

ŠIAULIŲ UNIVERSITETAS
REGIONŲ PLĖTROS INSTITUTAS

Dovilė Dovydaitytė

**ANEMOFILINIŲ AUGALŲ ŽIEDADULKIŲ EKSTRAKTŲ
ANTIGRYBINĖS SAVYBĖS**

Magistro darbas

Gamtinių sistemų valdymo magistro studijų programa

Vadovė: lekt. dr. Ilona Kerienė

Šiauliai, 2019

TURINYS

ĮVADAS	3
1. MOKSLINĖS LITERATŪROS ANALIZĖ.....	5
1.1. Anemofiliniai augalai ir jų žiedadulkės	5
1.2. Žiedadulkių nauda ir poveikis sveikatai	8
1.3. Bioaktyvūs junginiai anemofiliniuose augaluose ir jų žiedadulkėse	9
1.4. Mikroskopiniai grybai ir savybės	10
1.5. Antigrybiniuose tyrimuose taikomi metodai	13
2. DARBO OBJEKTAS IR METODAI.....	14
2.1. Darbo objektas	14
2.2. Tyrimo metodai.....	14
2.2.1. Žiedadulkių ir sporų sklaida Šiaulių miesto ore.....	14
2.2.2. Bendro fenolinių junginių kiekio žiedadulkėse nustatymo metodika	15
2.2.3. Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo tyrimo metodika.....	16
2.2.4. Statistinis rezultatų vertinimas	17
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ	18
3.1. Alergines reakcijas sukeliančių anemofilinių augalų ir mikroskopinių grybų sklaida ore	18
3.2. Bendras fenolinių junginių kiekis anemofilinių augalų žiedadulkėse	20
3.3. Žiedadulkių ekstraktų poveikis mikroskopinių grybų augimui	21
3.3.1. Beržo žiedadulkių poveikis mikroskopinių grybų (<i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp. ir <i>Fusarium</i> spp.) augimui	21
3.3.2. Dilgėlės žiedadulkių ekstrakto poveikis mikroskopinių grybų (<i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp. ir <i>Fusarium</i> spp.) augimui	25
3.3.3. Kiečio žiedadulkių poveikis mikroskopinių grybų (<i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp. ir <i>Fusarium</i> spp.) augimui	27
3.4. Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo mikroskopinių grybų augimui palyginimas... ..	28
3.5. Rekomendacijos.....	30
IŠVADOS.....	32
SANTRAUKA	33
SUMMARY	34
LITERATŪRA	35

IVADAS

Pasaulinė alergijos organizacija atkreipia dėmesį, kad dėl klimato kaitos keičiasi augalų fenologija, dėl to aplinkoje padaugėja alergines ligas sukeliančių anemofilinių žiedadulkių (Lietuvos hidrometeorologijos tarnyba, 2019), o padidėjęs oro drėgnis skatina mikroskopinių grybų dauginimąsi (World Allergy Organization, 2016), kurie ne tik sukelia alergines reakcijas bet ir teršia maisto produktus. Remiantis Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) duomenimis, dėl patogeninių mikroskopinių grybų dauginimosi ir jų gaminamų mikotoksinų maisto žaliavų užterštumas didėja (Food and agriculture organization of the United Nations, 2008). Jų sintezę kontroliuoti sunku (Karlovsky et al., 2016), todėl dažniausiai augalų apsaugai naudojami agresyvūs sintetiniai fungicidai, kurie daro neigiamą žalą gamtai, o jų likučiai užteršia maisto produktus. Todėl pasaulyje ieškoma natūralių, gamtoje egzistuojančių būdų, kurie padėtų apsaugoti maisto produktus nuo mikrobiologinės taršos. Tarptautiniu lygmeniu natūraliai maisto produktų apsaugai plačiai naudojami ekstraktai, pagaminti iš įvairių augalų dalių, nes juose gausu bioaktyvių junginių (Onaran, Sağlam, 2016), kurie pasižymi antigrybinėmis savybėmis (Lattanzio, Cardinali, 2006). Didelę bioaktyvių junginių grupę sudaro fenoliniai junginiai (Kolosej, 2017). Tikėtina, kad veikdami kartu su kitais bioaktyviais junginiais, galėtų paveikti mikroskopinio grybo ląstelės sienelę ir sutrikdyti svarbius fiziologinius procesus (Ansari et al., 2013). Tyrimai rodo, kad anemofilinėse žiedadulkėse gausu naudingų aminorūgščių, riebalų rūgščių, vitaminų (Baltuškevičius, 2019), tačiau tyrimų apie anemofilinių žiedadulkių bioaktyvių junginių koncentracijas ir jų antigrybinį aktyvumą tarptautiniu lygmeniu ir atliekamų Lietuvoje nėra. Dažniau analizuojami entomofilinių augalų žiedadulkių bioaktyvūs junginiai ir jų antibakterinis poveikis (Kacániová et al., 2012).

Aktualumas: Šiuo tyrimu siekiame išanalizuoti alergines reakcijas sukeliančių anemofilinių augalų žiedadulkių ir mikroskopinių grybų ore sklaidą bei įvertinti iš žiedadulkių pagamintų ekstraktų bioaktyvumą. Gauti tyrimo rezultatai prisidės ieškant būdų apsaugoti maisto produktus bei aplinką nuo taršos mikroskopiniais grybais. Todėl šis darbas yra aktualus, nes suteiks žinių apie alergines reakcijas sukeliančias žiedadulkes ir mikroskopinius grybus bei galimybes panaudoti iš žiedadulkių pagamintus ekstraktus visuomenės poreikiams.

Naujumas: Tarptautiniu lygmeniu dažniau analizuojamas entomofilinių augalų žiedadulkių bioaktyvumas ir jų antibakterinis poveikis, tačiau trūksta mokslinės informacijos apie anemofilinių žiedadulkių savybes. Šiame tyrime pateikiama nauja informacija apie anemofilinėse žiedadulkėse

sukauptą fenolinių junginių kiekį ir pirmą kartą įvertintas šių žiedadulkių ekstraktų antigrybinis poveikis patogeninių mikroskopinių grybų augimui.

Tyrimo tikslas: Nustatyti anemofilinių augalų žiedadulkėse fenolinių junginių kiekį ir įvertinti žiedadulkių ekstraktų poveikį mikroskopinių grybų augimui.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti alergines reakcijas sukeliančių mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp.) ir žiedadulkių (beržo, dilgėlės, kiečio) pasiskirstymą Šiaulių miesto ore;
2. Ištirti bendrą fenolinių junginių kiekį anemofilinių augalų (beržo, dilgėlės ir kiečio) pernešamose žiedadulkėse;
3. Nustatyti žiedadulkių ekstraktų antigrybinį poveikį mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp.) augimui.

1. MOKSLINĖS LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Anemofiliniai augalai ir jų žiedadulkės

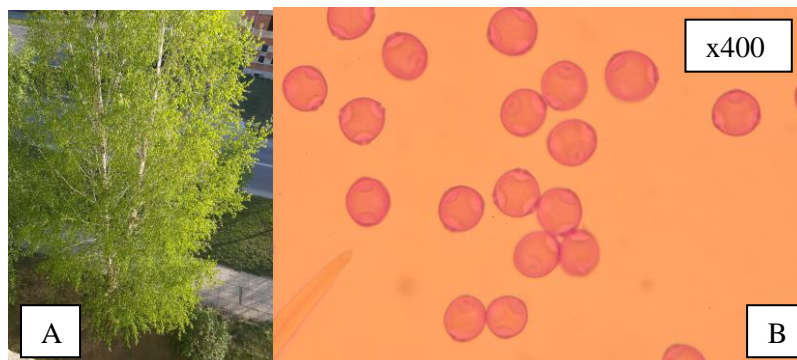
Kiekvienais metais, augalams žydint, išbyra daug žiedadulkių ir sporų. Ore jos plačiai pasklinda, gali patekti į ežerus, jūras, pelkes, upes ir ten nusėsti. Žiedadulkės ir sporos turi atsparius išorinius apvalkalėlius, todėl nuosėdose išlieka dešimtis ir net šimtus milijonų metų. Įvairių augalų žiedadulkės bei sporos yra nevienodo dydžio ir formos, skirtingais apvalkalėliais (Kabailienė, 1979). Dideli kiekiai žiedadulkių sklando ore tam tikrais metų laikais. Pavasarį tai būna medžių žiedadulkės, o vasarą didžiausi žiedadulkių skleidėjai yra žolės. Mažiau žiedadulkių būna pakrantėse ir aukštuose kalnuose (Astma-og Allergiforbundet, 2017).

Ekologiškai anemofilija yra susijusi su vyriškos ir moteriškos reprodukcinės struktūros atskyrimu arba erdviniu, arba laikiniu atskyrimu, kuri, pavyzdžiui, gali paskatinti kryžminimą. Genetinių tyrimų rezultatai rodo, kad anemofilinių augalų kryžminimo spartos yra mažos (arba mažos normos (t.y. savaime), arba didelės normos (t.y. kryžminimas)). Tai rodo skirtingų taksonų poravimosi sistemų skirtumus. Tačiau tarp poravimosi sistemų, atrodo, didžiausi genų srauto rodikliai yra pernešami vėjo (Ackerman, 1999). Anemofiliniai augalai pasižymi didele žiedadulkių gausa, nes apdulkinimo vektorius, kurį jie naudoja, vėjas, yra labai atsitiktinis, o ne konkretus (Tormo-Molina et al., 1996). Didelis vėjo greitis skatina anemofilinių žiedadulkių sklaidą. Atstumas nuo anemofilinių žiedadulkių nutolęs nuo pradinio augalo skiriasi ir dažnai priklauso nuo vėjo srovių dydžio, augalo aukščio ir augalijos dangos tankio (Jones, Jones, 2001).

Žiedadulkės – tai augalo dalis, kurios pirminė paskirtis – padėti augalams plisti ir įsitvirtinti žemės paviršiuje. Žiedadulkės yra vyriškasis augalų lytinio dauginimosi pradai, gamtoje nešantis rūšies genetinę įvairovę (Šaulienė ir kt., 2015). Anemofilinės augalų žiedadulkės lakios ir lengvos. Jei oras sausas, į jį patekusios žiedadulkės gali sklisti atmosfera tūkstančius kilometrų. Žiedadulkės augalų vegetacijos metu yra pagrindinė priežastis, dėl kurios kyla alerginės reakcijos (Gabinaitytė, Šaulienė, 2008).

Beržas (1 pav.) – bukiečių (*Fagales*) eilės beržinių (*Betulaceae* Gray) šeimos augalų gentis (Šiaulių universitetas, 2017). Vasaržalis lapuotis medis, gali būti vieno ar kelių kamienų, žievė dažnai ryškiai baltai juoda. Nereiklūs buveinėms, todėl greitai suveši pažeistose teritorijose (Pasyfo, 2019). Lapai nedideli, kiaušiniški arba rombiški, smailaviršūniai. Viriški žirginiai susiformuoja rudenį, žiemoja ir pavasarį prasiskleidžia. Pažiedės priaugusios prie dengiamojo lapo (sudaro triskiautį žvyną). Vaisius – sparnuotas riešutėlis. Vaisiams subrendus, žirginių triskiaučiai žvynai nukrinta ir riešutėliai išbyra (Galinis, 1984). Žydi balandžio–gegužės mėn., lapams

skleidžiantis (Pasyfo, 2019). Beržas yra pagrindinis Europoje žiedadulkių alergenų gaminantis medis (D'Amato et al., 2007). Beržo žiedadulkės labai alergeniškos. Dažnos kryžminės reakcijos su lazdyno, alksnio, skroblo ir bukiečių (*Fagales*) šeimos augalų žiedadulkėmis (Pasyfo, 2019).



1 pav. Beržas (A) ir beržo žiedadulkės (B), matomos pro mikroskopą (dažytos fuksino dažu)

Dilgėlė (2 pav.) – tai dilgėliečių (*Urticales*) eilės dilgėlinių (*Urticaceae* Juss.) šeimos augalų gentis (Šiaulių universitetas, 2017). Vienmetės arba daugiametės žolės. Turi dilginamuosius ir paprastuosius plaukelius (Pasyfo, 2019). Didžioji dilgėlė (*Urtica dioica*) – daugiametis augalas su šakniastiebiais. Auga dirvose, kuriose gausu nitratų. Stiebuose yra plaušų. Daržuose dažna gailioji dilgėlė (*Urtica urens*) – vienmetė piktžolė (Galinis, 1984). Žydi liepos–rugsėjo mėn. (Pasyfo, 2019). Dilgėlių žiedadulkės nealergeniškos (Pasyfo, 2019).



2 pav. Dilgėlė (A) ir dilgėlės žiedadulkės (B) matomos pro mikroskopą (dažytos fuksino dažu)

Kiečio gentis priklauso astrinių (*Asteraceae* Dumort.) šeimai (Šiaulių universitetas, 2017). Kietis (3 pav.) – tai vienmetis ar daugiametis žolinis augalas, puskrūmis ar krūmas. Žiedai smulkūs, gausūs, žalsvi arba rusvi, susitelkę į šluoteles. Žydi liepos–rugsėjo mėnesiais (Pasyfo, 2019). Kiečio žiedadulkės gaminamos milžinišku kiekiu, nes vienas augalas gali gaminti milijonus

žiedadulkių grūdų. Kadangi žiedadulkių grūdai yra maži (18–22 μm), jie dažnai dalyvauja tolimose oro pernašose (D'Amato et al., 2007). Žiedadulkės labai alergeniškos (Pasyfo, 2019).



3 pav. Kietis (A) ir kiečio žiedadulkės (B) matomos pro mikroskopą (dažytos fuksino dažu)

Žiedadulkės yra mažytės dalelytės, augalų paskleidžiamos į orą, pernešamos vėjo ar vabzdžių, tokiu būdu apdulkinant kitus tos pačios rūšies augalus (Astma-og Allergiforbundet, 2017). Anemofilinių augalų žiedadulkės – lengvos, sausos, o kartais, kad lengviau būtų pakeliamos, turi oro maišelius (Kabailienė, 1979). Augalams žydint ore gausu žiedadulkių, kurias subrandinę paleidžia vėjadulkiai augalai. Priklausomai nuo meteorologinių sąlygų, žiedadulkių ore gali būti nesuskaičiuojami kiekiai, nes vienas augalas, atsižvelgiant į rūšį, gali pagaminti milijonus ar net milijardus žiedadulkių (Šaulienė ir kt., 2015). Bičių surinktos žiedadulkės vadinamos entomofilinėmis. Savo chemine sudėtimi ir biologiniu veikimu jos skiriasi nuo anemofilinių laukų ir pievų žiedadulkių, išnešiojamų vėjo (Baltuškevičius, 2019). Anemofilinių augalų žiedadulkės yra mažo skersmens, todėl manoma, kad tai sumažina nusėdimo greitį ir tokiu būdu padidina žiedadulkių sklidimo atstumą (Ackerman, 1999).

