

**Vpliv lektina CnGL iz glive poprhnjene livke na rast bakterij
Escherichia coli in *Listeria innocua***

RAZISKOVALNA NALOGA

Področje biologija

Vid Kodrič

Matic Izak

Anika Gregori Kmecl

MENTORICA: Helena Potočnik Vičar, prof. biol.

SOMENTORICI: viš. znan. sod. dr. Jerica Sabotič in Nika Zaveršek,
mag. biokem.

Ljubljana, 2025

Zahvala

Raziskovalna naloga je bila opravljena na Institutu »Jožef Stefan«, na odseku za biotehnologijo (B3). Najlepše se zahvaljujemo somentorici dr. Jerici Sabotič, ki nam je omogočila raziskovalno delo v laboratorijih instituta. Prav tako pa se vam zahvaljujemo za vso pomoč in nasvete pri pisanju, iskanju literature ter za strokovni pregled raziskovalne naloge. Posebna zahvala gre tudi Niki Zaveršek, mag. biokem., ki nas je usmerjala pri laboratorijskem delu in z nami delila številne nasvete in izkušnje. Brez vas nam ne bi uspelo.

Iskreno se zahvaljujemo šolski mentorici Heleni Potočnik Vičar, prof. biol., za vso podporo, nasvete in predloge pri pisanju raziskovalne naloge. Hvala za nenehno spodbudo in ves trud, ki ste ga vložili v nas.

Zahvala gre tudi našemu profesorju slovenščine dr. Andreju Koritniku, ki je jezikovno pregledal raziskovalno nalogo.

Vpliv lektina CnGL iz glive poprhnjene livke na rast bakterij *Escherichia coli* in *Listeria innocua*

Povzetek

Zaradi pretirane rabe antibiotikov v preteklosti se danes soočamo z eno izmed največjih groženj javnemu zdravju – odpornostjo mikroorganizmov proti antibiotikom. Zato je ključno poiskati nove protibakterijske snovi, pri tem pa so pomemben vir le-teh dokaj neraziskane glive. Iz glive poprhnjene livke (*Clitocybe nebularis*) so že bili izolirani različni lektini z insekticidnim učinkom in z učinkom na rakave celice. To so proteini, ki se lahko reverzibilno vežejo na sladkorje. V raziskovalni nalogi smo iz poprhnjene livke z metodo afinitetne kromatografije izolirali lektin, ki se veže na glukozo (CnGL). Njegovo čistost smo preverili z gelsko elektroforezo in potrdili domnevo o prisotnosti glukoza vezavnega lektina v našem vzorcu glive. V drugem delu naloge smo raziskovali, kako izolirani lektin vpliva na rast bakterij vrst *Listeria innocua* in *Escherichia coli*. Preučili smo tudi vpliv soka glive *C. nebularis* na bakterije in učinke primerjali z učinki antibiotika ampicilina. S spektrofotometričnim merjenjem optične gostote bakterijskih kultur smo spremljali bakterijsko rast in ugotovili, da ima lektin CnGL na vrsto *L. innocua* zelo majhen vpliv, lahko pa bi vplival na bakterije v fazi prilagajanja rasti, kar bi bilo smiselno raziskati v prihodnje. Na bakterije *E. coli* je imel lektin večji vpliv in je rast spodbujal. Pri večji koncentraciji lektina smo opazili manjšo rast, zato bi bilo v prihodnje smiselno raziskati vpliv večjih količin lektina CnGL na bakterije. Poprhnjena livka se je izkazala kot zanimiv vir snovi, ki vplivajo na bakterijsko rast.

Ključne besede: *Clitocybe nebularis*, lektin, bakterijska rast, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, antibiotik, protibakterijski učinek

The effect of CnGL lectin from the clouded funnel mushroom on the growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua*

Abstract

Due to the overuse of antibiotics in the past, we are now facing one of the biggest threats to public health – antibiotic resistance in microorganisms. Therefore, it is crucial to find new antibacterial substances, and relatively unexplored fungi are an important source of such compounds. Various lectins with insecticidal activity and effects on cancer cells have already been isolated from the clouded funnel mushroom (*Clitocybe nebularis*). Lectins are proteins that can reversibly bind to sugars. We isolated a lectin that binds to glucose (CnGL) from *C. nebularis* using affinity chromatography. The purity of the isolated lectin was verified by gel electrophoresis, which confirmed our assumption that the glucose-binding lectin would be present in our sample. In the second part of the study, we investigated how the isolated lectin affects the growth of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. We also investigated the effect of the *C. nebularis* extract on the bacteria and compared this effect with that of the antibiotic ampicillin. By measuring the optical density of bacterial cultures using spectrophotometry, we monitored bacterial growth and found that CnGL lectin had a small effect on *L. innocua*. However, it could affect the bacteria during the lag phase, which would need to be investigated further. On *E. coli*, the lectin had a greater growth-promoting effect. However, bacterial growth was lower at higher lectin concentration than at lower concentration, suggesting that further studies on the effects of higher CnGL lectin concentrations on bacteria would be worthwhile. *C. nebularis* proved to be an interesting source of substances that influence bacterial growth.

Keywords: *Clitocybe nebularis*, lectin, bacterial growth, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, antibiotic, antibacterial effect

Kazalo

1	Uvod.....	1
1.1	Glive.....	1
1.1.1	Prostotrosnice.....	2
1.1.2	Poprhnjena livka.....	2
1.1.3	Obrambni mehanizmi gliv.....	3
1.1.4	Antibiotične učinkovine gliv.....	4
1.2	Lektini.....	4
1.2.1	Glivni lektini.....	5
1.2.2	Lektini iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>	6
1.2.3	Vpliv lektinov na bakterije.....	7
1.3	Bakterije.....	7
1.3.1	Listerije.....	7
1.3.2	<i>Escherichia coli</i>	8
1.4	Rastne krivulje.....	8
1.4.1	Bakterijska rast.....	8
1.4.2	Model bakterijske rasti v zaprtem sistemu.....	9
1.4.3	Faza prilagajanja.....	9
1.4.4	Faza eksponentne rasti.....	9
1.4.5	Stacionarna faza.....	9
1.4.6	Faza odmiranja.....	10
1.5	Antibiotik ampicilin.....	10
2	Namen dela in hipoteze.....	12
2.1	Opredelitev problema.....	12
2.2	Namen dela.....	12
2.3	Hipoteze.....	13
3	Materiali in metode.....	14
3.1	Reagenti.....	14
3.2	Laboratorijska oprema.....	15
3.3	Pufri in raztopine.....	16

3.4	Biološki material	17
3.5	Gojišča.....	17
3.6	Metode dela	18
3.6.1	Izolacija lektina CnGL	18
3.6.2	Proučevanje vpliva lektina CnGL na bakterijsko rast	24
4	Rezultati	27
4.1	Afinitetna kromatografija in elucijski diagram	27
4.2	Analiza vzorcev z NaDS PAGE	28
4.3	Izkoristek izolacije	29
4.4	Vpliva lektina CnGL na rast bakterij <i>Listeria innocua</i>	29
4.4.1	Rastne krivulje bakterij <i>Listeria innocua</i>	30
4.4.2	Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti ampicilina.....	30
4.4.3	Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti soka poprhnjene livke	31
4.4.4	Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti lektina CnGL.....	32
4.4.5	Primerjava rastnih krivulj bakterij <i>L. innocua</i> z različnimi dodanimi učinkovinami	33
4.4.6	Obdelava podatkov o rasti bakterij <i>L. innocua</i>	34
4.5	Vpliv lektina CnGL na rast bakterij <i>Escherichia coli</i>	38
4.5.1	Rastne krivulje bakterij <i>Escherichia coli</i>	38
4.5.2	Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti ampicilina	38
4.5.3	Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti soka poprhnjene livke	39
4.5.4	Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti lektina CnGL	41
4.5.5	Primerjava rastnih krivulj bakterij <i>E. coli</i> z različnimi dodanimi učinkovinami .	42
4.5.6	Obdelava podatkov o rasti bakterij <i>E. coli</i>	42
5	Razprava	46
5.1	Izolacija lektina CnGL	46
5.2	Vpliv lektina CnGL na bakterijsko rast.....	47
6	Zaključek.....	51
7	Literatura.....	53

Kazalo slik

Slika 1: Poprhnjena livka	3
Slika 2: Shematski prikaz rastle krivulje	10
Slika 3: Struktura ampicilina	11
Slika 4: Shema sistema za dovajanje pufru pri afinitetni kromatografiji	19
Slika 5: Kromatografska kolona	19
Slika 6: Shema nanosa vzorcev na prvi gel za NaDS PAGE	22
Slika 7: Shema nanosa vzorcev na drugi gel za NaDS PAGE	22
Slika 8: Aparatura za NaDS PAGE Slika 9: Barvanje gelov s srebrom	23
Slika 10: Ultrafiltracija izoliranega lektina	23
Slika 11: Shema nanosa učinkovin na mikrotitrsko ploščo	26
Slika 12: Elucijski diagram afinitetne kromatografije na glukozil sefarozi	27
Slika 13: Analiza vsebnosti proteinov v izbranih frakcijah afinitetne kromatografije z NaDS-PAGE	28
Slika 14: Analiza vsebnosti proteinov v izbranih frakcijah afinitetne kromatografije z NaDS-PAGE	28

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Reagenti za ločevalni in koncentrirni gel za NaDS PAGE	21
Preglednica 2: Prostornine vzorcev in nanašalnega gela za NaDS PAGE	21
Preglednica 3: Optične gostote in prostornine gojišč ter kultur za tri ponovitve	25

Kazalo grafov

Graf 1: Rast kontrolne skupine bakterij <i>L. innocua</i> v prvi biološki ponovitvi	30
Graf 2: Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti ampicilina v prvi biološki ponovitvi	31
Graf 3: Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti soka poprhnjene livke v prvi biološki ponovitvi	32
Graf 4: Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti lektina CnGL v prvi biološki ponovitvi ..	33
Graf 5: Rast bakterij <i>L. innocua</i> v prisotnosti različnih učinkovin v prvi biološki ponovitvi	34
Graf 6: Nakloni logaritemske faze rastle krivulj bakterij <i>L. innocua</i>	35
Graf 7: Čas vstopa v stacionarno fazo pri bakteriji <i>L. innocua</i>	36

Graf 8: Končna OD pri bakteriji <i>L. innocua</i>	37
Graf 9: Rast kontrolne skupine bakterij <i>E. coli</i> v prvi biološki ponovitvi	38
Graf 10: Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti ampicilina v prvi biološki ponovitvi	39
Graf 11: Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti soka poprhnjene livke v prvi biološki ponovitvi	40
Graf 12: Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti lektina CnGL v prvi biološki ponovitvi	41
Graf 13: Rast bakterij <i>E. coli</i> v prisotnosti različnih učinkovin v prvi biološki ponovitvi	42
Graf 14: Nakloni logaritemske faze rastnih krivulj bakterij <i>E. coli</i>	43
Graf 15: Čas vstopa v stacionarno fazo pri bakteriji <i>E. coli</i>	44
Graf 16: Končna OD pri bakteriji <i>E. coli</i>	45

Seznam uporabljenih kratic in simbolov

A₂₈₀	absorbanca, merjena pri 280 nm
APS	amonijev persulfat
CnGalLs	za galaktozo specifičen lektin iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>
CnGL	za glukozo specifičen lektin iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>
CnGlcL	za glukozo specifičen lektin iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>
CNL	za laktozo specifičen lektin iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>
CnSepLs	za sefarozo specifičen lektin iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>
CnSucL	za saharozo specifičen lektin iz glive <i>Clitocybe nebularis</i>
Da	Dalton [g/mol]
F.	frakcija
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS PAGE	gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
OD	optična gostota
OD₆₀₀	optična gostota, merjena pri 600 nm
TEMED	tetrametiletildiamin
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan

1 Uvod

1.1 Glive

Glive so heterotrofni evkariontski organizmi, ki so prisotni po celem svetu. Najpogosteje se nahajajo v bolj vlažnih okoljih, najdemo pa jih tudi na območjih z ekstremnimi pogoji. Večina gliv se prehranjuje z odpadnimi organskimi snovmi iz okolice in imajo tako skupaj z bakterijami pomembno ekološko vlogo kot razkrojevalci. Poleg saprofitskih gliv pa poznamo tudi simbiotske in parazitske glive. Najbolj poznana primera simbioze gliv z drugimi organizmi sta mikoriza (sožitje med glivo in rastlinskimi koreninami) in lišaji, ki so skupki gliv in alg [1]. Parazitske glive pa se hranijo z organskimi snovmi iz celic živih gostiteljev. Lahko jih bodisi napadejo, ubijejo in prebavijo, bodisi se v njih naselijo in izrabljajo njihova hranila. Zajedajo lahko človeka in povzročajo različne bolezni (pogoste so kožne mikoze, npr. mikrosporija) ter tudi druge živali, rastline in celo druge glive [2].

Za glivne celice je značilna celična stena iz hitina, zaradi nje pa tudi zunajcelična prebava. Glive v svojo okolico izločajo prebavne encime, ki razgradijo makromolekule hranil, manjše molekule pa nato vsrkajo v celico [1]. Poznamo enocelične (kvasovke) in večcelične glive. Zgrajene so iz nitk, imenovanih hife, ki so lahko iz verige enojedrnih celic, ki jih ločujejo septe, ali pa gre za eno samo, dolgo in večjedrno celico. Preplet hif v substratu (npr. prsti) se imenuje micelij. Ob ugodnih razmerah se iz micelija razvije plodišče ali goba, ki je sestavljena iz prepletenih hif, služi pa razmnoževanju s sporami oziroma trosi [2].

Glive lahko delimo na prave (Eumycota) in neprave glive, vendar neprave glive uvrščamo tudi med protiste in so glivam podobne le po videzu in načinu rasti. Primer so glive sluzavke (Myxomycota) in vodne plesni (Oomycota). Prave glive pa glede na zgradbo steljke, načine razmnoževanja in danes tudi na podlagi molekularno-genetskih metod delimo na osem debel. Najvišje razviti skupini sta zaprtotrosnice (Ascomycota) in prostotrosnice (Basidiomycota) [2, 3].

Glive se razmnožujejo nespolno in spolno, oba načina pa sta povezana s tvorbo haploidnih spor ali trosov. Iz spore tako zraste nov organizem s haploidnimi hifami. Pri spolnem razmnoževanju spore nastajajo z mejotsko delitvijo, iz njih pa se razvijejo haploidni miceliji [2]. Temu sledi združitev dveh hif in nato tudi kratko diploidno obdobje. Vendar pa do združitve jeder pri višjih glivah ne pride takoj in za nekaj časa se vzpostavi dvojedrno stanje. Pri zaprtotrosnicah se spore z mejozo razvijajo v endosporangiju, imenovanem ask. Za prostotrosnice pa je značilen

eksosporangij bazidij, na čigar površini se razvijajo spore. Prostotrosnice in nekatere zaprtotrosnice razvijejo plodišča iz dvojedrnih hif, imenovana gobe, in na katerih so bazidiji oziroma aski, na katerih nastajajo spore [3].

1.1.1 Prostotrosnice

Deblo prostotrosnic (Basidiomycota) uvrščamo med dvojedrne glive (Dikarya), ki so najbolj razvita skupina gliv [2]. Za micelij prostotrosnic so značilne pravilno septirane hife, ki so v svoji zgradbi med vsemi glivami najkompleksnejše. Ko se srečata dve kompatibilni hifi različnih micelijev, se njuni celici zlijeta, jedra pa se ne združijo. Tako nastane dvojedrni ali dikariontski micelij, ki se ob primernih pogojih razvije v plodišče (goba), na katerem začnejo nastajati bazidiji in bazidiospore. Ta se pri večini predstavnikov razvijejo, na površini njihovih cevč in lističev pa se tvorijo trosonosne plasti [4]. Značilna struktura prostotrosnic je bazidij, ki je eksosporangij. Gre za končno celico razmnoževalne hife, v kateri pride do združitve dveh jeder (kariogamija). Temu takoj sledita prekrížanje in mejoza, zatem pa se na površino bazidija prek ozkih citoplazemskih podaljškov (sterigme) iztisne jedro in del citoplazme. Tako nastanejo haploidne bazidiospore, ki se na primernem substratu razvijejo v haploidni micelij in začnejo življenjski krog glive [5].

1.1.2 Poprhnjena livka

Poprhnjena livka ali tudi meglenka (*Clitocybe nebularis*) je prava gliva iz debela prostotrosnic (Basidiomycota). Uvrščamo jo v družino kolobarničark (*Clitocybaceae*) in rod livk (*Clitocybe*) [6]. Ima mesnat, drobljiv in sivkast klobuk, ki je ugreznjen v sredini. Njegova barva se spreminja od pepelnato sive do sivo rjave, saj kožico sprva prekriva tanek belkast popr, ki kmalu odpade [7]. Klobuk meri v premer med 6 in 20 cm in ima močno podvihan rob [8]. Bet je čvrst, čokat, vlaknast in svetlejši od klobuka. Kasneje postane votel. Lističi so gosti, ozki in pritrjeni na bet [9]. Raste od zgodnje do pozne jeseni v listnatih in mešanih gozdovih. Najdemo jo v velikih skupinah na jasah ali obrobju gozda [7]. Ko gliva porabi hranila na mestu, se micelij razširja v vse večji krog. Tako nastanejo tudi do osem metrov veliki krogi z več kot 1000 plodišči [10]. Za poprhnjeno livko je značilen močan in neprijeten vonj ter kiselkast okus. Je pogojno užitna, saj lahko pri nekaterih povzroča prebavne motnje, zato jo pred uporabo prekuhamo [9]. V naravi niso pogosta tarča plenilcev, kot so žuželke ali polži, kar nakazuje na visoko vsebnost obrambnih snovi, in predstavlja dober vir nepoznanih biološko aktivnih snovi [23].



Slika 1: Poprhnjena livka. Vir: First Nature [online]. [citirano 3.1.2025; 11.15]. Dostopno na povezavi: <https://www.first-nature.com/fungi/clitocybe-nebularis.php#>

1.1.3 Obrambni mehanizmi gliv

Za razširjanje višjih gliv je ključno preživetje njihove razmnoževalne strukture ali plodišča (goba), ki jo ogrožajo razni škodljivci. Poznamo več vrst škodljivcev, kot so plenilci, zajedavci, patogeni mikroorganizmi itd. Škodljivci imajo različne ekološke niše, kar pomeni, da imajo tudi različen vpliv na glive. V s hranili bogatem substratu celice glivnega micelija tekmujejo s saprofitskimi bakterijami za hranila, hkrati pa je isti micelij tudi tarča raznih žuželk in ogorčic, ki se z njim prehranjujejo. Plodišče pa je prikladen vir hranil za mnoge žuželke, polže in vretenčarje [11].

Tako so glive med evolucijo razvile različne obrambne strategije, primerne različnim škodljivcem, prevladuje pa kemična obramba s toksini, ki zavirajo rast škodljivcev. Gre za sekundarne metabolite, peptide in proteine, za katere je značilna vezava na molekule celic škodljivca. Velja hipoteza, da je lega teh molekul odvisna od škodljivca, ki mu je namenjena. Tako se protibakterijske snovi izločajo iz celic micelija v okolico, kjer delujejo toksično na konkurenčne in patogene bakterije. Primer je betalaktamski antibiotik penicilin, ki preprečuje sintezo bakterijske celične stene in ga v okolico izloča gliva *Penicillium*. Proti glivojedim organizmom pa so se razvile znotrajcelične obrambne snovi, ki se kopičijo v citoplazmi celic micelija in plodiča. Ko škodljivec te snovi zaužije, se absorbirajo skozi prebavila in nanj delujejo toksično. Primer je α -amanitin, ki ga proizvajajo nekatere mušnice in deluje toksično na živalske plenilce [11, 12].

Obrambni mehanizem v obliki toksinov, ki spominja na prirojeni imunski sistem živali in rastlin, je pri glivah uravnavan. Nekatere toksične snovi se sproščajo v okolico ves čas, druge pa se sproščajo le ob napadu določenega škodljivca [11]. Sinteza obrambnih sekundarnih

metabolitov, ki niso ključni za osnovne življenjske funkcije, je namreč energijsko potratna, zato je le-ta časovno in prostorsko omejena [13]. Tudi genetske analize kažejo, da se geni za protibakterijske proteine in peptide (npr. peptid Copsin glive *Coprinopsis cinerea*) izražajo v miceliju, medtem ko se geni za insekticidne in nematocidne lektine izražajo v celicah plodišč. Te snovi se sintetizirajo ves čas in so prisotne ob napadu antagonista, ko napade določeno tkivo. Po drugi strani pa se nekateri lektini, ki glive branijo pred živalskimi plenilci, pričnejo sintetizirati šele, ko je to tkivo napadeno. To pomeni, da imajo glive poleg avtonomnega in tkivno specifičnega obrambnega mehanizma tudi mehanizem, ki se sproži ob napadu antagonista [12].

1.1.4 Antibiotične učinkovine gliv

Glive za svojo obrambo in v tekmi za hranila z ostalimi organizmi proizvajajo različne vrste antibiotičnih (obrambnih) molekul. To so lahko sekundarni metaboliti, peptidi ali proteini. Najbolj znan primer obrambnih sekundarnih metabolitov je gotovo betalaktamski antibiotik penicilin, ki ovira delovanje encimov za sintezo peptidoglikana – glavnega gradnika bakterijske celične stene. Primer posredne protibakterijske obrambe so znotrajcelične laktonaze glive *Coprinopsis cinerea*, ki motijo signalizacijo med bakterijami in onemogočajo njihovo koordinacijo v prostoru [11]. Glive proizvajajo tudi snovi, ki delujejo sinergistično z antibiotiki. Primer so ergot alkaloidi, za katere je značilna tetraciklična struktura. Proizvajajo jih raznolike glive, na primer vrste iz rodu *Claviceps*. Najbolj pogost primer njihove uporabe v medicinske namene je zdravljenje migren in tumorjev, vendar pa imajo tudi sinergističen protibakterijski učinek v povezavi z antibiotiki širokega spektra. Primer je *lysergol*, ki pospeši absorpcijo antibiotikov skozi celične membrane. Poznamo še mnogo drugih antibiotičnih učinkovin, kot so glivni poliketidi, razne vrste polipeptidnih metabolitov, glivni terpenoidi itd. Vendar pa se glive neprestano spopadajo z različnimi antagonisti in se na njih prilagajajo, kar pomeni, da je mnogo antibiotičnih učinkovin iz gliv še neodkritih [14]. Iz glive *C. nebularis* so izolirali antibiotik nebularin, ki je pokazal močne protibakterijske učinke na rast nekaterih bakterij. Tudi izvlečki poprhnenih livk so pokazali negativne učinke na rast izbranih bakterij (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) in gliv (*Aspergillus fumigatus*) [23].

