

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katarina KONDA

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH
NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOLOGICAL ACTIVITIES IN ORGANIC EXTRACTS OF SOME
HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Komisija za dodiplomski študij univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je imenovala za mentorico prof. dr. Kristino Sepčić in za somentorico prof. dr. Nino Gunde-Cimerman.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora: 13.5. 2010

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana Katarina Konda 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 verziji, identična tiskani verziji.

Katarina Konda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	577.2:582.28(043.2) = 163.6
KG	Halofilne in halotolerantne glice/organski ekstrakti/biološko aktivne snovi/hemoliza/inhibicija acetilholinesteraze/protibakterijska aktivnost
AV	KONDA, Katarina
SA	SEPČIĆ, Kristina (mentor); GUNDE-CIMERMAN, Nina (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 51 str., 10 pregl., 6 sl, 2 pril., 64 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Od šestdesetih let prejšnjega stoletja je morje postalo nov do tedaj še neraziskan vir neznanih in potencialno uporabnih spojin, kar pa niti ni presenetljivo saj voda predstavlja več kot 70 % površine Zemlje. Raziskovalci so se sprva usmerili v bakterije in alge, kasneje tudi v spužve, korale, mehkužce in glice. Za slednje so mislili, da ne naseljujejo naravnih slanih okolij, a so raziskave potrdile njihovo prisotnost. Sposobne so prilagoditve na specifične razmere, predvsem na povišano slanost in zmanjšano vodno aktivnost. Zato jih uvrščamo med halofilne in halotolerantne glice. V naši raziskavi smo preučevali biološko aktivnost etanolnih in acetonskih ekstraktov 39 sevov gliv redu <i>Eurotiales</i> in <i>Saccharomycetales</i>, pridobljenih povečini s solin po svetu in iz Arktike. Seve smo gojili na gojišču YNB in gojišču YNB z 10 % NaCl, saj nas je zanimal vpliv soli na biološko aktivnost sevov. Testirali smo hemolitično aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze (AChE) in protibakterijsko aktivnost proti po Gramu negativni bakteriji <i>Escherichia coli</i> in po Gramu pozitivni bakteriji <i>Bacillus subtilis</i>. Organski ekstrakti so bili izjemno aktivni, saj je vsaj eno od aktivnost izražalo 38 sevov. Hemoliza se je pojavila pri 69 % sevov (pri sevih <i>Emericella stella-maris</i>, <i>Emericella discophora</i> in <i>Penicillium expansum</i> celo pri vseh testiranih ekstraktih). Encim acetilholinesterazo so inhibirali sledeči sevi vrst: <i>Aspergillus tubingensis</i>, <i>Emericella stella-maris</i>, <i>Em. discophora</i>, <i>Eurotium amstelodami</i>, <i>Eu. herbariorum</i>, <i>Eu. repens</i> in <i>Penicillium polonicum</i>. Protibakterijsko aktivnost proti vrsti <i>Escherichia coli</i> smo zaznali pri 74 % sevov, proti <i>Bacillus subtilis</i> pa pri 56 %. Med aktivnimi sevi je bilo 12 takšnih, ki so imeli močno protibakterijsko aktivne ekstrakte. Te smo zato redčili v razmerju 1:10 in 1:100 ter jih ponovno testirali. Biološko aktivnost preiskovanih sevov je dodatek soli največkrat zmanjšal.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.2:582.28(043.2) = 163.6
CX Halophilic and halotolerant fungi/organic extract/biologically active compounds/hemolysis/acetylcholinesterase inhibition/antibacterial activity
AU KONDA, Katarina
AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor); GUNDE-CIMERMAN, Nina (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2010
TI BIOLOGICAL ACTIVITIES IN ORGANIC EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 51 p., 10 tab., 6 fig., 2 ann., 64 ref.
LA Sl
AL sl/en

Since 1960s, sea has became a new and still underexploited resource of unknown and potentially useful compounds. This fact is hardly surprising if one takes into consideration that water represents more than 70 % of the Earth's surface. The researchers had initially focused on marine bacteria and algae, and later also on sponges, corals, molluscs and fungi. Fungi were initially considered not able to inhabit the natural saline environments but studies have confirmed them. They are able to adapt to conditions of increased salinity and decreased water activity. Because of this they are considered to be halophilic or halotolerant fungi. In our study, we studied the biological activity of ethanol and acetone extracts of 39 strains of fungi from the orders *Eurotiales* and *Saccharomycetales*. Most of them have been isolated from the salterns around the world, and from the Arctic environment. Each strain was grown on YNB medium, and on YNB medium with added 10% NaCl, since we were interested in the impact of NaCl on the biological activity of the strains. We tested hemolytic activity, inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and antibacterial activity against Gram-negative bacterium *Escherichia coli* and Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Organic extracts have proven to be extremely active since 38 strains exerted at least one activity. Hemolysis occurred in 69 % of the strains (*Emericella stella-maris*, *Emericella discophora* and *Penicillium expansum* exerted it in all tested extracts). Acetylcholinesterase inhibition was achieved by *Aspergillus tubingensis*, *Emericella stella-maris*, *Em. discophora*, *Eurotium amstelodami*, *Eu. herbariorum*, *Eu. repens*, and *Penicillium polonicum*. Antibacterial activity against *Escherichia coli* was present in 74 % of the strains, and against *Bacillus subtilis* in 56 % of strains. Twelve out of active strains had strong antibacterial activity. They were subsequent diluted at ratios of 1:10 and 1:100 before they were tested. Biological activity of the investigated strains decreased with addition of salt.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key Words Documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli.....	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI GLIV	3
2.2 BIOLOŠKO AKTIVNI SEKUNDARNI PRODUKTI GLIV.....	5
2.3 VPLIV SEKUNDARNIH PRODUKTOV GLIV NA ŽIVLJENJE LJUDI	6
2.4 GLIVE V OKOLIJAH S POVIŠANO SLANOSTJO	7
2.4.1 Vodna aktivnost	7
2.4.2 Slana okolja	7
2.4.3 Halofilne in halotolerantne glive	8
2.4.4 Prilagoditve gliv na povišano slanost	9
2.5 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	10
2.5.1 Namen dela	10
2.5.2 Hipoteza	10
3 MATERIAL IN METODE.....	11
3.1 SEZNAM PREUČEVANIH GLIV	11
3.2 MATERIAL	12
3.2.1 Gojišča in raztopine	12
3.2.2 Kemikalije	13
3.2.3 Laboratorijska oprema	13
3.3 METODE	14
3.3.1 Priprava gojišča in rast sevov	14

3.3.2	Priprava organskih ekstraktov	15
3.3.3	Določevanje suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih	15
3.3.4	Testi za določanje biološke aktivnosti	16
3.3.4.1	Test hemolitične aktivnosti	16
3.3.4.2	Test inhibicije acetilholinesteraze (AChE)	16
3.3.4.3	Test protibakterijskih aktivnosti	17
4	REZULTATI	19
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V VZORCIH	19
4.2	HEMOLITIČNA AKTIVNOST	22
4.3	INHIBICIJA ACETILHOLINESTERAZE	26
4.4	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	27
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.1.1	Rast	32
5.1.2	Priprava organskih ekstraktov	33
5.1.3	Določanje koncentracije suhe snovi v vzorcih	33
5.1.4	Hemolitična aktivnost	34
5.1.5	Inhibicija acetilholinesteraze	36
5.1.6	Protibakterijska aktivnost	36
5.1.7	Pregled vseh bioloških testov	38
5.2	SKLEPI	40
6	POVZETEK	42
7	VIRI	44

ZAHVALA

**PRILOGA A: NARAVNI PRODUKTI OBRAVNAVANIH RODOV GLIV IZ
NARAVNIH SLANIH HABITATOV DO KONCA LETA 2010**

**PRILOGA B: FOTOGRAFIJE OBRAVNAVANIH RODOV GLIV V
STACIONARNI FAZI RASTI**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrednosti vodne aktivnosti (a_w)	7
Preglednica 2: Seznam preučevanih gliv z originalno oznako in mestom vzorčenja.....	11
Preglednica 3: Gojišča in raztopine.	12
Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij.	13
Preglednica 5: Seznam uporabljene laboratorijske opreme.....	13
Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v organskih ekstraktih gliv, obravnavanih v diplomski nalogi.	20
Preglednica 7: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov gliv, obravnavanih v diplomski nalogi.	23
Preglednica 8: Inhibicija acetilholinesteraze v organskih ekstraktih sevov gliv, obravnavanih v diplomski nalogi.	26
Preglednica 9: Protibakterijska aktivnost organskih ekstraktov sevov gliv, obravnavanih v diplomski nalogi, proti sevoma <i>Escherichia coli</i> (Ec) in <i>Bacillus subtilis</i> (Bs).....	29
Preglednica 10: Redčitve 14 močno protibakterijsko aktivnih organskih ekstraktov	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Koncentracija suhe snovi v ekstraktu sevov gliv, obravnavanih v diplomski nalogi.....	21
Slika 2: Hemolitična aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi (mg/ml) v organskih ekstraktih sevov gliv, ki so rastli na gojiščih YNB.....	24
Slika 3: Hemolitična aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi (mg/ml) v organskih ekstraktih sevov gliv, ki so rastli na gojiščih YNB z NaCl (Y+10).....	24
Slika 4: Razporeditev 39 sevov gliv, obravnavanih v diplomski nalogi, v skupine glede na hemolitično aktivnost ekstraktov posameznega seva.....	25
Slika 5: Protibakterijska aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi v ekstraktih sevov gliv pridobljenih na YNB gojiščih.....	30
Slika 6: Protibakterijska aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi v ekstraktih sevov gliv pridobljenih na gojiščih z NaCl (Y+10).....	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

YNB A	acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na YNB gojišču
YNB E	etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na YNB gojišču
Y+10 A	acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču z dodanim 10-odstotnim natrijevim kloridom
Y+10 E	etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču z dodanim 10-odstotnim natrijevim kloridom
a_w	vodna aktivnost
S.S.	koncentracija suhe snovi
H	hemoliza
AChE	acetilholinesteraza
Ec	širina inhibicijske cone pri protibakterijskem testu proti <i>Escherichia coli</i>
Bs	širina inhibicijske cone pri protibakterijskem testu proti <i>Bacillus subtilis</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija, oz. najnižnja koncentracija aktivne snovi, ki še vedno inhibira rast bakterij

1 UVOD

Glice, obsežna evkariontska skupina organizmov, predstavljajo le del biosfere, a je njihov vpliv opazen tako v življenjskih okoljih ljudi kot v naravnih okoljih. Med in predvsem proti koncu rasti glic nastajajo spojine, nepotrebne za rast ali energijsko zalogo, vendar potencialno toksične za rastline, živali ali mikroorganizme. Večino teh snovi imenujemo sekundarni produkti in so kemično steroidi, karotenoidi, alkaloidi, ciklopeptidi, kumarini in podobne spojine (Samson in sod., 2004). Sekundarni produkti pogosto služijo kot obramba in s tem povečajo možnosti preživetja glic. Odpornost napadenega je naraven evolucijski odgovor, odvisen od prisotnosti teh snovi.

Raznoliki habitat s specifičnimi razmerami (predvsem s skrajnostnimi temperaturami, pH, sevanjem, pritiskom, slanostjo, izsuševanjem ...) so naseljeni z visoko specializiranimi organizmi – ekstremofili, ki morajo premostiti stresne razmere. Naravni slani habitat, kot je morje, so bogat vir makro- in mikroorganizmov, ki sintetizirajo nove in farmakološko aktivne produkte (Bhadury in sod., 2006; Faulkner, 2000; Donia in Hamann, 2003). Organizmi s kopnega ali sladkih voda so lahko prisotni v solinah in morju, a v slednjem niso sposobni preživeti daljšega časovnega obdobja. Zaradi sposobnosti prenašanja znižane vodne aktivnosti okolja, na račun povečane koncentracije soli, uvrščamo večino glic iz hiperslanih okolij med halotolerantne ali halofilne.

Biološko aktivne seve redu *Saccharomycetales* in predvsem redu *Eurotiales* že od odkritja antibiotika penicilina izkoriščamo v svojo korist. V literaturi zasledimo vrsto bioloških aktivnosti teh vrst: protimikrobeno (delovanje proti bakterijam, glicam, virusom, praživalim) (Bugni in Ireland, 2004; Casas in sod., 2004; Sonjak, 2007), citotoksično (Lin in sod., 2009), hemolitično (Anzai in sod., 2008), genotoksično (Wang in Groopman, 1999), imunosupresivno (Kerzaon in sod., 2008), inhibitorno delovanje na encime (Gamal-Eldeen in sod., 2009), antioksidativno (Sun in sod., 2009) in zaviralno na rast rakastih celic (Bringmann in sod., 2005). V naši raziskavi smo se odločili za iskanje protibakterijsko aktivnih učinkovin (proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* in po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*), hemolitičnih učinkovin in inhibitorjev encima

acetilholinesteraze v organskih ekstraktih halofilnih in halotolerantnih gliv, ki pripadajo tem redovom. Za primerjavo smo seve gojili na dveh gojiščih, in sicer na gojišču s soljo NaCl in brez nje, kajti zanimalo nas je, kako bo sol vplivala na biosintezo biološko aktivnih metabolitov. Pričakovali smo, da bo povečana slanost spremenila aktivnost prilagojenih halofilnih in halotolerantnih sevov, kakor tudi, da bomo odkrili nove in potencialno uporabne učinkovine primerne za nadaljne raziskave.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI GLIV

Glive so evkariontski organizmi in trenutno je znanih okrog 70000 vrst (Mueller in Schmitt, 2006). Ocena števila vseh vrst, vključno z neodkritimi, se giblje okoli 1,5 miljona (Hawksworth, 2001). Nove molekularne metode so povzročile spremembe taksomske razvrstitev znotraj kraljestva gliv (Hibett in sod., 2007). Prave glive uvrščamo v deblo *Fungi (Eumycota)*.

Organizacijsko je steljka glive enocelična ali večcelična. Enocelične kvasovke (kot je *Saccharomyces cerevisiae*) so večinoma ovalne oblike, 5-10 µm v premeru, druge (kot je *Schizosaccharomyces pombe*) pa so lahko bolj podolgovate oblike, premera 5 µm (Carlile in sod., 2001). Telo večceličnih gliv, ki mu pravimo micelij, je sestavljen iz prepleta tubularnih filamentov ali hif. Hife so lahko s septami razdeljene v ločene celice ali pa so brez sept in enotne. Rizoidi so modificirane hife, s katerimi se lahko glive pritrdijo na podlogo. Konidiofori so hife, ki izraščajo iz micelija. Na njih nastajajo konidiji ali spore. Glivni micelij ima v primerjavi z večino mnogoceličnih organizmov veliko razmerje med površino in volumnom, kar je posledica težnje po izboljšani absorpciji potrebnih snovi (Purves in sod., 2004). Pri pravih glivah se lahko iz podzemnega micelija razvije nadzemno plodišče s spolnimi sporami. Hife imajo lahko eno ali več jeder. V celicah gliv so pogosto opazne vakuole, v citoplazmi so prisotni plazmidi, mitohondriji, ribosomi, mikrotuboli in endoplazmatski retikel (Carlile in sod., 2001). Skupna vsem glivam sta ergosterol v membrani in hitin v celični steni. Hitin je polisaharid, sestavljen iz monomernih enot N-acetylglukozamina, ki se pojavlja tudi v zunanjih skeletih žuželk, pajkov in ostalih členonožcev.

Glive so heterotrofi, ki pridobijo hrano z absorpcijo direktno iz okolja. Saprofotne glive so poleg bakterij glavni razkrojevalci v biosferi. Prisotne so v lesnih substratih, zemlji, odpadnih listih in v mrtvih živalih. Glice tvorijo mutualistična razmerja z rastlinami v obliki mikorize. Z algami in cianobakterijami pa so del lišajev. Parazitske glive povzročajo rastlinske bolezni in mikoze pri živalih. Ogljik glive pridobijo iz sladkorjev ali proteinov.

Vir dušika so proteini, nitrati ali ioni amoniaka. Večina gliv ni sposobna sinteze vitamina B1 (tiamina) in biotina. Za rast potrebujejo tudi žveplo, kalij, kalcij, magnezij, železo, baker, mangan, cink in molibden. Najbolj specializirane prehrambene zahteve imajo fakultativni paraziti (Purves in sod., 2004). Rezervne snovi gliv so glikogen, maščobe in še nekatere druge spojine, nikoli pa škrob.

Razmnoževanje gliv je raznovrstno. Vegetativno brstijo in se razraščajo. Konidiji so spore, ki nastanejo z mitozo in so oblika nespolnega razmnoževanja. Pri spolnem razmnoževanju pride do združitve dveh enoceličnih gamet (gametogamija) ali dveh gametangijev (oblika hif) (gametangiogamija), ali dveh somatskih celic hif (somatogamija). Pri nekaterih vrstah združitev med enakimi t.i. paritvenimi tipi (»mating types«) oz. med genetsko identičnimi micelijimi ni možna, s tem se preprači samo-oploditev organizma (Purves in sod. 2004). Za spolno razmnoževanje je značilna sprememba ploidnosti, ko pride do nastanka diploidne zigote, v kateri poteče mejoza in nastanejo haploidne spore (askospore pri zaprtotrošnicah). Spolno razmnoževanje se lahko začne z nastankom dikariona oz. heterokariona, pri katerem je prišlo do združitve citoplazme, ne pa še do združitve jeder dveh celic hif (Purves in sod. 2004). Menjava generacij se pojavlja med spolno obliko (telomorfom) in nespolno obliko (anamorfom). Generaciji so pogosto opisali kot ločeni vrsti. Pri številnih skupinah obstaja le nespolno razmnoževanje, spolno je nepoznano oziroma je spolni rod izumrl. Anamorfna oblika oz. rod *Aspergillus* ima telomorfne robove *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya*, *Finnellia*, *Hemicarpenteles*, *Chaetosartorya*, *Petromyces* in *Sclerocleista*. Vrstem znotraj rodu *Penicillium* pripadajo telomorfi rodov *Eupenicillium* in *Talaromyces* (Samson in sod., 2004). Podatki kažejo, da so telomorfe našli le pri 70 od približno 180 vseh opisanih vrst iz rodu *Aspergillus* (Samson in sod., 2004).

Glive najdemo po vsemu svetu v raznovrstnih habitatih. Med drugim živijo v puščavah, v morskih globinah (Damare in sod., 1998), okoljih z visoko vsebnostjo soli (Gunde-Cimerman in sod., 2000), v habitatih z ekstremno nizkimi in visokimi temperaturami. Nekatere vrste gliv naj bi bile sposobne preživeti potovanje v vesolju, bodisi kot del lišajev ali kot samostojni organizmi (Onofri in sod., 2008).

2.2 BIOLOŠKO AKTIVNI SEKUNDARNI PRODUKTI GLIV

Biološko aktivni sekundarni produkti so spojine z nizko molekulsko maso, ki jih sintetizira ena ali nekaj vrst organizmov. Najpogosteje so dobri producenti sekundarnih metabolitov rastline, glice, lišaji (del katerih so glice) in aktinomicete, medtem ko so kvasovke, protozoji in živali manj učinkoviti producenti (Frisvad in sod., 2008). To ne drži vedno, saj se pojavljajo nekatere izjeme, npr. spužve, ki proizvajajo vrsto sekundarnih metabolitov (Sepčić in sod., 1997). Karakteristični naravni produkti katerekoli vrste se pogosto konstantno izražajo (Larsen in sod., 2005) in se zato skupaj z morfološkimi značilnostmi lahko uporablja za identifikacijo gliv (Frisvad in sod., 2008). Primer je vrsta *Penicillium expansum*, kjer vsi sevi sintetizirajo hetoglobozin A in komunezin B, 98 % sevov je proizvaja patulin in rokvefortin C, v 85 % sevov pa je zaznan citrinin (Andersen in sod., 2004).

Naravne produkte nitastih gliv sta Hoffmaister in Keller (2005) glede na njihovo biosintezo razdelila v tri skupine. Prva skupina so poliketidi in derivati maščobnih kislin, kamor uvrščamo npr. aflatoksine, ohratoksine, pigmente spor in hif, lovastatin, kompaktin in oksilipin. Med ne-ribosomske peptide in derivate aminokislin uvrščamo penicilin, cefalosporin, ciklosporin, gliotoksin, terekvinon, peptaibole in nekatere alkaloide (npr. ergot alkaloide). Ostane še skupina terpenov, kamor spadajo giberelini, indol diterpeni, karotenoidi itd.. Veliko večino sekundarnih produktov lahko razdelimo glede na razlike v kemični zgradbi na steroide, karotenoide, alkaloide, ciklopeptide in kumarine (Samson in sod., 2004).

Po predvidevanjih so se določeni sekundarni produkti razvili večkrat, kot npr. polipeptid griseofulvin, ki se je pojavil trinajstkrat, neodvisno skozi evolucijo, in sicer največkrat znotraj rodu *Penicillium* (Larsen in sod., 2005). Producija sekundarnih produktov je povezana s sporulacijo (Calvo in sod., 2002), kakor prikazuje primer raziskave pri vrsti *Aspergillus nidulans*, kjer so ugotovili vpliv linoleinske kisline na razmerje med produkcijo konidijev in askospor (Calvo in sod., 2001). Zmanjšana sinteza melanina zmanjša virulenčno sposobnost vrste *Aspergillus fumigatus* (Tsai in sod., 1998). Sekundarni produkti organizmov naj bi služili kot kompetitivno orožje proti bakterijam,

glivam, amebam, rastlinam in živalim. Lahko se rabijo tudi kot prenašalci kovin, kot posredniki simbioze med mikroorganizmi in drugimi organizmi, kot spolni hormoni ali kot diferenciacijski efektorji (Demain in Fang, 2000).

V prilogi A je pregled literature novih produktov obravnavanih rodov gliv iz naravnih slanih habitatov (predvsem iz morja) do konca leta 2010.

2.3 VPLIV SEKUNDARNIH PRODUKTOV GLIV NA ŽIVLJENJE LJUDI

Vrste rodu *Aspergillus* in *Penicillium* so v biotehnologiji poleg kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* najpomembnejše. V proizvodnji sirov sta poleg kvasovk prisotna še *Penicillium roqueforti* in *Penicillium camemberti*, ki prispevata k okusu in teksturi. *Aspergillus oryzae* se uporablja pri proizvodnji sojine omake. Citronska kislina, ki je tudi v sadju in se uporablja za izboljšanje okusa ter kontrolo pH-vrednosti hrane in pijač, je produkt fermentacije vrste *Aspergillus niger*. Penicilin, produkt vrst *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* in nekaterih drugih sevov, je prvi v vrsti antibiotikov, ki rešujejo življenja (povzeto po Webster in Weber, 2007).

Vrsta raziskav se ukvarja z negativnimi posledicami prisotnosti gliv v prehrambenih izdelkih, saj le-te spremenijo barvo in okus ter hkrati izločajo toksine. Raziskava o pokvarljivosti dimljenih izdelkov in trdih sirov je pokazala 86% prisotnost gliv na površini klobas in drugih mesnih proizvodov (od slednjih je 52,5 % pripadalo rodu *Penicillium*, 18 % kvasovkam, 12,5 % vrstam rodu *Aspergillus* in 29 % preostalim vrstam) ter 92 % prisotnost gliv na trdih sirih (od teh je bilo 68 % vrst roda *Penicillium*, 15 % kvasovk, 15 % iz rodu *Aspergillus* in 17 % ostalih vrst) (Feofilova in sod., 2009). Prisotnost vrste še ne pomeni pojav mikotoksinov, saj na njihovo produkcijo vplivajo različni okoljski dejavniki. Mikotoksini, kot so aflatoksini vrst *Aspergillus flavus* in *Aspergillus parasiticus*, ogrožajo zdravje vretenčarjev, ko pridejo v telo po naravni poti (Samson in sod., 2004). Maja Derlink se je v svoji diplomske nalogi osredotočila na hemolitičen in citotoksičen Asp-hemolizin vrste *Aspergillus fumigatus* (Derlink, 2009), ki je med drugim znan proizvajalec gliotoksina, mikotoksina s protimikrobnim, protiglivnim, protivirusnim, genotoksičnim in imunosupresijskim delovanjem (Waring in Beaver, 1996).

2.4 GLIVE V OKOLJIH S POVIŠANO SLANOSTJO

2.4.1 Vodna aktivnost

Vodna aktivnost (a_w) je poleg temperature, kisika in potrebnih nutrientov najpomembnejši faktor za rast in za produkcijo mikotoksinov (Samson in sod., 2004). Definirana je kot razmerje med parnim tlakom vode v preučevani raztopini in parnim tlakom čiste vode (Carlile in sod., 2001) pri isti temperaturi. Parni tlak vode je sila na enoto vode, ki omogoči, da voda prehaja iz raztopine, materiala ali medija. Vodna aktivnost je torej merilo za nevezano vodo v mediju, ki je sposobna prehajati v glivo in sodelovati pri kemijskih reakcijah. Vrednosti vodne aktivnosti segajo od 0 do 1 (a_w čiste vode). Preglednica 1 prikazuje vrednosti vodne aktivnosti (a_w) za različne substrate in vrednosti vodne aktivnosti (a_w), potrebne za rast nekaterih gliv.

Preglednica 1: Vrednosti vodne aktivnosti (a_w). Vodna aktivnost v različnih okoljih (primernih za substrate gliv) in vodne aktivnosti (a_w) primerne za rast in razmnoževanje nekaterih gliv pri optimalnih temperaturah (prirejeno po Carlile in sod., 2001 in po Samson in sod., 2004).

