

# **Antimikrobne in antioksidativne lastnosti nabranih in gojenih gob mešanega gozda**

Raziskovalna naloga

Maribor 2017

Avtorica: Gabriela Štumberger

Mentor: dr. rer. nat. Boštjan Vihar

Somentorica: Katja Honthaner Zorec

## KAZALO

<b>POVZETEK .....</b>	<b>6</b>
<b>ZAHVALA .....</b>	<b>7</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>8</b>
1.1 Raziskovalna vprašanja .....	9
1.2 Hipoteze.....	10
<b>2. TEORETIČNE OSNOVE.....</b>	<b>11</b>
2.1 Brezova odpadljivka ( <i>Piptoporus betulinus</i> ) .....	11
2.2 Brezova lenzovka ( <i>Lenzites betulina</i> ) .....	11
2.3 Borov glivec ( <i>Sparassis crispa</i> ).....	12
2.4 Bukova kresilka ( <i>Fomes fomentarius</i> ) .....	12
2.5 Bukov ostrigar ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) .....	13
2.6 Pisana ploskocevka ( <i>Trametes versicolor</i> ) .....	13
2.7 Veliki lovkar ( <i>Anthurus archeri</i> ).....	14
<b>3. MATERIALI IN METODE DE LA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Materiali .....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Gobe .....	14
3.1.2 Delovni mikroorganizmi .....	14
3.1.3 Zaščitna oprema .....	15
3.1.4 Kemikalije .....	15
3.1.5 Laboratorijski pribor .....	15
3.1.6 Laboratorijske aparature .....	16
3.1.7 Ostali material .....	16
<b>3.2 Metode dela.....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Priprava gojišč za mikroorganizme.....	16
3.2.2 Priprava primarnih gojišč za gobe .....	17
3.2.3 Priprava sekundarnih gojišč za gobe .....	18
3.2.4 Gojenje gob .....	18
3.2.5 Priprava gobjega materiala za ekstrakcijo .....	19
3.2.6 Ekstrakcija.....	20
3.2.7 Priprava prekonočnih bakterijskih kultur .....	20
3.2.8 Metoda difuzije na trdnem gojišču z diski – preverjanje antimikrobnega učinka.....	20

3.2.9	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči – ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	20
3.2.10	Metoda DPPH za določanje antioksidativne aktivnosti.....	22
<b>3.3</b>	<b>Statistična obdelava podatkov .....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>24</b>
4.1	Gojenje gob.....	24
4.2	Rezultati metode difuzije na trdnem gojišču z diski.....	25
4.3	Rezultati metode razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči .....	29
4.4	Rezultati metode DPPH.....	30
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>DRUŽBENA ODGOVORNOST .....</b>	<b>36</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČEK.....</b>	<b>37</b>
<b>8.</b>	<b>VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>39</b>
<b>9.</b>	<b>PRILOGE .....</b>	<b>44</b>
9.1	Velikosti inhibicijskih con kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski .....	44
9.2	Statistična pomembnost razlik med velikostmi inhibicijskih con različnih gobjih ekstraktov	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Brezova odpadljivka ( <i>Pitoporus betulinus</i> ) (lasten vir) .....	11
Slika 2: Brezova lenzovka ( <i>Lenzites betulina</i> ) (commons.wikimedia.org).....	11
Slika 3: Borov glivec ( <i>Sparassis crispa</i> ) (lasten vir) .....	12
Slika 4: Bukova kresilka ( <i>Fomes fomentarius</i> ) (commons.wikimedia.org).....	12
Slika 5: Bukov ostrigar ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) (Fred Stevens) .....	13
Slika 6: Pisana ploskocevka ( <i>Trametes versicolor</i> ) (Fred Stevens).....	13
Slika 7: Veliki lovkar ( <i>Anthurus archeri</i> ) (Marc Gattone).....	14
Slika 8: Primer micelija brezove odpadljivke zraslega na primarnem PCA gojišču (lasten vir) .....	19
Slika 9: Primer micelija brezove odpadljivke zraslega na sekundarnem gojišču iz brezovega lesa (lasten vir).....	19
Slika 10: Mikrotitrna plošča z <i>E. coli</i> (A1-C8), <i>B. cereus</i> (C9-F4) ter <i>S. cerevisiae</i> (F5-H12) z različnimi koncentracijami ekstraktov brezove odpadljivke, borovega glivca in bukove kreslike ter dodanim jodo-nitro-tetrazol vijolično indikatorjem .....	22
Slika 11: Sprememba absorpcije DPPH z nevtralizacijo (wikipedia.org) .....	22
Slika 13: Vzgojen micelij brezove odpadljivke (lasten vir).....	24
Slika 14: Vzgojen micelij borovega glivca (lasten vir) .....	24
Slika 15: Vzgojen micelij pisane ploskocevke (lasten vir) .....	24
Slika 16: Vzgojen klobuk bukovega ostrigarja (lasten vir) .....	24
Slika 17: Vzgojen klobluk bukove kreslike (lasten vir) .....	24

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na <i>E. coli</i> , podan s premeri inhibicijskih con (mm) $\pm$ 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski; navpični črti predstavljata negativni kontroli .....	25
Graf 2: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na <i>B. cereus</i> , podan s premeri inhibicijskih con (mm) $\pm$ 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski; navpični črti predstavljata negativni kontroli.....	26
Graf 3: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na <i>S. cerevisiae</i> , podan s premeri inhibicijskih con (mm) $\pm$ 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski; navpični črti predstavljata negativni kontroli.....	27

Graf 4: Umeritvena krivulja sposobnosti lovljenja prostih radikalov različnih koncentracij askorbinske kisline z etanolnimi ekstrakti nabranih (nXX) in gojenih micelijev (gXX) ter klobukov (gXXX) brezove odpadljivke (BRO), borovega glivca (BG), brezove lenzovke (BL), bukovke kreslike (BK), pisane ploskocevke (PP), velikega lovkarja (VL) in bukovke ostrigarja (BO)..... 31

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Minimalne inhibitorne koncentracije (mg suhega gobjega materiala / mL tekočega gojišča) etanolnih ekstraktov nabranih gob in gojenih micelijev brezove odpadljivke, borovega glivca ter bukovke kreslike, za inhibicijo rasti <i>E. coli</i> ter <i>B. Cereus</i> . Pozitivna kontrola vsebuje le ekstrakte brez bakterij, negativna pa le bakterije brez ekstraktov.....	29
Tabela 2: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na <i>E. coli</i> , podan s premeri inhibicijskih con (mm) $\pm$ 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski ....	44
Tabela 3: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na <i>B. cereus</i> , podan s premeri inhibicijskih con (mm) $\pm$ 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski ....	44
Tabela 4: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na <i>S. cerevisiae</i> , podan s premeri inhibicijskih con (mm) $\pm$ 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski..	45
Tabela 5: Statistična pomembnost razlik med antimikrobni učinkom etanolnih oz. metanolnih ekstraktov nabranih ter gojenih (klobuki in miceliji) gob oz. njihovimi kontrolami, proti <i>E. coli</i> , podanimi s P-vrednostmi kot rezultat ANOVA testa, pri čemer se vrednosti manjše od 0,05 smatrajo za statistično pomembne.....	46
Tabela 6: Statistična pomembnost razlik med antimikrobni učinkom etanolnih oz. metanolnih ekstraktov nabranih ter gojenih (klobuki in miceliji) gob oz. njihovimi kontrolami, proti <i>B. cereus</i> , podanimi s P-vrednostmi kot rezultat ANOVA testa, pri čemer se vrednosti manjše od 0,05 smatrajo za statistično pomembne.....	46
Tabela 7: Statistična pomembnost razlik med antimikrobni učinkom etanolnih oz. metanolnih ekstraktov nabranih ter gojenih (klobuki in miceliji) gob oz. njihovimi kontrolami, proti <i>S. cerevisiae</i> , podanimi s P-vrednostmi kot rezultat ANOVA testa, pri čemer se vrednosti manjše od 0,05 smatrajo za statistično pomembne.....	47

## POVZETEK

Gobe se že od nekdaj uporabljajo v tradicionalni medicini, zaradi antimikrobnih, antitumornih, antioksidativnih ter drugih učinkov, pa se tudi množično nabirajo. Cilj naše naloge je bil ugotoviti ali lahko zdravilne gobe iz lokalnega gozda gojimo tudi doma in kakšni so njihovi antimikrobni ter antioksidativni učinki v primerjavi z učinki nabranih gob. Gobe smo nabrali in jih poskušali gojiti. Iz nabranih in gojenih gob smo nato pripravili ekstrakte, ter s pomočjo metode difuzije na trdnem gojišču z diski ter razredčevanjem na mikrotitrski plošči ugotavljali antimikrobni učinek, z metodo DPPH pa antioksidativnega. Tako v smislu antimikrobnih kot antioksidativnih lastnosti so izstopale brezova odpadljivka, borov glivec ter bukova kresilka, pri čemer so imele statistično pomembne lastnosti tako nabrane gobe, kot gojeni miceliji. Rezultati so vzpodbudni za nadaljnje raziskave medicinskih lastnosti gob, vendar so v gojenju in pridobivanju učinkovin potrebne izboljšave.

## **ZAHVALA**

Najprej bi se iskreno želela zahvaliti mentorju, ki je vodil celotno nalogo in z menoj preživel kar nekaj časa v laboratoriju, velikokrat tudi do večera, ob tem pa je bil zmerom dosegljiv za razna (neumna) vprašanja. Da se je projekta lotil z navdušenjem in mi pokazal še veliko drugih zanimivih stvari, predvsem pa da je z menoj delil svoje znanje, čas in kreativnost, ob vsem tem pa nudil še moralno podporo.

Zahvala gre tudi somentorici, ki je zmerom rada priskočila na pomoč, ko se je kje zataknilo, predlagala rešitve ter dodatne metode, kot tudi pomagala pri iskanju potrebnih kontaktov.

Želela bi se zahvaliti tudi gobarju, ki je pomagal pri iskanju, nabiranju ter identifikaciji uporabljenih gob.

Hvala profesorici kemije, ki so prijazno pomagale pri dilemah kemijske narave, nas seznanim s primernimi metodami za doseganje zastavljenega cilja ter izpostavile napake, ki jih sami morda ne bi opazili.

Zahvaljujem se tudi šoli in inštitutu, ki sta nudila prostore in material za izvedbo raziskovalne naloge. Prav tako hvala vsem, ki ste kakorkoli drugače pomagali pri nastajanju te naloge.

## 1. UVOD

Gobe že od prazgodovine igrajo pomembno vlogo v človekovi prehrani, predvsem pa se zaradi vsebnosti številnih zdravilnih učinkovin pogosto uporabljajo v tradicionalni medicini (Molitoris, 1994). Zapisi o njihovi uporabi na Kitajskem segajo nazaj več sto let pred našim štetjem, ko so gobe gojili zaradi zdravilnih učinkovin, ki so v uporabi še danes. Stari Grki in Rimljani so jih uporabljali v prehrani (Erjavec, 2014), bukovo kresilko in brezovo odpadljivko pa naj bi s seboj nosil že Ötzi (Peintner *et al.*, 1998).

Danes je za številne gobe dokazana vsebnost raznih zdravilnih učinkovin. Svetlikava pološčenska (*Ganoderma lucidum*) npr. ima antioksidativne (Mau *et al.*, 2002) ter imunomodulatorne lastnosti (Lull *et al.*, 2005), užitnemu nazobčancu (*Lentinus edodes*) pripisujejo antibakterijske (Hearst *et al.*, 2009), antivirusne (Sarkar *et al.*, 1993) in antitumorne lastnosti (Yu *et al.*, 2010), velika zraščenska (*Grifola frondosa*) pa vsebuje vitamine, polisaharide in beljakovine, ki krepijo imunski sistem (Wu *et al.*, 2006). Seveda pa je izmed 14.000 znanih vrst gob (Wasser, 2002) mnogo učinkovin še neznanih.

Prekomerno nabiranje, kot smo mu priča pri običajnih užitnih oz. zdravilnih vrstah in okoljske spremembe lahko močno vplivajo na populacijo gob. To je že pripeljalo do ogroženosti nekaterih vrst, kot so npr. lekarniška macesnovka (*Lariciformes officinalis*). Le ta ima številne antimikrobne in antivirusne učinke, vendar pa je danes izjemno redka (Stamets, 2005) zaradi česar je pri nas uvrščena na rdeči seznam (uradni-list.si, 2017). Zaradi primerov kot je macesnovka bi bilo naravnim gobjim populacijam v prid, če bi te gobe lahko vsak sam gojil doma, ter jih posledično manj odvezal naravnemu okolju. Dodatna prednost takšnega in vitro gojenja bi potencialno lahko bilo celoletno gojenje gob, ki drugače rastejo le sezonsko. Na Kitajskem gobe za prehrano in učinkovine sicer po takšnem principu že masovno gojijo (Zhang *et al.*, 2014), vendar je nas bolj zanimalo kako je z domačimi vrstami.

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti ali je mogoče zdravilne gobe nabrane v domačem gozdu (brezova odpadljivka, brezova lenzovka, borov glivec, bukova kresilka, bukov ostrigar, pisana ploskocevka in veliki lovkar) gojiti pod laboratorijskimi pogoji oz. pogoji, ki si jih lahko ustvarimo doma, ali imajo gojene gobe antimikrobni oz. antioksidativni učinek in ali je le ta primerljiv z učinkom nabranih gob. Pri tem smo iz gob najprej pripravili vodne, etanolne in metanolne ekstrakte ter z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski preizkusili njihov antimikrobni učinek proti *E. coli*, *B. cereus* ter *S. cerevisiae*.