1.2 Lektini

Lektini so proteini z enim ali več vezavnimi mesti za sladkorje. Reverzibilno vežejo specifične sladkorje in lahko prepoznajo ter obarjajo polisaharide, glikoproteine in glikolipide. Lektini so molekule, ki niso imunskega izvora, imajo pa pomembno vlogo pri začetku infekcij,

spremenjenem vedenju rakavih celic in pri zaščiti novorojenčkov pred antigeni iz okolice [15]. Afiniteta med lektini in enostavnimi ogljikovimi hidrati je praviloma šibka, vendar zelo specifična. Ključni so v mnogih procesih, kot so prepoznavanje in komunikacija med celicami, signalizacija in adhezijski procesi. Za nekatere rastlinske lektine v semenih je znano, da so toksični za nekatere žuželke in druge škodljivce [16]. Primer njihove vloge pri adheziji najdemo pri simbiotskih bakterijah iz rodu *Rhizobium*, ki se vežejo na rastlinske celice korenin. Tu so pomembni pri nastanku koreninskih nodulov, v katerih bakterije pretvarjajo atmosferski dušik v amonijak [17].

Pomembna lastnost lektinov je tudi njihova sposobnost aglutinacije eritrocitov, limfocitov fibroblastov in drugih živalskih, rastlinskih, glivnih ter bakterijskih celic. Aglutinacija je posledica nekovalentnih interakcij med sladkorji na površini celic in vezavnimi mesti za sladkorje na lektinih [15]. Že konec 19. stoletja so bili znani proteini, ki so aglutinirali eritrocite, poimenovali pa so jih hemaglutinini. Hemaglutinini so igrali ključno vlogo pri razumevanju krvnih skupin AB0, saj so rastlinski izvlečki s hemaglutinini različnih rastlinskih vrst aglutinirali različne krvne skupine. Do šestdesetih let 20. stoletja je postalo jasno, da ti proteini aglutinirajo tudi druge celice in imajo afiniteto do specifičnih sladkorjev. Leta 1954 sta Boyd in Shapleigh predlagala novo ime lektini, ki izhaja iz latinske besede *legere*, kar pomeni 'izbrati' [18].

1.2.1 Glivni lektini

Glivni lektini so v primerjavi z rastlinskimi in živalskimi dokaj slabo raziskani. Tako glive ponujajo bogat vir še neraziskanih lektinov, ki imajo velik potencial za uporabo v biomedicini in biotehnologiji [19]. Glivni lektini zaradi protitumorskih, protivirusnih, insekticidnih in imunomodulatornih lastnosti vzbujajo vse več zanimanja [20]. Sestavljeni so iz dveh do štirih podenot, ki se med seboj običajno povezujejo z nekovalentnimi interakcijami. Pri glivah se lektini najpogosteje izražajo kot skladiščni proteini, ki naj bi imeli vlogo pri obrambi [21]. To dokazujeta na primer toksičnost lektinov iz gliv vrst *Volvariella volvacea* in *Agrocybe aegerita* na miši ter protivirusni učinki mnogih glivnih lektinov [22]. Domneva se, da imajo glivni lektini tudi pomembno vlogo pri simbiotskih odnosih z drugimi organizmi, npr. pri lišajih in mikorizi ter pri medceličnih interakcijah, npr. pri agregaciji micelija [21]. Poleg simbioze naj bi imeli vlogo tudi pri zajedanju rastlin in žuželk ter pri lovljenju ogorčic [22]. Lektini, izolirani iz različnih gliv, se med seboj razlikujejo v molekularnih masah (od 10 pa vse tja do 190 kDa), v obliki tridimenzionalne strukture, številu podenot in specifičnosti za sladkorje. Prav tako pa se

lahko močno razlikujejo tudi lektini, ki so izolirani iz ene vrste. Tako so bili izolirani raznoliki lektini iz plodišč, betov in micelija ene same glive [21]. Večina glivnih lektinov je bila izolirana iz višjih gliv oziroma gob (kar 82 %), 15 % jih je bilo izoliranih iz plesni in 3 % iz kvasovk [19].

Izražanje lektinov v glivah se lahko spreminja glede na razvojno stanje oziroma starost plodišča. Odvisno je tudi od različnih okoljskih dejavnikov, kot so na primer prisotnost hranil ali rastnih faktorjev, prisotnost škodljivcev, temperatura itd. Zato se vsebnost lektinov v glivah lahko razlikuje na različnih krajih in časih rasti [21].

1.2.2 Lektini iz glive *Clitocybe nebularis*

Poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*) je vir številnih majhnih in stabilnih lektinov z afinitetami do različnih ogljikovih hidratov. Iz razmnoževalnih struktur te glive je bilo z afinitetno kromatografijo izoliranih več lektinov, ki so se vezali na različne sladkorje. To so CnSepLs (specifičen za sefarozo, ki je krogličasta agarozna iz morske alge), CnGlcL (specifičen za glukozo), CnGalLs (specifičen za galaktozo), CnSucL (specifičen za saharozo) in CNL (specifičen za laktozo) [23].

Lektin CNL je eden izmed bolj raziskanih lektinov glive *C. nebularis*. Verjetno služi obrambi plodišč pred plenilci in paraziti, saj so dokazani njegovi nematotoksični in insekticidni učinki. Prav tako je dobro topen in občutljiv na visoke temperature, ekstremen pH ter proteolitično razgradnjo, kar nakazuje na njegovo obrambno vlogo [24]. Poleg tega je dokazan njegov citotoksičen učinek na rakave T-celice, saj sproži atipično celično smrt. Torej je potencialno uporaben za zdravljenje ali prepoznavanje akutne T-celične levkemije [25].

Lektini glive *C. nebularis* so majhni proteini z izoelektričnimi točkami pri pH med 4 in 5 z izjemo CnSucL. Določene so bile tudi približne molekulske mase teh lektinov. Za lektin CnGlcL je bila z NaDS PAGE določena približna molekulska masa 31 kDa. Ta lektin sestavljata dve podenoti, njegova izoelektrična točka pa je pri pH 5 [26].

Lektini iz glive *C. nebularis* bi bili lahko uporabljeni pri detekciji in tarčnemu zdravljenju raka, pri imunoterapiji ter pri spodbujanju imunskega odziva [23]. Poleg tega je predlagan tudi potencialni insekticidni učinek teh lektinov, ki so ga preizkušali na vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) in koloradskem hrošču (*Leptinotarsa decemlineata*) [26].

1.2.3 Vpliv lektinov na bakterije

V okviru iskanja novih antibiotičnih učinkovin se pojavlja zanimanje za učinek lektinov na medicinsko pomembne bakterije [27]. Lektini lahko delujejo protimikrobno na več načinov. Lahko preprečujejo vdor bakterij, zavirajo njihovo rast, uravnavajo adhezijo in migracijo mikrobnih celic [28]. Lektin iz gobe *Gymnopilus spectabilis* zavira *in vitro* rast bakterije *Staphylococcus aureus* tako, da se veže na N-acetil-glukozamin v celični steni bakterij. Lektin iz glive *Sparassis latifolia* pa ima potencialni antibakterijski učinek proti Gramnegativnim bakterijam, saj se veže na lipopolisaharidno plast v celični steni. Tako lahko nekateri lektini delujejo antibakterijsko zaradi sposobnosti vezave na površinske glikane na bakterijskih celičnih stenah [27].

Izvedena je bila tudi raziskava glivnih lektinov kot protibakterijskih in protibiofilmskih učinkovin na modelna seva *Listeria innocua* in *Listeria monocytogenes*. Nekateri od preiskovanih lektinov so opazno zmanjšali sposobnost preživetja bakterij v biofilmu, vendar pa niso vplivali na rast bakterij v tekočih kulturah, kar pomeni, da ne delujejo protibakterijsko, ampak protibiofilmsko. Glivni lektini imajo tako potencialni vpliv na interakcije med bakterijami, kar bi se lahko uporabilo pri preprečevanju kontaminacije površin z biofilmom bakterij iz rodu *Listeria* [29].

1.3 Bakterije

1.3.1 Listerije

Listerije so fakultativno anaerobne bakterije iz družine *Listeriaceae*. So po Gramu pozitivni bacili brez kapsule, ki ne tvorijo spor. Običajno so dolgi med 0,5 in 2 μm , široki pa med 0,4 in 0,5 μm . Optimalna temperatura za njihovo razmnoževanje je med 1 in 45 $^{\circ}\text{C}$, med 20 in 25 $^{\circ}\text{C}$ pa se najintenzivneje gibljejo s peritrihno razporejenimi bički [30]. Poznanih je 17 vrst iz rodu *Listeria*, od tega sta patogeni zgolj vrsti *Listeria monocytogenes* in *Listeria ivanovii*. *L. monocytogenes* je pomemben vzrok okužb, ki se prenašajo s hrano. V ZDA je tretji najpogostejši vzrok smrti zaradi mikrobioloških zastrupitev s hrano, v Evropi pa je listerioza na petem mestu po pogostosti pojavljanja med boleznimi, ki se prenašajo s hrano [31]. Bakterije vrste *L. monocytogenes* prek glikoproteinskih receptorjev vstopajo v celico in povzročajo listeriozo. Prenasajo se s kontaminirano hrano in so zelo odporne na različne pH in visoke koncentracije soli, hkrati pa se dobro razmnožujejo tudi pri nižjih temperaturah. Tako predstavljajo velik problem v živilski industriji [30].

Listeria innocua je nepatogena vrsta iz rodu *Listeria* in je v tesnem sorodu s patogeno vrsto *L. monocytogenes*. Pogosta je v različnih naravnih in urbanih okoljih [32]. Najdemo jo v prsti in hrani. Dokazano je, da vrsta lahko tvori biofilm, ki se lahko razvije tudi na hrani [33]. Uporablja se lahko kot eksperimentalni model za proučevanje sorodne, vendar patogene in nevarnejše vrste *L. monocytogenes* [34].

1.3.2 *Escherichia coli*

Bakterije vrste *Escherichia coli* uvrščamo v družino enterobakterij (*Enterobacteriaceae*), ki sodi v red Enterobacteriales. Vrsta spada med Gram negativne in fakultativno anaerobne bacile. Že leta 1886 jo je izoliral nemški zdravnik Theodor Escherich [30]. *E. coli* je del normalne človeške mikrobiote v prebavnem traktu. Poznanih je več sto sevov, med njimi pa so nekateri tudi patogeni in pri človeku povzročajo okužbe prebavil [35]. Te bakterije so ene izmed najbolj genetsko raznolikih organizmov in prav zato uspevajo v mnogih ekoloških nišah – tako v naravi kot tudi v gostiteljih. Simbiotski sevi naselijo človeška prebavila že nekaj ur po rojstvu, vendar pa mehanizem simbioze ni popolnoma znan. Študije predvidevajo, da simbiotske bakterije tekmujejo za hranila s patogenimi in tako preprečijo, da bi se te prekomerno razmnožile [36]. Bakterije *E. coli* je enostavno gojiti pod raznolikimi pogoji, prav tako pa imajo kratek generacijski čas. Tako je ta vrsta postala eden izmed najbolj proučevanih organizmov in predstavlja temelj pri odkrivanju bioloških konceptov. Je modelni organizem za molekularno biologijo, saj je primerna za biokemijske in genetske raziskave [37].

1.4 Rastne krivulje

1.4.1 Bakterijska rast

Bakterijska celica v primernem okolju, v katerem so izpolnjeni pogoji kot zadostna količina hranil, ustrezna temperatura, primeren pH itd., začne rasti. V trenutku, ko se njena velikost približno podvoji, pa se razdeli na dve genetsko enaki hčerinski celici, ki ponovno vstopita v ta cikel [30]. V citoplazmi rastoče celice se kopičijo makromolekule, ki se združujejo v nastajajoče celične strukture kot na primer ribosomi, citoplazemska membrana in celična stena. Ta proces imenujemo binarna fisija ali delitev na dvoje. Čas, potreben za eno delitev, imenujemo generacijski čas in se močno razlikuje med različnim bakterijskimi vrstami. Povprečen generacijski čas v idealnih pogojih znaša približno 20 minut, medtem ko pri nekaterih vrstah celo nekaj dni ali več mesecev. Prav tako je močno odvisen tudi od drugih dejavnikov, ki omejujejo rast [17, 30].

1.4.2 Model bakterijske rasti v zaprtem sistemu

V optimalnih pogojih se lahko število bakterijskih celic močno poveča, vendar pa so optimalni pogoji zelo redki. Bakterije običajno gojimo v gojiščih s stalno prostornino, količina hranil pa je omejena. Bakterijska rast in razmnoževanje se ne moreta odvijati v neskončnost, temveč sledita vzorcu, ki ga lahko ponazorimo z rastno krivuljo [17]. Gre za model, ki običajno prikazuje naravni logaritem števila celic v zaprtem sistemu, v katerem se bistvene sestavine gojišča ne obnavljajo, metabolni produkti bakterij pa se iz njega ne izločajo. Ta model verjetno najbolje prikazuje dogajanje med rastjo bakterij *in vivo* oziroma tudi pri večini kulturacij *in vitro*. Rastno krivuljo sestavljajo štiri faze: faza prilagajanja, faza eksponentne rasti, stacionarna faza in faza odmiranja [30].

1.4.3 Faza prilagajanja

Obdobje med nacepivitvijo bakterij v novo gojišče in začetkom rasti imenujemo faza prilagajanja ali t. i. *lagfaza*. Prenos v novo gojišče celicam predstavlja novo okolje, na katerega se morajo prilagoditi z drugačnimi in hitrejšimi presnovnimi potmi in sintezo pomembnih encimov ter makromolekul. V tej fazi se število celic ne spreminja, saj se celice ne delijo, poveča se le njihova prostornina [17, 38].

1.4.4 Faza eksponentne rasti

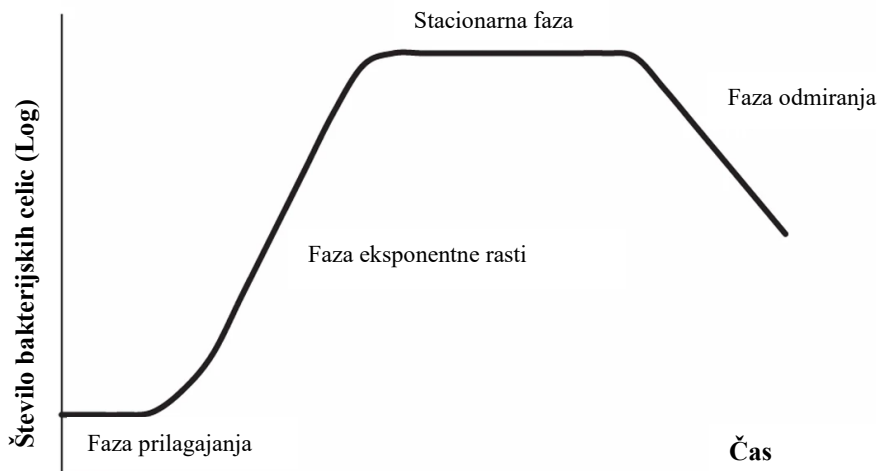
V eksponentni ali logaritemski fazi, ki jo imenujemo tudi *logfaza*, se bakterijske celice intenzivno razmnožujejo. Njihovo število se eksponentno veča, naklon krivulje pa je odvisen od medija, pogojev in od vrste bakterij. Eksponentna rast se nadaljuje, dokler okolje (gojišče) ne zmore več vzdrževati kulture [17]. Faza v povprečju traja nekje med 6 in 12 ur [38].

1.4.5 Stacionarna faza

V zaprtem sistemu je bakterijska rast omejena bodisi zaradi pomankanja hranil, bodisi zaradi kopičenja odpadnih produktov. Ko se eksponentna rast zaradi enega ali obeh razlogov konča, populacija vstopi v stacionarno fazo. Število celic je stalno, saj je prirastek približno enak odmiranju. Celični metabolizem se iz rasti preusmeri v preživetje, prav tako pa se celice spremenijo tudi morfološko [38].

1.4.6 Faza odmiranja

V fazi odmiranja se število celic naglo zmanjšuje zaradi pomankanja hranil in kopičenja strupenih stranskih produktov [38]. Delitev poteka le še pri redkih celicah, večina pa jih odmre. Nekatere vrste tvorijo spore in tako preživijo, ali pa se prilagodijo in za rast ponovno uporabijo hranila iz odmirajočih celic [17, 30].

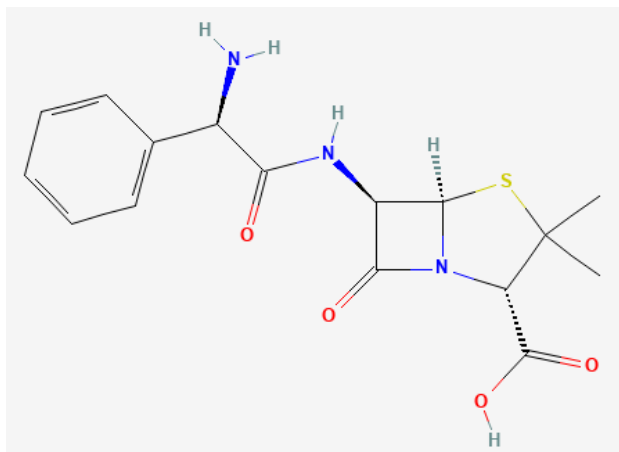


Slika 2: Shematski prikaz rastne krivulje. Prirejeno po: Wang, L., Fan, D., Chen, W., et al. 2015. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. Sci Rep [online], okt., št. članka 15159 [citirano 3. 1. 2025, 12:00]. Dostopno na povezavi: <https://doi.org/10.1038/srep15159>

1.5 Antibiotik ampicilin

Antibiotiki so snovi, ki zavirajo rast bakterij ali jih uničujejo, poznamo pa več različnih tipov antibiotikov, ki delujejo na različne tarče v bakterijskih celicah. Ampicilin je antibiotik, ki ga uvrščamo med betalaktamske antibiotike. Zanje je značilen štiričlenski betalaktamski obroč, na katerega se pri penicilinih veže petčlenski obroč z žveplom. Betalaktamski antibiotiki so baktericidni, saj zavirajo sintezo peptidoglikana, osnovne enote bakterijske celične stene. Za njegovo sintezo iz N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline pa so potrebni encimi karboksipeptidaze in transpeptidaze ali penicilin vezavni proteini (angl. *penicillin binding proteins*, PBP). Betalaktamski antibiotiki vstopajo skozi celično steno, nato pa se vežejo na PBP, s čimer onemogočijo sintezo peptidoglikana in celične stene. Tako se začnejo nabirati osnovni gradniki celične stene, to pa sproži avtolitični sistem celice.

Ampicilin uvrščamo med širokospektralne peniciline, saj deluje proti po Gramu pozitivnim kokom in proti nekaterim po Gramu negativnim bacilom [30].



Slika 3: Struktura ampicilina. Vir: National Center for Biotechnology Information. 2025. PubChem Compound Summary for CID 6249, Ampicillin [online]. [citirano 3. 1. 2025; 11:00]. Dostopno na povezavi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin.>

2 Namen dela in hipoteze

2.1 Opredelitev problema

Antibiotiki so temelj sodobne medicine, vendar pa zaradi njihove prekomerne in pogosto nepotrebne uporabe patogeni organizmi nanje razvijajo odpornost. Po navedbah Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je odpornost mikroorganizmov na antibiotike (protimikrobna odpornost) ena največjih groženj javnemu zdravju po svetu. Zgolj v letu 2019 je bila neposredni razlog za 1,27 milijonov smrti, posredno pa je prispevala k skoraj pet milijonom smrti po svetu. Kot posledica protimikrobne odpornosti se pojavi neučinkovitost antibiotikov in drugih zdravil proti povzročiteljem infekcij, te pa postanejo težko oziroma neozdravljive. Poročila sistema GLASS (Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) iz leta 2022 kažejo, da je že 42% vseh bakterij vrste *Escherichia coli* izoliranih iz bolnikov odpornih na cefalosporine tretje generacije. Kar ena petina okužb sečil s to bakterijo je kazala na zmanjšano učinkovitost ampicilina in drugih antibiotikov [39].

Tako so ena izmed prioritet pri spopadanju s tem skrb zbujujočim problemom tudi raziskave in razvoj novih protimikrobnih zdravil. Kot vir novih protimikrobnih učinkovin se ponujajo tudi glive, ki so dokaj neraziskana skupina organizmov. Za glivne proteine je značilna velika biološka aktivnost, dokazane imajo različne protibakterijske učinke – pa tudi vpliv na rakave celice. Eni izmed omenjenih glivnih proteinov so lektini, ki ponujajo možnost protimikrobnega učinka. Vežejo se na glikane, s katerimi bakterije stopijo v stik s podlago in pričnejo tvorbo biofilma [40]. Vir glivnih lektinov je tudi goba poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*), iz katere so bili v dosedanjih raziskavah nekateri lektini že izolirani in opisani [23]. Izoliran je bil tudi lektin CnGL, ki se veže na glukozo, vendar pa njegov vpliv na bakterijsko rast še ni raziskan. Lektin CnGL bi lahko imel učinke na bakterijsko rast, zato ga je smiselno raziskati in preučiti njegove vplive na rast bakterij vrst *Listeria innocua* (sorodna patogeni *L. monocytogenes*) in *Escherichia coli*. Obe spadata v skupino bakterij, ki pogosto povzročajo okužbe s hrano in so zato pomemben javnozdravstveni problem.

2.2 Namen dela

Namen raziskovalne naloge je bil izolirati za glukozo specifičen lektin iz gobe poprhnjene livke (*Clitocybe nebularis*) in ugotoviti, kako vpliva na rast bakterij. Za izolacijo proteina smo uporabili metodo afinitetne kromatografije z nosilcem sefaroze, na katero je bil vezan sladkor glukozo. Za koncentriranje izoliranega proteina smo uporabili ultrafiltracijo. S poliakrilamidno

gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata smo želeli določiti približno molsko maso izoliranega proteina in ugotoviti njegovo čistost.

Za analizo vplivov izoliranega proteina na rast bakterij smo uporabili predstavnika dveh bakterijskih skupin. Kot predstavnik po Gramu pozitivnih bakterij je služila vrsta *Listeria innocua*, ki je sorodna človeku patogeni vrsti *Listeria monocytogenes*. Kot predstavnik po Gramu negativnih bakterij pa je služila vrsta *Escherichia coli*. Zaradi varnejšega dela, smo izbrali nepatogena seva obeh vrst, ki se pogosto uporabljata kot modelna seva za njune patogene sorodnike. Bakterijsko rast smo spremljali z merjenjem optične gostote bakterijskih kultur v mikrotitrski plošči z uporabo spektrofotometra. Iz zbranih meritev optične gostote smo želeli izrisati rastne krivulje, obdelati podatke in tako ugotoviti vpliv lektina CnGL na rast bakterij.

2.3 Hipoteze

Postavili smo si naslednje hipoteze:

1. V našem vzorcu poprhnjene livke bo prisoten lektin CnGL, ki se veže na glukozo.
2. Lektin CnGL bo vplival na rast bakterij.
3. Lektin CnGL bo imel različen vpliv na rast pri različnih vrstah bakterij.