Ore esančios žiedadulkės sąveikauja su skirtingomis ore suspenduotomis medžiagomis, įskaitant mikroorganizmus, kurie nusėda ant žiedadulkių grūdų paviršiaus, šios sąveikos gali pakeisti žiedadulkių grūdų savybes. Anemofilinių augalų žiedadulkių grūdų paviršiuje yra mišri mikroflora, kurią sudaro bakterijos ir grybai. Labiausiai tikėtina, kad žiedadulkių grūdai yra užsikrėtę mikroorganizmais, kilusiais iš augalų paviršiaus (Puc, 2003). Ilgai laikant žiedadulkes, jos „pasensta“, sumažėja jose vitaminų, aminorūgščių ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų kiekis. Yra nustatyta, kad išlaikius žiedadulkes 3–4 metus, aminorūgščių ir kitų biologiškai vertingų medžiagų sumažėja iki 40 %, nes jose vykstantys fiziologiniai ir biocheminiai procesai pagreitina biologiškai aktyvių medžiagų irimą (Baltuškevičius, 2019).

1.2. Žiedadulkių nauda ir poveikis sveikatai

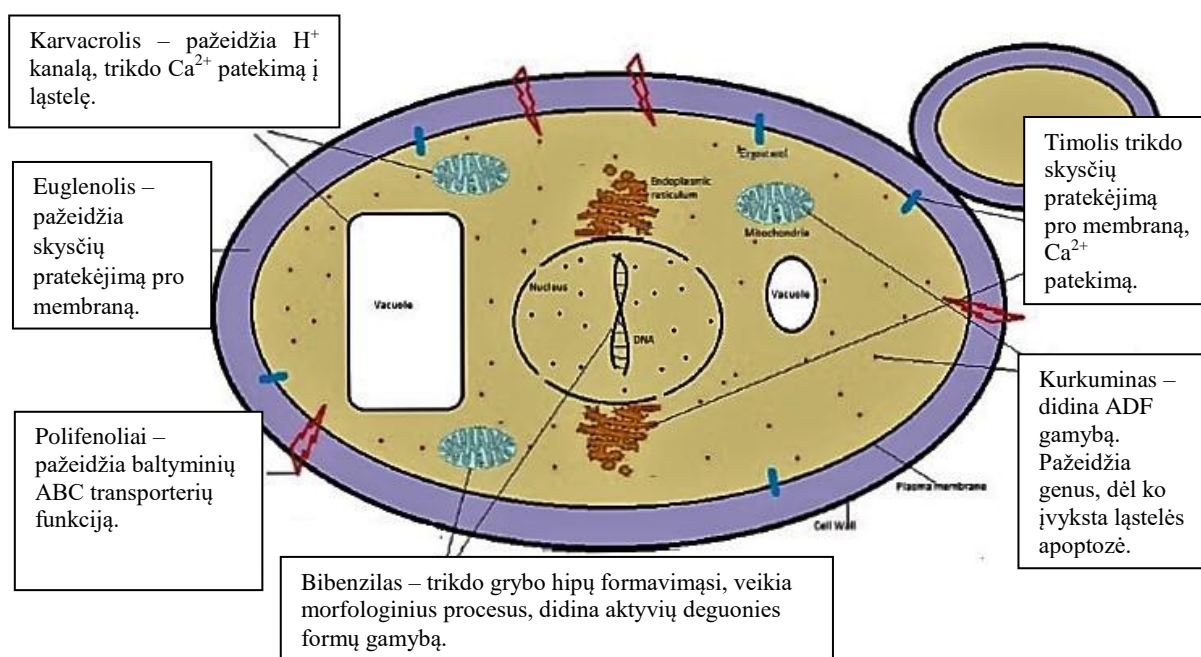
Žiedadulkės malšina uždegiminius procesus, stiprina kapiliarus, reguliuoja tulžies ir šlapimo procesus, stabdo aterosklerozės ir piktybinių auglių vystymąsi. Žiedadulkėse yra fermentų, kurie gerina medžiagų apykaitą ir reguliuoja svarbiausius organizmo biocheminius procesus (Rulinskas, 2019). Žiedadulkėse yra 5–7 kartus daugiau aminorūgščių negu jautienoje ir kiaušiniuose, taip pat nukleino rūgščių ir nukleoproteidų, apie 20 % augalinių riebalų. Ypač svarbūs lipidai, iš kurių susidaro vitaminas D, kai kurie cholesterolio kiekį reguliuojantys hormonai (Baltuškevičius, 2019). Tačiau žiedadulkės gali sukelti neigiamą poveikį alergiškiems organizmams.

Alergija yra padidėjęs jautrumas reakcijai į svetimas medžiagas (antigenus), kurie panašiais kiekiais ir aplinkybėmis yra nekenksmingi kitų žmonių kūnuose. Natūralus žmogaus organizmo atsparumas yra įgimto imuniteto, susidariusio sąlytyje su aplinkos antikūnais, rezultatas (Puc, 2003). Žiedadulkių alergija daro didelį klinikinį poveikį visoje Europoje. Moksliniai tyrimai rodo, kad pastaraisiais dešimtmečiais Europoje padaugėjo kvėpavimo takų alerginių reakcijų, kurias sukelia žiedadulkės (D'Amato et al., 2007). Aeroalergenai, jautriems asmenims sukeliantis alerginio rinito požymius, yra oru plintančios žiedadulkės (Šaulienė ir kt., 2015). Alergenų kiekis atmosferoje kinta priklausomai nuo augalijos, geografijos ir klimato kaitos. Todėl tyrėjams naujus iššūkius kelia vis dažnesnės oro permainingos – audros ir didėjantis žiedadulkių pernašos diapazonas (Šinušaitė, Veriankaitė, 2012). Epidemiologiniai tyrimai patvirtino, kad per pastaruosius du dešimtmečius sergamumas žiedadulkių alergenų sukeltomis alerginėmis ligomis didėjo visame pasaulyje. XX amžiaus pradžioje polinoze sirgo vidutiniškai vienas iš 100 Europos gyventojų, o dabar polinoze serga 15–20 % gyventojų (Staikūnienė ir kt., 2005). Alerginius susirgimus – rinitą, konjunktyvitą, kartais bronchinę astmą, sukelia žiedadulkių baltymai arba glikoproteinai. (Songailaitė, Veriankaitė, 2012), kurių molekulinė masė yra nuo 10–70 kDa. Daugelis žiedadulkių alergenų yra atsparūs pH pokyčiams ir aukštai temperatūrai net iki 100 °C (Puc, 2003). Baltymai žmogaus organizme įveikia ląstelės epitelinius barjerus ir sukelia alergines reakcijas (Gabinaitytė, Šaulienė, 2008). Pagal polinozę sukeliančius augalus Europa suskirstyta į Šiaurės, Centrinę, Rytų, kalnų ir Viduržemio jūros zonas. Lietuva yra centrinėje zonoje ir dažniausia polinozės priežastis – žolių, beržų ir kitų lapuočių augalų žiedadulkių alergenai (Staikūnienė ir kt., 2005). Neatmetama galimybė, kad kai kurie alerginiai simptomai padidėja dėl žiedadulkių grūdų mikroorganizmų ir endotoksinų, kurie gali veikti kaip pagalbinės medžiagos (Puc, 2003).

1.3. Bioaktyvūs junginiai anemofiliniuose augaluose ir jų žiedadulkėse

Į fenolinių junginių sudėtį įeina fenolinės rūgštys (benzoinės ir cinamono rūgšties dariniai), kumarinai, flavonoidai, stilbenai, hidrolizuojami ir kondensuoti taninai, lignanai ir ligninai. Šie junginiai sudaro didžiausią antrinių metabolitų grupę augalų karalystėje. Jie gaminami natūraliai, daugiausia veikia kaip apdulkintojai, antioksidantai ir tokiu būdu prisideda prie augalų pigmentacijos bei padeda augalui apsisaugoti nuo žalingų UV spindulių (Blainski, 2013).

Fenoliniai junginiai yra labai svarbūs augalų augimui, nes gamina fitoaleksinus, gali apsaugoti ląsteles nuo žalingų mikroorganizmų, suteikia augalams nemalonų skonį, todėl kai kurių augalų dalių neėda žolėdžiai gyvūnai (Apak et al., 2007). Pažeidus augalus, pakeitus aplinkos sąlygas, norėdami apsisaugoti jie pradeda sintetinti fenolinius junginius kaip atsaką į nepalankias sąlygas ar patogenus (Balasundram et al., 2006). Natūralūs fenoliniai junginiai yra mažos molekulinės masės organiniai junginiai, jų bioaktyvumas priklauso nuo struktūros, aromatinių žiedų pakaitų grupių pobūdžio ir ypač nuo hidroksilo grupių skaičiaus ir padėties aromatiniame žiede (Balasundram et al., 2006). Dėl lipofilinių savybių fenoliniai junginiai difunduoja pro mikroskopinių grybų biologinę membraną, įsiskverbia į ląstelės vidų ir pažeidžia grybų ląstelės komponentų (ergosterolių, gliukanų, chitino, gliukozaminų) sintezę, jungiasi su tretinės struktūros baltymais ir sutrikdo mikroskopinio grybo ląstelei gyvybiškai svarbių baltymų funkcijas (4 pav.) (Kerienė, 2017).



4 Pav. Fenolinių junginių poveikis mikroskopinio grybo ląstelei (Ansari et al., 2013)

Augalai yra biologiškai aktyvių medžiagų šaltinis, todėl pasižymi sveikatai naudingomis savybėmis bei padeda apsaugoti juos nuo žalingų mikroskopinių grybų. Dažniausiai augalų apsaugai nuo taršos mikroskopiniais grybais naudojamos cheminės medžiagos, bet augalų ekstraktai yra naudingesni, nes veikia švelniau ir yra lengviau pasisavinami lyginant su sintetinėmis cheminėmis medžiagomis ir antibiotikais (Mickienė ir kt., 2007). Ekstrakcija yra pirmas svarbus žingsnis atskiriant bioaktyvias sudedamąsias dalis iš augalinių medžiagų, labai svarbu pasirinkti tinkamą ekstrahavimo metodą (Burdejova, Polovka, 2017). Polifenolinių junginių ekstrakcijai tinkamiausi ekstrahentai yra etanolio, metanolio, acetono bei etilacetato tirpikliai arba jų vandeniniai mišiniai (Sultana et al., 2009). Dažniausiai naudojamas metanolis, kurio koncentracija yra nuo 45 iki 100 % bei nuo 30 iki 80 % etanolio tirpiklis. Angliavandenis fenolinio junginio molekulės struktūroje gerina jų tirpumą vandenyje, todėl naudinga tirpiklius maišyti su vandeniu (Miknienė ir kt., 2008).

Bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti augaluose yra naudojami kolorimetriniai Folin–Denis ir Folin–Ciocalteu metodai. Metodo esmė – augalinėje žaliavoje esantys fenoliniai junginiai šarminėje aplinkoje sudaro kompleksus, kurių sugerties maksimumas yra 760 nm. Šiuo metodu atliekamai analizei netrukdo baltymai, amino ar nukleino rūgštys, tačiau šie reagentai nėra specifiniai visiems fenoliniams junginiams, nes rezultatus gali iškreipti ir kitos augaluose esančios medžiagos (pavyzdžiui, askorbo rūgštis), kurios reakcijos metu gali vykdyti reduktoriaus funkcijas (Stalikas, 2007).

1.4. Mikroskopiniai grybai ir savybės

Fitopatogeniniams grybams plisti padeda įvairių tipų sporos. Grybai produkuoja didžiulius kiekius mikroskopinių sporų, kurios gali plisti labai toli ir kiekviena jų gali išauginti naują grybo koloniją (Dabkevičius ir kt., 2006). Mikroskopiniai grybai paplitę dirvožemyje ir kituose gamtiniuose substratuose, iš kur jie gali patekti į žmogaus gyvenamąsias ir darbo patalpas (Mačionienė ir kt., 2004). Mikroskopiniai grybai su oro srovėmis, įvairiais daiktais lengvai patenka į patalpas ir palankiomis sąlygomis gali jose išplisti (Levinskaitė, Paškevičius, 2009). Daugelio mikroskopinių grybų rūšių vystymuisi optimali aplinkos temperatūra yra 20–30 °C. Mikroskopinių grybų sporos pradeda vystytis esant 9–10 °C (Mačionienė ir kt., 2004). Grybų sporas pagal paskirtį galima skirstyti į trumpalaikes ir ilgalaikes (ramybės). Trumpalaikės sporos – tai konidijos, sporangėsporos, askosporos (aukšliasporės) ir bazidiosporos (papėdsporės), kurios skirtos greitai plisti ir užkrėsti naujus augalus. Dauguma jų turi ploną bespalvį apvalkalą, nedidelį maisto medžiagų atsargų kiekį, todėl negali išlikti ilgai gyvybingos, ypač nepalankiomis sąlygomis.

Ilgalaikės (ramybės) sporos turi storą tankų apvalkalą, didesnes maisto medžiagų atsargas, todėl skirtos ilgai išsaugoti grybo gyvybingumą nepalankiomis aplinkos sąlygomis ar laukiant, kol pasitaikys galimybė infekuoti naują augalą (Dabkevičius ir kt., 2006). Mikroskopiniai grybai produkuoja įvairius mikotoksinus, tokius kaip deoksinivalenolį (DON), nivalenolį (NIV), toksinus T-2, HT-2, zearalenoną, fumonizinus, aflatoksinus, ochtaroksiną A ir kt. (Mankevičienė ir kt., 2006). Patalpose dažnai aptinkami mikroskopiniai grybai, kurie gali sukelti infekcijas (pvz., bronchitą), astmą, imuninės sistemos susilpnėjimą, toksines reakcijas ir kt. (Levinskaitė, Paškevičius, 2009). Mikotoksinai yra grybeliniai metabolitai, sukeliantys žmonių ir gyvūnų ligą ar mirtį, kai jie yra nuryti, įkvėpti ir (arba) absorbuojami. Svarbiausia yra tai, kad jie aktyviai veikia mažomis koncentracijomis. Didelis kiekis gali būti mirtinas: ilgalaikis poveikis gali padidinti vėžio riziką ir slopinti imuninę sistemą (Paterson, Lima, 2010).