Za statistično-pomembno učinkovite etanolne ekstrakte smo nato z metodo razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči ugotavljali minimalne inhibitorne koncentracije za zgoraj omenjene mikroorganizme. Z metodo DPPH smo ugotavljali sposobnost lovljenja prostih radikalov etanolnih ekstraktov vseh gob.

### 1.1 Raziskovalna vprašanja

1. Ali lahko nabrane gobe: brezovo odpadljivko (*Piptoporus betulinus*), brezovo lenzovko (*Lenzites betulina*), borovega glivca (*Sparassis crispa*), bukovo kresilko (*Fomes fomentarius*), bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*), pisano ploskocevko (*Trametes versicolor*) ter velikega lovkarja (*Anthurus archeri*) gojimo v laboratoriju pod pogoji, ki jih lahko zagotovimo tudi doma?
2. Zaradi predhodno dokazanega protimikrobnega in drugih zdravilnih učinkov (Kimura, 2013; Tepyajiva *et al.* 2012; Seniuk *et al.*, 2011; Voda *et al.*, 2003; Schlegel *et al.*, 2000;) nabranih gob nas je zanimalo, ali je mogoče zdravilne aktivne učinkovine ekstrahirati tudi s preprostimi metodami, dostopnimi povprečnemu gospodinjstvu. Ali imajo vodni, etanolni ali metanolni ekstrakti nabranih in gojenih gob: brezova odpadljivka, brezova lenzovka, borov glivec, bukova kresilka, bukov ostrigar, pisana ploskocevka ter veliki lovkar protimikrobne lastnosti?
3. Ali imajo etanolni ekstrakti nabranih in gojenih gob: brezova odpadljivka, brezova lenzovka, borov glivec, bukova kresilka, bukov ostrigar, pisana ploskocevka ter veliki lovkar protioksidativne lastnosti in kakšne so te lastnosti v primerjavi z askorbinsko kislino, ki je močan protioksidant?

## 1.2 Hipoteze

1. Ker je večina izbranih gob parazitov (brezova odpadljivka, brezova lenzovka, bukova kresilka, bukov ostrigar in pisana ploskocevka), ki rastejo na bolanem ali odmrlem lesu, smo predvidevali, da je te gobe možno na podobnem substratu gojiti in vitro.
2. Literatura za izbrane gobe navaja antimikrobne učinke (Hearst et al., 2009; Suay et al., 2000; Schlegel et al., 2000; Woodward et al., 1993;) zato smo, z predpostavko, da je zdravilne učinkovine mogoče ekstrahirati z osnovnimi topili in enostavnimi ekstrakcijskimi metodami, predvidevali, da bodo nekateri vodni, etanolni in/ali metanolni ekstrakti gob imeli antimikrobni učinek na *E. coli*, *B. cereus* oz. *S. cerevisiae*.
3. Zaradi različne polarnosti topil in različne topnosti posameznih učinkovin v le teh, smo pričakovali razlike v antimikrobnem učinku med vodnimi, etanolnimi in metanolnimi ekstrakti gob.
4. Pričakovali smo, da bodo gojene in nabrane gobe iste vrste vsebovale različne učinkovine oz. različne količine le teh, zaradi česar smo predvidevali, da bodo razlike v antimikrobnem učinku ekstraktov istega topila med nabranimi in gojenimi gobami statistično pomembne.
5. Ker literatura navaja antioksidativne učinke etanolnih ekstraktov nekaterih izbranih gob (Liu et al., 2012; Sulkowska-Ziaja et al., 2012; Kalyoncu et al., 2010; Kim et al., 2008; Jayakumar et al., 2006), smo predvidevali, da bomo s pomočjo enostavnih ekstrakcijskih metod, lahko nekaj od njih ekstrahirali z etanolom.
6. Podobno kot pri antimikrobnih snoveh, smo zaradi različne vsebnosti antioksidativnih snovi gojenih in nabranih gob, pričakovali statistično pomembne razlike v antioksidativnem učinku gojenih in nabranih gob.

## 2. TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Brezova odpadljivka (*Piptoporus betulinus*)

Kot izda že ime, brezova odpadljivka raste na brezovem lesu. Njen okrogel do ledvičast klobuk ima gladko površino, ki je pri mladih gobah svetle, pri starejših pa rjave barve (Slika 1). Trosovnica je svetla z luknjicami. Klobuk ima zaokrožen rob in raste neposredno iz debla, bet pa je odsoten (gobe.si, 2017).

Brezova odpadljivka se tradicionalno uporablja v ljudski medicini. Iz mladih gob so kuhali čaj, za katerega je veljalo, da zmanjšuje utrujenost in krepi imunski sistem (Grienke *et al.*, 2014). Čeprav točen namen ni znan, je odpadljivko v najdišču ob sebi imel tudi Ötzi. (Capasso, 1998). Raziskave zadnjih dveh desetletij so pokazale tudi protivnetne lastnosti vsebovanih triterpenov (Kamo *et al.*, 2003) in protimikrobno delovanje aktivne učinkovine piptamin (Schlegel *et al.*, 2000).



Slika 1: Brezova odpadljivka (*Piptoporus betulinus*) (lasten vir)

### 2.2 Brezova lenzovka (*Lenzites betulina*)

Brezova lenzovka (Slika 2) ima blede-siv sploščen klobuk, ki je včasih tudi valovit. Njegova površina je usnjata in prekrita z dlačicami v koncentričnih pasovih. Trosovnica je iz podaljšanih luknjic, ki lahko dajejo lističast videz (gobe.si, 2017).

Brezova lenzovka je bila testirana na več potencialnih zdravilnih učinkov, vendar pa so rezultati raziskav različni. Liu *et al.* (2014) je pokazal blag protimikrobni učinek, Tepyajiva *et al.* (2012) opozarja na potencialne protivirusne učinke, ugotovljeni pa so bili tudi protioksidativni učinki snovi v etanolnem ekstraktu.



Slika 2: Brezova lenzovka (*Lenzites betulina*) (commons.wikimedia.org)

### 2.3 Borov glivec (*Sparassis crispa*)

Parazit borovih korenin (Slika 3) ima grmičasto obliko iz nakodranih lističev, ki po izgledu spominja na cvetačo. Zraste lahko nekaj 10 cm visoko. Trosovnica je gladka in pokriva celotno zunanjo površino (gobe.si, 2017).



Slika 3: Borov glivec (*Sparassis crispa*) (lasten vir)

Borov glivec je, predvsem v vzhodno-Azijskem prostoru, zaradi prijetnega okusa in potencialnih zdravilnih učinkov postal ena od popularnejših gob. K ugotovljenim farmakološkim učinkom med drugim spadajo imunomodulatorni in antimikrobni učinki (Kimura, 2013). Substance, ki jim pripisujejo slednje učinke so majhne aromatske molekule, kot na primer metil-2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoat (saprassol) (Kimura, 2013; Siepmann, 1987) ali metil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat (Kawagishi *et al.*, 2007).

### 2.4 Bukova kresilka (*Fomes fomentarius*)

Širok, poličast ali kopitast trosnjak (Slika 4) s sivo-rjavo površino, pokrito s koncentričnimi pasovi, ki nakazujejo starost, pri čemer je najmlajši, zunanji svetlejši rjavkaste barve, uspeva na bukovem lesu in ima luknjičasto trosovnico (gobe.si, 2017).



Slika 4: Bukova kresilka (*Fomes fomentarius*) (commons.wikimedia.org)

Tradicionalno so bukovno kresilko uporabljali kot material za prenos ognja, kot obliže (Hobbs, 1986), za lajšanje bolečin, pri revmi in pri težavah z izločali, prebavili ali težavnih menstruacijah (Grienke *et al.*, 2014). Sodobne raziskave so pokazale, da imajo učinkovine (hitin-melanin-glukan kompleks) bukovne kresilke lahko antimikrobne in antiviralne učinke (Seniuk *et al.*, 2011; Robles-Hernandez *et al.*, 2008).

## 2.5 Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)

Bukovega ostrigarja (Slika 5) najdemo na bukovem lesu, iz katerega izrašča z večimi podolgovatimi beti in najprej izbočenimi, nato pa školjkastimi klobuki, ki so lahko sivkasti do beli. Trosovnica je iz svetlih lističev, ki potekajo navzdol na bet (gobe.si, 2017).

Bukov ostrigar je danes ena najbolj popularnih gob za gojenje doma, saj se ga da zraven dobrega okusa tudi lepo vzgojiti (Pohleven *et al.*, 2016). Raziskave so pokazale tudi mnoge medicinsko zanimive lastnosti.  $\beta$ -glukani vzpodbujajo splošni imunski odziv, ki posledično zmanjšuje možnost virusnih obolenj (Majtan, 2012), klinične študije pa kažejo, da bukov ostrigar znižuje raven holesterola brez znatnih stranskih učinkov (Khatun *et al.*, 2007). Sama goba vsebuje tudi terpene in druge snovi z potencialnimi antibiotičnimi učinki (Gunde-Cimerman, 1999).



Slika 5: Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) (Fred Stevens)

## 2.6 Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)

Značilni pahljačasti trosnjaki pisane ploskocevke (Slika 6), ki pogosto rastejo skupaj, so na zgornji strani kolobarjasto pisani (sivo, rumeno, modro in rjavo), po robu pogosto valoviti, na spodnji strani pa imajo okrogle pore (gobe.si, 2017).

Pisana ploskocevka šteje med najbolj raziskane gob za zdravljenje različnih tipov raka (Pohleven *et al.*, 2016). Aktivni učinkovini PSK (polisaharid-K proteoglikan) in PSP (polisaharid-peptid), ki sta bili že uporabljeni v kliničnih študijah, sta skupaj s konvencionalnimi terapijami namreč pokazali dobre rezultate z malo stranskih učinkov (Kidd, 2000). Dodatno je bil za to gobo ugotovljen tudi antimikotični učinek (Voda *et al.*, 2003).



Slika 6: Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*) (Fred Stevens)



## 2.7 Veliki lovkar (*Anthurus archeri*)

Trosnjak velikega lovkarja (Slika 7) je sprva kroglast s tanko sivo ovojnico. Ko le ta počí, se iz nje prikažejo zvezdasto štrleči rdeče-črni kraki (lovke), ki močno smrdijo. Trosovnica je je luknjičasta površina krakov s temno sluzjo v kateri so trosi (gobe.si, 2017).



Slika 7: Veliki lovkar (*Anthurus archeri*) (Marc Gattone)

Veliki lovkar je med opisanimi gobami, morda tudi zaradi nevarljivega vonja in videza, najmanj raziskana goba. Čeprav pri nas ni domorodna vrsta, se je v zadnjih letih precej razširil po naših gozdovih. Njegovi učinki so tako še manj znani, vendar pa nekateri izsledki namigujejo na antivirusno in antimikrobno delovanje (Pohleven, 2015).

## 3. MATERIALI IN METODE DELA

### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 Gobe

Gobe smo nabrali 10. 10. 2016, v gozdu Stražunu v okolici Maribora. Identificirali smo jih s pomočjo gobarja. Pred nacepivitvijo na gojišča, smo gobe 24 h sušili na sobni temperaturi, preostanek pa zmrznili in do nadaljnje uporabe hranili pri -20°C. Uporabljene gobe so bile naslednje:

- brezova odpadljivka (*Piptoporus betulinus*)
- brezova lenzovka (*Lenzites betulina*)
- borov glivec (*Sparassis crispa*)
- bukova kresilka (*Fomes fomentarius*)
- bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)
- pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)
- veliki lovkar (*Anthurus archeri*)

#### 3.1.2 Delovni mikroorganizmi

- sev bakterije *Escherichia coli*
- sev bakterije *Bacillus cereus*
- kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, pridobljena iz suhega kvasa za peko (Dr. Oetker)

### **3.1.3 Zaščitna oprema**

- zaščitne rokavice za enkratno uporabo
- zaščitna halja
- zaščitna očala

### **3.1.4 Kemikalije**

- destilirana voda
- 80% etanol
- 80% metanol
- tripton
- pepton
- agar
- kvasni ekstrakt
- D- glukoza
- kuhinjska sol (NaCl)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)
- jodonitrotetrazolium vijolično
- askorbinska kislina v prahu (vitamin C)

### **3.1.5 Laboratorijski pribor**

- erlenmajerice (100 mL)
- čaše (100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL)
- merilni valj (100 mL, 1000 mL)
- epruvete (16 X 160 mm)
- cepilna zanka (eza)
- kivete (1,5 mL)
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki (0,5 – 10µl, 10 - 100µl, 100 - 1000µl)
- pinceta
- plastične petrijevke (9x9 cm)
- mikrocentrifugirke (epice) (1,5 mL)

### **3.1.6 Laboratorijske aparature**

- avtoklav
- centrifuga
- gorilnik
- grelna plošča
- inkubator
- laminarij
- magnetno mešalo
- pH meter
- prenosni računalnik s programom Logger Pro
- vakuumski koncentrador (speedvac)
- spektrofotometer UV/VIS
- tehnica
- tremoblok
- vibracijski mešalnik za epruvete

### **3.1.7 Ostali material**

- bukov les
- brezov les
- kamut
- konopljina vrv
- krompir
- korenje

## **3.2 Metode dela**

### **3.2.1 Priprava gojišč za mikroorganizme**

**LB gojišče** za heterotrofne bakterije pripravimo po naslednjem postopku:

Kvasni ekstrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 mL



Vse sestavine nasujemo v čašo ter dolijemo destilirano vodo do 1000 mL. Med segrevanjem mešamo, dokler gojišče ne zavre in se vse sestavine popolnoma raztopijo. Avtoklaviramo za 20 min pri 121°C in nalijemo v sterilne petrijevke. Pri tem tekoča in trdna gojišča pripravimo po enakem postopku, le da pri tekočih ne dodamo agarja.