3 Materiali in metode

3.1 Reagenti

<i>Reagenti</i>	<i>Proizvajalec</i>
akrilamid/bisakrilamid	Merck, Nemčija
ampicilin	Molekula group, Velika Britanija
amonijev persulfat	Sigma Aldrich, ZDA
bromfenol modro	Thermo Scientific, ZDA
etanojska kislina	J. T. Baker, Nemčija
etanol	Carlo Erba, Italija
formaldehid (37 % raztopina)	Millipore, ZDA
glicerol	GE Healthcare, ZDA
glicin	Sigma Aldrich, ZDA
izopropanol	Carlo Erba, Italija
klorovodikova kislina, HCl	VWR, ZDA
NaDS	Serva, Nemčija
natrijev hidroksid, NaOH	Fisher Scientific, Velika Britanija
natrijev karbonat, Na ₂ CO ₃	Honeywell, ZDA
natrijev klorid, NaCl	LabExpert, Velika Britanija
natrijev tiosulfat, Na ₂ S ₂ O ₃	Fluka Chemika, Švica
srebrov nitrat, AgNO ₃	Fisher Scientific, Velika Britanija
standard za NaDS PAGE proteinov nizke molske mase	Cytiva, Švedska
TEMED	Serva, Nemčija
Tris	Serva, Nemčija

3.2 Laboratorijska oprema

- aparatura za NaDS PAGE: »mPAGE® Mini Gel Tank«, Millipore, ZDA
- aparatura za pripravo MilliQ vode: Evoqua Water Technologies, ZDA
- aparatura za vlivanje gelov za elektroforezo: »mPAGE® Gel Casting Device, Millipore, ZDA«
- avtomatske pipete (10–5000 µL): Eppendorf, Nemčija
- centrifuga: »Eppendorf 5702 R«, Eppendorf, Nemčija
- centrifuga: »Sorvall LYNX 4000«, Thermo Fisher Scientific, ZDA
- centrifugirke (10 in 50 mL): »Falcon®«, Corning, ZDA
- čitalec mikrotitrskih plošč: »Sunrise«, Tecan, Avstrija
- glavnički (za 10 žepkov): Bio-Rad, ZDA
- hladilnik: Electrolux, Švedska
- inkubator: »Certomat HK«, B. Braun Biotech International, Nemčija
- kivete: Ratiolab, Nemčija
- krpicе: »to to biorazgradljive soft krpicе«, Tosama, Slovenija
- laminarna komora: SC-R Labcaire, Velika Britanija
- magnetno mešalo: »Rotamix SHP 10«, Domel, Slovenija
- membrana za ultrafiltracijo (3 kDa): »Ultracel® 3 kDa«, Millipore, ZDA
- mikrocentrifugirke: Eppendorf, Nemčija
- mikrotitrski plošča: (model 92096), Techno Plastic Products, Švica
- namizna centrifuga: »Mini star centrifuge«, Pioneer Veterinary Products, Velika Britanija
- napajalnik za elektroforezo: »Power pac 300«, Bio-Rad, ZDA
- pH lističi: »PANPEHA«, GE Healthcare, ZDA
- pH meter: »Seven easy«, Mettler Toledo, ZDA
- pipetor: »accu-jet® S«, Brand, Nemčija
- plinski gorilnik: (model 1330), Carl Friedrich Usbeck KG, Nemčija
- rotacijski stresalnik: »Vibromix 31«, Tehtnica, Slovenija
- serološke pipete (10 mL): »Falcon®«, Corning, ZDA
- sistem za slikanje gelov: »ChemiDoc Imaging System«, Bio-Rad, ZDA
- spektrofotometer: »NanoDrop 2000c«, Thermo Fisher Scientific, ZDA
- stekelca za vlivanje gelov (1,5 mm): »Mini-PROTEAN®«, Bio-Rad, ZDA
- sterilne eze/cepilne zanke: Golias, Slovenija
- stojalo za vlivaje gelov: »mPAGE® Gel Caster«, Millipore, ZDA
- stresalnik: »Certomat R«, B. Braun Biotech International, Nemčija
- termoblok: »Thermo-Shaker PHMT«, Grant-bio, Velika Britanija
- tehtnica: »Vibra AJ«, Vibra Shinko Denshi, Japonska
- ultrafiltracijska celica: »Amicon 8200«, Millipore, ZDA
- ultrafiltrator: »Macrosep® Advance«, Pall, ZDA
- vibracijski stresalnik: »Grant Instruments PV-1«, Thermo Fisher Scientific, ZDA
- vibracijski stresalnik: »Vibromix 10«, Tehtnica, Slovenija

3.3 Pufri in raztopine

Pufri in raztopine za afinitetno kromatografijo:

- Vezavni pufer: 20 mM Tris-HCl in 0,4 M NaCl, pH 7,4. Za pripravo 3 L pufera v dH₂O raztopimo 7,23 g Tris in 70,13 g NaCl ter pH uravnamo s HCl.
- Elucijski pufer: 10 mM NaOH. Za pripravo 0,5 L pufera v dH₂O raztopimo 0,2 g NaOH.
- Nevtralizacijski pufer: 0,8 M Tris-HCl in 3 M NaCl, pH 7. Za pripravo 100 mL pufera v dH₂O raztopimo 9,69 g Tris in 17,53 g NaCl ter pH uravnamo s HCl.
- Pufer 2 M Tris: 2 M Tris-HCl, pH 7,5. Za pripravo 50 mL pufera v dH₂O raztopimo 12,11 g Tris in pH uravnamo s HCl.

Pufri in raztopine za NaDS PAGE:

- Pufer za ločevalni gel: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Za pripravo 100 mL pufera v dH₂O raztopimo 18,15 g Tris in pH uravnamo s HCl. Pufer avtoklaviramo in shranimo pri 4 °C.
- Pufer za koncentrirni gel; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. Za pripravo 100 mL pufera v dH₂O raztopimo 6,05 g Tris in pH uravnamo s HCl. Pufer avtoklaviramo in shranimo pri 4 °C.
- 10-odstotna raztopina NaDS: 10 g NaDS raztopimo v 100 mL dH₂O.
- 40-odstotna raztopina akrilamid/bisakrilamid.
- 10-odstotna raztopina APS: 100 mg APS raztopimo v 1 mL dH₂O in avtoklaviramo ter shranimo pri -20 °C.
- Nanašalni pufer: 2,5 mL pufera za koncentrirni gel, 2,0 mL glicerola, 4,0 mL 10-odstotne raztopine NaDS, bromfenol modro in 1,5 mL dH₂O. Pufer avtoklaviramo in shranimo pri 4 °C.
- Elektroforezni pufer: Za pripravo 1 L pufera v dH₂O raztopimo 29 g Tris, 144 g glicina in 10 g NaDS.

Raztopine za barvanje s srebrom:

- 0,2 % Na₂S₂O₃: v 100 mL vode MilliQ raztopimo 0,2 g Na₂S₂O₃.
- 0,02 % Na₂S₂O₃: 5 mL 0,2 % Na₂S₂O₃ z vodo MilliQ razredčimo do 50 mL.
- 6 % Na₂CO₃: v 250 mL vode MilliQ raztopimo 15 g Na₂CO₃.
- 0,2 % AgNO₃: v 50 mL vode MilliQ raztopimo 0,1 g AgNO₃. Dodamo 50 µL 37-odstotne raztopine formaldehida.

- Fiksacijska raztopina: 250 mL etanola, 60 mL etanojske kisline in 250 μ L 37-odstotne raztopine formaldehida dopolnimo z vodo MilliQ do 500 mL.
- 50-odstotni etanol.

Ostale raztopine:

- Ampicilin 20 μ g/mL: v 1 mL sterilne vode MilliQ razredčimo 8 μ L založne raztopine ampicilina s koncentracijo 100 mg/mL. Po dodatku 5 μ L te raztopine v jamice, je bila končna koncentracija ampicilina v testu 20 μ g/mL.
- Ampicilin 1 μ g/mL: v 1 mL sterilne vode MilliQ razredčimo 50 μ L raztopine ampicilina s koncentracijo 20 μ g/mL. Po dodatku 5 μ L te raztopine v jamice, je bila končna koncentracija ampicilina v testu 1 μ g/mL.

3.4 Biološki material

Biološki material za izolacijo lektina CnGL je bila goba poprhnjena livka, nabrana 13. 11. 2023 v okolici Zaloga pri Ljubljani. Do eksperimentov je bila zamrznjena pri -20°C . Masa gob, iz katerih smo izvajali izolacijo, je bila 830 g.

Kot biološki material za proučevanje vpliva lektina CnGL na rast bakterij sta bili uporabljeni dve vrsti bakterij:

- *Escherichia coli*, sev DH5 α ,
- *Listeria innocua*, sev ŽM39.

3.5 Gojišča

Ta so:

- Tekoče gojišče LB Miller: 1 L gojišča vsebuje 10 g NaCl, 10 g triptona in 5 g kvasnega ekstrakta. 25 g pripravka raztopimo v 1 L vode in avtoklaviramo 15 minut pri 121°C . Proizvajalec: Sigma Aldrich, ZDA.

-Trdno gojišče TSA: 1 L gojišča vsebuje 17 g kazeinskega peptona, 5 g NaCl, 3 g sojinega peptona, 2,5 g K_2HPO_4 in 2,5 g glukoze. 30 g pripravka in 15 g agarja v prahu raztopimo v 1 L vode in avtoklaviramo 15 minut pri 121°C . Ohladimo na od 45 do 50°C in vlijemo v sterilne petrijevke. Proizvajalec: Sigma Aldrich, ZDA.

3.6 Metode dela

3.6.1 Izolacija lektina CnGL

3.6.1.1 Iztiskanje soka gobe poprhnjene livke

Preko noči smo odmrznili gobo poprhnjeno livko, ki je bila pred tem zamrznjena in shranjena pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo v banjico iz stiropora nasuli led in vanjo postavili čašo, v katero se bo stekal sok. V kovinsko stiskalko smo namestili viskozno krpico in vanjo dali koščke odmrznjene gobe. Krpico smo zaprli in material večkrat stisnili, da smo iz gobe dobili ves sok, ki se je stekal v čašo. Postopek smo večkrat ponovili, da smo iztisnili vse kose gobe. Iz 830 g gobe smo dobili približno 730 mL soka. V čašo s sokom smo vmešali 0,73 g reducenta $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in 17,06 g NaCl ter z merilno pipeto dodali še 7,4 mL pufru 2 M Tris s pH 7,5. Sok smo nato mešali na magnetnem mešalu tako dolgo, da so se vsi trdni topljenci raztopili.

3.6.1.2 Centrifugiranje soka

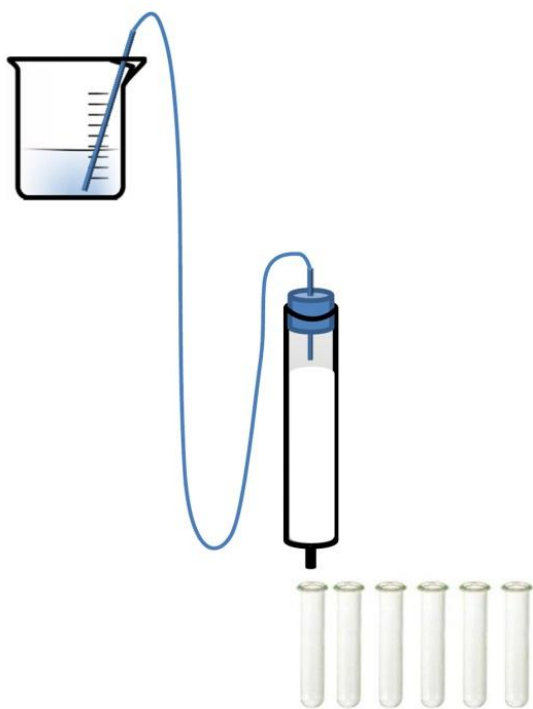
Tako pripravljeno raztopino smo prelili v šest centrifugirk in po dve v paru umerili na enako maso. Nato smo jih vstavili v rotor centrifuge in jih centrifugirali 15 minut pri 11000 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končanem centrifugiranju smo supernatant prelili v čašo, nato pa ga prek filter papirja prefiltrirali v steklenico. Tako pripravljene sok smo prelili v manjše označene platenke in jih zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nadaljnje uporabe.

3.6.1.3 Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda, ki temelji na specifičnih, nekovalentnih in reverzibilnih interakcijah med različnimi biološkimi molekulami. Eno izmed molekul (ligand) imobiliziramo na nosilec (v našem primeru sefaroza, ki smo ji vezali glukozo), skozi katerega spustimo raztopino z iskano molekulo, ki se poveže z ligandom. Nato te interakcije prekinemo (v našem primeru s spremembo pH z NaOH), iskana molekula pa se izloči oziroma eluira v več frakcijah [41].

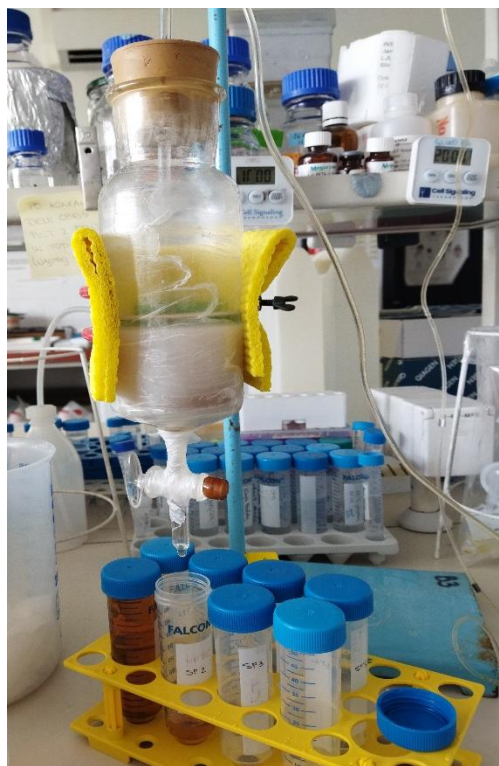
Nosilec v kromatografski koloni smo čez noč spirali, ekvilibrirali z vezavnim pufrom, in sicer s približno 10-kratnim volumnom sefaroze v koloni. Puffer smo dodajali po kapljicah s pomočjo sistema za dovajanje pufru (slika 4). Dotok pufru smo nato ustavili in približno 200 mL soka nanesli na pripravljen nosilec. Vzorec smo pomešali s sefarozo in ga inkubirali 20 minut. Nato smo odprli ventil pod kromatografsko kolono in spodaj postavili plastično posodico. Kolono smo pričeli spirati z vezavnim pufrom, ki smo ga po kapljicah dodajali s sistemom za dovajanje.

V posodico se je pričela zbirati nevezana frakcija. Ko se je ta nekoliko razbarvala, smo pod kolono postavili osem zaporedno označenih 50-mililitrskih centrifugirk. Vsaka je predstavljala sprano frakcijo, ki smo jih označili z rimskimi številkami. Ko so bile frakcije že skoraj brezbarvne, smo pričeli z rednim merjenjem absorbance pri 280 nm. Ko se je ta približala vrednosti 0, smo kolono ustavili in spodaj postavili stojalo s 40 zaporedno označenimi epruветami. Pričeli smo z dodajanjem elucijskega pufra. V epruветah smo zbirali eluirane frakcije po 10 mL in vsaki pomerili pH. Ko se je ta zvišal na 8, zato smo v to in vse naslednje frakcije s pipeto dodali 500 μ l nevtralizacijskega pufra. Vsako epruветo smo tudi premešali. Zbrane frakcije smo shranili v hladilniku pri 4 °C do nadaljnjih eksperimentov.



Slika 4: Shema sistema za dovajanje pufra pri afinitetni kromatografiji.

Prerejeno po: Kuhelj, R. 2021. *Biokemija v praksi: načela in tehnike*. 3. izd., 6. nat. Ljubljana: UL, FKKT.



Slika 5: Kromatografska kolona.

3.6.1.4 Spektrofotometrija

Proteini močno absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 280 nm, saj pri le-tej absorbirajo aromatske aminokisliline triptofan, tirozin in fenilalanin. To lastnost proteinov s pridom uporabljamo pri njihovi detekciji in določanju koncentracije. Absorpcija neke snovi je premo sorazmerna z njeno koncentracijo, kar opisuje Beer-Lambertov zakon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Pri tem je A absorbanca snovi, ε molarni absorpcijski koeficient, c koncentracija snovi v raztopini in l dolžina poti svetlobe. Molarni absorpcijski ali ekstinkcijski koeficient je odvisen od zgradbe snovi [42]. Tako smo na podlagi izmerjenih absorbcanc lahko ocenili relativno koncentracijo proteinov v raztopini.

Absorbance smo merili s spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, ZDA) pri valovni dolžini 280 nm. Meritve A_{280} spranih frakcij smo izvajali sočasno z afinitetno kromatografijo, absorbanco v eluiranih frakcijah pa smo izmerili dan po izvedbi afinitetne kromatografije. Za meritev A_{280} spranih frakcij smo kot slepi vzorec na spektrofotometer nanesli 2 μ L vezanega pufru in ga tako umerili. Nato smo nanesli še 2 μ L vsake sprane frakcije in pomerili absorbanco. Izvedli smo dve meritvi. Za meritve A_{280} prvih šestih eluiranih frakcij smo uporabili enak postopek. Pri sedmi frakciji, pri kateri se je tudi spremenil pH, smo spektrofotometer ponovno umerili. Kot slepi vzorec smo uporabili elucijski pufer. Na podlagi izmerjenih absorbcanc smo izrisali elucijski diagram in se glede na vrhove odločili, katere frakcije bomo uporabili za nadaljnjo analizo z NaDS-PAGE.

3.6.1.5 NaDS PAGE

Za ločevanje proteinov in nukleinskih kislin pogosto uporabljamo metodo gelske elektroforeze, ki poteka na agaroznih ali poliakrilamidnih gelih. Posebna vrsta gelske elektroforeze je poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE). S to metodo proteine ločujemo zgolj po velikosti, zelo uporabna pa je tudi za določanje približne molekulske mase. NaDS je anionski detergent, ki prekine privlake med aminokislinami v proteinu in ga enakomerno negativno nabije. Disulfidne vezi prekinemo z dodatkom reducenta, terciarno strukturo pa porušimo z nekaj minutnim segrevanjem vzorcev pri 100 °C.

Elektroforeza poteka na gelu, ki je sestavljen iz dveh različno zamreženih poliakrilamidnih gelov, v katerih je prisoten NaDS. Zgornji gel se imenuje zbiralni ali koncentracijski gel, spodnji pa ločevalni ali separacijski gel in je namenjen ločevanju proteinov. Pri NaDS PAGE

najmanjši proteini pripotujejo najdlje, po ustreznem barvanju pa jih vidimo kot obarvane lise [41].

Dva 1,5 mm debela gela za elektroforezo smo pripravili z aparaturo za vlivanje gelov za elektroforezo mPAGE® Gel Casting Device, Millipore, ZDA, v katero smo vpeli stekelca za pripravo gelov. Nadaljevali smo z mešanjem gelov. Za ločevalni gel smo v 50-mililitrski centrifugirki zmešali prve štiri raztopine iz preglednice 1 (ločevalni gel). Zmesi smo nato dodali še APS in TEMED, jo hitro premešali ter s pipeto vlili med stekelci v stojalu. Na vrh gela smo nalili izopropanol za zravnjanje gladine. Gel smo pustili stati približno 20 minut, da je akrilamid polimeriziral. Za pripravo koncentrirnega gela smo v 50-mililitrsko centrifugirko odpipetirali prve štiri raztopine iz preglednice 1 (koncentrirni gel) in pred vlivanjem gela dodali raztopini APS in TEMED ter raztopino hitro pomešali. Ko se je ločevalni gel strdil, smo odstranili izopropanol in vlili še koncentrirni gel. Vanj smo vstavili glavniček za deset žepkov.

Preglednica 1: Reagenti za ločevalni in koncentrirni gel za NaDS PAGE.

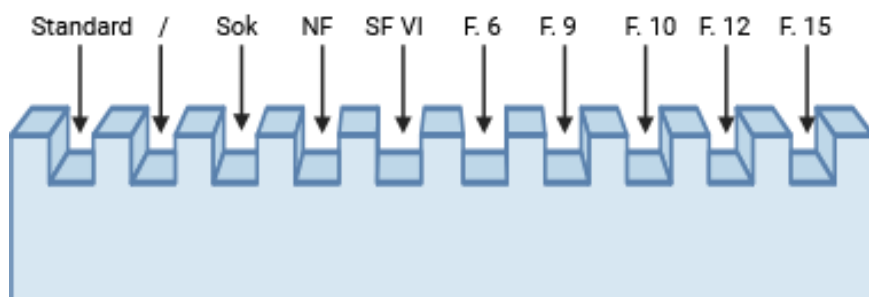
Reagent	Ločevalni gel	Koncentrirni gel
Voda MilliQ	8,670 mL	6,335 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 mL	/
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	/	2,500 mL
10 % NaDS	0,200 mL	0,100 mL
40-odstotna raztopina akrilamida	6,000 mL	1,000 mL
10-odstotna raztopina APS	0,100 mL	0,050 mL
TEMED	0,030 mL	0,015 mL

Vzorci smo pripravili v mikrocentrifugirkah, tako da smo jim dodali ustrezne volumne 6x nanašalnega pufra z reducentom (preglednica 2). Vzorci smo centrifugirali v namizni centrifugi, nato pa smo jih inkubirali 10 minut pri 100 °C. Pred nanosom smo vzorce še enkrat centrifugirali.

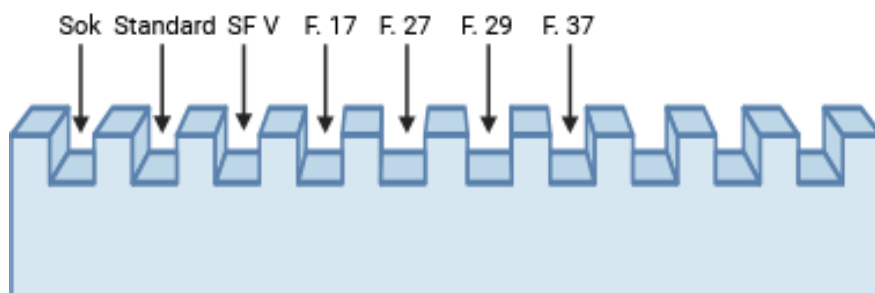
Preglednica 2: Prostornine vzorcev in nanašalnega gela za NaDS PAGE.

Vzorec	Prostornina vzorca	Prostornina nanašalnega pufra
Sok	5 µL	1 µL
Nevezana frakcija	10 µL	2 µL
Sprana frakcija (V. in VI.)	20 µL	4 µL
Eluirana frakcija (6., 9., 10., 12., 15., 17., 27., 29., 37.)	35 µL	7 µL

V elektroforezno komoro smo vpeli stekelci z geloma in do oznake nalili elektroforezni pufer. Na gela smo nanесли vzorce v skladu z vnaprej določeno shemo (prikazano na slikah 6 in 7). Na vsak gel smo nanесли tudi 3 μL standarda za NaDS PAGE proteinov nizke molske mase (Cytiva, Švedska). Elektroforeza je potekala pri toku 70 mA približno 70 minut. Po končani elektroforezi smo gela odstranili izmed stekelc in ju prenesli v fiksacijsko raztopino, v kateri smo ju inkubirali preko noči na orbitacijskem stresalniku.

