

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Erika GIOAHIN

**PROTIMIKROBNA AKTIVNOST ETERIČNEGA OLJA
IN IZVLEČKOV JAPONSKEGA DRESNIKA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Erika GIOAHIN

**PROTIMIKROBNA AKTIVNOST ETERIČNEGA OLJA IN
IZVLEČKOV JAPONSKEGA DRESNIKA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF JAPANESE KNOTWEED (*Fallopia
japonica*) ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo ter v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega študija imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce, za somentorico doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzentko izr. prof. dr. Barbko Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Jasna Dolenc Koce

Somentorica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentka: izr. prof. dr. Barbka Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: izr. prof. dr. Barbka JERŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 22.6.2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Erika Gioahin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
 DK UDK LJ 579.24:582.665:547.913(043)=163.6
 KG japonski dresnik/*Fallopia japonica*/invazivka/rastlinski izvlečki/eterično olje/korenike/listi/protibakterijska učinkovitost/protiglivna učinkovitost
 AV GIOAHIN, Erika, dipl. biol. (UN)
 SA DOLENC KOCE, Jasna (mentorica)/AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (somentorica)/JERŠEK, Barbka (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
 LI 2016
 IN PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST ETERIČNIH OLJ IN IZVLEČKOV JAPONSKEGA DRESNIKA
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
 OP XI, 73 str., 12 pregl., 14 sl., 8 pril., 93 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) je invazivka, ki v Sloveniji povzroča številne težave in je zato njeno mehansko odstranjevanje pogosto. Glede na pridobljene večje količine biomase pri odstranjevanju in informacije, da je rastlina odličen vir antioksidanta resveratrola, ter potreb po odkritju novih protimikrobnih snovi proti odpornim mikroorganizmom, smo uporabili različne izvlečke listov in korenin, ter eterično olje listov japonskega dresnika za ugotavljanje njihove potencialne protibakterijske in protiglivne učinkovitosti. Učinkovitost listnih in koreninskih izvlečkov smo testirali pri 8 vrstah bakterij (proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA), proti meticilinu odporen *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus agalactiae*, *Paenibacillus* sp., *Bacillus subtilis*) z difuzijskim antibiogram po Kirby-Bauerju in 6 vrstah plesni (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium palitans*) z metodo razmazovanja izvlečkov po površni gojišča, na katero smo nato nacepili kulturo plesni. Ugotovili smo, da ima japonski dresnik tako protibakterijsko kot tudi protiglivno aktivnost, da koreninski izvlečki bolj zavirajo rast bakterij in plesni kot listni ter, da sta alkoholni topili etanol in metanol izmed uporabljenih topil najbolj primerni za ekstrakcijo protimikrobnih snovi iz japonskega dresnika. Rezultati študije so pokazali tudi protibakterijsko učinkovitost eteričnega olja listov. Japonski dresnik torej ni le rastlina, ki v okolju povzroča težave, predstavlja lahko tudi pomemben vir biološko aktivnih sekundarnih metabolitov.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du2
 DC UDK LJ 579.24:582.665:547.913(043)=163.6
 CX Japanese knotweed/*Fallopia japonica*/invasive plants/plant extracts/essential oils/roots/leaves/antibacterial activity/antifungal activity
 AU GIOAHIN, Erika
 AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)/AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (co-advisor)/JERŠEK, Barbka (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
 PY 2016
 TY ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF JAPANESE KNOTWEED (*Fallopia japonica*) ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
 NO XI, 73 p., 12 tab., 14 fig., 8 ann., 93 ref.
 LA sl
 Al sl/en
 AB The Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) is an invasive plant which has a negative impact on Slovenian environment and therefore mechanical eradications are often organised. Because of a large biomass obtained during eradications and the information that the plant is a great source of the antioxidant resveratrol, and the need to find new antimicrobials to combat resistant microorganisms, we used different leaf and root extracts, as well as essential oil, which was obtained from the leaves of the plant, to test their antibacterial and antifungal activity. The efficiency of different leaf and root extracts was tested on 8 different bacterial species (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus agalactiae*, *Paenibacillus* sp., *Bacillus subtilis*) with disc diffusion antibiogram and on 6 different fungi (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium palitans*) with the spread plate method. The study results show that extracts of the Japanese knotweed exhibit varying degrees of antibacterial and antifungal activity, that root extracts have more potent antimicrobial properties than leaf extracts and that ethanol and methanol solutions are the most effective in the extraction of antimicrobial compounds from the plant's tissues. The results obtained also show that the essential oil of the leaves has antibacterial activity. We concluded that the Japanese knotweed does not only cause problems in the environment, but it is also a promising source of biologically active secondary metabolites.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI MAGISTRSKEGA DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 JAPONSKI DRESNIK (<i>Fallopia japonica</i>)	3
2.1.1 Opis vrste	3
2.1.2 Zgodovina in tradicionalna uporaba v Kitajski medicini	5
2.1.3 Fitokemija	6
2.1.4 Biološka aktivnost japonskega dresnika	8
2.2 PLESNI	9
2.2.1 Rod <i>Alternaria</i>	9
2.2.1.1 <i>Alternaria alternata</i>	9
2.2.1.2 <i>Alternaria infectoria</i>	11
2.2.2 <i>Aspergillus flavus</i>	12
2.2.3 <i>Epicoccum nigrum</i>	13
2.2.4 <i>Fusarium poae</i>	14
2.2.5 <i>Penicillium palitans</i>	15
2.3 BAKTERIJE	16
2.3.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	16
2.3.1.1 Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	17
2.3.1.2 Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> (MRSP)	18
2.3.1.3 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19
2.3.2 Rod <i>Streptococcus</i>	20

2.3.2.1 <i>Streptococcus canis</i>	21
2.3.2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	21
2.3.2.3 <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
2.3.3 <i>Paenibacillaceae</i>	24
2.3.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	24
2.3.4.2 <i>Paenibacillus</i> sp.	25
2.4 RASTLINSKI SEKUNDARNI METABOLITI	26
2.5 EKSTRAKCIJA PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN	28
2.6 ETERIČNA OLJA	29
3 MATERIALI IN METODE	31
3.1 RASTLINSKI VZORCI	31
3.1.1 Sušenje in mletje vzorcev	31
3.2 PRIPRAVA ORGANSKIH IN VODNIH IZVLEČKOV	32
3.2.1 Ekstrakcija	32
3.2.1.1 Vodni izvleček	32
3.2.1.2 Organski izvleček	33
3.2.2 Filtriranje in sušenje izvlečka	33
3.2.3 Priprava izvlečkov za testiranje protimikrobne aktivnosti	34
3.3 PLESNI	35
3.3.1 Vzorci	35
3.3.2 Priprava 2 % krompirjevega gojišča (PDA-gojišče)	35
3.3.3 Testiranje protiglivne aktivnosti izvlečkov	36
3.4 BAKTERIJE	37
3.4.1 Vzorci	37
3.4.2 Priprava trdnega in tekočega lizogenega gojišča (LB-gojišča)	37
3.4.3 Priprava fiziološke raztopine za redčenje po McFarlandu	38
3.4.4 Testiranje protibakterijske aktivnosti izvlečkov in eteričnih olj	39
3.4.5 Uvajanje metode testiranja protibakterijske aktivnosti izvlečkov in eteričnih olj	40
3.5 MERITEV RASTI PLESNI IN BAKTERIJSKIH KULTUR	41
3.6.1 Inhibicija rasti plesni	41
3.6.2 Cona inhibicije rasti bakterij	42

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	42
4 REZULTATI	43
4.1 IZKORISTEK RASTLINSKEGA MATERIALA Z EKSTRAKCIJO	43
4.2 PROTIGLIVNA AKTIVNOST	44
4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	48
5 RAZPRAVA	54
6 SKLEPI	59
7 POVZETEK	60
8 VIRI	63
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Sl. 1: Rastlinski deli japonskega dresnika. (Barney in sod., 2006).	4
Sl. 2: Strukturne formule sestavin izvlečkov japonskega dresnika in njihova zdravilna učinkovitost (prirejeno po Zhang in sod., 2013: 3-4).	7
Sl. 3: Mikotoksin alternariol (Kustrzeba-Wójcicka in sod., 2014).	10
Sl. 4: Osnovne biosintezne poti, ki vodijo do nastanka sekundarnih metabolitov (prirejeno po Ghasemzadeh in Jaafar, 2011: 1106; Giada, 2013: 88-105).	27
Sl. 5: <i>Alternaria alternata</i> ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.	44
Sl. 6: <i>Epicoccum nigrum</i> ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.	45
Sl. 7: <i>Fusarium poae</i> ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.	45
Sl. 8: Rast plesni v prisotnosti vodnih in organskih izvlečkov japonskega dresnika.	46
Sl. 9: Primerjava inhibicije rasti plesni glede na vrsto rastlinskega izvlečka.	47
Sl. 10: Inhibicija bakterijske rasti <i>B. subtilis</i> , <i>Paenibacillus</i> sp., MRSP in MRSA ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.	48
Sl. 11: Inhibicija bakterijske rasti <i>Staph. saprophyticus</i> , <i>Strep. agalactiae</i> , <i>Strep. pyogenes</i> v prisotnosti različnih koreninskih izvlečkov.	49
Sl. 12: Cone inhibicije za bakterije v prisotnosti izvlečkov in eteričnega olja japonskega dresnika.	50
Sl. 13: Delovanje eteričnega olja iz listov japonskega dresnika proti izbranim bakterijam.	51
Sl. 14: Primerjava cone inhibicije rasti bakterij glede na vrsto rastlinskega izvlečka.	53

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Taksonomska uvrstitev japonskega dresnika (Shaw, 2016).	3
Pregl. 2: Taksonomska uvrstitev vrst <i>Alternaria alternata</i> in <i>Alternaria infectoria</i> (Simmons, 1986).	9
Pregl. 3: Taksonomska uvrstitev vrste <i>Aspergillus flavus</i> (Link, 1809).....	12
Pregl. 4: Taksonomska uvrstitev vrste <i>Epicoccum nigrum</i> (Link, 1816).	13
Pregl. 5: Taksonomska uvrstitev vrste <i>Fusarium poae</i> (Wollenweber, 2014).	14
Pregl. 6: Taksonomska uvrstitev vrste <i>Penicillium palitans</i> (Link, 1816).	15
Pregl. 7: Taksonomska uvrstitev vrst <i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. pseudintermedius</i> in <i>Staph. saprophyticus</i> (Greenwood in sod., 2012).	16
Pregl. 8: Taksonomska uvrstitev vrst <i>Strep. canis</i> , <i>Strep. pyogenes</i> in <i>Strep. agalactiae</i> (Greenwood in sod., 2012).....	20
Pregl. 9: Taksonomska uvrstitev vrst <i>Bacillus subtilis</i> in <i>Paenibacillus</i> sp. (Link, 1816).....	24
Pregl. 10: Masa in izkoristek pridobljenega izvlečka.....	43
Pregl. 11: Primerjava delovanja vodnih in organskih listnih izvlečkov na različne bakterije..	52
Pregl. 12: Primerjava delovanja vodnih in organskih koreninskih izvlečkov na različne bakterije.....	52

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Povprečne površine kolonij plesni.
- Priloga B:** Povprečne meritve cone inhibicije.
- Priloga C:** Plesni vrste *Alternaria alternata* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga D:** Plesni vrste *Alternaria alternata* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga E:** Plesni vrste *Alternaria infectoria* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga F:** Plesni vrste *Alternaria alternata* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga G:** Plesni vrste *Aspergillus flavus* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga H:** Plesni vrste *Aspergillus flavus* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga I:** Plesni vrste *Fusarium poae* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga J:** Plesni vrste *Fusarium poae* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga K:** Plesni vrste *Epicoccum nigrum* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga L:** Plesni vrste *Epicoccum nigrum* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga M:** Plesni vrste *Penicillium palitans* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika.
- Priloga N:** Plesni vrste *Penicillium palitans* ob tretmaju z različnimi koreninski izvlečki japonskega dresnika.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	acetonski izvleček
E	etanolni izvleček
EO	eterično olje
EtOH	etanol
KE	kontrola - 70 % etanol
LB	gojišče za gojenje bakterij (Luria-Bertani)
LD ₅₀	smrtonosni odmerek, ki ubije 50 % testiranih organizmov (ang. Lethal Dosage)
M	metanolni izvleček
MBK	minimalna baktericidna koncentracija (ang. Minimal Bactericidal concentration)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija (ang. Minimal Inhibitory Concentration)
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. Methicillin resistant <i>Staph. aureus</i>)
MRSP	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (ang. Methicillin resistant <i>Staph. pseudintermedius</i>)
PBP2a	penicilin vezavni protein 2a
DMSO	dimetilsulfoksid
dH ₂ O	destilirana voda
PDA	krompirjevo gojišče (ang. Potato Dextrose Agar)
SPE	streptokokni pirogeni eksotoksin (ang. Streptococcal Pyrogenic Exotoxin)
V	vodni izvleček
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)

1 UVOD

Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) je geofitna trajnica z močno koreniko (Barney in sod., 2006), ki izvira iz vzhodne Azije (Peng in sod., 2013). Je tujerodna vrsta, ki je uvrščena med 100 najbolj invazivnih rastlin sveta. Zlasti ob sladkovodnih virih Evrope in Severne Amerike tvori goste sestoje, ki izpodrivajo naravno rastje ter tako spreminjajo videz krajine in negativno vplivajo na biotsko pestrost. Podobno je tudi pri nas, kjer ta vrsta tvori sklenjene sestoje na številnih mestih ob Dravi, Muri, Savi, Savinji in drugih rekah ter potokih. Korenike japonskega dresnika pa ne vplivajo le na biotsko pestrost temveč povzročajo velike težave tudi v gospodarstvu (Frajman, 2008).

Zaradi svojih bioloških in farmakoloških učinkov je japonski dresnik že dolgo prisoten v tradicionalni kitajski medicini. Koreniko so uporabljali za zdravljenje vnetij, okužb, zlatenice, opekline kože, hiperlipidemije (Peng in sod., 2013), za spodbujanja cirkulacije krvi, odpravljanje strdkov ter za lažje izkašljevanje (Zhang in sod., 2013). Zdravilne lastnosti korenike rastline so navedene tudi pod sinonimom "Hu Zhang" v Kitajski farmakopeji (Peng in sod., 2013). Številne pozitivne lastnosti uporabe japonskega dresnika v tradicionalni medicini so vodile v obširne fitokemične raziskave, zato je trenutno znanih 67 spojin, izoliranih iz korenike japonskega dresnika. Te sodijo med kinone, stilbene, flavonoide, kumarine in lignane ter druge spojine (Peng in sod., 2013). Številne novejšje študije pa japonskemu dresniku pripisujejo protivirusno, protimikrobno, protivnetno, estrogeno, nevroprotektivno in kardioprotektivno aktivnost (Zhang in sod., 2013).

Splošno so rastline znane kot bogat vir različnih sekundarnih metabolitov (Bhalodia in Shukla, 2011) in so bile že pred uporabo antibiotikov in sintetičnih protimikrobnih snovi pomemben vir protimikrobnih učinkovin (Gibbons, 2008). Antibiotiki sodijo med najpomembnejše načine boja proti bakterijam in so opazno pripomogli k izboljšanju zdravljenja bakterijskih okužb, vendar pa je njihova prekomerna uporaba doprinesla k povečani odpornosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem. Zato je zelo pomembno odkrivanje novih učinkovin, ki ne povzročajo odpornosti pri bakterijah (Bhalodia in Shukla, 2011). S tem namenom smo želeli

ugotoviti protiglivno in protibakterijsko aktivnost listnih in koreninskih izvlečkov japonskega dresnika.

1.1 CILJI MAGISTRSKEGA DELA

Namen oz. cilji magistrskega dela so bili:

- določiti protibakterijsko in protiglivno učinkovitost izvlečkov in eteričnih olj japonskega dresnika;
- ugotoviti ali obstajajo razlike v delovanju organskih in vodnih izvlečkov korenin in listov japonskega dresnika;
- ugotoviti ali obstajajo razlike v odpornosti oz. občutljivosti med različnimi vrstami bakterij in plesni.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Eterična olja in izvlečki japonskega dresnika imajo protibakterijsko in protiglivno učinkovitost.
- Eterična olja in izvlečki listov ter korenin različno vplivajo na različne bakterije, ker so le-te različno občutljive in ker imajo eterično olje (EO) in izvlečki različne učinkovine.
- Eterično olje in izvlečki zavirajo rast tudi odpornih in problematičnih bakterijskih sevov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 JAPONSKI DRESNIK (*Fallopia japonica*)

2.1.1 Opis vrste

Japonski dresnik oziroma *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. ima kar nekaj sinonimov, kot so *Polygonum cuspidatum* Sieb.&Zucc., *Reynoutria japonica* Houtt., *Polygonum zuccarinii* Small, *Pleuropterus zuccarinii* (Small) Small, *Pleuropterus cuspidatus* (Sieb. & Zucc.) H. Gross, *Polygonum japonicum* Meissn (Barney in sod., 2006).

Preglednica 1: Taksonomska uvrstitev japonskega dresnika (Shaw, 2016).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Plantae (rastline)
DEBLO	Spermatophyta (semenke)
PODDEBLO	Magnoliophytina (kritosemenke)
RAZRED	Magnoliopsida (dvokaličnice)
PODRAZRED	Caryophyllidae
RED	Polygonales (dresnovci)
DRUŽINA	Polygonaceae (dresnovke, slakovke, ovijalke)
PODDRUŽINA	Polygonoidea
ROD	<i>Fallopia</i> (dresnik, slakovec, ovijalka)
VRSTA	<i>Fallopia japonica</i> (japonski dresnik)

Japonski dresnik je geofitna trajnica (Barney in sod., 2006), ki izvira iz vzhodne Azije (Peng in sod., 2013). Korenika je temno rjava, vozličasta, v notranjosti svetlo oranžna in lahko v premeru meri do 8 cm. Nadomestne korenine so bele in nitkaste (Barney in sod., 2006). Steblo dresnika je kolenčasto členjeno. Nad kolenci, iz katerih izraščajo listi, steblo obdajajo prilisti, preoblikovani v cevasto tvorbo, škornjico (Frajman, 2008). Steblo je pokončno, visoko 1-3 metre visoko ter rdeče-roza lisasto, v prerezu pa ovalno in votlo (Barney in sod., 2006). Za rastlino je značilna grmičasta razrast. Do dva ali tri metre visoki grmi zrastejo iz podzemnih delov vsako vegetacijsko sezono, pozimi pa nadzemni deli odmrejo. Podzemne korenike, ki so zelo razrasle in lahko segajo več metrov stran od materinske rastline, prezimijo. Če rastlino kosimo, iz njenih korenin na različnih mestih vsakič znova poženejo do nekaj decimetrov visoka stebila, ki običajno ne cvetijo. Premenjalno nameščeni celorobi listi so široko jajčasti, dolgi 5 do 15, redkeje 20 cm, in široki do 10 cm, s prisekanim dnom in naglo zoženim vrhom.

Japonski dresnik pri nas vzcveti konec julija. Cvetovi so drobni, beli do zeleni, združeni v pokončna latasta socvetja (Frajman, 2008), ki so velika 8-15 cm (Barney in sod., 2006). Cvetovi so enospolni, z zakrnelimi, vendar opaznimi zasnovami organov drugega spola. Cvetnih listov je pet, zunanji trije se s širokimi robovi stikajo in obdajajo razvijajoč plod, trikotni orešek, ki je ob zrelosti črno obarvan (Frajman, 2008) (sl. 1).



Slika 1: Rastlinski deli japonskega dresnika. A. steblo z listi po cvetenju; B. poganjek iz korenike z vidnimi nodiji in nadomestnimi koreninami; C. moški cvet; D. ženski cvet; E. plod krilati orešek; F. bambusu podobno steblo z lisami in škornjico (Barney in sod., 2006).

Japonski dresnik je tujerodna vrsta, ki je uvrščena med 100 najbolj invazivnih rastlin sveta. Zlasti ob vodah Evrope in Severne Amerike tvori goste sestoje, ki izpodrivajo naravno rastje ter tako spreminjajo videz krajine in negativno vplivajo na biotsko pestrost. Podobno je tudi pri nas, kjer ta vrsta tvori sklenjene sestoje na številnih mestih ob Dravi, Muri, Savi, Savinji in drugih rekah ter potokih. Korenike japonskega dresnika pa ne vplivajo le na biotsko pestrost temveč povzročajo velike težave tudi v gospodarstvu, saj lahko prodrejo skozi 5 cm debele

plasti asfalta ter zato negativno vplivajo na stavbe in druge objekte, kot so ceste, nasipi, jezovi, itd. Zaradi invazivnosti lahko hitro preraste tudi obdelovalne površine, zlasti travnike, ki se jih ne kosi redno (Frajman, 2008).

2.1.2 Zgodovina in tradicionalna uporaba v Kitajski medicini

Japonski dresnik je trajnica, ki jo uvrščamo v družino Polygonaceae in izvira iz Azije (Peng in sod., 2013) ter je iz Japonske v Evropo prišla na začetku 18. stoletja (Beerling in sod., 1994; Child in Wade, 2000). Uporabljena je bila kot okrasna rastlina, za utrjevanje brežin ter kot krma za govedo. Prvi pobegi rastline so bili zabeleženi sredi 19. stoletja (Child in Wade, 2000; Bond in Turner, 2006).

Leta 1777 je Houttuyn prvič opisal japonski dresnik kot vrsto *Reynoutria japonica*, vendar pa so bili znanstveni podatki zaradi objave opisa v nizozemščini nedosegljivi več kot stoletje. Skoraj stoletje kasneje (1846) sta ga kot *Polygonum cuspidatum* neodvisno opisala Siebold in Zuccarini (Barney in sod., 2006).

Zaradi svojih bioloških in farmakoloških učinkov je japonski dresnik že dolgo prisoten v tradicionalni kitajski medicini. Zdravilne lastnosti korenin japonskega dresnika so v Kitajski farmakopeji že dolgo opisane pod sinonimom "Hu Zhang", v ljudskem zdravilstvu pa ga uporabljajo tudi v Koreji in na Japonskem. Predvsem koreniko so uporabljali za normalno delovanje žolčnika in zdravljenje zlatenice, za zdravljenje uretritisa (Peng in sod., 2013), spodbujanja cirkulacije krvi, odpravljanje strdkov, za lažje izkašljevanje (Zhang in sod., 2013), blaženje vnetja žrela, zobobola, čira, hemoroidov in kroničnega bronhitisa.

Danes na Kitajskem korenike dresnika uporabljajo v različnih oblikah za zdravljenje vnetij in vnetnih bolezni, kot so hepatitis, dermatitis, glivična okužba lasišča, zlatenica, opekline. Poleg uporabe v medicinske namene v Aziji mehkejša dele stebela uporabljajo tudi v kulinariki, suhi listi pa ponekod služijo kot tobak (Peng in sod., 2013).

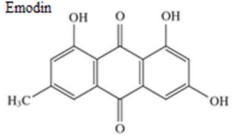
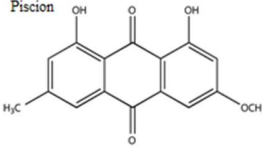
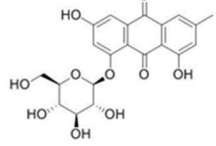
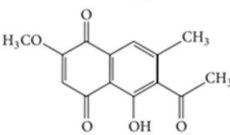
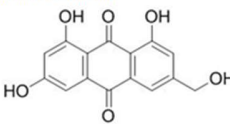
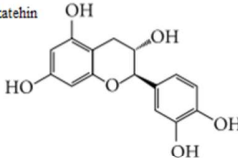
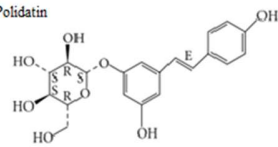
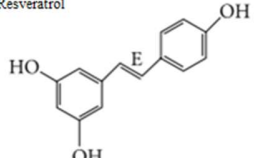
2.1.3 Fitokemija

Od leta 1950 dalje so na Kitajskem, Japonskem, v Koreji in nekaterih drugih državah izolirali številne kemijske spojine japonskega dresnika, ki sodijo med eterična olja, kinone, stilbene, flavonoide, kumarine in lignane ter druge spojine. Med stilbene sodijo dobro znani resveratrol, polidatin in antrakinoni, kot je emodin in njegovi glikozidi. Vsebuje pa tudi flavonoide, kot sta kvercetin in (+)-katehin. Med najbolj aktivne izolirane spojine japonskega dresnika sodijo emodin, piscion, emodin 8-O- β -D-glukopiranozid, 2-metoksi-6-acetil-metiljuglon, citreorosein, (+)-katehin, polidatin in resveratrol (Zhang in sod., 2013) (sl. 2).