**YEPD gojišče** za kvasovke pripravimo po naslednjem postopku:

Kvasni ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
D-glukoza	20 g
Agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Vse sestavine nasujemo v čašo ter dolijemo destilirano vodo do 1000 mL. Med segrevanjem mešamo, dokler gojišče ne zavre in se vse sestavine popolnoma raztopijo. Avtoklaviramo za 20 min pri 121°C in nalijemo v sterilne petrijevke. Tekoča gojišča ponovno pripravimo brez agarja.

### **3.2.2 Priprava primarnih gojišč za gobe**

**Agar s krompirjem in dekstrozo (PDA – »potato dextrose agar«)** pripravimo po naslednjem postopku:

Krompir	200 g
D-glukoza	20 g
Agar	20 g
Destilirana voda	do 1000 mL

200 g neolupljenega krompirja narežemo na 1 cm velike kocke ter za 30 min kuhamo v 0,5 L vrele, destilirane vode. Nato vse skupaj filtriramo skozi gazo in dolijemo destilirano vodo do 1 L. V tako pridobljeno tekočino dodamo dekstrozo in agar, ter ob mešanju segrevamo, dokler se vse ne raztopi. Avtoklaviramo za 20 min pri 121°C in nalijemo v sterilne petrijevke.

**Agar s krompirjem in korenjem (PCA – »potato carrot agar«)** pripravimo po naslednjem postopku:

Krompir	20 g
Korenje	20 g
Agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Krompir in korenje narežemo na 1 cm velike kocke ter za 30 min kuhamo v 0,5 L vrele, destilirane vode. Nato vse skupaj filtriramo skozi gazo in dolijemo destilirano vodo do 1 L. V tako pridobljeno tekočino dodamo agar, ter ob mešanju segrevamo, dokler se agar ne raztopi. Avtoklaviramo za 20 min pri 121°C in nalijemo v sterilne petrijevke.

### **3.2.3 Priprava sekundarnih gojišč za gobe**

#### **Gojišče iz bukovega/brezovega lesa**

Sveže bukove/brezove veje smo s pomočjo rezalnika za veje najprej zmleli na do 2 cm velike kose. Z njimi smo nato do  $\frac{3}{4}$  napolnili 1 L kozarce za vlaganje. Da bi gobam omogočili izmenjavo plinov smo v pokrov kozarca zvrtali 0,5 cm veliko luknjo, skozi katero smo, da bi preprečili kontaminacijo, natlačili vato. Tako pripravljena gojišča smo nato avtoklavirali za 20 min pri 121°C.

#### **Gojišče iz konopljne vrvi**

0,5 cm debelo konopljno vrv smo najprej za 10 min namočili v vodo, nato pa vrv nekaj časa drgnili, da smo zrahljali vlakna. Posamezni kozarec za vlaganje smo napolnili z 12 m vrvi. Pokrove smo pripravili na enak način kot pri gojiščih iz bukovega/brezovega lesa. Gojišča smo nato avtoklavirali za 20 min pri 121°C.

#### **Gojišče s kamuta**

1200 g kamuta smo sprali s tekočo vodo in namočili čez noč, nato pa 30 min kuhali v 1 L vode. Nato smo po 200 g kamuta napolnili v kozarce za vlaganje, pri katerih smo pokrove pripravili kot zgoraj opisano. Gojišča smo avtoklavirali za 20 min pri 121°C.

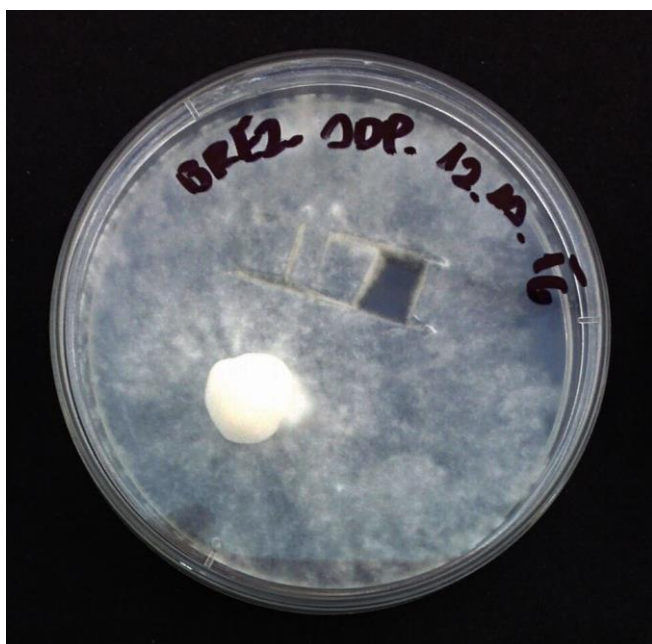
### **3.2.4 Gojenje gob**

Gobe smo za gojenje pripravili po naslednjem postopku. V gozdu nabrane gobe smo aseptično nacepili na PDA in PCA gojišča (pri velikem lovkarju kjer to ni bilo mogoče, smo na gojišče namazali sluz s sporami) in jih inkubirali pri sobni temperaturi in 60% zračni vlažnosti. Ko je na gojiščih zrasel micelij, smo s skalpelom izrezali 1x1 cm velik kos gojišča z micelijem (Slika 8) in ga prenesli na sekundarna gojišča, ki smo jih prav tako hranili pri sobnih pogojih.

Za parazitske gobe smo uporabili les posameznega drevesa katerega parazit so (bukov les za bukove parazite in brezovega za brezove) tj. gojišče iz bukovega lesa za bukovega ostrigarja, bukovo kresilko

ter pisano ploskocevko, ter gojišče iz brezovega lesa za brezovo lenzovko in brezovo odpadljivko. Za borovega glivca smo uporabili gojišče iz konoplje vrvi, kot navaja literatura (Stamets, 2005), za velikega lovkarja pa gojišče iz kamuta (Stamets, 2005; Stanley, 2010). Za posamezno gobo smo naredili 6 ponovitev.

Ko se je micelij razširil po vseh gojiščih (Slika 9), smo po 3 kozarce za vsako vrsto gobe postavili v zračen, a pred prahom zaščiten prostor, na sobno temperaturo, pri 60% zračni vlažnosti, jih odprli ter navlažili.



*Slika 8: Primer micelija brezove odpadljivke zraslega na primarnem PCA gojišču (lasten vir)*



*Slika 9: Primer micelija brezove odpadljivke zraslega na sekundarnem gojišču iz brezovega lesa (lasten vir)*

### **3.2.5 Priprava gobjega materiala za ekstrakcijo**

Pred ekstrakcijo smo gobe narezali na 0,5 cm debele kose ter jih posušili na sušilniku za sadje pri 45°C za 4 h. Gobe smo nato zmleli v fini prah, ki smo ga uporabili za pripravo ekstraktov.

Zrasle micelije oz. klobuke smo s pomočjo skalpela odstranili z gojišča ter jih prav tako posušili na sušilniku za sadje pri 45°C za 4 h. Tudi te smo s pomočjo mlinčka za kavo zmleli v fini prah, ki smo ga uporabili za pripravo ekstraktov.

### 3.2.6 Ekstrakcija

V epico smo odtehtali 0,05 g posušenega gobjega materiala, dodali 1 mL topila (destilirano vodo, 80% etanol ali 80% metanol) ter dobro pretresli. Epice smo v termobloku segrevali za 5 min pri 100°C, jih nato ohladili in pustili stati nadaljnjih 30 min. Dobljene ekstrakte smo centrifugirali, da se je gobji material posedel na dno in nato odpipetirali supernatant. Posamezni ekstrakt smo na enak način pripravili trikrat.

### 3.2.7 Priprava prekonočnih bakterijskih kultur

Iz čistih bakterijskih kultur *E. coli* oz. *B. cereus* smo s sterilno ezo aseptično odvzeli 1 kolonijo in jo prenesli v 50 mL tekočega LB gojišča. Dobro smo pretresli in inkubirali pri 37°C za 24 h. Za pripravo prekonočne kulture *S. cerevisiae* smo 0,5 g kvasa za peko natresli v 50 mL sterilnega, tekočega YEPD gojišče ter inkubirali pri sobni temperaturi za 24 h.

### 3.2.8 Metoda difuzije na trdnem gojišču z diski – preverjanje antimikrobnega učinka

Antimikrobni učinek smo preverjali s pomočjo metode difuzije na trdnem gojišču z diski. Pri tej metodi snov z diskov difundira v gojišče. Če ima snov na dan mikroorganizem antimikrobni učinek, na delu gojišča kjer je snov prisotna, bakterije ne zrastejo, kar je vidno po inhibicijskih conah. Pri večjih conah pričakujemo večji antimikrobni učinek.

Najprej smo z avtomatsko pipeto smo na trdno LB (bakterije) oz. YEPD (kvasovka) gojišče nanесли 200 µL prekonočne kulture posameznega mikroorganizma in jo s sterilno spatulo enakomerno razmazali. Na gojišče smo nato s sterilno pinceto položili 5 mm diske iz filtrirnega papirja, predhodno namočene v gobje ekstrakte. Diske smo razporedili tako, da smo na sredino petrijevke položili negativno kontrolo s topilom, okoli pa razporedili 6 diskov z istim ekstraktom. Za pozitivno kontrolo pri bakterijah smo uporabili 18 mg/mL vodno raztopino streptomicina.

Po 24 h inkubaciji na 37°C za bakterije in 48 h na sobni temperaturi za kvasovko, smo s pomočjo programa za obdelovanje slik *imageJ* izmerili velikosti nastalih inhibicijskih con v treh smereh.

### 3.2.9 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči – ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija je najnižja koncentracija antimikrobne snovi, ki inhibira vidno rast določenega mikroorganizma po prekonočni inkubaciji (Andrews, 2001). V tem poskusu smo k

mikroorganizmom pred prekonočno inkubacijo dodali različne koncentracije gobjih ekstraktov, metabolno aktivnost pa naslednji dan preverili s pomočjo indikatorja jodonitrotetrazolium vijolično. Le ta ob reakciji z NADH-jem spremeni barvo iz prozorne v vijolično, kar nakazuje metabolno aktivnost (Luo *et al.*, 2006). Če barvne spremembe ni, lahko zatorej sklepamo, da ekstrakt pri dani koncentraciji rast mikroorganizma inhibira.

### **Odstranitev topila**

Da bi preprečili antimikrobni učinek etanola, ki bi lahko vplival na rezultate, smo etanol morali najprej odstraniti, kar smo storili s pomočjo vakuumskega koncentradorja. Tako smo ekstrakte izbranih gob koncentrirali iz 1 mL na 0,1 mL in dosegli končno koncentracijo 500 mg suhega gobjega materiala / mL topila. Ker smo koncentrirali 80% etanol in etanol izhlapeva hitreje kot voda, smo najverjetneje odstranili veliko količino etanola.

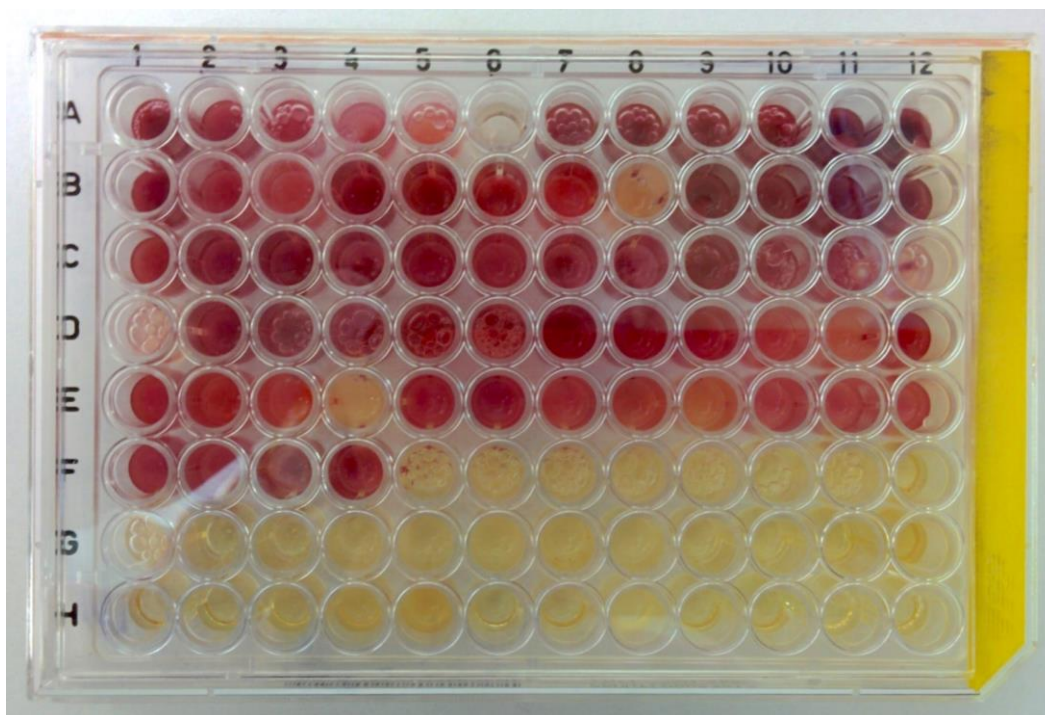
### **Priprava primernih koncentracij bakterij – redčitvena vrsta**

V 50 mL tekočega LB (za bakterije) oz. YEPD (za kvasovke) gojišča nacepili po 1 kolonijo bakterije oz. nasuli 0,5 g kvasa. Kulture smo dobro premešali in inkubirali čez noč na 37°C za bakterije in sobni temperaturi za kvasovke, s čemer smo dosegli približno koncentracijo  $2 \cdot 10^9$  CFU/mL. 1 mL teh prekonočnih kultur smo nato prenesli v 9 mL sterilne fiziološke raztopine, dobro premešali ter postopek ponovili še dvakrat, da smo dosegli koncentracijo  $2 \cdot 10^6$  CFU/mL.