Vodna aktivnost a_w	Primeri organizma oziroma substrata z dano vrednostjo
1.0	Čista voda
0.98	Morska voda
0.97	Spodnja meja rasti za večino gliv, ki uničujejo les
0.95	Kruh
0.88	Suhomesnati izdelki (šunka)
0.85-0.94	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Aspergillus fumigatus</i>
0.85	Suhomesnati izdelki (salama)
0.82-0.85	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Penicillium expansum</i>
0.80-0.82	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Penicillium citrinum</i>
0.80	Spodnja meja rasti za <i>Aspergillus nidulans</i>
0.78-0.82	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Penicillium brevicompactum</i>
0.78-0.80	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Aspergillus flavus</i>
0.78	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Aspergillus terreus</i>
0.75	Raztopina nasičena z NaCl
0.71-0.76; 0.75	Spodnja meja rasti in razmnoževanja za <i>Eurotium amstelodami</i>
0.61	Spodnja meja rasti za <i>Chrysosporium fastidium</i> in <i>Xeromyces bisporus</i>
0.58	Spore nekaterih vrst rodu <i>Eurotium</i> , <i>Aspergillus</i> in <i>Penicillium</i> so sposobne preživeti
0.48	Suhe doline Antartike

2.4.2 Slana okolja

Hladni, ledeniški habitati in naravni slani habitati, kot so morja, soline in slana jezera, so okolja z nizko a_w . Ekstremno slan habitat je Mrtvo morje z visoko koncentracijo soli v vodi (okoli 340g/l vseh raztopljenih soli), v kateri prevladujejo magnezijevi ioni (v primerjavi z

natrijevimi ioni) in klorovi ioni, ki predstavljajo 99% vseh anionov, a_w pa je pod 0,699 (Krumgalz in Millero 1982; cit. po Kis- Papo in sod., 2003). V Sečoveljskih solinah (Slovenija) v času največje produkcije soli v končnem bazenu koncentracija NaCl naraste do 30 %, a_w pa pade na 0,72 (Butinar in sod., 2005b). Prevladujejo natrijevi in klorovi ioni. Drugi vodni vzorci iz hiperslanih okolij imajo slanost od 8 % do 32 % NaCl in a_w od 0,95 do 0,67. Med temi so vodni vzorci iz Mrtvega morja (a_w 0,67); solin v delti reke Ebro – Španija (a_w 0,73–0,83); solin Santa Pola – Španija (a_w 0,73–0,94); solin Eilat – Izrael (obala Rdečega morja) in solin Dominikanske republike (a_w obeh vzorčnih mest 0,73–0,95); solin Camargue – Francija in solin Samouco – Portugalska (obala Atlantskega oceanega) z a_w 0,73 in namibijskih solin (a_w 0,78) (Butinar in sod., 2005b).

Na slanost solin in morij vplivajo geologija, topografija, temperatura in drugi fizikalno-kemijski parametri okolice.

2.4.3 Halofilne in halotolerantne glive

Z izrazom kserofilnost označujemo glive, ki uspevajo pri vodni aktivnosti, enaki ali nižji od 0,85, kar pomeni, da bi rastnemu gojišču dodali 17 % NaCl ali 50 % glukoze (De Hoog in sod., 2005). Izraz se uporablja neodvisno od kemijske narave topljenca. Poleg prilagoditve na nizke vodne aktivnosti se halofilni in halotolerantni organizmi prilagodijo tudi na visoke koncentracije ionov. Glive, izolirane iz slanih okolijih, so halofilne, kadar jih izoliramo na selektivnih medijih iz okolijih s slanostjo nad 10 %, in rastejo *in vitro* na 17 % NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Naveden vir glive uvršča med halotolerantne v primeru, kadar so izolirane iz okolij s slanostjo nižjo od 10 % in niso sposobne rasti *in vitro* na gojiščih z 17 % NaCl.

Halofilni in halotolerantni organizmi uspevajo v slanih okolijih, toda samo halofilni nujno potrebujejo sol (Russell, 1989). Glive izražajo drugačen halofilen značaj. Za preživetje ne potrebujejo soli, saj so sposobne obstati v razmerah celotnega spektra slanosti, od sveže vode do skoraj z NaCl nasičenih raztopin. Fleksibilnost jim omogoča preživetje stresnih obdobij v mirajočem stanju. Po izboljšanju razmer se povečajo metabolne aktivnosti, rast in razmnoževanje (De Hoog in sod., 2005).

2.4.4 Prilagoditve gliv na povišano slanost

Celice so ob nižji a_w okolja izpostavljene hiperosmotskem stresu. Tako je v ledenikih, kjer je voda nedostopna zaradi tvorbe ledenih kristalov, in v slanih okoljih, kjer je vezana zaradi visoke koncentracije NaCl. Oboje vodi v dehidracijo organizmov (Turk in sod., 2007a), saj voda izhaja iz celic. Povečan osmotski tlak tako vpliva na prevzem hranih, sintezo proteinov in na vrsto encimskih reakcij v celici.

Določeni organizmi (arheje) prenašajo stres zaradi povečane koncentracije soli v okolju s prevzemom anorganskih ionov (predvsem K^+ in Cl^-), le-ti pa lahko pri višjih koncentracijah spremenijo konfiguracijo in s tem aktivnost encimskih molekul. Normalno povišane notranje koncentracije soli odtegnejo vodo iz proteinov, ojačajo hidrofobne vezi in denaturirajo proteine. Zaradi tega morajo biti celične strukture posebej prilagojene (Grant, 2004). Ugotovili so, da imajo celice vrste glive *Hortea werneckii*, prilagojene na NaCl, nizke znotrajcelične koncentracije natrija in kalija, ki ne nihajo z naraščajočo koncentracijo soli izven celice (Kogej in sod., 2005). Po predvidevanjih naj bi celice imele učinkovit sistem izčrpavanja Na^+ in K^+ .

Drugi organizmi (bakterije, evkarionti) ob povečani koncentraciji soli v okolju sintetizirajo kompatibilne topljence. Kompatibilni topljenci so osmotsko aktivne, nizko molekulske organske spojine, med katere spadajo: polioli (glicerol, arabinol, manitol, sladkorji in derivati sladkorjev, kot je trehaloza), betaini, aminokisline, derivati aminokislin in druge spojine (Grant, 2004). Pri glivah je najpogosteji glicerol, ki dvigne osmotski pritisak v celici in tako vzpostavi osmotski gradient preko celične membrane. Tako lahko voda vstopa v celico. Hkrati se prehodnost membrane za glicerol zmanjša. Nekateri mikosporini lahko delujejo kot kompatibilni topljenci v določenih ekstremofilnih glivah, izpostavljenih različnim spremembam vodnega potenciala ali slanosti (Kogej in sod., 2006).

Pri slanosti blizu koncentracije morske vode se zmanjša fluidnost membrane vrste *Debaryomyces hansenii*, kar se ujema s spremembami v lipidni sestavi. Kot se je izkazalo, se poveča količina ergosterola. (Turk in sod., 2007b).

Izločanje glikoproteinov je pri številnih vrstah še ena izmed prilagoditev, ki jo izkoriščajo v biotehnologiji in medicini. Poleg naštetih prilagoditev na slanost se omenajo še specifični signalno-trandukcijski mehanizmi, ki zaznajo ter se odzovejo na povečane koncentracije soli (Gunde-Cimerman in sod., 2005).

Sekundarni produkti omogočajo preživetje organizma v njegovi ekološki niši (Fox in Howlett, 2008). V raziskavi iz leta 2004 sta Bugni in Ireland pri večini izoliranih vrst ugotovila povečano produkcijo protimikrobnih produktov v medijih z dodatkom 20-60 % morske vode; pri večjih deležih morske vode pa se je produkcija zmanjšala. V primeru vrste *Penicillium brocae* so pri povišani slanosti nastajali drugačni produkti (Bugni in Ireland, 2004).

2.5 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

2.5.1 Namen dela

Namen naše raziskave je bil testirati biološko aktivnost organskih ekstraktov izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv redov *Eurotiales* in *Saccharomycetales* na gojišču brez NaCl in z 10 % NaCl. Testirali smo hemolitično aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost na izbranih, po Gramu negativnih in pozitivnih bakterijah.

2.5.2 Hipoteza

Halofilne in halotolerantne glice iz slanih voda solin, so prilagojene na specifične okoljske razmere in so relativno neraziskan vir novih, biološko aktivnih organskih spojin. Predvidevali smo, da bomo našli potencialno zanimive in še nepoznane učinkovine, ki bi jih v prihodnosti lahko izolirali. Pričakovali smo razlike v proizvodnji sekundarnih metabolitov v ekstraktih gliv, ki so rastle na gojiščih brez in z dodatkom soli.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SEZNAM PREUČEVANIH GLIV

Raziskavo smo izvedli z 39 halofilnimi in halotolerantnimi sevi gliv, ki so navedeni v preglednici 2. Vzeli smo jih iz Zbirke ekstremofilnih gliv (EX -) Katedre za biologijo mikroorganizmov na Oddelku za Biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani in iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta (MZKI) v Ljubljani. Klasifikacija uporabljenih sevov v tej raziskavi je sledeča (povzeto po De Hoog in sod., 2000):

Kraljestvo: *Fungi (Eumycota)*

Deblo: *Ascomycota*

Razred: *Euascomycetes*

Red: *Eurotiales*

Družina: *Trichocomaceae*

Rodovi: *Aspergillus, Penicillium, Emericella, Eurotium*

Razred: *Hemiascomycetes*

Red: *Saccharomycetales*

Družina: *Endomycetaceae*

Rod: *Debaryomyces*

Družina: *Metschnikowiaceae*

Rod: *Metschnikowia*

Preglednica 2: Seznam preučevanih gliv z originalno oznako in mestom vzorčenja.

Vrsta glive	Originalna oznaka v zbirki	Mesto vzorčenja
<i>Aspergillus flavus</i>	EX -1751	Mrtvo morje, soline
<i>Aspergillus niger</i>	EX -799	Sečovlje, soline
<i>Aspergillus niger</i>	EX -2130	Arktika, morski led
<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX - 618	Španija, soline
<i>Aspergillus sydowii</i>	EX - 405	Sečovlje, soline
<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX - 401	Sečovlje, soline
<i>Aspergillus terreus</i>	EX - 312, MZKI - A160	Ljubljana, tla
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX - 3381, MZKI - A218	Sečovlje, soline
<i>Emericella stella-maris</i>	EX - 349	Sečovlje, soline
<i>Emericella filifera</i>	EX - 348	Sečovlje, soline
<i>Emericella olivicola</i>	EX - 2650	oliva
<i>Emericella discophora</i>	EX - 2680	tla
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 66, MZKI - A406	Sečovlje, soline
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 2134	Arktika, morski led
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 3369, MZKI - A338	Sečovlje, soline
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 1041	Arktika, morski led
<i>Eurotium repens</i>	EX - 2132	Arktika, morski led

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Vrsta glive	Originalna oznaka v zbirki	Mesto vzorčenja
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 1363	Arktika, morski led
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 3196	Sol, mesni izdelki (MIP)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 426	Sečovlje, soline
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 1030	Arktika, morski led
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1325	Arktika, ledeniški led
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1778	Mrtvo morje, soline
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 417	Sečovlje, soline
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 1300	Arktika, ledeniški led
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 763	Španija, soline
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 1329	Arktika, CREA+, ledeniški led
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 904	Arktika, CREA -, ledeniški led
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1813	Izrael, soline
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1348	Arktika, ledeniški led
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 503	Španija, soline
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 1140	Arktika, ledeniški led
<i>Penicillium citrinum</i>	EX - 792	Sečovlje, soline
<i>Penicillium antarcticum</i>	EX - 793	Sečovlje, soline
<i>Penicillium sizophiae</i>	EX - 424	Sečovlje, soline
<i>Penicillium steckii</i>	EX - 416	Sečovlje, soline
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 589	Namibija, soline
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 1590	Arktika
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EX - 1509	Arktika

3.2 MATERIAL

3.2.1 Gojišča in raztopine

Preglednica 3: Gojišča in raztopine.

Gojišče ali raztopina	Sestavine	Količine
Trdno gojišče YNB (Yeast Nitrogen Base) ; pH = 7,0	YNB formula $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ Glukoza Agar Destilirana H_2O	1,7 g/L 5 g/L 20 g/L 20 g/L Do 1000 ml
Trdno gojišče YNB z 10% NaCl; pH = 7,0	YNB formula $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ Glukoza Agar NaCl Destilirana H_2O	1,7 g/L 5 g/L 20 g/L 20 g/L 100g/L Do 1000 ml

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Gojišče ali raztopina	Sestavine	Količine
Trdno LB gojišče (Luria Broth)	LB Agar Destilirana H ₂ O	25 g/L 15 g/L Do 1000 ml
Tekoče LB gojišče (Luria Broth)	LB Destilirana H ₂ O	2,5 g (25g/L) 100 ml
Fiziološka raztopina (0,9% NaCl)	NaCl Destilirana H ₂ O	9g/L Do 1000 ml
SSS (Spore solution suspension)	Tween 80 Agar Destilirana H ₂ O	0,5g/L 0,5g/L Do 1000 ml

3.2.2 Kemikalije

Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij.

Kemikalije	Proizvajalec
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
AChE iz električne jegulje	Sigma, ZDA
Agaroza	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Celofan	Sigma - Aldrich, Steinheim, Nemčija
Etanol	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
H ₂ O ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Luria Broth (LB)	Sigma, ZDA
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
NaHCO ₃	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
(NH ₄) ₂ SO ₃	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
pH-indikator	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Tris-HCl	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Tween 80	Sigma - Aldrich, Steinheim, Nemčija
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Bio 101 Systems, ZDA

3.2.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 5: Seznam uporabljeni laboratorijske opreme.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitska tehnica MC 210 P max 210g ISO 9001	Sartorius, Nemčija
Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvaška
Centrifuga 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč	Dynex Technologies, ZDA

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Dvožarkovni spektrofotometer	Shimadzu, Japonska
Hladilniki ($T = 4^{\circ}\text{C}$)	Gorenje, Slovenija in Electrolux, Švedska
Hladna soba ($T = 4^{\circ}\text{C}$)	Smeva, Valkenswaard, Nizozemska
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrsko plošče	Nunc, Danska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pH meter Metrohm 713	Tehnica, Železniki, Slovenija
Stresalnik Vibromix 301 EVT	Tehnica, Železniki, Slovenija
Tehtnica EXACTA 310	Tehnica, Železniki, Slovenija
Topla soba ($T = 40^{\circ}\text{C}$)	Smeva, Valkenswaard, Nizozemska
Vodna kopel	Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
Rotacijski stresalnik EV-100	Tehnica, Železniki, Slovenija
Zmrzovalnik ($T = -80^{\circ}\text{C}$)	Heto ultra freeze, Danska

3.3 METODE

3.3.1 Priprava gojišča in rast sevov

Pripravili smo definirana gojišča YNB (Yeast Nitrogen Base) ali brez ali z 10 % NaCl. Tekoča gojišča smo vlili v Petrijeve plošče in poševnike ter jih pustili 1-2 dni na sobni temperaturi. Petrijeve plošče smo prenesli v toplo sobo za približno 1 teden, nato smo jih premaknili v hladno sobo, kjer smo jih hranili do uporabe.

Izbrane seve iz genske banke smo precepili na gojišča v poševnikih. Vsak sev smo prenesli na poševnik YNB brez NaCl (oznaka »YNB«) in z 10 % NaCl (oznaka »Y+10«), in sicer s pomočjo raztopine za suspendiranje spor – Spore solution suspension (SSS). Sledila je eno- do tritedenska inkubacija nacepljenih poševnikov na sobni temperaturi dokler glice niso dosegle stacionarne faze rasti.

Na posamezno gojišče v petrijevki smo namestili celofan, ga ponovno prenesli v hladno sobo in po enem tednu nacepili seve. Posamezen sev glice smo suspendirali v 5 ml fiziološke raztopine (0,9% NaCl). Nato smo po 100 μl suspenzije prenesli na 6 petrijevk z gojiščem YNB in 10 petrijevk z gojiščem YNB z NaCl. Micelije gliv s sporami smo po

inkubaciji do stacionarne faze (v enem do treh tednih) postrgali z gojišča. Biomaso posamezne glice smo razdelili na polovico. Polovico biomase vsakega seva je uporabila Maja Derlink v svoji diplomske nalogi (Derlink, 2009), drugo polovico smo uporabili v naši raziskavi.

3.3.2 Priprava organskih ekstraktov

Biomaso micelija posameznega seva z določenega tipa gojišča, namenjenega tej diplomi, smo porazdelili v 2 mikrocentrifugirki. Na gojišču YNB smo za vsak sev pridobili dva vzorca, ki smo ju označili z »YNB A« (YNB, aceton) in »YNB E« (YNB, etanol). Micelij seva, ki je zrasel na gojišču YNB z dodatkom 10 % NaCl je bil v dveh vzorcih z oznako »Y+10 A« (YNB z 10% NaCl, aceton) in »Y+10 E« (YNB z 10% NaCl, etanol). Tako smo za posamezen sev uporabili 4 mikrocentrifugirke, t.j. 4 vzorce. Mikrocentrifugirke smo zmrznili v tekočem dušiku in jih shranili na -80 °C v zamrzovalni omari. Sledila je 48-urna liofilizacija vzorcev na Katedri za fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. V liofilizirane vzorce smo dodali po 1 ml organskega topila (aceton ali etanol), jih ovili s parafilmom, dali v erlenmajerice in jih 24 ur stresali na stresniku pri 200 obratih/minuto in temperaturi 25°C. Aceton smo dodali v vzorce z oznako A in etanol v tiste z oznako E. Vzorce smo nato centrifugirali 20 minut pri 13000 obratih/minuto. Odpipetirali smo supernatant v nove mikrocentrifugirke z enako oznako, preostalemu sedimentu pa smo dodali sveže organsko topilo in ga stresali na stresniku 3 ure. Po drugem stresanju smo ponovno centrifugirali in odpipetirali supernatant ter ga dodali predhodno odpipetiranemu supernatantu. Vse mikrocentrifugirke s skupnim supernatantom smo odprli in jih dali v digestorij. Po 48 urah smo popolnoma posušenim vzorcem dodali 0,5 ml etanola in tako dobili ekstrakte pripravljene za testiranje. Mikrocentrifugirke smo ovili s parafilmom in jih do uporabe shranili v hladilniku na 4 °C.

3.3.3 Določanje suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih

Suho težo snovi v vzorcih smo določili s pomočjo skledic, ki smo jih oblikovali iz aluminija. Najprej smo posamezno skledico stehtali, nato smo vanjo dali 100 µl etanolne raztopine vzorca. Po 10 minutah sušenja vzorcev na 100 °C smo skledice ponovno stehtali in izračunali razliko v teži, jo preračunali ter dobili suhe teže v mg/ml. Rezultati so predstavljeni v preglednici 6.

3.3.4 Testi za določanje biološke aktivnosti

3.3.4.1 Test hemolitične aktivnosti

Hemolizo smo testirali na eritrocitih iz sveže goveje krvi, ki smo ji dodali citrat takoj po odvzemu, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo izolirali s centrifugiranjem in jih trikrat sprali s fiziološko raztopino. Do uporabe smo jih shranili v Alseverjevem konzervansu v hladilniku na 4 °C. Za biološke teste pripravljene eritrocite lahko uporabljamo, dokler se supernatant ne pobarva rdeče, torej dokler ne pride do hemolize. Suspenzija pripravljenih eritrocitov je imela pri 630 nm navidezno absorpcijo $1,0 \pm 0,01$.

Za test hemolitične aktivnosti smo uporabili mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. Test smo izvedli s čitalcem mikrotitrnih plošč. Vsako vdolbinico smo najprej napolnili s 100 µl eritrocitnega pufra (raztopina 0,13 M NaCl in 0,02 M TRIS-HCl, pH 7,4). Nato smo v vdolbinico dodali 20 µl posameznega vzorca. Ploščo smo namestili v čitalec in tik pred začetkom testa v vsako vdolbino odpipetirali še po 100 µl eritrocitov. Pri kontroli smo vzorec nadomestili z 20 µl etanola. Čitalec je med poskusom, ki je potekal 20 minut na 25°C, 41-krat izmeril absorpcijo pri 630 nm.

Jakost hemolize smo izrazili kot padec absorpcije na polovico začetne vrednosti oz. kot polovični čas hemolize (t_{50}).

3.3.4.2 Test inhibicije acetilholinesteraze (AChE)

Encim acetilholinesteraza (AChE) hidrolizira nevrotransmiter acetilholin v sinaptičnih špranjah in ustavi njegovo vezavo na receptorje na postsinaptični membrani. Inhibitorji delovanja AChE, ki jih uvrščamo med nevrotoksine, povzročijo, da se acetilholin stalno veže na receptorje. Posledica tega je, da se akcijski potenciali stalno prožijo, kar vodi v stalno depolarizacijo mišic, sledita mišična paraliza in smrt zaradi zadušitve.

Test aktivnosti in inhibicije acetilholinesteraze smo izvedli po Ellmanovi metodi (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč. Uporabili smo encim AChE iz električne jegulje. Pred vsako meritvijo smo pripravili svežo raztopino encima v koncentraciji 500 encimskih enot (EE/ml) iz 35 µl AChE in 7 ml 100 mM fosfatnega pufra

s pH 7,3. Tik pred meritvijo smo encim še dodatno 200-krat razredčili v istem pufru. V dolbinice na mikrotitriji plošči smo najprej napolnili s 150 µl raztopine končnega substrata s koncentracijo 1 mM (ta raztopina substrata je bila pripravljena iz 15 ml Ellmanovega reagenta in 15 µl substrata acetiltioholina). Ellmanov reagent smo predhodno pripravili iz 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg), NaHCO₃ (37,5 mg) v 25 mM fosfatnega pufra (100 ml), pH 7 in do 1 L deionizirane vode. V vdolbinice smo nato dodali po 10 µl posameznega vzorca (ekstrakta) gliv in na koncu pred meritvijo še po 50 µl razredčene raztopine encima AChE. Pri kontrolnih vdolbinicah smo namesto vzorca dodali 10 µl etanola.

Testni vzorci brez inhibitorjev AChE so raztopino v vdolbinici obarvali rumeno, saj je AChE delovala na acetiltioholin in ga razcepila na ocetno kislino in tioholin, ki je dal rumeno obarvanost. Po dodatku inhibitorja AChE tioholin ni nastajal oz. je nastajal počasneje in ni bilo rumenega obarvanja raztopine ali pa je bilo to manj izrazito. Razliko v obarvanosti in s tem delovanje inhibitorja smo zaznali z merjenjem absorpcije pri 412 nm. Test je trajal 5 minut pri 25 °C. Izmerjene vrednosti absorpcij, smo primerjali z vrednostmi povprečnega kontrolnega vzorca, pri kateremu je bila aktivnost 100%. Iz deleža aktivnosti AChE smo izračunali delež njene inhibicije.

3.3.4.3 Test protibakterijskih aktivnosti

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. V 10 ml avtoklavirane raztopine gojišča Luria Broth (LB) smo sterilno nacepili izbrane bakterije. Testni bakteriji sta bili po Gramu negativna vrsta *Escherichia coli* in po Gramu pozitiven *Bacillus subtilis* iz zbirke EX Katedre za biologijo mikroorganizmov Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Nacepljena gojišča smo 12 ur stresali pri 250 obratih/minuto na 37 °C. Naslednji dan smo 1 ml raztopine gojišča prenesli v plastično kiveto in izmerili optično gostoto pri 600 nm na spektrofotometru. Iz optične gostote raztopine smo s standardiziranimi umeritvenimi krivuljama za ustrezena bakterijska seva določili število bakterij. Spleti poskus je predstavljal sterilno tekoče gojišče Luria Broth.

Mešanico LB hranilnega medija, agarja in vode smo v erlenmajericah avtoklavirali. Ko se je vsebina ohladila (~42 °C) smo dodali ustrezni volumen vcepka bakterij tako, da je bila končna koncentracija bakterijskih kolonij 5×10^5 /L gojišča. Pripravljeno gojišče LB z vcepljeno bakterijsko kulturo smo premešali in na vsako Petrijevo ploščo vlili po 20 ml. Pripravili smo 36 plošč s sevom bakterije *Escherichia coli* in 36 plošč s sevom bakterije *Bacillus subtilis*. Do uporabe smo plošče hranili na 4 °C.

Na vsaki Petrijevi plošči z agarjem smo s sterilnim plutovrtom naredili 8 lukenj premera 1 cm in plošče čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo v vsako luknjo v agarju dodali po 100 µl ekstrakta vzorcev gliv navedenih v preglednici 2. Posamezen vzorec smo testirali na obeh sevih. Plošče z vzorci smo inkubirali za 48 ur na 37 °C in potem odčitali polmere inhibicijskih kon, ki so bile vidne okoli lukenj. Vzorce, katerih polmeri so bili enaki ali večji od 4 mm, smo redčili (v razmerju 1:10 in 1:100), razredčitve ponovno testirali in določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) za vsakega od aktivnih vzorcev.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V VZORCIH

Preglednica 6 prikazuje rezultate določanja koncentracije suhe snovi v organskih vzorcih halofilnih in halotolerantnih gliv. Slika 1 nam slednje podatke predstavi še grafično. Koncentracije suhe snovi iz preglednice 6 smo uporabili pri drugih testih za preračunavanje količine suhe snovi v posameznem testu.

Koncentracija suhe snovi je bila večja pri vzorcih sevov, vzgojenih na gojiščih s soljo (»Y+10 A«, »Y+10 E«) kot pa na gojiščih brez soli (»YNB A«, »YNB E«), kar je razvidno iz slike 1. Izjema so bili: acetonski ekstrakt seva *Penicillium antarcticum* (EX - 793), acetonski ekstrakt seva *Debaryomyces hansenii* (EX - 1590) in oba ekstrakta vrste *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509), kjer je bila koncentracija suhe snovi večja v vzorcih z gojiščem brez soli (»YNB A«, »YNB E«).