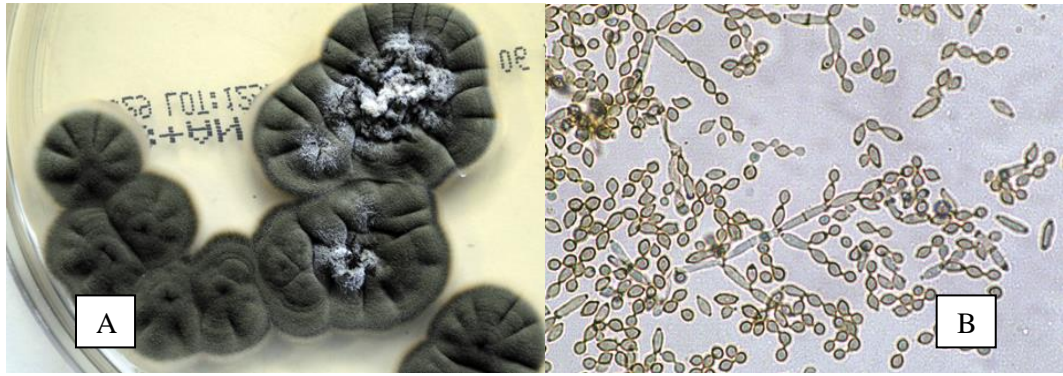
Alternaria spp. (5 pav.) gausiai aptinkamas gyvenamosiose patalpose, kuriose gausu šilumos ir drėgmės, senos statybos daugiabučiuose, todėl alergija pelėsiui dažniausiai pasireiškia būtent būnant namuose (Allergo medica, 2018).



5 pav. *Alternaria* (A) ir *Alternaria* sporos (B) matomos pro mikroskopą

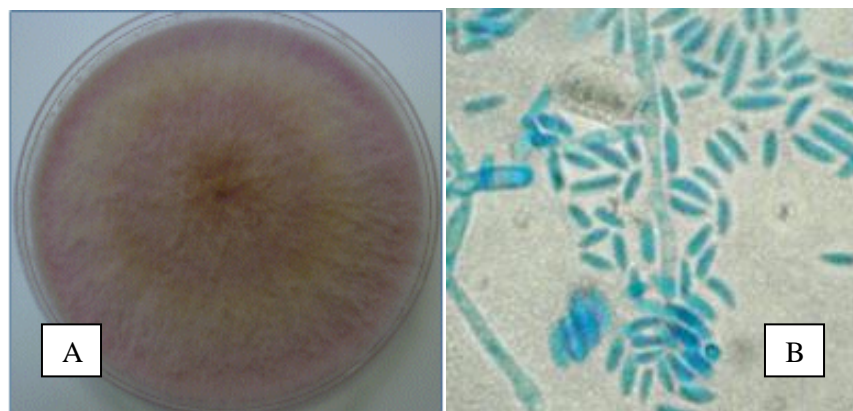
(Nuotraukų autorius: The university of Adelaide, 2016)

Cladosporium genties grybai paplitę visuose žemynuose ir yra aptinkami pačiose neįtikinamiausiose vietose. Jų sporos lengvai plinta oro srovėmis (Motiejūnaitė, 2011). *Cladosporium* spp. (6 pav.) yra dažnas mikroskopinis grybas, kuris gali turėti įtakos sveikatai. Kai kuriems žmonėms jis gali sukelti alergiją ir astmą. Labai retais atvejais jis gali sukelti infekcijas, tačiau dauguma *Cladosporium* genties rūšių nėra pavojingi žmonėms. *Cladosporium* spp. gali augti tiek uždaroje patalpose, tiek lauke (Healthline, 2019). Įvairių rūšių *Cladosporium* kolonijos dažniausiai būna tamsiai rudai žalsvos spalvos su pilkšvu, juodu atspalviais, aksominiu paviršiumi. Apatinė kolonijos pusė beveik juoda su žaliu ar rudu atspalviais (Motiejūnaitė, 2011).



6 pav. *Cladosporium* (A) ir *Cladosporium* sporos (B) matomos pro mikroskopą
(Nuotraukų autorius: The university of Adelaide, 2016)

Fusarium (7 pav.) yra viena iš labiausiai paplitusių ir svarbiausių aplinkai grybų genčių. Tai kosmopolitinė ir labai įvairialypė saprofitinių, fitopatogeninių ir toksigeninių grybų grupė, sutinkama beveik visose pasaulio ekosistemose (Stumbrienė, 2018). *Fusarium* grybai maisto medžiagas savo vystymuisi ir dauginimuisi absorbuoja iš kitų gyvų ar negyvų organizmų (Mankevičienė, 2012). *Fusarium* genties grybai – tai žemėje gyvenantys fakultatyviniai parazitai, kurie įprastai maitinasi augalų liekanomis, tačiau susidarius tam tikroms sąlygoms gali parazituoti ir gyvus augalus (Valstybinė miškų tarnyba, 2015). Gyvendami ant gyvų organizmų (įvairių augalų), jie sukelia ligas, o išskirdami toksinus nuodija ir augalus, ir iš jų pagamintus produktus bei aplinką (Mankevičienė, 2012). *Fusarium* genties grybai yra labiausiai paplitę ir padaro daugiausia žalos, jiems būdinga varietetų ir formų gausa bei įvairovė. Jie plinta konidijomis ir grybienu, o kai kurių rūšių yra žinoma ir lytinė vystymosi stadija – teleomorfa (išaugina aukšlius ir aukšliasporas) (Dabkevičius ir kt., 2006).



7 pav. *Fusarium* (A) ir *Fusarium* sporos matomos pro mikroskopą (B)
(Nuotraukų autorius: Mold & Bacteria Consulting Laboratories, 2019)

Fusarium ir *Alternaria* genties rūšys yra priskiriami „lauko“ mikroskopiniams grybams, jų vystymuisi reikia didesnės drėgmės (daugiau nei 95 %) ir žemesnės temperatūros (20 °C). (Kocić-Tanackov, Dimić, 2013). Lauke grybų sporų kiekiai yra susiję su natūraliais gamtos ciklais ir fiksuojami įprastomis žiedadulkių ir sporų gaudyklėmis (8A pav.) (Šaulienė ir kt., 2015).

Alternaria ir *Cladosporium* atmosferoje išsklaido daug sporų (konidijų). *Cladosporium* yra gausiausias sporų tipas daugelyje lauko aplinkos tyrimų, kurie sudaro 40–80 % visų sporų skaičiaus daugelyje Europos miestų. Abu sporų tipai yra kliniškai svarbūs, nes jie laikomi alerginiais (Recio et al., 2011). *Alternaria* genties grybai gerai žinomi kaip dirvos saprotrofai, augantys ant augalinių liekanų, bet tarp jų yra ir kai kurių augalų parazitinių rūšių. Parazitai ir saprotrofai, priklausomai nuo sąlygų, gali būti ir *Cladosporium* genties grybai. Šiai klasei priklauso ir grybų rūšys, naudojamos biologinei kovai su augalų kenkėjais (*Beauveria* gentis) ar fitopatogeniniais grybais (*Trichoderma lignorum* ir *Trichoderma roseum*) (Dabkevičius ir kt., 2006).

1.5. Antigrybiniuose tyrimuose taikomi metodai

Antigrybiniai testai dažniausiai atliekami *in vitro* sąlygomis. Augalų ekstraktai pilami tiesiai į terpę (Agaro praskiedimo metodas) arba kintančioje aplinkoje (mikroatmosfera metodas), taikant diskų difuzijos metodą (Agaro difuzijos metodas), mikro ir makro skiedimo metodus (skysčio praskiedimo metodas) (Kocić-Tanackov, Dimić, 2013).

Agaro šulinėlio difuzijos metodas yra labiausiai paplitęs metodas augalų ekstraktams analizuoti ir siekiant nustatyti jų antimikrobinį aktyvumą. Šiuo metodu šulinėlis, kuriame yra žinomas koncentracijos tiriamasis junginys, kontaktuoja su inokuluota terpe. Šulinėlyje susidaro skaidrios zonos skersmuo, kuris išmatuojamas inkubacijos pabaigoje (Aqil et al., 2010).

Plonasluoksnės chromatografijos rūšis (TLC) – bioautografija gali paaiškinti, kokia yra ekstrakto mikrobiologinė sudėtis. Šį metodą patogiu naudoti, nes chromatogramoje galima identifikuoti antimikrobinės ir antigrybinėmis savybėmis pasižyminčius junginius. (Aqil et al., 2010).

Taip pat mikrobiologiniuose tyrimuose naudojamas skysčio praskiedimo metodas. Tiriamieji junginiai sumaišomi su atitinkama terpe ir suleidžiami į bandomuosius mėginius. Nors jį galima atlikti tiek skystoje, tiek kietoje terpėje, geresnis būdas jį atlikti yra skystoje terpėje. Grybų augimo slopinimui naudojami įvairūs būdai: gali būti matuojamas daugeliu būdų, pavyzdžiui, matuojant absorbciją, padengiant žinomą tūrį ant agaro plokštelių, arba pagal plokštelės metodą (Aqil et al., 2010).

2. DARBO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Darbo objektas

Anemofilinių augalų – beržo, dilgėlės ir kiečio žiedadulkės ir jų antigrybinis poveikis alergines reakcijas sukeliantiems (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp.) ir mikotoksinus gaminantiems (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp) mikroskopiniams grybams.

Beržo žirginėliai skinti 2018 m. balandžio mėnesį, Šiaulių rajone – Kuršėnų mieste ir Račių kaime. Dilgėlių žiedynai surinkti 2018 m. liepos mėnesį Kuršėnų mieste ir Rekyvoje. Kiečio žiedynai surinkti 2018 m. rugpjūčio mėnesį prie Rekyvos miškų. Augalų dalys džiovintos iki pastovios masės esant $40,0 \pm 0,1$ °C temperatūrai. Žiedadulkės nuo augalų dalių atskirtos 125 mm akučių tankio sietu.

Mikroskopinių grybų monokultūros (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp) įsigytos iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (LAMMC). *Alternaria* spp. monokultūra išskirta iš morkos užsiteršusios mikroskopiniais grybais. *Cladosporium* spp. monokultūra išskirta iš liepos lapo augalo-šeimininko. Antigrybiniams tyrimams naudotos septynias dienas ant bulvių dektrozės agarų (BDA) terpės augintos mikroskopinių grybų monokultūros. Tyrimai atlikti Šiaulių universiteto chemijos ir biotechnologijų laboratorijose.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Žiedadulkių ir sporų sklaida Šiaulių miesto ore

Šiaulių aerobiologinėje stotyje, 143 m aukštyje virš jūros lygio, veikia Tarptautinės Aerobiologų Asociacijos nustatytus reikalavimus atitinkanti specializuota tūrinė Hirst tipo sporų ir žiedadulkių gaudyklė (8A pav.). Oro žiedadulkių ir sporų mėginiai renkami naudojant ištraukiamąjį dangtį su 7 dienas laikrodinio mechanizmo sukamu būgnu (8B pav.), ant kurio užklijuojama lipni juosta. Per gaudyklės angą 10 l/min. greičiu (tokiu greičiu sveikas žmogus įtraukia orą į plaučius) tolygiai traukiamas oras, su kuriuo patenka žiedadulkės, sporos ir kitos biologinės dalelės. Jos prilimpa prie lipnios juostos, kuri keičiama kiekvieną savaitę tuo pačiu laiku.



8 pav. Hirst tipo žiedadulkių ir sporų tūrinė gaudyklė (A) ir jos ištraukiamasis dangtis su sukamu būgnu (B)

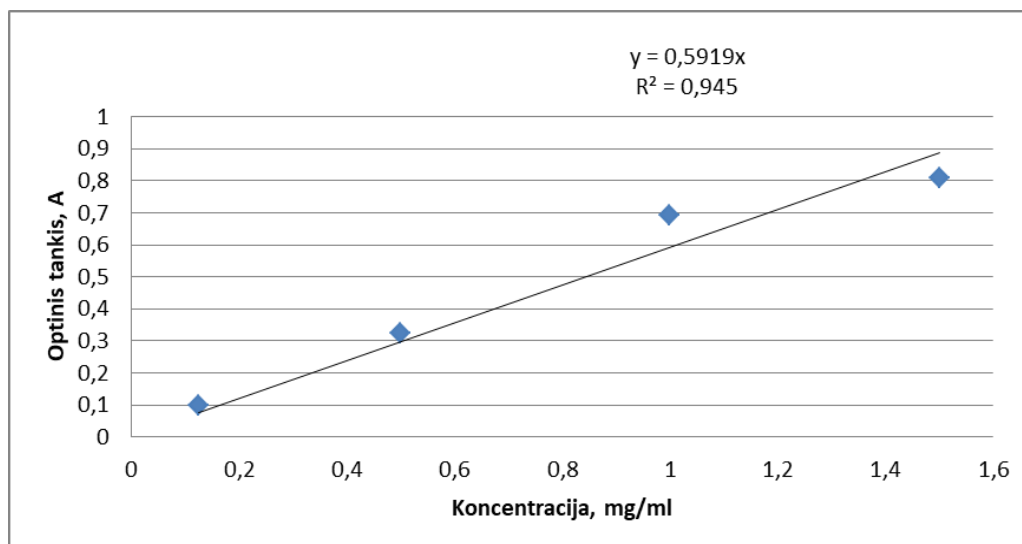
Analizuoti 2018 metų Šiaulių aerobiologinėje stotyje surinkti žiedadulkių (beržo, dilgėlės ir kiečio) ir mikroskopinių grybų sporų (*Alternaria* spp. ir *Cladosporium* spp.) duomenys.

2.2.2. Bendro fenolinių junginių kiekio žiedadulkėse nustatymo metodika

Bendram fenolinių junginių (BF) kiekiui žiedadulkėse nustatyti mėginiai paruošti pagal Mikašauskaitė et al. (2013) metodiką. Analitinėmis svarstyklėmis (Explorer Ohaus, Vokietija) pasvertos žiedadulkės ir užpiltos tirpikliu (75% etanolium) santykiu 1:10 ir 15 valandų ekstrahuota orbitinėje purtyklėje 200 aps. min⁻¹ greičiu esant kambario temperatūrai (21±1 °C). Ekstraktas 10 min. centrifuguotas 4000 aps. min⁻¹ greičiu. Ekstraktai paruošti dviem pakartojimais, iki analizės saugoti esant +4 °C temperatūrai. Bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti taikytas spektrofotometrinis metodas. Analizė atlikta dviem pakartojimais. BF kiekis nustatytas pagal Kerienė et al. (2015) metodiką: 100±0,1 μl mėginio atskiesta 7,9±0,1 ml distiliuotu vandeniu, įpilta 500,0±0,1 μl Folin–Ciocalteu reagento, po 6 min tirpalas šarmintas 1,5±0,1 ml 20 % natrio karbonatu. Reakcijos mišinys inkubuotas 120 min. tamsoje esant kambario temperatūrai (21±1 °C). Ekvivalentiškoms sąlygomis paruoštas palyginamasis etanolio tirpalas. Mėginio absorbcijos intensyvumas matuotas UV spektrofotometru kai bangos ilgis – 760 nm. Kalibracinei kreivei (9 pav.) sudaryti ekvivalentiškoms sąlygomis paruošti keturi standartiniai 0,125–1,500 mg ml⁻¹ koncentracijos rutino tirpalai. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas rutino ekvivalentu mg g⁻¹ (s.m.) kiekiui pagal formulę:

$$x = c \cdot V / m,$$

čia: x – bendras fenolinių junginių kiekis, mg g^{-1} (s.m.); c – fenolinių junginių koncentracija ekstrakto, apskaičiuota pagal kalibracinę kreivę, mg ml^{-1} ; V – ekstrahavimui paimto mėginio tūris, ml; m – analizei paimto mėginio masė, g.



9 pav. Rutino kalibravimo grafikas

Pagal gautą tiesės lygtį $A = k \times c$ apskaičiuotos mėginių koncentracijos,

čia: A – mėginio optinis tankis, k – tiesės polinkio kampo koeficientas, c – mėginio koncentracija, $\mu\text{g/ml}$.

$$A = 0,5919c$$

$$C = A/0,5919$$

2.2.3. Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo tyrimo metodika

Antigrybinio aktyvumo tyrimams naudoti beržo, dilgėlės ir kiečio žiedadulkių ekstraktai. Ekstraktais buvo veikiami alergines reakcijas sukiantys ir žalingus gyviesiems organizmams mikotoksinus gaminantys mikroskopiniai grybai. Antigrybinio aktyvumo tyrimai atlikti pagal Hussin et al. (2008). Į sterilias 9 cm Petri lėkšteles išpilstyta sterili bulvių dekstrozės agarų terpė, papildyta 20 % citrinos rūgšties (1 litrai – 3 ml). Terpė atvėsinta iki 35–40 °C temperatūros, įpilta 100 μl žiedadulkių ekstrakto, tolygiai išmaišyta. Terpei sustingus į lėkštelės centrą perkeltas mikroskopinio grybo 0,5×0,5 cm dydžio fragmentas. Inkubuota savaitę termostate esant 23±1 °C temperatūrai. Grybo monokultūros augimo intensyvumas vertintas periodiškai kas 24 val., 6 dienas, micelio augimo dydį (cm) matuojant nuo grybo centro į išorę (į abi puses). Tyrimai

atlikti paruošiant ne mažiau kaip po 9 lėkšteles pakartojimų kiekvieno antigrybinio testo varianto. Kontroliniam variantui naudota po 100 µl 75 % etanolio tirpiklio.

Tyrimo metu anemofilinių augalų žiedadulkės užpiltos 75 % etanolio santykiu: beržo žiedadulkių 1:40 ir 1:20, dilgėlės žiedadulkių 1:40 ir kiečio žiedadulkių 1:40.

2.2.4. Statistinis rezultatų vertinimas

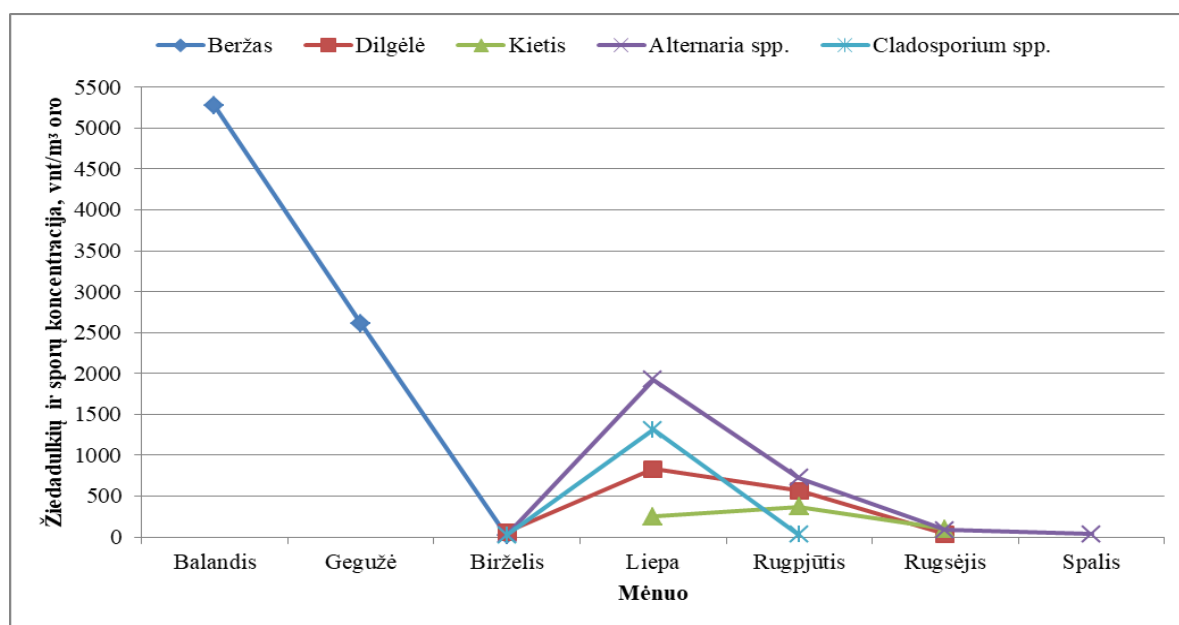
Bendro fenolinių junginių kiekio analizės atliktos ne mažiau kaip po du kartus, nekeičiant jų paruošimo sąlygų ir įrangos. Atlikta 20 bendro fenolinių junginių kiekio analizių. Žiedadulkių antigrybinio poveikio mikroskopinių grybų augimo slopinimui įvertinti, išanalizuotos 334 Petri lėkštutės (atlikta apie 1200 matavimų).

Rezultatų vidutinės vertės, standartinis nuokrypis apskaičiuotas kompiuterine programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, USA). Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroliniais variantais, įvertinti taikant vieno veiksnio dispersinės analizės programą ANOVA (Social Science Statistics), pagal Fišerio kriterijų (F lyginti dviejų imčių vidurkiai). Skirtumai statistiškai patikimi, kai patikimumo lygmuo ne mažiau arba lygus 95 % (* $p \leq 0,05$).

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ

3.1. Alergines reakcijas sukeliančių anemofilinių augalų ir mikroskopinių grybų sklaida ore

Žiedadulkių sklaidos duomenų analizė parodė, kad beržo žydėjimo sezono trukmė buvo nuo balandžio iki birželio mėn. (10 pav.). Didžiausia koncentracija ore nustatyta balandžio mėnesį - 5274 žiedadulkės/m³ oro, o gegužės ir birželio mėnesiais 51 % ir 97 % atitinkamai mažiau. Didžiausia paros koncentracija buvo balandžio 19 d. – 2026 žiedadulkės/m³ oro, tai sudarė 38 % viso balandžio mėnesio beržo žiedadulkių sklaidos. Alergines reakcijas sukeliančių *Alternaria* ir *Cladosporium* genties mikroskopinių grybų sklaidos ore pradžia sutapo beržo žiedadulkių sklaidos periodo pabaiga. Žiedadulkių užterštumo mikroskopiniais grybais tyrimas parodė, kad žiedadulkės buvo užsiteršusios šios genties mikroskopiniais grybais (11B pav.). Taip pat aptikta *Fusarium* genties mikroskopinių grybų. Tikėtina, kad šios grybų sporos yra ilgalaikės, kurios, anot Dabkevičiaus ir kt. (2006), turi didesnes maisto medžiagų atsargas, jų sporos turi storą tankų apvalkalą ir todėl gali išlikti ilgai gyvybingos.



10 pav. Beržo, dilgėlės ir kiečio žiedadulkių bei *Alternaria* spp. ir *Cladosporium* spp. sporų sklaida Šiaulių miesto ore (2018 m.)

Dilgėlės žiedadulkių sklaida 2018 m. užfiksuota birželio–rugsėjo mėn. (10 pav.). Didžiausia koncentracija ore nustatyta liepos mėnesį – 831 žiedadulkės/m³ oro, o birželio, rugpjūčio ir rugsėjo mėn. buvo 93 %, 32 %, 96 % atitinkamai mažiau. Didžiausia paros koncentracija buvo

liepos 20 d. – 93 žiedadulkės/m³ oro, tai sudarė 11 % viso liepos mėnesio dilgėlės žiedadulkių sklaidos. Mikroskopinių grybų, *Alternaria* spp. ir *Cladosporium* spp. sporų pasiskirstymo Šiaulių miesto ore duomenys parodė, kad dilgėlės žiedadulkių sklaidos pikai sutampa su šių grybų pasiskirstymo ore pikais (10 pav.). *Alternaria* spp. didžiausia sporų koncentracija ore taip pat buvo liepos mėn. – 1922 sporos/m³ oro, o birželio, rugpjūčio, rugsėjo ir spalio mėn. 2 %, 38 %, 5% ir 2% atitinkamai liepos mėn. kiekio. Didžiausia paros koncentracija buvo liepos 20 d. – 239 sporos/m³ oro. *Cladosporium* spp. grybo didžiausia sporų koncentracija ore liepos mėn. buvo – 1313 sporų/m³ oro, birželio ir rugpjūčio mėn. užfiksuoti tik 2 % nuo šio kiekio. Didžiausia paros koncentracija buvo liepos 15 d. – 372 sporos/m³ oro. Atlikus dilgėlės žiedadulkių užterštumo mikroskopiniais grybais ant mitybinės terpės tyrimą, buvo nustatyta, kad žiedadulkės užsiteršusios *Alternaria*, *Mucor*, *Botrytis* genties grybais (11A pav).

Kiečio žydėjimo sezonas buvo nuo liepos iki rugsėjo mėn. (10 pav.). Daugiausia kiečio žiedadulkių ore – 367 žiedadulkės/m³ nustatyta rugpjūčio mėnesį, o liepos ir rugsėjo mėn. 251 žiedadulkės/m³ ir 98 žiedadulkės/m³ oro, tačiau paros didžiausia koncentracija buvo liepos 29 d. – 63 žiedadulkės/m³ oro, tai sudarė 25 % viso liepos mėnesio kiečio žiedadulkių sklaidos. Kiečio žydėjimo periodas taip pat sutapo su *Alternaria* ir *Cladosporium* genties grybų sporų sezonu.



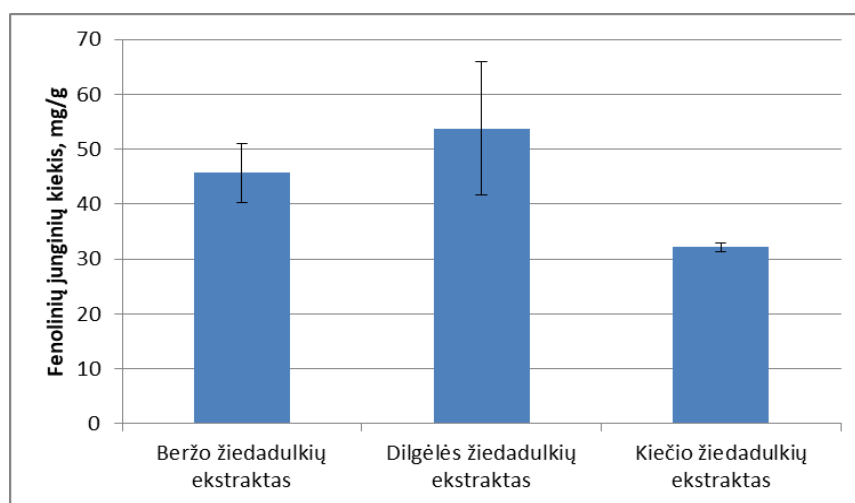
11 pav. Dilgėlės (A) ir beržo (B) žiedadulkių užterštumas mikroskopiniais grybais

Remiantis žiedadulkių ir mikroskopinių grybų sklaidos rezultatais, buvo atliktas žiedadulkių ekstraktų antigrybinio poveikio *in vitro* tyrimas, kuriuo buvo siekiama išsiaiškinti ar

anemofilinių augalų žiedadulkės gali turėti įtakos alergines reakcijas sukeliančių ir gyviesiems organizmams toksiškų mikroskopinių grybų augimui.

3.2. Bendras fenolinių junginių kiekis anemofilinių augalų žiedadulkėse

Buvo išsiaiškinta kiek bioaktyvių junginių sukaupia anemofilinių augalų žiedadulkės. Tyrimas parodė, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo dilgėlės žiedadulkių ekstrakto – $53,77 \pm 12,15$ mg/g (12 pav.). Kiečio ir beržo žiedadulkių ekstraktuose fenolinių junginių buvo nustatyta 40 % ir 15 % atitinkamai mažiau.



12 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis žiedadulkių ekstraktuose

Tyrimas parodė, kad fenolinių junginių kiekiui įtakos turėjo vietovė, kurioje rinkti augalai: beržo žiedadulkėse, rinktose Šiaulių rajone, Račių kaime buvo nustatyta 24 % daugiau fenolinių junginių, negu rinktose Kuršėnų mieste. Tačiau šioje vietovėje surinktose dilgėlių žiedadulkėse fenolinių junginių buvo nustatyta 36 % daugiau, lyginant su Rekyvoje rinktose žiedadulkėse. Mūsų tyrimai sutampa su Augspole et al. (2017), kurie teigia, dilgėlė yra viena iš daugiausiai fenolinių junginių kaupiantis augalas, lyginant su kitais laukiniais augalais. Kiti moksliniai tyrimai rodo, kad fenolinių junginių kiekis augaluose priklauso nuo vietovės, kurioje augalas augo ir aplinkos sąlygų.

Trūksta mokslinės informacijos apie bioaktyvių junginių koncentracijas dilgėlių žiedadulkėse, tačiau Fattahi et al. (2014) nustatė, kad dilgėlių lapų ekstrakto bendras fenolinių junginių kiekis yra $322,941 \pm 11,811$ mg/g. Otles, Yalcin, (2012) tyrimo rezultatai rodo, kad atsižvelgiant į surinktų augalų vietovę, bendras fenolinių junginių kiekis dilgėlės ekstrakto gali

svyruoti intervale nuo 66,97 iki 730,65 mg/g. Ossipov et al. (1995) nustatė, kad bendras fenolinių junginių kiekis beržo lapuose priklauso nuo jo rūšies: karpotojo beržo lapuose BFK buvo 27,05 mg/g, o plaukuotojo beržo lapuose – 44,70 mg/g. Carvalho et al. (2010) atliko kiečio šešių rūšių augalų ekstraktus ir nustatė, kad bendras fenolinių junginių kiekis svyruoja nuo 0,220±0,002 iki 0,390±0,004 g/100g. Remiantis Seddik et al. (2010) rezultatais kiečio lapų ekstrakte bendras fenolinių junginių kiekis siekė 133,43 mg/g.

3.3. Žiedadulkių ekstraktų poveikis mikroskopinių grybų augimui

Anemofilinių augalų žiedadulkių ekstraktų antigrybinis aktyvumas analizuotas naudojant penkių mikroskopinių grybų monokultūras – *Aspergillus* spp., *Penicilium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp. Tyrimai parodė, kad *Aspergillus* spp. ir *Penicilium* spp. monokultūros jau micelio augimo pradžioje intensyviai ir gausiai gamina sporas (priešingai nei kitos analizuotos monokultūros), kurios pasiskirsto visame Petri lėkštelės plote ir tik po to augina micelį. Šios augimo savybės iškreipė tyrimo rezultatus, todėl toliau buvo analizuotas žiedadulkių ekstraktų antigrybinis poveikis *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp. monokultūrų augimui.

3.3.1. Beržo žiedadulkių poveikis mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp.) augimui

Beržo žiedadulkių antigrybinis aktyvumas buvo analizuotas naudojant dvi ekstraktų koncentracijas – pagamintas santykiu 1:20 ir ekstraktas pagamintas santykiu 1:40. Skirtingų koncentracijų ekstraktų poveikio *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp. grybų augimui rezultatai pateikti 1 (1:40) ir 2 (1:20) lentelėse.

1 lentelė

Beržo žiedadulkių ekstrakto (1:40) poveikis mikroskopinių grybų augimui

Beržo žiedadulkių ekstrakto koncentracijos santykis 1:40	N	87	111	135	159	183	207
		vidurkis±standartinis nuokrypis (cm)					
Kontrolė	15	2,53±0,31	3,21±0,36	3,87±0,34	4,39±0,35	4,93±0,41	5,31±0,42
<i>Alternaria</i> spp.	12	2,45±0,26	3,06±0,20	3,59±0,23*	4,04±0,21*	4,57±0,27*	4,87±0,21*
Kontrolė	11	1,75±0,17	2,1±0,18	2,41±0,22	2,75±0,29	2,98±0,36	3,25±0,49
<i>Cladosporium</i> spp.	11	1,69±0,17	2,04±0,19	2,28±0,25	2,52±0,37	2,71±0,50	2,85±0,63
Kontrolė	12	1,08±0,11	1,77±0,29	2,48±0,47	3,42±0,57	4,52±0,59	6,52±0,87
<i>Fusarium</i> spp.	12	1,12±0,11	2,02±0,18*	2,92±0,27*	3,82±0,37	4,60±0,62	5,94±1,31

* - reikšmingi skirtumai lyginant su kontroliniu variantu, kai $p \leq 0,05$; N – pakartojimų skaičius.

Alternaria spp. tyrimo rezultatai parodė (1 lentelė), kad lyginant su kontroliniu variantu, beržo žiedadulkių ekstraktas (BŽE40) turėjo įtakos *Alternaria* spp. grybo augimui visu tyrimo laikotarpiu, tačiau pirmieji reikšmingi ($p \leq 0,05$) skirtumai nustatyti praėjus 135 val. nuo matavimų pradžios – BŽE40 grybo micelio augimą stabdė 7 % labiau nei kontroliniame variante. po 159 val. ir po 207 val., micelio augimas buvo 8 % mažesnis, lyginant su kontrole.

Cladosporium spp. tyrimo rezultatai parodė (1 lentelė), kad lyginant su kontroliniu variantu, BŽE40 turėjo įtakos *Cladosporium* spp. grybo augimui visu tyrimo laikotarpiu, tačiau reikšmingų ($p \leq 0,05$) skirtumų nenustatyta. Išryškėjo tendencija, kad BŽE40 mažiausiai įtakos grybo augimui turėjo praėjus 111 val. nuo inkubavimo pradžios – vidutinis micelio skersmuo buvo 0,06 cm mažesnis, lyginant su kontrole. Matavimų pabaigoje – po 207 val., grybo micelis buvo 0,4 cm mažiau paaugęs, lyginant su kontrole.

Fusarium spp. tyrimo rezultatai parodė (1 lentelė), kad lyginant su kontroliniu variantu, BŽE40 turėjo įtakos *Fusarium* spp. grybo augimui viso tyrimo metu. Reikšmingi ($p \leq 0,05$) skirtumai nustatyti praėjus 111 val. nuo inkubacijos pradžios, BŽE40 grybo micelio augimą spartino 12 % labiau nei kontroliniame variante. Didžiausia grybo augimo sparta buvo nustatyta po 135 val. nuo inkubavimo pradžios – *Fusarium* monokultūros micelio skersmuo buvo 15 % didesnis, lyginant su kontrole. Tačiau praėjus nuo inkubavimo pradžios 207 val., BŽE40 pristabdė *Fusarium* spp. grybo augimą ir buvo 9 % mažesnis micelio skersmuo, lyginant su kontrole.

2 lentelė

Beržo žiedadulkių ekstrakto (1:20) poveikis mikroskopinių grybų augimui

Beržo žiedadulkių ekstrakto koncentracijos santykis 1:20	N	87	111	135	159	183	207
		vidurkis±standartinis nuokrypis (cm)					
Kontrolė	10	1,23±0,09	1,79±0,10	2,23±0,15	2,67±0,16	2,99±0,21	3,32±0,20
<i>Alternaria</i> spp.	10	1,21±0,08	1,67±0,15	2,04±0,18*	2,36±0,21*	2,7±0,21*	3,0±0,2*
Kontrolė	9	1,16±0,11	1,7±0,15	2,16±0,11	2,58±0,13	2,96±0,11	3,26±0,16
<i>Cladosporium</i> spp.	9	1,12±0,09	1,62±0,13	2,04±0,14	2,48±0,20	2,8±0,18*	3,09±0,19
Kontrolė	11	1,88±0,22	2,7±0,3	3,55±0,28	4,54±0,36	5,62±0,41	6,8±0,54
<i>Fusarium</i> spp.	11	1,88±0,36	2,7±0,43	3,45±0,48	4,38±0,58	5,41±0,69	6,42±0,76

* - reikšmingi skirtumai lyginant su kontroliniu variantu, kai $p \leq 0,05$;

N – pakartojimų skaičius.

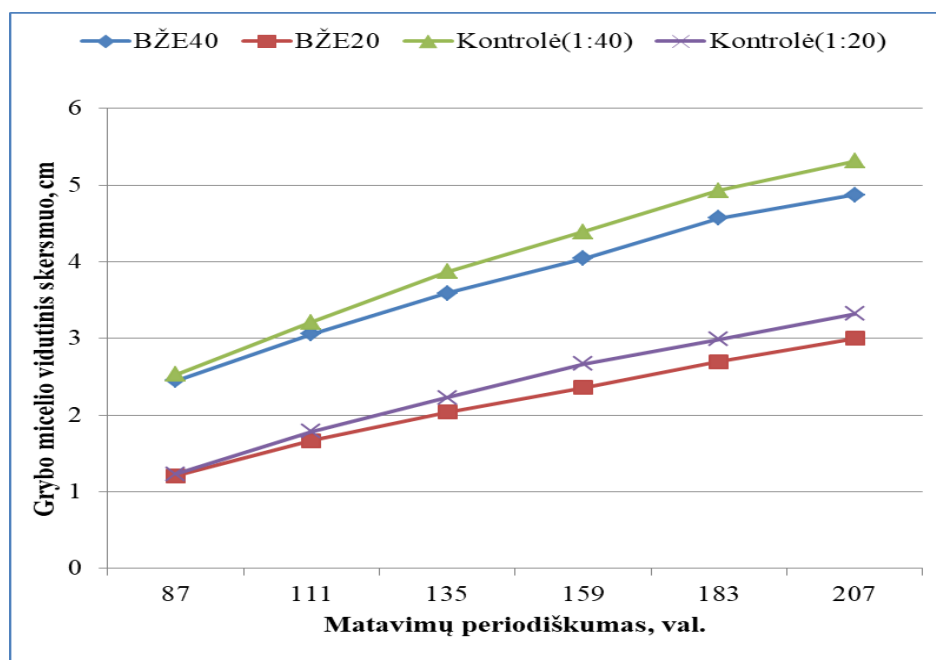
BŽE20 antigrybinio poveikio rezultatai parodė, kad ekstraktas turėjo neigiamos įtakos *Alternaria* spp. micelio augimui viso tyrimo laikotarpiu. Pirmieji reikšmingi ($p \leq 0,05$) skirtumai nustatyti praėjus 135 val. nuo matavimų pradžios: BŽE20 grybo micelis buvo 8,5 % mažesnis nei kontrolinio varianto. Didžiausias reikšmingas šio ekstrakto antigrybinis poveikis nustatytas praėjus

159 val. nuo inkubavimo pradžios: grybo micelio skersmuo buvo 11 % mažesnis lyginant su kontroliniu variantu.

BŽE20 ekstraktas visu tyrimo laikotarpiu stabdė ir *Cladosporium* grybo augimą (2 lentelė). Tačiau reikšmingi ($p \leq 0,05$) stabdymo požymiai (5 % lyginant su kontrole) nustatyti tik vieno matavimo laikotarpiu – praėjus 183 val. nuo matavimų pradžios.

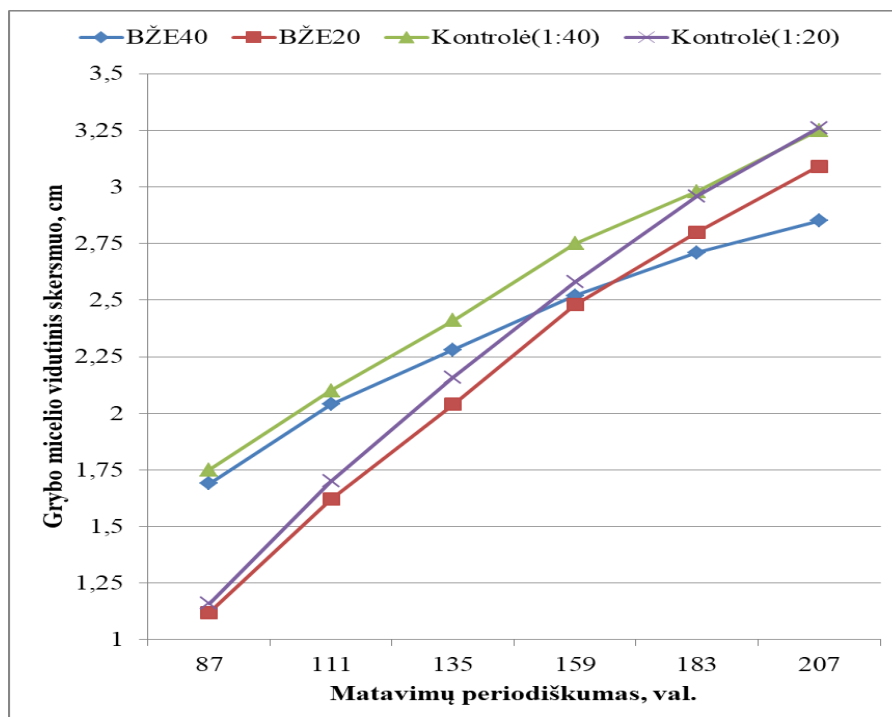
Fusarium spp. grybo micelis ant mitybinės terpės, apdorotos BŽE20 ekstrakto augo labai panašiai kaip ir kontroliniame variante iki laikotarpio, kai nuo micelio matavimų pradžios buvo praėję 159 val., vėliau micelis augo lėčiau, tačiau skirtumai buvo nereikšmingi.

Beržo žiedadulkių skirtingų koncentracijų ekstraktų poveikio palyginimas *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp. grybų augimui pateiktas 13–15 pav.



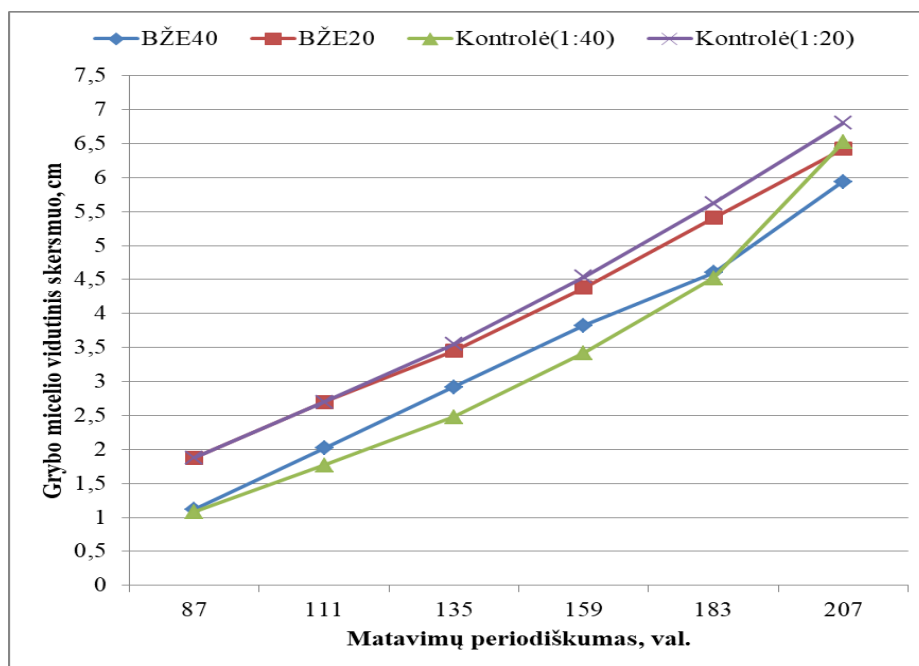
13 pav. Beržo žiedadulkių ekstraktų koncentracijų palyginimas *Alternaria* spp. grybo augimui

Palyginus dviejų BŽE koncentracijų rezultatus, gauta, kad BŽE20 koncentracijos antigrybinis aktyvumas buvo apie 3 % didesnis, lyginant su praskiestu iki BŽE40 (13 pav.). Tačiau pastebėta, kad mitybinių terpių, apdorotų skirtingais BŽE rezultatai neatsikartoja. Abiejų testų kontroliniuose variantuose etanolio koncentracija buvo vienoda, tačiau *Alternaria* spp. visu tyrimo laikotarpiu augo lėčiau ant terpės, kontroliniame variante, kuri buvo naudota statistiniam patikimumui palyginti terpei, apdorota didesne bioaktyvių junginių koncentracija.



14 pav. Beržo žiedadulkių ekstraktų 1:20 ir 1:40 koncentracijų palyginimas *Cladosporium* spp. grybo augimui

Skirtingų koncentracijų BŽE *Cladosporium* spp. augimui grafinis vaizdavimas rodo (14 pav.), kad tyrimo pradžioje *Cladosporium* spp. intensyviau augo ant terpės, kuri buvo apdorota BŽE40, tačiau praėjus nuo inkubavimo pradžios 159 val., 8 % didesnis *Cladosporium* spp. micelio skermuo buvo nustatytas lėkštelėse, kuriose mitybinė terpė buvo apdorota BŽE20. Didesnis augimo intensyvumas išliko iki matavimų pabaigos. Šie rezultatai rodo, kad reikšmingų skirtumų tarp BŽE20 ir BŽE40 nebuvo.



15 pav. Beržo žiedadulkių ekstraktų koncentracijų palyginimas *Fusarium* spp. grybo augimui

BŽE20 ir BŽE40 analizė rodo, kad abu ekstraktai *Fusarium* grybo augimui neturėjo reikšmingos įtakos. Tačiau remiantis abiejų testų rezultatais, jų antigrybinis aktyvumas sutapo – nuo matavimų pradžios praėjus 183 val., *Fusarium* spp. micelio skersmuo buvo mažesnis, lyginant su jų kontrolėmis. Išryškėjo tendencija, kad šiuo matavimo laikotarpiu BŽE20 *Fusarium* spp. grybo augimo stabdymui turėjo daugiau įtakos.

3.3.2. Dilgėlės žiedadulkių ekstrakto poveikis mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp.) augimui

Dilgėlės žiedadulkių ekstrakto (DŽE) *Alternaria* spp. antigrybinio poveikio rezultatai parodė (3 lentelė), kad DŽE turėjo įtakos *Alternaria* spp. augimui visu tyrimo laikotarpiu, o pirmieji reikšmingi ($p \leq 0,05$) skirtumai, kaip ir BŽE, nustatyti praėjus 135 val. nuo inkubacijos pradžios: *Alternaria* spp. micelio skersmuo buvo 7 % mažesnis nei kontroliniame variante. Didžiausias DŽE antigrybinis aktyvumas buvo praėjus 183 val. nuo inkubavimo pradžios: *Alternaria* spp. augimo intensyvumas buvo 10 % mažesnis, lyginant su kontroliniu variantu.

Dilgėlės žiedadulkių ekstrakto įtaka mikroskopinių grybų augimui

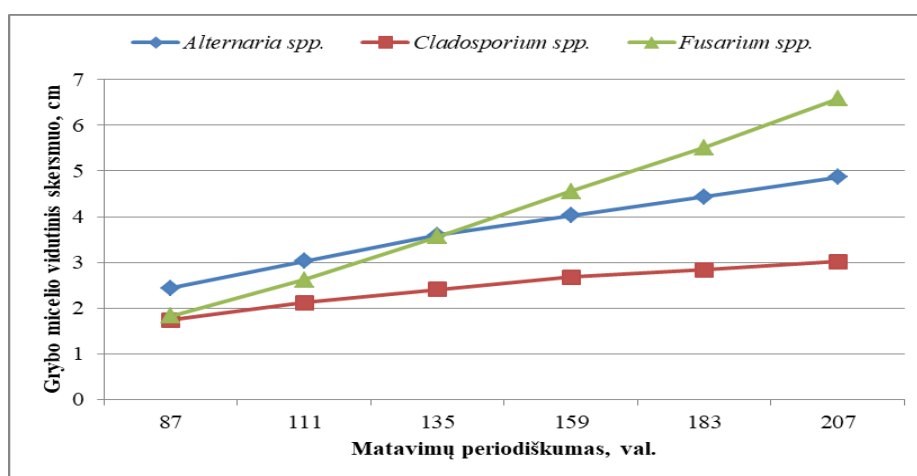
Dilgėlės žiedadulkių ekstrakto koncentracijos santykis 1:40	N	87	111	135	159	183	207
		vidurkis±standartinis nuokrypis (cm)					
Kontrolė	15	2,53±0,31	3,21±0,36	3,87±0,34	4,39±0,35	4,93±0,41	5,31±0,42
<i>Alternaria spp.</i>	12	2,44±0,17	3,03±0,19	3,6±0,24*	4,03±0,31*	4,44±0,35*	4,86±0,41*
Kontrolė	11	1,75±0,17	2,1±0,18	2,05±0,22	2,75±0,29	2,98±0,36	3,25±0,49
<i>Cladosporium spp.</i>	9	1,74±0,21	2,12±0,25	2,41±0,27	2,68±0,33	2,84±0,43	3,02±0,56
Kontrolė	11	1,88±0,22	2,70±0,30	3,55±0,28	4,54±0,36	5,62±0,41	6,71±0,53
<i>Fusarium spp.</i>	10	1,83±0,21	2,62±0,23	3,57±0,32	4,56±0,36	5,51±0,39	6,58±0,47

* - reikšmingi skirtumai lyginant su kontroliniu variantu, kai $p \leq 0,05$;

N – pakartojimų skaičius.

DŽE poveikis *Cladosporium spp.* ir *Fusarium spp.* augimui buvo nereikšmingas, tačiau išryškėjo tendencija, kad nuo inkubavimo pradžios praėjus 159 val. *Cladosporium spp.* augimas buvo pristabdytas 9 %, o *Fusarium spp.* augimas sulėtėjo tik tyrimo pabaigoje (po 183 val.).

Kitų mokslinių tyrimų susijusių su dilgėlių žiedadulkių ekstraktų antigrybinį poveikį mikroskopinių grybų augimui nepavyko surasti, tačiau Hadizadeh et al. (2009) tyrė visą dilgėlės augalą ir nustatė, kad jo ekstraktas *Alternaria spp.* augimą stabdė nuo 30,5 iki 100 %, priklausomai nuo ekstrakto koncentracijos. Šių mokslininkų tyrimai parodė ir antigrybinį aktyvumą stabdant *Fusarium spp.* augimą. Priklausomai nuo ekstrakto koncentracijos, stabdymo efektyvumas buvo nuo 24,3 iki 80 %. Taip pat ir kiti tyrimai rodo, kad *Fusarium spp.* ir *Alternaria spp.* augimui gali turėti neigiamos įtakos dilgėlės lapų ir šaknų ekstraktai (Nadiya Jan et al., 2017; Grata, Nabrdalik, 2015)



16 pav. Dilgėlės ekstrakto poveikis *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.* ir *Fusarium spp.* grybų augimui

Palyginus DŽE antigrybinį poveikį visų trijų patogeninių grybų augimui išryškėjo tendencija, kad *Fusarium* genties grybas augo greičiau ir jo micelio išsiplėtimo zona matavimo pabaigoje buvo atitinkamai 26 % ir 54 % didesnė lyginant su *Alternaria* ir *Cladosporium*. Lėčiausiai augo *Cladosporium* genties grybas. Tikėtina, kad šiam augimo dinamikų skirtumui turėjo įtakos mikroskopinių grybų fiziologinės savybės. Pagal Los et al. (2018), užterštumui *Fusarium* ir *Alternaria* grybui tinka tos pačios sąlygos. Tačiau Weikl et al. (2016) teigia, kad *Fusarium* auga greičiau ir jo dauginimuisi reikia mažiau maistinių medžiagų, lyginant su *Alternaria*.

3.3.3. Kiečio žiedadulkių poveikis mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp.) augimui

Kiečio žiedadulkių ekstrakto poveikis *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp. grybų augimui pateiktas 4 lentelėje.

4 lentelė

Kiečio žiedadulkių ekstrakto įtaka mikroskopinių grybų augimui

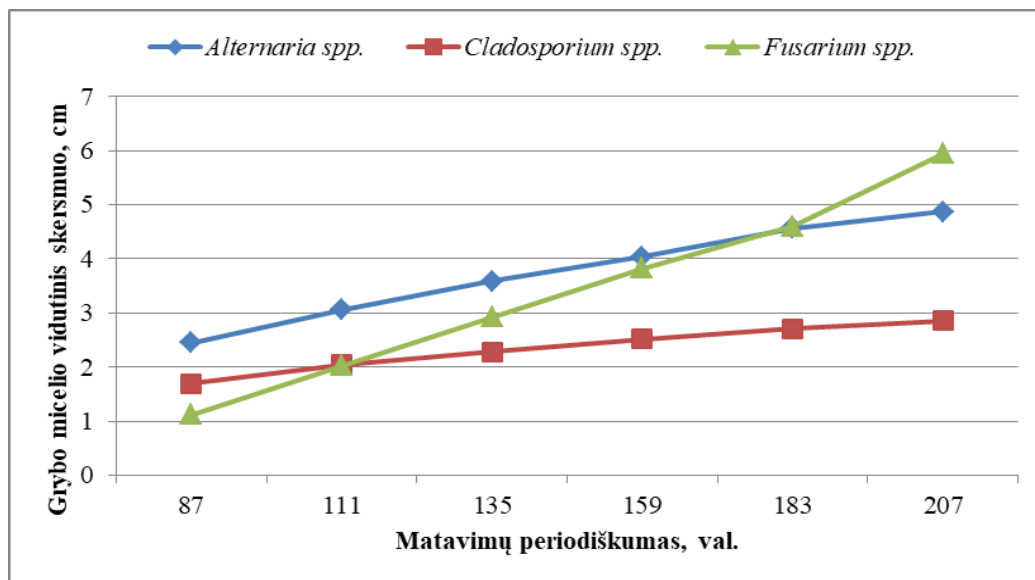
Kiečio žiedadulkių ekstrakto koncentracijos santykis 1:40	N	87	111	135	159	183	207
		vidurkis±standartinis nuokrypis (cm)					
Kontrolė (1:40)	15	2,53±0,31	3,21±0,36	3,87±0,34	4,39±0,35	4,93±0,41	5,31±0,42
<i>Alternaria</i> spp.	12	2,64±0,17	3,31±0,18	3,9±0,2	4,35±0,20	4,74±0,17	5,22±0,25
Kontrolė (1:40)	11	1,75±0,17	2,1±0,18	2,05±0,22	2,75±0,29	2,98±0,36	3,25±0,49
<i>Cladosporium</i> spp.	11	1,63±0,24	1,99±0,29	2,17±0,40	2,42±0,58	2,56±0,70	2,61±0,77*
Kontrolė (1:40)	12	1,08±0,11	1,77±0,29	2,48±0,47	3,42±0,57	4,52±0,59	6,52±0,87
<i>Fusarium</i> spp.	12	1,11±0,12	1,98±0,29	2,84±0,38	3,80±0,60	4,73±0,86	6,43±1,57

* - reikšmingi skirtumai lyginant su kontroliniu variantu, kai $p \leq 0,05$;

N – pakartojimų skaičius.

KŽE tyrimai parodė, kad jo įtaka mikroskopinių grybų augimui buvo nedidelė, reikšmingi stabdymo požymiai buvo nustatyti *Cladosporium* spp. micelio augimui. Matavimų pradžioje ant kontrolinio varianto ir KŽE praturtintos mitybinės terpės *Cladosporium* spp. augo labai panašiai, netgi kai kuriais atvejais išryškėjo tendencija, kad KŽE skatina šio patogenų augimą, tačiau matavimo pabaigoje įvyko reikšmingas stabdymo šuolis ir *Cladosporium* spp. micelio išsiplėtimo zona jau buvo reikšmingai mažesnė 20 % lyginant su kontroliniu variantu. Panaši tendencija išryškėjo išanalizavus *Alternaria* ir *Fusarium* micelių augimą – KŽE turėjo neigiamos įtakos praėjus nuo inkubavimo pradžios 159 val., tačiau skirtumai buvo nereikšmingi. El-Mergawi et al. (2018) tyrimai rodo, kad kiečio ekstraktas turi įtakos *Fusarium* micelio augimui, tačiau

stabdymo intensyvumas priklauso nuo ekstrakto koncentracijos – didėjant koncentracijai, stabdymo intensyvumas didėja 17,3–23,5 % intervale.

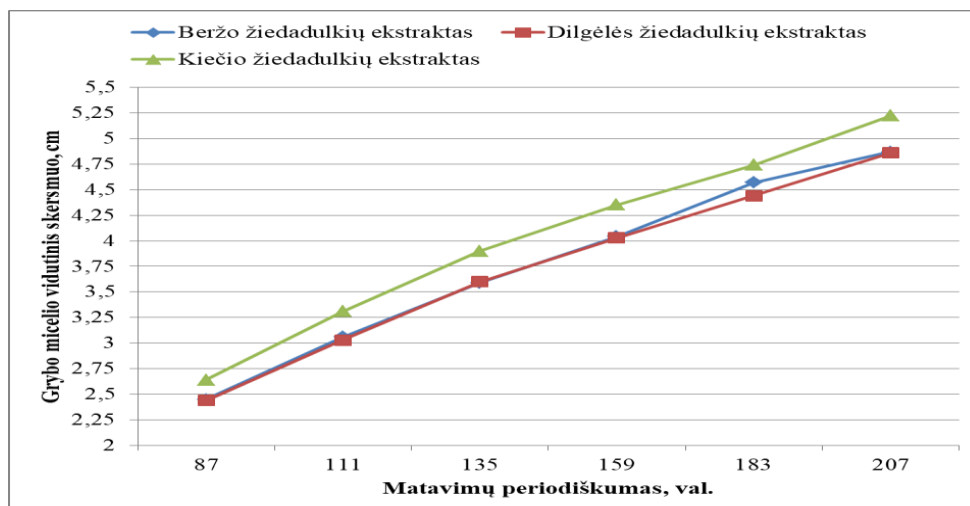


17 pav. Kiečio žiedadulkių ekstrakto poveikis *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.* ir *Fusarium spp.* grybų augimui

Alternaria, *Cladosporium* ir *Fusarium* grybų augimo ant mitybinės terpės praturtintos KŽE dinamikos analizė parodė, kad antigrybinio tyrimo pabaigoje *Fusarium spp.* skersmuo buvo $6,43 \pm 1,57$ cm., o *Alternaria spp.* ir *Cladosporium spp.* 18 % ir 59 % atitinkamai mažiau (17 pav.). Tai rodo, kad augimo dinamika išliko panaši kaip ir analizuojant kitų ekstraktų poveikį šių mikroskopinių grybų augimui.

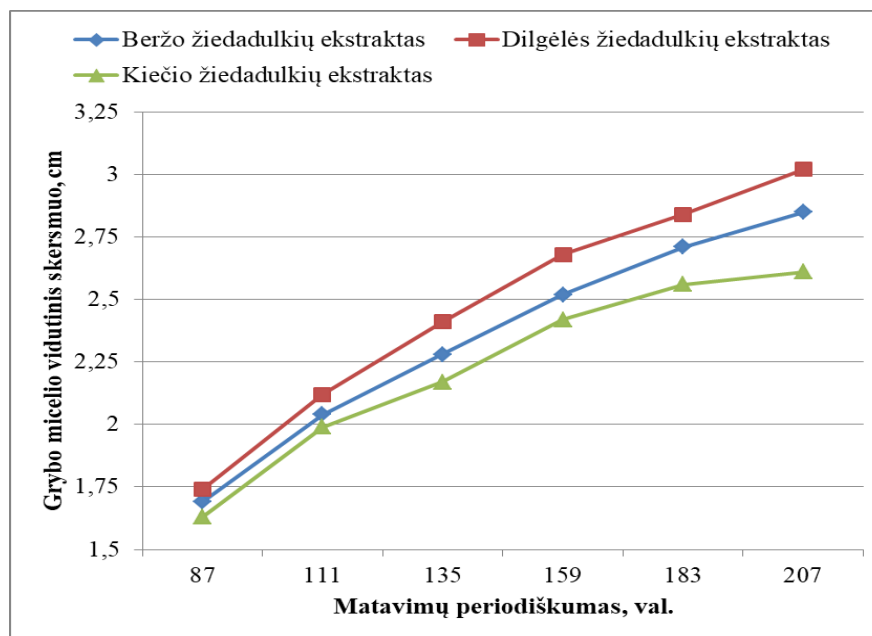
3.4. Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo mikroskopinių grybų augimui palyginimas

Tyrimas parodė, kad BŽE ir DŽE antigrybinis poveikis *Alternaria spp.* augimui buvo panašus visu tyrimo laikotarpiu. Išsiskyrė tik 183 val. matavimo periodas – DŽE micelio augimą stabdė 3 % labiau lyginant su BŽE. Tačiau abu šie ekstraktai statistiškai patikimiau stabdė *Alternaria* grybo augimą lyginant su KŽE: jų antigrybinis aktyvumas buvo efektyvesnis nuo 7 % (po 87) iki 8 % (po 135 val.).

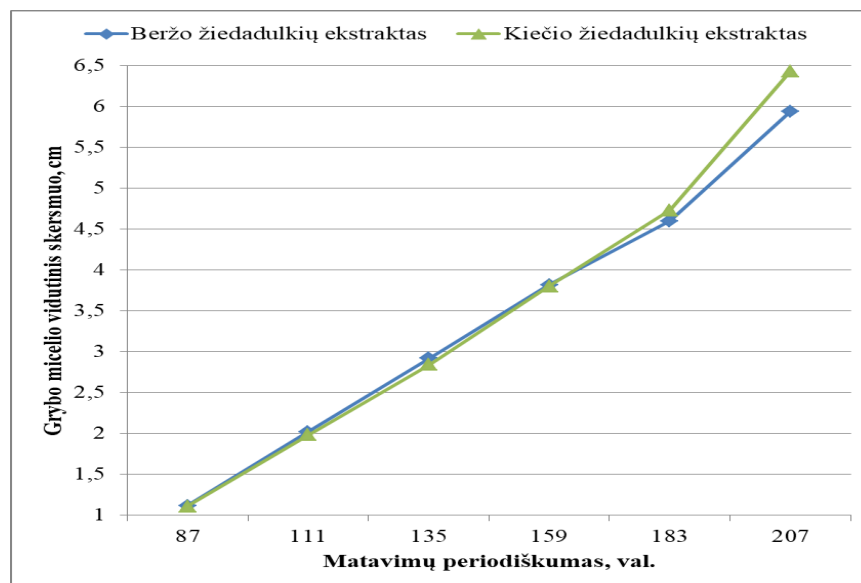


18 pav. Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo palyginimas *Alternaria* spp. augimui

Ekstraktų lyginamoji analizė *Cladosporium* grybo augimui parodė, kad geresnis antigrybinis poveikis buvo KŽE, tačiau reikšmingų ($p \leq 0,05$) skirtumų nenustatyta nei vienu matavimo periodu. DŽE įtaka *Cladosporium* spp. micelio augimui buvo didesnė lyginant su BŽE 7,5 %. Tačiau taip pat patikimų skirtumų nenustatyta.



19 pav. Žiedadulkių ekstraktų įtakos palyginimas tarpusavyje *Cladosporium* spp. grybo augimui



20 pav. Žiedadulkių ekstraktų įtakos palyginimas tarpusavyje *Fusarium* spp. grybo augimui

Fusarium spp. augimo slopinimui buvo atlikti keli tyrimai, jų metu naudotos skirtingos kontrolės, todėl 19 pav. pateikiama informacija tik apie ekstraktus, kurių antigrybinėms savybėms išsiaiškinti buvo naudotas tas pats kontrolinis variantas. Tyrimo rezultatai parodė, kad *Fusarium* spp. ant terpės apdorotos KŽE ir BŽE augo vienodai praėjus nuo inkubavimo pradžios 183 val. Toliau stabdymo efektyvumas buvo didesnis KŽE, bet skirtumai buvo nereikšmingi.

Apibendrinant gautus rezultatus nustatyta, kad analizuotų anemofilinių žiedadulkių ir patogeninių mikroskopinių grybų sporų sklaidos sezonas tiriamuoju laikotarpiu sutapo, todėl tikėtinas ir analizuotų žiedadulkių su mikroskopiniais grybais kontaktas.

Išryškėjo tendencija, kad ekstraktų antigrybinis efektyvumas nepriklausė nuo naudojamo ekstrakto tipo ir fenolinių junginių koncentracijos, o labiau buvo susijęs su veikiamo grybo gentimi.

3.5. Rekomendacijos

Remiantis šio tyrimo rezultatais *Alternaria* spp. plitimui mažinti, rekomenduojama naudoti beržo ir dilgėlės žiedadulkių ekstraktus. Abu skirtingų koncentracijų beržo žiedadulkių ekstraktai reikšmingai stabdė *Alternaria* spp. augimą, tačiau tyrimuose su *Alternaria* spp. tikslingiau naudoti didesnės koncentracijos ekstraktą, nes BŽE20 antigrybinis aktyvumas reikšmingai didesnis buvo lyginant su BŽE40.

Cladosporium spp. plitimui mažinti labiau išryškėjo kiečio ir beržo žiedadulkių ekstraktų antigrybinis poveikis. Nors ankstyvoje micelio vystymosi stadijoje reikšmingu

antigrybinio aktyvumo požymių nenustatyta, tačiau ekstraktas slopino subrendus *Cladosporium* spp. konidijoms (matavimo periodo pabaigoje).

Fusarium spp. augimui mažinti tikslinga naudoti beržo žiedadulkių ekstraktą skiestą 1:40 (BŽE40). Geriausias ekstrakto poveikis buvo ankstyvojoje patogeno micelio vystymosi stadijoje.

Siekiant padidinti analizuotų ekstraktų antigrybinį aktyvumą *Alternaria*, *Cladosporium* ir *Fusarium* mikroskopinių grybų plitimui, tikslinga tyrimus tęsti toliau ruošiant įvairiais santykiais beržo, dilgėlės ir kiečio ekstraktų mišinius bei analizuoti jų sinergetinį potencialą.

IŠVADOS

1. Anemofilinių žiedadulkių (beržo, dilgėlės ir kiečio) ir *Alternaria* spp. bei *Cladosporium* spp sporų sklaida Šiaulių miesto ore birželio mėn. sutapo su beržo ir dilgėlės žiedadulkių sklaida. Liepos mėn. didžiausios žiedadulkių ir sporų koncentracijos buvo dilgėlės (831 žiedadulkės/m³ oro), kiečio (251 žiedadulkės/m³ oro), *Alternaria* (1922 sporos/m³ oro) ir *Cladosporium* (1313 sporų/m³ oro).
2. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas dilgėlės žiedadulkių ekstrakte 53,77±12,15 mg/g. Kiečio žiedadulkių ekstrakte fenolinių junginių buvo 40 % mažiau nei dilgėlės. Jo poveikis mikroskopinių grybų augimui buvo silpniausias lyginant su beržo ir dilgėlės žiedadulkių ekstraktais.
3. Didesnė bioaktyvių junginių koncentracija beržo žiedadulkių ekstrakte, paruoštame santykiu 1:20 neturėjo statistiškai reikšmingos ($p \leq 0,05$) įtakos antigrybiniame tyrime, lyginant su ekstraktu, skiestu santykiu 1:40, išskyrus tyrime su *Alternaria* spp.
4. Beržo ir dilgėlės žiedadulkių ekstraktai statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$) stabdė *Alternaria* spp. micelio augimą visu grybo vystymosi periodu. *Cladosporium* ir *Fusarium* genties grybų augimui žiedadulkių ekstraktai turėjo mažai įtakos, statistiškai reikšmingai micelio augimas buvo pristabdytas matavimų pabaigoje – suformavus brandžias kolonijas.
5. Ekstraktų antigrybinis aktyvumas nepriklausė nuo žiedadulkių ekstrakto tipo ir fenolinių junginių koncentracijos, o labiau buvo susijęs su veikiamo grybo gentimi.

Dovilė Dovydaitytė
Anemofilinių augalų žiedadulkių ekstraktų antigrybinės savybės

SANTRAUKA

Pasaulinė alergijos organizacija atkreipia dėmesį, kad dėl klimato kaitos keičiasi augalų fenologija, dėl to aplinkoje padaugėja alergines ligas sukeliančių anemofilinių žiedadulkių, o padidėjęs oro drėgnis skatina mikroskopinių grybų dauginimąsi, kurie ne tik sukelia alergines reakcijas bet ir teršia maisto produktus. Didelę bioaktyvių junginių grupę sudaro fenoliniai junginiai. Tikėtina, kad veikdami kartu su kitais bioaktyviais junginiais, galėtų paveikti mikroskopinio grybo ląstelės sienelę ir sutrikdyti svarbius fiziologinius procesus.

Tyrimo tikslas – nustatyti anemofilinių augalų žiedadulkėse fenolinių junginių kiekį ir įvertinti žiedadulkių ekstraktų poveikį mikroskopinių grybų augimui. Šiam tikslui pasiekti, iškelti tokie uždaviniai: įvertinti alergines reakcijas sukeliančių mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp.) ir žiedadulkių (beržo, dilgėlės, kiečio) pasiskirstymą Šiaulių miesto ore; iširti bendrą fenolinių junginių kiekį anemofilinių augalų (beržo, dilgėlės ir kiečio) pernešamose žiedadulkėse; nustatyti žiedadulkių ekstraktų antigrybinį poveikį mikroskopinių grybų (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp.) augimui. Tyrimas atliktas 2018–2019 m. Šiaulių universiteto chemijos ir biotechnologijų laboratorijose.

Bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti taikytas spektrofotometrinis metodas naudojant Folin–ciocalteu reagentą. Žiedadulkių ekstraktų antigrybinio aktyvumo tyrimai atlikti taikant bulvių dekstrozės agarą metodą. Rezultatų vidutinių verčių reikšmingi skirtumai įvertinti taikant vieno veiksnio dispersinės analizės programą ANOVA. Žiedadulkių antigrybinio poveikio matavimų rezultatai lyginti su kontroliniu variantu bei tarpusavyje ir įvertinti pagal Fišerio kriterijų. Skirtumai statistiškai patikimi, kai patikimumo lygmuo ne mažiau arba lygus 95 % tikimybei (* $P \leq 0,05$).

Nustatyta, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo dilgėlės žiedadulkių ekstrakto – $53,77 \pm 12,15$ mg/g, o mažiausiai kiečio žiedadulkių ekstrakto $32,15 \pm 0,82$ mg/g. Tačiau fenolinių junginių koncentracija ekstraktuose šiame tyrime neturėjo reikšmingos įtakos. Beržo ir dilgėlės žiedadulkių ekstraktai statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$) stabdė *Alternaria* spp. micelio augimą visu grybo vystymosi periodu. *Cladosporium* ir *Fusarium* genties grybų augimui žiedadulkių ekstraktai turėjo mažai įtakos, statistiškai reikšmingai micelio augimas buvo pristabdytas matavimų pabaigoje.

Dovilė Dovydaitytė
Antifungal Activity of *Anemophilous* Plants Pollen Extracts

SUMMARY

World Allergy Organization notes that due to climate change, the phenology of plants is changing, thus the amount of anemophilous pollen causing allergic diseases is increasing in the environment, while the increased humidity promotes the growth of microscopic fungi that not only cause allergic reactions but also contaminate food. Phenolic compounds make a large group of bioactive compounds. It is likely that by interacting with other bioactive compounds they could affect the cell wall of a microscopic fungus and disrupt important physiological processes.

The aim of the research was to determine the amount of phenolic compounds in the pollen of anemophilous plants and to assess the effect of pollen extracts on the growth of microscopic fungi. In order to achieve the aim, the following objectives have been set: to evaluate the distribution of microscopic fungi (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp.) and pollen (birch, nettle, and wormwood) causing allergic reactions in the air of Šiauliai city; to examine the total amount of phenolic compounds in the pollen transported by anemophilous plants (birch, nettle, and wormwood); to determine the antifungal effect of pollen extracts on the growth of microscopic fungi (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ir *Fusarium* spp.). The research was conducted in 2018–2019 at the chemistry and biotechnology laboratories of Šiauliai University.

Spectrophotometric method using Folin–Ciocalteu reagent was applied to determine the total amount of phenolic compounds. The antifungal activity of pollen extracts was tested using the potato dextrose agar method. Significant differences in the mean values of the results were evaluated using the one-way dispersion analysis programme ANOVA. The results of measuring the antifungal effect of the pollen were compared with the control variant and were evaluated using Fisher criterion. The differences are statistically reliable with reliability level of at least 95% confidence ($*P \leq 0,05$). The highest amount of phenolic compounds was found in the nettle pollen extract – $53,77 \pm 12,15$ mg/g, while the lowest amount was found in wormwood pollen extract – $32,15 \pm 0,82$ mg/g. However, in the present research, the concentration of phenolic compounds in the extracts had no significant effect. Inhibition of the growth of *Alternaria* spp. mycelium, as it was inhibited by birch pollen extract and nettle pollen extract of both concentrations, was the most statistically significant. Pollen extracts had little effect on the fungi of genera *Cladosporium* and *Fusarium* and statistically significant inhibitions of mycelium growth were limited to certain measurement periods.

LITERATŪRA

1. Ackerman J. D., 1999. Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. Physical Ecology Laboratory, University of Northern British Columbia, Prince George, BC, Canada.
2. Allergo medica, 2018. Pelėsinis grybas sausgrybis (*Alternaria alternata*). [žiūrėta 2019 balandžio 28 d.]. <https://allergomedica.lt/allergijos-tyrimai/pavieniu-alergenu-tyrimai/pelesinis-grybas-sausgrybis-alternaria-alternata/>.
3. Ansari A. M., Anurag A., Fatina Z., Hameed S., 2013. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.
4. Apak R., Güçlü K., Demirata M., Özyürek M., Çelik ES., Bektaşoğlu B., Berker IK., Özyurt D., 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 2007; 12: 1496-1547.
5. Astma-og Allergiforbundet, 2017. Kas yra žiedadulkės (pollen). [žiūrėta 2019 kovo 3 d.]. <https://www.naaf.no/lt-LT/fokusomrader/allergi-og-overfolsomhet/kas-yra-iedadulks-pollen/>.
6. Augspole I., Duma M., Ozola B., Cinkmanis I., 2017. Phenolic profile of fresh and frozen nettle, goutweed, dandelion and chickweed leaves.
7. Aqil F., Zahin M., Ahmad I., Owais M., Ahmad Khan M. S., Bansal S., Farooq S., 2010. Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytochemicals: A Review. DOI 10.1007/978-3-642-12173-9_19.
8. Balasundram N., Sandram K., Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. Volume 99, Issue 1, 2006, Pages 191-203.
9. Baltuškevičius A., 2019. Žiedadulkės. [žiūrėta 2019 gegužės 17 d.]. http://bitininkas.lt/lt/?page_id=540&fbclid=IwAR0U66AEe6U8d6tvLDbHSIA60XSCcYovOg2Ug6mxbXMTJdtG4E6htHMUboE.
10. Blainski A., Lopes G.C., Palazzo de Mello J.C., 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 2013, 18, 6852-6865; doi:10.3390/molecules18066852.
11. Burdejova L., Polovka M., 2017. Effect of extraction solvents on phenolic compounds concentration, antioxidant activity and colour parameters of selected medical plants. November 8–9, 2017, Brno, Czech Republic.

12. Carvalho I. S., Cavaco T., Brodelius M., 2010. Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species. *Industrial Crops and Products* 33 (2011) 382-388.
13. Dabkevičius Z., Vasiliauskas A., Žiogas A., 2006. Miško fitopatologija. Kaunas: „Lututė“.
14. D'Amato G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T., Cauwenberge P., 2007. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 2007 DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.
15. El-Mergawi R., Ibrahim G., Al-Humaid A., 2018. Screening for antifungal potential of plant extracts of fifteen plant species against four pathogenic fungi species. *Gesunde Pflanzen* (2018) 70:217–224.
16. Fattahi S., Zabih E., Abedian Z., Pourbagher R., Motevalizadeh Ardekani A., Mostafazadeh A., Akhavan-Niaki H., 2014. Total Phenolic and Flavonoid Contents of Aqueous Extract of Stinging Nettle and In Vitro Antiproliferative Effect on Hela and BT–474 Cell Lines. *IJMCM Spring* 2014, Vol 3, No 2.
17. Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO). 2008. *Climate Change: Implications For Food Safety*, 49 p.
18. Gabinaitytė J., Šaulienė I., 2008. Anemofilinių augalų žydėjimo ir žieddulkių sklaidos ore periodų palyginimas. Šiaulių universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.
19. Galinis V., 1984. Aukštesniųjų augalų sistematika. Vilnius: leidykla „Mokslas“.
20. Grata K., Nabrdalik M., 2015. Assessment of the antifungal properties of nettle extracts against *Fusarium proliferatum*. DOI: 10.2429/proc.2015.9(2)053.
21. Hadizadeh I., Peivastegan B., Kolahi M., 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), Colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), Oleander (*Nerium oleander* L.) and Konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12 (1): 58-63, 2009.
22. Healthline, 2019. What Is *Cladosporium* and Is It Dangerous to Your Health?. [žiūrėta 2019 balandžio 28 d.]. <https://www.healthline.com/health/cladosporium>.
23. Jones G., Jones S., 2001. The uses of pollen and its implication for entomology. *Neotropical Entomology* 30(3): 341-350 (2001).
24. Kabailienė M., 1979. Taikomosios palinologijos pagrindai. Vilnius: „Mokslas“.
25. Kacániová M., Vuković N., Chlebo R., Haščík P., Rovná K., Cubon J., Džugan M., Pasternakiewicz A., 2012. The Antimicrobial Activity of Honey, Bee Pollen Loads and Beeswax From Slovakia, *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64 (3): 927-934.

26. Karlovsky P., Suman M. Berthiller F. De Meester J., Eisenbrand G. Perrin I. Oswald I. P., Speijers G., Chiodini A., Recker T., Dussort P. 2016. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination, *Mycotoxin Res*, 32:179–205.
27. Kerienė I., 2017. *Mikotoksinai ir jų ryšys su fenoliniais junginiais grikių grūduose*. Daktaro disertacija. Akademija: Aleksandro Stulginskio universitetas.
28. Kocić-Tanackov S. D., Dimić G. R., 2013. Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*.
29. Kolosej R., 2017. *Investigation of spring rape growth regulating properties of n-substituted β and γ -amino acids bearing aromatic and azoles moieties*. Daktaro disertacija. Kaunas: Kauno technologijos universitetas.
30. Lattanzio V., Cardinali A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, p. 23–67.
31. Levinskaitė, Paškevičius, 2009. Mikroskopiniai grybai, paplitę Vilniaus miesto gyvenamosiose ir darbo patalpose. *Laboratorinė medicina*. 2009, t. 11, Nr. 3(43), p. 124–128.
32. Lietuvos hidrometeorologijos tarnyba, 2019. Informacija apie ore sklindančias žiedadulkes. [žiūrėta 2019 gegužės 7 d.]. <http://www.meteo.lt/lt/ivairenybes/ziedadulkes>.
33. Los A., Ziuzina D., Bourke P., 2018. Current and future technologies for microbiological decontamination of cereal grains. *Journal of food science*, 83(6), 1484-1493.
34. Mačionienė I., Šalomskienė J., Jakubauskienė L., 2004. Plovimo ir dezinfekavimo medžiagų poveikis mikroskopinių grybų augimui. ISSN 1392-0227. *Maisto chemija ir technologija*. 2004. T. 38, Nr. 2.
35. Mankevičienė A., Dabkevičius Z., Mačkinaitė R., Cesevičienė J., 2006. Žieminių kviečių grūdų užterštumo mikromicetais ir mikotoksinais priklausomumas nuo tręšimo lygio. *Žemdirbystė. Mokslo darbai*, t. 93, Nr. 3 (2006), p. 131-140.
36. Mankevičienė A., 2012. *Fusarium rizika augalininkystėje*. [žiūrėta 2019 balandžio 29 d.]. <http://www.manoukis.lt/mano-ukis-zurnalas/2012/08/fusarium-rizika-augalininkysteje/>.
37. Mickienė R., Šiugždaitė J., Bakutis B., 2007. Eterinių aliejų poveikis mikromicetams, išskirtiems iš paukštynų oro. *Veterinarija ir zootechnika*. T. 40 (62).
38. Miknienė I., Milašienė R., Ratautaitė V., Ragažinskienė O., Prosevičius J., Kornyšova O., Maruška A., 2008. Vaistinių augalų cheminės sudėties tyrimas.
39. Motiejūnaitė O., 2011. Grybavimo patalpose ypatumai. [žiūrėta 2019 gegužės 26 d.]. <http://m.technologijos.lt/text/cat/1/article/S-18569>.

40. Nadiya Jan K., Zarafshan K., Singh S., 2017. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Food Measure* (2017) 11:423–433.
41. Onaran A., Sağlam H. D., 2016. Antifungal Activity of Some Plant Extracts against Different Plant Pathogenic Fungi. *Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg. (IJAAEE)* Vol. 3, Issue 2 (2016) ISSN 2349-1523 EISSN 2349-1531.
42. Ossipov V., Nurmi K., Loponen J., Haukioja E., Pihlaja K., 1995. High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *Journal of Chromatography A*, 721 (1996) 59-68.
43. Paterson R. M., Lima N., 2010. Toxicology of mycotoxins. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Volume 2: Clinical Toxicology.*
44. Pasyfo, 2019. Beržas (betula). [žiūrėta 2019 gegužės 3 d.]. <http://pasyfo.lt/ziedadulkiu-prognoze/alergenai/berzas/>.
45. Pasyfo, 2019. Kietis (*Artemisia*). [žiūrėta 2019 balandžio 28 d.]. <http://pasyfo.lt/ziedadulkiu-prognoze/alergenai/kietis/>.
46. Puc M., 2003. Characterisation of pollen allergens. *Ann Agric Environ Med* 2003, 10, 143–149.
47. Recio M., Trigo M., Docampo S., Melgar M., García-Sánchez J., Bootello L., Cabeduzo B., 2011. Analysis of the predicting variables for daily and weekly fluctuations of two airborne fungal spores: *Alternaria* and *Cladosporium*. *Int J Biometeorol* DOI 10.1007/s00484-011-0509-3.
48. Rulinskas L., 2019. Vertingas ir natūralus gamtos produktas – žiedadulkės. [žiūrėta 2019 gegužės 17 d.]. http://www.snaujienos.lt/sveikatos-kodas/35096-vertingas-ir-naturalus-gamtos-produktas-ziedadulkes.html?fbclid=IwAR0jBqpzoDK1io8GcbsUB_v6-NX6-iW4t2vJbmC9XJI0y_eaMUEnNH2yqJs.
49. Seddik K., Nadjat I., Abderrahmane B., Daoud H., Lekhmici A., 2010. Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. leaves and some phenolic compounds. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(13), pp. 1273-280.
50. Songailaitė V., Veriankaitė L., 2012. Meteorologinių parametų įtaka beržų, lazdynų ir kiečių žiedadulkių sklaidai 2004–2011 metais šiaulių mieste. Šiaulių universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.
51. Staikūnienė J., Japertienė L. M., Sakalauskas R., 2005. Žiedadulkių ir maisto alergenais įsijautrinimo įtaka polinozės klinikiniams požymiams. Kaunas: Medicina.

52. Stalikas C. D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.
53. Stumbrienė K., 2018. *Grybo Fusarium graminearum išplitimas, chemotipų struktūra, patogeniškumas ir kontrolė Lietuvoje auginamuose kviečiuose*. Daktaro disertacija. Akademija: Aleksandro Stulginskio universitetas.
54. Sultana B., Anwar F., Ashraf M., 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 2009; 14: 2167-2180.
55. Šaulienė I., Kainov D., Šukienė L., Greičiuvienė J., 2015. Alerginis rinitas: Kaip išvengti?. Vilnius: UAB „BMK Leidykla“.
56. Šiaulių universitetas, 2017. [žiūrėta 2019 gegužės 3 d.]. <http://ekomokslas.lt/ziedadulkes/augalai/>.
57. Šinušaitė A., Veriankaitė L., 2012. Meteorologinių parametrų įtaka alksnių, beržų ir dilgėlių žiedadulkių koncentracijai 2005–2011 metais vilniaus mieste. Šiaulių universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.
58. Tormo-Molina R., Muñoz Rodriguez A., Silva Palacios I., Gallardo López F., 1996. Pollen production in anemophilous tree. *Grana*: 35: 38-46, 1996.
59. Valstybinė miškų tarnyba, 2015. Fuzariozė. [žiūrėta 2019 gegužės 26 d.]. <http://www.amvmt.lt/index.php/misko-sanitarine-apsauga/kenkeju-paieska/6-medelynu-zeldiniu-ligos/57-fuzarioze>.
60. Weigl F., Ghirardo A., Schnitzler J. P., Pritsch K., 2016. Sesquiterpene emissions from *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*: effects of age, nutrient availability, and co-cultivation. *Scientific reports*, 6, 22152.
61. World Allergy Organization. World Allergy Week 2016. [žiūrėta 2019 gegužės 27 d.]. <http://www.worldallergy.org/resources/world-allergy/world-allergy-week-2016>.

PATVIRTINIMAS APIE ATLIKTO DARBO SAVARANKIŠKUMĄ

Patvirtinu, kad įteikiamas magistro baigiamasis darbas „Anemofilinių augalų žiedadulkių ekstraktų antigrybinės savybės“

1. Yra atliktas mano paties/pačios;
2. Nebuvo naudotas kitoje mokslo ir studijų institucijoje;
3. Nenaudojau šaltinių, kurie nėra nurodyti darbe, ir pateikiu visą panaudotos literatūros sąrašą.

Dovilė Dovydaitytė

.....
(data)

.....
(autorius vardas ir pavardė, parašas)

PATVIRTINIMAS APIE ATSAKOMYBĘ UŽ LIETUVIŲ KALBOS TAISYKLINGUMĄ ATLIKTAME DARBE

Patvirtinu lietuvių kalbos taisyklingumą atliktame darbe.

Dovilė Dovydaitytė

.....
(data)

.....
(autorius vardas ir pavardė, parašas)