### **Nastavitev poskusa**

Z mikrolitersko pipeto smo luknjice mikrotitrne plošče (Slika 10) napolnili s 100 µL sterilnega tekočega LB gojišča za bakterije in YEPD gojišča za kvasovke. Dodali smo po 5 µL suspenzije mikroorganizmov, s koncentracijo  $2 \cdot 10^6$  CFU/mL. Nato smo dodali ekstrakte nabranih in gojenih gob: brezove odpadljivke, borovega glivca ter bukove kresilke, da smo v gojiščih dosegli koncentracije 1 mg suhega gobjega materiala / mL gojišča, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL ter 100 mg/mL. Za negativno kontrolo smo gojiščem dodali le 5 µL suspenzije mikroorganizmov, v pozitivno kontrolo pa mikroorganizmov nismo dodali.

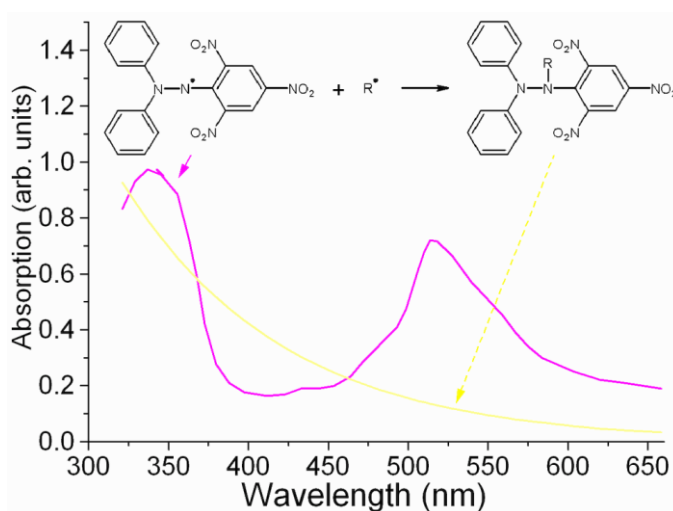
Po 24 h inkubaciji na 37°C za bakterije in sobni temperaturi za kvasovke, smo v vsako luknjico dodali 30 µL, 0,8 mM indikatorja jodonitrotetrazolium vijolično in premešali z nežnim pipetiranjem.



Slika 10: Mikrotitrna plošča z *E. coli* (A1-C8), *B. cereus* (C9-F4) ter *S. cerevisiae* (F5-H12) z različnimi koncentracijami ekstraktov brezove odpadljivke, borovega glivca in bukove kreslike ter dodanim jodnitrotetrazol vijolično indikatorjem

### 3.2.10 Metoda DPPH za določanje antioksidativne aktivnosti

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) je stabilen prosti radikal, s prostim valenčnim elektronom na enem od dušikovih atomov (Eklund *et al.*, 2005) (Slika 11). V takšnem stanju je vijolične barve, kar je vidno z značilnim absorpcijskim viškom pri okoli 515 nm. Če se DPPH veže na antioksidant, ga ta nevtralizira in barva se spremeni v blede rumeno, približno sorazmerno s količino zreagirane DPPH. Tako je mogoče antioksidativno aktivnost snovi določati spektrometrično (Sharma in Bhat, 2009).



Slika 11: Sprememba absorpcije DPPH z nevtralizacijo (wikipedia.org)

### **Priprava umeritvene krivulje s askorbinsko kislino**

Za primerjavo z gobjimi ekstrakti smo najprej naredili umeritveno krivuljo z askorbinsko kislino. Pripravili smo 0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM in 1,0 mM založne raztopine askorbinske kisline, ter 0,1 mL le teh dodali k 0,96 mL 0,2 mM raztopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila. Raztopine smo dobro premešali ter po 30 min v temi, na sobni temperaturi z UV/VIS spektrometrom izmerili absorbanco pri 515 nm. Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo nato izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{sposobnost lovljenja prostih radikalov (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbanca vzorca}}{\text{absorbanca kontrole}}\right) * 100$$

### **Nastavitev posuksa**

Podobno kot pri umeritveni krivulji smo pri nastavitvi poskusa k 0,96 mL 0,2 mM raztopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila dodali 0,1 mL gobjega ekstrakta, dobro pretresli, ter po 30 min v temi, na sobni temperaturi z UV/VIS spektrometrom izmerili absorbanco pri 515 nm. Za posamezni ekstrakt smo izvedli 5 ponovitev. Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo nato izračunali po zgoraj omenjeni enačbi, in le to primerjali s sposobnostjo različnih koncentracij askorbinske kisline.

## **3.3 Statistična obdelava podatkov**

Zaradi morebitnega inhibitornega vpliva topil (etanol, metanol) na rast mikroorganizmov pri preverjanju antimikrobnega učinka z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski, smo za ugotavljanje statistične pomembnosti rezultatov med kontrolo (topilo brez gobjega materiala) ter gobjim ekstraktom v programu Microsoft Office Excel najprej izvedli test normalnosti, da bi ugotovili, če je razporeditev podatkov normalna po Gaussovi krivulji. V skladu z pozitivnim rezultatom normalne distribucije, smo nato s pomočjo Excela izvedli dvosmerno analizo variance (ANOVA). Prav tako smo z ANOVA testom preverili statistično pomembnost razlik velikosti inhibicijskih con med ekstrakti nabranih in gojenih gob. Pomembnosti razlik smo primerjali le za etanolne in metanolne ekstrakte, saj vodni niso imeli antimikrobnega učinka. Pri tem smo razlike smatrali za statistično pomembne, če je bila P-vrednost, kot rezultat ANOVA testa manjša od 0,05. Tabele P-vrednosti so predstavljene v prilogi (Priloga 9.2).



## 4. REZULTATI

### 4.1 Gojenje gob

Pri vseh gobah smo uspeli vzgojiti micelij (Slika 13, 14, 15), pri bukovem ostrigarju in bukovi kresilki pa so zrasli tudi klobuki (Slika 16, 17).



Slika 12: Vzgojen micelij brezove odpadljivke (lasten vir)



Slika 13: Vzgojen micelij borovega glivca (lasten vir)



Slika 14: Vzgojen micelij pisane ploskocevke (lasten vir)



Slika 15: Vzgojen klobuk bukovega ostrigarja (lasten vir)

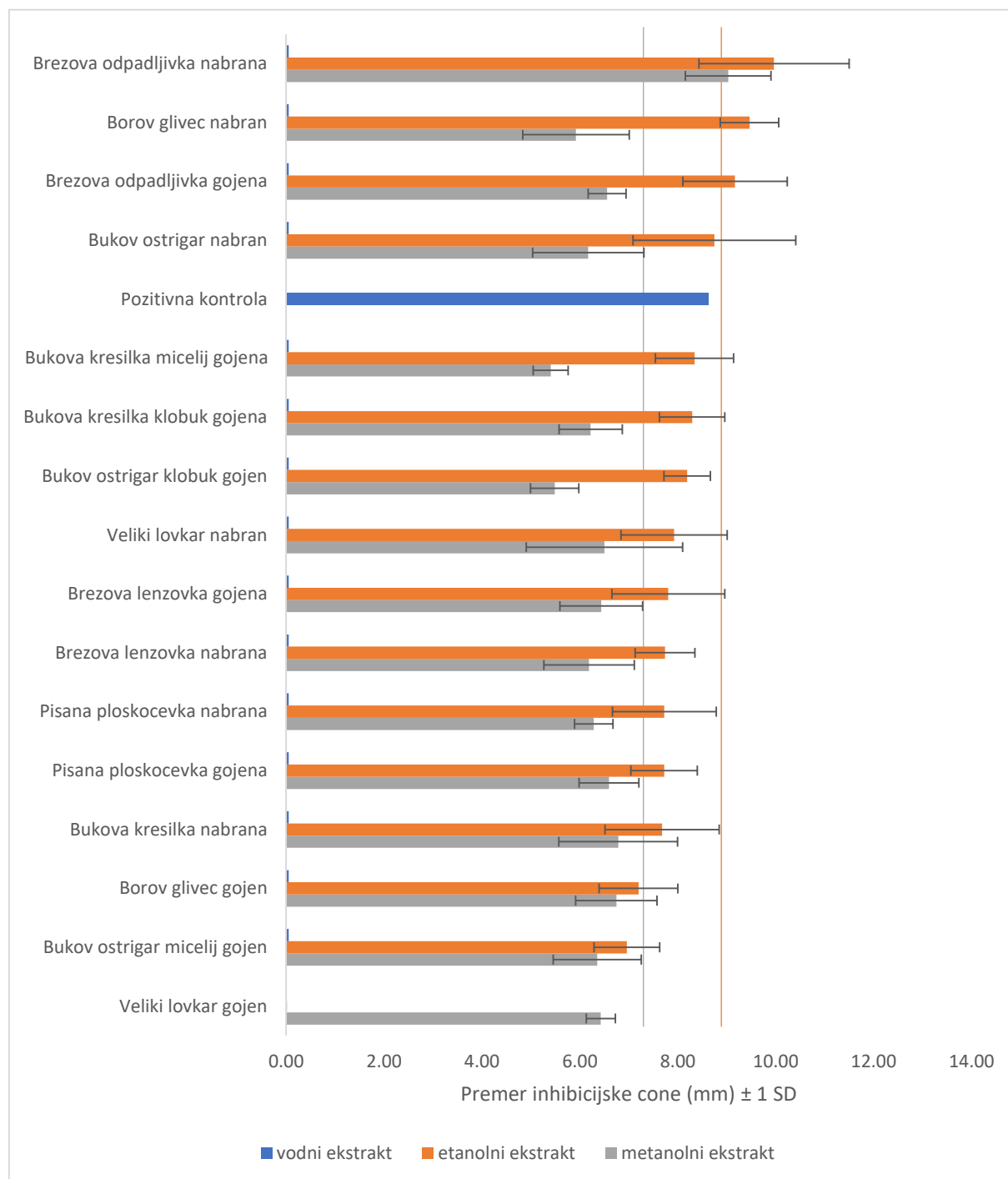


Slika 16: Vzgojen klobluk bukove kreslike (lasten vir)