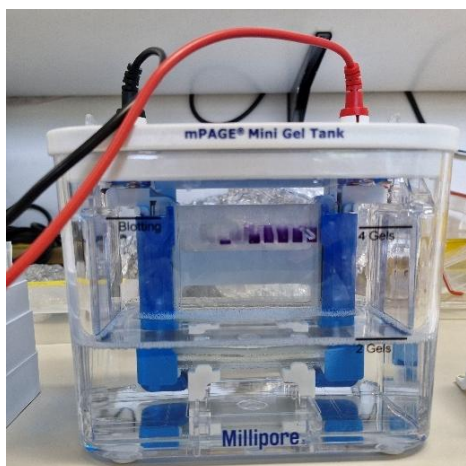


Slika 6: Shema nanosa vzorcev na prvi gel za NaDS PAGE. Vzorci so nanoseni v skladu s prikazom na shemi.

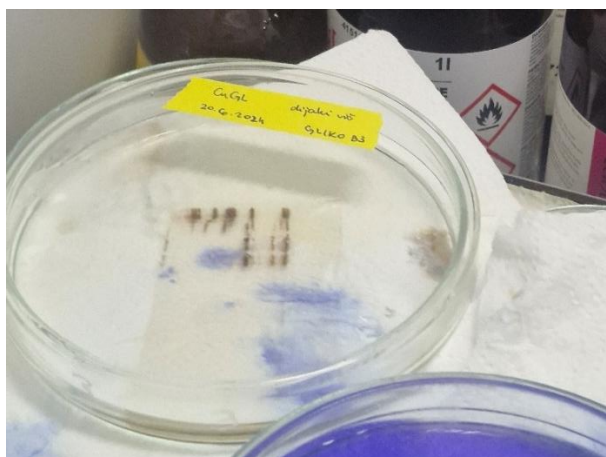


Slika 7: Shema nanosa vzorcev na drugi gel za NaDS PAGE. Vzorci so nanoseni v skladu s prikazom na shemi.

Po fiksaciji v etanolu in etanojski kislini, smo raztopino odlili in v petrijevko z geloma dolili 50-odstotni etanol ter ju tako inkubirali 20 minut. Postopek smo ponovili še dvakrat in vsakič zamenjali raztopino etanola. Nato smo gela razdelili v dve petrijevki. V vsako smo nalili vodo MilliQ in stresali 20 sekund. Vodo MilliQ smo vsakič zamenjali in postopek še dvakrat ponovili. V vsako petrijevko smo nalili 50 mL pripravljene raztopine AgNO_3 in gela impregnirali približno 20 minut. Raztopino smo odlili in vsak gel dvakrat spirali 30 sekund z vodo MilliQ. V vsako petrijevko smo nalili 50 mL razvijalne raztopine Na_2CO_2 in gela barvali, dokler se niso pojavile rjave lise. Takrat smo barvanje ustavili, odlili raztopino za razvijanje in v petrijevki dodali raztopino etanola in etanojske kisline. Gela smo inkubirali 10 minut, zatem pa smo ju še 10 minut spirali z vodo MilliQ. V postopku barvanja smo gela stresali na rotacijskem stresalniku (Vibromix 31, Tehnica, Slovenija). Vsak gel smo nato fotografirali s sistemom za slikanje gelov (ChemiDoc Imaging System, Bio-Rad, ZDA).



Slika 8: Aparatura za NaDS PAGE.



Slika 9: Barvanje gelov s srebrom.

3.6.1.6 Ultrafiltracija

Na podlagi elucijskega diagrama in analize gelov NaDS PAGE smo združili frakcije, za katere smo sklepali, da vsebujejo iskani protein. To so bile vse frakcije, od vključno šeste naprej. Raztopino s proteinom smo prelili v ultrafiltracijsko celico (Amicon 8200, Millipore, ZDA) in jo ob stalnem mešanju koncentrirali v hladni sobi (4 °C). Ultrafiltracija je potekal pri stalnem tlaku pet barov skozi membrano, ki prepušča molekule manjše od 3 kDa. Po zaključeni filtraciji smo koncentrirano raztopino s proteinom zamrznili pri -20 °C in jo shranili do nadaljnjih eksperimentov.



Slika 10: Ultrafiltracija izoliranega lektina.

3.6.2 Proučevanje vpliva lektina CnGL na bakterijsko rast

3.6.2.1 Priprava prekonočnih kultur

V šest sterilnih epruvet smo aseptično prenesli 5 mL tekočega gojišča LB Miller. S cepilno zanko smo v 3 epruvete aseptično nacepili kolonije bakterij *L. innocua* s trdnega gojišča. V preostale tri epruvete z gojiščem pa smo s pomočjo sterilnih nastavkov za pipetiranje aseptično nacepili kolonije bakterij *E. coli*. Prekonočne kulture smo inkubirali 18-20 ur pri 37 °C in 190 obratih na minuto (rpm). Postopek priprave prekonočnih kultur je bil enak za vse tri ponovitve.

3.6.2.2 Proučevanje rasti bakterij

Izvedli smo eno poskusno in dve biološki ponovitvi proučevanja rasti bakterij. Vse nadaljnje opisano delo je potekalo v aseptičnih pogojih v laminarju. Prekonočne kulture bakterij *E. coli* smo resuspendirali in združili. 100 µL kulture smo v kiveti razredčili z 900 µL gojišča (desetkratna redčitev). V drugo kiveto smo odpipetirali 1 mL gojišča za slepi vzorec. Prekonočne kulture bakterij *L. innocua* smo resuspendirali in jih prestavili v tri 10 mL centrifugirke, v katerih smo jih centrifugirali 10 min pri 3000 rpm. Odlili smo supernatant, usedline smo resuspendirali v 100 µL gojišča in kulture združili v eno epruveto. 50 µL resuspendirane kulture smo v kiveti razredčili s 950 µL gojišča (dvajsetkratna redčitev). Vsem trem vzorcem smo s spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, ZDA) izmerili optično gostoto pri 600 nm. Glede na dobljene rezultate smo preračunali potrebne redčitve kultur, da smo dosegli optično gostoto 0,1. Optične gostote in izračunane prostornine za vse tri ponovitve so predstavljene v preglednici 3. Pripravili smo raztopini antibiotika ampicilina opisani v poglavju 3.3.

Preglednica 3: Optične gostote in prostornine gojišč ter kultur za tri ponovitve.

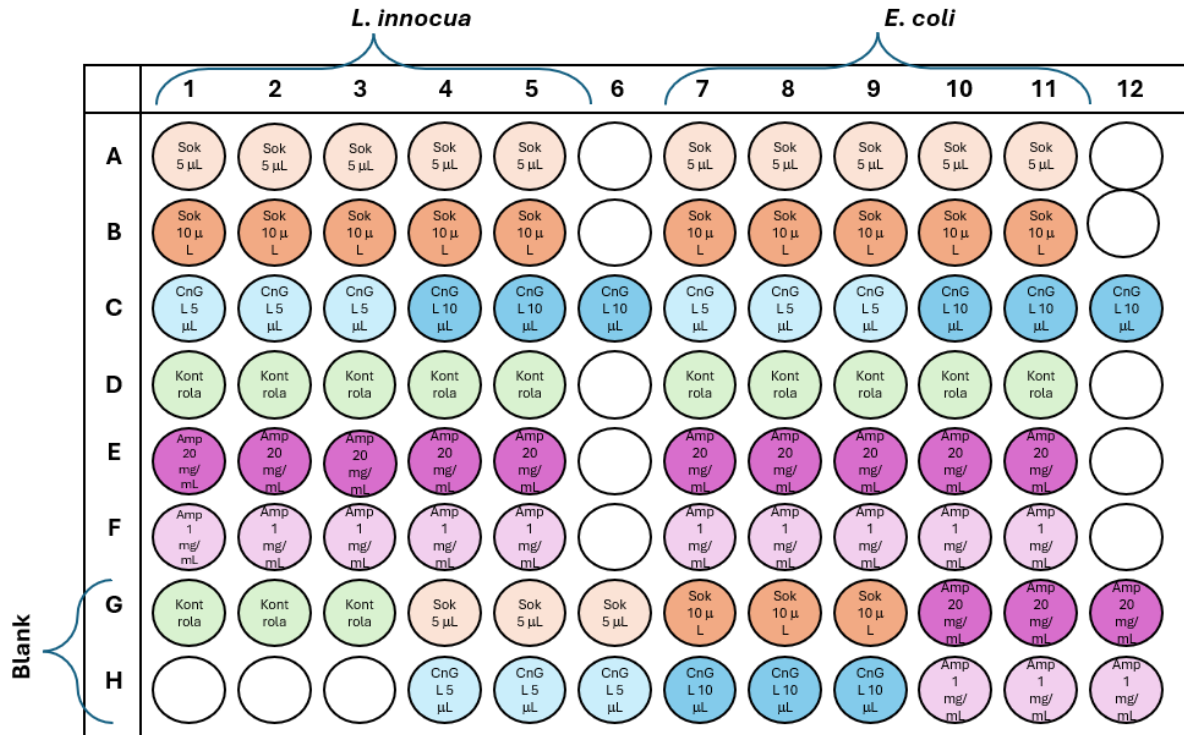
	Poskusna ponovitev	Prva biološka ponovitev	Druga biološka ponovitev
Optična gostota dvajsetkratne redčitve kulture <i>L. innocua</i>	0,206	0,185	0,166
Prostornina kulture <i>L. innocua</i>	170 μ L	189 μ L	211 μ L
Prostornina gojišča za kulturo <i>L. innocua</i>	6,830 mL	6,811 mL	6,789 mL
Optična gostota desetkratne redčitve kulture <i>E. coli</i>	0,446	0,421	0,490
Prostornina kulture <i>E. coli</i>	157 μ L	166 μ L	143 μ L
Prostornina gojišča za kulturo <i>E. coli</i>	6,843 mL	6,824 mL	6,857 mL

Za spektrofotometrično merjenje optične gostote in proučevanje rasti bakterij smo na mikrotitrsko ploščo nanesti vzorce z različnimi učinkovinami. V zadnji dve vrsti smo za slepe vzorce nanesti 200 μ L gojišča, v katerega smo dodali različne učinkovine oziroma vodo MilliQ v skladu s shemo (slika 11). Končna prostornina v vsaki jamici je bila 210 μ L. Nato smo vrsti s slepimi vzorci prelepili s folijo, ki preprečuje kontaminacijo.

V preostale jamice smo nanesti po 200 μ L bakterijskih kultur in v skladu s shemo (slika 11) dodali ustrezne prostornine vode MilliQ oziroma učinkovin. Končna prostornina v vsaki jamici je znašala 210 μ L. Ploščo smo prelepili s prozorno folijo in jo vstavili v čitalec mikrotitrskih plošč Sunrise (Tecan, Avstrija) ter zagnali program za meritev. Spektrofotometer je odčitaval optično gostoto pri 600 nm v intervalu dveh minut. Nastavljen dovoljen temperaturni razpon je bil med 33 °C in 39 °C, zelena temperatura je bila nastavljena na 37 °C, mešanje pa pri normalni hitrosti. Podatke je v Microsoft Excel beležil s čitalcem povezan program XFLUOR4.

Ker smo v poskusni ponovitvi opazili nekatere pomanjkljivosti, smo le-te pred prvo in drugo biološko ponovitvijo odpravili. Biološki ponovitvi smo z izjemo nekaj tehničnimi spremembami izvedli po istem postopku kot poskusno, da bi preprečili kontaminacije vzorcev. Vzorca soka gobe *C. nebularis* in izoliranega lektina CnGL smo pred biološkima ponovitevama sterilno filtrirali. Pri nanašanju kultur na mikrotitrsko ploščo smo za preprečitev kontaminacije med bakterijama najprej nanesti kulture bakterij *L. innocua* in učinkovine, nato pa smo to

polovico plošče prelepili s prozorno folijo. Nanesli smo še kulture bakterij *E. coli* in učinkovine ter prelepili še drugo polovico plošče.

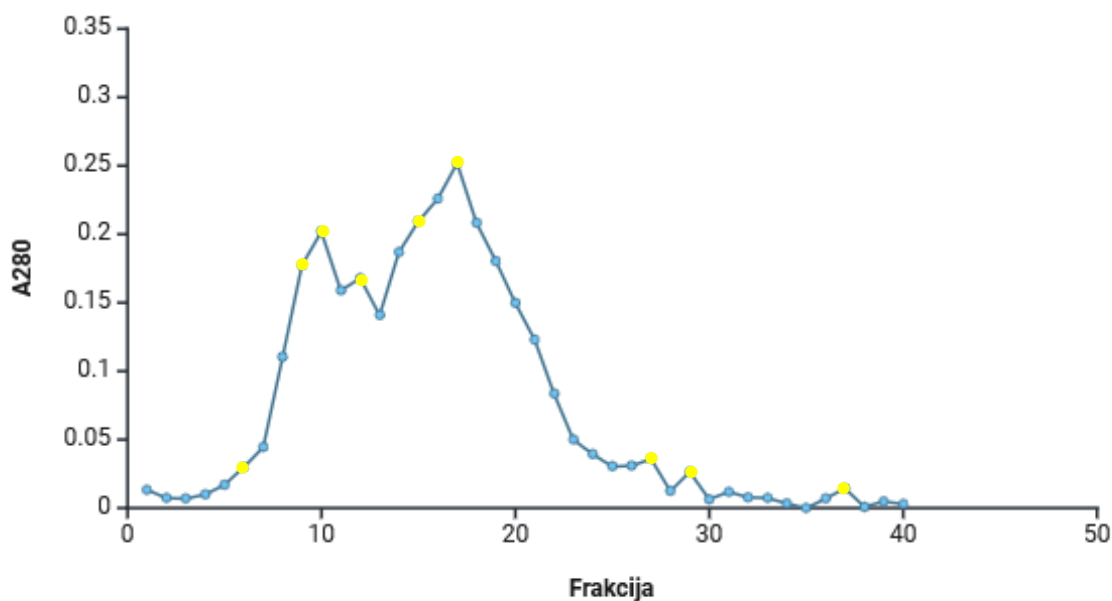


Slika 11: Shema nanosa učinkovin na mikrotitrsko ploščo. Zgornja leva stran plošče predstavlja vzorce bakterij *L. innocua*, desna pa *E. coli*. Spodnji vrstici (blank) predstavljata slepe vzorce, kjer smo uporabili zgolj gojišče brez bakterij. Skupinam s 5 µL soka in 5 µL CnGL ter obema skupinama z ampicilinom smo dodali 5 µL vode MilliQ. Kontrolni skupini smo dodali 10 µL vode MilliQ.

4 Rezultati

4.1 Afinitetna kromatografija in elucijski diagram

Lektin CnGL smo izolirali iz soka poprhnjene livke s pomočjo afinitetne kromatografije na glukozil-sefarozi. Elucijo na nosilec vezanih proteinov smo dosegli s spremembo pH z 10 mM raztopino NaOH. Vsem eluiranim frakcijam smo dvakrat izmerili absorbanco pri 280 nm in izrisali elucijski diagram, ki prikazuje povprečno vrednost A_{280} v odvisnosti od frakcije.

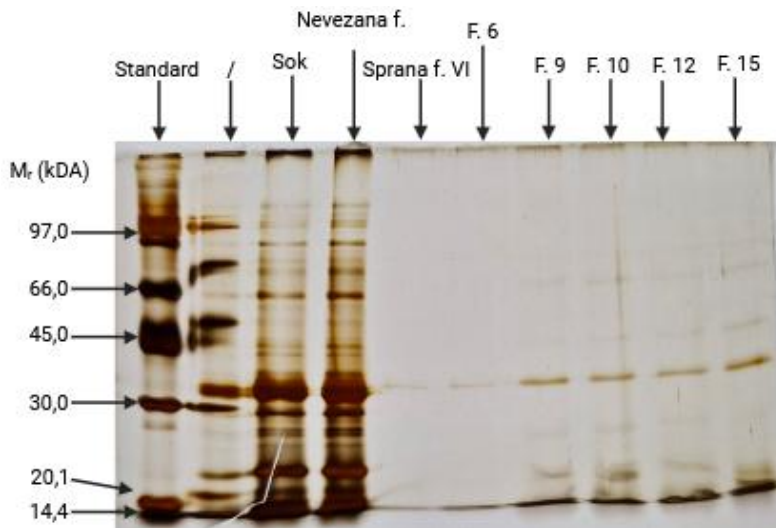


Slika 12: Elucijski diagram afinitetne kromatografije na glukozil-sefarozi. Na diagramu vsaka točka predstavlja absorbanco posamezne frakcije. Z rumeno so označene frakcije, ki smo jih izbrali za analizo z NaDS PAGE.

Izmerjena absorbanca je premo sorazmerna s koncentracijo proteina v raztopini. Pri sedmi frakciji se je pH zvišal na 8, zato smo v epruvete od vključno sedme frakcije dalje dodali nevtralizacijski pufer. V tem trenutku je elucijski pufer pritekel čez kolono, začela se je elucija, kar na sliki vidimo kot krivuljo, ki se naglo vzpne. Vidna sta dva vrhova pri 10. in 17. frakciji, kjer se je izločilo največ proteina. Pri 12. frakciji je viden manjši vmesni vrh. Pri 27., 29. in 37. frakciji opazimo tri manjše vrhove. Tako smo se na podlagi elucijskega diagrama in vrhov odločili, da za nadaljnjo analizo z NaDS PAGE uporabimo frakcije 6, 9, 10, 12, 15, 17, 27, 29 in 37.

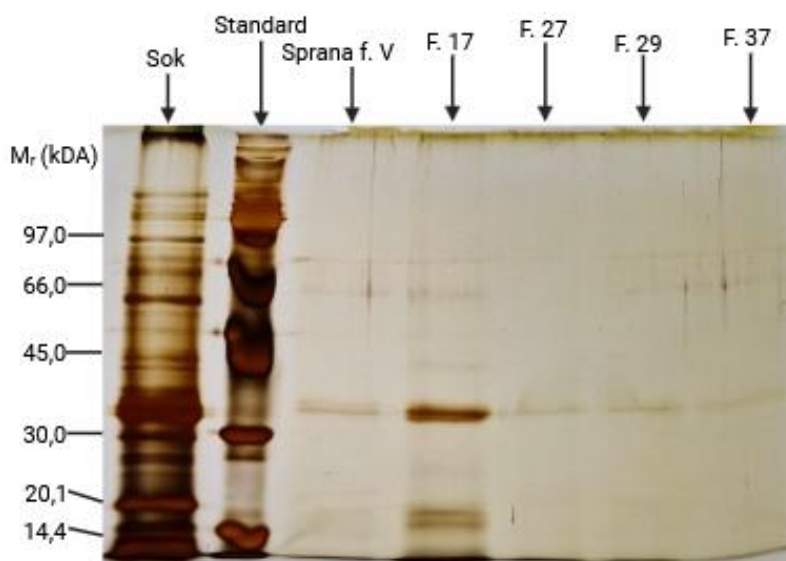
4.2 Analiza vzorcev z NaDS PAGE

Izbrane vzorce smo analizirali z NaDS PAGE, da bi ugotovili vsebnost proteinov v posameznih frakcijah in da bi ocenili čistost izoliranega lektina ter določili njegovo približno molekulsko maso. Vzorce smo nanesti na dva gela, ki smo ju po končani elektroforezi obarvali s srebrom.



Slika 13: Analiza vsebnosti proteinov v izbranih frakcijah afinitetne kromatografije z NaDS-PAGE. Prvi poliakrilamidni gel (12 %) barvan s srebrom. Vzorci označeni F. ustrežajo frakcijam označenim na sliki 12.

Na sliki prvega gela je viden standard, ki prikazuje proteine z znano molekulsko maso za primerjavo. V stolpcu sok in nevezana frakcija opazimo veliko lis, ki predstavljajo proteine, ki so v soku poprhnjene livke. V stolpcu sprana frakcija VI je vidna zelo blede lisa, kar predstavlja nizko koncentracijo proteina. V stolpcih eluiranih frakcij 6 do 15 opazimo močnejšo liso, ki sovpada z razdaljo standardnega proteina z molsko maso 30 kDa.



Slika 14: Analiza vsebnosti proteinov v izbranih frakcijah afinitetne kromatografije z NaDS-PAGE. Drugi poliakrilamidni gel (12 %) barvan s srebrom. Vzorci označeni F. ustrežajo frakcijam označenim na sliki 12.

Na sliki 14 vidimo velikostni standard in ostale vzorce. V stolpcu F. 17 lahko opazimo močno obarvano liso, ki ustreza proteinu velikosti približno 30 kDa. V primerjavi z ostalimi eluiranimi frakcijami je obarvana močnejše. Pri sprani frakciji vidimo blede liso.

Na podlagi elucijskega diagrama in rezultatov NaDS PAGE smo se odločili, da združimo vse frakcije od vključno 6 naprej, saj vsebujejo iskan protein. Zbrane frakcije smo očistili nečistoč s ponovno afinitetno kromatografijo na sefarozi, na katero so se le-te vezale, v nevezani frakciji pa je ostal lektin CnGL s končno koncentracijo 0,5 mg/mL.

4.3 Izkoristek izolacije

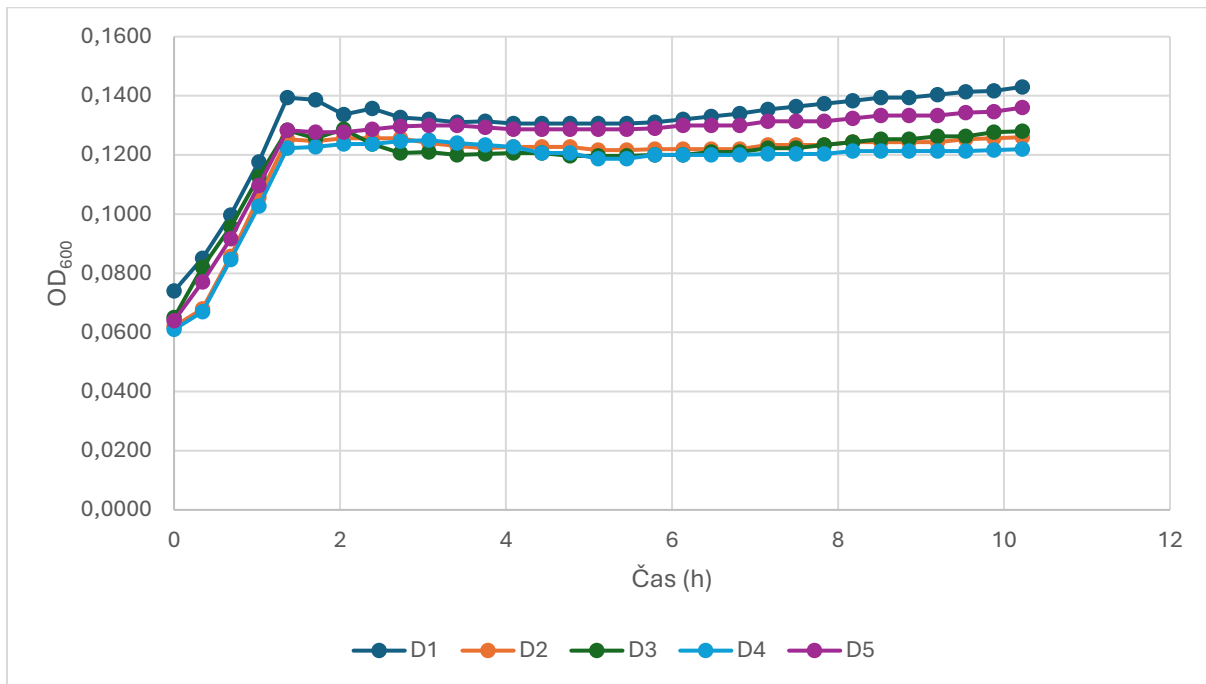
Iz 830 g gobe poprhnjene livke smo izolirali približno 2,6 mg lektina CnGL, pri čimer je bil izkoristek izolacije 0,003 %. Končna koncentracija izoliranega lektina je bila 0,5 mg/mL.