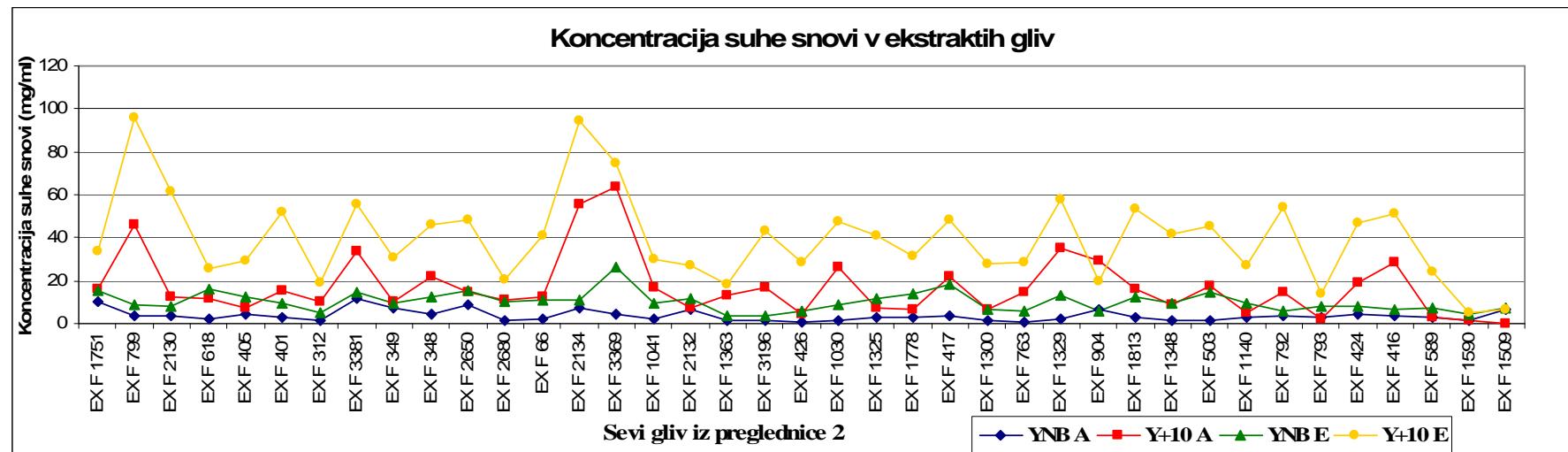
Etanolni ekstrakti sevov gliv, ki smo jih gojili na gojišču s soljo (»Y+10 E«) so imeli največjo koncentracijo suhe snovi (z izjemo seva *Penicillium crustosum* (EX - 904)), najmanjšo pa so imeli pri večini acetonski ekstrakti gliv z gojiščem brez soli (»YNB A«). Pri sevu *Penicillium crustosum* (EX - 904) ima najmanjšo koncentracijo etanolni ekstrakt glive z gojiščem brez soli (»YNB E«); pri *Penicillium antarcticum* (EX - 793), *Debaryomyces hansenii* (EX - 1590) in *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509) pa je bila najmanjša koncentracija acetonskega ekstrakta na soli (»Y+10 A«).

Če primerjamo rezultate glede na tip organskega topila, ugotovimo višje koncentracije suhe snovi v etanolnih vzorcih (»YNB E«) kot v acetonskih (»YNB A«) na gojiščih brez dodanega NaCl. To drži tudi za vzorce sevov, ki so rastli na gojiščih s soljo, z izjemo že omenjenega seva vrste *Penicillium crustosum* (EX - 904), kjer je koncentracija snovi v acetonskemu (»Y+10 A«) ekstraktu večja kot v etanolnem ekstraktu (»Y+10 E«).

Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v organskih ekstraktih gliv, obravnavanih v diplomske nalogi.

YNB A: acetonski ekstrakti gliv, ki smo jih gojili na gojišču YNB; YNB E: etanolni ekstrakti gliv z gojišča YNB; Y+10 A: acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl; Y+10 E: etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl.

	VRSTA GLIVE	OZNAKA SEVA	YNB A (MG/M L)	Y+10 A (MG/M L)	YNB E (MG/M L)	Y+10 E (MG/M L)
1.	<i>Aspergillus flavus</i>	EX - 1751	10,5	16,2	15,6	33,6
2.	<i>Aspergillus niger</i>	EX - 799	3,3	46,3	8,5	96,2
3.	<i>Aspergillus niger</i>	EX - 2130	3,8	12,2	8	61,5
4.	<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX - 618	2,3	11,7	16,3	25,6
5.	<i>Aspergillus sydowii</i>	EX - 405	4,1	7,2	12,1	29
6.	<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX - 401	2,7	15,7	9,8	52,2
7.	<i>Aspergillus terreus</i>	EX - 312	1,8	10,6	5,1	19,2
8.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX - 3381	11,4	33,4	14,5	55,4
9.	<i>Emericella stella-maris</i>	EX - 349	7,1	10,6	9,2	31
10.	<i>Emericella filifera</i>	EX - 348	4,7	22,1	12,6	46,1
11.	<i>Emericella olivicola</i>	EX - 2650	9	14,4	15,1	48,1
12.	<i>Emericella discophora</i>	EX - 2680	1,7	11,1	10,6	20,3
13.	<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 66	2,2	12,2	10,7	40,7
14.	<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 2134	7,3	55,7	11,2	94,2
15.	<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 3369	4,7	63,9	26,6	74,7
16.	<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 1041	1,9	16,5	9,8	29,8
17.	<i>Eurotium repens</i>	EX - 2132	6,3	7	12	26,8
18.	<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 1363	1,1	13,3	3,7	18,6
19.	<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 3196	1,6	16,7	3,9	43,5
20.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 426	0,6	4,7	6,2	28,8
21.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 1030	1,5	26	8,7	47,7
22.	<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1325	2,9	7,4	11,4	41
23.	<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1778	3,2	6,3	14	31,5
24.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 417	3,5	21,6	18,6	48,2
25.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 1300	1,8	6,9	6,6	27,5
26.	<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 763	0,9	14,5	5,8	28,8
27.	<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 1329	2,1	34,8	13,2	57,8
28.	<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 904	6,6	29,1	5,6	20
29.	<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1813	3	16	12,7	53,1
30.	<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1348	1,3	9,1	9,4	41,6
31.	<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 503	1,6	17,3	14,4	45,1
32.	<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 1140	3	5,3	9,7	26,8
33.	<i>Penicillium citrinum</i>	EX - 792	3,6	14,9	5,5	54,2
34.	<i>Penicillium antarcticum</i>	EX - 793	2,6	2,2	8,3	13,8
35.	<i>Penicillium sizovae</i>	EX - 424	4,1	19,3	7,9	46,5
36.	<i>Penicillium steckii</i>	EX - 416	3,4	28,5	6,8	51,2
37.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 589	2,8	3,1	7,4	24,1
38.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 1590	1,6	1,1	4,5	4,8
39.	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EX - 1509	6,7	0,3	7,1	6,4



Slika 1: Koncentracija suhe snovi v ekstraktu sevov gliv, obravnavanih v diplomske nalogi.

4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Hemolitično aktivnih je bilo 54 od 156 testiranih ekstraktov (34,6 % vseh vzorcev), kar prikazuje preglednica 7. Rahlo aktivnost je izražalo 7 vzorcev (tj. 4,5 % vzorcev), pri katerih je bil polovični čas hemolize daljši od 10 minut. Zmerno hemolitičnih vzorcev, pri katerih je bil polovični čas hemolize med 5 in 10 minutami, je bilo 17 (tj. 10,9 % vzorcev). Močno aktivni so bili vzorci, kjer je bil polovični čas hemolize krajši od 5 minut in takšnih je bilo 30 (19,2 % vzorcev). Od teh, ki so bili najbolj aktivni, velja še posebej izpostaviti močno aktivnost vseh 4 vzorcev seva *Emericella stella-maris* (EX - 349). Hemoliza ni potekla v nobenem od ekstraktov naslednjih sevov: 2 seva *Penicillium nordicum* (EX - 1363 in EX - 3196), 2 seva *Penicillium corylophilum* (EX - 1325 in EX - 1778), *Penicillium brevicompactum* (EX - 1300), *Penicillium crustosum* (EX - 1329), *Penicillium polonicum* (EX - 1140), *Penicillium antarcticum* (EX - 793), *Penicillium sizovae* (EX - 424), *Penicillium steckii* (EX - 416) in *Debaromyces hansenii* (EX - 1590).

Največ hemolitično aktivnih vzorcev pripada acetonskim ekstraktom sevov z gojišča brez soli (»YNB A«), kjer se hemoliza pojavi pri 18 od 39 sevov gliv, kar je tretjina vseh hemolitičnih ekstraktov. Najmanj, le pri petih sevih, se je hemoliza izrazila v etanolnih ekstraktih sevov gliv z gojišča s soljo (»Y+10 E«).

Pri ekstraktih sevov gliv z gojišč YNB je potekla hemoliza pri 44,9 % ekstraktov (35 od 78 vzorcev), med katerimi sta bili dve tretjini močno hemolitično aktivni (Slika 2). Ekstrakte z gojišča brez soli porazdelimo na 9 % acetonskih ekstraktov (»YNB A«), 7,7 % etanolnih ekstraktov (»YNB E«) in 28,2 % (t.j. 11) skupnih sevov gliv z aktivnima obema ekstraktoma (»YNB A« in »YNB E«). Slika 3 prikazuje ekstrakte na gojiščih s soljo (»Y+10«), pri katerih se je hemoliza izrazila pri 24,4 % sevov (21 od 78 ekstraktov), od teh je bilo 12,8 % acetonskih (»Y+10 A«), 1,3 % etanolnih (»Y+10 E«) in 10,3 % (t.j. 4) sevov z obema ekstraktoma (»Y+10 A« in »Y+10 E«).

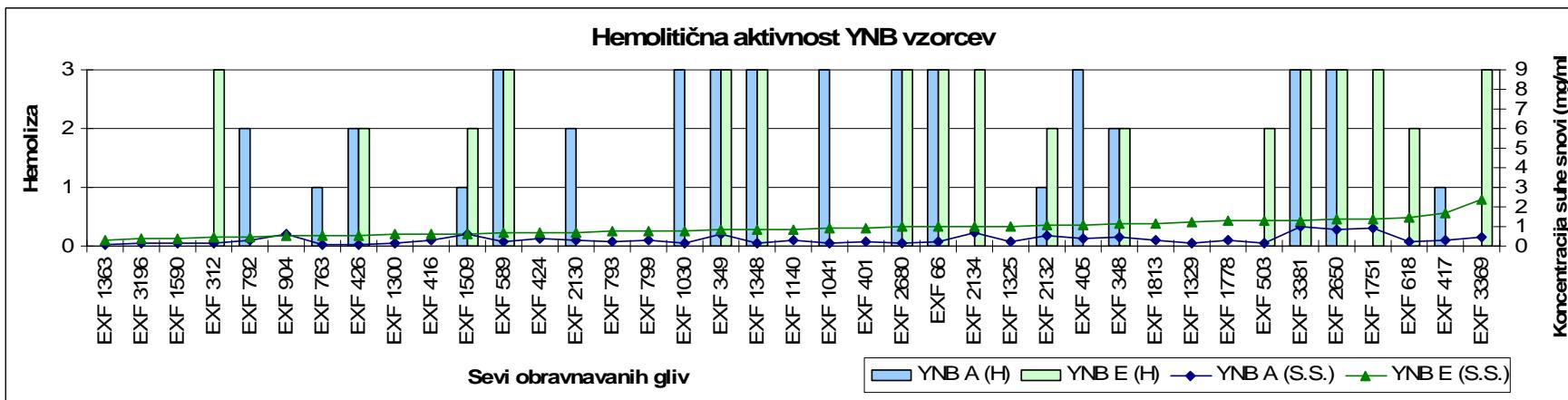
Preglednica 7: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov gliv, obravnavanih v diplomske nalogi.

YNB A: acetonski ekstrakti gliv, ki smo jih gojili na gojišču YNB; YNB E: etanolni ekstrakti gliv z gojišča YNB; Y+10 A: acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl; Y+10 E: etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl.

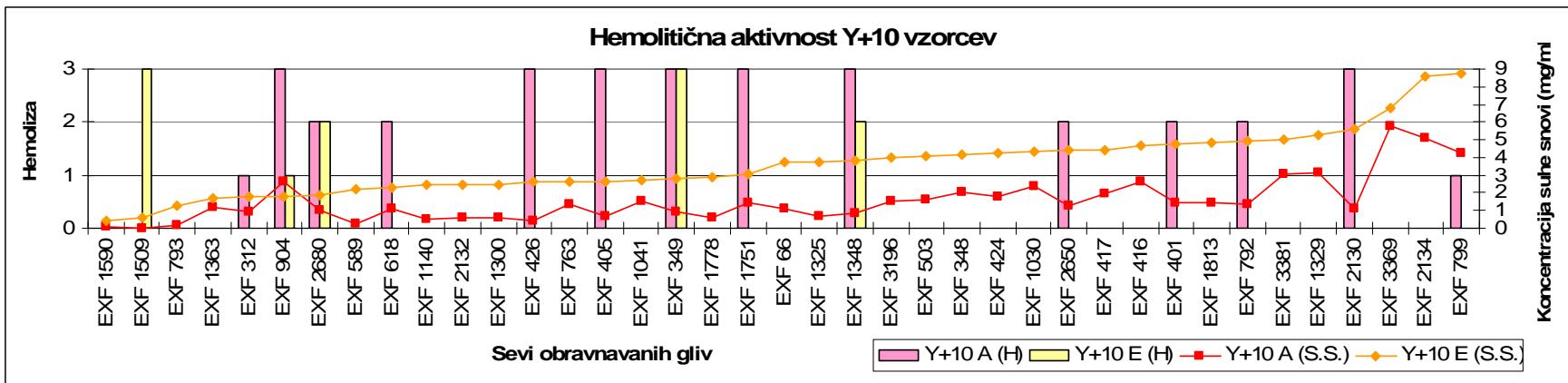
Pri vsakem rezultatu smo dopisali koncentracijo suhe snovi uporabljene v vzorcu, izraženo v mg/ml (S.S.)
Aktivnost hemolize(H): - = ni aktivnosti; + = rahla aktivnost (t_{50} hemolize je med 10 in 20 minut); ++ = zmerna aktivnost (t_{50} hemolize je med 5 in 10 minutami); +++ = močna aktivnost (t_{50} hemolize je krajši od 5 minut).

VRSTA GLIVE	OZNAKA SEVA	YNB A		Y+10 A		YNB E		Y+10 E	
		S.S. (mg/ ml)	H	S.S. (mg/ ml)	H	S.S. (mg/ ml)	H	S.S. (mg/ ml)	H
<i>Aspergillus flavus</i>	EX - 1751	0,955	-	1,473	+++	1,418	+++	3,055	-
<i>Aspergillus niger</i>	EX - 799	0,300	-	4,209	+	0,773	-	8,745	-
<i>Aspergillus niger</i>	EX - 2130	0,345	++	1,109	+++	0,727	-	5,591	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX - 618	0,209	-	1,064	++	1,482	++	2,327	-
<i>Aspergillus sydowii</i>	EX - 405	0,373	+++	0,655	+++	1,100	-	2,636	-
<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX - 401	0,245	-	1,427	++	0,891	-	4,745	-
<i>Aspergillus terreus</i>	EX - 312	0,164	-	0,964	+	0,464	+++	1,745	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX - 3381	1,036	+++	3,036	-	1,318	+++	5,036	-
<i>Emericella stella-maris</i>	EX - 349	0,645	+++	0,964	+++	0,836	+++	2,818	+++
<i>Emericella filifera</i>	EX - 348	0,427	++	2,009	-	1,145	++	4,191	-
<i>Emericella olivicola</i>	EX - 2650	0,818	+++	1,273	++	1,373	+++	4,373	-
<i>Emericella discophora</i>	EX - 2680	0,155	+++	1,009	++	0,964	+++	1,845	++
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 66	0,200	+++	1,109	-	0,973	+++	3,700	-
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 2134	0,664	-	5,064	-	1,018	+++	8,564	-
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 3369	0,427	-	5,809	-	2,418	+++	6,791	-
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 1041	0,173	+++	1,500	-	0,891	-	2,709	-
<i>Eurotium repens</i>	EX - 2132	0,573	+	0,636	-	1,091	++	2,436	-
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 1363	0,100	-	1,209	-	0,336	-	1,691	-
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 3196	0,145	-	1,518	-	0,355	-	3,955	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 426	0,055	++	0,427	+++	0,564	++	2,618	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 1030	0,136	+++	2,364	-	0,791	-	4,336	-
<i>Penicillium coryophilum</i>	EX - 1325	0,264	-	0,673	-	1,036	-	3,727	-
<i>Penicillium coryophilum</i>	EX - 1778	0,291	-	0,573	-	1,273	-	2,864	-
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 417	0,318	+	1,964	-	1,691	-	4,382	-
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 1300	0,164	-	0,627	-	0,600	-	2,500	-
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 763	0,082	+	1,318	-	0,527	-	2,618	-
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 1329	0,191	-	3,164	-	1,200	-	5,255	-
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 904	0,600	-	2,645	+++	0,509	-	1,818	+
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1813	0,273	-	1,455	-	1,155	-	4,827	-
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1348	0,118	+++	0,827	+++	0,855	+++	3,782	++
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 503	0,145	-	1,573	-	1,309	++	4,100	-
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 1140	0,273	-	0,482	-	0,882	-	2,436	-
<i>Penicillium citrinum</i>	EX - 792	0,327	++	1,355	++	0,500	-	4,927	-
<i>Penicillium antarcticum</i>	EX - 793	0,236	-	0,200	-	0,755	-	1,255	-
<i>Penicillium sizovae</i>	EX - 424	0,373	-	1,755	-	0,718	-	4,227	-
<i>Penicillium steckii</i>	EX - 416	0,309	-	2,591	-	0,618	-	4,655	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 589	0,255	+++	0,282	-	0,673	+++	2,191	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 1590	0,145	-	0,100	-	0,409	-	0,436	-
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EX - 1509	0,609	+	0,027	-	0,645	++	0,582	+++

Konda K. Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

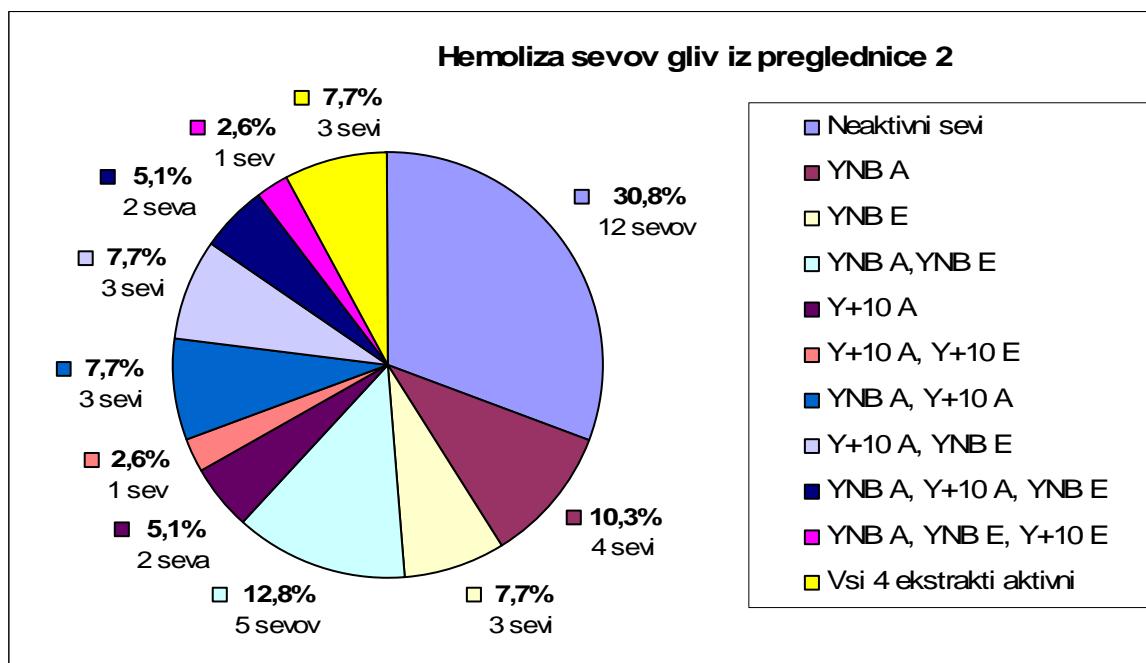


Slika 2: Hemolitična aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi (mg/ml) v organskih ekstraktih sevov gliv, ki so rastli na gojiščih YNB. Število na skali hemolize ustreza stopnji hemolize (0- ni aktivnosti; 1- rahla; 2- zmerna; 3- močna aktivnost).



Slika 3: Hemolitična aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi (mg/ml) v organskih ekstraktih sevov gliv, ki so rastli na gojiščih YNB z NaCl (Y+10). Število na skali hemolize ustreza stopnji hemolize (0- ni aktivnosti; 1- rahla; 2- zmerna; 3- močna aktivnost).

Glede na vse testirane seve je bilo povsem hemolitično neaktivnih 30,8 % sevov. Sevov z aktivnimi ekstraktmi le z ene vrste gojišča je bilo 38,5 %. 30,8 % aktivnih sevov pripada ekstraktom z gojišča YNB (»YNB«), od teh ima 10,3 % sevov aktivne acetonske ekstrakte (»YNB A«); 7,7 % sevov etanolne (»YNB E«) in 12,8 % sevov pa ima aktivne tako acetonske kot etanolne ekstrakte (»YNB A« in »YNB E«). Sevov z aktivnim ekstraktom le z gojišča z NaCl (»Y+10«) je bilo 7,7 %, od katerih jih ima 5,1 % aktiven acetonski ekstrakt (»Y+10 A«) in 2,6 % aktivna oba ekstrakta (»Y+10 A« in »Y+10 E«). Aktivnih sevov na obeh gojiščih je bilo 30,8 %, od tega je bilo 7,7 % acetonskih (»YNB A« in »Y+10 A«); 7,7 % sevov z aktivnima ekstraktoma Y+10 A in YNB E ; 5,1 % s aktivnimi YNB A, Y+10 A in YNB E; 2,6 % je imelo aktivne YNB A, YNB E in Y+10 E. Vse 4 ekstrakte aktivne je imelo 7,7 % sevov. To razporeditev sevov prikazuje slika 4.



Slika 4: Razporeditev 39 sevov gliv, obravnavanih v diplomske nalogi, v skupine glede na hemolitično aktivnost ekstraktov posameznega seva.

4.3 INHIBICIJA ACETILHOLINESTERAZE

Delovanje acetilholinesteraze so inhibirali naslednji organski ekstrakti sevov gliv:

- sev *Aspergillus tubingensis* (EX - 401) – ekstrakt Y+10 E
- sev *Emericella stella-maris* (EX - 349) – ekstrakta Y+10 A, Y+10 E
- sev *Emericella discophora* (EX - 2680) – ekstrakti YNB A, Y+10 A, YNB E in Y+10 E
- sev *Eurotium amstelodami* (EX - 2134) – ekstrakt Y+10 E
- sev *Eurotium herbariorum* (EX - 3369) – ekstrakta YNB E in Y+10 E
- sev *Eurotium repens* (EX - 2132) – ekstrakti YNB A, YNB E in Y+10 E
- sev *Penicillium polonicum* (EX - 1140) – ekstrakt YNB E

Inhibicija se je pojavila pri 9,0 % vseh organskih ekstraktov (Preglednica 8).

Preglednica 8: Inhibicija acetilholinesteraze v organskih ekstraktih sevov gliv, obravnavanih v diplomski nalogi.

YNB A: acetonski ekstrakti gliv, ki smo jih gojili na gojišču YNB; YNB E: etanolni ekstrakti gliv z gojišča YNB; Y+10 A: acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl; Y+10 E: etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl.

Pri vsakem rezultatu smo dopisali koncentracijo suhe snovi uporabljene v vzorcu, izraženo v mg/ml (S.S.)
I.A. = inhibitorna aktivnost, oz. odstotek inhibicije AChE glede na kontrolo.