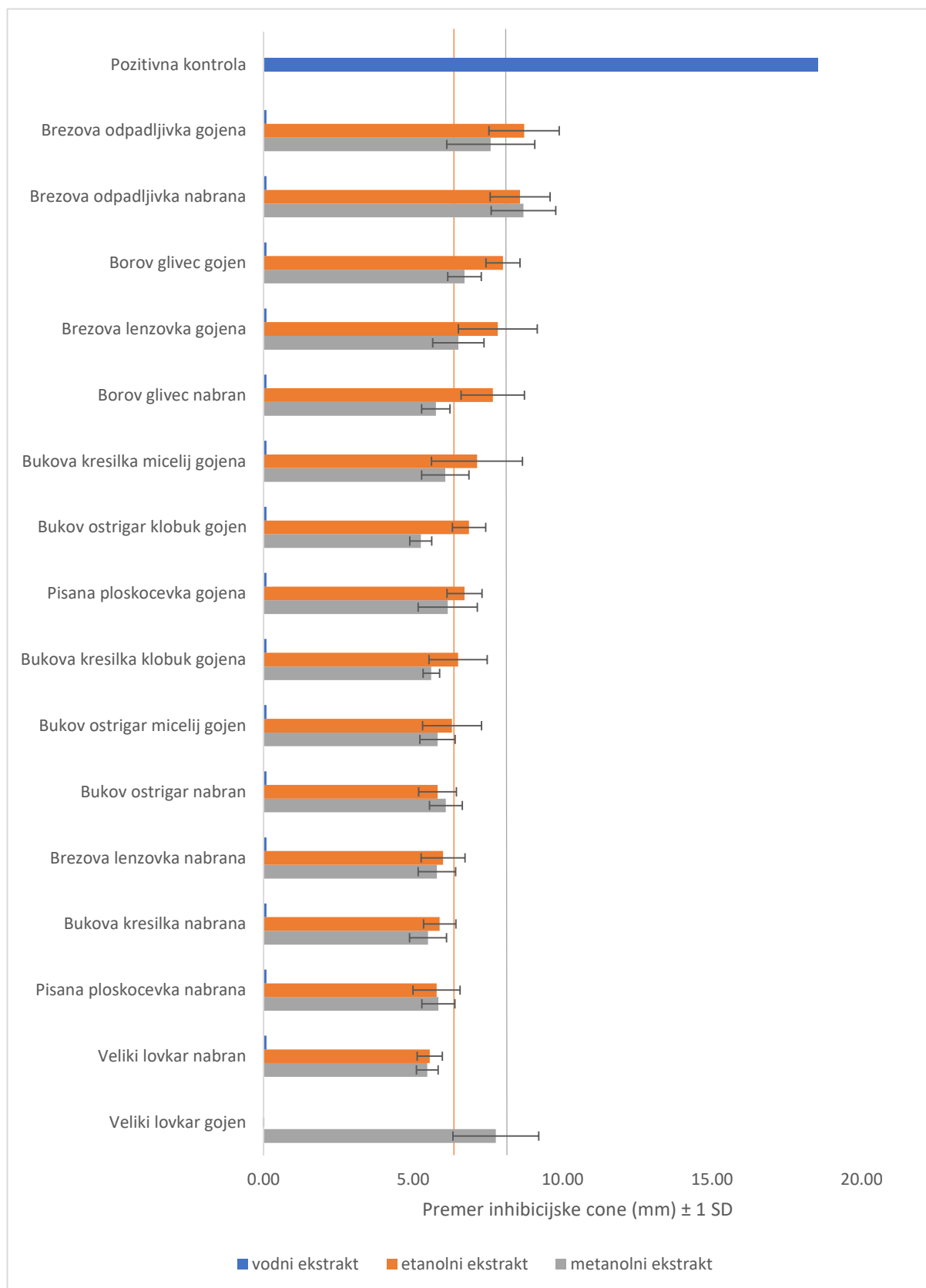


## 4.2 Rezultati metode difuzije na trdnem gojišču z diski

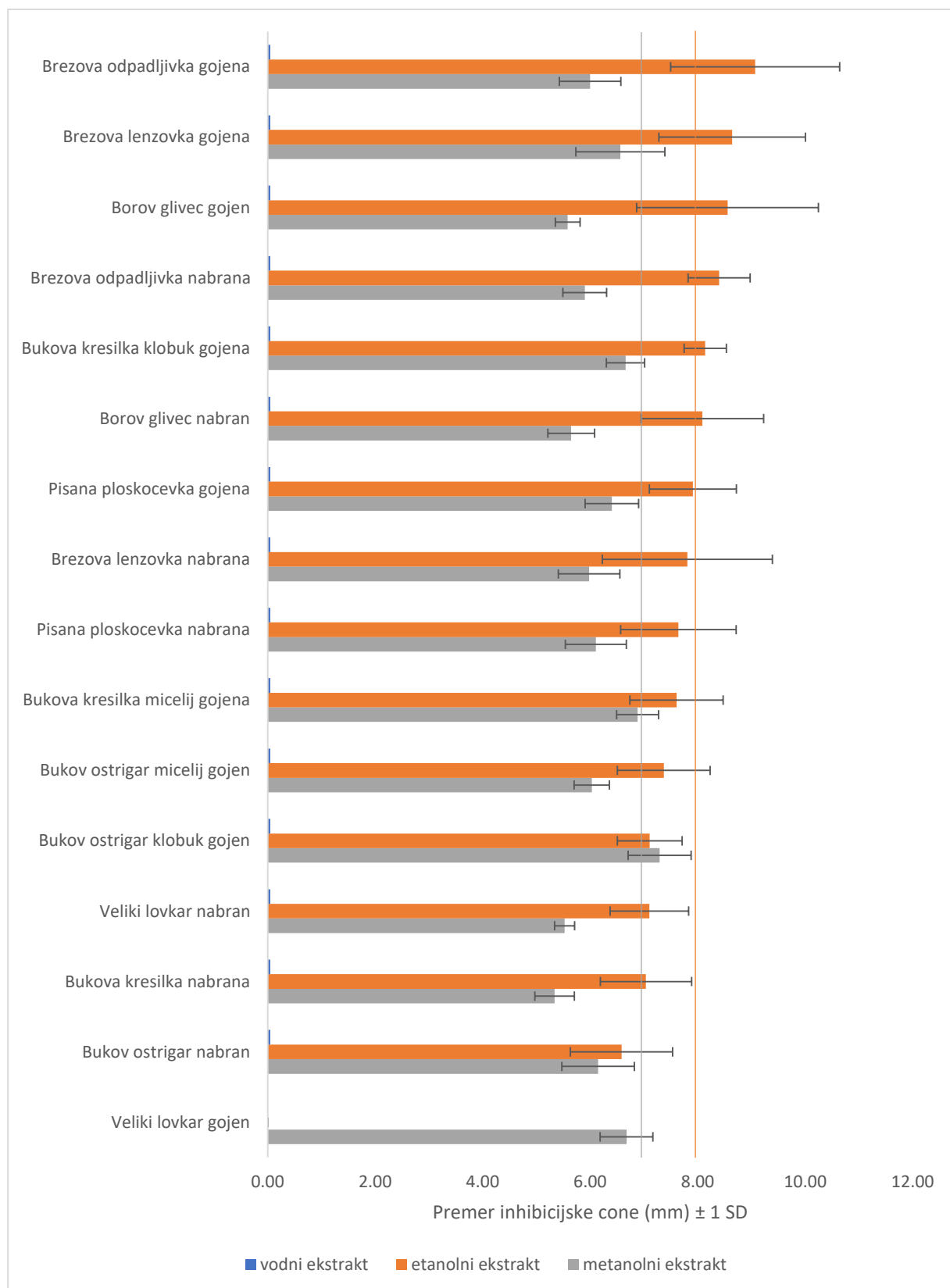
Antimikrobni učinek izkazan preko velikosti inhibicijskih con, kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski, smo kot povprečje 18 meritev  $\pm 1$  standardna deviacija, predstavili v spodnjih grafih (Graf 1, 2, 3). Tabele vseh povprečnih vrednosti se nahajajo v prilogi (Priloga 9.1).



Graf 1: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na *E. coli*, podan s premeri inhibicijskih con (mm)  $\pm 1$  SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski; navpični čri predstavljata negativni kontroli



Graf 2: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na *B. cereus*, podan s premeri inhibicijskih con (mm)  $\pm$  1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski; navpični črti predstavljata negativni kontroli



Graf 3: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na *S. cerevisiae*, podan s premeri inhibicijskih con (mm)  $\pm$  1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski; navpični črta predstavlja negativni kontroli

Inhibicijske cone pri metanolnih ekstraktih so v povprečju manjše od etanolnih in tudi razlika med samo kontrolo in ekstraktom je pri metanolnih ekstraktih manjša kot pri etanolnih. Nobeden od vodnih ekstraktov ni imel antimikrobnega učinka.

Na *E. coli* (Graf 1) so imeli največji antimikrobni učinek, z povprečno velikostjo inhibicijske cone 9 mm, ekstrakti nabrane brezove odpadljivke, razlike med nabranimi in gojenimi gobami pa so tudi statistično pomembne. Pomembno večji učinek kažejo tudi etanolni ekstrakti nabranega borovega glivca, med tem ko imajo ekstrakti gojenega glivca v primerjavi z ostalimi gobami relativno majhen inhibitorni vpliv na rast. Nabran bukov ostrigar se po učinkovitosti prav tako uvršča v prvo tretjino vseh gob. Tako gojeni klobuki kot miceliji bukove kreslike imajo, prb. 8% večje inhibicijske cone kot ekstrakti nabrane bukove kreslike ( $p > 0,05$ ), med učinkom gojenih klobukov in micelijev pa ni razlik ( $p < 0,05$ ). Pisana ploskocevka se po učinkovitosti uvršča med zadnjo tretjino, razlike med nabranimi in gojenimi gobami niso statistično pomembne.

Na *B. cereus* (Graf 2) so imeli največji antimikrobni učinek ekstrakti gojene brezove odpadljivke (Graf 2), ki jim tesno sledijo ekstrakti nabrane brezove odpadljivke, vendar pa velikosti inhibicijskih con v primerjavi z negativno kontrolo niso pomembne ( $p < 0,05$ ). Velik antimikrobni učinek kažejo tudi tako etanolni ekstrakti nabranega, kot tudi gojenega borovega glivca (gojenega nekoliko bolje), vendar pa razlike s kontrolo niso statistično pomembne. Bukova kreslika ima večji antimikrobni učinek kot nabrana, pri čemer so gojeni klobuki pomembno različni od kontrole ( $p > 0,05$ ). Gojena pisana ploskocevka je pomembno učinkovitejša od nabrane ter od kontrole. Ekstrakti bukovega ostrigarja se po učinkovitosti uvrščajo med spodnjo tretjino preizkušenih gob in so pomembno različni od kontrole le pri gojenih gobah.

Tudi na rast *S. cerevisiae* (Graf 3) je najbolj inhibitorno vplival ekstrakt gojene brezove odpadljivke, ki v primerjavi z ekstraktom nabrane gobe ni bil pomembno različen ( $p < 0,05$ ). Razlike v primerjavi z negativno kontrolo so pomembno različne ( $p > 0,05$ ). Velik pomemben učinek kažejo tudi etanolni ekstrakti borovega glivca. Podobno kot pri *B. cereus* ima tudi pri kvasovki bukova kreslika večji antimikrobni učinek kot nabrana, pri čemer so gojeni klobuki pomembno različni od kontrole ( $p > 0,05$ ). Pisana ploskocevka se po učinkovitosti uvršča na sredino preizkušenih gob, razlike med nabranimi in gojenimi gobami niso statistično pomembne, razlike med tako nabranimi kot gojenimi gobami in kontrolo pa so signifikantne. Ekstrakti bukovega ostrigarja se po učinkovitosti uvrščajo med spodnjo tretjino preizkušenih gob in so pomembno različni od kontrole le pri gojenih gobah.

Zaradi majhne količine materiala, je bilo pri gojenem lovkarju možno pripraviti le metanolni ekstrakt, le ta pa ima pri *B. cereus* in kvasovki večji antimikrobni učinek kot metanolni ekstrakt gojenega lovkarja in se z povprečjem 7,2 mm med obema mikroorganizmoma, uvršča v prvo tretjino po učinkovitosti med metanolnimi ekstrakti. Med učinkovitostjo metanolnih ekstraktov sicer ni tako velikih razlik, kot med učinkovitostjo etanolnih, vendar pa se tudi tukaj po učinkovitosti pri vseh mikroorganizmih v vrh uvrščajo ekstrakti brezove odpadljivke, borovega glivca, ter bukove kresilke; pri *B. cereus* in kvasovki je še dodatno učinkovit gojen veliki lovkar ter gojeni klobuki bukovega ostrigarja pri kvasovki ( $p < 0,05$  za vse navedene ekstrakte).

### 4.3 Rezultati metode razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči

Za etanolne ekstrakte, statistično pomembno večje od kontrole (brezova odpadljivka, borov glivec, bukova kresilka), smo za *E. coli* in *B. cereus* ugotovljali še minimalno inhibitorno koncentracijo. Poskus za *S. cerevisiae* ni uspel.

Tabela 1: Minimalne inhibitorne koncentracije (mg suhega gobjega materiala / mL tekočega gojišča) etanolnih ekstraktov nabranih gob in gojenih micelijev brezove odpadljivke, borovega glivca ter bukove kreslike, za inhibicijo rasti *E. coli* ter *B. Cereus*. Pozitivna kontrola vsebuje le ekstrakte brez bakterij, negativna pa le bakterije brez ekstraktov.

Vrsta gobe	Nabrana/gojena	MIC (mg/mL)*	
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
Brezova odpadljivka	nabrana	50	50
	gojen micelij	50	50
Borov glivec	nabran	75	75
	gojen micelij	75	50
Bukova kreslika	nabrana	nd**	nd
	gojen micelij	nd	nd
Pozitivna kontrola		nd	nd
Negativna kontrola		nd	nd

\*mg suhega gobjega materiala / mL tekočega gojišča

\*\*ni določeno

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) tako gojene kot nabrane brezove odpadljivke je bila za obe bakteriji 50 mg suhega materiala / mL tekočega gojišča, kar nekoliko odstopa od rezultatov metode difuzije na trdnem gojišču z diski, kjer je bila med ekstrakti gojenih in nabranih gob pri *B. cereus* vidna