4.4 Vpliva lektina CnGL na rast bakterij *Listeria innocua*

Želeli smo ugotoviti, kako lektin CnGL vpliva na rast bakterij vrste *Listeria innocua* in *Escherichia coli*. Merili smo optično gostoto kultur teh dveh bakterij, ki smo jim dodali dve različni koncentraciji lektina CnGL. Prav tako smo spremljali tudi rast bakterij v prisotnosti različnih koncentracij soka poprhnjene livke. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili dve koncentraciji antibiotika ampicilina.

Izvedli smo dve biološki ponovitvi merjenja optičnih gostot na mikrotitrski plošči. Prikazani so reprezentativni rezultati prve biološke ponovitve.

4.4.1 Rastne krivulje bakterij *Listeria innocua*

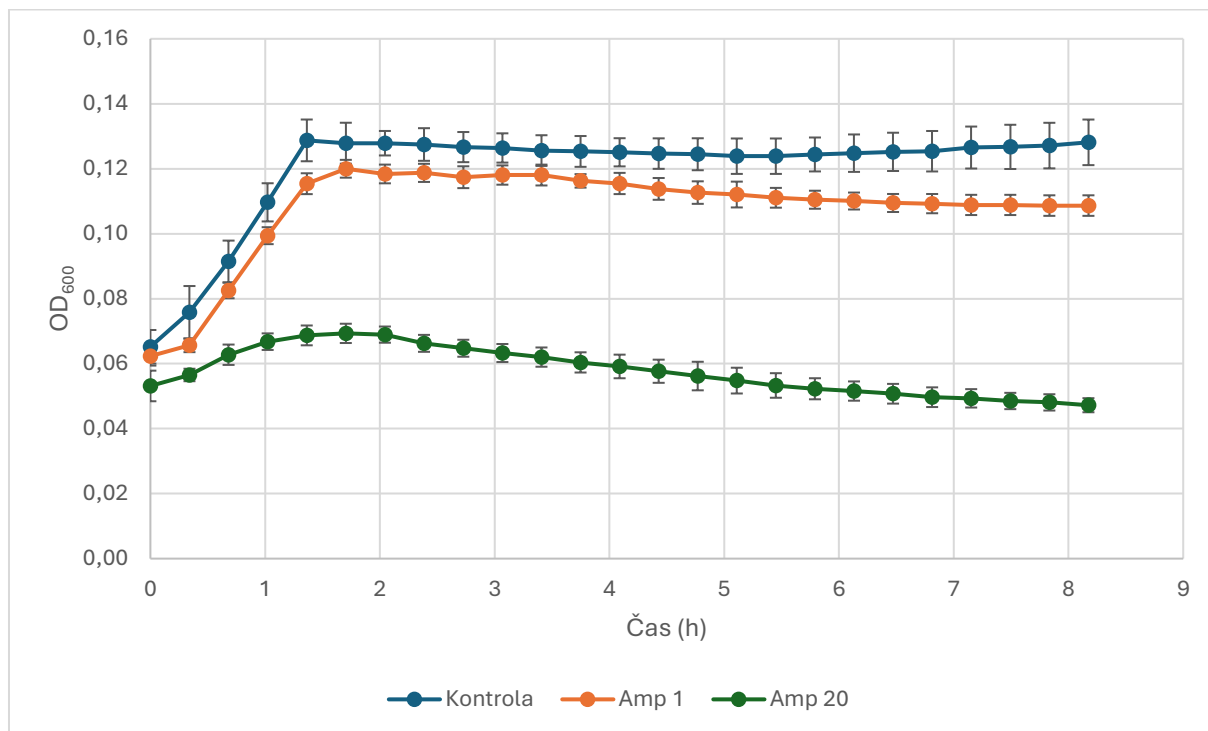


Graf 1: Rast kontrolne skupine bakterij *L. innocua* v prvi biološki ponovitvi. Prikazana je optična gostota v odvisnosti od časa za bakterije nacepljene v posamezne jamice mikrotitrne plošče z oznakami navedenimi v legendi grafa. Oznake od D1 do D5 predstavljajo pet jamic na mikrotitrski plošči, v katerih so bile kulture bakterije *L. innocua*.

Graf prikazuje rastne krivulje za bakterijo *L. innocua*, ki ji niso bile dodane učinkovine – gre za kontrolno skupino. Prikazanih je pet tehničnih ponovitev na mikrotitrski plošči iz prve biološke ponovitve. Opazimo, da se krivulje med seboj bistveno ne razlikujejo, manjše razlike so le v začetni in končni optični gostoti. V vseh sledečih grafih so izrisane krivulje, ki predstavljajo povprečja vseh tehničnih ponovitev iz ene biološke ponovitve.

4.4.2 Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti ampicilina

Za preučevanje vplivov učinkovin na rast bakterije smo kot pozitivno kontrolo uporabili antibiotik ampicilin, ki naj bi zaviral bakterijsko rast. Tako smo želeli primerjati rast bakterije *L. innocua* v prisotnosti ampicilina in rast te bakterije v prisotnosti soka poprhnjene livke ter lektina CnGL. Bakterijskim kulturam na mikrotitrski plošči smo dodali različne količine ampicilina, in sicer tako, da sta končni koncentraciji znašali 1 in 20 $\mu\text{g/mL}$. Za vsako koncentracijo je bilo izvedenih pet tehničnih ponovitev na plošči, prikazane pa so povprečne vrednosti.

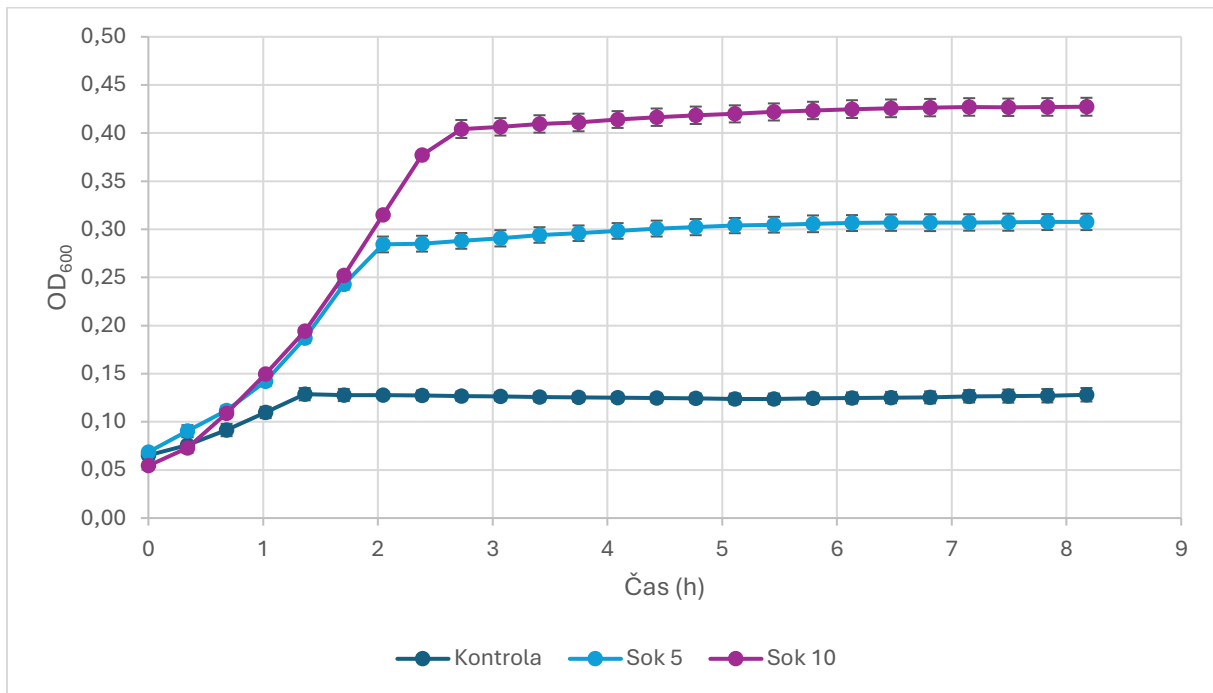


Graf 2: Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti ampicilina v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *L. innocua* v odvisnosti od časa brez ampicilina (Kontrola) in v prisotnosti 1 µg/mL ampicilina (Amp 1) oziroma 20 µg/mL (Amp 20).

Na grafu so prikazane povprečne vrednosti optične gostote (OD) petih tehničnih ponovitev iz prve biološke ponovitve in standardni odkloni za rast bakterij *L. innocua*. Opazimo lahko, da je oblika krivulje kontrolne skupine podobna tisti s koncentracijo ampicilina 1 µg/mL. Razlikujeta se v doseženi končni OD, ki je pri skupini z ampicilinom nekoliko nižja. Povsem drugačna pa je krivulja skupine s koncentracijo ampicilina 20 µg/mL, ki sprva narašča zelo položno, nato pa začne vztrajno padati. Končna OD je precej nižja v primerjavi s kontrolo.

4.4.3 Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti soka poprhnjene livke

Želeli smo ugotoviti, ali ima sok poprhnjene livke vpliv na rast bakterije *L. innocua*. Bakterijskim kulturam smo dodali dva različna volumna soka, in sicer 5 in 10 µL. Za vsak volumen smo izvedli pet tehničnih ponovitev na biološko ponovitev, prikazane pa so povprečne vrednosti.

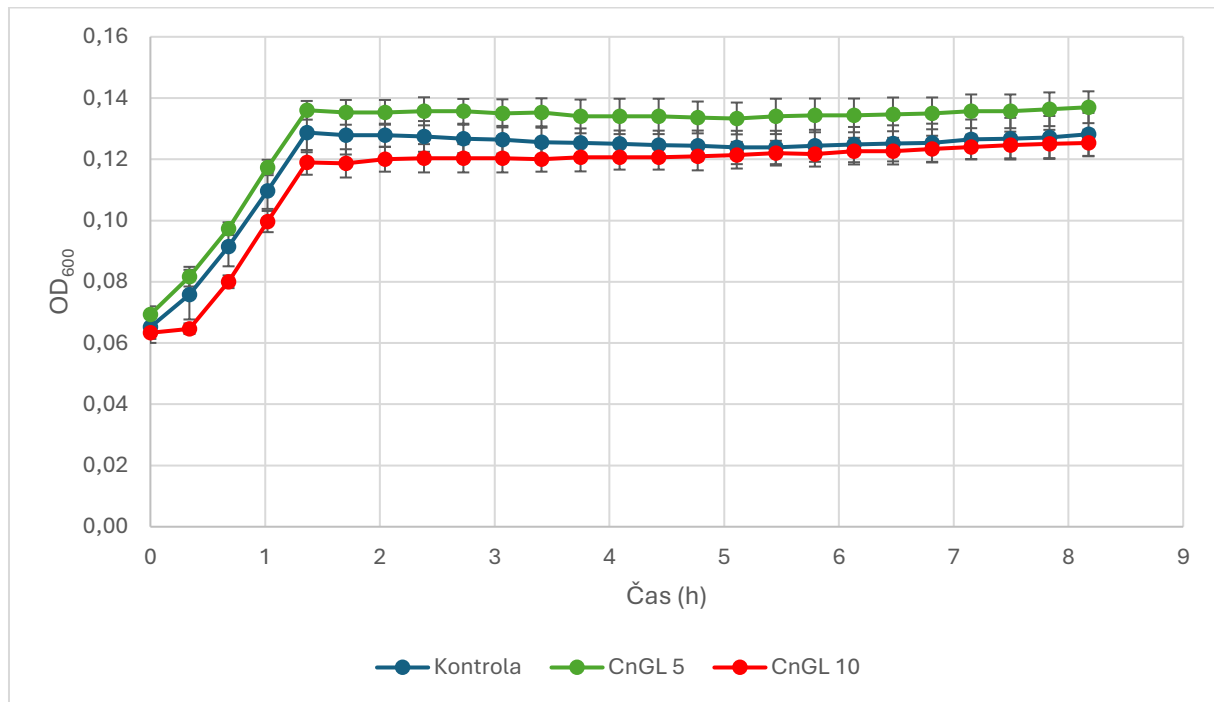


Graf 3: Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti soka poprhnjene livke v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *L. innocua* v odvisnosti od časa brez soka poprhnjene livke (Kontrola) in v prisotnosti 5 μ L soka (Sok 5) oziroma 10 μ L soka (Sok 10).

Na grafu so prikazane povprečne vrednosti petih tehničnih ponovitev za kontrolno skupino in vsako skupino s sokom poprhnjene livke ter standardni odkloni. Opazimo, da sta obliki krivulj za skupini s sokom zelo podobni, nekoliko pa se razlikujeta od krivulje kontrolne skupine, ki je v logaritemski fazi bolj položna. Obe skupini s sokom dosežeta precej višjo OD v primerjavi s kontrolno skupino. Skupina z 10 μ L soka doseže višjo OD v primerjavi s skupino s 5 μ L soka.

4.4.4 Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti lektina CnGL

Želeli smo ugotoviti, ali ima lektin CnGL vpliv na rast bakterij *L. innocua*. Bakterijskim kulturam smo dodali dva različna volumna raztopine izoliranega lektina s koncentracijo 0,5 mg/mL, in sicer 5 in 10 μ L. Za vsako prostornino smo izvedli tri tehnične ponovitve na biološko ponovitev, prikazane pa so povprečne vrednosti.

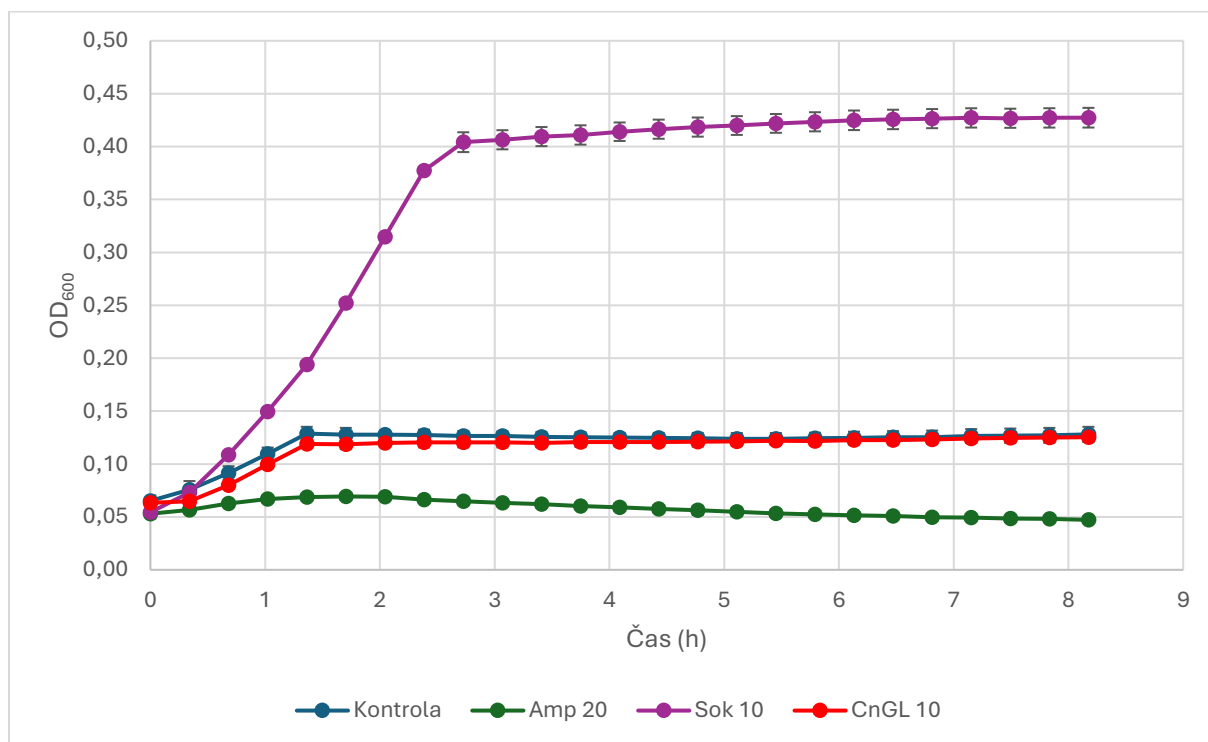


Graf 4: Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti lektina CnGL v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *L. innocua* v odvisnosti od časa brez lektina CnGL (Kontrola) in v prisotnosti 5 μ L lektina (CnGL 5) oziroma 10 μ L lektina (CnGL 10).

Na grafu so prikazane povprečne vrednosti petih tehničnih ponovitev za kontrolno skupino in treh tehničnih ponovitev za vsako skupino z lektinom CnGL ter standardni odkloni. Na grafu lahko vidimo, da so oblike vseh treh krivulj zelo podobne. Edina razlika je v tem, da skupina z 10 μ L lektina vstopi v logaritemsko fazo eno časovno točko kasneje kot ostali skupini. Razlike v OD so majhne. Opazimo, da največjo OD doseže skupina s 5 μ L lektina, najmanjšo OD pa skupina z 10 μ L lektina. Kontrolna skupina doseže vrednost OD, ki je po velikosti med skupinama z dodanim lektinom.

4.4.5 Primerjava rastnih krivulj bakterij *L. innocua* z različnimi dodanimi učinkovinami

Želeli smo ugotoviti, ali ima lektin CnGL vpliv na rast bakterij *L. innocua*, in kakšen je ta vpliv. Zato smo primerjali rastne krivulje bakterij z dodanimi različnimi učinkovinami.

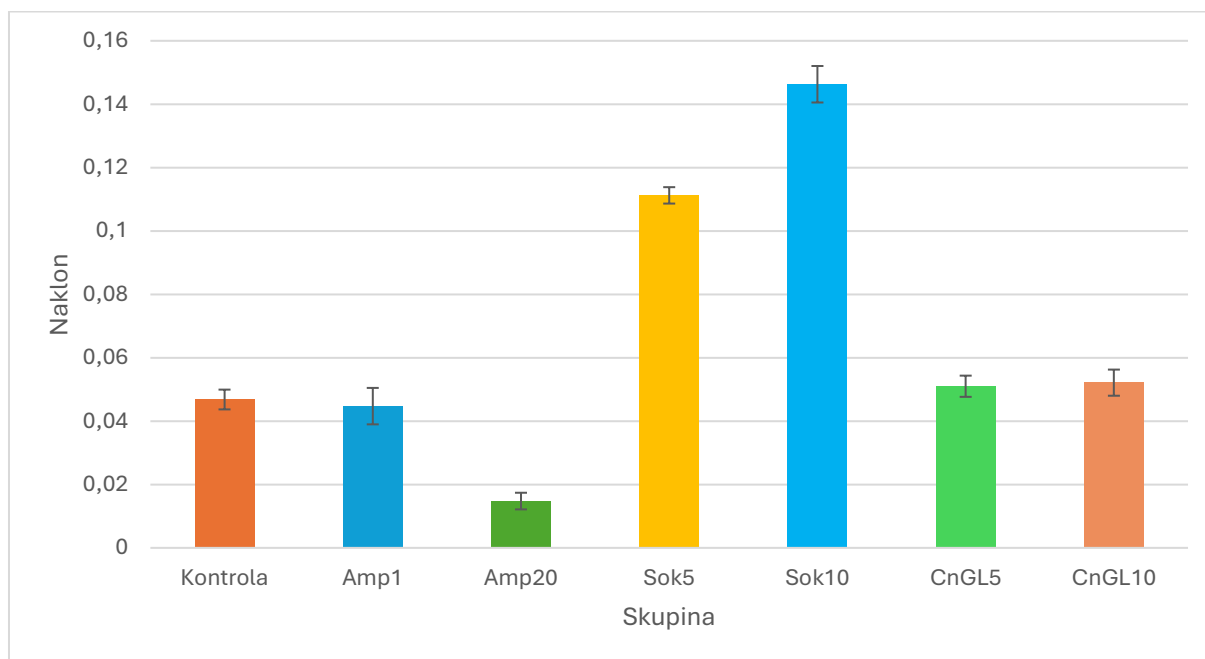


Graf 5: Rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti različnih učinkovin v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *L. innocua* v odvisnosti od časa brez dodanih snovi (Kontrola) in v prisotnosti ampicilina s koncentracijo 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Amp 20), 10 μL soka poprhnjene livke (Sok 10) ter 10 μL lektina CnGL (CnGL 10).

Iz grafa lahko razberemo, da daleč največjo OD doseže skupina z dodanim sokom poprhnjene livke. Približno enako OD dosežeta kontrolna skupina in skupina z dodanim lektinom. Najnižjo OD pa doseže skupina z ampicilinom. Krivulja skupine s sokom je v logaritemski fazi precej bolj strma kot ostale. Krivulji kontrolne skupine in skupine z lektinom sta podobni, le da slednja kasneje vstopi v logaritemsko fazo. Krivulja skupine z ampicilinom v primerjavi z ostalimi narašča mnogo počasneje, nato pa, ko ostale vstopijo v stacionarno fazo, ta začne padati.