VRSTA GLIVE	OZNAKA SEVA	YNB A		Y+10 A		YNB E		Y+10 E	
		S.S. (mg/ ml)	I.A. (%)	S.S. (mg/ ml)	I.A. (%)	S.S. (mg/ ml)	I.A. (%)	S.S. (mg/ ml)	I.A. (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	EX - 1751	0,500	0	0,771	0	0,743	0	1,600	0
<i>Aspergillus niger</i>	EX - 799	0,157	0	2,205	0	0,405	0	4,581	0
<i>Aspergillus niger</i>	EX - 2130	0,181	0	0,581	0	0,381	0	2,929	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX - 618	0,110	0	0,557	0	0,776	0	1,219	0
<i>Aspergillus sydowii</i>	EX - 405	0,195	0	0,343	0	0,576	0	1,381	0
<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX - 401	0,129	0	0,748	0	0,467	0	2,486	18,7
<i>Aspergillus terreus</i>	EX - 312	0,086	0	0,505	0	0,243	0	0,914	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX - 3381	0,543	0	1,590	0	0,690	0	2,638	0
<i>Emericella stella-maris</i>	EX - 349	0,338	0	0,505	22,1	0,438	0	1,476	29,8
<i>Emericella filifera</i>	EX - 348	0,224	0	1,052	0	0,600	0	2,195	0
<i>Emericella olivicola</i>	EX - 2650	0,429	0	0,667	0	0,719	0	2,290	0
<i>Emericella discophora</i>	EX - 2680	0,081	17,6	0,529	26,0	0,505	39,7	0,967	23,7
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 66	0,105	0	0,581	0	0,510	0	1,938	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 2134	0,348	0	2,652	0	0,533	0	4,486	51,2
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 3369	0,224	0	3,043	0	1,267	43,1	3,557	35,0
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 1041	0,090	0	0,786	0	0,467	0	1,419	0
<i>Eurotium repens</i>	EX - 2132	0,300	26,8	0,333	0	0,571	26,8	1,276	17,9
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 1363	0,052	0	0,633	0	0,176	0	0,886	0
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 3196	0,076	0	0,795	0	0,186	0	2,071	0

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

VRSTA GLIVE	OZNAKA SEVA	YNB A		Y+10 A		YNB E		Y+10 E	
		S.S. mg/ ml	I.A. (%)	S.S. mg/ ml	I.A. (%)	S.S. mg/ ml	I.A. (%)	S.S. mg/ ml	I.A. (%)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 426	0,029	0	0,224	0	0,295	0	1,371	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 1030	0,071	0	1,238	0	0,414	0	2,271	0
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1325	0,138	0	0,352	0	0,543	0	1,952	0
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1778	0,152	0	0,300	0	0,667	0	1,500	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 417	0,167	0	1,029	0	0,886	0	2,295	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 1300	0,086	0	0,329	0	0,314	0	1,310	0
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 763	0,043	0	0,690	0	0,276	0	1,371	0
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 1329	0,100	0	1,657	0	0,629	0	2,752	0
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 904	0,314	0	1,386	0	0,267	0	0,952	0
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1813	0,143	0	0,762	0	0,605	0	2,529	0
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1348	0,062	0	0,433	0	0,448	0	1,981	0
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 503	0,076	0	0,824	0	0,686	0	2,148	0
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 1140	0,143	0	0,252	0	0,462	19,5	1,276	0
<i>Penicillium citrinum</i>	EX - 792	0,171	0	0,710	0	0,262	0	2,581	0
<i>Penicillium antarcticum</i>	EX - 793	0,124	0	0,105	0	0,395	0	0,657	0
<i>Penicillium sizophiae</i>	EX - 424	0,195	0	0,919	0	0,376	0	2,214	0
<i>Penicillium steckii</i>	EX - 416	0,162	0	1,357	0	0,324	0	2,438	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 589	0,133	0	0,148	0	0,352	0	1,148	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 1590	0,076	0	0,052	0	0,214	0	0,229	0
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EX - 1509	0,319	0	0,014	0	0,338	0	0,305	0

4.4 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Protibakterijsko aktivnost organskih ekstraktov gliv prikazuje preglednica 9. Aktivnost je ponazorjena s širino inhibicijske cone rasti kolonij bakterij. Razvidno je, da je rast po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli* zaviralo 93 od 156 testnih vzorcev (59,6 %), rast po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* pa 45 od 156 testnih vzorcev (28,8 %). Od teh je takih, ki so zavirali obe bakteriji, skupno 38. Močno protibakterijsko aktivne ekstrakte (v preglednici 9 so označeni s črko p), torej tiste s cono inhibicije enako ali večjo od 4 mm, smo redčili in jih ponovno testirali na ploščah s sevom, proti kateremu so prvotno pokazali aktivnost. Takšnih vzorcev je bilo skupno 9,0 %. Vzorce smo redčili v razmerjih 1:10 in 1:100 ter določili približno minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), kar prikazuje preglednica 10.

Aktivnost proti bakteriji *Escherichia coli* se je pojavila pri 59,6 % ekstraktov (od 156), ki so pripadali 29 sevom. Od teh je bilo 34,0 % ekstraktov gliv z gojišča brez soli (»YNB«), ki so razdeljeni na 18,0 % acetonskih (»YNB A«) in 16,0 % etanolnih ekstraktov (»YNB

E«). Z gojišča s soljo (»Y+10«) smo pridobili 25,6 % aktivnih ekstraktov od katerih je bilo 14,1 % acetonskih (»Y+10 A«) in 11,5 % etanolnih (Y+10 E«). Rast bakterije *Bacillus subtilis* je inhibiralo 28,9 % od 156 ekstraktov 22 sevov gliv, 18,0 % jih pripada ekstraktom z gojišča brez soli (»YNB«) in 10,9 % ekstraktom z gojišča s soljo (»Y+10«). Aktivne YNB ekstrakte smo porazdelili na 9,6 % acetonskih (»YNB A«) in 8,3 % etanolnih (»YNB E«). Aktivnih ekstraktov z gojišča s soljo (»Y+10 A«) je bilo 7,7 % acetonskih (»Y+10 A«) in 3,2 % etanolnih (»Y+10 E«). Aktivnost ekstraktov z gojišča brez soli (»YNB«) prikazuje slika 5, ekstraktov z gojišča s soljo (»Y+10«) pa slika 6. Test protibakterijskih aktivnosti z naknadnim redčenjem smo ponovili na 14 ekstraktih, od katerih jih je 8 inhibiralo vrsto *Escherichia coli* in 6 vrsto *Bacillus subtilis*.

Inhibicija rasti obeh bakterij se ni pojavila pri 10 sevih: *Aspergillus terreus* (EX - 312), *Emericella stella-maris* (EX - 349), *Emericella filifera* (EX - 348), *Emericella discophora* (EX - 2680), *Penicillium chrysogenum* (EX - 426), *Penicillium corylophilum* (EX - 1778), *Penicillium crustosum* (EX - 763), *Penicillium crustosum* (EX - 904), *Penicillium expansum* (EX - 1348) in *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509). Aktivnost samo proti bakteriji *Escherichia coli* zasledimo pri naslednjih 7 sevih: *Aspergillus niger* (EX - 799), *Penicillium nordicum* (EX - 3196), *Penicillium corylophilum* (EX - 1325), 2 sevih *Penicillium polonicum* (EX - 503 in EX - 1140), *Penicillium antarcticum* (EX - 793) in *Penicillium sizovae* (EX - 424). Pri ostalih 22 sevih se pojavi inhibicija proti obema bakterijama.

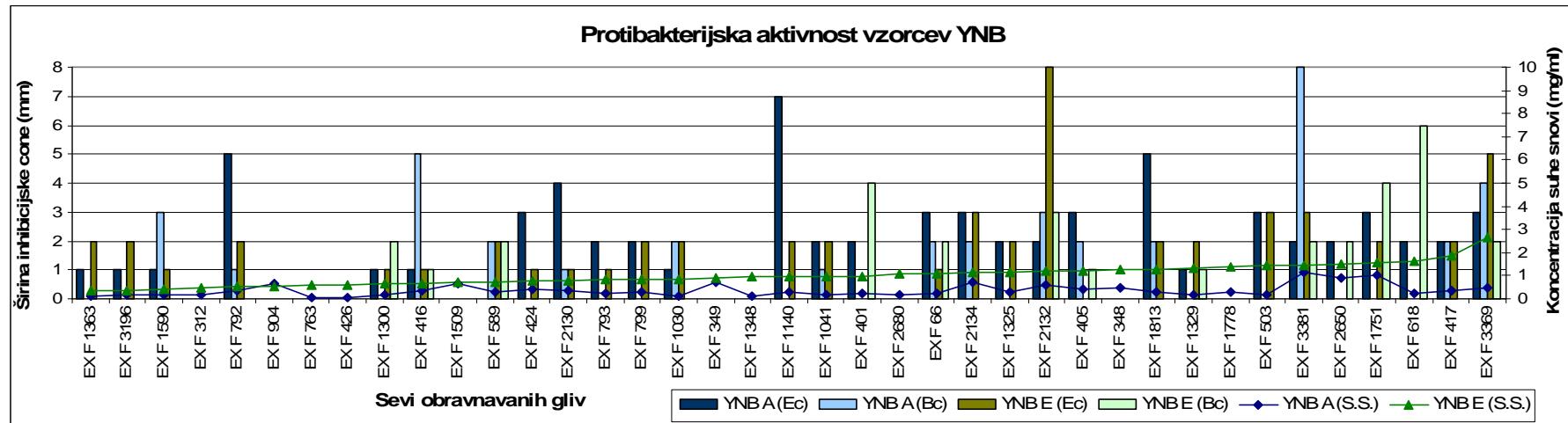
Preglednica 9: Protibakterijska aktivnost organskih ekstraktov sevov gliv, obravnavanih v diplomske nalogi, proti sevoma *Escherichia coli* (Ec) in *Bacillus subtilis* (Bs).

YNB A: acetonski ekstrakti gliv, ki smo jih gojili na gojišču YNB; YNB E: etanolni ekstrakti gliv z gojišča YNB; Y+10 A: acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl; Y+10 E: etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl.

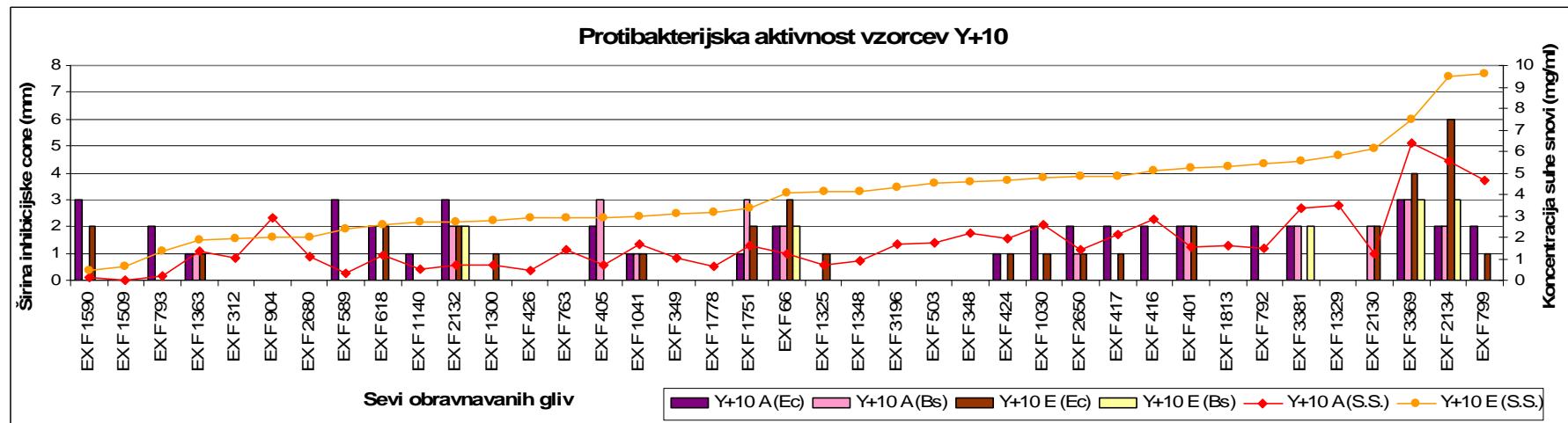
Pri vsakem rezultatu smo dopisali koncentracijo suhe snovi uporabljene v vzorcu, izraženo v mg/ml (S.S.)
Protibakterijsko aktivnost smo izrazili kot cono inhibicije (mm).

VRSTA GLIVE	OZNAKA SEVA	YNB A			Y+10 A			YNB E			Y+10 E		
		S.S. (mg/ ml)	Ec mm	Bs mm									
<i>Aspergillus flavus</i>	EX - 1751	1,050	3	0	1,620	1	3	1,560	2	4p	3,360	2	0
<i>sp ergillus niger</i>	EX - 799	0,330	2	0	4,630	2	0	0,850	2	0	9,620	1	0
<i>Aspergillus niger</i>	EX - 2130	0,380	4p	1	1,220	0	2	0,800	1	0	6,150	2	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX - 618	0,230	2	0	1,170	2	0	1,630	0	6p	2,560	2	0
<i>Aspergillus sydowii</i>	EX - 405	0,410	3	2	0,720	2	3	1,210	0	1	2,900	0	0
<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX - 401	0,270	2	0	1,570	2	2	0,980	0	4p	5,220	2	0
<i>Aspergillus terreus</i>	EX - 312	0,180	0	0	1,060	0	0	0,510	0	0	1,920	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX - 3381	1,140	2	8p	3,340	2	2	1,450	3	2	5,540	0	2
<i>Emericella stella-maris</i>	EX - 349	0,710	0	0	1,060	0	0	0,920	0	0	3,100	0	0
<i>Emericella filifera</i>	EX - 348	0,470	0	0	2,210	0	0	1,260	0	0	4,610	0	0
<i>Emericella olivicola</i>	EX - 2650	0,900	2	0	1,400	2	1	1,510	0	2	4,810	1	0
<i>Emericella discophora</i>	EX - 2680	0,170	0	0	1,110	0	0	1,060	0	0	2,030	0	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 66	0,220	3	2	1,220	2	2	1,070	1	2	4,070	3	2
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 2134	0,730	3	2	5,570	2	2	1,120	3	0	9,460	6p	3
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 3369	0,470	3	4p	6,390	3	3	2,660	5p	2	7,470	4p	3
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 1041	0,190	2	1	1,650	1	1	0,980	2	0	2,980	1	0
<i>Eurotium repens</i>	EX - 2132	0,630	2	3	0,700	3	2	1,200	8p	3	2,680	2	2
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 1363	0,110	1	0	1,330	1	1	0,370	2	0	1,860	1	0
<i>Penicillium nordicum</i>	EX - 3196	0,160	1	0	1,670	0	0	0,390	2	0	4,350	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 426	0,060	0	0	0,470	0	0	0,620	0	0	2,880	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX - 1030	0,150	1	2	2,600	2	0	0,870	2	0	4,770	1	0
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1325	0,290	2	0	0,740	0	0	1,140	2	0	4,100	1	0
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX - 1778	0,320	0	0	0,630	0	0	1,400	0	0	3,150	0	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 417	0,350	2	2	2,160	2	0	1,860	2	0	4,820	1	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX - 1300	0,180	1	0	0,690	0	0	0,660	1	2	2,750	1	0
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 763	0,090	0	0	1,450	0	0	0,580	0	0	2,880	0	0
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 1329	0,210	1	0	3,480	0	0	1,320	2	1	5,780	0	0
<i>Penicillium crustosum</i>	EX - 904	0,660	0	0	2,910	0	0	0,560	0	0	2,000	0	0
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1813	0,300	5p	2	1,600	0	0	1,270	2	0	5,310	0	0
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1348	0,130	0	0	0,910	0	0	0,940	0	0	4,160	0	0
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 503	0,160	3	0	1,730	0	0	1,440	3	0	4,510	0	0
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 1140	0,300	7p	0	0,530	1	0	0,970	2	0	2,680	0	0
<i>Penicillium citrinum</i>	EX - 792	0,360	5p	1	1,490	2	0	0,550	2	0	5,420	0	0
<i>Penicillium antarcticum</i>	EX - 793	0,260	2	0	0,220	2	0	0,830	1	0	1,380	0	0
<i>Penicillium sizovae</i>	EX - 424	0,410	3	0	1,930	1	0	0,790	1	0	4,650	1	0
<i>Penicillium steckii</i>	EX - 416	0,340	1	5p	2,850	2	0	0,680	1	1	5,120	0	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 589	0,280	0	2	0,310	3	0	0,740	2	2	2,410	0	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX - 1590	0,160	1	3	0,110	3	0	0,450	1	0	0,480	2	0
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EX - 1509	0,670	0	0	0,030	0	0	0,710	0	0	0,640	0	0

Konda K. Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Slika 5: Protibakterijska aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi v ekstraktih sevov gliv pridobljenih na gojiščih YNB.



Slika 6: Protibakterijska aktivnost v primerjavi s koncentracijo suhe snovi v ekstraktih sevov gliv pridobljenih na gojiščih z NaCl (Y+10).

Preglednica 10: Redčitve 14 močno protibakterijsko aktivnih organskih ekstraktov

YNB A: acetonski ekstrakti gliv, ki smo jih gojili na gojišču YNB; YNB E: etanolni ekstrakti gliv z gojišča YNB; Y+10 A: acetonski ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl; Y+10 E: etanolni ekstrakti gliv, ki so rastle na gojišču YNB z 10% NaCl.

Pri vsakem rezultatu smo dopisali koncentracijo suhe snovi uporabljene v vzorcu, izraženo v mg/ml (S.S.) in rezultate iz prvega testiranja (1:0). Protibakterijsko aktivnost smo izrazili kot cono inhibicije (mm) ter kot minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK).

VRSTA GLIVE	OZNAKA SEVA	OZNAKA VZORCA	REDČENJE	S.S. mg/ml	EC mm	BS mm	MIK mg/ml
<i>Aspergillus flavus</i>	EX - 1751	YNB E	1:0	1,560	2	4	0,016
			1:10	0,156	/	3	
			1:100	0,016	/	2	
<i>Aspergillus niger</i>	EX - 2130	YNB A	1:0	0,380	4	1	0,004
			1:10	0,038	0	/	
			1:100	0,004	1	/	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX - 618	YNB E	1:0	1,630	0	6	1,630
			1:10	0,163	/	0	
			1:100	0,016	/	0	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX - 401	YNB E	1:0	0,980	0	4	0,980
			1:10	0,098	/	0	
			1:100	0,010	/	0	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX - 3381	YNB A	1:0	1,140	2	8	0,011
			1:10	0,114	/	5	
			1:100	0,011	/	3	
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX - 2134	Y+10 E	1:0	9,460	6	3	0,094
			1:10	0,942	2	/	
			1:100	0,094	2	/	
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX - 3369	YNB A	1:0	0,470	3	4	0,047
			1:10	0,047	/	7	
			1:100	0,005	/	0	
		YNB E	1:0	2,660	5	2	0,027
			1:10	0,266	2	/	
			1:100	0,027	3	/	
		Y+10 E	1:0	7,470	4	3	0,075
			1:10	0,747	/	3	
			1:100	0,075	/	2	
<i>Eurotium repens</i>	EX - 2132	YNB E	1:0	1,200	8	3	0,012
			1:10	0,120	2	/	
			1:100	0,012	2	/	
<i>Penicillium expansum</i>	EX - 1813	YNB A	1:0	0,300	5	2	0,003
			1:10	0,030	1	/	
			1:100	0,003	1	/	
<i>Penicillium polonicum</i>	EX - 1140	YNB A	1:0	0,300	7	0	0,030
			1:10	0,030	1	/	
			1:100	0,003	0	/	
<i>Penicillium citrinum</i>	EX - 792	YNB A	1:0	0,360	5	1	0,004
			1:10	0,036	0	/	
			1:100	0,004	1	/	
<i>Penicillium steckii</i>	EX - 416	YNB A	1:0	0,340	1	5	0,034
			1:10	0,034	/	3	
			1:100	0,003	/	0	

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo pregledali seve gliv redov *Eurotiales* in *Saccharomycetales*, in sicer z namenom odkriti morebitne biološko aktivne organske ekstrakte, katerih biološko učinkovino bi lahko v prihodnosti izolirali in preučevali. Testirane aktivnosti (hemolitična, inhibicija acetilholinesteraze in protibakterijska) se pojavljajo v primerljivih raziskavah na organizmih prisotnih v morju (Sepčić in sod., 1997) in solinah (Derlink, 2009).

5.1.1 Rast

Sestava medija in rastne razmere vplivajo na rast in sintezo sekundarnih produktov. Glive, patogene za človeka, rastejo na medijih z visoko vodno aktivnostjo, visoko temperaturo in nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov, v nasprotju s tipičnimi saprofitskimi glivami, prisotnih v tleh in v hrani, ki lahko uspevajo pri nizkih vodnih aktivnostih, nizkih temperaturah in so pogoste v medijih z višjo vsebnostjo ogljikovih hidratov (Samson in sod., 2004). Pri naši raziskavi smo gojili seve gliv na YNB gojišču in YNB gojišču z 10 % NaCl. Na slednjem je bila rast počasnejša (velikost kolonij manjša). Rast gliv v tekočih gojiščih YNB z in brez NaCl v sorodni raziskavi je pokazala enak trend (Kogej in sod., 2006). Pri raziskavah biološko aktivnih snovi so bila uporabljena še drugačna gojišča. Sevi vrste *Penicillium crustosum*, izolirani iz Arktike in drugih ekoloških niš, so na gojiščih MEA (»malt extract agar«), YES (»yeast extract sucrose«), CYA (»Czapek yeast autolysate agar«) imeli pospešeno rast (večje premere kolonij), medtem ko je na CREA (»creatine sucrose agar«) gojišču 37 arktičnih sevov (od 121 skupnih) pokazalo slabo rast (Sonjak in sod., 2005). Samson in sodelavci (2004) so za kserotolerantne in kserofilne vrste rodu *Penicillium*, *Aspergillus* in *Eurotium* predlagali gojišče DG18 (»Dichloran 18 % Glycerol« agar). Rast in sporulacijo rodu *Eurotium* so določali na gojiščih MEA z 0% do 32 % NaCl in vseh 6 sevov je raslo vsaj do 20 % NaCl, pri vrsti *Eurotium halotolerans* pa je do klitja spor brez nadaljnje rasti pri 32, 5 % NaCl (Butinar in sod., 2005b).

Večina kvasovk na agarju izoblikuje okrogle kolonije z mejno rastno cono, ki eksponentno rastejo, dokler se rast zaradi pomanjkanja hrani in akumuliranja toksičnih produktov (npr. etanola) ne upočasni ali ustavi. Po inokulaciji medija z eno ali več spor ali z delčkom

filamentoznih hif se pojavi micelij z jasno razvidnim robom kolonije, ki se enakomerno razširja do ovire (druga kolonija, rob petrijevke). Včasih se rast ustavi zaradi toksičnih produktov metabolizma (vodikovi ioni, amoniak). Micelij se diferencira v 4 cone od roba do sredine: zunanja (»extending«), v kateri se hife razširjajo po novem mediju, produktivna (»productive«), kjer je povečanje mase največje, cona kjer se tvorijo spore na hifah, izhajajočih iz micelija (»fruiting« cona) in ostarela (»aged«) cona z znižanim metabolizmom (Carlile, 2001).

V poskusih z glivo *Serpula lacrymans* (hišni lesomor) se je količina sekundarnih produktov v gojišču spreminja s časom in sicer je protimikrobnii učinek izvlečka s časom rastel, po treh tednih je dosegel plato in nato začel upadati, kar je v skladu z zaporedjem dogodkov: aktivno rastjo gline, stacionarnim stanjem in avtolizo celič, ki sprosti encime. Posledica tega je razgradnja sekundarnih produktov (Janeš, 2007). Pričakovano smo zato glivni micelij postrgali z gojišča po enim do treh tednov, in sicer v stacionarni fazi rasti, ko so se pri večini pojavile spore. Strganje je bilo v nekaterih primerih oteženo zaradi rasti micelija, hife se namreč ne razširijo po površini, ampak prodrejo tudi v substrat in si tako povečajo dostopnost do hrani. Kompaktne strukture nekaterih micelijev nismo uspeli razdrobiti na manjše delčke kljub mehanski obdelavi in centrifugiranju.

5.1.2 Priprava organskih ekstraktov

Količine micelija v posameznih mikrocentrifugirkah so se je razlikovale in včasih kljub zadostni količini micelija nismo uspeli dobiti zadostne količine supernatanta. Pri prenosu v novo centrifugirko smo zato prenesli še delčke micelija, ki so morda motili določene teste. Ekstrakcija biološko aktivnih snovi je potekala z etanolom in acetonom. Pričakovane snovi, izolirane s temi organskimi topili so nepolarne: steroidi, določeni alkaloidi, terpeni in drugi.

5.1.3 Določanje koncentracije suhe snovi v vzorcih

Koncentracije suhe snovi večine organskih ekstraktov so bile višje v ekstraktih z gojišča s soljo v primerjavi z ekstrakti z gojišča brez soli. Predvidevamo, da so se sevi uspeli prilagoditi osmotskemu stresu in da povečane koncentracije snovi verjetno kažejo na povečano sintezo raznih produktov. Halofilni in halotolerantni organizmi se različno prilagodijo na povišano slanost: shranjujejo anorganske ione, imajo učinkovit izmenjevalni

sistem za ione (Kogej in sod., 2005) ali pa proizvajajo in kopičijo kompatibilne topljence, kot so glicerol, mikosporini in sladkorji (Grant, 2004). Lahko se jim preoblikuje membrana in se spremenijo njene lastnosti (Russell, 1989; Turk in sod., 2007a). Prav tako lahko izločajo glikoproteine in imajo specifične signalne trandukcijske mehanizme (Gunde-Cimerman in sod., 2005).

V naši raziskavi smo ugotovili štiri odstopanja od tega pravila, trije acetonski in en etanolni ekstrakt treh sevov gliv (*Penicillium antarcticum* (EX - 793), *Debaryomyces hansenii* (EX - 1590), *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509)), ki so imeli koncentracijo suhe teže večjo v ekstraktu seva v gojišču brez soli. V raziskavi vpliva soli na rast in metabolizem (pri različnih razmerah) je bil NaCl toksičen za *Saccharomyces cerevisiae*, pri halotolerantni *Debaryomyces hansenii* pa sta ji NaCl in KCl povečala rast (Almagro in sod., 2000). Ta lastnost omogoča vrsti *Debaryomyces hansenii* kontaminacijo hrane z večjo vsebnostjo soli, podobno kakor tudi halotolerantni vrsti *Aspergillus fumigatus*. V naši raziskavi smo imeli 2 seva vrste *Debaryomyces hansenii*, sev EX - 589 in sev EX - 1590. Slednji, arktični, je kot že omenjeno, kazal odstopanja od ostalih rezultatov. Enako velja za arktični sev *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509). Razlog za takšne rezultate je neznan, sicer Carlile (2001) v svoji knjigi navaja morebitni odgovor, da povečan osmotski tlak kvasovk vključuje ustavitev rasti, razgradnjo aktinskega citoskeleta, izgubo celične polarnosti, spremembe v prehodnosti membrane (za glicerol) in shranjevanje glicerola (poliol).

5.1.4 Hemolitična aktivnost

Hemolitično neaktivnih je bilo 12 sevov gliv (predvsem sevi rodu *Penicillium*), medtem ko je preostalih 27 sevov imelo celo 54 aktivnih ekstraktov. Vsi širje ekstrakti so bili aktivni pri treh sevih vrst *Emericella stella-maris* (EX - 349), *Emericella discophora* (EX - 2680) in *Penicillium expansum* (EX - 1348), kar kaže na močno hemolitične produkte, ki se sintetizirajo v gojišču brez ali z 10 % NaCl. Več ekstraktov je bilo aktivnih v gojišču brez soli (»YNB«) kot v gojišču s soljo (»Y+10 «) .

Ekstrakte aktivne le glede na rast glive na gojišču YNB je imelo 12 sevov: *Aspergillus fumigatus* (EX - 3381), *Emericella filifera* (EX - 348), vsi preiskovani sevi rodu *Eurotium* (EX - 66, EX - 2134, EX - 3369, EX - 1041 in EX - 2132), *Penicillium chrysogenum* (EX -

1030), *Penicillium brevicompactum* (EX - 417), *Penicillium crustosum* (EX - 763), *Penicillium polonicum* (EX - 503) in *Debaryomyces hansenii* (EX - 599). Predvidevamo da je sol zavrla sintezo hemolitičnih produktov. Aktivnost ekstrakta z največjo koncentracijo suhe snovi med acetonskimi ekstrakti z gojišča brez soli (»YNB A«), seva *Aspergillus fumigatus* (EX - 3381) je bila nasprotna od rezultatov Maje Derlink (2009), ki je uporabljala vodne ekstrakte. V njeni nalogi je bil edini hemolitično aktivен le ekstrakt seva *Aspergillus fumigatus* z gojišča s NaCl. Verjetno zaradi vsebnosti neznanega proteina. V literaturi smo zasledili, da lahko pri tej vrsti slanost morske vode (3,3 % NaCl) poveča izločanje gliotoksina (Kerzaon in sod., 2007). V raziskavi sevov vrste *Aspergillus fumigatus*, testiranih na različnih medijih z vodno aktivnostjo od 0,999 do 0,828, se je rast micelija postopoma znižala in dosegala nižjo maksimalno vrednost, pri vodnih aktivnostih nižjih od 0,878 pa sta se rast in sinteza sekundarnih produktov pri večini sevov ustavila (Tepšič in sod., 1997).

Nasprotno pa je NaCl spodbudil sintezo hemolitičnih učinkovin pri 3 sevih, ki so rastli na gojišču s soljo (»Y+10«) in sicer pri vrstah *Aspergillus tubingensis* (EX - 401), *Penicillium crustosum* (EX - 904) in *Aspergillus niger* (EX - 799). Slednji sev s solin (Sečovlje, Slovenija), je imel pozitiven le acetonski ekstrakt s slanega gojišča (»Y+10 A«). Možno je, da je rahla hemoliza posledica velike količine hemolitičnih produktov (največja koncentracija suhe snovi od vseh aktivnih ekstraktov). Sev EX - 2130 iste vrste iz morskega ledu (Arktika), je imel aktivna oba acetonska ekstrakta, zmerno na gojišču brez soli (»YNB«) in močno na soli (»Y+10«). Pri tem sevu je sol mogoče spodbudila sintezo hemolitičnih produktov. Uvrščamo ga med seve z aktivnimi ekstrakti z obeh gojišč. Skupno jih je devet (če izvzamemo zgoraj naštete v vseh ekstraktih aktivne seve): *Aspergillus flavus* (EX - 1751), *Aspergillus niger* (EX - 2130), *Aspergillus ochraceus* (EX - 618), *Aspergillus sydowii* (EX - 405), *Aspergillus terreus* (EX - 312), *Emericella olivicola* (EX - 2650), *Penicillium chrysogenum* (EX - 426), *Penicillium citrinum* (EX - 792) in *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509). Sevi vrste *Penicillium chrysogenum* so tvorili krisolizin, hemolitičen protein (Donuhue in sod., 2005). Oba seva te vrste sta bila v naši raziskavi hemolitično aktivna. V organskih ekstraktih nismo pričakovali proteinov, zato je bila aktivnost verjetno posledica prisotnosti neznane nepolarne snovi.

Sevi rodu *Aspergillus* in *Penicillium* so znani proizvajalci sekundarnih metabolitov, predvsem mikotoksinov. Anzai in sodelavci (2008) so testirali hemolitično aktivnost acetonskih ekstraktov 366 sevov 69 vrst rodu *Aspergillus* in 19,7 % sevov je bilo aktivnih. Ista skupina je raziskala 394 sevov 127 vrst gliv rodu *Penicillium*, aktivnih je bilo 45,4 % sevov (Nakashima in sod., 2008). Nasprotno smo v naši raziskavi rod ugotovili, da je rod *Aspergillus* bolj hemolitičen s 14 od 32 ekstraktov, večina (10) od teh je acetonskih. Za primerjavo, od 76 ekstraktov sevov rodu *Penicillium* je bilo le 15 pozitivnih, od tega 10 acetonskih.

5.1.5 Inhibicija acetilholinesteraze

Omejeno inbibicijo acetilholinesteraze (AChE) smo ugotovili pri 14 ekstraktih 7 sevov, kar je številčno manj v primerjavi z vodnimi vzorci istih sevov (Derlink, 2009), a je bila inhibicija organskih ekstraktov bolj izrazita (največ 51,2 %) v primeru etanolnega ekstrakta seva *Eurotium amstelodami* (EX - 2134) z gojišča z 10 % NaCl. Vsi 4 ekstrakti vrste *Emericella discophora* (EX - 2680) so izražali inhibicijo ne glede na razmere slanosti v gojišču. Podobno smo opazili tudi pri treh ekstraktih (»YNB A«, »YNB E«, »Y+10 E«) seva *Eurotium repens* (EX - 2132). Pri sevu *Emericella stella-maris* (EX - 349) se je inhibicija izrazila v ekstraktih z gojišča s soljo (»Y+10 A« in »Y+10 E«), pri sevu *Eurotium repens* (EX - 2132) pa v etanolnih ekstraktih (»YNB E« in »Y+10E«). Samo en aktiven ekstrakt so imeli sledeči sevi: *Aspergillus tubingensis* (EX - 401) in *Eurotium amstelodami* (EX - 2134), oba etanolni ekstrakt z gojišča s soljo (»Y+10«) ter *Penicillium polonicum* (EX - 1140) z etanolnim ekstraktom z gojišča YNB. Prevla dovali so vzorci z gojišča s soljo in etanolni ekstrakti. Inhibicija se je pojavila predvsem pri rodovih *Emericella* in *Eurotium*, kar pa v literaturi nismo zasledili. Viri navajajo inhibicijo AChE pri vrstah rodu *Penicillium* (Shiomi in sod., 1999) in *Aspergillus* (Yoo in sod., 2005).

5.1.6 Protibakterijska aktivnost

Protibakterijske učinkovine spadajo med protimikrobine snovi. Antibiotiki so učinkovine, izolirane iz različnih vrst mikroorganizmov (bakterij, gliv, aktinomicet), ki zavirajo rast ali ubijejo druge mikroorganizme. V odgovor se pri mikrobih lahko razvije odpornost proti določenim učinkovinam. Učinkovitost protibakterijskih produktov preizkušajo predvsem z difuzijskim testom na agarju, dilucijskim testom na agarju in dilucijskim testom v

hranilnem gojišču (Chambers, 2006). V pregledani literaturi bioaktivnih snovi gliv iz morskega okolja (Priloga A) smo zasledili, da le-te velikokrat izražajo protibakterijsko aktivnost. Potrdili smo protibakterijsko aktivnost vrste *Aspergillus sydowii* iz raziskave, ki je pokazala aktivnost proti vrstam *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* (Zhang in sod., 2008) ter aktivnost vrste *Penicillium citrinum* proti *Bacillus subtilis* (Sasaki in sod., 2005). V primerljivi raziskavi se je ob povečanju slanosti pri večini sevov morskih gliv rodu *Aspergillus* povečala sinteza protibakterijsko aktivnih snovi (Masuma in sod., 2001).

Protibakterijska aktivnost ekstraktov, izmerjena s standardnim difuzijskim testom na agarju proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*), je bila večja od aktivnosti proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). To so potrdili tudi rezultati z 10 sevi, ki so inhibirali samo rast bakterije *E. coli*, ne pa tudi bakterije *B. subtilis*. Sicer imajo po Gramu negativne bakterije zunanjno celično membrano, ki ščiti celico pred vdorom nezaželenih spojin (Janeš, 2007) in so zaradi te dodatne membrane naravno bolj odporne proti določenim snovem. V večini naših ekstraktov se to ni potrdilo.

Aktivnost vseh 8 ekstraktov, tako proti *E. coli* kot proti *B. subtilis*, se je izrazila pri sevih *Eurotium amstelodami* (EX - 66), *Eurotium herbariorum* (EX - 3369) in *Eurotium repens* (EX - 2132). Rod *Eurotium* se je izkazal kot protibakterijsko najbolj aktiven. Sev *Eurotium herbariorum* (EX - 3369) so že preučevali v raziskavi vrst rodu *Eurotium* iz hiperslanih okolijih, ki so tvorile neznane produkte in še vrstno specifične poznane produkte kot so ekinulin, neoekinulin A, flavoglavcin in auroglavcin (Butinar in sod., 2005b), med katerimi nekatere delujejo protibakterijsko. Morska gliva *Eurotium repens* je v etilacetatnem ekstraktu, ki je vseboval mešanico pigmentov, pokazala aktivnost proti po Gramu pozitivni bakteriji *Staphylococcus aureus* (Smetanina in sod., 2007). V našem testu je bila ravno pri vrstah *Eurotium repens* proti *E. coli* (ekstrakt YNB E) in *Aspergillus fumigatus* proti *B. subtilis* (YNB A) konca inhibicije največja (8 mm).

Na obeh gojiščih ni inhibiralo rasti bakterij 10 sevov gliv. Le-tem so se na gojišču z NaCl pridružili še širje: seva *Penicillium nordicum* (EX - 3196) in *Penicillium crustosum* (EX - 1329) izolirana iz Artike, ter solinska seva *Penicillium expansum* (EX - 1813) in *Penicillium polonicum* (EX - 503). Na sintezo protibakterijskih produktov je morda negativno vplivala sol. Sevi vrste *Penicillium crustosum*, med katerimi sta bila tudi seva

EX - 1329 (CREA+) in EX - 904 (CREA-), so proizvajali vrstno značilne sekundarne produkte (Sonjak in sod., 2005). Vsi sevi so tvorili penitreme in rokvefortine. Vrsto *Penicillium crustosum* so smatrali za halotolerantno zaradi rasti nekaterih sevov (med njimi EX - 1329) na gojiščih z 20 % NaCl na sobni temperaturi. To je v nasprotju z našimi rezultati, kjer se je pokazalo, da je pri zgoraj navedenih štirih sevih sol negativno vplivala na sintezo produktov kljub povečanju koncentracije suhe snovi.

V 14 ekstraktih je cona inhibicije dosegla ali presegla 4 mm, zato smo te ekstrakte redčili, ponovno izvedli test ter določili MIK. To so bili *Aspergillus flavus* (EX - 1751), *Aspergillus niger* (EX - 2130), *Aspergillus ochraceus* (EX - 618), *Aspergillus tubingensis* (EX - 401), *Aspergillus fumigatus* (EX - 3381), *Eurotium amstelodami* (EX - 2134), *Eurotium herbariorum* (EX - 3369), *Eurotium repens* (EX - 2132), *Penicillium expansum* (EX - 1813), *Penicillium polonicum* (EX - 1140), *Penicillium citrinum* (EX - 792) in *Penicillium steckii* (EX - 416). Večina ekstraktov (12/14) je pripadala ekstraktom z gojišča brez soli (YNB) in je inhibirala rast *E. coli* (8/14). Najmanjšo minimalno inhibitorno koncentracijo (0,003 mg/ml) je imel acetonski ekstrakt z gojišča brez soli (»YNB A«) vrste *Penicillium expansum*.

5.1.7 Pregled vseh bioloških testov

Biološko aktivnost smo zasledili pri 38 preiskovanih sevih, edina izjema brez aktivnosti je bil solinski (Mrtvo morje) sev *Penicillium corylophilum* (EX - 1778). Zanimivo, pri sevu EX - 1325 iste vrste smo ugotovili protibakterijsko aktivnost, morski sev te vrste pa je sintetiziral mikotoksin citreozukumarinol (Malstrom in sod., 2000). V vseh testih so bili aktivni sevi vrst *Eurotium amstelodami* (EX - 66), *Eurotium herbariorum* (EX - 3369) in *Eurotium repens* (EX - 2132). Aktivnost je prevladovala v ekstraktih sevov z gojišča brez dodatka NaCl in v acetonskih ekstraktih. Največ sevov je kazalo protibakterijsko aktivnost (proti *E. coli*), najmanj pa je inhibiralo acetilholinesterazo, kar je glede na pregledano literaturo tudi pričakovano.

Primerjava med ekstrakti istih sevov na gojiščih brez (»YNB«) in s soljo (»Y+10«) je pokazala, da je NaCl večinoma zmanjšal biološko aktivnost ekstraktov, saj so bile vrednosti Y+10 ekstraktov nižje. Preživetje gliv v morskih okoljih je odvisno od regulacijskih mehanizmov, ki so energijsko potratni, zato se lahko pojavi zmanjšana

sinteza sekundarnih produktov ali upočasnjena produkcija metabolitov v prisotnost visokih koncentracij soli (Bugni in Ireland, 2004). To bi lahko pojasnilo manjše aktivnosti določenih sevov iz solin, ki so v literaturi opredeljeni kot halofilni ali halotolerantni. Skoraj vse vrste so med kserotolerantne oz. kserofilne uvrstili De Hoog in sod. (2005). Izjeme so bile vrsta *Penicillium nordicum*, vrste rodu *Emericella* (Zalar in sodelavci (2008) so jih pozneje predlagali za nove vrste) in vrsta *Debaryomyces hansenii*, izolirana iz solin (Butinar in sod., 2005a) in že prej določena kot halotolerantna (Almagro in sod., 2000). Kvasovke so v naši raziskavi pokazale določeno biološko aktivnost, predvsem solinski sev (EX - 589).

Aktivnosti med solinskimi (21 sevov) in arktičnimi sevi (14 sevov) se niso bistveno razlikovale, večinoma je bil delež aktivnih v skupini arktičnih sevov višji od deleža aktivnosti v skupini solinskih sevov, pri hemolizi je bilo obratno (delež solinskih (16/21) presegel arktične seve (8/14)). Sevi se morajo obeh okoljih prilagoditi na razmere zmanjšane vodne aktivnosti, zato rezultati niso presenetljivi. Biološko aktivne produkte so že preučevali pri nekaterih naših sevih izoliranih iz Arktike (Sonjak, 2006; Sonjak in sod., 2006).

5.2 SKLEPI

- Dodatek 10 % NaCl na definiranem gojišču YNB je upočasnil rast glivnih kultur.
- Koncentracije suhe snovi so bile višje pri ekstraktih pridobljenih na gojišču z 10 % NaCl v primerjavi z ekstrakti dobljenimi z gojišča brez dodane soli.
- Hemolitično aktivni so bili sevi:
 - Vsi sevi rodu *Aspergillus*: *A. flavus* (EX - 1751), oba seva *A. niger* (EX - 799 in EX - 2130), *A. ocharaceus* (EX - 618), *A. sydowii* (EX - 405), *A. tubingensis* (EX - 401), *A. terreus* (EX - 312) in *A. fumigatus* (EX - 3381),
 - Vsi sevi rodu *Emericella*: *E. stella-maris* (EX - 349), *E. filifera* (EX - 348), *E. olivicola* (EX - 2650) in *E. discophora* (EX - 2680),
 - Vsi sevi rodu *Eurotium*: oba seva *E. amstelodami* (EX - 66 in EX - 2134), oba seva *E. herbariorum* (EX - 3369 in EX - 1041) in *E. repens* (EX - 2132),
 - Sevi rodu *Penicillium*: oba seva *P. chrysogenum* (EX - 426 in EX - 1030), *P. brevicompactum* (EX - 417), 2 seva *P. crustosum* (EX - 763 in EX - 904), *P. expansum* (EX - 1348), *P. polonicum* (EX - 503) in *P. citrinum* (EX - 792),
 - Kvasovki: *Debaryomyces hansenii* (EX - 599) in *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509).
- Encim acetilholinesterazo so inhibirali sevi: *A. tubingensis* (EX - 401), *Em. stella-maris* (EX - 349), *Em. discophora* (EX - 2680), *Eu. amstelodami* (EX - 2134), *Eu. herbariorum* (EX - 3369), *Eu. repens* (EX - 2132) in *P. polonicum* (EX - 1140).
- Protibakterijska aktivnost proti vrstama *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* se je pojavila pri sevih: *A. flavus* (EX - 1751), *A. niger* (EX - 2130), *A. ocharaceus* (EX - 618), *A. sydowii* (EX - 405), *A. tubingensis* (EX - 401), *A. fumigatus* (EX - 3381), *Em. olivicola* (EX - 2650), obeh sevih *Eu. amstelodami* (EX - 66 in EX - 2134), obeh sevih *Eu. herbariorum* (EX - 3369 in EX - 1041), *Eu. repens* (EX - 2132), *P. nordicum* (EX - 1363), *P. chrysogenum* (EX - 1030), obeh sevih *P. brevicompactum* (EX - 417 in EX - 1300), *P. crustosum* (EX - 1329), *P.*

expansum (EX - 1813), *P. citrinum* (EX - 792), *P. steckii* (EX - 416), ter pri obeh sevih *D. hansenii* (EX - 599 in EX - 1590).

- Protibakterijska aktivnost proti vrsti *Escherichia coli* se je pojavila pri večjemu številu sevov kot proti vrsti *Bacillus subtilis*.
- Biološko aktivni v vseh treh testih so sevi *Eurotium amstelodami* (EX - 66), *Eurotium herbariorum* (EX - 3369) in *Eurotium repens* (EX - 2132).
- Biološko neaktivен je bil sev *Penicillium corylophilum* (EX - 1778).
- Organski ekstrakti halofilnih in halotolerantnih sevov so bolj biološko aktivni od vodnih ekstraktov.

6 POVZETEK

Naravni produkti organizmom pogosto omogočajo preživetje v njihovi ekološki niši. V ekstremnih okoljih se pojavijo novi organizmi z neznanimi in učinkovitimi načini za premagovanje stresnih razmer. Halofilne in halotolerantne glice se pojavljajo v naravnih okoljih z nizko vodno aktivnostjo kot so soline, morje ali ledeniki. Ker gre za znane proizvajalce naravnih produktov, nas je zanimalo, ali nizka vodna aktivnost vpliva na sintezo naravnih produktov. Obravnavali smo 39 vrst rodov *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Debaryomyces* in *Metschnikowia*. Te vrste oziroma njihove seve so izolirali iz solin po svetu (Izrael, Mrtvo morje, Namibija, Sečovlje-Slovenija in Španija), Arktike (morski in ledeniški led) ter preostalih okolij (oliva, tla, sol). Seve smo gojili na gojiščih YNB brez in z 10 % dodatkom NaCl. Želeli smo ugotoviti, ali na sintezo naravnih produktov vpliva vsebnost soli v gojišču, ki povzroči znižanje vodne aktivnosti. Ekstrakcijo smo izvedli z organskimi topili – acetonom in etanolom. Opravili smo test hemolitične aktivnosti, test inhibicije encima acetilholinesteraze in protibakterijski test proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* in proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*.

Raziskava je pokazala, da je bila koncentracija suhe snovi višja na definiranem gojišču YNB z dodatkom soli v primerjavi z gojiščem YNB brez soli. Biološko neaktivен je bil samo sev vrste *Penicillium corylophilum*. Hemolitično aktivnost je izražala vrsta sevov, med drugim vsi sevi rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ocharaceus*, *A. sydowii*, *A. tubingensis*, *A. terreus*, *A. fumigatus*), *Emericella* (*E. stella-maris*, *E. filifera*, *E. olivicola*, *E. discophora*) in *Eurotium* (*E. amstelodami*, *E. herbariorum*, *E. repens*). Hemolitično manj aktivni so bile vrste rodu *Penicillium*: *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. polonicum* in *P. citrinum* ter kvasovki *Debaryomyces hansenii* in *Metschnikowia bicuspidata*. Delovanje encima acetilholinesteraze so zavirale vrste: *Aspergillus tubingensis*, *Emericella stella-maris*, *Emericella discophora*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*, *Eurotium repens* in *Penicillium polonicum*. Največ ekstraktov je izrazilo protibakterijsko aktivnost, in sicer predvsem proti vrsti *Escherichia coli*. Vrste z aktivnostjo proti obema bakterijama so bile naslednje: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ocharaceus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus tubingensis*,

Aspergillus fumigatus, *Emericella olivicola*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum*, *Eurotium repens*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium steckii* in kvasovka *Debaryomyces hansenii*. 14 ekstraktov je izražalo močno protibakterijsko aktivnost, zato smo jih redčili in določili približno minimalno inhibitorno koncentracijo; najmanjšo je imel *Penicillium expansum*. Primerjava je pokazala večjo biološko aktivnost organskih ekstraktov v primerjavi z vodnimi ekstrakti istih sevov. Biološke aktivnosti opažene v tej raziskavi za večino vrst dosedaj še niso bile opisane v pregledani literaturi. Pri sevih obravnavanih gliv, ki izhajajo iz morskih habitatov, smo zasledili in potrdili le protibakterijsko aktivnost vrst *Aspergillus sydowii* in *Penicillium citrinum*.

7 VIRI

Almagro A., Prista C., Castro S., Quintas C., Madeira-Lopes A., Ramos J., Loureiro-Dias M.C. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. International Journal Of Food Microbiology, 56 (2-3): 191-197.

Andersen B., Smedsgaard J., Frisvad J.C. 2004. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (8): 2421-2428.

Anzai K., Mayuzumi S., Nakashima T., Sato H., Inaba S., Park J.-Y., Kuwahara N., Suzuki R., Utsumi N., Yokoyama F., Ohfuku Y., Ando K. 2008. Comparison of groupings among members of the genus *Aspergillus* based on phylogeny and production of bioactive compounds. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 72 (8): 2199-2202

Bhadury P., Mohammad B.T., Wright P.C. 2006. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33(5): 325-337.

Bringmann G., Lang G., Gulder T. A. M., Tsuruta H., Mühlbacher J., Maksimenka K., Steffens S., Schaumann K., Stöhr R., Wiese J., Imhoff J.F., Perović-Ottstadt S., Boreiko O., Müller W.E.G. 2005. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. Tetrahedron, 61: 7252–7265.

Bugni T.S., Ireland C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms Natural Product Reports, 21 (1): 143-163.

Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005 a. Yeast diversity in hypersaline habitats. Fems Microbiology Letters, 244 (2): 229-234

Butinar L., Zalar P., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2005b. The genus *Eurotium* - members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. Fems Microbiology Ecology, 51 (2): 155-166.

Calvo A.M., Gardner H.W., Keller N.P. 2001. Genetic Connection between fatty Acid Metabolism and Sporulation in *Aspergillus nidulans*. The Journal of Biological Chemistry, 276 (28): 25766-25774.

Calvo A.M., Wilson R.A., Woo Bok J., Keller N.P. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 (3): 447-459.

Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. 2001. Fungal Cells and Vegetative Growth. V: *The Fungi*. 2nd edition. San Diego (USA), Academic Press: 85-184.

Casas E., de Ancos B., Valderrama M.J., Cano P., Peinado J.M. 2004. Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. International Journal of Food Microbiology, 94: 93– 96.

Chambers H.F. 2006. General principles of antimicrobial therapy. V: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th edition, Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. (eds.), New York (USA), McGraw-Hill: 1143-1170.

Damare s., Raghukumar C, Raghukumar S. 1998. Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. Aquatic Microbial Ecology 15: 153–63.

De Hoog S., Zalar P., Van Den Ende B.G., Gunde-Cimerman N. 2005. Relation of Halotolerance to Human-Pathogenicity in the Fungal Tree of Life: An Overview of Ecology and Evolution under Stress. V: Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (ur.). Nizozemska, Springer: 371-395.

Demain A.L., Fang A. 2000. The natural functions of secondary products. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 69: 1-39.

Derlink M. 2009. Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv: diplomska naloga. Ljubljana.

Donia M., Hamann M.T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. Lancet Infectious Diseases, 3 (6): 338-348.

Donohue M., Chung Y., Magnuson M.L., Ward M., Selgarde M.J., Vesper S. 2005. Hemolysin chrysolysin from *Penicillium chrysogenum* promotes inflammatory response. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 208 (4): 279-285.

Ellman G. L., Courtney D., Andres V., Featherstone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7: 88-95.

Faulkner J. 2000. Marine pharmacology. Antonie van Leeuwenhoek, 77 (2): 135-145.

Feofilova E.P., Kuznetsova L.S., Sergeeva Y.E., Galanina L.A. 2009. Species composition of food-spoiling mycelial fungi. Microbiology, 78 (1): 112-116.

Fox E.M., Howlett B.J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. Current Opinion in Microbiology, 11 (6): 481-487.

Frisvad J.C., Andersen B., Thrane U. 2008. The use of secondary products profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. Mycological Research, 112: 231-240.

Gamal-Eldeen A.M., Abdel-Lateff A., Okino T. 2009. Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algaliculous marine fungus *Penicillium* sp.. Environmental Toxicology and Pharmacology, 28: 317-322.

Grant W.D., 2004. Life at low water activity. The Royal Society, 359: 1249-1267l.

Gunde-Cimerman N., Butinar L., Sonjak S., Turk M., Uršič V., Zalar P., Plemenitaš A. 2005. Halotolerant and halophilic fungi from coastal environments in the artics. V: Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya. Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. (ur.) Dordrecht, Springer: 397- 423.

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): 235-240.

Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, 105: 1422-1432.

Hoffmeister D., Keller N.P. 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. Natural Product Reports, 24 : 393-416.

Janeš D. 2007. Raziskave gliv kot virov novih protimikrobnih učinkovin: doktorska disertacija. Ljubljana.

Kerzaon I., Grovel O., Robiou Du Pont T., Le Pape P., Pouchus Y.-F. 2008. Effects of seawater on growth and gliotoxin excretion of marine strains of *Aspergillus fumigatus* Fres. Toxicon, 51, 398-405.

Kis-Papo T., Oren A., Wasser S.P., Nevo E. 2003. Survival of Filamentous Fungi in Hypersaline Dead Sea Water. Microbal Ecology, 45: 183–190.

Kogej T., Gostincar C., Volkmann M., Gorbushina A.A., Gunde-Cimerman N. 2006. Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? Environmental Chemistry, 3(2): 105-110.

Kogej T., Ramos J., Plemenitas A., Gunde-Cimerman N. 2005. Halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 6600-6605.

Krumgalz B.S., Millero F.J. 1982. Physico-chemical study of the Dead Sea waters. I. Activity coefficient of major ions in the Dead Sea water. *Marine Chemistry* 11: 209–222
citirano po Kis-Papo T., Oren A., Wasser S.P., Nevo E. 2003. Survival of Filamentous Fungi in Hypersaline Dead Sea Water. *Microbal Ecology*, 45: 183–190.

Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E., Frisvad J.C. 2005. Phenotypic taxonomy and produktes profiling in mikrobial drug discovery. *Natural Products Report*, 22: 672-695.

Lin A.-Q., Du L., Fang Y.-C., Wang F.-Z., Zhu T.-J., Gu Q.-Q., Zhu W.-M. 2009. *iso- α -Cyclopiazonic acid*, a new natural product isolated from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus* C-F-3. *Chemistry of Natural Compounds*, 5: 569-571.

Malmstrom J., Christophersen C., Frisvad J.C. 2000. Secondary produktes characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochemistry*, 54 (3): 301-309.

Masuma R., Yamaguchi Y., Noumi M., Omura S., Namikosh M. 2001. Effect of sea water concentration on hyphal growth and antimicrobial produktes production in marine fungi. *Mycoscience*, 42: 455-459.

Mueller G.M., Schmit J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16 (1): 1-5.

Nakashima T., Mayuzumi S., Inaba S., Park J.-Y., Anzai K., Suzuki R., Kuwahara N., Utsumi N., Yokoyama F., Sato H., Okane I., Tsurumi Y., Ando K. 2008. Production of

Bioactive Compounds Based on Phylogeny in the genus *Penicillium* Preserved at NBRC. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 72 (11): 3051-3054.

Onofri S., Barreca D., Selbmann L., Isola D., Rabbow E., Horneck G., de Vera J.P., Hatton J., Zucconi L. 2008. Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and Martian conditions. Studies in Mycology, 61: 99-109.

Purves K.P., Sadava D., Orians G.H., Heller H.C. (ur.) 2004. Fungi: Recyclers, Pathogens, Parasites, and Plant Partners. V: Life: The science of Biology. 7th edition. Sunderland (USA), Sinauer Associates: 603-619.

Rusell N.J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. Journal Of Bioenergetics And Biomembranes, 21 (1): 93-113.

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

Sasaki M., Tsuda M., Sekiguchi M., Mikami Y., Kobayashi J. 2005. Perinadine A, a novel Tetracyclic Alkaloid from Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. Organic Letters, 7 (19): 4261-4264.

Sepčić K., Batista U., Vacelet J., Maček P., Turk T. 1997. Biological Activities of Aqueous Extracts from Marine Sponges and Cytotoxic Effects of 3-Alkylpyridinium Polymers from Reniera sarai. Comparative Physiology and Biochemistry, 117(1): 47-53.

Shiomi K., Tomoda H., Otoguro K., Omura S. 1999. Meroterpenoids with various biological activities produced by fungi. Pure and Applied Chemistry, 71(6): 1059-1064.

Smetanina O.F., Kalinovskii A.I., Khudyakova Y.V., Slinkina N.N., Pivkin M.V., Kuznetsova T.A. 2007. Produktes from the marine fungus *Eurotium repens*.Chemistry of Natural Compounds, 43 (4): 395-398

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

Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2005. Comparison of secondary products production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. Fems Microbiology Ecology, 53: 51-60.

Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman. 2006. *Penicillium* Mycobiota in arctic Subglacial Ice. Microbial ecology, 52: 207-216.

Sun H.-H., Mao W.-J. Chen Y., Guo S.-D., Li H.-Y., Qi X.-H., Chen Y.-L., Xu J. 2009. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. Carbohydrate Polymers, 78: 117–124.

Tepsic K., Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C. 1997. Growth and mycotoxin production by *Aspergillus fumigatus* strains isolated from a saltern Fems Microbiology Letters, 157 (1): 9-12.

Tsai H.-F., Chang Y.C., Washburn R.G., Wheeler M. H., Kwon-Chung K.J. 1998. The Developmentally Regulated *alb1* Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. Journal of Bacteriology, 180 (12): 3031-3038.

Turk M., Abramovic Z., Plemenitas A., Gunde-Cimerman N. 2007a. Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi. Fems Yeast Research, 7 (4): 550-557.

Turk M., Montiel V., Žigon D., Plemenitas A., Ramos J. 2007b. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. Microbiology, 153: 3586-3592.

Wang J.-S., Groopman J.D. 1999. DNA damage by mycotoxins. Mutation Research 424: 167–181.

Waring P., Beaver J. 1996. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. General Pharmacology 27(8):1311-1316.

Webster J., Weber R.W.S. 2007. Eurotiales. V: Introduction to fungi. 3rd edition. New York (USA), Cambridge University Press : 297-315.

Yoo I.-D., Cho K.-M., Lee C.-K., Kim W.-G. 2005. Isoterreulactone A, a novel meroterpenoid with anti-acetylcholinesterase activity produced by *Aspergillus terreus* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15(2): 353-356

Zalar P., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2008. Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. Mycologia, 100(5): 779-795.

Zhang M., Wang W.-L., Fang Y.-C., Zhu T.-J., Gu Q.-Q., Zhu W.-M. 2008. Cytotoxic Alkaloids and Antibiotic Nordammarane Triterpenoids from the Marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. Journal of Natural Products, 71: 985-989.

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rada zahvalila mentorici Kristini Sepčić za njeno neomajno podporo, nasvete in pomoč pri moji diplomi.

Hvala somentorici Nini Gunde-Cimerman za sprejem somentrstva in vsem ostalim na Katedri za biologijo mikroorganizmov za pomoč pri izvedbi diplome. Še posebej hvala dr. Poloni Zalar za spremljanje napredka mojega dela. Ireni Pavešič in Gregorju Bajcu hvala za pomoč v laboratoriju. Članom komisije hvala za njihov prispevак k moji diplomske nalogi.

Maja, tebi sem neskončno hvaležna za male in velike dogodivščine pri praktičnem delu diplome. Najlepša hvala prijateljicam, ker verjamete vame in me sprejmete takšno kot sem. Najbolj bi se rada zahvalila mami Mariji in očetu Tonetu za podporo med študijem. Hvala teti Pepci in Damjanu za vsa skupaj preživeta leta. In vsakemu članu moje družine hvala za zaupanje. Hvala trenutkom in osebam, ki so pomagale sooblikovati moja študentska leta.

PRILOGA A: NARAVNI PRODUKTI OBRAVNAVANIH RODOV GLIV IZ NARAVNIH SLANIH HABITATOV DO KONCA LETA 2010

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspermitin A	Poliketid	Inducira rast nevritov v podganjih feokromocitomskih celicah	Tsukamoto, S. in sod. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2004, 14 , 417 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus</i> sp.	Golmenon	Diketopiperazinski alkaloid	Antioksidant, lovilec radikalov	Li, Y. in sod. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 2004, 52 , 375 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus</i> sp.	Himeične kisline A-C		Himeična kislina A inhibira ubikvitinsko aktivacijo encima E1	Tsukamoto, S. in sod. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2005, 15 , 191 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus</i> sp.	(+)-Epoksidon (+)-Epoksidon monoacetat Gentizil alkohol 3-Klorogentizil alkohol Metilhidrokinon	Poliketidi	Protibakterijska aktivnost proti MRSA (methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in MDRSA (multi-drug-resistant <i>S.aureus</i>) Lovilec radikalov, antioksidant	Closse, A. in sod. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 1965, 49 , 204 Assante, G. in sod. <i>Phytopathol. Mediterr.</i> , 1980, 19 , 163 Sequin-Frey, M. in Tamm, C. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 1971, 54 , 851. Burnett, A.R. in Thomson, R.H. <i>J. Chem. Soc. C</i> , 1968, 857. Li, Y in sod. <i>Nat. Prod. Sci.</i> , 2005, 11 , 136. (vsi članki v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergilamid A Aspergilamid B	Tripeptid	Citotoksičnost	Toske, S.G. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 1998, 54 , 13459 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Aspergillus</i> sp.	Maktanamid	Diketopiperazin	Fungistatično učinkovanje	Lorenz, P. <i>Nat. Prod. Lett.</i> , 1998, 12 , 55 (v Faulkner, DJ <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergiloksid	Sesterterpenski epoksi-diol		Cueto, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2002, 4 , 1583 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21 , 1-49)
<i>Aspergillus</i> sp.	Asperiamid A	Cerebrozid		Ouyang M.A. in sod. <i>J. Asian Nat. Prod. Res.</i> , 2005, 7 , 761 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus</i> sp.	Tropolaktoni A-D	Meroterpenoidi	Tropolaktona A in C sta šibko citotoksična proti HCT-116 celicam	Cueto, M. in sod. <i>Phytochemistry</i> , 2006, 67 , 1826 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Aspergillus</i> sp.	Dimetil 2, 3 -dimetilozoot		Citotoksičen proti humani kronični mieločni levkemiji (celični liniji K5672) preko blokade S-faze in apoptoze	Liu, R. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2006, 59 , 362 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Aspergillus</i> sp.	Dehidroksiklorofusarielin B	Polioksigenatni dekalinski derivat	Zmerna aktivnost proti <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA in MDRSA	Kobayashi, H. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1995, 48 , 42 Nguyen, H.P. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 1188 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
	Fusarielin A (znan)			
	Fusarielin B (znan)			
<i>Aspergillus</i> sp.	Notoamidi A-D	Dvojno prenilirani indolni alkaloidi	Zmerna citotoksičnost (proti HeLa in L1210 celicam)	Kato, H. in sod. <i>Angew. Chem., Int. Ed.</i> , 2007, 46 , 2254 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
<i>Aspergillus</i> sp. 05F16	Tetrahidrostricin 1-deoksitetrahidrobostricin	Dva heksahidroantrona	Rahla protibakterijska aktivnost proti <i>Staphylococcus aureus</i> in <i>Escherichia coli</i>	Xu, JZ. in sod. <i>J. Antib.</i> , 2008, 61 , 415-419 (v Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Aspergillus</i> sp.	Notoamidi F-K	Šest Indol alkaloidov	Rahla citotoksična aktivnost proti HeLa celicam (Notoamid L)	Tsukamoto, S. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2008, 71 , 2064-2067
<i>Aspergillus</i> sp.	(-)-Versikolamid B			Tsukamoto, S. in sod. <i>Organ. Let.</i> , 2009, 11 , 1297-1300
	Notoamidi L-N	Alkaloidi		
<i>Aspergillus</i> sp. MF-93	Asperksanton	Difuranksanton	Inhibicijska aktivnost	Wu, Z.J. in sod. <i>P. Manag. Sci.</i> , 2009, 65 , 60-65
	Asperbifenil	Bifenil		
<i>Aspergillus aculeatus</i> CR1323-04	Aspergilusol A	Derivat tirozina	Inhibicija α -glukozidaze kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ingavat, N. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2009, 72 , 2049-2052
<i>Aspergillus candidus</i>	Prenilterfenilin 4``-Deoksiprenilterfenilin 4``- Deoksiizoterprenin 4``- Deoksiterprenin (znan)		Citotoksični za človeške epidermalne rakave KB (KB3-1) celice	Wei, H. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 586 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Karbonaron A Karbonaron B		Zmerna citotoksičnost (K562)	Zhang, Y. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 153 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus carneus</i>	Aspergilicini A–E	Depsipeptidi	Citotoksičnost proti nematodu <i>Haemonchus contortus</i>	Capon, R.J. in sod. <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2003, 1 , 1856. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15–61)
<i>Aspergillus glaucus</i>	Aspergiolid A	Antrakinonski derivat	Citotoksičen proti vrsti sesalskih celičnih linijah	Du, L. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2007, 63 , 1085 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus flavipes</i>	Flavicerebrozid A Flavicerebrozid B	Cerebrozidni analogi	Aktivnost proti KB celični liniji	Jiang, T. in sod. <i>J. Asian Nat. Prod. Res.</i> , 2004, 6 , 249. (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26–78)
<i>Aspergillus flavus</i>	4-hidroksimetil-5-hidroksi-2H-piran-2-on (5-hidroksi-2-okso-2H-piran-4-il) metil acetat	Dva 5-hidroksi-2-pironksa derivata	Indukcija sinteze cAMP (4-hidro.)	Lin, A.Q. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2008, 61 , 245-249 (Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Aspergillus flavus</i> C-F-3	Izo- α -ciklopiazonična kislina	Triptofanski derivat	Citotoksična aktivnost proti vrsti celičnih linij (HL-60, MOLT-4, BEL-7402 in A-549)	Lin, A.Q. in sod. <i>Chem. Nat. Prod.</i> , 2009, 45 , 677-680
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumikvinazolini A-C		Zmerna citotoksičnost	Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1992, 33 , 1621(v Faulkner, DJ <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1994-)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumikvinazolini D-G	Alkaloid		Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1992, 33 , 1621 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Aspergillus fumigatus</i> BM 939	Triprostatin A Triprostatin B	Diketopiperazin	Citotoksičnost	Cui, C.B. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1995, 48 , 1382 Depew, K.M. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 1996, 118 , 12463 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1999, 16 , 155-198)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Triptokvivaline J			Yamazaki, M. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 1978, 26 , 111. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11-O-Metilpseurotin A		Selektivna inhibicija Hof1 seva kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Boot, C.M. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 1672 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cefalimizin A		Opazna citotoksičnost (proti P388 in HL-60 celicam)	Yamada, T. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2007, 48 , 6294 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Spirotriprostatini C-E 2 derivata fumitremorgina B 13-oksoverkulogen	Sedem indol diketopiperazinskih alkaloidov	Citotoksična aktivnost proti vrsti celičnih linij (MOLT-4, A549, HL-60, BEL-7420)	Wang, F.Z. in sod., <i>Tetrahedron</i> , 2008, 64 , 7986-7991 (Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Aspergillus fumigatus</i>		Analog gliotoksina	Citotoksična aktivnost proti celični liniji tsFT210	Zhao, W.Y. in sod. <i>Nat. Prod. Res.</i> , 2009, 23 , 203-207
<i>Aspergillus glaucus</i>	Aspergiolid A	Antrakinonski derivat	Protitumorska aktivnost	Du, L. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2008, 64 , 4657-4657 Tao, KK. in sod. <i>Tetrahedron L.</i> , 2009, 50 , 1082-1085
<i>Aspergillus glaucus</i>	Aspergiolide B, 3 Naptil ribofuranozidi 2 Antracena 2 Bianronona	Osem aromatskih poliketidov	Citotoksična aktivnost nekaterih produktov proti celični liniji HL-60 in A-549	Du, L. in sod. <i>J. Nat..Prod.</i> 2009, 71 , 1837-1842
<i>Aspergillus glaucus</i>	Aspergiolid A		Protitumorska aktivnost	Tao, K.K. in sod. <i>Tetra. Let.</i> , 2009, 50 , 1082-1085
<i>Aspergillus insuetus</i>	Teretonin E Teretonin F	Meroterpenoida	Inhibitorja mitohondrijske dihalne verige sesalcev	Lopez-Gresa, M.P. in sod. <i>J. Nat..Prod.</i> 2009, 72 , 1348-1351
<i>Aspergillus insulicola</i>	Insulikolid	Nitrobenzoiloksi - substituiran sesterterpen		Rahbæk, L. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 1997, 60 , 811 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1999, 16 , 155-198)
<i>Aspergillus niger</i>	Asperazin	Dimerni diketopiperazinski alkaloid	Citotoksičnost	Varoglu, M. <i>J. Org. Chem.</i> , 1997, 62 , 7078 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1999, 16 , 155-198)
<i>Aspergillus niger</i>	Asperinska kislina			Varoglu, M. in sod. Crews, P. <i>J. Nat. Prod.</i> 2000, 63 , 41 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Aspergillus niger</i>	Janutoni A-E 1-hidroksi januton A 1-hidroksi januton C 22-deacetiljanuton A	Meroterpenoidi		Bugni, T.S. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2000, 65 , 7195 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Aspergillus niger</i>	Nafuredin		Inhibitor anaerobnega elektronskega transporta (inhibitor NADH fumarat – reduktaze)	Ohta, E. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2001, 57 , 8463 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1-48)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus niger</i>		Diketopiperazinski dimer		Ovenden, S.P.B. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 2093 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus niger</i>	Bikumanigrin			Jagers, E. in sod. <i>Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.</i> , 1987, 42 , 1354;
	Aspernigrin A	4-benzil-1 <i>H</i> piridin-6-on derivati	Aspernigrin B je močno živčno zaščitno sredstvo	Jagers, E. in sod. <i>Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.</i> , 1987, 42 , 1349;
	Aspernigrin B			
	Piranonigrini A-D			Hiort, J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 1532
	Cikloleukomelon		Citotoksičen <i>in vitro</i> proti celičnim linijam humanega raka	(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus niger</i>	Nigerasperoni A-C	Nafto- γ -pironi	Nigerasperon C šibka aktivnost proti glivi <i>Candida albicans</i> in zmerna antioksidacijska aktivnost	Zhang, Y. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 204
	Asperramid A	Sfingolipidi		
	Asperramid B			
	Ergosterimid	Naravni Diels–Alder adukt ergosteroida in maleimida	Asperramid A in naftokinoneimin zmerno aktivna proti glivi <i>Candida albicans</i>	(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
	Naftokinoneimin			
<i>Aspergillus niger</i>	Asperramid B	Dva cerebrosida		Wu, Z.J. in sod. <i>Chin. J. Chem.</i> , 2008, 26 , 759-764
	Asperramid C			(v Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Cirkumdatin G	Alkaloid		He, H. in sod. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2001, 123 , 5362 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1-48)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CJ- 17665	Diketopiperazin in N-indol	Inhibicija rasti vrste bakterij	Sugie, Y. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2001, 54 , 911-916.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2-hidroksicirkumdatin C	Benzodiazepinski analog	Opazna DPPH radikalna aktivnost	Cui, C.M. in sod. <i>Hel. Chim.</i> , 2009, 92 , 1366-1370
<i>Aspergillus cf. ochraceus</i>	Klorokarolid A	Kloriran poliketid		Abrell, LM. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1996, 37 , 2331
	Klorokarolid B			(v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Aspergillus ostianus</i>	2 Asperlaktonska derivata	Klorirani antibiotiki	Inhibicija rasti bakterij <i>Ruegeria atlantica</i> , <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	Namikoshi, M. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2003, 56 , 755
	Aspironski derivat			(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus ostianus</i>	Aspinotriol A Aspinotriol B Aspinonediol	Pentaketidi		Fuchser, J. in Zeeck, A. <i>Liebigs Annalen/Recueil</i> , 1997, 87 Kito, K. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 2022. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus ostianus</i> 01F313	Aspergilidi A-C	Trije makrolidi	Citotoksična aktivnost proti mišjim limfocitnim levkemičnim celicam (L1210)	Kito, K. in sod. <i>Organ. Lett.</i> , 2009, 10 , 225-228
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Parasitenon	Gabozinski derivat		Son, B.W. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2002, 65 , 794 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21, 1-49)
<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	Psevdodeflektuzin	Isokroman	Citotoksičen za celične linije humanega raka	Ogawa, A. in sod. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2004, 14 , 3539 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> PT06-1	Sklerotid A Sklerotid B	Ciklična heksapeptida	Protiglivna aktivnost proti <i>Candida albicans</i> (sklerotid A in B), rahla citotoksična aktivnost proti HL-60 celični liniji in protibakterijska aktivnost proti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (samo sklero. B)	Zheng, J. in sod. <i>Org. Lett.</i> 2009, 11 , 5262-5265
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> Sp080903f04	JBIR-15 (1)	Aspokracinski derivat		Motohashi, K..in sod. <i>Biosci. Bioteh. Biochem.</i> 2009, 73 , 1898-1900
<i>Aspergillus sydowii</i>	Sidovin A Sidovin B	Ciklopentanoida		Teuscher, F. in sod. <i>Nat. Prod. Commun.</i> , 2006, 1 , 927 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Aspergillus sydowii</i>	6-metoksipirotriprostatin B, 18-oksotriprostatin A, 14-hidroksiterezin D	Trije diketopiperazinski alkaloidi	Rahla citotoksična aktivnost proti A-549 (vse tri), rahla citotoksična aktivnost proti HL-60 (le 6-met. B)	Zhang, M. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2008, 71 , 985-989 (v Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Aspergillus tamarii</i>	Speradin A	Pentaciklični oksindolni alkaloid	Inhibitorna aktivnost proti histonski deacetilazi in antibakterijska aktivnost proti bakteriji <i>Micrococcus luteus</i>	Tsuda, M. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2003, 59 , 3227 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus terreus</i>	Terreusinon	Kiralni Dipirobenzokinon- ski derivat		Lee, S.M. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2003, 44 , 7707 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Aspergillus terreus</i>	Aspernolid A Aspernolid B	Dva aromatska butenolida	Rahla citotoksična aktivnost proti kancerogenim celičnim linijam (Asp. A)	Parvatkar, R.R. in sod.. <i>Phytochem.</i> , 2009, 70 , 128-132
<i>Aspergillus ustus</i>		Sedem drimanskih seskviterpenoidov	Citotoksična aktivnost proti limfomski celični liniji L5178Y	Liu, H.B. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2009, 72 , 1585- 1588
<i>Aspergillus ustus</i> 094102	Ustusol A-C	Trije drimanski seskviterpeni	Citotoksična aktivnost določenih (ustosoran E, ustosolati A, C in E) proti humanima celičnima linijama A549 in HL-60	Lu, Z.Y. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2009, 72 , 1761- 1767
	Ustosolat A-E	Pet drimanskih seskviterpenskih estrov		
	Ustosoran A-F	Šest benzofuranskih derivatov		
<i>Aspergillus varians</i>	Patulin 4- <i>epi</i> -izomer patulina		Aktivnost proti morskemu ježku <i>Strongylocentrus</i> <i>intermedius</i> , citotoksični za zarodke in spermatoksični	Waksman, S.A. in sod. <i>Science</i> , 1942, 96 , 202 Tatsuta, K. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1974, 27 , 579 Smetanina, O.F. in sod. <i>Chem. Nat. Compd.</i> , 2005, 41 , 243 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus versicolor</i>	9 α , 14-dihidroksi-6 β -p- nitrobenzoilcinamolid	Širje sesterterpenski nitrobenzoilni estri	Močna citotoksičnost za celične linije HCT-116 in zmerna selektivna citotoksičnost za renalne tumorske celične linije	Belofsky, G.N. In sod. <i>Tetrahedron</i> , 1998, 54 , 7335 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7- 55)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergioni A-F	Šest kromonskih derivatov		Lin, W.H. in sod. <i>Chin. Chem. Lett.</i> , 2001, 12 , 235
	Aspergilon Aspergilodiol Aspergilol 12-Acetylaspergilol			(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1-48)
<i>Aspergillus versicolor</i> NRRL 35600	Versikolamid B	Indol alkaloid		Greshock, T.J. in sod. <i>Angewandte Chemie- Inter. Ed.</i> , 2008, 47 , 3573-3577

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus versicolor</i>	Brevianamid J	Indol alkaloid dimeri	Širje diketopiperazinski alkaloidi	Li, G.Y. in sod. <i>Organ. Lett.</i> , 2009, 11 , 3714-3717
	Brevianamid K-N			
<i>Aspergillus versicolor</i> MST-MF495	Kotokvinazolin A	Alkaloid	Šibka citotoksičnost	Fremlin, L.J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2009, 72 , 666-670
	Koteslosin A	Ciklopentapeptida		
	Koteslosin B			
<i>Emericella</i> sp. gojena v kulturi z aktinomiceto <i>Salinispora arenicola</i>	Emericelamid A	Ciklična depsipeptida	Šibka aktivnost proti na MRSA, šibka citotoksičnost	Oh, D.C. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 515 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
	Emericelamid B			
<i>Emericella nidulans</i>	Arugozin G Arugosin H	Prenilirani poliketidi	Arugozin H aktiven proti glivi <i>Mycotypha microspora</i> in zeleni algi <i>Chlorella fusca</i>	Hatsuda, Y. in Kuyama, S. <i>Nippon Nogei Kagaku Kaishi</i> , 1954, 28 , 989 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Emericella unguis</i>	Guizinol	Kloriran depsid	Blago antibakterijsko učinkovanje	Nielson, J. in sod. <i>Phytochemistry</i> , 1999, 50 , 263 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Emericella unguis</i>	Unguzin A Unguzin B	GABA vsebujoč ciklični heptapeptid		Malmstrøm, J. <i>J. Nat. Prod.</i> , 1999, 62 , 787 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Emericella variecolor</i>	Varitriol		Močna citotoksičnost proti nekaterim renalnim, živčnim celicam in proti celičnim linijam raka dojke in NCI60 celični liniji	Malmstrøm, J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2002, 65 , 364
	Varioksiran			
	Dihidroterrein			
	Variksanton		Protimikrobnna aktivnost proti vrsti bakterij (<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphlococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>)	(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21 , 1-49)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Emericella variecolor</i>	Evarikinon	Antrakinon	Protiproliferacijska aktivnost za KB in NCI-H460 celice	Hopmann, C. in sod. <i>PCT Int. Appl.</i> , WO 01/44264 A2, 2001
	Izoemericelin	Prenilksanton		(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
	Stromemicin	C-glikozidni depsid		
<i>Emericella variecolor</i>	6- <i>epi</i> -Ofiobolin G 6- <i>epi</i> -Ofiobolin N (in še 6 drugih znanih ofiobilinov)	Sesterterpeni	Citotoksičnost proti neuroblastomski celični liniji	Wei, H. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2004, 60 , 6015 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
	Šimalakton A	Poliketid	V manjših koncentracijah spodbudi nevitogenezo v nevroblastomskih nevro-2a celicah, v višjih koncentracijah je citotoksičen	Wei, H. <i>Tetrahedron</i> , 2005, 61 , 8054 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Emericella variecolor</i>	Šimalakton B	Poliketid	V nizkih koncentracijah inducira nevtogenezo v nevroblastomskih neuro 2a celicah	Wei, H. in sod. <i>Heterocycles</i> , 2006, 68 , 111 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Penicillium</i> sp.	Komunezin B (znan)	Alkaloid	Zmerna protiproliferatna aktivnost proti nekaj celičnim linijam humane levkemije in aktivnost proti solinskim rakkem	Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1993, 34 , 2355. Jadulco, R. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 78 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
	Komunezin C			
	Komunezin D			
<i>Penicillium</i> sp.	Komunenzin A	Alkaloid	Citotoksičnost	Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1993, 34 , 2355 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1995-)
	Komunenzin B			
<i>Penicillium</i> sp. BM 1689-P	Epolakten		Spodbuja nevitogenezo	Kakeya, H. in sod. <i>J. Antibiotics</i> , 1995, 48 , 733 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp. BM 923	Acetoftalidin		Zaustavi celični cikel v fazi G2	Cui, C.B. in sod. <i>J. Antibiotics</i> , 1996, 49 , 216 (v Faulkner, DJ <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp.	Penohalazini A-C		Citotoksičnost	Numata, A. in sod. <i>J. Chem. Soc.. Perkin Trans. I</i> , 1996, 239 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp.	Penostatini A-E		Citotoksičnost (A-C) za celice P338	Takahashi, C. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1996, 37 , 655. (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp. OUPS-79	Penostatini F-I		Citotoksičnost	Iwamoto, C. in sod. <i>J. Chem. Soc.. Perkin Trans. I</i> , 1998, 449 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Penicillium</i> sp. N115501	N115501A	Antranilamidni derivat	Protimikrobro učinkovanje	Onuki, H. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1998, 51 , 442 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Penicillium</i> sp.	Piranolakton	Lakton		Shao, Z. in sod. <i>Zhongsan Daxue Xuebao Ziran Kexueban</i> , 1999, 38 , 131 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Penicillium</i> sp. CNC-350	11,11'-Dideoksiverticilin 11'-Deoksiverticilin	Diketopiperazinska dimera	<i>In vitro</i> citotoksičnost proti HCT-113 celični liniji	Son, B. W. In sod. <i>Nat. Prod. Lett.</i> , 1999, 13 , 213 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Penicillium</i> sp.	Koruskol A	1,3-Dioksan		Kagata, T. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> 2000, 63 , 886 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	Skulezonon A Skulezonon B			Komatsu, K. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2000, 63 , 408 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	Penacilazin	Kinolinski derivat		Lin, Y. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2000, 56 , 9607 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	7-deacetoksijanuton A 2, 3-hidro derivat 7-deacetoksijanutona A	Polioksigeniran farnesilcikloheksanon	<i>In vitro</i> citotoksičnost proti 5 človeškim celičnim linijam, <i>in vitro</i> protibakterijska aktivnost proti MRSA MDRSA	Li, X. in sod. <i>J Nat Prod.</i> 2003; 66 , 1499-500.
<i>Penicillium</i> sp.	Griseuzin	Kinon	Aktivnost proti 3α -hidroksisteroid dehidrogenazi (3α -HSD)	Li, X. in sod. <i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2006, 29 , 942 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Penicillium</i> sp.	Cefalosporolid H Cefalosporolid I		Inhibitorja ksantin oksidaze and 3α -hidroksisteroid dehidrogenaze	Li, X. in sod., <i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2007, 30 , 812. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
<i>Penicillium</i> sp.	Šearinini D-K	Indol triterpeni	Šearinin D in E ter v manjši meri G kažejo aktivnost blokiranja visoko prevodnih natrij-kalijevih kanalčkov Šearinin D inducira apoptozo v HL-60 celicah	Xu, M. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2007, 63 , 435 Smetanina, O.F. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70, 906 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
<i>Penicillium</i> sp.	Penisporolid A Penisporolid B			Li, X. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 191 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)

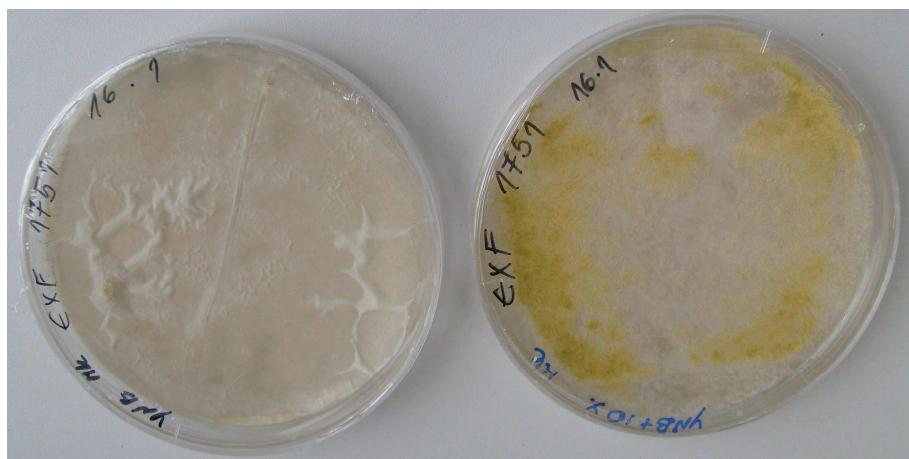
Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Penicillium</i> sp. BL27-2	3-acetil-9, 7(11)-dien-7 α -hidroksi-8-oksoeremofilan 3-acetil-13-deoksifomenon	Dva eremofilanska seskviterpena		Huang, Y.F. in sod. <i>Chinese Chem. Lett.</i> , 2008, 19 , 562-564
<i>Penicillium</i> sp.	8'-hidroksizearalanon 2'-hidroksizearalanol	Dva resorciklična kislinska laktonska derivata		Yang, X. in sod. <i>Chem. Pharm. Bulletin</i> , 2008, 56 , 1355-1356 (v Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Penicillium</i> sp. (ZZF 32#)	8-(metoksikarbonil)-1-hidroksi-9-okso-9H-ksanten-3-karboksilna kislina Dimetil 8-metoksi-9-okso-9H-ksanten-1, 6-dikarboksilat	Dva ksantona		Shao, C.L. in sod. <i>Mag. Reson. Chem.</i> , 2009, 46 , 1066-1069
<i>Penicillium</i> sp.	2-piridon-a	Dva alkaloida		De Silva, E.D. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2009, 72 , 477-479
<i>Penicillium</i> sp. SS080624SCf1	JBIR-27 JBIR-28	Analogi eremofilana		Motohashi, K.J. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2009, 62 , 247-250
<i>Penicillium</i> sp. Sp F23-2	PS1-1 PS12 PS2-1	Trije polisaharidi	Antioksidantske aktivnosti	Sun, H.H. in sod. <i>Carbohydrate Pol.</i> , 2009, 78 , 117-124
<i>Penicillium</i> sp. DQ25 in SC10		Alkaloid		Wei, R.B. in sod. <i>Annal. Micro.</i> 2009, 59 , 579-585
<i>Penicillium</i> sp.	Brevioni F-H	Breviane spiroditerpenoidi		Li, Y. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2009, 72 , 912-916
<i>Penicillium</i> sp.	Kromanon A	kromonski derivat	Inhibicija karcionogenih encimov (CYP1A), aktivnost proti hidroksil radikalom	Gamal-Eldeen, A.M. in sod. <i>Envir. Tox. Phar.</i> 2009, 28 , 317-322
<i>Penicillium</i> sp. PSU-F44	Penicipiron Penicilakton	Triciklični pironski derivat γ -laktonski derivat	Protimikrobnna aktivnost proti kliničnemu izolatu MRSA SK1	Trisuwan, K. in sod. <i>Chem. Pharm. Bul.</i> , 2009, 57 , 110-1102
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Aurantiomidi A-C	Kvinazolinski alkaloid	Citotoksični proti tumorskim celičnim linijam	Xin, Z.H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 853 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
<i>Penicillium auratiogriseum</i>	Benzoat		Citotoksičen proti tsFT210 celicam	Xin, Z.H. in sod. <i>Chin. Chem. Lett.</i> , 2005, 16 , 1227 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Penicillium bilaii</i>	(-)-2,3- Dihidrocitromicetid Bilaini A-C	Aromatični poliketidi Diketopiperazimi		Capon, R.J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 1746 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Petrosifungin A Petrosifungin B	Ciklodepsipeptida		Bringmann, G. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 311 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium brocae</i>	Brokaenoli A-C	Poliketidi	Citotoksični (aktivnost proti HCT-116 celični liniji)	Bugni, T.S. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2003, 68 , 2014. Bugni, T.S. in sod. , <i>J. Org. Chem.</i> , 2003, 68 , 6846. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Penicillium citrinum</i>	Izociklocitrinol A Acetilisociklocitrinol A	Steroidi	Protibakterijska aktivnost proti vrstam <i>Staphylococcus epidermidis</i> in <i>Enterococcus durans</i>	Amagata, T. <i>Org. Lett.</i> , 2003, 5 , 4393 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinadin A		Citotoksičen proti L1210 in KB celičnim linijam	Tsuda, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2004, 6 , 3087 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium citrinum</i>	Skaluzamidi A-C	Pirolidinski alkaloidi	Skaluzamid A kaže rahlo protiglivno aktivnost za <i>Cryptococcus neoformans</i> in antibakterijsko aktivnost proti <i>Micrococcus luteus</i>	Tsuda, M. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2005, 68 , 273 Sasaki, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2005, 7 , 4261 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
	Perinadin A	Tetraciklični alkaloid	Rahlo aktiven proti L1210 celicam in protibakterijska aktivnost za vrste <i>M. luteus</i> and <i>B. subtilis</i>	
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinadin B		Citotoksičen za L1210 celice	Tsuda, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2004, 6 , 3087 Mugishima, T. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2005, 70 , 9430 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24, 31-86)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sorbicillakton A in Sorbicillakton B	Alkaloidi sorbicilinskih derivatov	Sorbicillakton A aktiven proti HIV, z živčno-zaščitnim potencialom in selektivno aktiven proti L5178y celicam	Bringmann, G. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2005, 61 , 7252 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Penicillium corylophilum</i> (mešana kultura dveh sevov <i>P. corylophilum</i>)	Anserinon A (znan) Anserinon B (znan) (+)-Formilanserinon B, (-)-Epoksiserinon A , (+)-Epoksiserinon A	Glivna pigmenta Pentaketidi	Anserinon B aktiven proti vrsti tumorskih celičnih linij (+)-Formilanserinon B aktiven proti vrsti tumorskih celičnih linij	Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 163 Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 163 Gautschi, J.T.. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 362. Wang, H.in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 1637.
	Hidroksimethilanserinon B Deoksianserinon B			Gautschi, J.T. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 1638 Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 163 (vsi članki v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium expansum</i>		Citokalasan alkaloidi Nevroaktivni komunesini		Kerzaon, I., in sod. <i>Planta Medica</i> , 2008, 74 , 1052-1052
<i>Penicillium fellutanum</i>	Felutamid A Felutamid B	Peptid	Citotokičnost	Shigemori H. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 1991, 47 , 8529 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1993-)
<i>Penicillium griseofulvum</i> Y19-07	4-hidroksifenetil metil sukcinat 4- hidroksifenetil 2-(4-hidroksifenil) acetat		Potencialna aktivnost proti humanim HL-60 celicam raka	Wang, Y.N. in sod. <i>Jour. Asian Nat. Prod. Reser</i> , 2009, 11 , 912-917.
<i>Penicillium janczewskii</i>	2 Kvinolinona (diastereoisomerična)		Citotoksični za vrsto humanih tumorskih celičnih linij (močno proti SKOV-3 celicam)	He, J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2005, 68 , 1397 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> ,2007, 24 , 31-86)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Jantinolid A Jantinolid B	2,5-Piperazindionski alkaloidi		Xue, C. in sod. <i>Pharmazie</i> , 2006, 61 ,1041 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> ,2008, 25 , 35-94)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Šerinin E		Inducira apoptozo v HL-60 celicah in inhibira EGF-inducirano maligno spremembo mišjih epidermalnih JB6 P+ Cl 41 celic	Metanina, O.F. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 906 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium cf. montanense</i>	Ksestodekalaktoni A-C	10-Členski makrolid z 1,3-dihidroksibenzenskim obročem	Aktivnost proti glivi <i>Candida albicans</i> (Ksestodekalakton B)	Edrada R.A. in sod. , <i>J. Nat. Prod.</i> , 2002, 65 , 1598 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21 , 1-49)

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Penicillium rugulosum</i>	Prugozeni A1–A3, B1, B2, C1, C2	Poliketidi		Lang, G. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2007, 63 , 11844 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium steckii</i>	Tanzavaična kislina 3,7-dimetil-1,8-dihidroksi-6-metoksiizohroman			Malmstrøm, J. In sod. <i>Phytochemistry</i> , 2000, 54 , 301(v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium stoloniferum</i>	Stoloniferol A	Izokumarinski derivat		Xin, Z.H. in sod. <i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2007, 30 , 816 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
	Stoloniferol B			
<i>Penicillium terrestre</i>	Penicilon A Penicilon B	Poliketida	Rahla citotoksičnost proti P388 and A-549 celičnim linijam (penicillon B le proti A-549 celični liniji)	Liu, W. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2005, 46 , 4993 (v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
	2 snovi	Benzokinonska derivata		
	2 snovi	Bisorbicillinoida	Antiproliferativna aktivnost za za P388 in A-549 celične linije	Liu, W. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2005, 58 , 441 (v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
	Dihidrotrihodimerol	Bbisorbicillinoid	Citotoksičen za P388 in A-549 celične linije	
	Tetrahydrotrihodimerol	Bisorbicillinoid	Citotoksičen za P388 in A-549 celične linije	Liu, W. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2005, 58 , 621 Andrade, R. in sod. <i>Can. J. Chem.</i> , 1992, 70 , 2526 Abe, N. in sod. <i>Biosci., Biotechnol., Biochem.</i> , 1998, 62 , 661
				Warr, G.A. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1996, 49 , 234 (vsi članki v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Penicillium terrestre</i>	Trimerni terestrol A Dimerni terestroli B-H Monomerni derivat	Pet gentisil alkoholnih derivatov	Citotoksična aktivnost proti HL-60, MOLT-4, BEL-7402 in A-549 celični liniji. Terestrol G inhibira protein tirozinsko kinazo.	Chen, L. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2008, 71 , 66-70 (v Blunt in sod., <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Penicillium waksmanii</i> OUPS-N133	Pirenocin D Pirenocin E		E inhibira P388 levkemijske celice	Amagata, T. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1998, 51 , 532 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)

PRILOGA B: FOTOGRAFIJE OBRAVNAVANIH RODOV GLIV V STACIONARNI FAZI RASTI



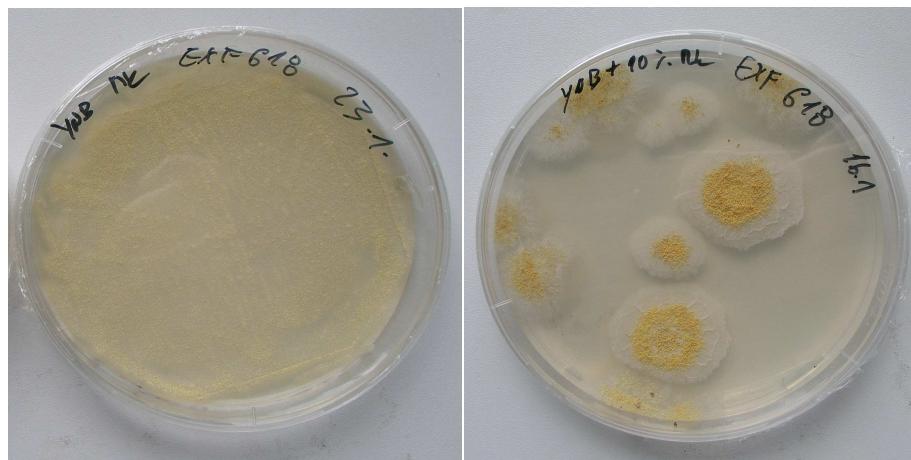
Slika 1: *Aspergillus flavus* (EX -1751)



Slika 2: *Aspergillus niger* (EX -799)



Slika 3: *Aspergillus niger* (EX -2130)



Slika 4: *Aspergillus ochraceus* (EX - 618)



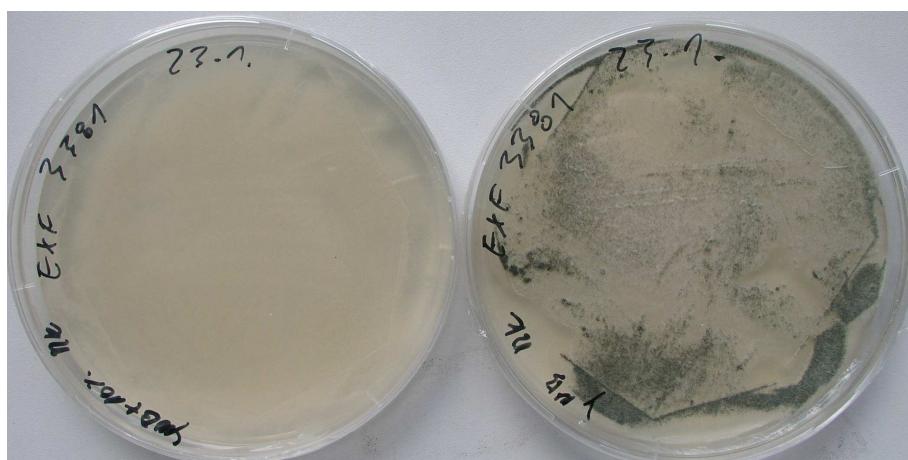
Slika 5: *Aspergillus sydowii* (EX - 405)



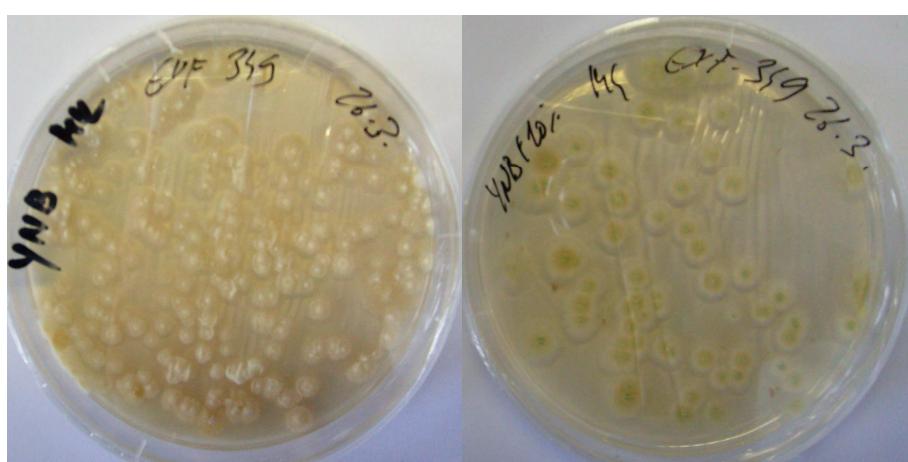
Slika 6 : *Aspergillus tubingensis* (EX - 401)



Slika 7: *Aspergillus terreus* (EX - 312)



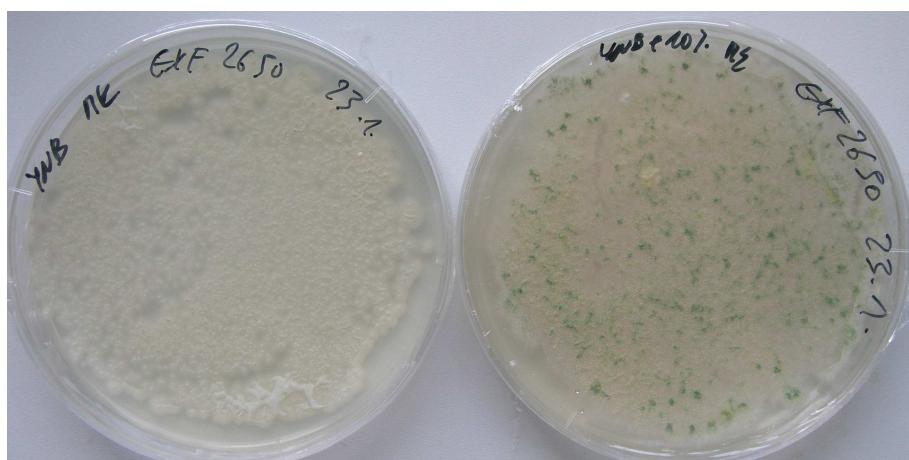
Slika 8: *Aspergillus fumigatus* (EX - 3381)



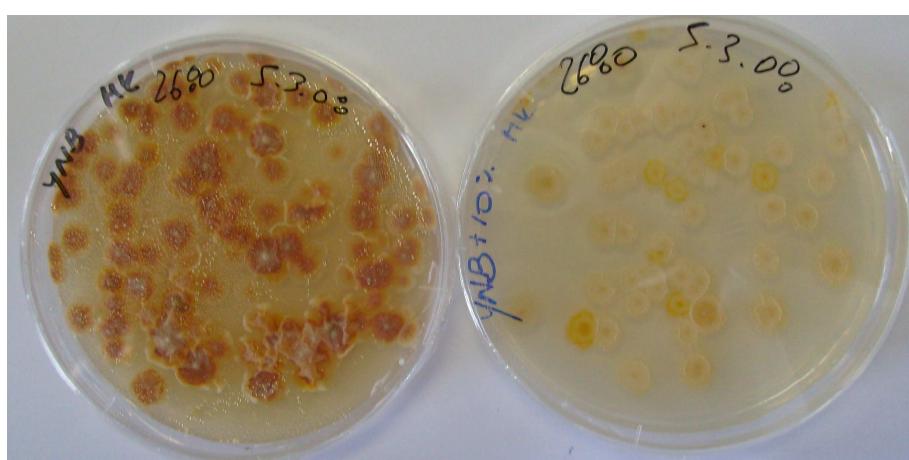
Slika 9: *Emericella stella-maris* (EX - 349)



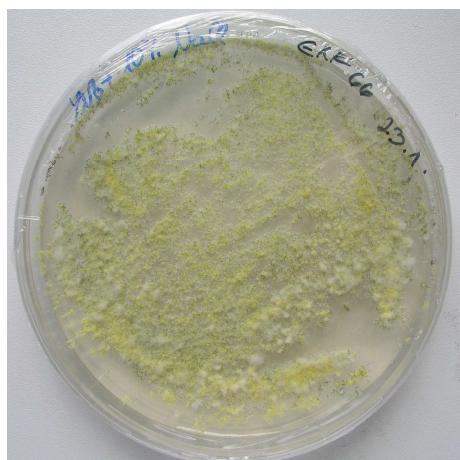
Slika 10: *Emericella filifera* (EX - 348)



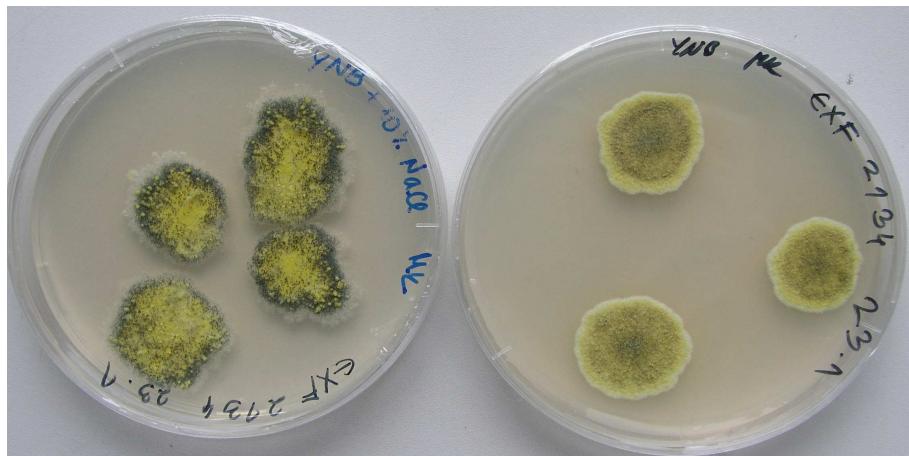
Slika 11: *Emericella olivicola* (EX - 2650)



