkim odkrili, so slabo raziskane. V diplomski nalogi smo se osredotočili na ugotavljanje vpliva stresnih pogojev (povečane koncentracije glukoze in nizke temperature) na sintezo protibakterijskih, hemolitičnih in protiacetilholinesteraznih snovi 43 sevov različnih črnih kvasovk iz redu Dothideales. Uporabili smo metanolne in acetonske ekstrakte liofiliziranih vzorcev. Ugotovili smo, da nekateri sevi v stresnih pogojih sintetizirajo več hemolitično aktivnih učinkovin. Taki so bili sev EXF 517 vrste *Candida parapsilosis*, sevi vrste *Alternaria tenuissimum*, sev EXF 922 vrste *Aureobasidium sp.*, sev EXF 391 vrste *Cladosporium psychrotolerans*, sev EXF 225/MZKI B736 *Hortaea werneckii* ter sevi rodu *Fusarium*. Sev EXF 334 glice *Cladosporium spinulosum* pa je pri pogojih z znižano vodno aktivnostjo sintetiziral več protibakterijskih učinkovin.

**KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)****DN Dd****DC UDC 561.28(043.2)=163.6****CX** halophile and halotolerant fungi / natural products / extracts / hemolysis / acetylcholinesterase inhibition / antibacterial activity**AU** HORVAT, Mojca**AA** SEPČIČ, Kristina/GUNDE-CIMERMAN, Nina**PP** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111**PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology**PY** 2010**TI** INFLUENCE OF GLUCOSE AND TEMPERATURE ON PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN ORGANIC EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI FROM ORDER DOTHIDEALES AND CHOSEN YEASTS**DT** Graduation Thesis (University studies)**NO** XI, 79 p., 11 tab., 18 fig., 42 ref.**LA** sl**AL** sl/en

**AB** Fungi are interesting for men due to their ability to synthesize a number of bioactive substances that could be used in medicine, industry and in food production. Since halophilic and halotolerant fungi have been discovered only recently, they are poorly investigated. In this thesis, we assessed the impact of stressful conditions (increased glucose concentration and low temperature) on the secretion of antibacterial, hemolytic, and acetylcholinesterase-inhibitory activities for 43 different strains of black yeasts from the order Dothideales. We used acetone and methanole extracts from lyophilised samples. We found that in conditions with low water activity some strains secrete more bioactive substances. Such strains were *Candida parapsilosis* strain EXF 517, strains of *Alternaria tenuissimum*, strain EXF 922 of *Aureobasidium sp.*, strain EXF 391 of *Cladosporium psychrotolerans*, strain EXF 334 of *Cladosporium spinulosum* strain EXF 225/MZKI B736 of *Hortaea werneckii* and strains of the genus *Fusarium*.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO GRAFOV .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Splošne in morfološke značilnosti gliv .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 ČRNE KVASOVKE .....	2
<b>2.2 Kserofilne in halofilne glive .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Dosedanje objave o izbranih črnih kvasovkah .....</b>	<b>4</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Priprava gojišč .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Gojenje gliv .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Ekstrakcija .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Določanje koncentracije suhe snovi v ekstraktih.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Testi za določanje bioloških aktivnosti .....</b>	<b>13</b>
3.5.1 HEMOLITIČNI TEST .....	13
3.5.2 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI .....	14
3.5.3 TEST INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE.....	15
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1 Koncentracija suhe snovi v ekstraktih .....</b>	<b>16</b>
<b>4.2 Rezultati hemolitičnega testa .....</b>	<b>18</b>
4.2.1 REZULTATI HEMOLITIČNEGA TESTA ACETONSKIH EKSTRAKTOV	18

4.2.1 REZULTATI HEMOLIZIČNEGA TESTA METANOLNIH EKSTRAKTOV	26
<b>4.3 Rezultati testa protibakterijske aktivnosti</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Rezultati testa inhibicije acetilholinesteraze</b>	<b>66</b>
 <b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	 67
<b>5.1 Razprava</b>	<b>67</b>
5.1.1 HEMOLITIČNA AKTIVNOST	67
5.1.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	71
<b>5.2 Sklepi</b>	<b>72</b>
 <b>6 POVZETEK</b>	 73
 <b>7 VIRI</b>	 75

**ZAHVALA**

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Deleži hemolitične aktivnosti vseh acetonskih ekstraktov glede na pogoje rasti gliv.	21
Graf 2: Hemolitična aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi	23
Graf 3: Hemolitična aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi	25
Graf 4: Deleži hemolitične aktivnosti vseh metanolnih ekstraktov glede na pogoje rasti gliv.	29
Graf 5: Hemolitična aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi	31
Graf 6: Hemolitična aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi	33
Graf 7: Deleži acetonskih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti <i>B.subtilis</i> glede na pogoje rasti gliv.	37
Graf 8: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>B. subtilis</i> .	39
Graf 9: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>B. subtilis</i> .	41
Graf 10: Deleži metanolnih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti <i>B.subtilis</i> glede na pogoje rasti gliv.	45
Graf 11: Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>B. subtilis</i> .	47
Graf 12: : Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>B. subtilis</i> .	49
Graf 13: Deleži acetonskih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti <i>E.coli</i> glede na pogoje rasti gliv.	53
Graf 14: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>E.coli</i> .	55
Graf 15: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>E.coli</i> .	57
Graf 16: : Deleži metanolnih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti <i>E.coli</i> glede na pogoje rasti gliv.	61
Graf 17: Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>E.coli</i> .	63
Graf 18: Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti <i>E.coli</i> .	65

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Podatki iz literature o odkritih naravnih učinkovinah izoliranih iz izbranih rodov morskih gliv .....	4
Preglednica 2: Recept za pripravo gojišča.....	8
Preglednica 3: Seznam halofilnih in halotolerantnih gliv iz Sečoveljskih solin in Arktike..	9
Preglednica 4: Pogoji gojenja za posamezne seve gliv .....	11
Preglednica 5: Koncentracije suhe snovi v organskih ekstraktih gliv .....	17
Preglednica 6: Rezultati hemolitičnega testa acetonskih ekstraktov .....	18
Preglednica 7: Rezultati hemolitičnega testa metanolnih ekstraktov .....	26
Preglednica 8: Premeri inhibicijskih con acetonskih ekstraktov na ploščah z bakterijo <i>B. subtilis</i> .....	34
Preglednica 9: Premeri inhibicijskih con metanolnih ekstraktov na ploščah z bakterijo <i>B. subtilis</i> .....	42
Preglednica 10: Premeri inhibicijskih con acetonskih ekstraktov na ploščah z bakterijo <i>E. coli</i> .....	50
Preglednica 11: Premeri inhibicijskih con metanolnih ekstraktov na ploščah z bakterijo <i>E. coli</i> .....	58

## SLOVARČEK

**Estuar:** je delno zaprto vodno telo ob obali, v katerega se zliva ena ali več rek.

**Halofil:** organizem, ki bolje raste v okoljih z visoko koncentracijo soli, kot slana jezera in soline.

**Halotolerant:** organizem, ki lahko živi v slanih okoljih, vendar za preživetje ne potrebuje soli.

**Kserofil:** organizem prilagojen na omejen dostop proste vode v okolju, zmožen preživeti sušo.

**Psihrotolerant:** organizem, ki lahko živi pri nizkih temperaturah.

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

A	vzorec ekstrahiran z acetonom
AChE	acetilholinesteraza
$a_w$	aktivnost vode
BHK celice	celice ledvic mladih hrčkov
C	koncentracija
CV	koncentracija suhe snovi v poskusu
G	ekstrakti vzorcev, ki so rasli pri visoki koncentraciji glukoze
$G^+$	po Gramu pozitivna
$G^-$	po Gramu negativna
Glc	glukoza
H	hemoliza
HeLa S3 celice	celična linija človeškega epitelnega karcinoma
IA	inhibicija acetilholinesteraze
K	ekstrakti vzorcev, ki so rasli pri kontrolnih pogojih
NaCl	natrijev klorid
M	vzorec ekstrahiran z metanolom
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija ( <i>ang. minimal inhibitory concentration</i> )
NT	ekstrakti vzorcev, ki so rasli pri nizki temperaturi
PIC	premer inhibicijske cone
S	ekstrakti vzorcev, ki so rasli pri pogojih povečane slanosti

SS koncentracija suhe snovi

T temperatura

$t_{50}$  polovični čas hemolize

YNB kvasna dušikova osnova (yeast nitrogen base)

## 1 UVOD

Glive so izjemno bogat vir različnih spojin, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov (citotoksična, protibakterijska, protivirusna in imunomodulatorna aktivnost, inhibicija različnih encimov, hemaglutinacija ...). Nekatere teh snovi lahko najdejo tudi potencialno uporabnost v različnih medicinskih in industrijskih panogah.

Dolgo je veljalo mnenje, da v ekstremno slanih okoljih, najdemo le alge, praživali, arheje in bakterije, ne pa tudi glive (Brock, 1979). Leta 1975 je bil prvič predstavljen pojem halofilnih gliv za nekaj kserofilnih vrst, ki kontaminirajo hrano z visoko vsebnostjo NaCl (Pitt & Hocking, 1985). Kasneje so glive opisali tudi v naravnih srednjih slanih okoljih, kot so slana močvirja, slana tla in morska voda, velika vrstna pestrost pa je bila opisana tudi v ekstremno slanih okoljih (Gunde-Cimerman s sod., 1997). Prav te na novo odkrite halofilne in halotolerantne glive so nov, še neraziskan vir biološko aktivnih snovi.

Cilj naše diplomske naloge je bil testirati vpliv stresnih pogojev (povišane koncentracije glukoze v gojišču ter vpliv nizke temperature), na produkcijo biološko aktivnih snovi v organskih ekstraktih izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk. Testirali smo hemolitično aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost na izbranih po Gramu pozitivnih ( $G^+$ ) in po Gramu negativnih ( $G^-$ ) bakterijah.

Pridobljene rezultate smo primerjali z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih snovi izbranih gliv. Glede na to, da halofilne in halotolerantne glive predstavljajo še dokaj neraziskan vir strukturno novih in biološko aktivnih spojin smo predvidevali, da bomo v pripravljenih organskih ekstraktih našli potencialno zanimive in še neopisane učinkovine.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 Splošne in morfološke značilnosti gliv

Glive so poleg protistov, živali in rastlin domena nadkraljestva Eukarya. Glice delimo na naslednja debla: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota in Basidiomycota (Hibbett s sod., 2007).

Za glive je značilno, da nimajo plastidov. Med barvili ni klorofilov ali flavonoidov, pojavljajo pa se najrazličnejša druga. Kot hrana se pojavljajo glikogen in olja, nikoli škrob. Celična stena gliv je iz hitina (polimer N-acetylglukozamina), polisaharidov (manan in glukan) in beljakovin. Celice nimajo zoospor. Razmnoževanje je zelo raznovrstno: vegetativno z brstenjem in razraščanjem, nespolno s tvorbo konidijev ali spolno s somatogamijo (hifogamija), gametangiogamijo in gametogamijo. Glice so heterotrofi. So paraziti, saprofici ali simbionti. Najdemo jih predvsem na kopnem ter v sladkih in slanih vodah. Najdemo jih tudi v okoljih, kjer bakterije ne uspevajo (npr. kislo okolje). Glice so pomembni razkrojevalci. So skoraj edini razkrojevalci lesa, pomembne so mikorizne vrste (simbioza z višjimi rastlinami). Industrijsko so pomembne predvsem plesni, ki tvorijo 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).

#### 2.1.1 ČRNE KVASOVKE

Kvasovke niso enotna taksonomska skupina, temveč jih najdemo med debli Ascomycota in Basidiomycota. Do danes je bilo opisanih okoli 1500 vrst (Kurtzman, 2006), mnoge imajo morske predstavnike (Bass, 2007).

Večinoma se razmnožujejo nespolno z brstenjem, nekaj se jih razmnožuje tudi s cepitvijo. So enocelični organizmi, nekateri lahko z združevanjem brstov tvorijo psevdohife (Kurtzman, 2005).

Najopaznejša skupina gliv, izoliranih iz vode evtrofnih solin, so polimorfne črne kvasovke. Te glive vsaj del svojega življenjskega cikla preživijo v kvasni oz. brsteči obliki (Zalar, 1999). Značilnosti črnih kvasovk so debela, melanizirana celična stena, počasna, pogosto meristematska rast ter razmnoževanje z endokonidiji (Zalar, 2006).

Večina črnih gliv spada v skupino Ascomycota, izjema sta dva roduv, *Moniliella* in *Trichosporonoides*, ki spadajo v skupino Basidiomycota. Askomicetne črne glive spadajo v dva redova, v red Dothideales in red Chaetothyriales. Medtem ko so nekateri pripadniki redu Chaetothyriales človeške patogene glive, je večina vrst iz redu Dothideales nepatogenih, z nekaj oportunistično patogenih vrst (Zalar, 1999).

## 2.2 Kserofilne in halofilne glive

Nekatera ekstremna okolja lahko naseljujejo le mikroorganizmi. To velja tudi za naravne soline in tiste, ki jih je naredil človek. Glavna značilnost slanih bazenov je evaporacija vode, katere slanost niha od 3 % pa do 35 % NaCl. Značilni so tudi nizka koncentracija kisika, visoka intenziteta svetlobe, nizka dostopnost hranil in nevtralen pH (Brock, 1979).

Dolgo je veljalo mnenje, da v ekstremno slanih okoljih najdemo le alge, praživali, arheje in bakterije, ne pa tudi glive (Brock, 1979). Leta 1975 je bil prvič predstavljen pojem halofilnih gliv za nekaj kserofilnih vrst, ki kontaminirajo hrano z visoko vsebnostjo NaCl (Pitt & Hocking, 1985). Kasneje so glive opisali tudi v naravnih srednjih slanih okoljih, kot so slana močvirja, slana tla in morska voda, velika diverziteta pa je bila opisana tudi v ekstremno slanih okoljih (Gunde-Cimerman s sod., 1997).

Kserofilne in kserotolerantne glive kontaminirajo hrano z nizko vodno aktivnostjo ( $a_w$ ). Kvasovke kontaminirajo tekoče produkte, kot sta sirup in med. Kserotolerantne kvasovke, ki kontaminirajo hrano, se uvrščajo v roduv *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotor* in *Zygosaccharomyces* (Samson, 2000).

Nekatere kvasovke lahko tolerirajo visoke koncentracije sladkorja in lahko ratsejo pri  $a_w$  nižji od 0,62, medtem ko druge tolerirajo visoke koncentracije soli (NaCl višji od 15 %).

Osmotolerantne kvasovke lahko najdemo v slanih okoljih, kot so slana prst, voda in sedimenti v estuarijih, slana močvirja in globokomorska okolja (Butinar, 2005).

### 2.3 Dosedanje objave o izbranih črnih kvasovkah

Iz literature zbrani podatki o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v ekstraktih gliv, ki so bile vključene v naše raziskovalno delo, so predstavljeni v preglednici 1. Prazno polje v tabeli pomeni, da informacija v viru ni bila navedena.

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

IME MIKROORGANIZMA	VRSTA MOLEKULE	UČINKOVINA	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Alternaria sp.</i>	alternariol (AOH) alternariol monometil eter (AME) tenuazonična kislina altenuen (ALT)		citotoksična in mutagena	Müller M., Zentralbl Mikrobiol. 1992;147(3–4):207–213
<i>Aureobasidium pullulans</i>	diketopiperazin in orcinotriol			Shigemori, H. in sod., J. Nat Prod., 1998, 61, 696 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2000, 17, 7–55)
<i>Aureobasidium sp.</i>	aureobasidin	ester	obe spojini imata protibakterijsko aktivnost na <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	Abdel-Lateff, A., Elkhayat, E.S., Fouad, M.A. in Okino, T. Nat Prod Commun, 2009 4(3). pp389–94
	4,6-dihidroksi-decenoična kislina in (5R,3Z)-5-hidroksidec-3-enoična kislina			
<i>Fusarium sp.</i>	neofusapiron	piron	zmerna antimikotična aktivnost proti glivi <i>Aspergillus clavatus</i> .	Evidente, A. in sod., Nat. Toxins, 1994, 2, 4. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2008, 25, 35–94)
<i>Fusarium sp.</i>	Fusapiron	piron	zmerna antimikotična aktivnost proti glivi <i>Aspergillus clavatus</i> .	Evidente, A. in sod., Nat. Toxins, 1994, 2, 4. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2008, 25, 35–94)
<i>Fusarium sp.</i>	deoksiusapiron	piron	zmerna antimikotična aktivnost proti glivi <i>Aspergillus clavatus</i> .	Evidente, A. in sod., Nat. Toxins, 1994, 2, 4. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2008, 25, 35–94)

<i>Fusarium sp.</i>	fusarielin E	polioksigeniran derivat dekalina	antimikotična aktivnost proti glivi <i>Pyricularia oryzae</i>	Gai, Y. in sod., Chin. Chem. Lett., 2007, 18, 954. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2009, 26, 170–244)
<i>Fusarium sp.</i>	JM47	ciklični tetrapeptid	citotoksična	Jiang, Z. in sod., Phytochemistry, 2002, 60, 33. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1–49)
<i>Fusarium sp.</i>	karotenoid glikozilni ester	ester		Sakaki, H. in sod. J. Nat. Prod., 2002, 65, 1683. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1–49)
<i>Fusarium sp.</i>	neomanginol A-C	sesterpenoid	citotoksična	Renner, M. K. in sod., J.Org.Kem., 1998, 63. 8346 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2000, 17, 7–55)
<i>Fusarium sp.</i>	sansalvamid	ciklični pentadepsipeptid	zavira virusno (MCV) topoizomerazo, citotoksična	Belofsky, G.N. in sod., Tetrahedron lett., 1999, 40, 2913 in Hwang, Y. in sod., Mol. Pharmacol., 1999, 55, 1049 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2001, 18, 1–49)
<i>Fusarium sp.</i>	N-metilsansalvamid	ciklični pentadepsipeptid		Cueto, M. in sod., Phytochemistry, 2000, 55, 223 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2002 19, 1–48)
<i>Fusarium sp.</i>	mangikol A-G	sesterterpenski poliol	citotoksična	Renner, M.K. in sod., J. Org. Chem., 2000, 65, 4843 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2002 19, 1–48)
<i>Fusarium clamydosporum</i>	fusaperazin A in B	žveplo vsebujoč derivat diksopiperazina	citotoksična	Chu, M. in sod., Tetrahedron Lett., 1993, 34, 7537. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1–49)

<i>Cladosporium sp.</i>	pandangolid 1a	heksaketid		Smith, J.C. in sod., J. Nat. Prod., 2000, 63, 142. (v Blunt, J.W. in sod, Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 31–86)
<i>Cladosporium sp</i>	pandangalid 1	heksaketid		Smith, J.C. in sod., J. Nat. Prod., 2000, 63, 142. (v Blunt, J.W. in sod, Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 31–86)
<i>Cladosporium sp</i>	izo-kladospolid B			Smith, J.C. in sod., J. Nat. Prod., 2000, 63, 142. (v Blunt, J.W. in sod, Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 31–86)
<i>Cladosporium sp</i>	sporiolid A, sporiolid B	citotoksični makrolid	sporiolid A zmerno zavira rast večih gliv, oba sta aktivna proti G <sup>+</sup> bakteriji <i>Micrococcus luteus</i>	Shigemori, H. in sod., Mar. Drugs, 2004, 2, 164. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2006, 23, 26–78)
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	peroksiergosterol	sterol	antioksidant, zavira nastanek tumorjev	San Martín, A. in sod., An. Asoc. Quím. Argent., 2005, 93, pp 46.
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	kladosporin, monoacetyl kladosporin	3, 4-dihidro-6, 8-dihidroksi-3-(tetrahidro-6-metil-2H-pira -2- il) metilisocoumarin	inhibirata rast gliv	Scott, P.M. in sod.. The Journal of Antibiotics, 1971, 24 (11), pp 747–755.
<i>Cladosporium herbarum</i>	herbarin A in B	α-piron	citotoksična za solinske rakce ( <i>Artemia salina</i> )	Jadulco, R. in sod. J. Nat. Prod., 2002, 65, 730., (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1–49)
<i>Cladosporium herbarum</i>	12-členski makrolid pandangolid 3	makrolid		Jadulco, R. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 527. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1–48)
<i>Cladosporium herbarum</i>	dimerni makrolid pandangolid	makrolid		Jadulco, R. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 527. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1–48)

<i>Cladosporium herbarum</i>	derivat acetila: 5-hidroksimetilfuran-2-karboksilna kislina		inhibira rast G <sup>+</sup> bakterij <i>Bacillus subtilis</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	Jadulco, R. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 527. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1–48)
<i>Hortaea werneckii</i>	hortein	spojina z acenaftol (1', 2': 7,8) naftalenskim obročem		Brauers, G. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 651. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1–48)
<i>Wallemia sebi</i>	valeminol in valeminon	<i>cis</i> -zlit iso-kariofilen	valeminol: pri 80 µg/ml povzroča 41 % smrtnost solinskih rakcev, pri 50 µg/ml povzroča smrt protozojev ( <i>Tetrahymena pyriformis</i> ), in je pri 50 µg/ml MIC citotoksičen za jetrne celice in celice BHK  rast in produkcija toksina je bila večja pri ekstraktu iz gline, ki je rasla na mediju z 20 % saharozo.	Wood GM, Mann PJ, Lewis DF, Reid WJ, Moss, MO (1990). Food Additives and Contaminants 7: 69–77.
<i>Wallemia sebi</i>	UCA 1064-B in UCA 1064-A	azasteroid	UCA 1064-A and B: zavirata rast glive <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MIC = 50 in 390 ng/ml) protibakterijska aktivnost na G+ bakterije (40 µg /ml), ne pa tudi na G- bakterije. Antiproliferenten na celice HeLa S3 (12.7 in 14.8 µM)	Takahashi I, Maruta R, Ando K, Yoshida M, Iwasaki T, Kanazawa J, Okabe M, Tamaoki T (1993). The Journal of Antibiotics 48: 1312–1313.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 Priprava gojišč

**Preglednica 2: Recept za pripravo gojišča.** Glc glukoza.

	YNB z 2 % Glc (1l gojišča)	YNB z 40 % Glc (1l gojišča)	YNB z 10 % NaCl (1l gojišča)
YNB (g)	1,7	1,7	1,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ (g)	5	5	5
Glc (g)	20	400	20
NaCl (g)	-	-	100
Agar (g)	13	13	13

V čaši z volumnom 1500 ml smo pripravili 1000 ml vodne raztopine. Zatehtali smo ustrezno količino gojišča YNB,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$  in glukoze. Dodali smo destilirano vodo do 1 l. Raztopino smo z magnetnim mešalom mešali, dokler se sestavine niso raztopile. S pomočjo pH metra smo izmerili pH raztopine. Ob mešanju smo dodali toliko 2 M NaOH, da je bil končni pH 7,0. Raztopino smo prelili v 2 l erlenmajerico, ji dodali agar in premešali na magnetnem mešalu.