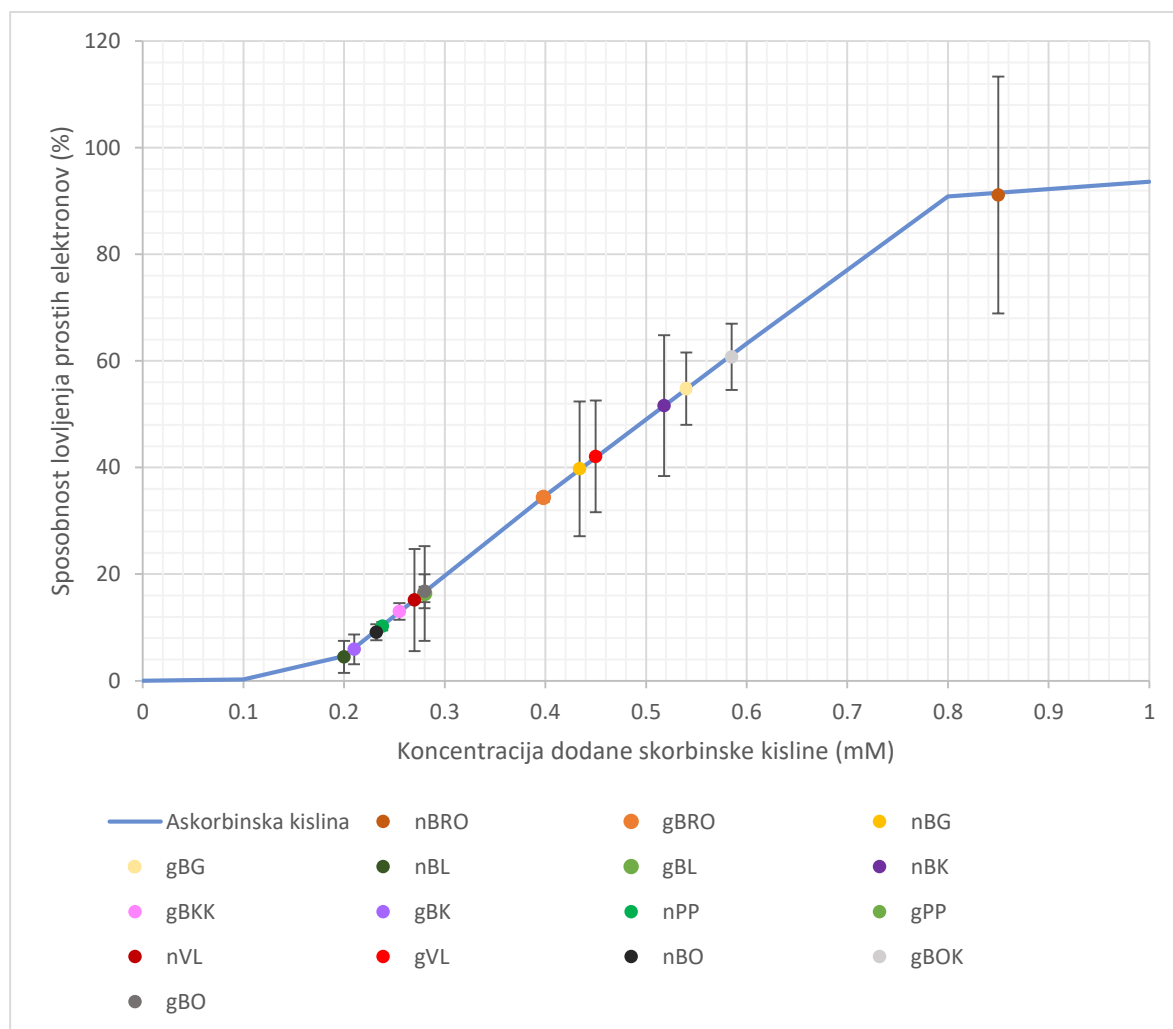
razlika v učinkovitosti. Za borovega glivca je bila pri MIC v večini primerov nekoliko večja – 75 mg/mL. Za *E. coli* pri le tej med ekstrakti gojenih in nabranih gob ni bilo razlik, kar se sklada tudi z rezultati metode difuzije na trdnem gojišču z diski, kjer so bile razlike med gojenim in nabranim borovim glivcem nepomembne ( $p < 0,05$ ). Za *B. cereus* je bila MIC gojenih micelijev 25 mg/mL manjša kot pri nabranih gobah, kar se ujema z velikostmi inhibicijskih con iz prejšnjega poskusa ( $p > 0,05$ ). Zaradi previsokih potrebnih koncentracij in pomanjkanja količine ekstrakta, za bukovo kresilko MIC nismo mogli določiti, lahko pa sklepamo, da je le ta višja kot pri brezovi odpadljivki in borovem glivcu, kar je v skladu z rezultati prej omenjenega poskusa, kjer so bile inhibicijske cone kreslike manjše od con preostalih dveh gob.

#### **4.4 Rezultati metode DPPH**

Iz absorbance 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila z dodanimi različno-koncentriranimi raztopinami askorbinske kisline smo za posamezno koncentracijo izračunali povprečje 3 meritev. Iz le te smo nato izračunali sposobnost lovljenja prostih radikalov (Graf 4) in narisali umeritveno krivuljo. Podobno smo iz povprečja 5 meritev za posamezni gobji ekstrakt izračunali sposobnost lovljenja prostih radikalov in vrednosti umestili na prej omenjeno umeritveno krivuljo.

Največjo sposobnost lovljenja prostih radikalov je izkazala nabrana brezova odpadljivka, ki je primerljiva z 0,8 mM askorbinsko kislino in je z 92% kar 30% večja od sposobnosti naslednje-uvrščenih gojenih klobukov bukovega ostrigarja. V primerjavi z njo, je gojena brezova odpadljivka izkazala le 34% sposobnost, primerljivo z 0,4 mM askorbinsko kislino - kar dvakrat manj od ekstrakta nabrane odpadljivke. Sledijo ekstrakti gojenega borovega glivca s sposobnostjo primerljivo z 0,55 mM askorbinsko kislino, nabrane bukove kresilke s sposobnostjo primerljivo z 0,5 mM askorbinsko kislino, gojenega lovkarja s sposobnostjo primerljivo z 0,45 mM askorbinsko kislino ter nabranega borovega glivca z rahlo manjšo sposobnostjo. Preostali ekstrakti se gibljejo med sposobnostjo lovljenja prostih radikalov, primerljivo z 0,2 – 0,4 mM askorbinsko kislino.

Med tem ko imata nabrana brezova odpadljivka in bukova kresilka večji antioksidativni učinek kot gojene gobe iste vrste, je sposobnost lovljenja prostih radikalov pri gojenih gobah preostalih vrst večja kot pri nabranih.



Graf 4: Umeritvena krivulja sposobnosti lovljenja prostih radikalov različnih koncentracij askorbinske kisline z etanolnimi ekstrakti nabranih (nXX) in gojenih micelijev (gXX) ter klobukov (gXXK) brezove odpadljivke (BRO), borovega glivca (BG), brezove lenzovke (BL), bukove kresikle (BK), pisane ploskocevke (PP), velikega lovkarja (VL) in bukovega ostrigarja (BO)

## 5. DISKUSIJA

Pri vseh gobah smo uspeli vzgojiti micelij, klobuki pa so zrasli le pri bukovem ostrigarju in bukovih kresilkah in sicer v odprtem prostoru z vlaženjem. Vzrok za to so najverjetneje pogoji za rast, ki za vse gobe niso bili optimalni in bi jih bilo potrebno prilagoditi posamezni vrsti gobe. Vsekakor bi bilo potrebno gobe dodatno navlažiti oz. hraniti v prostoru z višjo zračno vlago, saj so se nekatere čez nekaj časa posušile, kar je vsekakor zaviralo rast. Prav tako bi lahko dodatno prilagodili temperaturo. Optimalna temperatura za rast ostrigarja npr., leži med 10 in 21 °C (goba.eu, 2017) V nekaterih člankih navajajo tudi dodajanje hranil. Pleszczyńska *et al.* (2016) npr., dodajajo saharozo, otrobe, mleto koruzo, sojin prašek, rž in druge žitarice, da bi pospešili rast in povečali izkoristek brezove odpadljivke. Dodatno vata zaradi premajhne izmenjevalne površine morda ni dopuščala zadostnega pretoka zraka in je s tem upočasnila oz. onemogočila rast. V prihodnje bi bilo potrebno narediti večjo luknjo ali pa uporabiti filter z večjo propustnostjo za zrak. S temi rezultati je naša prva hipoteza, da bomo gobe lahko gojili in vitro, delno potrjena, saj smo pri vseh gobah uspeli vzgojiti micelije, klobuke pa le pri dveh. Vendar pa ni nujno, da miceliji ne vsebujejo primerljivo oz. enako učinkovitih aktivnih snovi kot klobuki.

Pri metodi difuzije na trdnem gojišču z diski so antimikrobni učinek na *E. coli*, pomembno večji od kontrole, izkazali etanolni ekstrakti nabranega borovega glivca ter etanolni ekstrakt gojene brezove odpadljivke. Rast *B. cereus* so pomembno inhibirali etanolni ekstrakti tako micelijev kot klobukov gojene bukovih kresilk, klobukov gojenega bukovega ostrigarja in gojene pisane ploskocevke, ter metanolni ekstrakti gojene brezove odpadljivke in gojenega velikega lovkarja. Antimikrobni učinek pomembno večji od kontrole so na *S. cerevisiae* izkazali etanolni ekstrakti nabranega in gojenega borovega glivca, gojenih klobukov bukovih kresilk, nabrane brezove odpadljivke ter gojene pisane ploskocevke, kot tudi metanolni ekstrakti klobukov gojenega bukovega ostrigarja. Nobeden od vodnih ekstraktov ni imel antimikrobnega učinka, kar skupaj z podatkom o topnosti v etanolu oz. metanolu nakazuje, da so pridobljene učinkovine najverjetneje nepolarne. Prav tako, bi to v bolj praktičnem smislu pomenilo, da kuhanje čaja ni učinkovita metoda ekstrakcije zdravilnih aktivnih snovi. Dobljeni rezultati potrjujejo našo drugo hipotezo, saj so nekateri od ekstraktov imeli antimikrobni učinek na *E. coli*, *B. cereus* ter *S. cerevisia*, prav tako pa tudi tretjo hipotezo, saj so med učinki etanolnih, metanolnih ter vodnih ekstraktov iste gobe razlike v antimikrobnem učinku.



Pri ekstraktih brezove odpadljivke, je imela na *E. coli* večji antimikrobni učinek gojena goba, vendar razlika ni bila statistično pomembna. Pri *B. cereus* in *S. cerevisiae* so imeli ekstrakti gojene odpadljivke pomembno močnejši antimikrobni učinek kot ekstrakti nabrane odpadljivke. Ugotovitev se z rezultati ugotavljanja minimalne inhibitorne ekstrakcije ne sklada čisto, saj so bile tam MIC tako za *E. coli* kot za *B. cereus* pri nabranih in gojenih gobah enake. Ker naš rezultat o antimikrobnem učinku nabrane brezove odpadljivke potrjujejo tudi druge raziskave (Schlegel *et al.*, 2000; Suay *et al.*, 2000), ti rezultati vsekakor pomenijo, da je za pridobivanje antimikrobnih učinkovin gojenje micelija vsaj enako učinkovito (*E. coli*) oz. celo bolje (*B. cereus*, *S. cerevisiae*) kot nabiranje gobe v gozdu. Iz literature pa lahko sklepamo, da je snov odgovorna za antimikrobni učinek pri brezovi odpadljivki, zelo verjetno piptamin (Schlegel *et al.*, 2000).

Podobno je bilo tudi pri borovem glivcu. Tudi tukaj med učinki na *E. coli* ni pomembnih razlik, antimikrobni učinek ekstraktov gojenih gob pa je na *B. cereus* ter *S. cerevisiae* pomembno višji. Antimikrobni učinek nabranih glivcev so ugotovile tudi druge raziskave (Keller *et al.*, 2002), kar ponovno nakazuje na enako učinkovitost gojenih gob z antimikrobnega stališča v primerjavi z nabranimi. Kar se tiče samih aktivnih substanc odgovornih za antimikrobni učinek, bi pri borovem glivcu to lahko bile majhne aromatske spojine z obroči, kot so metil-2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoat (Kimura, 2013). Naši rezultati nakazujejo, da je te snovi težko ekstrahirati z vodo, z alkoholom pa je bila ekstrakcija uspešna. Morda bi bil zaradi tega izid ekstrakcije z bolj koncentriranim etanolom oz. metanolom, morda celo drugim nepolarnim topilom višje koncentracije kot je aceton, uspešnejši.

Pri bukovi kresilki so bile razlike v antimikrobnem učinku med nabranimi gobami, gojenimi klobuki ter gojenimi micelijami na *E. coli* statistično pomembne, na *B. cereus* ter *S. cerevisiae* pa nepomembne. Največji antimikrobni učinek so na bakteriji imeli ekstrakti gojenih micelijev, ki so jim sledili ekstrakti gojenih klobukov, na kvasovko pa so največji antimikrobni učinek imeli ekstrakti nabrane bukove kresilke, kar ponovno nakazuje, da so gojene gobe v primerjavi z nabranimi, v smislu antimikrobnega učinka učinkovitejše. Tudi antimikrobno aktivnost bukove kresilke potrjujejo druge raziskave (Suay *et al.*, 2000) in kot potencialni vir antimikrobnega učinka navajajo melanin-glukan kompleks (Senyuk *et al.*, 2011). Na podlagi teh podatkov lahko četrto hipotezo, ki je predvidevala razlike v antimikrobnih učinkih med gojenimi in nabranimi gobami iste vrste potrdimo.

Pri ekstraktih preostalih gob so bile velikosti inhibicijskih con po večini manjše od kontrole, razlike v primerjavi z kontrolo pa so bile statistično nepomembne, kar pa ni v skladu z ostalimi raziskavami, ki za

bukovega ostrigarja (Gunde-Cimerman, 1999), brezovo lenzovko (Liu *et al.*, 2014) ter velikega lovkarja (Pohleven, 2015), navajajo antimikrobne lastnosti. Do razlike bi lahko prišlo zaradi tega, ker so bile naše gobe preprosto že prestare, da bi še vsebovale zdravilne učinkovine, še verjetneje pa, uporabljena ekstrakcijska metoda ni bila primerna za vsebovane aktivne snovi zgoraj navedenih gob, bodisi zaradi topil, bodisi zaradi prekratkega ekstrakcijskega časa ali pa prenizke temperature.

Nekateri ekstrakti, kot npr. etanolni ekstrakti micelijev in klobukov gojene bukove kresilke, nabrane brezove lenzovke ter nabranih in gojenih klobukov bukovega ostrigarja pri *E. coli*, gojenega bukovega ostrigarja pri *B. cereus* ter gojenih klobukov in micelijev bukovega ostrigarja, nabrane pisane ploskocevke in nabrane bukove kresilke pri *S. cerevisiae*, so imele inhibicijske cone sicer manjše od negativne kontrole, vendar pa so razlike med njimi in kontrolo vseeno statistično pomembne, kar je zanimivo. Morda je bil material določenih gob bolj suh kot pri ostalih in je nase vezal nekaj etanola, zaradi česar je bil delež le tega v ekstraktu po odstranitvi suhe mase manjši. Še verjetneje je, da je nekaj etanola med pripravo ekstraktov izhlapelo, vendar pa lahko le ugibamo in za ustrežnejšo razlago bi bile vsekakor potrebne nadaljnje raziskave.

Največja omejitev uporabljene metode je zagotovo prisotnost topila v ekstraktih (80% etanol in 80% metanol), ki je na rast izbranih mikroorganizmov delovalo inhibitorno. Prav zaradi tega smo izvedli test statistične pomembnosti ANOVA ter ugotavljali še minimalno inhibitorno koncentracijo ekstraktov s statistično pomembnim antimikrobnim učinkom, tokrat brez topil, da bi lahko učinek topila izključili. Topil za metodo difuzije na trdnem gojišču z diski nismo mogli izpariti, saj nekateri koncentradi (npr. koncentrat brezove odpadljivke) postanejo zelo gosti in jih ne bi bilo mogoče posrkati v diske. Rešitev bi sicer lahko bilo drugo topilo brez antimikrobnega učinka, kot je npr. DMSO, vendar le to ni bilo na voljo. Faktor, ki bi pri tej metodi prav tako lahko vpliva na rezultate, je hitrost difuzije topila skozi gojišče, vendar pa to v našem primeru najverjetneje ni pomembno vplivalo na rezultate, saj smo med seboj primerjali le ekstrakte z istimi topili. Iz velike standardne deviacije inhibicijskih con nekaterih ekstraktov lahko sklepamo, da je do razlik prišlo bodisi pri ekstrakciji, še bolj verjetno pa je, da vsi diski niso vsebovali enake količine ekstrakta. V prihodnje bi lahko za preprečitev slednjega na disk z mikrotitrsko pipeto nanесли določeno količino ekstrakta. Dodatno so bili diski zaradi načina izrezovanja neenakomerno oblikovani in na robovih neenakomerno stisnjeni, kar bi lahko vplivalo na absorpcijo in kasnejšo oddajo topila. Največja pomanjkljivost pri razredčevanju na mikrotitrski plošči je bila, da nismo imeli zadostne količine ekstrakta in nismo naredili več ponovitev. Pri bukovi kresilki bi bile za ugotovitev MIC vsekakor potrebne še višje koncentracije.

Rezultati metode DPPH za določanja antioksidativnega učinka etanolnih ekstraktov gob so pokazali največjo sposobnost lovljenja prostih radikalov pri nabrani brezovi odpadljivki, primerljivo z 0,8 mM askorbinsko kislino. Sledili so klobuki gojenega bukovega ostrigarja, gojena brezova odpadljivka, gojen borov glivec, nabrana bukova kresilka, gojeni veliki lovkar ter nabran borov glivec. Kot možen antioioksidant v brezovi odpadljivki viri navajajo protokatekujsko kislino ter p-hidroksi benzoično kislino (Sulkowska-Ziaja *et al.*, 2012), ki sta obe dobro topni v etanolu, kar se z našimi ugotovitvami sklada, saj smo za poskus uporabili etanolne ekstrakte. Za gobe *Pleurotus* (ostrigarji) so ugotovili vsebnost protokatekujске kisline, galne kisline ter nekaterih fenolov (Oskoueian *et al.*, 2011), ki so ponovno dobro topni v alkoholih, ter bi lahko bili odgovorni za antioksidativni učinek gobe. Tudi v ekstraktih borovega glivca so našli visoke koncentracije fenolnih spojin (Joshi in Sagar, 2014). Rezultati našo hipotezo o vsebnosti antioksidativnih snovi v nekaterih gobah, ki jih možno ekstrahirati z enostavno ekstrakcijsko metodo, potrjuje.

Med tem ko sta imeli nabrana brezova odpadljivka in bukova kresilka večji antioksidativni učinek kot gojene gobe iste vrste, je bila sposobnost lovljenja prostih radikalov pri gojenih gobah preostalih vrst večja kot pri nabranih. Možno je, da imajo ekstrakti teh gojenih gob dejansko večji antioksidativni učinek, možno pa ja tudi, da so bile nabrane gobe že prestare ali pa so se antioksidativne snovi izgubile z zmrzovanjem/shranjevanjem/preparacijo. Vsekakor so tako klobuki bukove kresilke kot klobuki bukovega ostrigarja pokazali večjo antioksidativno spobnost kot micelij iste vrste, kar bi lahko kazalo na to, da v nasprotju z antimikrobnimi, gobe antioksidativne snovi začnejo proizvajati komaj v poznejših stadijih rasti. Dobljeno potrjuje našo hipotezo o razlikah v vsebnosti antioksidativnih snovi med nabranimi in gojenimi gobami, rezultati pa nakazujejo potencial gob kot naravnih antioksidantov, vendar pa bi bile za primerljivost rezultatov med nabranimi ter gojenimi gobami potrebne še nadaljnje raziskave, narejene s svežimi, in ne zmrznjenimi, nabranimi gobami.

## 6. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se nanašajo na osnovna načela družbene odgovornosti.

Zaradi prekomernega nabiranja in človeškega vpliva na okolje so že danes ogrožene nekatere populacije gliv v naravi. Primer take zdravilne gobe je lekarniška macesnovka (*Laricifomes officinalis*). Z izsledki naše naloge tega problema sicer ne bomo rešili, lahko pa domača vzgoja gob že samo z osveščanjem zagotovo pripomore k ohranitvi naravnih populacij.

Samega raziskovanja smo se lotili skrbno in odgovorno. Pri nabiranju gob smo pazili, da preostalih gob in njihovega naravnega okolja nismo po nepotrebnem poškodovali. Na koncu izvedenih poskusov smo vse mikroorganizme ter z njimi kontaminirana gojišča sterilizirali in primerno odstranili. Prav tako smo primerno odstranili odpadne kemikalije. S primerno zaščitno opremo smo poskrbeli tudi za varnost pri delu, da pri izvedbi naloge nismo ogrožali sebe in drugih.

## 7. ZAKLJUČEK

Cilj naloge je bil ugotoviti ali je mogoče zdravilne gobe nabrane v domačem gozdu (brezova odpadljivka, brezova lenzovka, borov glivec, bukova kresilka, bukov ostrigar, pisana ploskocevka in veliki lovkar) gojiti pod laboratorijskimi pogoji oz. pogoji, ki si jih lahko ustvarimo doma, ali imajo gojene gobe antimikrobni oz. antioksidativni učinek ter ali je le ta primerljiv z učinkom nabranih gob.

Ugotovili smo, da je pri vseh izbranih gobah možno gojiti micelije, pri bukovem ostrigarju in bukovi kresilki pa smo uspeli vzgojiti tudi klobuke.

Antimikrobni učinek na *E. coli* so imeli etanolni ekstrakti nabranega borovega glivca ter etanolni ekstrakt gojene brezove odpadljivke. Rast *B. cereus* so zavirali etanolni ekstrakti tako micelijev kot klobukov gojene bukove kresilke, klobukov gojenega bukovega ostrigarja in gojene pisane ploskocevke, ter metanolni ekstrakti gojene brezove odpadljivke in gojenega velikega lovkarja, rast *S. cerevisiae* pa so inhibirali etanolni ekstrakti nabranega in gojenega borovega glivca, gojenih klobukov bukove kresilke, nabrane brezove odpadljivke ter gojene pisane ploskocevke, kot tudi metanolni ekstrakti klobukov gojenega bukovega ostrigarja. Vodni ekstrakti niso imeli antimikrobnega učinka. Minimalne inhibitorne koncentracije za bakterije so se za brezovo odpadljivko gibale okoli 50 mg suhe gobje mase / mL gojišča, za borovega glivca pa okoli 75 mL. Pomembne razlike v antimikrobnem učinku med ekstrakti gojenih in nabranih gob, večje od kontrole, smo opazili pri učinku etanolnih ekstraktov brezove odpadljivke ter borovega glivca na *B. cereus* ter *S. cerevisiae*. Tam so imele gojene gobe večji učinek in pri vplivu etanolnih ekstraktov bukove kresilke na *E. coli*, kjer so imeli gojeni miceliji večji antimikrobni učinek kot gojeni in nabrani klobuki. Podatek govori v prid gojenju teh gob.

Največji antioksidativni učinek so pokazali etanolni ekstrakti nabrane brezove odpadljivke, klobuki gojenega bukovega ostrigarja, gojene brezove odpadljivke, gojenega borovega glivca ter nabrane bukove kresilke. Razen pri brezovi odpadljivki in bukovi kresilki so bili tudi tukaj antioksidativni učinki gojenih gob večji od nabranih, kar ponovno govori v prid gojenju gob, v nasprotju z nabiranjem v gozdu.

V prihodnje bi se bilo zanimivo osredotočiti na eno od gob (npr. brezovo odpadljivko) in optimirati ekstrakcijske metode za ekstrakcijo antimikrobnih in antioksidativnih učinkovin. Prilagajali bi lahko

topila, čas ekstrakcije ter temperaturo. Prav tako bi bilo zanimivo z metodo HPLC ločiti posamezne ekstrakte na frakcije in bodisi z masnim spektrometrom, bodisi z infrardečim spektrometrom ugotoviti kemijsko sestavo posameznega eluenta, njegove antimikrobne in antioksidativne učinke ter kako se količina in vrsta ekstrahiranih snovi razlikuje z uporabo različnih topil. V nadaljnjem bi lahko ugotavljali tudi vpliv rizičnih faktorjev, kot so prisotnost določenih mikroorganizmov oz. drugih gliv na produkcijo antimikrobnih učinkovin.

Vsekakor rezultati naše raziskovalne naloge predstavljajo vzpodbudne ugotovitve za gojenje izbranih gob v medicinske namene, tako v laboratorijskem kot tudi domačem okolju.

## 8. VIRI IN LITERATURA

Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), pp.5-16.

Capasso L. 1998. 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *Lancet*, 352, 9143: 1864.

Eklund, P., Långvik, O., Wärnå, J., Salmi, T., Willför, S. and Sjöholm, R. (2005). Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(18), p.3336.

gobe.si. (2017). Piptoporus betulinus, brezova odpadljivka - Gobarsko društvo Lisička Maribor. [online] Available at: <http://www.gobe.si/Gobe/PiptoporusBetulinus> [Accessed 5 Feb. 2017].

Grienke U., Zöll M., Peintner U., Rollinger J.M. 2014. European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 3: 564–583.

Gunde-Cimerman N. 1999. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P.Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 1: 69–80.

Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B., Maeda, Y., Goldsmith, C., Rooney, P., Loughrey, A., Rao, J. and Moore, J. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(1), pp.5-7.

Hobbs C. 1986. Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing, & culture. Summertown, TN, Botanica Press.

Hudson, H. (1986). Fungal biology. 1st ed. London: Edward Arnold.

Jayakumar, T., Ramesh, E. and Geraldine, P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12), pp.1989-1996.

Kalyoncu, F., Oskay, M. and Kayalar, H. (2010). Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology*, 1(3), pp.195-199.

Kamo T., Asanoma M., Shibata H., Hirota M. 2003. Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*. *Journal of Natural Products*, 66, 8: 1104–1106.

Keller, C., Maillard, M., Keller, J. and Hostettmann, K. (2002). Screening of European Fungi for Antibacterial, Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal, Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities and Subsequent Isolation of Bioactive Compounds. *Pharmaceutical Biology*, 40(7), pp.518-525.

Khatun K., Mahtab H., Khanam P.A., Sayeed M.A., Khan K.A. 2007. Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subjects. *Mymensingh Medical Journal*, 16, 1: 94–99.

Kidd P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, 5, 1: 4–27.

Kim, M., Seguin, P., Ahn, J., Kim, J., Chun, S., Kim, E., Seo, S., Kang, E., Kim, S., Park, Y., Ro, H. and Chung, I. (2008). Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), pp.7265-7270.

Kimura T (2013) Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Saprasia crispa*. *BioMed Research International*, DOI: 10.1155/2013/982317

Liu K, Wang J-L, Gong W-Z, Xiao X, Wang Q (2012) Antioxidant Activities In Vitro of Ethanol Extract and Fractions from Mushroom, *Lenzites Betulina*. *Journal of Food Biochemistry*, 37(6):687-693

Liu K, Wang J-L, Zhao L, Wang Q (2014) Anticancer and Antimicrobial Activities and Chemical Composition of the Birch Mazegill Mushroom *Lenzites betulina* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(4): 327-337



Lull, C., Wichers, H. and Savelkoul, H. (2005). Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. *Mediators of Inflammation*, 2005(2), pp.63-80.

Luo, C., Wang, X., Long, J. and Liu, J. (2006). An NADH-tetrazolium-coupled sensitive assay for malate dehydrogenase in mitochondria and crude tissue homogenates. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 68(2), pp.101-111.

Majtan J. 2012. Pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*): An effective nutritional supplement against upper respiratory tract infections? *Medicine and Sport Science*, 59: 57–61.

Mau, J., Lin, H. and Chen, C. (2002). Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), pp.6072-6077.

Molitoris, H. (1994). Mushrooms in medicine. *Folia Microbiologica*, 39(2), pp.91-98.

Peintner, U., Pöder, R. and Pümpel, T. (1998). The iceman's fungi. *Mycological Research*, 102(10), pp.1153-1162.

Pleszczyńska, M., Wiater, A., Siwulski, M., Lemieszek, M., Kunaszewska, J., Kaczor, J., Rzeski, W., Janusz, G. and Szczodrak, J. (2016). Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9).

Pohleven F (2015) Veliki lovkar - nenavadna smrdeča goba. *Les : revija za lesno gospodarstvo*, 61 (11/12). str. 472.

R. Siepmann, "Wachstumshemmung von Stammfaulepilzen und von *Gremmeniella abietina* durch *Bacillus subtilis*," *European Journal of Forest Pathology*, vol. 17, pp. 59–64, 1987

Robles-Hernández L., Cecilia-González-Franco A., Soto-Parra J.M., Montes-Domínguez F. 2008. Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms. *Tecnociencia Chihuahua*, 2, 2: 95–107.

S. Woodward, H. Y. Sultan, D. K. Barrett, and R. B. Pearce, "Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees," *Journal of General Microbiology*, vol. 139, no. 1, pp. 153–159, 1993

Sarkar, S., Koga, J., Whitley, R. and Chatterjee, S. (1993). Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, 20(4), pp.293-303.

Schlegel B., Luhmann U., Härtl A., Gräfe U. 2000. Piptamine, a new antibiotic produced by *Piptoporus betulinus* Lu 9-1. *The Journal of Antibiotics*, 53, 9: 973–974.

Seniuk O.F., Gorovoj L.F., Beketova G.V., Savichuk N.O., Rytik P.G., Kucherov I.I., Prilutskaya A.B., Prilutsky A.I. 2011. Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (Aphyllphoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13, 1: 7–18.

Sharma, O. and Bhat, T. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), pp.1202-1205.

Stamets, P. (2005). Antipox Properties of *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Singer (Agarikon) from the Pacific Northwest of North America. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(3), pp.495-506.

Stamets, P. (2005). *Mycelium running*. 1st ed. Berkeley, Calif.: Ten Speed Press.

Stanley, H. (2010). Effect of substrates of spawn production on mycelial growth of Oyster mushroom species. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(5), pp.817-820.

Suay, I. (2000). *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2), pp.129-140.

Sulkowska-Ziaja, K., Muszynska, B., Motyl, P., Pasko, P. and Ekiert, H. (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Some Species of Polyporoid Mushrooms from Poland. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(4), pp.385-393.

TePLYakova TV, Psurtseva NV, Kosogova TA, Mazurkova NA, Khanin VA, Vlasenko VA. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *Int J Med Mushrooms*. 2012;14(1):37-45.

uradni-list.si. (2017). *Uradni list - Vsebina Uradnega lista*. [online] Available at: <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/7610> [Accessed 5 Feb. 2017].

Voda K, Boh B, Vrtačnik M, Pohleven F (2003) Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(1): 51–59

Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), pp.258-274.

Woodward, S., Sultan, H., Barrett, D. and Pearce, R. (1993). Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. *Journal of General Microbiology*, 139(1), pp.153-159.

Wu, M., Cheng, T., Cheng, S., Lian, T., Wang, L. and Chiou, S. (2006). Immunomodulatory Properties of *Grifola frondosa* in Submerged Culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), pp.2906-2914.

Yu, Z., Ming, G., Kaiping, W., Zhixiang, C., Liquan, D., Jingyu, L. and Fang, Z. (2010). Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, 81(8), pp.1163-1170.

Zhang, Y., Geng, W., Shen, Y., Wang, Y. and Dai, Y. (2014). Edible Mushroom Cultivation for Food Security and Rural Development in China: Bio-Innovation, Technological Dissemination and Marketing. *Sustainability*, 6(5), pp.2961-2973.

## 9. PRILOGE

### 9.1 Velikosti inhibicijskih con kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski

Tabela 2: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na *E. coli*, podan s premeri inhibicijskih con (mm)  $\pm$  1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski

Vrsta gobe	Nabrana/gojena	Cona inhibicije (mm) $\pm$ 1 SD		
		Vrsta ekstrakta		
		vodni	etanolni	metanolni
Borov glivec	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	9,5 $\pm$ 1,5	5,9 $\pm$ 0,9
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 0,8
Bukova kresilka	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 1,2	6,8 $\pm$ 1,2
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	8,3 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 0,4
	gojen klobuk	0,0 $\pm$ 0,0	8,3 $\pm$ 0,7	6,2 $\pm$ 0,6
Brezova lenzovka	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,9
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	7,8 $\pm$ 1,2	6,4 $\pm$ 0,8
Bukov ostrigar	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	8,7 $\pm$ 1,1	6,2 $\pm$ 0,4
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,9
	gojen klobuk	0,0 $\pm$ 0,0	8,2 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,5
Brezova odpadljivka	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,9	9,0 $\pm$ 2,0
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	9,2 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 1,1
Pisana ploskocevka	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 1,1	6,3 $\pm$ 0,4
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 0,7	6,6 $\pm$ 0,6
Veliki lovkar	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	7,9 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 1,6
	gojen micelij	/	/	6,4 $\pm$ 0,3
Negativna kontrola		0,0 $\pm$ 0,0	8,9 $\pm$ 1,7	5,9 $\pm$ 1,1

Tabela 3: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na *B. cereus*, podan s premeri inhibicijskih con (mm)  $\pm$  1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski

Vrsta gobe	Nabrana/gojena	Cona inhibicije (mm) $\pm$ 1 SD		
		Vrsta ekstrakta		
		vodni	etanolni	metanolni
Borov glivec	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 1,1	5,8 $\pm$ 0,5
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,6	6,7 $\pm$ 0,6
Bukova kresilka	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	5,9 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,6
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 1,5	6,1 $\pm$ 0,8
	gojen klobuk	0,0 $\pm$ 0,0	6,5 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 0,3
Brezova lenzovka	nabran	0,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,7	5,8 $\pm$ 0,6
	gojen micelij	0,0 $\pm$ 0,0	7,8 $\pm$ 1,3	6,5 $\pm$ 0,9

Bukov ostrigar	nabran	0,0 ± 0,0	5,8 ± 0,6	6,1 ± 0,5
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	6,3 ± 1,0	5,8 ± 0,6
	gojen klobuk	0,0 ± 0,0	6,9 ± 0,6	5,3 ± 0,4
Brezova odpadljivka	nabran	0,0 ± 0,0	8,6 ± 1,0	8,7 ± 1,1
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	8,7 ± 1,2	7,6 ± 1,5
Pisana ploskocevka	nabran	0,0 ± 0,0	5,8 ± 0,8	5,9 ± 0,6
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	6,2 ± 0,6	6,2 ± 1,0
Veliki lovkar	nabran	0,0 ± 0,0	5,6 ± 0,4	5,5 ± 0,4
	gojen micelij	/	/	7,8 ± 1,4
Negativna kontrola		0,0 ± 0,0	6,5 ± 2,2	7,1 ± 1,0

Tabela 4: Antimikrobni učinek vodnih, etanolnih in metanolnih ekstraktov gob na *S. cerevisiae*, podan s premeri inhibicijskih con (mm) ± 1 SD kot rezultat metode difuzije na trdnem gojišču z diski

		Cona inhibicije (mm) ± 1 SD		
		Vrsta ekstrakta		
Vrsta gobe	Nabrana/gojena	vodni	etanolni	metanolni
Borov glivec	nabran	0,0 ± 0,0	8,1 ± 1,1	5,7 ± 0,4
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	8,6 ± 1,7	5,6 ± 0,2
Bukova kresilka	nabran	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,8	5,3 ± 0,4
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	7,6 ± 0,9	6,9 ± 0,4
	gojen klobuk	0,0 ± 0,0	8,1 ± 0,4	6,7 ± 0,4
Brezova lenzovka	nabran	0,0 ± 0,0	7,8 ± 1,6	6,0 ± 0,6
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	8,6 ± 1,4	6,6 ± 0,8
Bukov ostrigar	nabran	0,0 ± 0,0	6,6 ± 1,0	6,2 ± 0,7
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	7,4 ± 0,9	6,0 ± 0,3
	gojen klobuk	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,6	7,3 ± 0,6
Brezova odpadljivka	nabran	0,0 ± 0,0	8,4 ± 0,6	5,9 ± 0,4
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	9,1 ± 1,6	6,0 ± 0,6
Pisana ploskocevka	nabran	0,0 ± 0,0	7,6 ± 1,1	6,1 ± 0,6
	gojen micelij	0,0 ± 0,0	7,9 ± 0,8	6,4 ± 0,5
Veliki lovkar	nabran	0,0 ± 0,0	7,1 ± 0,7	5,5 ± 0,2
	gojen micelij	/	/	6,7 ± 0,5
Negativna kontrola		0,0 ± 0,0	7,8 ± 1,3	7,0 ± 0,6

## 9.2 Statistična pomembnost razlik med velikostmi inhibicijskih con različnih gobjih ekstraktov

Tabela 5: Statistična pomembnost razlik med protimikrobni učinkom etanolnih oz. metanolnih ekstraktov nabranih ter gojenih (klobuki in micelij) gob oz. njihovimi kontrolami, proti *E. coli*, podanimi s P-vrednostmi kot rezultat ANOVA testa, pri čemer se vrednosti manjše od 0,05 smatrajo za statistično pomembne

Vrsta gobe	Vrsta ekstrakta	P-vrednosti		
		Vrsta primerjanj ekstraktov		
		Nabrana: gojena	Nabrana: kontrola	Gojena: kontrola
Borov glivec	etanolni	< 0,001	0,238	0,002
	metanolni	0,006	< 0,001	0,004
Bukova kresilka (micelij)	etanolni	0,055	0,037	0,347
	metanolni	< 0,001	0,017	< 0,001
Bukova kresilka (klobuki)	etanolni	0,320	0,037	0,610
	metanolni	0,361	0,017	0,012
Brezova lenzovka	etanolni	0,827	0,027	0,062
	metanolni	0,337	< 0,001	0,003
Bukov ostrigar (micelij)	etanolni	< 0,001	0,934	< 0,001
	metanolni	0,428	< 0,001	< 0,001
Bukov ostrigar (klobuki)	etanolni	0,194	0,934	0,425
	metanolni	0,027	< 0,001	< 0,001
Brezova odpadljivka	etanolni	< 0,001	0,020	0,129
	metanolni	< 0,001	0,025	0,002
Pisana ploskocevka	etanolni	0,987	0,040	0,026
	metanolni	0,080	< 0,001	< 0,001
Veliki lovkar	etanolni	/	0,092	/
	metanolni	0,943	< 0,001	0,014

Tabela 6: Statistična pomembnost razlik med protimikrobni učinkom etanolnih oz. metanolnih ekstraktov nabranih ter gojenih (klobuki in micelij) gob oz. njihovimi kontrolami, proti *B. cereus*, podanimi s P-vrednostmi kot rezultat ANOVA testa, pri čemer se vrednosti manjše od 0,05 smatrajo za statistično pomembne

Vrsta gobe	Vrsta ekstrakta	P-vrednosti		
		Vrsta primerjanj ekstraktov		
		Nabrana: gojena	Nabrana: kontrola	Gojena: kontrola
Borov glivec	etanolni	0,238	0,0119	< 0,001
	metanolni	< 0,001	< 0,001	0,444
Bukova kresilka (micelij)	etanolni	0,002	0,007	0,339
	metanolni	0,020	< 0,001	0,009
Bukova kresilka (klobuki)	etanolni	0,145	0,007	0,688
	metanolni	0,681	< 0,001	0,011
Brezova lenzovka	etanolni	< 0,001	0,028	0,009
	metanolni	0,021	< 0,001	0,192

Bukov ostrigar (micelij)	etanolni	0,089	0,005	0,246
	metanolni	0,156	0,005	< 0,001
Bukov ostrigar (klobuki)	etanolni	0,015	0,005	0,814
	metanolni	0,005	0,005	0,003
Brezova odpadljivka	etanolni	0,114	< 0,001	< 0,001
	metanolni	0,016	< 0,001	0,133
Pisana ploskocevka	etanolni	< 0,001	0,006	0,977
	metanolni	0,248	< 0,001	0,029
Veliki lovkar	etanolni	/	< 0,001	/
	metanolni	0,004	< 0,001	0,266

Tabela 7: Statistična pomembnost razlik med antimikrobni učinkom etanolnih oz. metanolnih ekstraktov nabranih ter gojenih (klobuki in miceliji) gob oz. njihovimi kontrolami, proti *S. cerevisiae*, podanimi s P-vrednostmi kot rezultat ANOVA testa, pri čemer se vrednosti manjše od 0,05 smatrajo za statistično pomembne

Vrsta gobe	Vrsta ekstrakta	P-vrednosti		
		Vrsta primerjanj ekstraktov		
		Nabrana: gojena	Nabrana: kontrola	Gojena: kontrola
Borov glivec	etanolni	0,336	0,389	0,110
	metanolni	0,576	< 0,001	< 0,001
Bukova kresilka (micelij)	etanolni	0,055	0,062	0,726
	metanolni	< 0,001	< 0,001	0,349
Bukova kresilka (klobuki)	etanolni	0,012	0,062	0,391
	metanolni	< 0,001	< 0,001	0,100
Brezova lenzovka	etanolni	0,100	0,880	0,048
	metanolni	0,020	< 0,001	0,057
Bukov ostrigar (micelij)	etanolni	0,014	0,004	0,321
	metanolni	0,513	< 0,001	< 0,001
Bukov ostrigar (klobuki)	etanolni	0,911	0,004	0,460
	metanolni	0,022	< 0,001	0,992
Brezova odpadljivka	etanolni	0,099	0,052	0,009
	metanolni	0,551	< 0,001	< 0,001
Pisana ploskocevka	etanolni	0,344	0,812	0,865
	metanolni	0,104	< 0,001	0,002
Veliki lovkar	etanolni	/	0,076	/
	metanolni	< 0,001	< 0,001	0,133