4.4.6 Obdelava podatkov o rasti bakterij *L. innocua*

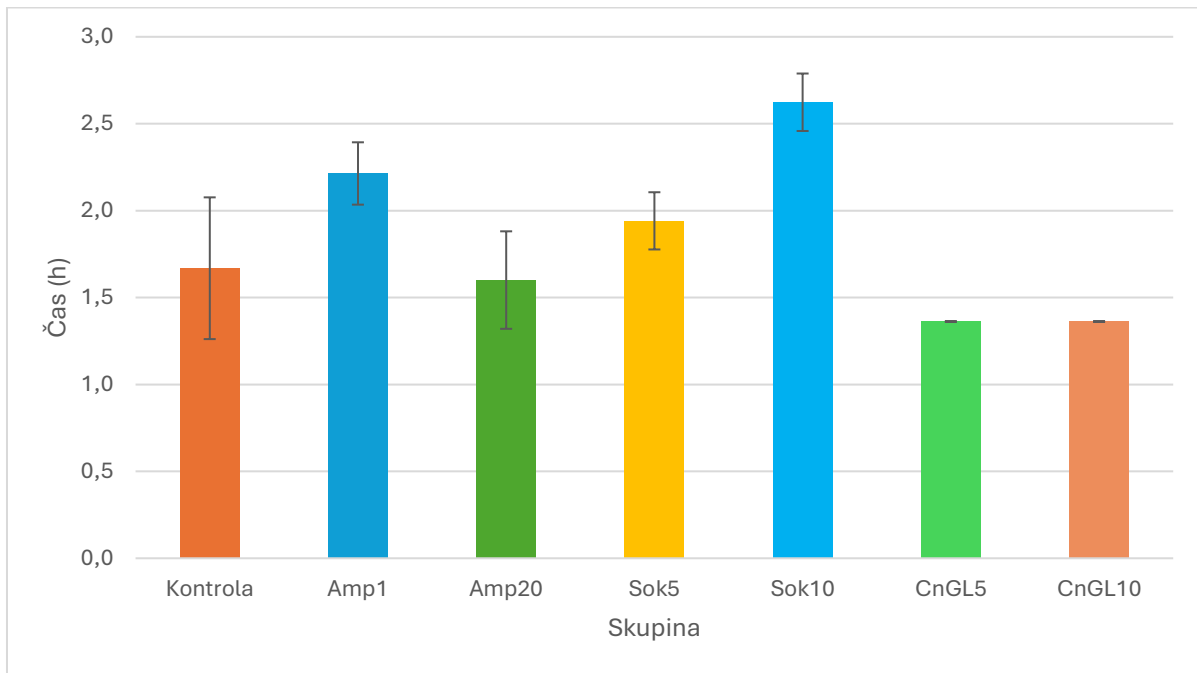
Ker smo želeli ugotoviti, kako lektin CnGL vpliva na rast bakterij *L. innocua*, smo podatke, ki smo jih zbrali z meritvami, tudi obdelali. Iz grafov smo za vsako tehnično ponovitev iz vsake biološke ponovitve določili območje logaritemske rasti, ki ima obliko premice. Tako smo iz točk na premici izračunali njen naklon. Nato smo izračunali povprečne vrednosti in standardne deviacije naklonov za skupine iz obeh bioloških ponovitev in jih med seboj primerjali.



Graf 6: Nakloni logaritemske faze rastnih krivulj bakterij *L. innocua*. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti naklonov logaritemske faze rasti bakterij *L. innocua*. Prikazana je skupina brez dodanih snovi (Kontrola), skupina z 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp1), skupina z 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp20), skupina s 5 μL soka poprhnjene livke (Sok5), skupina z 10 μL soka poprhnjene livke (Sok10), skupina s 5 μL lektina CnGL (CnGL5) in skupina z 10 μL lektina (CnGL10).

Histogram prikazuje povprečne vrednosti naklonov v logaritemski fazi rastnih krivulj bakterij *L. innocua* ter standardne deviacije. Opazimo, da so nakloni kontrolne skupine in skupin z dodanim ampicilinom (koncentracija 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in lektinom CnGL (volumna 5 in 10 μL) približno enako veliki. Skupina z 10 μL lektina ima malenkost večji naklon od skupine s 5 μL lektina. Ta ima nekoliko večji naklon od kontrolne skupine, ki ima večji naklon od skupine s koncentracijo ampicilina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Izstopa skupina s koncentracijo ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ki ima bistveno nižji naklon kot ostale. Prav tako pa izstopata tudi skupini z dodanim sokom, ki imata precej večji naklon v primerjavi z ostalimi skupinami. Skupina z 10 μL soka ima večji naklon od skupine s 5 μL .

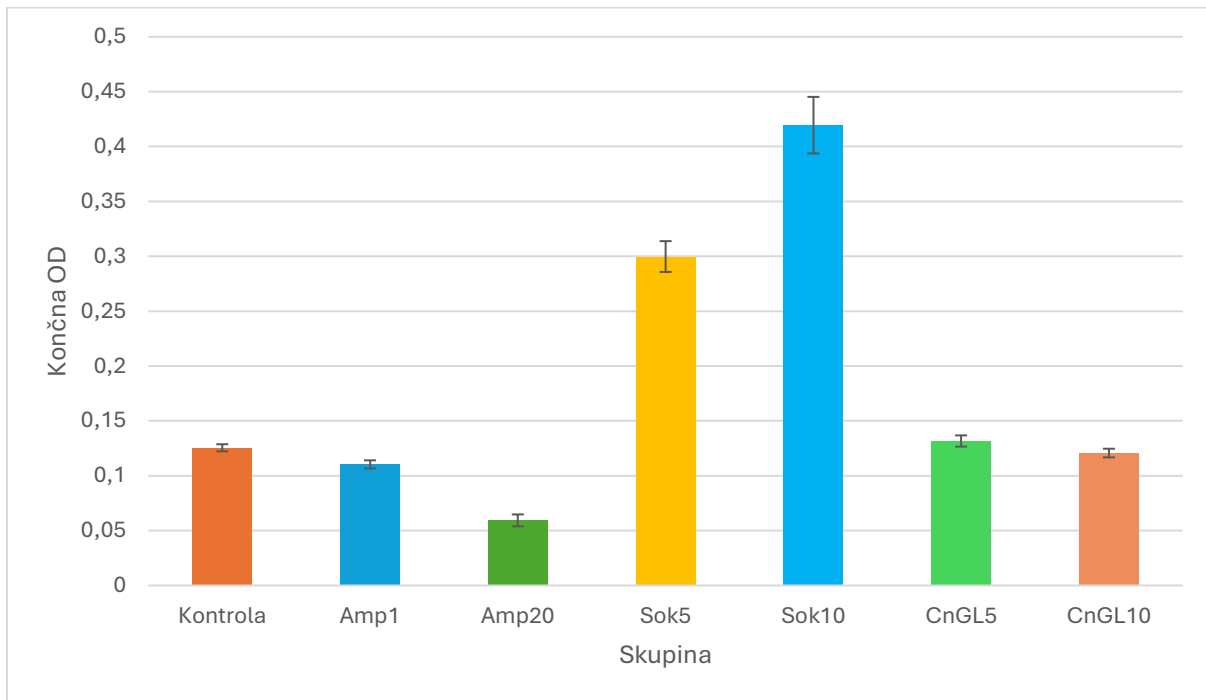
Iz grafov smo za vsako tehnično ponovitev določili tudi čas vstopa v stacionarno fazo. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardne deviacije časovnih točk za skupine iz obeh bioloških ponovitev in jih med seboj primerjali.



Graf 7: Čas vstopa v stacionarno fazo pri bakteriji *L. innocua*. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti časa vstopa v stacionarno fazo rasti bakterij *L. innocua*. Prikazana je skupina brez dodanih snovi (Kontrola), skupina z 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp1), skupina z 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp20), skupina s 5 μL soka poprhnjene livke (Sok5), skupina z 10 μL soka poprhnjene livke (Sok10), skupina s 5 μL lektina CnGL (CnGL5) in skupina z 10 μL lektina (CnGL10).

Histogram prikazuje povprečne vrednosti časa vstopa v stacionarno fazo ter standardne deviacije. Na grafu opazimo, da sta skupini z lektinom CnGL najhitreje vstopili v stacionarno fazo, časa sta enaka. Nekoliko kasneje sta v stacionarno fazo vstopili kontrola in skupina s koncentracijo ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vendar je razpršenost podatkov pri le-teh večja. Približno 15 minut kasneje je v stacionarno fazo vstopila skupina s 5 μL soka, 18 minut za njo pa še skupina s koncentracijo ampicilina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Zadnja je vstopila skupina z 10 μL soka.

Na podlagi grafov smo določili tudi končno optično gostoto. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardne deviacije končnih OD za skupine iz obeh bioloških ponovitev in jih med seboj primerjali.



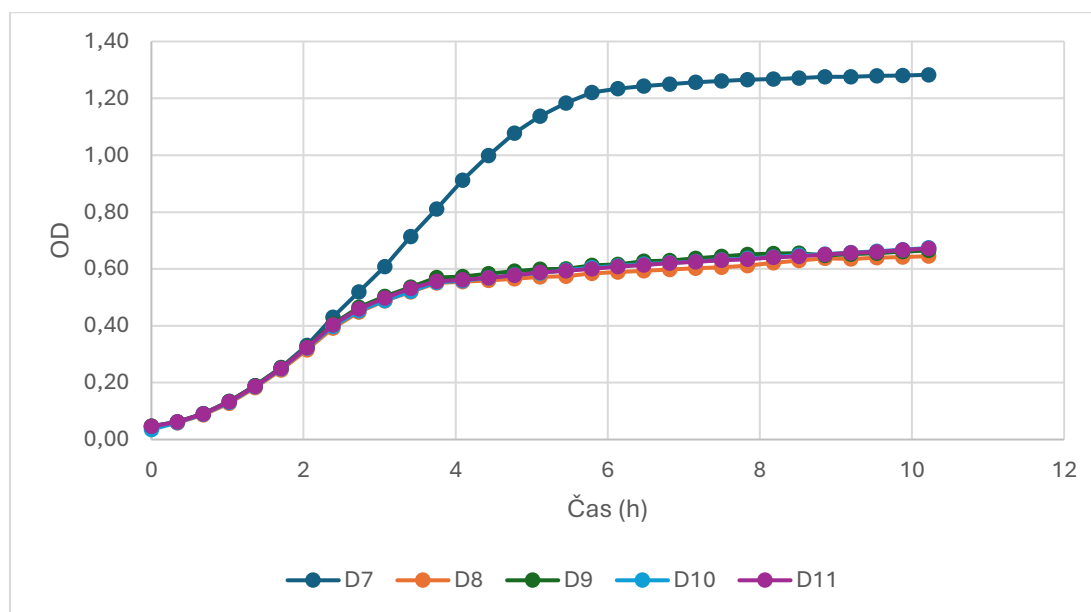
Graf 8: Končna OD pri bakteriji *L. innocua*. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti končne OD kultur bakterij *L. innocua*. Prikazana je skupina brez dodanih snovi (Kontrola), skupina z 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp1), skupina z 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp20), skupina s 5 μL soka poprhnjene livke (Sok5), skupina z 10 μL soka poprhnjene livke (Sok10), skupina s 5 μL lektina CnGL (CnGL5) in skupina z 10 μL lektina (CnGL10).

Histogram prikazuje povprečne vrednosti končnih optičnih gostot ter standardne deviacije. Opazimo, da je končna OD skupine s koncentracijo ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ daleč najmanjša. Končna OD skupine s koncentracijo ampicilina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je še enkrat večja, OD kontrole pa je še nekoliko večja. Podobni sta tudi OD kultur z dodanim lektinom, pri tem ima skupina s 5 μL lektina nekoliko večjo končno OD kot tista z 10 μL lektina. Najbolj izstopata skupini z dodanim sokom, ki imata bistveno večjo končno OD, pri čemer ima skupina z 10 μL soka za 0,12 večjo končno OD kot tista s 5 μL soka.

4.5 Vpliv lektina CnGL na rast bakterij *Escherichia coli*

Izvedli smo dve biološki ponovitvi merjenja optičnih gostot na mikrotitrski plošči. Prikazani so rezultati reprezentativne prve biološke ponovitve.

4.5.1 Rastne krivulje bakterij *Escherichia coli*

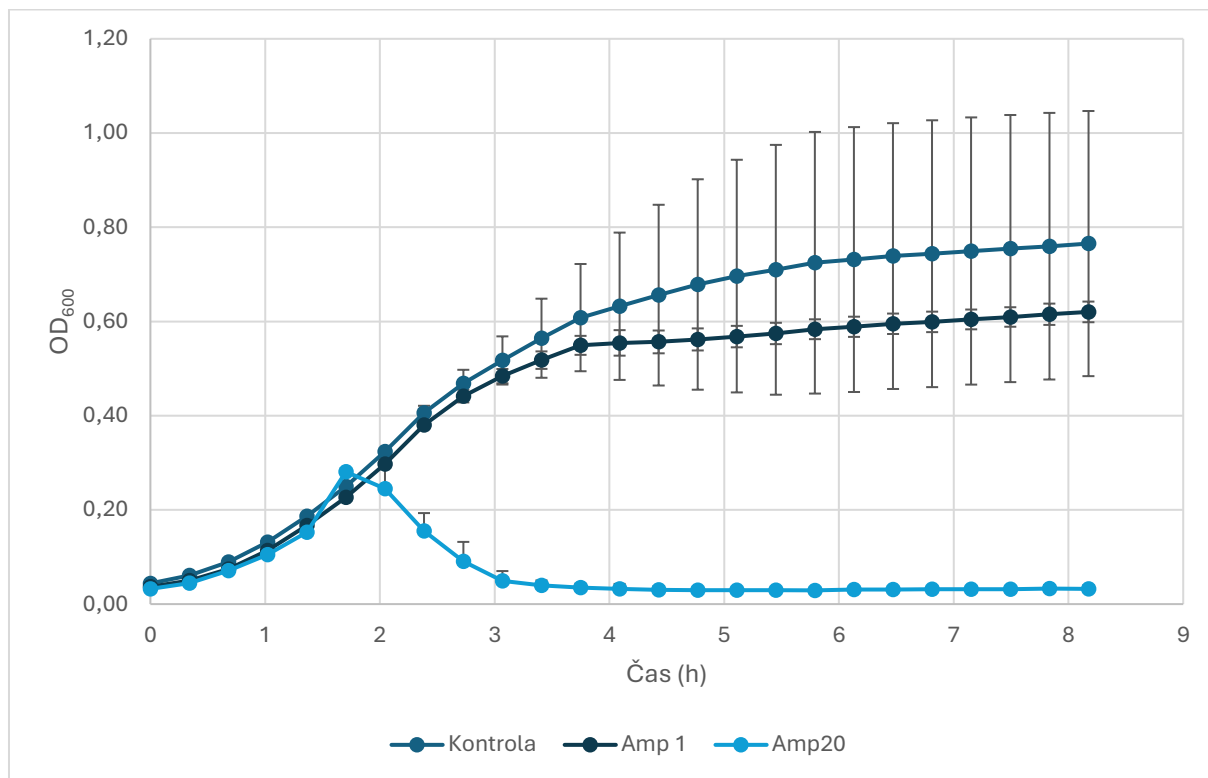


Graf 9: Rast kontrolne skupine bakterij *E. coli* v prvi biološki ponovitvi. Prikazana je optična gostota v odvisnosti od časa za bakterije nacepljene v posamezne jamice mikrotitrski plošče z oznakami navedenimi v legendi grafa. Oznake od D7 do D11 predstavljajo pet jamic na mikrotitrski plošči, v katerih so bile kulture bakterije *E. coli*.

Graf prikazuje rastne krivulje bakterije *E. coli*, ki ji niso bile dodane učinkovine – gre za kontrolno skupino. Prikazanih je pet tehničnih ponovitev iz prve biološke ponovitve. Opazimo, da so krivulje štirih tehničnih ponovitev zelo podobne. Med seboj se ne razlikujejo v začetni in končni optični gostoti. Krivulja D7 je po obliki podobna ostalim, vendar pa se rast nadaljuje dlje časa in končna OD je bistveno večja. V vseh sledečih grafih so izrisane krivulje, ki predstavljajo povprečja vseh ponovitev iz ene serije.

4.5.2 Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti ampicilina

Za preučevanje vplivov učinkovin na rast bakterij smo kot pozitivno kontrolo uporabili antibiotik ampicilin, ki naj bi zaviral bakterijsko rast. Tako smo želeli primerjati rast bakterij *E. coli* v prisotnosti ampicilina in rast teh bakterij v prisotnosti soka poprhnjene livke ter lektina CnGL. Bakterijskim kulturam na mikrotitrski plošči smo dodali različne količine ampicilina, in sicer tako, da sta končni koncentraciji znašali 1 in 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Za vsako koncentracijo je bilo izvedenih pet tehničnih ponovitev na plošči, prikazane pa so povprečne vrednosti.

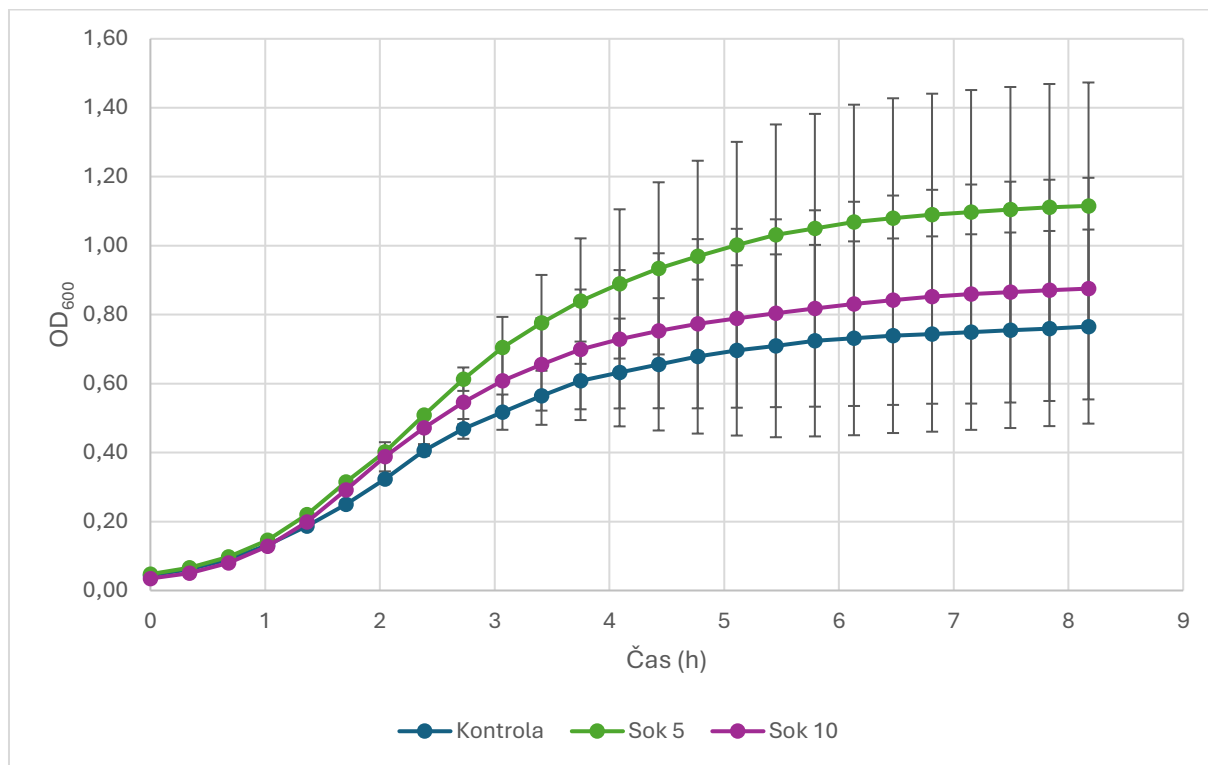


Graf 10: Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti ampicilina v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *E. coli* v odvisnosti od časa brez ampicilina (Kontrola) in v prisotnosti 1 µg/mL ampicilina (Amp 1) oziroma 20 µg/mL (Amp 20).

Na grafu so prikazane povprečne vrednosti OD petih tehničnih ponovitev iz prve biološke ponovitve in standardni odkloni za rast bakterije *E. coli*. Opazimo lahko, da je oblika krivulje kontrolne skupine podobna tisti s koncentracijo ampicilina 1 µg/mL. Razlikujeta se v doseženi končni OD, ki je pri skupini z ampicilinom nekoliko nižja. Krivulja skupine s koncentracijo ampicilina 20 µg/mL pa je nekoliko drugačna. Sprva narašča podobno kot ostali dve krivulji, nato pa naglo pade in doseže končno OD, ki je blizu 0 in se ne spreminja več.

4.5.3 Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti soka poprhnjene livke

Želeli smo ugotoviti, ali ima sok poprhnjene livke vpliv na rast bakterij *E. coli*. Bakterijskim kulturam smo dodali dva različna volumna soka, in sicer 5 in 10 µL. Za vsak volumen smo izvedli pet tehničnih ponovitev na biološko ponovitev, prikazane pa so povprečne vrednosti.

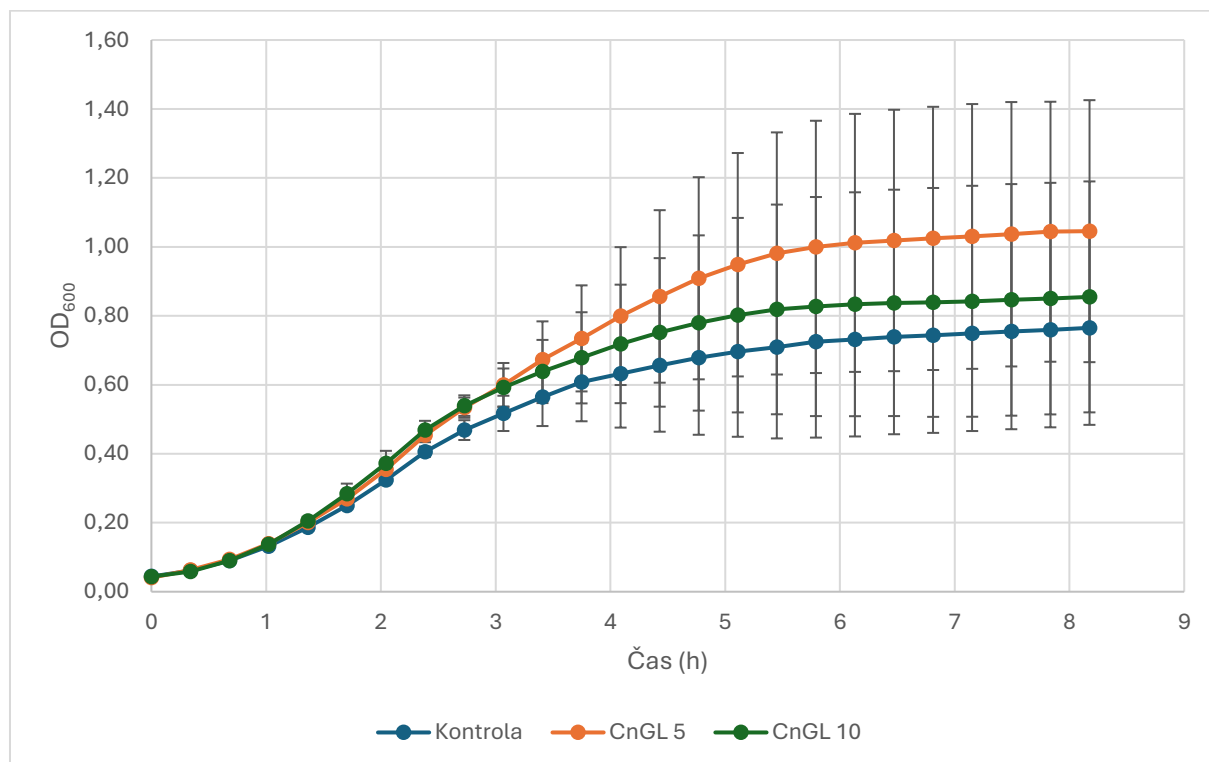


Graf 11: Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti soka poprhnjene livke v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *E. coli* v odvisnosti od časa brez soka poprhnjene livke (Kontrola) in v prisotnosti 5 µL soka (Sok 5) oziroma 10 µL soka (Sok 10).