S pomočjo metode destilacije z Likens-Nickersonovo aparaturo je Štalcar (2015) pridobila eterično olje listov japonskega dresnika (uporabljen v naši nalogi), v katerem je s pomočjo analize GC-MS identificirala prisotne spojine v eteričnem olju. Najbolj zastopana spojina v EO je heksadekanojska kislina (56,0 %), nato sledita dodekanojska kislina (15,6 %) in nonanojska kislina (3,29 %). Skupna količina vseh treh najbolj zastopanih maščobnih kislin je predstavljala okrog 70 % spojin EO. Večinoma so bile v EO listov najbolj zastopane nepolarne snovi (maščobne kisline, farnezil- in geranilaceton, fitol), po zastopanosti izmed bolj polarnih spojin pa izstopa (2E)-heks-2-enal (okoli 2 %).

Japonski dresnik je del tradicionalne kitajske medicine že vrsto let in je za uporabo prepovedan le pri nosečnicah, saj naj bi povzročal splav. Znani so podatki, da uživanje antrakinonov (9 mg/mL) ni povzročilo smrti mišk pri testu z maksimalno toleranco, vrednost LD₅₀ za emodin in polidatin sta bili $249,5 \pm 34,3$ in $1000 \pm 57,3$ mg/kg. Pri izvajanju poskusov z japonskim dresnikom *in vitro* ni bilo vidne nikakršne hemolize ali aglutinacijske reakcije, sistemske anafilaksije ali kožne alergije in stimulatornih učinkov pri zajčjih avrikularnih žilah in mišicah. Vendar pa lahko določene količine polidatina privedejo do peritonitisa (Peng in sod., 2013).

Gioahin E. Protimikrobna aktivnost eteričnega olja in izvlečkov japonskega dresnika.
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije, 2016

Klasifikacija	Kemijska spojina	Molekulska formula	Biološka aktivnost
Antrakinoni	Emodin 	$C_{15}H_{10}O_5$	Protimikrobna Protivnetna Estrogena Inhibitor tirozinaze
	Piscion 	$C_{16}H_{12}O_5$	Inhibitor tirozinaze
Antrakinoni	Emodin-8-beta-D-glukozid 	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Anti-HIV Estrogena Nevroprotektivna
	2-metoksi-6-acetil-7-metiljuglon 	$C_{14}H_{12}O$	Nevroprotektivna
Antrakinoni	ω-hidroksi-emodin 	$C_{15}H_{10}O_6$	Protivnetna Estrogena Inhibitor tirozinaze
Flavonoidi	(+)-katehin 	$C_{15}H_{14}O_6$	Anti-HIV
Stilbeni	Polidatin 	$C_{20}H_{22}O_8$	Protivnetna Nevroprotektivna Kardioprotektivno
	Resveratrol 	$C_{14}H_{12}O_3$	Anti-HIV Protivnetna Nevroprotektivna Kardioprotektivno Prehransko dop. Antitumorska

Slika 2: Strukturne formule sestavin izvlečkov japonskega dresnika in njihova zdravilna učinkovitost (prirejeno po Zhang in sod., 2013: 3-4).

2.1.4 Biološka aktivnost japonskega dresnika

Številne študije japonskemu dresniku pripisujejo protivirusno, protimikrobno, protivnetno, estrogeno, nevroprotektivno in kardioprotektivno aktivnost (Zhang in sod., 2013). Med pomembnejše aktivnosti izvlečkov sodi protibakterijski učinek. Vodni izvleček rastline, ki je ekvivalenten 1 g/mL neobdelane rastlinske droge ima protibakterijske učinke proti vrstam *Staph. aureus*, *Staph. albus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *B. typhosum*, α -hemolitičnim streptokokom in β -hemolitičnim streptokokom. Območja zavrte rasti bakterijske kulture (tj. inhibicijske cone) so bile v povprečju velika 1,015 cm (Wang in sod., 2006). Metanolni izvleček učinkuje proti vrstam *Strep. mutans* in *Strep. sobrinus*. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za omenjeni bakteriji je bila 0,5-4 mg/mL in obeta učinkovito kontroliranje nastanka zobnih oblog (Song in sod., 2006; Song in sod., 2007). Metanolni izvleček s koncentracijo 100 mg/mL pa vpliva tudi na nekatere bakterije, ki povzročajo zastrupitev s hrano, kot so na primer *B. cereus*, *L. monocytogenes* in *Staph. aureus*, za bakterije so bile pri poizkusu z difuzijskim antibiogramom z jamicami inhibicijske cone velike 16,4; 19,2 in 20,2 mm. Za ostala dva zelo pogosta povzročitelja zastrupitve s hrano, *E. coli* in *Salm. Anatum*, pa so bile velikosti inhibicijskih con pri isti koncentraciji bistveno manjše (6,4 in 12,8 mm) (Shan in sod., 2008). Pai-Wei in sod. (2015) so z difuzijskim antibiogramom po Kirby-Bauerju potrdili, da etanolni izvleček s koncentracijo 100 mg/mL zavira rast nokosomialnih bakterij *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa* in *Ac. baumannii*. Povprečna velikost izmerjenih inhibicijskih con bakterij je bila 21,0; 15,5 in 11,50 mm. Poleg koncentriranega etanolnega izvlečka v študiji so pripravili in testirali tudi izvlečke z različno polarnimi topili (n-heksan, kloroform, etil eter in etil acetat), kjer se je frakcija etil etra izkazala za najbolj aktivno proti *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Ac. baumannii* in so izmerili inhibicijske cone velike 26,0; 20,3 in 17,0 mm (Pai-Wei in sod., 2015).

S tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo so ugotovili, da imajo protibakterijske učinke predvsem stilbeni (polidatin, resveratrol) in hidroksiantrakinoni (emodin, emodin-1-O-glukozid in emodin-3-metil eter) (Shan in sod., 2008). Dodatek

eteričnega olja listov japonskega dresnika v 10 % koncentraciji lahko zaustavi rast vrst *B. cereus* in *V. parahemolyticus* za 72 ur (Kim in sod., 2005).

Poleg protibakterijskega učinka so odkrili tudi protiglivno delovanje japonskega dresnika. Zavira rast plesni *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Fonsecaea pedrosi* in *Candida albicans*. Minimalne inhibitorne koncentracije izvlečkov za omenjene plesni so bile 5, 10, 20 in 40 mg/mL (Peng in sod., 2013).

Raziskovalci so ugotovili, da resveratrol 4-*O*-d-(2'-galoil)-glukopiranozid in resveratrol 4-*O*-d-(6'-galoil)-glukopiranozid delujeta kot inhibitorja DNA primaze (Hegde in sod., 2004).

2.2 PLESNI

2.2.1 Rod *Alternaria*

Za rod *Alternaria* je značilen rjav micelij. Na trosonoscih nastanejo v nizih konidiji, ki so obrnjeno kijasti, včasih vretenasti ali valjasti, večcelični in predeljeni kot zid iz opeke. Vrhnja celica je večkrat podaljšana v svetlejši bič. V tem rodu je veliko parazitov gojenih in samoniklih rastlin (Maček, 1991).

Preglednica 2: Taksonomska uvrstitev vrst *Alternaria alternata* in *Alternaria infectoria* (Simmons, 1986).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Fungi
DEBLO	Ascomycota
RAZRED	Dothideomycetes
PODRAZRED	Pleosporomycetidae
RED	Pleosporales
DRUŽINA	Pleosporaceae
ROD	<i>Alternaria</i>
VRSTA	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria infectoria</i>

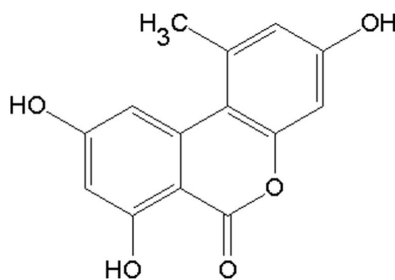
2.2.1.1 *Alternaria alternata*

Alternaria alternata sodi v družino črnih plesni, ki tvorijo hitro rastoče sivo-rjave do olivno-zelene kolonije. Površina odraslih kolonij je zaradi številnih hif na pogled videti puhasta. Rjave hife s septami tvorijo konidiofore s septami. Konidiji, ki so lahko posamič ali v verigah,

so veliki 45-50 x 36 μm in so različne oblike glede na pogoje rasti, od ovalne do oblike s podaljšano konico. Konidiji plesni, gojene v hladnejših in suhih razmerah, imajo krajše konice od tistih, ki uspevajo v optimalnih razmerah (Kustrzeba-Wójcicka in sod., 2014) in so eni izmed virulentnih faktorjev, ki pripomorejo k invaziji plesni v celico (Tsuge in sod., 2013). Celice obdaja celična stena, zgrajena iz hitina in β -1,3-glukana. *Alternaria alternata* proizvaja suhe, razmeroma velike spore, ki so podolgovate, kljunaste in prečno septirane.

Je kozmopolitska vrsta, ki se pojavlja kot saprofit na rastlinah, tleh in hrani ter kot parazit v rastlinah, živalih in človeku. Povzroča razvoj alternarioze, mikoze, ki se pojavlja predvsem pri imunsko oslabljenih bolnikih. *Alternaria alternata* je mezohigrofil, ki uspešno raste ter proizvaja mikotoksine pri vlagi od 84 do 89 % ter pri 97 % in temperaturi 20 °C. Spore za prenos po zraku potrebujejo suhe, tople, vetrovne pogoje, da se lahko razširjajo. Tako so največkrat prisotne v ozračju ob sončnih popoldnevih pozno poleti in zgodaj jeseni.

Alternaria se nahaja predvsem v naravi, najdemo pa jo tudi v vlažnih zaprtih prostorih s slabšo ventilacijo. Poleg prostorov z visoko vlago, veliko tveganje za prisotnost alergenih spor *Alternaria alternata* predstavljajo tudi prostori s ščurki in mačkami, saj le ti lahko prenesejo spore v notranjost prostorov. Eksperimentalne študije z izvlečki plesni dokazujejo, da te povzročajo morfološke spremembe in produkcijo citokinov v epitelnih celicah respiratornega trakta (Kustrzeba-Wójcicka in sod., 2014).



Slika 3: Mikotoksin alternariol (Kustrzeba-Wójcicka in sod., 2014).

Alternaria proizvaja 30 mikotoksinov, vendar je več znanih le za sedem mikotoksinov, ki povzročajo največjo skrb za zdravje ljudi (Brzonkalik in sod., 2011). Med njimi so

najpomembnejši alternariol, alternariol metil eter, altenuen, alvertoksin I, II, III in tenuazojska kislina. Alternariol lahko najdemo v hrani (Kustrzeba-Wójcicka in sod., 2014), saj *Alternaria* uspeva na številnih prehransko pomembnih pridelkih, kot so sadje, zelenjava, žita in oljnice. Mikotoksine *Alternaria* proizvaja ob optimalnih razmerah, pri 25 °C in 88 – 98 % vlagi (Ostry, 2008).

Alternariol in njegov metilni eter imata pomembno vlogo pri etiologiji raka požiralnika pri človeku (Ostry, 2008). Alternariol, alternariol metil eter, tenuazojska kislina in alvertoksin imajo fetotoksične in teratogene učinke za živali. Alternariol in alternariol metil eter sta tudi mutagena (Efsa, 2011).

2.2.1.2 *Alternaria infectoria*

Morfološko se plesni vrste *Alternaria infectoria* od plesni vrste *Alternaria alternata* razlikujejo po daljših in širših konidijih, ki se povezujejo v verige, katere so zaradi prisotnih dolgih septiranih sekundarnih konidiofor močno razvejane (Pitt in Hocking, 2009). Tvorijo značilne puhaste, bele kolonije na PDA-gojišču, kjer je opaziti tudi značilno temno obarvanje v središču kolonije.

Alternaria infectoria se v produkciji sekundarnih metabolitov zelo razlikuje od ostalih vrst iz rodu *Alternaria*. Plesen ima z *Alternaria alternata* le nekaj skupnih metabolitov (Andersen in sod., 2002), saj ne tvori nobenega izmed znanih *Alternaria* metabolitov (Andersen in Thrane, 1996). Glavni habitat vrste so listi in klasi žit ter trav. *Alternaria infectoria* je oportunistični patogen, ki lahko v redkih primerih, predvsem pri imunsko oslabljenih, povzroča obolenja, kot je feohifomikoza (Nulens in sod., 2006).

2.2.2 *Aspergillus flavus*

Preglednica 3: Taksonomska uvrstitev vrste *Aspergillus flavus* (Link, 1809).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Fungi
DEBLO	Ascomycota
RAZRED	Eurotiomycetes
PODRAZRED	Eurotiomycetidae
RED	Eurotiales
DRUŽINA	Trichocomaceae
ROD	<i>Aspergillus</i>
VRSTA	<i>Aspergillus flavus</i>

Aspergillus flavus lahko okarakteriziramo kot hitro rastočo rumeno-zeleno kolonijo, ki v sedmih dneh, v temi in pri 25 °C zraste v premeru od 65 do 70 mm. Uspešno raste tudi pri 37 °C. *Aspergillus flavus* je telomorf z nenavadno urejenimi askosporami v samoodpirajočem se asku. Konidiofora je dolga od 400 do 800 µm, vezikli so okrogle do elipsoidne oblike, v premeru veliki od 3 do 6 µm (Klich, 2007).

Aspergillus flavus je saprofit in oportunistični patogen rastlin, živali in insektov. Povzroča gnitje shranjenih pridelkov in proizvaja mikotoksin, aflatoksin B₁ (Stevens in sod., 2000). Aflatoksin B₁ je najbolj močan naravni karcinogen in je eden izmed redkih mikotoksinov, ki so ga razvijali za biološko orožje (Bennett in sod., 2003). Aflatoksini so derivati difuranokumarinov, ki nastajajo kot produkt v poliketidni poti. Obstajajo štirje glavni aflatoksini; B₁, B₂, G₁ in G₂ (Squire, 1981; Klich, 2007). Aflatoksin pri živalih in ljudeh povzroča dve glavni obliki aflatoksikoze. Akutno aflatoksikozo, ki se konča s smrtjo, in kronično aflatoksikozo, ki se odraža v nastanku raka, predvsem na jetrih, zmanjšanju odpornosti, teratogenosti in drugih simptomih (Bennett in sod., 2003).

Aspergillus flavus je oportunistični patogen koruze, arašidov, bombaža in drevesnih oreškov. Znaki okužbe se kažejo kot nekrotične lezije, bledenje nadzemnih delov in manjša tvorba sekundarnih korenin. Povzroča gnitje pridelkov in zmanjša viabilnost semen zaradi delovanja aflatoksina (Klich, 2007). *Aspergillus flavus* je bil izoliran iz zemlje v vseh podnebnih pasovih, vendar pa je pogostejše izoliran v okolju s toplejšim podnebjem, kjer so temperature od 25 do

35 °C, uspeva pa vse do 42 °C. Kontaminacije polj z aflatoksinom so povezane z visokimi temperaturami in sušnim stresom. Raziskave kažejo, da bi umetno namakanje bistveno zmanjšalo vsebnost toksinov v arašidih. Visoke temperature in sušni stres vplivata tudi na fiziologijo rastline, rastline so pod stresom, kar jih naredi dovzetnejše za okužbo ali produkcijo aflatoksinov. Sušni stres naprimer vpliva na povišanje prolina v rastlinah, ki vpliva na povečanje produkcije aflatoksina. Zaradi stresa je zavrta tudi tvorba nekaterih fitoaleksinov, ki imajo v rastlini protimikrobno delovanje (Klich, 2007).

2.2.3 *Epicoccum nigrum*

Preglednica 4: Taksonomska uvrstitev vrste *Epicoccum nigrum* (Link, 1816).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Fungi
DEBLO	Ascomycota
PODDEBLO	Pezizomycotina
RAZRED	Ascomycetes (Dothideomycetes)
PODRAZRED	Pleosporomycetidae
RED	Pleosporales
DRUŽINA	Pleosporaceae
ROD	<i>Epicoccum</i>
VRSTA	<i>Epicoccum nigrum</i>

Epicoccum nigrum je askomiceta, razširjena po vsem svetu, ki tvori značilne temno obarvane, muriformne konidije na kratkih konidioforih, nameščenih na sporodohijih. Kolonizira različne tipe tal in rastlin. Je sapotrofna gliva, ki primarno sodeluje pri razgradnji rastlinskega materiala (Mims in Richardson, 2005) in se pogosto pojavlja kot endofit v različnih rastlinah (Lima Favaro in sod., 2011). Rastlini omogoča obrambo pred patogeni, kot je *Sclerotinia sclerotiorum* v sončnicah, *Pythium* v bombažu, fitoplazmi v jablanah in *Monilinia* spp. v breskvah in nektarinah. S svojimi proizvajanjem sekundarnih metabolitov deluje proti rastlinskemu patogenom, opazno pa je tudi povečanje biomase pri rastlinah, inokuliranih z *Epicoccum nigrum* (de Fávoro in sod., 2012).

Epicoccum nigrum je uporabljen kot antimikrobno biološko sredstvo za rastlinske patogene in proizvaja številne bioaktivne sekundarne metabolite, kot so flavipin, epicorazin A-B, epirocin,

triornicin, oreovacten, epicoccamide, epicocconone, D8646-2-6 inepicoccin A–D (Da Silva Araújo in sod., 2012). Opisana je tudi produkcija nekaterih drugih bioaktivnih kemijskih spojin, kot so siderofori, antioksidanti, inhibitorji replikacije HIV-1, inhibitorji levkemičnih celic, inhibitorji proteaze, inhibitorji telomeraze in fluorescentne spojine s potencialno biotehnološko aplikacijo (de Fávoro in sod., 2011).

2.2.4 *Fusarium poae*

Preglednica 5: Taksonomska uvrstitev vrste *Fusarium poae* (Wollenweber, 2014).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Fungi
DEBLO	Ascomycota
PODDEBLO	Pezizomycotina
RAZRED	Sordariomycetes
PODRAZRED	Hypocreomycetidae
RED	Hypocreales
DRUŽINA	Nectriaceae
ROD	<i>Fusarium</i>
VRSTA	<i>Fusarium poae</i>

Micelij plesni na PDA-gojišču je bujen, po izgledu nitast in se spremeni v pudrasto obliko, ko se tvorijo konidiji. Micelij je sprva svetel in s staranjem potemni do rdeče-rjave barve. Gliva okužuje predvsem žita in se razširja s pomočjo pršice *Siteroptes graminum*, ki se hrani s *Fusarium poae*, ali preko zraka raznesenih konidijev (Leslie in Summerell, 2006). *Fusarium poae* se pojavlja predvsem v krajih z relativno suhim in toplim ozračjem (Xu in sod., 2008), zato je pogosta v Evropi.

Fusarium poae je ena izmed plesni iz rodu *Fusarium*, ki pri žitih povzroča fuzarioze klasa (Vogelgsang in sod., 2008a). Bolezen okuži vsa žita, najpomembnejša pa je pri pšenici. Najopaznejši znak okužbe je tipično pobeljenje klasa (Leslie in Summerell, 2006), ki vodi v zmanjšano kvaliteto žit ter posledično veliko izgubo pridelka. Plesen tekom rasti producira sekundarne metabolite in kontaminira žitna semena in slamo z različnimi mikotoksini. Ti metaboliti pa predstavljajo nevarnost za zdravje človeka in živali (Bennett in sod., 2003).

Fusarium poae proizvaja številne trihotecene, ki so močni inhibitorji sinteze beljakovin v telesu (Bennett in sod., 2003). Mednje sodijo trihoceteni tipa A, diacetoksiscirpenol, monoacetoksiskirpenol, scirpentriol, HT-2-toksin, T-2-toksin in neosolaniol ter tudi trihoteceni tipa B, nivalenol in fusarenon-X. Producira tudi mikotoksina beauvericin in eniatin (Vogelgsang in sod., 2008b).

Značilni učinki prisotnosti trihotecenov v krmi perutnine so izguba apetita in odklanjanje krme, slabše operjanje, poškodbe jeter in ledvic, rane na koži in sluznicah, živčne motnje, nekroze v prebavnem traktu, pešanje imunskega sistema, nižja masa nekaterih organov, anemija in pogin. Opazne so tudi spremembe na kljunu in manjša nesnost (Rezar in sod., 2008).

Trihoteceni so zelo močni inhibitorji sinteze beljakovin v celici. Za najbolj toksična iz skupine trihotecenov sta se v študijah na živalih izkazala T-2 in diacetoksiscirpenol. Citotoksičen učinek teh dveh mikotoksinov se odraža zmanjšani obrambi proti patogenom, kar se pogosto odraža v pojavljanju gastrointestinalnih, dermatoloških in nevroloških simptomov pri živalih. Pri ljudeh T-2 in diacetoksiscirpenol povzročata alimentarno aleukijo, katere simptomi so: dermatitis, bruhanje in hematopoetske tkivne motnje. Akutna faza se odraža v nekrozi ustne votline, krvavenju iz nosu, vaginalnem krvavenju in motnji živčnega sistema. Trihotecenski mikotoksini povzročajo tudi astmo in alergije (Lazicka, 2010).

2.2.5 *Penicillium palitans*

Preglednica 6: Taksonomska uvrstitev vrste *Penicillium palitans* (Link, 1816).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Fungi
DEBLO	Ascomycota
PODDEBLO	Pezizomycotina
RAZRED	Eurotiomycetes
PODRAZRED	Eurotiomycetidae
RED	Eurotiales
DRUŽINA	Trichocomaceae
ROD	<i>Penicillium</i>
VRSTA	<i>Penicillium palitans</i>

Rod *Penicillium* obsega veliko število vrst in je ubikvitaren. Večina plesni rodu *Penicillium* je mezofilnih (de Hoog in sod., 2000). Vrste tega rodu so saprofiti, s pomembno ekološko vlogo razkrajanja odmrlega materiala (Johnston, 2008).

Ciegler (1969) je prvi poročal o sevu *Penicillium palitans*, ki je bil izoliran iz komercialne krme za molzne krave in naj bi takrat povzročil množični pogin. Takrat so dokazali, da sev producira tri toksine, ki imajo tremorgene lastnosti, in sicer tremortini A, B in C (Ciegler in Hou, 1970).

Penicillium palitans je pogosto izoliran iz sira, kjer lahko proizvaja ciklopiazonično kislino. Ciklopiazonična kislina je močen kalcijev kelatni mikotoksin, ki povzroča točkovne nekroze v organih vretenčarjev (Frisvad in sod., 2007).

2.3 BAKTERIJE

2.3.1 Rod *Staphylococcus*

V rod *Staphylococcus* uvrščamo po Gramu pozitivne koke, ki se urejajo v gručice. So ubikvitarni, negibljivi, fakultativno aerobni in katalaza-pozitivni mikroorganizmi. Pogosto so del normalne mikrobiote kože in sluznic zgornjega dela respiratornega trakta (Greenwood in sod., 2012). Visoka odpornost na vplive okoljskih dejavnikov jim omogoča enostavno širjenje z neposrednim stikom. Glede na sposobnost izdelovanja koagulaze, lahko rod razdelimo na dve skupini: koagulaza pozitivne in koagulaza negativne stafilokoke (Brooks in sod., 2001).

Preglednica 7: Taksonomska uvrstitev vrst *Staph. aureus*, *Staph. pseudintermedius* in *Staph. saprophyticus* (Greenwood in sod., 2012).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Bacteria
DEBLO	Firmicutes
RAZRED	Bacilli
RED	Bacillales
DRUŽINA	Staphylococcaceae
ROD	<i>Staphylococcus</i>
VRSTE	<i>Staph. aureus</i> ; <i>Staph. pseudintermedius</i> ; <i>Staph. saprophyticus</i>

2.3.1.1 Proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA)

So 1 μm veliki, po Gramu pozitivni koki, ki se urejajo v grozdaste strukture. So nesporogeni, negibljivi in nimajo kapsule. Uspešno rastejo na različnih gojiščih in tvorijo značilne zlato-rumene, okrogle, svetleče kolonije, ki merijo od 2-3 mm. Rumeno-zlata barva kolonij, ki je posledica produkcije β -karotena, β -hemoliza in produkcija ekstracelularnega encima koagulaze, so značilni za *Staph. aureus* (Murray in sod., 2012). Prav tako so zanj specifični celični proteini na površini in proizvajanje termostabilne nukleaze, ki uniči oziroma razgradi DNA (Greenwood in sod., 2012).

Staph. aureus je najbolj patogen predstavnik stafilokokov. Pri zdravih ljudeh predstavlja del normalne kožne mikrobiote, najpogosteje naseljuje nosnice, predele pod pazduho, perinej in dimlje. Približno 30 % človeške populacije je asimptomatskih nosilcev te bakterije.

Glavni virulentni faktorji bakterije so produkcija Panton-Valentin leukocidina, α -toksina in sekrecija proteaz. Proti meticilinu odporni *Staph. aureus* (MRSA) pa dodatno proizvaja penicilin vezavni protein 2a (PBP2a), ki je posledica izražanja gena *mecA*, ki se nahaja na stafilokokni kromosomski genski kaseti *mec* (SCC *mec*) in omogoča odpornost proti β -laktamskim antibiotikom. MRSA povzroča velike težave v bolnišnicah, kjer posebno tveganje predstavljajo imunsko občutljivi pacienti, ki so na intenzivni negi ali pa so prestali operacijo (Greenwood in sod., 2012).

Bakterija *Staph. aureus* povzroča velik spekter okužb, od lokalnih okužb mehkih tkiv in kože do sistemskih, kot je bakteriemija. Povzroča tudi okužbe zgornjih in spodnjih dihal, lokomotornega aparata, osrednjega živčnega sistema, sečil in bolezenska stanja, ki so posledica delovanja bakterijskih toksinov (Seme, 2002). Razširja se z neposrednim stikom, najpogosteje preko rok zdravstvenega osebja ali posredno preko okuženih predmetov. Zaradi velikega števila nosilcev in izjemne tolerance za zunanje vplive se *Staph. aureus* hitro in uspešno širi (Greenwood, 2012).

Izjemne sposobnosti prilagajanja bakteriji omogočajo preživetje v človeškem organizmu. Površinski polisahardi jih s svojim protifagocitnim delovanjem ščitijo pred makrofagi, številni beljakovinski receptorji pa jim omogočajo učinkovito pritrditev na različne celične strukture. Pogosto izločajo glikokaliks, zunajcelično polisaharidno snov, ki jim omogoča tvorbo biofilma, ki pripomore k vezavi in jih ščiti pred naravnim obrambnim mehanizmom ter delovanjem antibiotikov. Številni dodatni encimi jim omogočajo lažje prodiranje in hitrejše širjenje okužbe (Seme, 2002). Zaenkrat je zdravljenje bolnikov, okuženih z MRSA, omejeno na uporabo glikopeptidnih antibiotikov, ki so manj učinkoviti kot protistafilokokni β -laktamski antibiotiki (Greenwood in sod., 2012).

2.3.1.2 Proti meticilinu odporen *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP)

Je za koagulazo pozitivna bakterija, ki je del normalne mikrobiote kože in mukozne membrane pri psih (Bannoehr in Guardabassi, 2012) in mačkah, ter jo lahko izoliramo iz nosnic, ust, žrela, čela, dimelj in anusa zdravih psov in mačk (van Duijkeren in sod., 2011). Običajno pri živalih povzroča predvsem oportunistične infekcije kože in ušes (Bannoehr in Gurdabassi, 2012). Pred uporabo molekularnih metod je bila bakterija dolgo časa identificirana kot *Strep. intermedius*, sedaj pa je uvrščena v tako imenovano skupino *Strep. intermedius* (SIG) v katero sodita še *Strep. delphi* in *Strep. intermedius* (van Duijkeren in sod., 2011).

Bakterija oblikuje izbočene, okrogle kolonije srednje velikosti, ki so neobarvane in imajo veliko nedokončano β -hemolizo in manjšo γ -hemolizo ali le eno izmed njih na ovčjem ali govejem krvnem agarju (Bannoehr in Gurdabassi, 2012). Proizvaja koagulazo, proteazo, termonukeazo in toksine, kot so hemolizini, eksfoliatni toksini in enterotoksine (Frank in Loeffler, 2012).

Da gre za proti meticilinu odporno *Strep. pseudintermedius* lahko dokažemo z potrditvijo prisotnosti gena *mecA*, ki je že zelo dobro poznan pri MRSA in bakteriji omogoča odpornost proti meticilinu in drugim β -laktamskim antibiotikom, vključno z cefalosporini in karbapenemi (Frank in Loeffler, 2012). Prvič so o tej bakteriji poročali v Severni Ameriki leta

1999, leta 2005 pa tudi v Evropi (Moodley in sod., 2014) in dandanes povzroča veliko skrbi saj je možen prenos iz živali na človeka (Sareyyüpoğlu in sod., 2014).

Bakterija je pogost povzročitelj pioderme pri psih, vendar pa glede na pogostost ne gre zaslediti veliko visoko učinkovitih terapij. Terapija kožnih infekcij običajno vključuje kombinacijo sistemske in topične terapije, v nekaterih primeri le topično. Pri sistemski terapiji se običajno uporabljajo antibiotiki, kot so kloramfenikol, amikacin, klindamicin, linezolid medtem, ko se za zdravljenje površinskih infekcij uporabljajo šamponi in sprej s klorheksidinom, mupirocinsko mazilo, benzoil peroksidni gel, fusidno kislino ali nizin. Ker je organizem nagnjen k pridobivanju različnih genov za odpornost proti antibiotikom ali protimikrobnim učinkovinam (Frank in Loeffler, 2012), in ker gre zato v veliko primerih za terapije, ki jih običajno uporabljamo za zdravljenje bolezni pri ljudeh (van Duijkeren in sod., 2011), je zelo pomembno odkritje novih učinkovitih sredstev za inhibicijo rasti te bakterije pri psih in mačkah (Frank in Loeffler, 2012).

2.3.1.3 *Staphylococcus saprophyticus*

Spada v skupino koagulaza negativnih stafilokokov in predstavlja del normalne mikrobiote kože in membran sluznic človeka in živali. Za razliko od ostalih stafilokokov je *Staph. saprophyticus* obligativen anaerob in predvsem pri dekletih v dobi odraščanja (Greenwood in sod., 2012) in spolno aktivnih ženskah povzroča infekcije urinarnega trakta. Manj pogosto se pojavlja pri moških in kot kontaminant živil, predvsem govejega in svinjskega mesa.

Virulentni faktorji *Staph. saprophyticus* omogočajo adherenco na urotelne celice s pomočjo lipoteihoične kisline, hemaglutinina, ki se veže na fibronektin in hemolizina. Infekcija urinarnega trakta se največkrat odraža kot hematurija in piurija (Raz in sod., 2005).

2.3.2 Rod *Streptococcus*

Preglednica 8: Taksonomska uvrstitev vrst *Strep. canis*, *Strep. pyogenes* in *Strep. agalactiae* (Greenwood in sod., 2012).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Bacteria
DEBLO	Firmicutes
RAZRED	Bacilli
RED	Lactobacillales
DRUŽINA	Streptococcaceae
ROD	<i>Streptococcus</i>
VRSTE	<i>Strep. canis</i> ; <i>Strep. pyogenes</i> ; <i>Strep. agalactiae</i>

Rod sodi v družino *Streptococcaceae*, kamor uvrščamo tudi *Enterococcus* spp. So katalaza negativni, po Gramu pozitivni koki, ki so običajno urejeni v pare ali verižice. V primerjavi z ostalimi po Gramu pozitivnimi koki, streptokoki nimajo sferične ampak podolgovato obliko celice. So fakultativni anaerobi, nekatere vrste pa so tudi kapnofilne in zahtevajo višje koncentracije ogljikovega dioksida. Glede na njihovo po Gramu pozitivno celično steno, ki je zgrajena iz peptidoglikana in teihoične kisline, lahko streptokoke glede na prisotnost vrstno specifičnega polisaharida v njihovi celični steni serološko klasificiramo po Lancefieldu (Greenwood in sod., 2012).

Streptokoke lahko razdelimo na β -hemolitične streptokoke ali piogene in vrste, ki niso β -hemolitične (Mahon in sod., 2015). Kolonije stafilokokov, ki spadajo v piogeno skupino so na krvnem agarju navadno obdane z nekaj milimetrov veliko zbistritveno cono, ki nastane zaradi lize rdečih krvnih celic z bakterijskim hemolizinom. To je β -hemoliza, ki nam služi kot pokazatelj, da gre za potencialno patogene streptokoke. Druga skupina na krvnem agarju povzroča zelena razbarvanja okoli kolonij, temu pravimo α -hemoliza čeprav ne gre za hemolizo. Gre le za vodikov peroksid, ki oksidira hemoglobin v zeleni methemoglobin. Rod *Streptococcus* vključuje kar nekaj pomembnih patogenov in komenzalov mukozne membrane zgornjega dela respiratornega trakta (Greenwood in sod., 2012).

2.3.2.1 *Streptococcus canis*

Streptococcus canis je β -hemolitični oportunistični patogen, ki sodi med streptokoke skupine G (Kruger in sod., 2010). Bakterija kot komenzal poseljuje sluznico in kožo ter lahko povzroči resna obolenja, kot so streptokokni toksični šok sindrom, nekrozo, septikemijo in meningitis pri živalih in ljudeh. Njegov glavni virulentni dejavnik je proteinu M podoben protein, ki je plazminogen vezavni protein, izražen pri nekaterih klinično pomembnih vrstah *Strep. canis*. Zaradi proteina se lahko veže na različne gostiteljeve proteine, med drugim tudi na fibrinogen. Proteinu M podoben protein pa naj bi bakteriji omogočil tudi združevanje v agregate in s tem onemogočil fagocitozo. Med okužbo se lahko bakterija s proteinom veže na kar nekaj proteinov, ki krožijo v gostiteljevem krvnem obtoku, kot je plazminogen. Zaradi plazminske proteolitične aktivnosti *Strep. canis* lahko razgradi agregat fibrin trombin in s tem poskrbi za razširjanje bakterije v tkivu (Fulde in sod., 2013).

2.3.2.2 *Streptococcus pyogenes*

Za bakterijo je značilno, da na krvnem agarju tvori velike kolonije in β -hemolizo. Zaradi specifičnega polisaharida v njeni celični steni jo uvrščamo v serološko skupino A in jo poimenujemo tudi streptokoki skupine A. Gre za mikroorganizem, ki povzroča bolezni pri ljudeh in ima veliko prevalenco po vsem svetu, saj gre letno zaslediti več kot 750 milijonov infekcij. Povzroča predvsem infekcije žrela (farinigitis, tonzilitis) in kože (nebulozni impetigo). Epitelij žrela in kože je pomembno primarno okolje bakterije, saj gre za mesto preko katerega se lahko bakterija zlahka prenaša naprej ali povzroča infekcije. V redkih primerih lahko bakterija vstopi v običajno sterilni del respiratornega sistema ali prodre v kožo od koder se lahko po krvnem obtoku prenese globlje v tkiva (Bessen in sod., 2014). V ekstremnih primerih lahko bakterija povzroča življenjsko ogrožajoče invazivne okužbe, kot je nekrozni fascitis, streptokokni toksični šok sindrom (Fieber in Kovarik, 2014) in bakteriemijo (Greenwood in sod., 2012). Več kot 25 % invazivnih okužb se konča s smrtjo. Zaradi svojih virulentnih faktorjev bakterija povzroča različne okužbe (Fieber in Kovarik, 2014). *Strep. pyogenes* se lahko preko površinsko izraženega proteina F veže na fibronektin epiteljskih celic žrela in

kože gostitelja. Pomembna pri vezavi sta tudi bakterijska lipotehoična kislina in na površini izražen protein M, ki bakterijo ščiti pred fagocitozo. Na površini bakterijske celice ima *Strep. pyogenes* tudi C5a proteinazo, ki specifično cepi in s tem inaktivira C5a pri ljudeh, ki je eden glavnih kemoatraktantov fagocitnih celic. *Strep. pyogenes* proizvaja dva različna hemolizina, streptolizin O (kisik labilen) in streptolizin S (v serum raztopljen). Oba z naluknjanjem membrane povzročata lizo eritrocitov in nevtrofilcev. Streptolizin S pa je odgovoren tudi za β -hemolizo okoli kolonij na krvnem agarju (Greenwood in sod., 2012).

Večina sevov *Strep. pyogenes* proizvaja enega ali več toksinov, imenovanih piogeni eksotoksini, ki povzročajo povišanje telesne temperature. Bolje poznani in raziskani so trije eksotoksini, imenovani SPE-A, SPE-B, SPE-C poleg njih pa je še nekaj drugih. Med njimi za najbolj toksičnega velja eksotoksin SPE-A. *Strep. pyogenes* in nekateri drugi piogeni streptokoki uporabljajo hialuronidazo za razgradnjo hialuronske kisline, ki je sestavina gostiteljevega vezivnega tkiva, kar se odraža v hitrejšem širjenju infekcije. Streptokinaza, ki je znana tudi kot fibrinolizin, je še eden izmed faktorjev, ki pripomore k hitremu širjenju infekcije. Izražen je pri vseh sevih *Strep. pyogenes* in deluje skupaj s površinsko izraženim vezavnim mestom za plazminogen na bakteriji. Ko se gostiteljev plazminogen veže na površino bakterije, se pretvori v plazmin s pomočjo streptokinaze, zato so infekcije hitrejše in bolj razširjene v mehkih tkiv v primerjavi z lokalizirani abscesi, ki so tipični za stafilokokne infekcije. Poleg že omenjenega bakterija producira vsaj štiri različne DNaze, ki hidrolizirajo nukleinske kisline in omogočijo bakteriji pobeg pred DNA-mrežo, ki jo tvorijo fagociti (Greenwood in sod., 2012).

2.3.2.3 *Streptococcus agalactiae*

Strep. agalactiae je β -hemolitična bakterija, ki sodi v Lancefieldovo streptokokno serološko skupino B. Primarno se nahaja v debelem črevesju in se lahko prenese v žrelo (Greenwood in sod., 2012), 10-40 % žensk pa ima *Strep. agalactiae* v nožnici kot del normalne vaginalne flore (Lindahl in sod., 2005). Novorojenčki žensk, okuženih s *Strep. agalactiae*, lahko

razvijejo okužbo, če so med nosečnostjo ali porodom izpostavljeni bakteriji. V preteklosti je bila bakterija znana predvsem kot povzročitelj mastitisa pri kravah, od leta 1960 pa je eden izmed glavnih razlogov neonatalnih infekcij v razvitem svetu. Prav tako je znana kot povzročitelj smrti žensk po porodu (Greenwood in sod., 2012).

Neonatalne infekcije *Strep. agalactiae* razdelimo na zgodnje ali pozne infekcije. Zgodnja infekcija je najbolj pogosta okužba novorojenčkov s *Strep. agalactiae* in se razvije v prvem tednu življenja, pozna infekcija novorojenčkov pa se razvije med 1 tednom in 3 meseci življenja. Pri zgodnji obliki okužbe, novorojenček pride v stik z mikroorganizmom med nosečnostjo ali porodom. Najbolj pogoste so okužbe z bakterijo v plodovnici. *Strep. agalactiae* lahko preide iz genitalnega trakta matere v plodovnico, v kateri se razmnoži in okuži respiratorni trakt fetusa. Ko bakterija vstopi v respiratorni trakt, lahko pride do razvoja pljučnice, kateri lahko sledi septikemija. Razširjanje po krvnem obtoku bakteriji omogoči, da doseže različne dele telesa, kjer lahko prodira v tkivo in povzroči meningitis in osteomielitis. Poznejše okužbe novorojenčkov s *Strep. agalactiae* so manj pogoste kot zgodnejše in so predvsem posledica prenosa bakterije preko bolniškega osebja. Najpogosteje vodijo v meningitis in bakteriemijo (Lindahl in sod., 2005).

Novorojenčki, ki preživijo okužbo s *Strep. agalactiae* imajo lahko po neonatalnem meningitisu doživljenjske posledice, kot so mentalna zaostalost, kortikalna slepota, gluhonemost, epileptični napad, hidrocefalus, izguba sluha in poznejša sposobnost govora. Oportunistična okužba z bakterijo se razvije le v nekaj primerih novorojenčkov, okuženih s *Strep. agalactiae*. Razlogi za to naj bi bili prezgodnje rojstvo, nizka porodna teža, gosta poselitev z bakterijo v vaginalnem traktu, intrapartum vročina ali zaradi majhne količine prisotnih materinih protiteles proti polisaharidni kapsuli ali površinskim proteinom bakterije (Lindahl in sod., 2005).

Strep. agalactiae ima kar nekaj virulentnih faktorjev, kot so produkcija hemolizina, polisaharidne kapsule, C5a-peptidaze (samo patogeni človeški sevi), hilaruonidaze, vendar ne

pri vseh sevih, in številni proteini na površini, ki vežejo IgA protitelesa človeka in služijo kot adhezini (Greenwood in sod., 2012).

Deset različnih tipov kapsularnih polisaharidov je bilo identificiranih (Ia, Ib in II-IX). Tip, ki je največkrat povezan z neonatalnimi infekcijami je tip III, infekcije pri odraslem pa povzročajo različni serotipi (Greenwood in sod., 2012).

2.3.3 *Paenibacillaceae*

Preglednic 9: Taksonomska uvrstitev vrst *Bacillus subtilis* in *Paenibacillus* sp. (Zeigler, 2013).

Taksonomski nivo	Uvrstitev
KRALJESTVO	Bacteria
DEBLO	Firmicutes
RAZRED	Bacilli
RED	Bacillales
DRUŽINA	Paenibacillaceae
ROD	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i>

2.3.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je eden najbolj poznanih in preučevanih mikroorganizmov, ki pogosto predstavlja model za regulacijske, metabolne in diferenciacijske procese pri prokariotih (Sonensheim in sod., 2002). Je aerobna ali fakultativno anaerobna, po Gramu pozitivna paličasta bakterija, ki so jo osamili iz različnih, tako vodnih kot tudi kopenskih okolij (Earl in sod., 2008). Ubikvitarnost *B. subtilis* lahko razložimo s sposobnostjo tvorbe endospor, ki se zlahka širijo z vetrom po zraku in na ta način prepotujejo dolge razdalje. Največkrat literatura *B. subtilis* opisuje kot bakterijo, izolirano iz tal (Earl in sod., 2008), njeno prisotnost pa so dokazali tudi v gastrointestinalnem traktu mnogih sesalcev, kjer lahko bakterijska spora vzklije, se razmnoži in resporulira (Tam in sod., 2006). Za izolate *B. subtilis* je značilna velika raznolikost tako na nivoju genoma kot tudi v sami fiziologiji. Neverjetna narava *B. subtilis* se kaže v njegovi sposobnosti diferenciacije v različne celične tipe, ki verjetno povečajo njegovo preživetje v različnih okoljskih razmerah (Lopez in sod., 2009).

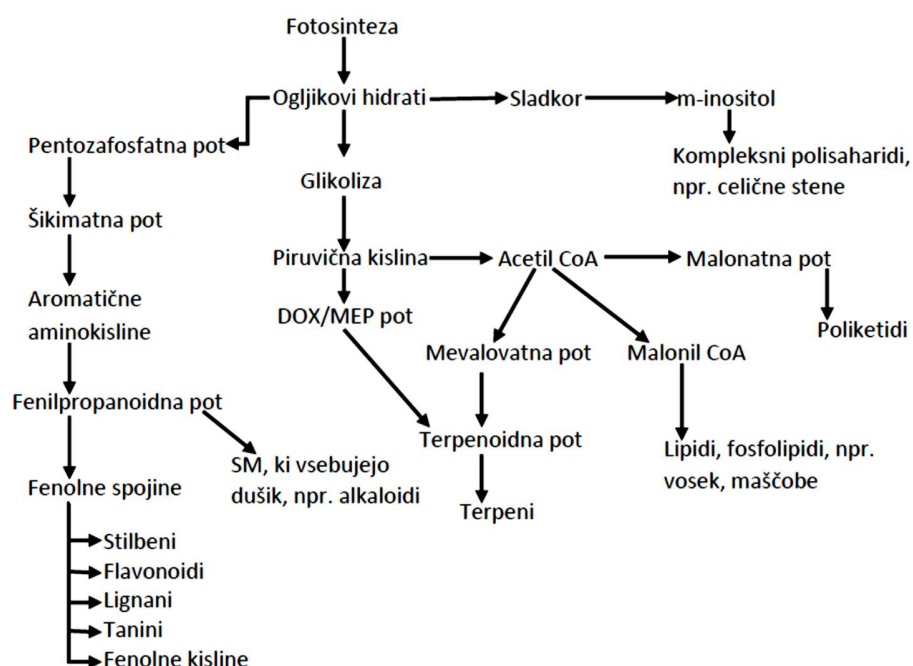
B. subtilis je široko uporabljena bakterija za proizvodnjo encimov, kot so proteaze in α -amilaze, ki se dodajajo detergentom, hrani in pijači (Harwood in Cranenburgh, 2008). Opisan je tudi kot probiotik, ki ga najdemo v nekaterih fermentiranih izdelkih, in pozitivno deluje na zdravje človeka, v medicini pa ni znan kot patogen človeka. Poleg tega, da ima *B. subtilis* veliko vlogo pri razgrajevanju odpadlega rastlinskega materiala, ga najdemo tudi v rizosferi, kjer tvori biofilm in dokazano pripomore k boljši oziroma hitrejši rasti rastline (Earl in sod., 2008).

2.3.4.2 *Paenibacillus* sp.

Vrste rodu *Paenibacillus* sp. so bile do nedavnega uvrščene v rod *Bacillus* in so leta 1993 postale samostojen rod glede na filogenetske analize 16S rRNA (Ash in sod., 1993). Rod *Paenibacillus* vključuje po Gramu pozitivne, aerobne ali fakultativno anaerobne bakterije paličaste oblike, ki tvorijo endospore. Bakterije so široko razširjene v okolju. Našli so jih v tleh, vodi, rizosferi, na rastlinskem materialu, koreninah drevja, hrani, kot tudi na površini materiala bolnišnic. Glavna značilnost rodu je predvsem sekrecija ekstracelularnih encimov v nevtralnih in bazičnih rastnih pogojih. Nekatere vrste rodu so sposobne produkcije polisaharidov, aminokislin in sekundarnih metabolitov, kot so antibiotiki, barvila in toksini, ki skupaj sinergistično pripomorejo h kompeticiji in simbiozi, delujejo kot encimski inhibitorji, feromoni in pospeševalci rastlinske in živalske rasti. Vrste rodu imajo kar nekaj različnih mehanizmov, ki pripomorejo k biološkemu nadzoru in zatiranju aktivnosti patogenov, kot sta tekmovanje za hranila in kolonizacija. Dokazano je, da njihova biološka aktivnost vpliva na širok spekter mikoorganizmov, kot so filamentozne plesni in bakterije. Deluje tudi proti pomembnemu anaerobnemu patogenu *Clostridium botulinum*. Nekatere vrste rodu proizvajajo protiglivne metabolite, ki učinkovito delujejo proti številnim patogenom rastlin in živali. Postali so pomembno biokontrolno sredstvo zaradi njihove sposobnosti razgradnje hitina, ki je glavna sestavina stene glive (Lorentz in sod., 2006). Vedno več je zanimanja za raziskovanje *Paenibacillus* sp. kot vira novih protimikrobnih sredstev. Kljub temu, da *Paenibacillus larvae* povzroča bolezen pri ličinkah čebel, ni znano, da bi *Paenibacillus* sp. povzročal bolezen pri človeku (Guo in sod., 2012).

2.4 RASTLINSKI SEKUNDARNI METABOLITI

Za rastline je značilno, da so sposobne sinteze in shranjevanja širokega nabora spojin z nizko molekulsko maso. Te spojine imenujemo sekundarni metaboliti (SM). Opisanih je že več kot 100 000 spojin, vendar pa je resnična številka precej višja, saj je bilo do sedaj fitokemijsko raziskanih le 20-30 % vseh rastlin. Gre za spojine, ki ne vsebujejo dušika (terpeni, poliketidi, fenoli, saponini in poliacetileni) in spojine z dušikom (alkaloidi, amini, cianogeni glikozidi, neproteinske aminokisline, glukozinolati, alkalamidi in peptidi). Za razliko od primarnih metabolitov, ki so ključni za preživetje rastline, se nekateri tipi SM pojavljajo le pri nekaterih rastlinah, kar pomeni, da niso ključni za preživetje le teh. SM pa za rastlino niso neuporabne snovi, rastlini služijo kot obramba proti virusom, bakterijam, glivam, kompetitorjem in proti herbivorom. Lahko služijo tudi kot signalne molekule, ki živali privlačijo k opravljanju (aromatični monoterpeni, barvila antociani ali karotenoidi) in raznosu semen. SM so kompleksne mešanice spojin, ki se razlikujejo od organa do organa rastline, včasih med rastlinami iste vrste in še posebno med rastlinami različnih vrst. Običajno se višje koncentracije akumulirajo in shranjujejo v organih rastline, ki so pomembni za preživetje in razmnoževanje. V rastlini SM predstavljajo 1-3 % suhe mase. Na splošno se hidrofilne snovi shranjujejo v vakuoli, medtem ko se lipofilne spojine nalagajo v smolnih vodih, laticiferih, trihomih, oljnih celicah ali v kutikuli (Wink, 2010).



Slika 4: Osnovne biosintezne poti, ki vodijo do nastanka sekundarnih metabolitov (prirejeno po: Ghasemzadeh in Jaafar, 2011: 1106; Giada, 2013: 88-105)

Nenadzorovana uporaba antibiotikov se odraža v povečanem številu odpornih bakterij. Da bi uspešno premagovali odpornost nosokomialnih bakterij potrebujemo bolj učinkovita protimikrobna sredstva z novimi načini delovanja. Kot kaže so zdravilne rastline, uporabljene v tradicionalni medicini za zdravljenje infekcijski bolezni, obilen vir bioaktivnih SM. Zato je bilo v zadnjih letih narejenih veliko študij, v katerih so določevali protimikrobne aktivnosti zdravilnih rastlin in rastlinskih izvlečkov. S pomočjo frakcionizacije bioaktivnih rastlinskih izvlečkov so tekom študij izolirali različne sekundarne metabolite s protimikrobno aktivnostjo. Rezultati kažejo, da gre protimikrobno aktivnost rastlinskih izvlečkov pripisati predvsem alkaloidom, flavonoidom, fenolnim spojinam, terpenoidom in taninom. Protimikrobno aktivnost imajo tudi eterična olja, ki dokazano delujejo proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam in glivam. Bioaktivni sekundarni metaboliti in eterična olja so del obrambnega sistema višjih rastlin (Reichling, 2010).

2.5 EKSTRAKCIJA PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Ekstrakcija je prvi pomemben korak pri pridobitvi bioaktivnih sestavin rastline (Chew in sod., 2011). V osnovi ekstrakcija vključuje pranje rastlinskega materiala, sušenje ali liofilizacijo in mletje, da dobimo homogen vzorec, ki omogoča večji stik topila z rastlinskimi delci (Sasidharan in sod., 2011). Kar nekaj dejavnikov vpliva na učinkovitost ekstrakcije, kot je ekstrakcijska metoda, vrsta in koncentracija topila, velikost rastlinskih delcev, trajanje, temperatura in pH ekstrakcije, razmerje med topilom in rastlinskim materialom (Chew in sod., 2011). Učinkovitost topila in metode je močno odvisna tudi od uporabljenega rastlinskega materiala (Tomsone in sod., 2012). Izbira topila temelji predvsem na naravi bioaktivnih sestavin rastline, ki jih želimo ekstrahirati (Sasidharan in sod., 2011). Topila, kot so metanol, etanol, aceton, propanol in etil acetat se pogostokrat uporabljajo za ekstrakcijo fenolnih komponent iz rastline. Lastnosti topila močno vplivajo na ekstrakcijo izmerjenih skupnih fenolnih komponent (± 25 % variabilnost) in antioksidativno aktivnost (do 30 % variabilnost). Zelo pomemben parameter je polarnost topila (Tomsone in sod., 2012), saj obstaja zelo preprosto in praktično empirično pravilo, ki narekuje, da se snovi raztapljajo v njim podobnem topilu in temelji na polarnosti sistema, polarne molekule se raztapljajo v polarnem topilu (voda, alkohol). Polarnost organskih molekul je determinirana s prisotnostjo polarnih vezi glede na prisotnost elektronegativnih atomov (N, O) in polarnih funkcionalnih skupin, kot so amini ($-NH_2$) in alkoholi ($-OH$) (Jones in Fleming, 2009). Višja je polarnost topila, boljša je topnost fenolnih komponent. Največja količina izvlečkov oz. izkoristki (do 22,8 %) so bili pridobljeni z uporabo alkoholnih topil. Dodatek vode etanolu ekstrakcijo še izboljša, vendar količina dodane vode ne sme biti prevelika (Tomsone in sod., 2012).

2.6 ETERIČNA OLJA

Eterična olja (EO) so ekstrahirana iz različnih aromatičnih rastlin, ki uspevajo predvsem v krajih z višjimi temperaturami, kot so mediteranske in tropske dežele. So tekoča, hlapna, bistra in redko obarvana, topna v maščobah in organskih topilih, ki imajo manjšo gostoto od vode. Gre za naravne, kompleksne snovi, za katere je značilno, da imajo izrazit vonj in da jih aromatične rastline proizvajajo kot sekundarne metabolite. Sintetizirana so lahko v vseh organih rastline in se shranjujejo v žleznih celicah, vdolbinicah, kanalih, epidermalnih celicah ali žleznih trihomih. Ker so znana po antiseptičnih, zdravilnih in aromatičnih lastnostih, jih uporabljamo za konzerviranje živil, kot protimikobno terapijo, analgetike, sedative, protivnetna sredstva, spazmolitike in lokalne anestetike (Bakkali in sod., 2008).

Obstaja nekaj metod za ekstrakcijo EO; ekstrakcija s tekočim ogljikovim dioksidom, mikrovalovi in parna oziroma vodna destilacija. Metodo ekstrakcije izberemo glede na namen uporabe EO, saj lahko kemijski profil eteričnih olj variira ne le v številu molekul temveč tudi v stereokemičnem tipu ekstrahiranih molekul. Ekstrahirani produkt lahko variira v kvaliteti, količini in sestavi tudi glede na podnebje in tip tal kjer rastlina uspeva, vrsto rastlinskega organa, starost in stopnjo rastnega oz. življenjskega cikla. Če torej želimo vedno pridobiti EO iste sestave, je potrebno ekstrakcijo vedno izvesti pod istimi pogoji, iz istega rastlinskega materiala (organa), ki je rasel v enakih razmerah (ista tla, enako podnebje, isti letni čas nabiranja). Kvaliteta večine komercialnih EO je kemotipizirana s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo. Trenutno je poznanih približno 3000 eteričnih olj, 300 od teh je komercialno pomembnih predvsem v farmacevtski, agronomski, živilski, sanitarni, kozmetični in parfumski industriji (Bakkali in sod., 2008).

EO so zelo kompleksne naravne mešanice, ki lahko vsebujejo 20 do 60 sestavin v različnih koncentracijah. Zanje so značilne predvsem dve do tri glavne sestavine, ki lahko predstavljajo 20-70 % EO v primerjavi z ostalimi sestavinami, ki so prisotne le v sledih. Te glavne sestavine določajo biološke lastnosti EO. Spojine EO lahko uvrstimo v dve glavni skupini

glede na biosintezni izvor. Ena skupina vključuje terpene ali terpenoide, druga pa aromatske in alifatske spojine, katerim je skupna nizka molekulska masa (Bakkali in sod., 2008).

EO vplivajo na metabolizem v citoplazmi in celični steni bakterij in plesni. Predvsem monoterpeni povečajo fluidnost in prepustnost celične membrane (poškodujejo lipide in proteine membrane), zavirajo celično dihanje in spremenijo transport ionov (Reichling in sod., 2006). Zaradi njihove prooksidativne aktivnosti delujejo citotoksično in so zato odlično antiseptično protimikrobno sredstvo, ki se ga lahko uporablja za domačo uporabo. Velika prednost EO je tudi, da njihova uporaba ne predstavlja genotoksičnih tveganj. Zaradi njihovega prooksidativnega vpliva na delovanje mitohondrijev so eterična olja tudi unikatno antitumorsko sredstvo. Pri uporabi EO je produkcija radikalov zelo dobro kontrolirana ter tarčno usmerjena in ne predstavlja mutagenih stranskih učinkov za zdravo tkivo (Bakkali in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

V eksperimentalnem delu smo testirali protibakterijsko in protiglivno učinkovitost listnih in koreninskih vodnih, etanolnih, metanolnih, acetonskih izvlečkov ter EO listov izdelanih iz japonskega dresnika (*F. japonica*). Iz listov smo pripravili vodne in organske izvlečke ter eterično olje, iz korenin pa vodne in organske izvlečke.

3.1 RASTLINSKI VZORCI

V magistrskem delu smo uporabili liste in korenike japonskega dresnika. Zrele liste japonskega dresnika smo nabrali 17.6.2014, korenike pa 27.11.2014. Ves rastlinski material smo nabrali v sestoju japonskega dresnika ob potoku Mali Graben, ob Cesti Dolomitskega odreda (Vrhovci, Ljubljana, GPS koordinate: N 46°02'33.9"; E 14°27'00.9").

Eterično olje so iz posušenih listov pripravili na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (Štalcar, 2015). Vodne, acetonske, etanolne in metanolne izvlečke iz listov in korenin pa smo pripravili v laboratorijih Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.1.1 Sušenje in mletje vzorcev

Material:

- trsne škarje,
- lopatka,
- papirnate vrečke
- sušilnik s krožno ventilacijo (Heraeus Instruments, Nemčija)
- žaga,
- deska,
- vodno hlajen analitski mlinček (IKA-Werke M20, IKA, Nemčija),
- liofilizator (Christ Alpha 1-4LSC, Christ, Nemčija),

- tekoči dušik,
- steklene posodice z navijalnimi pokrovčki za shranjevanje zmletih vzorcev,
- spatula.

Nabrane liste smo posušili v ventilacijskem sušilniku, jih zmleli v vodno hlajenem analitskem mlinčku in jih shranili v tesno zaprte steklene posodice v temi pri sobni temperaturi.

Nabrane korenike smo najprej dobro očistili (umili pod tekočo vodo in osušili), narezali na manjše kolute debeline okoli 1 cm in zamrznili s tekočim dušikom, ter jih do sušenja v liofilizatorju shranili v zamrzovalnik pri -20 °C. Korenike smo v liofilizatorju sušili 3 dni.

3.2 PRIPRAVA ORGANSKIH IN VODNIH IZVLEČKOV

3.2.1 Ekstrakcija

3.2.1.1 Vodni izvleček

Material:

- erlenmajerica (500 in 1000 mL),
- steklena palčka,
- parafilm,
- stresalnik (Heraeus Instruments, Nemčija),
- analizna tehtnica (Kern 572, Kern&Sohn, Nemčija),
- merilni valj (150 mL),
- dH₂O.

Za pripravo vodnega izvlečka smo v erlenmajerici zmešali 50 g zmletega rastlinskega materiala in 600 mL destilirane vode, da smo pridobili izhodno vodno raztopino izvlečka japonskega dresnika s koncentracijo 8,3 % (w/v). Erlenmajerico smo pokrili s parafilmom, vpeli na stresalnik ter zmes stresali 24 ur pri 175 obr/min pri sobni temperaturi. Po stresanju smo mešanico prefiltrirali in za nadaljnje delo uporabili filtrat.

3.2.1.2 Organski izvleček

Material:

- erlenmajerica (500 mL),
- steklena palčka,
- parafilm,
- stresalnik (Laboshake 500, Gerhardt, Nemčija),
- analizna tehtnica (Kern 572, Kern&Sohn, Nemčija),
- merilni valj (150 mL),
- absolutni etanol (Panreac, Hrvaška),
- absolutni metanol (Merck, Nemčija),
- absolutni aceton (Merck, Nemčija).

Za pripravo posameznega organskega izvlečka smo v erlenmajerico natehtali 50 g rastlinskega materiala in 300 mL organskega topila (absolutni etanol, metanol, aceton), da smo pridobili izhodno organsko raztopino izvlečka japonskega dresnika s koncentracijo 16,6 % (w/v). Erlenmajerico smo pokrili s parafilmom, da bi preprečili izhlapevanje topila, vpeli na stresalnik in zmes stresali 24 ur pri 175 obr/min pri sobni temperaturi. Po stresanju smo mešanico prefiltrirali in za nadaljnje delo uporabili filtrat.

Različne koncentracije vodnih in organskih rastlinskih izvlečkov smo pripravili zato, ker se je 50 g rastlinskega materiala drugače saturiralo z vodo kot pa z organskimi topili. V primeru vodnega ekstrakta je bila mešanica, ki smo jo pripravili videti gosta in se je težje mešala, zato smo dodali večji delež tekočine, kot pa v primeru organskih topil.

3.2.2 Filtriranje in sušenje izvlečka

Material:

- Bihnerjev lij,

- presesalna erlenmajerica,
- filtrirni papir (velikost por 11 μm , Watman, Velika Britanija),
- steklena vodna črpalka,
- cedilo,
- čaša,
- spatula,
- žlička,
- bučka za rotavapor (500 mL),
- rotavapor (Rotavapor R-124, Vacobox B-177, Waterbath B-480, Büchi, Švica),
- plastična centrifugirka,
- analizna tehtnica (Kern 572, Kern&Sohn, Nemčija).

Mešanico, ki se je 24 ur stresala na stresalniku, smo precedili skozi cedilo, da smo se znebili večjih delov rastlinskega materiala. Tekoči del pa nato prefiltrirali pod znižanim tlakom skozi filtrirni papir. Pridobljeni izvleček v presesalni erlenmajerici smo nato prelili v bučko za rotavapor in tekočo fazo na rotavaporju izparevali do povsem suhega izvlečka, ki je odstopil od stene bučke. Dobljeni suh izvleček smo stehtali.

3.2.3 Priprava izvlečkov za testiranje protimikrobne aktivnosti

Material:

- 2 mL Eppendorf-centrifugirka,
- pipeta,
- analizna tehtnica (Kern ALJ 160-4NM, Kern&Sohn, Nemčija),
- čaša,
- spatula,
- vibracijski mešalnik (Yellow line, TTS2, IKA, ZDA),
- posušeni izvlečki,
- 70 % etanol in dH₂O.

V Eppendorf-centrifugirko smo zatehtali 0,5 g posameznega izvlečka in dodali 1 mL vode za vodni izvleček oz. 1 mL 70 % etanola za organske izvlečke. Mešanice smo premešali na vibracijskem mešalniku, da se je material dobro premešal in raztopil. Pridobili smo izvlečke s koncentracijo 500 mg/mL.

3.3 PLESNI

3.3.1 Vzorci

Plesni vrst *Alternaria alternata* KP271953, *Alternaria infectoria* KP271957, *Aspergillus flavus* KP271956, *Fusarium poae* KP271958 in *Epicoccum nigrum* KP271954 smo pridobili iz zbirke Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Vrsto *Penicillium palitans* EXF 3675 smo pridobili iz zbirke Mycosmo na Katedri za biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.3.2 Priprava 2 % krompirjevega gojišča (PDA-gojišče)

Material:

- Petrijeve plošče (premer 85 mm),
- steklenice za avtoklaviranje (300 mL),
- trak za označevanje,
- alkoholni flomaster
- analizna tehtnica (Kern 572, Kern&Sohn, Nemčija),
- merilni valj (150 mL),
- krompirjev dekstrozni agar PDA (Biolife, 4019352, Italija),
- dH₂O,
- brezprašna komora (PIO LFV 122, Iskra PIO, Slovenija),
- gorilnik,
- vžigalnik.

V posamezno steklenico za avtoklaviranje smo natehtali 7 g PDA in dodali 350 mL destilirane vode, da smo pridobili 2 % PDA-gojišče. Steklenice z raztopljenim gojiščem smo nato avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo pustili, da se gojišče ohladi na približno 42 °C in ga vlili v sterilne Petrijeve plošče. Pripravljene plošče s trdnim 2 % PDA-gojiščem smo uporabili za testiranje biološke aktivnosti izvlečkov.

3.3.3 Testiranje protiglivne aktivnosti izvlečkov

Material:

- alkoholni flomaster,
- brezprašna komora (PIO LFV 122, Iskra PIO, Slovenija),
- vžigalnik,
- gorilnik,
- 2 % PDA-gojišče,
- 96 % etanol (Merck, Nemčija),
- 70 % etanol (Merck, Nemčija),
- spatula,
- pipeta,
- nastavki za pipeto,
- škarje,
- parafilm,
- spatula po Drigalskem,
- čaša,
- plošče s kulturo plesni,
- centrifugirke (2 mL),
- 6 mm papirnati diski za antibiogram,
- dH₂O,
- pinceta,
- fotoaparat (Canon EOS 1000D, Canon, Japonska).

Na 2 % PDA-gojišče smo s pipeto nanesti 50 μ L raztopljenega izvlečka za testiranje. Ker so bili izvlečki zelo gosti smo v primeru listnih izvlečkov konice pipetnih nastavkov odrezali, da smo lahko odpipetirali želeni volumen. Izvleček smo nato enakomerno razmazali po celotni površini gojišča s spatulo po Drigalskem. Iz plošče z osnovno kulturo plesni smo z dvema kovinskima spatulama z roba kulture plesni izrezali kvadrat velikosti 25 mm² (stranice 5 mm) in jo prenesli na gojišče s sveže razmazanim izvlečkom. Plošče smo označili, oblepili s parafilmom in jih inkubirali en teden pri sobni temperaturi v temi. Po enem tednu inkubacije smo plošče pregledali, fotografirali in fotografije obdelali z računalniškim programom ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Vsak tretma plesni z izbranim izvlečkom smo pripravili v 2-3 ponovitvah.

3.4 BAKTERIJE

3.4.1 Vzorci

Bakterijske vrste, proti metilinu odporna *Staph. aureus* 3802 in *Staph. pseudintermedius* 1342, *Staph. saprophyticus* L572, *Strep. pyogenes* V59, *Strep. Canis* spp., *Strep. agalactiae* V60, *Paenibacillus* sp. L564, *B. subtilis* spp. smo pridobili na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.4.2 Priprava trdnega in tekočega lizogenega gojišča (LB-gojišča)

Material:

- analizna tehtnica (Kern PFB 1200-2, Kern, Nemčija),
- žlička,
- alkoholni flomaster,
- plastična merilna posoda (1000 mL),
- erlenmajerica (1000 mL),
- tekoče gojišče LB Broth Miller (Formedium, England),

- agar (Formedium, England),
- dH₂O,
- merilni valj (500 mL),
- magnetno mešalo (IKA RCT Standard, Kitajska),
- pipeta,
- staničevinasti celulozni zamaški,
- aluminijeva folija,
- avtoklav (Kambič, Slovenija),
- Petrijeve plošče (premer 85 mm),
- brezprašna komora (Iskra PIO, Slovenija).

Pripravili smo tekoče gojišče za gojenje prekonočne bakterijske kulture. V plastično merilno posodo smo natehtali 25 g LB-gojišča in dodali do 1 L destilirano vodo. Raztopljeno gojišče smo nato odpipetirali v 30 mL erlenmajerice, jih zamašili in avtoklavirali. Nato smo pripravili trdno LB-gojišče, kjer smo v vsako od dveh 500 mL erlenmajeric natehtali po 12,5 g LB-gojišča in 7,5 g agarja ter dodali do 500 mL destilirane vode. Po avtoklaviranju smo 1 L pripravljenega trdnega gojišča razlili v Petrijeve plošče, počakali, da se gojišče strdi in plošče z gojiščem shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.4.3 Priprava fiziološke raztopine za redčenje po McFarlandu

Material:

- plastična merilna posoda,
- magnetno mešalo (IKA RCT Standard, Kitajska),
- NaCl (Merck, Nemčija),
- dH₂O,
- stojalo za epruvete,
- steklene epruvete (10 mL),
- zamaški za epruvete,

- pipeta,
- avtoklav (Kambič, Slovenija).

Za redčenje do 0,5 po McFarlandu smo potrebovali epruvete s 7 mL sterilne fiziološke raztopine. V plastično merilno posodo smo natehtali 9 g NaCl in dodali 1 L destilirane vode. Raztopino smo nato s pipeto odpipetirali v steklene epruvete, avtoklavirali in do uporabe shranili pri 4 °C.

3.4.4 Testiranje protibakterijske aktivnosti izvlečkov in eteričnih olj

Materiali:

- 0,5 standard po McFarlandu,
- fiziološka raztopina,
- LB gojišče,
- pipeta,
- nastavki za pipeto,
- gorilnik,
- vžigalnik,
- alkoholni flomaster,
- sterilne steklene kroglice za razmazovanje,
- sterilni papirnati diski za antibiogram (6 mm premera, Becton Dickinson, ZDA),
- pinceta,
- stojalo,
- rokavice,
- 70 % etanol (Merck, Nemčija),
- organski izvlečki japonskega dresnika (etanolni, metanolni, acetonski)
- vodni izvleček japonskega dresnika,
- eterično olje listov japonskega dresnika (28,5 mg),
- centrifuga (5417 R, Eppendorf AG, Nemčija),

- fotoaparat (Canon EOS 1000D, Canon, Japonska),
- dH₂O,
- 10 % dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma, Nemčija).

Prekonočno kulturo smo redčili v 7 mL fiziološke raztopine do gostote 0.5 po McFarlandu, nato pa 100 µL redčene kulture prenesli na LB-gojišče. Kulturo smo s steklenimi kroglicami enakomerno razmazali do suhega. Na gojišče s kulturo smo položili po pet papirnatih diskov premera 6 mm, na katere smo s pipeto nanесли po 4 µL izvlečka, bodisi vodnega, acetonskega, metanolnega ali etanolnega, ki smo jih pred tem centrifugirali 10 min pri 14 000 obr/min in uporabili le supernatant. Peti disk je služil kot kontrola, nanj smo nanесли 4 µL 70 % etanola, saj smo v njem raztapljali posušene organske izvlečke.

Posebej smo na plošči testirali aktivnost eteričnega olja listov in delovanje 10 % DMSO, ki je služil kot kontrola. 28,5 mg eteričnega olja smo redčili z 28,5 µL 10 % DMSO. 4 µL 50 % eteričnega olja in 10 % DMSO smo nanесли na papirnata diska. Plošče smo nato inkubirali 18-24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo plošče z bakterijskimi kulturami pregledali in fotografirali. Uporabljene plošče smo avtoklavirali in zavrgli. Fotografije smo obdelali z računalniškim programom ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Vsak tretma bakterij z izbranim izvlečkom smo pripravili v 2 ponovitvah, razen testiranj z EO, ker smo imeli premalo EO.

3.4.5 Uvajanje metode testiranja protibakterijske aktivnosti izvlečkov in eteričnih olj

Pri uvajanju metode smo testirali po Gramu pozitivne bakterijske vrste (proti meticilinu odporna *Staph. aureus* in *Staph. pseudintermedius*, *Staph. saprophyticus*, *Strep. pyogenes*, *Strep. canis*, *Strep. agalactiae*, *Paenibacillus* sp., *B. subtilis*) in po Gramu negativne vrste (*Ac. baumannii*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Raoultella*), ki smo jih pridobili na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Pri predpoizkusu za magistrsko nalogo smo uporabili enak material, ki je naštet v vseh podpoglavjih bakterije. Pri metodi, ki smo jo uporabili za testiranju delovanja izvlečka na bakterije smo pri uvajanju metode preizkusili nanos kapljic izvlečka na gojišče in difuzijski antibiogram po Kirby-Bauerju pri kateri smo na papirnate diske nanašali 5 μ L izvlečka. Ker se je redčen izvleček izlival iz diskov smo nato naprej v študiji uporabljali po 4 μ L testirane mešanice. Za nanos kapljic na gojišče pa se zaradi razlivanja za takšno metodo nismo odločili in smo uporabili metodo difuzijskega antibiograma po Kirby-Bauerju.

3.5 MERITEV RASTI PLESNI IN BAKTERIJSKIH KULTUR

Površino kulture plesni in velikost inhibicijske cone pri bakterijskih kulturah smo izmerili na fotografijah s programom ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Fotografije smo v programu umerili s pomočjo znanega premera Petrijeve plošče (85 mm). Vrednost negativne kontrole za bakterije je bila 6 mm (premer uporabljenega papirnatega diska) oziroma 0 mm, saj etanolna kontrola v nobenem primeru rasti bakterij ni zavirala.

Dobljene količine, ki prikazujejo delovanje izvlečkov na rast plesni in bakterijskih kultur, smo statistično ovrednotili in rezultate prikazali v obliki grafov.

3.6.1 Inhibicija rasti plesni

Izmerili smo površino tretirane kulture plesni ter kontrole in izračunali delež rasti v odvisnosti od uporabljenega izvlečka, ki smo jo izrazili kot delež rasti glede na kontrolo (enačba 1).

$$\text{Delež rasti (\%)} = \left(\frac{P_{\text{tretma}} - P_{\text{kontrola}}}{P_{\text{kontrola}}} \right) * 100 \quad \dots(1)$$

3.6.2 Cona inhibicije rasti bakterij

Iz izmerjenih premerov inhibicijskih con skupaj s papirnatim diskom smo izračunali debelino kolobarja, ki določa dejansko inhibicijsko cono. Premer papirnatega diska ($2r_{\text{disk}}$; 6 mm) smo odšteli od izmerjene cone inhibicije skupaj s papirnatim diskom ($2r_{\text{inh}}$) in delili z 2 (enačba 2).

$$\text{Cona inhibicije [mm]} = \frac{(2r_{\text{inh}} - 2r_{\text{disk}})}{2} \quad \dots(2)$$

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke o rasti plesni in bakterij smo uredili in statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel. Rezultate smo prikazali grafično in tabelarično kot povprečne vrednosti in standardne napake. Tretmaje smo med seboj primerjali s statističnima metodama t-test in ANOVA. Statistično značilne razlike so tiste, s p-vrednostjo manjšo od 0,05 ($p < 0,05$).

4 REZULTATI

V nalogi smo iz listov in korenin japonskega dresnika (*Fallopia japonica*) ekstrahirali vodne in organske izvlečke. Po ekstrakciji smo ugotavljali njihovo protibakterijsko in protiglivno aktivnost.

4.1 IZKORISTEK RASTLINSKEGA MATERIALA Z EKSTRAKCIJO

Izvlečke, pridobljene s 24-urno ekstrakcijo na stresalniku, smo prefiltrirali in do suhega izparevali na rotavaporju. Pridobljen posušen izvleček, ki se je zlahka odlepil iz stene bučke, smo stehali in izračunali izkoristek glede na začetno maso uporabljenega rastlinskega materiala, ki je znašala 50 g za liste in 25 g za korenike (pregl. 10).

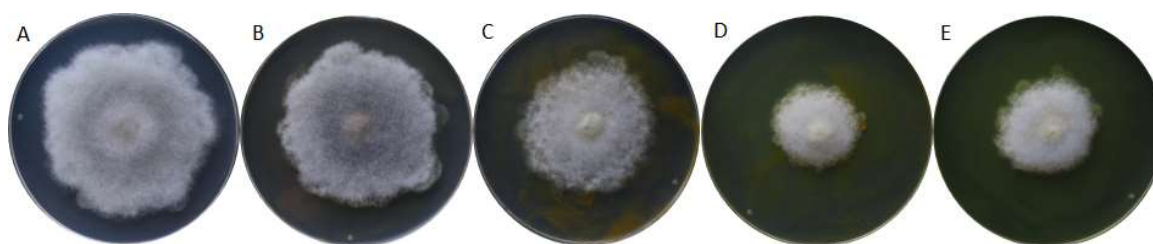
Preglednica 10: Masa in izkoristek pridobljenega izvlečka.

Vrsta izvlečka	Masa listnega izvlečka (g)	Masa koreninskega izvlečka (g)		
	Izkoristek (%)		Izkoristek (%)	
vodni	2,58	5,16	1,63	6,52
acetonski	4,88	9,76	3,56	14,24
metanolni	3,58	7,16	2,26	9,04
etanolni	2,40	4,80	2,01	8,04

Koncentracija izvlečkov, ki smo jih uporabili za nadaljnje tretmaje plesni in bakterijskih kultur, je bila **500 mg/mL**. Za slednjo koncentracijo smo se odločili, ker je bila to najvišja koncentracija pri kateri se je posušen izvleček lahko homogeno mešal v 70 % etanolu. Mešanica za nanos na gojišče in papirnate diske ni bila pregosta, ter smo jo lahko nanесли na gojišče ob enem pa je bila koncentracija zadostna, da smo lahko ugotovili aktivnost izvlečkov.

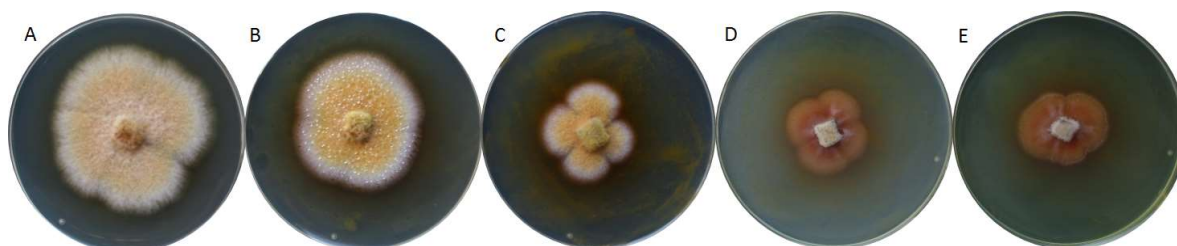
4.2 PROTIGLIVNA AKTIVNOST

Protiglivno aktivnost izvlečkov japonskega dresnika smo ocenili z merjenjem površine kolonije pri šestih vrstah plesni, ki so rastle v prisotnosti izvlečkov, ter vrednosti primerjali s kontrolo (tj. voda za vodne izvlečke, 70 % etanol za organske izvlečke) (sl. 8).



Slika 5: *Alternaria infectoria* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A – vodna kontrola, B - vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – etanolni izvleček, E – metanolni izvleček.

Ugotovili smo, da listni izvlečki niso zmanjšali rasti plesni, v nekaterih primerih so jo celo povečali (*Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium poae*, *Penicillium palitans*). Večjo protiglivno aktivnost so imeli organski koreninski izvlečki, ki so zavrli rast plesni *Alternaria infectoria*, *Epicoccum nigrum* in *Fusarium poae* (primer na sl. 5, 6 in 7). Na rast plesni *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* in *Penicillium palitans* so koreninski izvlečki delovali slabše oziroma na rast skoraj niso vplivali, saj je bila velikost kolonij podobna kot pri kontrolnih vzorcih. *Aspergillus flavus* je v vseh primerih ob različnih tretmajih pokazal zelo majhno občutljivost v primerjavi s kontrolo, z izjemo vodnega listnega izvlečka, kjer sumimo, da je prišlo do napake pri poizkusu in je bil morda vodni izvleček okužen.

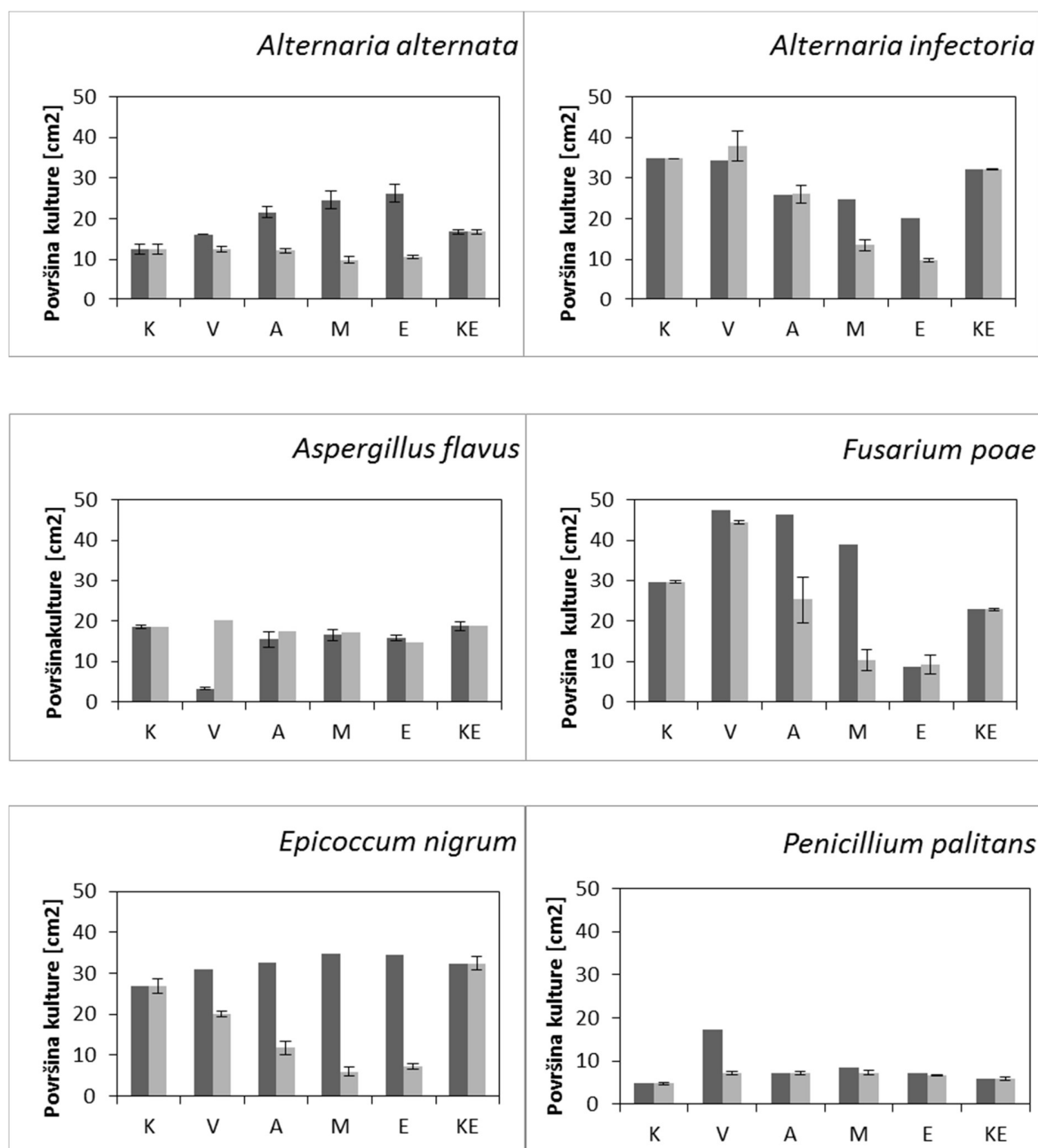


Slika 6: *Epicoccum nigrum* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A – vodna kontrola, B - vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – etanolni izvleček, E – metanolni izvleček.

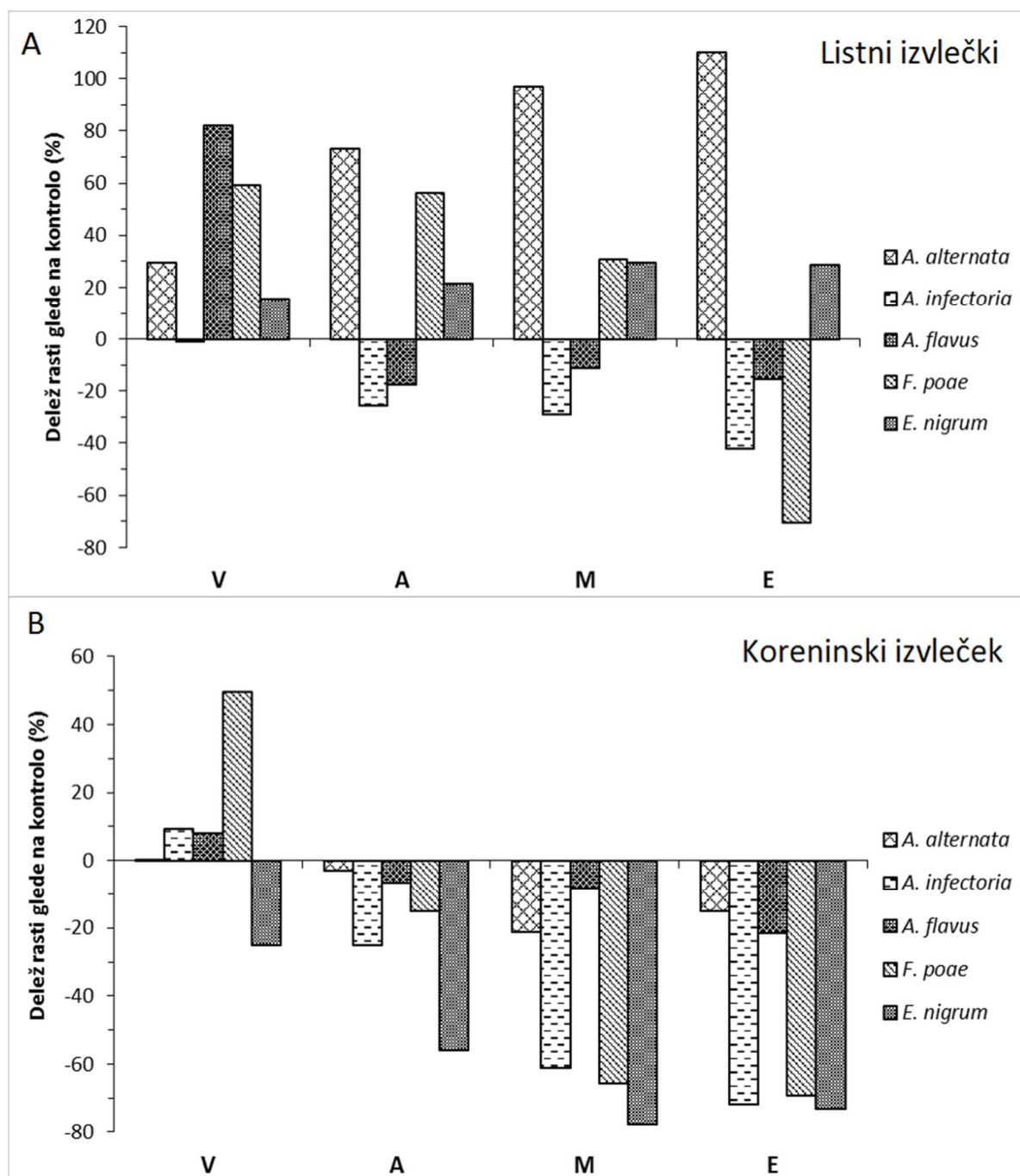
Najbolj učinkovito protiglivo delovanje sta pokazala alkoholna izvlečka, ki sta najbolj zavirala rast tistih plesni, ki so bile predhodno izolirane iz semena pšenice. Etanolni in metanolni koreninski izvleček sta pri vrstah *Alternaria infectoria*, *Epicoccum nigrum* in *Fusarium poae* povzročila 60-80 % zavrtje rasti. Pri vrsti *Alternaria alternata* pa je metanolni koreninski izvleček povzročil 20 % zavrtje rasti, etanolni pa 18 %. V primeru vrste *Aspergillus flavus* je najbolj zaviralno deloval etanolni koreninski izvleček in povzročil za 20 % manjšo rast plesni (sl. 9). Kontrolni poizkusi s 70 % etanolom kažejo, da etanol sam ni imel protiglivnega učinka (sl. 8).



Slika 7: *Fusarium poae* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A – kontrola, B - vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – etanolni izvleček, E – metanolni izvleček.



Slika 8: Rast plesni v prisotnosti vodnih in organskih izvlečkov japonskega dresnika. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka površine plesni po tretiranju z listnimi (■) in koreninskimi (■) izvlečki. Oznake: K – kontrola voda, V – vodni izvleček, A – acetonski izvleček, M – metanolni izvleček, E – etanolni izvleček, KE – kontrola etanol.

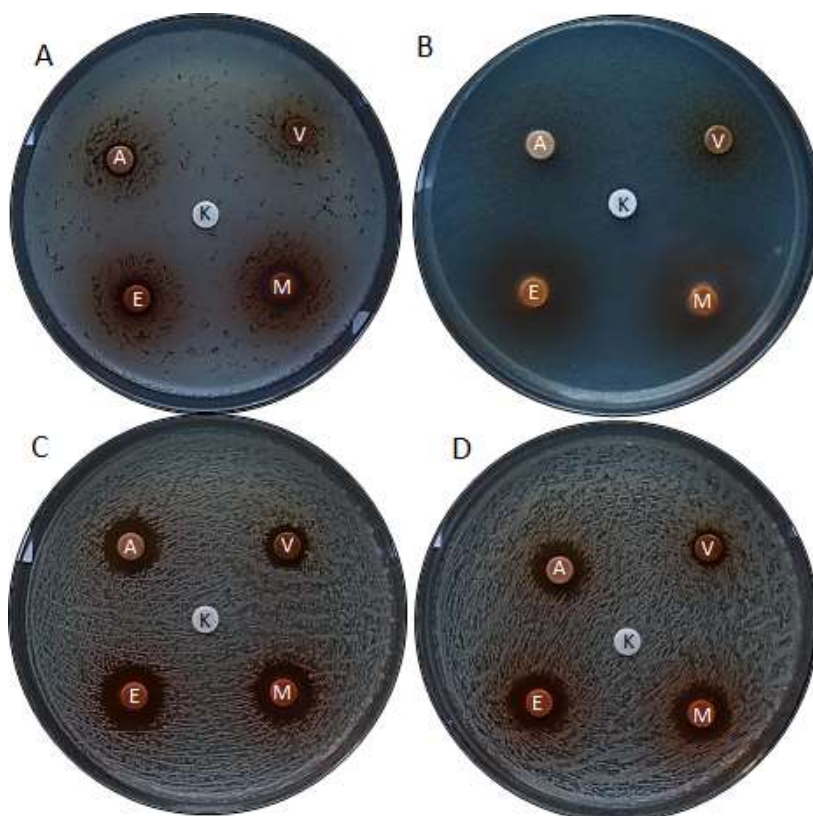


Slika 9: Primerjava deleža rasti (formula 1) plesni glede na dodan listni izvleček (A) in koreninske izvlečke (B). Oznake: V - vodni izvleček, A - acetonski izvleček, M - metanolni izvleček, E - etanolni izvleček, *A. alternata* – *Alternaria alternata*, *A. infectoria* – *Alternaria infectoria*, *A. flavus* – *Aspergillus flavus*, *F. poae* – *Fusarium poae*, *E. nigrum* – *Epicoccum nigrum*, *P. palitans* – *Penicillium palitans*.

4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Protibakterijsko aktivnost izvlečkov japonskega dresnika smo ocenili z merjenjem inhibicijske cone rasti v gojišču (sl. 12). Z metodo difuzijskega antibiograma smo preverjali delovanje japonskega dresnika na 8 vrst bakterij, ki so rastle v prisotnosti listnih in koreninskih izvlečkov (primer na sl. 10 in 11). Bakterije smo poleg tega tretirali tudi z eteričnim oljem listov (sl. 13). Kontrolni tretma, 70 % etanol, na bakterije ni imel učinka, zato je bila vrednost negativne kontrole za vsako bakterijo enaka, in sicer 0 mm cona inhibicije.

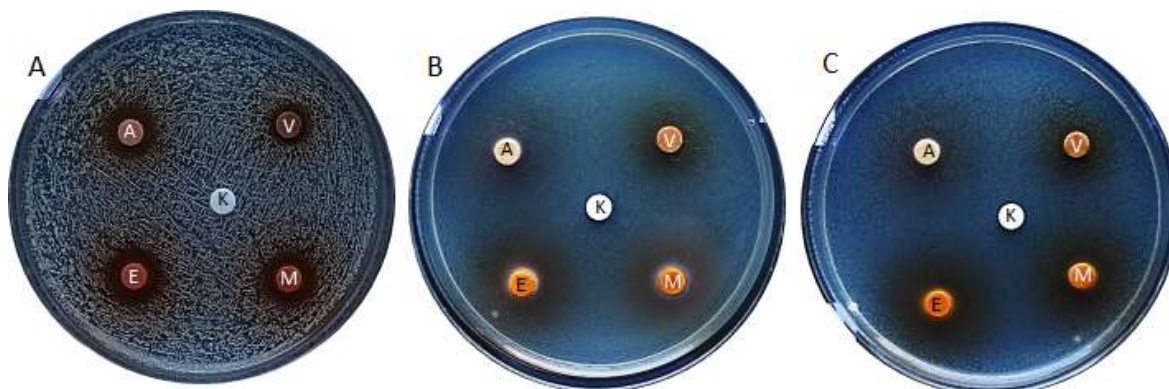
Vse izbrane po Gramu pozitivne bakterije so bile občutljive tako na izvlečke kot na eterično olje japonskega dresnika. Na splošno je bila protibakterijska učinkovitost najmanjša pri vodnih izvlečkih, največja pa pri etanolnih (sl. 14).



Slika 10: Inhibicija bakterijske rasti (A: *B. subtilis*, B: *Paenibacillus*, C: MRSP, D: MRSA) ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: V - vodni izvleček, A – acetonski izvleček, M – metanolni izvleček, E – etanolni izvleček, K – kontrola (etanol).

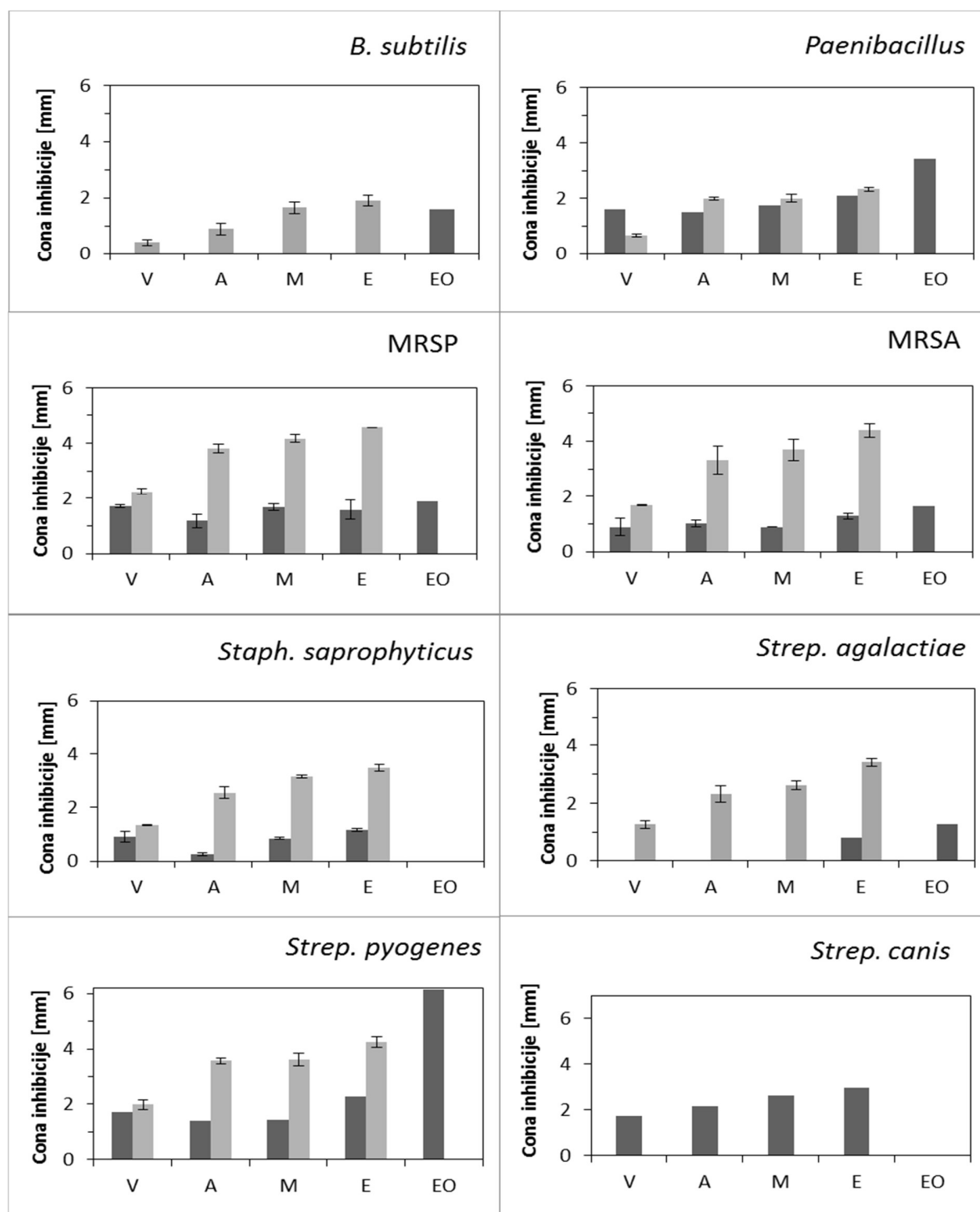
B. subtilis ni pokazal občutljivosti za listne izvlečke, izmerili pa smo cone inhibicije pri tretmajih s koreninskimi izvlečki, izmed katerih se je za najučinkovitejšega izkazal etanolni (sl. 10A). V podobnem obsegu je zavrlo rast bacilusa tudi EO. Rast vrste *Paenibacillus* sp. je najbolj zavrlo EO ter etanolni koreninski in listni izvleček (sl. 10B). MRSA in MRSP sta pokazala občutljivost za vse vrste izvlečkov, še posebno za etanolni koreninski izvleček. Velikost inhibicijske cone v prisotnosti etanolnega koreninskega izvlečka je bila 4,57 mm za MRSP in 4,39 mm za MRSA (sl. 10C in D).

EO je, v nasprotju z našimi pričakovanji, rast bakterij MRSA, MRSP, *Strep. agalactiae*, *B. subtilis* zaviralo več kot 60 % slabše kot etanolni koreninski izvleček. *Staph. saprophyticus* je pokazal visoko občutljivost za etanolni koreninski izvleček (sl. 11A) in veliko slabšo občutljivost za vse listne izvlečke. Bakterija ni pokazala občutljivosti za eterično olje, vendar bi bilo zaradi morebitne napake pri delu poskus potrebno ponoviti.



Slika 11: Inhibicija bakterijske rasti (A: *Staph. saprophyticus*, B: *Strep. agalactiae*, C: *Strep. pyogenes*) v prisotnosti različnih koreninskih izvlečkov. Oznake: V - vodni izvleček, A – acetonski izvleček, M – metanolni izvleček, E – etanolni izvleček, K – etanol.

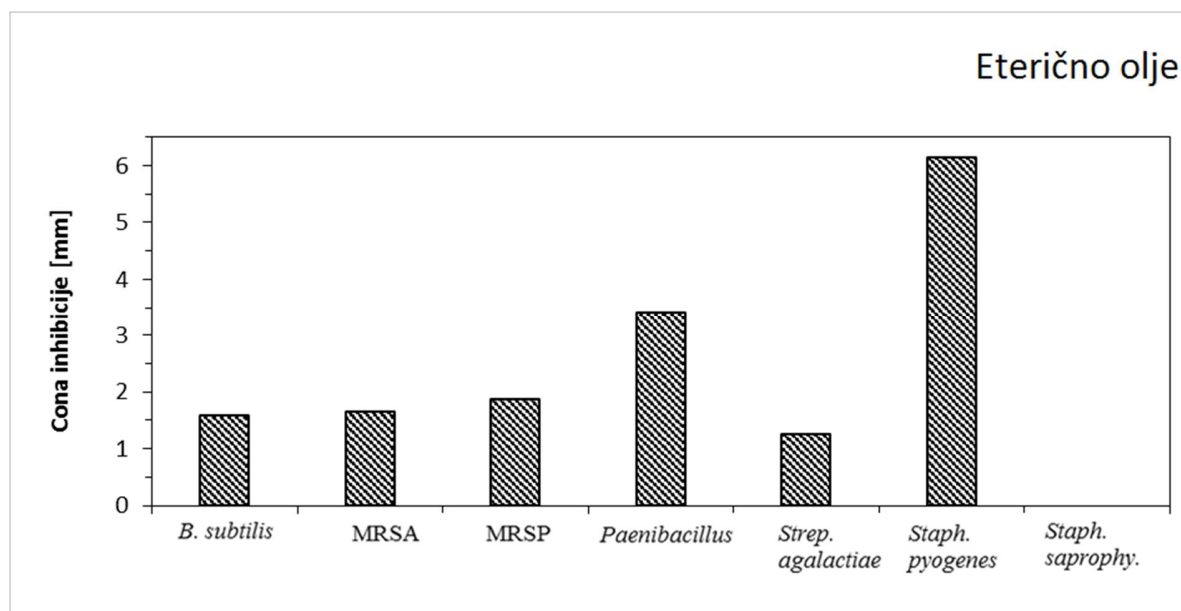
Vrsta *Strep. agalactiae* je pokazala občutljivost le na etanolni listni izvleček in EO, izmed koreninskih izvlečkov pa so rast zavirali vsi izvlečki, najmočnejše etanolni (sl. 11B). Zelo dobro je EO delovalo tudi proti *Strep. pyogenes*, saj smo izmerili inhibicijsko cono veliko 6 mm, kar je bila največja inhibicijska cona v našem poizkusu. Poleg EO so rast *Strep. pyogenes* dobro zavirali tudi vsi ostali izvlečki, najbolj koreninski etanolni izvleček (sl. 11C).



Slika 12: Cone inhibicije bakterij v prisotnosti izvlečkov in eteričnega olja japonskega dresnika. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka izmerjene cone inhibicije po tretiranju z listnimi (■) in koreninskimi (■) izvlečki. Oznake: V - vodni izvleček, A - acetonski izvleček, M - metanolni izvleček, E - etanolni izvleček, EO – eterično olje.

Listni izvlečki so zaviralno delovali na vrsto *Strep. canis*, najbolj etanolni. Podatkov ali koreninski izvlečki in EO inhibirajo rast *Strep. canis* žal nimamo, saj bakterija na gojišču ni zrasla in bi bilo potrebno poizkus ponoviti. Predpostavljamo, da bi glede na opazen trend rezultatov z listnimi izvlečki tudi koreninski izvlečki in EO najverjetneje inhibirali rast vrste *Strep. canis*.

Tretmaji z eteričnim oljem so prav tako pokazali občutljivost izbranih bakterij. Največjo protibakterijsko aktivnost je EO imelo proti *Strep. pyogenes*, manjši je bil vpliv na *Paenibacillus*, MRSP, MRSA, *Strep. agalactiae* in *B. subtilis* (sl. 13).



Slika 13: Delovanje eteričnega olja iz listov japonskega dresnika proti izbranim bakterijam.

Iz rezultatov je razvidno, da proti bakterijam večinoma delujejo tako listni kot koreninski izvlečki. Vendar pa so koreninski izvlečki bolj zavrli rast. Z rezultati parnih primerjav velikosti con inhibicij (pregl. 11 in 12) smo ugotovili, da so razlike med acetonskimi, metanolnimi in etanolnimi izvlečki korenin in listov statistično značilne, medtem, ko razlike med vodnimi izvlečki korenin in listov niso bile značilne. Glede na polarnost topila se je, tako pri listnih kot pri koreninskih izvlečkih, za najbolj učinkovitega izkazal etanolni izvleček,

sledijo metanolni, acetonski in najmanj učinkovit, vodni izvleček. Rezultati t-testa so pokazali, da sicer prihaja do statistično značilnih razlik v primeru listnih izvlečkov le med kontrolo in različno vrsto izvlečka, ne prihaja pa do značilnih razlik v vplivu različnih izvlečkov. Vsi listni izvlečki podobno zavirajo rast bakterij. V primeru koreninskih izvlečkov so značilne razlike tako med kontrolo in vrstami izvlečkov kot tudi med vodnim in organskimi izvlečki. Med tremi organskimi koreninskimi izvlečki, kljub temu, da je na grafu opaziti boljše protibakterijsko delovanje etanolnega izvlečka, statistično značilnih razlik ni.

Preglednica 11: Primerjava delovanja vodnih in organskih listnih izvlečkov na različne bakterije. Prikazane so vrednosti p, izračunane s t-testom za parno primerjavo med tretmaji.

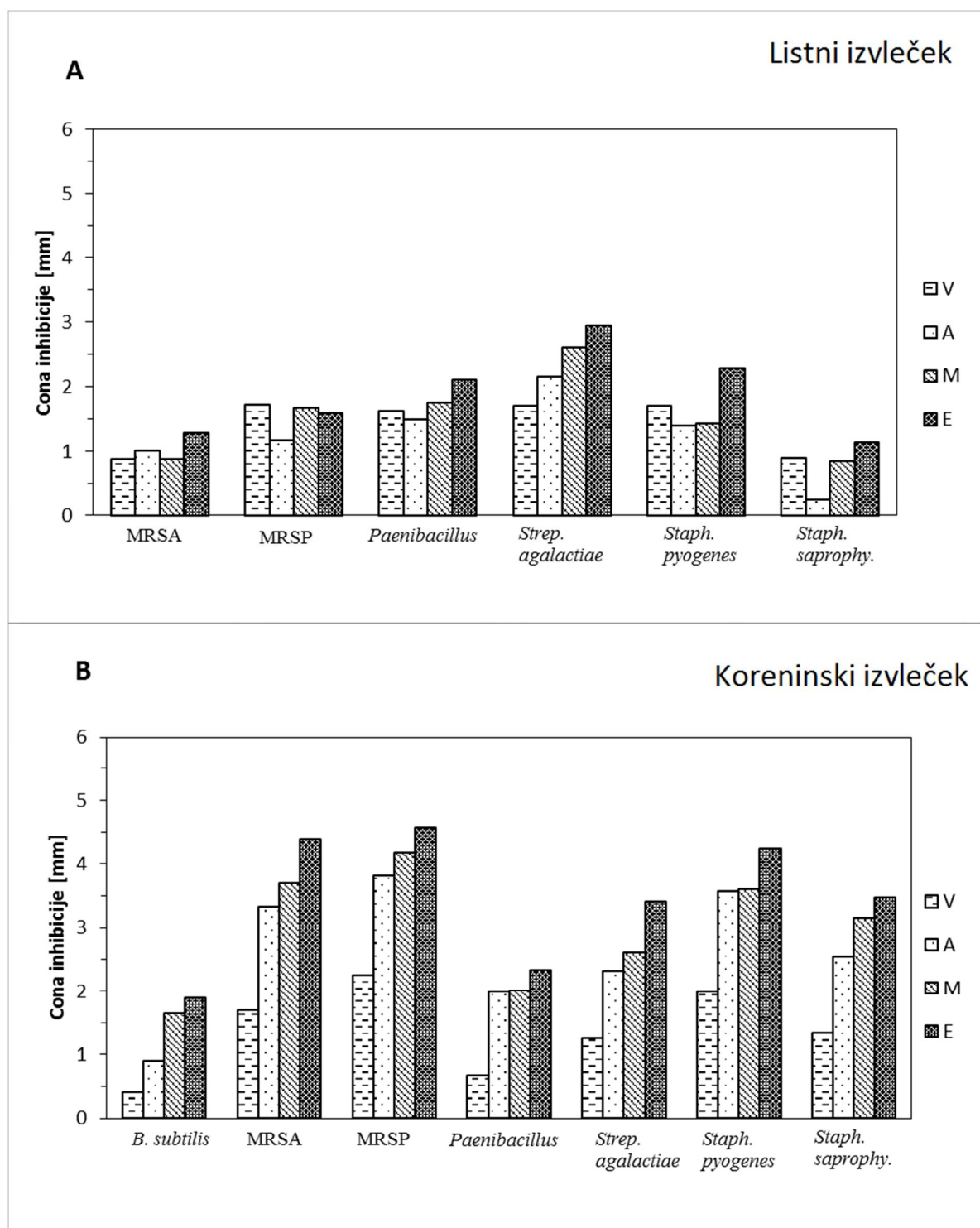
		Listni izvleček				
		Kontrola	Vodni	Acetonski	Metanolni	Etanolni
Listni izvleček	Kontrola	/	<0,001	0,001	0,001	0,001
	Vodni	<0,001	/	0,692	0,818	0,490
	Acetonski	0,001	0,692	/	0,570	0,322
	Metanolni	0,001	0,818	0,570	/	0,662
	Etanolni	<0,001	0,490	0,322	0,662	/

Op: Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) so poudarjene.

Preglednica 12: Primerjava delovanja vodnih in organskih koreninskih izvlečkov na različne bakterije. Prikazane so vrednosti p, izračunane s t-testom za parno primerjavo med tretmaji.

		Koreninski izvleček				
		Kontrola	Vodni	Acetonski	Metanolni	Etanolni
Koreninski izvl.	Kontrola	/	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Vodni	<0,001	/	0,018	0,003	0,001
	Acetonski	<0,001	0,018	/	0,516	0,154
	Metanolni	<0,001	0,003	0,516	/	0,373
	Etanolni	<0,001	0,001	0,154	0,373	/

Op: Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) so poudarjene.



Slika 14: Primerjava cone inhibicije za bakterije glede na vrsto rastlinskega izvlečka: listni izvlečki (A); koreninski izvlečki (B). Oznake: V - vodni izvleček, A - acetonski izvleček, M - metanolni izvleček, E - etanolni izvleček

5 RAZPRAVA

Rastline so znane kot bogat vir različnih sekundarnih metabolitov (Bhalodia in Shukla, 2011) ter so bile že pred uporabo antibiotikov in sintetičnih protimikrobnih snovi pomemben vir protimikrobnih učinkovin, naravnih snovi z dokazano protimikrobno učinkovitostjo (Gibbons, 2008). Antibiotiki so eden izmed pomembnejših načinov boja proti bakterijam in so opazno pripomogli k izboljšanju zdravljenja bakterijskih infekcij, vendar pa je njihova prekomerna uporaba doprinesla k povečani odpornosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem. Zaradi tega je zelo pomembno odkrivanje novih učinkovin, ki ne bi povzročale odpornosti pri bakterijah (Bhalodia in Shukla, 2011). Naravni produkti imajo že od nekdaj pomembno vlogo pri zdravljenju in preventivi človeških bolezni. Ocene kažejo, da 50 % vseh drog v klinični uporabi vsebuje učinkovine rastlinskega izvora. Po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) 80 % ljudi iz držav v razvoju še vedno uporablja le tradicionalno zdravilstvo in 85 % od tega predstavlja uporabo rastlinskih izvlečkov (Owk in sod., 2015).

Japonski dresnik je v Evropi in Severni Ameriki tujerodna rastlina, uvrščena med 100 najbolj invazivnih rastlin sveta, ki povzroča gospodarsko škodo ter negativno vpliva na biotsko pestrost in se razrašča tudi v Sloveniji (Frajman, 2008). Številne študije izvlečkom japonskega dresnika pripisujejo protivirusno, protimikrobno, protivnetno, estrogeno, nevroprotektivno in kardioprotektivno aktivnost (Zhang in sod., 2013). Ker ima rastlina glede na študije nekatere pozitivne lastnosti za človeka ter se hitro razširja, kar pomeni veliko biomase, smo se odločili, da preučimo potencial tkiv japonskega dresnika za uporabo proti različnim bakterijskim in glivnim mikrobom. Izvlečke bi lahko potencialno uporabili pri konzerviranju živil, kot nadomestek antibiotikov za zdravljenja okužb pri živalih in ljudeh ter za pripravo fitofarmacevtskih sredstev. S tem namenom smo želeli ugotoviti specifično protiglivno in protibakterijsko aktivnost listnih in koreninskih izvlečkov japonskega dresnika. Ker so protimikrobne učinkovine lahko tako polarne kot nepolarne, smo izvlečke pripravili z različnimi topili.

Kot modelne plesni smo vzeli vrste: *Penicillium palitans*, *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum*. Slednjih pet so na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin izolirali iz semena pšenice. Za uporabo zgoraj naštetih plesni smo se odločili, ker gre za vrste, ki s svojim pojavljanjem in produkcijo mikotoksinov predstavljajo veliko skrb za zdravje človeka in živali. Poleg tega nekatere povzročajo slabši razvoj semen in posledično slabši donos ter zaslužek kmetov. Zanimivo je, da so listni izvlečki v poizkusu rast nekaterih plesni spodbudili ali pa na plesni niso imeli vpliva. Bujnejša rast plesni bi lahko bila posledica prisotnih rastlinskih hormonov v listnem izvlečku. Znano je, da avksin spodbuja tudi rast mikroorganizmov in prav tako kot pri rastlinah vpliva na podaljšanje glivne celice (Wang in sod., 2010). Protiglivno aktivnost smo dokazali koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. V literaturi gre zaslediti, da koreninski izvlečki japonskega dresnika delujejo protiglivno, kar lahko potrdimo, vendar pa vrste *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Fonsecaea pedrosi* in *Candida albicans* v literaturi (Peng in sod., 2013) niso bile enake kot v našem poizkusu.

Kot modelne bakterije smo izbrali nekatere po Gramu pozitivne povzročitelje pomembnejših bolezni ter bakterije, ki so prisotne v živilski industriji: Proti metilcinu odporni *Staph. aureus* in *Staph. pseudintermedius*, *Staph. saprophyticus*, *Strep. pyogenes*, *Strep. canis*, *Strep. agalactiae*, *Paenibacillus* sp. in *B. subtilis*. V preliminarinih poizkusih smo delovanje izvlečkov testirali tudi na po Gramu negativnih bakterijah: *Ac. baumannii*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Raoultella*, ki pa ob enkratnem poskusu niso pokazale občutljivosti za nobeno vrsto izvlečka in jih zato nismo vključili v nalogo ter smo pozornost posvetili izbranim, po Gramu pozitivnim bakterijam. Po Gramu negativne bakterije so manj občutljive za protimikrobna sredstva, vstop v celico namreč otežuje kompleksna celična stena z lipopolisaharidno zunanjo membrano, ki je po Gramu pozitivne bakterije nimajo (Moreno in sod., 2006).

Iz različnih študij je znano, da je za ekstrakcijo biološko aktivnih spojin smiselno uporabiti predvsem metanol, etanol in mešanico vode ter etanola. Gre za polarna topila, ki v rastlinskem

materialu raztapljajo polarne molekule (Sasidharan in sod, 2011; Tomsone in sod., 2012). Mednje sodijo tudi fenolne spojine, ki imajo znano antioksidativno, protivnetno in protimikrobno delovanje (Häkkinen, 2000) in se najbolje raztapljajo v metanolu in etanolu (Sultana et. al., 2009) ter vodno etanolni mešanici (Chew in sod., 2011). Za ekstrakcijo biološko aktivnih snovi iz tkiv japonskega dresnika smo izbrali vodo, aceton, metanol in etanol. Gre za različno polarna topila, katerih polarnost pada v sledečem zaporedju: voda > etanol > metanol > aceton. Ker so fitokemične analize japonskega dresnika pokazale veliko vsebnost fenolnih spojin (Zhang in sod., 2013), ki so polarne narave, je smiselno, da se je etanolni izvleček pokazal za biološko najbolj aktivnega.

Glede na objavljeno študijo Wang in sodelavcev (2007), ki so uporabili koreninski vodni izvleček japonskega dresnika ekvivalenten 1 g/mL neobdelane rastlinske droge, lahko glede na naše študije potrdimo, da ima vodni izvleček rastline protibakterijske učinke proti vrstam *Staphylococcus aureus* in β -hemolitičnim streptokokom. Inhibicijske cone so bile v njihovi študiji povprečno velike okoli 10 mm (Wang in sod., 2007) v naši študiji pa 3 mm. V preliminarini študijah, za razliko od zgoraj omenjene raziskave, nismo ugotovili protibakterijske učinkovitosti kateregakoli izvlečka proti vrstam *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. Metoda uporabljena v preliminarni študiji je enaka opisani v magistrski nalogi. Ker izvlečki in EO japonskega dresnika rasti po Gramu negativnih bakterij niso zavrli in je bil rezultat 0 mm, v nadaljnjo študijo po Gramu negativnih bakterij nismo vključili.

Iz študije Shana in sod. (2008) je razvidno, da metanolni izvleček s koncentracijo 100 mg/mL močnejše zavira rast vrste *Staphylococcus aureus* kot vodni, kar smo ugotovili tudi v našem poskusu, saj so bile inhibicijske cone velike 20,2 mm. Pai-Wei in sod. (2015) so z difuzijskim antibiogram po Kirby-Bauerju potrdili, da etanolni izvleček s koncentracijo 100 mg/mL zavira rast bakterij *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii*. V naši raziskavi inhibitornega učinka izvlečkov japonskega dresnika za slednji dve po Gramu negativni bakteriji v preliminarini poskusih nismo potrdili. Do razlik v delovanju rastlinskih izvlečkov proti določenim bakterijam med študijami verjetno prihaja zaradi različnih metod

pridobivanja izvlečkov, različnih topil, različnih koncentracij in količin ekstrakcijskih mešanic, uporabljenih pri difuzijskem antibiogramu po Kirby-Bauerju in drugimi vrstami antibiograma.

Tretmaji z eteričnim oljem so prav tako pokazali občutljivost vseh bakterij. Močno protibakterijsko aktivnost je EO imelo proti *Strep. pyogenes*, manjšo pa proti sevom vrst *Paenibacillus*, MRSP, MRSA, *Strep. agalactiae* in *B. subtilis*. Delovanje EO je drugačno od alkoholnih izvlečkov, saj EO vsebujejo predvsem nepolarne snovi, medtem ko izvlečki vsebujejo polarne snovi in jih zato med seboj ne moremo primerjati.

Glede na rezultate, ki smo jih dobili v naši raziskavi, bi bilo smiselno poizkuse v prihodnje ponoviti predvsem z izvlečki iz korenike japonskega dresnika. Glede na študiji Roglja (2015) in Štalcarjeve (2015) pa bi bila smiselna tudi priprava EO in izvlečkov iz socvetij ter testiranje njihove protimikrobne aktivnosti. Predlagamo, da bi pri pripravi izvlečkov dodali topilo iz mešanice etanola in vode, saj bi pridobili še večji nabor različnih sekundarnih metabolitov, ki delujejo protimikrobno, poleg tega pa bi bila takšna mešanica potencialno uporabna tudi za klinične študije (Chew in sod., 2011). Priporočljivo bi bilo tudi daljše stresanje ekstrakcijskih mešanic in dodatek nepolarnih topil (Sasidharan in sod., 2010). Pri testiranju tako protiglivne kot protibakterijske aktivnosti bi lahko spore plesni in bakterijsko kulturo resuspendirali v na 40 °C ohlajeno gojišče in gojišče vlili v Petrijeve plošče, počakali, da se gojišče strdi, nanесли papirnate diske in na njih odpipetirali izvlečke. S tem bi pridobili enakomerno rast kultur in meritve bi bile enostavnejše in bolj natančne. Predlagamo tudi posebno pozornost pri raztapljanju eteričnega olja, saj je le to v vodi netopno in smo zato kot topilo uporabili 10 % DMSO.

Glede na protiglivno in protibakterijsko učinkovitost koreninskih izvlečkov in eteričnih olj dokazanih v študiji bi lahko izvlečke uporabili kot potencialno fitofarmacevtsko sredstvo. Semena, okužena s plesnimi *Alternaria alternata*, *Fusarium poae* in *Epicoccum nigrum*, bi lahko tretirali z izvlečki korenika, ki bi s svojim protiglivno aktivnostjo delovali kot fungicidi. Ob tem bi bile potrebne tudi dodatne študije, s katerimi bi preverili kako izvlečki japonskega

dresnika vplivajo na viabilnost in kalivost semen tretirane rastline. Velik potencial kot farmacevtsko sredstvo ima glede na svoje protibakterijske lastnosti predvsem koreninski izvleček in eterično olje. Iz preteklih študij je znano, da izvlečki japonskega dresnika ne delujejo toksično na živali, poleg tega pa je dobro znana tudi uporaba japonskega dresnika v tradicionalni kitajski medicini (Peng in sod., 2013). Glede na omenjena, znana dejstva in dobljene rezultate o protibakterijskem delovanju izvlečkov v naši študiji bi bila smiselna klinična študija uporabe izvlečkov.

6 SKLEPI

- Listni izvlečki japonskega dresnika spodbujajo rast plesni vrst *Alternaria alternata*, *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium palitans*.
- Vodni koreninski izvleček japonskega dresnika spodbuja rast testiranih plesni vrst *Alternaria infectoria*, *Fusarium poae* oz. ne učinkuje na *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* in *Penicillium palitans*.
- Organski (acetonski, metanolni in etanolni) koreninski izvlečki dobro zavirajo rast plesni vrst *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum* in *Alternaria infectoria*.
- Koreninski izvlečki zavirajo rast plesni *Alternaria infectoria*, *Fusarium poae* in *Epicoccum nigrum*.
- Organski in vodni koreninski izvlečki japonskega dresnika ne učinkujejo na plesni vrst *Aspergillus flavus* in *Penicillium palitans*.
- Koreninski izvlečki zavirajo rast bakterij bolje kot listni izvlečki, vendar oba zavirata rast večine bakterij.
- Acetonski, metanolni in etanolni koreninski izvlečki bolj zavirajo rast bakterijskih sevov MRSP, MRSA, *Strep. pyogenes*, *Strep. agalactiae* kot vodni koreninski izvleček in listni izvlečki.
- Koreninski izvlečki imajo boljšo protiglivo in protibakterijsko aktivnost kot listni.
- Učinkovitost topil za ekstrakcijo protimikrobnih snovi iz tkiv dresnika pada v sledečem zaporedju: absolutni etanol > absolutni metanol > aceton > voda.
- Eterična olja zavirajo rast po Gramu pozitivnih bakterij. Veliko protibakterijsko aktivnost je EO imelo proti *Strep. pyogenes*, manjšo pa proti *Paenibacillus*, MRSP, MRSA, *Strep. agalactiae* in *B. subtilis*.

7 POVZETEK

Globalizacija trgovine in potovanj se odraža v razširjanju tujerodnih vrst po vsem svetu. Japonski dresnik (*Fallopia japonica*), ki je geofitna trajnica z močno koreniko (Barney in sod., 2006) in izvira iz vzhodne Azije (Peng in sod., 2013), je tujerodna vrsta, ki je uvrščena med 100 najbolj invazivnih rastlin sveta. Ta invazivna rastlina se je dobro prilagodila na dane razmere v okolju in ima negativen vpliv na okolje in gospodarstvo. Poleg škodljivih vplivov pa številne študije izvlečkom japonskega dresnika pripisujejo protivirusno, protimikrobno, protivnetno, estrogeno, nevroprotektivno in kardioprotektivno aktivnost (Zhang in sod., 2013). Rastline so znane kot vir različnih sekundarnih metabolitov (Bhalodia in Shukla, 2011), ki delujejo tudi protimikrobno (Gibbons, 2008). Njihovo odkrivanje in preučevanje je zelo pomembno, saj je prekomerna uporaba antibiotikov privedla do prevelike odpornosti bakterij, ki bi se z odkritjem novih protimikrobnih učinkovin lahko zmanjšala (Bhalodia in Shukla, 2011).

Glede na veliko biomaso japonskega dresnika in probleme, ki jih kot invazivka povzroča v okolju, in na znano uporabo v tradicionalni kitajski medicini, je bil namen magistrske naloge pripraviti izvlečke listov in korenin japonskega dresnika ter določiti njihovo protibakterijsko in protiglivno učinkovitost. Izvlečke bi potencialno lahko uporabili pri konzerviranju živil, kot nadomestek antibiotikov za zdravljenja okužb pri živalih in ljudeh ter za pripravo fitofarmacevtskih sredstev.

Nabrane liste in korenike smo posušili in zmleli v mlinčku. Zmlet rastlinski material smo namočili v destilirani vodi, absolutnem acetonu, metanolu ter etanolu. Izvlečke smo po 24 urnem stresanju prefiltrirali pod pritiskom in filtrat do suhega posušili na rotavaporju. Pridobljen posušen izvleček smo za protiglivne in protibakterijske teste raztapljali v 70 % etanolu, katera je bila tudi naša kontrola. Za testiranje protiglivne učinkovitosti smo izvleček, raztopljen v 70 % etanolu, razmazali po površini PDA-gojišča in nacepili posamezne plesni. Po enem tednu smo izmerili površino rasti kulture plesni, ki smo jo za vrednotenje rezultatov primerjali s kontrolnim tretmajem. Protibakterijsko učinkovitost smo dokazovali s pomočjo

difuzijskega antibiogram po Kirby-Bauerju, kjer smo na ploščo z nacepljeno bakterijsko kulturo namestili papirnate diske, na katere smo nanесли testiran izvleček oz. eterično olje.

Protimikrobna učinkovitost je odvisna od vrste tkiva dresnika, uporabljenega ekstrakcijskega topila in občutljivosti mikroorganizma. Korenike so v primerjavi z listi boljši vir protimikrobnih snovi, saj smo dokazali, da so imeli koreninski izvlečki večjo aktivnost kot listni. Etanol in metanol pa sta se v poizkusu izkazala kot najboljši topila za ekstrakcijo protimikrobno aktivnih sekundarnih metabolitov. Listni izvlečki so spodbudili rast plesni *Alternaria alternata*, *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium palitans* in zavrli rast plesni *Alternaria infectoria* in *Aspergillus flavus*. Vodni koreninski izvleček je večinoma spodbujal rast testiranih plesni. Acetonski, metanolni in etanolni koreninski izvleček so zavrli rast plesni *Alternaria alternata*, *Fusarium poae*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria infectoria* in *Aspergillus flavus*, predvsem pa sta veliko protiglivno učinkovitost pokazala metanolni in etanolni koreninski izvleček, saj sta močno zavrla rast plesni *Alternaria alternata*, *Fusarium poae* in *Epicoccum nigrum*. Listni in koreninski izvlečki učinka na plesen *Penicillium palitans* niso imeli.

Rast bakterij so zavrli tako koreninski kot listni izvlečki. V primerjavi s plesnimi smo dokazali večjo občutljivost bakterij za izvlečke japonskega dresnika. Za najaktivnejše so se izkazali koreninski izvlečki, izmed katerih sta najbolj delovala etanolni in metanolni izvleček, sledi pa jima acetonski. Acetonski, metanolni in etanolni koreninski izvlečki so močno zavrli tudi rast odpornih oz. problematičnih bakterijskih sevov MRSP, MRSA, *Strep. pyogenes*, *Strep. agalactiae*. Nekoliko manj so izvlečki zavirali rast *B. subtilis*, *Paenibacillus*, *Staph. saprophyticus* in *Strep. canis*. Eterično olje je prav tako dobro zaviralo rast bakterij. Veliko protibakterijsko aktivnost je EO imelo proti *Strep. pyogenes*, manj pa proti *Paenibacillus*, MRSP, MRSA, *Strep. agalactiae* in *B. subtilis*.

Rezultati naše preiskave so pokazali protiglivno in protibakterijsko delovanje japonskega dresnika. Japonski dresnik torej ni le rastlina, ki v okolju povzroča težave, ampak predstavlja

tudi pomemben vir številnih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, ki imajo dobro protimikrobno delovanje.

8 VIRI

- Andersen B., Krøger E., Roberts, R.G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *Alternaria infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, 106, 2: 170–182
- Ash C., Priest F. G., Collins M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64: 253–260
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475
- Bannoehr J., Guardabassi L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: Taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, 23, 4: 253-266
- Barney J.N., Tharayil N., DiTommaso A., Bhowmik P.C. 2006. The biology of invasive alien plants in Canada. [= *Fallopia japonica* (Houtt .) Ronse Decr .]. *Canadian Journal of Plant Science*, 14853: 887–905
- Beerling D. J., Bailey P. J., Conolly P.A. 1994. *Fallopia Japonica* (Houtt.) Ronse Decraene. *Journal of Ecology*, 82, 4: 959-979
- Bennett J.W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3: 497–516
- Bessen D.E., McShan M. W., Nguyen S. V., Shetty A., Agrawal S. 2014. Molecular epidemiology and genomics of group A *Streptococcus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 33:393–418
- Bhalodia N., Shukla V. 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2, 2: 104-109

- Bond W., Davies G., Turner R. 2007. The biology and non-chemical control of Japanese knotweed (*Fallopia japonica* (Houtt)). Coventry, Henry Doubleday Research Association: 5 str.
<http://www.gardenorganic.org.uk/organicweeds> (junij, 2015).
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2001. The staphylococci. V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 22nd ed. Foltin J., Ransom J., Lebowitz H., Holton B. (eds.). New York, The McGraw-Hill Companies, Inc.: 197-202
- Brzonkalik K., Herrling T., Sylatk C., Neumann A. 2011. Process development for the elucidation of mycotoxin formation in *Alternaria alternata*. AMB Express, 1, 1: 1-9
- Chew K.K., Khoo M. Z., Ng S. Y., Thoo Y. Y., Wan Aida W. M., Ho C. W. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. International Food Research Journal, 18:4: 1427–1435
- Child L., Wade P.M. 2000. The Japanese knotweed manual: The management and control of an invasive alien weed. Chichester, Packard Publishing: 123 str.
- Ciegler A. 1969. Tremorgenic toxin from *Penicillium palitans*. Applied Microbiology, 18, 1:128–129
- Ciegler A., Hou C.T. 1970. Isolation of viridicatin from *Penicillium palitans*. Archiv für Mikrobiologie, 73, 3: 261–267
- da Silva Araújo F.D., de Lima Fávaro L. C., Araújo W. L., de Oliveira F. L., Aparicio R., 2012. Epicolactone – natural product isolated from the sugarcane endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. European Journal of Organic Chemistry, 12: 5225-5230
- de Fávaro L.C.L., de Melo F. L., Aguilar-Vildoso C. I., Araujo W. L. 2011. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. PLoS ONE, 6, 8: e14828, doi: 10.1371/journal.pone.0014828: 18 str.

- de Fávoro L.C.L., de Sebastianes F.L.S., Araújo W.L. 2012. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. PLoS ONE, 7, 6: e36826, doi: 10.1371/journal.pone.0036826: 10 str.
- De Hoog G. S., Guarro J., Gené J., Figueras M. J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed., Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1160 str.
- Earl A.M., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology, 16, 6: 269–275
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. EFSA Journal, 9, 10: 2407, doi:10.2903/j.efsa.2011.2407: 97 str.
- Fieber C., Kovarik P. 2014. Responses of innate immune cells to group A *Streptococcus*. Frontiers Cellular and Infection Microbiology, 4: 140, doi:10.3389/fcimb.2014.00140: 7 str.
- Frajman B. 2008. Japonski dresnik *Fallopia japonica*, Informativni list 1. Projekt Thuja. Nova vas, Zavod Symbiosis: 4 str.
<http://www.tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF1-japonski-dresnik.pdf> (maj, 2015).
- Frank L., Loeffler A. 2012. Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Clinical challenge and treatment options. Veterinary Dermatology, 23, 4: 283-291
- Frisvad J. C., Thrane U., Samson R. A. 2007. Mycotoxin producers. V: Food mycology: A multifaceted approach to fungi and food. Vol. 25. Dijksterhuis J., Samson R. A. (eds.). Utrecht, CRC Press: 135-159
- Fulde M., Rohde M., Polok A., Preissner K. T., Chhatwal S. G., Bergmann S. 2013. Cooperative plasminogen recruitment to the surface of *Streptococcus canis* via M protein and enolase enhances bacterial survival. mBio, 4, 2: e00629-12, doi:10.1128/mBio.00629-12: 12 str.

- Ghasemzadeh A., Jaafar H. 2011. Effect of CO₂ Enrichment on synthesis of some primary and secondary metabolites in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). International Journal of Molecular Sciences, 12: 1101-1114
- Giada M. 2013. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. V: Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants figure. Morales-González J.A. (ed.). Rijeka, Intech: 87-112
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. Planta Medica, 74, 6: 594–602
- Greenwood D., Barer M., Slack R., Irving W. 2012. Medical microbiology. 18th ed. Churchill, Livingstone: 794 str.
- Guo Y., Huang E., Yuan C., Zhang L., Yousef A. E. 2012. Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. Applied and Environmental Microbiology, 78: 3156-3165
- Häkkinen S. 2000. Flavonols and phenolic acids in berries and berry products flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral dissertation. Kuopio, Faculty of Medicine: 90 str.
- Harwood C.R., Cranenburgh R. 2008. Bacillus protein secretion: an unfolding story. Trends in Microbiology, 16, 2: 73–79
- Hegde V.R., Pu H., Patel M., Black T., Soriano A., Zhao W., Gullo V. P., Chan, T. M. 2004. Two new bacterial DNA primase inhibitors from the plant *Polygonum cuspidatum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14, 9: 2275–2277
- Johnston C.L. 2008. Identification of *Penicillium* species in the South African litchi export chain. M.Sc. Thesis. Pretoria, University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Microbiology and Plant Pathology: 123 str.

- Jones M., Fleming S. A. 2009. Organic chemistry. 4th ed. New York, W. W. Norton & Company: 1220 str.
- Kim Y.-S., Hwang C.-S., Shin D.-H. 2005. Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S. et Z. and their anti-bacterial activities. Food Microbiology, 22, 1: 139–144
- Klich M. 2007. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. Molecular Plant Pathology, 8, 6: 713–722
- Kruger E.F., Byrne B. A., Pesavento P., Hurley K. F., Lindsay L.L., Sykes J. E. 2010. Relationship between clinical manifestations and pulsed-field gel profiles of *Streptococcus canis* isolates from dogs and cats. Veterinary Microbiology, 146, 1-2: 167–171
- Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrała A., Mędrała W. 2014. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 47, 3: 354–36
- Lazicka K., Orzechowski S. 2010. The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. Natural Science, 2, 46: 544–550
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell: 388 str.
- Lindahl G., Stalhammer-Carlemalm M., Areschoug T. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clinical Microbiology Reviews, 18, 1: 102–127
- Link H.F. 1809. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin, 3, 1: 3-42
http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=209842
 (maj, 2016).

- Link H.F. 1816. Observationes in ordines plantarum naturales. 2. Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin, 8: 25-45
<http://www.mycobank.org/MB/226758> (maj, 2016).
- Lopez D., Vlamakis H., Kolter R. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews, 33, 1: 152–163
- Lorentz R.H., Ártico S., da Silveira A.B., Einsfeld A.,G. Corção. 2006. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. Letters in Applied Microbiology, 43, 5: 541-547
- Maček J. 1991. Posebna fitopatologija. Patologija poljščin. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Agronomski oddelek: 285 str.
- Mahon C.R., Lehman D.C., Manuselis G. 2014. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. New York, Saunders: 1096 str.
- Marsaioli A.J. 2012. Epicolactone - Natural product isolated from the sugarcane endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. European Journal of Organic Chemistry, 27: 5225–5230
- Mims C.W., Richardson E. 2005. Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. Canadian Journal of Botany, 83, 10: 1354–1363
- Moodley A., Damborg P., Nielsen S.S. 2014. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. Veterinary Microbiology, 171, 3-4: 337–341
- Moreno S., Scheyer T., Romano C. S., Vojnov A. A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radical Research, 40, 2: 223-231

- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2012. Medical microbiology. 7th ed. Saunders, St. Louis: 888 str.
- Nduagu C., Ekefan E. J., Nwankiti A. O. 2008. effect of some crude plant extracts on growth of *Colletotrichum capsici* (Synd) Butler & Bisby, causal agent of pepper anthracnose. Journal of Applied Biosciences, 6, 2: 184 – 190
- Nulens E., Laere E. D., Vandeveldel H., Hilbrands L. B., Rijs A. J. M. M., Melchers W. J. G., Verweij P. E. 2006. *Alternaria infectoria* phaeohyphomycosis in a renal transplant patient. Medical Mycology, 44, 4: 379–382
- Ostry V. 2008. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin Journal, 1, 2: 175–188
- Owk A.K., Mortha K.R., Lagudu M.N. 2015. Evaluation of antimicrobial activity of root extracts of *Abitulon indicum*. Notulae Scienta Biologicae, 7:160–163
- Pai-Wei S., Cheng-Hong Y., Jyh-Ferng Y., Pei-Yu S., Li-Yeh C. 2015. Antibacterial activities and antibacterial mechanism of *Polygonum cuspidatum* extracts against nosocomial drug-resistant pathogens. Molecules, 20, 6: 11119-11130
- Peng W., Qin R., Li X., Zhou H. 2013. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.: a review. Journal of Ethnopharmacology, 148, 3: 729–745
- Pitt I. J., Hocking A. D. 2009. Fungi and food spoilage. 3rd ed. New York, Springer: 519 str.
- Raz R., Colodner R., Kunin C.M. 2005. Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? Clinical Infectious Diseases, 40, 6: 896–898
- Reichling J. 2010. Plant–microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. V: Annual plant reviews. Vol. 39. Functions and

- biotechnology of plant secondary metabolites. Wink M. (ed.). Oxford, Wiley-Blackwell: 214-347
- Reichling J., Suschke U., Schnee J., Geiss H.K. 2006. Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components – structure–activity relationship. *Natural Product Communications*, 1, 11: 1003–1012
- Rezar V., Frankič T., Salobir J. 2008. Nekatere prehranske možnosti za preprečitev škodljivega vpliva fuzarijskih toksinov (T-2 in DON) na proizvodne lastnosti in lipidno peroksidacijo pri piščancih. *Acta agriculturae Slovenica*, 92, 1: 19-27
- Rogelj A. 2015. Antioksidanti in njihova učinkovitost v različnih tkivih invazivnih tujerodnih dresnikov. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 172 str.
- Sareyyüpoğlu B., Müştak H.K., Cantekin Z., Diker K.S. 2014. Methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from shelter dogs in Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20, 3: 435–438
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M., Yoga Latha L. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8, 1: 1–10
- Seme K. 2002. Stafilokoki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-146
- Shan B., Cai, Y. Z., Brooks J. D., Corke H. 2008. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry*, 109: 530-537
- Shaw D. 2013. *Fallopia japonica* (Japanese knotweed). V: *Invasive species compendium*. Wallingford, CAB International: 22 str.
<http://www.cabi.org/isc/datasheet/23875> (maj, 2016).

- Simmons E.G. 1986. *Alternaria* themes and variations (22-26). *Mycotaxon*, 25, 1: 287-308
http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=103987
(maj, 2016).
- Sonensheim A.L., Hoch J.A., Losick R. 2002. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, ASM Press: 629 str.
- Song J.H, Kim S. K., Chang K. W., Han S. K., Yi H. K., Jeon J. G. 2006. *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology*, 51: 1131-1140
- Song J.H., Yang T. C., Chang K. W., Han S. K., Yi H. K., Jeon J. G. 2007. *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 419-425
- Squire R. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* (New York, N.Y.), 214, 4523: 877–800
- Stevens D., Kan V. L., Judson M. A., Morrison A. V., Dummer S., Denning D. W., Bennett J. E., Walsh T. J., Patterson T. F., Pankey G. A. 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases*, 30, 4: 696–709
- Sultana B., Anwar F., Ashraf M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14: 2167-2180
- Štalcar A. 2015. Analiza hlapnih spojin v japonskem dresniku (*Fallopia japonica*) in češkem dresniku (*Fallopia x bohemica*). Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 74 str.

- Tam N.K.M., Uyen N. Q., Hong H. A., Le H., Hoa T. T., Serra C. R., Henriques A. O., Cutting S. M., Duc L. H., Claudia R. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, 188, 7: 2692–2700
- Tomsone L., Kruma Z., Galoburda R. 2012. Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*Armoracia rusticana*). *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 6, 4: 1164–1169
- Tsuge T., Harimoto Y., Akimitsu K., Ohtani K., Kodama M., Akagi Y., Egusa M., Yamamoto M., Otani H., 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 1: 44–66
- van Duijkeren E., Catry B., Greko C., Moreno M.A., Pomba M. C., Pyörälä S., Ruzauskas M., Sanders P., Threlfall E.J., Torren-Edo J., Törneke K. 2011. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 12: 2705–2714
- Vogelgsang S., Sulyok M., Bänziger I., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H. R. 2008a. Effect of fungal strain and cereal substrate on *in vitro* mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives & Contaminants*, 25, 6: 745–757
- Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H. R. 2008b. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 2: 265–276
- Wang Q.L., Li B.Y., Qiu S.C., Li Y.L., Mi W., Song H.Y. 2006. Study on antibacteria effect in vitro of *Polygonum cuspidatum* Sieb. *Lishizhen Medicine and Material Medica Research*, 17: 762–763
- Wang X. Y., Wei X. L., Luo H., Kim J. A., Jeon H. S., Koh Y. J., Hur J.-S. 2010. Plant hormones promote growth in lichen-forming fungi. *Mycobiology*, 38, 3: 176–179

- Wink M. 2010. Introduction. V: Annual plant reviews. Vol. 39. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Wink M. (ed.). Oxford, Wiley-Blackwell: 1-20
- Wollenweber. 1914. *Fusarium poae* (Peck) Wollenweber, Technical bulletin, Maine Agricultural Experiment Station: 254 str.
<http://www.mycobank.org/MB/226758> (maj, 2016).
- Xu X.-M., Nicholson P., Thomsett M. A., Simpson D., Cooke B. M., Doohan F. M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S. G., 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, 98, 1: 69–78
- Zeigler D. R. 2013. The family Paenibacillaceae, *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, Part 5. Columbus, *Bacillus* Genetic Stock Center: 28 str.
http://bgsc.org/_catalogs/Catpart5.pdf (junij, 2015).
- Zhang H., Li C., Kwok S. T., Zhang Q. W., Chan S. W., 2013. A review of the pharmacological effects of the dried root of *Polygonum cuspidatum* (Hu Zhang) and its constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, ID 208349, doi: 10.1155/2013/208349: 13 str.

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila vsem, ki so mi pomagali na poti do cilja in mi pri tem svetovali, me spodbujali in učili. Najprej bi se zahvalila mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce za vse nasvete in podporo, somentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin, recenzentki izr. prof. dr. Barbki Jeršek in predsednici komisije doc. dr. Polona Zalar. Hvala za sodelovanje, znanje in vse nasvete. Hvala tudi ostalim, ki so sodelovali pri oblikovanju in popravljanju naloge.

Iskreno bi se rada zahvalila tudi vsem sodelavcem Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, za vso pomoč, nasvete in dobro vzdušje. Olajšali in polepšali ste mi delo.

Prav tako bi se zahvalila vsem prijateljem, ki so bili z mano skozi vsa leta študija. Ljudje, ki so z mano delili svoj dragoceni čas, mi stali ob strani, me bodrili, se veselili z mano in me tolažili, ko je bilo to potrebno; Ljudje, katerih objemi so bili in so vedno iskreni, topli in polni upanja; Ljudje, ki so mi bili pripravljeni priskočiti na pomoč vedno, ne glede na dan, uro ali pa časovni pas, v katerem so se v tistem trenutku nahajali; nenazadnje Ljudje, ki so mi omogočili vse dragocene izkušnje – takšne in drugačne.

Za podporo se zahvaljujem tudi mami Ingrid. Na koncu pa bi se rada zahvalila predvsem družini Pečko in babici Olgi. Hvala za spodbudo, podporo in pomoč pri uresničitvi mojega cilja. Hvala vam!

PRILOGE

Priloga A: Povprečne površine kolonij plesni s standardno napako (SN; N = 2- 3), v odvisnosti od vrste uporabljenega izvlečka. Kot kontrolno gojišče je bilo za rast plesni uporabljeno PDA-gojišče brez dodanega izvlečka. Pri etanolni kontroli je plesen rastla na PDA-gojišču z dodatkom 70 % etanola. / -ni standardne napake, ker smo imeli le eno meritev in zato standardne napake ni bilo mogoče izračunati.

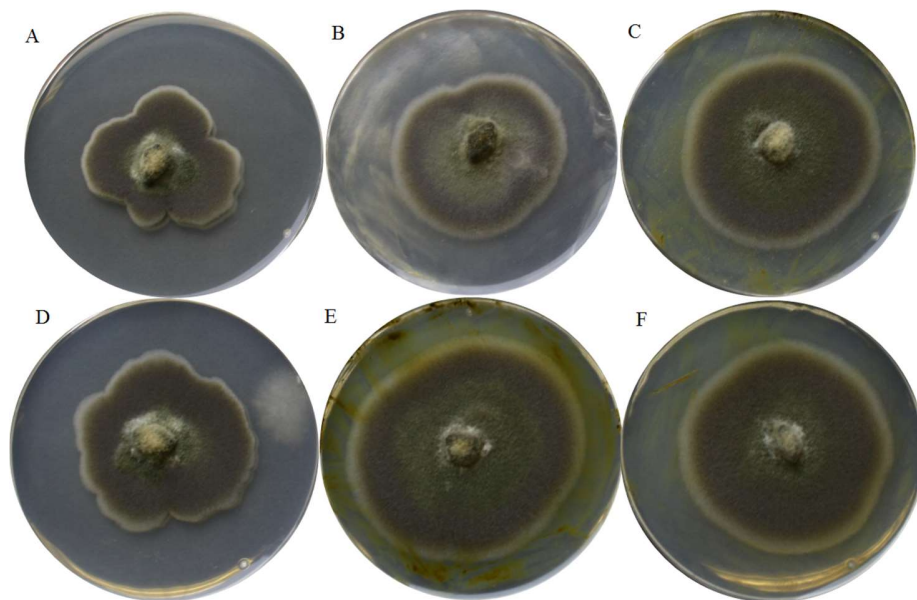
	Vrsta izvlečka	Povprečna površina kolonije $\pm$ SN (cm ²)					
		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria infectoria</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium poae</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Penicillium palitans</i>
Listni izvleček	Vodni	16,17 $\pm$ /	34,33 $\pm$ /	3,32 $\pm$ 0,23	47,32 $\pm$ /	31,02 $\pm$ /	17,29 $\pm$ /
	Acetonski	21,61 $\pm$ 1,34	25,85 $\pm$ /	15,38 $\pm$ 2,03	46,42 $\pm$ /	32,63 $\pm$ /	7,27 $\pm$ /
	Metanolni	24,58 $\pm$ 2,11	24,70 $\pm$ /	16,52 $\pm$ 1,37	38,95 $\pm$ /	34,81 $\pm$ /	8,47 $\pm$ /
	Etanolni	26,23 $\pm$ 2,20	20,12 $\pm$ /	15,71 $\pm$ 0,72	8,75 $\pm$ /	34,53 $\pm$ /	7,19 $\pm$ /
Koreninski izvleček	Vodni	12,51 $\pm$ 0,77	37,94 $\pm$ 3,70	20,09 $\pm$ /	44,50 $\pm$ 0,35	20,10 $\pm$ 0,63	7,16 $\pm$ 0,37
	Acetonski	12,12 $\pm$ 0,51	26,00 $\pm$ 2,08	17,36 $\pm$ /	25,23 $\pm$ 5,64	11,80 $\pm$ 1,70	7,26 $\pm$ 0,42
	Metanolni	9,83 $\pm$ 0,75	13,45 $\pm$ 1,40	17,06 $\pm$ /	10,19 $\pm$ 2,59	5,95 $\pm$ 1,07	7,26 $\pm$ 0,45
	Etanolni	10,60 $\pm$ 0,52	9,78 $\pm$ 0,36	14,56 $\pm$ /	9,17 $\pm$ 2,35	7,20 $\pm$ 0,66	6,64 $\pm$ 0,22
Kontrola	Voda	12,49 $\pm$ 1,12	34,73 $\pm$ 0,10	18,60 $\pm$ 0,39	29,74 $\pm$ 0,37	26,84 $\pm$ 1,81	4,76 $\pm$ 0,29
	70 % EtOH	16,73 $\pm$ 0,57	32,16 $\pm$ 0,23	18,72 $\pm$ 1,08	22,76 $\pm$ 0,19	25,67 $\pm$ 1,66	5,93 $\pm$ 0,38

Legenda: etanol (EtOH), /: ni standardne napake, ker smo imeli le eno meritev.

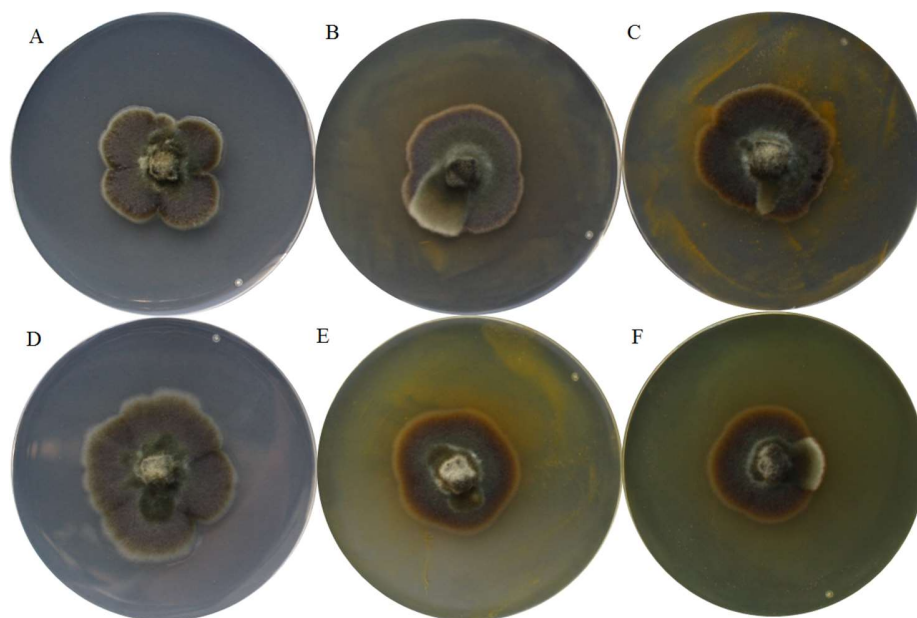
Priloga B: Povprečne vrednosti bakterijskih con inhibicije, podanih v mm s standardno napako (SN; N = 2), v odvisnosti od vrste uporabljenega izvlečka in eteričnega olja. Kot kontrola je bil uporabljen 70 % etanol, ki rasti bakterij ni inhibiral. / -ni standardne napake, ker smo imeli le eno meritev in zato standardne napake ni bilo mogoče izračunati.

	Vrsta izvlečka	<i>B. subtilis</i>	<i>Paenibacillus</i>	MRSP	MRSA	<i>Staph. saprophyticus</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Strep. pyogenes</i>	<i>Strep. canis</i>
Listni izvleček	EO listov	1,58 ± /	3,42 ± /	1,88 ± /	1,65 ± /	0,00 ± /	1,26 ± /	6,15 ± /	-
	Vodni	0,00 ± /	1,63 ± /	1,72 ± 0,04	0,88 ± 0,32	0,90 ± 0,40	0,00 ± /	1,71 ± /	1,71 ± /
	Acetonski	0,00 ± /	1,50 ± /	1,18 ± 0,24	1,01 ± 0,11	0,25 ± 0,10	0,00 ± /	1,40 ± /	2,16 ± /
	Metanolni	0,00 ± /	1,76 ± /	1,68 ± 0,12	0,89 ± 0,01	0,85 ± 0,10	0,00 ± /	1,43 ± /	2,61 ± /
	Etanolni	0,00 ± /	2,11 ± /	1,59 ± 0,34	1,29 ± 0,1	1,15 ± 0,10	0,81 ± /	2,28 ± /	2,94 ± /
Koreninski izvleček	Vodni	0,40 ± 0,10	0,67 ± 0,05	2,25 ± 0,10	1,69 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,26 ± 0,15	1,99 ± 0,17	-
	Acetonski	0,89 ± 0,20	1,99 ± 0,06	3,82 ± 0,16	3,32 ± 0,51	2,55 ± 0,45	2,32 ± 0,28	3,57 ± 0,10	-
	Metanolni	1,65 ± 0,20	2,01 ± 0,14	4,17 ± 0,15	3,70 ± 0,39	3,15 ± 0,11	2,62 ± 0,15	3,61 ± 0,23	-
	Etanolni	1,89 ± 0,18	2,34 ± 0,07	4,57 ± 0,00	4,39 ± 0,25	3,48 ± 0,25	3,41 ± 0,14	4,24 ± 0,20	-
Kon.	70 % EtOH	0,00 ± /	0,00 ± /	0,00 ± /	0,00 ± /	0,00 ± /	0,00 ± /	0,00 ± /	0,00 ± /

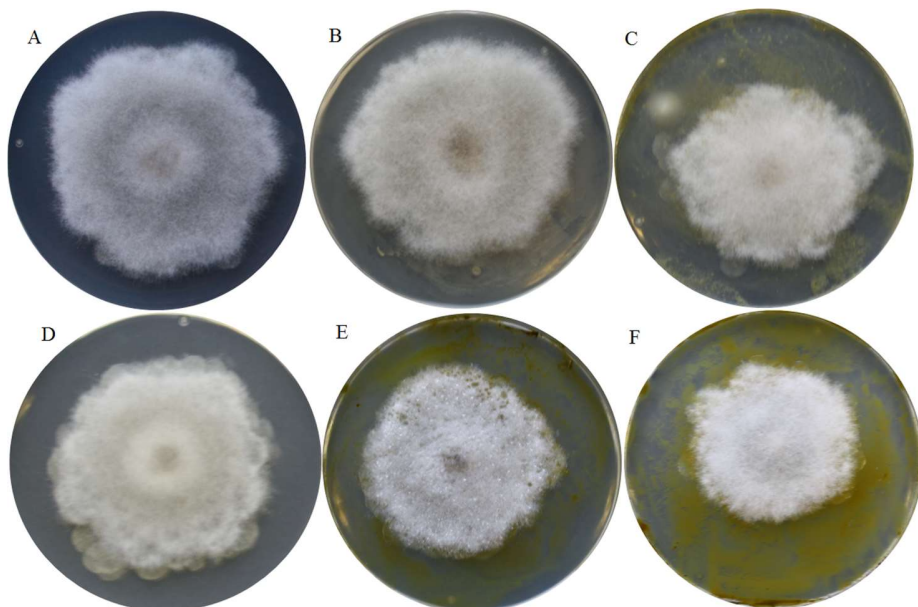
Legenda: Eterično olje (EO), etanol (EtOH), /: ni standardne napake, ker smo imeli le eno meritev, -: ni meritve.



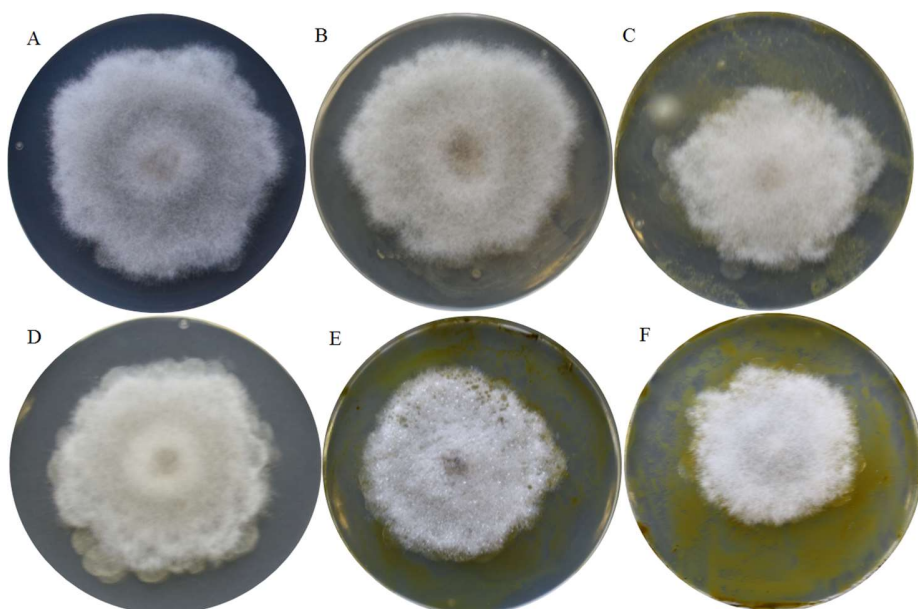
Priloga C: Plesni vrste *Alternaria alternata* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



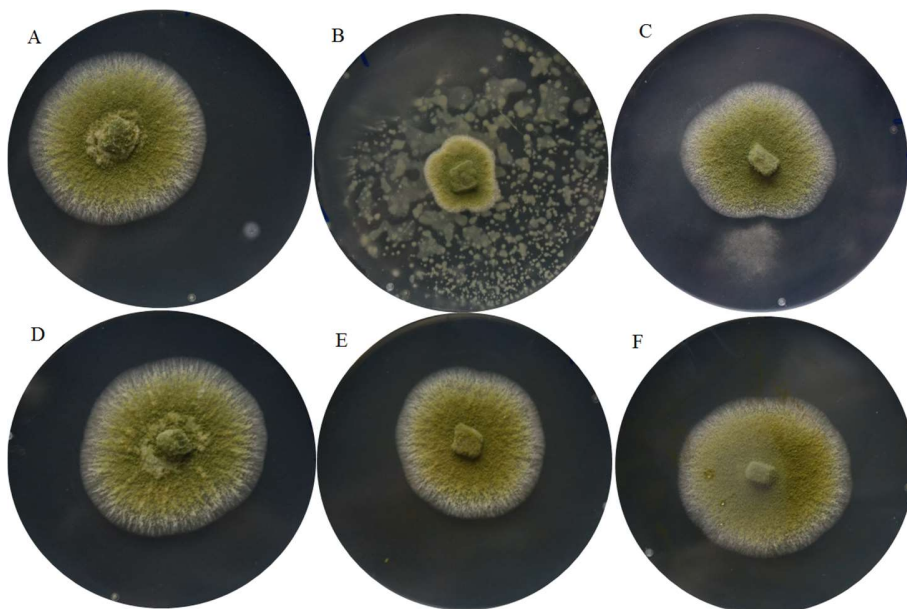
Priloga D: Plesni vrste *Alternaria alternata* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



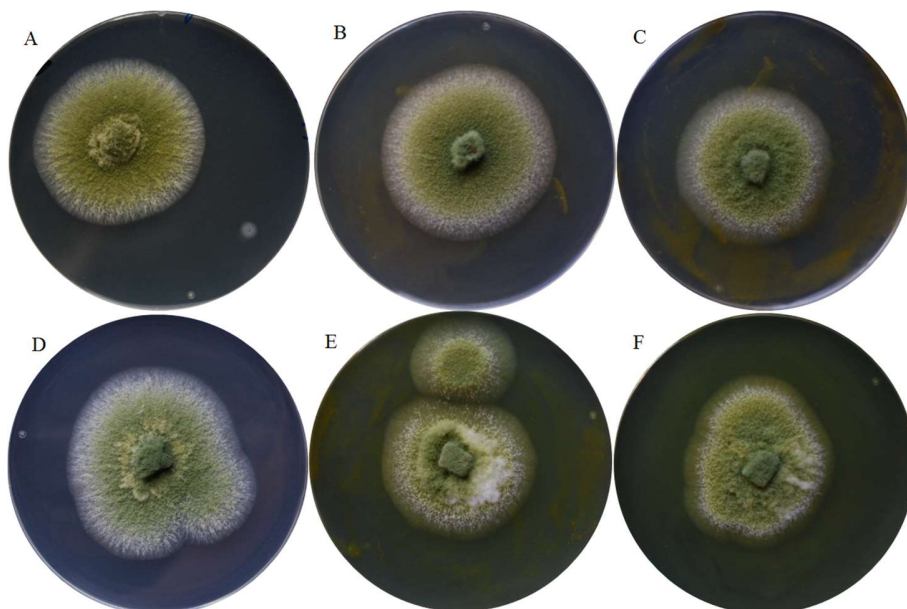
Priloga E: Plesni vrste *Alternaria infectoria* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A – vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



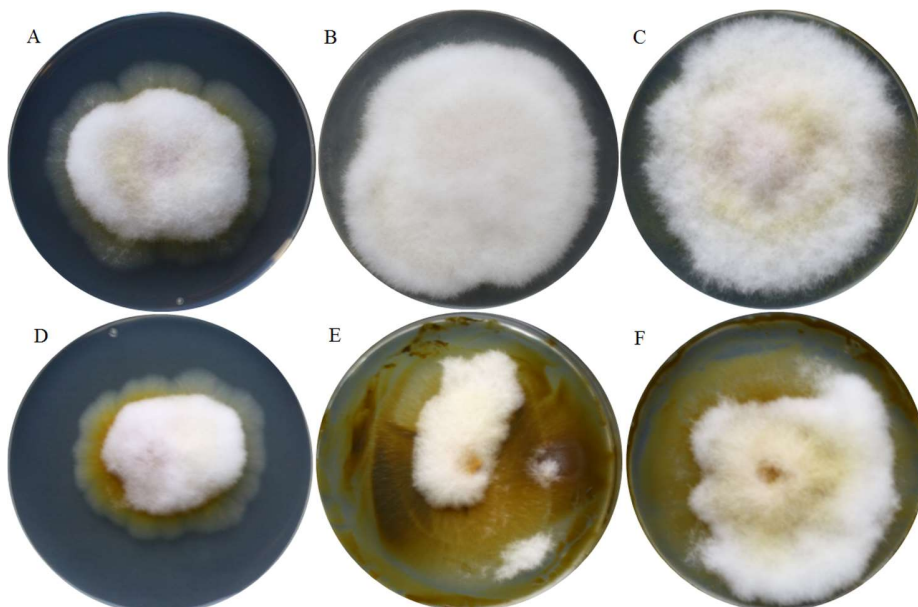
Priloga F: Plesni vrste *Alternaria alternata* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A – vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D- kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



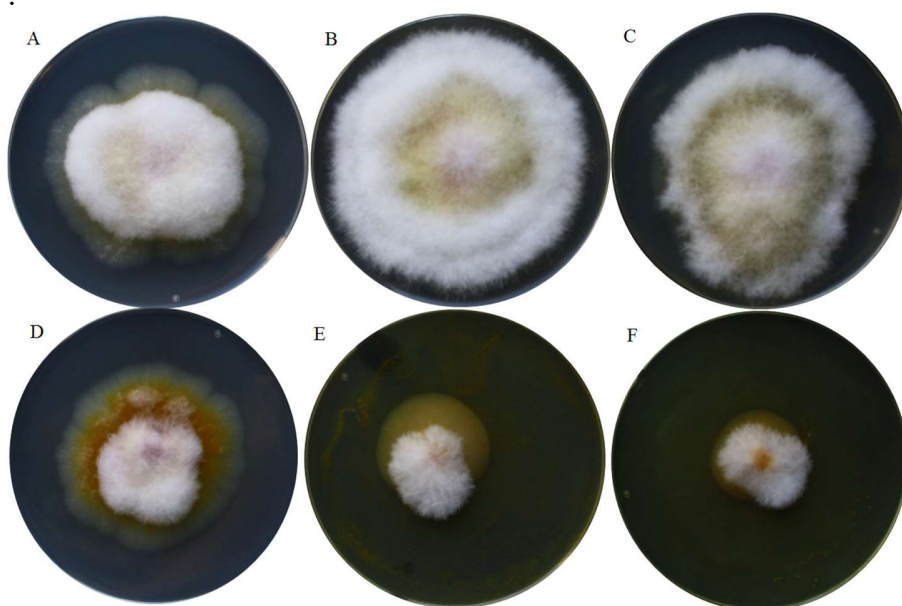
Priloga G: Plesni vrste *Aspergillus flavus* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70% etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



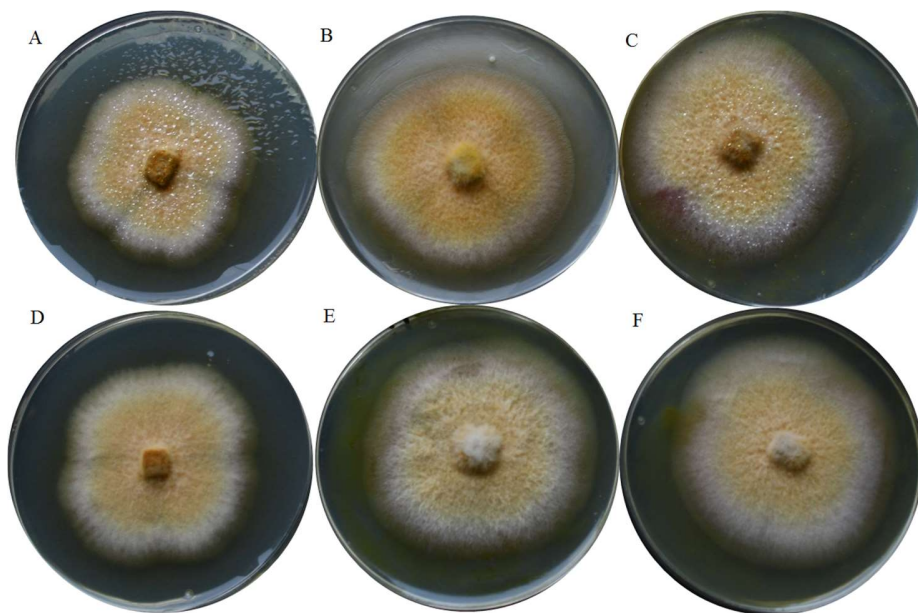
Priloga H: Plesni vrste *Aspergillus flavus* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70% etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



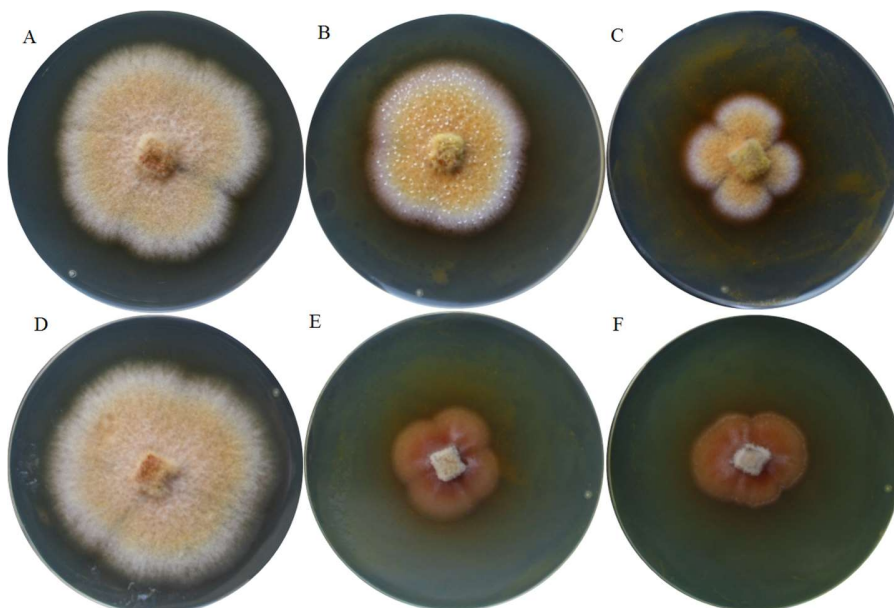
Priloga I: Plesni vrste *Fusarium poae* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70% etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



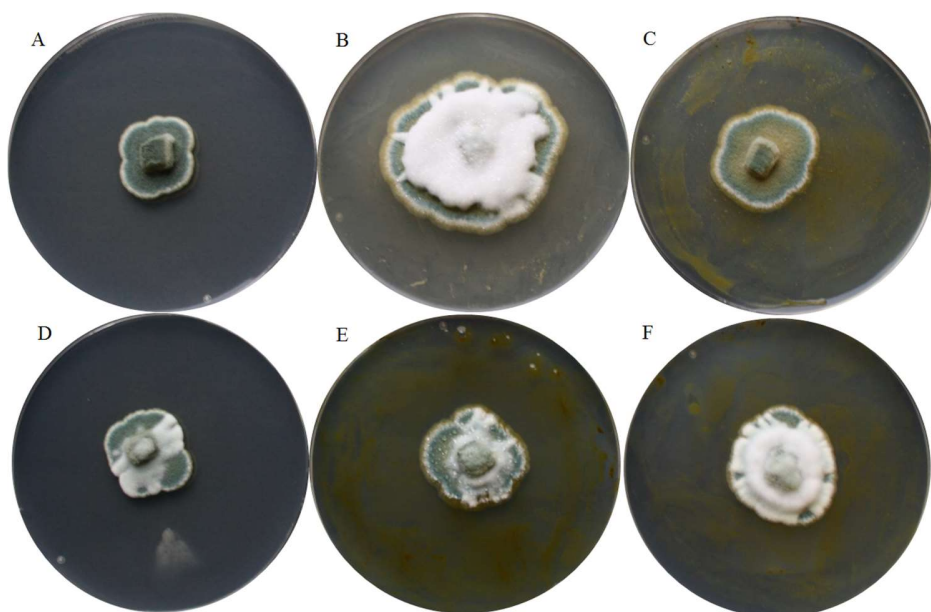
Priloga J: Plesni vrste *Fusarium poae* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



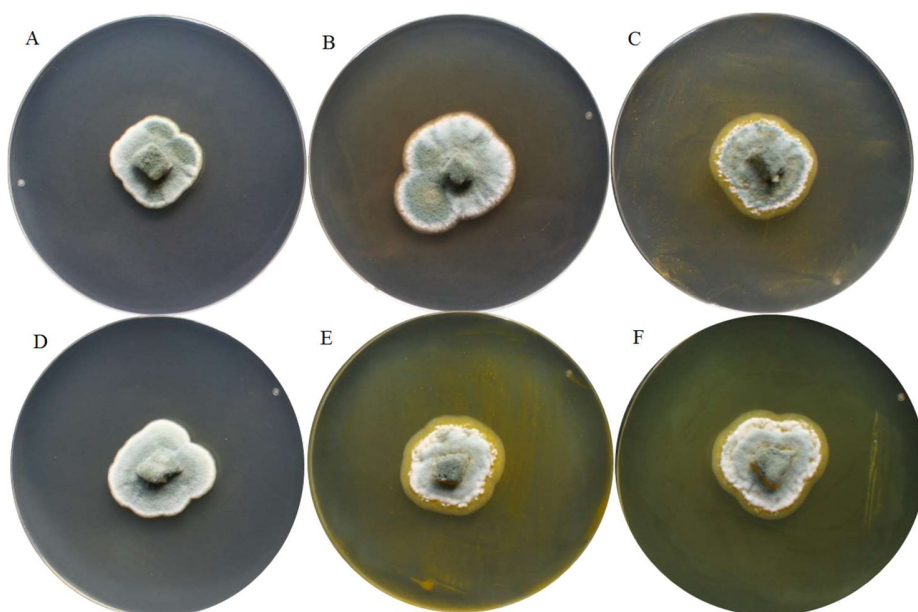
Priloga K: Plesni vrste *Epicoccum nigrum* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



Priloga L: Plesni vrste *Epicoccum nigrum* ob tretmaju z različnimi koreninskimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70% etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



Priloga M: Plesni vrste *Penicillium palitans* ob tretmaju z različnimi listnimi izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.



Priloga N: Plesni vrste *Penicillium palitans* ob tretmaju z različnimi koreninski izvlečki japonskega dresnika. Oznake: A –vodna kontrola, B – vodni izvleček, C – acetonski izvleček, D – kontrola 70 % etanol, E – etanolni izvleček, F – metanolni izvleček.