Za pripravo poševnih gojišč smo uporabili steklene epruvete z zamaški iz vase. Pripravljeno gojišče smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je agar stopil. V epruvete smo s pipeto odpipetirali 7,3 ml gojišča, jih zaprli z zamaški in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo epruvete postavili na poševno stojalo. Po 24 urah smo poševna gojišča do nadaljnje uporabe shranili pri 5 °C.

Za pripravo plošč smo erlenmajerico z gojiščem zaprli z aluminijasto folijo in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo gojišče dali v toplo kopel (45 °C), da se je nekoliko ohladilo. Gojišče smo premešali, nato pa smo ga v laminariju razlili v označene sterilne petrijevke. Petrijevke z gojišči smo čez noč pustili na sobni temperaturi, nato pa smo jih shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

### 3.2 Gojenje gliv

**Preglednica 3: Seznam halofilnih in halotolerantnih gliv iz Sečoveljskih solin in Arktike.** ? identifikacija ni gotova.

Št.	Vrsta	Sev	Oznaka	Mesto izolacije
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2329	AltS	Soline
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2318	AltS	Soline
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF-2338	AltS	Soline
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF-2332	AliS	Soline
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF-2340	AlaS	Soline
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	ApS	Soline
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	AspA	Arktika
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EX-F 3233 (275-1-1)	ApG	Japonsko morje, globina 4000 m
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	CcS	Soline
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246	CcA	Arktika
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	CsS	Soline
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	AR 297	CsA	Arktika
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	CdS	Soline
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	CvS	Soline
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	ChS	Soline
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	CsaS	Soline
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	CIS	Nohti
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	CpS	Soline
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	CfS	Soline
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	CsS	Soline
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 /MZKI B736	HwS	Soline
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	EXF-206	PtS	Soline
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/MZKI B734	TsS	Soline
24.	<i>Fusarium</i> sp.1	EXF 2254	F1S	Soline
25.	<i>Fusarium</i> sp.2	EXF 2276	F2S	Soline
26.	<i>Fusarium</i> sp.3	EXF 2275	F3S	Soline
27.	<i>Fusarium</i> sp.4	EXF 2277	F4S	Soline
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	WiS	Soline
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Wm	Soline
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Ws	Sončnočno seme
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	CaA	Arktika
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	ClA	Arktika
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	FfA	Arktika
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	PgS	Soline
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	PgA	Arktika
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	RbS	Soline
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	RdA	Arktika
38.	<i>Rhotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630	RmA	Arktika
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 1444	TmS	Soline
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366	TmA	Arktika
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 1574	CpA	Arktika
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 517	CpS	Soline
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	ScK	Kontrola

Vsi v poskusu uporabljeni sevi so shranjeni v zbirki Ex na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete (oznaki EXF in AR) ali v Mikrobiološki zbirki Kemijskega inštituta (oznaka MZKI).

Glive smo iz zbirke prenesli na poševnike. Delo je potekalo v laminariju. Poševnik iz zbirke smo odprli in vrh epruvete obžgali nad plamenom. S cepilno zanko za enkratno uporabo smo previdno postrgali glivno kulturo. Vrh epruvete smo spet obžgali in jo zaprli. Na sterilnimi poševnik smo razmazali glivno kulturo. Za posamezen sev smo uporabili po tri poševnike vsakega gojišča.

Poševnike z nacepljenimi glivami smo inkubirali pri sobni temperaturi. Po dveh tednih inkubacije smo glivne kulture prenesli iz poševnikov na plošče. Pripravili smo fiziološke raztopine: za gojišča z 2 % Glc smo v 100 ml destilirane vode raztopili 0,9 g NaCl, za gojišča z 40 % (30 %, 55 %) Glc pa smo v 100 ml vode raztopili 40 g (30 g, 55 g) Glc.

Poševnik smo odprli in vrh epruvete obžgali nad ognjem, nato pa smo dodali 1 ml raztopine z ustrezno koncentracijo Glc. S sterilno cepilno zanko za enkratno uporabo smo postrgali glive s površine gojišča. Epruveto smo obžgali nad plamenom, zaprli ter premešali na rotacijskem stresalniku. Pripravili smo 7 plošč z ustreznim gojiščem. Epruveto smo odprli in obžgali vrh nad plamenom, nato pa smo s pipeto prenesli po 100 ml tekočine na plošče z gojišči. S stekleno palčko smo raztopino razmazali po ploščah. Plošče z gojiščem YNB z 40 % Glc smo inkubirali pri 30 °C, plošče z gojišči YNB z 2 % Glc pa smo inkubirali pri 4 °C. Plošče z glivami smo inkubirali toliko časa, da smo dobili zadostno količino glivne kulture.

Pri nekaterih sevih gliv smo koncentracijo sladkorja v gojiščih in inkubacijsko temperaturo prilagodili njihovim rastnim potrebam (preglednica 4).

**Preglednica 4: Pogoji gojenja za posamezne seve gliv.** \*gliva ni rasla pri nižjih koncentracijah sladkorja; ? identifikacija ni gotova.

		nizka temperatura		visoka koncentracija Glc	
		T(°C)	c(Glc) (g/l)	T(°C)	c(Glc) (g/l)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	4	2	30	40
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	4	2	30	40
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	4	2	30	40
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	10	2	30	30
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	4	2	30	40
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	2	30	40
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	4	2	30	40
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	4	2	30	40
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10	2	30	40
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	4	2	30	40
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	10	2	30	40
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	10	2	30	40
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	10	2	30	40
14.	<i>Cladosporium velox</i>	4	2	30	40
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	10	2	30	40
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	10	2	30	40
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	10	2	30	40
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	4	2	30	40
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	4	2	30	40
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	10	2	30	40
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	10	2	30	40
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	4	2	30	40
23.	<i>Trimmastroma salinum</i>	10	2	30	40
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	4	2	30	40
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	10	2	30	40
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	10	2	30	40
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	4	2	30	30
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	10	55*	30	55*
29.	<i>Wallemia muriae</i>	10	40*	30	40
30.	<i>Wallemia sebi</i>	sobna	2	30	40
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	4	2	30	40
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	4	2	30	40
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	4	2	30	30
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	4	2	30	40
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	4	2	30	40
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	4	2	30	40
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	4	2	30	40
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	2	30	40
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	10	2	30	30
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	10	2	30	40
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	10	2	30	40
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	10	2	30	40
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	2	30	40

Po inkubaciji smo glivno kulturo postrgali z gojišča. Delo je potekalo v laminariju. Uporabili smo po dve mikrocenrifugirki z volumnom 2 ml za vsak sev glive in ju označili z alkoholnim flomastrom. Spatulo smo obžgali nad plamenom, nato pa smo s plošč postrgali glivno kulturo in jo enakomerno porazdelili v mikrocentrifugirki. Mikrocentrifugirke smo zaprli in zamrznili v tekočem dušiku. Shranili smo jih pri  $-80^{\circ}\text{C}$  do nadaljnje uporabe.

Za kontrolne vzorce smo uporabili podatke kolegic Miše Cajnko in Sandre Žulič. Kontrolne glice so rasle na gojiščih YNB z 2 % Glc pri temperaturi  $30^{\circ}\text{C}$ . Postopki gojenja, ekstrakcije, določanja suhe mase ter testi biološke aktivnosti so bili enaki kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Poleg kontrol so v preglednicah v poglavju Rezultati prikazani še rezultati kolegice Miše Canjko (stolpci označeni s sivo barvo), ki je glica gojila na gojiščih z 10 % NaCl pri  $30^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 Ekstrakcija

Mikrocentrifugirke z zamrznjenimi glivnimi kulturami smo postavili v stojalo in odprli pokrovčke. Stojalo z odprtimi mikrocentrifugirkami smo postavili v liofilizator in jih čez noč posušili do suhega.

Po liofilizaciji smo dodali ustrezno topilo do 2 mm pod rob mikrocentrifugirke. Delo je potekalo v digestoriju. V eno mikrocenrifugirko z isto glivno kulturo smo dodali aceton, v drugo pa metanol. Aceton in metanol sta organski topili z različno polarnostjo. Dielektrična konstanta metanola je 33.6, acetona pa 20.7.

Mikrocentrifugirke smo označili z etiketami, na katere smo s svinčnikom napisali številko seva, temperaturo pri kateri smo sev gojili in vrsto topila. Etikete smo prelepili s selotejpom. Pokrovčke zaprtih mikrocentrifugirk smo oblepili s parafilmom, da topilo ni izhlapelo. Tako pripravljene mikrocentrifugirke smo čez noč dali na stresalnik pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Stresali smo jih minimalno 12 ur.

Po stresanju smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 min pri 13000 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant s pipeto prenesli v čiste označene mikrocentrifugirke. Odprte mikrocentrifugirke smo pustili v digestoriju, dokler topilo ni izhlapelo do suhega.

Ko je topilo izhlapelo smo v vse mikrocentrifugirke dodali 0.5 ml etanola. Mikrocentrifugirke smo zaprli in pokrovčke oblepili s parafilmom. Do nadaljnje uporabe smo jih shranili pri 4 °C.

### **3.4 Določanje koncentracije suhe snovi v ekstraktih**

Pripravili smo si posodice premera 1,5 cm iz aluminijaste folije. Posodice smo označili in stehtali. V stehtane posodice smo odpipetirali 100 µl ekstrakta in jih posušili v sušilniku pri 100 °C. Nato smo posodice ponovno stehtali in izračunali neto vrednost suhe snovi v vzorcu. Za določanje koncentracije (mg/ml) smo dobljeno vrednost pomnožili z 10.

### **3.5 Testi za določanje bioloških aktivnosti**

#### **3.5.1 HEMOLITIČNI TEST**

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi. Pri odvzemu smo ji dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino. Do nadaljne uporabe smo jih shranili v Alseverjevem konzervansu v hladilniku. Tako pripravljeni eritrocite lahko uporabljam do dokler ne pride do hemolize, to je dokler se supernatant ne obarva rdeče.

Pred uporabo smo konzervirane eritrocite dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0.13 M NaCl in 0.02 M TRIS.HCl), pH 7.4. Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je imela pri 650 nm navidezno absorpcijo  $1.0 \pm 0.01$ .

Hemolitično aktivnost smo spremljali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Mikrotitrne plošče so imele 12x8 vdolbinic, kar nam je omogočilo spremeljanje hemolitične aktivnosti 96 vzorcev naenkrat.

Na mikrotitrni plošči smo z multikanalno pipeto napolnili vdolbinice s 100 µl eritrocitnega pufra in z navadno pipeto dodali še po 20 µl ekstrakta glivne kulture. Nato smo tik pred začetkom meritve v vsako vdolbinico z multikanalno pipeto dodali 100 µl suspenzije eritrocitov.

Hemolizo smo opazovali kot padec absorpcije pri 650 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100 µl eritrocitnega pufra, 20 µl etanola in 100 µl eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25 °C. Odčitali smo polovični čas hemolize ( $t_{50}$ ) oz. čas, pri katerem je navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov padla na polovico svoje začetne vrednosti.

Kjer vzorci niso bili močno hemolitično aktivni, jih nismo redčili.

### 3.5.2 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Protibakterijsko aktivnost vzorcev glij smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testna mikroorganizma smo uporabili po Gramu negativen sev *Escherichia coli* in po Gramu pozitiven sev *Bacillus subtilis*. Oba seva sta shranjena v zbirki EXF Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Omenjeni bakteriji smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerici, ki sta vsebovali po 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča LB (Luria-Bertani broth). Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2,5 g gojišča LB (Sigma, ZDA) in raztopino razdelili v erlenmajerici. Erlenmajerici z nacepljenim gojiščem smo preko noči stresali pri 250 obratov/minuto pri 37 °C. Naslednji dan smo določili število bakterij, tako da smo 1 ml gojišča sterilno prenesli v plastično kiveto in na dvožarkovnem spektrofotometru (Shimadzu, Japonska) izmerili optično gostoto pri 600 nm. Kot slepi poskus smo uporabili sterilno tekoče gojišče LB. Število bakterij smo določili iz optične gostote raztopine s pomočjo standardiziranih umeritvenih krivulj za ustrezna bakterijska seva.

Plošče z agarjem smo pripravili z raztplavljanjem in mešanjem 25 g gojišča LB in 15 g agarja (Merck, Nemčija) v 1 l deionizirane vode. Tako pripravljeno gojišče smo nalili v 2 l erlenmajerice in jih pokrili z aluminijasto folijo ter avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo vroče gojišče pustili, da se je ohladilo na primerno temperaturo (~42 °C).

Med ohlajanjem smo izračunali volumen tekoče bakterijske kulture za pripravo bakterijske kulture z končno koncentracijo  $5 \times 10^5$  bakterij na 1 l gojišča. Preračunane volumne smo sterilno prenesli v ohlajeno gojišče ter dobro premešali. Po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo smo razlili v Petrijeve plošče. Le te smo do uporabe hranili pri 4 °C.

Pred uporabo smo s pomočjo steriliziranega plutovrta v vsako ploščo zvrtali 10 vdolbin premera 1 cm. Na spodnjo stran petrijevke smo označili, kateri vzorec je v posamezni vdolbini. V vsako od njih smo za test dodali po 100 µl posameznega vzorca. Kot kontrolo smo testirali 100 µl etanola. Po 12-urni inkubaciji pri 37 °C smo odčitali širino inhibicijske cone, ki je bila vidna kot prozoren kolobar okoli vdolbine.

### 3.5.3 TEST INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE

Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki v sinaptičnih špranjah hidrolizira nevrotransmitem acetilholin in s tem prepreči njegovo konstantno vezavo na receptorje postsinaptične membrane. Inhibicija AChE povzroči neprestano proženje postsinaptičnih potencialov, zato lahko spojine, ki jo inhibirajo uvrščamo med nevrotoksine.

Aktivnost acetilholinesteraze in njeni inhibiciji s testnimi vzorci smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč. Kot encim smo uporabili AChE iz električne jegulje, ki smo ga raztopili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 7.3 v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml. Pred testom smo ga stokrat redčili v fosfatnem pufru. Mikrotitrno ploščo smo napolnili s 150 µl mešanice Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in natrijevega hidrogen karbonata (37.5 mg) v 25 mM fosfatnem pufru, pH 7.0) in substrata (acetiltioholin jodid s končno koncentracijo 1 mM).

Potem smo v posamezne vdolbinice dodali 20 µl vsakega testnega vzorca. Tik pred začetkom meritve smo dodali še 50 µl encima AChE. Kontrola je namesto vzorca vsebovala 20 µl etanola. Vse meritve smo izvajali 12 min pri 412 nm in 25 °C.

Ker vzorci niso inhibirali AChE, jih nismo dodatno redčili.

## 4 REZULTATI

Rezultati testov so predstavljeni v preglednicah in grafih. V preglednicah smo zaradi večje preglednosti uporabili barvno označevanje glede na okolje, iz katerega je bil sev izoliran. Z modro smo označili seve izolirane iz solin, z zeleno seve izolirane iz Arktike ter z rožnato seve izolirane iz drugih okolij.

Rezultati ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih s soljo, so povzeti po diplomi Miše Canjko, zato jih nismo prikazali v grafih.

### 4.1 Koncentracija suhe snovi v ekstraktih

Koncentracije suhe snovi v posameznih ekstraktih testiranih gliv so prikazane v preglednici 5. Metanolni ekstrakti gliv so imeli nekajkrat višjo koncentracijo suhe snovi kot acetonski ekstrakti. To zlasti velja za metanolne ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze. Opazili smo, da je, potem ko je metanol izhlapel, na dnu mikrocentrifugirk ostala oljnata usedlina.

**Preglednica 5: Koncentracije suhe snovi v organskih ekstraktih gliv.** Prva črka v tabeli je oznaka za topilo (A-aceton, M-metanol), druga črka je oznaka za pogoje pri katerih je bila gliva gojena (K-kontrolni pogoji, S-rast na gojišču s soljo, NT-rast pri nizki temperaturi, G-rast na gojišču z visoko koncentracijo Glc). Z modro so označeni sevi izolirane iz solin, z zeleno sevi izolirane iz Arktike ter z rdečo sevi izolirane iz drugih okolij. V sivih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojišču s soljo, kolegice Miše Canjko. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova.

Št.	Vrsta	Sev	A-K (mg/ml)	M-K (mg/ml)	A-S (mg/ml)	M-S (mg/ml)	A-NT (mg/ml)	M-NT (mg/ml)	A-G (mg/ml)	M-G (mg/ml)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2329	1,7	11,8	29,8	1,7	0,3	8,7	2,5	26,5
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2318	2,3	7,6	1,8	25,9	0,7	10,4	6,4	7,6
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF – 2338	0,3	3,9	2,8	4,5	0,9	7,1	2,4	28,3
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF – 2332*	/	/	/	/	0,1	8,7	3,0	17,8
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF – 2340	2,0	12,3	3,5	28,1	8,7	5,5	1,9	23,7
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	2,6	14,7	20,4	65,8	0,1	6,3	25,0	47,0
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	3,8	48,4	7,4	5,0	0,1	5,8	71,8	29,6
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 – 1 – 1)	4,4	14,0	6,3	46,6	0,1	8,3	4,0	45,8
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	4,9	2,0	2,2	39,9	0,1	6,4	2,1	42,3
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246	/	/	/	/	0,9	6,4	10,2	42,6
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	4,9	13,4	4,4	28,8	0,1	10,1	4,3	53,0
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	/	/	/	/	2,2	7,3	1,4	16,7
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	4,6	14,0	3,5	30,7	1,2	8,0	1,8	24,1
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	4,1	25,1	2,7	35,1	0,9	10,9	3,6	28,2
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	17,0	65,3	6,7	63,8	0,5	6,4	3,4	22,7
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	4,7	9,2	4,4	18,1	1,8	5,2	2,7	37,3
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	5,5	24,0	6,9	47,6	0,8	7,2	2,1	39,1
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	7,2	17,3	5,2	26,9	1,6	10,4	2,1	25,4
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	7,9	8,8	5,7	23,8	2,1	11,8	11,4	34,9
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	2,8	7,1	2,7	30,8	4,4	3,0	3,9	39,8
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225/ MZKI B736	4,6	8,5	1,4	71,2	0,9	11,4	2,8	30,2
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	6,1	17,8	2,9	29,2	0,5	14,8	4,0	39,7
23.	<i>Trimmastroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	1,2	4,7	2,6	15,4	0,8	5,9	2,7	39,1
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	/	/	/	/	0,8	5,2	9,5	36,3
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	2,0	7,7	3,1	20,2	0,1	3,5	7,4	26,6
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	5,9	10,4	10,4	18,2	0,1	14,6	7,3	86,3
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	/	/	/	/	1,2	6,8	5,9	33,9
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	1,6	17,7	1,8	22,4	0,9	66,0	2,7	27,6
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	0,7	13,6	6,6	23,6	1,1	15,0	2,8	15,5
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	4,7	9,1	0,6	14,3	0,2	16,3	1,2	21,4
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	1,9	8,6	1,7	11,3	0,8	9,3	2,3	12,4
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	2,4	21,3	0,6	7,7	3,7	8,6	2,3	13,2
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	14,7	3,5	14,9	10,7	0,7	10,4	2,0	18,2
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	0,3	19,3	0,5	14,7	0,5	16,6	2,8	26,3
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	2,2	4,8	1,0	24,4	0,6	15,3	4,4	5,9
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	2,2	21,1	1,7	19,3	2,5	22,1	2,4	17,5
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	1,9	22,2	7,4	3,1	0,6	8,4	1,5	44,0
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	/	/	/	/	1,6	5,3	1,8	16,9
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	/	/	/	/	0,1	13,7	1,6	15,8
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	/	/	/	/	1,0	12,1	1,7	18,5
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	2,9	14,8	3,0	23,7	1,8	5,4	2,6	31,2
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	4,8	19,4	1,7	16,0	1,4	5,3	9,7	13,9
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	3,9	7,8	1,0	7,1	1,3	3,2	0,6	12,2

## 4.2 Rezultati hemolitičnega testa

### 4.2.1 REZULTATI HEMOLITIČNEGA TESTA ACETONSKIH EKSTRAKTOV

**Preglednica 6: Rezultati hemolitičnega testa acetonskih ekstraktov.** Legenda: +++  $t_{50}$  hemoliza med 0 in 5 minut, ++  $t_{50}$  hemoliza med 5 in 10 minut, +  $t_{50}$  hemoliza med 10 in 15 minut, - hemolize ni v 20 minutah; CV koncentracija suhe snovi v poskusu. K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. Z modro so označeni sevi izolirani iz solin, z zeleno sevi izolirani iz Arktike ter z rdečo sevi izolirani iz drugih okolij. V sivih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih s soljo, kolegice Miše Canjko.