Na grafu so prikazane povprečne vrednosti petih tehničnih ponovitev za kontrolno skupino in vsako skupino s sokom poprhnjene livke ter standardni odkloni. Opazimo, da so oblike vseh krivulj podobne. Krivulja kontrolne skupine je v logaritemski fazi malo bolj položna. Razlikujejo se v doseženi OD. Največjo doseže skupina s 5 µL soka, najmanjšo pa kontrolna skupina. Vmes je skupina z 10 µL soka, ki je bližje kontrolni skupini.

4.5.4 Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti lektina CnGL

Želeli smo ugotoviti, ali ima lektin CnGL vpliv na rast bakterij *E. coli*. Bakterijskim kulturam smo dodali dva različna volumna raztopine izoliranega lektina, in sicer 5 in 10 μL . Za vsak volumen smo izvedli tri tehnične ponovitve na biološko ponovitev, prikazane pa so povprečne vrednosti.

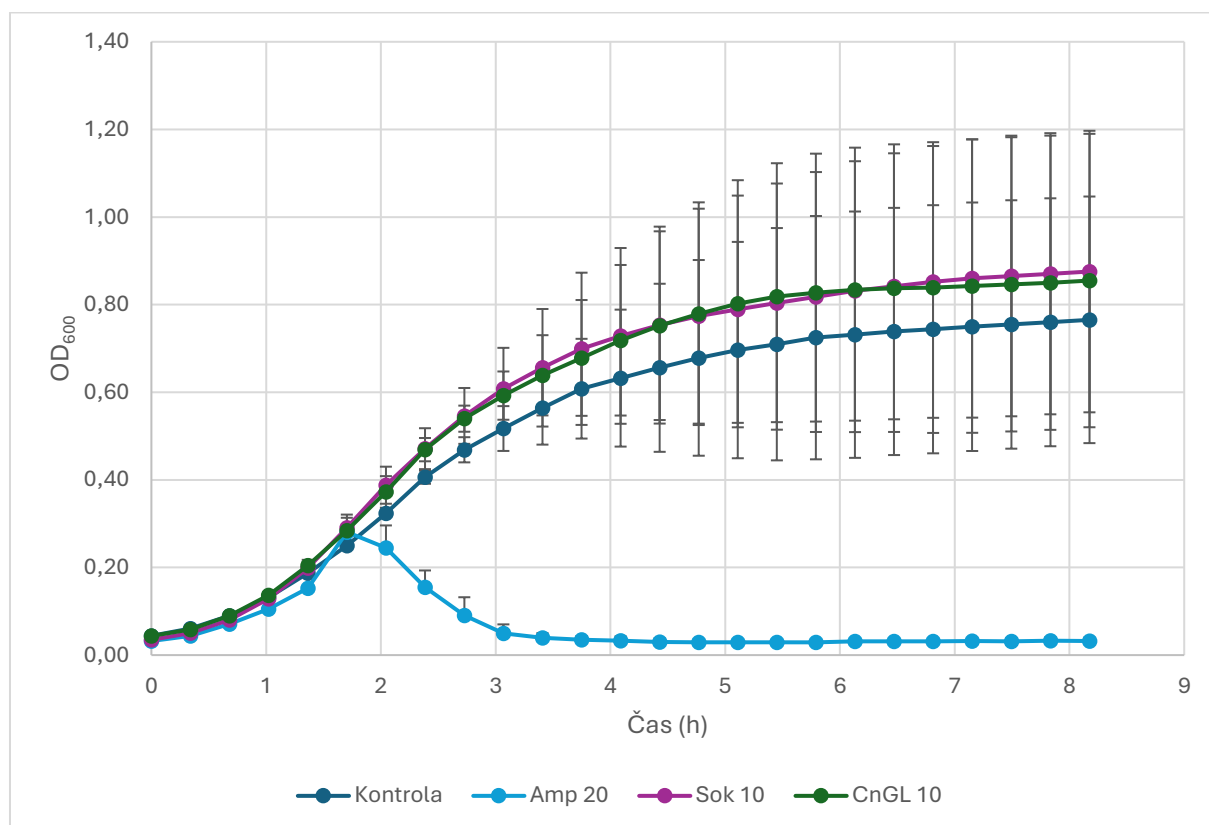


Graf 12: Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti lektina CnGL v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *E. coli* v odvisnosti od časa brez lektina CnGL (Kontrola) in v prisotnosti 5 μL lektina (CnGL 5) oziroma 10 μL lektina (CnGL 10).

Na grafu so prikazane povprečne vrednosti petih tehničnih ponovitev za kontrolno skupino in treh tehničnih ponovitev za vsako skupino z lektinom CnGL ter standardni odkloni. Na grafu lahko vidimo, da so oblike krivulj podobne, bolj pa se razlikujejo v OD. Največjo doseže skupina s 5 μL lektina. Skupina z 10 μL lektina doseže za 0,2 manjšo OD, kontrolna skupina pa doseže najmanjšo OD.

4.5.5 Primerjava rastnih krivulj bakterij *E. coli* z različnimi dodanimi učinkovinami

Želeli smo ugotoviti, ali ima lektin CnGL vpliv na rast bakterij *E. coli*, in kakšen je ta vpliv. Zato smo primerjali rastne krivulje bakterije z dodanimi različnimi učinkovinami.



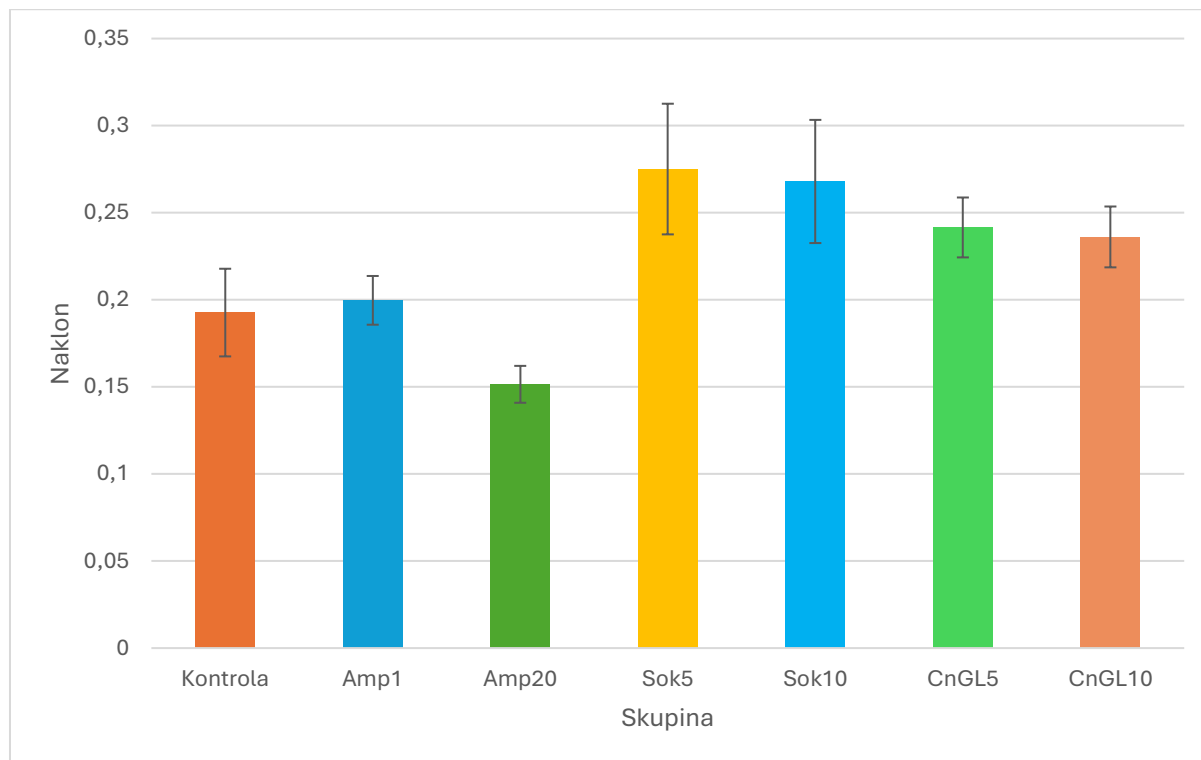
Graf 13: Rast bakterij *E. coli* v prisotnosti različnih učinkovin v prvi biološki ponovitvi. Na grafu je prikazana sprememba optične gostote kultur bakterij *E. coli* v odvisnosti od časa brez dodanih snovi (Kontrola) in v prisotnosti ampicilina s koncentracijo 20 $\mu\text{g/mL}$ (Amp 20), 10 μL soka poprhnjene livke (Sok 10) ter 10 μL lektina CnGL (CnGL 10).

Na grafu vidimo, da sta krivulji za skupino s sokom in lektinom skoraj enaki in se prekrivata. Nekoliko manjšo OD doseže kontrolna skupina, ki pa ima isto obliko krivulje. Izstopa krivulja skupine z ampicilinom, ki v prvem delu narašča enako kot ostale, nato pa naglo pade skoraj na nič in se ustali.

4.5.6 Obdelava podatkov o rasti bakterij *E. coli*

Ker smo želeli ugotoviti, kako lektin CnGL vpliva na rast bakterij *E. coli*, smo podatke, ki smo jih zbrali z meritvami, tudi obdelali. Iz grafov smo za vsako tehnično ponovitev iz vsake biološke ponovitve določili območje logaritemske rasti, ki ima obliko premice. Tako smo iz

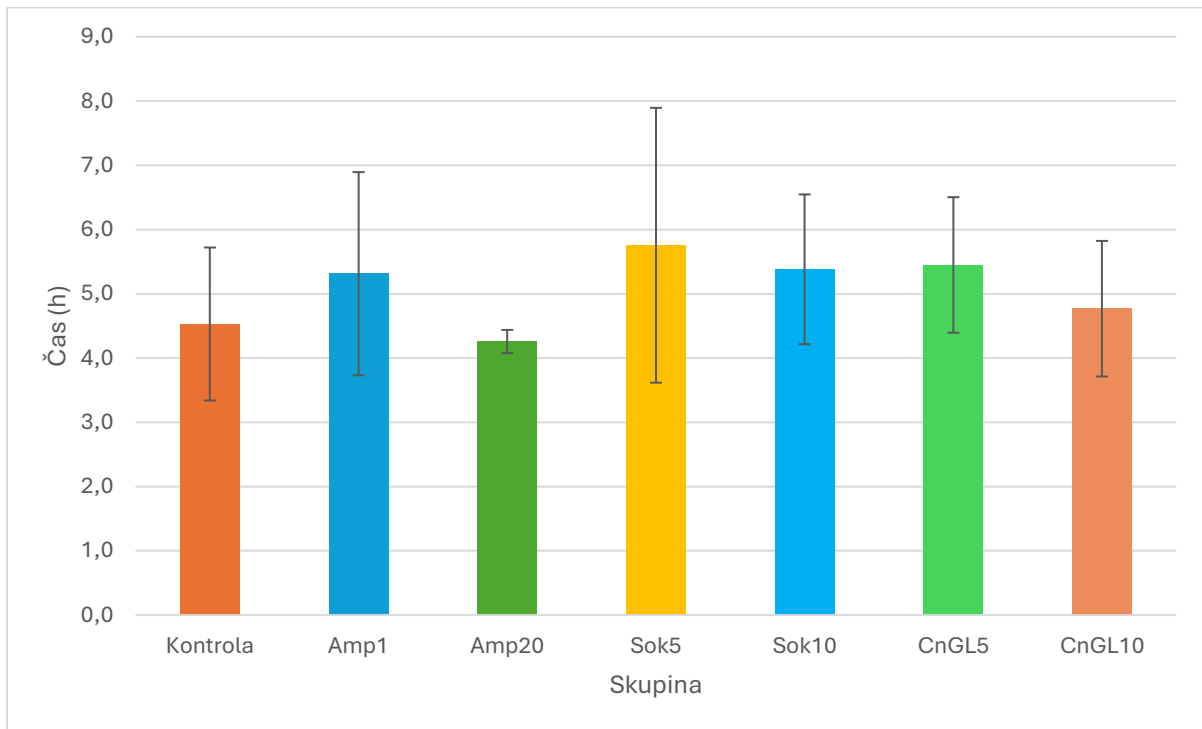
točk na premici izračunali njen naklon. Nato smo izračunali povprečne vrednosti in standardne deviacije naklonov za skupine iz obeh bioloških ponovitev in jih med seboj primerjali.



Graf 14: Nakloni logaritemske faze rastnih krivulj bakterij *E. coli*. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti naklonov logaritemske faze rasti bakterij *E. coli*. Prikazana je skupina brez dodanih snovi (Kontrola), skupina z 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp1), skupina z 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp20), skupina s 5 μL soka poprhnjene livke (Sok5), skupina z 10 μL soka poprhnjene livke (Sok10), skupina s 5 μL lektina CnGL (CnGL5) in skupina z 10 μL lektina (CnGL10).

Histogram prikazuje povprečne vrednosti naklonov v logaritemski fazi rastnih krivulj bakterij *E. coli* ter standardne deviacije. Opazimo, da sta naklona krivulje kontrolne skupine in skupine z dodanim ampicilinom (koncentracija 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) približno enako velika. Naklon skupine s koncentracijo ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je nekoliko manjši. Skupini z dodanim lektinom imata večji naklon, pri čemer ima skupina z 10 μL lektina malenkost manjši naklon od skupine s 5 μL lektina. Še večji naklon imata skupini z dodanim sokom. Skupina z 10 μL soka ima malo manjši naklon od skupine s 5 μL soka.

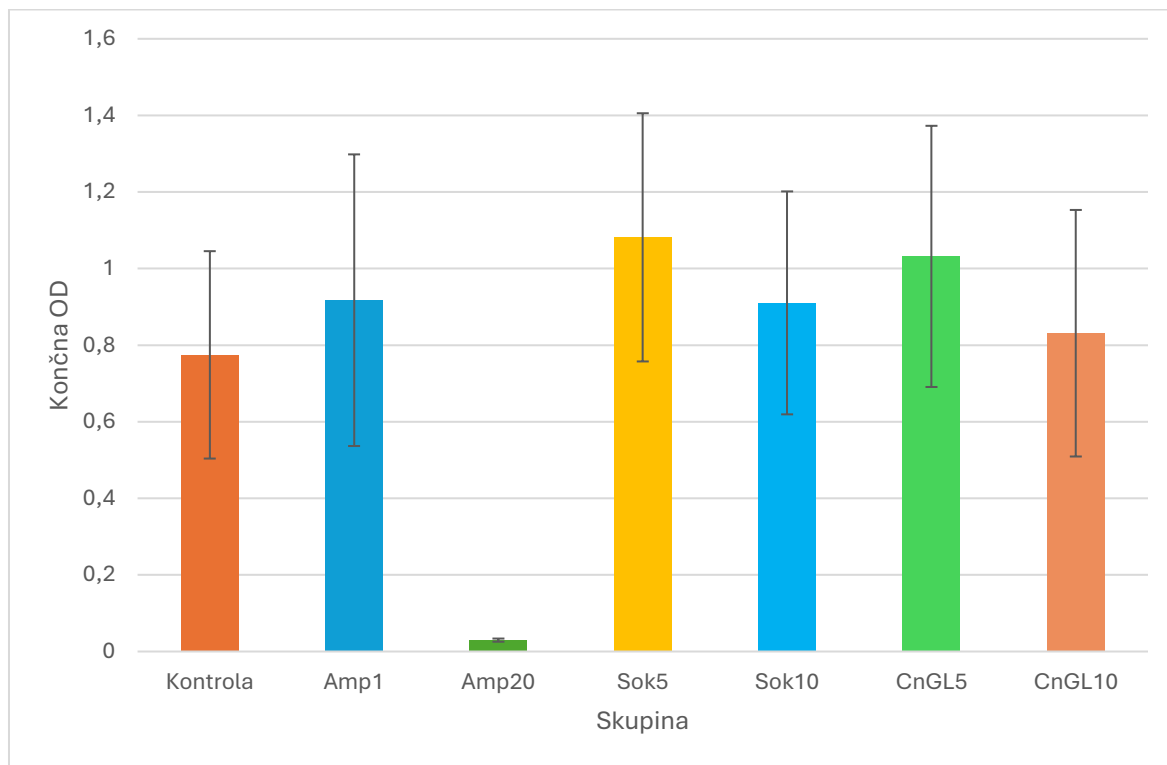
Iz grafov smo za vsako tehnično ponovitev določili tudi čas vstopa v stacionarno fazo. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardne deviacije časovnih točk za skupine iz obeh bioloških ponovitev in jih med seboj primerjali.



Graf 15: Čas vstopa v stacionarno fazo pri bakteriji *E. coli*. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti časa vstopa v stacionarno fazo rasti bakterij *E. coli*. Prikazana je skupina brez dodanih snovi (Kontrola), skupina z 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp1), skupina z 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp20), skupina s 5 μL soka poprhnjene livke (Sok5), skupina z 10 μL soka poprhnjene livke (Sok10), skupina s 5 μL lektina CnGL (CnGL5) in skupina z 10 μL lektina (CnGL10).

Histogram prikazuje povprečne vrednosti časa vstopa v stacionarno fazo ter standardne deviacije. Opazimo, da je v stacionarno fazo najhitreje vstopila skupina s koncentracijo ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Za njo sta v približno enakem času vstopili kontrola in skupina z 10 μL lektina. Še nekoliko kasneje so v približno enakem času vstopile skupine s koncentracijo ampicilina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, z 10 μL soka in s 5 μL lektina. Kot zadnja je v stacionarno fazo vstopila skupina s 5 μL soka.

Na podlagi grafov smo določili tudi končno optično gostoto. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardne deviacije končnih OD za skupine iz obeh bioloških ponovitev in jih med seboj primerjali.



Graf 16: Končna OD pri bakteriji *E. coli*. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti končne OD kultur bakterij *E. coli*. Prikazana je skupina brez dodanih snovi (Kontrola), skupina z 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp1), skupina z 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Amp20), skupina s 5 μL soka poprhnjene livke (Sok5), skupina z 10 μL soka poprhnjene livke (Sok10), skupina s 5 μL lektina CnGL (CnGL5) in skupina z 10 μL lektina (CnGL10).

Histogram prikazuje povprečne vrednosti končnih optičnih gostot ter standardne deviacije. Opazimo, da je končna OD skupine s koncentracijo ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ daleč najmanjša. Končna OD skupine s koncentracijo ampicilina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je mnogo večja, prav tako je večja tudi od kontrolne skupine in je primerljiva z OD skupine z 10 μL soka. Večjo OD dosežeta skupini s 5 μL soka in s 5 μL lektina. Manjšo OD doseže skupina z 10 μL lektina in je primerljiva s kontrolno skupino.

5 Razprava

5.1 Izolacija lektina CnGL

Iz predhodno zamrznjenih plodišč poprhnjene livke smo iztisnili sok, iz katerega smo želeli izolirati lektin, ki se veže na glukozo (CnGL). Tega smo se lotili z afinitetno kromatografijo na nosilcu glukozil sefaroze, na katerega naj bi se vezal iskani lektin. Iz izmerjenih vrednosti absorbanca smo izrisali elucijski diagram (slika 12) in se na podlagi vrhov odločili za frakcije, ki smo jih analizirali z analizo NaDS PAGE (na sliki 12 označene rumeno). Vrhovi predstavljajo frakcije z največjo koncentracijo proteinov.

Izbrane frakcije smo nanegli na gela za NaDS PAGE in izvedli elektroforezo. Na gelu 1 in 2 (slika 13 in 14) vidimo v vrsticah soka in nevezane frakcije veliko lis. Pri soku lise predstavljajo množico glivnih proteinov, pri nevezani frakciji pa vse proteine, ki se niso vezali na nosilec. Pri sprani frakciji VI so lise zelo blede, kar pomeni, da v njej ni skoraj nič proteinov, ki bi se sprali z nosilca. Pri sprani frakciji V opazimo malenkost močnejšo liso kot pri VI, kar pomeni, da ta vsebuje nekoliko več spranega proteina. V sprani frakciji so prisotni proteini, ki se niso vezali na ligand, ampak so ostali med kroglicami nosilca. Ker je v frakciji VI lektin še prisoten, bi ga lahko iz spranih frakcij od I do VI ponovno izolirali. Pri eluiranih frakcijah opazimo dve močnejši lisi. Lisa se glede na standard velikosti nahaja v območju velikosti okoli 30 kDa, kar sovпада z ocenjenimi 29,7 kDa, določeno z masno spektrometrijo [23], oziroma je bila določena približna molekulska masa 31 kDa z NaDS PAGE [26]. Druga lisa je opazna na spodnjem robu gela, kar pomeni, da ima ta protein manjšo molekulsko maso, in sicer približno 14,4 kDa. Sklepamo, da gre za lektin, ki se je vezal na molekule sefaroze iz nosilca, in sicer lektin CnSepLs. Tudi v drugih raziskavah je bila ocenjena molekulska masa tega lektina na 15 do 16 kDa [23], kar se približno ujema z našo eksperimentalno določeno vrednostjo. V drugih raziskavah so prav tako ob izolaciji za glukozo specifičnega lektina iz glive *C. nebularis* na NaDS PAGE gelu poleg lise pri 31 kDa zasledili več lis, ki predstavljajo manjše proteine, verjetno lektin CnSepLs [26].

Za lektine predvidevamo, da je njihovo izražanje v celicah odvisno od prostora in časa nabiranja vzorcev. Pri nekaterih glivah je dokazano, da se proteini izražajo tudi glede na vrsto tkiva. Tako se pri vrstah *Pleurotus ostreatus* in *Agrocybe aegerita* hemolitična proteina izražata večinsko v plodiščih v času nastajanja bazidiospor [43]. Naš vzorec plodišč glive *C. nebularis* lahko ne bi vseboval lektina CnGL ali pa bi ga vseboval malo, če bi se ta izražal pretežno v vegetativnem miceliju. Vendar pa smo pri analizi z NaDS PAGE ugotovili, da smo uspeli izolirati lektin

CnGL, saj velikosti proteina iz eluiranih frakcij sovpadajo z znano velikostjo tega lektina. Izolirali smo 0,31 mg lektin na 100 g plodišč. Iz glive *C. nebularis* so izolirali 2 mg klitocipina na 100 g plodišč, kar je več od našega izkoristka [44]. To lahko pomeni, da se v glivi *C. nebularis* izraža več klitocipina, vendar pa je možno, da se velika količina lektina ni vezala na ligand, saj na gelih opazimo močne lise v nevezani frakciji.

Na podlagi elucijskega diagrama in rezultatov NaDS PAGE smo se odločili združiti vse od šeste frakcije naprej, saj je v njih prisoten lektin CnGL. V frakcijah je bil prisoten še drug protein (druga lisa), ki se je verjetno vezal na sefarozo. Da bi raztopino očistili, smo ponovno izvedli afinitetno kromatografijo zgolj s sefarozo, na katero se je vezal nezaželeni lektin, v nevezani frakciji pa je ostal zgolj iskani lektin CnGL.