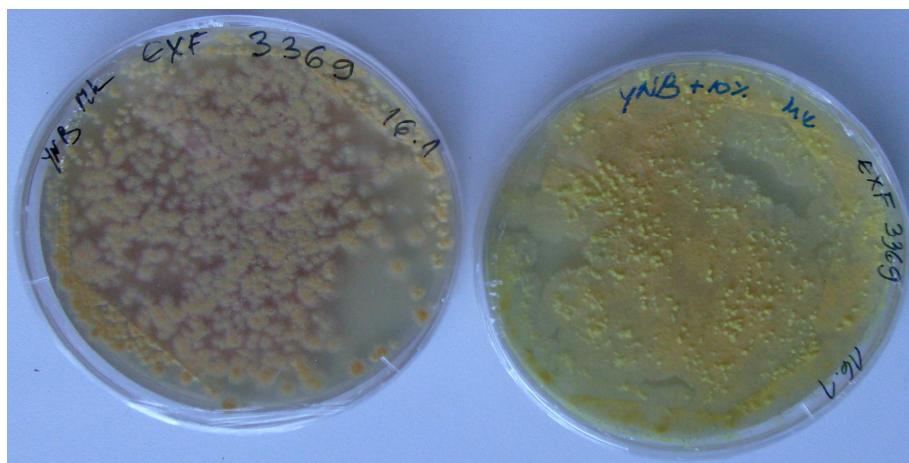
Slika 12: *Emericella discophora* (EX - 2680)



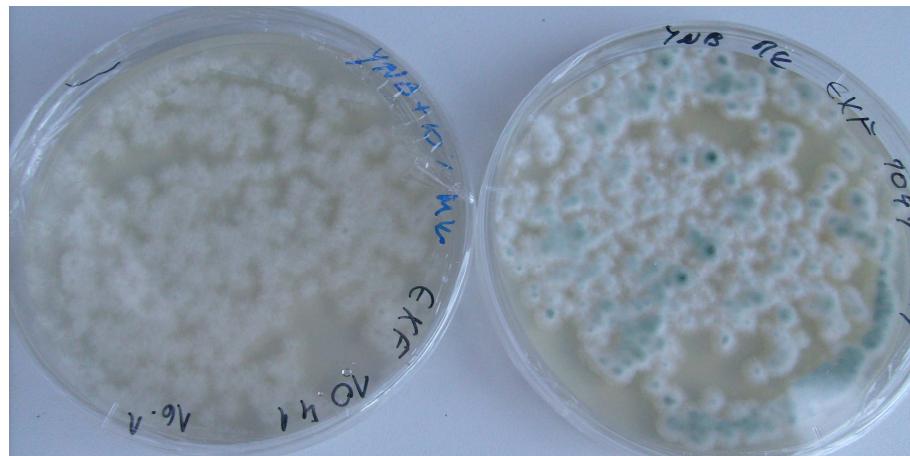
Slika 13: *Eurotium amstelodami* (EX - 66)



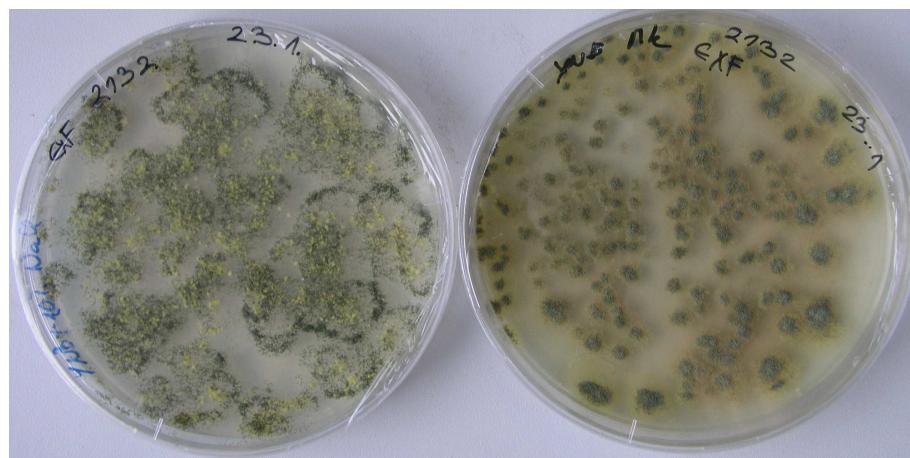
Slika 14: *Eurotium amstelodami* (EX - 2134)



Slika 15: *Eurotium herbariorum* (EX - 3369)



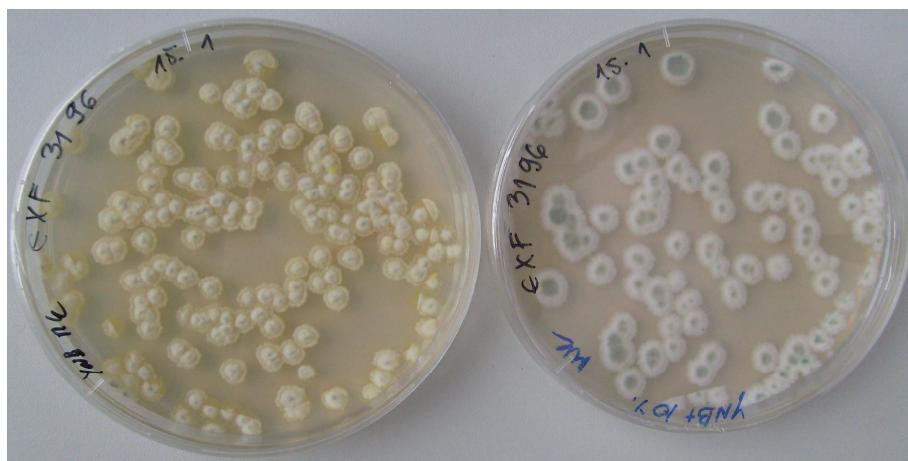
Slika 16: *Eurotium herbariorum* (EX - 1041)



Slika 17: *Eurotium repens* (EX - 2132)



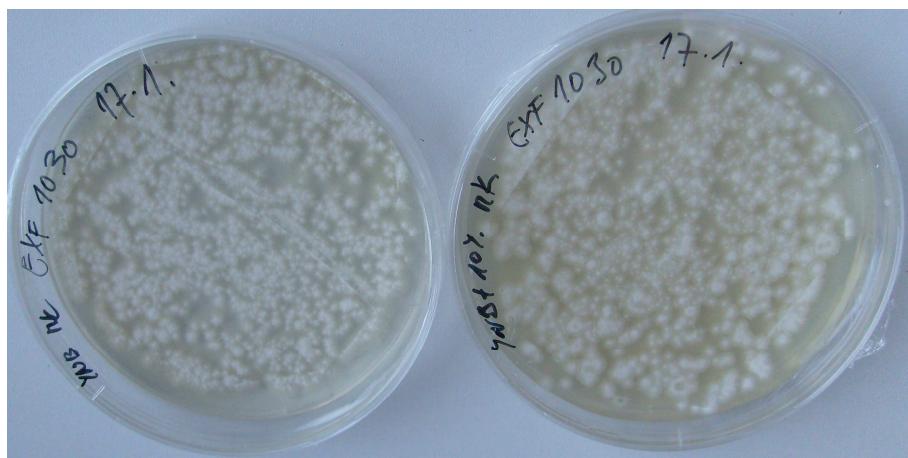
Slika 18: *Penicillium nordicum* (EX - 1363)



Slika 19: *Penicillium nordicum* (EX - 3196)



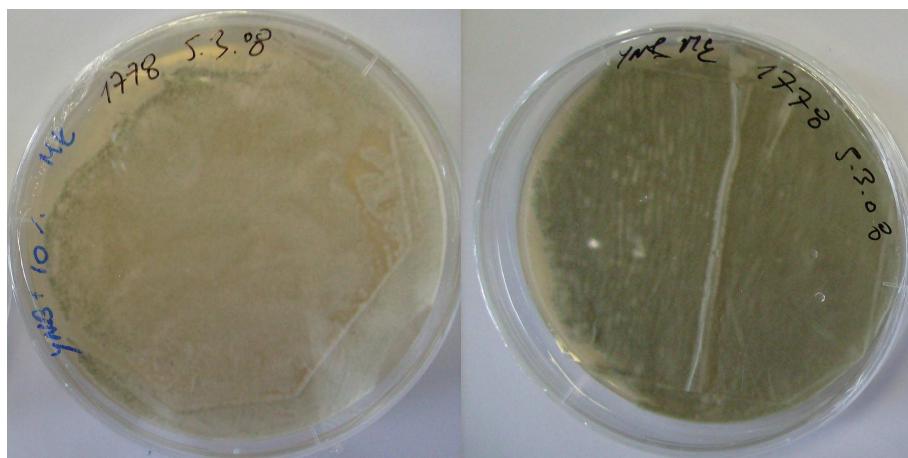
Slika 20: *Penicillium chrysogenum* (EX - 426)



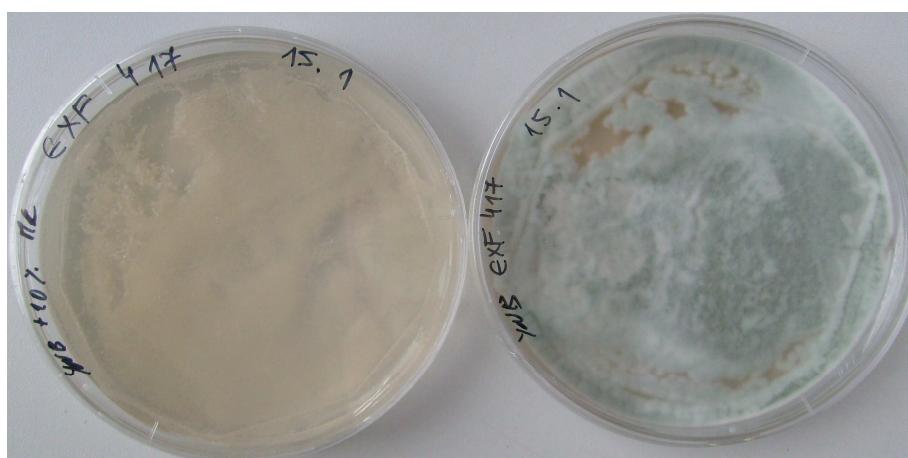
Slika 21: *Penicillium chrysogenum* (EX - 1030)



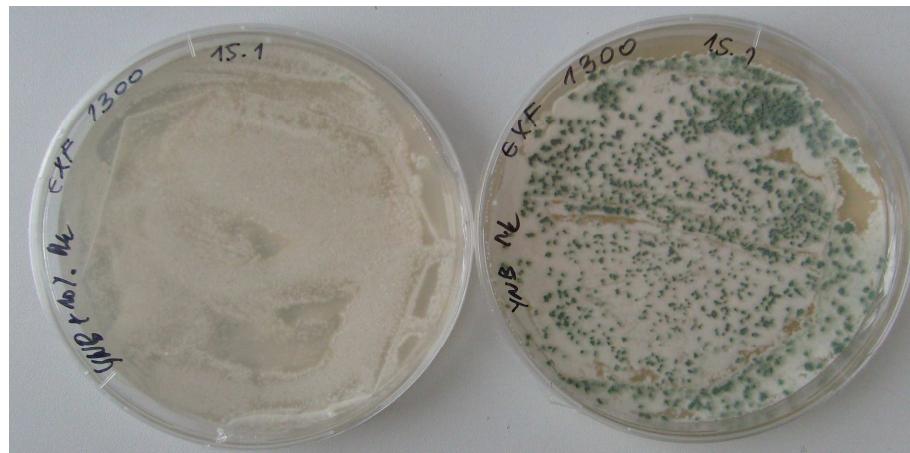
Slika 22: *Penicillium corylophilum* (EX - 1325)



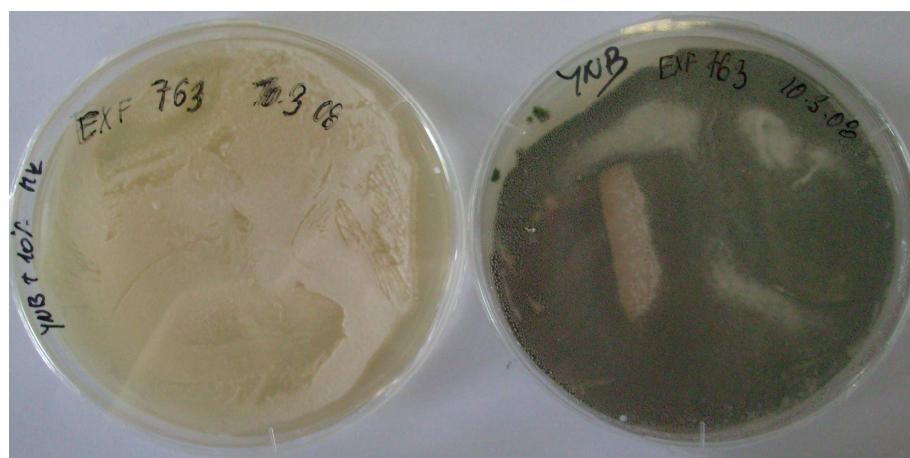
Slika 23: *Penicillium corylophilum* (EX - 1778)



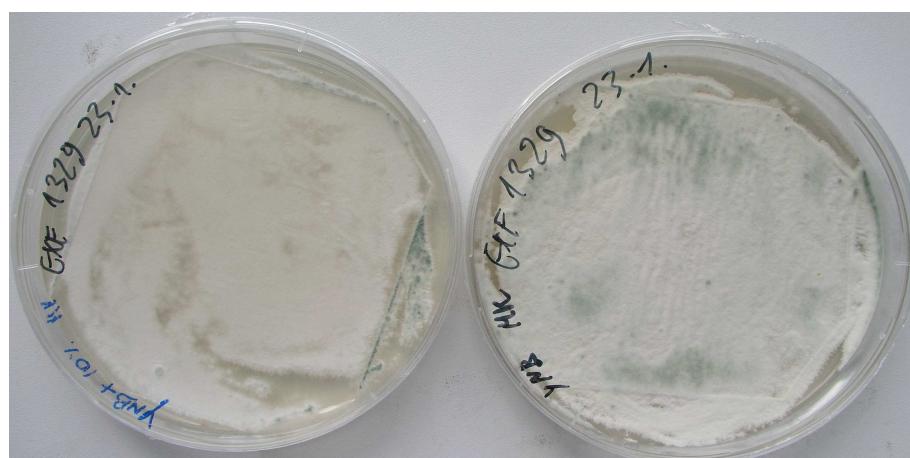
Slika 24: *Penicillium brevicompactum* (EX - 417)



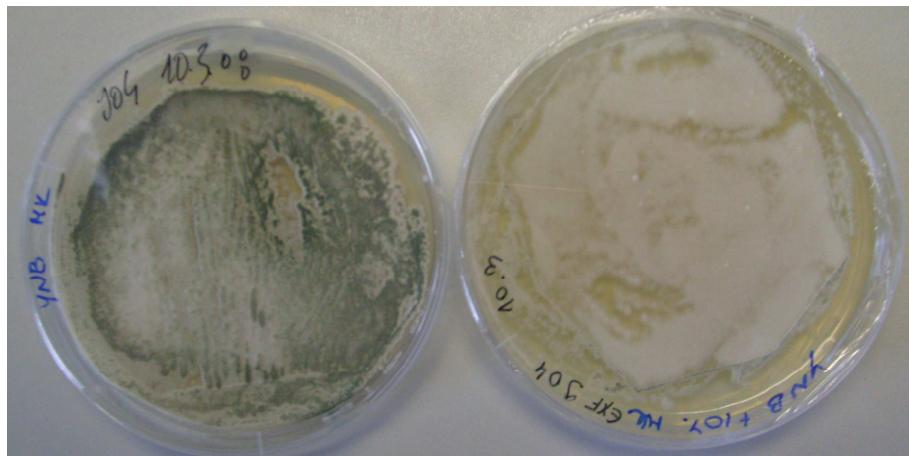
Slika 25: *Penicillium brevicompactum* (EX - 1300)



Slika 26: *Penicillium crustosum* (EX - 763)



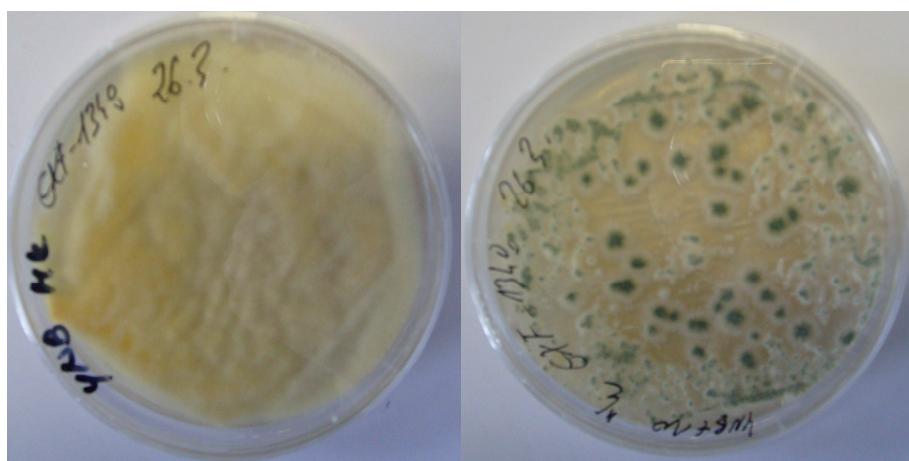
Slika 27: *Penicillium crustosum* (EX - 1329)



Slika 28: *Penicillium crustosum* (EX - 904)



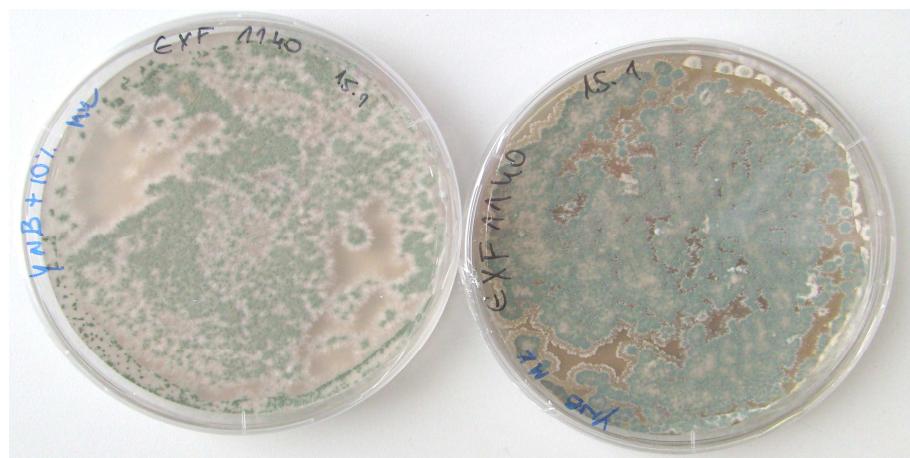
Slika 29: *Penicillium expansum* (EX - 1813)



Slika 30: *Penicillium expansum* (EX - 1348)



Slika 31: *Penicillium polonicum* (EX - 503)



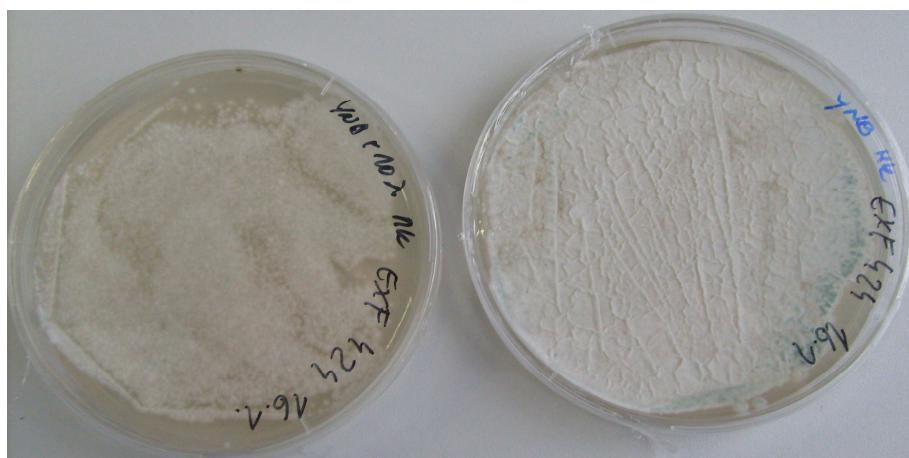
Slika 32: *Penicillium polonicum* (EX - 1140)



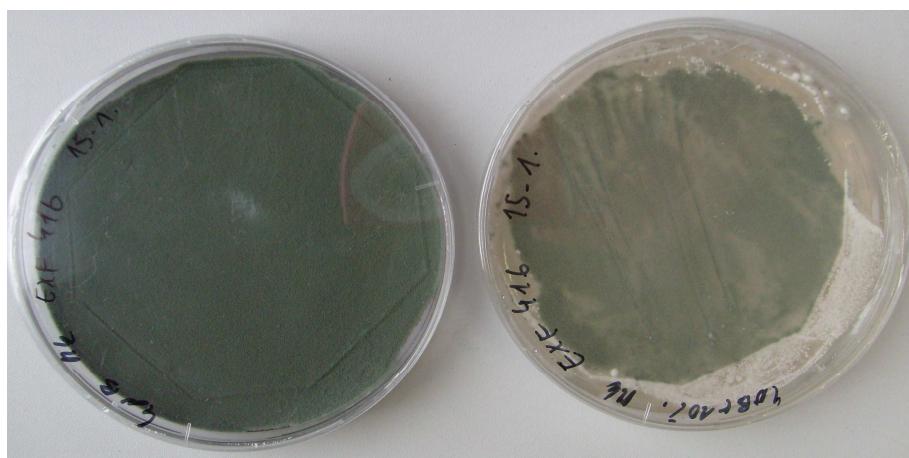
Slika 33: *Penicillium citrinum* (EX - 792)



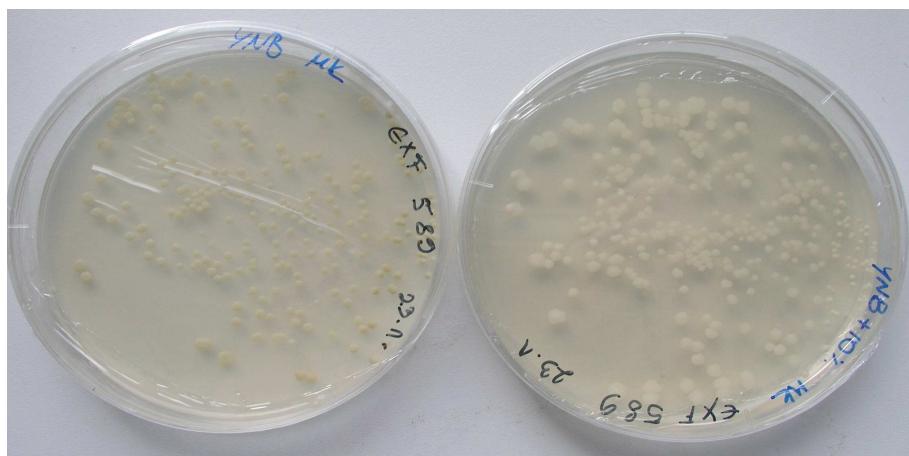
Slika 34: *Penicillium antarcticum* (EX - 793)



Slika 35: *Penicillium sizophorae* (EX - 424)



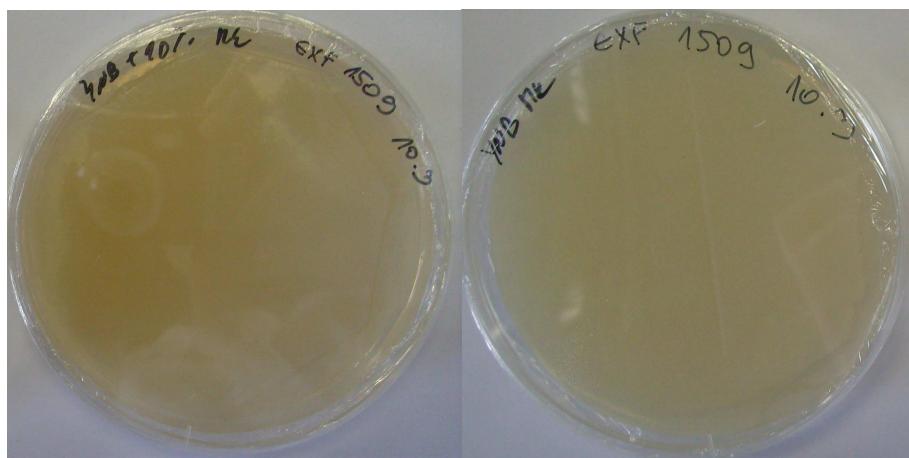
Slika 36: *Penicillium steckii* (EX - 416)



Slika 37: *Debaryomyces hansenii* (EX - 589)



Slika 38: *Debaryomyces hansenii* (EX - 1590)



Slika 39: *Metschnikowia bicuspidata* (EX - 1509)