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K	CV-S (mg/ml)	S	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2329	Soline	0,15	+	2,71	-	0,03	-	0,23	-
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2318	Soline	0,21	-	0,16	-	0,06	-	0,58	+++
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF – 2338	Soline	0,03	-	0,25	-	0,08	+++	0,22	-
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF – 2332*	Soline	/	/	/	/	0,01	-	0,27	-
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF – 2340	Soline	0,18	-	0,32	-	0,79	-	0,17	-
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	Soline	0,24	++ +	1,85	-	0,01	-	2,27	+++
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	Arktika	0,34	-	0,67	++ +	0,01	-	6,53	++
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 – 1 – 1)	Japonsko morje, globina 4000 m	0,40	++ +	0,57	++ +	0,01	-	0,36	-
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	Soline	0,44	++ +	0,20	-	0,01	-	0,19	-
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246*	Arktika	/	/	/	/	0,08	-	0,93	+++
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	Soline	0,44	++ +	0,40	-	0,01	+++	0,39	-
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	Arktika	/	/	/	/	0,20	+++	0,13	-
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	Soline	0,42	-	0,32	-	0,11	+	0,16	-
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	Soline	0,37	-	0,24	-	0,08	-	0,33	-
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	Soline	1,54	-	0,61	-	0,04	+++	0,31	-
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	Soline	0,43	++ +	0,40	-	0,16	-	0,24	-
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	Nohti	0,50	+	0,63	-	0,07	-	0,19	-
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	Soline	0,65	+	0,47	-	0,14	-	0,19	-
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	Soline	0,72	++ +	0,52	-	0,19	-	1,04	++
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	Soline	0,25	++	0,24	-	0,40	-	0,35	-
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 / MZKI B736	Soline	0,42	-	0,13	++	0,08	-	0,25	-

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

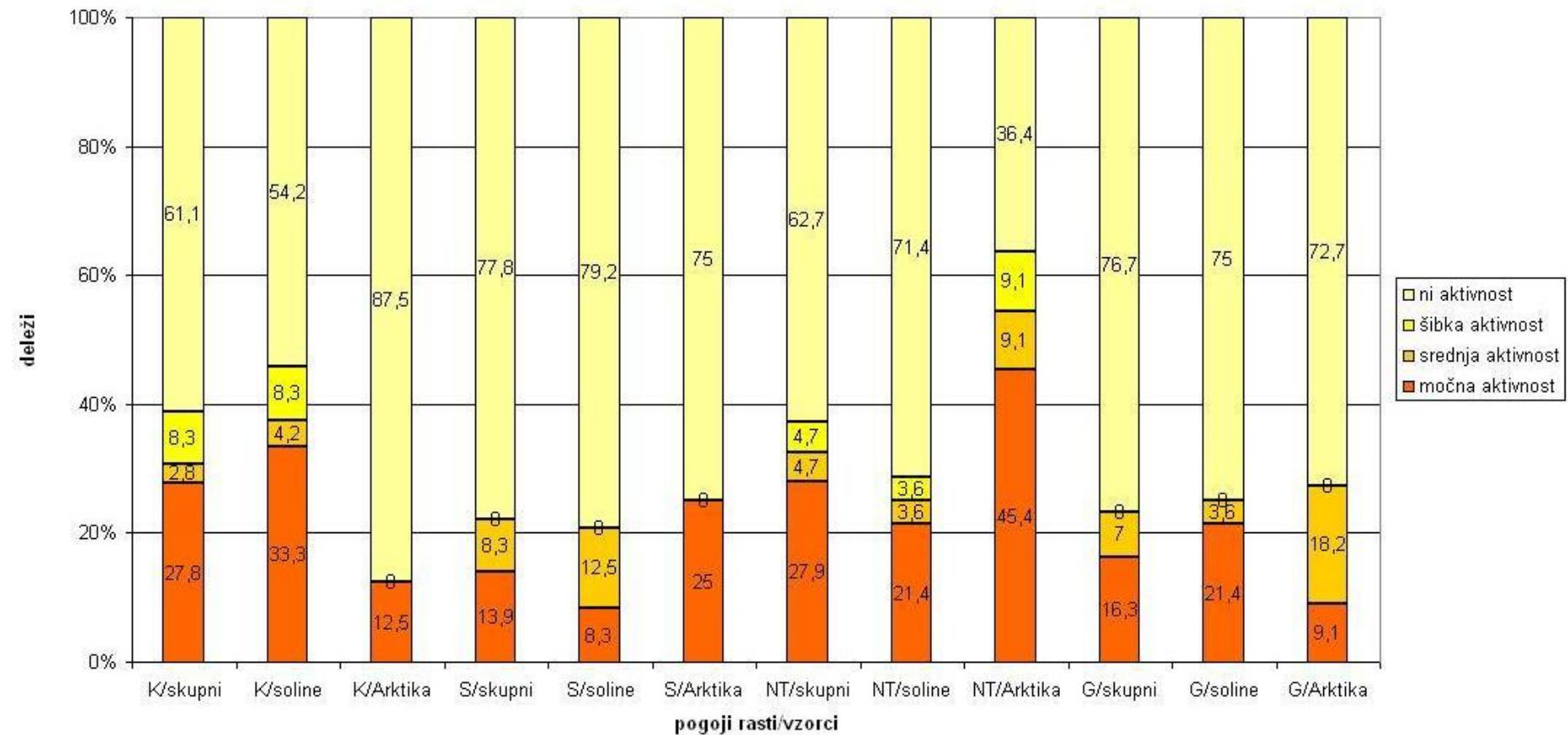
Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K	CV-S (mg/ml)	S	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	Soline	0,55	+++	0,26	+++	0,04	-	0,36	-
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	Soline	0,11	-	0,24	++	0,07	-	0,24	-
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	Soline	/	/	/	/	0,07	+++	0,86	+++
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	Soline	0,18	-	0,28	-	0,01	-	0,67	-
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	Soline	0,54	-	0,94	-	0,01	-	0,66	-
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	Soline	/	/	/	/	0,11	-	0,54	-
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Soline	0,14	-	0,16	-	0,08	-	0,24	+++
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Soline	0,06	-	0,60	-	0,10	-	0,25	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Sončnično seme	0,43	-	0,05	-	0,02	+++	0,11	-
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika	0,17	-	0,15	-	0,07	+	0,21	-
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika	0,22	-	0,05	-	0,34	+++	0,21	-
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	Arktika	1,34	+++	1,35	-	0,06	-	0,18	-
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	Soline	0,03	+++	0,04	+++	0,04	+++	0,25	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	Arktika	0,20	-	0,09	-	0,05	+++	0,40	-
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Soline	0,20	+++	0,15	++	0,23	+++	0,22	+++
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika	0,17	-	0,67	+++	0,05	+++	0,14	-
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	Arktika	/	/	/	/	0,14	++	0,16	++
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	Soline	/	/	/	/	0,01	-	0,14	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	Arktika	/	/	/	/	0,09	-	0,15	-
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	Arktika	0,26	-	0,27	-	0,16	+++	0,24	-
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	Soline	0,44	-	0,15	-	0,13	+++	0,88	+++
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	Kontrola	0,35	-	0,09	-	0,12	-	0,05	-

Graf 1 prikazuje deleže hemolitične aktivnosti acetonskih ekstraktov. V stolpcih so ločeno prikazani deleži aktivnosti glede na pogoje rasti. Za vsak pogoj rasti so v grafu trije stolpci: prvi prikazuje deleže aktivnosti vseh acetonskih ekstraktov, drugi deleže aktivnosti acetonskih ekstraktov gliv izoliranih iz solin in tretji stolpec deleže aktivnosti acetonskih ekstraktov gliv izoliranih iz Arktike. Za močno hemolitične smo šteli tiste ekstrakte, pri katerih je hemoliza potekla v 0–5 minutah, kot srednjo hemolitično aktivnost vzorce, pri katerih je hemoliza potekla v 5–10 minutah ter šibko tiste, pri katerih je hemoliza potekla v 10–15 minutah.

Pri kontrolnih pogojih je imelo močno hemolitično aktivnost 27,8 % testiranih sevov. Delež močne hemolitične aktivnosti je bil nekoliko večji (33,3 %) pri kontrolnih pogojih, če smo upoštevali le rezultate ekstraktov gliv izoliranih iz solin in nižji (12,5 %) pri kontrolnih pogojih, če smo upoštevali le rezultate ekstraktov gliv izoliranih iz Arktike. Največji delež močne hemolitične aktivnosti (45,4 %) so imeli ekstrakti gliv, ki so bile izolirane iz Arktike in so rasle pri nizki temperaturi. Le 9,1 % sevov izoliranih iz Arktike je sintetiziralo močno hemolitične snovi, če so rasli na gojišču z visoko koncentracijo glukoze. Najmanjši delež (8,3 %) močno hemolitičnih snovi so imeli ekstrakti gliv izoliranih iz solin, ki so rasle na gojiščih s soljo.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv reda Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



**Graf 1: Deleži hemolitične aktivnosti vseh acetonskih ekstraktov glede na pogoje rasti gliv.**

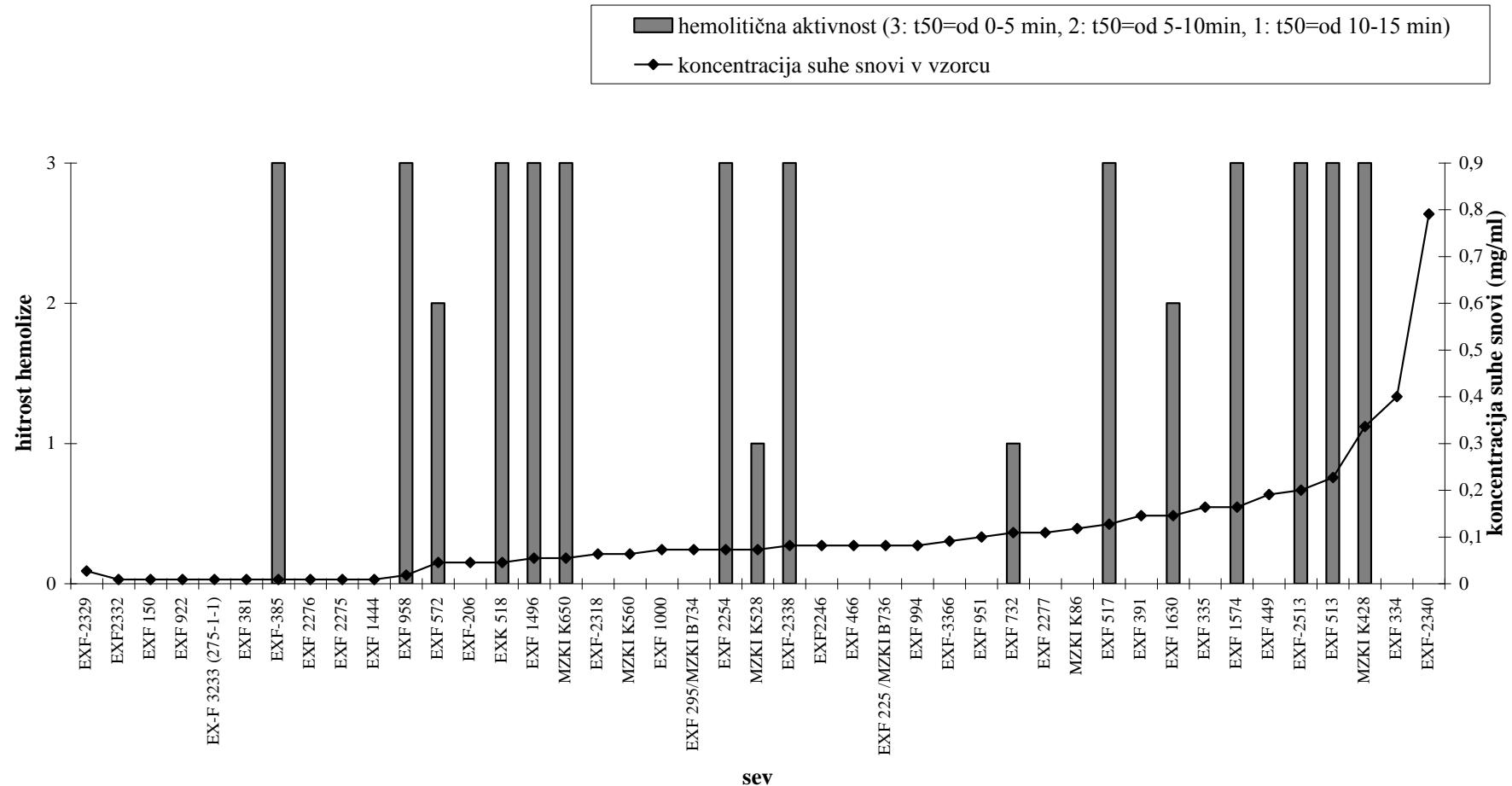
Legenda: K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze.

Graf 2 prikazuje hemolitično aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi. Med testiranimi sevi izstopata sev vrste *Cladosporium sphaerospermum* z oznako EXF 385 izoliran iz solin ter sev vrste *Wallemia sebi* z oznako EXF 958 izoliranega iz sončnega semena, ki sta pri zelo nizki koncentraciji suhe snovi v ekstraktu imela visoko hemolitično aktivnost. Za razliko od prvega pri slednjem močne aktivnosti nismo zasledili pri acetonskem ekstraktu iz kontrolnih pogojev (preglednica 6).

Hemolitično aktivnost pri nizki temperaturi (v nasprotju z ostalimi pogoji) smo zasledili še pri acetonskih ekstrakth seva vrste *Pichia guilliermondii* z oznako EXF 1496 izoliranega iz Arktike, seva vrste *Candida parapsilosis* z oznako EXF 1574 izoliranega iz Arktike, seva vrste *Cryptococcus liquefaciens* z oznako MZKI K428 izoliranega iz Arktike ter seva vrste *Alternaria tenuissima* skupina X z oznako EXF 2338 izoliranega iz solin.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



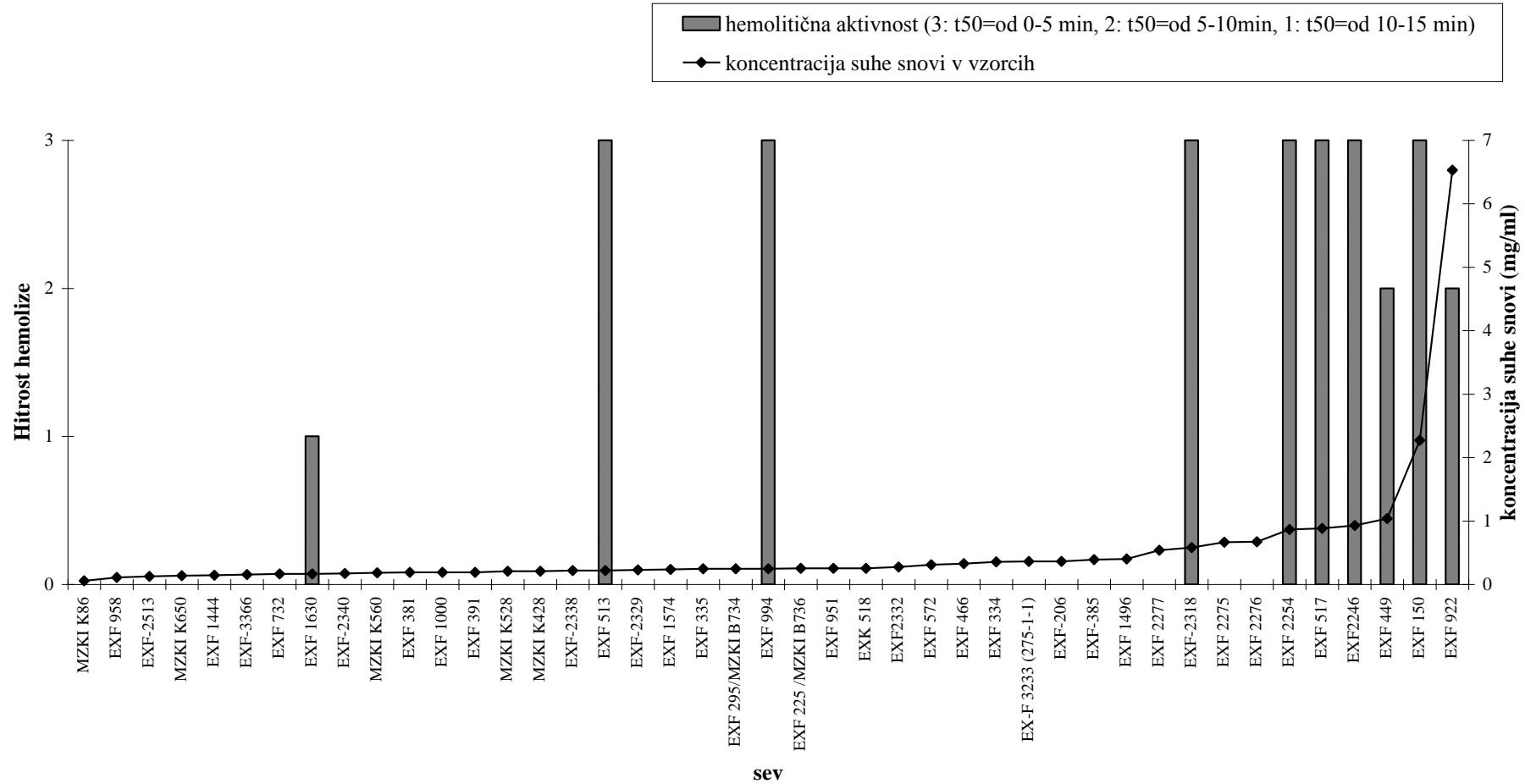
Graf 2: Hemolitična aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

Graf 3 prikazuje hemolitično aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi. Koncentracija suhe snovi acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo glukoze je bila nekajkrat višja od koncentracije suhe snovi acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi.

Visoko hemolitično aktivnost so imeli acetonski ekstrakti naslednjih gliv izolizanih iz solin: sev vrste *Rhodosporidium babjevae* z oznako EXF 513, sev vrste *Walleimia ichthyophaga* z oznako EXF 994 ter sev vrste *Alternaria tenuissima* skupina C z oznako EXF 2318. Pri zadnjih dveh sevih so imeli hemolitično aktivnost le acetonski ekstrakti gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko vsebnostjo glukoze. Acetonski ekstrakti gliv, ki so rasle pri drugačnih pogojih, niso kazali hemolitične aktivnosti.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Graf 3: Hemolitična aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

#### 4.2.1 REZULTATI HEMOLIZIČNEGA TESTA METANOLNIH EKSTRAKTOV

**Preglednica 7: Rezultati hemolitičnega testa metanolnih ekstraktov.** Legenda: +++  $t_{50}$  hemoliza med 0 in 5 minut, ++  $t_{50}$  hemoliza med 5 in 10 minut, +  $t_{50}$  hemoliza med 10 in 15 minut, - hemolize ni v 20 minutah; CV koncentracija suhe snovi v poskusu. K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. Z modro so označeni sevi izolirani iz solin, z zeleno sevi izolirani iz Arktike ter z rdečo sevi izolirani iz drugih okolij. V sivih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih s soljo, kolegice Miše Canjko.

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K	CV-S (mg/ml)	S	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2329	Soline	1,07	-	0,15	-	0,79	+++	2,41	+++
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2318	Soline	0,69	-	2,35	-	0,94	+++	0,69	+
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF – 2338	Soline	0,35	-	0,41	-	0,64	+++	2,57	+++
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF – 2332*	Soline	/	/	/	/	0,79	-	1,62	-
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF – 2340	Soline	1,12	-	2,55	-	0,50	-	2,15	++
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	Soline	1,34	+++	5,98	-	0,57	+++	4,27	+++
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	Arktika	4,40	-	0,45	+++	0,53	+++	2,69	+++
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 – 1 – 1)	Japonsko morje, globina 4000 m	1,27	+++	4,24	-	0,75	++	4,16	+++
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	Soline	0,18	++	3,63	-	0,58	+	3,84	+++
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246	Arktika	/	/	/	/	0,58	+++	3,87	+++
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	Soline	1,22	++	2,62	-	0,92	+++	4,82	+++
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	Arktika	/	/	/	/	0,66	+++	1,52	++
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	Soline	1,27	++	2,79	-	0,73	++	2,19	+++
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	Soline	2,28	-	3,19	-	0,99	-	2,56	-
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	Soline	5,94	+	5,80	-	0,58	+++	2,06	-
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	Soline	0,84	++	1,64	-	0,47	+++	3,39	++
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	Nohti	2,18	-	4,33	-	0,65	++	3,55	++
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	Soline	1,57	-	2,44	-	0,94	+++	2,31	+++
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	Soline	0,80	++	2,16	-	1,07	+++	317	-
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	Soline	0,64	+	2,80	-	0,27	-	3,62	+++
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 / MZKI B736	Soline	0,77	-	6,47	+++	1,04	+++	2,74	+++
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	Soline	1,62	+++	2,65	+++	1,34	++	3,61	-
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295 / MZKI B734	Soline	0,43	-	1,40	+++	0,54	+++	3,55	++

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

---

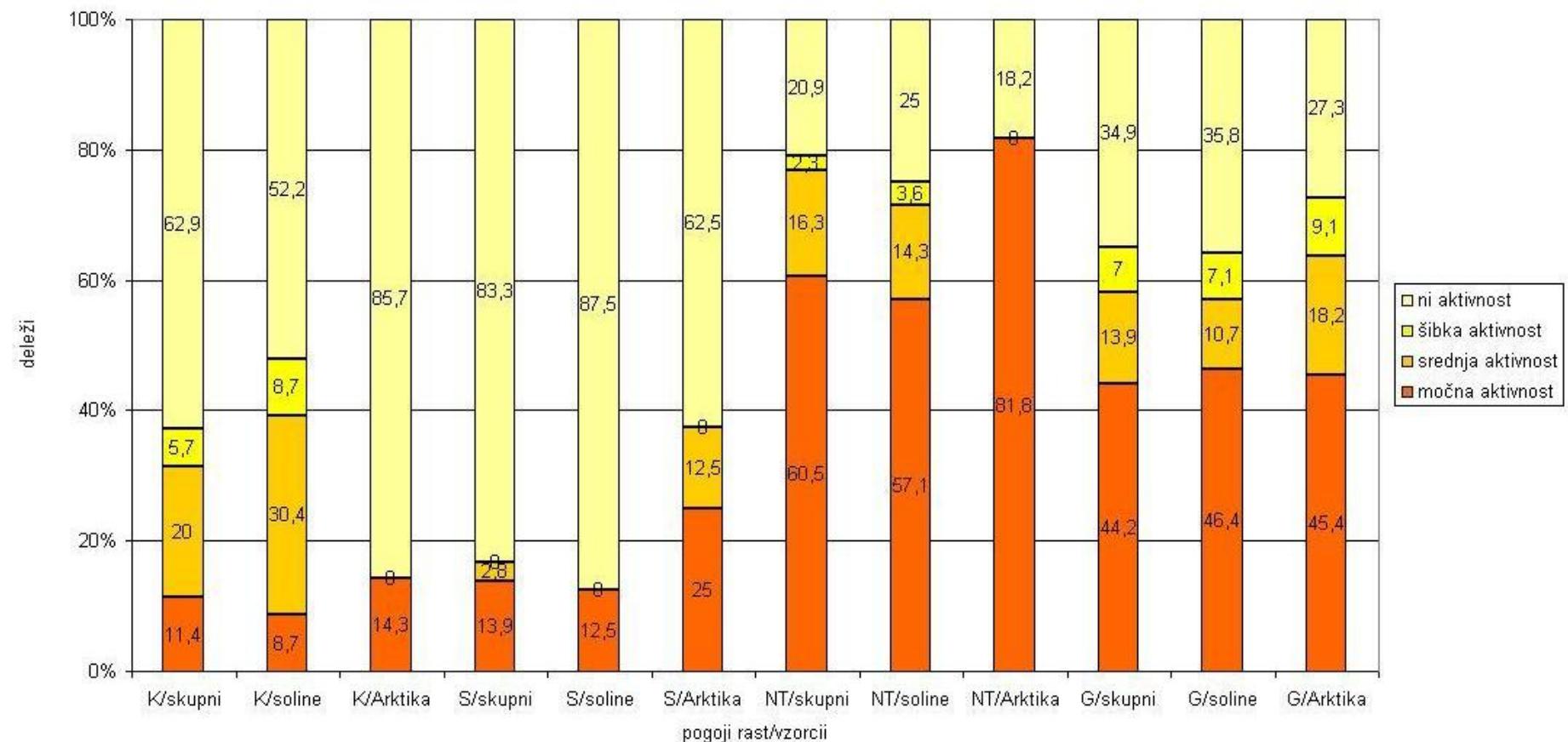
Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K	CV-S (mg/ml)	S	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	Soline	/	/	/	/	0,47	+++	3,30	+++
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	Soline	0,70	-	1,84	-	0,32	+++	2,42	+++
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	Soline	0,94	-	1,65	-	1,33	+++	7,84	+++
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	Soline	/	/	/	/	0,62	-	3,08	-
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Soline	1,61	-	2,04	-	6,00	-	2,51	+
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Soline	1,24	-	2,14	-	1,36	++	1,41	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Sončnično seme	0,83	-	1,30	-	1,48	+++	1,94	-
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika	0,78	-	1,03	+++	0,84	+++	1,13	++
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika	1,94	-	0,70	-	0,78	+++	1,20	+++
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	Arktika	0,32	+++	0,97	-	0,94	+++	1,65	-
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	Soline	1,75	++	1,34	-	1,51	+++	2,39	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	Arktika	0,44	-	2,22	-	1,39	-	0,54	+++
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Soline	1,92	++	1,75	-	2,01	+++	1,59	+++
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika	2,02	-	0,28	++	0,76	+++	4,00	-
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	Arktika	/	/	/	/	0,48	+++	1,54	+++
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	Soline	/	/	/	/	1,24	-	1,44	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	Arktika	/	/	/	/	1,10	-	1,68	-
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	Arktika	1,34	-	2,15	-	0,49	+++	2,84	+
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	Soline	1,76	-	1,45	-	0,48	+++	1,26	-
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	Kontrola	0,71	-	0,64	-	0,29	++	1,11	-

Podobno kot v grafu 1 za acetonske ekstrakte, so v grafu 4 prikazani deleži hemolitične aktivnosti za metanolne ekstrakte. Iz grafa je razvidno, da je pri kontrolnih pogojih najmanj sevov sintetiziralo hemolitične snovi topne v metanolu. Le 11,4 % metanolnih ekstraktov vseh gliv je imelo močno hemolitično aktivnost.

Pri stresnih pogojih (nizka temperature, gojišča s soljo, visoka vsebnost glukoze v gojišču) je bil delež metanolih ekstraktov z močno hemolitično aktivnostjo večji. Največji delež močno hemolitičnih metanolnih ekstraktov (81,8 %) so imeli vzorci sevov izoliranih iz Arktike, ki so rasli pri nizki temperaturi (pri kontrolnih pogojih 14,3 %). Najnižji delež močne hemolize so imeli sevi izolirani iz solin, ki so rasli pri kontrolnih pogojih (8,7 %).

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv reda Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



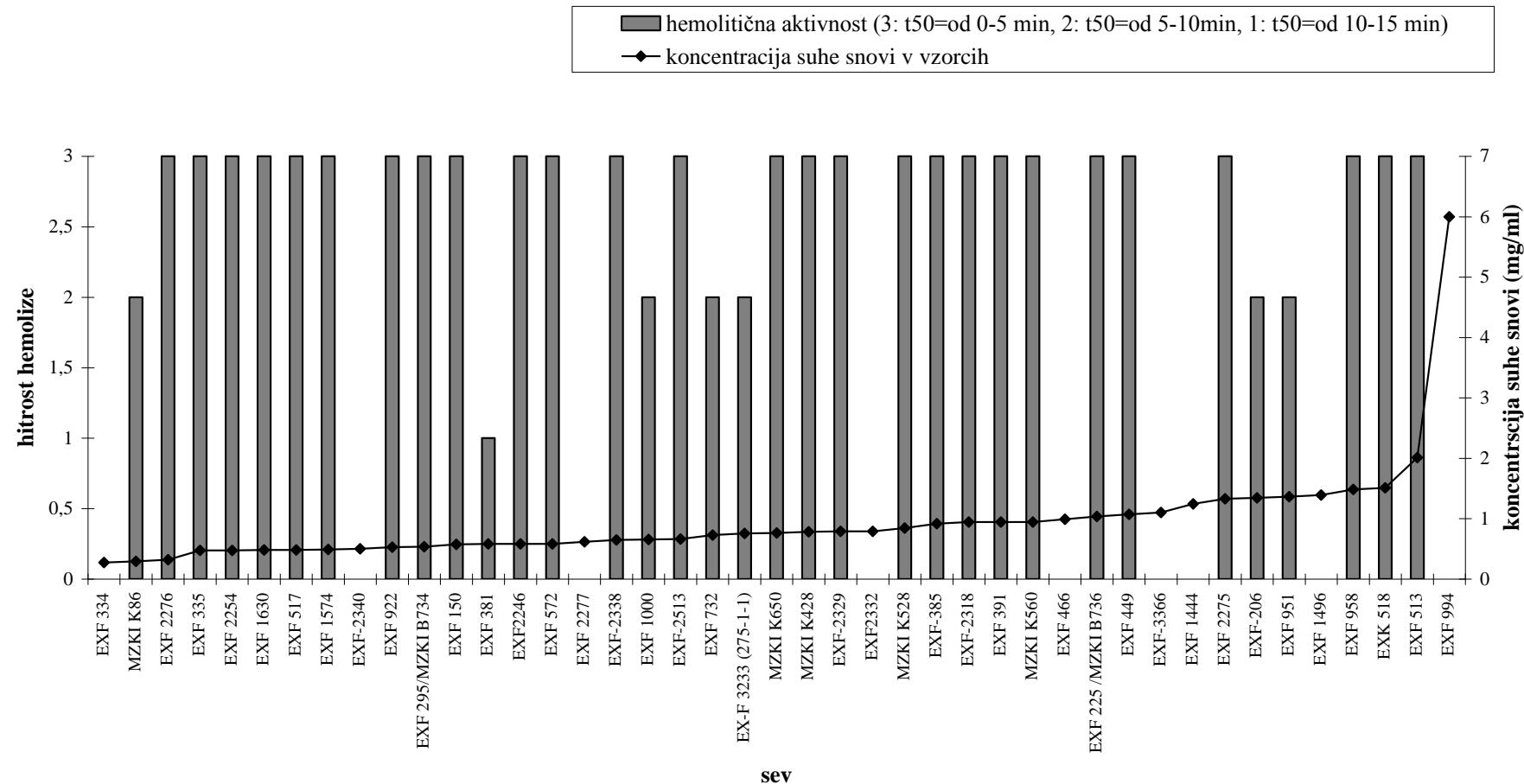
**Graf 4: Deleži hemolitične aktivnosti vseh metanolnih ekstraktov glede na pogoje rasti gliv.**  
Legenda: K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze.

Graf 5 prikazuje hemolitično aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da je veliko ekstraktov imelo močno hemolitično aktivnost. Nekaj sevov je sintetiziralo hemolitično aktivne snovi topne v metanolu le, če so rasli pri nizki temperaturi. Ta značilnost se je pokazala pri obeh sevih vrste *Candida parapsilosis* (z oznakama EXF 517 in EXF 1574), pri sevu vrste *Cladosporium halotolerans* z oznako EXF 571 izoliranem iz solin, sevu vrste *Alternaria tenuissima* skupina C z oznako EXF 2318 izoliranim iz solin ter sevu vrste *Wallemi sebi* z oznako EXF 958 izoliranem iz sončničnega semena.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



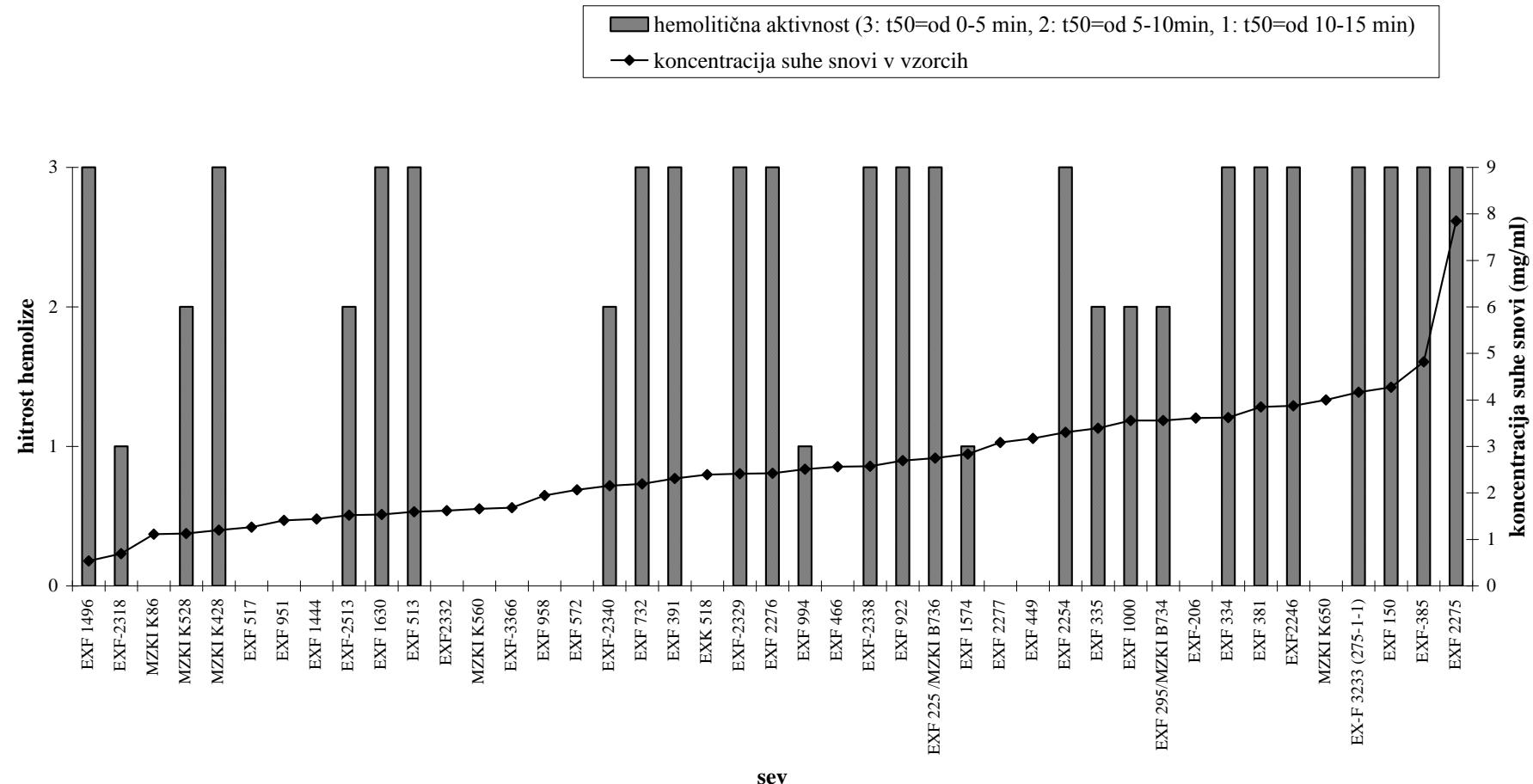
Graf 5: Hemolitična aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

Graf 6 prikazuje hemolitično aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Sev vrste *Pichia guilliermondii* z oznako EXF 1496 izoliran iz Arktike je sintetiziral hemolitično aktivne snovi le na gojišču z visoko koncentracijo glukoze. Pri sevu vrste *Cladosporium spinulosum* z oznako EXF 334 izoliranem iz solin, smo zasledili močno hemolitično aktivnost le pri ekstraktih gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze. Metanolni ekstrakti gliv, ki so rasle pri kontrolnih pogojih, so imeli šibko hemolitično aktivnost.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Graf 6: Hemolitična aktivnost metanolih ekstraktov gliv, ki rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

### 4.3 Rezultati testa protibakterijske aktivnosti

**Preglednica 8: Premeri inhibicijskih con acetonskih ekstraktov na ploščah z bakterijo *B. subtilis*.** CV koncentracija suhe snovi v poskusu. K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. Z modro so označeni sevi izolirane iz solin, z zeleno sevi izolirane iz Arktike ter z rdečo sevi izolirane iz drugih okolij. V sivih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojišči s soljo, kolegice Miše Canjko.

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2329	Soline	1,7	3,5	29,8	5	0,3	-	2,5	-
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2318	Soline	2,3	3,5	1,8	1,5	0,7	-	6,4	1,5
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF – 2338	Soline	0,3	-	2,8	2,5	0,9	-	2,4	-
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF – 2332*	Soline	/	/	/	/	0,1	-	3,0	-
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF – 2340	Soline	2,0	5	3,5	4,5	8,7	-	1,9	-
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	Soline	2,6	4	20,4	3	0,1	-	25,0	-
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	Arktika	3,8	-	7,4	1	0,1	-	71,8	-
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 – 1 - 1)	Japonski morje, globina 4000 m	4,4	4,5	6,3	5	0,1	2	4,0	-
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 381	Soline	4,9	4	2,2	2	0,1	-	2,1	1
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246*	Arktika	/	/	/	/	0,9	-	10,2	-
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF 385	Soline	4,9	4	4,4	1	0,1	-	4,3	-
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	Arktika	/	/	/	/	2,2	-	1,4	-
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	Soline	4,6	4	3,5	-	1,2	-	1,8	-
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	Soline	4,1	-	2,7	-	0,9	-	3,6	-
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	Soline	17,0	-	6,7	-	0,5	-	3,4	-
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	Soline	4,7	3	4,4	2	1,8	1	2,7	-
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	Nohti	5,5	3	6,9	3	0,8	-	2,1	-
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	Soline	7,2	-	5,2	2	1,6	4	2,1	-
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	Soline	7,9	4	5,7	5	2,1	3	11,4	2
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	Soline	2,8	2	2,7	4	4,4	12	3,9	1,5
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 / MZKI B736	Soline	4,6	1	1,4	4	0,9	-	2,8	-
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	Soline	6,1	4	2,9	5	0,5	-	4,0	-
23.	<i>Trimmastroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	Soline	1,2	3	2,6	2	0,8	-	2,7	1,5

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	Soline	/	/	/	/	0,8	2	9,5	3,5
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	Soline	2,0	5	3,1	-	0,1	-	7,4	1
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	Soline	5,9	5	10,4	-	0,1	-	7,3	-
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	Soline	/	/	/	/	1,2	-	5,9	2
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Soline	1,6	-	1,8	1	0,9	-	2,7	2
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Soline	0,7	-	6,6	-	1,1	2	2,8	2
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Sončnično seme	4,7	2	0,6	3	0,2	-	1,2	-
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika	1,9	-	1,7	-	0,8	-	2,3	-
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika	2,4	2	0,6	1	3,7	2	2,3	-
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	Arktika	14,7	4	14,9	-	0,7	2	2,0	-
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	Soline	0,3	2	0,5	-	0,5	-	2,8	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	Arktika	2,2	2,5	1,0	3,5	0,6	-	4,4	-
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Soline	2,2	-	1,7	-	2,5	-	2,4	-
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika	1,9	-	7,4	-	0,6	-	1,5	-
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	Arktika	/	/	/	/	1,6	-	1,8	-
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	Soline	/	/	/	/	0,1	-	1,6	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	Arktika	/	/	/	/	1,0	-	1,7	-
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	Arktika	2,9	-	3,0	-	1,8	-	2,6	-
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	Soline	4,8	-	1,7	1,5	1,4	-	9,7	2
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	Kontrola	3,9	-	1,0	-	1,3	-	0,6	-

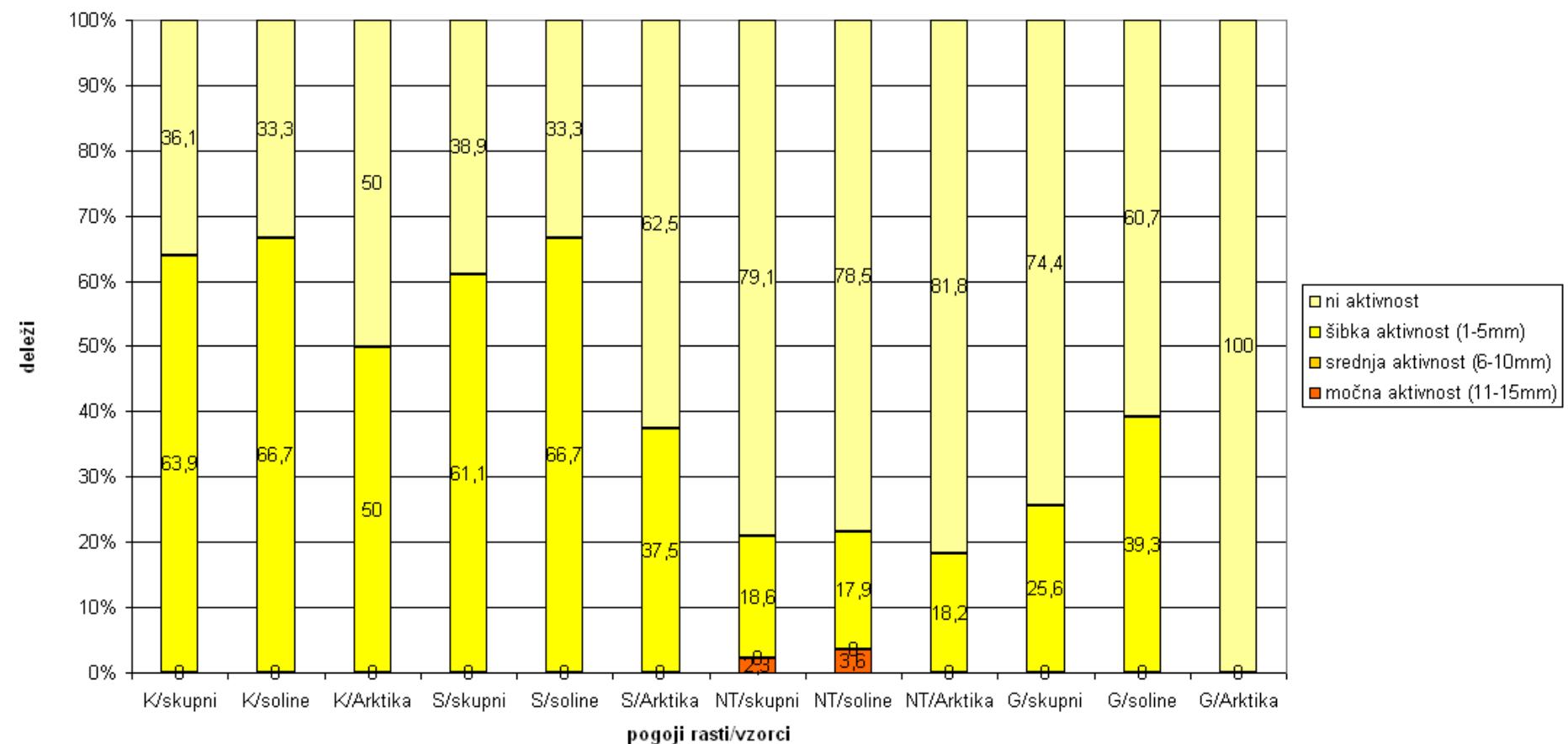
Graf 7 prikazuje deleže sevov, glede na širino cone inhibicije *B. subtilis* vseh acetonskih ekstraktov, acetonskih ekstraktov gliv izoliranih iz solin ter gliv izoliranih iz arktičnega ledu, glede na pogoje rasti.

Iz grafa je razvidno, da je imel močno protibakterijsko aktivnost le ekstrakt gline izolirane iz solin, ki je rasla pri nizki temperaturi.

Delež ekstraktov s šibko aktivnostjo je bil največji pri kontrolnih pogojih (63,9 %).

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



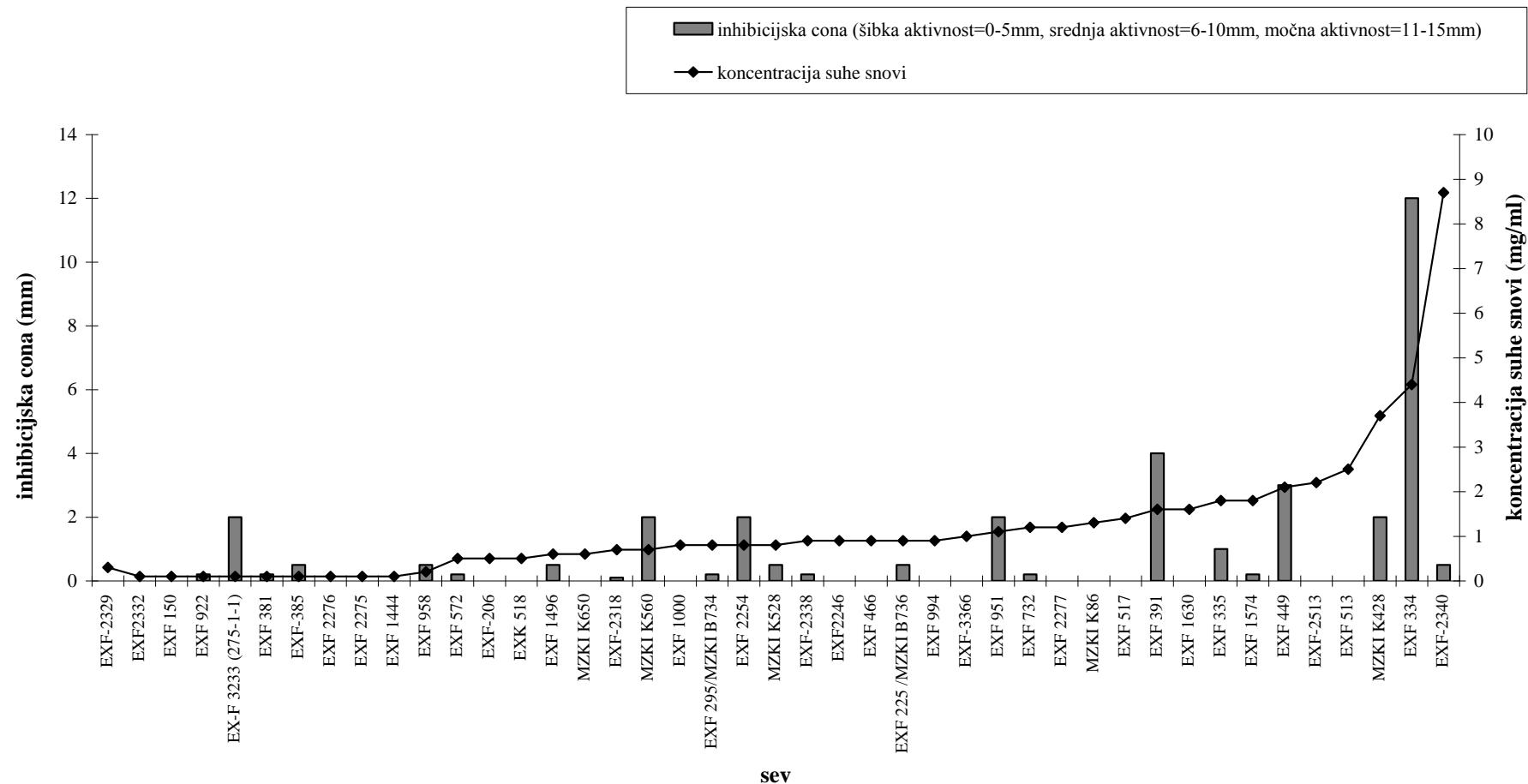
**Graf 7: Deleži acetonskih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti *B. subtilis* glede na pogoje rasti gliv.**  
Legenda: K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze.

Graf 8 prikazuje širine inhibicijskih con pri protibakterijskem testu na ploščah z *B.subtilis*, za acetonske ekstrakte gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da je imel močno protibakterijsko aktivnost na *B.subtilis* le sev vrste *Cladosporium spinulosum* z oznako EXF 334, ki je bil izoliran iz solin. Acetonski ekstrakti tega seva so imeli protibakterijsko aktivnost proti *B.subtilis* tudi pri ostalih pogojih rasti, vendar cona inhibicije ni bila večja od 4 mm (preglednica 8).

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



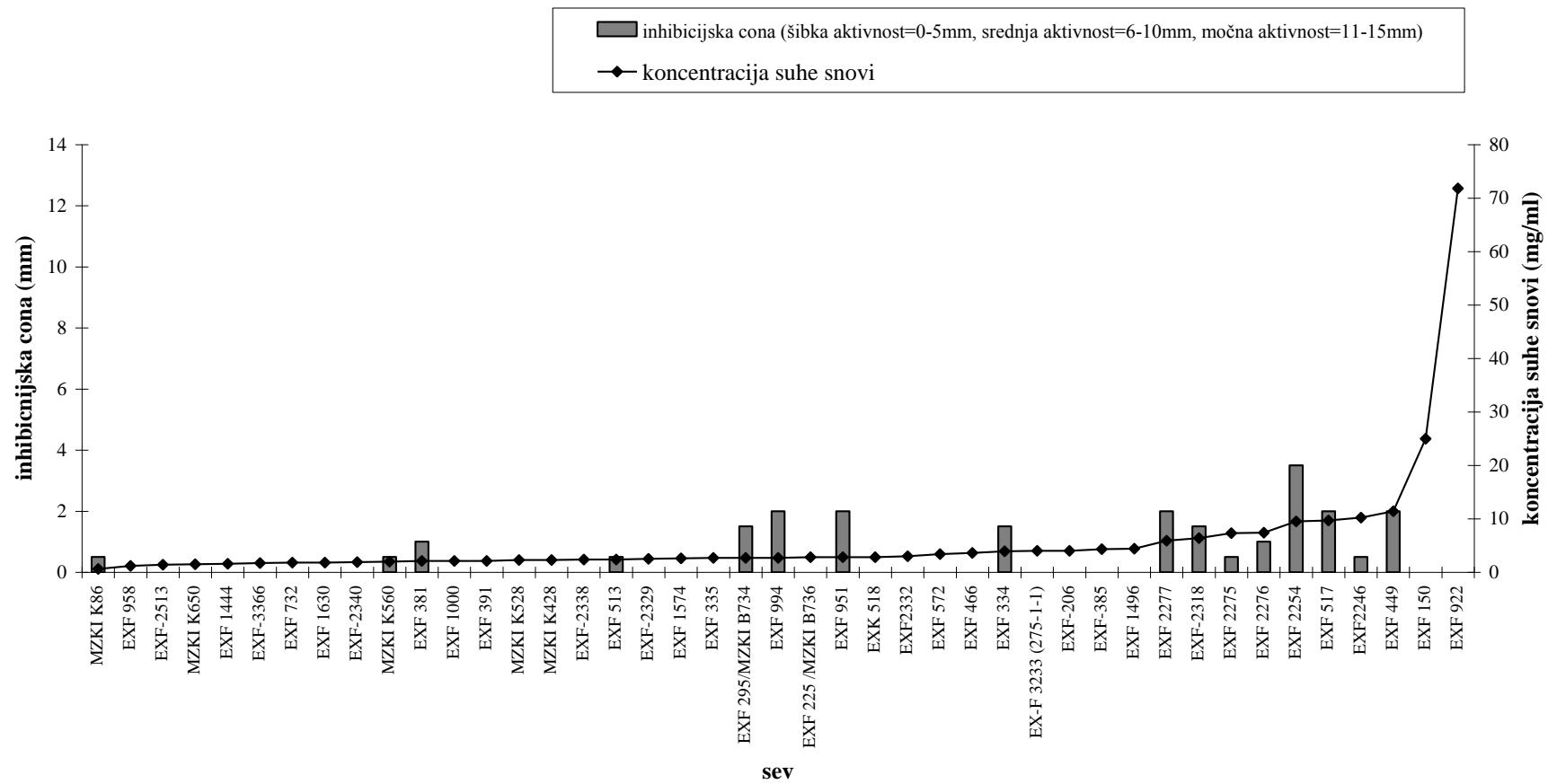
Graf 8: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *B. subtilis*.

Graf 9 prikazuje širine inhibicijskih konc pri testu na ploščah z *B.subtilis*, za acetonske ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da v ekstraktih ni bilo snovi z močno protibakterijsko aktivnostjo na *B.subtilis* oz. da te snovi niso bile prisotne v zadostni količini, da bi zavirale rast bakterije.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



**Graf 9: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *B. subtilis*.**

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

**Preglednica 9: Premeri inhibicijskih con metanolnih ekstraktov na ploščah z bakterijo *B. subtilis*.** K kontrolni pogoj. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišča z visoko koncentracijo glukoze. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. Z modro so označeni sevi izolirane iz solin, z zeleno sevi izolirane iz Arktike ter z rdečo sevi izolirane iz drugih okolij. V sivih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojišči s soljo, kolegice Miše Canjko.

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF - 2329	Soline	11,8	1,5	1,7	1	8,7	-	26,5	1
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF - 2318	Soline	7,6	2,5	25,9	1,5	10,4	-	7,6	2
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF - 2338	Soline	3,9	3,5	4,5	1,5	7,1	-	28,3	4
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF - 2332*	Soline	/	/	/	/	8,7	-	17,8	1
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF - 2340	Soline	12,3	5	28,1	-	5,5	1	23,7	2
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	Soline	14,7	4	65,8	4	6,3	-	47,0	-
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	Arktika	48,4	1	5,0	1	5,8	-	29,6	2
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 - 1 - 1)	Japonsko morje, globina 4000 m	14,0	5	46,6	3,5	8,3	2,5	45,8	2
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	Soline	2,0	2	39,9	2,5	6,4	-	42,3	4
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246*	Arktika	/	/	/	/	6,4	-	42,6	6
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	Soline	13,4	5	28,8	1	10,1	-	53,0	2
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	Arktika	/	/	/	/	7,3	-	16,7	2
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	Soline	14,0	4	30,7	-	8,0	-	24,1	1,5
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	Soline	25,1	-	35,1	-	10,9	2	28,2	1,5
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	Soline	65,3	-	63,8	-	6,4	-	22,7	1,5
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	Soline	9,2	3	18,1	-	5,2	-	37,3	1
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	Nohti	24,0	4	47,6	-	7,2	-	39,1	3
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	Soline	17,3	1,5	26,9	-	10,4	-	25,4	-
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	Soline	8,8	4	23,8	7	11,8	2	34,9	1,5
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	Soline	7,1	-	30,8	3,5	3,0	12	39,8	3,5
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 / MZKI B736	Soline	8,5	1	71,2	3,5	11,4	3	30,2	4
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	Soline	17,8	3	29,2	4,5	14,8	3	39,7	4
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	Soline	4,7	-	15,4	3	5,9	4	39,1	-

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

---

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	Soline	/	/	/	/	5,2	3,5	36,3	-
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	Soline	7,7	4	20,2	-	3,5	9	26,6	-
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	Soline	10,4	7	18,2	-	14,6	3	86,3	-
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	Soline	/	/	/	/	6,8	3	33,9	-
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Soline	17,7	-	22,4	-	66,0	-	27,6	-
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Soline	13,6	-	23,6	-	15,0	-	15,5	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Sončnično seme	9,1	2	14,3	-	16,3	2	21,4	-
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika	8,6	-	11,3	1	9,3	2,5	12,4	-
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika	21,3	-	7,7	2	8,6	1	13,2	-
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	Arktika	3,5	2	10,7	-	10,4	-	18,2	1,5
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	Soline	19,3	-	14,7	-	16,6	-	26,3	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	Arktika	4,8	2	24,4	2,5	15,3	-	5,9	-
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Soline	21,1	-	19,3	-	22,1	-	17,5	-
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika	22,2	1	3,1	-	8,4	-	44,0	-
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	Arktika	/	/	/	/	5,3	-	16,9	-
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	Soline	/	/	/	/	13,7	-	15,8	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	Arktika	/	/	/	/	12,1	-	18,5	-
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	Arktika	14,8	-	23,7	-	5,4	-	31,2	-
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	Soline	19,4	-	16,0	-	5,3	-	13,9	-
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	Kontrola	7,8	-	7,1	-	3,2	-	12,2	-

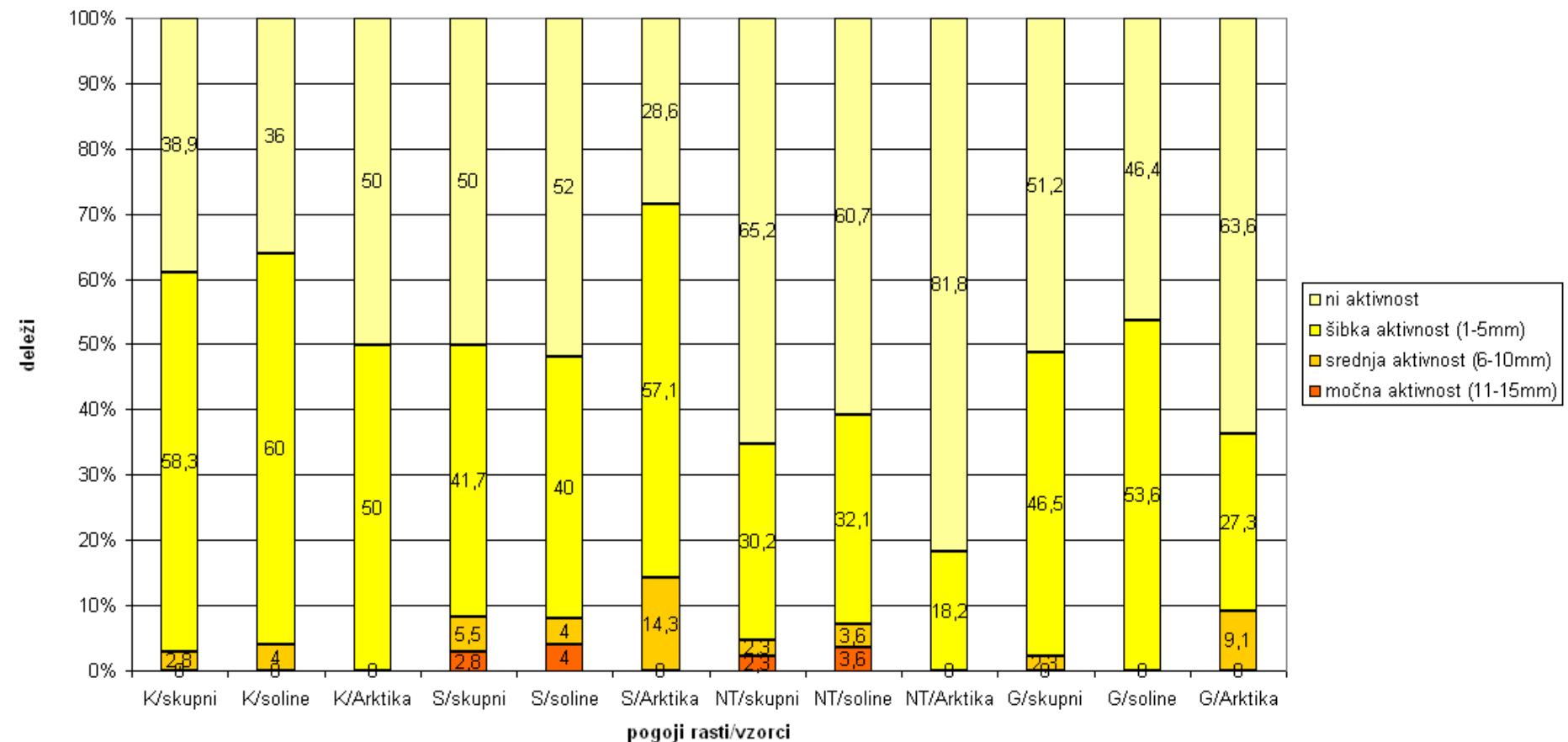
Graf 10 prikazuje delež sevov glede na širino cone inhibicije *B.subtilis* vseh metanolnih ekstraktov, metanolnih ekstraktov gliv izoliranih iz solin ter gliv izoliranih iz arktičnega ledu glede na pogoje rasti.

Iz grafa je razvidno, da je imel močno protibakterijsko aktivnost le ekstrakt gline izolirane iz solin, ki je rasla pri nizki temperaturi.

Delež ekstraktov, ki niso kazali protibakterijske aktivnosti, je bil najvišji pri glivah, ki so rasle pri nizki temperaturi.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



**Graf 10: Deleži metanolnih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti *B.subtilis* glede na pogoje rasti gliv.**

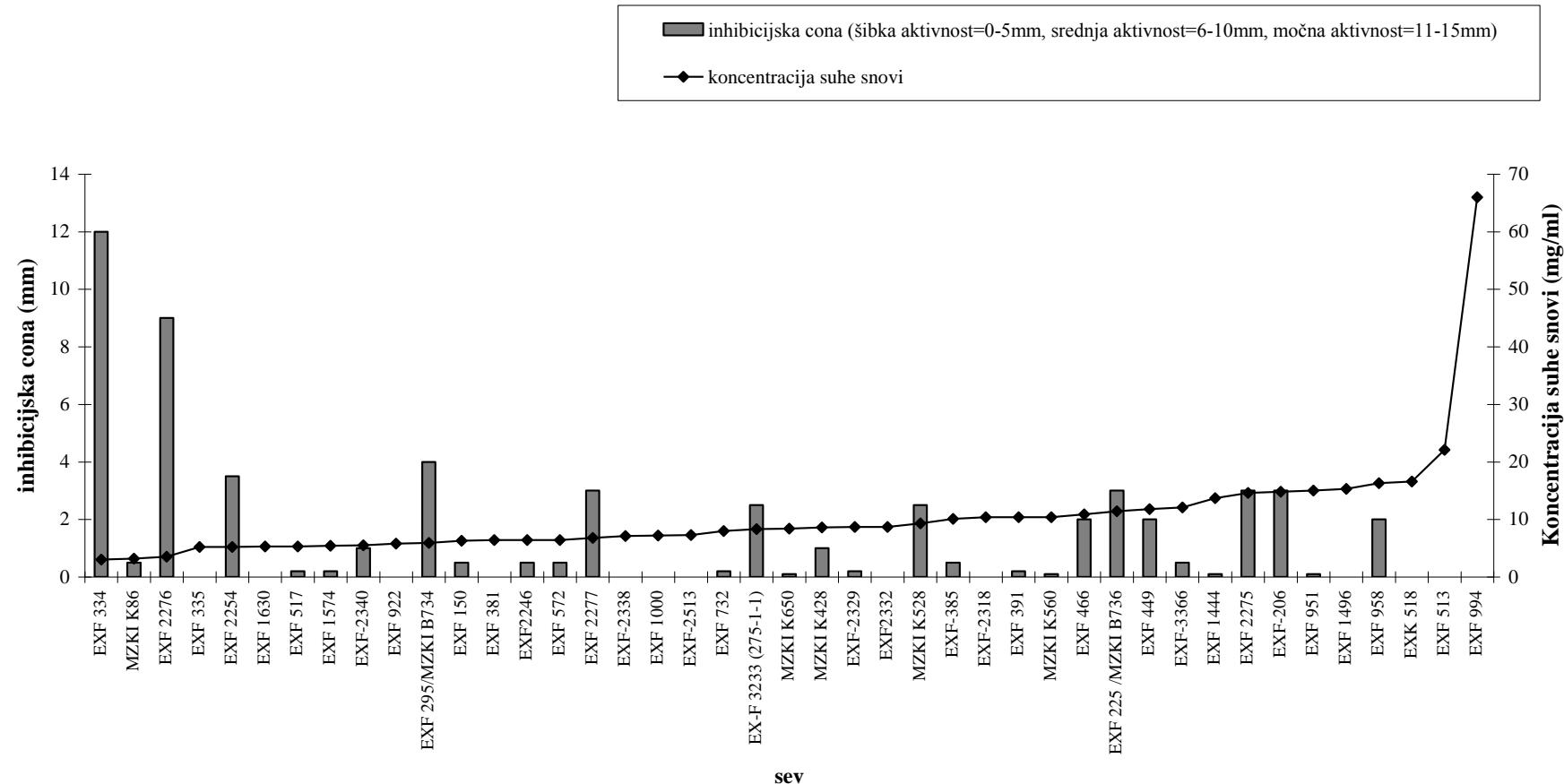
Legenda: K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze.

Graf 11 prikazuje širine inhibicijskih con pri testu na ploščah z *B.subtilis*, za metanolne ekstrakte gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da je imel močno protibakterijsko aktivnost proti *B.subtilis* le sev vrste *Cladosporium spinulosum* z oznako EXF 334, ki je bil izoliran iz solin. Vsi metanolni ekstrakti tega seva, z izjemo kontrole, so kazali protibakterijsko aktivnost proti *B.subtilis*, vendar pri ostalih metanolnih ekstraktih cona inhibicije ni bila večja od 4 mm (preglednica 9).

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



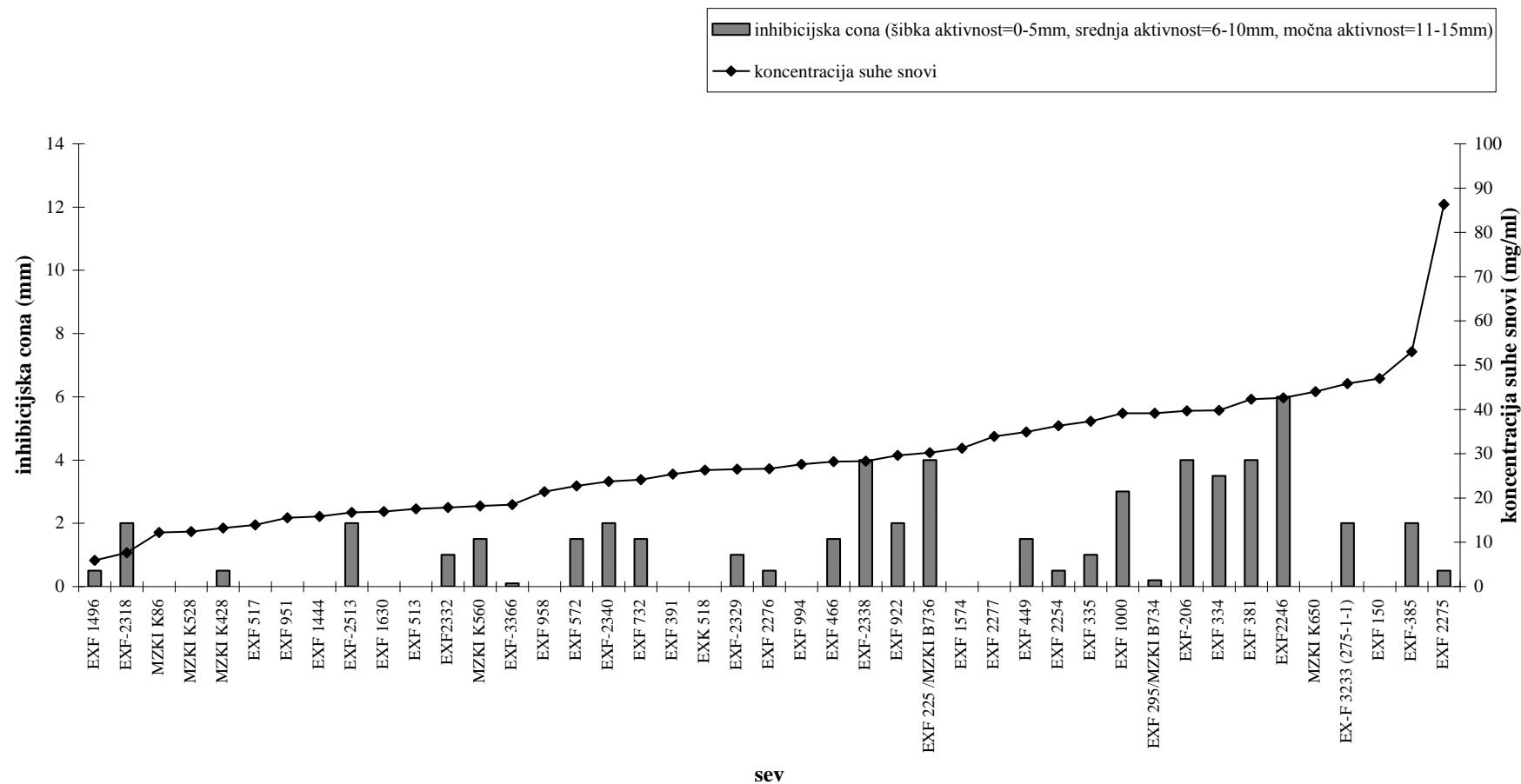
Graf 11: Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *B.subtilis*.

Graf 12 prikazuje širine inhibicijskih konc pri testu na ploščah z *B.subtilis*, za metanolne ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da v ekstraktih ni bilo snovi z močno protibakterijsko aktivnostjo proti *B.subtilis*. Širina inhibicijske cone je bila največja pri sevu vrste *Cladosporium cladosporioides* z oznako EXF 2246, ki je bil izoliran iz Arktike.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Graf 12: : Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *B.subtilis*.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

**Preglednica 10: Premeri inhibicijskih con acetonskih ekstraktov na ploščah z bakterijo *E.coli*.** CV koncentracija suhe snovi v poskusu. K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišča z visoko koncentracijo glukoze. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. Z modro so označeni sevi izolirane iz solin, z zeleno sevi izolirane iz Arktike ter z rdečo sevi izolirane iz drugih okolij. V svih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojišči s soljo, kolegice Miše Canjko.

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2329	Soline	1,7	-	29,8	-	0,3	-	2,5	-
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2318	Soline	2,3	-	1,8	-	0,7	-	6,4	-
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF – 2338	Soline	0,3	-	2,8	-	0,9	-	2,4	-
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF – 2332*	Soline	/	/	/	/	0,1	-	3,0	-
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF – 2340	Soline	2,0	-	3,5	-	8,7	1	1,9	-
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	Soline	2,6	-	20,4	-	0,1	-	25,0	1,5
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922*	Arktika	3,8	-	7,4	-	0,1	-	71,8	2
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 – 1 – 1)	Japonsko morje, globina 4000 m	4,4	-	6,3	-	0,1	-	4,0	-
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	Soline	4,9	-	2,2	-	0,1	-	2,1	-
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246*	Arktika	1,7	-	2,4	-	0,9	1	10,2	-
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	Soline	4,9	-	4,4	-	0,1	-	4,3	-
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	Arktika	/	/	/	/	2,2	1	1,4	-
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	Soline	4,6	-	3,5	-	1,2	-	1,8	-
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	Soline	4,1	-	2,7	-	0,9	-	3,6	-
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	Soline	17,0	-	6,7	-	0,5	-	3,4	-
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	Soline	4,7	-	4,4	-	1,8	-	2,7	-
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	Nohti	5,5	-	6,9	-	0,8	-	2,1	-
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	Soline	7,2	-	5,2	-	1,6	-	2,1	-
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	Soline	7,9	1	5,7	1,5	2,1	-	11,4	-
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	Soline	2,8	-	2,7	-	4,4	-	3,9	-
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 / MZKI B736	Soline	4,6	-	1,4	-	0,9	-	2,8	-
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	Soline	6,1	-	2,9	-	0,5	-	4,0	-
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	Soline	1,2	-	2,6	-	0,8	-	2,7	-

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

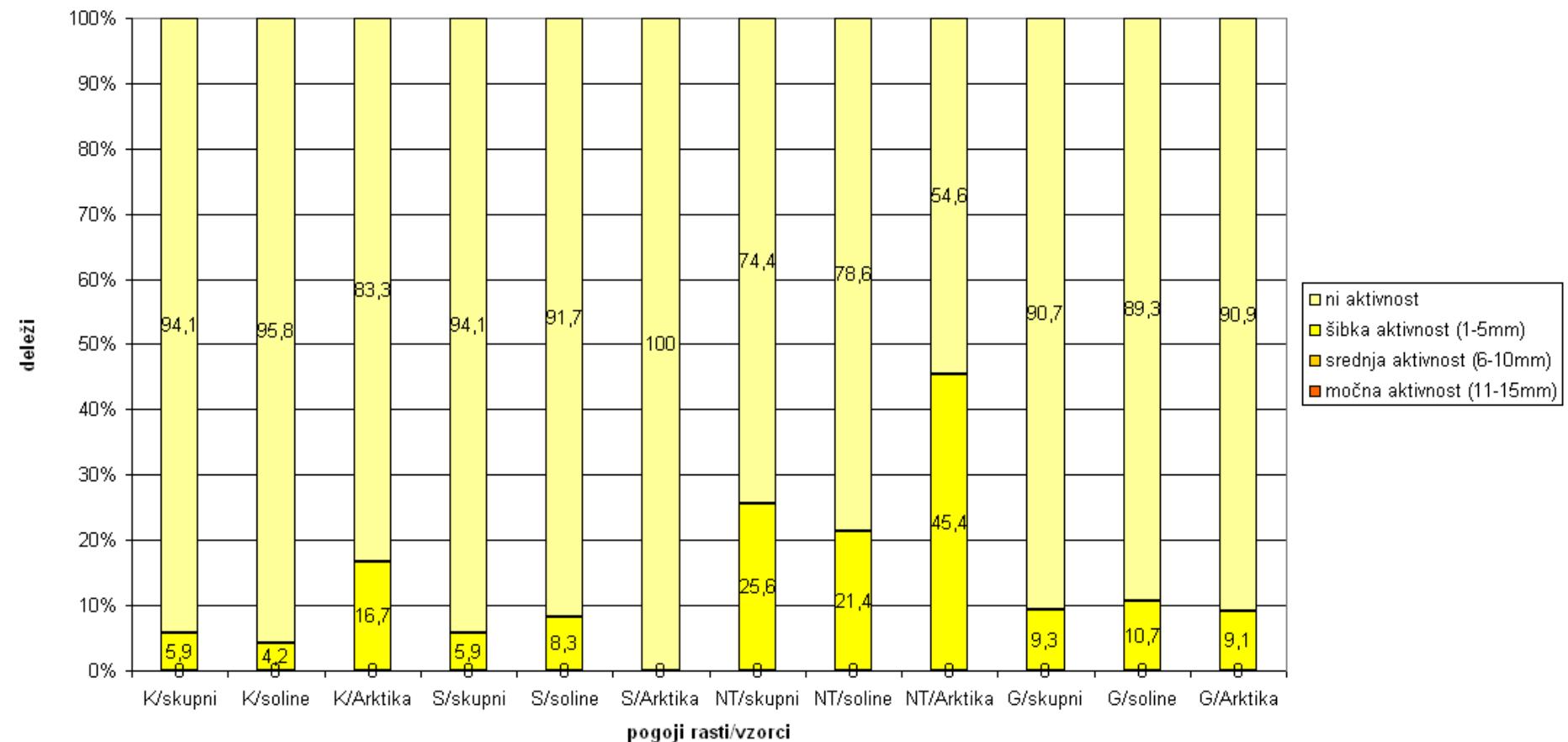
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

---

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	Soline	/	/	/	/	0,8	1	9,5	-
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	Soline	2,0	-	3,1	-	0,1	1	7,4	-
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	Soline	5,9	-	10,4	-	0,1	1	7,3	-
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	Soline	/	/	/	/	1,2	1	5,9	1
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Soline	1,6	-	1,8	-	0,9	1	2,7	1
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Soline	0,7	-	6,6	-	1,1	-	2,8	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Sončnično seme	4,7	-	0,6	-	0,2	-	1,2	-
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika	1,9	-	1,7	-	0,8	1	2,3	-
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika	2,4	-	0,6	-	3,7	2	2,3	-
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	Arktika	14,7	1	14,9	-	0,7	2	2,0	-
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	Soline	0,3	-	0,5	1,5	0,5	-	2,8	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	Arktika	2,2	-	1,0	-	0,6	-	4,4	-
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Soline	2,2	-	1,7	-	2,5	-	2,4	-
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika	1,9	-	7,4	-	0,6	-	1,5	-
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	Arktika	/	/	/	/	1,6	-	1,8	-
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	Soline	/	/	/	/	0,1	-	1,6	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	Arktika	/	/	/	/	1,0	-	1,7	-
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	Arktika	2,9	-	3,0	-	1,8	-	2,6	-
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	Soline	4,8	-	1,7	-	1,4	-	9,7	-
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	Kontrola	3,9	-	1,0	-	1,3	-	0,6	-

Graf 13 prikazuje deleže sevov glede na širino cone inhibicije *E.coli*, vseh acetonskih ekstraktov, acetonskih ekstraktov gliv izoliranih iz solin ter gliv izoliranih iz arktičnega ledu glede na pogoje rasti.

Iz grafa je razvidno, da v ekstraktih ni bilo prisotnih snovi z močno protibakterijsko aktivnostjo proti *E.coli*. Šibko aktivnost je kazalo le nekaj ekstraktov. Pri teh ekstraktih cona inhibicije ni bila širša od 5 mm.

**Graf 13: Deleži acetonskih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti *E.coli* glede na pogoje rasti gliv.**

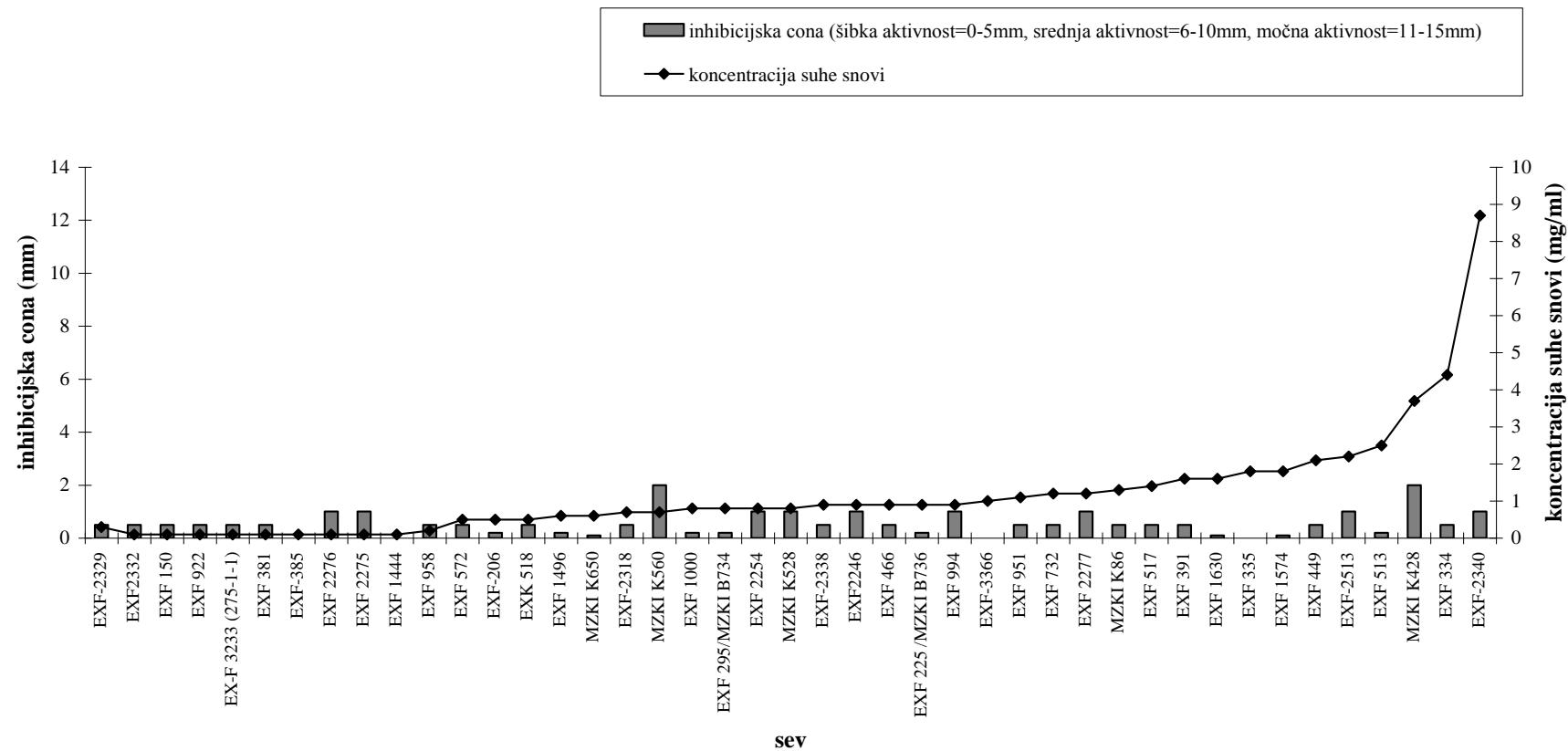
Legenda: K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze.

Graf 14 prikazuje širine inhibicijskih kon. pri testu na ploščah z *E.coli*, za acetonske ekstrakte gliv, ki so rasle pri nizkih temperaturah, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da ekstrakti niso imeli močne protibakterijske aktvinosti proti *E.coli*. Neaktivnost bi lahko bila posledica nizkih vsebnosti suhe snovi v ekstraktih.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



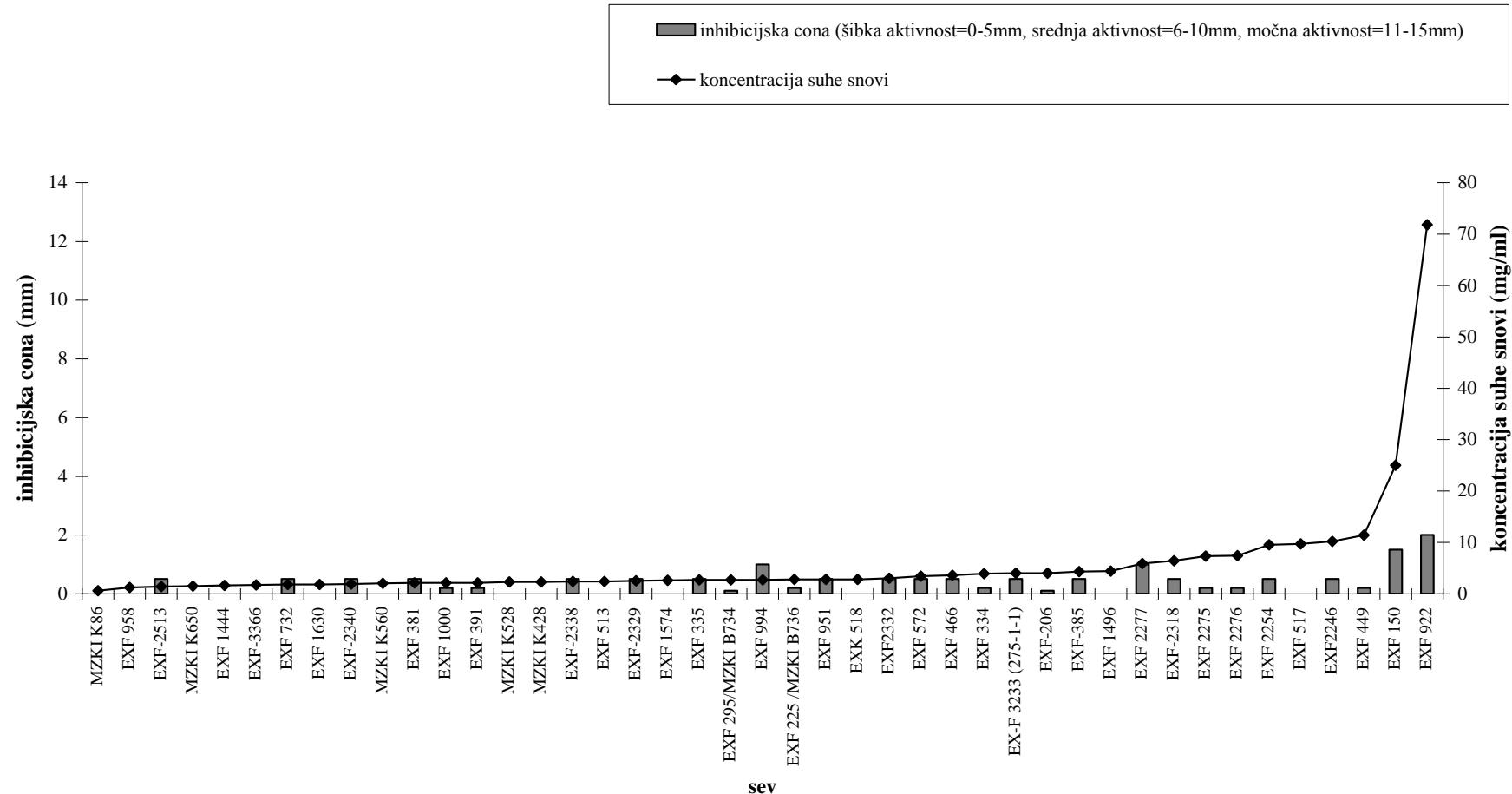
Graf 14: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *E.coli*.

Graf 15 prikazuje širine inhibicijskih kon. pri testu na ploščah z *E.coli*, za metanolne ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da ekstrakti niso imeli močne protibakterijske aktivnosti na *E.coli*.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Graf 15: Protibakterijska aktivnost acetonskih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *E.coli*.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

**Preglednica 11: Premeri inhibicijskih con metanolnih ekstraktov na ploščah z bakterijo *E.coli*.** CV koncentracija suhe snovi v poskusu. K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišča z visoko koncentracijo glukoze. \*ni podatkov za kontrolo. ? identifikacija ni gotova. / gliva v teh pogojih ni bila testirana. Z modro so označeni sevi izolirane iz solin, z zeleno sevi izolirane iz Arktike ter z rdečo sevi izolirane iz drugih okolij. V sivih poljih so navedeni rezultati za ekstrakte gliv, ki so rasle na gojišči s soljo, kolegice Miše Canjko.

Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2329	Soline	11,8	-	1,7	-	8,7	-	26,5	1
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF – 2318	Soline	7,6	-	25,9	-	10,4	-	7,6	-
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF – 2338	Soline	3,9	-	4,5	-	7,1	-	28,3	-
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF – 2332*	Soline	/	/	/	/	8,7	-	17,8	-
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF – 2340	Soline	12,3	-	28,1	-	5,5	-	23,7	-
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	Soline	14,7	-	65,8	-	6,3	-	47,0	-
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	Arktika	48,4	-	5,0	-	5,8	-	29,6	1
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275 – 1 – 1)	Japonsko morje, globina 4000 m	14,0	-	46,6	-	8,3	-	45,8	-
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	Soline	2,0	-	39,9	-	6,4	-	42,3	1
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ?	EXF 2246*	Arktika	/	/	/	/	6,4	-	42,6	1
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	Soline	13,4	-	28,8	-	10,1	-	53,0	1
12.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> ?	EXF-2513*	Arktika	/	/	/	/	7,3	-	16,7	-
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	Soline	14,0	-	30,7	-	8,0	-	24,1	-
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	Soline	25,1	-	35,1	-	10,9	1	28,2	1
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	Soline	65,3	-	63,8	-	6,4	-	22,7	1
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	Soline	9,2	-	18,1	-	5,2	-	37,3	1
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	Nohti	24,0	-	47,6	-	7,2	-	39,1	1
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	Soline	17,3	-	26,9	-	10,4	-	25,4	-
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	Soline	8,8	1	23,8	2	11,8	-	34,9	-
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	Soline	7,1	-	30,8	-	3,0	-	39,8	2
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225 / MZKI B736	Soline	8,5	-	71,2	-	11,4	-	30,2	1
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI 206	Soline	17,8	-	29,2	-	14,8	-	39,7	1
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	Soline	4,7	-	15,4	-	5,9	1	39,1	-

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

---

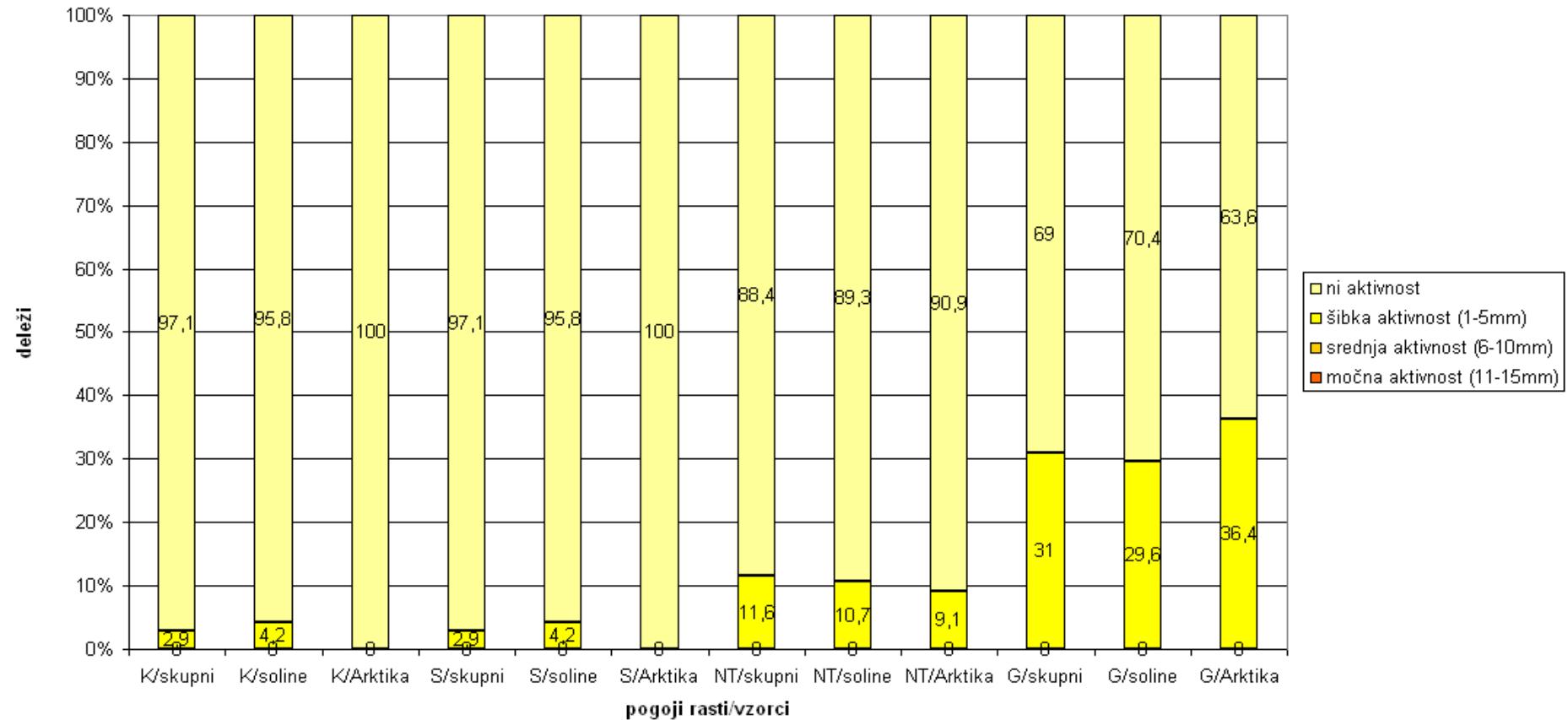
Št.	Vrsta	Sev		CV-K (mg/ml)	K (mm)	CV-S (mg/ml)	S (mm)	CV-NT (mg/ml)	NT (mm)	CV-G (mg/ml)	G (mm)
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*	Soline	/	/	/	/	5,2	-	36,3	-
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	Soline	7,7	-	20,2	-	3,5	-	26,6	-
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	Soline	10,4	-	18,2	-	14,6	-	86,3	-
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*	Soline	/	/	/	/	6,8	-	33,9	-
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	Soline	17,7	-	22,4	-	66,0	-	27,6	-
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Soline	13,6	-	23,6	-	15,0	-	15,5	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Sončnično seme	9,1	-	14,3	-	16,3	-	21,4	-
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	Arktika	8,6	-	11,3	-	9,3	-	12,4	-
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	Arktika	21,3	-	7,7	-	8,6	-	13,2	-
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	Arktika	3,5	-	10,7	-	10,4	-	18,2	-
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	Soline	19,3	-	14,7	-	16,6	-	26,3	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	Arktika	4,8	-	24,4	-	15,3	-	5,9	1
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	Soline	21,1	-	19,3	-	22,1	-	17,5	-
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	Arktika	22,2	-	3,1	-	8,4	-	44,0	-
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*	Arktika	/	/	/	/	5,3	-	16,9	1
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF – 1444*	Soline	/	/	/	/	13,7	-	15,8	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*	Arktika	/	/	/	/	12,1	-	18,5	-
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 1574	Arktika	14,8	-	23,7	-	5,4	1	31,2	-
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF – 517	Soline	19,4	-	16,0	-	5,3	1	13,9	-
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	Kontrola	7,8	-	7,1	-	3,2	1	12,2	-

Graf 16 prikazuje deleže sevov glede na širino cone inhibicije *E.coli*, vseh metanolnih ekstraktov, metanolnih ekstraktov gliv izoliranih iz solin ter gliv izoliranih iz arktičnega ledu glede na pogoje rasti.

Iz grafa je razvidno, da v ekstraktih ni bilo prisotnih snovi z močno protibakterijsko aktivnostjo proti *E.coli*. Šibko protibakterijsko aktivnosti smo zasledili le pri nekaterih ekstraktih. Pri teh ekstraktih cona inhibicije ni bila širša od 5 mm. Delež ekstraktov s šibko protibakterijsko aktivnostjo proti *E.coli* je večji pri ekstraktih arktičnih gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze v primerjavi z deležem ekstraktov s šibko protibakterijsko aktivnostjo pri drugih pogojih rasti.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



**Graf 16:** Deleži metanolnih ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo proti *E.coli* glede na pogoje rasti gliv.

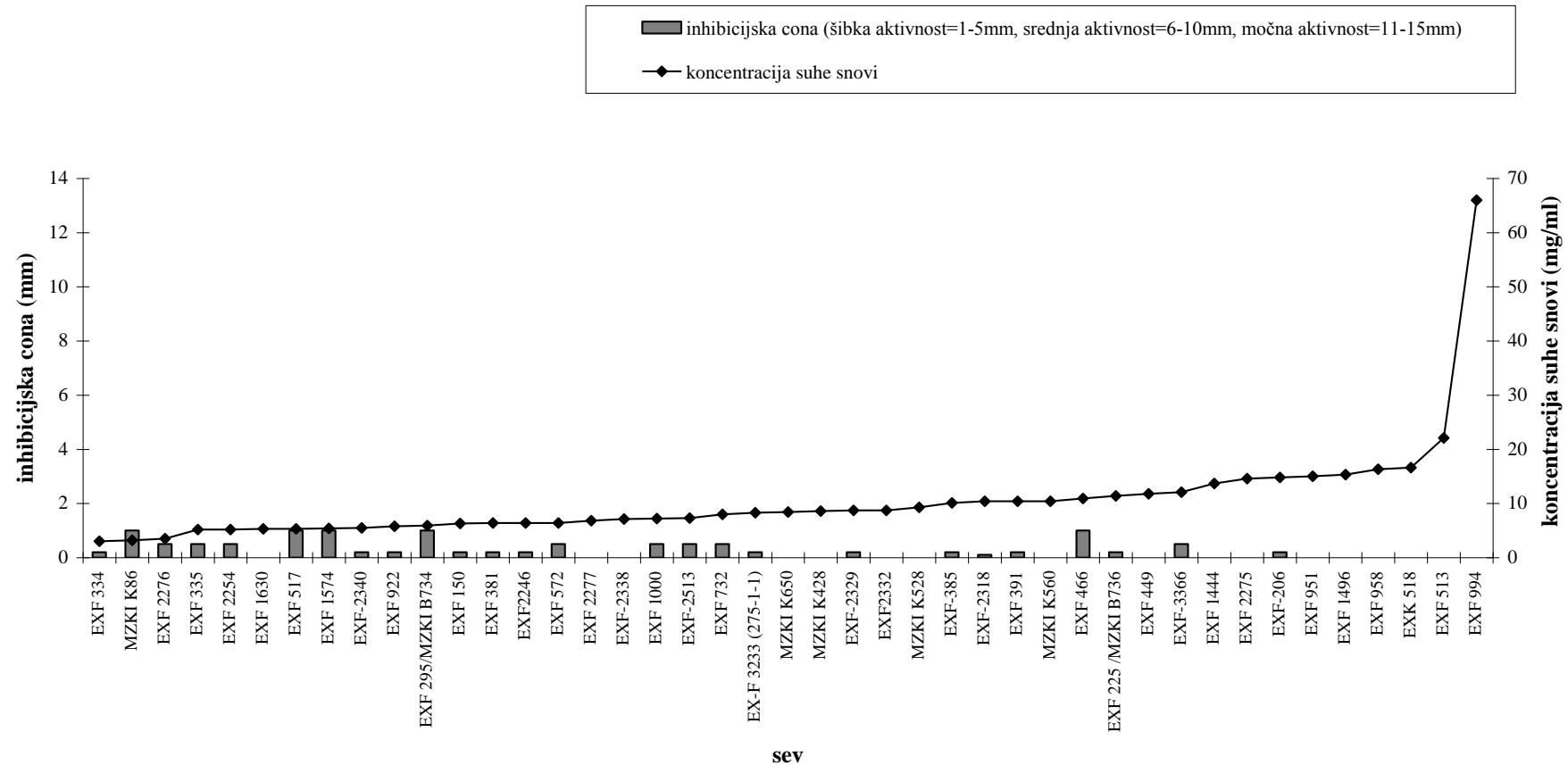
Legenda: K kontrolni pogoji. S gojišče s soljo. NT nizka temperatura. G gojišče z visoko koncentracijo glukoze.

Graf 17 prikazuje širine inhibicijskih cone pri testu na ploščah z *E.coli*, za metanolne ekstrakte gliv, ki so rasle pri nizkih temperaturah, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da ekstrakti niso imeli močne protibakterijske aktivnosti proti *E.coli*. Širina inhibicijske cone ekstraktov ni bila večja od 2 mm.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



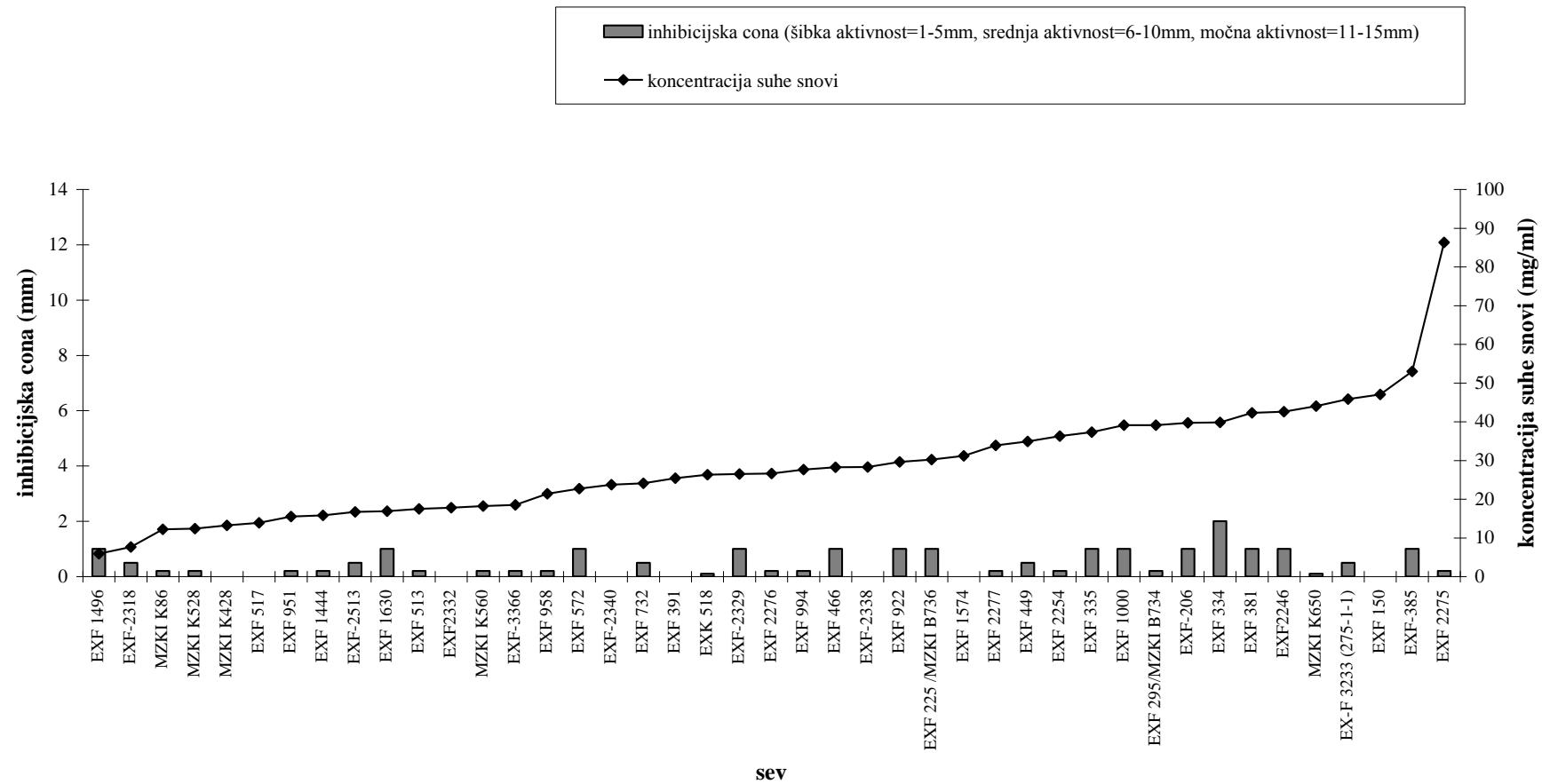
Graf 17: Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *E. coli*.

Graf 18 prikazuje širine inhibicijskih kon pri testu na ploščah z *E.coli*, za metanolne ekstrakte gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi.

Iz grafa je razvidno, da ekstrakti niso imeli močne protibakterijske aktvinosti na *E.coli*.

Horvat M. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Graf 18: Protibakterijska aktivnost metanolnih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi, proti *E.coli*.

#### **4.4 Rezultati testa inhibicije acetilholinesteraze**

Vzorci, ki smo jih testirali, niso inhibirali AChE, zato rezultatov nismo grafično prikazali.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 Razprava

Ekstremna okolja so dolgo veljala za habitate, kjer glice ne preživijo. Šele Gundcimerman in sodelavci so leta 1997 po vzorčenju različnih ekoloških niš v Sečoveljskih solinah ugotovili, da so glice v ekstremnem okolju solin ne le prisotne, temveč je njihova diverziteta zelo velika.

Glede na to, da so halofilne in halotolerantne glice iz naravnih okolij še precej slabo raziskane, v literaturi nismo zasledili veliko podatkov o njihovih bioaktivnih metabolitih. Največ podatkov o naravnih učinkovinah smo zasledili za rodova *Fusarium* in *Cladosporium*. Predvsem pri fitopatogenem rodu *Fusarium* je bilo opisanih več snovi, ki zavirajo rast nekaterih gliv, kar je pomembna prednost pri kompeticiji z drugimi glivami. Podatki o do danes odkritih učinkovinah so prikazani v preglednici 1.

V preteklosti je iskanje novih sekundarnih metabolitov temeljilo na naključnih presevnih raziskavah izoliranih sevov. Danes je pomembno, da iskanje sekundarnih metabolitov optimiziramo, pri čemer se je potrebno zavedati, da se lahko sinteza sekundarnih metabolitov razlikuje glede na ekološko nišo, v kateri organizem živi, ter glede na metabolne interakcije z okoljem (Schultz B. in sod. 2002). Nas je zanimal predvsem vpliv okolja, torej ekološke niše, na sintezo biološko aktivnih snovi. Osredotočili smo se na dva ključna pogoja, ki določata življenje: vodno aktivnost ter (nizko) temperaturo.

#### 5.1.1 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Ob primerjavi deležev sevov s hemolitično aktivnostjo (graf 1 za acetonske in graf 4 za metanolne ekstrakte) opazimo, da je bil delež ekstraktov kontrolnih gliv, ki so povzročali močno hemolizo, večji pri acetonskih kot pri metanolnih ekstraktih.

Delež ekstraktov, ki so povzročali močno hemolizo, se je pri stresnih pogojih pri metanolnih ekstraktih povečal glede na kontrolne pogoje. Delež metanolnih ekstraktov z močno hemolitično aktivnostjo je bil pri kontrolnih pogojih le 11,4 %, na gojiščih s soljo

13,9 %, medtem ko je bil delež ekstraktov z močno hemolitično aktivnostjo pri pogojih z nizko temperaturo 60,5 % in na gojiščih z visoko vsebnostjo glukoze 44,2 %. Povečan delež metanolnih ekstraktov z močno hemolitično aktivnostjo pri stresnih pogojih kaže na to, da imajo hemolitične snovi za glice fiziološki pomen pri teh pogojih oz. da ti pogoji sprožijo sintezo hemolitičnih snovi.

Opazili smo, da se je delež ekstraktov, ki so povzročali močno hemolizo, najbolj povečal pri glivah izoliranih iz Arktike, ki so rasle pri nizki temperaturi, in sicer pri ekstraktih pripravljenih iz obeh topil. Ker je zamrzovanje vode v polarnih predelih počasen proces, se fiziološko prilagajanje mikroorganizmov na zamrzovanje začne že pri temperaturah nad lediščem (Gunde-Cimerman in sod., 2002). Iz tega lahko sklepamo, da je sintetiziranje snovi, ki v ekstraktih povzročajo hemolizo, pri glivah izoliranih iz arktičnega ledu prilagoditev na nizke temperature.

Pri sevih vrste *Alternaria tenuissima* smo opazili pojav hemolize v metanolnih ekstraktih pri rasti na gojišču z visoko koncentracijo glikoze ter rasti pri nizki temperaturi. Hemolizo bi lahko povzročal kateri od že opisanih toksinov rodu *Alternaria* (preglednica 1). Alternariol, alternariol monometil eter, tenuazonična kislina in altenuen so toksini značilni za skladiščeno hrano (sadje in žita), ki jo poraščajo glice tega rodu. Ti toksini imajo citotoksičen učinek, ki je lahko posledica membranske aktivnosti, in so dobro topni v organskih topilih kot sta aceton in metanol. Sintetizira jih večina vrst iz rodu *Alternaria*. Vpliv  $a_w$  in temperature na sintezo mikotoksinov rodu *Alternaria* je bil raziskan in opisan pri vrsti *Alternaria alternata* (Magan in sod., 1984). Magan in sodelavci so ugotovili, da se z nižanjem temperature in  $a_w$  niža količina sintetiziranih toksinov ter da se njihovo razmerje spreminja. Pri mikotoksinih izoliranih iz gliv rodu *Alternaria* je bil opisan sinergični učinek med spojinama alternariol in alternariol monometil eter na inhibicijo *Bacillus mycoides* (Pero in sod. 1973). Hemoliza ekstraktov testiranih gliv, ki so rasle pri znižani vodni aktivnosti, je lahko posledica večje sinteze določenih toksinov (kar je ravno nasprotno trendu, ki ga je opisal Magan), lahko pa je hemoliza posledica sinergičnega učinka dveh ali več toksinov. Kaj je bil vzrok za hemolitično aktivnost naših ekstraktov nismo raziskali.

Halotoleranten rod *Aureobasidium* je sintetiziral hemolitične snovi pri različnih pogojih. Pri sevu EXF 922, izoliranem iz Arktike, se je hemoliza ekstraktov pripravljenih iz obeh topil pojavila le pri stresnih pogojih in ne tudi pri kontrolnih pogojih. Poleg kontrolnih pogojev je bil hemolitični test negativen še pri acetonskem ekstraktu gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, kar pa je verjetno posledica nizke koncentracije suhe snovi v vzorcu.

Pri vrsti *Cladosporium psychrotolerans* smo opazili, da so se hemolitične snovi sintetizirale le pri nizki temperaturi ter pri rasti na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze. Aktivni so bili tako acetonski, kot tudi metanolni ekstrakti. Pri vrsti *Cladosporium halotolerans* smo opazili, da so močno hemolitično aktivnost kazali le ekstrakti gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi. V literaturi nismo zasledili podatkov o snoveh, ki bi lahko povzročale hemolizo v ekstraktih te glive.

Med posameznimi testiranimi vrstami najbolj izstopa črna kvasovka *Hortaea werneckii*. Pri kontrolnih pogojih sev ni sintetiziral hemolitično aktivnih snovi, medtem ko so imeli hemolitično aktivnost vsi metanolni ekstrakti gliv, ki so rasle pri stresnih pogojih. *Hortaea werneckii* je halofilna gliva, katere ekološka niša so soline (Gunde-Cimerman in sod. 2000). Hemolitično aktivne snovi, ki se sintetizirajo pod določenimi pogoji bi lahko nakazovale ekofiziološki pomen (Frisvad in sod., 2006).

Vrsta *Wallemia sebi* je hemolitično aktivne snovi sintetizirala le pri nizki temperaturi (preglednici 6 in 7). Zaradi šibke rasti pri 4 °C smo gojišča po 3 tednih prestavili na sobno temperaturo. Hemolitično aktivne snovi so bile prisotne tako v acetonskih kot v metanolnih ekstraktih. Verjetno gre za isto snov, ki je topna v obeh topilih. V literaturi smo zasledili poročila o citotoksičnosti, ki jih povzročata snovi valeminol in valeminon. Citotoksičnost bi lahko bila posledica membranske aktivnosti teh opisanih snovi. Zaradi spremenjenih pogojev rasti ne moremo sklepati o vplivu temperature na sintezo hemolitično aktivnih snovi.

Poleg *W.sebi* smo testirali še dve vrsti tega rodu. Pri obeh smo uporabili gojišča z visoko koncentracijo glukoze v gojišču (preglednica 4). Pri vrsti *W.muriae* smo zasledili srednjo hemolitično aktivnost le pri metanolnem ekstraktu gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi

(10 °C). *W.ichthyophaga* je sintetizirala hemolitično aktivne snovi le pri visoki koncentraciji glukoze in temperaturi 30 °C. Acetonski ekstrakt teh gliv je imel močno hemolitično aktivnost, metanolni ekstrakt pa šibko, iz česar lahko sklepamo, da je snov, ki je povzročala hemolizo, bolj topna v acetonu kot v metanolu.

Trije od štirih testiranih sevov gliv iz rodu *Fusarium* so, za razliko od kontrolnih pogojev, pri stresnih pogojih sintetizirali hemolitično aktivne snovi topne v metanolu. Hemolizo bi lahko povzročala katera od že opisanih snovi s citotoksičnim delovanjem (preglednica 1).

Seva rodu *Cryptococcus* izolirana iz Arktike sta pri stresnih pogojih sintetizirala hemolitično aktivne snovi topne v metanolu. Hemolitično aktivna sta bila tudi acetonska ekstrakta gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi. Acetonski ekstrakt *C.albidus* je kazal šibko hemolitično aktivnost, kar pa je verjetno posledica nizke koncentracije suhe snovi v vzorcu. Hidroliza fosfolipidov je bila pri tem rodu opisana za vrsto *C.neoformans*, ki povzroča infekcije pljuč. Hidrolizo je pri tej vrsti povzročal encim fosfolipaza B (Himmelreich, 2003).

Zanimiva sta tudi seva gliv vrste *Candida parapsilosis*. Oba testirana seva sta pri nizkih temperaturah sintetizirala hemolitično aktivne snovi topne v obeh topilih. Sev izoliran iz solin je, tudi pri rasti na gojiščih z visoko koncentracijo glukoze, sintetiziral hemolitično aktivne snovi topne v acetonu. V literaturi nismo zasledili podatkov o snovi, ki bi lahko povzročala hemolizo.

Pri vrsti *Filobasidium floriforme* smo pri kontrolnih pogojih zasledili hemolitično aktivnost v ekstraktih pridobljenih z obema topiloma. Pri pogojih z nizko vodno aktivnostjo smo hemolitično aktivnost zasledili le še pri metanolnem ekstraktu gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi. Pri acetonskem ekstraktu gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi nismo zasledili hemolitične aktivnosti, kar pa je lahko posledica nizke vsebnosti suhe snovi v vzorcu.

### 5.1.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Protibakterijsko aktivnost smo testirali na *E.coli*, ki je po Gramu negativna bakterija, ter na *B.subtilis*, ki je po Gramu pozitivna bakterija. Če primerjamo rezultate testov za obe vrsti (grafi 7, 10, 13 in 16) ugotovimo, da večina preizkušenih vzorcev ni inhibirala rasti *E.coli* oz. je bila inhibicija rasti zelo šibka. Pri testu na ploščah z *B.subtilis* je rast šibko inhibiral večji delež vzorcev, vendar smo močno protibakterijsko aktivnost opazili le pri enem sevu.

Le pri ekstraktih seva vrste *Cladosporium spinulosum* smo zasledili cono inhibicije *B.subtilis* širšo od 10 mm. Snov, ki je inhibirala rast *B.subtilis* je bila prisotna tako v metanolnem kot tudi v acetonskem ekstraktu gliv, ki so rasle pri temperaturi 10 °C. Ekstrakti gliv, ki so rasle pri drugih pogojih so imeli inhibicijsko cono na *B.subtilis* manjšo od 5 mm. Pri rodu *Cladosporium* smo v literaturi zasledili dve snovi, ki sta imeli protibakterijsko aktivnost proti po Gramu pozitivni bakteriji *Micrococcus luteus* – sporiolid A in sporiolid B. Pri vrsti *C.herbarum* smo v literaturi zasledili tudi snov 5-hidroksimetilfuran-2-karboksilno kislino, ki zavira rast bakterij *B.subtilis* in *Staphylococcus aureus*. Morda bi katera od opisanih snovi lahko bila odgovorna za inhibicijo rasti *B.subtilis* v našem testu.

## 5.2 Sklepi

- glive pri stresnih pogojih (znižani  $a_w$  in nizki temperaturi) sintetizirajo več hemolitično aktivnih snovi topnih v metanolu;
- glive izolirane iz arktičnega ledu sintetizirajo več hemolitično aktivnih snovi, če rastejo pri nizki temperaturi, kot če rastejo pri ostalih pogojih;
- sevi vrste *Alternaria tenuissima* so sintetizirali hemolitično aktivne snovi topne v metanolu pri stresnih pogojih;
- *Hortaea werneckii* pri stresnih pogojih sintetizira hemolitične snovi topne v metanolu;
- pri glivah iz rodu *Fusarium* so stresni pogoji sprožili sintetizo hemolitično aktivne snovi;
- sev vrste *Cladosporium spinulosum* je pri nizki temperaturi sintetiziral snovi, ki so močno zavirale rast po Gramu pozitivne bakterije *B.subtilis*;
- nobena od testiranih vrst ni inhibirala encima AChE.

## 6 POVZETEK

Glive sintetizirajo bogat spekter različnih spojin, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov. Te spojine s pridom izkoriščajo v farmaciji in različnih industrijskih panogah.

Dolgo je veljalo mnenje, da v ekstremno slanih okoljih glice niso sposobne preživeti. Šele leta 1997 je bila opisana velika diverziteta vrst v ekstremnih okoljih, kot so naravne soline. Med opisanimi je bilo nekaj halotolerantih vrst, ki za preživetje sicer ne potrebujejo soli, vendar se lahko prilagodijo na širok razpon koncentracij soli od sladke vode do skoraj nasičene raztopine natrijevega klorida, nekatere – kot na primer *Hortaea werneckii* – pa celo bolje rastejo ob večjih koncentracijah soli, čemur pravimo halofilnost. Poleg ekstremno slanih okolij so bile glice izolirane tudi iz izjemno hladnih okolij, kot je na primer arktični led. V takih okoljih najdemo psihrotolerantne organizme, ki so sposobne rasti pri nizkih temperaturah. Visoka koncentracija topljenca (npr. soli ali sladkorja) in nizke temperature nižajo vodno aktivnost v okolju. Glivam, ki živijo v okoljih z nizko vodno aktivnostjo pravimo kserofilne ali kserotolerantne glice.

Glice iz ekstremnih okolij predstavljajo nov, še neraziskan vir biološko aktivnih snovi, ki bi lahko delovale kot potencialna zdravila, industrijski reagenti in drugo. V tej diplomski nalogi smo s pomočjo presevnih testov iskali biološko aktivne snovi pri 43 sevih, ki so bili izolirani iz solin ali arktičnega ledu, torej iz okolij z znižano vodno aktivnostjo. Glice, ki smo jih testirali, se uvrščajo v red Dothideales. Testirali smo hemolitično aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost na izbranih G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterijah. Glice smo gojili na gojišču YNB s 30 % glukoze (izjemoma z 40 ali 55 % glukoze) pri 30 °C ter na gojišču YNB z 2 % glukoze pri 4 °C (oz. 10 °C pri glivah, ki po treh tednih pri 4 °C niso rasle). Za ekstrakcijo glivnega materiala smo uporabili organski topili z različno polarnostjo – aceton in metanol.

Pridobljene rezultate smo primerjali z rezultati ekstraktov gliv, ki so rasle pri kontrolnih pogojih ter z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz izbranih gliv. Glede na to, da so halofilne in halotolerantne glice še dokaj neraziskan vir strukturno novih in biološko aktivnih spojin smo predvidevali, da bomo v pripravljenih organskih ekstraktih našli potencialno zanimive in še neopisane učinkovine.

Rezultati hemolitičnega testa so pokazali, da glive pri stresnih pogojih sintetizirajo več hemolitično aktivnih snovi. Ob primerjavi gliv izoliranih iz različnih okolij smo ugotovili, da glive izolirane iz arktičnega ledu, sintetizirajo več hemolitično aktivnih snovi pri nizki temperaturi kot pri ostalih pogojih. Sevi vrst *Alternaria tenuissima* in sev vrste *Hortaea werneckii* so pri stresnih pogojih sintetizirali hemolitične snovi topne v metanolu. Sintezo hemolitično aktivnih snovi so stresni pogoji sprožili tudi pri glivah iz rodu *Fusarium*. V literaturi smo zasledili podatke o citotoksičnih snoveh izoliranih iz rodov *Alternaria* in *Fusarium*. Citotoksične snovi bi lahko povzročale hemolizo celic. Ali je hemolizo v testiranih vzorcih povzročala katera od že opisanih snovi, nismo raziskali.

Med vsemi testiranimi glivami je le sev vrste *Cladosporium spinulosum* pri rasti pri nizki temperaturi sintetiziral snovi, ki so močno zavirale rast po Gramu pozitivnih bakterij vrste *B.subtilis*. Pri tej vrsti glive v literaturi nismo zasledili podatkov o snovi, ki bi lahko povzročala inhibicijo rasti vrste *B.subtilis*. Protibakterijska aktivnost na po Gramu pozitivno bakterijo *Micrococcus luteus* je bila opisana pri *Cladosporium sp.* Pri vrsti *C.herbarum* smo v literaturi zasledili tudi snov, ki zavira rast bakterij *B.subtilis* in *S.aureus*. Katera snov je povzročala protibakterijsko aktivnost pri našem sevu nismo raziskali.

Glive so kazale le šibko protibakterijsko aktivnost na po Gramu negativno bakterijo *E.coli*.

Nobena od testiranih vrst ni inhibirala encima AChE.

## 7 VIRI

Abdel-Lateff, A., Elkhayat, E.S., Fouad, M.A. in Okino, T. (2009) Aureobasidin, new antifouling metabolite from marine-derived fungus *Aureobasidium sp.* Nat Prod Commun 4(3). pp 389–94.

Bass D, Howe A, Brown N, et al (2007). Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. Proc. Biol. Sci. 274. pp 3069–77.

Belofsky G.N., Jensen P.R. and Fenical W. (1999). Sansalvamide: A new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*. Tetrahedron Letters 40, 15, pp 2913–2916.

Brauers G., Ebel R., Edrada R., Wray V., Berg A., Gräfe U. and Proksch P. (2001) Hortein, a New Natural Product from the Fungus *Hortaea werneckii* Associated with the Sponge *Aplysina aerophoba*. J. Nat. Prod., 64 (5), pp 651–652.

Brock, T.D. (1979) Ecology of saline lakes. In: Strategies of Microbial Life in Extreme Environments (Shilo, M., Ed.), pp. 29–47. Dahlem Konferenzen, Berlin.

Butinar, R., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren A. et Gunde-Cimerman N. (2005) Yeast diversity in hypersaline habitat. FEMS Microbiology Letters 244, pp 229–234.

Canjko, M.M. (2010). Biološko aktivne snovi v ograniskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani.

Chu M., Mierzwa R., Trumees I., Gentile F., Petel M., Gullo V., Chan T.M. and Puar M.S. (1993), Two novel diketopiperazines isolated from the fungus *Tolypocladium* sp. Tetrahedron Lett., 34, pp 7537–7540.

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

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric Biodetermination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, pp 88–95.

Evidente A., Conti L., Altomare C., Bottalico A., Sindona G., Segre A.L. and A. Logrieco (1994). Fusapyrone and deoxifusapyrone two antifungal-a -pyrones from *Fusarium semitectum*. Natural Toxins, 2, pp 4–13.

Frisvad J.C., Larsen T.O., Dalsgaard P.W., Seifert K.A., Louis-Seize G., Lyhne E.K., Jarvis B.B., Fettinger J.C. and Overy D.P. (2006) Four psychrotolerant species with high cemical diversity consistently producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp.nov., *Penicillium soppii* and *Penicillium lanosum*. Int J Syst Evol Microbiol. 56, pp 1427–1437.

Gai Y., Zhao L.L., Hu C.Q. and Zhang H.P. (2007). Fusarielin E, a new antifungal antibiotic from *Fusarium* sp., Chin. Chem. Lett. 18, 8, pp 954–956.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P. and Cimerman, A. (1997) Diversity of fungal community in high salt marine environments. Proceedings Int. Symp. Environ. Biotech. (ISEB), Oostende, pp 189–191.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., Plemenitaš A. (2000) Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiology Ecology. 32, 3, pp 235–240.

Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J.C., Diderichsen, B., Plemenitaš, A. (2002) xtremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. Phys. chem. Earth. 28, pp 1273–1278.

Hibbett D.S, Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O. E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., P. Matheny B., McLaughlin D. J., Powell M. J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J. W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y., Gams W., Geiser D.M, Griffith G.W., Gueidan

C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Koljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J. P., Schüßler A., Sugiyama J., Thorn R. G., Tibell L., Untereiner W. A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M. M., Winka K., Yao Y., Zhang N. 2007. A Higher-Level Phylogenetic Classification Of The Fungi. *Mycological Research*, 111, pp 509–547.

Himmelreich, U., Allen, C., Dowd, S., Malik, R., Shehan, B.P., Mountford, C., Sorrell, T.C. 2003. Identification of metabolites of importance in the pathogenesis of pulmonary cryptococcoma using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Microbes and infection*. 5(4) pp 285–290.

Jadulco R., Brauers G., Edrada R.A., Ebel R., Wray V., Sudarsono and Proksch P. (2002). New Metabolites from Sponge-Derived Fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *J. Nat. Prod.*, 65 (5), pp 730–733.

Jadulco R., Proksch P., Wray V., Sudarsono, Berg A. and Gräfe U. (2001). New Macrolides and Furan Carboxylic Acid Derivative from the Sponge-Derived Fungus *Cladosporium herbarum*. *J. Nat. Prod.*, 64 (4), pp 527–530.

Jiang, Z., Barret M.O., Boyd K.G., Adams D.R., Boyd A.S.F. and Grant Burgess J. (2002). JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species. *Phytochemistry*, 60, pp 33–38.

Jogan N. 2001. Navodila za vaje iz sistematske botanike. 3. Izdaja delovne verzije. Ljubljana. Str.25.

Kurtzman CP, Fell JW (2005). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (in: *The Yeast Handbook*, Gábor P, de la Rosa CL, eds.). Berlin: Springer. pp 11–30.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 2006. Yeast Systematics and Phylogeny—Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, *The Yeast Handbook*, Springer.

Magan N., Cayley G.R., Lacey J. 1984. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl Environ Microbiol.* 47(5), pp 1113–1117.

Müller M. 1992. Toxin-producing ability of molds of the genus *Alternaria*. *Zentralbl Mikrobiologie.* 147(3-4). pp 207–13.

Pero, R.W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D. in Spalding, J.W. (1973) Toxicity of metabolites produced by the “*Alternaria*”. *Environ Health Prospect*, 4, pp 87–94.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1985) *Fungi and Food Spoilage*, 1st edn. Academic Press, Sydney.

Renner, M. K., Jensen P.R., and Fenical W. (1998), Mangicols: structures and biosynthesis of A new class of sesterterpene polyols from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *J.Org.Kem.*, 63. pp 4843–52.

Renner, M. K., Jensen P.R., and 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, pp 4843–4852.

Sakaki, H., Kaneno H., Sumiya Y., Tsushima M., Miki W., Kishimoto N., Fujita T., Matsumoto S., Komemushi S. and Sawabe A. (2002). A New Carotenoid Glycosyl Ester Isolated from a Marine Microorganism, *Fusarium* Strain T-1 *J. Nat. Prod.*, 65, pp 1683–1684.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2000) *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, p. 389.

San Martín, A., Painemal, K., Díaz, Y., Martínez C., Rovirosa, J. (2005) Metabolites From The Marine Fungus *Cladosporium cladosporioides*. *An. Asoc. Quím. Argent.* 93, pp 46.

Schultz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A.-K. and Krohn K. (2002) Endopytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol.Res.* 106, pp 996-1004.

Scott, P.M., van Walbeek, W., Maclean, W.M. (1971) Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporoides*. The Journal of Antibiotics, 24 (11), pp 747–755.

Shigemori H., Tenma M., Shimazaki K. and Kobayashi J. (1998) Three New Metabolites from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*. J. Nat. Prod., 61 (5), pp 696–698.

Shigemori H., Kasai Y., Komatsu K., Tsuda M., Mikami Y. and Kobayashi J. (2004) Sporiolides A and B, New Cytotoxic Twelve-Membered Macrolides from a Marine-Derived Fungus *Cladosporium* Species Mar. Drugs, 2(4), pp. 164–169.

Smith, J.C., Abbanat D., Bernan V.S., Maiese W.M., Greenstein M., Jompa J., Tahir A. and Ireland C.M. (2000) Novel Polyketide Metabolites from a Species of Marine Fungi. J. Nat. Prod., 63, pp 142–145.

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, pp 1312–1313.

Wood GM, Mann PJ, Lewis DF, Reid WJ, Moss, MO (1990). Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. Food Additives and Contaminants 7, pp 69–77.

Zalar, P. (1999) Halofilne črne kvasovke v vodah solin. Magistersko delo, biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.

Zalar, P. (2006) Sistematika halofilnih gliv rodov *Cladosporium*, *Wallemia*, *Emericella* in črnih kvasovk rodu *Dothidales*. Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.

## ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Kristini Sepčić za strokovno vodenje, spodbudo ter optimizem in prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za strokovno vodenje in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala vsem asistentom in tehnikom iz laboratorijs Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov ter Katedre za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete za pomoč in vodenje pri praktičnem delu diplomske naloge.

Doc. Dr. Jerneji Ambrožič Avguštin se zahvaljujem za hiter pregled diplomske naloge.

Hvala sestri Katji za lektoriranje diplome in spodbudo tekom študija.

Velika zahvala je namenjena mojim staršem ter babici in dedku za potrpežljivost, zaupanje in finančno podporo.

Hvala mojim sošolkam za pomoč, spodbudo, motivacijo in druženje v času študija.

Hvala Barbari za moralno podporo.

Predvsem pa hvala tebi Matej, da verjameš vame in me spodbujaš na moji poti.