5.2 Vpliv lektina CnGL na bakterijsko rast

Vpliv lektina CnGL na rast bakterij smo preučevali z metodo ravnih krivulj bakterij *Listeria innocua* in *Escherichia coli*, v prisotnosti lektina CnGL, soka poprhnjene livke, ki je služil za primerjavo, in ampicilina, ki je kot antibiotik služil za pozitivno kontrolo. Kontrolni skupini bakterij sta rastle v običajnem gojišču brez dodanih učinkovin.

Na grafu 1 vidimo, da so rastne krivulje bakterij *L. innocua* zelo podobne. Logaritemska faza vseh tehničnih ponovitev je trajala približno dve uri, nato pa so vse vstopile v stacionarno fazo.

Nasprotno pri tehničnih ponovitvah kontrolne skupine bakterij *E. coli* na grafu 9 opazimo, da ena ponovitev močno odstopa od ostalih, saj se logaritemska rast nadaljuje in doseže precej višjo OD. To se je ponovilo tudi pri tehničnih ponovitvah z nekaterimi učinkovinami, zato so tudi standardni odkloni pri večini skupin precej veliki. Predvidevamo, da je do tega prišlo zaradi skupkov bakterij, ki se kljub večkratnemu mešanju na stresalniku niso razbili pred nacepivitvijo v gojišče.

Vpliv antibiotika ampicilina na rast bakterij *L. innocua* vidimo na grafu 2. Koncentracija 1 $\mu\text{g/mL}$ očitno ni imela velikega vpliva, saj je oblika krivulje v primerjavi s kontrolo zelo podobna, le končna OD je malenkost nižja. Antibiotični učinek se kaže pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$, saj je rast na začetku zelo majhna, nato pa začne krivulja celo padati, kar pomeni, da so bakterije pričele odmirati. To potrjuje tudi graf 6, na katerem vidimo, da je naklon rasti v logaritemski fazi pri kontroli in koncentraciji ampicilina 1 $\mu\text{g/mL}$ približno enak. Pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$ pa je naklon bistveno manjši, poleg tega je iz grafa 8 razvidno, da je končna OD pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$ res bistveno nižja v primerjavi s kontrolo.

Podoben vpliv ampicilina na bakterije *E. coli* je prikazan na grafu 10. Pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ opazimo podobno obliko krivulje kot pri kontroli, vendar doseže nižjo končno OD kot kontrola. Vendar se to ne sklada s prikazom na grafu 16, ki zajema podatke prve in druge biološke ponovitve. V drugi je namreč prišlo do odstopanja, kjer je bila končna OD skupine z 1 $\mu\text{g/mL}$ ampicilin višja od kontrole. Pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$ pa opazimo, da krivulja sprva narašča kot kontrola, nato pa po 1,5 ure močno pade in doseže končno OD, ki je skoraj nič.

Iz tega sklepamo, da koncentracija ampicilina 1 $\mu\text{g/mL}$ nima velikega vpliva na bakteriji *L. innocua* in *E. coli*. Očitno ima ampicilin pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$ močan antibiotični učinek na rast obeh vrst preučevanih bakterij. V nekaterih raziskavah je bilo določeno, da je minimalna inhibitorna koncentracija ampicilina za bakterije *E. coli* 4 $\mu\text{g/mL}$ [45]. To pojasnjuje, da pri koncentraciji ampicilina 1 $\mu\text{g/mL}$ antibiotičnega učinka nismo zaznali, pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/mL}$ pa je bil ta zelo izrazit.

Vpliv soka poprhnjene livke na bakterije *L. innocua* prikazuje graf 3. Podobne učinke soka opazimo na grafih 6, 7 in 8. Obe skupini z različnima količinama soka dosežeta višjo končno OD kot kontrola. Iz tega sklepamo, da sok pozitivno vpliva na rast bakterij *L. innocua*; pri tem ima večja količina soka večji vpliv, saj je skupina z 10 μL soka dosegla višjo končno OD, kasneje vstopila v stacionarno fazo in imela večji naklon v logaritemski fazi kot skupina s 5 μL soka. Predvidevamo, da so vzrok za to razna hranila v soku, saj več kot je soka in posledično hranil, večja je tudi rast. Hranila v soku bi lahko bili razni glivni ogljikovi hidrati ali proteini. V drugih raziskavah so opazili pozitiven učinek hladnovodnega izvlečka bukovega ostrigarja na rast bakterij vrste *Listeria monocytogenes* [46]. Ta je sorodna bakteriji *L. innocua*, ki smo jo preučevali. Učinek hladnovodnega izvlečka na rast bakterij *L. monocytogenes* je primerljiv z učinkom soka poprhnjene livke na bakterije *L. innocua*, kar podpira naš sklep, da ima sok pozitiven učinek na rast bakterij.

Na grafu 11 vidimo vpliv soka poprhnjene livke na bakterije *E. coli*, ki pa ni tako izrazit kot pri bakteriji *L. innocua*. Prikazane krivulje so povprečne vrednosti petih tehničnih ponovitev, ki pa so se, kot že omenjeno pri kontrolni skupini, med seboj precej razlikovale. Zaradi tega na grafu vidimo zelo velike standardne odklone. Če opazujemo povprečne krivulje, opazimo, da bakterije v prisotnosti soka rastejo bolje, saj dosežejo višjo končno OD. Učinek je večji pri 5 μL soka, vendar predvidevamo, da je do večje OD prišlo zaradi skupkov bakterij, saj je bilo v tej skupini več odstopajočih krivulj. Predvidevamo, da enako kot pri bakteriji *L. innocua*, do pozitivnega učinka na rast pride zaradi snovi v soku, ki jih bakterije porabijo kot hranila. Vendar

zaradi velikih odstopanj tega ne moremo potrditi. Na pozitiven učinek soka na bakterije *E. coli* lahko sklepamo predvsem iz naklonov logaritemske rasti (graf 14), saj sta pri obeh skupinah s sokom naklona večja kot pri kontroli. Nakloni niso vezani na končno OD, ki je pri tehničnih ponovitvah zelo razpršena. Zato je standardni odklon pri naklonih precej manjši in lahko z večjo gotovostjo sklepamo na pozitiven učinek soka na rast bakterij.

Graf 4 prikazuje rast bakterij *L. innocua* v prisotnosti lektina CnGL. Vidimo lahko, da 5 μL lektina nima bistvenega vpliva na rast, saj je krivulja zelo podobna kontroli. Doseže le malo višjo OD, kar vidimo na grafu 8. Prav tako na grafu 6 vidimo, da je naklon rasti primerljiv s kontrolo. Pri 10 μL lektina pa vidimo razliko v obliki rastnih krivulj. Skupina z lektinom vstopi v fazo logaritemske rasti 20 minut kasneje kot kontrola. Gre za t. i. *lagfazo*, v kateri se bakterije prilagajajo na okolje [38]. Na *lagfazo* bi lahko vplivala prisotnost lektina. To lahko primerjamo s pozitivno kontrolo ampicilinom (graf 2), na katerem podobno opazimo, da bakterije v logaritemsko fazo vstopijo kasneje v primerjavi s kontrolo. Prav tako na grafu 8 opazimo, da skupina z 10 μL lektina doseže nižjo OD kot kontrola. Poleg tega je tudi čas logaritemske rasti krajši kot pri kontroli (graf 7). 5 μL lektina CnGL očitno nima bistvenega vpliva na rast bakterij *L. innocua*. Večja količina (10 μL) pa bi lahko imela zaviralen vpliv na rast bakterij, saj se jih namnoži manj. Vendar so razlike majhne, zato tega ne moremo zagotovo trditi in bi bile potrebne nadaljnje raziskave. Morda ima lektin vpliv na komunikacijo med bakterijami oziroma njihovo interakcijo z okoljem, saj je faza prilagajanja daljša pri skupini z več lektina. To se sklada z raziskavami vpliva glivnih lektinov na bakterije iz rodu *Listeria*, kjer so ugotovili, da bi le-ti lahko imeli vpliv na adhezijo bakterij na podlago, vendar pa preučevani lektini niso delovali protibakterijsko [26].

Vpliv lektina CnGL na bakterije *E. coli* je prikazan na grafu 12. Kot že omenjeno pri ostalih skupinah, je tudi pri tej prišlo do velikih odstopanj v končni OD med tehničnimi ponovitvami. Zaradi tega so standardni odkloni zelo veliki in ne omogočajo zanesljivih zaključkov. Če primerjamo povprečne krivulje, opazimo, da obe skupini z lektinom dosežeta malo višjo končno OD kot kontrola (vidno tudi na grafu 16). Na grafu 14 lahko vidimo naklone logaritemske rasti, ki imajo manjše standardne odklone in so bolj reprezentativni. Skupini z lektinom imata večji naklon kot kontrola, kar se sklada tudi s končno OD in obliko krivulj. Torej ima lektin rahlo pozitiven učinek na rast, vendar pa sta pri 10 μL lektina naklon in končna OD manjša kot pri 5 μL . Sklepamo lahko, da bakterije lektina niso porabile kot hranilo, saj bi bila v tem primeru rast večja pri dodatku 10 μL lektina. Morda bi imela še večja količina lektina negativne učinke na

rast, saj se rast pri večji količini zmanjša v primerjavi z manjšo količino lektina. Vendar v primerjavi z ampicilinom vidnega antibiotičnega učinka ni.

Če primerjamo še vpliv lektina CnGL med bakterijami *L. innocua* in *E. coli*, opazimo, da je pri obeh vrstah pri skupini s 5 μ L lektina rast večja v primerjavi s kontrolo. Prav tako je pri obeh vrstah rast manjša pri 10 μ L lektina v primerjavi s skupino s 5 μ L lektina. Razlikujeta se v tem, da je rast pri 10 μ L lektina pri bakteriji *L. innocua* manjša v primerjavi s kontrolo, pri bakteriji *E. coli* pa je rast pri tej količini lektina še vedno večja od kontrole. Vrsti se razlikujeta v zgradbi celične stene, kar pomeni, da imata lahko na njej različne ogljikove hidrate. Lektin se morda bolje veže le na snovi v steni Grampozitivne bakterije *L. innocua*, kar bi lahko bil razlog za razlike.

6 Zaključek

V raziskovalni nalogi smo proučevali vpliv lektina CnGL na rast bakterij vrst *Listeria innocua* in *Escherichia coli*. Lektin specifičen za glukozo (CnGL) smo z afinitetno kromatografijo na glukozil-sefarozi izolirali iz plodišč glive vrste poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*). Z metodo NaDS PAGE smo ugotovili, da je bil v našem vzorcu glive prisoten lektin CnGL, s čimer smo potrdili našo prvo hipotezo. Ker smo lektin izolirali zgolj iz plodišč (gob) lahko sklepamo, da se ta v njih izraža v času poznejše jeseni, saj je bil vzorec nabran v sredini novembra. Vendar pa smo z analizo NaDS PAGE ugotovili, da je v izoliranem vzorcu prisoten tudi lektin, ki se je vezal na sefarozo. Tega smo iz vzorca odstranili s ponovno afinitetno kromatografijo z nosilcem sefarozo.

Z metodo spektrofotometričnega merjenja optične gostote bakterijski kultur na mikrotitrski plošči smo spremljali vpliv izoliranega lektina CnGL na rast preučevanih vrst bakterij. Rast v prisotnosti lektina smo primerjali s kontrolno skupino, s pozitivno kontrolo – antibiotikom ampicilinom in s skupino z dodanim sokom glive *C. nebularis*. V poskusni ponovitvi smo naleteli na več napak, saj je prišlo do kontaminacije slepih vzorcev in tudi bakterijskih kultur. Te pomanjkljivosti smo odpravili s sterilnim filtriranjem vzorcev soka in lektina, poleg tega pa smo gojišča bakterij *L. innocua* na mikrotitrski plošči pred nanosom bakterij *E. coli* prelepili z zaščitno folijo. Nato smo izvedli dve enaki biološki ponovitvi.

Ugotovili smo, da lektin CnGL na bakterijo *L. innocua* nima bistvenega vpliva, velik pozitiven vpliv pa ima sok poprhnjene livke. Podoben pozitiven vpliv soka smo opazili tudi pri bakteriji *E. coli*, predvidevamo pa, da do tega vpliva pride zaradi hranil v soku. V prihodnje bi bilo dobro raziskati, ali je to res pravi razlog za velik pozitiven učinek. Na podlagi rezultatov lahko našo drugo hipotezo, da bo lektin CnGL vplival na rast bakterij, delno potrdimo, saj smo ugotovili, da ima lektin zelo majhen vpliv na vrsto bakterij *L. innocua*. Večji in pozitiven vpliv ima na vrsto *E. coli*, vendar pa zaradi velikih odstopanj tega ne moremo zagotovo trditi. Zanimivo je, da ima večji pozitiven učinek na bakterije *E. coli* manjša količina lektina, kar pomeni, da ga bakterije verjetno ne porabijo kot hranilo. V nadaljnjih raziskavah bi bilo tako smiselno proučiti vpliv večjih količin lektina, ki bi morda lahko imele tudi iskani protibakterijski učinek. Vendar velja opozoriti, da je pri večini skupin bakterij *E. coli* prišlo do več odstopanj in velike razpršenosti podatkov, zato iz večine dobljenih rezultatov ne moremo postaviti gotovih sklepov in bi bilo v prihodnje smiselno izvesti dodatne ponovitve.

Če primerjamo obe bakterijski vrsti, ugotovimo, da se vpliv lektina med vrstama razlikuje, saj ta pri vrsti *L. innocua* nima bistvenega vpliva oz. je rahlo negativen, pri *E. coli* pa ima lektin pozitiven vpliv na rast. Tako smo potrdili našo tretjo hipotezo, do teh razlik pa bi lahko prišlo zaradi različne zgradbe celičnih sten bakterij, saj je ena vrsta po Gramu pozitivna, druga pa negativna. V prihodnje bi bilo smiselno raziskati tudi mehanizem delovanja lektina. Ta bi lahko vplival tudi na interakcije bakterijskih celic z okoljem, saj smo pri bakteriji *L. innocua* v prisotnosti lektina ugotovili, da je faza prilagajanja daljša v primerjavi s kontrolo, kar bi lahko bila posledica delovanja lektina. Tako bi bilo smiselno raziskati vpliv večjih koncentracij lektina na adhezijo bakterij na površine, saj bi lektin lahko imel tudi potencialni vpliv pri zaviranju tvorbe biofilmov.

Pri lektinu CnGL antibiotičnega učinka nismo zaznali, vendar pa bi se ob nadaljnjih raziskavah lahko pokazalo, da imajo večje količine lektina tudi iskani protibakterijski učinek. Čeprav smo opazili pozitiven vpliv na rast, se je ta pri večji količini lektina zmanjšal, zato je v prihodnje smiselno raziskovati vpliv lektina CnGL na bakterije, sploh v večjih koncentracijah in sinergistične učinke tega lektina z antibiotiki.

7 Literatura

1. Campbell, N. A., Reece, J. 2018. *Biologija 2: zgradba in delovanje organizmov: učbenik za gimnazije in srednje strokovne šole*. Celovec: Mohorjeva družba.
2. Belušič, G., et al. 2024. *Biologija 2: o zgradbi in delovanju organizmov: učbenik za biologijo v gimnazijah in srednjih strokovnih šolah biologija*. Ljubljana: Mladinska knjiga.
3. Podobnik, A., Devetak D. 2000. *Biologija. 4 in 5, Raznolikost živih bitij*. 2. izd., 3. nat. Ljubljana: DZS.
4. Jogan, N. 2001. *Navodila za vaje iz sistematske botanike*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
5. Mauseth, J. D. 2003. *Botany: an introduction to plant biology*. 3. izd. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers.
6. Harmaja, H. 2003. Notes on *Clitocybe s. lato* (Agaricales). *Ann. Bot.*, jan., let. 40, št. 3, str. 213–218.
7. Bielli, E. 2002. *Gobe: spoznavanje, prepoznavanje in nabiranje najbolj razširjenih vrst gob*. Ljubljana: Mladinska knjiga.
8. Ivec, Z. 2012. *Gobe I*. Maribor: Ivec.
9. Pace, G. 1977. *Vse o gobah*. Ljubljana: Mladinska knjiga.
10. Petersen, J. H. 2012. *The Kingdom of Fungi*. New Jersey: Princeton University Press.
11. Sabotič, J. 2020. Imajo gobe imunski sistem? Molekularni mehanizmi obrambe pri glivah. *Proteus*, mar., let. 82, št. 7, str. 302–309.
12. Künzler, M. 2018. How fungi defend themselves against microbial competitors and animal predators. *PLoS Pathog.*, sep., let. 14, št. 9. doi:10.1371/journal.ppat.1007184.
13. Meldau, S., Erb M., Baldwin I. T. 2012. Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Ann Bot.*, dec., let. 110, št. 8. doi: 10.1093/aob/mcs212.
14. Jakubczyk, D., Dussart, F. 2020. Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. *Molecules*, feb., let. 25, št. 4, str. 911. doi:10.3390/molecules25040911.
15. Singh, R. S., Tiwary, A. K., Kennedy, J. F. 2010. Lectins: Sources, Activities, and Applications. *Crit Rev Biotechnol.*, let 19, št. 2, str. 145–178. doi: 10.1080/0738-859991229224.
16. Nelson, D. L., Cox, M. M., Hoskins, A. A. 2021. *Lehninger Principles of biochemistry*. 8. izd. New York: Macmillan Learning.
17. Madigan, M. T., et al. 2022. *Brock biology of microorganisms*. 16. izd. Harlow: Pearson.
18. Sharon, N., Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, nov., let. 14, št. 11. doi: 10.1093/GLYCOB/CWH122.

19. Varrot, A., Basheer, S. M., Imberty, A. 2013. Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Curr Opin Struct Biol*, okt., let. 23, št. 5, str. 678–685. doi: 10.1016/J.SBI.2013.07.007.
20. Kobayashi, Y., Kawagishi, H. 2014. Fungal lectins: A growing family. *Methods in Molecular Biology*, let. 1200, str. 15–38. doi: 10.1007/978-1-4939-1292-6_2.
21. Hassan, M. A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T. W., Tiralongo, J. 2015. Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *Int J Mol Sci*, apr., let. 16, št. 4. doi:10.3390/ijms16047802.
22. Singh, R. S., Bhari, R., Kaur, H. P., 2010. Mushroom lectins: current status and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, jun., let. 30, št. 2, str. 99–126. doi: 10.3109/07388550903365048.
23. Pohleven, J., Kos, J., Sabotič, J. 2016. Medicinal Properties of the Genus *Clitocybe* and of Lectins from the Clouded Funnel Cap Mushroom, *C. nebularis* (Agaricomycetes): A Review. *Int J Med Mushrooms*. let. 18, št. 11, str. 965–975. doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i11.20.
24. Sabotič, J., Kos, J. 2019. CNL-*Clitocybe nebularis* Lectin-The Fungal GalNAc β 1-4GlcNAc-Binding Lectin. *Molecules*, nov., let. 24, št. 23. doi:10.3390/molecules24234204.
25. Perišić Nanut, M., Žurga, S., Konjar, Š., Prunk, M., Kos, J., Sabotič, J. 2022. The fungal *Clitocybe nebularis* lectin binds distinct cell surface glycoprotein receptors to induce cell death selectively in Jurkat cells. *FASEB J*, apr., let. 36, št. 4. doi:10.1096/fj.202101056RR.
26. Pohleven, J., Brzin, J., Vrabec, L., et al. 2011. Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. *Appl Microbiol Biotechnol*, maj, let. 91, št. 4, str.1141–1148. doi:10.1007/s00253-011-3236-0
27. Singh, R. S., Wali, A. K., Kennedy, J. F., 2020. Mushroom lectins in biomedical research and development. *Int J Biol Macromol*, maj, let. 151, str. 1340–1350. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.10.180.
28. Breitenbach Barroso Coelho, L. C., et al. 2018. Lectins as antimicrobial agents. *J Appl Microbiol*, nov., let. 125, št. 5, str. 1238–1252. doi: 10.1111/JAM.14055.
29. Janež, N., Ladányi, M., Sterniša, M., et al. 2024. Exposure to specific fungal lectins during adhesion impairs biofilm formation of *Listeria* on polystyrene. *Microb Biotechnol*, nov., let. 17, št. 12. doi:10.1111/1751-7915.70040
30. Ihan, A., et al (ur.). 2020. *Medicinska bakteriologija z mikologijo in parazitologijo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo.
31. Orsi, R. H., Wiedmann, M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol*, apr., let. 100, št. 12. doi:10.1007/s00253-016-7552-2.
32. Moura, A., Disson, O., Lavina, M., et al. 2019. Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, mar. let. 87, št. 4. doi:10.1128/IAI.00758-18.

33. Perni, S., Jordan, S. J., Andrew, P. W., Shama, G. 2006. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. *Food control*, nov., let. 17, št. 11, str. 875–883.
34. Seeliger, H. P. 1981. Apathogene listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977) [Nonpathogenic *listeriae*: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977) (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A Med Mikrobiol Infekt Parasitol*, let. 249, št. 4, str. 487–493.
35. Mueller, M., Tainter, C. R. 2023. *Escherichia coli* Infection. V: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
36. Braz, V. S., Melchior, K., Moreira, C. G. 2020. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol*, dec. doi:10.3389/fcimb.2020.548492.
37. Ruiz, N., Silhavy, T. J. 2022. How *Escherichia coli* Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology, *J Bacteriol*, avg., let. 204, št. 9. doi:10.1128/jb.00230-22.
38. Cappuccino, J. G., Sherman, N. 1992. *Microbiology: a laboratory manual*. 3. izd. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company.
39. *Antimicrobial resistance* [online]. 2023. [citirano 26. 1. 2025; 15:00]. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
40. *Nove protimikrobne strategije preprečevanja tvorbe biofilma z uporabo lektinov, ki inhibirajo bakterijsko adhezijo*. [online]. [citirano 26. 1. 2025; 15:30]. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.ijs.si/ijsw/ARRSProjekti/2019/Nove%20protimikrobne%20strategije%20prepre%20C4%8Devanja%20tvorbe%20biofilma%20z%20uporabo%20lektinov%20ki%20inhibirajo%20bakterijsko%20adhezijo>
41. Kuhelj, R. 2021. *Biokemija v praksi: načela in tehnike*. 3. izd., 6. nat. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
42. Bavec, A. 2008. *Navodila za laboratorijske vaje iz biokemije s teoretičnim dodatkom*. Ljubljana: Študentska založba.
43. Vidic, I., Berne, S., Drobne, D., et al. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycol Res*, mar., let. 109, št. 3, str. 377–382.
44. Brzin J., Rogelj B., Popovic T., Strukelj B., Ritonja A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *J Biol Chem*, jun., let. 275, št. 26, str. 20104–20109. doi: 10.1074/jbc.M001392200.
45. Peechakara, B. V., Basit, H., Gupta, M. 2025. In: StatPearls: *Ampicillin* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [datum zadnjega popravljanja: 28. 8. 2023], [citirano 6. 2. 2025; 15:40]. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519569/>

46. Baš, T., Bohinc, O. 2022. Vpliv izvlečkov gob na rastno krivuljo bakterij *Listeria monocytogenes* in *Lactiplantibacillus plantarum*. Ljubljana : BIC Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola.